



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลี  
ในแนวปะการังชายฝั่งภาคตะวันออกและความจำเพาะของเจ้าบ้าน-ชนิดของสาหร่าย  
ที่ได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม

Genetic diversification of coral endosymbionts in the genus  
*Symbiodinium* from coral reefs in eastern part of Thailand and host-  
symbiont specificity influenced by environmental conditions

หัวหน้าโครงการวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นรินทร์รัตน์ คงจันทร์ตรี  
ผู้ร่วมวิจัย: ดร.วันศุกร์ เสนานานู  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอง จันท์ประสาทสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 258281  
สัญญาเลขที่ 142/2560

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลีในแนวปะการังชายฝั่งภาคตะวันออกและความจำเพาะของเจ้าบ้าน-ชนิดของสาหร่ายที่ได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม

(Genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium* from coral reefs in eastern part of Thailand and host-symbiont specificity influenced by environmental conditions)

หัวหน้าโครงการวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นรินทร์รัตน์ คงจันทร์ตรี  
ผู้ร่วมวิจัย: ดร.วันศุกร์ เสนานาญ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอง จันท์ประสาทสุข

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กรกฎาคม ๒๕๖๒

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 142/2560

## บทคัดย่อ

สาหร่ายซูแซนเทลลีในวงศ์ Symbiodiniaceae มีบทบาทสำคัญในการปรับตัวของปะการังให้เข้ากับ การเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม ผู้วิจัยจึงประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังจากแนวปะการังในจังหวัดชลบุรีและระยอง จำนวน 11 วงศ์ 21 สกุล เพื่อจำแนกชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลี โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS2 ที่แยกด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และพบสายพันธุ์ที่เอนเออย่างน้อยจำนวน 7 แบบ (ลำดับนิวคลีโอไทด์ 12 แสพโพลไทป์) ประกอบไปด้วยสกุล *Durusdinium* (6 แสพโพลไทป์) และ *Cladocopium* (6 แสพโพลไทป์) องค์ประกอบของสาหร่ายซูแซนเทลลีมีความผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของปะการังเจ้าบ้าน และสถานที่ศึกษาโดย *Durusdinium* spp. (D1) พบได้มากที่สุดในปะการังทุกชนิด และทุกสถานีในแนวปะการังจังหวัดชลบุรีและระยอง *Cladocopium* sp. (C15) ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับปะการัง *Porites* แต่ยังพบได้บ้างในปะการัง *Platygyra Goniastrea* และ *Pocillopora* ด้วย *Durusdinium* sp. (D1-6) ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับปะการัง *Pocillopora* ในขณะที่ปะการัง *Platygyra* ในสถานีหมู่เกาะแสมสารพบ *Cladocopium* sp. (C3u) เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งแตกต่างจากสถานีหินเพิง และหมู่เกาะสีชังที่พบ *Durusdinium* spp. (D1) เป็นองค์ประกอบหลัก ผลดังกล่าวสะท้อนความสำคัญของการปรับตัวร่วมกันของเจ้าบ้านและสาหร่าย กับสภาพแวดล้อม จากการศึกษาครั้งนี้ได้สะท้อนให้เห็นความซับซ้อนของธรรมชาติและการจำแนกชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลี โดยเฉพาะชนิดที่มีความใกล้เคียงกันมากๆ ในสกุล *Durusdinium* โดยเฉพาะ *D. trenchii* และ *D. glynnii* จะต้องใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความไวสูงขึ้น เช่น *psb A<sup>ncr</sup>* และ microsatellite loci นอกจากนี้การวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคโนโลยี high throughput sequencing ยังอาจให้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดสาหร่ายซูแซนเทลลีที่มีความชุกชุมต่ำ

## Abstract

Zooxanthellae in the family Symbiodiniaceae play important roles in the adaptive capacity of corals to environmental changes. We examined genetic diversity of Symbiodiniaceae in 21 coral genera belonging to 11 families in Chonburi and Rayong reefs. Based on the sequences of Internal Transcribed Spacer-2 (ITS2) DNA, revealed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), we observed at least seven ITS2 DGGE profiles (12 haplotypes) of Symbiodiniaceae consisting of the genera *Durusdinium* (6 haplotypes) and *Cladocopium* (6 haplotypes). Zooxanthellae community compositions varied upon coral host taxa and locations. *Durusdinium* spp. (D1) were common in all coral hosts across all sites in Chonburi and Rayong reefs. On the other hand, *Cladocopium* sp. (C15) was more specific to species and/or sites; it was highly abundant in *Porites lutea* and occasionally, it could be found in *Platygyra Goniastrea* and *Pocillopora*. *Durusdinium* sp. (D1-6) was quite specific to *Pocillopora*. Some zooxanthellae were specific to sites. We found that the presence of *Cladocopium* sp. (C3u) was unique in *Platygyra* from Samaesan Islands; *Platygyra* in other locations, Sichang Islands and Hin Ploeng Pinnacle, was mainly associated with *Durusdinium* spp. (D1). The findings suggested the importance of host-symbiont co-adaptation to environmental conditions. Our results also reflected the complex nature of Symbiodiniaceae nomenclature. In particular, delineation of very closely related *Durusdinium* species, *D. trenchii* and *D. glynnii*, must rely on high resolution genetic markers e.g. *psb A<sup>ncr</sup>*, and microsatellite allele frequencies. High-throughput sequencing analysis may also provide insights on additional zooxanthellae species especially those that are rare.

## สารบัญเรื่อง

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	1.1 หลักการและเหตุผล	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
	1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
2	วิธีดำเนินการวิจัย	5
	2.1 พื้นที่ศึกษา	5
	2.2 การเก็บตัวอย่าง	5
	2.3 การสกัดดีเอ็นเอ ปฏิกริยาถูกลูโซโฟลิเมอเรส และการวิเคราะห์ DGGE	7
	2.4 การวิเคราะห์ลำดับเบส	9
	2.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายซูแซนเทลลี	9
	2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	10
3	ผลการวิจัย	11
	3.1 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	11
	3.2 ความหลากหลายชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังในจังหวัดชลบุรีและ ระยอง	13
	3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีกับชนิดของปะการังและ ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	20
4	อภิปรายผลและสรุปผลการศึกษา	26
	4.1 ความเฉพาเจาะจงกับชนิดของเจ้าบ้าน	26
	4.2 ตำแหน่งที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ และอิทธิพลจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อ ประชากรของสาหร่ายซูแซนเทลลี	27
5	ผลผลิต	29
	รายงานการเงิน	30
	เอกสารอ้างอิง	31
	ภาคผนวก ก บทควมวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในฐานข้อมูล Scopus จำนวน 1 เรื่อง	38
	ภาคผนวก ข บทควมวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (Q2) ที่อยู่ในขั้นตอน การแก้ไข จำนวน 1 เรื่อง	53
	ประวัตินักวิจัยและคณะ	55

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วงศ์ และสกุลของตัวอย่างปะการัง รวมทั้งจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	6
2	ปะการังสกุลหลักจากวงศ์ต่างๆ และสัดส่วนองค์ประกอบของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังเจ้าบ้านแต่ละสกุล	14
3	การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงขององค์ประกอบประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังเจ้าบ้านแต่ละสกุล	22
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนหลายตัวแปร (MANOVA) ขององค์ประกอบประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังเจ้าบ้านที่พบในสถานีต่างๆ	22
5	ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน คุณภาพน้ำจากสถานีเก็บตัวอย่างทั้ง 4 สถานีบริเวณแนวปะการังจังหวัดชลบุรี และระยอง ในระหว่างฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (ธันวาคม 2559 – มีนาคม 2560) และฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (สิงหาคม 2560)	24
6	องค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีและชนิดเด่น (ตัวหนา) ในปะการังแข็ง ที่พบในภูมิภาคต่างๆ	26

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สถานีเก็บตัวอย่างปะการังแข็งจากบริเวณ 1) หมู่เกาะสีชัง 2) หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี 3) หมู่เกาะมัน และ 4) กองหินเพิง จังหวัดระยอง	5
2	ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปะการังและการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ	7
3	ขั้นตอนการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในวงศ์ Symbiodiniaceae ในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	8
4	ตัวอย่างดีเอ็นเอโพรไฟล์ของสาหร่ายซูแซนเทลลี แต่ละชนิดที่ได้จาก Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ที่ได้จากการศึกษา	11
5	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ Maximum likelihood แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype ของสาหร่ายซูแซนเทลลีสกุล <i>Cladocopium</i> spp. และ <i>Durusdinium</i> spp. ในปะการังเจ้าบ้านจำนวน 21 สกุกจากการศึกษา	12
6	ความถี่ของสาหร่ายซูแซนเทลลีชนิดต่างๆที่บันทึกจากดีเอ็นเอโพรไฟล์ ที่พบในปะการังเจ้าบ้านในแต่ละวงศ์	13
7	สัดส่วนองค์ประกอบของปะการังเจ้าบ้านสกุลต่างๆ ที่พบสาหร่ายซูแซนเทลลีชนิด C15, C1 และ C3u*	17
8	สัดส่วนองค์ประกอบของปะการังเจ้าบ้านสกุลต่างๆ ที่พบสาหร่ายซูแซนเทลลีชนิด C3u, D1 และ D6	18
9	สัดส่วนองค์ประกอบของปะการังเจ้าบ้านสกุลต่างๆ ที่พบสาหร่ายซูแซนเทลลีชนิด D1-6 และ D1-4	19
10	แผนภาพการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงขององค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังสกุลต่างๆ ในพื้นที่แนวปะการังจังหวัดชลบุรีและระยอง	20
11	แผนภาพการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงขององค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังสกุลต่างๆ ตามสถานีเก็บตัวอย่างในพื้นที่แนวปะการังจังหวัดชลบุรีและระยอง	21
12	DbRAD พล็อตแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อม และชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังสกุล a) <i>Pocillopora</i> b) <i>Platygyra</i> และ c) <i>Porites</i> ในสถานีหมู่เกาะสีชัง (SC) แสมสาร (SS) หมู่เกาะมัน (MI) และ หินเพิง (HP)	25



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลกเป็นเรื่องใกล้ตัวที่ทุกภาคส่วนให้ความสนใจ โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้จะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศทั้งบนบกและในทะเล ดังจะเห็นได้ชัดเจนจากรายงานการพบปะการังฟอกขาวในหลายๆภูมิภาคของโลก รวมถึงแนวปะการังในประเทศไทยด้วยเช่นกัน จากรายงานการสำรวจแนวปะการังจากที่ต่างๆทั่วโลกพบว่าในปีที่เกิดเอลนีโญ จะมีรายงานการพบปะการังฟอกขาวมากกว่าในปีที่มีสภาพภูมิอากาศเป็นปกติ (Wilkinson 1998; Guinotte et al. 2003; Kleypas and Hoegh-Guldberg, 2008; Heron et al., 2016) สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการเกิดปะการังฟอกขาว ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 2538 2541 2546 2548 2550 2553 2557 และล่าสุดในปี 2562 (สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน 2554; Wilkinson 1998) ซึ่งสาเหตุหลักของการเกิดปะการังฟอกขาวในประเทศไทย เกิดขึ้นเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำทะเล โดยปกติปะการังจะดำรงชีวิตอยู่ในน้ำที่มีช่วงอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิสูงสุดที่ปะการังจะสามารถทนได้ ซึ่งเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ น้ำทะเล เพิ่มขึ้นเพียง 1-2 องศาเซลเซียสจากอุณหภูมิ น้ำทะเลปกติเป็นระยะเวลาติดต่อกันนานๆ ก็ส่งผลอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของปะการัง (เจ้าบ้าน) และสาหร่ายซูแซนเทลลี (zooxanthellae: วงศ์ Symbiodiniaceae) ที่อาศัยอยู่ร่วมกับปะการัง ความสัมพันธ์ระหว่างสาหร่ายซูแซนเทลลีและปะการังเจ้าบ้าน มีบทบาทสำคัญในการปรับตัวของปะการังที่จะดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยสิ่งแวดล้อม (Blackall et al., 2015)

ปะการังแข็งและสิ่งมีชีวิตอื่นในอาณาจักรสัตว์ เช่น ฟองน้ำ ดอกไม้ทะเล ปะการังอ่อน และหอยมือเสือ เป็นกลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันโดยอยู่ร่วมกับสาหร่ายซูแซนเทลลี ซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวสีออกน้ำตาลแกมเหลือง ในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต (dinoflagellate) อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อปะการังหรือสัตว์อื่นดังกล่าวไปแล้ว แบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) และมักเรียกสิ่งมีชีวิตที่เป็นผู้ให้อาศัยว่าเจ้าบ้าน (host) และเรียกสาหร่ายว่าซิมไบออนท์ (symbiont) โดยสาหร่ายซูแซนเทลลี เดิมจัดอยู่ในสกุล *Symbiodinium* โดยในความสัมพันธ์นั้น ปะการังหรือเจ้าบ้านจะให้ที่อยู่อาศัย และธาตุอาหารที่จำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย เจ้าบ้านบางชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของสาหร่าย แต่ในปะการังพบว่าความหลากหลายของชนิดพันธุ์ของสาหร่ายซูแซนเทลลียังขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ ความลึกน้ำ ปริมาณแสง อุณหภูมิ น้ำทะเล ธาตุอาหาร และสุขภาพของแนวปะการังด้วย (Gong et al., 2018; LaJennesse et al. 2010a; Rodriguez-Lanetty et al. 2001; Sampayo et al. 2007; Thornhill et al. 2008; ) ปะการังและสาหร่ายซูแซนเทลลี มักจะอยู่ในบริเวณที่มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิสูงสุดที่พวกมันจะทนอยู่ได้ ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูงขึ้นเพียง 1-2 องศาเซลเซียส ในฤดูร้อน เหนืออุณหภูมิสูงสุดที่พวกมันทนได้ ก็อาจทำให้เกิดการฟอกขาวของปะการังเกิดขึ้น และอาจส่งผลให้ปะการังตายได้ (Jokiel and Coles 1999) แต่ในปะการังเองก็จะมีกลไกในการปรับตัวให้เข้ากับอุณหภูมิของน้ำทะเลที่เปลี่ยนแปลงไปได้ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีภายในโคโลนี (shuffling หรือ switching) (Baker 2003)

การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของสาหร่ายซูแซนเทลลี ในยุคแรกๆใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และโครงสร้างภายใน รวมถึงลักษณะทางสรีรวิทยาและพฤติกรรมของสาหร่ายแต่ละชนิด (Blank and Trench 1986; Schoenberg and Trench 1980) หลังจากนั้นในช่วงต้นยุค 1990 ที่มีการพัฒนา งานวิจัยทางด้านการจัดระบบสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular systematics) Rowan and Powers (1991) เป็นผู้เริ่มต้นศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (evolutionary relationships) ของสาหร่ายซูแซนเทลลีโดยใช้เทคนิค RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) ของไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ small subunit ribosomal RNA (18S) โดยค้นพบสาหร่ายซูแซนเทลลีทั้งสิ้น 3 clade หลักๆ และในแต่ละ clade ประกอบไปด้วย 5-6 subclade จนถึงปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ หลายชนิดในการศึกษาสายพันธุ์ของสาหร่ายซูแซนเทลลีเช่น ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ large subunit (28S) (Rowan 1998; Baker 1999) คลอโรพลาสต์ (chloroplast large subunit; 23S) (Santos et al. 2002) ไมโท-คอนเดรียล ดีเอ็นเอ (mitochondrial protein-coding gene; cytochrome oxidase subunit I) และนิวเคลียร์ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ noncoding internal transcribed spacer regions, ITS1 และ ITS2 (Takabayashi et al. 2004; Lajeunesse 2001) โดย ITS1 และ ITS2 เป็นที่นิยมใช้มากที่สุดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลีโดยใช้ร่วมกับเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) และการตรวจสอบลำดับเบสทางพันธุกรรม (sequencing)

ในปัจจุบันสาหร่ายซูแซนเทลลีถูกจัดให้อยู่ในวงศ์ Symbiodiniaceae ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เดิมมีรายงานจำนวน 9 clade (clade A-I) แต่ในปัจจุบันมีการจัดลำดับทางอนุกรมวิธานใหม่ โดยยกให้ clade เทียบเท่ากับระดับสกุล ซึ่งสกุลที่พบได้ทั่วไปในปะการังแข็ง ได้แก่ สกุล *Symbiodinium* (clade A), *Breviolum* (clade B), *Cladocopium* (clade C), *Durusdinium* (clade D), และสกุลที่พบบ่อย 2 สกุล ได้แก่ *Fugacium* (clade F) และ *Gerakladium* (clade G) ปัจจุบันมีการปรับปรุงการเรียกชื่อและการจัดลำดับอนุกรมวิธานของสาหร่ายซูแซนเทลลี โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์และลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีรายงานสาหร่ายซูแซนเทลลีอย่างน้อย 15 สกุล (หรือ phylogenetic clades) โดยที่มีการตั้งชื่อใหม่แล้วได้แก่สมาชิกในสกุล *Durusdinium* ประกอบไปด้วย *Durusdinium eurythalpos* (D8, D12-13 และ D13), *D. boreum* (D15), *D. glynnii* (D1, D1-6) ซึ่ง *D. glynnii* มักพบในปะการังสกุล *Pocillopora*, *Seriatopora* และ *Montipora* และ *D. trenchii* (D1-4) ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในปะการังหลายชนิด และสมาชิกในสกุล *Cladocopium* ที่รอการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ อีกกว่า 100 ชนิด (Lajeunesse et al., 2018; Wham et al., 2017)

ในการเกิดปะการังฟอกขาว ส่วนมากเกิดจากอุณหภูมิรวมถึงความเข้มแสงที่สูงขึ้นกว่าปกติ ไปกระตุ้นการตอบสนองทางสรีรวิทยาของปะการังและสาหร่ายซูแซนเทลลีให้เกิดความเครียด ปะการังจะตอบสนองโดยมีการลดปริมาณ/ความหนาแน่นของสาหร่ายซูแซนเทลลีภายในเนื้อเยื่อ เซลล์สาหร่ายจะถูกทำลายได้ง่ายขึ้น และเมื่อความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายลดลง จึงทำให้มองเห็นปะการังเป็นสีขาว เนื่องจากสาหร่ายออกจากปะการังที่เป็นเจ้าบ้าน หากสถานการณ์เกิดต่อเนื่องเป็นระยะเวลาานหลายๆ สัปดาห์ หรือเป็นเดือน ก็จะทำให้ปะการังขาดอาหารและตายได้ในที่สุด เพราะในสภาวะปกติปะการังได้รับพลังงานประมาณ 90-95% ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตมาจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายซูแซนเทลลี ด้วยสาเหตุนี้จึงส่งผลให้เกิดการตายของปะการังเป็นบริเวณกว้าง ทำให้แนวปะการังที่ได้รับผลกระทบอยู่ในสภาพเสื่อมโทรมอย่างรวดเร็ว (Hoegh-Guldberg 1999; Hoegh-Guldberg et al.

2007) ความแปรปรวนขององค์ประกอบของสาหร่ายซูแซนเทลลี ในปะการังเจ้าบ้านชนิดต่างๆ อาจจะเป็นตัวสะท้อนการตอบสนองจากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยสิ่งแวดล้อม หรือกิจกรรมรบกวนต่างๆ ทำให้สามารถทน หรือปรับตัวให้อยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันไป (Cooper et al., 2011; Gong et al., 2018)

เหตุการณ์ปะการังฟอกขาวในปี พ.ศ. 2553 เป็นเหตุการณ์ที่มีความรุนแรงมากที่สุดทั้งในทะเลอ่าวไทยและอันดามันที่มีรายงานในประเทศไทย การฟอกขาวในครั้งนั้นปะการังได้รับผลกระทบรุนแรงกว่าเหตุการณ์สึนามิในปี พ.ศ. 2547 หลายเท่า ในแง่ของการสูญเสียปะการังที่มีชีวิต โดยเฉพาะปะการังเขากวาง และปะการังกิ่งอื่นๆ (พบปะการังตายตั้งแต่ 30-90% ของปะการังมีชีวิตที่มีอยู่เดิม) ทำให้ความหลากหลายทางชีวภาพในแนวปะการังลดลง (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง 2548; สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน 2554) โดยปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้ระดับความสูญเสียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะสภาพแวดล้อม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่อาศัยอยู่ร่วมกับปะการังที่แตกต่างกันไป แต่ข้อมูลชนิดพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลีในแนวปะการังในประเทศไทยมีอยู่น้อยมาก และยังไม่มีความสำคัญในการศึกษาอย่างจริงจัง ทั้งที่เป็นที่ทราบกันดีในหมู่นักวิทยาศาสตร์ทางทะเลทั่วโลกว่าสาหร่ายซูแซนเทลลี แต่ละชนิดในภูมิภาคต่างๆ มีระดับความทนทานต่อการฟอกขาวที่แตกต่างกัน (เช่น Weis 2010, Jones and Berkelmans 2010, LaJeunesse et al. 2010a) และจากรายงานการฟอกขาวของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่าลักษณะสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะบริเวณแนวปะการังใกล้ฝั่ง (มักจะมีน้ำตื้น น้ำขุ่นและมีองค์ประกอบของปะการังก้อนเป็นหลัก) พบปะการังตายจากการฟอกขาวน้อยกว่าแนวปะการังไกลฝั่ง (บริเวณที่มีน้ำใสและมีองค์ประกอบของปะการังกิ่งก้านเป็นหลัก) (Guest et al., 2012) แต่จากเหตุการณ์ปะการังฟอกขาวที่เกิดขึ้นในปีพ.ศ. 2553 และ 2557 พบการฟอกขาวทั้งในปะการังกิ่ง และปะการังก้อน และไม่พบรูปแบบการตอบสนองที่ชัดเจน โดยปะการังบางชนิดที่เคยอ่อนไหวต่อการฟอกขาวกลับไม่ได้รับผลกระทบ แต่กลับพบการฟอกขาวมากในปะการังก้อนบางชนิด ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อความอ่อนไหว ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสาหร่ายซูแซนเทลลี ความชุ่ม และความสามารถในการจับกินอาหารของปะการัง (Guest et al., 2016)

ในประเทศไทย เคยมีรายงานถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลีในระดับสายพันธุ์ (subclade) เพียงการศึกษาเดียวเท่านั้น โดย LaJeunesse et al. (2010a) ที่ได้เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในแนวปะการังบริเวณหมู่เกาะภูเก็ต (ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของมหาสมุทรอินเดีย) เปรียบเทียบกับประเทศแซนซิบาร์ (Zanzibar) ซึ่งอยู่ในมหาสมุทรอินเดียตะวันตก และเกรทแบริเออร์รีฟ ประเทศออสเตรเลีย ในมหาสมุทรแปซิฟิก โดยพบว่าในประเทศไทยสาหร่ายซูแซนเทลลีส่วนใหญ่อยู่ใน clade C รองลงมาคือ clade D และยังมีพบ clade A, F และ G ซึ่งบางสายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่พบเฉพาะพื้นที่ (regionally endemic) ซึ่งสาหร่ายซูแซนเทลลีในแต่ละสายพันธุ์จะมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีแนวปะการังที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ที่ได้รับอิทธิพลทางสิ่งแวดล้อมแตกต่างกันไป ทั้งเรื่องของความเค็ม (แนวปะการังบริเวณหมู่เกาะสี่ซัง ต้องปรับตัวให้เข้ากับน้ำความเค็มต่ำในช่วงฤดูฝน) การพัฒนาชายฝั่ง (แนวปะการังบริเวณเกาะสะเก็ด ต้องเจอกับปัญหาตะกอนจากการขุดลอกร่องน้ำ และการถมทะเลในเขตนิคมอุตสาหกรรม) เป็นต้น แต่การศึกษาถึงชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลียังมีจำกัดอยู่แค่เพียงการศึกษาชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังอ่อน ในระดับ clade เท่านั้น (Panithanarak, 2015)

ดังนั้นการศึกษาคั้งนี้จึงต้องการทราบข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมและสายพันธุ์ของสาหร่ายซูแซนเทลลีในแนวปะการัง โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบชนิดพันธุ์ของปะการังที่เป็นเจ้าบ้าน และสาหร่ายซูแซนเทลลีที่เป็นซิมไบออนท์ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ความแตกต่างของการปรับตัวของแนวปะการังแต่ละแห่ง รวมถึงชนิดพันธุ์ของปะการังที่มีการตอบสนองต่อสถานการณ์ปะการังฟอกขาวในระดับที่แตกต่างกัน หรือความแตกต่างของปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆได้ ซึ่งจะทำให้เราเข้าใจถึงวิวัฒนาการในการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายซูแซนเทลลีให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม หรือกลไกในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมทางภูมิศาสตร์ ข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการจำแนกพื้นที่ที่มีความเปราะบางเชิงนิเวศ และนำไปใช้ในการวางแผนการจัดการ เพื่อเตรียมการป้องกันหรือวางแผนฟื้นฟูทรัพยากรปะการังที่จะสูญหายไปกับเหตุการณ์ปะการังฟอกขาวที่จะเกิดขึ้นในอนาคตอันใกล้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลีในแนวปะการัง ภาคตะวันออก และจำแนกสายพันธุ์ที่เป็นชนิดเด่น โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล
2. เพื่อทราบสายพันธุ์ของสาหร่ายซูแซนเทลลีและจำแนกสายพันธุ์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเจ้าบ้าน
3. เพื่อตรวจสอบรูปแบบการกระจายพันธุ์ของสาหร่ายซูแซนเทลลี ว่ามีความแตกต่างระหว่างสภาวะแวดล้อมหรือตำแหน่งที่ตั้งทางภูมิศาสตร์หรือไม่

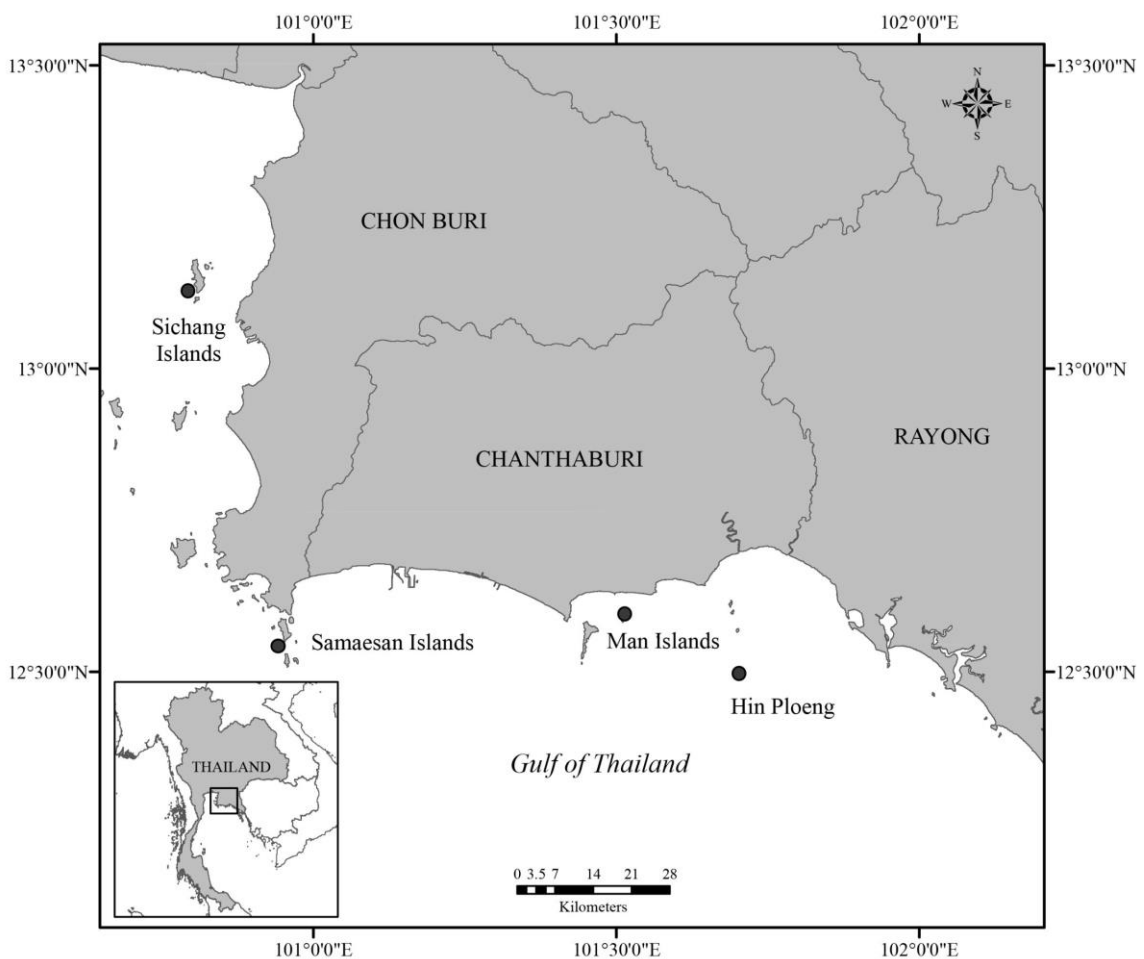
## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลี ทางชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) และการตรวจสอบลำดับเบสทางพันธุกรรม (sequencing) ในการจำแนกชนิดพันธุ์ (subclade) ศึกษาในเจ้าบ้านที่เป็นปะการังแข็งเป็นหลัก โดยเลือกตัวแทนปะการังแข็งที่เป็นชนิดที่พบได้ทั่วไป ทั้งแบบก้อน (massive) และแบบกิ่ง (branching) จากแนวปะการังที่มีสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน โดยจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้นอยู่ระหว่าง 75-100 ตัวอย่าง ทำการเก็บข้อมูลสิ่งแวดล้อมเบื้องต้น เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความลึก และความขุ่นใสของน้ำ

## บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

### 2.1 พื้นที่ศึกษา

พิจารณาเลือกตัวแทนแนวปะการังที่มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน เพื่อเป็นตัวแทนในการทดสอบสมมติฐานเรื่องความแตกต่างของปัจจัยทางกายภาพ และตำแหน่งที่ตั้งของแนวปะการัง 1) แนวปะการังชายฝั่งที่ได้รับอิทธิพลจากการเปลี่ยนแปลงความเค็ม น้ำลึกประมาณ 3-5 เมตร ได้แก่ หมู่เกาะสีชัง จ.ชลบุรี 2) แนวปะการังบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี 3) แนวปะการังที่ได้รับอิทธิพลจากฝั่ง เช่น การปล่อยน้ำทิ้ง การพัฒนาชายฝั่ง หรือการท่องเที่ยว ได้แก่ หมู่เกาะมัน จ.ระยอง 4) แนวปะการังที่อยู่ห่างฝั่ง มีน้ำใส และอยู่ในน้ำค่อนข้างลึก ได้แก่ แนวปะการังบริเวณกองหินเพิง จ.ระยอง



ภาพที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างปะการังเชิงจากบริเวณ 1) หมู่เกาะสีชัง 2) หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี 3) หมู่เกาะมัน และ 4) กองหินเพิง จังหวัดระยอง

### 2.2 การเก็บตัวอย่าง

เลือกตัวแทนชนิดของปะการังที่มีรูปร่างของโคโลนี่เป็นแบบที่ทนต่อการฟอกขาวได้ดี ได้แก่ ปะการังที่มีรูปรทรงแบบก้อนที่พบได้ทั่วไป (เช่น ปะการังสมอง: *Platygyra*, ปะการังโขด: *Porites*, ปะการังวงแหวน: *Dipsastraea* (ชื่อเดิม *Favia*), ปะการังช่องเหลี่ยม: *Favites* ปะการังรังผึ้ง:

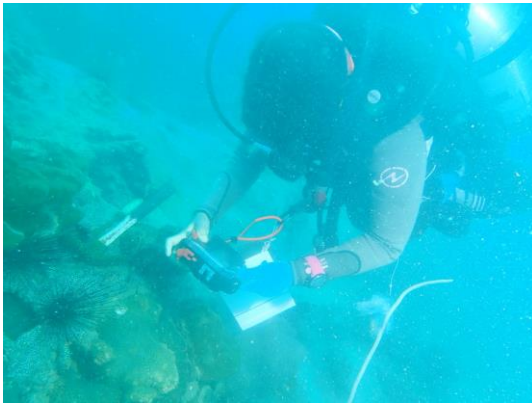
*Goniastrea* หรือปะการังสมองร่องใหญ่: *Symphyllia*) และกลุ่มที่มีความไวต่อการฟอกขาว ได้แก่ ปะการังแบบกิ่งก้าน (เช่น ปะการังเขากวาง: *Acropora*, ปะการังดอกกะหล่ำ: *Pocillopora*) ซึ่งจะต้องเป็นปะการังสกุลเดียวกันที่จะพบได้ทั้งสามพื้นที่การศึกษา อย่างน้อย 3 สกุล และสกุลอื่นๆที่เป็นชนิดเด่นของพื้นที่

เก็บตัวอย่างปะการังจากแต่ละแหล่งโดยการดำน้ำลึก (SCUBA diving) โดยเก็บตัวอย่างชนิดที่เป็นตัวแทนจากทุกสถานี ได้แก่สกุล *Platygyra* *Pocillopora* และ *Porites* อย่างน้อยสกุลละ 5 ตัวอย่าง โดยระบุความลึกจากสถานที่เก็บตัวอย่างและจำแนกเป็นบริเวณที่ตื้น (3-10 เมตร) และบริเวณที่ลึก (>10-20 เมตร) โดยการเก็บปะการังก่อนจะใช้สิ่วสกัดที่บริเวณผิวของก้อนปะการัง คิดเป็นพื้นที่ผิวประมาณ 1 ตร.ซม. ส่วนปะการังแบบกิ่งหรือแบบแผ่นจะใช้คีมหักที่บริเวณปลายกิ่งของโคโลนี รักษาตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95% และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะมีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

**ตารางที่ 1** วงศ์ และสกุลของตัวอย่างปะการัง รวมทั้งจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

Family	Genera (no. of colony)	
Acroporidae	<i>Acropora</i> (4)	
Agariciidae	<i>Leptoseris</i> (2)	<i>Pavona</i> (9)
Dendrophylliidae	<i>Turbinaria</i> (7)	
Fungiidae	<i>Lithophyllon</i> (1)	
Lobophyllidae	<i>Acanthastrea</i> (1)	<i>Lobophyllia</i> (1)
Merulinidae	<i>Echinopora</i> (2)	<i>Dipsastraea</i> ชื่อเดิม <i>Favia</i> (5)
	<i>Favites</i> (9)	<i>Goniastrea</i> (3)
	<i>Hydnophora</i> (2)	<i>Oulastrea</i> (2)
	<i>Platygyra</i> (18)	
Oculinidae	<i>Galaxea</i> (4)	
Pectinidae	<i>Echinophyllia</i> (1)	<i>Pectinia</i> (1)
Pocilloporidae	<i>Pocillopora</i> (16)	
Poritidae	<i>Porites</i> (22)	<i>Goniopora</i> (1)
Siderastreidae	<i>Psammocora</i> (2)	

ก)



ข)



ค)



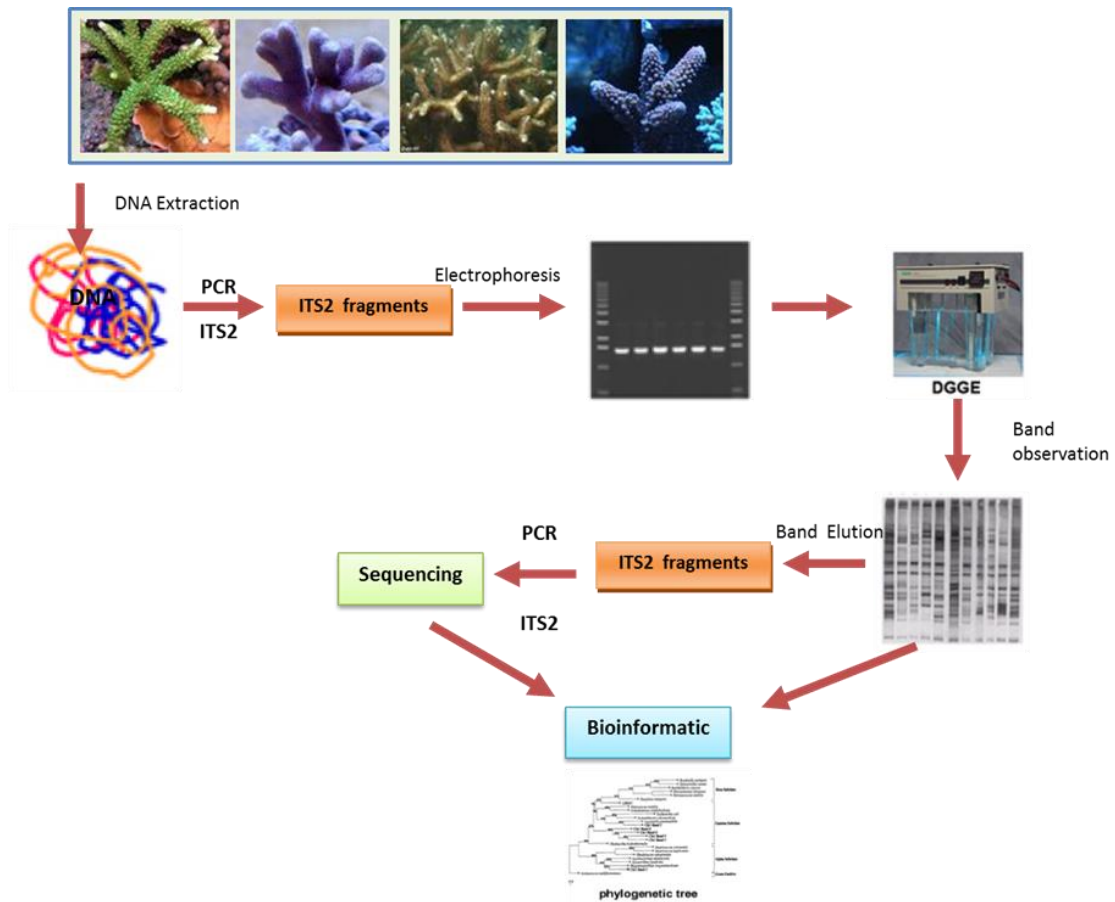
ง)



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปะการังและการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ก) เก็บตัวอย่างด้วยการดำน้ำลึก บันทึกข้อมูลชนิดปะการัง และความลึก ก่อนใช้ค้อนและสิ่วสกัดเนื้อเยื่อบริเวณผิวของปะการัง บรรจุใส่ถุงซิปล็อคที่มีการติดฉลาก 2) บรรจุเนื้อเยื่อปะการังจากแต่ละโคโลนีลงในหลอดเก็บตัวอย่าง 3) เติมเอทานอล 95% เพื่อรักษาภาพเนื้อเยื่อ 4) บันทึกข้อมูลบนหลอดเก็บตัวอย่าง ปิดฝาให้สนิทนำกลับมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

### 2.3 การสกัดดีเอ็นเอ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และการวิเคราะห์ DGGE

ตัวอย่างที่เก็บมาจากแนวปะการังจะถูกนำมาบดและสกัดดีเอ็นเอ โดยดัดแปลงจากวิธี salting-out method (Ferrara et al., 2006) โดยแต่ละตัวอย่างใช้ปะการังประมาณ 500 mg หลังจากนั้นนำไปบ่มในสารละลาย lysis buffer (SDS 20%, EDTA 5mM, Tris-HCl 10mM) เติม 0.1  $\mu$ l proteinase K (10  $\mu$ l/ml) ที่อุณหภูมิ 56  $^{\circ}$ C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ของปะการังและสาหร่ายซูแซนเทลลีแตก ตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายอิมิตัว  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (6.1 M) ในสัดส่วน 1 ml ต่อ lysate 4 ml แล้วนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำ supernatant ไปใส่ในหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 99% บ่มที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง และฝังดีเอ็นเอให้แห้ง เป็นเวลา 15 นาที และทำละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ ด้วย 1.5% อะกาโรสเจล ในสารละลาย 1xTBE



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายในวงศ์ Symbiodiniaceae ในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

สำหรับการวิเคราะห์ DGGE นั้น เมื่อได้สารละลายดีเอ็นเอแล้ว จะนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ของ nuclear rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction หรือ PCR) เพื่อวิเคราะห์ชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลี จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS2 โดยใช้ไพรเมอร์ ITSintfor2 (5'GAATTGCAGAACTCCGTG-3') และ ITS2CLAMP (5'CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (LaJeunesse and Trench, 2000). ในปฏิกิริยา 20  $\mu$ l ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1  $\mu$ l, 1 x PCR buffer, 3 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM ของแต่ละ dNTP, 0.2 และ 0.4 uM ของ forward และ reverse primer และ Taq polymerase 1 ยูนิต (5 U·ul<sup>-1</sup>, Vivantis, Malaysia). เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสาหร่ายซูแซนเทลลี เราใช้ touchdown temperature profile โดยให้ annealing temperature ลดลงอย่างคงที่ โดยมี profile ดังนี้ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 92 °C เป็นเวลา 3 min ตามด้วย อุณหภูมิ 92 °C เป็นเวลา 30 s, annealing temperature อุณหภูมิ 62 °C -52 °C เป็นเวลา 40 s, และสิ้นสุดที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 s จำนวน 20 รอบ โดย touchdown cycles กำหนดให้ annealing temperature ลดจาก 62 °C เป็น 52 °C ในอัตรา 0.5 °C ต่อรอบ หลังจากนั้น ตามด้วย อุณหภูมิ 92 °C เป็นเวลา 30 s, 52 °C เป็นเวลา 40 s, 72 °C เป็นเวลา 30 s จำนวน 15 รอบ และจบโปรแกรมด้วย extension step ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 min (LaJeunesse, 2002)



ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลี ในปะการังแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE, 8% polyacrylamide gels ที่ 45-80% ของ urea และ formamide 3.2-5.6 M urea และ 18-32% formamide) ด้วยเครื่อง VS20WAVE-DGGE (Clever Scientific, Ltd., Warwickshire, United Kingdom) เป็นเวลา 14-15 ชั่วโมง ด้วยกระแสไฟ 110 V ที่อุณหภูมิ 65 °C ย้อมเจลด้วยสี 1xSYBR Gold (Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA) เป็นเวลา 10 min.

บันทึกภาพดีเอ็นเอ โปรไฟล์ (DNA profiles) ที่ปรากฏ อ่านและบันทึกรูปแบบดีเอ็นเอ โปรไฟล์ ของแต่ละตัวอย่าง หลังจากที่มีการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ โปรไฟล์ โดยการตัดแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบ ที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นเจลเติมน้ำปราศจากไอออนทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค พิซีอาร์ อีกครั้ง โดยใช้ reverse primer ที่ปราศจาก GC-rich clamp (ITSrev) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอ เป้าหมายในปริมาณมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ผลผลิต PCR จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด purification kit (GF1-AmbiClean, Vivantis, Malaysia) และส่งตัวอย่างเพื่อ วิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ (ABI 3130xl, 1<sup>st</sup> Base Inc., Malaysia) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มา จะถูกนำไปเทียบกับ DNA profile ที่ปรากฏ เพื่อใช้ในการจำแนกองค์ประกอบในประชาคมของสาหร่าย ซูแซนเทลลี

#### 2.4 การวิเคราะห์ลำดับเบส

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากดีเอ็นเอ โปรไฟล์ ร่วมกับการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย (ความสอดคล้องกันระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ และ ความชัดเจนของ peak) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Sequence Scanner v. 1 (Applied Biosystems, USA) จากนั้น เปรียบเทียบระดับความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล SymbioGBR (<http://www.SymbioGBR.org>) (Tonk et al., 2013) และ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม BLASTn ที่อยู่ในฐานข้อมูลดังกล่าว

#### 2.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่ายซูแซนเทลลี

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ clade และ subclade ของสาหร่ายซูแซนเทลลี ที่ ตรวจพบในแต่ละแหล่งด้วยแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic trees) ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ ITS2 ด้วย Maximum likelihood ซึ่งมีการทดสอบหาอัตราการแทนที่นิวคลีโอไทด์ ที่เหมาะสมกับ สายนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยโมเดลที่อธิบายอัตราการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ระหว่าง ตัวอย่าง ที่ดีที่สุด คือโมเดลที่ให้ค่า BIC (Bayesian Information Criterion) ต่ำที่สุด คือ Kimura 2 model ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มของหน่วยอนุกรมวิธาน ได้จากการสุ่มข้อมูล Parsimony information sites แบบ bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง (ได้ 1000 แผนภูมิฯ) จากนั้นนำเสนอการ แผนภูมิฯที่จัดกลุ่มโดยรวม (Consensus Tree) แบบ Majority Rule (จะนำเสนอตัวเลขสนับสนุนการ จัดกลุ่มเฉพาะที่ปรากฏในแผนภูมิมากกว่า 50%) วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA version 6.0 (Tamura et al. 2011)

สำหรับข้อมูลดีเอ็นเอโปรไฟล์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ DGGE จะนำมาประเมินความหลากหลายชนิด และองค์ประกอบของชุมชนของสาหร่ายซูแซนเทลลี จากสัดส่วนของดีเอ็นเอโปรไฟล์ร่วมกับข้อมูลจาก สายนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน ในแต่ละตัวอย่าง จากนั้น เปรียบเทียบองค์ประกอบ ชุมชน ชนิดของปะการังเจ้าบ้าน และระหว่างสถานี

## 2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

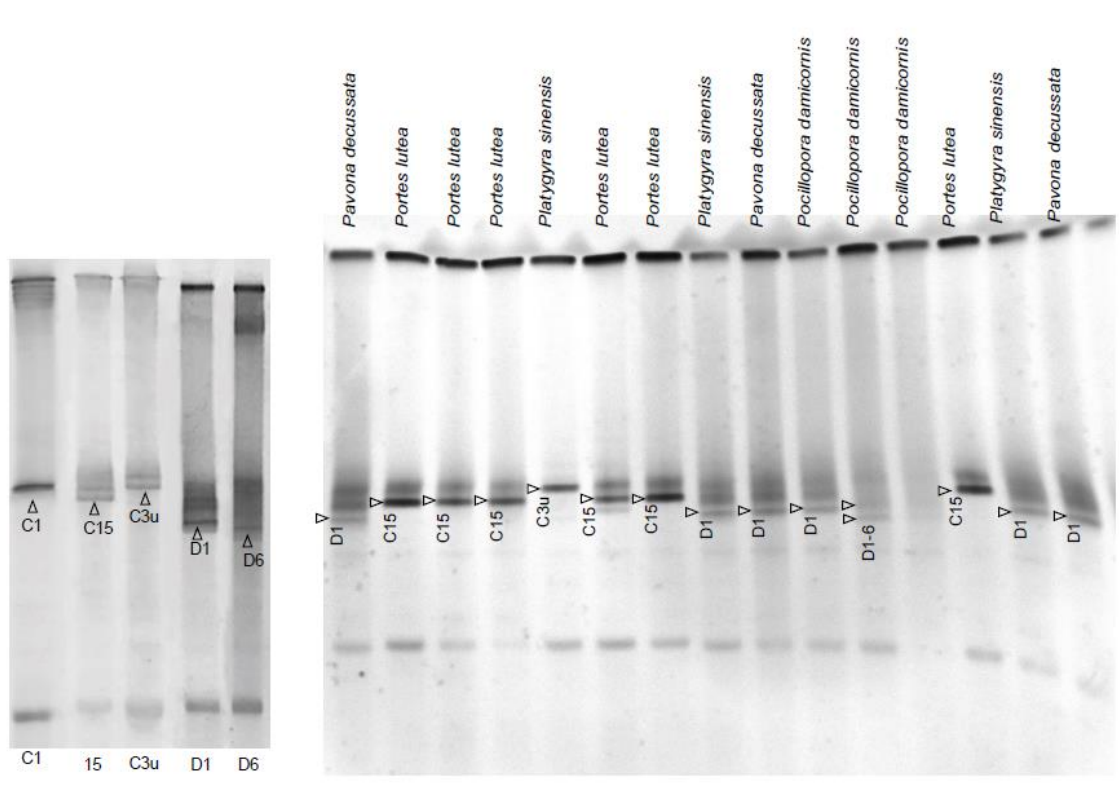
วิเคราะห์องค์ประกอบประชาคมของสาหร่ายซูแซนเทลลีโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป PRIMER 6 (Clarke and Gorley, 2006) with PERMANOVA (Anderson et al., 2008) จากตารางข้อมูลดิบที่บันทึกการพบ-ไม่พบ สาหร่ายชนิดต่างๆในแต่ละตัวอย่างจากแต่ละสถานี ข้อมูลจะถูกนำมา transform ในรูปของการพบ-ไม่พบ แล้วนำไปคำนวณค่าความคล้ายคลึง (Bray-Curtis similarity matrix) ขององค์ประกอบประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลี ระหว่างสถานี และชนิดของปะการังเจ้าบ้าน ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงขององค์ประกอบประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลีกับชนิดของเจ้าบ้าน โดยใช้ one-way analysis of similarity (ANOSIM) และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงขององค์ประกอบประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลีในเจ้าบ้านแต่ละชนิด ด้วย similarity percentage analysis (SIMPER) และวิเคราะห์การจัดกลุ่มขององค์ประกอบประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลี โดยใช้ UPGMA Cluster Analysis โดยใช้ SIMPROF ทดสอบระดับความมีนัยสำคัญของการจัดกลุ่มในแต่ละกลุ่ม

การวิเคราะห์ความแตกต่างขององค์ประกอบประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลีระหว่างสถานี ในปะการังเจ้าบ้านชนิดต่างๆ วิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนหลายตัวแปร (Multivariate Analysis of Variance: MANOVA) แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างปะการังแต่ละชนิดที่เก็บจากแต่ละสถานี มีจำนวนไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงได้คัดเลือกปะการังบางชนิดที่พบได้บ่อยในหลายๆพื้นที่ ได้แก่ ปะการังสกุล *Favites* *Pavona* *Platygyra* *Pocillopora* *Porites* และ *Turbinaria* มาทำการวิเคราะห์

## บทที่ 3 ผลการวิจัย

### 3.1 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

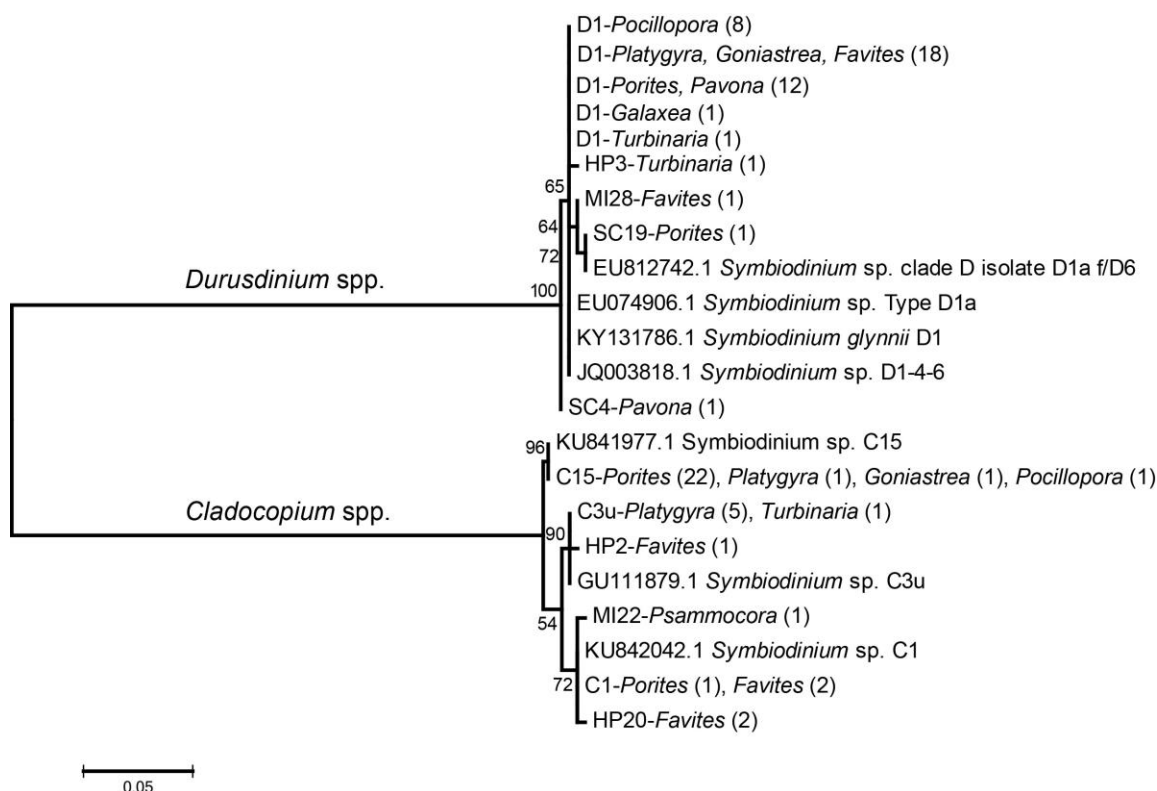
ในการศึกษาครั้งนี้ มีการเก็บตัวอย่างปะการังแข็งจากแนวปะการังบริเวณหมู่เกาะสี่ซัง หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี หมู่เกาะมัน และหินเพิง จังหวัดระยอง จำนวน 113 ตัวอย่าง จากปะการัง 11 วงศ์ จำนวนทั้งสิ้น 21 สกุล (ตารางที่ 1) และนำไปตรวจสอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลี โดยดูจากลักษณะของดีเอ็นเอโพรไฟล์ที่ได้จาก DGGE โดยพบโพรไฟล์ทั้งสิ้น 7 โพรไฟล์ ได้แก่ C1, C15, C3u, D1, D6, D1-4 และ D1-6 (ภาพที่ 4) ร่วมกับตัดชิ้นตัวอย่างจากดีเอ็นเอโพรไฟล์ เพื่อไปตรวจสอบความผันแปรของลำดับทางพันธุกรรมบางส่วนบริเวณตำแหน่ง ITS2 ได้ลำดับทางพันธุกรรมบริเวณตำแหน่ง ITS2 จำนวนทั้งสิ้น 81 ตัวอย่าง



ภาพที่ 4 ตัวอย่างดีเอ็นเอโพรไฟล์ของสาหร่ายซูแซนเทลลี แต่ละชนิดที่ได้จาก Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ที่ได้จากการศึกษา

จากการวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับทางพันธุกรรมบางส่วนบริเวณ ITS2 จากตัวอย่างสาหร่ายซูแซนเทลลีทั้งหมดจำนวน 81 ตัวอย่าง สามารถจำแนกสาหร่ายซูแซนเทลลีออกเป็น 2 สกุล คือ สกุล *Cladocopium* และ สกุล *Durusdinium* เมื่อเปรียบเทียบลำดับทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลีในการศึกษานี้กับข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN พบว่าผลการตรวจสอบสกุลของสาหร่ายซูแซนเทลลีสอดคล้องกัน และมีตัวอย่างบางตัวอย่างที่มีข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมบางตำแหน่งแตกต่างไปจากข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และได้นำลำดับทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลี ในฐานข้อมูล GenBank หมายเลข accession numbers ดังต่อไปนี้

KU842042, GU111879, KU841977, EU074906, KY131786, JQ003818, EU812742 มาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิง จากการนำข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมบางส่วนบริเวณ ITS2 ของสาหร่ายซูแซนเทลลีในการศึกษานี้ (81 ตัวอย่าง) ไปหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับสาหร่ายซูแซนเทลลีในสกุล *Cladocopium* และ สกุล *Durusdinium* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับปะการังในฐานข้อมูล GenBank จำนวนรวม 88 ตัวอย่าง โดยการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี maximum parsimony (total character = 287, parsimony informative character = 100)

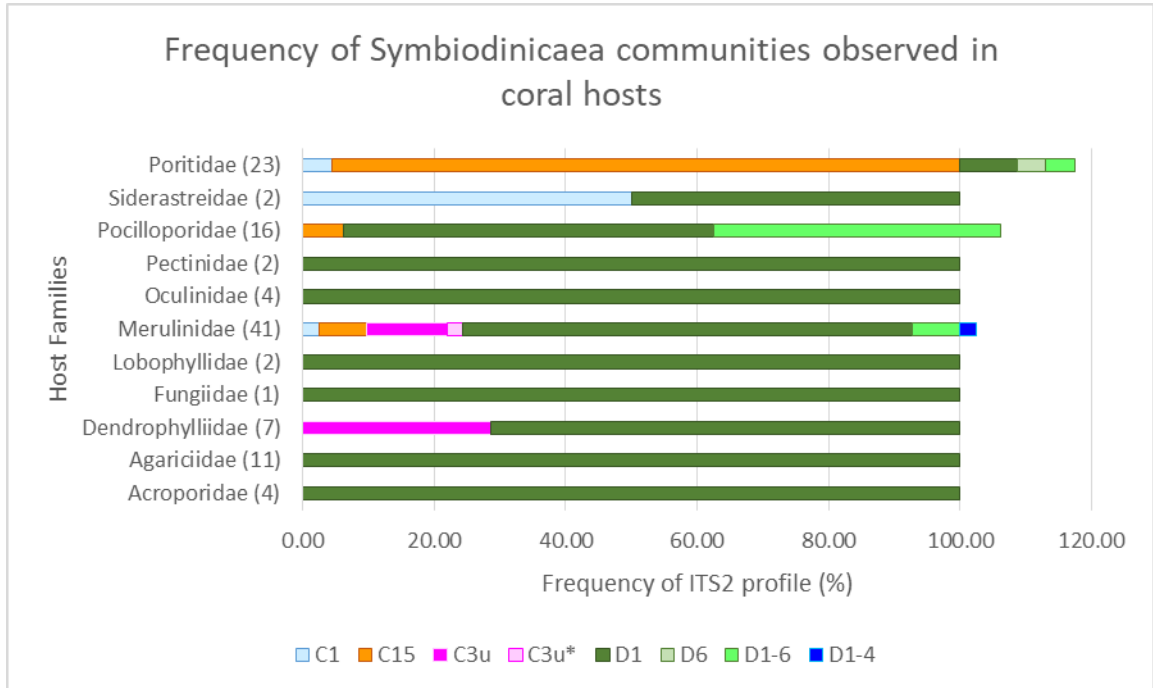


ภาพที่ 5 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ Maximum likelihood แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype ของสาหร่ายซูแซนเทลลีสกุล *Cladocopium* spp. และ *Durusdinium* spp. ในปะการังเจ้าบ้านจำนวน 21 สกุนจากการศึกษานี้ ตัวเลขที่อยู่บนแผนผังแสดงค่า bootstrap value (%) จากการวิเคราะห์ 1,000 ครั้ง; ชื่อสาหร่ายซูแซนเทลลีที่ระบุในแผนภาพ (D1, C15, C3u, C1) คือตัวอย่างที่มี haplotype ตรงกับข้อมูลจาก GenBank, ตัวอย่างที่มี haplotype แตกต่างไปจากฐานข้อมูล GenBank จะระบุชื่อสถานี (ตัวอักษรภาษาอังกฤษ 2 ตัว) หมายเลขตัวอย่าง และสกุลของปะการัง (ตัวเลขในวงเล็บ คือจำนวนตัวอย่างสาหร่ายซูแซนเทลลีที่มีการวิเคราะห์ลำดับทางพันธุกรรม)

พบรูปแบบลำดับทางพันธุกรรมของสาหร่ายในสกุล *Durusdinium* 5 รูปแบบ (haplotypes) โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม แต่ไม่สามารถแบ่งแยกได้อย่างชัดเจน ได้แก่ กลุ่ม D1 (ประกอบไปด้วยปะการังเจ้าบ้านหลายชนิด) ร่วมกับ D1-4 (EU074906) และ D1-4-6 (JQ003818) และกลุ่ม D1-4/D6 (EU812742) และรูปแบบลำดับทางพันธุกรรมของสาหร่ายในสกุล *Cladocopium* 6 รูปแบบ (haplotypes) โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 5) หรืออย่างน้อยจำแนกได้เป็น 3 ชนิด คือ กลุ่ม *Cladocopium* sp. (C15), *Cladocopium* sp. (C1) และ *Cladocopium* sp. (C3u)

### 3.2 ความหลากหลายชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังในจังหวัดชลบุรีและระยอง

จากการเก็บตัวอย่างปะการังจำนวน 21 สกุน จาก 11 วงศ์ พบสาหร่ายซูแซนเทลลีอย่างน้อย 4 ชนิด ซึ่งสามารถใช้ดีเอ็นเอโพรไฟล์ในการจำแนกได้เป็น 7 โพรไฟล์ประกอบไปด้วยโพรไฟล์ของสกุล *Cladocopium* 3 โพรไฟล์ (C1, C15 และ C3u) และสกุล *Durudinium* 4 โพรไฟล์ (D1, D6, D1-6 และ D1-4) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ความถี่ของสาหร่ายซูแซนเทลลีชนิดต่างๆที่บันทึกจากดีเอ็นเอโพรไฟล์ ที่พบในปะการังเจ้าบ้านในแต่ละวงศ์ (ความถี่ที่เกิน 100% เกิดจากปะการังบางตัวอย่าง พบชนิดของสาหร่ายมากกว่า 1 ชนิด)

จากภาพที่ 5-6 จะพบว่าในพื้นที่แนวปะการังจังหวัดชลบุรีและจังหวัดระยอง พบสาหร่ายซูแซนเทลลีในสกุล *Durudinium* spp. (D1) เป็นชนิดเด่น โดยพบได้ในปะการังทุกวงศ์ โดยเป็นสาหร่ายเพียงชนิดเดียวที่พบในวงศ์ Pectinidae, Oculinidae, Lobophylliidae, Agariciidae และ Acroporidae และเป็นองค์ประกอบหลักที่พบมากกว่า 50% ในปะการังวงศ์ Merulinidae, Dendrophylliidae และ Pocilloporidae ในขณะที่วงศ์ Poritidae พบสาหร่ายซูแซนเทลลีสกุล *Cladocopium* sp. (C15) เป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่ปะการังวงศ์ Merulinidae และ Dendrophylliidae สามารถพบสาหร่ายซูแซนเทลลีสกุล *Cladocopium* sp. (C3u) ได้ทั่วไป นอกจากนี้ยังพบว่าปะการังในวงศ์ Poritidae และ Merulinidae บางโคโลนี พบสาหร่ายซูแซนเทลลีมากกว่า 1 ชนิด

ตารางที่ 2 ปะการังสกุลหลักจากวงศ์ต่างๆ และสัดส่วนองค์ประกอบของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังเจ้าบ้านแต่ละสกุล

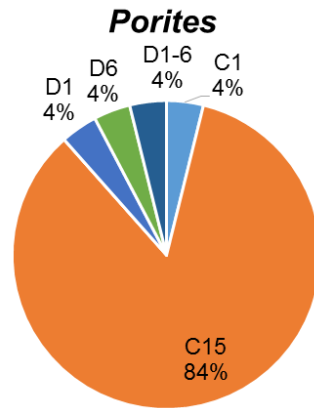
---

### Family Poritidae

---



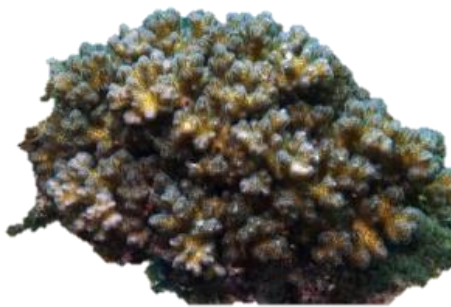
ปะการังโขด (*Porites*)  
n=26



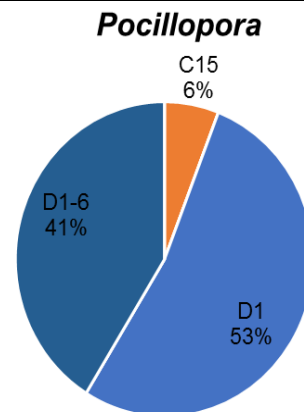
---

### Family Pocilloporidae

---



ปะการังดอกกะหล่ำ (*Pocillopora*)  
n=17



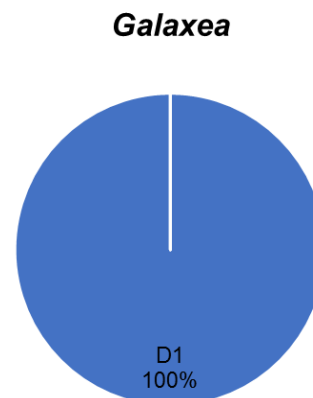
---

### Family Oculinidae

---



ปะการังกาแล็คซี่ (*Galaxea*)  
n=4

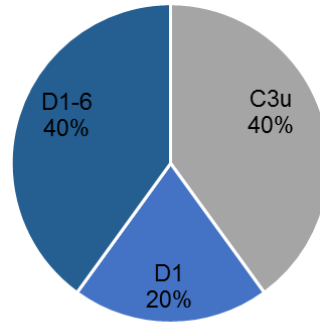


ตารางที่ 2 ปะการังสกุลหลักจากวงศ์ต่างๆ และสัดส่วนองค์ประกอบของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังเจ้าบ้านแต่ละสกุล (ต่อเนื่อง)

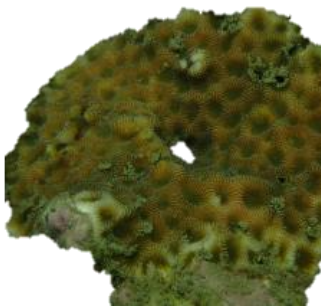
Family Merulinidae



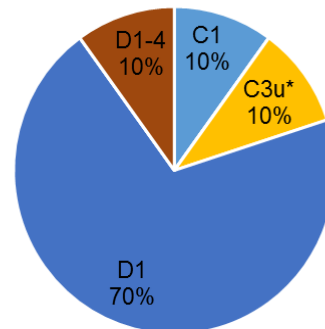
**Dipsastraea**



ปะการังวงแหวน (*Dipsastraea*  
ชื่อเดิม *Favia*)  
n=5



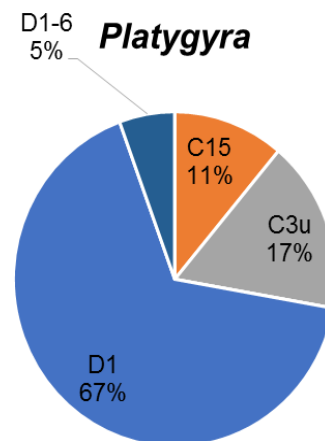
**Favites**



ปะการังช่องเหลี่ยม (*Favites*)  
n=10



**Platygyra**



ปะการังสมอง (*Platygyra*)  
n=18

ตารางที่ 2 ปะการังสกุลหลักจากวงศ์ต่างๆ และสัดส่วนองค์ประกอบของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบใน  
ปะการังเจ้าบ้านแต่ละสกุล (ต่อเนื่อง)

---

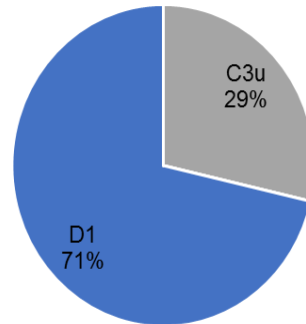
Family Dendrophylliidae

---



ปะการังจาน (*Turbinaria*)  
n=7

***Turbinaria***

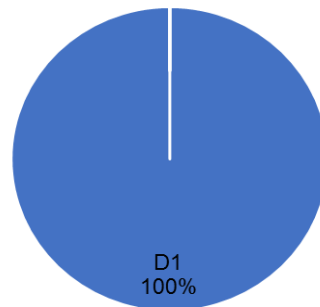


Family Agariciidae



ปะการังลายดอกไม้ (*Pavona*)  
n=9

***Pavona***

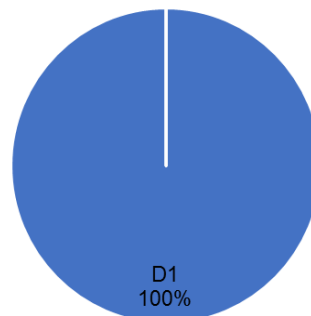


Family Acroporidae

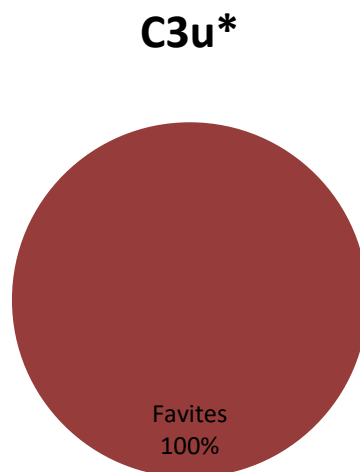
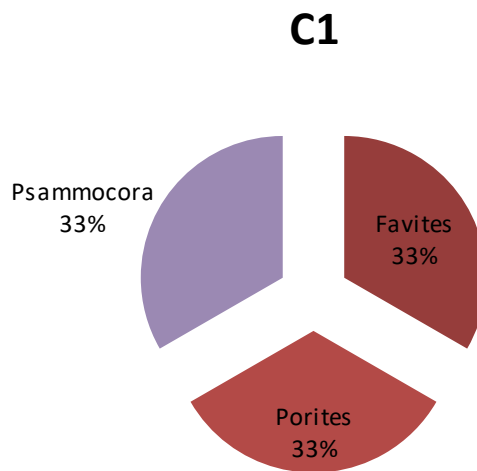
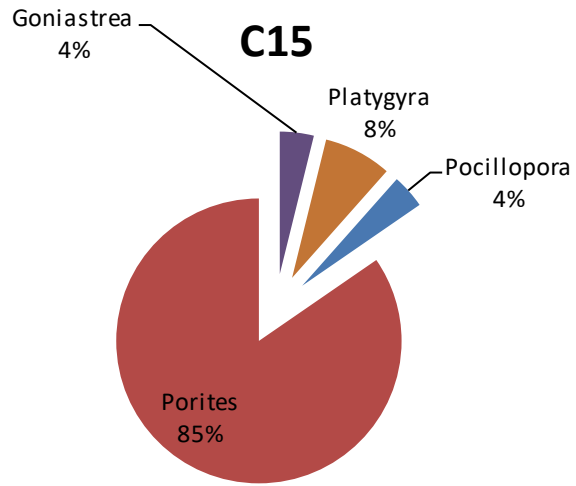


ปะการังเขากวาง (*Acropora*)  
n=4

***Acropora***

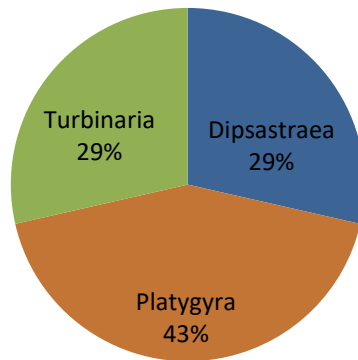




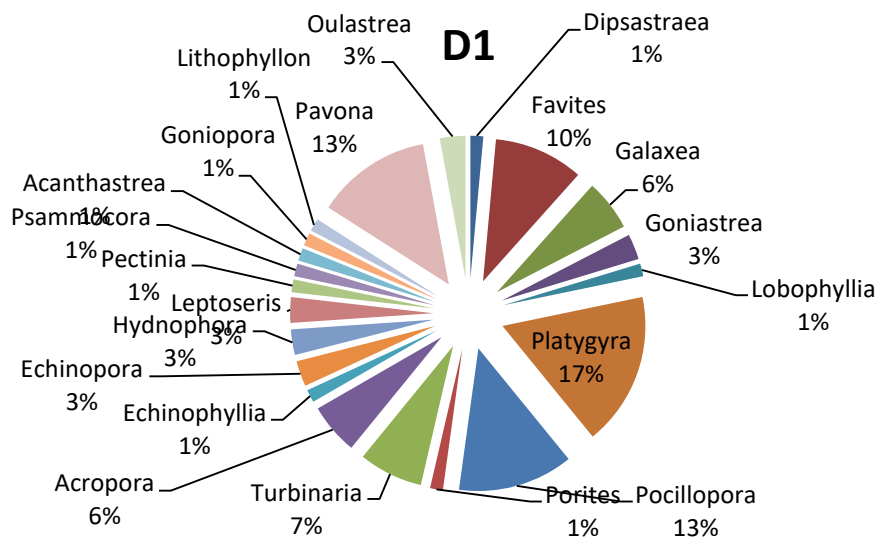


ภาพที่ 7 สัดส่วนองค์ประกอบของปะการังเจ้าบ้านสกุลต่างๆ ที่พบสำหรับยูแซนเทลลีชนิด C15, C1 และ C3u\*

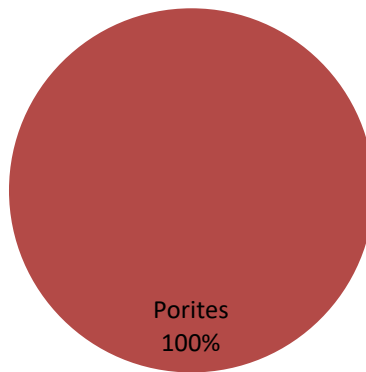
### C3u



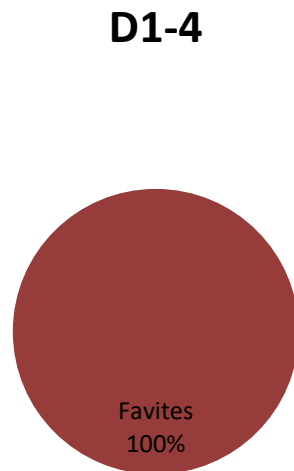
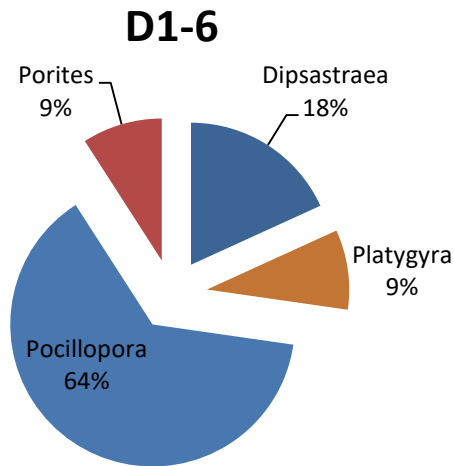
### D1



### D6



ภาพที่ 8 สัดส่วนองค์ประกอบของปะการังเจ้าบ้านสกุลต่างๆ ที่พบสาหร่ายซูแซนเทลลีชนิด C3u, D1 และ D6

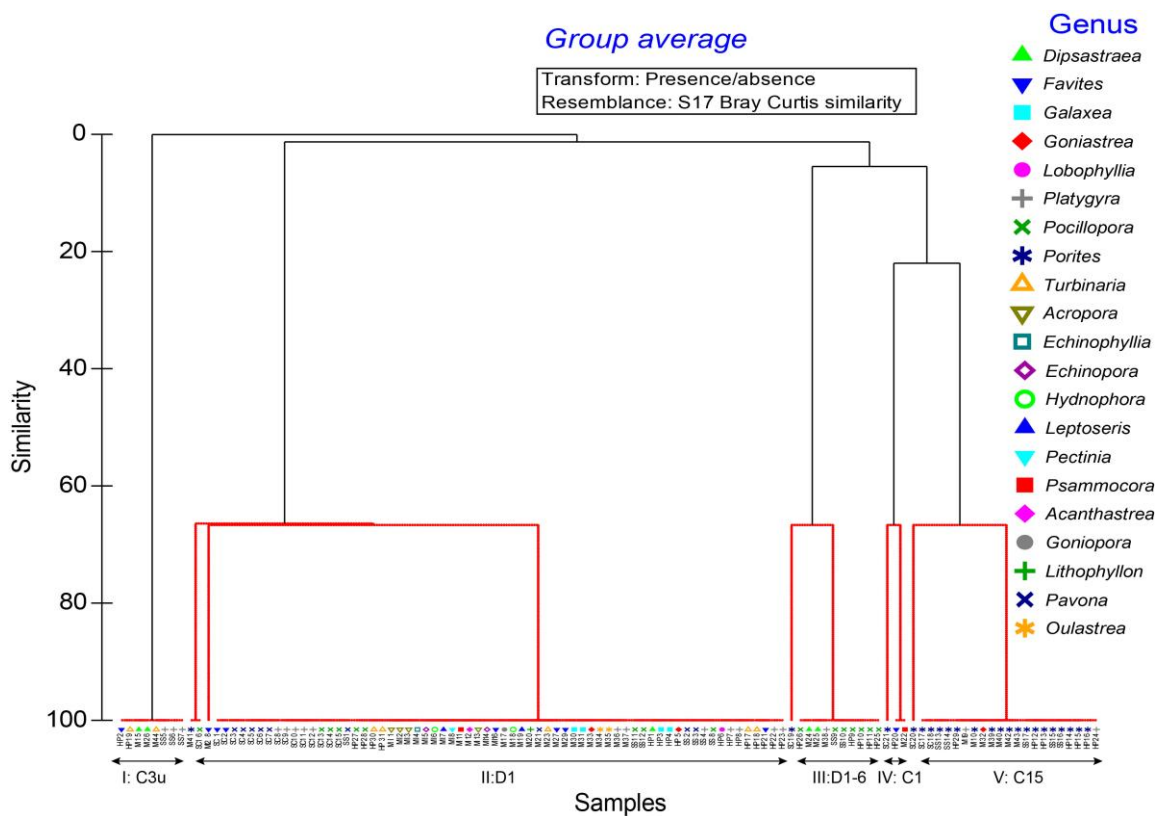


ภาพที่ 9 สัดส่วนองค์ประกอบของปะการังเจ้าบ้านสกุลต่างๆ ที่พบสาหร่ายซูแซนเทลลีชนิด D1-6 และ D1-4

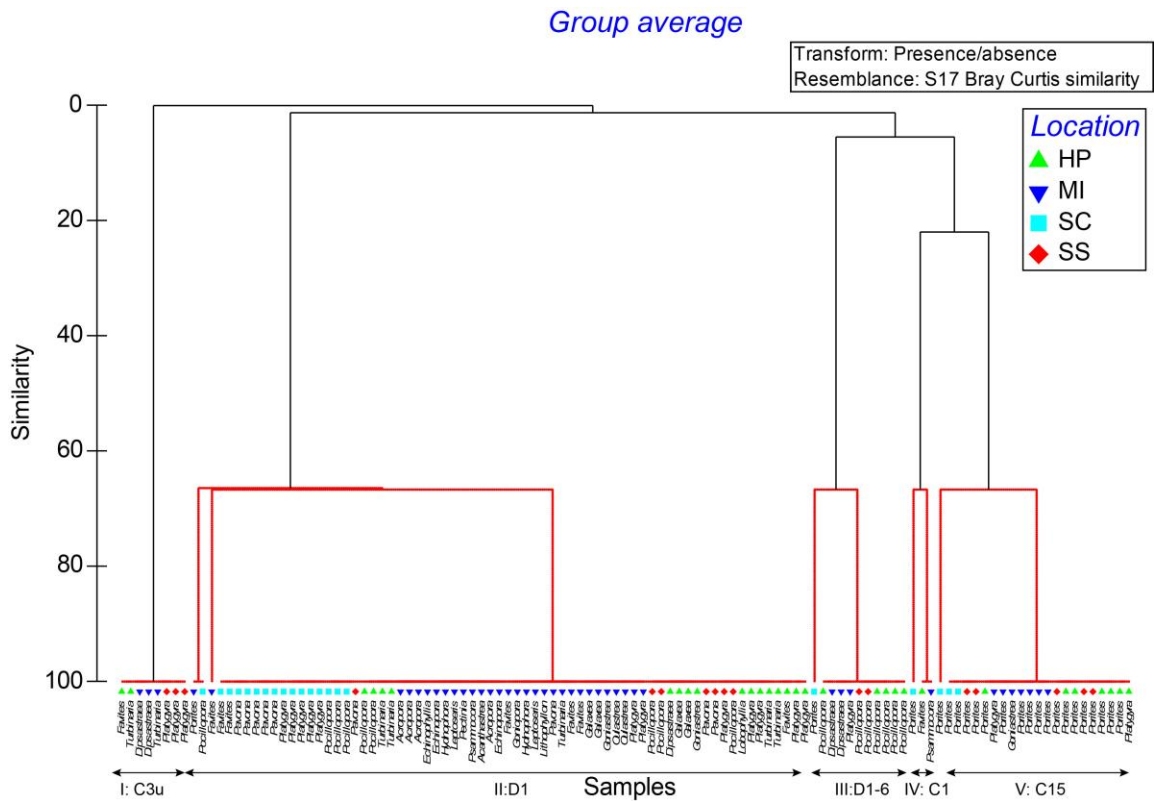
เมื่อพิจารณาชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีและความจำเพาะกับชนิดของปะการัง พบว่าสาหร่ายซูแซนเทลลีในสกุล *Cladocopium* spp. ที่ค่อนข้างมีความเฉพาะเจาะจงกับปะการังเจ้าบ้าน คือ C15 พบเป็นชนิดเด่นในปะการังสกุล *Porites* แต่ยังสามารถพบได้บ้างในปะการังสกุลอื่นๆ เช่น *Platygyra*, *Lobophyllia* และ *Pocillopora* ในขณะที่ C1 พบในปะการังสกุล *Porites*, *Psammocora* และ *Galaxea* ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน คล้ายคลึงกับ C3u ที่พบได้ในปะการังสกุล *Platygyra*, *Dipsastraea* และ *Turbinria* ส่วนสาหร่ายซูแซนเทลลีในสกุล *Durusdinium* spp. (D1) พบได้ในปะการังทุกสกุล โดยเฉพาะในปะการังสกุล *Platygyra* (17%), *Pocillopora* (13%), *Pavona* (13%) และ *Favites* (10%) (ตารางที่ 2, ภาพที่ 7-9)

### 3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีกับชนิดของปะการังและปัจจัยสิ่งแวดล้อม

จากการวิเคราะห์ ANOSIM test พบความแตกต่างระหว่างชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีและชนิดของปะการังอย่างมีนัยสำคัญ ( $R = 0.46, P = 0.001$ ) โดยพบความแตกต่างขององค์ประกอบสาหร่ายซูแซนเทลลี ระหว่างปะการัง *Porites* และปะการังสกุลอื่นๆ ประกอบด้วย *Dipsastraea*, *Favites*, *Galaxea*, *Platygyra*, *Pocillopora*, *Turbinaria* และ *Pavona* และการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster Analysis) พบว่าองค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่อาศัยอยู่ร่วมกับปะการังที่เป็นเจ้าบ้าน แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 5 กลุ่ม (ภาพที่ 10) ที่ระดับความคล้ายคลึงประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ โดยกลุ่ม 1) ประกอบไปด้วย *Cladocopium* sp. (C3u) ซึ่งอาศัยอยู่ร่วมกับปะการังในสกุล *Platygyra*, *Dipsastraea*, *Favites* และ *Turbinaria* 2) เป็นกลุ่มใหญ่ที่สุด คือ *Durusdinium* spp. (D1) อาศัยอยู่ร่วมกับปะการังทุกสกุล 3) กลุ่ม D1-6 และ D6 ซึ่งส่วนมากพบในปะการัง *Pocillopora* 4) กลุ่ม C1 พบได้ค่อนข้างน้อย 5) กลุ่ม C 15 ส่วนใหญ่ค่อนข้างมีความเฉพาะเจาะจงกับปะการัง *Porites* แต่ไม่มีความจำเพาะกับสถานที่ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 แผนภาพการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงขององค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังสกุลต่างๆ ในพื้นที่แนวปะการังจังหวัดชลบุรีและระยอง เส้นสีแดง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการจัดกลุ่ม ( $p < 0.05$ ) ด้วยการทดสอบ SIMPROF. ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงจุดเก็บตัวอย่างและหมายเลขตัวอย่าง



ภาพที่ 11 แผนภาพการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงขององค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังสกุลต่างๆ ตามสถานีเก็บตัวอย่างในพื้นที่แนวปะการังจังหวัดชลบุรีและระยอง เส้นสีแดงแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการจัดกลุ่ม ( $p < 0.05$ ) ด้วยการทดสอบ SIMPROF

ผลจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (SIMPER) พบว่าในปะการังสกุลเดียวกัน พบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีคล้ายคลึงกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงแสดงดังตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงขององค์ประกอบประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังเจ้าบ้านแต่ละสกุล

**Similarity**

<i>Dipsastraea</i> (5)	<i>Porites</i> (22)
60.00 %	92.90 %
C3u	C15

<i>Favites</i> (9)	<i>Galaxea</i> (4)	<i>Goniastrea</i> (3)	<i>Platygyra</i> (18)	<i>Pocillopora</i> (16)	<i>Turbinaria</i> (7)
75.28 %	100 %	66.67 %	72.88 %	71.83 %	76.19 %
D1	D1	D1	D1	D1	D1
				D1-6	

<i>Acropora</i> (4)	<i>Echinopora</i> (2)	<i>Hydnophora</i> (2)	<i>Leptoseris</i> (2)	<i>Pavona</i> (9)	<i>Oulastrea</i> (2)
100.00 %	100.00 %	100.00 %	100.00 %	100.00 %	100.00 %
D1	D1	D1	D1	D1	D1

ตัวเลขในวงเล็บหลังชื่อสกุลของปะการัง หมายถึงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงขององค์ประกอบสาหร่ายซูแซนเทลลี ภายในปะการังสกุลนั้นๆ ชนิดของสาหร่ายที่เป็นองค์ประกอบหลักภายในปะการังสกุลนั้นๆ

จากตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าปะการังสกุล *Porites* ค่อนข้างมีความจำเพาะเจาะจงกับสาหร่าย *Cladocopium* sp. (C15) โดยพบมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั้งหมดที่นำมาศึกษา และปะการังสกุล *Pocillopora* ค่อนข้างมีความจำเพาะเจาะจงกับสาหร่าย *Durusdinium* spp. (D1 และ D1-6) ส่วนปะการังชนิดอื่นๆ พบ *Durusdinium* sp. (D1) เป็นชนิดเด่น

เนื่องจากจำนวนตัวอย่างปะการังแต่ละชนิดที่เก็บจากแต่ละสถานีนี้อาจมีจำนวนไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงได้คัดเลือกปะการังบางชนิดที่พบได้บ่อยในหลายๆพื้นที่ ได้แก่ ปะการังสกุล *Favites* *Pavona* *Platygyra* *Pocillopora* *Porites* และ *Turbinaria* เพื่อนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของการพบองค์ประกอบของสาหร่ายซูแซนเทลลี ในพื้นที่ต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** การวิเคราะห์ความแปรปรวนหลายตัวแปร (MANOVA) ขององค์ประกอบประชาคมสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังเจ้าบ้านที่พบในสถานีนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สกุล	Df	SS	MS	Pseudo-F	P (perm)
<i>Favites</i>	2	6574.1	3287	1.8205	0.119
<i>Pavona</i>	2	0	0	0	
<i>Platygyra</i>	3	18111	6037	3.0185	0.026*
<i>Pocillopora</i>	2	12812	6405.8	3.0707	0.1
<i>Porites</i>	3	558.92	186.31	0.89207	0.864
<i>Turbinaria</i>	1	1285.7	1285.7	0.49451	1

\* พบความแตกต่างระหว่างสถานีนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$

จากองค์ประกอบประชาคมของสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังเจ้าบ้านทั้ง 6 สกัล พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสถานี เฉพาะในปะการังสกัล *Platygyra* ที่เก็บจากทั้ง 4 สถานี (SC, SS, MI และ HP) พบว่าสถานีที่ค่อนข้างมีแตกต่างกัน คือระหว่างสถานีหินเพิง (HP) และหมู่เกาะแสมสาร (SS) ( $p=0.087$ ) และระหว่างสถานีหมู่เกาะสีซัง (SC) และหมู่เกาะแสมสาร (SS) ( $p=0.067$ ) โดยสถานีหินเพิง และหมู่เกาะสีซัง พบสาหร่าย D1 เป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่หมู่เกาะแสมสาร พบ C3u เป็นองค์ประกอบหลัก

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังกลุ่มเด่น ได้แก่ ปะการังสกัล *Pocillopora*, *Platygyra* และ *Porites* ร่วมกับปัจจัยสิ่งแวดล้อม (ตารางที่ 5) พบว่าตัวอย่างปะการังสกัล *Pocillopora* ส่วนใหญ่ที่เก็บมา มาจากสถานีเกาะสีซัง แสมสาร และหินเพิง จึงได้ทำการวิเคราะห์ระหว่างสามสถานีนี้เท่านั้น พบว่าสาหร่ายซูแซนเทลลีชนิดที่เป็นองค์ประกอบหลักในปะการังสกัล *Pocillopora* คือ *Durusdinium* spp. (D1 และ D1-6) ซึ่ง D1 จะพบได้ทุกสถานี และมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกปริมาณธาตุอาหารในกลุ่มซิลิเกต แอมโมเนียม ไนเตรต และฟอสเฟต ในขณะที่ D1-6 มีความสัมพันธ์กับความเค็มและอุณหภูมิ พบมากบริเวณแสมสารและหินเพิง (ภาพที่ 12 a) ปะการังสกัล *Platygyra* พบสาหร่ายสกัล *Durusdinium* spp. (D1) เป็นองค์ประกอบหลักในทุกสถานี ในขณะที่สกัล *Cladocopium* sp. (C3u) พบเฉพาะที่บริเวณเกาะแสมสาร ซึ่งมีความสัมพันธ์กับธาตุอาหารในกลุ่มแอมโมเนียม ไนเตรต และฟอสเฟต (ภาพที่ 12b) ส่วนปะการังสกัล *Porites* เป็นชนิดที่จำเพาะกับสาหร่ายในสกัล *Cladocopium* sp. (C15) ในทุกสถานี แต่พบว่าในสถานีเกาะสีซัง พบสาหร่ายชนิดอื่นๆด้วย เช่น C1, D6 และ D1-6 โดยพบว่าสัมพันธ์กับปริมาณซิลิเกต และพบ *Durusdinium* spp. (D1) บริเวณหมู่เกาะมัน โดยมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารแขวนลอย (TSS) (ภาพที่ 12c)

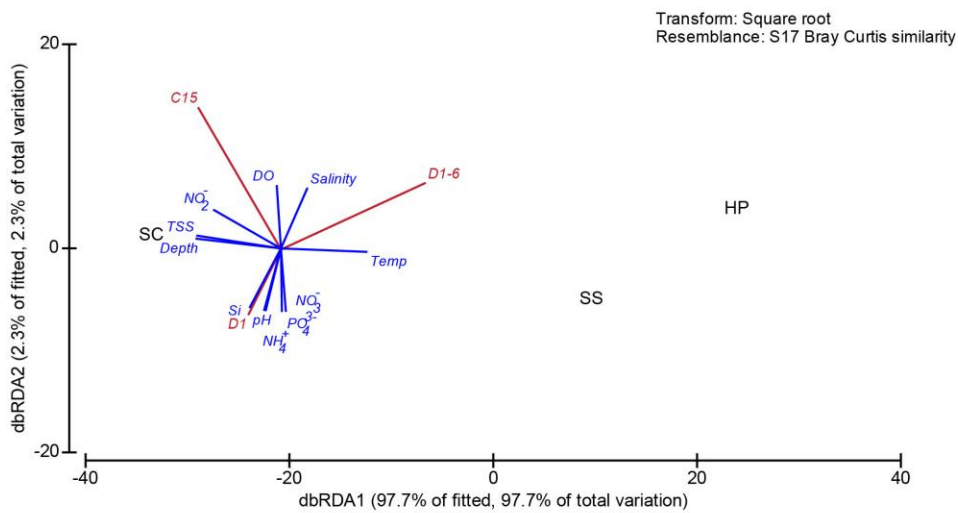
ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน คุณภาพน้ำจากสถานีเก็บตัวอย่างทั้ง 4 สถานีบริเวณแนวปะการังจังหวัดชลบุรี และระยอง ในระหว่างฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (ธันวาคม 2559 – มีนาคม 2560) และฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (สิงหาคม 2560)

Site	Depth (m)	pH	Temp (°C)	Salinity (ppt)	DO (mg/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg N/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg N/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µg N/L)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (µg P/L)	Si (µg Si/L)	TSS (mg/L)	
Sichang Is. (SC)	Mean	4-6	8.39	30.28	29.36	6.42	17.39	2.43	21.70	4.11	863.91	15.28
	SD		0.25	0.41	3.72	1.18	12.08	2.87	24.90	2.69	146.45	3.31
Samaesan Is. (SS)	Mean	3-6	8.18	30.45	32.97	6.48	ND	2.00	0.42	2.09	102.43	15.51
	SD		0.03	0.35	0.95	0.12	ND	3.53	0.48	0.73	114.81	3.78
Man Is. (MI)	Mean	3-5	8.19	28.45	32.00	6.21	0.00	0.00	6.61	2.54	113.33	32.03
	SD		0.02	0.35	0.00	0.24	0.00	0.00	9.35	3.59	160.27	1.01
Hin Ploeng Pinnacle (HP)	Mean	6-12	8.25	29.28	31.38	6.55	7.49	3.65	2.86	2.74	268.11	23.20
	SD		0.02	1.08	1.90	0.39	12.20	8.95	2.44	0.37	161.55	14.11

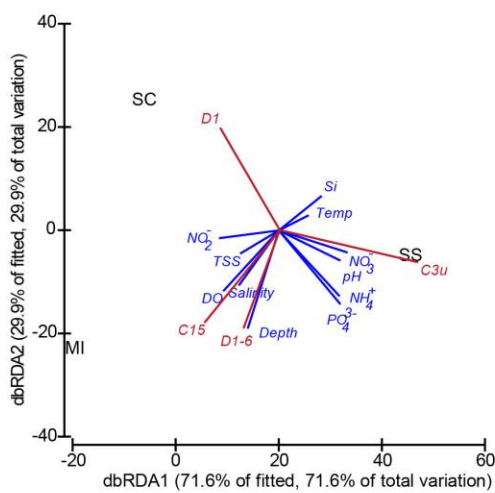
ที่มา : ได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูลจากศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก



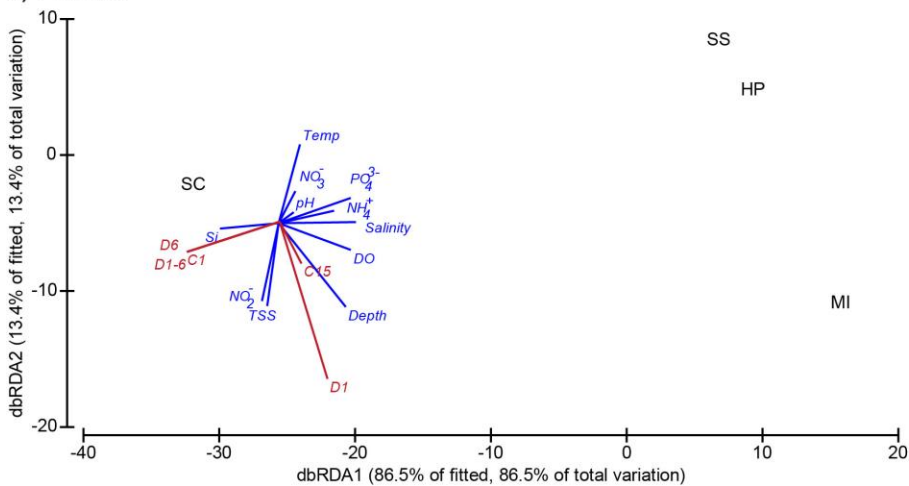
a) *Pocillopora*



b) *Platygyra*



c) *Porites*



ภาพที่ 12 DbRAD พล็อตแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อม และชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลี ในปะการังสกุล a) *Pocillopora* b) *Platygyra* และ c) *Porites* ในสถานีหมู่เกาะสี่ซัง (SC) แสมสาร (SS) หมู่เกาะมัน (MI) และ หินเพิง (HP)

## บทที่ 4

### อภิปรายผลและสรุปผลการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้เก็บตัวอย่างปะการังแข็งในจังหวัดชลบุรี และระยอง จำนวน 113 ตัวอย่าง จากปะการัง 11 วงศ์ จำนวนทั้งสิ้น 21 สกุล จาก 4 สถานี พบความหลากหลายชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลี ในวงศ์ Symbiodiniaceae อย่างน้อย 5 ชนิด ประกอบไปด้วยสกุล *Cladocopium* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ C15, C3u และ C1 และสกุล *Durusdinium* อย่างน้อย 2 ชนิด ได้แก่ D1, D1-4, D6, D1-6 ที่เครื่องหมาย ITS2 ยังไม่สามารถระบุความแตกต่างระหว่าง *D. trenchii* และ *D. glynnii* ได้ (Wham et al., 2017) ซึ่งถือว่าความหลากหลายของชนิดค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานจากประเทศอื่นๆ (ตารางที่ 6)

**ตารางที่ 6** องค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีและชนิดเด่น (ตัวหนา) ในปะการังแข็ง ที่พบในภูมิภาคต่างๆ

ประเทศ	จำนวนสกุล (ปะการัง)	จำนวนชนิด (ซูแซนเทลลี)	องค์ประกอบชนิด (ซูแซนเทลลี)	ความจำเพาะ	References
Thailand (Gulf of Thailand)	21	≥5	<b>D1</b> , D1-4, D1-6, D6, C15, C1, C3u	<i>Porites</i> (C15) <i>Pocillopora</i> (D1-6)	This study
Thailand (Andaman)	12	>30	e.g. <b>C3u</b> , C101, C1, C3b, C3z, C15, <b>D1-4</b> , D1-4-10, D5	<i>Porites</i> (C15)	LaJeunesse et al. (2010)
Singapore	6	4	<b>C1</b> , C27, C15, <b>D1</b> ,	<i>Porites</i> (C15)	Tanzil et al. (2017)
Hongkong	12	4	<b>C1</b> , C21, D13, C15	<i>Porites</i> (C15)	Wong et al. (2016)
Moorea/French Polynesia	14	13	A1, A3, <b>C1</b> , <b>C1b</b> , <b>C1f</b> , <b>C3</b> , <b>C3b</b> , C15, C21, C42, C45, D1, D1-4	<i>Porites</i> (C15)	Putnam et al. (2012)

#### 4.1 ความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของเจ้าบ้าน

สาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังแข็ง อาจมีได้ทั้งชนิดที่มีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของปะการังเจ้าบ้าน หรือชนิดที่ไม่เฉพาะเจาะจง ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความจำเพาะเจาะจงของสาหร่ายซูแซนเทลลี อาจเป็นผลมาจากกลไกในการเข้ามาอยู่อาศัยของสาหร่ายซูแซนเทลลีร่วมกับปะการังเจ้าบ้าน ทั้งจากสิ่งแวดล้อม และจากการถ่ายทอดจากโคโลนีแม่สู่ลูก (Stat et al., 2008; LaJeunesse et al., 2010b) นอกจากนี้ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในแต่ละแห่งยังมีผลต่อความชุกชุมของสาหร่ายซูแซนเทลลี สกุล *Cladocopium* spp. หรือ สกุล *Durusdinium* spp. (Tonk et al., 2013; Gong et al., 2018). จากการศึกษาปะการังทั้ง 21 สกุล ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าปะการังสกุล *Porites* มีความจำเพาะเจาะจงกับสาหร่าย *Cladocopium* sp. (C15) และปะการังสกุล *Pocillopora* ค่อนข้างมีความจำเพาะกับสาหร่าย

*Durusdinium* sp. (D1-6) ในขณะที่สำหรับ *Durusdinium* spp. (D1) เป็นชนิดที่สามารถแพร่กระจายได้หลากหลายในปะการังทุกสกุล

ถึงแม้ว่าทั้งสาหร่ายสกุล *Durusdinium* และ *Cladocopium* หลายชนิดจะสามารถปรับตัวให้ทนได้ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง มีความขุ่นสูง แต่ดูเหมือนว่าปริมาณธาตุอาหารอาจจะเป็นอีกหนึ่งปัจจัย ที่อาจจะส่งผลต่อองค์ประกอบภายในประชาคมของสาหร่ายซูแซนเทลลีในแนวปะการัง (Tonk et al., 2013; Gong et al., 2018) ความต้องการปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน อาจทำให้สาหร่ายแต่ละชนิดมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม และอาจจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการจับกินอาหารของปะการังเจ้าบ้าน ซึ่งจะมีผลต่อพัฒนาการและการปรับตัวของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่อาศัยอยู่ร่วมกับเจ้าบ้านแต่ละชนิดที่ต่างกัน เช่นการที่สาหร่ายซูแซนเทลลีหรือปะการังจะต้องแลกเปลี่ยนระหว่างความประสิทธิภาพในการใช้แสงเพื่อการเจริญเติบโต หรือสุขภาพของปะการังเจ้าบ้าน (Iglesias-Prieto et al., 2004; Mieog et al., 2009) สาหร่าย *Cladocopium* sp. (C15) ที่พบจำเพาะอยู่กับปะการังสกุล *Porites* ที่มีอยู่ในแนวปะการังที่มีน้ำค่อนข้างขุ่น (Sudara and Yeemin, 1997) และจากรายงานพบว่าปะการังที่อาศัยในน้ำที่ค่อนข้างขุ่น มักมีการปรับตัวโดยการจับกินอาหาร เพื่อชดเชยการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่จำกัดในสภาวะที่มีแสงน้อย (Ferrier-Pagès et al., 2011) สำหรับปะการัง *Pocillopora damicornis* มักพบมีความเฉพาะเจาะจงกับ *Cladocopium* sp. (D1-6) ในขณะที่สำหรับ *Durusdinium* spp. (D1) เป็นกลุ่มที่มีการแพร่กระจายกว้างขวางในปะการังทุกสกุล และพบในแนวปะการังที่ค่อนข้างหลากหลายในอ่าวไทย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ได้สะท้อนให้เห็นความซับซ้อนของธรรมชาติ และการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ของสาหร่ายซูแซนเทลลี เนื่องจากสาหร่ายซูแซนเทลลีในสกุล *Cladocopium* มีจำนวนชนิดที่หลากหลาย ในการศึกษาครั้งนี้พบสมาชิกอย่างน้อย 3 ชนิด (แต่ยังไม่ได้มีการยืนยันชื่อชนิด ตามหลักการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์อย่างเป็นทางการ) ซึ่งในการตั้งชื่อชนิด จะต้องต้องมีข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา และด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อมาสนับสนุน สำหรับสกุล *Durusdinium* จากการศึกษาครั้งนี้คาดว่าประกอบไปด้วย *Durusdinium* อย่างน้อย 2 ชนิด แต่ เครื่องหมาย ITS2, *cob* และ chloroplast 23S ยังไม่สามารถระบุความแตกต่างระหว่างชนิด *D. trenchii* (D1-4, D1-4-6) และ *D. glynnii* (D1-6, D1-4-6) ได้ (Wham et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบว่า ในบางตัวอย่างที่มี co-dominant sequences เช่น D1-4-6 อาจจะเป็นได้ทั้ง *D. trenchii* หรือ *D. glynnii* ในการจะจำแนกชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่มีความใกล้เคียงกันมากๆ ในสกุล *Durusdinium* โดยเฉพาะ *D. trenchii* และ *D. glynnii* จะต้องใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความไวสูงขึ้น เช่น *psb A<sup>ncr</sup>* หรือ microsatellite เป็นต้น (Wham et al., 2017)

#### 4.2 ตำแหน่งที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ และอิทธิพลจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อประชาคมของสาหร่ายซูแซนเทลลี

ความหลากหลายชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการังแข็งในจังหวัดชลบุรีและระยองค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีที่พบในปะการังแข็งที่เก็บจากทะเลอันดามัน (LaJeunesse et al., 2010a) และที่อื่นๆ (ตารางที่ 5) จากการศึกษาของ LaJeunesse et al. (2010a) จากทะเลอันดามันของประเทศไทย พบสาหร่ายสกุล *Cladocopium* รวม 23 ชนิด และ *Durusdinium* 11 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแนวปะการังฝั่งทะเลอันดามันของประเทศไทย มีความหลากหลายชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลี สูงกว่าปะการังในจังหวัดชลบุรีและระยอง แต่เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของสาหร่ายซูแซนเทลลี ในปะการังชนิดเดียวกันที่พบระหว่างอันดามัน และแนวปะการังจังหวัดชลบุรี-

ระยอง พบว่าทั้งสองแห่ง ปะการังสกุล *Porites* มักพบเฉพาะเจาะจงอยู่กับสาหร่าย *Cladocopium* sp. (C15) ในขณะที่ฝั่งทะเลอันดามัน พบ *Cladocopium* sp. (C3u) เป็นชนิดเด่นที่พบได้ในปะการังที่เป็น broadcast spawner เช่น *Acropora*, *Platygyra*, *Favites*, *Goniastrea*, *Symphyllia* แต่ในจังหวัด ชลบุรีและระยอง กลับพบ *Durusdinium* spp. (D1) เป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่ *Cladocopium* sp. (C3u) จะพบได้น้อย และพบในปะการังบางชนิดในบางพื้นที่เท่านั้น (ในการศึกษานี้พบ C3u ในปะการัง *Platygyra* ในพื้นที่หมู่เกาะแสมสารมากกว่าสถานีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) นอกจากนี้ ในปะการัง *Pocillopora* ในทะเลอันดามัน พบ *Durusdinium* sp. (D5) เป็นองค์ประกอบหลัก แต่ในจังหวัดชลบุรี-ระยอง พบว่า *Durusdinium* spp. (D1 และ D1-6) เป็นองค์ประกอบหลัก

เช่นเดียวกันกับในประเทศสิงคโปร์ ฮองกง ไต้หวัน หรือแม้กระทั่งที่ Great Barrier Reef ประเทศออสเตรเลีย พบปะการังสกุล *Porites* ส่วนใหญ่มีความเฉพาะเจาะจงอยู่กับสาหร่าย *Cladocopium* sp. (C15) Tanzil et al., 2016; Wong et al., 2016; Keshavmurthy et al., 2014; LaJeunesse et al., 2004) ในขณะที่ปะการัง *Pocillopora damicornis* ที่พบในอ่าวไทย Palau และ สิงคโปร์ มีรายงานว่าอาศัยอยู่ร่วมกับสาหร่าย *Durusdinium glynnii* (D1) (Tanzil et al., 2016; Pettay, 2011) ในขณะที่บริเวณ Great Barrier Reef หรือเกาะ Okinawa กลับพบว่า *P. damicornis* อาศัยอยู่ร่วมกับสาหร่าย *Cladocopium* spp. (C1j และ C1c ตามลำดับ) (LaJeunesse et al., 2004) ในขณะที่ในเขตอบอุ่น เช่น ประเทศฮองกง พบว่าปะการังสกุล *Pavona* และ *Platygyra* อาศัยอยู่ร่วมกับสาหร่าย *C. goreau* (C1) เท่านั้น (Wong et al., 2016) แต่ปะการังสกุล *Pavona* ที่ Great Barrier Reef อาศัยอยู่ร่วมกับสาหร่าย *Cladocopium* spp. (C3h, C21 และ C1) ในขณะที่เกาะ Okinawa พบอาศัยอยู่ร่วมกับ *D. trenchii* (D1-4) และพบว่าปะการังสกุล *Platygyra* ที่ Great Barrier Reef อาศัยอยู่ร่วมกับ *Cladocopium* spp. (C3, C3h) ในขณะที่ Okinawa พบ *Cladocopium* sp. (C55) (LaJeunesse et al., 2004) ดังนั้นการที่พบองค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีในปะการัง ชนิดเดียวกัน แต่ภูมิภาคต่างกัน อาจขึ้นอยู่กับองค์ประกอบชนิดของสาหร่ายซูแซนเทลลีในแต่ละพื้นที่ และความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของปะการังเจ้าบ้านและชนิดของสาหร่าย

แต่จากการที่เราพบสาหร่ายในสกุล *Durusdinium* spp. (D1) เป็นชนิดเด่นในปะการังหลาย ชนิด ในทุกๆสถานที่ที่ทำการศึกษ เป็นไปได้ว่าสาหร่ายในสกุล *Durusdinium* spp. (D1) ที่พบ แพร่กระจายทั่วไปในจังหวัดชลบุรี และระยองนั้น อาจจะประกอบไปด้วยสาหร่ายมากกว่า 1 ชนิด แต่ด้วยข้อจำกัดของเครื่องหมาย ITS2 ทำให้ยังไม่สามารถระบุในรายละเอียดได้ว่าสาหร่าย *Durusdinium* spp. (D1) ประกอบไปด้วยชนิดใดบ้าง ซึ่งมีแนวโน้มว่าจะเป็นชนิดที่มีการแพร่กระจายกว้างขวางใน ภูมิภาคนี้ ได้แก่ *D. trenchii* (D1-4, D1-4-6) และ *D. glynnii* (D1-6, D1-4-6) ชนิดที่มีความจำเพาะกับ ปะการัง *Pocillopora* (LaJeunesse et al., 2010a; Pattay, 2011) ซึ่งพบว่าในอ่าวไทยสาหร่ายหลาย ชนิดในสกุล *Durusdinium* มี haplotype ต่างจากสาหร่ายชนิดเดียวกัน ที่พบในภูมิภาคอื่นๆ

แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งไม่มีการศึกษาที่เป็นตัวแทนภาพรวมของแนวปะการังในอ่าวไทย ซึ่งมีลักษณะแนวปะการังและองค์ประกอบชนิดของปะการังที่ค่อนข้างหลากหลาย การที่จะตอบคำถามให้ ได้ว่าสาหร่ายที่ทนต่ออุณหภูมิ และความขุ่น ในสกุล *Durusdinium* นี้จะมีความจำเพาะกับปะการัง เจ้าบ้าน หรือลักษณะของถิ่นที่อยู่อาศัยหรือไม่ เราจึงจำเป็นต้องใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความ ไวในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างชนิดที่สูงขึ้นกว่าเครื่องหมาย ITS2 เพื่อจะเป็นข้อมูลที่สำคัญใน การพัฒนาการวางแผนการจัดการแนวปะการังที่มีการปรับตัวในสภาพแวดล้อมที่จำกัด อย่างแนว ปะการังในอ่าวไทย

## บทที่ 5 ผลผลิต

1. บทความวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในฐานข้อมูล Scopus จำนวน 1 เรื่อง

Chankong A, Kongjandtre N, Senanan W and Manthachitra M (2018) Genetic Diversity of Symbiodiniaceae Associated with *Porites lutea* and *Pocillopora damicornis* in the Gulf of Thailand Inferred from Nucleotide Sequences of Internal Transcribed Spacer-2. *Journal of Fisheries and Environment*, 42 (3): 66-79

2. บทความวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (Q2) ที่อยู่ในขั้นตอนการแก้ไข จำนวน 1 เรื่อง

Chankong A, Kongjandtre N, Senanan W and Manthachitra M (Under Review) Community composition of Symbiodiniaceae among four scleractinian corals in the eastern Gulf of Thailand. *Regional Studies in Marine Science*.

รายงานสรุปการเงิน  
 เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2560A10802084 สัญญาเลขที่ 142/2560  
 โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายซูแซนเทลลีในแนวปะการังชายฝั่ง  
 ภาคตะวันออกและความจำเพาะของเจ้าบ้าน-ชนิดของสาหร่ายที่ได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.นรินทร์รัตน์ คงจันทร์ตรี

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2560 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 6 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2560 – 30 มิถุนายน 2562

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ		
งวดที่ 1 (50%)	336,000 บาท	เมื่อวัน เดือน ปี 5 มกราคม 2560
งวดที่ 2 (40%)	268,800 บาท	เมื่อวัน เดือน ปี มิถุนายน 2560
งวดที่ 3 (10%)	67,200 บาท	เมื่อวัน เดือน ปี.....
รวม	672,000 บาท (หกแสนเจ็ดหมื่นสองพันบาทถ้วน)	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าตอบแทน	65,000	61,128.92	3871.08
2. ค่าจ้าง	126,000	126,000.00	0
3. ค่าวัสดุ	35,000	5,334.00	29,666.00
4. ค่าใช้สอย	378,800	412,337.08	-33,537.08
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ค่าธรรมเนียมร้อยละ 10	67,200	67,200.00	0
รวม	672,000	672,000.00	0

(.....)  
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นรินทร์รัตน์ คงจันทร์ตรี

## เอกสารอ้างอิง

- กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ร่วมกับ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยรามคำแหง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ตรัง และสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพฯ. (2548) รายงานการสำรวจและประเมินผลกระทบจากเหตุการณ์ธรณีพิบัติภัยต่อทรัพยากรชายฝั่งทะเลในทะเลอันดามัน. กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. หจก.เวิร์ลออฟเซ็ท.
- คณะกรรมการแก้ไขปัญหาผลกระทบของการฟอกขาวต่อสถานภาพปะการัง (2553) *สถานการณ์ปะการังฟอกขาวและแนวทางการแก้ไขปัญหา*. จดหมายอิเล็กทรอนิกส์. ทีมข่าวการศึกษา (2554, 20 มกราคม 2554) ด่วนปิดจุดดำน้ำใน 7 อุทยานตั้งพื้นฟูปะการังฟอกขาว. ไทยรัฐ
- ธนวัฒน์ จารุงษ์สกุล (2550) *โลกร้อนสุดขีด วิกฤตอนาคตประเทศไทย*. กรุงเทพฯ. ฐานบุ๊คส์. 258 หน้า.
- สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน (2554) *รายงานเบื้องต้นผลกระทบจากการเกิดปะการังฟอกขาว ปี 2553*. กลุ่มชีววิทยาและนิเวศวิทยาทางทะเลและชายฝั่ง. จดหมายอิเล็กทรอนิกส์.
- Anderson M.J., Gorley R.N., Clarke K.R. (2008). *Permanova for primer: guide to software and statistical methods*. PRIMER-E, Plymouth.
- Arif C., Daniels C., Bayer T., Banguera-Hinestroza E., Barbrook A., Howe C.J., LaJeunesse T.C. and Voolstra C.R. (2014) Assessing *Symbiodinium* diversity in scleractinian corals via next-generation sequencing-based genotyping of the ITS2 rDNA region. *Molecular Ecology* 23: 4418-4433
- Baird A.H., Guest J.R., Willis B.L. (2009). Systematic and biogeographical patterns in the reproductive biology of scleractinian corals. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40, 551-571.
- Baker A.C. (1999) *The symbiosis ecology of reef building corals*. PhD thesis. Univ. Miami. 120 pp.
- Baker A.C. (2003) Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 661-689
- Berkelmans R., van Oppen M.J.H. (2006). The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 273, 2305-2312.
- Blank R.J., Trench R.K. (1986) Nomenclature of endosymbiotic dinoflagellates. *Taxon* 35: 286-294.
- Buranapratheprat A., Yanagi T., Matsumura S. (2008) Seasonal variation in water column conditions in the upper Gulf of Thailand. *Cont. Shelf. Res.* 28 (17), 2509-2522.
- Buranapratheprat A., Luadnakrob P., Yanagi T., Morimoto A., Qiao F. (2016). The influences of the South China Sea and monsoonal winds on water column conditions in the Gulf of Thailand. *Cont. Shelf. Res.* 118, 100-110.

- Coffroth M.A., Santos S.R. (2005) Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist* 156: 19-34
- Cooper T.F., Lai M., Ulstrup K.E., Saunders S.M., Flematti G.R., Radford B., van Oppen J.H. (2011) *Symbiodinium* Genotypic and Environmental Controls on Lipids in Reef Building Corals. *PLoS ONE* 6(5): e20434.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020434>
- Fabricius K., Mieog J., Colin P., Idip D.H., Van Oppen M. (2004) Identity and diversity of coral endosymbionts (zooxanthellae) from three Palauan reefs with contrasting bleaching, temperature and shading histories. *Mol Ecol* 13(8): 2445-2458
- Ferrara G.B., Murgia B., Parodi A.M., Valisano L., Cerrano C., Plamisano G., Bavestrello G., Sara, M. (2006). The assessment of DNA from marine organisms via a modified salting-out protocol. *Cell Mol. Biol. Lett.* 11, 155-160.
- Ferrier-Pagès C., Hoogenboom M., Houlbrèque F. (2011). The role of plankton in coral trophodynamics, in: Dubinsky Z., Stambler N., (Eds.) *Coral Reefs: an ecosystem in transition*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 215-229.
- Gong S., Chai G., Xiao Y., Xu L., Yu K., Li J., Liu F., Cheng H., Zhang F., Liao B., Li Z. (2018). Flexible symbiotic associations of *Symbiodinium* with five typical coral species in tropical and subtropical reef regions of the Northern South China Sea. *Front. Micro. Biol.* 9, 2485.
- Guest J.R., Baird A.H., Maynard J.A., Muttaqin E., Edwards A.J., Campbell S.J., Yewdall K., Affendi Y.A., Chou L.M. (2012) Contrasting Patterns of Coral Bleaching Susceptibility in 2010 Suggest an Adaptive Response to Thermal Stress. *PLoS ONE* 7(3): e33353. doi:10.1371/journal.pone.0033353
- Guest J.R., Low J., Tun K., Wilson B., Ng C., Raingeard D., Ulstrup K.E., Tanzil J.T.I., Todd P.A., Toh T.C., McDougald D., Chou L.M., Steinberg P.D. (2016) Coral community response to bleaching on a highly disturbed reef. *Scientific Reports* 6:20717 | DOI: 10.1038/srep20717
- Guinotte J.M., Buddemeire R.W. and Kleypas J.A. (2003) Future coral reef habitat marginality: temporal and spatial effects of climate change in the Pacific basin. *Coral Reefs* 22: 551-558
- Heron S.F., Maynard J.A., van Hooidonk R., Eakin C.M. (2016) Warming trends and bleaching stress of the World's coral reefs 1985-2012. *Scientific Reports* 6:38402 | DOI: 10.1038/srep38402
- Hoegh-Guldberg O. (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and Freshwater Research* 50:839-866
- Hoegh-Guldberg O., Jones R.J., Ward S., Loh W.K. (2002) Is coral bleaching really adaptive? *Nature* 415:601-602



- Hoegh-Guldberg O., Mumby P.J., Hooten A.J., Steneck R.S., Greenfield P., Gomez E., Harvell C.D., Sale P.F., Edwards A.J., Caldeira K., Knowlton N., Eakin C.M., Iglesias-Prieto R., Muthiga N., Bradbury R.H., Dubi A., Hatzioelos M.E. (2007) Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 318:1737-1742
- Hoegh-Guldberg O. (2004). Closely related Symbiodinium spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284, 147-161.
- Howells E.J., Beltran V.H., Larsen N.W., Bay L.K., Willis B., Van Oppen M.J. (2012). Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nat. Clim. Change.* 2, 116-120.
- Hughes T.P., Baird A.H., Bellwood D.R., Card M., Connolly S.R., Folke C., Grosberg R., Hoegh-Guldberg O., Jackson J.B.C., Kleyplas J., Lough J.M., Marshall P., Nystorm M., Palumbi S.R., Pandolfi J.M., Rosen B., Roughgarden J. (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301(5635): 929-933
- Iglesias-Prieto R., Beltrán V.H., LaJeunesse T.C., Reyes-Bonilla H., Thomé P.E. (2004). Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 271, 1757-1763.
- Jokiel P.L., Coles S.L. (1999) Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs* 8: 155-162
- Jones A., Berkelmans R. (2010) Potential costs of acclimatization to a warmer climate: Growth of a reef coral with heat tolerant vs. sensitive symbiont types. *Plos One* 5(5) e10437
- Jones A., Berkelmans R., Van Oppen M.J.H., Mieog J., Sinclair W. (2008) A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proc R Soc B Biol Sci* 275: 1359-1365
- Keshavmurthy S., Meng P., Wang J., Kuo C, Yang S., Hsu C., Gan C, Dai C, Chen C.A. (2014). Can resistant coral-Symbiodinium associations enable coral communities to survive climate change? A study of a site exposed to long-term hot water input. *PeerJ* 2:e327 <https://doi.org/10.17717/peerj.327>.
- Kleypas J.A, Hoegh-Guldberg O. (2008) Coral Reefs and Climate Change: Susceptibility and Consequences. In Wilkinson C., Souter D. (2008) *Status of Caribbean coral reefs after bleaching and hurricanes in 2005*. Global Coral Reef Monitoring Network, and Reef and Rainforest Research Centre, Townsville, 152 p.
- Kleypas J.A., McManus J.W. Menez L.A.B. (1999). Environmental limits to coral Reef Development: Where do we draw the line? *Amer. Zool.* 39, 146-159.
- Kuanui P., Chavanich S., Viyakarn V., Omori M., Lin C. (2015). Effects of temperature and salinity on survival rate of cultured coral and photosynthetic efficiency of zooxanthellae in coral tissue. *Ocean. Sci. J.* 50(2), 263-268.

- LaJeunesse T.C. (2001) Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a “species” level marker. *Journal of Phycology* 37: 866-880
- LaJeunesse T. (2002) Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology* 141: 387-400
- LaJeunesse T.C., Trench R.K. (2000). Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissimi* (Brandt). *Biol. Bull.* 199, 126-134.
- LaJeunesse T.C., Loh W.K.W., Woesik R.V., Hoegh-Guldberg O., Schmidt G.W., Fitt W.K. (2003) Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals relative to those of the Caribbean. *Limnol. Oceanogr.* 48: 2046-2054.
- LaJeunesse T.C., Reyes Bonilla H., Warner M.E., Willis M., Schmidt G.W., Fitt W.K. (2008) Specificity and stability in high latitude eastern Pacific coral-algal symbioses. *Limnol. Oceanogr.* 52: 719-727
- LaJeunesse T.C., Wham D.C., Pettay D.T., Parkinson J.E., Keshavmurthy S., Chen C.A. (2014). Ecologically differentiated stress-tolerant endosymbionts in the dinoflagellate genus *Symbiodinium* (Dinophyceae) Clade D are different species. *Phycologia* 53(4): 305-319.
- LaJeunesse T.C., Parkinson J.E., Gabrielson P.W., Jeong H.J., Reimer J.D., Voolstra C.R., Santos S.R. (2018). Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Curr. Biol.* 28(16), 2570-2580. e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.008>.
- LaJeunesse T.C., Bhagooli R., Hidaka M., deVantier L., Done T., Schmidt G.W., Fitt W.K., Hoegh-Guldberg O. (2004). Closely related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. *Mar Ecol Prog Ser* 284: 147-161.
- LaJeunesse, T.C., Pettay, D.T., Sampayo, E.M, Phongsuwan, N., Brown, B., Obura, D., Hoegh-Guldberg, O., and Fitt, W.K. (2010a) Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host-symbiont specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *Journal of Biogeography*, doi:10.1111/j.1365-2699.2010.02273.x
- LaJeunesse T.C., Smith R., Walther M., Pinzón J., Pettay D.T., McGinley M., Aschaffenburg M., Medina-Rosas P., Cupul-Magaña A.L., Pérez A.L., Reyes-Bonilla H., Warner, M.E. (2010b). Host-symbiont recombination versus natural selection in the response of coral-dinoflagellate symbioses to environmental disturbance. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 277, 2925-2934.

- Lien Y., Keshavmurthy S., Nakano Y., Plathong S., Huang H., Hsu C., Fukami H., Yamashita Y., Hsieh H.J., Wang J., Chen C.A. (2013) Host genetics and *Symbiodinium* D diversity in a stress-tolerant scleractinian coral, *Oulastrea crispata*, in the West Pacific. *Mar Ecol Prog Ser* 473:163-177.
- McArdle B.H., Anderson M.J. (2001). Fitting multivariate models to community data: A comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 82, 290-297.
- Mieog J.C., Oppen M.J.H., Cantin N.E, Stam W.T., Olsen J.L. (2007) Real-time PCR reveals a high incidence of *Symbiodinium* clade D at low levels in four scleractinian corals across the Great Barrier Reef: implications for symbiont shuffling. *Coral Reefs* 26: 449-457
- Mieog J.C., Olsen J.L., Berkelmans R., Bleuler-Martinez S.A., Willis B., van Oppen M.J.H. (2009). The roles and interactions of symbiont, host and environment in defining coral fitness. *PLOS ONE* 4(8), 10.1371/annotation/e06b31ef-6b29-44ae-aec1-1740daa93f4b. <https://doi.org/10.1371/annotation/e06b31ef-6b29-44ae-aec1-1740daa93f4b>.
- Oliver T., Palumbi S. (2011) Many corals host thermally resistant symbionts in high-temperature habitat. *Coral Reefs* 30(1): 241-250
- Panithanarak T. (2015) Effects of the 2010 coral bleaching on phylogenetic clades and diversity of zooxanthellae (*Symbiodinium* spp.) in soft corals of the genus *Sinularia*. *Plankton Benthos Res* 10(1): 11-17.
- Pettay D.T. (2011). *Diversity, Stability and connectivity of Symbiodinium populations at various spatial scales*. Doctoral dissertation. The Pennsylvania State University. 188 pp.
- Pettay D.T., Wham D.C. Pinzón J.H., LaJeunesse T.C. (2011). Genotypic diversity and spatial-temporal distribution of *Symbiodinium* clones in an abundant reef coral. *Mol. Ecol.* 20(24), 5197-212.
- Rodriguez-Lanetty M., Loh W., Carter D., Hoegh-Guldberg O. (2001) Latitudinal variability in symbiont specificity within the widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora*. *Marine Biology* 138: 1175-1181
- Rowan R. (1998) Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *J. Phycol.* 34: 407-417
- Rowan R. (2004) Coral bleaching: thermal adaptation in reef coral symbionts. *Nature* 430: 742
- Rowan R., Powers D.A. (1991) A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science* 251:1348-1351
- Rowan R., Knowlton N., Baker A.C., Jara J. (1997) Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature* 388: 265-269
- Sampayo E.M., Franceschinis L., Hoegh-Guldberg O., Dove S. (2007) Niche partitioning of closely related symbiotic dinoflagellates. *Molecular Ecology* 16: 3721-3733

- Santos S.R., Taylor D.J., Kinzie R.A., Hidaka M., Sakai K., Coffroth M.A. (2002) Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 23: 97-111
- Schoenberg D.A., Trench R.K. (1980) Genetic-variation in *Symbiodinium* (=Gymnodinium) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. II. Morphological variation in *Symbiodinium microadriaticum*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 207: 429-444
- Seutin G., White B.N., Boag P.T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82-90
- Silverstein N., Correa A.M.S., Baker A.C. (2012) Specificity is rarely absolute in coral algal symbiosis: implications for coral response to climate change. *Proc. R. Soc. B.* doi:10.1098/rspb.2012.0055
- Stat M., Gates R.D. (2011). Clade D *Symbiodinium* in Scleractinian Corals: A “Nugget” of Hope, a Selfish Opportunist, an Ominous Sign, or All of the Above? *J. of Mar. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1155/2011/730715>
- Stat M., Loh W.K.W., Hoegh-Guldberg O., Carter D.A. (2008). Symbiont acquisition strategy drives host-symbiont associations in the southern Great Barrier Reef. *Coral Reefs* 27, 763-772.
- Stat M., Yost D.M., Gates R.D. (2015). Geographic structure and host specificity shape the community composition of symbiotic dinoflagellates in corals from the Northwestern Hawaiian Islands. *Coral Reefs* 34, 1075-1086.
- Sutthacheep M., Yucharoen M., Klinthong W., Pengsakun S., Sangmanee K., Yeemin T. (2012). Coral mortality following the 2010 mass bleaching event at Kut Island, Thailand. *Phuket. Mar. Biol. Cent. Res. Bull.* 71,83-92.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tanzil I., Thuaibah J., Abigayle N., Yi Qing T., Beverly T., Yun E., Huang D. (2016). A preliminary characterisation of *Symbiodinium* diversity in some common corals from Singapore. *COSMOS* 12, 15-27.
- Thomas L., Kendrick G.A., Kennington W.J., Richard Z.T., Stat M. (2014) Exploring *Symbiodinium* biodiversity and host specificity in *Acropora* corals from geographical extremes of Western Australia with 454 amplicon pyrosequencing. *Molecular Ecology*, 23: 3113-3126
- Thornhill D.J., Kemp D.W., Sampayo E.M., Schmidt G.W. (2010) Comparative analyses of amplicon migration behavior in differing denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) systems. *Coral Reefs* 29: 83-91

- Thornhill D.J., Kemp D.W., Bruns B.U., Fitt W.K.W., Schmidt G.W. (2008) Correspondence between cold tolerance and temperate biogeography in a Western Atlantic *Symbiodinium* (Dinophyta) lineage. *J. Phycol.* 44: 1126-1135
- Thornhill D.J., LaJeunesse T.C., Kemp D.W., Fitt W.K., Schmidt G.W. (2006) Multi-year, seasonal genotypic surveys of coral-algal symbioses reveal prevalent stability or post-bleaching reversion. *Marine Biology* 148: 71-722
- Tonk L., Sampayo E.M., Weeks S., Magno-Canto M., Hoegh-Guldberg O. (2013). Host-specific interaction with environmental factors shape the distribution of *Symbiodinium* across the Great Barrier Reef. *PLoS ONE* 8(7): e68533. doi:10.1371/journal.pone.0068533
- van Oppen M.J.H. (2004). Mode of zooxanthella transmission does not affect zooxanthella diversity in acroporid corals. *Mar. Biol.* 144, 1-7.
- Wattayakorn G., (2006). Environmental Issues in the Gulf of Thailand, in: Wolanski E., (Ed.), *The Environment in Asia Pacific Harbours*. Springer, Netherlands, pp. 249-259.
- Weis V.M. (2010) The susceptibility and resilience of corals to thermal stress: adaptation, acclimatization or both? *Molecular Ecology* 19: 1515-1517
- Wham D.C., Ning G., LaJeunesse T.C. (2017). *Symbiodinium glynnii* sp. nov., a species of stress-tolerant symbiotic dinoflagellates from pocilloporid and montiporid corals in the Pacific Ocean. *Phycologia* 56(4), 396-409.
- Wong C.Y., Thompson P., James Y.X., Qiu J.W., Baker D.M. (2016). *Symbiodinium* clade C generality among common scleractinian corals in subtropical Hong Kong. *Reg. Stud. in Mar. Sci.* 8, 439-444.
- Yamashita Y., Hsieh H.J., Wang J., Chen A.C. (2013). Host genetics and *Symbiodinium* D diversity in a stress-tolerant scleractinian coral, *Oulastrea crispata*, in the West Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 473, 163-177. <https://doi.org/10.3354/meps10041>
- Zhang H., Bhattacharya D., Lin S. (2005). Phylogeny of dinoflagellates based on mitochondrial cytochrome b and nuclear small subunit rDNA sequence comparisons. *J. Phycol.* 41, 411-420.
- Ziegler M., Arif C., Burt J.A., Dobretsov S., Roder C., LaJeunesse T.C., Voolstra C.R. (2017). Biogeography and molecular diversity of coral symbionts in the genus *Symbiodinium* around the Arabian Peninsula. *J. Biogeogr.* 44(3), 674-686.
- Ziegler M., Roder C., Büchel C., Voolstra C.R. (2015). Niche acclimatization in Red Sea corals is dependent on flexibility of host-symbiont association. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 533, 149-161.

## ภาคผนวก ก

บทความวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในฐานข้อมูล Scopus จำนวน 1 เรื่อง

Chankong A, Kongjandtre N, Senanan W and Manthachitra M (2018) Genetic Diversity of Symbiodiniaceae Associated with *Porites lutea* and *Pocillopora damicornis* in the Gulf of Thailand Inferred from Nucleotide Sequences of Internal Transcribed Spacer-2. *Journal of Fisheries and Environment*, 42 (3): 66-79

## Genetic Diversity of Symbiodiniaceae Associated with *Porites lutea* and *Pocillopora damicornis* in the Gulf of Thailand Inferred from Nucleotide Sequences of Internal Transcribed Spacer-2

Anchalee Chankong<sup>1,2,\*</sup>, Narinratana Kongjandtre<sup>1</sup>, Wansuk Senanan<sup>1</sup> and Vipoosit Manthachitra<sup>1</sup>

### ABSTRACT

Understanding the variation in symbiotic algae-coral associations can provide insights about how corals respond to environmental changes. We examined community composition of family Symbiodiniaceae in two scleractinian coral hosts, *Porites lutea* and *Pocillopora damicornis* at nine sites (n = 4-5 colonies/species/site) in the Gulf of Thailand (GoT). Species in the family Symbiodiniaceae were resolved from denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and identified based on Internal Transcribed Spacer-2 (ITS2) DNA sequences. We observed five ITS2 haplotypes including those contained within *Cladocopium goreaui* (C1), *Cladocopium* spp. (C15, C15.7), *Durusdinium glynnii* (D1) and *D. glynnii* (D6). *Cladocopium* sp. (C15) was abundant and prevalent in *Por. lutea*. *D. glynnii* (D1) was prevalent in *Poc. damicornis*. PERMANOVA revealed the effects of host species and site interactions on Symbiodiniaceae communities. The sampling sites contributed to the variation in Symbiodiniaceae species composition in *Poc. damicornis* ( $P < 0.01$ ), but not in *Por. lutea*. Cluster analysis suggested three groups: (1) *Por. lutea* (dominated by *Cladocopium* sp. (C15)), (2) *Poc. damicornis* (dominated by *D. glynnii* (D1)) and (3) a minor group consisting of *Poc. damicornis* from SM with *D. glynnii* (D6). *D. glynnii* (D1) is likely to be widely distributed in the GoT while other is restricted in particular habitats. Despite multiple bleaching events in the GoT, our results suggest the persistence of spatial variation of Symbiodiniaceae communities, and thus stress the importance of local adaptation of coral-symbiont partnerships.

**Keywords:** Coral, DGGE, Gulf of Thailand, ITS2, Symbiodiniaceae, Zooxanthellae

### INTRODUCTION

The Gulf of Thailand (GoT), locates between 5° 00' and 13° 30' N and 99° 00' and 106° 00' E, is a semi-enclosed, shallow coastal basin situated on the northwestern part of the Sunda Shelf, and measuring approximately 400 km by 800 km. The gulf can be considered as the inner and lower GoT, divided by a line drawn from the most southern tip of Chonburi Province (Sattahip District) to Hua

Hin District, Prachuap Khiri Khan Province. Due to the enclosed nature of the inner GoT (surrounded by land in the north, east and west), strong influence from major rivers and unique sea surface circulation (Buranapratheprat *et al.*, 2008), several islands in the inner GoT harbor a high diversity of scleractinian corals, and the most inner island, Sichang Island, hosts a unique coral community. The eastern part of the inner gulf contains reefs developed along the coastline and near islands in Pattaya and Sattahip,

<sup>1</sup> Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand

<sup>2</sup> Marine and Coastal Resources Research and Development Center, Eastern Gulf of Thailand, Department of Marine and Coastal Resources, Rayong, Thailand

\* Corresponding author, e-mail address: anchankong@yahoo.com ; Tel.: +66-86365-9528

Received 17 July 2018 / Accepted 16 November 2018

Chonburi Province and further along the east coast from Rayong to Trat. Along the west coast of the lower Gulf, a few islands are surrounded by fringing reefs in Prachuap Khiri Khan and Chumphon provinces, and with Losin Island (Pattani Province) being the furthest south (Sudara and Yeemin, 1997; Phongsuwan *et al.*, 2013).

Coral reefs in the GoT have been threatened historically by natural and human disturbances, and the pressure is alarming in the present. In the past two decades, coral reefs in the GoT, especially in inshore areas, have experienced at least five mass bleaching events, with mild bleaching in 2003, 2005 and 2008, and severe events in 1998 and 2010 (Sutthacheep *et al.*, 2012). Prior to the 1998 bleaching event, reef communities were dominated by *Porites* and *Acropora*, and *Pocillopora* was common, but afterwards, mature colonies of *Acropora* were almost wiped out from the GoT (Boonprakob and Chankong, 2000). *Acropora* and *Pocillopora* were most vulnerable, and 70-90% died, while massive corals such as *Porites* and faviids were less impacted. During the 2010 coral bleaching event, 30-90% of live corals died and previously healthy reefs became deteriorated. However, branching colonies of *Acropora* appeared to resist the 2010 bleaching. In this case the more vulnerable coral taxa were *Porites lutea* and faviids; additionally, *Pocillopora* disappeared from many reefs in the GoT (Sutthacheep *et al.*, 2012). Several factors may have contributed to this changing resilience among coral communities in the GoT, including coral-symbiont associations, adaptation to high turbidity and the heterotrophic feeding ability of corals.

The composition of symbiotic zooxanthellae in coral colonies depends on geographical and environmental conditions, as well as host species. In their recent systematic revision of the formerly known genus *Symbiodinium*, LaJeunesse *et al.* (2018) described *Symbiodinium* "clades" as being equivalent to genera in the family Symbiodiniaceae, and some new species were described (previously recognized as subclades). For example, a common C1 type has been revised to '*Cladocopium goreau*', and D1 and D1-4-6 to '*Durusdinium glynnii*' (LaJeunesse *et al.* 2010, LaJeunesse and Thornhill,

2011, Wham *et al.*, 2017). Our preliminary results indicated six ITS2 haplotypes (i.e. *C. goreau* (C1), *Cladocopium* spp. (C3u, C15, C15.7), *D. glynnii* (D1) and *D. glynnii* (D6)) from four scleractinian corals, including *Porites lutea*, *Platygyra daedalea*, *Pavona decussata* and *Pocillopora damicornis* in the eastern GoT. The diversity of *Durusdinium* spp. (two haplotypes) was less than that of *Cladocopium* spp. (four haplotypes) (Chankong, 2018). Due to changing vulnerability of coral hosts to coral bleaching, in this study we are interested in the association of Symbiodiniaceae in brooder species with branching colony growth form (*Poc. damicornis*) and broadcast spawners with massive growth form (*Por. lutea*) along the reefs in the GoT. We tested the effects of location (inshore-offshore), site and host species on the Symbiodiniaceae community composition within *Poc. damicornis* and *Por. lutea*. Insights from the study will benefit coral rehabilitation programs after future coral bleaching events.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area and sample collection

During 2016-2017, we collected coral tissue samples by SCUBA diving on reefs from a depth range between 3-19 m at nine locations in GoT (Figure 1). These locations represented inshore (1.5-8 km from shore) and offshore (15-80 km from shore) areas (Table 1). Distance from shore was associated with water turbidity levels, with inshore areas being more turbid than those offshore. Five inshore sites included Sichang Island, Chonburi Province (SC), Samaesan Island, Chonburi (SS), Samet Island, Rayong (SM), Kudsee Island, Rayong (KD) and Khai Island, Chumphon (KH) and four offshore sites were Hin Ploeng Pinnacle, Rayong (HP), Rankai Island, Chumphon (RK), Kra Island, Nakhon Sri Thammarat (KR) and Losin Island, Pattani (LS). Characteristics of coral communities and their dominant species varied among sites, except for *Porites* being prevalent across all sites. Corals at these sites have experienced various degrees of coral bleaching in the past 20 years. Coral tissues were sampled from a total of 89 coral



colonies, belonging to a broadcast spawner species (*Por. lutea*, n = 5 colonies/location) and a brooder species (*Poc. damicornis*, n = 4-5 colonies/site). Tissue biopsies were preserved in 95% ethanol for further analysis.

#### Genomic DNA extraction of Symbiodiniaceae

Coral tissue and calcium skeletons were ground and processed for DNA extraction following

a modified salting-out method (Ferrara *et al.*, 2006). Approximately 500 mg of each sample was incubated in 1 mL of lysis buffer solution (SDS 20%, EDTA 5 mM, Tris-HCl 10 mM) with 0.1  $\mu$ L of proteinase K (10  $\mu$ L/mL) for 3 h at 56°C to lyse coral and symbiont cells. Proteins were precipitated in saturated  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (6.1 M), with 1 mL added for each 4 mL of lysate. Samples were then centrifuged at 10,000 g for 20 min, and the supernatant was transferred to a new tube. Two volumes of 99%



Figure 1. Locations of coral and Symbiodiniaceae collections in the inner Gulf of Thailand (Sichang, Samaesan), eastern Gulf of Thailand (Samet, Kudae, Hin Ploeng) and western Gulf of Thailand (Rankai, Khai, Kra and Losin).

Table 1. Environmental and coral community characteristics of nine sampling locations in the Gulf of Thailand surveyed in 2016–2017.

Inshore/ Offshore	Location	Distance from shore (km)	Depth (m)	Turbidity level (m-FTU)	Coral reef area (km <sup>2</sup> ) (Number of coral species)	Dominant corals	% coral colonies bleached in 2010
Inshore	1. Sichang Is. (SC) Chonburi Province	8	4-6	1.68	0.0912 (10-15)	<i>Porites, Pavona,</i> <i>faviids</i>	5 - 10
	2. Samaesan Is. (SS) Chonburi Province	2	3-6	1.04	0.5424 (15-20)	<i>Porites, Pavona,</i> <i>faviids, Pocillopora</i>	30 - 50
	3. Samet Is. (SM) Rayong Province	3	3-5	1.60	1.1904 (25-30)	<i>Porites, Pavona,</i> <i>faviids, Acropora</i>	50 - 70
	4. Kudae Is. (KD) Rayong Province	4	4-6	0.78	0.224 (25-30)	<i>Porites, Pavona,</i> <i>faviids, Acropora</i>	50 - 70
	5. Khai Is. (KH) Chumphon Province	3	4-6	0.47	0.1824 (20-25)	<i>Porites, Pavona,</i> <i>faviids, Acropora</i>	10 - 30
Offshore	6. Hin Ploeng (HP) Rayong Province	25	10-13	0.92	0.016 (20-25)	<i>Porites, Pavona,</i> <i>faviids, Pocillopora</i>	5 - 10
	7. Rankai Is. (RK) Chumphon Province	15	3-5	0.37	0.0096 (20-25)	<i>Porites, Pavona,</i> <i>faviids, Pocillopora</i>	10 - 30
	8. Kra Is. (KR) Nakhon Sri Thammarat Province	53	5-10	0.35	0.6592 (15-20)	<i>Acropora, faviids,</i> <i>Porites</i>	30 - 50
	9. Losin Is. (LS) Pattani Province	80	16-19	0.34	0.072 (15-20)	<i>Acropora, faviids,</i> <i>Porites</i>	10 - 30

cold ethanol were added to each supernatant sample to precipitate the total genomic DNA. The samples were then incubated at -20°C for 30 min and then centrifuged at 12,000 g for 30 min. The solution was discarded and DNA pellets were allowed to dry for 15 min, then resuspended in 50-100 µL of sterile distilled water. DNA quantity and quality was checked by electrophoresis on a 1.5% agarose gel in 1xTBE buffer.

#### PCR amplification and DGGE analysis

We inferred the Symbiodinium OTUs from the ITS2 nucleotide sequences, obtained from community DNA profiles on polyacrylamide denaturing gradient gels (LaJeunesse and Trench 2000). The ITS2 region was amplified using the primers ITSintf2 (5'GAATTGCAGAACTCCG TG-3') and ITS2CLAMP (5'CGCCCGCCGCGC

CCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGG GATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') in polymerase chain reactions (PCR) (LaJeunesse and Trench, 2000). Each reaction (20 µl) contained 1 µL of template DNA, 1 x PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 and 0.4 µM of forward and reverse primers, respectively, and 1 unit of *Taq* polymerase (5 U•µL<sup>-1</sup>, Vivantis, Malaysia). To maximize the amplification of Symbiodiniaceae within coral colonies, we employed the touchdown temperature profile where annealing temperature was decreased or increased at a consistent rate (0.5°C per cycle in our case, LaJeunesse and Trench 2000). The temperature profile consisted of a DNA denaturing step at 92°C for 3 min, followed by 20 cycles of 92°C for 30 s, then 62°C-52°C for 40 s (i.e., a touchdown step), and finally 72°C for 30 s and 15 cycles of 92°C for 30 s, 52°C for 40 s, 72°C for 30 s and ending with an extension step at 72°C for 5 min.

The ITS2 fingerprint of the Symbiodiniaceae community in each coral colony was resolved using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE, 8% polyacrylamide gels with a 45-80% gradient of urea and formamide - 3.2 to 5.6 M urea and 18% to 32% formamide) (VS20WAVE-DGGE, Cleaver Scientific, Ltd, Warwickshire, United Kingdom) for 14 - 15 h at 110 V at a constant temperature of 65°C. For visualization, gels were stained with 1 x SYBR Gold (Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA) for 10 min.

Prominent bands of representative ITS2-DGGE fingerprints were excised, eluted overnight in distilled water, and re-amplified using the ITS for 2 and the reverse primer without the GC-rich clamp (ITSrev), using PCR ingredients and a temperature profile similar to the original PCR conditions (annealing temperature of 52°C), excluding the touchdown step. The PCR products were then purified using a commercial column-based purification kit (GF1-AmbiClean, Vivantis, Malaysia) and submitted for sequencing (ABI 3130xl, 1<sup>st</sup> Base Inc., Malaysia). The sequences of diagnostic bands and the accompanying ITS2-DGGE fingerprints were aligned; the remaining fingerprints were inferred from the diagnostic bands. All nucleotide sequences were checked and edited manually using Sequence Scanner v.1 (Applied Biosystems, USA) and contiged with CAP3, a sequence assembly program (Huang and Madan, 1999). To identify species of family Symbiodiniaceae, the sequences were aligned with existing sequences available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) database, a custom ITS2 BLAST database (Arif *et al.*, 2014) and the SymbioGBR database (<http://www.symbioGBR.org>) (Tonk *et al.*, 2013), using the nucleotide basic local alignment search tool (BLASTn).

To generate a phylogenetic matrix, alignments were performed using MEGA7 software. The length of the sequences used in the analysis was 282 bp. Based on the maximum likelihood approach implemented in MEGA 7, the best-fit nucleotide substitution model was Kimura 2-parameter (lowest Bayesian Information Criterion score). All positions containing gaps and missing data were

eliminated. Maximum likelihood phylogenetic trees of the ITS2-DGGE sequences were constructed using the maximum likelihood (mL) approach based on Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980) with 1,000 replicates to generate a supporting value for each node (MEGA7 software, Kumar *et al.*, 2016). Clade A was used as an outgroup (accession no. MH211593.1).

#### Statistical analysis

All statistical analyses of Symbiodiniaceae community composition were performed using the software package PRIMER 6 (Clarke and Gorley, 2006) with PERMANOVA+ (Anderson *et al.*, 2008) (Multivariate statistics were executed with the software PRIMER v6 and the add-on software). All analyses used a Bray-Curtis similarity matrix, based on presence/absence data for Symbiodiniaceae assemblages. We evaluated global effects of location (inshore-offshore), site, and host species on Symbiodiniaceae assemblage using a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) (Anderson *et al.*, 2008). Post-hoc pairwise tests were also performed and *P* values were generated by 1,000 permutations. To test for host specificity, we performed a one-way analysis of similarity (ANOSIM) of Symbiodiniaceae assemblages between the two host species and performed similarity percentage analysis (SIMPER) to identify the species contributing to the composition differences. An unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram was also generated to reveal the clustering pattern of *Symbiodinium* assemblages by host coral species, and the SIMPROF test was conducted to determine statistical significance of the dendrogram nodes.

## RESULTS

### Phylogenetic relationships

We recovered 52 Symbiodiniaceae ITS2 sequences obtained from 45 *Por. lutea* colonies and 44 *Poc. damicornis* colonies. All Symbiodiniaceae sequences were assigned to genus *Cladocopium* (3 DGGE profiles: 1 profile of C1, 1 profile of

C15, 1 profile of C15.7) and genus *Durusdinium* (2 DGGE profiles: 1 profile of D1 and 1 profile of D6) (Table 2). Phylogenetic analysis of family Symbiodiniaceae, inferred from ITS2 sequences (271-283 bp, variation 57.45%), revealed that prominent genera *Cladocopium* and *Durusdinium* were genetically distinct (bootstrap values = 99, Figure 2). Genus *Cladocopium* formed a monophyletic group consisting of three haplotypes namely *C. goreaui* (C1), *Cladocopium* sp. (C15) and *Cladocopium* sp. (C15.7). All haplotypes are associated with *Por. lutea*, *Cladocopium* spp. (C15 and C15.7) haplotypes formed closely related

group (bootstrap value = 98) while *C. goreaui* (C1) is separated. Genus *Durusdinium* consisted of four haplotypes: *D. glynnii* (D1, D1v1 (a novel *D. glynnii* (D1) variant 1, 1 bp different form ITS2 type of *D. glynnii* (D1)), D1v2 (a novel *D. glynnii* (D1) variant 2, 1 bp different form ITS2 type of *D. glynnii* (D1)) and *D. glynnii* (D6). All haplotypes associated with *Poc. damicornis*, which *D. glynnii* (D1) and D1v1 formed a monophyletic group (bootstrap value = 100). *D. glynnii* (D1v2) and *D. glynnii* (D6) were more genetically similar to each other than to *D. glynnii* (D1) (bootstrap value = 53).

Table 2. GenBank accession number for Symbiodiniaceae ITS2 haplotypes.

Symbiodiniaceae ITS2 haplotype	GenBank accession number	Custom database (Arif et al., 2014)
<i>Cladocopium goreaui</i> (C1)	AF333515	lc:Query_46063
<i>Cladocopium</i> sp. (C15)	AY236639	lc:Query_239713
<i>Cladocopium</i> sp. (C15.7)	HE579015.1	lc:Query_10097
<i>Durusdinium glynnii</i> (D1)	EU449061	lc:Query_239913
<i>Durusdinium glynnii</i> (D6)	EU812742	lc:Query_40547

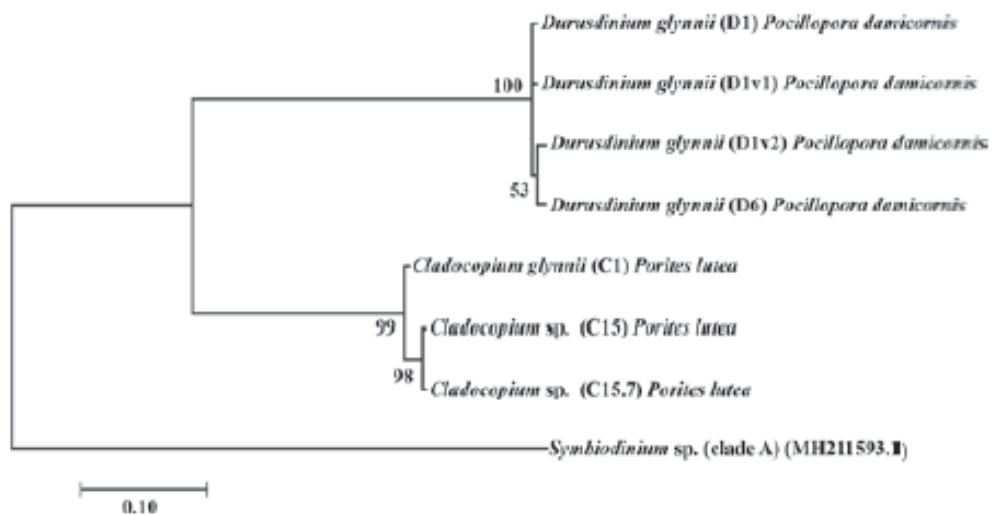


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree of unique Symbiodiniaceae ITS2 sequences (Kimura 2-parameter model) in *Por. lutea* and *Poc. damicornis* in the Gulf of Thailand. Branch labels indicate bootstrap values (1,000 replicates).

### Diversity of Symbiodiniaceae in corals in the Gulf of Thailand

*Cladocopium* and *Durusdinium* were found in similar proportions in the assemblages, 48.4% and 51.6%, respectively (Table 3). We detected five ITS2 haplotypes of dominant Symbiodiniaceae species, including *C. goreaui*, *Cladocopium* (C15, C15.7), *D. glynnii* (D1) and *D. glynnii* (D6) (Figure 3). Colonies typically contained a single species, with a few rare cases having two species (i.e., three colonies of *Por. lutea* and one colony of *Poc. damicornis* at SC and SS, Chonburi Province and SM, Rayong Province). The number of Symbiodiniaceae species

observed in *Por. lutea* (at least 3 species) was higher than in *Poc. damicornis* (1 species). *Cladocopium* sp. (C15) was prevalent in *Por. lutea* populations, while *D. glynnii* (D1) was prevalent in *Poc. damicornis* populations.

Overall, every Symbiodiniaceae species observed in this study was found at least one of the inshore sites, while at the offshore sites only *Cladocopium* sp. (C15) (in *Por. lutea*) and *D. glynnii* (D1) (in *Poc. damicornis*) were recorded (Table 3, Figure 4). However, the spatial pattern of Symbiodiniaceae species distribution differed between the two coral host species.

Table 3. Occurrence of Symbiodiniaceae ITS2 haplotypes and DGGE profiles in coral hosts (expressed as the number of colonies) from five inshore sites and four offshore sites in the Gulf of Thailand.

Location (Inshore/ Offshore)	Sites	Coral species	C1	C15	C15.7	D1	D6	Total DGGE profiles
Inshore	Sichang Is. (SC)	<i>Porites lutea</i>	1	5	-	-	1	3
		<i>Pocillopora damicornis</i>	-	-	-	4	-	1
	Samaesan Is. (SS)	<i>Porites lutea</i>	-	5	-	-	-	1
		<i>Pocillopora damicornis</i>	-	-	-	4	1	2
	Samet Is. (SM)	<i>Porites lutea</i>	-	3	1	2	-	3
		<i>Pocillopora damicornis</i>	-	-	-	-	5	1
	Kudee Is. (KD)	<i>Porites lutea</i>	-	5	-	-	-	1
		<i>Pocillopora damicornis</i>	-	-	-	5	-	1
	Khai Is. (KH)	<i>Porites lutea</i>	-	5	-	-	-	1
		<i>Pocillopora damicornis</i>	-	-	-	5	-	1
Offshore	Hin Ploeng (HP)	<i>Porites lutea</i>	-	5	-	-	-	1
		<i>Pocillopora damicornis</i>	-	-	-	5	-	1
	Rankai Is. (RK)	<i>Porites lutea</i>	-	5	-	-	-	1
		<i>Pocillopora damicornis</i>	-	-	-	5	-	1
	Kra Is. (KR)	<i>Porites lutea</i>	-	5	-	-	-	1
		<i>Pocillopora damicornis</i>	-	-	-	5	-	1
	Losin Is. (LS)	<i>Porites lutea</i>	-	5	-	-	-	1
		<i>Pocillopora damicornis</i>	-	-	-	5	-	1

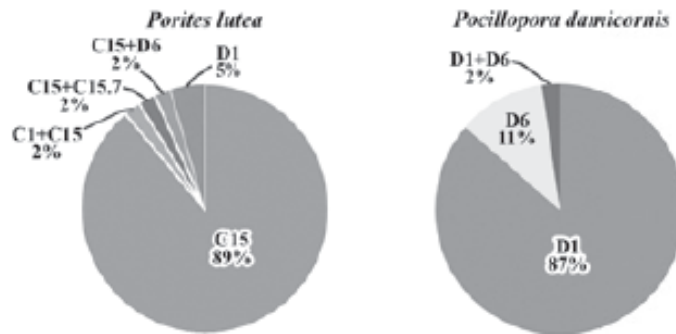


Figure 3. Percentage of occurrence of Symbiodiniaceae communities in *Porites lutea* (n=45 colonies) and *Pocillopora damicornis* (n=44 colonies) from five inshore sites and four offshore sites in the Gulf of Thailand (Refer to the text for Symbiodiniaceae species names).

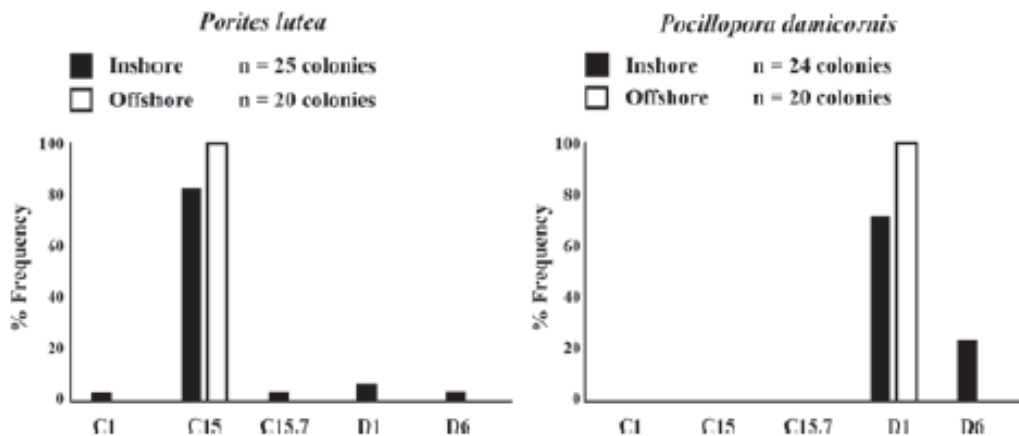


Figure 4. Frequency of occurrence of Symbiodiniaceae ITS2 haplotypes observed in *Por. lutea* and *Poc. damicornis* at inshore and offshore sites in the Gulf of Thailand.

PERMANOVA suggested that the Symbiodiniaceae assemblages were highly structured by host species and site ( $P=0.005$ ). Symbiodiniaceae species compositions in *Por. lutea* and *Poc. damicornis* were significantly different in four pairs of sites (SS-SM, SC-SM at  $P \leq 0.05$ ; SM-KD, SM-KH at  $P \leq 0.01$ ). We also observed highly significant interactions between site and host species ( $P=0.005$ ). The Symbiodiniaceae species compositions in *Poc. damicornis* differed among sites (SS-SM, SC-SM, SM-KD and SM-KH at

$P \leq 0.05$ ). However, we did not observe the same pattern in the Symbiodiniaceae communities in *Por. lutea*. The pairwise tests suggested no significant differences in Symbiodiniaceae species composition in *Por. lutea* among sites.

Global ANOSIM tests showed that the Symbiodiniaceae species association with coral species was significant ( $R = 0.789$ ,  $P = 0.001$ ), indicating host specificity. SIMPER analysis revealed that the proportions of *Cladopodium* sp.

(C15) and *D. glynnii* (D1) or their combinations contributed to a distinctive composition in each coral species. *Por. lutea* was mainly associated with *Cladopodium* sp. (C15) and *Poc. damicornis* was associated with *D. glynnii* (D1). The UPGMA dendrogram revealed a consistent clustering pattern with each coral species harboring a distinctive Symbiodiniaceae species composition (Figure 5). The dendrogram provided additional

insights into host species and site interactions. At 65% similarity, the dendrogram suggested three main clusters, with one major cluster containing mostly *Por. lutea* and another containing *Poc. damicornis*, and a small but quite unique cluster of *Poc. damicornis* with D6 from SM. In addition, we found some coral specimens (from SS, SC and SM) that contained more than one species of Symbiodiniaceae.

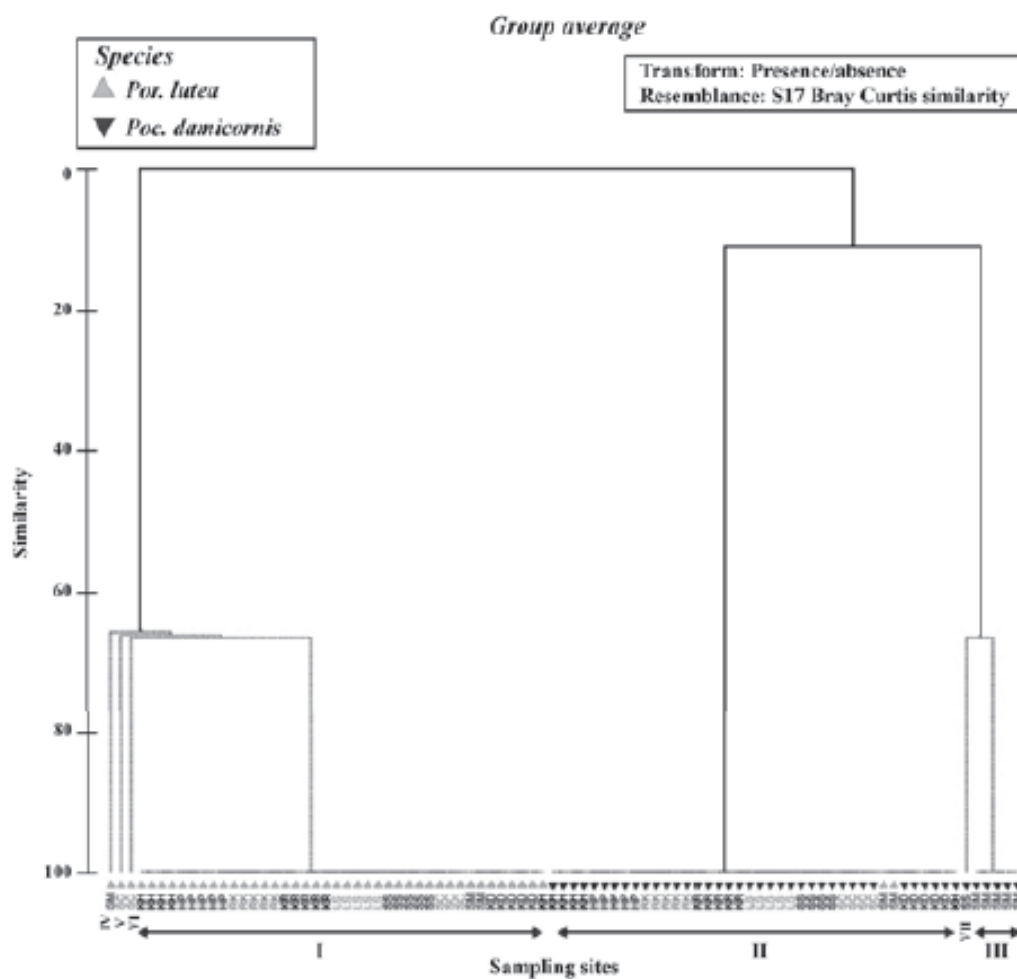


Figure 4. UPGMA dendrogram based on Bray-Curtis similarity of Symbiodiniaceae species composition in *Por. lutea* and *Poc. damicornis* from the Gulf of Thailand. Red line indicates significant groupings ( $P < 0.05$ ) based on the SIMPROF test. Labels for nine sampling sites are SC, Sichang Is.; SS, Samaesan Is.; SM, Samet Is.; KD, Kudee Is.; HP, Hin Ploeng Pinnacle; KH, Khai Is.; RK, Rankai Is.; KR, Kra Is. and LS, Losin Is. The host-symbiotic algae associations are superimposed on the significant clusters (I to VII).

The clustering patterns were associated with dominant Symbiodiniaceae species. The first major group consisted of most *Por. lutea* colonies hosting *Cladocopium* sp. (C15) (subgroup I). The second major group consisted of most *Poc. damicornis* colonies hosting *D. glynnii* (D1) and two *Por. lutea* at SM (subgroup II). The third major group consisted of *Poc. damicornis* colonies hosting *D. glynnii* (D6) (subgroup III). The other smaller groups (IV-VII) each of which contained only a coral colony, included *Por. lutea* colonies at SC hosting *Cladocopium* sp. (C15) in a combination with *C. goreau* (C1) or *D. glynnii* (D6); an SM *Por. lutea* colony containing *Cladocopium* sp. (C15) and *Cladocopium* sp. (C15.7) and an SS *Poc. damicornis* colony hosting *D. glynnii* (D1-6) (subgroup VII).

## DISCUSSION

Compared to other Indo-Pacific regions, we found relatively diverse Symbiodiniaceae species in *Por. lutea* (5 ITS2 haplotypes) and in *Poc. damicornis* (2 haplotypes) across nine sites from the GoT. *Cladocopium* sp. (C15) was dominant in *Por. lutea* while *D. glynnii* (D1) was dominant in *Poc. damicornis*. Symbiodiniaceae communities were highly structured by host coral species and by site. We observed significant interactions between the coral host species and two geographic factors on Symbiodiniaceae species compositions.

### *Symbiodiniaceae communities in relation to local environment and geography*

The overall number of Symbiodiniaceae ITS2 haplotypes (or profiles) detected for *Por. lutea* and *Poc. damicornis* in the GoT (this study and Putschim (2017)) is lower (5 haplotypes) than in reports from the Andaman Sea (11 haplotypes) (LaJeunesse *et al.*, 2010; Putschim 2017), but higher than for reefs in Singapore, Hong Kong and Taiwan (Tanzil *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2016; Keshavmurthy *et al.*, 2014). In this study, we found three ITS2 haplotypes of *Cladocopium* spp. (*C. goreau* (C1), *Cladocopium* sp. (C15) and *Cladocopium* sp. (C15.7)) and two *Durudinium* spp. (*D. glynnii* (D1),

*D. glynnii* (D6)), while Putschim (2017) reported one additional haplotype, namely *Cladocopium* sp. (C17). In the Andaman Sea, LaJeunesse *et al.*, (2010) and Putschim (2017) reported 11 haplotypes in *Porites* and *Pocillopora*, with *Por. lutea* being associated with five haplotypes (*Cladocopium* spp. 4 haplotypes and *D. trenchii*), and *Poc. damicornis* being associated with seven haplotypes (*Cladocopium* spp. 4 haplotypes and *Durudinium* spp. 3 haplotypes). In Singapore, Hong Kong, and Taiwan, *Porites* harboured only *Cladocopium* sp. (C15) and *Pocillopora* was associated with only a few haplotypes (Keshavmurthy *et al.*, 2014; Tanzil *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2016).

The Indo-Pacific Symbiodiniaceae species in both coral genera are generally less diverse than those observed in the reefs off the Arabian Peninsula (Persian/Arabian Gulf, PAG, Sea of Oman, SO, and Red Sea, RS) (Ziegler *et al.*, 2017). Ziegler *et al.* (2017) reported 10 (PAG) - 28 (RS) haplotypes in *Porites* and 3 (PAG) - 8 (RS) haplotypes in *Pocillopora* across all three regions, with PAG harbouring the lowest number of haplotypes. The lower diversity in other Indo-Pacific regions may be due to fewer species within each genus being sampled, the molecular techniques employed (DGGE vs. next generation sequencing) or the environments being examined having a narrower environmental gradient. In extreme environmental gradients among regions, Ziegler *et al.* (2017) found a shift in Symbiodiniaceae species composition from *Cladocopium* spp. dominant reefs in the Red Sea and the Sea of Oman (cooler water) to *Durudinium* spp. dominant reefs in the Persian/Arabian Gulf (highly saline, warmer water). These results suggested that an extreme selective pressure (such as in PAG) can drastically alter the Symbiodiniaceae species composition with a tendency to lower Symbiodiniaceae diversity. Also, the physiology of each coral species may play an important role in maintaining its Symbiodiniaceae association within each environment.

In the GoT, site had a significant effect on the distribution of Symbiodiniaceae species for *Poc. damicornis*, but not for *Por. lutea*. In *Por. lutea*, most sites had one common haplotype (*Cladocopium* sp. (C15)), and some colonies in Sichang and Samet



Islands harbored additional, less common haplotypes. This observation of few haplotypes per site in this coral species has been made in other areas in the GoT (Putchim, 2017), the Andaman Sea (LaJeunesse *et al.*, 2010; Putchim, 2017) and other Indo-Pacific regions (Putnam *et al.*, 2012; Keshavmurthy *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2016).

In *Poc. damicornis*, on the other hand, we consistently observed more Symbiodiniaceae species at the inshore sites (2 haplotypes) than at the offshore sites (1 haplotype). An opposite pattern was observed for the Andaman Sea, where LaJeunesse *et al.* (2010) reported three *Durusdinium* spp. at the inshore sites and six haplotypes (3 *Cladocopium* spp. and 3 *Durusdinium* spp. haplotypes) at offshore sites. Our observation in the GoT may be explained by local adaptation of corals and Symbiodiniaceae to highly disturbed environments nearshore. Constant exposure to selective agents (high turbidity, freshwater discharge from major rivers, high sedimentation) might have allowed for diversification of Symbiodiniaceae species (Anthony and Fabricius, 2000; LaJeunesse *et al.*, 2010; Sawall *et al.*, 2014). Also, coral colonies in the nearshore areas, where the water flow was high, were not as badly bleached as some of the offshore areas in the 2010 bleaching event (Phuket Marine Biological Center, 2010). In addition to potential local adaptation to persistent environmental disturbances, light penetration through the water column is decreased at these sites, thus reducing the combined temperature/light stresses that induce bleaching (Phuket Marine Biological Center, 2010).

#### Host specificity

In our study, we observed associations between the 'host specific' *Cladocopium* sp. (C15) and *Por. lutea* and between 'host generalist' types, *D. glynnii* (D1), and *Poc. damicornis*. We detected a very high prevalence of *Cladocopium* sp. (C15) (90% of total coral colonies) and *D. glynnii* (D1) (4%) associated with *Por. lutea*. This pattern is consistent with the observations of Putchim (2017) in other sites in the GoT, where 60-100% of *Por. lutea* colonies hosted *Cladocopium* sp. (C15) and 20-40% hosted *C. goreaui*. Similarly, LaJeunesse *et al.* (2010) and Putchim (2017) found *Cladocopium*

sp. (C15) to be associated with 75-90% of *Por. lutea* colonies in the Andaman Sea. In addition, Tanzil *et al.* (2016) found only *Cladocopium* sp. (C15) associated with *Por. lutea* at three shallow reefs around Singapore's southern islands (i.e. Pulau Tekukor, Kusu Island and Pulau Satuma).

In this study, *Poc. damicornis* with *D. glynnii* (D1) was found in both locations (inshore sites and offshore sites), whereas *D. glynnii* (D1) was regularly found associated with *Pocillopora* inhabiting turbid and shallow habitats in the far tropical eastern Pacific (Pinzón and LaJeunesse, 2011). In addition, we observed a difference in species dominance at an inshore site in the eastern GoT (*D. glynnii* (D6), Samet Island) (Figures 3, 4). These dominant Symbiodiniaceae species in *Poc. damicornis* in the GoT differ from several locations in other Indo-Pacific areas (e.g., LaJeunesse *et al.*, 2010; Stat *et al.*, 2015; Tanzil *et al.*, 2016). In particular, the prevalence of *D. glynnii* (D6) that was found alone at SM and found in combination with *Cladocopium* sp. (C15) at SS showed a difference from other sites in the GoT. Conversely, in the Andaman Sea *Poc. damicornis* was found associated with *Durusdinium* sp. (D5) (LaJeunesse *et al.*, 2010). Interestingly, at Cape Panwa, an inshore reef in Phuket which has similar reef type to SM and SS, LaJeunesse *et al.* (2010) reported *D. glynnii* (D6) in combination with D1-4 (or D1-4-6) in *Poc. damicornis*. For comparison, in central GBR where there was high temperature and turbidity, C3h was the dominant symbiont (LaJeunesse *et al.*, 2004).

The dominance of *D. glynnii* (D1) at the offshore sites in the GoT was unexpected as these sites are less turbid, less disturbed by human activities and possibly cooler than the inshore sites. The recent recolonization of *Poc. damicornis* in the GoT after the 2010 severe mass bleaching event (Sutthacheep *et al.*, 2012; Kuanui *et al.*, 2015) may explain this association. This species was severely bleached in 2010 and absent from many sites, but juvenile colonies reappeared in 2014 (Kuanui *et al.*, 2015) and they tended to have increased bleaching resistance. A similar phenomenon occurred in the Andaman Sea (Putchim, 2017). The increased prevalence of *D. glynnii* (D1) in our

samples is probably due to the adaptation of new *Poc. damicornis* recruits after the 2010 bleaching, similar to *Poc. acuta* in Singapore (Tanzil *et al.*, 2016).

## CONCLUSION

Symbiodiniaceae fingerprints, inferred from ITS2 haplotypes, in two scleractinian coral hosts, *Por. lutea* and *Poc. damicornis*, at nine sites in the GoT consisted of one or a combination of five dominant Symbiodiniaceae haplotypes. *Cladocopium* sp. (C15) was highly abundant in *Por. lutea*, while *D. glynnii* (D1) were prevalent in *Poc. damicornis*. Symbiodiniaceae species composition varied significantly by site and host species, and by the interactions between site and host species. Based on coral-Symbiodiniaceae association, the UPGMA dendrogram suggested three major groups, (1) *Por. lutea* colonies associated with *Cladocopium* sp. (C15) and its combination with less common haplotypes; (2) *Poc. damicornis* colonies associated with *D. glynnii* (D1); and (3) *Poc. damicornis* colonies associated with *D. glynnii* (D6). Despite multiple bleaching events and other selective pressures due to coastal influence on coral reefs, nearshore coral-Symbiodiniaceae associations can still maintain some diversity and resilience. However, recent drastic environmental changes may have altered coral-Symbiodiniaceae associations in 'less tolerant' reefs offshore, leading to lower overall diversity. For the long-term resilience of coral reefs in the region, the protection of these Symbiodiniaceae refugia nearshore as well as those 'less tolerant' offshore may provide such a safeguard.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of three Marine and Coastal Resources Research and Development Centers - Eastern Gulf of Thailand, Central Gulf of Thailand and Lower Gulf of Thailand, and Nangmoi-Somyos Yossundara ([www.saveoursea.net](http://www.saveoursea.net)) for their field assistance. We appreciate the laboratory

assistance of Jearayut Jeuthong, a research assistant in the Department of Aquatic Science, Burapha University. We also thank David J. Anderson for English editing of the manuscript and Suchart Chayhard for producing Figure 1. This work was partially supported by the National Research Council of Thailand (Grant no.142/2560) to N.K. and Ph.D. funding support from the Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University to A.C.

## LITERATURE CITED

- Anderson, M.J., R.N. Gorley and K.R. Clarke. 2008. **Permanova for primer: guide to software and statistical methods.** PRIMER-E, Plymouth.
- Anthony, K.R.N. and K.E. Fabricius. 2000. Shifting roles of heterotrophy and autotrophy in coral energetics under varying turbidity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 252: 221–253.
- Arif, C., C. Daniels, T. Bayer, E. Banguera-Hinestroza, A. Barbrook, C.J. Howe, T.C. LaJeunesse and C.R. Voolstra. 2014. Assessing *Symbiodinium* diversity in scleractinian corals via next-generation sequencing-based genotyping of the ITS2 rDNA region. **Molecular Ecology** 23: 4418–4433.
- Boonprakob, R. and A. Chankong. 2000. **Occurrence of coral bleaching in the Gulf of Thailand in 1998.** Abstract of the 8<sup>th</sup> International Coral Reef Symposium, Bali. 373 pp.
- Buranapratheprat, A. T. Yanagi and S. Matsumura. 2008. Seasonal variation in water column conditions in the upper Gulf of Thailand. **Continental Shelf Research** 28(17): 2509–2522.
- Chankong A. 2018. **Geographic and environmental effects on genetic diversity of *Symbiodinium* in scleractinian corals in the Gulf of Thailand.** Doctoral dissertation, Burapha University. 108 pp.
- Clarke, K.R. and R.N. Gorley. 2006. **Primer v6: user manual/tutorial.** Primer-E Ltd., Plymouth.

- Ferrara, G.B., B. Murgia, A.M. Parodi, L. Valisano, C. Cerrano, G. Plamisano, G. Bavestrello and M. Sara. 2006. The assessment of DNA from marine organisms via a modified salting-out protocol. **Cellular and Molecular Biology Letters** 11: 155–160.
- Huang, X. and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research** 9(9): 868–877.
- Keshavmurthy, S., P. Meng, J. Wang, C. Kuo, S. Yang, C. Hsu, C. Gan, C. Dai and C.A. Chen. 2014. Can resistant coral-*Symbiodinium* associations enable coral communities to survive climate change? A study of a site exposed to long-term hot water input. **PeerJ** 2: e327 <https://doi.org/10.7717/peerj.327>.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16: 111–120.
- Kuanui, P., S. Chavanich, V. Viyakarn, M. Omori and C. Lin. 2015. Effects of temperature and salinity on survival rate of cultured coral and photosynthetic efficiency of zooxanthellae in coral tissue. **Ocean Science Journal** 50(2): 263–268.
- Kumar, S., G. Steche and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33: 1870–1874.
- LaJeunesse, T.C. and D.J. Thornhill. 2011. Improved resolution of reef-coral endosymbiont (*Symbiodinium*) species diversity, ecology, and evolution through *psbA* non-coding region genotyping. **PLoS ONE** 6(12): e29013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029013>
- LaJeunesse, T.C. and R.K. Trench. 2000. Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissimi* (Brandt). **Biological Bulletin** 199: 126–134.
- LaJeunesse, T.C., J.E., Parkinson, P.W., Gabrielson., H.J., Jeong, J.D., Reimer, C.R., Voolstra and S.R. Santos. 2018. Systematic revision of symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. **Current Biology** 28: 2570–2580.
- LaJeunesse, T.C., R. Bhagooli, M. Hidaka, L. deVantier, T. Done, G.W. Schmidt and W.K. Fitt. 2004. Closely related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. **Marine Ecology Progress Series** 284: 147–161.
- LaJeunesse, T.C., T. Pettay, E.M. Sampayo, N. Phongsuwan, B. Brown, D. Obura, O. Hoegh-Guldberg and W.K. Fitt. 2010. Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host-symbiont specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. **Journal of Biogeography** 37: 785–800.
- Phongsuwan, N., A. Chankong, C. Yamarunpathana, H. Chansang, R. Boonprakob, P. Petchkumnerd, N. Thongtham, S. Paokantha, T. Chanmethakul, P. Panchaiyapoom and O. Bundit. 2013. Status and changing patterns on coral reefs in Thailand during the last two decades. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography** 96:19–24.
- Phuket Marine Biological Center. 2010. **Coral Bleaching in 2010**. Poster. <http://www.dmcr.go.th/detailLib/651>.
- Pinzón J.H. and T.C. LaJeunesse. 2011. Species delimitation of common reef corals in the genus *Pocillopora* using nucleotide sequence phylogenies, population genetics and symbiosis ecology. **Molecular Ecology** 20: 311–325.
- Putchim, L. 2017. **Coral bleaching and recovery in the Thai Andaman Sea**. Doctoral dissertation, University of Bremen. 151 pp.
- Putnam, H.M., M. Stat, X. Pochon and R.D. Gates. 2012. Endosymbiotic flexibility associates with environmental sensitivity in scleractinian corals. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 279(1746): 4352–4361.

- Sawall, Y., A. Al-Sofyani, E. Bangué-Hinestroza and C.R. Woolstra. 2014. Spatio-temporal analyses of *Symbiodinium* physiology of the coral *Pocillopora verrucosa* along large-scale nutrient and temperature gradients in the Red Sea. **PLoS ONE** 9(8): e103179. doi:10.1371/journal.pone.0103179.
- Stat, M., D.M. Yost and R.D. Gates. 2015. Geographic structure and host specificity shape the community composition of symbiotic dinoflagellates in corals from the Northwestern Hawaiian Islands. **Coral Reefs** 34: 1075–1086.
- Sudara, S. and T. Yeemin. 1997. **Status of coral reefs in Thailand**. In: Status of coral reefs in the Pacific. (eds. R.W. Grigg, and C. Birkeland), pp. 135–144. Sea Grant College Program, School of Ocean and Earth Science and Technology, University of Hawaii.
- Sutthacheep, M., M. Yucharoen, W. Klinthong, S. Pengsakun, K. Sangmanee and T. Yeemin, 2012. Coral mortality following the 2010 mass bleaching event at Kut Island, Thailand. **Phuket Marine Biological Center Research Bulletin** 71: 83–92.
- Tanzil, I., J. Thuaibah, N. Abigayle, T. Yi Qing, T. Beverly, E. Yun and D. Huang. 2016. A preliminary characterisation of *Symbiodinium* diversity in some common corals from Singapore. **COSMOS** 12: 15–27.
- Tonk, L., P. Bongaerts, E.M. Sampayo and O. Hoegh-Guldberg. 2013. *SymbioGBR*: a web-based database of *Symbiodinium* associated with cnidarian hosts on the Great Barrier Reef. **BMC Ecology** 13: 7.
- Wham, D. C., G. Ning and T.C. LaJeunesse. 2017. *Symbiodinium glynnii* sp. nov., a species of stress-tolerant symbiotic dinoflagellates from pocilloporid and montiporid corals in the Pacific Ocean. **Phycologia** 56(4): 396–409.
- Wong, C.Y., P. Thompson, Y.X. James, J.W. Qiu and D.M. Baker, 2016. *Symbiodinium* clade C generality among common scleractinian corals in subtropical Hong Kong. **Regional Studies in Marine Science** 8: 439–444.
- Ziegler, M., C. Arif, J.A. Burt, S., Dobretsov, C. Roder, T.C. LaJeunesse and C.R. Woolstra. 2017. Biogeography and molecular diversity of coral symbionts in the genus *Symbiodinium* around the Arabian Peninsula. **Journal of Biogeography** 44(3): 674–686.