

การระบุพันธุกรรมของสต็อกปลานิลจากเยอรมันนี้ โดยใช้วิธีอัลโลไซม์อิเล็กโตรโฟรีซิส

Genetic identification of German *Oreochromis niloticus* stock using allozyme electrophoresis

คำสำคัญ (Key word) : ปลานิล, tilapia, *Oreochromis niloticus*,
genetic identification, allozyme, electrophoresis

*พนม กระจ่างพนธ์ สอดสุข, Ph.D.

และ ศรีรัตน์ สอดสุข, Ph.D.

*สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

หมู่ 1 ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ 02-5775060, โทรสาร 02-5775062

E-mail: opnk@nontri.ku.ac.th

Abstract

Genetic identification of German *Oreochromis niloticus* stock was carried out using allozyme electrophoresis and comparing with two other strains of the fish, the Chitralada and Egyptian strains. The study presented a very interesting result in the German strain that an only one allele was fixed at the ADA* locus which actually was shown by other previous studies to be very high polymorphic of 4 alleles in *Oreochromis niloticus*, as being supported and confirmed again by the allozyme patterns of those two compared strains in this study. The result of ADA* fixation of only one allele in the German stock was an appearance of losing genetic variation or diversity, which means to genetic drift or bottlenecking of the population caused by severe inbreeding and always happening because of unawareness of good broodstock management.

A number of useful knowledges inferred from the study have also been raised and considered as appropriate advices for good genetic status control of any *Oreochromis niloticus* stocks.

บทคัดย่อ

การระบุพันธุกรรมของสต็อกปลานิลสายพันธุ์ที่มาจากประเทศเยอรมันนี้ โดยใช้วิธีอัลโลไซม์อิเล็กโตรโฟรีซิส พร้อมด้วยการเปรียบเทียบกับปลานิลสายพันธุ์อื่นอีก 2 สายพันธุ์ คือ จิตรลดา และ อียิปต์ ผลการศึกษาที่ได้มีความน่าสนใจ กล่าวคือ 'ปลานิลเยอรมัน' มีพันธุกรรมคงที่เพียงอัลลีลเดียว (one fixed allele) ณ ที่โลкус ADA* ซึ่งเป็นโลкусที่ถูกพบในการศึกษาก่อนหน้านี้อย่างมาแล้วว่า โดยปกติจะแสดงรูปแบบพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูงมากถึง 4 อัลลีลในประชากรปลานิลโดยทั่วไป โดยได้รับการสนับสนุนและยืนยันอีกครั้งจากรูปแบบอัลโลไซม์ที่แสดงออกในปลานิลอีก 2 สายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบกับกันในการศึกษารั้งนี้ด้วย การที่ 'ปลานิลเยอรมัน' มีพันธุกรรมคงที่เพียงอัลลีลเดียว ณ โลкус ADA* ซึ่งโดยปกติควรจะเป็นโลкусที่มีความหลากหลายสูงมากนี้ คือการแสดงออกถึง

การสูญเสียความแปรปรวนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร ซึ่งหมายถึงปรากฏการณ์ของชีวิตที่เกิดจากการผสมพันธุ์
เลือดชิดอย่างรุนแรง โดยมักจะเกิดขึ้นเพราะขาดความเอาใจใส่ในการบริหารพ่อแม่พันธุ์ที่ดี

นอกจากนี้ ข้อคิดต่างๆ จากการศึกษาก็เป็นประโยชน์ ได้อยู่ยกขึ้นมาพิจารณาเพื่อเป็นแนวทางปฏิบัติสำหรับการควบคุม
สถานภาพทางพันธุกรรมของประชากรปลาชนิด ไม่ว่าจะเป็นในสต็อกใดๆ ก็ตาม

คำนำ

ในปี พ.ศ. 2539 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดของ
กรมประมง ได้รับมอบลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*)
จำนวนหนึ่งจาก Institute of Freshwater Ecology and Inland
Fisheries แห่งเมืองเบอร์ลิน ประเทศเยอรมนี ด้วยวัตถุประสงค์
คือ ต้องการนำมาทดลองเพาะเลี้ยงเพื่อพิจารณาความเหมาะสม
ที่จะเป็นการดีหรือไม่ ถ้านำปลาเหล่านี้มาใช้เป็นแหล่งพันธุ์ใหม่
หรือเป็นแหล่งพันธุ์เสริม ร่วมกับปลานิลจิตรลดาของไทย เพื่อ
พัฒนาสายพันธุ์ปลานิลของไทยต่อไปในอนาคต และนับตั้งแต่
นั้นเป็นต้นมา ลูกปลานิลจากเยอรมันดังกล่าว ก็ได้ให้กำเนิด
ลูกหลานขึ้นมาจนกลายเป็นสต็อก (stock) ของแหล่งพันธุ์ที่มี
จำนวนมากพอสมควรทีเดียวในปัจจุบัน โดยมีชื่อเรียกกันติดปาก
จากนักวิชาการผู้ทำการเพาะเลี้ยงว่า 'ปลานิลเยอรมัน'

เนื่องจากความต้องการที่จะนำ 'ปลานิลเยอรมัน' เหล่านี้
มาใช้เป็นสต็อกพ่อแม่พันธุ์แหล่งใหม่ หรือใช้เสริมร่วมกับปลานิล
จิตรลดาของไทย จึงสมควรที่จะต้องทำการตรวจสอบเสียก่อน
ว่า สายพันธุ์ที่กำลังจะนำเข้ามา (introduce) นี้ มีสถานภาพทาง
พันธุกรรม (genetic status) แตกต่างจากพันธุ์ท้องถิ่นของไทย
อย่างไรหรือไม่ และจะสามารถระบุความแตกต่างของแต่ละ
สายพันธุ์ได้อย่างไร ด้วยเหตุนี้ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรม
สัตว์น้ำ โดยกลุ่มวิจัยพันธุศาสตร์ประชากร จึงได้รับมอบหมายให้
ทำการศึกษาและตรวจสอบปลานิลสายพันธุ์ดังกล่าว เปรียบเทียบ
กับสายพันธุ์จิตรลดาซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองของไทย และสายพันธุ์
ที่มาจากอียิปต์โดยตรง ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เป็นต้นกำเนิดของปลานิล
โดยทั่วไปรวมทั้งพันธุ์จิตรลดาด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ ก็เพื่อป้องกัน
ความสับสนและความเข้าใจที่ผิดพลาดซึ่งอาจจะเกิดขึ้นได้ และ
เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จาก 3 แหล่ง
(sources) ได้แก่ สายพันธุ์ที่มาจากเยอรมันนี้ ที่ต้องการตรวจสอบ
พันธุ์จิตรลดาซึ่งถือเป็นพันธุ์ท้องถิ่นของไทย และ สายพันธุ์อียิปต์
ที่มาจากอียิปต์โดยตรงซึ่งเป็นต้นกำเนิดของปลานิลโดยทั่วไป
ได้ถูกนำมาตรวจสอบข้อมูลทางพันธุกรรมที่เรียกว่า อัลโลไซม์

(allozyme) โดยใช้เทคโนโลยีทางอนุพันธุศาสตร์ (molecular
genetics) ในระดับโปรตีน/เอนไซม์ ที่เรียกว่า สดาร์ชเจลอิเล็ก-
โตรโฟรีซิส (starch gel electrophoresis) ที่จำนวน 7
เอนไซม์โลไซ (enzyme loci) ได้แก่ AAT-2*, AAT-3*, ADA*,
AH-2*, EST-2*, FH-2* และ MEP-2* ซึ่งเป็นโลไซที่ถูกพบ
โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ (พนม กระจำพจน์, 2537; 2539) มา
แล้วว่ามีความเป็นพหิรมอร์ฟิซึม (polymorphism) หรือ มีความ
หลากหลายในรูปแบบพันธุกรรม (genotypes) สูงในปลานิล

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ ยึดถือ
ตามการศึกษาของ Sodsuk (1993) โดยมีการเขียนชื่อเอนไซม์
และระบุชื่อยีนโลกซ์ตาม Shaklee et al. (1990)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการใช้วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสตรวจสอบข้อมูลอัลโลไซม์
(allozyme electrophoresis) ในตัวอย่างปลานิลทั้ง 3 สายพันธุ์
พบว่า ที่โลกซ์ (locus) ADA* แสดงข้อมูลทางพันธุกรรมของ
ปลานิลที่มาจากเยอรมันนี้แตกต่างจากอีก 2 สายพันธุ์ (รูปที่ 1)
และยังแตกต่างจากผลการศึกษาของ พนม กระจำพจน์ (2537,
2539) และ Sodsuk (1993) ที่เคยศึกษาไว้ในปลานิลสายพันธุ์
จากอียิปต์ด้วยเช่นกัน

ข้อมูลทางพันธุกรรมที่แตกต่างในปลานิลที่มาจากเยอรมันนี้
ซึ่งตรวจพบที่โลกซ์ ADA* นี้ แสดงออกมาในรูปของการสูญเสีย
ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (loss of genetic variation) หรือ
genetic drift นั้นเอง ซึ่งน่าจะเป็นปรากฏการณ์ที่เป็นผลสืบเนื่อง
มาจากการผสมพันธุ์เลือดชิด (inbreeding) และการใช้พ่อแม่
พันธุ์ในจำนวนเพียงไม่กี่ตัวเป็นสำคัญ จากการศึกษาของ พนม
กระจำพจน์ (2537, 2539) และ Sodsuk (1993) พบว่า โดย
ปกติประชากรปลานิลจะแสดง polymorphism สูงมากถึง 4
อัลลีล (alleles) หรือมากกว่า ณ ที่โลกซ์ ADA* หรืออาจกล่าว
ได้ว่า โลกซ์ ADA* เป็นโลกซ์ที่ควรจะมีหลากหลาย
ทางพันธุกรรมสูงในปลานิล ประกอบกับจากการศึกษาในครั้งนี้ที่ได้
พบรูปแบบพันธุกรรม (genotypes) ที่มีความหลากหลายมากใน
ปลานิล 2 สายพันธุ์ ยกเว้นพันธุ์ที่มาจากเยอรมันนี้ ดังแสดงใน
รูปที่ 1 จึงเท่ากับเป็นการสนับสนุนและยืนยันความถูกต้องของ

การศึกษาของ พนม กระจำพจน์ (2537, 2539) และ Sodsuk (1993) ดังกล่าว ส่วนในปลาไนที่มาจากเยอรมันนี้ซึ่งแสดงพันธุ์กรรมที่ปราศจากความหลากหลาย กล่าวคือ มีพันธุ์กรรมคงที่ (fixed) อยู่ที่เพียงอัลลีลเดียว ณ ที่โลกัส ADA* นั้น จึงเป็นการแสดงออกถึงปรากฏการณ์ที่เรียกว่า genetic drift หรือ bottlenecking ซึ่งน่าจะเป็นผลสืบเนื่องมาจากการผสมพันธุ์เลือดชิดภายในหมู่พี่น้องครอบครัวเดียวกันในวงแคบที่มีการใช้พ่อแม่พันธุ์เพียงไม่กี่ตัวในการเพาะพันธุ์แต่ละครั้ง ดังกล่าวแล้วข้างต้น จึงเป็นเหตุให้เกิดการสูญเสียความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุ์กรรมอย่างรุนแรง

จากการติดต่อกับไปยัง Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries ประเทศเยอรมัน (ติดต่อกับการส่วนตัวกับ Dr. Klaus Kohlmann) เพื่อสืบหาข้อมูลและประวัติความเป็นมาของ 'ปลาไนเยอรมัน' เพิ่มเติม จึงทำให้ทราบว่า สัตว์โคลนนิ่งของปลาไนของสถาบันแห่งนี้ก็มาจากการนำเข้าลูกปลาจำนวนหนึ่งจากประเทศสาธารณรัฐเช็ก (Czech Republic) อีกทีหนึ่ง โดยสัตว์โคลนดังกล่าว มีไว้เพียงเพื่อการทดลองอาหารปลาเท่านั้น การเพาะขยายพันธุ์จึงเป็นเพียงแบบง่ายๆ และธรรมดา (simple mass selection) ซึ่งมีได้มีการวิเคราะห์หรือตรวจสอบโดยใช้หลักการทางพันธุ์กรรมใดๆ เข้าไปเกี่ยวข้องทั้งสิ้น อีกทั้ง 'ลูกปลาไนเยอรมัน' ที่ได้รับมอมมาแต่แรกนั้น ก็เป็นลูกพันธุ์ที่ถูกเพาะขึ้นมาจากพ่อแม่ปลาเพียงคู่เดียวอีกด้วย ด้วยเหตุนี้ จึงได้รับการยืนยันความเห็นที่สอดคล้องกันจาก Dr. Klaus Kohlmann ว่า ปรากฏการณ์ fixation ที่พบเพียงหนึ่งอัลลีลที่โลกัส ADA* ในสัตว์โคลนของ 'ปลาไนเยอรมัน' นี้ ควรจะเป็นผลของ genetic drift หรือ bottlenecking อย่างแน่นอน ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าว จัดเป็นปรากฏการณ์ที่ชี้ให้เห็นถึงความเสื่อมโทรมของสายพันธุ์ที่กำลังจะเกิดขึ้น อันเนื่องมาจากการขาดการเอาใจใส่ในหลักของการบริหารพ่อแม่พันธุ์ หรือ 'broodstock management' ที่ดี และด้วยเหตุนี้ ทางสถาบันฯ แห่งนี้จึงมีความต้องการที่จะปรับปรุงสัตว์โคลนปลาของเขาใหม่ด้วยเช่นกัน

ประโยชน์และแนวทางปฏิบัติที่ได้รับจากการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้ นับเป็นตัวอย่างหนึ่งที่ชี้ให้เห็นถึงประโยชน์และความสำคัญของเทคนิคอัลโลไซม์อิเล็กโตรโฟรีซิส ตลอดจนความรู้และความเข้าใจที่จะประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการบริหารการประมง โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันสถานการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ แต่อาจจะเกิดขึ้นได้จากการตัดสินใจที่ผิดพลาดโดยรู้เท่าไม่ถึงการณ์

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้ชี้ให้เห็นถึงหลักการและ

แนวทางที่ถูกต้องและสมควรปฏิบัติ ในการบริหารสัตว์โคลนปลาไนต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงและเพาะขยายพันธุ์ ดังนี้

(1) ควรจะได้ทำการตรวจสอบพันธุ์กรรมของพันธุ์ปลาไนทุกสายพันธุ์ที่กำลังจะนำเข้าหรือได้นำเข้ามาแล้วจากแหล่งต่างๆ ด้วยวิธีอัลโลไซม์อิเล็กโตรโฟรีซิส ก่อนที่จะตัดสินใจดำเนินการใดๆ ในขั้นต่อไป โดยควรแยกเลี้ยงแต่ละสายพันธุ์ออกจากกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอย่าให้ปะปนกับพันธุ์ดั้งเดิมหรือพันธุ์ท้องถิ่นที่มีอยู่เป็นอันขาดถ้ายังมิได้ทำการตรวจสอบ

(2) จากผลการตรวจสอบสัตว์โคลน 'ปลาไนเยอรมัน' ซึ่งได้พบว่า เป็นสัตว์โคลนที่มีการสูญเสียความแปรปรวนหรือความหลากหลายทางพันธุ์กรรมอย่างรุนแรงที่โลกัส ADA* นั้น เท่ากับเป็นการแนะนำว่า ไม่สมควรอย่างยิ่งที่จะนำพันธุ์ปลาไนตัวนี้ไปใช้ เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อการแพร่ขยายพันธุ์ต่อไปโดยตรง ตรงไปตรงมา ไม่มีการทดสอบและเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์เพื่อดูลักษณะความสามารถที่แสดงออก (phenotypic performances) ต่อสภาพของการเพาะเลี้ยงในแต่ละท้องถิ่นนั้นเสียก่อน

(3) อาจนำพันธุ์ปลาไนจากสัตว์โคลน 'ปลาไนเยอรมัน' ไปใช้เพื่อการปรับปรุงสัตว์โคลนของพ่อแม่พันธุ์ที่มีอยู่เดิมเสียใหม่ ในกรณีที่มีความต้องการจะเหนี่ยวนำ (introduce) ยีนบางตัวจากสัตว์โคลน 'ปลาไนเยอรมัน' ซึ่งพบว่าไม่มีในสัตว์โคลนของพ่อแม่พันธุ์เดิม ให้ไปเพิ่มอยู่ในสัตว์โคลนที่กำลังทำการปรับปรุงใหม่ ทั้งนี้ก็เพื่อวัตถุประสงค์ที่ต้องการจะเพิ่มความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุ์กรรม เพื่อให้มีศักยภาพในการปรับปรุงพันธุ์เพิ่มมากขึ้นนั่นเอง เพราะถ้าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุ์กรรมแล้ว การปรับปรุงพันธุ์ก็คงไม่อาจเกิดขึ้นได้เช่นกัน

(4) ควรมีการตรวจสอบพันธุ์กรรมของสัตว์โคลนปลาไนที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์โดยวิธีอัลโลไซม์อิเล็กโตรโฟรีซิสนี้เป็นครั้งคราว เนื่องจากการสูญเสียความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุ์กรรมในแหล่งเพาะเลี้ยงนี้ สาเหตุส่วนใหญ่ก็เนื่องมาจากผลกระทบจากการคัดพันธุ์ (selective breeding) นั่นเอง ซึ่งมักจะเกิดขึ้นโดยไม่อาจจะหลีกเลี่ยงได้ถ้าขาดความเอาใจใส่ในการบริหารพันธุ์กรรมของพ่อแม่พันธุ์ที่ดี โดยจะทำให้ความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุ์กรรมลดลงเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาของการเพาะพันธุ์ในแต่ละรุ่น

คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อท่านรองฯ ชรินทร์ ศรีทองสุข (รองอธิบดีกรมประมง ฝ่ายพัฒนา 2) ผู้ซึ่งให้การสนับสนุนและผลักดันให้มีการศึกษาข้อมูลรายละเอียดทางพันธุ์กรรมของ 'ปลาไนเยอรมัน' ในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ

คุณสุจินต์ หนูขวัญ และ คุณวีระ วัชรกรโยธิน นักวิชาการประมงของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดทั้ง 2 ท่าน ที่กรุณาให้ความเอื้อเฟื้อตัวอย่างพันธุ์ 'ปลานิลเยอรมัน' สำหรับการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งให้ข้อมูลต่างๆ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษาในครั้งนี้

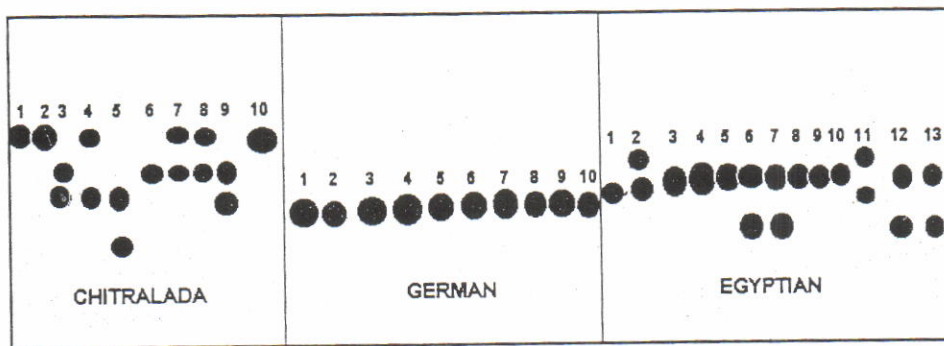
เอกสารอ้างอิง

พ่นม กระจ่างพ่น สอดสุข. 2537. ข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับตรวจสอบปลาในกลุ่มปลานิล 4 ชนิดโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส. *วารสารการประมง* 47(6): 525-539.

พ่นม กระจ่างพ่น สอดสุข. 2539. ความแตกต่างทางพันธุกรรมในปลากลุ่มปลานิล 4 ชนิดที่เคยนำเข้าประเทศ. *เอกสารวิชาการฉบับที่ 11* สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง. 23 หน้า.

Shaklee, J. B., F. W. Allendorf, D. C. Morizot and G. S. Whitt. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 2-15.

Sodsuk, P. K. 1993. Molecular genetics and systematics of tilapiine cichlids using allozymes and morphological characters. *PhD thesis*, University of Stirling, Scotland, UK. 269 pp.



รูปที่ 1 รูปแบบอัลโลไซม์ที่โลกัส ADA* ในปลานิล 3 สายพันธุ์ ได้แก่

- จิตรลดา (CHITRALADA) 10 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงความหลากหลายในรูปแบบพันธุกรรมต่างๆ ของ 4 อัลลีล คือ ตัวอย่างที่ 1, 2, 6 และ 10 แสดงรูปแบบพันธุกรรมของยีนที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) โดยในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 10 เป็นโฮโมไซกัสที่อัลลีลเดียวกัน แต่เป็นคนละอัลลีลกับโฮโมไซกัสในตัวอย่างที่ 6 ส่วนในตัวอย่างที่ 3, 4, 5, 7, 8 และ 9 แสดงรูปแบบพันธุกรรมของยีนที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ในแบบต่างๆ
- เยอรมัน (GERMAN) 10 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงถึงการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมที่โลกัส ADA* ของปลานิลในประชากรนี้ เพราะทุกตัวอย่างแสดงรูปแบบพันธุกรรมที่มีความคงที่อยู่ที่อัลลีลเดียว (fixed allele) เหมือนกันหมด
- อียิปต์ (EGYPTIAN) 13 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงความหลากหลายในรูปแบบพันธุกรรมต่างๆ ของ 4 อัลลีล คือ ตัวอย่างที่ 1, 3, 4, 5, 8, 9 และ 10 แสดงรูปแบบพันธุกรรมของยีนที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) ที่อัลลีลเดียวกัน ส่วนในตัวอย่างที่ 2, 6, 7, 11, 12 และ 13 แสดงรูปแบบพันธุกรรมของยีนที่เป็นเฮเทอโรไซกัสในแบบต่างๆ

หมายเหตุ เนื่องจาก ADA เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็นโมโนเมอร์ (monomeric) ดังนั้น จึงแสดงรูปแบบอัลโลไซม์ให้เห็นเป็น 2 แบนด์ ในตัวอย่างที่มีสภาพเป็นเฮเทอโรไซกัส