รายงานผลการดำเนินงาน

ปีงบประมาณ 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การแยกและเลี้ยง zooxanthellae สำหรับตัวอ่อนปะการังและหอยมือเสือ

Isolation and cultivation of zooxanthellae for coral and giant clam larvae

ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

ผู้รับผิดชอบโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์

นาวาตรีอัศวิน คงประเสริฐ

นาวาตรีพุทธิพิพัฒน์ ศรีจันทร์บุญ

หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ

รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การแยกและเลี้ยง zooxanthellae สำหรับตัวอ่อนปะการังและหอยมือเสือ
Isolation and cultivation of zooxanthellae for coral and giant clam larvae
ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

คณะผู้ดำเนินงาน

รศ.ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์
นาวาตรีอัศวิน คงประเสริฐ
นาวาตรีพุทธิพิพัฒน์ ศรีจันทร์บุญ
หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2560 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและความเค็มที่ลดลงอย่างผิดปกติ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ฟอกขาวในปะการังและสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆที่มี zooxanthellae ร่วมอาศัย การเกิดปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวอย่างรุนแรงเนื่องจากอุณหภูมิของน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้นในปี 2559 ทำให้ปะการังและสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดเกิดการฟอกขาวในหลายพื้นที่เป็นบริเวณกว้าง ในปีงบประมาณปี 2560 จึงทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ zooxanthellae ที่ได้จากการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ทนร้อนในปีงบประมาณ 2556-2558 มาใช้ในการรักษาปะการังฟอกขาวในห้องปฏิบัติการ และให้กับตัวอ่อนหอยมือเสือที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

การรักษาปะการังฟอกขาวทำโดยการเตรียมปะการังดอกกะหล่ำ(*Pocillopora damicornis*) ใช้ในการรักษาปะการังฟอกขาวในห้องปฏิบัติการในปีงบประมาณ 2561 สำหรับ ให้ zooxanthellae กับตัวอ่อนหอยมือเสือที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนั้น ได้ทำการเพาะหอยมือเสือให้ได้ตัวอ่อนเพื่อใช้ในการศึกษาการเข้าร่วมอิงอาศัยของ zooxanthellae ที่แยกได้จากเจ้าบ้าน 5 ชนิด คือ ปะการังเขากวาง (*Acropora* sp.) ปะการังดอกเห็ด (*Fungia fungites*) ปะการังรังผึ้ง (*Goniastrea* sp.) หอยมือเสือ (*Tridacna* sp.) และดอกไม้ทะเล (*Epiactis* sp.) ที่โรงเพาะเลี้ยงหอยมือเสือของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ทำการทดลอง 5 ชุดการทดลองๆละ 3 ซ้ำ พบว่าหอยมือเสือวัยอ่อนที่ได้รับ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังเขากวางมีอัตราการรอดมากที่สุดคิดเป็น 42±3.85 % มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับทุกชุดการทดลอง ขณะที่หอยมือเสือวัยอ่อนในชุดการทดลองที่ได้รับ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังรังผึ้ง ใช้เวลาการพัฒนาการจากระยะ veliger เป็น pediveliger น้อยที่สุด 7.0±1 วัน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับทุกชุดการทดลอง นอกจากนี้หอยมือเสือวัยอ่อนที่ได้รับซูแซนเทลลีที่แยกจากปะการังรังผึ้ง และดอกไม้ทะเลใช้เวลาการสร้างภาวะอิงอาศัยกับหอยมือเสือวัยอ่อนน้อยที่สุดใช้เวลา 12.0±1.0 และ 12.3±0.6 วัน ตามลำดับ มีความแตกต่างกับทุกชุดการทดลอง ($p < 0.05$) สรุปได้ว่าแม้ซูแซนเทลลีจากปะการังเขากวางจะให้อัตราการรอดที่สูงที่สุด แต่ซูแซนเทลลีที่แยกจากปะการังรังผึ้งทำให้หอยมือเสือวัยอ่อนนั้นใช้เวลาในการพัฒนาการและการสร้างภาวะอิงอาศัยที่น้อยที่สุดมีผลดีคือช่วยลดระยะเวลาในการอนุบาลตัวอ่อนและยังทำให้หอยมือเสือวัยอ่อนได้รับพลังงานจากการสังเคราะห์แสงของซูแซนเทลลีที่อยู่ในเนื้อเยื่อได้เร็วขึ้นจึงเหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงหอยมือเสือวัยอ่อน

คำสำคัญ: อุณหภูมิ, ความเค็ม, zooxanthellae, *Pocillopora damicornis*, หอยมือเสือ

สารบัญเรื่อง

ชื่อเรื่อง การแยกและเลี้ยง zooxanthellae สำหรับตัวอ่อนปะการังและหอยมือเสือ
Isolation and cultivation of zooxanthellae for coral and giant clam larvae

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
สารบัญเรื่อง	iii
สารบัญรูป	iv
บทนำ	1
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วัตถุประสงค์	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
วิธีดำเนินการศึกษา	4
สรุปและอภิปรายผลการศึกษา	7
เอกสารอ้างอิง	19
ภาคผนวก	22

สารบัญรูป

รูปที่ 1 จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร 4
รูปที่ 2 การเตรียมแปลงปะการังสำหรับการย้ายปลูกที่จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร 6
รูปที่ 3 กิ่งปะการังจากการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน พฤษภาคม 2559 7
รูปที่ 4 กิ่งปะการังจาการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน กรกฎาคม 2559 7
รูปที่ 5 กิ่งปะการังจาการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน กันยายน 2559 8
รูปที่ 6 กิ่งปะการังจาการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน มกราคม 2560 8
รูปที่ 7 กิ่งปะการังจาการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน เมษายน 2560 8
รูปที่ 8 กิ่งปะการังจาการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน กรกฎาคม 2560 9
รูปที่ 9 แนวปะการังบริเวณเขาหมาจอ 9
รูปที่ 10 ปะการังดอกกะหล่ำบริเวณเขาหมาจอที่จะตัดกิ่งและย้ายปลูก ที่จุดดำน้ำหาดทียน 10
รูปที่ 11 แปลงปะการังดอกกะหล่ำเขาหมาจอย้ายไปปลูกที่จุดดำน้ำหาดทียนในเดือน พฤษภาคม 2560 11
รูปที่ 12 แปลงปะการังดอกกะหล่ำที่ย้ายปลูก ที่จุดดำน้ำหาดทียนในเดือน กรกฎาคม 2560 11
รูปที่ 13 เกาะปลาหมึก 11
รูปที่ 14 ปะการังดอกกะหล่ำบริเวณเกาะปลาหมึกที่จะตัดกิ่งและย้ายปลูก ที่จุดดำน้ำหาดทียน 12
รูปที่ 15 แปลงปะการังดอกกะหล่ำที่ย้ายปลูกจากเกาะปลาหมึก ในเดือน พฤษภาคม 2560 12
รูปที่ 16 แปลงปะการังดอกกะหล่ำที่ย้ายปลูกจากเกาะปลาหมึก ในเดือน กรกฎาคม 2560 12
รูปที่ 17 จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร 13
รูปที่ 18 ปะการังดอกกะหล่ำบริเวณจุดดำน้ำหาดเทียนที่จะตัดกิ่งย้ายปลูก 13
รูปที่ 19 แปลงกิ่งปะการังดอกกะหล่ำย้ายปลูกที่จุดดำน้ำหาดเทียน ในเดือน พฤษภาคม 2560 14
รูปที่ 20 แปลงกิ่งปะการังดอกกะหล่ำย้ายปลูกที่จุดดำน้ำหาดเทียน ในเดือนกรกฎาคม 2560 14
รูปที่ 21 อัตราการรอด (%)ของตัวอ่อนหอยที่ได้รับ zooxanthellae ที่แยกจากเจ้าบ้านชนิดต่างๆ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Ap = ดอกไม้ทะเล, Td = เนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยมือเสือ, Gn = ปะการังรัง ผึ้ง, Fg = ปะการังดอกเห็ด และ Ac = ปะการังเขากวาง) 15
รูปที่ 22 พัฒนาการของตัวอ่อนหอยมือเสือวัยอ่อนที่ได้รับ zooxanthellae โดย
A ตัวอ่อนในระยะ trochophore อายุ 24-28 ชั่วโมง
B ตัวอ่อนในระยะ veliger อายุ 2-3 วัน มี cilia (รูปที่ 2C) สำหรับว่ายน้ำและพัดโบกอาหาร
C ตัวอ่อนในระยะ veliger อายุ 4-6 วัน มี umbo ชัดเจนและมีอาหารอยู่ในกระเพาะอาหาร

D ตัวอ่อนในระยะ pediveliger ที่มีเท้า หรือ foot (ลูกศรชี้ในรูป 2D) ชัดเจน อายุ 7-12 วัน 16

รูปที่ 23 หอยมือเสือวัยอ่อนที่มีการสร้างการเข้าร่วมอาศัยในระยะต่างๆ โดย
A และ B คือหอยมือเสือวัยอ่อนที่สร้างภาวะอิงอาศัยในระยะ Alimentary I
C คือหอยมือเสือวัยอ่อนที่สร้างภาวะอิงอาศัยในระยะ Alimentary II
D คือหอยวัยอ่อนที่สร้างภาวะอิงอาศัยที่สมบูรณ์ (completely symbiosis) 17

ชื่อเรื่อง ภาษาไทย การแยกและเลี้ยง zooxanthellae สำหรับตัวอ่อนปะการังและหอยมือเสือ

ภาษาอังกฤษ Isolation and cultivation of zooxanthellae for coral and giant clam larvae

ชื่อผู้วิจัย รศ.ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ
นาวาตรีอัศวิน คงประเสริฐ
นาวาตรีพุทธิพิพัฒน์ ศรีจันทร์บุญ

บทนำ

Zooxanthellae(*Symbiodinium microadriaticum*) เป็นแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต พบอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน(host) ที่เป็นสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด เช่น ปะการัง ดอกไม้ทะเล หอยมือเสือ เป็นต้น เซลล์ที่พบในเนื้อเยื่อมีลักษณะกลม(coccoid cell) สีน้ำตาลอมเหลืองมีขนาดตั้งแต่ 6-15 ไมโครเมตร โดยทั่วไปจะพบ zooxanthellae ได้หลาย clade ในก้อนปะการัง โดยพบ zooxanthellae clade C กระจายในเขตร้อน clade B จะพบเฉพาะในเขตอบอุ่นซึ่งมีแสงและอุณหภูมิน้ำทะเลต่ำ และพบว่า clade D สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมได้ดีที่สุด ในบางกรณีอาจพบ clade A, B, D, F และ G (Stambler, 2011) ความสัมพันธ์ระหว่างปะการังกับ zooxanthellae เป็นแบบพึ่งพาซึ่งกันและกัน ได้ประโยชน์ด้วยกันทั้งคู่ โดย zooxanthellae จะนำคาร์บอนไดออกไซด์และธาตุอาหารที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของปะการังมาใช้ในการสังเคราะห์แสง ได้ผลผลิตเป็นออกซิเจนและสารอาหารกลับคืนให้ปะการัง (Trench, 1979) คิดเป็น90 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานและสารอาหารทั้งหมดที่ปะการังได้รับจากทุกกระบวนการ (Muscatine and Porter, 1977)

เมื่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลง zooxanthellae ที่อาศัยร่วมกับปะการัง อาจไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงได้ ทำให้ปะการังสูญเสีย zooxanthellae เป็นสาเหตุทำให้ปะการังมีสีขาว เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ปะการังฟอกขาว(coral bleaching) เช่น เมื่ออุณหภูมิน้ำทะเลสูงขึ้นกว่าปกติเพียง 1-2 องศาเซลเซียส เมื่อความเค็มลดต่ำลง เป็นต้น ปะการังที่ปราศจาก zooxanthellae จะอ่อนแอเพราะไม่ได้รับสารอาหารที่เพียงพอ และอาจตายหากมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำทะเลเป็นเวลานาน (Podesta and Glynn, 1997) แม้ว่าการสูญเสีย zooxanthellae อาจจะเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น อุณหภูมิน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้น ความเข้มแสงเพิ่มมากขึ้น ความเค็มน้ำทะเลลดลง หรือการติดเชื้อแบคทีเรีย (Fagoonee *et al.*, 1999) แต่การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำทะเลเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบต่อ zooxanthellae เช่น เมื่ออุณหภูมิน้ำทะเลเพิ่มขึ้นจากปกติ 27 องศาเซลเซียส เป็น 32 องศาเซลเซียส zooxanthellae จะมีสีจางลงและมีจำนวนต่อพื้นที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และหากเพิ่มอุณหภูมิเป็น 34 องศาเซลเซียส ปะการังจะตายภายใน 8 ชั่วโมง (Hoegh-Guldberg and Smith, 1989) การที่ปะการังมีสีซีดจางลงเนื่องจาก zooxanthellae ถูกขับออกมาภายนอกปะการังหรือตัวสาหร่ายเองสูญเสียรงควัตถุไปในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยรุนแรง ปะการังจะมีสีขาวอย่างสมบูรณ์(completely bleaching)

อย่างไรก็ตามพบว่าปะการังมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นแตกต่าง แม้ในโคโลนีเดียวกันก็อาจพบบางส่วนไม่ฟอกขาว แสดงให้เห็นว่าอาจมี zooxanthellae หลายสายพันธุ์ทั้งที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงได้และที่ทนไม่ได้อาศัยอยู่ร่วมกันในปะการังก้อนหรือกิ่งเดียวกัน จึงตั้งสมมติฐานในการศึกษาว่า ปะการังที่มีการฟอกขาวเพียงบางส่วนของก้อนปะการังอาจเป็นเพราะมี zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนและไม่ทนการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอาศัยอยู่ในปะการังก้อนเดียวกันหรือต่างชนิดกัน และสายพันธุ์ดังกล่าวอาจมีทั้งที่จำเพาะและไม่จำเพาะกับผู้ให้อาศัย(host specific)

การคัดเลือกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2556-2558 จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อนที่นำไปใช้ในการบรรเทาปัญหาการเกิดปะการังฟอกขาวในปีงบประมาณ 2559 เมื่อเกิดปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวขึ้น ในปีงบประมาณ 2560 จึงได้นำ zooxantellae ที่ผ่านการทดลองคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง นำมาทดลองใช้ในการรักษาปะการังฟอกขาวและนำมาให้เกิดการอิงอาศัยในตัวอ่อนของหอยมือเสือ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว (Coral Bleaching)

ปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว หรือ coral bleaching เป็นปรากฏการณ์ที่เป็นสาเหตุให้ปะการังตายเป็นจำนวนมาก เริ่มมีการสนใจศึกษาตั้งแต่ปี 1980 พบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ปัจจัยที่สำคัญคือการที่อุณหภูมิเฉลี่ยผิวน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้น (Baker et al., 2008) ส่งผลให้ zooxanthellae ที่อาศัยแบบพึ่งพาภายในตัวปะการัง (endosymbiosis) ไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจึงออกจากเนื้อเยื่อปะการังทำให้ปะการังมีสีขาว ส่งผลให้ปะการังขาดแคลนอาหารและตายลงในที่สุด ปรากฏการณ์นี้ไม่ได้พบเฉพาะแต่ในปะการังเท่านั้น ยังพบในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ ที่มี zooxanthellae เป็นผู้อาศัยเช่น ฟองน้ำ ทากเปลือย และดอกไม้ทะเล เป็นต้น ก็พบการฟอกขาวด้วยเช่นกัน การศึกษาของ Rowan ในปี 1997 พบว่า การฟอกขาวที่เกิดขึ้นในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังนั้นมีความแตกต่างกันระหว่างชนิดของ zooxanthellae ที่สามารถแบ่งได้เป็นหลาย clade ด้วยกัน ส่งผลให้ความสามารถในการทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละเจ้าบ้าน (Host) (Louis et al., 2002)

การเกิดปรากฏการณ์ฟอกขาวมีความรุนแรงมากขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2553 เกิดปรากฏการณ์ฟอกขาว เมื่ออุณหภูมิน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้นจาก 29 องศาเซลเซียส เป็น 30 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ปลายเดือนมีนาคม 2553 สามสัปดาห์ต่อมาได้เกิดปะการังฟอกขาวเป็นวงกว้างทั้งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน พบว่าแนวปะการังได้รับความเสียหายมากที่สุดเป็นประวัติการณ์ (นลินี ทองแถม และ นิพนธ์ พงศ์สุวรรณ, 2553)

ความเค็มต่ำส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์ฟอกขาวได้เช่นเดียวกัน เมื่อทำการทดลองโดยเปลี่ยนแปลงระดับความเค็มโดยทันที พบว่าปะการังอ่อน *Sarcophyton* spp. ที่เก็บจากบริเวณค่ายพระมหาเจษฎาราชเจ้า อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี มีการฟอกขาวที่ระดับความเค็ม 20 psu และเมื่อทำการทดลองแบบเรื้อรังปะการังอ่อน *Sarcophyton* spp. จะฟอกขาวที่ระดับความเค็ม 10 psu (Chavanich *et al.*, 2009) ทั้งนี้ความเค็มที่เริ่มทำให้เกิดปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวในช่วงการเกิดอุทกภัยปี 2554 บริเวณเกาะค้างคาว จังหวัดชลบุรี มีค่าเท่ากับ 11 psu (ธรรมศักดิ์ ยีมิน และคณะ, 2554)

การเข้าอิงอาศัยของ zooxanthellae ในตัวอ่อนหอยมือเสือ

การเข้าร่วมอิงอาศัยของ zooxanthellae ในหอยมือเสือได้มีการศึกษามาเป็นเวลานาน โดยนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน เช่น Fitt and Trench (1981) ได้ทำการทดลองในหอยมือเสือชนิด *Tridacna squamosa* พบว่าลูกหอยมือเสือที่ไม่ให้ zooxanthellae จะตายภายใน 3 สัปดาห์ สำหรับลูกหอยที่ได้รับ zooxanthellae ที่แยกจากเจ้าบ้านต่างชนิดกัน พบว่าลูกหอยที่ได้รับซูแซนเทลลี่จากหอยมือเสือชนิด *T. squamosa* จะมีอัตรารอดสูงกว่าลูกหอยที่ได้รับ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล *Aiptasia pallida, Cassiopeia xamachana, Zoanthus solanderi* และกลุ่มของหอยมือเสือ *T. gigas,* และ *T. maxima*

William et al. (1986) ได้ทำการทดลองให้สาหร่ายหลายชนิดแก่ลูกหอยมือเสือชนิด *Hippopus hippopus* พบว่า zooxanthellae เท่านั้นสามารถเข้าถึงทางเดินอาหาร ส่วนของแอ่งเลือด (haemal sinuses)และสามารถอาศัยในเนื้อเยื่อหอยมือเสือได้ ดังนั้น zooxanthellae จึงเป็น symbiotic algae ที่จำเพาะในหอยมือเสือ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อให้ zooxanthellae ที่แยกได้จากหอยมือเสือชนิด *H. hippopus* ให้กับลูกหอยชนิดเดียวกันจะทำให้ลูกหอยมีพัฒนาการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) ลงเกาะที่พื้นได้เร็วและมีการเติบโตดีขึ้น เมื่อเทียบกับสาหร่ายที่แยกจากแหล่งอื่นให้เป็นอาหาร และยังสามารถเลี้ยงลูกหอยมือเสือกับ zooxanthellae ในน้ำทะเลกรอง โดยให้เพียงแสงสว่าง แต่ไม่ให้อาหารได้นานถึง 10 เดือน

สำหรับประเทศไทย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ กรมประมง ได้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงหอยมือเสือชนิด *Tridacna squamosa* ตั้งแต่ปี 2536 ภายในโรงเพาะเลี้ยงระบบเปิดกลางแจ้ง โดยให้ *Isochrysis galbana* และ *Chaetoceros calcitrans* เป็นอาหาร เมื่อลูกหอยวัยอ่อนเข้าสู่ระยะ pediveliger จึงให้ zooxanthellae ที่ได้จากมูลหอยมือเสือ(fecal pellet) (กรมประมง, 2540 : ออนไลน์) เพื่อให้เกิดการเข้าร่วมอิงอาศัยระหว่างหอยมือเสือและซูแซนเทลลี่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อนำ zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อนที่คัดเลือกให้กับตัวอ่อนหอยมือเสือและปะการัง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้ zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงหอยมือเสือและใช้ในการบรรเทาปัญหาปะการังฟอกขาวและการฟื้นฟูปะการัง

ขอบเขตการวิจัย

การใช้ zooxanthellae ที่แยกได้จากเจ้าบ้าน 5 ชนิด คือ ปะการังเขากวาง (*Acropora* sp.) ปะการังดอกเห็ด (*Fungia fungites*) ปะการังรังผึ้ง (*Goniastrea* sp.) หอยมือเสือ (*Tridacna* sp.) และดอกไม้ทะเล (*Epiactis* sp.) ให้กับตัวอ่อนหอยมือเสือและไปใช้ในการทดลองการฟื้นฟูปะการังฟอกขาว

วิธีดำเนิการศึกษา

พื้นที่ศึกษา

ทำการศึกษาในแนวปะการังบริเวณจุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร

การเตรียมปะการังเพื่อใช้ในการทดลองการฟื้นฟูปะการังฟอกขาวโดยใช้ zooxanthellae

การฟื้นฟูปะการังฟอกขาวโดยใช้ zooxanthellae สายพันธุ์ร้อนที่ได้จากการศึกาในปีงบประมาณ 2557 และ 2558 ได้เริ่มทำการเตรียมปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* ในปีงบประมาณ 2560 เพื่อใช้ในการทดลองการฟื้นฟูในปีงบประมาณ 2561

แบ่งการเตรียมปะการังเป็นสองส่วน คือ

1.การเตรียมแปลงย้ายปลูกของปะการังดอกกะหล่ำ ที่จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร

2.การย้ายปลูกกิ่งปะการังดอกกะหล่ำไปไว้ในแปลงเตรียมกิ่งปะการังที่จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร จาก 3 แหล่ง คือ

2.1.เขาหมาจอ

2.2.เกาะปลาหมึก

2.3.จุดดำน้ำหาดเทียน

การเตรียมกิ่งปะการังจาก 3 แหล่ง เพราะ เป็นปะการังชนิดเดียวกันแต่อยู่ต่างระดับความลึก และสาเหตุที่ย้ายปลูกที่แปลงจุดดำน้ำหาดเทียน เนื่องจากไม่มีการรบกวนจากนักท่องเที่ยว

การศึกษาการอิงอาศัยของ zooxanthellae ในตัวอ่อนหอยมือเสือ

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. การแยกและเลี้ยง zooxanthellae จากผู้ให้อาศัย

เก็บตัวอย่างชิ้นและเนื้อเยื่อของสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งทำหน้าที่เป็นผู้ให้อาศัย จานวน 5 ชนิด ได้แก่ ปะการังเขากวาง (*Acropora* sp.) ปะการังดอกเห็ด (*Fungia fungites*) ปะการังรังผึ้ง (*Goniastrea* sp.) หอยมือเสือ (*Tridacna squamosa*) และดอกไม้ทะเล (*Epiactis* sp.) ในบริเวณแนวปะการังเกาะแสมสาร นำเนื้อเยื่อส่วนที่ยังมีชีวิต ของผู้ให้อาศัย (host) ในกลุ่มของปะการังโดยวิธีดูดด้วยกระบอกเข็มฉีดยา ดอกไม้ทะเลใช้เนื้อเยื่อจากส่วนของหนวด ขนาดประมาณ 1 – 2 เซนติเมตร นำมาแยก zooxanthellae ออกจากชิ้นส่วนที่ตัดมาด้วยการฉีดด้วยน้ำทะเลกรองใส่เนื้อเยื่อบน petri dish แล้วนำน้ำที่สกัดเซลล์ใน petri dish ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำมาแยก zooxanthellae ด้วยเทคนิค pasteur pipette single cell isolation นำเซลล์ที่แยกได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนในหลอดทดลอง ตามวิธีของ กมลพร พัฒนศิริ (2556) สาหรับหอยมือเสือ นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อชั้น mantle มาเป็นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ใน Microcentrifuge Tubes เขย่าในน้ำทะเลที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 นาที และทำการแยก zooxanthellae ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น

เมื่อ zooxanthellae ที่แยกเลี้ยงเพิ่มจานวนมากขึ้นจึงขยายลงขวดเลี้ยงให้มีปริมาตร 10 ลิตร ให้อากาศเพื่อให้สาหร่ายเติบโตได้ดีและไม่ติดขวดเลี้ยง zooxanthellae ทั้งหมดที่ใช้การการศึกษาครั้งนี้จะทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนสูตร Daigo' IMK (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd) อุณหภูมิ 27 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 54 μmol $m^{-2}s^{-1}$ ช่วงมืด: ช่วงสว่าง สัดส่วน 12:12 ชั่วโมง ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 4,500-5,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมบ่อและน้ำสาหรับการเพาะเลี้ยงหอยมือเสือวัยอ่อน

2.1 การเตรียมน้ำและบ่อสาหรับเพาะเลี้ยง ทำโดยสูบน้ำทะเลผ่านบ่อพักเพื่อลดตะกอน ผ่านกรองทรายและกรองละเอียดกรองขนาด 1 ไมครอน ฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยแสง UV นำน้ำทะเลดังกล่าวปริมาตร 15 ลิตร ใส่ในถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 20 ลิตร ควบคุมคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงอยู่ในช่วงความเค็ม 33-35 psu, อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส, pH 8.3 - 8.4 ให้อากาศตลอดเวลา

2.2 การกระตุ้นเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ ด้วยวิธีผึ่งแห้งนาน 1-2 ชั่วโมง หลังจากไข่และสเปิร์มปฏิสนธิกัน ภายใน 3 วันหอยมือเสือวัยอ่อนจะเข้าสู่ระยะ veliger สามารถกรองกินและว่ายน้ำได้ จึงนำไปใช้ในการทดลอง

2.3 แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) ประกอบด้วย 6 ชุดการทดลอง (treatment) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แต่ละชุดการทดลองมีความหนาแน่นของ หอยมือเสือ (*Tridacna sqaumosa*) วัยอ่อน ในระยะ veliger 3 ตัว / มิลลิลิตร ให้อาหารเป็น zooxanthellae ที่แยกได้จากผู้ให้อาศัยต่างๆ (ตารางที่ 1) ทุกวันๆละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) คุณภาพน้ำได้ทำการวัดในส่วนของ ความเค็ม อุณหภูมิ pH และค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำ มีความหนาแน่นเซลล์ในถังเลี้ยง 450-500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปลี่ยนถ่ายน้ำ 100% ทุกๆ 2 วัน ซึ่งในการทดลองนี้ จะสุ่มตรวจหอยมือเสือวัยอ่อนครั้งละ 30 ตัว ทุกวัน เพื่อให้ครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) ของหอยมือเสือวัยวัยอ่อนระยะ veliger ถึงระยะ pediveliger ใช้ระยะเวลาในการทดลองเลี้ยงทั้งสิ้น 2-3 สัปดาห์ สังเกตการพัฒนา การเกิดภาวะอิงอาศัยของ zooxanthellae

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนประกอบ (compound light microscope) เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการนับจานวนเพื่อศึกษาอัตรารอด

3. การวิเคราะห์ผล

3.1 การศึกษาภาวะอิงอาศัยและพัฒนาการ

ภาวะอิงอาศัยและพัฒนาการของหอยมือเสือวัยอ่อนที่ได้ โดยอ้างอิงการศึกษาของ Hirose et al., (2006) จากการสังเกตการพบและไม่พบ zooxanthellae ภายในส่วนของทางเดินอาหาร (alimentary canal) และเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิล (mantle tissue) ของหอยมือเสือวัยอ่อนระยะ veliger ถึงระยะ pediveliger

3.2 การศึกษาอัตราการรอด (%)

อัตราการรอด (%) = (จำนวนลูกหอยวัยอ่อนวันสุดท้าย/จำนวนลูกหอยวัยอ่อนวันแรก)×100

ตารางที่ 1 ที่มาของซูแซนเทลลีในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	เจ้าบ้านของซูแซนเทลลี
ชุดการทดลองที่ 1 (Ap)	ดอกไม้ทะเล (*Epiactis* sp.)
ชุดการทดลองที่ 2 (Td)	เนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยมือเสือ (*Tridacna squamosa*)
ชุดการทดลองที่ 3 (Gn)	ปะการังรังผึ้ง (*Goniastrea* sp.)
ชุดการทดลองที่ 4 (Fg)	ปะการังเห็ด (*Fungia fungites*)
ชุดการทดลองที่ 5 (Ac)	ปะการังเขากวาง (*Acropora* sp.)

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

การเตรียมปะการังเพื่อใช้ในการทดลองการฟื้นฟูปะการังฟอกขาวโดยใช้ zooxanthellae

1.การเตรียมแปลงย้ายปลูกของปะการังดอกกะหล่ำ ที่จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร

รูปที่ 2 การเตรียมแปลงปะการังสำหรับการย้ายปลูกที่จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร

ปะการังที่นำมาปลูกในแปลงที่เตรียมไว้ข้างต้น เป็นกิ่งปะการังจากแปลงปะการังที่ใช้ในการทดลองผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการฟอกขาวในปะการังดอกกะหล่ำ เมื่อเดือนเมษายน 2559 หลังเสร็จสิ้นการทดลอง ได้ให้ zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อนแก่กิ่งในโหลแก้วการทดลองเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำกลับไปไว้ที่แปลงย้ายปลูก ที่จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร(รูปที่ 3-8) เมื่อเดือนพฤษภาคม 2559 ซึ่งกิ่งปะการังเหล่านั้นสามารถฟื้นตัวได้ดี จึงได้มีการสำรวจความสมบูรณ์ของปะการังต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบันเพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไปในปีงบประมาณ 2561

รูปที่ 3 กิ่งปะการังจากการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน พฤษภาคม 2559

รูปที่ 4 กิ่งปะการังจาการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน กรกฎาคม 2559

รูปที่ 5 กิ่งปะการังจากการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน กันยายน 2559

รูปที่ 6 กิ่งปะการังจากการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน มกราคม 2560

รูปที่ 7 กิ่งปะการังจากการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน เมษายน 2560

รูปที่ 8 กิ่งปะการังจากการทดลองการฟอกขาว ในแปลงปลูกเดือน กรกฎาคม 2560

2.การย้ายปลูกกิ่งปะการังดอกกะหล่ำไปไว้ในแปลงเตรียมกิ่งปะการังที่จุดดำน้ำหาดเทียน

2.1. กิ่งปะการังจากแนวปะการังบริเวณเขาหมาจอ

พบปะการังหนาแน่น และหลากหลายชนิด มีลักษณะทางกายภาพของแนวปะการังที่สำคัญคือ มีในช่วงความลึก 1-3 เมตร คลื่นลมแรง และน้ำขุ่น

รูปที่ 9 แนวปะการังบริเวณเขาหมาจอ

รูปที่ 10 ปะการังดอกกะหล่ำบริเวณเขาหมาจอที่จะตัดกิ่งและย้ายปลูก ที่จุดดำน้ำหาดทียน

รูปที่ 11 แปลงปะการังดอกกะหล่ำเขาหมาจอย้ายไปปลูกที่จุดดำน้ำหาดทียนในเดือน พฤษภาคม 2560

รูปที่ 12 แปลงปะการังดอกกะหล่ำที่ย้ายปลูก ที่จุดดำน้ำหาดทียนในเดือน กรกฎาคม 2560

2.2. กิ่งปะการังจากเกาะปลาหมึก

พบปะการังหนาแน่น และหลากหลายชนิด แต่พบเป็นหย่อม มีลักษณะทางกายภาพของแนวปะการังที่สำคัญคือ มีในช่วงความลึก 1-3 เมตร น้ำใส และมีกิจกรรมดำน้ำของนักท่องเที่ยวในพื้นที่

รูปที่ 13 เกาะปลาหมึก

รูปที่ 14 ปะการังดอกกะหล่ำบริเวณเกาะปลาหมึกที่จะตัดกิ่งและย้ายปลูก ที่จุดดำน้ำหาดทียน

รูปที่ 15 แปลงปะการังดอกกะหล่ำที่ย้ายปลูกจากเกาะปลาหมึก ในเดือน พฤษภาคม 2560

รูปที่ 16 แปลงปะการังดอกกะหล่ำที่ย้ายปลูกจากเกาะปลาหมึก ในเดือน กรกฎาคม 2560

2.3. กิ่งปะการังจากจุดดำน้ำหาดเทียน

ปะการังที่อยู่ในระดับน้ำตื้น 1 เมตร พบบางส่วนตาย บางส่วนเสียหาย แต่ปะการังที่อยู่ในระดับลึกลงไป 1-4 เมตร สภาพสมบูรณ์ พื้นที่มีกิจกรรมดำน้ำของนักท่องเที่ยวในพื้นที่

รูปที่ 17 จุดดำน้ำหาดเทียน เกาะแสมสาร

รูปที่ 18 ปะการังดอกกะหล่ำบริเวณจุดดำน้ำหาดเทียนที่จะตัดกิ่งย้ายปลูก

รูปที่ 19 แปลงกิ่งปะการังดอกกะหล่ำย้ายปลูกที่จุดดำน้ำหาดเทียน ในเดือน พฤษภาคม 2560

รูปที่ 20 แปลงกิ่งปะการังดอกกะหล่ำย้ายปลูกที่จุดดำน้ำหาดเทียน ในเดือนกรกฎาคม 2560

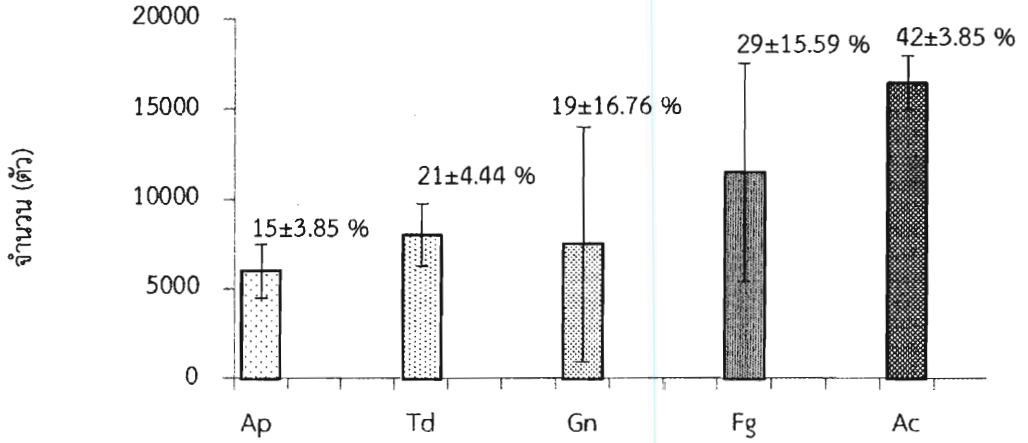
การศึกษาการอิงอาศัยของ zooxanthellae ในตัวอ่อนหอยมือเสือ

1.อัตราการรอด

การเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ ANOVA Test เพื่อดูความแตกต่างของชุดการทดลอง พบว่าอัตรารอดของหอยมือเสือวัยอ่อนอายุ 14 วันในระยะ pediveliger ที่เลี้ยงด้วย zooxanthellae ที่แยกจากปะการังเขากวาง (Ac) ให้อัตราการรอดมากที่สุดคิดเป็น 42±3.85 % มีความแตกต่างกับชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสาคัญ ($P<0.05$) รองลงมาเป็นหอยมือเสือวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วย zooxanthellae ที่แยกจากปะการังดอกเห็ด (Fg) คิดเป็น 29±15.54 %, เนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยมือเสือ (Td) คิดเป็น 21±4.44 %, ปะการังรังผึ้ง (Gn) คิดเป็น 19±16.76 %,และดอกไม้ทะเล (Ap) 15±3.85 %แสดงให้เห็นว่า zooxanthellae มีบทบาทความสาคัญต่ออัตราการรอดของหอยมือเสือวัยอ่อน

William, Fisher and Trench, (1986) พบว่า zooxanthellae สามารถสร้างสารอาหารให้แก่หอยมือเสือวัยอ่อนเพื่อใช้ในการเติบโต ทำให้มีอัตราการรอดสูงขึ้น โดยสารอาหารที่หอยมือเสือวัยอ่อนในระยะ veliger ได้รับมาจากการย่อยของซูแซนเทลลีทั้งที่ยังมีชีวิต และไม่มีชีวิต เมื่อหอยมือเสือวัยอ่อนเข้าสู่ระยะ pediveliger และเริ่มมีการสร้างภาวะอิงอาศัยเกิดขึ้น หอยมือเสือวัยอ่อนก็จะได้รับสารอาหารจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดย zooxanthellae

นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า zooxanthellae จากผู้ให้อาศัยที่ต่างกันสามารถให้อัตราการรอดของหอยมือเสือที่แตกต่างกันอีกด้วย ทั้งนี้ zooxanthellae จากผู้ให้อาศัยต่างๆจะมีการปรับตัวตามผู้ให้อาศัยเคยอาศัยอยู่เดิม มีผลทำให้ของพฤติกรรม ขนาด หรือความสามารถในการทนทานต่อสิ่งแวดล้อมแตกต่างกัน



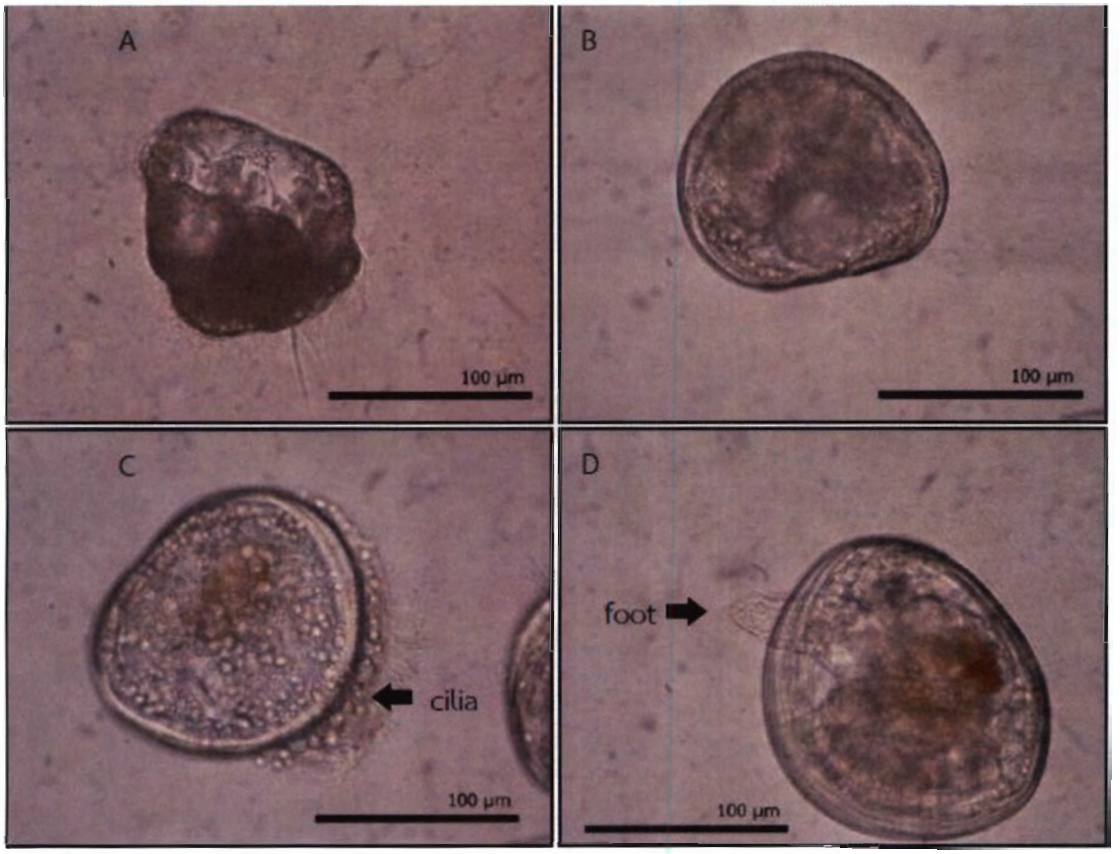
รูปที่ 21 อัตราการรอด (%)ของตัวอ่อนหอยที่ได้รับ zooxanthellae ที่แยกจากเจ้าบ้านชนิดต่างๆ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Ap = ดอกไม้ทะเล, Td = เนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยมือเสือ, Gn = ปะการังรังผึ้ง, Fg = ปะการังดอกเห็ด และ Ac = ปะการังเขากวาง)

2. พัฒนาการของตัวอ่อน

หลังจากไข่หอยมือเสือมีการปฏิสนธิแล้วจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ trochophore ภายใน 24-28 ชั่วโมง จากนั้นจะพัฒนาเป็น veliger ภายใน 2-3 วัน โดยแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ได้แก่ D-shape veliger คือ ระยะที่หอยมือเสือวัยอ่อน มีเปลือกห่อหุ้มทั้งหมดด้านหนึ่งโค้งอีกด้านหนึ่งลักษณะคล้ายตัว D มีขนเล็กๆสาหรับว่ายน้าเรียกว่า cilia ดำรงชีวิตด้วยการกรองกินอาหารจาพวกแพลงก์ตอนพืชภายในมวลน้ำ จากนั้นในวันที่ 4-6 หอยมือเสือวัยอ่อนจะเติบโตขึ้น ฝาพับจะโค้งนูนขึ้นเป็นส่วนที่เรียกว่า umbo โดยจะเริ่มเปลี่ยนจาก D-shape veliger เป็น umbo veligerภายใน 3-6 วัน จากนั้นหอยมือเสือวัยอ่อน จะเริ่มพัฒนาเท้า(foot) ใช้ในการคืบคลานไปตามพื้นเพื่อหาพื้นที่สาหรับลงเกาะ ภายใน 7-12 วัน เรียกระยะนี้ว่า pediveliger

ผลการทดลองพบว่าหอยมือเสือวัยอ่อนมีพัฒนาการจากระยะ D-shape veliger เข้าสู่ระยะ pediveliger เร็วที่สุดได้แก่ชุดการทดลองที่ให้ zooxanthellae ที่จากปะการังรังผึ้ง (Gn) ใช้เวลา 7±1 วัน รองลงมาเป็นชุดการที่ให้ zooxanthellae จากปะการังเขากวาง (Ac) ภายใน 8 วัน ชุดการทดลองที่ให้

zooxanthellae จากเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยมือเสือ (Td) ภายใน9±1 วัน ชุดการทดลองที่ zooxanthellae จากปะการังดอกเห็ด (Fg) ใช้เวลา 10±2 วัน และชุดการทดลองที่ให้ซูแซนเทลลีจากดอกไม้ทะเล (Ap) ภายใน 11±2 วัน(รูปที่ 2)จากข้อมูลการพัฒนาการของหอยมือเสือวัยอ่อน พบว่าชุดการทดลองที่ให้ซูแซนเทลลีที่จากปะการังรังผึ้ง (Gn)ใช้เวลาในการพัฒนาการจากระยะ D-shape veliger เป็นระยะ pediveliger เร็วที่สุดภายใน 7±1 วัน ซึ่งใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงหอยมือเสือในประเทศไทย ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ ที่เพาะเลี้ยงหอยมือเสือวัยอ่อนโดยให้ Isochrysis galbana ผสม Chetoceros calcitransเป็นอาหาร โดยใช้เวลาในการพัฒนาการจากระยะ D-shape veliger เข้าสู่ระยะ pediveliger ภายใน 8-10 วัน (จินตนา นักระนาด, 2543)



รูปที่ 22 พัฒนาการของตัวอ่อนหอยมือเสือวัยอ่อนที่ได้รับ zooxanthellae โดย

A ตัวอ่อนในระยะ trochophore อายุ 24-28 ชั่วโมง

B ตัวอ่อนในระยะ veliger อายุ 2-3 วัน มี cilia (รูปที่ 2C) สำหรับว่ายน้ำและพัดโบกอาหาร

C ตัวอ่อนในระยะ veliger อายุ 4-6 วัน มี umbo ชัดเจนและมีอาหารอยู่ในกระเพาะอาหาร

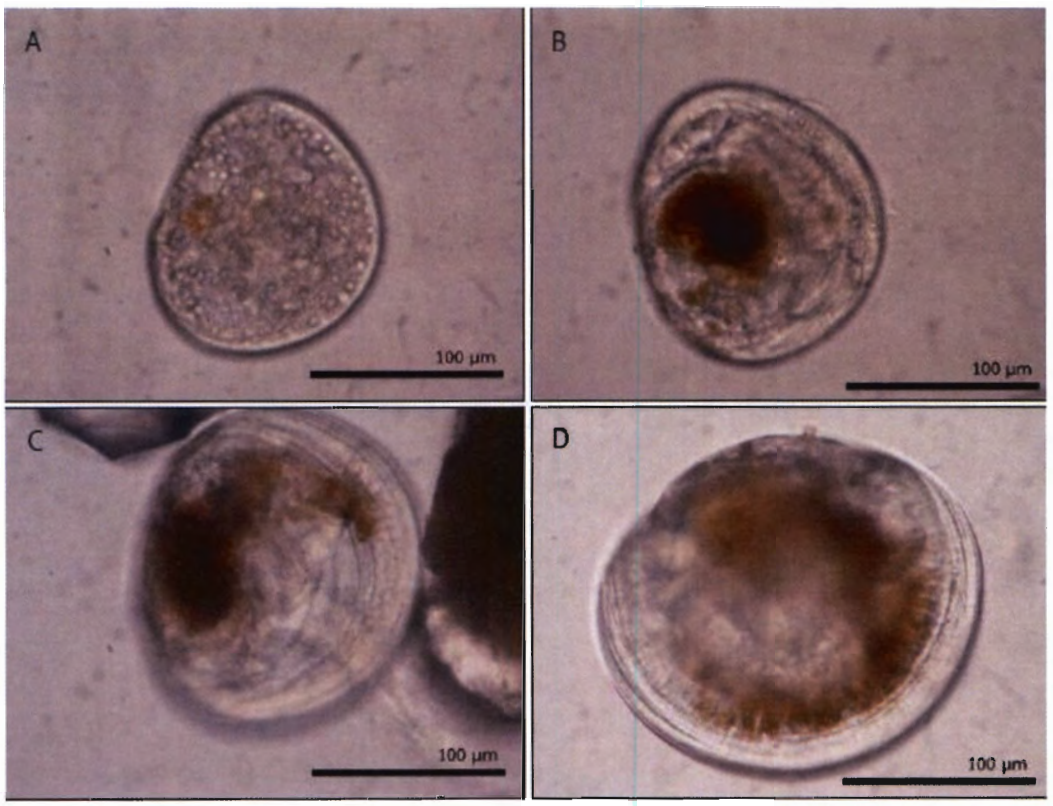
D ตัวอ่อนในระยะ pediveliger ที่มีเท้า หรือ foot (ลูกศรชี้ในรูป 2D) ชัดเจน อายุ 7-12 วัน

3. การเข้าร่วมอาศัย

ทุกชุดการทดลองที่ให้ zooxanthellae ตั้งแต่ระยะ D-shape veliger อายุ 3 วัน พบว่าหลังจากให้ zooxanthellae แล้ว 1 วัน จะพบ zooxanthellae อยู่ในกระเพาะอาหาร ในระยะนี้หอยสามารถว่ายน้ำและกรองกินอาหารจากมวลน้ำ เรียกระยะนี้ว่า Alimentary I (รูป 23A และ 23B)

หอยมือเสือวันอ่อนอายุ 9 - 11 วัน จะพบ zooxanthellae หนาแน่นบริเวณด้านข้างของกระเพาะอาหาร โดยหอยมือเสือวัยอ่อนอายุ 9 วัน ที่ได้รับ zooxanthellae จากเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยมือเสือ (Td) และปะการังเขากวาง (Ac) จะเริ่มพบ zooxanthellae อยู่บริเวณข้างๆกระเพาะอาหาร ส่วนในชุดการทดลองที่ให้ zooxanthellae จากดอกไม้ทะเล (Ap), ปะการังรังผึ้ง (Gn) และปะการังดอกเห็ด (Fg) อายุ 10 วันจึงเริ่มพบ zooxanthellae อยู่บริเวณข้างๆกระเพาะอาหาร เรียกระยะนี้ว่าAlimentary II (รูปที่3C) ซึ่งเป็นระยะที่หอยมือเสือวันอ่อนและซูแซนเทลลีจะสร้างภาวะอิงอาศัยที่สมบูรณ์ (completely symbiosis) เมื่อลูกหอยวัยอ่อนอายุ 12 - 16 วัน (รูป 3D) จะพบ zooxanthellae หนาแน่นบริเวณทางเดินอาหาร (alimentary canal) เนื้อเยื่อแมนเทิล (mantle) เท้า(foot) และอื่นๆจนเต็มตัวหอย

หอยมือเสือวันอ่อนที่ได้รับ zooxanthellae จากดอกไม้ทะเล (Ap) ปะการังเขากวาง (Ac) และปะการังรังผึ้ง (Gn) ใช้เวลาเข้าอิงอาศัย 12.3±0.58 วัน 12.3±0.58 วัน และ 12 ± 1.00 วัน ตามลำดับ รองลงมาเป็นหอยมือเสือวันอ่อนที่ได้รับ zooxanthellae จากเนื้อเยื่อหอยมือเสือ (Td) เมื่ออายุ 13.3±0.58 วัน และซูแซนเทลลีจากปะการังดอกเห็ด (Fg) เมื่ออายุ 14.3±1.53 วัน



รูปที่ 23 หอยมือเสือวัยอ่อนที่มีการสร้างการเข้าร่วมอาศัยในระยะต่างๆ โดย
A และ B คือหอยมือเสือวัยอ่อนที่สร้างภาวะอิงอาศัยในระยะ Alimentary I
C คือหอยมือเสือวัยอ่อนที่สร้างภาวะอิงอาศัยในระยะ Alimentary II
D คือหอยวัยอ่อนที่สร้างภาวะอิงอาศัยที่สมบูรณ์ (completely symbiosis)

Hirose et al., (2006) พบว่า หอยมือเสือวัยอ่อนในระยะ veliger จะย่อยและกิน zooxanthellae เป็นอาหารเพื่อใช้ในการเติบโต เมื่อหอยมือเสือวัยอ่อนโตพัฒนาขึ้นจะเริ่มสะสม zooxanthellae ในกระเพาะอาหารจนสังเกตเป็นสีน้ำตาลดาเข้มตรงกลางตัว จากนั้น zooxanthellae จะค่อยๆเคลื่อนตัวเป็นเส้นจากบริเวณข้างๆ กระเพาะอาหารของหอยมือเสือวัยอ่อนไปยังส่วนของเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิล เส้นดังกล่าวเรียกว่า zooxanthellae tube

zooxanthellae tube เป็นท่อที่สร้างขึ้นเชื่อมส่วนของกระเพาะอาหารไปยังส่วนของเนื้อเยื่อแมนเทิล เพื่อให้ zooxanthellae สามารถเคลื่อนที่จากกระเพาะอาหารไปยังแมนเทิล และจะมีการสร้างท่อเชื่อมไปยังส่วนต่างๆเมื่อหอยอายุมากขึ้น นอกจากนี้ zooxanthellae tube มีความสามารถในการคัดเลือกซูแซนเทลลีเข้าไปในท่อด้วยกระบวนการแบบสุ่ม (Maruyama and Heslinga, 1997) โดยเซลล์ที่ตายแล้วหรือไม่สมบูรณ์ภายในเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิลจะถูกนำออกไปในรูปแบบของมูล (pseudo feces) ทางไซฟอน (exhalent siphon) และสามารถนำ zooxanthellae สมบูรณ์หรือยังมีชีวิตจากกระเพาะอาหารเข้ามาในเนื้อเยื่อขณะเดียวกันก็สามารถส่งผ่านสารอาหารจากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ได้จาก zooxanthellae ส่งไปยังเซลล์ของหอยมือเสือได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

กมลพร พัฒนศิริ. 2556. ผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการเติบโตของ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังและดอกไม้ทะเล. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จินตนา นักระนาด. 2543. หอยมือเสือ : จากโรงเพาะฟักคือสู่ท้องทะเล. กรุงเทพมหานคร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธรรมศักดิ์ ยีมิน และคณะ. Climate change impacts and implications. โครงการการประมวลสถานการณ์และองค์ความรู้ด้านผลกระทบ การฟื้นตัว และการจัดการแนวปะการังจากปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว.

รณวัน บุญประกอบ, ปิยะโชค สินอนันต์, และสุวิชา ใจเปี่ยม. ผลของปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวต่อแนวปะการังจังหวัดตราด. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่39,97-103.

สมยศ หล่อวิทยากร. 2541. การวิเคราะห์ข้อมูลอุณหภูมิและความเค็มที่ผิวน้ำทะเลจากทุ่นสำรวจสมุทรศาสตร์ ประกอบรูปแบบการไหลเวียนของกระแสน้ำในอ่าวไทยจากแบบจำลองคณิตศาสตร์ วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก. 2553. รายงานผลกระทบของปรากฏการณ์ รายงานผลกระทบของปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวต่อแนวปะการัง จังหวัดตราด

อุกกฤต สตภูมินทร์. 2536. การตอบสนองของปะการังและแนวปะการังต่อเหตุการณ์การฟอกขาวของแนวปะการังปี 2534 ในทะเลอันดามัน ประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Berkelmans, R. & Van open, M. 2006. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a "nugget of hope" for coral reefs in an era of climate change. The royal society. 273 : 2305-2312.

Bin Othman, A. S., Goh, G. H., and Todd, P. A. 2010. The distribution and status of giant clams (family Tridacnidae) a short review. Raffles Bull Zool 58(1) : 103-111.

Drew, E.A., 1972. The biology and physiology of alga-invertebrate symbioses. II. The Density of symbiotic algal cells in number of hermatypic hard corals and alcyonarians from various depths. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Vol. 9 : 71-75.

Engebretson, H., Martin, KLM. 1994. Effects of decreased salinity on expulsion of zooxanthellae in the symbiotic sea anemone *Anthopleura elegantissima.* Pacific science (PAC.SCI).Vol.48, No.4 : p.446-457.

Fagoonee, I., Wilson, H. B., Hassell M. P., Turner, J. R. 1999. The dynamics of zooxanthellae populations: A long term study in the field. Science. 283 : 843.

Ferrier-Pages, C., Gattuso, J-P., Jaubert, J. 1999. Effect of small variations in salinity on the rates of photosynthesis and respiration of the zooxanthellae coral *Stylophora pistillata.*

Hinde, R. 1987. Symbioses between aquatic invertebrates and algae. International Journal for Parasitology, 17(2) : 383-390.

Hirose, E., Iwai, K., and Maruyama, T. 2006. Establishment of the photosymbiosis in the early ontogeny of three giant clams. Marine Biology,148(3) : 551-558.

Hoegh-Gildberg, O. & Smith, G. 1989. The effect of sudden changes in temperature, light, and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Stylopora pistillata* and *Seriatopora hystrix* J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 129 : pp 279-303.

Kinzie, R. A., M. Takayama, et al. (2001). "The adaptive bleaching hypothesis: Experimental tests of critical assumptions." Biological Bulletin **200**(1): 51-58.

Maruyama, T., & Heslinga, G. A. 1997. Fecal discharge of zooxanthellae in the giant clam *Tridacna derasa*, with reference to their in situ growth rate. Marine Biology, 127(3), 473-477.

Meehan, W. J. and G. K. Ostrander (1997). "Coral bleaching: A potential biomarker of environmental stress." Journal of Toxicology and Environmental Health **50**(6): 529-552.

Muscatine, L. & Porter, J. W. 1977. Reef corals-mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. Bioscience 27 : 454-460

Norton, J. H., and Jones, G. W. 1992. The giant clam: an anatomical and histological atlas. The giant clam: an anatomical and histological atlas.

Noga Stambler, 2011. Zooxanthellae: The yellow symbionts inside animals. Corals reefs: An ecosystem in transition.

Pilley, R., Willis, B., Terashima, H. 2005. Trends in the density of zooxanthellae in *Acropora millepora* at the Palm Island Group, Great barrier reef, Australia. Symbiosis. 38 : 209-226.

Podesta GP, Glynn PW. Sea surface temperature variability in Panama and Galapagos: Extreme temperature causing coral bleaching. 1997. J. Geophysic. Res. C. Oceans. Vol.102 : 15749-15759.

Rodoffer-Metalpa, R., Richard, C., Allemand, D., Bianchi, C., Morri, C., Ferrier-Pages, C. 2006.Response of zooxanthellae in symbiosis with the Mediterranean corals Cladocora caespitosa and Oculina patagonica to elevated temperatures. Mar Bio, 150 : 45-55

Sakami, T. 2000. Effects of temperature, irradiance, salinity and inorganic nitrogen concentration on coral zooxanthellae in culture. Fisheries science. Vol.66 : p.1006-1013.

Singh, N. K., and Azam, K. 2013. Comparative study of available spawning methods of the giant clam *Tridacna squamosa* [Bivalvia: Tridacnidae] in Makogai, Fiji. World Journal of Fish and MarineSciences. 5(3) : 353-357.

Stimson, J. 1997. The annual cycle of density of zooxanthellae in the tissues of field and laboratory-held Pocillopora damicornis. Journal of experimental Marine biology

and ecology, 214 : 35-48.

Strychar, K. B., M. Coates, et al. (2005). "Loss of Symbiodinium from bleached soft corals *Sarcophyton ehrenbergi, Sinularia* sp. and *Xenia* sp." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **320**(2): 159-177.

Venn, A.A., Loram, J.E., Douglas, A.E. 2008. Photosynthetic symbioses in animails. Journal of experimental botany. Vol. 59. No. 5 : p.1069-1080

Wakefield, T., Farmer, MA., and Kempf SC. 2002. Revised description of fine structure of in situ Zooxanthellae genus Symbiodinium. The biology Bulletin. 199 : 76-82.

Warner, M., Fitt, W., Schmidt, G. 1996. The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae in hospite from four different species of reef coral: a novel approach. Plant, Cell & Environment. Vol.19 : p.291-299.

William K. Fitt, Fisher, C. R., and Trench, R. K. 1986. Contribution of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* to the nutrition, growth and survival of larval and juvenile tridacnid clams. Aquaculture. 55(1) : 5-22.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. สูตรอาหารสำเร็จรูป Daigo

สารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแพลงค์ตอน เตรียมจากสูตรสำเร็จรูป Daigo โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อใช้งานจึงนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ในน้ำทะเลกรอง 1000 มิลลิลิตร อาหารสำเร็จรูปมีองค์ประกอบของธาตุอาหารต่างๆ ดังนี้

อัตราส่วน mg /1,000 mL

$NaNO_3$	200
Na_2HPO_4	1.4
K_2HPO_4	5
NH_4Cl	2.68
Fe-EDTA	5.2
Mn-EDTA	0.332
Na_2-EDTA	37.2
$ZnSO_4$.$7H_2O$	0.023
$CoSO_4$ .7 H_2O	0.014
Na_2MoO_4 .2 H_2O	0.0073
$CuSO_4$ .7 H_2O	0.0025
H_2SeO_3	0.0017
Thiamin-HCl	0.2
Biotin	0.0015
Vitamin B_{12}	0.0015
$MnCl_2$ .4 H_2O	0.018