รูปแบบการสืบพันธุ์ของปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) บริเวณเขาหมาจอ จังหวัดชลบุรี โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์

นางสาวทิพวิมล รัตนะวงวาล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

REPRODUCTIVE MODE OF CAULIFLOWER CORAL *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) AT KHAO MAA CHO, CHON BURI PROVINCE, USING MICROSATELLITE MARKERS

Miss Tipwimon Rattanawongwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Marine Science
Department of Marine Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	รูปแบบการสืบพันธุ์ของปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) บริเวณเขาหมาจอ จังหวัดชลบุรี โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์
โดย	นางสาวทิพวิมล รัตนะวงวาล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุชนา ชวนิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชนา ชวนิชย์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นาย นิพนธ์ พงศ์สุวรรณ)

ทิพวิมล รัตนะวงวาล : รูปแบบการสืบพันธุ์ของปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) บริเวณเขาหมาจอ จังหวัดชลบุรี โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ (REPRODUCTIVE MODE OF CAULIFLOWER CORAL *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) AT KHAO MAA CHO, CHON BURI PROVINCE, USING MICROSATELLITE MARKERS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. สุชนา ชวนิชย์, 56 หน้า.

ปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศ และมีการรายงานไว้ว่าในปะการังชนิดนี้ เซลล์ไข่สามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนได้แม้ไม่ได้รับการผสมกับเสปิร์ม โดยอัตราส่วนการสร้างตัวอ่อนแบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศนี้จะแตกต่างกันไปตามปัจจัย เช่น ที่ตั้ง สภาพแวดล้อมในพื้นที่ และขนาดของโคโลนี เป็นต้น การศึกษานี้มุ่งสำรวจการสร้างตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* บริเวณเขาหมาจอ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ในส่วนของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอจำนวน 5 ตำแหน่ง ถูกใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์ของโคโลนีแม่ทั้งหมด 9 โคโลนี และตัวอ่อนทั้งหมด 276 ตัว (เฉลี่ย 31±2.52 ตัว/โคโลนี) การเปรียบเทียบรูปแบบพันธุกรรมของตัวอ่อนกับโคโลนีแม่ พบว่าตัวอ่อนจากโคโลนีแม่จำนวน 5 โคโลนี (55.56 เปอร์เซ็นต์) ถูกผลิตจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ส่วนตัวอ่อนจากโคโลนีแม่อีก 4 โคโลนี (44.44 เปอร์เซ็นต์) เกิดจากการผลิตตัวอ่อนแบบอาศัยเพศ โดยพบตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมพันธุ์ของโคโลนีแม่กับโคโลนีพ่อเพียงโคโลนีเดียว จำนวน 3 โคโลนีแม่ และตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมพันธุ์ของโคโลนีแม่กับโคโลนีพ่อมากกว่า 1 โคโลนี จำนวน 1 โคโลนีแม่ ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าประชากรของปะการังชนิดนี้ในบริเวณที่ศึกษามีการทดแทนประชากรจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและแบบอาศัยเพศควบคู่กันไป ซึ่งก่อให้เกิดสมดุลระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมและการคงไว้ซึ่งพันธุกรรมที่เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมในพื้นที่ รวมถึงการขยายแนวปะการังให้กว้างขึ้น ข้อมูลรูปแบบการสืบพันธุ์ดังกล่าวเป็นหนึ่งในข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะช่วยให้การวางแผนอนุรักษ์ประชากรปะการังดอกกะหล่ำในพื้นที่นี้สามารถทำได้อย่างประสิทธิภาพมากขึ้น

ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5471983323 : MAJOR MARINE SCIENCE
KEYWORDS: POCILLOPORA DAMICORNIS / PARTHENOGENETIC LARVAE / MICROSATELLITE

TIPWIMON RATTANAWONGWAN: REPRODUCTIVE MODE OF CAULIFLOWER CORAL *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) AT KHAO MAA CHO, CHON BURI PROVINCE, USING MICROSATELLITE MARKERS. ADVISOR: ASST. PROF. DR. SANIT PIYAPATTANAKORN, CO-ADVISOR: ASST. PROF. DR. SUCHANA CHAVANICH, 56 pp.

Cauliflower coral, *Pocillopora damicornis*, has two reproductive modes: sexual and asexual reproduction. Moreover, there were reports on its parthenogenetic larvae. The proportions of sexual and asexual larvae were dependent on locations, environments and colony sizes. This study was focusing on the reproductive modes in cauliflower coral, *P. damicornis*. The genotyping of total 9 brood colonies and 276 larvae (31±2.52 larvae per brooder), collected from Khao Maa Cho, Sattahip, Chon Buri, were carried out using 5 polymorphic microsatellite loci. The results revealed that there were 5 brood colonies (55.56 %) producing asexual or parthenogenetic larvae and 4 brood colonies (44.44 %) producing sexual larvae, in whichthe sexual larvae from 3 brood colonies were produced via a single mating and 1 colony was produced by multiple mating. The results suggested that the recruitment of the populations could be supplied by both asexual and sexual larvae. These two reproductive modes could play an important role in the maintenance of genetic diversity and fitness of the populations in the area. The knowledge of the reproductive modes in *P. damicornis* is the major information to enhance the efficiency of conservative planning for this coral species in this area.

Department:	Marine Science	Student's Signature	.....
Field of Study:	Marine Science	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2014	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุชนา ชวนิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และรองศาสตราจารย์ ดร. วรณพ วิยกาญจน์ อาจารย์ผู้ดูแลกลุ่มวิจัยชีววิทยาแนวปะการัง สำหรับคำแนะนำในการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ครบถ้วนสมบูรณ์ อีกทั้งยังจัดหาแหล่งเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์ ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธิติวรกุล และคุณนิพนธ์ พงศ์สุวรรณ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ในสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ Dr. Akira Iguchi ประเทศญี่ปุ่น สำหรับความรู้ในเรื่องเทคนิคอณูพันธุศาสตร์ และคำแนะนำในการวิเคราะห์ผลของงานวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่าน ในการให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในขณะที่ทำวิทยานิพนธ์ ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุ์พืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) และหน่วยสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการกองทัพเรือ ในการสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ ตลอดจนการดูแลความปลอดภัยขณะดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โครงการ อพ.สธ. และเจ้าหน้าที่กองทัพเรือทุกท่าน ที่ช่วยให้การดำเนินในภาคสนามสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอบคุณ คุณปฐพร เกื้อนุ้ย คุณเสธ์ ทรงพลอย คุณศุภกาญจน์ จันทร์แดง คุณวิภาดา ลลิตภัทรกิจ คุณนิติ วงศ์เทพวานิชย์ คุณนเรนฤทธิ์ ชิ้นฟัก คุณณัฐธิดา จันทศิริ คุณอิศรา ศรีสุข คุณจันทร์จิรา คำดีเงิน และสมาชิกในกลุ่มวิจัยปะการังทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้รับเงินทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย เพื่อนำมาใช้เป็นค่าใช้จ่ายในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดา บิดา และญาติพี่น้องทุกคน ที่คอยให้กำลังใจและเป็นแรงผลักดันสำคัญทำให้งานทุกอย่างสำเร็จเป็นไปตามเป้าหมายที่วางไว้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูปภาพ ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ลักษณะและการกระจายตัวของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* 3
2.2 การสืบพันธุ์ของปะการัง *P. damicornis* 4
2.2.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ 4
2.2.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 6
2.2.3 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ 8
2.3 การใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ปะการัง 9
2.4 การอนุรักษ์ฟื้นฟูปะการัง 12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 14
3.1 พื้นที่ศึกษาและชนิดของปะการัง 14
3.2 ขั้นตอนการศึกษา 15
3.2.1 การเก็บตัวอย่าง 15
3.2.2 การทำแผนที่ระยะห่างระหว่างโคโลนีพ่อและโคโลนีแม่ 16
3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ 17
3.2.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 17

หน้า

3.2.5 การทดสอบอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (gradient polymerase chain reaction; gradient PCR) 18
3.2.6 การทดสอบเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ที่เหมาะสม 20
3.2.7 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ 20
3.2.8 การตรวจสอบจีโนไทป์และการวิเคราะห์ผล 20
บทที่ 4 ผลการศึกษา 21
4.1 ตัวอย่างโคโลนีปะการังและตัวอ่อนปะการัง *P. damicornis* 21
4.2 แผนที่ระยะห่างระหว่างโคโลนีแม่และโคโลนีที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่ 21
4.3 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ 23
4.4 ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ 24
4.5 รูปแบบการผลิตตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* 25
4.6 จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อ 28
4.7 ระยะทางการเข้าผสมจากสเปิร์ม 32
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ 33
5.1 ตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 33
5.2 ตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ 35
5.3 รูปแบบการสืบพันธุ์กับการอนุรักษ์ปะการัง *P. damicornis* 35
5.4 ข้อเสนอแนะ 36
รายการอ้างอิง 38
ภาคผนวก 45
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3- 1 เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส) อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส) และจำนวนของแอลลีลที่พบ (Na)..... 19

ตารางที่ 4- 1 จำนวนตัวอย่างโคโลนีปะการังทั้งโคโลนีแม่และโคโลนีรอบๆ โคโลนีแม่ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง และจำนวนตัวอ่อนที่ใช้วิเคราะห์จีโนไทป์ของแต่ละโคโลนีแม่..... 21

ตารางที่ 4- 2 เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส) และอุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)..... 23

ตารางที่ 4- 3 เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ จำนวนของแอลลีลที่พบ (Na) แอลลีลที่พบ (คู่เบส) จีโนไทป์ที่พบ (คู่เบส) จำนวนของโคโลนีแม่ และจำนวนของตัวอ่อนแต่ละจีโนไทป์..... 24

ตารางที่ 4- 4 จีโนไทป์ของโคโลนีแม่และตัวอ่อนปะการังในแต่ละตำแหน่ง 26

ตารางที่ 4- 5 แอลลีลของตัวอ่อนที่แตกต่างจากแอลลีลของโคโลนีแม่ซึ่งได้รับการถ่ายทอดจากโคโลนีพ่อ 27

ตารางที่ 4- 6 จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อที่เป็นไปได้ในแต่ละตำแหน่งไมโครแซตเทลไลท์ 28

ตารางที่ 4- 7 ระยะที่เป็นไปได้ในการรับสเปิร์มระยะที่ใกล้สุดและระยะไกลสุดของโคโลนีแม่ที่พบ ตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ..... 32

ภาคผนวก ข ตารางรูปแบบการผลิตตัวอ่อนที่เป็นไปได้ทั้งหมดของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* จากโคโลนีแม่ทั้ง 4 โคโลนี ในแต่ละตำแหน่งไมโครแซตเทลไลท์ โดยวิเคราะห์จากจีโนไทป์ของโคโลนีพ่อที่เป็นไปได้ จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้ และจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง..... 49

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 รูปร่างของโคโลนีปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* แบบ Y (ซ้าย) และแบบ B (ขวา)..... 4

รูปที่ 2 รูปแบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของปะการัง (A) hermaphroditic broadcast spawning; (B) hermaphroditic brooding (self-fertilization); (C) gonochoric broadcast spawning และ (D) gonochoric brooding 5

รูปที่ 3 รูปแบบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของปะการัง (A) การแตกหักของชิ้นส่วนปะการัง; (B) การแตกหน่อ; (C) การแยกตัวของโพลิป และ (D) การพัฒนาตัวอ่อนจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์จากสเปิร์ม 7

รูปที่ 4 รูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำของไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอ 10

รูปที่ 5 ประโยชน์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ (A) ความหลากหลายของจำนวนซ้ำของยีน (B) การแสดงออกของเฮเทอโรไซกัส และ co-dominant markers 11

รูปที่ 6 พื้นที่ดำน้ำเก็บตัวอย่างบริเวณแนวปะการังเขาหมาจอ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดย A คือ จุดดำน้ำเก็บตัวอย่าง (12° 35' 54.05" องศาเหนือ 100° 56' 54.20" องศาตะวันออก) และ B คือ โรงอนุบาลปะการัง (12° 35' 59.68" องศาเหนือ 100° 56' 57.10" องศาตะวันออก).... 14

รูปที่ 7 โคโลนีปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* (A) และ ตัวอ่อนของปะการัง 15

รูปที่ 8 แผนการสุ่มเก็บตัวอย่างโคโลนีปะการังในพื้นที่ 16

รูปที่ 9 แผนที่การวัดระยะห่างระหว่างโคโลนีแม่กับโคโลนีที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่ โดยเส้นสีฟ้า คือ ท่อพีวีซีความยาว 2 เมตร ที่ระบุระยะทุก 5 เซนติเมตร เพื่อใช้ระบุระยะห่างของโคโลนีในแต่ละแถว 16

รูปที่ 10 แผนที่การกระจายตัวของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ในพื้นที่เก็บตัวอย่าง 3 จุด (A) จุดที่ 1 (B) จุดที่ 2 และ (C) จุดที่ 3 โดยจุดสีทึบ คือ โคโลนีแม่ และจุดไม่ทึบ คือ โคโลนีที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่ 22

รูปที่ 11 กราฟแสดงสัดส่วนของรูปแบบการสืบพันธุ์ของการผลิตตัวอ่อนในโคโลนีแม่ทั้ง 9 โคโลนี 25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

แนวปะการังเป็นระบบนิเวศทางทะเลที่สำคัญทั้งในแง่ของการเป็นแหล่งอาหาร แหล่งที่อยู่อาศัย และแหล่งอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนของสัตว์ทะเล แต่ปัจจุบันแนวปะการังมีความเสื่อมโทรมลงทั้งจากผลกระทบทางธรรมชาติและจากกิจกรรมของมนุษย์ จึงได้มีการวางแผนอนุรักษ์ทรัพยากรปะการังหลายชนิดขึ้น แต่การอนุรักษ์นั้น นอกเหนือจากข้อมูลสภาพสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ ยังต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจในชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเฉพาะรูปแบบการทดแทนประชากร

ปัจจุบันการอนุรักษ์แนวปะการังจะใช้รูปแบบการสืบพันธุ์ในการจำแนก ซึ่งมีอยู่ 2 วิธี คือ การใช้ปะการังที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศเพื่อทดแทนประชากรปะการังที่สนใจ โดยส่วนใหญ่มักจะพบการใช้ปะการังที่ได้มาจากจะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในการอนุรักษ์มากกว่า ซึ่งการอนุรักษ์แบบนี้ใช้หลักการการแตกหักของชิ้นส่วนปะการัง (fragmentation) ทำให้ได้ชิ้นส่วนของปะการังจำนวนมาก อีกทั้งมีอัตราการเติบโตเร็ว จึงสามารถช่วยทดแทนประชากรภายในพื้นที่ได้รวดเร็ว แต่ปะการังเหล่านั้นสวนใหญ่ได้มาจากกิ่งปะการังจากปะการังเพียงไม่กี่โคโลนี จึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และมีส่วนช่วยเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมให้แก่ประชากรได้ค่อนข้างน้อย ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศทำได้โดยการผสมเซลล์ไข่และสเปิร์ม ทำให้เกิดการเข้าคู่กันของยีน จึงทำให้ปะการังที่จะนำไปใช้ในการทดแทนประชากรมีความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่การอนุบาลและเลี้ยงก่อนการนำไปใช้จะต้องใช้ระยะเวลายาวนานกว่าแบบไม่อาศัยเพศ เนื่องจากจะต้องมีการพัฒนามาจากตัวอ่อน อีกทั้งยังมีอัตราการเติบโตที่ต่ำกว่า

สำหรับปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) ถูกจัดอยู่ในไฟลัมไนดาเรีย (cnidaria) กลุ่มเดียวกับพวกดอกไม้ทะเล ปะการังชนิดนี้พบมากในแนวปะการังบริเวณเขตเส้นศูนย์สูตรทั้งมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรอินเดีย และมหาสมุทรแอตแลนติก ปะการังชนิดนี้สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศเช่นเดียวกับปะการังชนิดอื่น และในพื้นที่บริเวณฝั่งตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิกและอินโดแปซิฟิกส่วนใหญ่พบการผสมพันธุ์ของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ภายในโคโลนี โดยตัวอ่อนพัฒนาอยู่ภายในโพลิปก่อนถูกปล่อยออกสู่มวลน้ำ ซึ่งตัวอ่อนเหล่านี้อาจเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือพัฒนามาจากเซลล์ไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม (parthenogenesis) อย่างไรก็ตามข้อมูลการรูปแบบสืบพันธุ์ของ

ปะการังชนิดนี้ยังไม่ชัดเจน และยังมีความแตกต่างกันไปตามพื้นที่และสภาวะแวดล้อมของพื้นที่นั้นๆ สำหรับพื้นที่บริเวณเขาหมาจอ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการสำรวจรูปแบบการสืบพันธุ์ของปะการังชนิดนี้ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมตรวจสอบ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ในการผลิตตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* บริเวณเขาหมาจอ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยใช้ไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม ไมโครแซตเทลไลท์ คือ บริเวณหนึ่งของจีโนมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน 2-6 เบส ความยาวประมาณ 100-500 คู่เบส ซึ่งในแต่ละตำแหน่งจะมีจำนวนลำดับที่ซ้ำกันที่แตกต่างกัน สำหรับการศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตไมโครแซตเทลไลท์มีความเหมาะสมอย่างมาก เพราะมีความสะดวกและมีประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างเฉพาะตัว เนื่องจากเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็น co-dominant marker สามารถช่วยตรวจสอบดูรูปแบบการสืบพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จะทำให้ทราบข้อมูลรูปแบบการสืบพันธุ์และการผลิตตัวอ่อนของปะการังในการทดแทนประชากร ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่อการประยุกต์ใช้ในการวางแผนอนุรักษ์ปะการัง เพื่อฟื้นฟูแนวปะการังให้เหมาะสมกับแต่ละพื้นที่ เช่น พื้นที่ที่ความหลากหลายต่ำควรเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ส่วนพื้นที่ที่ประชากรถูกทำลายอย่างรวดเร็ว เช่น พายุ ควรทดแทนประชากรอย่างรวดเร็ว และขยายพื้นที่แนวปะการังด้วยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะและการกระจายตัวของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis*

ปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) จัดอยู่ใน Phylum Cnidaria, Class Anthozoa, Subclass Hexacorallia, Order Scleractinia, Suborder Astrocoeniina, Family Pocilloporidae, Genus Pocillopora ปะการังชนิดนี้มีการกระจายตัวเป็นบริเวณกว้างในเขตชายฝั่งน้ำตื้นตามแนวเขตเส้นศูนย์สูตรทั้งมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรแอตแลนติก และมหาสมุทรอินเดีย โดยเฉพาะชายฝั่งทะเลประเทศออสเตรเลียชายฝั่งตะวันตกของทวีปอเมริกาและชายฝั่งประเทศในกลุ่มเอเชียตะวันออก เช่น ประเทศญี่ปุ่น และประเทศไทย เป็นต้น รูปร่างของโคโลนี (colony) ปะการังชนิดนี้แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ แบบ Y และแบบ B โดยโคโลนีแบบ Y จะมีสีเหลืองชัดเจนและปลายกิ่งมีขนาดกว้างกว่าโคโลนีแบบ B ที่มีสีน้ำตาลและปลายกิ่งเรียวเล็ก ดังรูปที่ 1 โคโลนีทั้ง 2 แบบนี้ยังมีช่วงเวลาการปล่อยตัวอ่อนแตกต่างอีกด้วย (Ayre and Miller, 2004; Magalon *et al.*, 2004; Richmond and Jakiel, 1984) นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกได้จากการสร้างสีของโคโลนี (pink pigmentation) ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ แบบสีน้ำตาล (brown morph) และแบบสีชมพู (pink morph) การกระจายตัวตามลักษณะของโคโลนีมีความหลากหลายแตกต่างกันตามพื้นที่ โดยโคโลนีสีน้ำตาลมีการกระจายตัวและความหลากหลายมากบริเวณน้ำตื้นต่ำกว่า 1 เมตร ส่วนโคโลนีสีชมพูมีการกระจายตัวและความหลากหลายมากบริเวณเขตน้ำลึกกว่า 3 เมตร (Takabayashi and Hoegh-Guldberg, 1995) แม้ว่าปะการังดอกกะหล่ำจะสามารถจำแนกชนิดได้จากรูปร่างและสีของโคโลนี รวมถึงพื้นที่การกระจายตัว แต่การจำแนกอย่างแม่นยำนั้นทำได้ยาก จึงถูกนำมาศึกษาในหลายด้าน เช่น สรีระวิทยา นิเวศวิทยา และการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติ เป็นต้น ซึ่งการศึกษาด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์จึงเป็นวิธีการช่วยจำแนกให้ชัดเจนขึ้น (Stoddart, 1983)

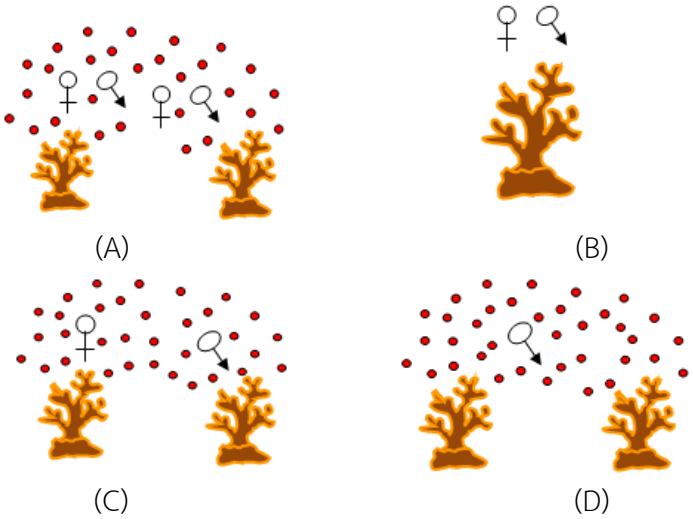
รูปที่ 1 รูปร่างของโคโลนีปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* แบบ Y (ซ้าย) และแบบ B (ขวา)

2.2 การสืบพันธุ์ของปะการัง *P. damicornis*

การสืบพันธุ์ของปะการังโดยทั่วไปสามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* มีลักษณะเช่นเดียวกัน ซึ่งรูปแบบการสืบพันธุ์นั้นจะแตกต่างกันตามชนิดและพื้นที่ (Harrison and Wallace, 1990; Whitaker, 2006)

2.2.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดจากการผสมของพันธุกรรมระหว่างสเปิร์มของพ่อและเซลล์ไข่ของแม่เกิดเป็นตัวอ่อน (planula) ปะการังที่เกิดใหม่จะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างหรือใกล้เคียงกับโคโลนีเดิม การสืบพันธุ์รูปแบบนี้เป็นประโยชน์ต่อการแพร่กระจายและช่วยเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบ่งตามเพศของโคโลนีออกเป็น 2 แบบ คือ แบบพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์สองเพศในเวลาเดียวกัน (hermaphrodite) และแบบแยกเพศชัดเจน (gonochoric) นอกจากนี้ยังมีการแบ่งตามการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ออกเป็น 2 ชนิด คือ Broadcast spawners ซึ่งปล่อยเซลล์ไข่และสเปิร์มออกมาผสมกันในมวลน้ำ ทำให้ตัวอ่อนมีพัฒนาการในมวลน้ำ อีกชนิด คือ Brooders เป็นโคโลนีที่ปล่อยเพียงสเปิร์มออกสู่มวลน้ำเพื่อผสมกับเซลล์ไข่ที่อยู่ภายในโคโลนี ปะการังกลุ่มหลังมีการผสมพันธุ์ภายใน ตัวอ่อนมีพัฒนาการภายในโคโลนีเช่นเดียวกัน (Sheppard *et al.*, 2009) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 รูปแบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของปะการัง (A) hermaphroditic broadcast spawning; (B) hermaphroditic brooding (self-fertilization); (C) gonochoric broadcast spawning และ (D) gonochoric brooding

ปะการังมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ มีรูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศภายในโคโลนีเดียวกัน (Harrison, 2011) เช่น ปะการัง Acroporidae Faviidae Mussidae และ Poccillporidae (Fukami *et al.*, 2008) โดยแบ่งตามช่วงเวลาในการสร้างเซลล์สสืบพันธ์ทั้งสองเพศและความพร้อมในการสืบพันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์เป็น 4 แบบ ได้แก่ 1) Simultaneous hermaphrodite คือ ชนิดที่สร้างเซลล์ไข่และสเปิร์มในช่วงเวลาเดียวกัน และเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองมีความพร้อมในการสืบพันธุ์ในช่วงเวลาเดียวกัน พบในปะการังบางขนิด เช่น *Pocillopora verrucosa* (Sier and Olive, 1994) โดยพบว่าปะการังแบบนี้มีโอกาสเกิดการผสมพันธุ์เซลล์ไข่และสเปิร์มของโคโลนีเดียวกัน (self-fertilization) ได้น้อย 2) Sequential hermaphrodite คือ ชนิดที่สร้างเซลล์ไข่และสเปิร์มคนละช่วงเวลา (Ghiselin, 1974) โดยอาจมีความพร้อมในการสืบพันธุ์พร้อมกันและอาจเกิดการผสมพันธุ์ภายในโคโลนีเดียวกัน เช่น *Pavona gigantea* และ *Gardineroseris planulata* เป็นต้น (Glynn and Ault, 2000; Glynn *et al.*, 2012) หรือมีความพร้อมในการสืบพันธุ์เพียงเพศใดเพศหนึ่งและจะเข้าผสมกับโคโลนีอื่น เช่น *Mussimilia hispida* เป็นต้น 3) Adolescent protandric hermaphrodite คือ ชนิดที่วัยอ่อนสร้างเพียงเซลล์สเปิร์ม แต่เมื่อถึงระยะสืบพันธุ์กลายเป็นสองเพศในโคโลนีเดียว (Hall and Hughes, 1996; Harrison and Wallace, 1990) และ 4) Protandrous hermaphrodite คือ ชนิดที่มีการเปลี่ยนเพศได้ พบมากในปะการังเห็ด (fungiid mushroom coral) โดยมักพบว่าโคโลนีขนาดเล็กเป็นเพศผู้และโคโลนีขนาดใหญ่เป็นเพศเมีย เช่น *Fungia rapanda* และ *F. scruposa* เป็นต้น (Loya

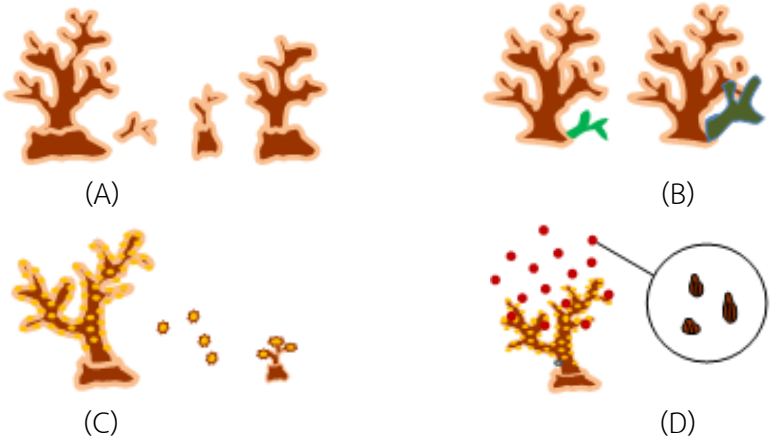
and Sakai, 2008; Loya *et al.*, 2009) ส่วนปะการังที่มีรูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพียงเพศเดียวชัดเจนพบได้น้อย เช่น *Porites* sp. และ *Pavona* sp. เป็นต้น (Glynn and Ault, 2000; Glynn *et al.*, 2012)

รูปแบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในปะการัง *P. damicornis* นี้ก็มีความแตกต่างกันตามพื้นที่ บริเวณแนวเส้นศูนย์สูตรทางฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิกพบการสืบพันธุ์โดยวิธี Broadcasting ในขณะที่พื้นที่แถบอินโดแปซิฟิกส่วนใหญ่ รวมถึงประเทศไทยเป็น Brooding (Combosch and Vollmer, 2013) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการไหลของกระแสน้ำเนื่องจากการหมุนของโลก ทำให้เซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อนแพร่กระจายจากตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิกซึ่งเป็น Broadcast spawners ไปยังตะวันตกที่มีการทดแทนประชากรภายในพื้นที่โดย Brooders (Ayre and Resing, 1986; Chávez-Romo *et al.*, 2008; Combosch and Vollmer, 2013; Paz-García *et al.*, 2012; Stoddart, 1984a) แต่มีบางพื้นที่ไม่เป็นไปตามการศึกษาเหล่านี้ เช่น ปะการังในแนวปะการัง Great Barrier Reef ประเทศออสเตรเลีย มีการสืบพันธุ์ทั้งโดยการอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศกระจายในแต่ละพื้นที่ ทั้งๆ ที่สภาพพื้นที่และสภาพแวดล้อมไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน (Sherman *et al.*, 2006; Ward, 1992) ตัวอ่อนของปะการัง *P. damicornis* มีลักษณะเป็นรูปซิการ์ (cigar shaped) ว่ายน้ำเร็วเนื่องจากมีซิเลีย (cilia) ประมาณ 2-3 วันจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกระบอกและว่ายน้ำช้าลง หลังจากนั้นหาที่ลงเกาะและเปลี่ยนรูปร่างเป็นวงกลม (Stoddart, 1983) แต่ถ้าภายในสามวันที่ลงเกาะตัวอ่อนถูกรบกวนหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ตัวอ่อนนั้นสามารถกลับขึ้นมาว่ายน้ำเพื่อหาที่ลงเกาะใหม่ได้ (Richmond, 1985) ตัวอ่อนบางตัวที่ลงเกาะใกล้กับโคโลนีอื่นสามารถเติบโตรวมกับโคโลนีที่อยู่ใกล้ๆ นั้นได้ (Hidaka *et al.*, 1985) นอกจากนี้ยังมีรายงานจากการศึกษาเนื้อเยื่อของ *P. damicornis* และ *P. verrucosa* สามารถสร้างเซลล์ไข่และเซลล์สเปิร์มได้ในช่วงเวลาเดียวกัน (simultaneous hermaphrodite) (Kruger and Schleyer, 1998; Stoddart and Black, 1985) แต่เป็นเพียงการศึกษาในระยะเวลาเพียงหนึ่งปี ซึ่งในปีอื่นๆ โคโลนีเดียวกันนี้อาจมีรูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ต่างออกไป ทำให้รูปแบบการสืบพันธุ์ของปะการังชนิดนี้ยังไม่มีความชัดเจน (Miller and Ayre, 2004)

2.2.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นการเติบโตของปะการังโคโลนีใหม่จากชิ้นส่วนของปะการังเดิม โคโลนีใหม่จะมีลักษณะพันธุกรรมเหมือนโคโลนีเดิม ส่วนมากพบในปะการังกิ่ง การสืบพันธุ์รูปแบบนี้สามารถทดแทนประชากรบริเวณพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากธรรมชาติหรือสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ดี เนื่องจากมีอัตราการเติบโตที่รวดเร็ว โดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบ่งออกเป็น 4

กลุ่ม ดังนี้ 1) การแตกหักของชิ้นส่วนปะการัง (fragmentation) ซึ่งส่วนใหญ่พบในปะการังรูปแบบกิ่งและแผ่น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากพายุ คลื่น หรือกระแสลมที่รุนแรง โดยชิ้นส่วนปะการังที่แตกหักสมารถยึดเกาะพื้นผิวและเจริญเป็นโคโลนีใหม่ได้ (Adjeroud and Tsuchiya, 1999) 2) การแตกหน่อ (budding) เป็นการแบ่งตัวออกจากโคโลนีเดิม (Harrison and Wallace, 1990; Richmond, 1987; Sakai, 1998) 3) การแยกตัวของโพลิป (polyp bail-out) เกิดจากโพลิปแยกจากโครงร่างแข็ง เคลื่อนที่หาพื้นที่ลงเกาะเพื่อเจริญเติบโตเป็นโคโลนีใหม่ พบในปะการังกลุ่ม *Goniopora* (Sammacro, 1982) และ 4) การพัฒนาตัวอ่อนจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม (pathenogenesis) ตัวอ่อนแบบนี้จะพบในปะการังที่ไม่มีสาหร่ายซูแซนเทลลี (ahermatypic species) เช่น ปะการัง *Tubastraea diaphana* และ *T. coccinea* เป็นต้น (Ayre and Resing, 1986) แต่ปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* เป็นปะการังที่มีสาหร่ายซูแซนเทลลี (hermatypic species) ที่สามารถสร้างตัวอ่อนจากไข่ที่ยังได้รับการผสมจากสเปิร์มได้ อนึ่งตัวอ่อนของกลุ่มที่ 4 นี้มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับโคโลนีแม่ทุกประการ เนื่องจากตัวอ่อนเกิดการแบ่งเซลล์แบบ ameiotic ถึงแม้ว่าตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะได้รับการถ่ายทอดพันธุกรรมจากโคโลนีแม่ ตัวอ่อนเหล่านั้นก็มีความสามารถในการปรับตัวให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ต่างกับการสืบพันธุ์จากการแตกหักของชิ้นส่วนปะการัง หรือ การแตกหน่อ (Ayre and Miller, 2004; Ayre and Resing, 1986; Sherman *et al.*, 2006; Stoddart, 1983; Stoddart, 1984b; Yeoh and Dai, 2010) อย่างไรก็ตาม ตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ที่เกิดจากโคโลนีที่เป็น Broadcast spawners จะมีช่วงเวลาในการลงเกาะประมาณ 3-6 วันหลังจากปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ทำให้สามารถแพร่กระจายไปได้ไกลกว่าตัวอ่อนที่เกิดจากโคโลนีที่เป็น Brooders ที่ใช้เวลาในการลงเกาะน้อยกว่า (Richmond, 1985)



รูปที่ 3 รูปแบบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของปะการัง (A) การแตกหักของชิ้นส่วนปะการัง; (B) การแตกหน่อ; (C) การแยกตัวของโพลิป และ (D) การพัฒนาตัวอ่อนจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์จากสเปิร์ม

2.2.3 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ

รูปแบบการสืบพันธุ์นั้นเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรสิ่งสิ่งมีชีวิต โดยสิ่งมีชีวิตบางชนิดสามารถปรับรูปแบบการสืบพันธุ์ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่อยู่ทางธรรมชาติได้ ตัวอย่างเช่น ในสภาวะที่สภาพแวดล้อมปกติปะการังบางชนิดสามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ และไม่มีความจำเป็นต้องปรับตัวมากนัก แต่เมื่อพื้นที่นั้นถูกรบกวนหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม สิ่งมีชีวิตในพื้นที่นั้นต้องปรับตัว รูปแบบการสืบพันธุ์ที่เหมาะสมจะช่วยให้ประชากรของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นสามารถดำรงอยู่ได้ ซึ่งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำให้เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรที่ซับซ้อน ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะช่วยคงพันธุกรรมที่เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อมของพื้นที่นั้น หรือคงไว้ซึ่งพันธุกรรมที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม (Morris and Morris, 2003) แต่อย่างไรก็ตาม รูปแบบการสืบพันธุ์บางรูปแบบอาจทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงได้ เช่น การผสมพันธุ์ของเซลล์ไข่และสเปิร์มของสิ่งมีชีวิตตัวเดียวกัน (self-fertilization) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ในสิ่งมีชีวิตที่มีสองเพศในตัวเดียวกันเท่านั้น (hermaphrodite) และการพัฒนาของตัวอ่อนโดยไม่มีการปฏิสนธิ (parthenogenesis) ซึ่งการสืบพันธุ์สองรูปแบบนี้จะทำให้เกิดการผสมเลือดชิด (inbreeding) และปริมาณโฮโมไซโกตของประชากรเพิ่มมากขึ้น (Harrison, 2011)

การผสมพันธุ์ของเซลล์ไข่และสเปิร์มของสิ่งมีชีวิตตัวเดียวกันนั้นเกิดขึ้นในสัตว์น้ำได้น้อยเมื่อเทียบกับอัตราการเกิดการสืบพันธุ์รูปแบบนี้ในสัตว์บก (Brazeau *et al.*, 1998) อีกทั้งยังพบได้ยากในปะการังที่เป็น Hermaphroditic spawner เนื่องจากในธรรมชาติรูปแบบการสืบพันธุ์ของปะการังรูปแบบนี้จะมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์หลายโคโลนีพร้อมกัน โอกาสเกิดการผสมของเซลล์ไข่และสเปิร์มของโคโลนีเดียวกันนั้นเกิดขึ้นได้ยาก หากเกิดขึ้น อัตราการรอดของตัวอ่อนที่เกิดจากการสืบพันธุ์รูปแบบนี้จะมีอัตราการรอดและอัตราการลงเกาะที่ต่ำ ในทางตรงกันข้าม การสืบพันธุ์นี้พบได้ในปะการังที่เป็น Hermaphroditic brooder (Carlon, 1999) ตัวอย่างเช่น *Acropora* (*Isopora*) *brueggemanni* ที่เป็น brooder เมื่อนำมาเลี้ยงในห้องทดลองโดยแยกหนึ่งโคโลนีต่อตู้ทดลอง พบว่าบางโคโลนีสามารถปล่อยตัวอ่อนได้ ถึงแม้ว่าจะมีจำนวนน้อย โดยเมื่อศึกษาเนื้อเยื่อเพื่อดูการพัฒนาของเซลล์ไข่และสเปิร์ม พบถุงสเปิร์มแตกออกและเซลล์ไข่รอบๆ ถุงสเปิร์มเปลี่ยนรูปร่างเป็นตัวอ่อนระยะแรก การศึกษานี้ได้สรุปว่าปะการังที่เลี้ยงในห้องทดลองนี้เกิดการผสมพันธุ์ของเซลล์ไข่และสเปิร์มของโคโลนีเดียวกัน และอัตราการเกิดการผสมพันธุ์ของเซลล์ไข่และสเปิร์มของโคโลนีเดียวกันนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อสภาวะแวดล้อมจำกัด (Okubo *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตาม แม้ว่า *P. damocornis* ในบริเวณแปซิกฟิกตะวันตกนั้นส่วนมากเป็น Hermaphroditic brooder ยกเว้นชายฝั่งตะวันตกของประเทศออสเตรเลีย (Miller and Ayre, 2004) แต่ยังไม่มีรายงานจากการศึกษาด้วยอณูพันธุศาสตร์ที่แน่ชัดว่าปะการังชนิดนี้เกิดการผสมพันธุ์ของเซลล์ไข่และสเปิร์มของ

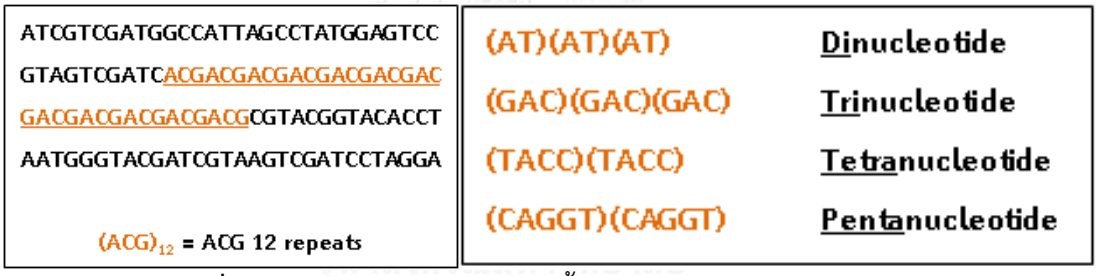
โคโลนีเดียวกัน ในทางตรงกันข้าม ในหลายพื้นที่นั้นพบว่าปะการังชนิดนี้สามารถผลิตตัวอ่อนจากไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม (Stoddart, 1983; Whitaker, 2006; Yeoh and Dai, 2010) ซึ่งรูปแบบการสืบพันธุ์เช่นนี้สามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ Rotifers Gastroticha Mollusca Anelida Sipuncula Arthropoda และ Cnidaria (Lively and Johnson, 1994) โดยเฉพาะในกลุ่ม Anthozoa นั้นพบทั้งในดอกไม้ทะเล ปะการังอ่อน และปะการังแข็ง เช่น *Tubastrea* และ *Pocillopora* เป็นต้น (Ayre and Resing, 1986; Ward, 1992)

แม้ว่าปะการัง *P. damicornis* จะสามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศเช่นเดียวกับปะการังส่วนใหญ่ โดยรูปแบบการสืบพันธุ์ในแต่ละพื้นที่มีความเด่นแตกต่างกัน ซึ่งพื้นที่ที่ได้รับการทำลายจากภัยธรรมชาติเป็นประจำ เช่น จากพายุ หรือพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมสูง เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเนื่องจากภาวะโลกร้อน ปะการังในพื้นที่เหล่านี้มีการทดแทนประชากรโดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสูง เนื่องจากสามารถทดแทนประชากรภายในพื้นที่ที่ถูกทำลายได้ในปริมาณมากภายในเวลาที่รวดเร็วกว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่ต้องรอระยะเวลาพร้อมสืบพันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์ แต่การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศช่วยทำให้เกิดการขยายพื้นที่ของแนวปะการังและเป็นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม (Adjeroud and Tsuchiya, 1999; Ayre and Miller, 2004; Benzie *et al.*, 1995; Miller and Ayre, 2004) โดยเฉพาะพื้นที่ปะการังผสมเซลล์สืบพันธุ์ในมวลน้ำ และตัวอ่อนแพร่กระจายไปตามกระแสน้ำไปยังพื้นที่อื่น ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมจะมากกว่าปะการังที่ผสมพันธุ์ภายในที่มีโอกาสเกิดการสืบพันธุ์ภายในตัวเองได้ง่าย (self-fertilization) (Magalon *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามพบว่าการแตกหักของปะการังในปริมาณมากจะส่งผลให้การปล่อยตัวอ่อนลดลง และขนาดของตัวอ่อนเล็กลงด้วย แสดงว่าพื้นที่ที่ประชากรส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนำไปสู่การลดความสามารถในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ส่งผลให้การขยายพื้นที่และความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง (Zakai *et al.*, 2000)

2.3 การใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ปะการัง

การศึกษาการสืบพันธุ์ของปะการังสามารถใช้วิธีการศึกษาเนื้อเยื่อ (Histology) เพื่อดูการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายในโคโลนี แต่การศึกษาด้วยวิธีนี้ไม่สามารถตรวจสอบการเข้าคู่ของยีนเพื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ได้ (Diah Permata *et al.*, 2000) ซึ่งการใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics) สามารถแสดงข้อมูลทางพันธุกรรมได้ โดยเริ่มจากการใช้ Allozyme electrophoresis เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรและรูปแบบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ

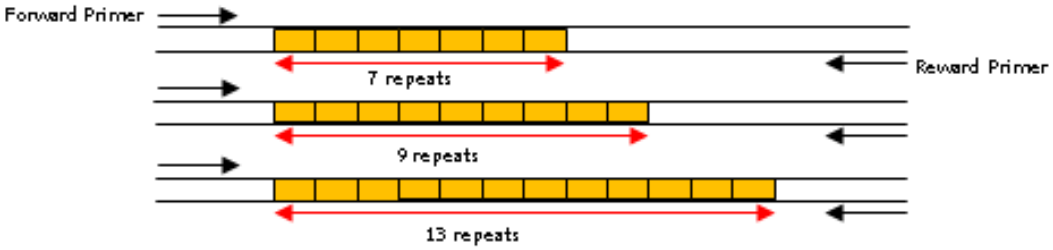
สิ่งมีชีวิตกลุ่มไนดาเรีย รวมถึงการวิเคราะห์จีโนไทป์ของตัวอ่อนและพ่อแม่ในปะการัง (Ayre and Miller, 2004; Stoddart, 1983) แต่การศึกษาด้วยเทคนิคนี้ไม่สามารถจำแนกการปนเปื้อนของโปรตีนปะการังกับสาหร่ายซูแซนเทลลีได้ชัดเจน อีกทั้งควรใช้เนื้อเยื่อสดหรือเก็บรักษาตัวอย่างด้วยไนโตรเจน ต่อมามีการศึกษาพันธุกรรมของปะการังเขากวาง *Acropora* ที่แนวปะการัง Great Barrier Reef โดยใช้ยีน rDNA-ITS แต่ผลการศึกษาพบว่ายีนดังกล่าวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ (Marquez *et al.*, 2003) จากนั้นได้มีการพัฒนาทางเทคนิคในวิธีการที่สามารถใช้ได้สะดวกและมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า (Ayre and Miller, 2004) คือ การใช้ไมโครแซตเทลไลท์ (microsatellite) หรือ Short tandem repeats (STR) โดยไมโครแซตเทลไลท์นั้นเป็นบริเวณหนึ่งของจีโนมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน 2-6 เบส ความยาวประมาณ 100-500 คู่เบส (Brooker, 2009; Snusted and Simmons, 2010) เป็นยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน (non-coding gene) ซึ่งในแต่ละตำแหน่ง (microsatellite locus) จะมีจำนวนลำดับที่ซ้ำนี้แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4 จึงนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างเฉพาะตัว และศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ รวมทั้งปะการัง



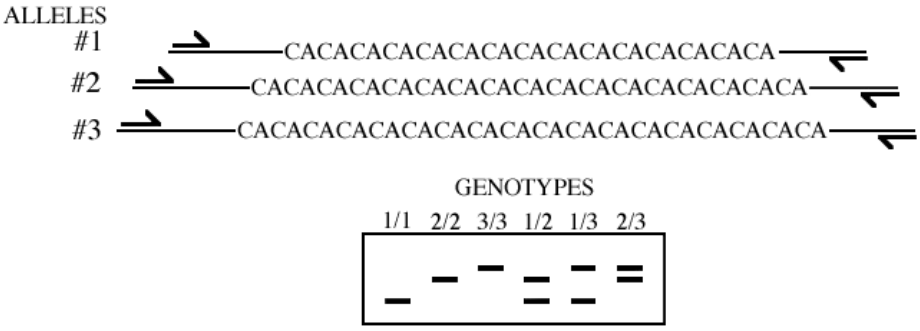
รูปที่ 4 รูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำของไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอ

การศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ของปะการังโดยใช้ไมโครแซตเทลไลท์ไพรเมอร์ มีความเหมาะสม เนื่องจาก 1) เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตเป็นอย่างมาก จึงทำให้ไม่มีปัญหาในเรื่องการปนเปื้อนของสาหร่ายขนาดเล็ก (zooxanthellae) ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อปะการัง (D'croz and Mat, 2004) 2) มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง ซึ่งจำเป็นต่อการสืบหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปะการังแต่ละโคโลนี 3) มีลักษณะเป็น co-dominant markers ที่สามารถใช้ตรวจสอบเฮเทอโรไซโกต ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการพิสูจน์ว่าปะการังมีการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis หรือ self-fertilization โดยเทียบความเหมือนของจีโนไทป์ระหว่างพ่อแม่และลูก จากการวิเคราะห์การแยกตัวของแอลลีล และการเข้าคู่กันของโครโมโซม (gene recombination) หากตัวอ่อนมีจีโนไทป์เหมือนแม่ทุกประการแสดงว่าเป็นการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis เนื่องจากได้รับพันธุกรรมจากแม่ทั้งหมด ไม่ได้เกิดการเข้าคู่กันของโครโมโซมกับ

โคโลนีพ่อ (Brooker, 2009; Magalon *et al.*, 2005; Magalon *et al.*, 2006; Magalon *et al.*, 2004; Snusted and Simmons, 2010; Starger *et al.*, 2008; Stoddart, 1983)



(A)



(B)

รูปที่ 5 ประโยชน์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ (A) ความหลากหลายของจำนวนซ้ำของยีน (B) การแสดงออกของเฮเทอโรไซกัส และ co-dominant markers

ทั้งนี้จากการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์สำหรับศึกษาปะการังดอกกะหล่ำ *P. verrucosa* *P. meandrina* และ *P. damicornis* ขึ้นมา 4 ตำแหน่ง และสำหรับ *P. damicornis* ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง เพื่อนำมาตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของปะการังชนิดนี้ในประเทศโพลินีเซีย อินโดนีเซีย และไต้หวัน โดยพบว่ามีเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ 7-8 ตำแหน่งที่มีจำนวนแอลลีลต่อโลคัสสูง (high polymorphic markers) ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมระหว่างตัวอ่อนและพ่อแม่ (Starger *et al.*, 2008) ซึ่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์และการสร้างตัวอ่อนในปะการังได้ โดยจากการศึกษารูปแบบการสร้างตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ที่ผ่านมาพบว่าสามารถสร้างตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศในเวลาเดียวกันในหลายพื้นที่ เช่น ประเทศออสเตรเลีย ญี่ปุ่น ไต้หวัน และฮาวาย พบสัดส่วนของตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมากกว่าแบบอาศัยเพศ (Starger *et al.*,

2008) ยกเว้นที่ One Three Island ประเทศออสเตรเลีย ที่พบว่าสัดส่วนของตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมากกว่าแบบไม่อาศัยเพศ เนื่องจาก One Three Island มีลักษณะเป็นพื้นที่ปิดทำให้กระแสน้ำไหลเวียนภายใน ทำให้การแพร่กระจายเซลล์สืบพันธุ์ไปได้ไม่ไกล (Benzie *et al.*, 1995)

2.4 การอนุรักษ์ฟื้นฟูปะการัง

ปะการังเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศทางทะเลเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นแนวป้องกันทางธรรมชาติ เป็นแหล่งที่อยู่อาศัย แหล่งอาหาร และแหล่งอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนหลายชนิด อีกทั้งยังเป็นพื้นที่เชื่อมต่อธาตุอาหารระหว่างทะเลเปิดกับระบบนิเวศทางทะเลอื่นๆ เช่น ระบบนิเวศหญ้าทะเล และป่าชายเลน เป็นต้น (Moberg and Folke, 1999) แต่ปัจจุบันแนวปะการังมีความเสื่อมโทรมลงจากทั้งผลกระทบจากการใช้ประโยชน์ของมนุษย์ เช่น การทำประมง (Seaman, 2007) ตะกอนของเสียที่ถูกปล่อยลงมายังชายฝั่ง (Pandolfi *et al.*, 2003) และการท่องเที่ยว (Rinkevich, 1995; Van Treeck and Schumacher, 1999) เป็นต้น ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลกที่ก่อให้เกิดปะการังฟอกขาวและโรคของปะการัง และผลจากการกินของดาวมงกุฎหนาม (Hughes *et al.*, 2003) การอนุรักษ์จึงมีบทบาทสำคัญในการช่วยรักษาและฟื้นฟูความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศปะการังได้ เช่น การสร้างแนวปะการังเทียมชนิด *Acropora cervicornis* ที่ประเทศจาไมกา พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 2 ปี ปะการัง *A. cervicornis* ในแนวปะการังเทียมนี้มีขนาดและจำนวนเพิ่มขึ้น รวมทั้งพบประชากรปลาเข้ามาในแนวปะการังมากขึ้น (Ferse, 2008; Quinn and Kojis, 2006)

การฟื้นฟูแนวปะการังโดยอาศัยหลักการสืบพันธุ์แบ่งเป็น 2 วิธี คือ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และแบบอาศัยเพศ การฟื้นฟูด้วยเทคนิคการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยส่วนใหญ่จะใช้การแบ่งส่วนจากโคโลนีปะการังเดิมมายึดติดกับวัสดุ เช่น เชือก โครงสร้างโลหะ และโครงสร้างปูน เป็นต้น (Quinn and Kojis, 2006) แต่อัตราการรอดจากการฟื้นฟูแบบนี้ควรมีมากกว่าอัตราการลงเกาะในธรรมชาติ (Bowden-Kerby, 2003) ส่วนการฟื้นฟูด้วยเทคนิคการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศทำได้โดยผสมเซลล์ไข่และสเปิร์ม ซึ่งพัฒนากลายเป็นตัวอ่อน จากนั้นเมื่อตัวอ่อนเติบโตเป็นโคโลนีที่มีขนาดเหมาะสมจึงนำกลับสู่ธรรมชาติ ทั้งนี้อัตราการรอดของตัวอ่อนจะขึ้นอยู่กับพื้นผิวการลงเกาะ (Petersen and Tollrian, 2001)

การฟื้นฟูแนวปะการังที่นิยม ได้แก่ การย้ายปลูก (transplantation) โดยใช้หลักการ fragmentation โดยมีการดัดแปลงรูปแบบของวัสดุ รวมไปถึงการสร้างแนวปะการังเทียมรูปแบบ

ต่างๆ เช่น Reefballs และ BioRocks ซึ่งใช้กระแสไฟฟ้าในการเพิ่มอัตราการสร้างโครงสร้างหินปูนของปะการัง เป็นต้น วิธีการเหล่านี้สามารถช่วยเพิ่มการปกคลุมพื้นผิวของปะการัง เพิ่มความสมบูรณ์ของชนิดปลา (Clark and Edwards, 1999) อีกทั้งยังช่วยดึงดูดตัวอ่อนปะการังให้ลงเกาะในบริเวณนั้น (Quinn and Kojis, 2006) อย่างไรก็ตาม หากปะการังที่ย้ายปลูกเหล่านั้นตายจะทำให้เกิดเศษซากปะการังในพื้นที่แนวปะการังบริเวณนั้นเพิ่มขึ้น การย้ายปลูกโดยใช้ชนิดของปะการังที่ไม่พบในแนวปะการังธรรมชาติบริเวณนั้น และปะการังชนิดนั้นมีการเติบโตที่รวดเร็วกว่าชนิดท้องถิ่นอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดชองโครงสร้างประชากรในพื้นที่นั้นได้ (Bowden-Kerby, 2003)

การจัดการที่ดีควรมีการศึกษารูปแบบวงจรชีวิต โดยเฉพาะอัตราการรอดและการเติบโตของปะการังชนิดนั้นๆ ที่สำคัญควรศึกษาข้อมูลโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรในพื้นที่นั้นก่อน เนื่องจากหากเข้าไปจัดการอนุรักษ์อย่างผิดวิธี อาจทำให้ความสมบูรณ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง โดยทำให้เกิดการผสมกับสายพันธุ์เดียวกัน (inbreeding) หรือ การเพิ่มขึ้นอย่างมากของประชากรจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เป็นต้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้อาจเป็นการลดประสิทธิภาพของการทดแทนและการปรับตัวของประชากรในพื้นที่ได้ (Baums, 2008b; Baums, 2008a) อีกทั้งการศึกษาทางพันธุกรรมจะสามารถช่วยคาดคะเนการตอบสนองของปะการังต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลกที่ส่งผลต่อสภาพแวดล้อมทางทะเล เช่น การเพิ่มขึ้นของอุณภูมิผิวน้ำทะเล ความเป็นกรดด่างของน้ำทะเล ระดับน้ำทะเลที่สูงขึ้น และรูปแบบการไหลเวียนของมวลน้ำ เป็นต้น (Van Oppen and Gates, 2006) เนื่องจากปะการังแต่ละชนิดมีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและการฟอกขาวได้แตกต่างกัน (Hughes *et al.*, 2003)

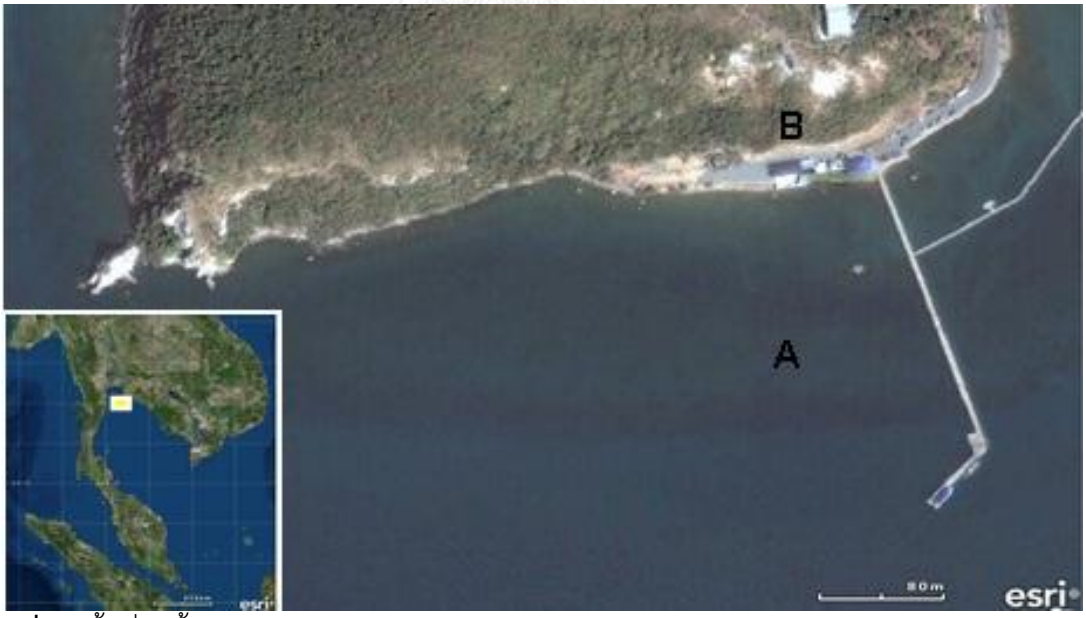
การอนุรักษ์ฟื้นฟูให้ได้ประสิทธิผลที่ดีควรเน้นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมไปพร้อมๆ กับการคงไว้ซึ่งพันธุกรรมที่ทนต่อสภาพแวดล้อมนั้นๆ และการขยายพื้นที่ของแนวปะการัง ซึ่งการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่ถูกต้องเหมาะสม ทำให้เห็นโครงสร้างทางพันธุกรรม การไหลของยีน ความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สามารถช่วยให้การจัดการและการอนุรักษ์ทรัพยากรปะการังให้มีความเหมาะสมกับพื้นที่ได้ดียิ่งขึ้น

บทที่ 3

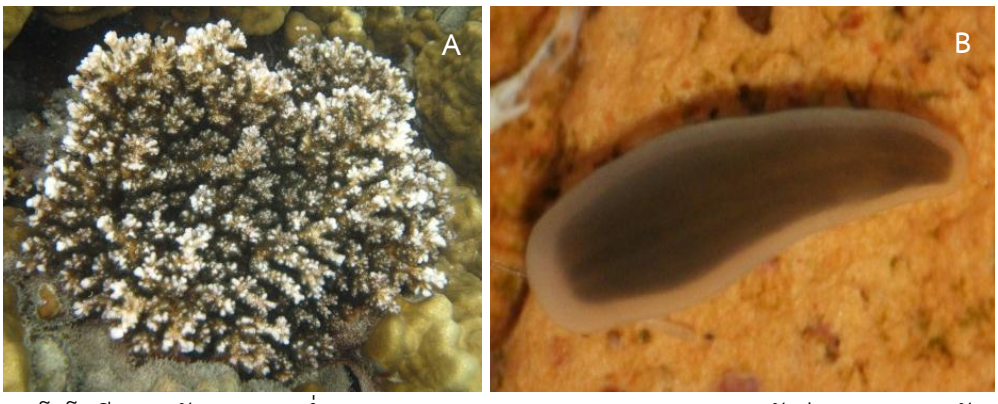
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พื้นที่ศึกษาและชนิดของปะการัง

พื้นที่เขาหมาจอ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (รูปที่ 6) อยู่ในเขตการดูแลของกองทัพเรือใกล้ชุมชนชาวประมง พื้นที่นี้ถูกใช้ประโยชน์ทางการเดินเรือทั้งในราชการของกองทัพเรือและเพื่อการท่องเที่ยว พื้นนี้พบปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* (รูปที่ 7) กระจายตัวอยู่ในแนวปะการังที่มีระดับน้ำค่อนข้างตื้น โดยมีอุณหภูมิน้ำสูงสุดประมาณ 31 องศาเซลเซียส และความเค็มประมาณ 28 PSU ปะการังชนิดนี้มีช่วงเวลาการปล่อยตัวอ่อนอยู่ในช่วงแรม 15 ค่ำ จนถึงช่วงขึ้น 13 ค่ำ ของทุกเดือน (Kuanui *et al.*, 2008)



รูปที่ 6 พื้นที่ดำน้ำเก็บตัวอย่างบริเวณแนวปะการังเขาหมาจอ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดย A คือ จุดดำน้ำเก็บตัวอย่าง (12° 35' 54.05" องศาเหนือ 100° 56' 54.20" องศาตะวันออก) และ B คือ โรงอนุบาลปะการัง (12° 35' 59.68" องศาเหนือ 100° 56' 57.10" องศาตะวันออก)

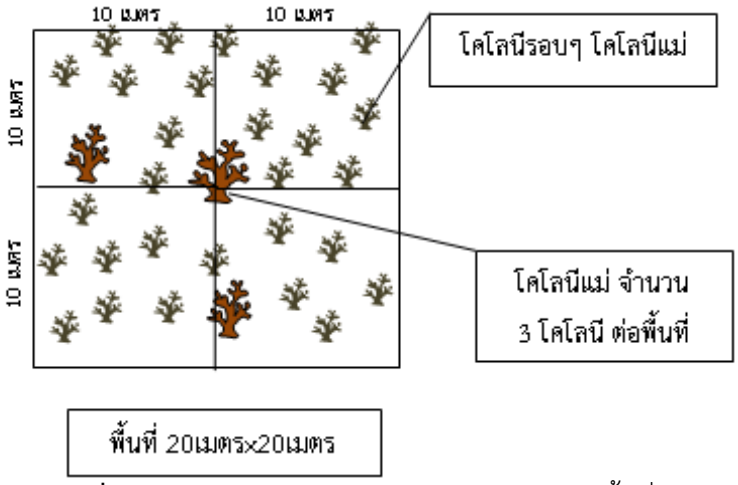


รูปที่ 7 โคโลนีปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* (A) และ ตัวอ่อนของปะการัง *P. damicornis* (B)

3.2 ขั้นตอนการศึกษา

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

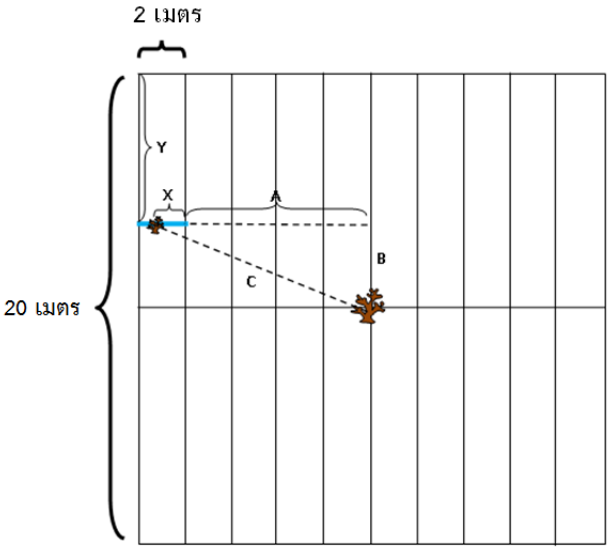
เก็บตัวอย่างปะการัง *P. damicornis* จากพื้นที่แนวปะการังเขาหมาจอในเดือนมีนาคม 2556 ช่วงแรม 15 ค่ำ ซึ่งเป็นช่วงปะการังปล่อยตัวอ่อน โดยระบุขอบเขตการวางแนวเก็บตัวอย่างรอบโคโลนีศูนย์กลางด้วยเชือกเป็นพื้นที่ 20X20 ตารางเมตร จำนวน 3 จุด ด้วยเครื่องกำหนดตำแหน่งบนพื้นโลก หรือ จีพีเอส (global positioning system) จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีแม่ (broodparent) ของปะการังดอกกะหล่ำจำนวน 3 โคโลนีในแต่ละจุด ทั้งนี้โคโลนีแม่ต้องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีไม่ต่ำกว่า 15 เซนติเมตร และมีตัวอ่อนพัฒนาอยู่ภายในโพลิป สุ่มวัดระยะห่างของโคโลนีปะการังชนิดนี้ที่กระจายตัวอยู่ในพื้นที่ของแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พร้อมระบุตำแหน่งและทำแผนที่ของทุกโคโลนีที่เก็บตัวอย่าง ดังรูปที่ 8 โดยใช้เข็มทิศกำหนดทั้งทิศทางและใช้ท่อพีวีซีที่มีมาตรวัดความยาววัดระยะทางที่ห่างจากโคโลนีแม่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความเป็นไปได้ในการเป็นพ่อพันธุ์และหาระยะทางที่เป็นไปได้ในการสืบพันธุ์ ขั้นตอนสุดท้ายคือ นำชิ้นส่วนของโคโลนีปะการังที่พร้อมปล่อยตัวอ่อนมาเลี้ยงในโรงอนุบาลปะการังที่อยู่บริเวณเขาหมาจอ เพื่อรอให้ปะการังปล่อยตัวอ่อน โดยระยะเวลาและปริมาณการปล่อยตัวอ่อนนั้นขึ้นอยู่กับแต่ละโคโลนี สุ่มเก็บตัวอ่อนที่ถูกปล่อยออกมาของแต่ละโคโลนี ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกเก็บรักษาไว้ด้วย 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 8 แผนการสุ่มเก็บตัวอย่างโคโลนีปะการังในพื้นที่

3.2.2 การทำแผนที่ระยะห่างระหว่างโคโลนีพ่อและโคโลนีแม่

ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างโดยใช้เชือกกำหนดขอบเขตพื้นที่เก็บตัวอย่างแต่ละจุดนั้น เชือกที่ใช้มีริบบิ้นผูกไว้เพื่อบอกระยะทุกๆ 10 เซนติเมตร มีก้อนตะกั่วถ่วงน้ำหนักเชือกไว้ให้ไม่เคลื่อนที่ และท่อพีวีซีความยาว 2 เมตร ที่ระบุระยะไว้ทุก 5 เซนติเมตร เพื่อใช้บันทึกระยะในรูปแบบ (x, y) และนำมาคำนวณค่าระยะห่างระหว่างโคโลนีแม่กับโคโลนีที่อยู่รอบๆ โดยดำน้ำสุ่มเก็บตัวอย่างปะการังทีละแถว แต่ละแถวมีพื้นที่ 2x20 ตารางเมตร ทั้งหมด 10 แถว เมื่อได้ค่าระยะทางระหว่างโคโลนีในแต่ละแถว ให้นำมาคำนวณตามทฤษฎีปีทากอรัส $C^2 = (X+A)^2 + B^2$ ซึ่งค่า C คือ ระยะห่างระหว่างโคโลนีแม่กับโคโลนีที่อยู่รอบๆ ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แผนที่การวัดระยะห่างระหว่างโคโลนีแม่กับโคโลนีที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่ โดยเส้นสีฟ้า คือ ท่อพีวีซีความยาว 2 เมตร ที่ระบุระยะทุก 5 เซนติเมตร เพื่อใช้ระบุระยะห่างของโคโลนีในแต่ละแถว

3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนปะการังมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ SpinClean Genomic DNA Purification Kit (m.biotech) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมที่ทางผู้ผลิตระบุไว้ ดัดแปลงบางขั้นตอน โดยก่อนชะล้างดีเอ็นเอให้ตากดีเอ็นเอคอลัมน์ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเปลี่ยนจากชะล้างด้วย elution buffer เป็น water (sigma) ส่วนดีเอ็นเอของตัวอ่อนสกัดด้วยเทคนิคการกำจัดเกลือ (salting out technique) (Miller *et al.*, 1988) ดัดแปลงโดยใส่ตัวอ่อนแต่ละตัวลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TNE buffer (pH 8.0) กับ 1% SDS 140 ไมโครลิตร และเติม proteinase K (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร นำตัวอย่างเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างออกมาที่อุณหภูมิห้อง เติม 6M NaCl 80 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที นำสารละลายใสด้านบนใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม 95% เอทิลแอลกอฮอล์ 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดทดลองไปมาเพื่อให้สารพันธุกรรมตกตะกอน นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เท 95% เอทิลแอลกอฮอล์ออกจากหลอดทดลองให้หมด แล้วเติม 70% เอทิลแอลกอฮอล์ 700 ไมโครลิตร พลิกหลอดทดลองไปมา นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูด 70% เอทิลแอลกอฮอล์ออกจากหลอดทดลอง ตากสารพันธุกรรมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติม TE buffer (pH 8.0) (0.01M Tris-HCl และ 1mM EDTA) 15 ไมโครลิตร เขย่าหลอดทดลองเพื่อให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอโดยการแยกขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (gel electrophoresis)

Chulalongkorn University

3.2.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำสารพันธุกรรมที่สกัดได้ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตร และ loading buffer 10X Ultra Power (ประกอบด้วยสารเรืองแสงภายใต้ UV 10,000X Ultra Power และ loading dye (สารละลายกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ และ Orange G) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100) 3 ไมโครลิตร แล้วนำมาโหลดลงใน 1.0% (w/v) Agarose gel พร้อมกับ DNA มาตรฐานที่รู้ปริมาณ ทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ความต่างศักย์คงที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำมาถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยเครื่อง Gel Documentation (Bio Rad) ภายใต้แสง UV เพื่อใช้ในการประเมินปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมที่สกัดได้

3.2.5 การทดสอบอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (gradient polymerase chain reaction; gradient PCR)

ในการศึกษานี้ได้เลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ซึ่งอยู่ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ อีกทั้งยังมีความเหมาะสมในการศึกษาเปรียบเทียบพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่และลูกดังที่กล่าวไว้ข้างต้น เครื่องหมายพันธุกรรมที่เลือกใช้นี้ถูกพัฒนาสำหรับ *Pocillopora* spp. จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ PV2 PV5 และ PV6 (Magalon *et al.*, 2004) และพัฒนาสำหรับ *Pocillopora damicornis* จำนวน 10 ตำแหน่ง (Pd2-001 จนถึง Pd3-010) (Starger *et al.*, 2008) ดังตารางที่ 3-1 ขั้นตอนนี้เป็นการทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมที่สุดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง โดยอุณหภูมิ annealing ที่ทดสอบอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส ส่วนประกอบพีซีอาร์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร 1x PCR mixture ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบประมาณ 10-20 นาโนกรัม KAPA *Taq* Readymix PCR Kit ของ Kapa Biosystems (KAPA *Taq* polymerase, Kapa *Taq* Buffer, 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM dNTPs) forward primer และ reverse primer อย่างละ 25 พิโคโมล ลำดับขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ annealing ช่วง 50-60 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที สุดท้ายจบด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3-1 เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส) อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส) และจำนวนของแอลลีลที่พบ (Na)

ตำแหน่ง	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' - 3')	รูปแบบเบสซ้ำ (STR motif)	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)	อุณหภูมิ Annealing ($^{\circ}$C)	จำนวนแอลลีลที่พบ (Na)
Pd-2001	CAGACTTGTCGGAATGAAAGC TTTTGTTTATAAGTCGATACAATGCA	$CA)_{11}$	158–173	56	5
Pd2-003	CCTCTTCCTGTTTGGGCTCT TCTGCATTACGTTTGTTTGACA	$(CA)_{16}$	198–202	56	3
Pd2-006	TCTCCATGTGATCGGCATT GTTCCCCCAGCTGAGAAGTT	$(CA)_{8}$	181–199	55	7
Pd2-007	AAGAAGGTGTGGTATTTCAGAGGG GGTGGATAAAGTATTTCTCACTCTTGG	(AC) imperfect	307–489	60	7
Pd3-002	ATCCGAATACAAGCGAAACG CAAAGCTTCTATCAGAAAATGCAA	$(AAC)_{10}$	195–243	56	10
Pd3-004	ACCAGACAGAAACACGCACA GCAATGTGTAACAGAGGTGGAA	$(ATG)_{8}$	193–201	55	4
Pd3-005	AGAGTGTGGACAGCGAGGAT GTTCCTTCGCCTTCGATTTT	$(TGA)_{9}$	162–187	55	3
Pd3-008	AGTTGAGGTTGTTGAAACATG TCCATGCAGAACCCC	$(CTG)_{7}$	153–162	60	4
Pd3-009	CCAATGCGTCCGTAGCTCTC ATCACCTAAAAATTTCAGTCCCTTACC	$(CAA)_{7}$, [88 bp insert], $(GAG)_{6}$	339–358	47	6
Pd3-010	CTGATCAACAAACTGGGAGGC TCATTAGAAATCATCTTGATTTGATAAGG	$(GTT)_{5}$, $(TGC)_{11}$	259–281	47	7
PV2	GCCAGGACCCATTTATACTCC TGCAGTGTTCTACTTGTCAGTGC	$(GA)_{20}$	130–196	56	7
PV5	GGTCATCACGCAAAGTTCC GAATAGCCTGCGTTTATTTGG	$(CA)_{11}$	221–255	56	12
PV6	CTTTCCCGACCAGTTTAGGG AGCCGTTCAGCTACCTATGG	$(GT)_{7}$	195–219	56	14

3.2.6 การทดสอบเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ที่เหมาะสม

เมื่อได้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์และอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมที่สุดจากหัวข้อ 3.2.5 ทำการเพิ่มปริมาณยีน โดยใช้ fluorescent primers ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ติด fluorescent dyes ที่ตำแหน่ง 5’ ของ ไพรเมอร์ มี 3 สี ดังนี้สีฟ้า (FAM) สีเขียว (HEX) หรือ สีเหลือง (TAMRA) ส่วนประกอบพีซีอาร์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร 1x PCR mixture ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบประมาณ 10-20 นาโนกรัม KAPA *Taq* Readymix PCR Kit ของ Kapa Biosystems (KAPA *Taq* polymerase, Kapa *Taq* Buffer, 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM dNTPs) forward primer (fluorescent) และ reverse primer อย่างละ 25 พิโคโมล ลำดับขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ annealing x* องศาเซลเซียส (x* ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่ใช้) 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที สุดท้ายจบด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.2.7 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณผลผลิตพีซีอาร์

ผลผลิตพีซีอาร์ 7 ไมโครลิตร ถูกผสมกับ loading buffer 10X Ultra Power (ประกอบด้วยสารเรืองแสงภายใต้ UV 10,000X Ultra Power และ loading dye (สารละลายกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ และ Orange G) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100) 3 ไมโครลิตร นำมาโหลดลงใน 1.5% (w/v) Agarose gel พร้อมกับ KAPA Universal DNA Ladder (Kapa Biosystems) แล้วทำการแยกขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ความต่างศักย์คงที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 55 นาที จากนั้นนำมาถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยเครื่อง Gel Documentation (BIO-RAD) ภายใต้แสง UV

3.2.8 การตรวจสอบจีโนไทป์และการวิเคราะห์ผล

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ตรวจสอบแล้วของทั้งโคโลนีแม่และตัวอ่อนถูกส่งไปตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่อง automated genotyping ABI3730XL ที่ Macrogen Inc. โดยส่งตัวอย่างที่เคยวิเคราะห์ผลแล้วไปเปรียบเทียบด้วยทุกครั้ง เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนในการระบุจีโนไทป์ในแต่ครั้ง ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMarker 2.0 ซึ่งโปรแกรมจะแสดงขนาดของไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอ เพื่อนำมาใช้ระบุจีโนไทป์ของตัวปะการังโคโลนีแม่และตัวอ่อนในแต่ละตำแหน่ง จีโนไทป์ของโคโลนีแม่และตัวอ่อนของแต่ละโคโลนีจะถูกนำมาเปรียบเทียบกันในไมโคแซตเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง เพื่อระบุรูปแบบการสืบพันธุ์ที่เป็นไปได้ของปะการังดอกกะหล่ำ และกำหนดจีโนไทป์ที่น่าจะเป็นไปได้ของโคโลนีพ่อ

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ตัวอย่างโคโลนีปะการังและตัวอ่อนปะการัง *P. damicornis*

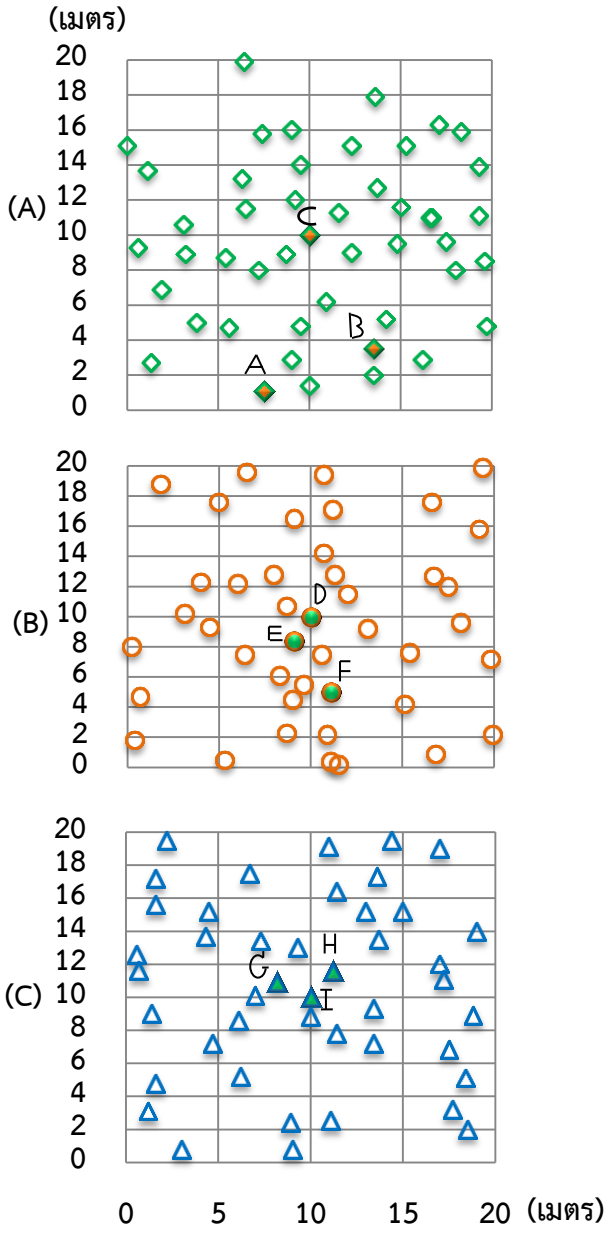
การเก็บตัวอย่างโคโลนีปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* โดยโคโลนีแม่นั้นเลือกเฉพาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 15 เซนติเมตร ส่วนโคโลนีปะการังที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่เลือกเฉพาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 เซนติเมตร เมื่อรวมทั้งโคโลนีแม่และโคโลนีที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่ในพื้นที่ศึกษาทั้ง 3 จุด มีจำนวน 47 ตัว 43 ตัว และ 44 ตัว ตามลำดับ ส่วนจำนวนตัวอ่อนของแต่ละโคโลนีแม่ทั้ง 9 โคโลนีที่วิเคราะห์จีโนไทป์มีจำนวนทั้งสิ้น 276 ตัว โดยเฉลี่ยโคโลนีละ 31$\pm$2.52 ตัว แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4- 1 จำนวนตัวอย่างโคโลนีปะการังทั้งโคโลนีแม่และโคโลนีรอบๆ โคโลนีแม่ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง และจำนวนตัวอ่อนที่ใช้วิเคราะห์จีโนไทป์ของแต่ละโคโลนีแม่

จุดเก็บตัวอย่าง	จุดที่ 1			จุดที่ 2			จุดที่ 3		
จำนวนโคโลนีทั้งหมด (โคโลนี)	47			43			44		
โคโลนีแม่	A	B	C	D	E	F	G	H	I
จำนวนตัวอ่อน (ตัว)	30	30	34	30	30	34	27	27	34

4.2 แผนที่ระยะห่างระหว่างโคโลนีแม่และโคโลนีที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่

เมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างโคโลนีที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่ โดยดำน้ำสุ่มเก็บตัวอย่างปะการังทีละแถว แต่ละแถวมีพื้นที่ 2x20 ตารางเมตร ทั้งหมด 10 แถว เมื่อได้ค่าระยะทางระหว่างโคโลนีในแต่ละแถวในรูปแบบ (x, y) โดยให้จุดกึ่งกลางของพื้นที่เป็น (0, 0) จากนั้นคำนวณตามทฤษฎีปีทากอรัส (หัวข้อที่ 3.2.2) นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟจะได้แผนภาพการกระจายตัวของโคโลนีปะการังที่ถูกเก็บตัวอย่างภายในพื้นที่ทั้ง 3 จุด ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แผนที่การกระจายตัวของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ในพื้นที่เก็บตัวอย่าง 3 จุด (A) จุดที่ 1 (B) จุดที่ 2 และ (C) จุดที่ 3 โดยจุดสีทึบ คือ โคโลนีแม่ และจุดไม่ทึบ คือ โคโลนีที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่

4.3 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์

การตรวจสอบจีโนไทป์ของโคโลนีแม่ทั้ง 9 โคโลนี ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมโครแซตเทลไลท์ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง พบว่าให้ผลผลิตพีซีอาร์เพียง 5 ตำแหน่ง ด้วยอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละตำแหน่ง โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับช่วงความยาวคู่เบสที่รายงานไว้ (Magalon *et al.*, 2004; Starger *et al.*, 2008) ยกเว้นในตำแหน่ง Pd3-004 ที่ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 156-162 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าที่รายงาน คือ 193-201 คู่เบส ทั้งนี้อาจเป็นไปได้เนื่องจากเป็นตัวอย่างจากกลุ่มประชากรต่างพื้นที่ ทำให้ขนาดของแอลลีลมีความแปรปรวน หลังจากนั้นเมื่อทราบขั้นตอนการทำพีซีอาร์ที่เหมาะสม ให้ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ทั้ง 5 ตำแหน่ง ที่ติดฟลูโอเรสเซ้นต์ไว้ที่ปลาย 5’ ของ forward primer ดังแสดงในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4- 2 เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส) และอุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)

ตำแหน่ง	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' - 3')	รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif)	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)	อุณหภูมิ Annealing (^{o}C)
Pd2-006	TCTCCATGTGATCGGCATT-HEX GTTCCCCCAGCTGAGAAGTT	$(CA)_8$	195	50.9
Pd3-004	ACCAGACAGAAACACGCACA-6FAM GCAATGTGTAACAGAGGTGGAA	$(ATG)_8$	156-162	54.3
Pd3-005	AGAGTGTGGACAGCGAGGAT–TAMRA GTTCCTTCGCCTTCGATTTT	$(TGA)_9$	204-234	59.0
Pd3-008	AGTTGAGGTTGTTGAAACATG-TAMRA TCCATGCAGAACCCC	$(CTG)_7$	162-165	57.0
PV2	GCCAGGACCCATTTATACTCC-6FAM TGCAGTGTTCTACTTGTCAGTGC	$(GA)_{20}$	128-170	56.0

4.4 ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์

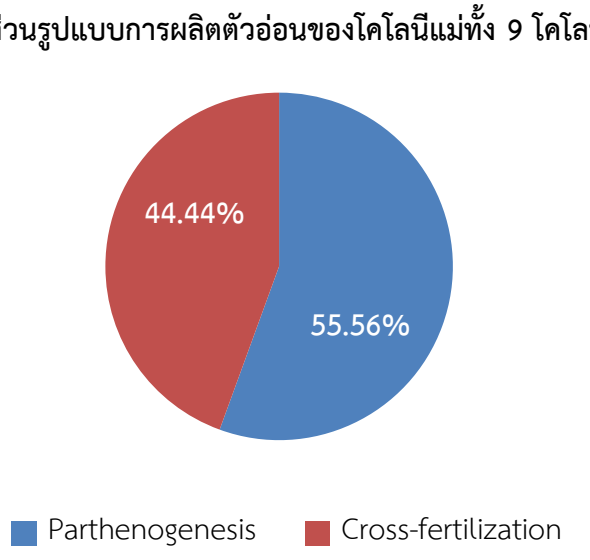
จากการสำรวจและวิเคราะห์จีโนไทป์ของโคโลนีแม่ทั้ง 9 โคโลนี และตัวอ่อนจากโคโลนีแม่ดังกล่าว โคโลนีละ 27-34 ตัว ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง พบว่า Pd2-006 มีแอลลีลเพียงขนาดเดียว คือ 195 คู่เบส แสดงผลเป็นโฮโมไซโกตทั้งในโคโลนีแม่และตัวอ่อนทุกโคโลนี ซึ่งไม่มีความหลากหลายของแอลลีลและจีไทป์ (monomorphism) จึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์การเข้าคู่ของยีนได้ ส่วนไมโครแซตเทลไลท์ตำแหน่งอื่นแสดงผลเป็นทั้งโฮโมไซโกตและเฮเทอโรโกต ทั้งนี้พบความหลากหลายของแอลลีลและจีโนไทป์มากที่สุดที่ตำแหน่ง Pd3-005 จำนวน 5 แอลลีล และ 7 จีโนไทป์ (ตารางที่ 4-3)

ตารางที่ 4- 3 เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ จำนวนของแอลลีลที่พบ (Na) แอลลีลที่พบ (คู่เบส) จีโนไทป์ที่พบ (คู่เบส) จำนวนของโคโลนีแม่ และจำนวนของตัวอ่อนแต่ละจีโนไทป์

ตำแหน่ง	จำนวนของแอลลีลที่พบ (Na)	แอลลีลที่พบ (คู่เบส)	จีโนไทป์ที่พบ (คู่เบส)	จำนวนของโคโลนีแม่ (โคโลนี)	จำนวนของตัวอ่อนแต่ละจีโนไทป์ (ตัว)
Pd2-006	1	195	195/195	9	276
Pd3-004	3	156	156/159	5	157
		159	159/159	2	70
		162	159/162	2	49
Pd3-005	5	204	204/234	1	30
		207	207/213	3	54
		213	207/219	-	1
		219	207/234	-	12
		234	213/213	-	1
		-	213/219	2	76
		-	213/234	3	102
Pd3-008	2	162	162/165	-	31
		165	165/165	9	245
PV2	3	128	128/158	2	168
		158	158/158	-	30
		170	158/170	7	78

4.5 รูปแบบการผลิตตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis*

ผลการเปรียบเทียบจีโนไทป์ระหว่างโคโลนีแม่ทั้ง 9 โคโลนีและตัวอ่อนของแต่ละโคโลนี ดังรูปที่ 11 พบว่า โคโลนีแม่ที่ผลิตตัวอ่อนที่มีจีโนไทป์เหมือนแม่ทุกตำแหน่งมีจำนวน 5 โคโลนี (55.56 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ โคโลนี A โคโลนี B โคโลนี F โคโลนี H และโคโลนี I และพบว่าไมโครแซตเทลไลท์ตำแหน่ง Pd3-004 Pd3-005 และ PV2 เป็นเฮเทอโรไซโกต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนเหล่านั้นได้รับการถ่ายทอดยีนในตำแหน่งดังกล่าวจากโคโลนีแม่ โดยไม่มีการเข้าคู่ของยีนกับโคโลนีอื่น ดังนั้นโคโลนีแม่ทั้ง 5 โคโลนีนี้ผลิตตัวอ่อนด้วยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เกิดจากเซลล์ไข่พัฒนาเป็นตัวอ่อนโดยที่ไม่ได้รับการผสมจากเซลล์สเปิร์ม ส่วนอีก 4 โคโลนี (44.45 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ โคโลนี C โคโลนี D โคโลนี E และโคโลนี G ไมโครแซตเทลไลท์บางตำแหน่งมีแอลลีลของตัวอ่อนที่แตกต่างจากโคโลนีแม่ โดยพบว่าตัวอ่อนของโคโลนี C และโคโลนี E มีรูปแบบจีโนไทป์ทั้งสิ้นโคโลนีละ 8 แบบ ส่วนตัวอ่อนของโคโลนี D และโคโลนี G มีรูปแบบจีโนไทป์ทั้งสิ้นโคโลนีละ 3 แบบ ดังตารางที่ 4-4 แสดงว่าเกิดการเข้าคู่ของไมโครแซตเทลไลท์ในตำแหน่งดังกล่าวระหว่างโคโลนีแม่กับโคโลนีอื่น ตัวอ่อนจากทั้ง 4 โคโลนีจึงน่าจะเป็นตัวอ่อนที่ถูกผลิตจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (ตารางที่ 4-5)



รูปที่ 11 กราฟแสดงสัดส่วนของรูปแบบการสืบพันธุ์ของการผลิตตัวอ่อนในโคโลนีแม่ทั้ง 9 โคโลนี

ตารางที่ 4- 4 จีโนไทป์ของโคโลนีแม่และตัวอ่อนปะการังในแต่ละตำแหน่ง

	จีโนไทป์ในแต่ละตำแหน่งไมโครแซตเทลไลท์					จำนวนของตัวอ่อน (ตัว)
	Pd2-006*	Pd-3004	Pd3-005	Pd3-008	PV2	
โคโลนีแม่ A	195/195	159/159	213/219	165/165	128/158	
ตัวอ่อน A-1	195/195	159/159	213/219	165/165	128/158	30
					รวม	*30*
โคโลนีแม่ B	195/195	159/159	213/219	165/165	128/158	
ตัวอ่อน B-1	195/195	159/159	213/219	165/165	128/158	30
					รวม	*30*
โคโลนีแม่ C	195/195	156/159	207/213	165/165	158/170	
ตัวอ่อน C-1	195/195	156/159	207/213	165/165	158/170	1
ตัวอ่อน C-2	195/195	156/159	213/*234*	165/165	158/170	6
ตัวอ่อน C-3	195/195	156/159	213/*219*	165/165	*128*/158	7
ตัวอ่อน C-4	195/195	*159*/159	213/*219*	165/165	*128*/158	9
ตัวอ่อน C-5	195/195	*159*/159	213/*234*	165/165	*128*/158	1
ตัวอ่อน C-6	195/195	156/*162*	207/213	165/165	158/170	2
ตัวอ่อน C-7	195/195	156/*162*	207/213	165/165	158/170	7
ตัวอ่อน C-8	195/195	156/*162*	207/213	165/165	*128*/158	1
					รวม	*34*
โคโลนีแม่ D	195/195	156/162	204/234	165/165	158/170	
ตัวอ่อน D-1	195/195	156/*159*	204/234	165/165	158/170	6
ตัวอ่อน D-2	195/195	156/*159*	204/234	165/165	158/*158*	5
ตัวอ่อน D-3	195/195	156/*159*	204/234	*162*/165	158/*158*	19
					รวม	*30*
โคโลนีแม่ E	195/195	156/162	207/213	165/165	158/170	
ตัวอ่อน E-1	195/195	156/162	207/213	165/165	158/170	14
ตัวอ่อน E-2	195/195	156/162	207/*219*	165/165	158/170	1
ตัวอ่อน E-3	195/195	156/162	207/213	165/165	156/*158*	2
ตัวอ่อน E-4	195/195	156/*159*	207/213	165/165	156/*158*	1
ตัวอ่อน E-5	195/195	156/162	207/213	*162*/165	158/170	8
ตัวอ่อน E-6	195/195	156/162	*213*/213	*162*/165	158/170	1
ตัวอ่อน E-7	195/195	156/162	207/213	162/165	156/*158*	2
ตัวอ่อน E-8	195/195	156/*159*	207/213	*162*/165	156/*158*	1

	จีโนไทป์ในแต่ละตำแหน่งไมโครแซตเทลไลท์					จำนวนของตัวอ่อน (ตัว)
	Pd2-006*	Pd-3004	Pd3-005	Pd3-008	PV2	
					รวม	*30*
โคโลนีแม่ F	195/195	156/159	213/234	165/165	158/170	
ตัวอ่อน F-1	195/195	156/159	213/234	165/165	158/170	34
					รวม	*34*
โคโลนีแม่ G	195/195	156/162	207/213	165/165	159/170	
ตัวอ่อน G-1	195/195	156/162	207/213	165/165	159/170	11
ตัวอ่อน G-2	195/195	156/*159*	207/213	165/165	159/170	4
ตัวอ่อน G-3	195/195	156/*159*	207/*234*	165/165	159/170	12
					รวม	*34*
โคโลนีแม่ H	195/195	156/159	213/234	165/165	159/170	
ตัวอ่อน H-1	195/195	156/159	213/234	165/165	159/170	34
					รวม	*34*
โคโลนีแม่ I	195/195	156/159	213/236	165/165	159/170	
ตัวอ่อน I-1	195/195	156/159	213/236	165/165	159/170	34
					รวม	*34*

* คือ ตำแหน่งที่เป็นโฮโมไซโกต และตัวเอียงขีดเส้นใต้ คือ แอลลีลที่ได้รับจากโคโลนีพ่อ

ตารางที่ 4- 5 แอลลีลของตัวอ่อนที่แตกต่างจากแอลลีลของโคโลนีแม่ซึ่งได้รับการถ่ายทอดจากโคโลนีพ่อ

Brooder	ขนาดของแอลลีลตัวอ่อนที่แตกต่างจากแอลลีลของโคโลนีแม่			
	Pd3-004	Pd3-005	Pd3-008	PV2
Brooder C	162	219, 234	*ND*	128
Brooder D	159	*ND*	162	*ND*
Brooder E	159	219	162	*ND*
Brooder G	159	234	*ND*	*ND*

ND ไม่พบแอลลีลที่แตกต่างจากของโคโลนีแม่

4.6 จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อ

จากการวิเคราะห์จีโนไทป์ของโคโลนีแม่และตัวอ่อน รวมถึงแอลลีลของตัวอ่อนที่แตกต่างจากโคโลนีแม่ทั้ง 4 โคโลนี เพื่อคาดคะเนจีโนไทป์ของโคโลนีพ่อและรูปแบบการผลิตตัวอ่อนที่เป็นไปได้ทั้งหมดปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ในพื้นที่ศึกษานี้ จะพบว่าตัวอ่อนที่มีจีโนไทป์เหมือนโคโลนีแม่อาจจะเกิดมาจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศหรือแบบอาศัยเพศ (ตารางที่ 4-4) โดยจีโนไทป์ของโคโลนีพ่อที่เป็นไปได้ของแต่ละโคโลนีแม่ในแต่ละตำแหน่งแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4- 6 จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อที่เป็นไปได้ในแต่ละตำแหน่งไมโครแซตเทลไลท์

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง
โคโลนี C	Pd3-004	156/159	156/159	156/156	-
				156/159	156/159
				159/159	159/159
			159/162	156/159	156/159
				159/159	159/159
				156/162	156/162
				159/162	-
	Pd3-005	207/213	207/219	207/207	-
				207/213	207/213
				207/219	-
				213/219	213/219
			207/234	207/207	-
				207/213	207/213
				207/234	-
				213/234	213/234
			213/219	207/213	207/213
				213/213	-
				207/219	-

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง
				213/219	213/219
			213/234	207/213	207/213
				213/213	-
				213/234	213/234
				207/234	-
	PV2	158/170	128/158	128/158	128/158
				158/158	-
				128/170	-
				158/170	158/170
			128/170	128/158	128/158
				128/170	-
				158/170	158/170
				170/170	-
โคโลนี D	Pd3-004	156/162	159/159	156/159	156/159
				159/162	-
	Pd3-008	165/165	162/165	162/165	162/165
				165/165	165/165
	PV2	158/170	158/158	158/158	158/158
				158/170	158/170
โคโลนี E	Pd3-004	156/162	156/159	156/156	-
				156/159	156/159
				156/162	156/162
				159/162	-
			159/162	156/159	156/159
				156/162	156/162
				159/162	-
				162/162	-
	Pd3-005	207/213	213/219	207/213	207/213
				213/213	213/213

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง
				207/219	207/219
				213/219	-
	Pd3-008	165/165	162/165	162/165	162/165
				165/165	165/165
	PV2	158/170	158/158	158/158	158/158
				158/170	158/170
โคโลนี G	Pd3-004	156/162	156/159	156/156	-
				156/159	156/159
				156/162	156/162
				159/162	-
			159/162	156/159	156/159
				156/162	156/162
				159/162	-
				162/162	-
	Pd3-005	207/213	207/234	207/207	-
				207/213	207/213
				207/234	207/234
				213/234	-
			213/234	207/213	207/213
				213/213	-
				207/234	207/234
				213/234	-

โคโลนี C มีตำแหน่งที่ตัวอ่อนมีจีโนไทป์ที่แตกต่างจากโคโลนีแม่ ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของโคโลนีพ่อได้จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ Pd3-004 Pd3-005 และ PV2 โดยเมื่อพิจารณาจีโนไทป์ของตัวอ่อนทุกตัวในตำแหน่ง Pd3-005 พบว่า ตัวอ่อนมีแอลลีลต่างจากโคโลนีแม่ 2 แอลลีล (219 และ 234) แสดงว่า ตัวอ่อนที่เกิดจากโคโลนีแม่ C นี้ เกิดจากการผสมของโคโลนีพ่อ 2 โคโลนี (multiple mating) ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ทั้งหมด 4 คู่ ได้แก่ 207/219+217/234 213/219+213/234 207/219+213/234 และ 207/234+213/219 เมื่อ Pd3-005 แสดงการเข้าผสมของโคโลนีพ่อ 2 โคโลนี ดังนั้นตำแหน่ง Pd3-004 และ PV2 แสดงการเข้าผสมของโคโลนีพ่อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2 โคโลนีเช่นกัน โดยจีโนไทป์ของโคโลนีพ่อในตำแหน่ง Pd3-004 คือ 156/159 และ159/162 ส่วนในตำแหน่ง PV2 คือ 128/158 และ 128/170 (ตารางที่ 4-6)

โคโลนี D มีตำแหน่งที่สามารถวิเคราะห์จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อจำนวน 3 ตำแหน่ง คือ Pd3-004 Pd3-008 และ PV2 โดยเมื่อพิจารณาจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริงกับจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้จากการเข้าคู่ของโคโลนีแม่และของโคโลนีพ่อที่เป็นไปได้ทั้งหมดในทุกตำแหน่ง (ภาคผนวก ข) พบว่า จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อที่เป็นไปได้มีเพียงแบบเดียว ดังตารางที่ 4-6 แสดงว่าตัวอ่อนของโคโลนีแม่นี้เกิดจากการเข้าผสมของโคโลนีพ่อเพียงโคโลนีเดียว (single mating) โดยจีโนไทป์ของโคโลนีพ่อในตำแหน่ง Pd3-004 Pd3-008 และ PV2 ได้แก่ 159/159 162/165 และ 158/158 ตามลำดับ

โคโลนี E มีตำแหน่งที่สามารถวิเคราะห์จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อจำนวน 4 ตำแหน่ง คือ Pd3-004 Pd3-005 Pd3-008 และ PV2 ซึ่งเมื่อพิจารณาจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริงกับจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้จากการเข้าคู่ของโคโลนีแม่และของโคโลนีพ่อที่เป็นไปได้ทั้งหมดในตำแหน่ง Pd3-005 Pd3-008 และ PV2 พบว่า จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อที่เป็นไปได้มีเพียงแบบเดียว แสดงว่าตัวอ่อนของโคโลนีแม่นี้เกิดจากการเข้าผสมของโคโลนีพ่อเพียงโคโลนีเดียว (single mating) โดยจีโนไทป์ของโคโลนีพ่อในตำแหน่ง Pd3-005 Pd3-008 และ PV2 ได้แก่ 213/219 162/165 และ 158/170 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาตัวอ่อนในตำแหน่ง Pd3-004 พบว่า จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อเป็นไปได้ 2 แบบ คือ 156/159 หรือ 159/162 ซึ่งยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดเนื่องจากพบว่ามีจีโนไทป์ของตัวอ่อนไม่ปรากฏในตัวอ่อนที่ทำการสำรวจ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก null alleles หรือจำนวนตัวอ่อนที่สำรวจในแต่ละโคโลนีแม่มีจำนวนน้อยไป ยกเว้นในตำแหน่ง Pd3-008 ที่ไม่พบ null alleles

Chulalongkorn University

ส่วนโคโลนี G มีตำแหน่งที่สามารถวิเคราะห์จีโนไทป์ของโคโลนีพ่อเพียง 2 ตำแหน่ง คือ Pd3-004 และ Pd3-005 โดยทั้งสองตำแหน่งพบว่าตัวอ่อนนั้นได้รับแอลลีลจากโคโลนีพ่อ 1 โคโลนี แสดงว่าตัวอ่อนของโคโลนี E อาจเกิดจากการผสมของโคโลนีพ่อที่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซโกตเพียงโคโลนีเดียว ทั้งนี้มีจีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ 2 แบบ โดยในตำแหน่ง Pd3-004 คือ 156/159 หรือ 159/162 ส่วนในตำแหน่ง Pd3-005 คือ 207/234 หรือ 213/234

อย่างไรก็ตามพบว่า ทุกโคโลนีมีจีโนไทป์ของตัวอ่อนไม่ปรากฏในตัวอ่อนที่ทำการสำรวจ ดังตารางที่ 4-5 ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก null alleles ที่สามารถพบได้ในการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ หรืออาจเกิดจากจำนวนตัวอ่อนที่สำรวจในแต่ละโคโลนีแม่นั้นมีจำนวนน้อยไป

4.7 ระยะทางการเข้าผสมจากสเปิร์ม

จากแผนภาพการกระจายตัวของโคโลนีที่อยู่รอบๆ โคโลนีแม่ที่ผลิตตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (รูปที่ 10) พบว่า ระยะที่เป็นไปได้ในการรับสเปิร์มระยะที่ใกล้สุดและระยะไกลสุดของโคโลนี C โคโลนี D โคโลนี E และโคโลนี G แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4- 7 ระยะที่เป็นไปได้ในการรับสเปิร์มระยะที่ใกล้สุดและระยะไกลสุดของโคโลนีแม่ที่พบตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

โคโลนีแม่	ระยะที่ใกล้สุด (เมตร)	ระยะไกลสุด (เมตร)
โคโลนี C	2.45±0.82	10.86±0.50
โคโลนี D	2.32±0.67	16.12±1.11
โคโลนี E	1.52±0.77	12.22±1.11
โคโลนี G	2.61±0.69	11.62±0.42

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ

การศึกษารูปแบบการผลิตตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* โคโลนีแม่จำนวน 9 โคโลนี และตัวอ่อนทั้งหมด 276 ตัว (เฉลี่ยโคโลนีละ 31±2.52 ตัว) ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์จำนวน 5 ตำแหน่ง โดยในตำแหน่ง Pd3-004 ให้ผลพีซีอาร์ที่มีขนาดต่างจากที่รายงานไว้ (Magalon *et al.*, 2004; Starger *et al.*, 2008) ทั้งนี้เนื่องจากเป็นตัวอย่างเป็นกลุ่มประชากรจากคนละพื้นที่ และไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอยังมีความแปรปรวนของยีนสูง จึงพบความแตกต่างของขนาดไมโครแซตเทลไลท์ได้ (Miller and Ayre, 2004; Starger *et al.*, 2008; Yeoh and Dai, 2010) เมื่อนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ระหว่างโคโลนีแม่และตัวอ่อน พบว่าตำแหน่ง Pd2-006 มีเพียงแอลลีลขนาดเดียว โดยแสดงจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส ทำให้เครื่องหมายในตำแหน่งนี้ไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์รูปแบบการผลิตตัวอ่อนได้ เนื่องจากไม่ทราบแน่ชัดว่าจีโนไทป์ของตัวอ่อนนั้นเกิดการเข้าคู่ของยีนหรือไม่ โดยไมโครแซตเทลไลท์อีก 4 ตำแหน่ง คือ Pd3-004 Pd3-005 Pd3-008 และ PV2 พบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์รูปแบบการผลิตตัวอ่อนในปะการัง *P. damicornis* ได้

5.1 ตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

เมื่อตรวจสอบรูปแบบการผลิตตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ในบริเวณพื้นที่เขาหมาจอ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยเก็บตัวอย่างโคโลนีแม่ทั้งหมด 9 โคโลนี พบว่าโคโลนีแม่จำนวน 5 โคโลนี (คิดเป็น 55.56 เปอร์เซ็นต์) มีรูปแบบการผลิตตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หรือ การพัฒนาจากเซลล์ไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม แสดงว่าในพื้นที่นี้มีรูปแบบการสร้างตัวอ่อนแบบไม่อาศัยเพศเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งอัตราการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นหลักมักพบได้ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มแอนโทซัว (Anthozoan) เช่น ดอกไม้ทะเล เป็นต้น (Harrison and Wallace, 1990) โดยการศึกษารูปแบบการสร้างตัวอ่อนแบบไม่อาศัยเพศของปะการังกลุ่ม *Pocillopora* รวมถึง *Pocillopora damicornis* ในประเทศออสเตรเลีย ญี่ปุ่น และไต้หวัน พบสัดส่วนการสร้างตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสูงกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (Ayre and Resing, 1986; Starger *et al.*, 2008; Stoddart, 1983; Stoddart, 1984a, b; Yeoh and Dai, 2010) อีก

ทั้งปะการังชนิดนี้ที่กระจายตัวอยู่ในบริเวณชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ซึ่งมีรูปแบบการสืบพันธุ์โดยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ผสมกันในมวลน้ำ และตัวอ่อนพัฒนาอยู่ภายนอกโคโลนี ไม่พบการสร้างตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Ayre and Miller, 2006; Ayre and Resing, 1986; Gleason and Hofmann, 2011)

สาเหตุที่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นส่วนใหญ่ อาจเป็นผลมาจากขนาดของโคโลนีแม่ โดยโคโลนีแม่ที่เก็บมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่มากกว่า 15 เซนติเมตรที่ขึ้นไป ซึ่งมีรายงานว่าในปะการัง *P. damicornis* โคโลนีแม่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่มากกว่า 10 เซนติเมตรที่ขึ้นไปจะมีปริมาณการผลิตตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสูงขึ้นตามขนาดของโคโลนี อีกทั้งยังมีรายงานว่าปะการังชนิดนี้มักจะสร้างตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในระยะแรกของวงจรชีวิต เพื่อขยายพื้นที่แนวปะการังและเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม หลังจากนั้นเมื่อปรับตัวเติบโตขึ้นในสภาวะแวดล้อมหนึ่งได้ก็จะเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพิ่มมากขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมในพื้นที่นั้นๆ (Ayre and Miller, 2004; Chávez-Romo *et al.*, 2008; Combosch and Vollmer, 2013; Paz-García *et al.*, 2012)

นอกจากขนาดของโคโลนีจะส่งผลต่อสัดส่วนรูปแบบการสร้างตัวอ่อน สภาพแวดล้อมภายในพื้นที่ก็เป็นสาเหตุสำคัญต่อรูปแบบการทดแทนประชากรในพื้นที่ โดยพื้นที่ที่ถูกรบกวน เช่น พื้นที่ที่เกิดพายุ เป็นต้น จะส่งผลให้ประชากรลดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เนื่องจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะช่วยฟื้นฟูประชากรในพื้นที่ที่ถูกรบกวนได้รวดเร็วกว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่ต้องอาศัยระยะเวลาพร้อมของเซลล์สืบพันธุ์ และระยะเวลาในการเติบโต (Ayre and Resing, 1986; Chávez-Romo *et al.*, 2008; Combosch *et al.*, 2008; Harrison and Wallace, 1990; Paz-García *et al.*, 2012; Stoddart, 1984a; Whitaker, 2006) ซึ่งปะการังในพื้นที่นี้นั้นอยู่ในเขตที่ระดับน้ำตื้นทำให้ได้รับปริมาณแสงมาก และอุณหภูมิน้ำค่อนข้างสูงในช่วงเดือนเมษายน การคงไว้ซึ่งพันธุกรรมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมดังกล่าวจะช่วยให้ปะการังชนิดนี้อยู่รอดได้ นอกจากนั้นปะการังที่สร้างตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น *Acropora perifera* และ *Tubastrea diaphana* ยังมีข้อได้เปรียบคือแม้ว่าตัวอ่อนที่ได้จะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนโคโลนีแม่ แต่ตัวอ่อนเหล่านั้นมีโอกาสเกิดการวิวัฒนาการในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ ซึ่งต่างจากการสืบพันธุ์จากการแตกหักของกิ่ง หรือการแบ่งตัวจากโคโลนีแม่ ที่โคโลนีใหม่จะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับโคโลนีเดิมทุกประการ (Ayre and Miller, 2006; Ayre and Resing, 1986)

5.2 ตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

เมื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ของโคโลนีแม่และตัวอ่อนรวมถึงแอลลีลของตัวอ่อนที่แตกต่างจากโคโลนีแม่นั้นๆ เพื่อคาดคะเนจีโนไทป์ของโคโลนีพ่อและรูปแบบการผลิตตัวอ่อนที่เป็นไปได้ในปะการังชนิดนี้ พบว่า โคโลนีแม่ 4 โคโลนีมีตัวอ่อนมีจีโนไทป์ต่างออกไป คือ โคโลนี C โคโลนี D โคโลนี E และโคโลนี G แสดงว่า *P. damicornis* ในพื้นที่นี้มีรูปแบบการผลิตตัวอ่อนแบบอาศัยเพศ (44.44 เปอร์เซ็นต์) โดยโคโลนีที่ผลิตตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนี้เป็นไปได้ทั้งได้รับเซลล์สเปิร์มจากโคโลนีพ่อเพียงโคโลนีเดียว (จำนวน 3 โคโลนีแม่) หรือจากโคโลนีพ่อมากกว่า 1 โคโลนี (จำนวน 1 โคโลนีแม่) ซึ่งการผลิตตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์รูปแบบนี้จะช่วยเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรได้ เนื่องจากตัวอ่อนเหล่านั้นเกิดจากการเข้าคู่ของยีน ซึ่งทำให้เกิดเฮเทอโรไซโกตเพิ่มขึ้นได้ (Gleason and Hofmann, 2011; Harrison and Wallace, 1990)

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบรูปแบบการผลิตตัวอ่อนจากการผสมพันธุ์ภายในโคโลนีเดียวกันของประชากรปะการัง *P. damicornis* การผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีดังกล่าวมักจะเกิดขึ้นภายใต้สภาพพื้นที่ที่ปะการังชนิดนั้นมีประชากรน้อยและกระจายตัวอยู่ห่างกัน (isolated area) ทำให้โอกาสที่จะได้รับสเปิร์มจากโคโลนีอื่นมีน้อย ดังรายงานที่พบในปะการัง *Acropora* (*Isopora*) *brueggemanni* (Okubo *et al.*, 2007) สำหรับ *P. damicornis* ไม่พบการผสมพันธุ์ภายในโคโลนีเดียวกันนั้นอาจเป็นเพราะ *P. damicornis* เลือกที่จะใช้การผลิตตัวอ่อนด้วยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแทน เมื่อต้องอาศัยอยู่ในสภาพพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งการผลิตตัวอ่อนด้วยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสามารถเกิดขึ้นได้ง่ายกว่า โดยไม่ต้องรอความพร้อมของสเปิร์มและไข่ในเวลาเดียวกัน หรือรอการเข้าผสมของเสปิร์มจากโคโลนีข้างเคียง (Combosch and Vollmer, 2013; Gleason and Hofmann, 2011; Hagedorn *et al.*, 2006; Kuanui *et al.*, 2008; Richmond and Jakiel, 1984; Starger *et al.*, 2008; Stoddart and Black, 1985) อีกทั้งตัวอ่อนที่เกิดจากการจากการผสมพันธุ์ภายในโคโลนีเดียวกันนั้นมีอัตราการรอดและการลงเกาะต่ำ (Carlon, 1999)

5.3 รูปแบบการสืบพันธุ์กับการอนุรักษ์ปะการัง *P. damicornis*

การอนุรักษ์ฟื้นฟูทรัพยากรอย่างถูกวิธี นอกจากควรศึกษาสภาพพื้นที่และสิ่งแวดล้อมภายในพื้นที่นั้นๆ การศึกษาโครงสร้างของประชากรก็มีส่วนช่วยให้การวางแผนอนุรักษ์มีประสิทธิผลมากขึ้น ซึ่งการศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นสามารถทำให้ทราบถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรโดยรวมได้ ปะการัง *P. damicornis* พบกระจายตัวอยู่ในแนวปะการังโดยทั่วไปในเขตเส้นศูนย์สูตร อีกทั้งมีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม

ได้น้อยกว่าปะการังหลายกลุ่ม เช่น *Acropora* spp. *Platygyra* spp. และ *Porites* spp. เป็นต้น ปะการังชนิดนี้สามารถผลิตตัวอ่อนได้ทั้งจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศในช่วงเวลาเดียวกัน แต่สัดส่วนของรูปแบบการสร้างตัวอ่อนทั้ง 2 แบบ จะแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่และขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัยดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น (Combosch *et al.*, 2008; Combosch and Vollmer, 2013; H. Fukami *et al.*, 2003; Miller and Ayre, 2004; Sier and Olive, 1994; Smith-Keune and Van Oppen, 2006)

การอนุรักษ์ปะการังชนิดนี้สามารถทำได้ทั้งจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งโดยมากนิยมใช้วิธีแบ่งกิ่ง ซึ่งจะเป็นการคงไว้ซึ่งลักษณะพันธุกรรมที่เหมาะสมของโคโลนีเดิม และแบบอาศัยเพศในปะการังชนิดนี้สามารถทำได้โดยการอนุบาลตัวอ่อน จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าว่า ตัวอ่อนที่ศึกษาส่วนใหญ่ถูกผลิตจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นการอนุรักษ์ประชากรปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ในพื้นที่เขาหมาจอ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี สามารถทำได้ทั้งวิธีแบ่งกิ่งและการอนุบาลตัวอ่อน เนื่องด้วยการแบ่งกิ่งจะช่วยในเรื่องการเพิ่มจำนวนของโคโลนีได้รวดเร็วและในแง่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมก็ไม่ต่างจากการใช้โคโลนีที่ได้จากการอนุบาลตัวอ่อนที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) ส่วนการนำตัวอ่อนมาอนุบาลนั้นจะได้ผลดีหากตัวอ่อนนั้นเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เพราะถึงแม้ว่าจะใช้เวลาที่นานกว่า แต่จะเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมให้แก่ประชากรปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ได้ อย่างไรก็ตาม หากมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปะการังดอกกะหล่ำในพื้นที่ดังกล่าว จะทำให้ทราบว่าควรใช้ตัวอ่อนหรือกิ่งจากโคโลนีใดเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมให้แก่ประชากรปะการังในพื้นที่ (Baums, 2008a; Baums, 2008b; D'croz and Mat, 2004)

Chulalongkorn University

5.4 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริงกับจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้ทั้งหมด ปรากฏว่าไม่พบบางจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก null alleles คือ แอลลีลที่ควรพบกลับไม่ปรากฏในจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่สำรวจ ซึ่งพบได้ในการศึกษาด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลท์ (Chapuis and Estoup, 2007; Dakin and Avise, 2004) โดยอาจเกิดจากจำนวนตัวอ่อนที่สำรวจของแต่ละโคโลนีแม่มีจำนวนน้อยเกินไป ซึ่งจำนวนตัวอ่อนที่ศึกษาในแต่ละโคโลนีมีจำนวนเฉลี่ยเพียง 31 ± 2.52 ตัวต่อโคโลนีแม่ ทั้งนี้หากศึกษาในจำนวนที่มากขึ้นอาจทำให้แอลลีลที่ไม่พบนั้นปรากฏขึ้น อาจทำให้เห็นรูปแบบการผลิตตัวอ่อนและสัดส่วนการสืบพันธุ์ที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

ถึงแม้ว่าในการศึกษานี้จะแสดงข้อมูลรูปแบบการสร้างตัวอ่อนของปะการัง *P. damicornis* แต่การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรภายในพื้นที่ จะทำให้ทราบรูปแบบการสืบพันธุ์และการทดแทนประชากรในภาพรวม นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิเคราะห์หาโคโลนีที่มีโอกาสเป็นโคโลนีพ่อเพื่อระบุว่าตัวอ่อนที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น เกิดจากการเข้าสืบพันธุ์จากโคโลนีพ่อเพียงโคโลนีเดียวหรือจากโคโลนีพ่อมากกว่า 1 โคโลนี เพื่ออระบุว่าโคโลนีใดมีโอกาสเป็นโคโลนีพ่อและสามารถหาระยะเข้าสืบพันธุ์ได้ ซึ่งการศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ที่ชัดเจนทำให้เห็นโครงสร้างทางพันธุกรรม การไหลของยีน ความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สามารถช่วยให้การจัดการและการอนุรักษ์ทรัพยากรปะการังให้มีความเหมาะสมกับพื้นที่ได้ดียิ่งขึ้น (Souter *et al.*, 2009; Starger *et al.*, 2008; Whitaker, 2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Adjeroud, M. and Tsuchiya, M. 1999. Genetic variation and clonal structure in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* in the Ryukyu Archipelago, southern Japan. Marine Biology 134: 753-760.

Ayre, D.J. and Miller, K.J. 2004. Where do clonal coral larvae go? Adult genotypic diversity conflicts with reproductive effort in the brooding coral *Pocillopora damicornis*. Marine Ecology Progress Series 277: 95–105.

Ayre, D.J. and Miller, K.J. 2006. Random mating in the brooding coral *Acropora palifera*. Marine Ecology Progress Series 307: 155–160.

Ayre, D.J. and Resing, J.M. 1986. Sexual and asexual production of planulae in reef corals. Marine Biology 90: 187-190.

Baums, I.B. 2008a. A restoration genetics guide for coral reef conservation. Molecular Ecology 17: 2796-2811.

Baums, I.B. 2008b. A synopsis of coral restoration genetics, Vol. 2. Public Aquarium Husbandry Series.

Benzie, J.A.H., Haskell, A. and Lehman, H. 1995. Variation in the genetic composition of coral (*Pocillopora damicornis* and *Acropora palifera*) populations from different reef habitats. Marine Biology 121: 731-739.

Bowden-Kerby, A. 2003. Coral transplantation and restocking to accelerate the recovery of coral reef habitats and fisheries resources within no-take marine protected areas: hands-on approaches to suport community-based coral reef management. In The second international tropical marine ecosystems management symposium (ITMEMS 2). Manilla, Philippines.

Brazeau, D.A., Gleason, D.F. and Morgan, M.E. 1998. Self-fertilization in brooding hermaphroditic Caribbean corals: Evidence from molecular markers. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 231: 225-238.

Brooker, R. 2009. Genetics analysis and principles, 3 edn. New York. McGraw-Hill. 546.

Carlon, D.B. 1999. The evolution of mating systems in tropical reef corals. Trends in

Ecology and Evolution 14: 491-495.

Chapuis, M.P. and Estoup, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution 24: 621-631.

Chávez-Romo, H.E., Correa-Sandoval, F., Paz-García, D.A., Reyes-Bonilla, H., López-Pérez, R.A., Medina-Rosas, P. and Hernández-Cortés, M.P. 2008. Genetic structure of the scleractinian coral, *Pocillopora damicornis*, from the Mexican Pacific. In The 11th International Coral Reef Symposium. Ft. Lauderdale, Florida. 429-433.

Clark, S. and Edwards, A.J. 1999. An evaluation of artificial reef structures as tools for marine habitat rehabilitation in the Maldives. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 9: 5-21.

Combosch, D.J., Guzman, H.M., Schuhmacher, H. and Vollmer, S.V. 2008. Interspecific hybridization and restricted trans-Pacific gene flow in the Tropical Eastern Pacific *Pocillopora*. Molecular Ecology 17: 1304-1312.

Combosch, D.J. and Vollmer, S.V. 2013. Mixed asexual and sexual reproduction in the Indo-Pacific reef coral *Pocillopora damicornis*. Ecology and Evolution 3: 3379-3387.

D'Croz, L. and Mat, J.L. 2004. Experimental responses to elevated water temperature in genotypes of the reef coral *Pocillopora damicornis* from upwelling and non-upwelling environments in Panama. Coral Reefs 23: 473–483.

Dakin, E.E. and Avise, J.C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity (Edinb) 93: 504-509.

Diah Permata, W., Kinzie, R.A. and Hidaka, M. 2000. Histological studies on the origin of planulae of the coral *Pocillopora damicornis*. Marine Ecolgy Progress Series 200: 191-200.

Ferse, S.C.A. 2008. Artificial reef structures and coral transplantation: Fish community responses and effects on coral recruitment in North Sulawesi/Indonesia. Ph.D. Thesis., University of Bremen. Bremen, Germany.

Fukami, H., Chen, C.A., Budd, A.F., Collins, A., Wallace, C., Chuang, Y.Y., Chen, C., Dai,

C.F., Iwao, K., Sheppard, C. and Knowlton, N. 2008. Mitochondrial and nuclear genes suggest that stony corals are monophyletic but most families of stony corals are not (Order Scleractinia, Class Anthozoa, Phylum Cnidaria). PLoS One 3:

Gleason, D.F. and Hofmann, D.K. 2011. Coral larvae: From gametes to recruits. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 408: 42-57.

Glynn, P.W. and Ault, J.S. 2000. A biogeographic analysis and review of the far eastern Pacific coral reef region. Coral Reefs 19: 1-23.

Glynn, P.W., Colley, S.B., Maté, J.L., Baums, I.B., Feingold, J.S., Cortés, J., Guzmán, H.M., Afflerbach, J.C., Brandtneris, V.W. and Ault, J.S. 2012. Reef coral reproduction in the equatorial eastern Pacific: Costa Rica, Panamá, and the Galápagos Islands (Ecuador). VII. Siderastreidae, *Psammocora stellata* and *Psammocora profundacella*. Marine Biology 159: 1917-1932.

H. Fukami, M. Omori, K. Shimoike, T. Hayashibara and Hatta, M. 2003. Ecological and genetic aspects of reproductive isolation by different spawning times in corals. Marine Biology 124: 679–684.

Hagedorn, M., Pan, R., Cox, E.F., Hollingsworth, L., Krupp, D., Lewis, T.D., Leong, J.C., Mazur, P., Rall, W.F., MacFarlane, D.R., Fahy, G. and Kleinhans, F.W. 2006. Coral larvae conservation: physiology and reproduction. Cryobiology 52: 33-47.

Hall, V.R. and Hughes, T.P. 1996. Reproductive strategies of modular organisms: Comparative studies of reef- building corals. Ecology 77: 950.

Harrison, P.L. 2011. Sexual Reproduction of Scleractinian Corals, In Coral Reefs: An Ecosystem in Transition. Dubinsky, Z. and Stambler, N. (eds). Springer Science and Business Media B.V.

Harrison, P.L. and Wallace, C.C. 1990. Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals., In Ecosystems of the World: Coral Reefs. Dubinsky, Z. (ed), 133–207. Amsterdam: Elsevier.

Hidaka, Y., Shiba, S., Takuma, H. and Suga, M. 1985. Thermal decomposition of ethane in shock waves. International Journal of Chemical Kinetics 17: 441-453.

Chulalongkorn University

Hughes, T.P., Baird, A.H., Bellwood, D.R., Card, M., Connolly, S.R., Folke, C., Grosberg, R., Hoegh-Guldberg, O., Jackson, J.B., Kleypas, J., Lough, J.M., Marshall, P., Nystrom, M., Palumbi, S.R., Pandolfi, J.M., Rosen, B. and Roughgarden, J. 2003. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. Science 301: 929-933.

Kruger, A. and Schleyer, M.H. 1998. Sexual reproduction in the coral *Pocillopora verrucosa* (Cnidaria : Scleractinia) in KwaZulu-Natal, South Africa. Marine Biology 132: 703-710.

Kuanui, P., Chavanich, S., Raksasab, C. and Viyakarn, V. 2008. Lunar periodicity of larval release and larval development of *Pocillopora damicornis* in Thailand. Marine and Freshwater Research 11: 375-377.

Lively, C.M. and Johnson, S.G. 1994. Brooding and the evolution of parthenogenesis: strategy models and evidence from aquatic invertebrates. In Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences, Vol. 256. 89-95.

Loya, Y. and Sakai, K. 2008. Bidirectional sex change in mushroom stony corals. Proceeding of Biological Science 275: 2335-2343.

Loya, Y., Sakai, K. and Heyward, A. 2009. Reproductive patterns of fungiid corals in Okinawa, Japan. Galaxea 11: 119-129.

Magalon, H., Adjeroud, M. and Veuille, M. 2005. Patterns of genetic variation do not correlate with geographical distance in the reef-building coral *Pocillopora meandrina* in the South Pacific. Molecular Ecology 14: 1861-1868.

Magalon, H., Baudry, E., Husté, A., Adjeroud, M. and Veuille, M. 2006. High genetic diversity of the symbiotic dinoflagellates in the coral *Pocillopora meandrina* from the South Pacific. Marine Biology 148: 913-922.

Magalon, H., Samadi, S., Richard, M., Adjeroud, M. and Veuille, M. 2004. Development of coral and zooxanthella-specific microsatellites in three species of *Pocillopora* (Cnidaria, Scleractinia) from French Polynesia. Molecular Ecology Notes 4: 206-208.

Marquez, L.M., Miller, D.J., MacKenzie, J.B. and Van Oppen, M.J. 2003. Pseudogenes contribute to the extreme diversity of nuclear ribosomal DNA in the hard coral *Acropora*. Molecular Biology and Evolution 20: 1077-1786.

Miller, K.J. and Ayre, D.J. 2004. The role of sexual and asexual reproduction in structuring high latitude populations of the reef coral *Pocillopora damicornis*. Heredity 92: 557-568.

Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16: 1215.

Moberg, F. and Folke, C. 1999. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. Ecological Economics 29: 215–233.

Morris, J.A. and Morris, R.D. 2003. The conservation of redundancy in genetic systems: effects of sexual and asexual reproduction. Bioscience 28: 671-681.

Okubo, N., Motokawa, T. and Omori, M. 2007. When fragmented coral spawn? Effect of size and timing on survivorship and fecundity of fragmentation in *Acropora formosa*. Marine Biology 151: 353-363.

Pandolfi, J.M., Bradbury, R.H., Sala, E., Hughes, T.P., Bjorndal, K.A., Cooke, R.G., McArdle, D., McClenachan, L., Newman, M.J., Paredes, G., Warner, R.R. and Jackson, J.B. 2003. Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. Science 301: 955-958.

Paz-García, D.A., Chávez-Romo, H.E., Correa-Sandoval, F., Reyes-Bonilla, H., López-Pérez, A., Medina-Rosas, P. and Hernández-Cortés, M.P. 2012. Genetic connectivity patterns of porals *Pocillopora damicornis* and *Porites panamensis* (Anthozoa: Scleractinia) Along the West Coast of Mexico. Pacific Science 66: 43-61.

Petersen, D. and Tollrian, R. 2001. Methods to enhance sexual recruitment for restoration of damaged reefs. Bulletin of Marine Science 69: 989-1000.

Quinn, N.J. and Kojis, B.L. 2006. Evaluating the potential of natural reproduction and artificial techniques to increase *Acropora cervicornis* populations at Discovery Bay, Jamaica. Revista de Biología Tropical 54: 105-116.

Richmond, R.H. 1985. Reversible metamorphosis in coral planula larvae. Marine Ecological Progress Series 22: 181-185.

Richmond, R.H. 1987. Energetics, competency, and long-distance dispersal of

planula larvae of the coral *Pocillopora damicornis*. Marine Biology 93: 527-533.

Richmond, R.H. and Jakiel, P.L. 1984. Lunar periodity in larva release in the reef *Pocillopora damicornis* at Enewetak and Hawaii. Bulletin of Marine Science 34: 280-287.

Rinkevich, B. 1995. Restoration strategies for coral reefs damaged by recreational activities: The use of sexual and asexual recruits. Restoration Ecology 3: 241-251.

Sakai, K. 1998. Effect of colony size, polyp size, and budding mode on egg production in colonial coral. Biological Bulletin 195: 319-325.

Sammacro, P.W. 1982. Polyp bail-out: An escape response to environmental stress and a new means of reproduction in corals. Marine Ecology Progress Series 10: 57-65.

Seaman, W. 2007. Artificial habitats and the restoration of degraded marine ecosystems and fisheries. Hydrobiologia 580: 143-155.

Sheppard, C.R.C., Davy, S.K. and Pilling, G.M. 2009. The Biology of Coral Reefs.

Sherman, C.D.H., Ayre, D.J. and Miller, K.J. 2006. Asexual reproduction does not produce clonal populations of the brooding coral *Pocillopora damicornis* on the Great Barrier Reef, Australia. Coral Reefs 25: 7-18.

Sier, C.J.S. and Olive, P.J.W. 1994. Reproduction and reproductive variability in the coral *Pocillopora verrucosa* from the Republic of Maldives. Marine Biology 118: 713-722.

Smith-Keune, C. and Van Oppen, M. 2006. Genetic structure of a reef-building coral from thermally distinct environments on the Great Barrier Reef. Coral Reefs 25: 493-502.

Snusted, D.P. and Simmons, M.J. 2010. Principles of genetics, 5 edn. John Willey and Sons (Asia) Pte Ltd. 821.

Souter, P., Henriksson, O., Olsson, N. and Grahn, M. 2009. Patterns of genetic structuring in the coral *Pocillopora damicornis* on reefs in East Africa. BMC Ecology 9: 19.

Starger, C.J., Yeoh, S.S., Dai, C.F., Baker, A.C. and Desalle, R. 2008. Ten polymorphic

STR loci in the cosmopolitan reef coral, *Pocillopora damicornis*. Molecular Ecology Resource 8: 619-621.

Stoddart, J.A. 1983. Asexual production of planulae in the coral *Pocillopora damicornis*. Marine Biology 76: 279–284.

Stoddart, J.A. 1984a. Genetic differentiation amongst populations of the coral *Pocillopora damicornis* off southwestern Australia. Coral Reefs 3: 149-156.

Stoddart, J.A. 1984b. Genetical structure within populations of the coral *Pocillopora damicornis*. Marine Biology 81: 19-30.

Stoddart, J.A. and Black, R. 1985. Cycles of gametogenesis and planulation in the coral *Pocillopora damicornis*. Marine Biology Progress Series 23: 153-164.

Takabayashi, M. and Hoegh-Guldberg, O. 1995. Ecological and physiological differences between two colour morphs of the coral *Pocillopora damicornis*. Marine Biology 123: 705-714.

Van Oppen, M.J. and Gates, R.D. 2006. Conservation genetics and the resilience of reef-building corals. Molecular Ecology 15: 3863-3883.

Van Treeck, P. and Schumacher, H. 1999. Mass Diving Tourism - A New Dimension Calls for New Management Approaches. Marine Pollution Bulletin 37: 499-504.

Ward, S. 1992. Evidence for broadcast spawning as well as brooding in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. Marine Biology 112: 641-646.

Whitaker, K. 2006. Genetic evidence for mixed modes of reproduction in the coral *Pocillopora damicornis* and its effect on population structure. Marine Ecology Progress Series 306: 115-124.

Yeoh, S.R. and Dai, C.F. 2010. The production of sexual and asexual larvae within single broods of the scleractinian coral, *Pocillopora damicornis*. Marine Biology 157: 351-359.

Zakai, D., Levy, O. and Chadwick-Furman, N.E. 2000. Experimental fragmentation reduces sexual reproductive output by the reef-uilding coral *Pocillopora damicornis.* Coral Reefs 19: 185-188.

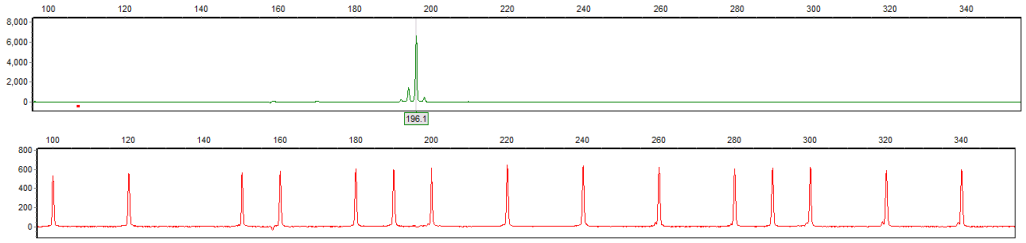
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก กราฟฟีโรแกรมแสดงจีโนไทป์ของไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งเทียบกับเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลท์ที่ทราบขนาด (กราฟสีแดง)

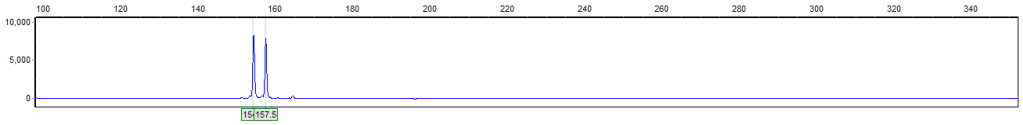
1. ไมโครแซตเทลไลท์จีโนไทป์ตำแหน่ง Pd2-006 มี 1 จีโนไทป์ คือ (A) 195/195

(A) 195/195

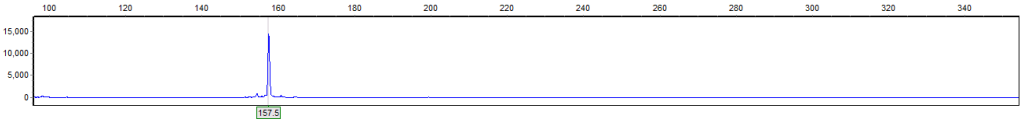


2. ไมโครแซตเทลไลท์จีโนไทป์ตำแหน่ง Pd3-004 พบ 3 จีโนไทป์ คือ (A) 156/159 (B) 159/159 และ (C) 159/162

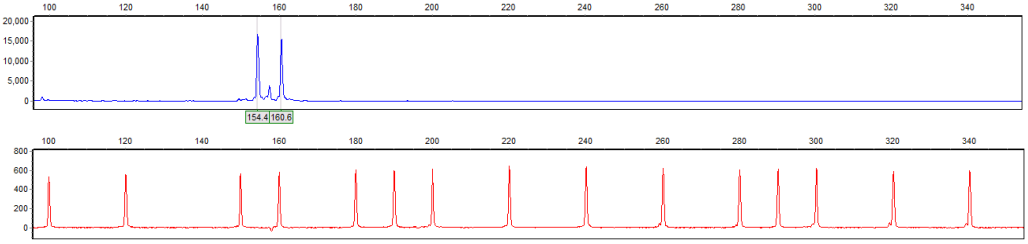
(A) 156/159



(B) 159/159

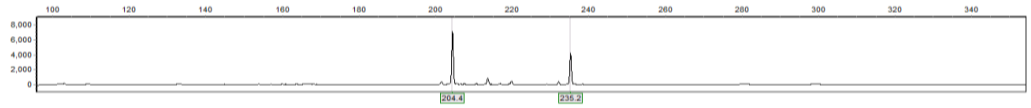


(C) 159/162

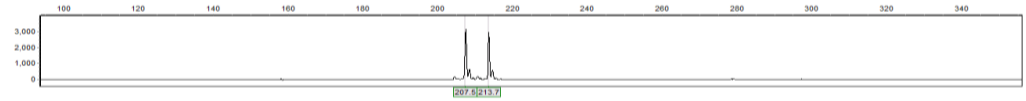


3. ไมโครแซตเทลไลท์จีโนไทป์ตำแหน่ง Pd3-005 พบ 7 จีโนไทป์ คือ (A) 204/234 (B) 207/213 (C) 207/219 (D) 207/234 (E) 213/213 (F) 213/219 และ (G) 213/234

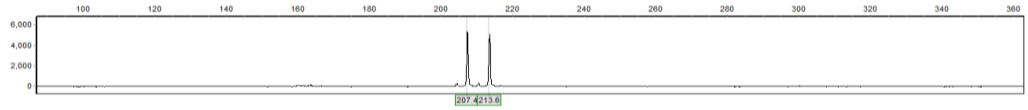
(A) 204/234



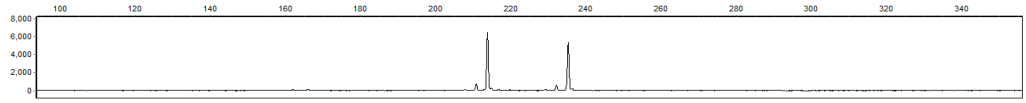
(B) 207/213



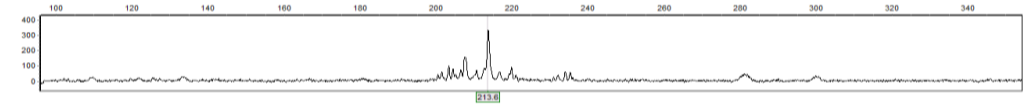
(C) 207/219



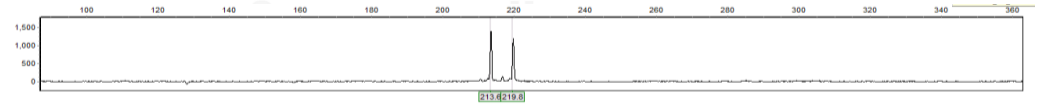
(D) 207/234



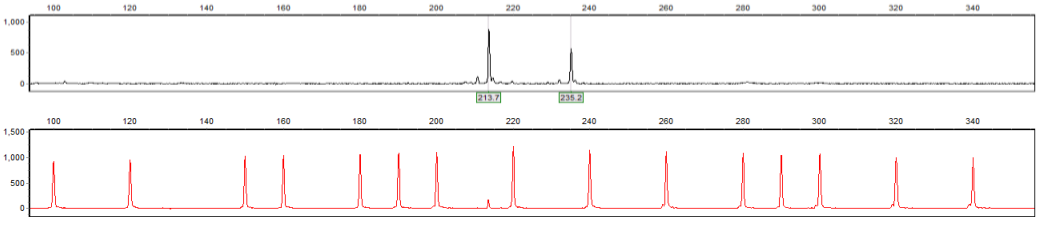
(E) 213/213



(F) 213/219

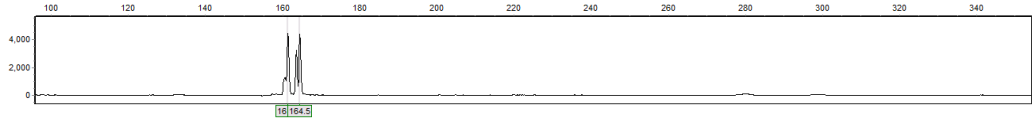


(G) 213/234

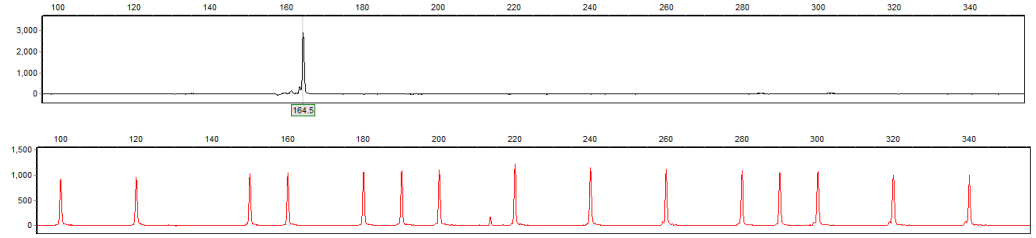


4. ไมโครแซตเทลไลท์จีโนไทป์ตำแหน่ง Pd3-008 พบ 2 จีโนไทป์ คือ (A) 162/165 และ (B) 165/165

(A) 162/165

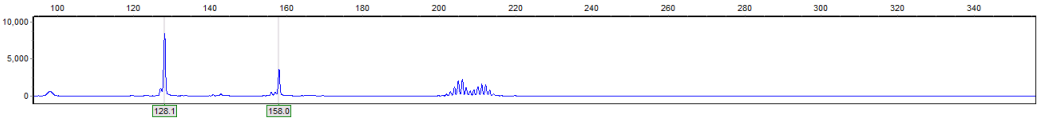


(B) 165/165

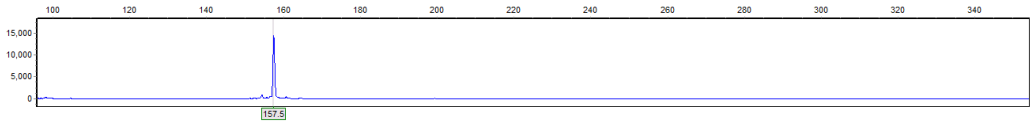


5. ไมโครแซตเทลไลท์จีโนไทป์ตำแหน่ง PV2 พบ 3 จีโนไทป์ คือ (A) 128/158 (B) 158/158 และ (C) 158/170

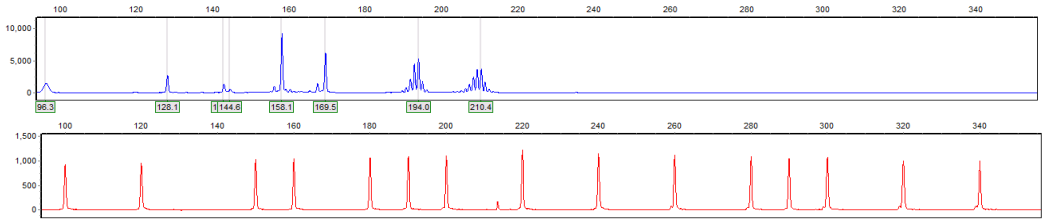
(A) 128/158



(B) 158/158



(C) 158/170



ภาคผนวก ข ตารางรูปแบบการผลิตตัวอ่อนที่เป็นไปได้ทั้งหมดของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* จากโคโลนีแม่ทั้ง 4 โคโลนี ในแต่ละตำแหน่งไมโครแซตเทลไลท์ โดยวิเคราะห์จากจีโนไทป์ของโคโลนีพ่อที่เป็นไปได้ จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้ และจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง	หมายเหตุ
โคโลนี C	Pd3-004	156/159	-	-	156/159	Parthenogenesis
			156/156	156/156	-	Cross-fertilization
				156/159	156/159	
			159/159	159/159	159/159	
				156/159	156/159	
			162/162	156/162	156/162	
				159/162	-	
			156/159	156/156	-	
				156/159	156/159	
				159/159	159/159	
			156/162	156/156	-	
				156/159	156/159	
				156/162	156/162	
				159/162	-	
			159/162	156/159	156/159	
				159/159	159/159	
				156/162	156/162	
				159/162	-	
	Pd3-005	207/213	-	-	207/213	Parthenogenesis
			207/207	207/207		Cross-fertilization
				207/213	207/213	
			213/213	207/213	207/213	
				213/213	-	
			219/219	207/219	-	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง	หมายเหตุ
				213/219	213/219	
			234/234	207/234	-	
				213/234	213/234	
			207/213	207/207	-	
				207/213	207/213	
				213/213	-	
			207/219	207/207	-	
				207/213	207/213	
				207/219	-	
				213/219	213/219	
			207/234	207/207	-	
				207/213	207/213	
				207/234	-	
				213/234	213/234	
			213/219	207/213	207/213	
				213/213	-	
				207/219	-	
				213/219	213/219	
			213/234	207/213	207/213	
				213/213	-	
				213/234	213/234	
				207/234	-	
			219/234	207/219	-	
				207/234	-	
				213/219	213/219	
				213/234	213/234	
	PV2	158/170	-	-	-	Parthenogenesis

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง	หมายเหตุ
			128/128	128/158	128/158	Cross-fertilization
				128/170	-	
			158/158	158/158	-	
				158/170	158/170	
			170/170	158/170	158/170	
				170/170	-	
			128/158	128/158	128/158	
				158/158	-	
				128/170	-	
				158/170	158/170	
			128/170	128/158	128/158	
				128/170	-	
				158/170	158/170	
				170/170	-	
			158/170	158/158	-	
				158/170	158/170	
				170/170	-	
โคโลนี D	Pd3-004	156/162	159/159	156/159	156/159	Cross-fertilization
				159/162	-	
			156/159	156/156	-	
				156/159	156/159	
				156/162	-	
				159/162	-	
			159/162	156/159	156/159	
				156/162	-	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง	หมายเหตุ
				159/162	-	
				162/162	-	
	Pd3-008	165/165	-	-	165/165	Parthenogenesis
			162/162	162/165	162/165	Cross-fertilization
			165/165	165/165	165/165	
			162/165	162/165	162/165	
				165/165	165/165	
	PV2	158/170	-	-	158/170	Parthenogenesis
			158/158	158/158	158/158	Cross-fertilization
				158/170	158/170	
			170/170	158/170	158/170	
				170/170	-	
			158/170	158/158	-	
				158/170	158/170	
				170/170	170/170	
โคโลนี E	Pd3-004	156/162	-	-	156/162	Parthenogenesis
			156/156	156/156	-	Cross-fertilization
				156/159	156/159	
			159/159	156/159	156/159	
				159/162	-	
			162/162	156/162	156/162	
				16258/162	-	
			156/159	156/156	-	
				156/159	156/159	
				156/162	156/162	
				159/162	-	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง	หมายเหตุ
			156/162	156/156	-	
				156/162	156/162	
				162/162	-	
			159/162	156/159	156/159	
				156/162	156/162	
				159/162	-	
				162/162	-	
	Pd3-005	207/213	-	-	207/213	Parthenogenesis
			207/207	207/207	-	Cross-fertilization
				207/213	207/213	
			213/213	207/213	207/213	
				213/213	213/213	
			219/219	207/219	207/219	
				213/219	-	
			207/213	207/207	-	
				207/213	207/213	
				213/213	213/213	
			207/219	207/207	-	
				207/213	207/213	
				207/219	207/219	
				213/219	-	
			213/219	207/213	207/213	
				213/213	213/213	
				207/219	207/219	
				213/219	-	
	Pd3-008	165/165	-	-	165/165	Parthenogenesis
			162/162	162/165	162/165	Cross-fertilization

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง	หมายเหตุ
			165/165	165/165	165/165	
			162/165	162/165	162/165	
				165/165	165/165	
	PV2	158/170	-	-	158/170	Parthenogenesis
			158/158	158/158	158/158	Cross-fertilization
				158/170	158/170	
			170/170	158/170	158/170	
				170/170	-	
			158/170	158/158	158/158	
				158/170	158/170	
				170/170	-	
โคโลนี G	Pd3-004	156/162	-	-	156/162	Parthenogenesis
			156/156	156/156	-	Cross-fertilization
				156/162	156/162	
			159/159	156/159	156/159	
				159/162	-	
			162/162	156/162	156/162	
				162/162	-	
			156/159	156/156	-	
				156/159	156/159	
				156/162	156/162	
				159/162	-	
			159/162	156/159	156/159	
				156/162	156/162	
				159/162	-	
				162/162	-	
	Pd3-005	207/213	-	-	207/213	Parthenogenesis

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โคโลนีแม่	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของโคโลนีแม่	จีโนไทป์โคโลนีพ่อที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่เป็นไปได้	จีโนไทป์ของตัวอ่อนที่พบจริง	หมายเหตุ
			207/207	207/207	-	Cross-fertilization
				207/213	207/213	
			213/213	207/213	207/213	
				213/213	-	
			234/234	207/234	207/234	
				213/234	-	
			207/213	207/207	-	
				207/213	207/213	
				213/213	-	
			207/234	207/207	-	
				207/213	207/213	
				207/234	207/234	
				213/234	-	
			213/234	207/213	207/213	
				213/213	-	
				207/234	207/234	
				213/234	-	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทิพวิมล รัตนะวงวาล เกิดเมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2532 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 และได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย ปี 2556

การศึกษานี้ได้รับการเผยแพร่ทางวิชาการโดยการนำเสนอทางวาจาและโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ทิพวิมล รัตนะวงวาล, สุชนา ชวนิชย์, วรณพ วิยกาญจน์ และศานิต ปิยพัฒนากร. 2557. รูปแบบการผลิตตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ Pocillopora damicornis (Linnaeus, 1758). การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ทางทะเล ครั้งที่ 4 “วิทยาการในโลกของทะเลสีคราม: Blue Ocean Science”, วันที่ 10-12 มิถุนายน 2557, ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Rattanawongwan, T., Chavanich, S., Viyakarn, V. and Piyapattanakorn, S. 2014. Reproductive Strategies of a Cauliflower Coral Pocillopora damicornis. The 3rd Asia-Pacific Coral Reef Symposium “Challenge of Asia-Pacific Coral Reefs under the Changing Ocean” on June 23th-27th, 2014, at Pingtung, Taiwan.

ทิพวิมล รัตนะวงวาล, สุชนา ชวนิชย์, วรณพ วิยกาญจน์ และศานิต ปิยพัฒนากร. 2558. ตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของปะการังดอกกะหล่ำ Pocillopora damicornis. การประชุมหาดใหญ่วิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6, วันที่ 26 มิถุนายน 2558, มหาวิทยาลัยหาดใหญ่. 11 หน้า.