

## ตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของปะการังดอกกะหล่ำ

*Pocillopora damicornis* Asexual Larvae in Cualiflower Coral*Pocillopora damicornis*

ทิพวิมล รัตนวงวาล<sup>1\*</sup>, สุชนา ชวนิชย์<sup>2</sup>, วรณพ วียากัญญ์<sup>3</sup> และศานิต ปิยพัฒน์<sup>4</sup>  
Tipwimon Rattanawongwan<sup>1\*</sup>, Suchana Chavanich<sup>2</sup>, Voranop Viyakarn<sup>3</sup>  
and Sanit Piyapattanakorn<sup>4</sup>

<sup>1</sup> กลุ่มวิจัยชีววิทยาแนวปะการัง ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>1</sup> Reef Biology Research Group, Department of Marine Science, Faculty of Science,  
Chulalongkorn University

<sup>2, 3</sup> รองศาสตราจารย์ ดร., กลุ่มวิจัยชีววิทยาแนวปะการัง ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>2, 3</sup> Associate Professor Dr., Reef Biology Research Group, Department of Marine Science, Faculty of  
Science, Chulalongkorn University, Thailand.

<sup>4</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร., กลุ่มวิจัยชีววิทยาแนวปะการัง ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<sup>4</sup> Assistant Professor Dr., Reef Biology Research Group, Department of Marine Science, Faculty of  
Science, Chulalongkorn University, Thailand.

\*Corresponding author, E-mail: tipwimon.r@hotmail.com

**บทคัดย่อ**

ปะการังแข็งโดยทั่วไปสามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ปะการังดอกกะหล่ำ (*Pocillopora damicornis*) ก็เช่นกัน แต่ลักษณะเด่นของปะการังชนิดนี้ คือ เซลล์ไข่สามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนได้แม้ไม่ได้รับการผสมกับสเปิร์ม (parthenogenesis) นอกจากนี้อัตราส่วนการสร้างตัวอ่อนแบบปกติและแบบไม่อาศัยเพศนี้จะแตกต่างกันไปตามปัจจัยต่างๆ เช่น ขนาดของโคโลนี สภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่ และการขึ้นลงของมวนน้ำ เป็นต้น การศึกษานี้มุ่งสำรวจการสร้างตัวอ่อนแบบไม่อาศัยเพศของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* บริเวณอำเภอสตึก จังหวัดชลบุรี โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ในส่วนของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอจำนวน 5 ตำแหน่ง ตรวจสอบจีโนไทป์ของโคโลนีแม่และตัวอ่อน โดยใช้ตัวอ่อนจากโคโลนีแม่ 4 โคโลนี ๆ ละ 40 ตัว เมื่อเทียบรูปแบบพันธุกรรมของตัวอ่อนกับโคโลนีแม่ พบว่าตัวอ่อนทั้ง 4 โคโลนีนั้นมีรูปแบบพันธุกรรมเหมือนกับโคโลนีแม่ทุกประการ ซึ่งหมายถึงตัวอ่อนพัฒนามาจากไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของสเปิร์ม แสดงให้เห็นว่าประชากรส่วนใหญ่ของปะการังชนิดนี้

ในบริเวณดังกล่าวน่าจะมีการทดแทนประชากรมาจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ในพื้นที่

**คำสำคัญ:** ตัวอ่อน ไม่อาศัยเพศ ปะการังดอกกะหล่ำ ไมโครแซทเทลไลท์

## Abstract

Cauliflower coral, *Pocillopora damicornis*, has two reproductive modes: sexual reproduction and asexual reproduction. However, there were reports that the Planula larvae could be reproduced via both sexual and asexual reproductions, simultaneously and the proportion of sexual larvae and asexual larvae were dependent on locations, environments, colony size, and cycle day. This study focused on the occurrence of asexual larvae in Cauliflower coral, *P. damicornis*. The genotypes of 4 brood colonies and 40 larvae of each brooder at Sattahip, Chonburi were examined using 5 polymorphic microsatellite loci. The microsatellite genotyping results revealed asexual or parthenogenetic larvae were found in all brood colonies. This result suggested that most of the recruitment of the population were derived from asexual reproduced larva. This could have an effect on the genetic diversity of the population in the area.

**Keywords:** larvae, parthenogenetic, *Pocillopora damicornis*, microsatellite

## บทนำ

ปะการังดอกกะหล่ำ *P. Damicornis* มีรูปแบบการสืบพันธุ์เหมือนกับปะการังส่วนใหญ่ ซึ่งโดยทั่วไปสามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แตกต่างกันตามชนิดและพื้นที่ (Harrison & Wallace, 1990) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดจากการแลกเปลี่ยนของพันธุกรรมระหว่างสเปิร์มของพ่อและเซลล์ไข่ของแม่ โดยอาจเกิดจากการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ให้ผสมกันในมวลน้ำ (spawning) หรือเซลล์สืบพันธุ์ผสมกันภายในโคโลนี (brooding) ซึ่งปะการังที่เกิดใหม่จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างหรือใกล้เคียงกับโคโลนีพ่อแม่ การสืบพันธุ์รูปแบบนี้ช่วยเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการเข้าสู่ของยีนพ่อแม่และเป็นประโยชน์ต่อการกระจายเนื่องจากตัวอ่อนพัฒนาไปตามมวลน้ำก่อนจะลงเกาะบนพื้นผิว ซึ่งแตกต่างจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยเฉพาะการแตกหักของชิ้นส่วนปะการัง (fragmentation) ที่พันธุกรรมของโคโลนีใหม่เหมือนโคโลนีเดิมทุกประการ อีกทั้งไม่สามารถกระจายตัวได้ไกลจากโคโลนีเดิม การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ การแตกหักของชิ้นส่วนปะการัง (Adjerdoud & Tsuchiya, 1999) การแตกหน่อ (Sakai, 1998) การแยกตัวของโพลีป (polyp bail-out) (Sammacro, 1982) และการพัฒนาตัวอ่อนจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม (parthenogenesis) ตัวอ่อนของกลุ่มนี้มีลักษณะทางพันธุกรรม

เหมือนกับโคลนนิ่งแม่ พบในปะการัง *P. damicornis* เป็นต้น (Stoddart, 1983; 1984; Ayre & Resing, 1986; Yeoh & Dai, 2010)

รูปแบบการสืบพันธุ์ของปะการังในแต่ละพื้นที่ที่มีความเด่นแตกต่างกัน โดยพื้นที่ที่ได้รับการทำลายจากภัยธรรมชาติเป็นประจำ หรือพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมสูง เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเนื่องจากภาวะโลกร้อน ปะการังในพื้นที่เหล่านี้มีการทดแทนประชากรโดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสูง เนื่องจากสามารถทดแทนประชากรภายในพื้นที่ที่ถูกทำลายได้ในปริมาณมากภายในเวลาที่รวดเร็วกว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่ต้องรอระยะเวลาพร้อมสืบพันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์ แต่การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศช่วยให้เกิดการขยายพื้นที่ของแนวปะการังและเป็นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม (Benzie et al., 1995; Adjeroud & Tsuchiya, 1999; Miller & Ayre, 2004) อย่างไรก็ตาม พบว่าการแตกหักของปะการังในปริมาณมากจะส่งผลให้การปล่อยตัวอ่อนลดลง และขนาดของตัวอ่อนเล็กลงด้วย แสดงว่าพื้นที่ที่ประชากรส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนำไปสู่การลดความสามารถในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ส่งผลให้การขยายพื้นที่และความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง (Zakai et al., 2000)

รูปแบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในปะการัง *P. Damicornis* นี้ก็มีความแตกต่างกันตามพื้นที่บริเวณแนวเส้นศูนย์สูตรทางฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิกพบการสืบพันธุ์โดยวิธี Broadcasting ในขณะที่พื้นที่แถบอินโดแปซิฟิกส่วนใหญ่เป็น brooding (Combosch & Vollmer, 2011) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการไหลของกระแสน้ำเนื่องจากการหมุนของโลกทำให้เซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อนแพร่กระจายจากตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิกซึ่งเป็น broadcast spawners ไปยังตะวันตกที่มีการทดแทนประชากรภายในพื้นที่โดย brooder (Stoddart, 1984; Ayre & Resing, 1986; Chávez-Romo, 2008; Combosch & Vollmer, 2011; Paz-García et al., 2012) แต่มีบางพื้นที่ไม่เป็นไปตามการศึกษาเหล่านี้ เช่น ปะการังในแนวปะการัง great barrier reef ประเทศออสเตรเลีย มีการสืบพันธุ์ทั้งโดยการอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศกระจายในแต่ละพื้นที่ ทั้งๆ ที่สภาพพื้นที่และสภาพแวดล้อมไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน (Sherman et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ในไต้หวัน และญี่ปุ่น ตัวอ่อนของปะการังชนิดนี้เกิดจากทั้งการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจากเสปิร์ม และการผสมกับเสปิร์มของโคลนอื่นในเวลาเดียวกัน แต่สัดส่วนของทั้งสองรูปแบบนั้นต่างกันตามช่วงเวลาและสถานที่ (Stoddart, 1983; Stoddart, 1984; Ayre & Resing, 1986; Yeoh & Dai, 2010) สำหรับปะการัง *P. Damicornis* ในพื้นที่ประเทศไทยนั้นเป็น Brooder คือ ตัวอ่อนได้รับการผสมและพัฒนาอยู่ภายในโคลนนิ่ง แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับรูปแบบการสร้างตัวอ่อนของปะการังชนิดนี้

การศึกษาพันธุกรรมของตัวอ่อนเริ่มจากการใช้ allozyme electrophoresis (Stoddart, 1983) แต่การศึกษาด้วยวิธีการนี้นำมาใช้เปรียบเทียบพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่และตัวอ่อนได้ไม่ชัดเจนนักเนื่องจากมีความแปรปรวนต่ำ ปัจจุบันมีการพัฒนาทางเทคนิคและวิธีการที่สามารถใช้ได้สะดวกและมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า เช่น การใช้ microsatellite หรือ short tandem repeats (STR) โดยไมโครแซท

พลโลห์เป็นบริเวณหนึ่งของจีโนมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน 2-6 เบส ความยาวประมาณ 100-500 คู่เบส (Brooker, 2009; Snusted & Simmons, 2010) ซึ่งในแต่ละ microsatellite locus จะมีจำนวนลำดับที่ซ้ำกันนี้แตกต่างกัน จึงนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างเฉพาะตัว และศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้ รวมทั้งปะการัง (Megalon et al., 2004; Megalon et al., 2005; Megalon et al., 2006)

การใช้ microsatellite markers ในการศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ของปะการังมีความเหมาะสมเนื่องจากเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตเป็นอย่างมาก จึงทำให้ไม่มีปัญหาในเรื่องการปนเปื้อนของสาหร่ายขนาดเล็ก (zooxanthellae) ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อปะการัง (Ayre & Resing, 1986) เป็นเครื่องหมายที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง ซึ่งจำเป็นต่อการสืบหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปะการังแต่ละโคโลนี ที่สำคัญคือมีลักษณะเป็น co-dominant markers นำมาตรวจสอบเฮเทอโรไซโกตได้ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการพิสูจน์ว่า ปะการังมีการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis หรือ self-fertilization โดยเทียบความเหมือนของจีโนไทป์ระหว่างพ่อแม่และลูก หากตัวอ่อนมีจีโนไทป์เหมือนแม่ทุกประการแสดงว่าเป็นการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis (Stoddart, 1983; (Megalon et al., 2004; Megalon et al., 2005; Megalon et al., 2006; Starger et al., 2008; Brooker, 2009; Snusted & Simmons, 2010) ทั้งนี้การศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ที่ชัดเจนจะทำให้เห็นโครงสร้างทางพันธุกรรม การถ่ายเทของยีน และความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สามารถช่วยในการจัดการและการอนุรักษ์ทรัพยากรปะการังให้มีความเหมาะสมกับพื้นที่ได้ดียิ่งขึ้น

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ตรวจสอบการสร้างตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศบริเวณอำเภอสตูล จังหวัดสตูล

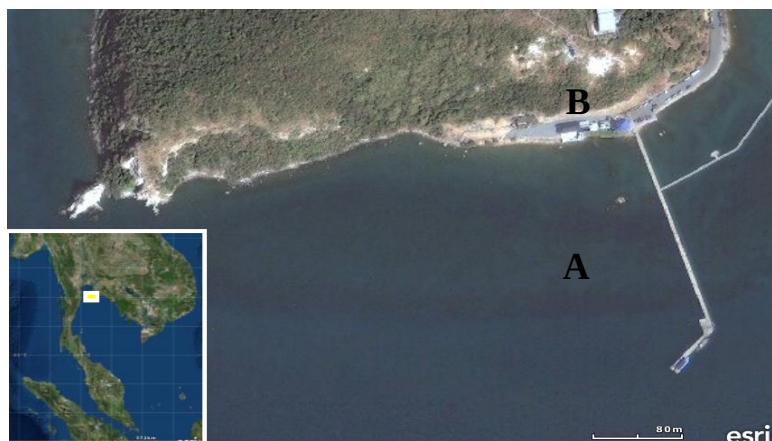
### แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

แม้จะมีการพบว่าปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* สามารถสร้างตัวอ่อนได้ทั้งจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและจากไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม แต่สัดส่วนการสร้างตัวอ่อนทั้งสองรูปแบบนั้นแตกต่างกันไปตามพื้นที่ พื้นที่ที่ถูกรบกวนน้อยและปัจจัยธรรมชาติเอื้ออำนวย จะพบว่าปะการังชนิดนี้จะมีรูปแบบการทดแทนประชากรโดยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นหลัก ส่วนพื้นที่ที่ถูกรบกวนไม่ว่าจะมีสาเหตุจากธรรมชาติหรือกิจกรรมของมนุษย์ พื้นที่นั้นจะพบว่าการทดแทนประชากรด้วยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นหลัก เพราะว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศต้องใช้ระยะเวลาในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งประชากรพื้นที่นั้นควรเน้นการเพิ่มจำนวนเพื่อไม่ให้ปะการังชนิดนั้นสูญพันธุ์ไปจากพื้นที่ ดังนั้นการที่จะอนุรักษ์ปะการังควรต้องมีการศึกษารูปแบบการทดแทนประชากรในพื้นที่นั้นๆ ก่อนเพื่อจะช่วยในการวางแผนการอนุรักษ์ให้ดีขึ้น หากพื้นที่นั้นมีการทดแทนประชากรแบบอาศัยเพศเป็นหลัก

การอนุรักษ์ควรเน้นไปในทางการเพิ่มจำนวนประชากร แต่หากพื้นที่นั้นมีการทดแทนประชากรแบบไม่อาศัยเพศเป็นหลัก ควรเน้นการเพิ่มความหลากหลายของพันธุกรรม เพื่อช่วยให้การอนุรักษ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น

### วิธีดำเนินการวิจัย

เก็บตัวอย่างโคลนปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* จากพื้นที่แนวปะการังสะพานท่าเรือเขาหมาจอ อำเภอสตูล จังหวัดสตูล ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2556 ด้วยการดำน้ำลึก (scuba) ซึ่งปะการังชนิดนี้จะปล่อยตัวอ่อนทุกเดือน โดยเลือกเก็บตัวอย่างเฉพาะโคลนที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคลนไม่ต่ำกว่า 15 เซนติเมตร และเมื่อหักกิ่งดูพบว่ามีตัวอ่อนพัฒนาอยู่ในโพลีป หรือเรียกว่าโคลนแม่ (broodparent) จำนวน 4 โคลน นำส่วนของปะการังที่พร้อมปล่อยตัวอ่อนมาเลี้ยงในโรงอนุบาลปะการังที่อยู่บริเวณสะพานท่าเรือเขาหมาจอ เพื่อรอให้ปะการังปล่อยตัวอ่อน โดยระยะเวลาและปริมาณการปล่อยตัวอ่อนนั้นขึ้นอยู่กับแต่ละโคลน จากนั้นสุ่มเก็บตัวอ่อนที่ถูกปล่อยออกมาจนกว่าจะได้อย่างน้อย 40 ตัวต่อโคลน เมื่อตัวอ่อนถูกปล่อยออกมาแล้วให้เก็บชิ้นส่วนโคลนแม่ โคลนละ 3 ชิ้น แต่ละชิ้นยาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกเก็บรักษาไว้ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบที่ 1 พื้นที่แนวปะการังบริเวณสะพานท่าเรือเขาหมาจอ อำเภอสตูล จังหวัดสตูล โดย A คือ จุดดำน้ำเก็บตัวอย่าง ( $12^{\circ} 35' 54.05''$  องศาเหนือ  $100^{\circ} 56' 54.20''$  องศาตะวันออก) B คือ โรงอนุบาลปะการัง

### การสกัดสารพันธุกรรม

นำชิ้นส่วนปะการังมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ The FavorPrep (favorgen) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมที่ทางผู้ผลิตระบุไว้ ส่วนดีเอ็นเอของตัวอ่อนสกัดด้วยเทคนิคการกำจัด

เกลือ (Salting out technique) (Miller et al., 1988) โดยใส่ตัวอ่อนแต่ละตัวลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติมน TNE buffer (pH 8.0) กับ 1% SDS 385  $\mu$ l และ proteinase K (10mg/ml) 15  $\mu$ l แล้วนำตัวอย่างเข้าสู่ตู้อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างออกมาที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม 6M NaCl 200  $\mu$ l เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที นำสารละลายใสด้านบนลงในหลอดทดลองอันใหม่ เติมน 1,000  $\mu$ l 95% เอทานอล พลิกหลอดทดลองไปมาเพื่อให้สารพันธุกรรมตกตะกอน นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เท 95% เอทานอล ออกจากหลอดทดลองให้หมด แล้วเติมน 700  $\mu$ l 70% เอทานอล พลิกหลอดทดลองไปมา นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ค่อยๆ ตูด 70% เอทานอลออกจากหลอดทดลองให้หมด ตากสารพันธุกรรมให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน 30  $\mu$ l TE buffer (pH 8.0) (0.01M Tris-HCl และ 1mM EDTA) เขย่าหลอดทดลองให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

### การเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction; PCR)

ในการศึกษานี้ได้เลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ซึ่งอยู่ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ อีกทั้งยังมีความเหมาะสมในการศึกษาเปรียบเทียบพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่และลูกดั่งที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยเครื่องหมายพันธุกรรมที่เลือกใช้ถูกพัฒนาโดย Magalon et al. (2004) และ Starger et al. (2008) โดยปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25  $\mu$ l 1x PCR mixture ประกอบด้วย 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 pmol และดีเอ็นเอแม่แบบประมาณ 10-20 ng ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที annealing temperature (ขึ้นกับไพรเมอร์ที่ใช้) 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และจบด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที (ตารางที่ 1) ผลผลิต PCR ที่ได้จะถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

### การตรวจสอบจีโนไทป์

ผลผลิต PCR ที่ตรวจสอบแล้วของทั้งโคลนแม่และตัวอ่อนถูกส่งไปตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่อง automated genotyping ABIX3730 โดย MacroGen Inc. และผลที่ได้นำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GeneMarker 2.0 ซึ่งโปรแกรมจะแสดงขนาดของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ เพื่อนำมาใช้ระบุจีโนไทป์ของตัวปะการังโคลนแม่และตัวอ่อนในแต่ละตำแหน่ง โดยหากตัวอ่อนทุกตัวเป็นเฮเทอโรไซโกตและมีจีโนไทป์เหมือนโคลนแม่ทุกตำแหน่ง แสดงว่าเกิดจากการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม (parthenogenesis) แต่หากมีตัวอ่อนที่มีจีโนไทป์ต่างจากโคลนแม่แสดงว่าเกิดการเข้าคู่ของยีนกับโคลนอื่น



**ตารางที่ 1** เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif) ขนาดของผลผลิต PCR (คู่เบส) อุณหภูมิ annealing (Ta) และจำนวนของแอลลีลที่พบ (Na)

| Locus   | Primer sequences (5' – 3')                           | STR motif          | Size (bp) | Ta (°C) | Na |
|---------|------------------------------------------------------|--------------------|-----------|---------|----|
| Pd2-006 | TCTCCATGTGATCGGCATT-HEX<br>GTTCCCCCAGCTGAGAAGTT      | (CA) <sub>8</sub>  | 196       | 50.9    | 1  |
| Pd3-004 | ACCAGACAGAAACACGCACA-6FAM<br>GCAATGTGTAACAGAGGTGGAA  | (ATG) <sub>8</sub> | 194-212   | 54.3    | 4  |
| Pd3-005 | AGAGTGTGGACAGCGAGGAT-NED<br>GTTCTTCGCCTTCGATTTT      | (TGA) <sub>9</sub> | 214-236   | 59.0    | 3  |
| Pd3-008 | AGTTGAGGTTGTTGAAACATG-NED<br>TCCATGCAGAACCCC         | (CTG) <sub>7</sub> | 164       | 57.0    | 1  |
| PV2     | GCCAGGACCCATTTATACTCC-6FAM<br>TGCAGTGTCTACTTGTCACTGC | (GA) <sub>20</sub> | 128-170   | 56.0    | 3  |

### ผลการวิจัย

จากการสำรวจและวิเคราะห์จีโนไทป์ของโคลนแม่ทั้ง 4 โคลน และตัวอ่อนจากโคลนแม่ดังกล่าว ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง พบว่ามี 2 ตำแหน่ง คือ Pd2-006 และ Pd3-008 แสดงผลเป็นโฮโมไซโกตที่มีจีโนไทป์เหมือนกันทั้งในโคลนแม่และตัวอ่อน แสดงให้เห็นว่าไมโครแซทเทลไลต์ 2 ตำแหน่งนี้ มีความแปรปรวนน้อยมาก และไม่สามารถระบุได้ว่า ตัวอ่อนเกิดจากการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis หรือไม่ เพราะผลดังกล่าวสามารถเกิดได้จากการรูปแบบการสืบพันธุ์หลายรูปแบบ ทั้งการผสมพันธุ์ตัวเอง (self - fertilisation) การผสมข้ามของโคลนพ่อที่มีจีโนไทป์เหมือนแม่ (cross-fertilisation) หรือแม้การสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis อย่างไรก็ตาม ในไมโครแซทเทลไลต์อีก 3 ตำแหน่งที่เหลือ คือ Pd-3004 Pd3005 และ PV2 แสดงผลเป็นเฮเทอโรโกตที่มีจีโนไทป์เหมือนกันทั้งในโคลนแม่และตัวอ่อนแสดงให้เห็นว่า ตัวอ่อนของปะการังดอกกะหล่ำที่ได้จากโคลนแม่ทั้ง 4 โคลนในการศึกษาครั้งนี้ จึงเกิดจากการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis เพราะหากเกิดจากการสืบพันธุ์รูปแบบอื่น จีโนไทป์ของตัวอ่อนในแต่ละโคลนแม่ต้องไม่เหมือนกันร้อยเปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)



ตารางที่ 2 จีโนไทป์ของโคลนีแม่และตัวอ่อนปะการังในแต่ละตำแหน่ง (\* ตำแหน่งที่เป็นโฮโมไซโกต)

|           | Microsatellite loci and Genotypes |         |         |         |         | Total of larvae |
|-----------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|-----------------|
|           | Pd2006*                           | Pd3004  | Pd3005  | Pd3008* | PV2     |                 |
| Brooder 1 | 196/196                           | 206/212 | 214/220 | 164/164 | 128/158 |                 |
| Larvae    | 196/196                           | 206/212 | 214/220 | 164/164 | 128/158 | 40              |
| Brooder 2 | 196/196                           | 206/212 | 214/220 | 164/164 | 128/158 |                 |
| Larvae    | 196/196                           | 206/212 | 214/220 | 164/164 | 128/158 | 40              |
| Brooder 3 | 196/196                           | 194/209 | 214/236 | 164/164 | 158/170 |                 |
| Larvae    | 196/196                           | 194/209 | 214/236 | 164/164 | 158/170 | 40              |
| Brooder 4 | 196/196                           | 194/209 | 214/236 | 164/164 | 158/170 |                 |
| Larvae    | 196/196                           | 194/209 | 214/236 | 164/164 | 158/170 | 40              |

### สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษารูปแบบการสร้างตัวอ่อนปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* ในพื้นที่สัดหีบ จังหวัดชลบุรี โดยศึกษาด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง พบว่า ตำแหน่ง Pd2-006 และ Pd3-008 ไม่สามารถใช้วิเคราะห์ได้ว่าตัวอ่อนเกิดจากการสืบพันธุ์แบบใด เนื่องจาก จีโนไทป์ของโคลนีแม่และตัวอ่อนเหมือนกันและเป็นโฮโมไซโกต (Starger et al., 2008) อย่างไรก็ตามไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเออีก 3 ตำแหน่ง (Pd-3004 Pd3005 และ PV2) ให้ผลจีโนไทป์ของโคลนีแม่ และตัวอ่อนเป็นเฮเทอโรไซโกต และมีจีโนไทป์เหมือนกันร้อยเปอร์เซ็นต์ แสดงว่าตัวอ่อนเหล่านั้นเกิดจากการพัฒนาของไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม (parthenogenesis) หรือเป็นตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (clonal larvae) (Stoddart, 1983; Stoddart, 1984; Ayre & Resing, 1986; Yeoh & Dai, 2010) ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างตัวอ่อนแบบไม่อาศัยเพศ คือ ขนาดของโคลนีปะการัง Combosch & Vollmer (2013) รายงานว่าโคลนีที่มีขนาดมากกว่า 50 ตารางเซนติเมตร จะพบตัวอ่อนที่มีจีโนไทป์ต่างจากโคลนีแม่ หรือเกิดจากการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศ ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอ่อนทั้งหมด ซึ่งจะลดลงเมื่อโคลนีขนาดใหญ่ขึ้น สำหรับสาเหตุที่ปะการังดอกกะหล่ำ *P. damicornis* มีรูปแบบการทดแทนประชากรด้วยการสร้างตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในพื้นที่ศึกษาครั้งนี้ น่าจะมีสาเหตุเนื่องมาจากแนวปะการังอยู่ติดกับพื้นที่ชายฝั่งที่มีสะพานท่าเรือที่มีการเดินเรือเข้าออกและมีการประมงอยู่อย่างต่อเนื่อง ผลกระทบจากกิจกรรมของมนุษย์เหล่านั้นส่งผลให้ปะการังแตกหัก ซึ่งจะทำให้ปะการังเร่งการทดแทนประชากรด้วยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมากขึ้น (Adjeruod et al., 2014; Zakai et al., 2000) และแนวปะการังบริเวณนี้ตั้งอยู่ในพื้นที่ที่มีระดับน้ำค่อนข้างตื้น ทำให้ได้รับปริมาณแสงมาก โดยสังเกตพบว่าปะการังในพื้นที่นี้เกิดการฟอกขาวทุกปี การทดแทนประชากรด้วยการสร้างตัวอ่อนแบบไม่อาศัยเพศไม่เพียงแต่จะช่วยสืบทอดยีนที่ทนต่อ



สภาพแวดล้อมนั้นๆ ตัวอ่อนแต่ละตัวยังสามารถปรับตัวให้ทนทานได้ดีขึ้น (Megalon et al., 2004; Megalon et al., 2005; Megalon et al., 2006; Starger et al., 2008) อีกทั้งการกระจายตัวของตัวอ่อนยังเป็นการขยายพื้นที่แนวปะการังด้วย ซึ่งนี่เป็นข้อแตกต่างจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยทั่วไป

ถึงแม้ว่าจากการศึกษาจะพบว่าโคโลนีแม่สร้างตัวอ่อนจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่หากเพิ่มจำนวนตัวอย่างโคโลนีแม่ และตัวอ่อนปะการังให้มากขึ้น อาจทำให้รูปแบบการสร้างตัวอ่อนของปะการังชนิดนี้ ในบริเวณพื้นที่นี้ได้ชัดเจนขึ้น

### คำขอบคุณ

การศึกษานี้สำเร็จล่วงได้เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี โครงการ NRCT-JSPS Asian CORE COMSEA Program หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ โครงการไทยเข้มแข็ง ทุนสนับสนุนงานวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกลุ่มวิจัยชีววิทยาแนวปะการัง ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### เอกสารอ้างอิง

- Adjeroud, M., Guérécheau, A., Vidal-Dupiol, J., Flot, J.F., Arnaud-Haond, S., & Bonhomme, F. (2014). Genetic diversity, clonality and connectivity in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*: a multi-scale analysis in an insular, fragmented reef system. *Marine Biology*, 161(3), 531-541.
- Adjeroud, M., & 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., & Resing, J.M. (1986). Sexual and asexual reproduction of planulae in reef corals. *Marine Biology*, 90, 187-190.
- Benzie, J. A. H., Haskell, A., & Lehman, H. (1995). Variation in the Genetic Composition of Coral (*Pocillopora damicornis* and *Acropora palifera*) Populations from Different Reef Habitats. *Marine Biology*, 121(4), 731-739.
- Brooker, R. (2009). *Genetics analysis and principles* (the 3<sup>rd</sup> ed). McGraw-Hill, New York, 546.
- Combosch, D.J., & Vollmer, S.V. (2011). Population genetics of an ecosystem-defining reef coral *Pocillopora damicornis* in the Tropical Eastern Pacific. *PLoS ONE* 6(8).

- Combosch, D.J., & Vollmer, S.V. (2013). Mixed asexual and sexual reproduction in the Indo-Pacific reef coral *Pocillopora damicornis*. *Ecology and Evolution*, 3(10), 3379-3387.
- Chávez-Romo, H.E., Correa-Sandoval, F., Paz-García, D.A., Reyes-Bonilla, H., López-Pérez, R.A., Medina-Rosas, P., & Hernández-Cortés, M.P. (2008). Genetic structure of the scleractinian coral, *Pocillopora damicornis*, from the Mexican Pacific. *Paper presented at the The 11th International Coral Reef Symposium*, Ft. Lauderdale, Florida.
- Harrison, P.L., & Wallace, C.C. (1990). Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. In: Dubinsky, Z. (ed), *Ecosystems of the World: Coral Reefs*. Elsevier, Amsterdam, 133–207.
- Magalon, H., Samadi, S., Richard, M., Adjeroud, M., & Veuille, M. (2004). Development of coral and zooxanthella-specific microsatellites in three species of *Pocillopora* (Cnidaria, Scleractinia) from French Polynesia. *Molecular Ecology Notes*, 4(2), 206-208.
- Magalon, H., Adjeroud, M., & 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., Hesté, A., Adjeroud, M., & Veuille, M. (2006). High genetic diversity of the symbiotic dinoflagellates in the coral *Pocillopora meandrina* from the South Pacific. *Marine Biology*, 148, 913-922.
- Miller, T.J., Crowder, L.B., Rice, J.A., & Marschall, E.A. (1988). Larval size and recruitment mechanisms in fishes: toward a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45, 1657–1670.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., & Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.
- Miller, K. J., & Ayre, D. J. (2004). The role of sexual and asexual reproduction in structuring high latitude populations of the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Heredity*, 92(6), 557-568.
- Paz-García, D. A., Chávez-Romo, H. E., Correa-Sandoval, F., Reyes-Bonilla, H., López-Pérez, A., Medina-Rosas, P., & Hernández-Cortés, M. P. (2012). Genetic Connectivity Patterns of Corals *Pocillopora damicornis* and *Porites panamensis*

- (Anthozoa: Scleractinia) Along the West Coast of Mexico1. *Pacific Science*, 66(1), 43-61.
- 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.
- Sherman, C. D. H., Ayre, D. J., & 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(1), 7-18.
- Snusted, D.P., & Simmons, M.J. (2010). *Principles of genetics* (the 5th ed). John Willey and Sons (Asia) Pte Ltd, 821.
- Starger, C. J., Yeoh, S. S., Dai, C. F., Baker, A. C., & Desalle, R. (2008). Ten polymorphic STR loci in the cosmopolitan reef coral, *Pocillopora damicornis*. *Molecular Ecology Resource*, 8(3), 619-621.
- Stoddart, J.A. (1983). Asexual Reproduction of planulae in the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 76, 279-284.
- Stoddart, J. A. (1984). Genetical structure within populations of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 81, 19-30.
- Yeoh, S. R., & Dai, C. F. (2010). The production of sexual and asexual larvae within single broods of the scleractinian coral, *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 157(2), 351-359.
- Zakai, D., Levy, O., & Chadwick-Furman, N.E. (2000). Experimental fragmentation reduces sexual reproductive output by the reef-building coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 19, 185-188.