โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความแปรผันทางพันธุกรรมของปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา

Genetic variation of *Heteropsammia cochlea* based on morphological difference

ชื่อนิสิต นางสาวณัฏฐิกา แจ่มสว่าง **เลขประจำตัว** 5832810423

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ความแปรผันทางพันธุกรรมของปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา

นางสาวณัฏฐิกา แจ่มสว่าง

5832810423

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

Genetic variation of *Heteropsammia cochlea* based on morphological difference

Miss. Nutthika Jamsawang

5832810423

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Bachelor of Science in Marine Science

Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2018

หัวข้อโครงงาน	ความแปรผันทางพันธุกรรมของปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา
โดย	นางสาวณัฏฐิกา แจ่มสว่าง
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2309499 โครงงานวิทยาศาสตร์

.....หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรณพ วิยกาญจน์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญใจ สมพงษ์ชัยกุล)

สมฤดี จิตประไพ .....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมฤดี จิตประไพ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์)

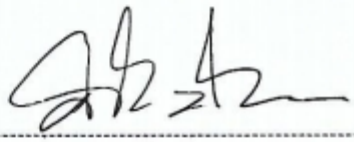
Project Title	Genetic variation of *Heteropsammia cochlea* based on morphological difference
By	Miss Nutthika Jamsawang
Field of Study	Marine Science
Project Advisor	Assoc. Prof. Sanit Piyapattanakorn, Ph. D.

Accepted by the Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Bachelor's Degree.

..... Head of Marine Science Department

(Assoc. Prof. Voranop Viyakarn, Ph. D.)

PROJECT COMMITTEE



..... Project Advisor

(Assoc. Prof. Sanit Piyapattanakorn, Ph. D.)

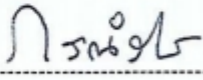
..... Member

(Asst. Prof. Penjai Sompongchaiyakul, Ph. D.)

Somrudee Jitpraphai

..... Member

(Asst. Prof. Somrudee Jitpraphai, Ph. D.)



..... Member

(Asst. Prof. Komrawee Aiemsomboon, Ph. D.)

ชื่อโครงการ ความแปรผันทางพันธุกรรมของปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา
ชื่อนิสิต นางสาวณัฏฐิกา แจ่มสว่าง
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนากร
ปีการศึกษา 2561
ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเลคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ปะการังเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่รวมกันเป็นโคโลนีที่ประกอบไปด้วยโพลิปเดี่ยวๆจำนวนมาก แต่ปะการังในกลุ่มปะการังเห็ดนั้นแตกต่างออกไป เพราะอาศัยอยู่แบบเดี่ยว (Solitary) ซึ่งใน 1 ก้อนจะมี 1 โพลิปและแต่ละโพลิปมี 1 ปาก ปะการัง *Heteropsammia cochlea* นั้นจัดอยู่ในกลุ่มปะการังเห็ด มีการสำรวจปะการังชนิดนี้ที่บริเวณเกาะเต่าและพบว่าจำนวนปากในแต่ละโพลิปนั้นมีจำนวนแตกต่างกัน ตั้งแต่ 1 ปาก ไปจนถึง 3 ปาก การศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของปะการัง *H. cochlea* จากแนวปะการังบริเวณเกาะเต่า ตัวอย่างปะการัง *H. cochlea*ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วยปะการังที่มี 1 ปาก 4 ตัวอย่าง, 2 ปาก 4 ตัวอย่าง และ 3 ปาก 1 ตัวอย่าง ถูกนำมาหาความแปรผันทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคการหาลำดับเบส DNA ของยีน COI ในไมโตคอนเดรียดีเอ็น-เอ จำนวน 570 คู่เบส เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้ BLAST analysis พบว่าปะการังทั้ง 9 ตัวอย่าง นั้นมีลำดับเบสตรงกันกับปะการัง *H. cochlea* ที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลและมีค่า percentage identity (เปอร์เซ็นความเหมือนและความคล้ายคลึง) 99-100% จากการเปรียบเทียบลำดับเบสพบว่ามีตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันอยู่ 3 ตำแหน่ง คิดเป็น 0.53% ซึ่งมีค่าน้อยมาก แสดงให้เห็นว่าปะการังที่มีจำนวนปากแตกต่างกันมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะเป็นปะการังชนิดเดียวกัน รูปแบบทางพันธุกรรมที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีทั้งหมด 5 รูปแบบ คือ H1 – H5 โดย H1 คือรูปแบบที่พบมากที่สุด ทั้งในปะการังที่มี 1 ปาก, 2 ปาก และ 3 ปาก รูปแบบ H2 พบในปะการังที่มี 1 ปาก และ 2 ปาก รูปแบบ H3 พบเฉพาะในปะการังที่มี 1 ปาก ส่วนรูปแบบ H4 และ H5 พบเฉพาะในปะการังที่มี 2 ปาก อย่างไรก็ดีมีความจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างปะการังเพื่อความชัดเจนของผลการศึกษา

คำสำคัญ: ความแปรผันทางพันธุกรรม, ปะการังเห็ด, *Heteropsammia cochlea*

Project Title Genetic variation of *Heteropsammia cochlea* based on morphological difference
Name Miss. Nutthika Jamsawang
Advisor Asst. Prof. Sanit Piyapattanakorn, Ph.D.
Academic Year 2018
Department Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

---

Abstract

Corals are creatures that live communally in colonies of many polyps. However, in case of the mushroom corals, they are mostly solitary, which one coral contains one polyp and each polyp has one mouth. *Heteropsammia cochlea* is one of mushroom corals and the survey of this coral at Koh Tao found that the number of mouths in each polyp varied from 1 - 3 mouths. This study aims to apply molecular techniques to investigate the genetic variation of *H. cochlea* from Koh Tao. 9 coral samples different in number of mouths were collected consisting of 4, 4, and 1 samples of the coral having 1, 2, and 3 mouths respectively. DNA sequencing technique of COI gene in the mitochondria DNA was used for this study. The obtained DNA sequences were searched for similarity with NCBI database using BLAST analysis. 99-100% similarity to COI sequence of *H. Cochlea* was found. It suggested that the sequences belong to *H. cochlea.* The total 570 bps of COI sequences of the 9 samples were aligned and compared. There were 3 positions different in the sequences (0.53%). The result showed that the corals with the different number of mouths in this study were likely to be the same species. 5 haplotypes (H1-H5) were found and H1 was a common haplotype found in all coral types (1 mouth, 2 mouths, and 3 mouths). H2 was found in corals having 1 mouth and 2 mouths. H3 is found only in coral with 1 mouth and H4 and H5 were specific to corals with 2 mouths.However, for the clarity of the study, it is important to increase the number of coral samples with a different number of mouths.

Keywords: Genetic variation, Mushroom coral, *Heteropsammia cochlea*

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิตปิยพัฒนากร ที่ให้คำปรึกษา ข้อคิดเห็นรวมไปถึงให้คำแนะนำวิธีศึกษาและการแก้ปัญหาต่างๆ ในการศึกษา ทำให้โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ในครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำวิชา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมฤดี จิตประไพ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.เพ็ญใจ สมพงษ์ชัยกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์ ที่ช่วยดูแลและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ เพื่อปรับปรุงข้อบกพร่องของโครงการวิจัยนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่าน ที่ให้ความรู้ในการศึกษา ช่วยดูแลและให้คำแนะนำนิสิตตลอด 4 ปีที่ผ่านมา รวมทั้งขอบคุณและขอบใจพี่ๆ เพื่อนๆและน้องๆ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกคน และผู้มีพระคุณทุกท่านที่มิได้เอ่ยนามถึงในครั้งนี้ ที่ให้ความห่วงใย ข้อเสนอแนะ และคำปรึกษาตลอดการดำเนินโครงการนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว สำหรับความรัก ความเข้าใจ กำลังใจ และการสนับสนุนในทุกๆ ด้านที่มีให้เสมอมา

ณัฏฐิกา แจ่มสว่าง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการศึกษา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	1
1.3 ขอบเขตการศึกษา	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและการศึกษาที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ความแปรผันทางพันธุกรรม	3
2.2 ชีววิทยาและลักษณะของปะการัง *Heteropsammia cochlea*	3
2.3 ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial DNA gene)	4
2.4 ยีน Cytochrome C Oxidase subunit I (COI)	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการศึกษา	6
3.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่าง	6
3.2 ทำการทดลองด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา	6
3.3 เพิ่มปริมาณยีนที่สนใจด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)	7

3.3.1 ทดสอบการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของ Primer 7

3.4 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณผลผลิต PCR ด้วยวิธี Gel electrophoresis 9

3.5 การหาลำดับเบส (DNA sequencing) 9

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล 9

บทที่ 4 ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล 10

4.1 การสกัด DNA จากปะการัง 10

4.2 การเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิคPCR 10

4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI กับฐานข้อมูล NCBI 11

4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และความแปรผันทางพันธุกรรม 11

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 16

5.1 สรุปผลการศึกษา 16

5.2 ข้อเสนอแนะ 17

เอกสารอ้างอิง 18

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 3.3.1 ปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่มีจำนวน 1 ปาก, 2 ปาก และ 3 ปาก จากเกาะเต่า 6

รูปที่ 4.2.1 ผลการตรวจสอบ PCR product ของบางตัวอย่าง ด้วยวิธี gel electrophoresis (1.5% agarose gel) 10

รูปที่ 4.4.1 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment ของปะการัง 9 ตัวอย่าง 11

รูปที่ 4.4.2 ความแตกต่างกันของลำดับเบสในตำแหน่งที่ 245, 560 และ 566 12

รูปที่ 4.4.3 ความถี่ของปะการังที่มีจำนวนปากแตกต่างกันในแต่ละรูปแบบพันธุกรรม 15

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1.1 ตัวอย่างและจำนวนปากของปะการัง *H. cochlea* 6

ตารางที่ 3.3.1 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (primer) โดยแสดงลำดับเบสและขนาดของ primer 7

ตารางที่ 3.3.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบหาอุณหภูมิ annealing 8

ตารางที่ 4.4.1 ตำแหน่งลำดับเบสที่แตกต่างกันของรูปแบบพันธุกรรม (haplotypes)
ในตัวอย่างปะการัง ทั้ง 9 ตัวอย่าง 13

ตารางที่ 4.4.2 รูปแบบพันธุกรรมที่พบในปะการังที่มีจำนวนปากต่างกัน 14

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการศึกษา

ปะการัง *Heteropsammia cochlea* จัดอยู่ในไฟลัม Cnidaria ชั้น Anthozoa และอยู่ในวงศ์ Dendrophylliidae ปะการังชนิดนี้มีการดำรงชีวิตแบบ free-living คือการดำรงชีวิตแบบอิสระไม่ได้ยึดติดกับพื้นผิว สามารถเคลื่อนที่ได้ (Hoelsema and Bongaerts, 2016) และมีลักษณะสำคัญที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่นได้ คือจะมีลักษณะคล้ายเลข 8 เมื่อมองจากทางด้านบน ซึ่งเป็นลักษณะของปาก มีหนวดไว้สำหรับจับอาหารเรียงตัวกันเป็นเส้นบริเวณ oral disc ซึ่งอยู่ส่วนบนของปะการัง (Mehrotra, Scott and Hoeksema, 2015) ปะการังชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับหนอนขนาดเล็ก *Aspidosiphon muelleri* ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณใต้ฐานของปะการัง ด้วยการเคลื่อนที่ของหนอนขนาดเล็กนั้นจึงทำให้ปะการังสามารถเคลื่อนที่ได้ เพื่อช่วยในการหาอาหารและหลีกเลี่ยงการถูกฝังในทราย

ในการสำรวจปะการังที่บริเวณเกาะเต่า ปะการัง *H. cochlea* ที่พบนั้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน โดยแตกต่างกันที่จำนวนของปาก ปะการัง *H. cochlea* นั้น เป็นปะการังที่อยู่แบบเดี่ยว (Solitary) ซึ่งใน 1 ก้อนจะมีเพียง 1 โพลิป และในโพลิปนั้นจะมีเพียง 1 ปากแต่ปะการัง *H. cochlea* ที่พบบริเวณเกาะเต่านั้นมีจำนวนปากในแต่ละโพลิปจำนวน 1 ปากไปจนถึง 3 ปาก ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากการปรับตัวของปะการังให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม หรือเกิดจากพันธุกรรม จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของปะการัง *H. cochlea* ที่มีจำนวนของปากที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของปะการัง*Heteropsammia cochlea* ที่มีจำนวนของปากที่แตกต่างกัน

1.3 ขอบเขตการศึกษา

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่มีจำนวนปากแตกต่างกันจากเกาะเต่า เพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่มีจำนวนปากแตกต่างกัน เพื่อประโยชน์ทางการศึกษาสันฐานวิทยาของปะการังดังกล่าว

บทที่ 2 ทฤษฎีและการศึกษาที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความแปรผันทางพันธุกรรม

ความแปรผันทางพันธุกรรม หรือ ความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic Variation) คือ ลักษณะที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต โดยในระบบชีวภาพนั้น สิ่งมีชีวิตในแต่ละหน่วยหรือกลุ่มประชากรจะมียีนที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรม ความแตกต่างทางพันธุกรรมนั้นมีมูลฐานมาจากอัลลีลแบบต่างๆของยีน ซึ่งเกิดขึ้นทั้งภายในกลุ่มประชากรและข้ามกลุ่มประชากรโดยอาศัยสิ่งมีชีวิตเป็นพาหะของยีนในแบบต่างๆ นอกจากนี้ยังเกิดจากการกลายพันธุ์แบบสุ่มซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงอย่างถาวรในโครงสร้างทางเคมีของยีน

ความแปรผันทางพันธุกรรมนั้นเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการวิวัฒนาการ เพราะมีผลต่อการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตที่มีต่อความกดดันทางสิ่งแวดล้อม โดยสิ่งมีชีวิตต้องมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมเพื่อให้มีโอกาสในการอยู่รอด (Vanijajiva, 2012) ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันมักจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน และมีความแตกต่างกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น แต่ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันนั้น ก็มีบางลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้มาจากความแปรผันทางพันธุกรรมที่ทำให้ยีนต่างกัน ความแปรผันทางพันธุกรรมนั้นแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การแปรผันลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่อเนื่อง เป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย และการแปรผันทางพันธุกรรมที่ไม่ต่อเนื่อง เป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนและสามารถจำแนกได้ง่าย การเปลี่ยนแปลงลักษณะของสิ่งมีชีวิตนั้นเกิดได้จาก 2 ปัจจัย คือ พันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม

2.2 ชีววิทยาและลักษณะของปะการัง *Heteropsammia cochlea*

ปะการัง *Heteropsammia cochlea*จัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom): Animalia
ไฟลัม (Phylum): Cnidaria
ชั้น (Class): Anthozoa
อันดับ (Order): Scleractinia
วงศ์ (Family): Dendrophylliidae

ปะการังเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยส่วนมากจะอาศัยอยู่รวมกันเป็นโคโลนีที่ประกอบไปด้วยโพลิปเดี่ยวๆจำนวนมาก แต่ปะการังในกลุ่มปะการังเห็ดนั้นแตกต่างออกไปปะการังใน

กลุ่มนี้อาศัยอยู่แบบเดี่ยว (Solitary) ซึ่งใน 1 ก้อนจะมี1 โพลิป และแต่ละโพลิปมี 1 ปาก และปะการัง *H. cochlea* นั้นจัดอยู่ในกลุ่มปะการังเห็ด ปะการังชนิดนี้มีลักษณะสำคัญที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่นได้ คือจะมีลักษณะคล้ายเลข 8 เมื่อมองจากทางด้านบน ซึ่งเป็นลักษณะของปาก มีหนวดไว้สำหรับจับอาหารเรียงตัวกันเป็นเส้นบริเวณ oral disc ซึ่งอยู่ส่วนบนของปะการัง นอกจากนี้ปะการังชนิดนี้ยังมีความสัมพันธ์กับหนอนขนาดเล็ก *Aspidosiphon muelleri* ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณใต้ฐานของปะการัง ซึ่งการเคลื่อนที่ของหนอนขนาดเล็กนั้นทำให้ปะการังสามารถเคลื่อนที่ได้

ปะการัง *H. cochlea* สามารถพบการแพร่กระจายทั้งใน tropical และ subtropical waters ในแถบ Indo-West Pacific ตั้งแต่บริเวณ eastern coasts of Africa, Red Sea, Philippines, Southern Japan, Australia และ New Caledonia โดยจะอาศัยอยู่ที่ sea floor, flat bottom หรือ gentle slope ที่ระดับความลึกตั้งแต่ 1-40 เมตร

2.3 ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial DNA gene)

ไมโตคอนเดรีย ดีเอ็นเอของสัตว์ มีโครงสร้างเป็นวงกลมสายคู่ มีความยาวประมาณ 16,000 คู่เบส ประกอบด้วยน้ำตาลและเบส 4 ชนิด คือ Adenine (A), Thymine (T), Cytosine (C) และ Guanine (G) โดยระดับในการเรียงตัวเบสเหล่านี้เป็นรหัสในการสร้างโปรตีนที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต มียีนประมาณ 37 ยีน ซึ่งเป็นยีนที่สามารถสร้างโปรตีนได้จำนวน 13 ยีน เช่น Cytochrome b, Cytochrome Oxidase และ ATP synthase เป็นต้น

ไมโตคอนเดรีย ดีเอ็นเอ นั้นมีจำนวนมากในร่างกาย และมีลักษณะที่ถ่ายทอดมาจากมารดาโดยตรง (Maternal inheritance) ทำให้สามารถสืบประวัติทางพันธุกรรมไปทางบรรพบุรุษฝั่งมารดาได้ (Avise et al, 1987) นอกจากนี้ยังมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่า นิวเคลียส ดีเอ็นเอ สูงถึง 5-10 เท่า เพราะไม่มีเอนไซม์ในการซ่อมแซมการสร้างดีเอ็นเอใหม่ ทำให้เกิดการแทนที่เบสและการสลับเบสโดยเฉพาะบริเวณ control region และ ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ นั้นยังเป็น Neutral marker ซึ่งเป็นพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อเข้ากับสิ่งแวดล้อม และไม่มี Intron ซึ่งเป็นลำดับเบสที่เกิดการสร้างโปรตีน (Gissi et al, 2008) อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงในไมโตคอนเดรียทำให้เกิดความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymorphism)จากทั้งหมดที่กล่าวมานั้น ทำให้ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอสามารถบอกข้อมูลได้มากกว่านิวเคลียสดีเอ็นเอในช่วงระยะเวลาที่สั้นกว่าได้ และเหมาะในการนำมาศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ดีเช่นกัน

2.4 ยีน Cytochrome C Oxidase subunit I (COI)

ยีน Cytochrome C Oxidase subunit I เป็นยีนในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) ที่ประกอบไปด้วย 3 subunit ได้แก่ mtCOI, mtCOIIและ mtCOIIIยีน COI เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์ โดยจะแทรกอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย อยู่บริเวณ complex IV ในกระบวนการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน (Electron transport chain) ของกระบวนการ oxidative phosphorylation ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก complex ต่างๆ และเปลี่ยนโมเลกุลออกซิเจนให้กลายเป็นโมเลกุลน้ำ

ยีน COI นี้เป็นยีนที่สามาถนำมาใช้ในการศึกษาอัตราการกลายพันธุ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ดี เนื่องจากยีนในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอนั้นมีอัตราการการกลายพันธุ์สูง รวมไปถึงยีน COI ด้วย ซึ่งยีน COI นี้เป็นยีนที่มีผู้ศึกษาเป็นจำนวนมากและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank จากหลายๆงานวิจัยในต่างประเทศ จึงสามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบและตรวจสอบผลการทดลอง ทำให้ผลการทดลองที่ได้นั้นมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการศึกษา

3.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปะการัง *Heteropsammia cochlea* จากเกาะเต่า อ.เกาะพะงัน จ.สุราษฎร์ธานี โดยเก็บตัวอย่างที่มี 1 ปาก, 2 ปากและ 3 ปาก ต่อ 1 โพลิป รวมทั้งหมด 9 ตัวอย่าง

รูปที่ 3.1.1 ปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่มีจำนวน 1 ปาก, 2 ปาก และ 3 ปาก จากเกาะเต่า (ภาพจาก: Rahul Mehrotra)

ตารางที่ 3.1.1 ตัวอย่างและจำนวนปากของปะการัง*H. cochlea*

รหัสตัวอย่าง	จำนวนปาก
Hc1	1
Hc2	1
Hc3	1
Hc4	1
Hc5	2
Hc6	2
Hc7	2
Hc8	2
Hc9	3

3.2 ทำการทดลองด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

สกัดสารพันธุกรรม (DNA extraction) ด้วยวิธี Salting-out โดยนำตัวอย่างปะการังมาจากนั้นบดให้ละเอียดเป็นผง ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1,500 µLจากนั้นใส่ TNE+1%SDS ลงไปในหลอดที่ใส่ตัวอย่างแล้ว 335µL จากนั้นเติม Proteinase K ลงไป 10 µL นำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที และนำเข้าเครื่อง Incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ระหว่างนั้นให้นำตัวอย่างออกมา vortex และ spin down ทุกๆ 30 นาที จนได้สารละลายใส

หลังจากนั้นเติม 6M NaCl ลงในหลอด 250 µL นำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ขนาด 500 µL และเติม Absolute alcohol 1,000 µL คว่ำและหงายหลอดเพื่อตกตะกอน DNA และนำเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งและเติม 70% ethanol 1,000 µL เพื่อล้างตะกอน นำมาคว่ำและหงาย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง และสุดท้ายนำหลอดทดลองมาตากที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Ultra pure water (Sigma) 30 µL เพื่อละลายตะกอน DNA แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยการนำ DNA ของแต่ละตัวอย่างมา 5 µLผสมกับ Loading dye (สารละลายกลีเซอรอล 40% และ Orange G) 3µLจากนั้นโหลดลงใน 1.0% (w/v) Agarose gel ที่แช่อยู่ใน buffer 0.5X TBE เพื่อแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที

3.3 เพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ยีน COI ซึ่งอยู่ใน mitochondria

3.3.1 ทดสอบการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction; PCR) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของ Primer

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของตัวอย่าง ด้วยเครื่อง Gradient PCR MJ Mini Personal Thermal Cycler (BIO- RAD) เลือกตัวอย่างปะการังที่มีปริมาณ DNA ที่เหมาะสมมา 1 ตัวอย่าง (10-20 ng/µL) และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction โดยใช้ primer ของ COI gene คือ COIDENL, COIDENR(Arrigoni et al, 2014)

ตารางที่ 3.3.1 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (primer) โดยแสดงลำดับเบสของ primer และขนาดของ primer (bp)

Primers	ลำดับเบส	ขนาด (bp)
COIDENL	5'- CGCTGGGCGTTTTCTACTAA -3'	20
COIDENR	5'- GAAATCATTCCAAAGCCAGGT -3'	21

ปฏิกิริยา PCR 25 µLประกอบด้วย 1x KAPA Readymix PCR Kit ของ KAPA Biosystems (KAPA Taq polymerase, KAPA Taq Buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2mM dNTPs) Forward และ Reverse Primer อย่างละ 0.45 pmol/µLและ DNA ต้นแบบ ของตัวอย่าง 10-20ng/µL ลำดับขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, 30 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, อุณหภูมิ annealing ช่วง 45-53 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และจบด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

ผลผลิต PCR ที่ได้จะถูกนำมาตรวจสอบเพื่อดูผลของการทำงานของ Primer ด้วยวิธี Gel electrophoresis นำผลผลิต PCR 5 µL ก่อนโหลดโหลดลงใน 1.5% (w/v) Agarose gel พร้อมกับ KAPA Universal DNA Ladder (Kapa Biosystems) 3 µL แยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที หลังจากนั้นบันทึกภาพภายใต้แสง UV เพื่อใช้ประเมินผล

ตารางที่ 3.3.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบหาอุณหภูมิ annealing

Lane	**อุณหภูมิที่ใช้ (°C)**
A	53.0
B	52.5
C	51.4
D	50.0
E	48.2
F	46.7
G	45.6
H	45.0

เพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

PCR 25µl ประกอบด้วย 1x KAPA Readymix PCR Kit ของ KAPA Biosystems (KAPA Taq polymerase, KAPA Taq Buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2mM dNTPs) Forward และ Reverse Primer อย่างละ 0.45 pmol/µL และ DNA ต้นแบบ 10-20 ng/µL ลำดับขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 94องศาเซลเซียส 2นาที, 30รอบของ 94องศาเซลเซียส 30วินาที, 47องศาเซลเซียส 1 นาที, 72องศาเซลเซียส 1 นาที และจบด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7นาที

3.4 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณผลผลิต PCR ด้วยวิธี Gel electrophoresis

นำผลผลิต PCR 5 µL โหลดลงใน 1.5% (w/v) Agarose gel พร้อมกับ KAPA Universal DNA Ladder (KapaBiosystems) 3 µLแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที หลังจากนั้นบันทึกภาพภายใต้แสง UV ไว้ประเมินผล

3.5 การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

ผลผลิตของ PCR จะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR Purification kit (NucleoSpin®) แล้วนำส่งบริษัท Macrogen, Korea เพื่อทำ Standard Sequencing

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ลำดับเบสของตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำมาเปรียบเทียบโดยการทำ BLAST analysis (Basic Local Alignment Search Tool) จากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อใช้ในการระบุชนิด และนำลำดับเบสทั้งหมดมาทำ Multiple alignment ด้วยซอฟแวร์ของ BioEdit (Hall, 1999)เพื่อจัดกลุ่มแยกลำดับเบสที่เหมือนกันเป็น haplotype ของแต่ละตัวอย่าง

บทที่ 4 ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

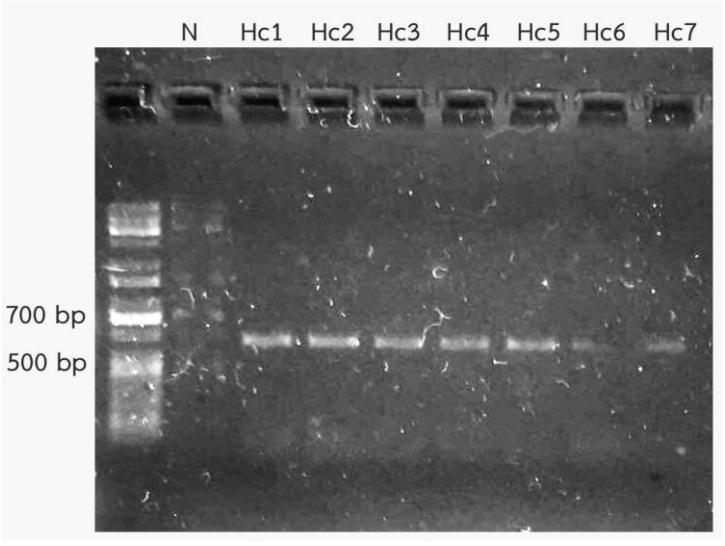
ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการหาลำดับเบส DNA สายสั้นจากยีนCOI ใน mitochondrial DNA ของปะการัง *H. cochlea* ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างปะการังที่มี 1 ปาก 4 ตัวอย่าง, ปะการังที่มี 2 ปาก 4 ตัวอย่าง และปะการังที่มี 3 ปาก 1 ตัวอย่าง เพื่อนำมาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบหาความแตกต่าง

4.1 การสกัด DNA จากปะการัง

จากการสกัด DNA จากตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่างพบว่าการสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธี Salting out สามารถใช้กับตัวอย่างของปะการัง *Heteropsammia cochlea* โดยมีปริมาณ 10 – 50 ng/µL และมีคุณภาพที่สามารถนำไปทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR ได้

4.2 การเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิคPCR

การทำ PCR พบว่า primer COIDENL และ COIDENR ให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 600-700 คู่-เบส โดย primer ชุดนี้สามารถใช้ในการเพิ่มส่วนของยีน COI ได้ดี จึงใช้ primer COIDENL และ COIDENR ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง



รูปที่ 4.2.1 ผลการตรวจสอบ PCR product ของบางตัวอย่าง ด้วยวิธี gel electrophoresis (1.5% agarose gel)

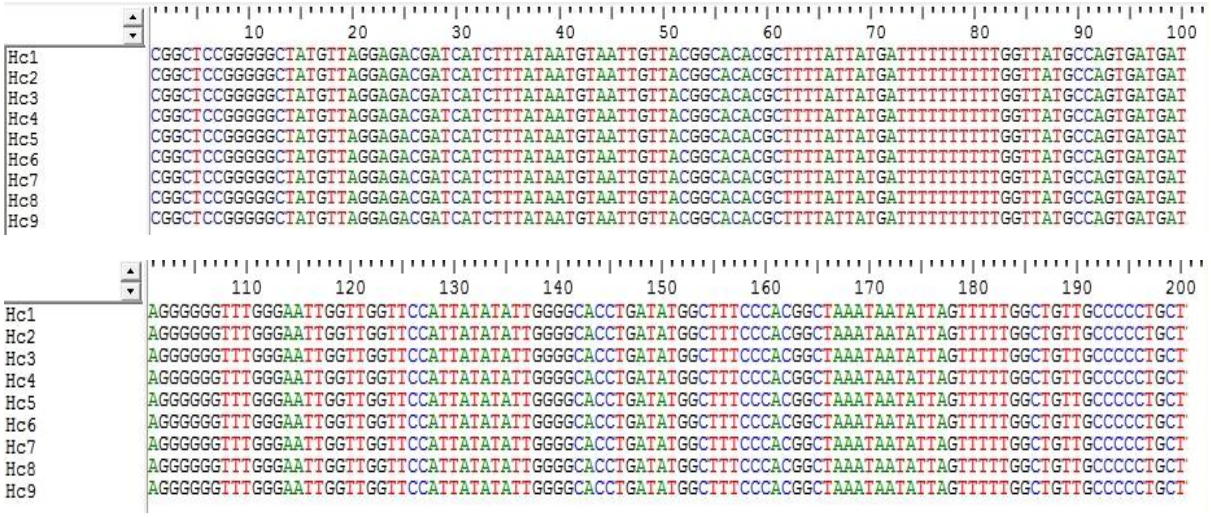
4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI กับฐานข้อมูล NCBI

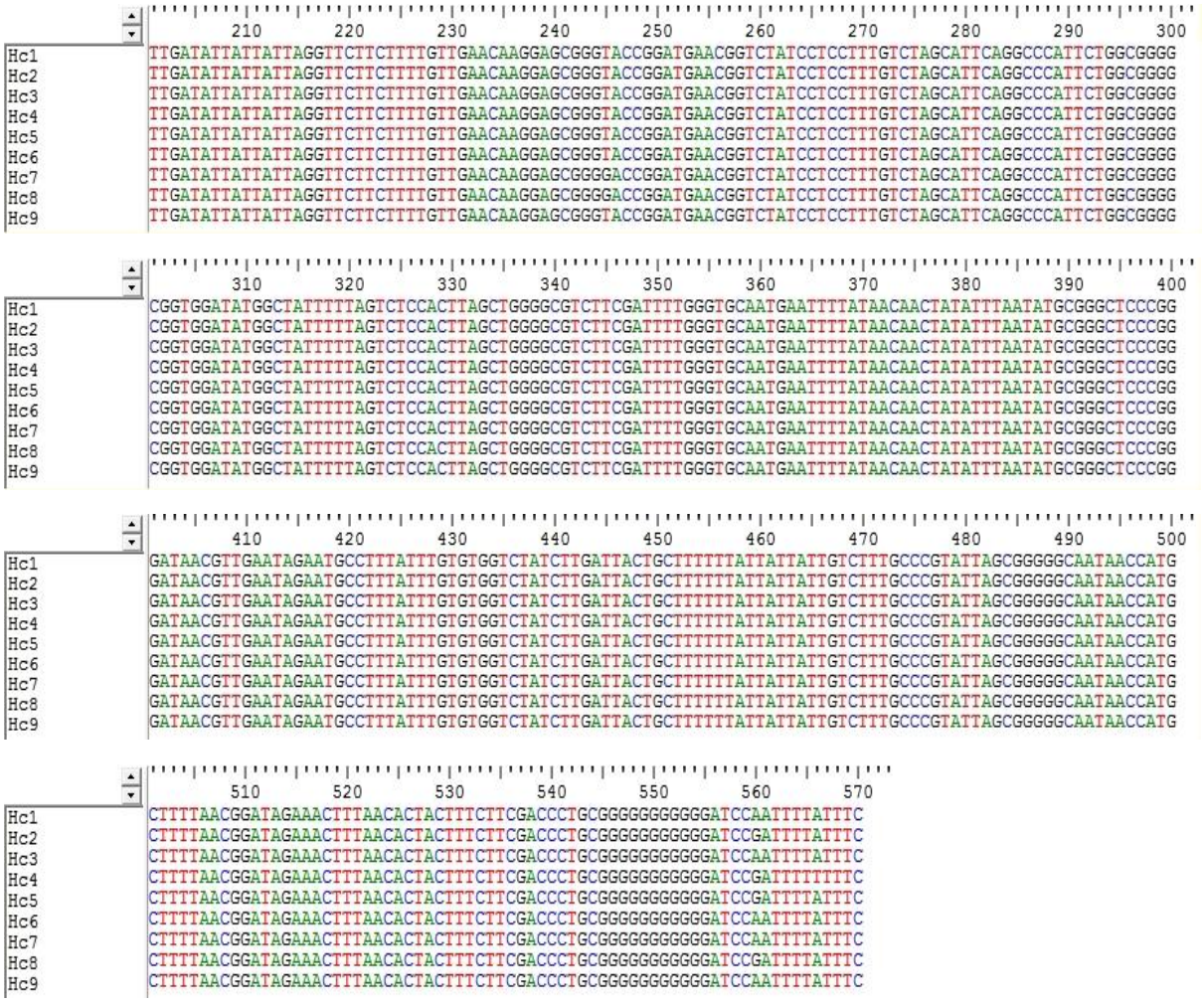
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องเรียบร้อยแล้ว เมื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปะการัง *H. cochlea* ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucletide blast (BLASTN) พบว่าลำดับเบสของปะการังทั้ง 9 ตัวอย่างนั้นมีลำดับเบสตรงกันกับลำดับเบสของปะการัง *H. cochlea* ที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลมากถึง 99-100% จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ปะการังทั้ง9 ตัวอย่างนั้นจะเป็นปะการังชนิดเดียวกัน ซึ่งก็คือปะการัง *H. cochlea*

4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และความแปรผันทางพันธุกรรม

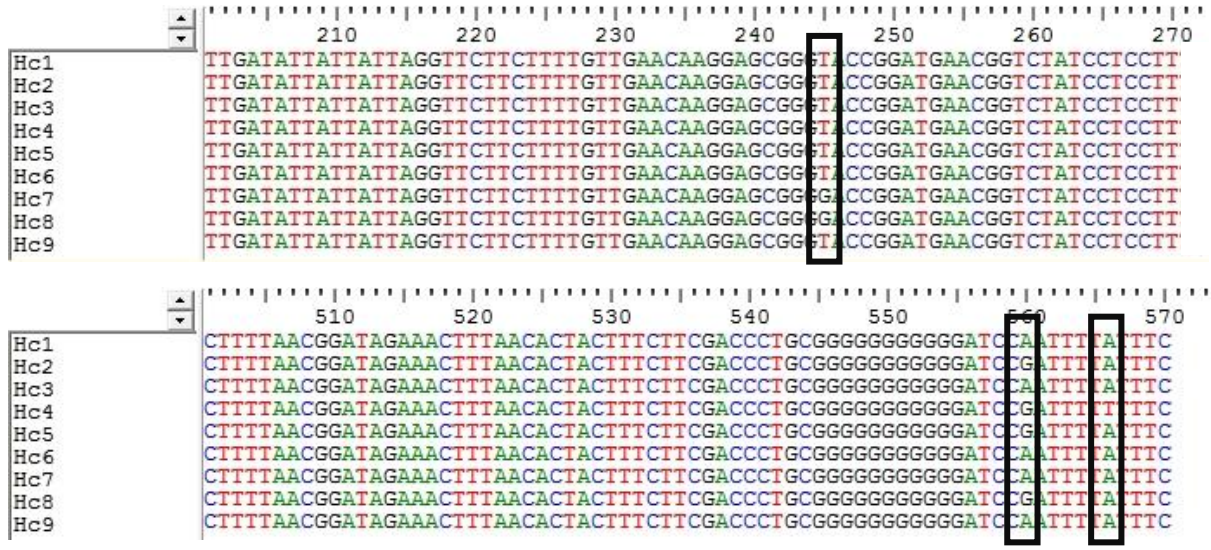
ผลจากการศึกษายีน COI ในปะการัง *Heteropsammia cochlea*เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ sequencing มาแล้ว จะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program และทำการเก็บข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้

เมื่อวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตัดแต่งจากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Programลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปะการัง *H. cochlea* ที่นำมาศึกษามีความยาวขนาด 570 คู่เบส ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยการทำ multiple sequence alignment พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเบสในบางตัวอย่าง โดยพบตำแหน่งที่แตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ลำดับเบสในตำแหน่งที่ 245, 560 และ 566





รูปที่ 4.4.1 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment ของปะการัง 9 ตัวอย่าง



รูปที่ 4.4.2 ความแตกต่างกันของลำดับเบสในตำแหน่งที่ 245, 560 และ 566

จากผลการศึกษาบริเวณที่มีความแตกต่าง จะพบว่าในตำแหน่ง 245 ลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงคือ T และ G โดยในตัวอย่างที่ Hc1, Hc2, Hc3, Hc4, Hc5, Hc6 และ Hc9 พบว่าเบสในตำแหน่งที่ 245 เป็นเบส T ส่วนตัวอย่างที่ Hc7 และ Hc8 นั้นเป็นเบส G

ในตำแหน่งที่ 560 พบลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงคือ A และ G โดยในตัวอย่างที่ Hc1, Hc3, Hc6, Hc7 และ Hc9 พบว่าเบสในตำแหน่งที่ 560 เป็นเบส A ส่วนในตัวอย่างที่ Hc2, Hc4, Hc5 และ Hc8 นั้นเป็นเบส G

ส่วนตำแหน่งที่ 566 นั้นพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส A และ T โดยในตัวอย่างที่ Hc1, Hc2, Hc3, Hc5, Hc6, Hc7, Hc8 และ Hc9 พบว่าเบสในตำแหน่งที่ 566 เป็นเบส A ส่วนตัวอย่างที่ Hc4 นั้นเป็นเบส T

ในการศึกษาด้านความแปรผันทางพันธุกรรม จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน COI พบว่ามีตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันอยู่ทั้งหมด 3ตำแหน่ง ได้แก่ตำแหน่งที่ 245, 560 และ 566ทำให้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันทั้งหมด 5รูปแบบ (haplotypes) ได้แก่ H1-H5โดยรูปแบบทางพันธุกรรมที่พบมากที่สุดคือ H1 ซึ่งพบในตัวอย่างถึง 4 ตัวอย่าง (n=4) รองลงมาคือ H2 พบ 2 ตัวอย่าง (n=2) และน้อยที่สุดคือ H3, H4 และ H5 พบอย่างละ 1 ตัวอย่าง (n=1)

ตารางที่ 4.4.1 ตำแหน่งลำดับเบสที่แตกต่างกันของรูปแบบพันธุกรรม (haplotypes) ในตัวอย่างปะการังทั้ง 9 ตัวอย่าง

Sample	Number of mouths	Variable sites			Haplotypes
		245	560	566	
Hc1	1	T	A	A	H1
Hc2	1	T	G	A	H2
Hc3	1	T	A	A	H1
Hc4	1	T	G	T	H3
Hc5	2	T	G	A	H2
Hc6	2	T	A	A	H1
Hc7	2	G	A	A	H4

Hc8	2	G	G	A	H5
Hc9	3	T	A	A	H1

ในรูปแบบทางพันธุกรรมแบบ H1 นั้นพบในตัวอย่างทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ Hc1, Hc3, Hc6 และ Hc9 ซึ่งตัวอย่าง Hc1 และ Hc3 เป็นปะการังที่มี 1 ปาก, ตัวอย่าง Hc6 เป็นปะการังที่มี 2 ปาก และตัวอย่าง Hc9 เป็นปะการังที่มี 3 ปาก

ในรูปแบบพันธุกรรมแบบ H2 พบในตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ Hc2 และ Hc5 ซึ่งตัวอย่าง Hc2 นั้นเป็นปะการังที่มี 1 ปาก และตัวอย่าง Hc5 เป็นปะการังที่มี 2 ปาก

ส่วนในรูปแบบพันธุกรรมแบบ H3, H4 และ H5 พบเพียงรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง โดยรูปแบบพันธุกรรม H3 พบในตัวอย่าง Hc4 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มี 1 ปาก ส่วนรูปแบบพันธุกรรม H4 และ H5 พบในตัวอย่าง Hc6 และ Hc7 ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองตัวอย่างนั้นเป็นปะการังที่มี 2 ปาก

เมื่อนำแต่ละรูปแบบพันธุกรรมในแต่ละแบบมาเปรียบเทียบกับปะการังแต่ละตัวอย่างที่มีจำนวนปากแตกต่างกัน พบว่ารูปแบบพันธุกรรมแบบ H1 พบทั้งในปะการังที่มีจำนวน 1 ปาก, 2 ปาก และ 3 ปาก รูปแบบพันธุกรรมแบบ H2 พบในปะการังที่มีจำนวน 1 ปาก และ 2 ปาก รูปแบบพันธุกรรมแบบ H3 พบในปะการังที่มีจำนวน 1 ปาก ส่วนรูปแบบพันธุกรรมแบบ H4 และ H5 พบในปะการังที่มีจำนวน 2 ปาก

ตารางที่ 4.4.2 รูปแบบพันธุกรรมที่พบในปะการังที่มีจำนวนปากต่างกัน

Haplotypes	Number of mouths		
	1	2	3
H1	✓	✓	✓
H2	✓	✓	
H3	✓		
H4		✓	
H5		✓	

รูปที่ 4.4.3 ความถี่ของปะการังที่มีจำนวนปากแตกต่างกันในแต่ละรูปแบบพันธุกรรม

บทที่ 5 สรุปผลศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษา พบว่าลำดับเบสของยีน COI ในปะการัง *Heteropsammia cochlea* ที่นำมาศึกษามีจำนวน 570 คู่เบส เมื่อนำลำดับเบสของทั้ง 9 ตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยการทำ multiple sequence alignment โดยโปรแกรม BioEdit พบว่ามีบริเวณที่แตกต่างกัน (variable site) ทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ความแตกต่างนั้นคิดเป็น 0.53% ซึ่งมีค่าน้อยมาก จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ปะการังที่มีจำนวนปากแตกต่างกันจะเป็นชนิดเดียวกัน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการalignment และตัดแต่งโดยโปรแกรม BioEdit มาเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปะการัง *H. cochlea* ที่มีการเก็บสะสมอยู่ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucletide blast (BLASTN) โดยจะแสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นความเหมือนและความคล้ายคลึง (percentage identity) พบว่ามีค่าเท่ากับ 99-100%

จากความแตกต่างที่พบสามารถนำมาจัดรูปแบบพันธุกรรม (haplotype) แบ่งได้เป็น 5 รูปแบบ (H1-5) จากตัวอย่างปะการังทั้งหมด 9 ตัวอย่าง โดยรูปแบบพันธุกรรมที่พบมากที่สุดคือ H1 โดยพบทั้งหมด 4 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่มี 1 ปาก จำนวน 2 ตัวอย่าง, 2 ปาก จำนวน 1 ตัวอย่าง และ 3 ปาก จำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วนรูปแบบ H2 นั้นพบ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ในตัวอย่างที่มี 1 ปาก จำนวน 1 ตัวอย่าง และ 2 ปาก จำนวน 1 ตัวอย่าง รูปแบบ H3 นั้นพบเพียง 1 ตัวอย่าง โดยพบในตัวอย่างที่มี 1 ปาก ส่วนรูปแบบ H4 และ H5 นั้นพบอย่างละ 1 ตัวอย่าง โดยพบในตัวอย่างที่มี 2 ปาก ทั้งสองรูปแบบ

จากผลการศึกษาพบว่ารูปแบบพันธุกรรมแบบ H1 เป็น common haplotype โดยสามารถพบได้ทั้งในปะการังที่มีจำนวน 1 ปาก, 2 ปาก และ 3 ปาก จึงไม่สามารถใช้รูปแบบพันธุกรรมแบบ H1 ในการจำแนกปะการังที่มีจำนวนปากที่แตกต่างกันออกมาได้

รูปแบบพันธุกรรม H3 นั้นมีความจำเพาะในตัวอย่างที่มี 1 ปาก เพราะรูปแบบพันธุกรรมแบบ H3 นั้นพบเพียงในตัวอย่างปะการังที่มี 1 ปากเท่านั้น ส่วนรูปแบบพันธุกรรมแบบ H4 และ H5 ก็มีความจำเพาะในตัวอย่างที่มี 2 ปากเช่นกัน เพราะรูปแบบพันธุกรรมทั้ง 2 แบบนี้ พบเฉพาะในปะการังที่มีจำนวน 2 ปาก แต่จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ยังไม่สามารถสรุปได้ว่ารูปแบบพันธุกรรมเหล่านี้เป็นลักษณะเฉพาะของปะการังที่มีจำนวน 1 ปาก และ 2 ปาก เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นมีจำนวนน้อย ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อความชัดเจนของผล

5.2 ข้อเสนอแนะ

ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีจำนวนน้อย ทำให้ผลที่ได้ยังไม่มีความชัดเจนและน่าเชื่อถือ ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างของปะการัง

เอกสารอ้างอิง

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552. อณูพันธุศาสตร์เบื้องต้น: มหัศจรรย์ของดีเอ็นเอ. 2000 เล่ม. ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. 2551. พื้นฐานเทคนิค polymerace chain reaction. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

หัทยา กาวีวงศ์. 2546. อณูพันธุศาสตร์. ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ห้างหุ้นส่วนจำกัด เชียงใหม่บิสเนสเซ็นเตอร์ แอนด์ สตูดิโอ.

หนูเดือน เมืองแสน. 2552. คู่มือ: การทำวิจัยทางชีววิทยาระดับโมเลกุล.1000 เล่ม. ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. and Lipman, D. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403-410.

Arrigoni, R., Kitano, Y.F., Stolarski, J., et al. 2014. A phylogeny reconstruction of the Dendrophylliidae (Cnidaria, Scleractinia) based on molecular and micromorphological criteria, and its ecological implications. Zoologica Scripta, 43: 661-688.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., et al. 1987. Intraspecificphylogeography - The mitochondrial-DNA bridge between population genetics and systemics. Annual Review of Ecology and Systematics, 18: 489-522.

Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids SympSer, 41: 95-98

Hoeksema, B. W. and Bongaerts, P. 2015. Mobility and self-righting by a free-living mushroom coral through pulsed inflation.Senkenberg: 521-524.

Katanchalee, Nampuksa. 2007. Genetic variation of *Noctiluca scintillans* in the inner gulf of Thailand. Master's Thesis, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Mehrotra, R., Scott, C. M. and Hoeksema, B. W. 2015. A large gape facilitates predation on salps by *Heteropsammia* corals. Senkenberg.

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 Res, 16(3): 1215.

Okamoto, K., Perman, P. and Butow, R. 1998. The Sorting of Mitochondrial DNA and Mitochondrial Proteins in Zygotes: Preferential Transmission of Mitochondrial DNA to the Medical Bud. The Journal of Cell Biology, 142(3): 613-623.

Ongkarn,Vanijajiva. 2012. Low genetic variation of *Boesenbergia tenuispicata*, a species endangered and endermic to Thailand, using RAPD markers. Thai J. Genet.: 67-78

Palumbi, S. R., 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. Molecular systematics: 205-248.

Sakone, Sunantaraporn. 2014. Analysis of Cytochrome Oxidase subunit I gene in mitochondrial DNA of human head lice (*Pediculus humanus capitis*) in Thailand. Master's Thesis, Department of Medical Science, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Thomson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24: 4876-4882.