การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และสมรรถนะของประชากรปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) จากโรงเพาะฟัก

Genetic Diversity and Performance in Hatchery Stocks of Günther's Walking Catfish, *Clarias macrocephalus*

วิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์[1]* สมบูรณ์ สุนทรโชติ[1] คงภพ อำพลศักดิ์[1] พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล[2]
ธชาทัช ธีรติเดชากุล[3] ประจักษ์ บัวเนียม[1] และ ชัยติศักดิ์ บริบูรณ์[4]

Visarut Chailertrit[1]* Somboon Suntornchot[1] Kongphob Umpolsak[1] Puttharat Baoprasertkul[2]
Thachathass Theeratidechakul[3] Prachak Buaneam[1] and Chaitisak Borriboon[4]

[1] ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำปทุมธานี กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

[1] Pathumthani Aquatic Animal Genetics Research and Development Center,
Aquatic Animal Genetics Research and Development Division, Department of Fisheries.

[2] กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ

[2] Aquatic Animal Health Research and Development Division, Department of Fisheries.

[3] สำนักงานประมงจังหวัดนครสวรรค์

[3] Nakhonsawan Fisheries Provincial Office, Department of Fisheries.

[4] กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

[4] Aquatic Animal Genetics Research and Development Division, Department of Fisheries.

*Corresponding author: ku_bcv@hotmail.com

บทคัดย่อ

ทดสอบเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรม การเจริญเติบโต และความต้านทานโรคในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) จาก 2 แหล่งคือ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร และฟาร์มปลาสุภาภรณ์ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 5 ตำแหน่ง พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาดุกอุยจาก 2 แหล่งไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แต่เมื่อพิจารณาค่า F_{st} พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.013 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง สำหรับข้อมูลด้านการเจริญเติบโต (น้ำหนัก ความยาว อัตรารอด) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (P>0.05) แต่เมื่อพิจารณาค่า condition factor (K) พบว่าปลาดุกจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร มีค่าต่ำกว่าปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ แสดงให้เห็นว่าปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร มีลักษณะลำตัวที่เป็นทรงเพรียวยาวกว่าปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ สำหรับการทดสอบความต้านทานโรคจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยวิธีการแช่พบค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 2.08×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และพบว่าปลาดุกอุยจากทั้ง 2 แหล่งมีความต้านทานไม่แตกต่างกัน (P>0.05) จากการศึกษาครั้งนี้บ่งบอกได้ถึงความผันแปรของความแตกต่างทางพันธุกรรม และลักษณะทางกายภาพของลำตัวของปลาดุกอุยจากทั้ง 2 แหล่งได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงควรนำปลาจากทั้ง 2 แหล่งมาเพื่อสร้างเป็นประชากรพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ: ไมโครแซทเทลไลท์ การเจริญเติบโต อัตรารอด ความต้านทานโรค *Aeromonas hydrophila*

Abstract

Genetic diversity, growth performance and disease resistance of Günther's Walking Catfish, *Clarias macrocephalus*, from Chumphon aquatic animal genetics research and development center (P) and Supaphon farm (S) were compared. Genetic diversity indices were analyzed using five microsatellite loci that showed no significant difference between populations (P>0.05). While the F_{st} value was 0.103 suggesting moderate genetic differentiation. The overall growth traits (body weight, total length and survival rate) were not significantly different between populations (P>0.05). However, the value of condition factor (K) from population P was lower than that of population S, which indicated that the fish in population P had rather longer body shape and slender than population S. Resistance to *Aeromonas hydrophila* via experimental infection was examined using immerse technique. Mortality rate was calculated through 96-hour period and lethal dose at LC_{50} was determined to be 2.08×10^6 cell/ml. Survival rate was not significantly different between populations (P>0.05). The results of this experiment showed variation between two populations of Günther's Walking Catfish in genetic differentiation and body shape. Therefore, both studied populations should be mixed to create the base population for further genetic improvement in Günther's Walking Catfish.

Keywords: Microsatellite, Growth, Survival rate, Disease resistance, *Aeromonas hydrophila*

คำนำ

ปลาดุกอุย (Günther's Walking Catfish) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clarias macrocephalus* เป็นปลาน้ำจืดที่พบได้ทั่วประเทศไทย ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถพบปลาดุกอุยได้ตามลำคลอง หนอง บึง คูน้ำในสวน หรือแม้กระทั่งบริเวณที่มีน้ำกร่อยเล็กน้อย ปลาดุกอุยเป็นปลาหนังที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจซึ่งมีรสชาติที่ดี ในปี พ.ศ. 2559 ปลาในกลุ่มปลาดุกมีปริมาณการจับรวมเพาะเลี้ยงและมูลค่ารวมเป็นอันดับที่ 2 ของปลาน้ำจืดทั้งหมด ซึ่งคิดเป็นปริมาณ 111,100 ตัน และรวมมูลค่า 5,416.9 ล้านบาท (Department of Fisheries, 2018)

ปัจจุบันเกษตรกรนิยมเลี้ยงปลาดุกอุยเทศ ซึ่งเป็นปลาดุกที่ได้จากการผสมพ่อปลาดุกเทศ (*C. gariepinus*) กับแม่ปลาดุกอุยเข้าด้วยกัน ปลาดุกอุยเทศเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ทนทานต่อโรค และมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับปลาดุกอุย ทำให้เกษตรกรไม่นิยมเลี้ยงปลาดุกอุยที่โตช้า และไม่ทนทานต่อโรคเท่าปลาดุกอุยเทศ ด้วยเหตุนี้ทำให้ปลาดุกอุยมีปริมาณการเพาะเลี้ยงที่ลดลง ส่งผลให้ลูกพันธุ์ขาดแคลน แม่พันธุ์ปลาดุกอุยมีราคาที่สูงมาก ปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ทั้งเกษตรกรและหน่วยงานของกรมประมงที่มีหน้าที่เพาะพันธุ์ประสบอยู่ และสายพันธุ์ปลาดุกอุยทั้งของเกษตรกรและหน่วยงานภาครัฐที่มีอยู่นั้นมีการเจริญเติบโตและความสมบูรณ์ที่ลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสื่อมโทรมพันธุ์ นอกจากนี้ จากการศึกษาหาสาเหตุและการป้องกันโรคในปลาดุกอุย พบว่าการเกิดโรคในปลาดุกอุยส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ

Aeromonas hydrophila ซึ่งจะทำให้เกิดอาการท้องบวม และกกหูบวม มีการเสื่อมของเซลล์ตับ มีการตายของเซลล์ไต ม้ามมีขนาดใหญ่ จนทำให้ปลาตายในที่สุด (Primpol, 1990)

จากปัญหาที่กล่าวข้างต้นคณะผู้วิจัยจึงได้ดำเนินโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ปลาดุกอุยที่เติบโตดีและทนทานต่อโรค เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรกลับมาเพาะเลี้ยงปลาดุกอุย ที่เป็นปลาพื้นบ้านของไทย และส่งต่อสู่หน่วยงานของกรมประมง เพื่อผลิตแจกจ่าย และจำหน่ายแก่เกษตรกร อย่างไรก็ตามก่อนที่จะเริ่มปรับปรุงพันธุ์นั้น จำเป็นที่จะต้องมีประชากรเริ่มต้นที่มีฐานพันธุกรรมกว้าง และหากมีประชากรเริ่มต้นมากกว่า 1 ประชากร ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบสมรรถนะของปลาในแต่ละประชากร เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับนำไปใช้บริหารจัดการสร้างประชากรเริ่มต้นให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์

งานวิจัยนี้จะเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมและสมรรถนะการเจริญเติบโต อัตรารอด และความต้านทานโรคใน ปลาดุกอุย 2 แหล่ง คือ แหล่งพันธุ์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร และแหล่งพันธุ์จากฟาร์มของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดสิงห์บุรี (ฟาร์มปลา สุภาภรณ์) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้บริหารจัดการสร้างประชากรเริ่มต้นในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วิธีดำเนินการ

การเพาะพันธุ์ปลาดุกอุย

เตรียมปลาพ่อแม่พันธุ์โดยนำปลาดุกอุยจาก 2 แหล่งคือ แหล่งพันธุ์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์โดย Komanpririn *et al*. (2004) และแหล่งพันธุ์จากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ ซึ่งเป็นพันธุ์จากฟาร์มเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดสิงห์บุรี ที่มีการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยเพื่อผลิตปลาดุกอุยเทศ และจำหน่ายพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยให้แก่เกษตรกรที่สนใจ นำมาเพาะพันธุ์โดยวิธีการผสมเทียมในอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:1 จำนวน 15 ครอบครัวต่อแหล่ง นำไข่ที่ได้ไปแยกฟักในบ่อซีเมนต์ขนาด 6 ตารางเมตร ครอบครัวละ 1 บ่อ โดย 2 สัปดาห์แรกให้กินไรแดง และหลังจากนั้นให้อาหารผงสำเร็จรูปสำหรับลูกปลาร่วมกับไรแดง เมื่อลูกปลาดุกอุยอายุครบ 1 เดือน ให้สุ่มลูกปลาดุกอุยในแต่ละครอบครัวจำนวน 500 ตัว นำไปรวมกับลูกปลาดุกอุยในครอบครัวอื่น ๆ อีก 14 ครอบครัว โดยรวมเฉพาะลูกปลาที่มาจากแหล่งเดียวกัน เลี้ยงต่อไปจนอายุครบ 2 เดือน จึงเริ่มนำไปใช้ทดสอบเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของปลาดุกอุย และทดสอบเปรียบเทียบการต้านทานโรค *Aeromonas hydrophila*

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาดุกอุย

สุ่มเก็บครีบหางปลาดุกอุยในรุ่นพ่อแม่จาก 2 แหล่ง แหล่งละ 50 ตัว สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี salt extraction (Aljanabi and Martinez, 1997) ทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนามาจาก Sukmanomon *et al*. (2003) จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ Cma-6, Cma-8, Cma-19, Cma-21 และ Cma-22 (Table 1) นำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 10 µl โดยมีดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ng, ไพรเมอร์อย่างละ 0.5 µM, 1x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs (Biotechrabbit, Hennigsdorf, Germany), 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 denaturation 95 °C 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 denaturation 95 °C 30 วินาที annealing ที่ T_a °C (Table 1) 30 วินาที extension 72 °C 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ และ

ขั้นตอนที่ 3 extension 72 °C 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ไปแยกขนาดด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมสีด้วยวิธี silver stain (Benbouza *et al*., 2006) นำข้อมูลมาคำนวณค่า Apparent alleles (A_a), Effective number of alleles (A_e), Observed heterozygosities (H_o), Expected heterozygosities (H_e) และ ทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium โดยใช้โปรแกรม Popgen v.1.31 (Yeh *et al*., 1999) ทดสอบปรากฏการณ์คอขวด (Bottleneck) โดยใช้โปรแกรม BOTTLENECK version 1.2.02 (Cornuet and Luikart, 1996) วิเคราะห์ค่า effective population size (N_e) โดยใช้โปรแกรม NeEstimator V2 (Do *et al*., 2014) และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธ์-F (Fixation index) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2001)

Table 1 Five microsatellite markers used in this study

Locus	accession number	Primer sequences (5'–3')	Repeats	T_a (°C)	alleles sizes (bp)
Cma-6	AY 185607	F: GGGCACTAAGGGGTCGCTCTC R: GGGGCTTCTGGGACATCCTCT	$(GT)_5(GA)_8$	50	232–239
Cma-8	AY 185608	F: CCGTGATACAACTGTGACT R: CGGTGCACTGAAAGG	$(CA)_{26}$	55	212–286
Cma-19	AY 185613	F: ATCAGAGCCCTTTCATCACC R: CGTGCGAGTTCCCAGAG	$(GA)_8$	50	131–136
Cma-21	AY 185615	F: CTCGCTTAAAGGCAAGTTCACTC R: CGCCATATAGCCATAGAGGTGTG	$(CT)_9$	60	178–200
Cma-22	AY 185616	F: TGTGTACGAGTGTGTTTCTCAGTG R: CAGTTACACACTCACGCAAATCAG	$(GT)_{10}$	50	184–216

การเลี้ยงทดสอบเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของปลาดุกอุย

สุ่มลูกปลาดุกอุยอายุ 2 เดือน จำนวน 600 ตัวต่อแหล่ง มาเลี้ยงทดสอบในบ่อซีเมนต์ขนาด 20 ตารางเมตร บ่อละ 200 ตัว จำนวน 3 บ่อต่อแหล่ง (ความหนาแน่น 10 ตัว/ตารางเมตร) เลี้ยงทดสอบเป็นระยะเวลา 6 เดือน (อายุปลา 8 เดือน) เก็บข้อมูลความยาว น้ำหนัก และนับจำนวนปลาดุกอุยที่รอดในแต่ละบ่อ ทั้งก่อนเริ่มการทดลอง (อายุ 2 เดือน) และเมื่ออายุ 8 เดือน นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นและสุดท้าย (กรัม) ความยาวเฉลี่ยเริ่มต้นและสุดท้าย (เซนติเมตร) น้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน (Daily weight gain; DWG, กรัม/วัน) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR, %/วัน) Condition factor (K, %) และอัตรารอด (%) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี t-test

การทดสอบเปรียบเทียบการต้านทานโรค *Aeromonas hydrophila* ของปลาดุกอุย

คัดแยกเชื้อโดยนำเชื้อ *A. hydrophila* จากกองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง ที่ได้เก็บรวบรวมไว้ (รหัสเชื้อ 15021005/5k) มา cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทำการยืนยันเชื้อด้วยวิธีการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมี และใช้ชุดทดสอบ API 20 NE (bioMérieux® sa, Marcy-l'Etoile, France) เมื่อทดสอบยืนยันเชื้อแล้วให้นำเชื้อไปฉีดในปลาดุกอุยปกติที่ปราศจากเชื้อ เพื่อเป็นการกระตุ้นเชื้อให้มีความรุนแรง รอจนปลาดุกอุยป่วยใกล้ตายจึงคัดแยกเชื้อ *A. hydrophila* โดยเขี่ยเชื้อจากตับนำมา cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาขยายและทดสอบยืนยันเชื้อ โดยทำการฉีดกระตุ้นเชื้อในปลาดุกอุยจำนวน 2 รอบ นำเชื้อที่ได้เก็บไว้สำหรับนำไปใช้ทดสอบต่อไป

หาค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50}) โดยเตรียมลูกปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร อายุ 2 เดือน จำนวน 120 ตัว แบ่งการทดสอบเป็น 6 ชุดการทดสอบ ให้แบ่งเป็นชุดทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 1.49×10^7, 9.48×10^5, 6.24×10^4, 6.44×10^3 และ 6.44×10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุม โดยแช่ปลาในน้ำที่ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เจือจางเชื้อ 1 ชุด แต่ละชุดการทดสอบมี 2 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีลูกปลาดุกอุยจำนวน 10 ตัว ใช้เข็มฉีดยาสะกิดข้างลำตัวให้เป็นแผลเพื่อเปิดช่องให้เชื้อสามารถเข้าไปในตัวปลาได้ แช่ปลาในเชื้อที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายปลาไปอยู่ในน้ำปราศจากเชื้อเพื่อเก็บข้อมูล และทำ plate count เพื่อยืนยันปริมาณเชื้อที่ใช้แช่ สังเกตอาการและบันทึกข้อมูลอัตราการตายของลูกปลาดุกอุยในแต่ละชุดการทดสอบ โดยให้สังเกตตลอดเวลาเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง จึงสิ้นสุดการทดสอบ นำข้อมูลที่ได้ไปหาค่า LC_{50} ตามวิธีการของ Reed and Muench (1938) ยืนยันการตายของปลาโดยการผ่าพิสูจน์ดูสภาพภายใน เขี่ยเชื้อจากตับนำมา streak เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อดูลักษณะโคโลนี ย้อมสีแกรม ทำการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมี และใช้ชุดทดสอบ API 20 NE

ทดสอบเปรียบเทียบการต้านทานโรค โดยเตรียมลูกปลาดุกอุยอายุ 2 เดือน จำนวน 120 ตัว แบ่งการทดสอบเป็น 4 ชุดการทดสอบ คือชุดทดลองจำนวน 2 ชุดการทดสอบ แบ่งเป็นแหล่งละชุดการทดสอบ และชุดควบคุมจำนวน 2 ชุดการทดสอบ แบ่งเป็นแหล่งละชุดการทดสอบ โดยแต่ละชุดการทดสอบมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีลูกปลาดุกอุยจำนวน 10 ตัว แช่ลูกปลาดุกอุยในน้ำที่มีความเข้มข้นเชื้อที่ LC_{50} และชุดควบคุมแช่ในน้ำที่ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เจือจางเชื้อ ใช้เข็มฉีดยาสะกิดข้างลำตัวให้เป็นแผล แช่ปลาในเชื้อที่เตรียมไว้ระยะเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายปลาไปอยู่ในน้ำปราศจากเชื้อเพื่อเก็บข้อมูล ทำ plate count เพื่อยืนยันปริมาณเชื้อที่ใช้แช่ สังเกตอาการและบันทึกข้อมูลอัตราการตายของลูกปลาดุกอุยในแต่ละชุดการทดสอบ โดยให้สังเกตตลอดเวลาเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง จึงสิ้นสุดการทดสอบ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป สำหรับปลาที่ตายให้ทำการยืนยันการตายของปลาตามวิธีการข้างต้น

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาดุกอุย

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 5 ตำแหน่ง ในปลาดุกอุยจำนวน 2 แหล่ง คือ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) และฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) พบว่าค่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (A_a) ค่า Effective number of alleles (A_e) ค่า Observed heterozygosities (H_o) และค่า Expected heterozygosities (H_e) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value > 0.05) เมื่อพิจารณาค่าสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า H_o และ H_e ในแต่ละตำแหน่งด้วยวิธี Chi-square test พบว่าปลาดุกอุยจากทั้ง 2 แหล่งเบี่ยงเบนจากสมดุลอาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ($P_{HWE} < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับค่า F_{is} ที่บ่งบอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อยที่มีค่าเท่ากับ 0.248 และ 0.288 ตามลำดับ อีกทั้งเมื่อตรวจสอบปรากฏการณ์คอขวด (Bottleneck) ของทั้ง 2 แหล่ง พบว่าปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) ไม่เกิดปรากฏการณ์คอขวด ($P_{BottN} > 0.05$) แต่ปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) เกิดปรากฏการณ์คอขวดขึ้น ($P_{BottN} < 0.05$) ส่วนค่า effective population size (N_e) ของปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) เท่ากับ 82.6 มีค่าอยู่ในช่วง 27.9 – Infinity และปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) เท่ากับ 28.1 มีค่าอยู่ในช่วง 13.2 – 81.4 (Table 2)

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของประชากรปลาดุกอุย โดยศึกษาผ่านค่าสัมประสิทธ์-F (Fixation index) พบว่าค่า F_{st} ที่บ่งบอกระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร มีค่าอยู่ระหว่าง -0.003 – 0.209 และมีค่ารวมในทุกตำแหน่งเท่ากับ 0.103 ค่า F_{is} ที่บ่งบอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อย มีค่าอยู่ระหว่าง -0.147 – 0.445 และมีค่ารวมในทุกตำแหน่งเท่ากับ 0.267 ค่า F_{it} ที่บ่งบอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรทั้งหมด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.072 – 0.560 และมีค่ารวมในทุกตำแหน่งเท่ากับ 0.343 (Table 3)

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าปลาดุกอุยจากทั้ง 2 แหล่ง ความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน แต่น้อยกว่าการศึกษาของ Na-Nakorn *et al*. (1999) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกอุยจากธรรมชาติ 4 แหล่ง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 4 ตำแหน่ง (Cma-1, Cma-2, Cma-3 และ Cma-4) พบจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง หรือ apparent alleles (A_a) ตั้งแต่ 6.00 – 10.00 และ Muiocha *et al*. (2017) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกอุยจากโรงเพาะฟักและจากแหล่งน้ำธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 4 ตำแหน่ง (Cma-4, Cma-5, Cma-8 และ Cma-17) พบ apparent alleles (A_a) เท่ากับ 6.75 ± 1.50 และ 8.00 ± 5.47 ตามลำดับ แต่ด้วยการใช้เครื่องหมายต่างตำแหน่งทำให้เกิดความผิดพลาดในการเปรียบเทียบได้ เนื่องจากแต่ละตำแหน่งของเครื่องหมายจะมีความหลากหลายของอัลลีลที่ไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงอาจเทียบความหลากหลายได้จากตำแหน่งเดียวกันที่ใช้ศึกษา ซึ่งการศึกษาของ Muiocha *et al*., 2017 มีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่เหมือนกับการศึกษานี้จำนวน 1 ตำแหน่งคือ ตำแหน่ง Cma-8 พบว่าการศึกษานี้พบจำนวน 9 อัลลีลทั้ง 2 แหล่ง และการศึกษาของ Muiocha *et al*. (2017) พบจำนวน 5 อัลลีลในประชากร

โรงเพาะฟัก และ 7 อัลลีลในประชากรธรรมชาติ ดังนั้น เมื่อพิจารณาเฉพาะตำแหน่ง Cma-8 จะพบว่าความหลากหลายของประชากรปลาดุกอุยในการศึกษานี้มีความหลากหลายที่ตำแหน่ง Cma-8 มากกว่าประชากรปลาดุกอุยจากการศึกษาของ Muiocha *et al*. (2017) แต่ด้วยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่อาจใช้ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในการบ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรได้ จำเป็นต้องพิจารณาร่วมกันหลาย ๆ ตำแหน่ง ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมกันในกรณีที่มีการใช้ตำแหน่งของเครื่องหมายที่แตกต่างกันได้ ดังนั้นหากจำเป็นต้องมีการเปรียบเทียบกันจะต้องใช้เครื่องหมายตำแหน่งเดียวกัน และจำนวนตำแหน่งต้องเท่ากัน

เมื่อพิจารณาค่า F_{is} หรือค่าสัมประสิทธิ์การผสมเลือดชิด (inbreeding coefficient) ที่บ่งบอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อยพบว่าทั้ง 2 ประชากรมีค่าเป็นผลบวก บ่งบอกว่าประชากรทั้ง 2 อยู่ในสภาวะโฮโมไซโกต (Homozygote) มากกว่าที่ควรจะเป็นเมื่อประชากรอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ซึ่งค่า F_{is} ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกอุยในโรงเพาะฟัก และมีค่ามากกว่าการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกอุยในธรรมชาติในประเทศไทย (Na-Nakorn *et al*., 1999; Muiocha *et al*., 2017) ลักษณะดังกล่าวอาจมีปัจจัยมาจากการเกิด Wahlund's effect หรือภาวะที่มี heterozygote ต่ำกว่าปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับที่คาดการว่าควรจะเป็นในภาวะสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ในกรณีที่ประชากรที่แตกต่างกันมาอยู่รวมกัน และถูกสุ่มตัวอย่างเป็นประชากรเดียวกัน (Chaisureesri, 2005) หรือการผสมเลือดชิด (inbreeding) (Hansen *et al*., 2001; Li *et al*., 2004) และเมื่อพิจารณาร่วมกับปรากฏการณ์คอขวด (Bottleneck) ปรากฏว่าประชากรปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) เกิดปรากฏการณ์คอขวดขึ้น (P_{BottN}= 0.041) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวคือ ปรากฏการณ์ที่ขนาดของประชากรลงลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งอาจเกิดจากภัยจากธรรมชาติ การเกิดโรคระบาด หรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์ โดยจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของอัลลีลอย่างรวดเร็ว หรืออาจทำให้บางอัลลีลสูญหายไปจากประชากรก็ได้ โดยปรากฏการณ์ดังกล่าวจะส่งผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรลดลง (Borivetanan, 2016) และจากการสอบถามข้อมูลของฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) พบว่าทางฟาร์มจะเพาะปลาดุกอุยปีละครั้ง แล้วนำลูกพันธุ์ปลาดุกอุยที่เพาะได้ไปเลี้ยงที่จังหวัดสมุทรปราการ เมื่ออายุได้ 7-8 เดือนจึงคัดเอาตัวเมียที่มีไข่มาใช้ผลิตลูกปลาดุกอุยเทศในฟาร์ม และนำตัวเมียไข่ส่วนหนึ่งพร้อมตัวผู้มาผสมเพื่อสร้างประชากรปลาดุกอุยรุ่นถัดไป ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นพบว่าฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) มีการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์โดยที่ไม่ได้ตั้งใจ ส่งผลให้ในรุ่นลูกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ลดลง การนำพ่อแม่จำนวนน้อยมาผสมกัน อาจทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมในรุ่นลูกลดลงอันเนื่องจากปรากฏการณ์คอขวด (Bottleneck) จะส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดการผสมเลือดชิด (inbreeding) และการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมในระยะยาว ซึ่งสอดคล้องกับค่า N_e ที่ได้เท่ากับ 28.1 น้อยกว่าที่ควรจะเป็นที่ N_e เท่ากับ 50 (Tave, 1993) สำหรับประชากรปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) ไม่เกิดปรากฏการณ์คอขวด (P_{BottN}= 0.051) แต่ค่า P-value ที่ปรากฏสามารถบ่งบอกว่าประชากรปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) มีความเสี่ยงที่จะเกิดปรากฏการณ์คอขวด (Bottleneck) ดังนั้น

จึงควรมีการบริหารจัดการพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยต่อไป เพื่อป้องกันการเกิดการผสมเลือดชิด (inbreeding) และการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม

ค่า F_{st} ที่บ่งบอกระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดย Wright (1978) กล่าวว่าค่า F_{st}= 0.00 – 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ ค่า F_{st}= 0.05 – 0.15 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง ค่า F_{st}= 0.15 – 0.25 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง และค่า F_{st} > 0.25 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงมาก ซึ่งการศึกษานี้พบค่า F_{st} = 0.103 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง จากข้อมูลที่กล่าวมาทั้งหมดหากต้องการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมให้กว้างขึ้นและเพิ่ม heterozygote ให้กับประชากรควรนำประชากรทั้ง 2 มาผสมร่วมกัน และวางแผนในการจัดการพ่อแม่พันธุ์ตามหลักพันธุศาสตร์เพื่อป้องกันการเกิดการผสมเลือดชิด (inbreeding) และการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป

Table 2 Genetic variation based on five microsatellite loci of *Clarias macrocephalus* from Chumphon aquatic animal genetics research and development center (P) and Supaphon farm (S)

Population	A_a (±SD)	A_e (±SD)	H_o (±SD)	H_e (±SD)	P_{HWE}	F_{is}	P_{BottN}	N_e (95% CI)
P	5.00 (2.5495)	3.20 (1.6653)	0.47 (0.1096)	0.62 (0.1761)	0.016	0.248	0.051	82.6 (27.9-Inf.)
S	4.60 (2.7019)	3.20 (1.5989)	0.45 (0.1129)	0.63 (0.1696)	0.046	0.288	0.041	28.1 (13.2-81.4)
P-value	0.8158	0.9976	0.7683	0.9607	-	-	-	-

Note: apparent alleles (A_a), effective number of alleles (A_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), P-value for Hardy-Weinberg equilibrium (P_{HWE}), Fixation index (F_{is}), P-value for Bottleneck test (P_{BottN}), effective population size (N_e) and P-value for t-test between the population means (P-value).

Table 3 Fixation index (F_{st}, F_{is} and F_{it}) of *Clarias macrocephalus* for each locus and all loci

locus	F_{st}	F_{is}	F_{it}
Cma-6	0.191	-0.147	0.072
Cma-8	0.018	0.401	0.411
Cma-19	-0.003	0.173	0.171
Cma-21	0.068	0.261	0.312
Cma-22	0.209	0.445	0.560
All loci	**0.103**	**0.267**	**0.343**

การเลี้ยงทดสอบเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของปลาดุกอุย

ก่อนเริ่มทำการทดลองได้เก็บข้อมูลน้ำหนักเริ่มต้น (IBW) และความยาวเริ่มต้น (ITL) พบว่าปลาจากทั้ง 2 แหล่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value > 0.05) หลังสิ้นสุดการทดลองพบว่าน้ำหนักสุดท้าย (FBW) ความยาวสุดท้าย (FTL) น้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน (DWG) และอัตรารอด (SUR) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value > 0.05) จากทั้ง 2 แหล่ง แต่ปลาดุกอุยเพศผู้จากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) มีน้ำหนักสุดท้าย และน้ำหนักที่เพิ่มต่อวันมากกว่าปลาดุกอุยเพศผู้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value < 0.05) และปลาดุกอุยเพศเมียจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) มีความยาวสุดท้ายมากกว่าปลาดุกอุยเพศเมียจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value < 0.05) สำหรับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) และ Condition factor (K) ของปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) มีค่ามากกว่าปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มเพศ (P-value < 0.05) (Table 4)

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าน้ำหนักสุดท้าย (FBW) ความยาวสุดท้าย (FTL) และอัตรารอด (SUR) ของปลาดุกอุยรวมเพศจากทั้ง 2 ประชากรไม่แตกต่างกัน แต่ปลาดุกอุยเพศผู้จากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) มีน้ำหนักสุดท้ายมากกว่าปลาดุกอุยเพศผู้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) ซึ่งสอดคล้องกับค่าน้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน (DWG) และค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ที่ปลาดุกอุยเพศผู้จากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) มีค่ามากกว่าปลาดุกอุยเพศผู้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) ในขณะที่ปลาดุกอุยเพศเมียจากทั้ง 2 แหล่งไม่แตกต่างกันทั้งน้ำหนักสุดท้ายและน้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน (DWG) เมื่อพิจารณาความยาวสุดท้ายกลับพบว่าปลาดุกอุยเพศเมียจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) มีความยาวมากกว่าปลาดุกอุยเพศเมียจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) ในขณะที่ปลาดุกอุยเพศผู้จากทั้ง 2 แหล่งไม่แตกต่างกันในด้านความยาว จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปลาดุกอุยทั้งเพศผู้และเพศเมียจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) มีลักษณะลำตัวที่เป็นทรงเพรียวยาวกว่าปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) ซึ่งสอดคล้องกับค่า condition factor (K) ที่เป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักและความยาวสามารถใช้บ่งบอกถึงรูปร่างของปลาได้ หากมีค่าต่ำแสดงว่าปลามีรูปร่างลำตัวที่เพรียวยาว (Froese, 2006; Nash *et al*., 2006) ที่พบว่าปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) มีค่า K ต่ำกว่าปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value < 0.05) ถึงแม้ข้อมูลน้ำหนักสุดท้ายและความยาวสุดท้ายรวมเพศของทั้ง 2 แหล่งไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาแยกเพศกลับพบว่าลักษณะทางกายภาพของปลาดุกอุยจากทั้ง 2 แหล่งมีความแตกต่างกัน ซึ่งบ่งบอกได้ถึงความผันแปร (Variation) ของปลาดุกอุยจากทั้ง 2 แหล่งได้เป็นอย่างดี

Table 4 Growth performance of initial body weight (IBW, g), initial total length (ITL, cm), final body weight (FBW, g), final total length (FTL, cm), daily weight gain (DWG, g.day^{-1}), specific growth rate (SGR, %.day^{-1}), condition factor (K, %) and survival rate (SUR, %) of *Clarias macrocephalus* from Chumphon aquatic animal genetics research and development center (P) and Supaphon farm (S)

Growth performance		P	S
IBW (g)		1.01 (0.960 – 1.052)	1.00 (0.959 – 1.048)
ITL (cm)		5.28 (5.200 – 5.358)	5.29 (5.212 – 5.370)
FBW (g)	All	27.05* (26.261 – 27.831)	28.08* (27.396 – 28.762)
	Male	25.98*[a] (24.876 – 27.071)	28.50*[b] (27.614 – 29.381)
	Female	28.31* (27.195 – 29.412)	27.63* (26.571 – 28.681)
FTL (cm)	All	15.30* (15.153 – 15.448)	15.22* (15.093 – 15.340)
	Male	15.25* (15.029 – 15.459)	15.51* (15.345 – 15.662)
	Female	15.37*[a] (15.165 – 15.562)	14.89*[b] (14.705 – 15.058)
DWG (g.day^{-1})	All	0.145* (0.1404 – 0.1491)	0.151* (0.1467 – 0.1543)
	Male	0.139*[a] (0.1328 – 0.1450)	0.153*[b] (0.1479 – 0.1577)
	Female	0.152* (0.1456 – 0.1579)	0.148* (0.1421 – 0.1538)
SGR (%.day^{-1})	All	1.818*[a] (1.8012 – 1.8338)	1.843*[b] (1.8290 – 1.8562)
	Male	1.795*[a] (1.7708 – 1.8180)	1.852*[b] (1.8347 – 1.8693)
	Female	1.844* (1.8215 – 1.8655)	1.832* (1.8106 – 1.8535)

Table 4 Growth performance of initial body weight (IBW, g), initial total length (ITL, cm), final body weight (FBW, g), final total length (FTL, cm), daily weight gain (DWG, g.day^{-1}), specific growth rate (SGR, %.day^{-1}), condition factor (K, %) and survival rate (SUR, %) of *Clarias macrocephalus* from Chumphon aquatic animal genetics research and development center (P) and Supaphon farm (S) (Cont.)

Growth performance		P	S
K (%)	All	0.748*[a]	0.795*[b]
		(0.7425 – 0.7534)	(0.7898 – 0.8000)
	Male	0.725*[a]	0.761*[b]
		(0.7172 – 0.7327)	(0.7555 – 0.7672)
	Female	0.776*[a]	0.831*[b]
		(0.7695 – 0.7816)	(0.8254 – 0.8374)
SUR (%)		97.83	96.50
		(92.814 – 102.853)	(95.258 – 97.742)

การทดสอบเปรียบเทียบการต้านทานโรค *Aeromonas hydrophila* ของปลาดุกอุย

ศึกษาหาความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50}) โดยแช่ปลาดุกอุยในเชื้อ *A. hydrophila* ที่มีระดับความเข้มข้น 5 ระดับคือ 1.49×10^7, 9.48×10^5, 6.24×10^4, 6.44×10^3 และ 6.44×10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และแช่ปลาดุกอุยในน้ำปลอดเชื้อสำหรับชุดควบคุม พบว่าปลาดุกอุยตายร้อยละ 75, 40, 30, 15, 0 และ 0 ตามลำดับภายในเวลา 96 ชั่วโมง (Figure 1) เมื่อนำผลร้อยละการตายของปลาดุกอุยแต่ละระดับมาคำนวณหาค่า LC_{50} ตามวิธีการของ Reed and Muench (1938) พบว่ามีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.08×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยปลาที่ตายเร็วสุดพบอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 1.49×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง 30 นาที และปลาที่ตายตัวสุดท้ายพบอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 6.44×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 35 ชั่วโมง 20 นาที ปลาดุกอุยที่ตายทุกตัวพบว่าตายด้วยสาเหตุจากเชื้อ *A. hydrophila* โดยดูจากลักษณะทางกายภาพคือ ท้องบวม มีน้ำในช่องท้อง ตับซีด และเมื่อเขี่ยเชื้อจากตับออกมาพบว่ามีเชื้อ *A. hydrophila* จำนวนมาก และไม่พบเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาที่รอดทุกตัว

จากการศึกษาครั้งนี้โดยการแช่ปลาดุกอุยในน้ำที่มีเชื้อ *A. hydrophila* และใช้ปลาดุกอุยน้ำหนักเฉลี่ย 1.62 กรัม พบว่าค่า LC_{50} เท่ากับ 2.08×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ Karoon and Areechon (1994) ที่นำเชื้อ *A. hydrophila* เข้าสู่ตัวปลาดุกอุยโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง และใช้ปลาดุกอุยน้ำหนักเฉลี่ย 12.44 กรัม พบค่า LD_{50} เท่ากับ 4.9×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ Rasatapana (1996) ที่นำเชื้อ *A. hydrophila* เข้าสู่ตัวปลาดุกอุยโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักปลา 10 กรัม พบค่า LD_{50} เท่ากับ 5.45×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ค่า LC_{50} (LD_{50}) มีความแตกต่างกันเนื่องจากใช้เชื้อคนละสายพันธุ์ ส่งผลให้ความรุนแรงของเชื้อแตกต่างกัน อีกทั้งการศึกษานี้ใช้ลูกปลาดุกอุยที่มีขนาดเล็กกว่า จึงส่งผลให้ปริมาณเชื้อที่ใช้ลดลง แต่การศึกษานี้นำเชื้อเข้าสู่ตัวปลาโดยวิธีการแช่ ต่างจากการศึกษาทั้ง 2 ข้างต้น

ซึ่งโดยปกติการนำเชื้อเข้าโดยวิธีการแช่ต้องใช้ความเข้มข้นเชื้อที่สูงกว่าการฉีด ดังนั้นเชื้อ *A. hydrophila* สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงที่สามารถใช้ในการศึกษาได้

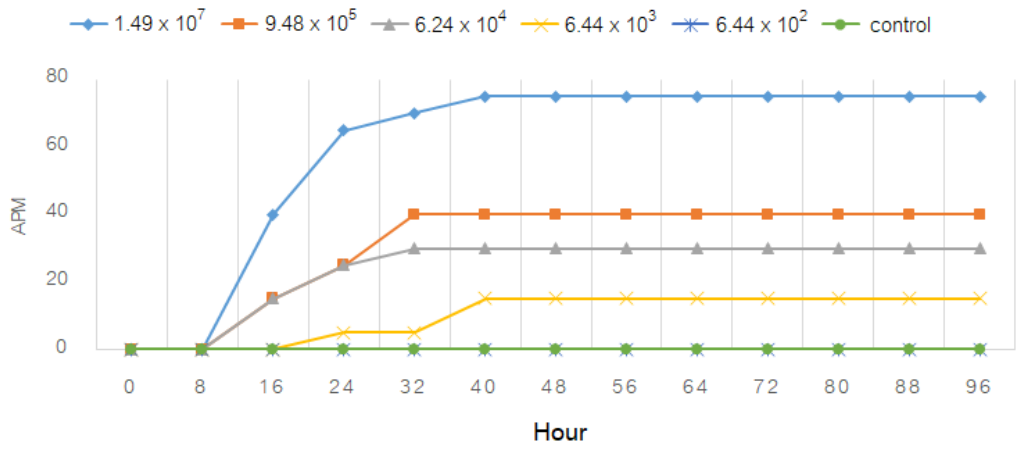

Figure 1 Accumulative percentage of mortality rate (APM) of *Clarias macrocephalus* experimentally infected with various concentrations of *A. hydrophila*

ทดสอบเปรียบเทียบความต้านทานโรคโดยการแช่ปลาดุกอุยในเชื้อที่มีความเข้มข้น 3.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (LC_{50} เท่ากับ 2.08×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) พบว่าในชุดทดลองปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) มีค่าเฉลี่ยการตายเท่ากับ 5.33 ± 1.33 ตัว คิดเป็นร้อยละ 53.33 ภายในเวลา 96 ชั่วโมง และปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) มีค่าเฉลี่ยการตายเท่ากับ 4.67 ± 4.33 ตัว คิดเป็นร้อยละ 46.67 ภายในเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่าอัตราการตายจากทั้ง 2 ประชากรไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P-value > 0.05) และในชุดควบคุมพบว่าปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) มีค่าเฉลี่ยการตายเท่ากับ 1.00 ± 1.00 ตัว คิดเป็นร้อยละ 10 ภายในเวลา 96 ชั่วโมง และไม่พบการตายในปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่าอัตราการตายจากทั้ง 2 ประชากรไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P-value > 0.05) (Table 5, Figure 2) เมื่อตรวจสอบสาเหตุการตายพบว่าในชุดทดลองปลาดุกที่ตายทุกตัวมีอาการท้องบวม มีน้ำในช่องท้อง ตับซีด และเมื่อเขี่ยเชื้อจากตับออกมาพบว่ามีเชื้อ *A. hydrophila* จำนวนมาก และไม่พบเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาที่รอดทุกตัว และในชุดควบคุมไม่พบเชื้อ *A. hydrophila* ทั้งในปลาที่รอดและปลาที่ตาย

การตายของปลาดุกอุยจากเชื้อ *A. hydrophila* ในการศึกษานี้พบว่าจะตายอยู่ในช่วงเวลาตั้งแต่ 8 – 40 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ (Figure 1, 2) และพบว่าปลาดุกอุยจากการทดลองนี้ที่ตายหลังจากชั่วโมงที่ 40 ไม่พบเชื้อ *A. hydrophila* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Karoon and Areechon (1994) และ Rasatapana (1996) ที่รายงานว่าปลาดุกอุยจะเริ่มตายในช่วงชั่วโมงที่ 10 - 12 หลังจากฉีดเชื้อ แต่มีข้อแตกต่างที่การศึกษาของ Karoon and Areechon (1994) พบการตายจากเชื้อที่ถึงชั่วโมงที่ 96 หลังจากฉีดเชื้อ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบปลาที่ตายหลังจากชั่วโมงที่ 40 หลังจากรับเชื้อจำนวน 3 ตัว (ในประชากรจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรม

สัตว์น้ำชุมพร (P) จำนวน 1 ตัว และจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) จำนวน 2 ตัว) แต่เนื่องด้วยไม่พบเชื้อ *A. hydrophila* จึงไม่นับเป็นปลาที่ตายจากเชื้อ อีกทั้งในชุดควบคุมของปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) ก็มีการตาย (จำนวน 3 ตัว) และไม่พบเชื้อ *A. hydrophila* จากผลดังกล่าวเป็นความผิดพลาดที่อาจเกิดจากความอ่อนแอของตัวปลาเนื่องจากเข็มฉีดยาสะกิดข้างลำตัวให้เป็นแผลก่อนนำไปแช่ แต่การศึกษานี้ได้ใช้คนที่สะกิดข้างตัวปลาเป็นคนเดียวเพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากตัวบุคคล ทั้งนี้ปลาดุกอุยที่รอดตายจากการแช่เชื้อ และไม่พบเชื้อภายในตัวอาจเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถทำลายเชื้อแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวปลาได้

เมื่อพิจารณาความต้านทานเชื้อพบว่าปลาดุกอุยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพร (P) มีอัตราการตาย (ร้อยละ 53.33) มากกว่าปลาดุกอุยจากฟาร์มปลา สุภาภรณ์ (S) (ร้อยละ 46.67) แต่เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่าอัตราการตายจากทั้ง 2 ประชากรไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P-value > 0.05) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปลาดุกอุยจาก 2 แหล่งมีความต้านทานโรคที่ไม่แตกต่างกัน และจากผลที่ได้จากการตรวจสอบหาเชื้อจากปลาที่รอดตายจากทั้ง 2 แหล่ง พบว่าทั้ง 2 แหล่งมีปลาที่สามารถกำจัดเชื้อที่เข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงควรผสมข้ามปลาจากทั้ง 2 แหล่งเพื่อสร้างเป็นประชากรพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

Table 5 Number of deaths in each replication, mean of deaths and standard deviation (S.D.) of *Clarias macrocephalus* from Chumphon aquatic animal genetics research and development center (P) and Supaphon farm (S) in experimental group and control group

group	Population	Replication 1	Replication 2	Replication 3	Mean	S.D.
Experimented	P	6	6	4	5.33^{a}	1.33
	S	7	4	3	4.67^{a}	4.33
Control	P	0	2	1	1.00^{b}	1.00
	S	0	0	0	0^{b}	0

Note: mean with different superscripts in each column differ significantly from each other (P<0.05) and number of deaths in the experimented group at not from *A. hydrophila* are excluded

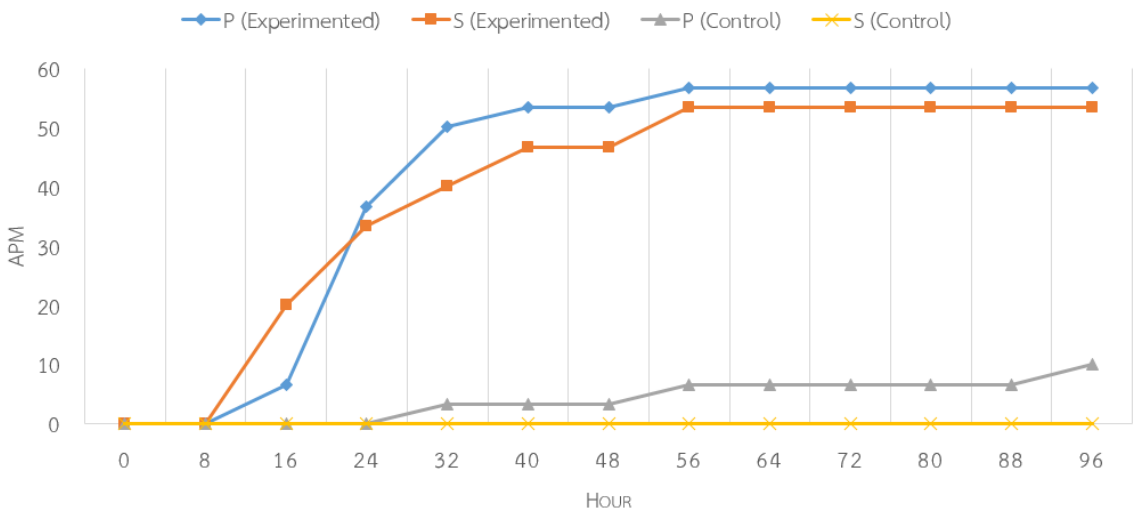

Figure 2 Accumulative percentage of mortality rate (APM) of *Clarias macrocephalus* from Chumphon aquatic animal genetics research and development center (P) and Supaphon farm (S) experimentally infected with *A. hydrophila*

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าประชากรปลาดุกอุยจากทั้ง 2 แหล่งมีความแตกต่างกันในด้านพันธุกรรมและลักษณะทางกายภาพของลำตัว ซึ่งบ่งบอกได้ถึงความผันแปร (Variation) ของปลาดุกอุยจากทั้ง 2 แหล่งได้เป็นอย่างดี แม้ความสามารถในการต้านทานโรคจะไม่แตกต่างกัน แต่พบว่ายังมีปลาที่สามารถกำจัดเชื้อที่เข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงควรผสมข้ามปลาจากทั้ง 2 แหล่งเพื่อสร้างเป็นประชากรพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณลุงตี๋ – ป้าเล็ก เจ้าของฟาร์มปลา สุภาภรณ์ จ.สิงห์บุรี ที่อนุเคราะห์พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุย และให้ความรู้ คำแนะแนะนำเกี่ยวกับปลาดุกอุยในประเทศไทย ขอขอบคุณ ผอ.สุชาติ จุลอดุง ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพรที่อนุเคราะห์พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุย ขอขอบคุณนางสาวจันทร์นภา ศักดิ์ศรีพิพัฒน์ นักวิชาการประมงของกองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ และเจ้าหน้าที่ประจำกองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำทุกท่านที่อำนวยความสะดวก และให้การช่วยเหลือในการทดสอบเปรียบเทียบการต้านทานโรค *Aeromonas hydrophila* ของปลาดุกอุย สุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำปทุมธานีทุกท่านที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Aljanabi, S.M. and I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research. 25: 4692-4693.

Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudin and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotech. Agron. Soc. Environ. 10: 77–81.

Borivetanan, P. 2016. Bottleneck effect. IPST Magazine. 44 (201): 10-14. [in Thai]

Chaisureesri, K. 2005. Application of isoenzyme electrophoresis to assess genetic diversity in conservation of tropical forest genetic resources: theory and practice. Forest and plant conservation research office. Bangkok. 157 pp. [in Thai]

Cornuet, J. M. and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics. 144: 2001–2014.

Department of Fisheries. 2018. Fisheries statistics of Thailand 2016. Fisheries development policy and strategy division. Bangkok. 87 pp. [in Thai]

Do, C., R. S. Waples, D. Peel, G. M. Macbeth, B. J. Tillett and J. R. Ovenden. 2014. NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. Molecular Ecology Resources. 14(1): 209-214.

Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationship: history, meta-analysis and recommendations. J. Appl. Ichthyol. 22: 241-253.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available Source: http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html, January 9, 2014.

Hansen, M.M., D.E. Ruzzante, E.E. Nielsen and K.D. Mensberg. 2001. Brown trout (*Salmo trutta*) stocking impact assessment using microsatellite DNA markers. Ecol. Appl. 11: 148–160.

Karoon, B. and N. Areechon. 1994. Study on resistance to experimental infection of Aeromonas hydrophila in hybrid catfish. Proceedings of the 32nd Kasetsart University Annual Conference: Animal Science, Veterinary Science and Fisheries. Bangkok. 475-487. [in Thai]

Komanpririn, K., S. Leesanga and S. Uraiwan. 2004. Mass selection for growth of Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus* Günther). Technical Paper no. 3. Aquatic animal genetic research and development institute. Bangkok. 28 pp. [in Thai]

Li, Q., C. Park, T. Endo and A. Kijima. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). Aquaculture. 235: 207-222.

Muiocha, D.A., S. Onming and U. Na-Nakorn. 2017. Growth performance, genetic diversity and morphometric traits of an introduced wild and hatchery population of *Clarias macrocephalus* Günther, 1864. Journal of Fisheries and Environment. 41(2): 19 pp.

Na-Nakorn, U., N. Taniguchi, E. Nugroho, S. Seki and W. Kamonrat. 1999. Isolation and characterization of microsatellite loci of *Clarias macrocephalus* and their application to genetic diversity study. Fisheries Science. 65(4): 520-526.

Nash, R.D.M., A.H. Valencia and A.J. Geffen. 2006. The original of Fulton's condition factor: Setting the record straight. Fisheries. 31(5): 236-238.

Primpol, M. 1990. Study on disease in Gunther's walking catfish (*Clarias macrocephalus*) and its prevention. Thesis (Master's degree), Kasetsart University, Bangkok. [in Thai]

Rasatapana, D. 1996. Estimation of heritability of disease resistance, body weight and length of Thai walking catfish, *Clarias macrocephalus*. Thesis (Master's degree), Kasetsart University, Bangkok. 66 pp. [in Thai]

Reed, L.J. and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. Am. J. Hug. 27: 493-497.

Sukmanomon, S., S. Poompuang and M. Nakajima. 2003. Isolation and characterization of microsatellites in the Asian Walking Catfish *Clarias macrocephalus*. Molecular Ecology Notes. 3: 350-351.

Tave, D. 1993. Genetics of fish hatchery management. 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, Boston. 415 pp.

Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Vol.4: Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press.

Yeh, F.C., R. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE version 1.31. Microsoft Window–based Freeware for Population Genetic Analysis. (http://www.ualberta.ca/~fyeh/).