ความผันแปรตามฤดูกาลและลักษณะทางพันธุกรรมของประชาคมแพลงก์ตอนสัตว์ ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

บทนำ

บริเวณหมู่เกาะแสมสารที่ตั้งอยู่ในพื้นที่อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นบริเวณที่มีพื้นที่เป็นหมู่เกาะประกอบด้วยเกาะต่างๆ 9 เกาะ ที่อยู่บริเวณใกล้กับเกาะแสมสาร และเป็นพื้นที่อยู่ในการดูแลของกองทัพเรือ นับว่ามีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติอีกทั้งมีความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเลสูงแห่งหนึ่ง และจัดเป็นเป็นพื้นที่ที่ได้รับการปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเลที่เริ่มต้นมาจากสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้มีพระราชกระแสเกี่ยวกับงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพื้นที่ตามเกาะต่างๆ มีพืชพรรณอยู่มากและยังไม่มีผู้ใดสนใจน่าจะมีการสำรวจพืชพรรณตามเกาะ เพื่อใช้เป็นพื้นที่เรียนรู้ และอบรมให้เยาวชนได้หันมาสนใจพืชพรรณและอนุรักษ์ไว้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อประเทศในระยะยาวด้วย ต่อมา กองทัพเรือได้เข้าร่วมสนองพระราชดำริและพิจารณาพื้นที่เกาะแสมสารที่ตั้งอยู่ใกล้ฝั่ง ไม่มีประชาชนอาศัยอยู่ อีกทั้งมีแหล่งน้ำจืดเพียงพอที่จะเข้าร่วมโครงการฯ พร้อมที่จะสนับสนุนและอำนวยความสะดวกได้ รวมถึง มหาวิทยาลัยบูรพาได้จัดส่งคณะปฏิบัติการวิทยาการซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของนักวิชาการที่มาจากหน่วยงานของ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล เข้าร่วมสนองพระราชดำริในการสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล ทางด้าน แพลงก์ตอนพืช-สัตว์ โคพีพอด ไมซิด เพรียงหัวหอม หอยทะเล ปะการังอ่อน ฟองน้ำและลักษณะพันธุกรรมของฟองน้ำฯลฯ มาเป็นระยะเวลามากกว่า 6 ปี แล้วนั้น

แพลงก์ตอนสัตว์นั้นมีความสำคัญในระบบของห่วงโซ่อาหาร ระบบเศรษฐกิจ และระบบนิเวศ โดยมีความสัมพันธ์กันทั้งทางกายภาพและทางชีวภาพ โดยระบบของห่วงโซ่อาหารนี้จะมีความสมบูรณ์ก็ต่อเมื่อประกอบด้วยผู้ผลิต ผู้บริโภคและผู้ย่อยสลายของระบบนิเวศนั้นๆ การถ่ายทอดพลังงานเป็นทอดๆนั้น อาจมีรูปแบบที่แตกต่างไปเช่น ผู้ผลิตอาจเริ่มต้นจากแบคทีเรียหรือซากพืช-สัตว์ ที่เติบโตโดยใช้อินทรีย์สารเป็นอาหาร หรือจากแพลงก์ตอนพืชเป็นผู้ผลิตโดยมีแพลงก์ตอนสัตว์เป็นผู้บริโภคในขั้นถัดไป และแพลงก์ตอนสัตว์นั้นเป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์ในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไฟลัมอื่น หรือเป็นอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลังเช่น ลูกปลาวัยอ่อน ในสภาพแวดล้อมปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอย่างมากเช่น ฝนไม่ตกตามฤดูกาล แหล่งน้ำที่ได้รับผลกระทบจากของเสียจากชุมชนก็จะส่งผลให้ห่วงโซ่อาหารบางส่วนอาจขาดหายไป หรือ สัตว์ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งมีปริมาณน้อย/มากเกินไป ทำให้ไม่มีความอุดมสมบูรณ์ในแหล่งน้ำนั้นๆ หรือจากการเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำทะเลที่สูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่ปรับสภาพไม่ได้ เคลื่อนย้ายที่อยู่อาศัยหรืออพยพหนีไม่ได้ต้องตายลงเป็นการสูญเสียทรัพยากรทางธรรมชาติอีกทางหนึ่งเช่นกัน จึงต้องมีการติดตามและเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตเมื่อสภาพแวดล้อมเกิดการไม่สมดุลย์ทางธรรมชาติ

การศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยการใช้แผนภาพต้นไม้ (phylogeny หรือ phylogenetic tree) เพื่อศึกษาถึงสิ่งมีชีวิตที่มีข้อมูลโมเลกุลเหมือนกัน (homologous) ที่มีบรรพบุรุษร่วมกันมา ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นใช้หลักฐานทางโมเลกุลเพื่อดูความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยแถบดีเอ็นเอจากเครื่องหมายแบบต่างๆ โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบรรพบุรุษถึงปัจจุบัน (สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล, 2552) ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของโคพีพอดที่มีมากทั้งจำนวนชนิดและปริมาณปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องมือใหม่ๆ ในระดับดีเอ็นเอ เพื่อช่วยในการจัดจำแนกและจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสัตว์ โดยการใช้ตัวแทนยีนจากไมโทคอนเดรีย เนื่องจากยีนแต่ละประเภทมีความโดดเด่นเฉพาะตัวที่อาจให้

รูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เหมือนหรือแตกต่างกัน ยีนบนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ มักมีอัตราการเกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์สูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส (ประมาณ 5-10 เท่า) ไม่มีการรวมยีนหรือการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (Recombination) และมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรรมจากแม่สู่ลูก (Avise, 2004) นอกจากนี้การเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสภาวะแวดล้อมจะส่งผลให้ชนิดมีการเปลี่ยนแปลงไปหรืออาจมีชนิดอื่นเข้ามาแทนที่และโคพีพอดชนิดเดิมอพยพย้ายถิ่นไป ซึ่งลักษณะทางพันธุกรรมจะช่วยอีกทางหนึ่งในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางชนิดของโคพีพอดขนาดเล็กที่ไม่สามารถตรวจสอบจากสัณฐานวิทยาได้ โดยการตรวจดีเอ็นเอที่เป็นส่วนของยีน COI และ 16S rRNA ในไมโทคอนเดรีย เพื่อใช้การตรวจสอบหรือระบุชนิดโดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับโคพีพอดแต่ละชนิด (ขวัญเรือน ศรีนุ้ย และคณะ ยังไม่ได้ตีพิมพ์)

ดังนั้นกลุ่มสิ่งมีชีวิตของประชากรกลุ่มของแพลงก์ตอนสัตว์สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงความแปรผันของสภาวะแวดล้อมหรือติดตามสภาวะแวดล้อมทางทะเลในแต่ละฤดูกาล ที่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณของสัตว์น้ำวัยอ่อนและตัวเต็มวัยได้อย่างต่อเนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ โดยมีข้อมูลทางกายภาพและชีวภาพสนับสนุน อีกทั้งข้อมูลของวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเช่น โคพีพอดที่ได้เป็นการยืนยันชนิด ติดตามวิวัฒนาการตั้งแต่บรรพบุรุษจนถึงปัจจุบัน และเป็นการยังสนับสนุนข้อมูลทางสัณฐานวิทยาให้ชัดเจน แม่นยำยิ่งขึ้น รวมทั้งยังสามารถนำข้อมูลที่ศึกษาได้ไปประกอบเป็นแนวทางในการบริหารจัดการ การแก้ไขปัญหาทรัพยากรธรรมชาติไม่สมดุลย์ หรือผิดปกติที่เกิดขึ้นจากธรรมชาติได้อีกแนวทางหนึ่งด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริในโครงการการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
2. เพื่อศึกษาความผันแปรตามฤดูกาลและลักษณะทางพันธุกรรมของแพลงก์ตอนสัตว์บางชนิดบริเวณเกาะแสมสาร เกาะจระเข้ เกาะปลาหมึก และเกาะจวง อำเภอสัตหีบจังหวัดชลบุรี

การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีข้อมูลการศึกษาฤดูกาลและสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อความหลากหลายทางชนิดของแพลงก์ตอนสัตว์มีน้อย โดยมีการศึกษาของ ขวัญเรือน ศรีนุ้ย และรุจิรา แก้วกิ่ง (2548) ศึกษาการแพร่กระจายและความชุกชุมของแพลงก์ตอนสัตว์บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกในเดือนมีนาคม 2547 (ฤดูแล้ง) และในเดือนสิงหาคม 2547 (ฤดูฝน) พบแพลงก์ตอนสัตว์ทั้งสิ้น 15 ไฟลัม 41 กลุ่ม ในฤดูแล้งมีความชุกชุมของแพลงก์ตอนสัตว์มากกว่าฤดูฝน โดยมีไฟลัมArthropoda เป็นชนิดเด่น รองลงมาคือ Chordata และ Mollusca ตามลำดับ ส่วนในฤดูฝนแพลงก์ตอนสัตว์ที่ชุกชุมเป็นชนิดเด่นได้แก่ ไฟลัม Protozoa รองลงมาคือ Chordata และArthropoda ตามลำดับ ส่วนใหญ่ไฟลัมที่พบมากที่สุดคือ Arthropoda ที่มีความสำคัญของระบบเศรษฐกิจได้แก่โคพีพอด ลูกกุ้ง ลูกปู เป็นต้น โดยพบว่าโคพีพอดมีปริมาณมากถึง 80 % ของกลุ่มแพลงก์ตอนสัตว์ทั้งหมด

ในช่วงระยะเวลาเดียวกันมีผู้ศึกษาแพลงก์ตอนสัตว์ในอ่างคุ้งกระเบนโดย วรพงศ์ ตันติชัยวณิช (2548) พบแพลงก์ตอนสัตว์ทั้งหมด 40 กลุ่ม จาก 15 ไฟล้ม แบ่งเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ถาวร 22 กลุ่ม และ แพลงก์ตอนสัตว์ชั่วคราว 18 กลุ่ม มีความหนาแน่น เฉลี่ยอยู่ในช่วง 7.69 x 105 – 1.76 x 107 ตัวต่อปริมาตรน้ำ 100 ลูกบาศก์เมตร โดยมี Copepods เป็นแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มเด่น มีความหน่าแน่นร้อยละ 49.92 ของปริมาณแพลงก์ตอน สัตว์ทั้งหมดที่พบ แพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มที่พบรองลง มาได้แก่ Crustacean nauplius, Gastropod larvae, Bivalvia larvae และ Larvacean แพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มที่ พบได้ตามฤดูกาลได้แก่กลุ่ม

Cladocera และ Rotifera พบมีความหนาแน่นสูงในช่วงฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (ฤดูฝน) เนื่องจากแพลงก์ตอนสัตว์ 2 กลุ่มนี้ เป็นแพลงก์ตอนสัตว์น้ำจืดและน้ำกร่อยจึงพบในช่วงที่มีความเค็มต่ำ แต่ในช่วงฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ มีความหนาแน่นของแพลงก์ตอน สัตว์ทั้งหมดสูงกว่าช่วงฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ชุมชนแพลงก์ตอนสัตว์ ในบริเวณในอ่างคุ้งกระเบนมีความคล้ายคลึงกันมากกว่าชุมชนแพลงก์ตอนสัตว์บริเวณปากอ่าวคุ้งกระเบน และบริเวณใกล้แนวป่าชายเลน แต่ความหนาแน่นของแพลงก์ตอนสัตว์ที่เป็นตัวอ่อนของ Crustacean มีการผันแปรตามความโปร่งแสงของน้ำอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.05) Hydromedusae นอกจากนี้แพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มผู้ล่าเช่น หนอนธนู, Hydromedusae และลูกปลาน่าจะมีบทบาทในการควบคุม ความหนาแน่นของแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่ม Copepod, ตัวอ่อนของหอย ตัวอ่อนของไส้เดือนทะเลและตัวอ่อน ของ Crustacean ด้วย แพลงก์ตอนสัตว์กลุ่ม Brachyuran larvae พบหนาแน่นสูงบริเวณใกล้แนวป่าชายเลน ในเดือนกันยายนและพฤศจิกายน 2547 ซึ่งตรงกับช่วงฤดูผสมพันธุ์และวางไข่ของปูม้าและปูทะเล ดังนั้น จึงควรลดปริมาณการจับปูม้าและปูทะเลในช่วงดังกล่าวลดลงเพื่อคงไว้ซึ่งพ่อแม่พันธุ์ของปูทะเลและปูม้าในอนาคตต่อไป ผลการศึกษาครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่ม Brachyuran larvae, Shrimp larvae, Fish larvae และ Bivalvia larvae ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน

ที่ผ่านมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความหลากชนิดของโคพีพอดและไมซิดเป็นระยะเวลา 3 ปี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือน พฤษภาคม 2553 พบโคพีพอดทั้งสิ้น 4 Suborder 16 จำนวน 24 สกุล 47 ชนิด เป็นชนิดที่พบใหม่ในประเทศไทย 3 ชนิด ในอันดับ Calanoida ครอบครัว Pseudodiaptomidae เป็นชนิดที่พบใหม่ในน่านน้ำประเทศไทย 2 ชนิด คือ *Pseudodiaptomus ishigakiensis*, *P. galleti* และยังพบโคพีพอดในครอบครัวเดียวกันอีก 2 ชนิด ที่พบครั้งแรกในอ่าวไทยคือ *P. andamanensis, Pseudocyclops ensiger* ครอบครัวของโคพีพอดที่พบจำนวนชนิดมากที่สุดคือครอบครัว Pontellidae ที่พบทั้งสิ้น 5 สกุล 11 ชนิด ส่วนไมซิดพบทั้งสิ้น 4 เผ่าพันธุ์ 11 สกุล 17 ชนิด เป็นชนิดที่รายงานเป็นครั้งแรกในประเทศไทย 3 ชนิด คือ *Anisomysis aikawai* และ *Anisomysis ijimai*, และ *Pseudanchialina inermis* ไมซิดที่พบแพร่กระจายมากที่สุดในบริเวณหมู่เกาะแสมสารคือ *Anisomysis aikawai* ขวัญเรือน ศรีนุ้ย (2554)

เมื่อพิจารณาชนิดของโคพีพอดที่พบจากชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตะวันตก มีชนิดที่แพร่กระจายแตกต่างกันกับการศึกษาของ ศุภมัย พรหมแก้ว ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ และอัจฉราพร เปี่ยมสมบูรณ์ (2555) พบความหลากชนิดของโคพีพอดบริเวณอ่าวปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราชในฤดูแล้งและฤดูฝน พบว่าโคพีพอดชนิด *Pseudodiaptomus annandalei* Sewell, 1919 มีความชุกชุมสูงสุดในฤดูฝน ส่วนฤดูแล้งพบโคพีพอดชนิด *Acartia plumosa* Scott, 1894 เป็นชนิดเด่นบริเวณปากคลองนคร อีกทั้งยังพบโคพีพอดซึ่งรายงานเป็นครั้งแรกในน่านน้ำไทยอีก 5 ชนิด ได้แก่ *Pseudodiaptomus incises* Shen and Lee, 1963; *Pseudodiaptomus trihamatus* Wright, 1937; *Eucalanus subtenuis* Giesbrecht, 1888; *Pontellopsis* sp. และ *Caligus* sp.

และมีการศึกษาเพิ่มเติมบริเวณปากแม่น้ำบางปะกงโดย วิชญา กันบัว และคณะ (2557) ที่พบประชาคมของแพลงก์ตอนสัตว์ทั้งสิ้น 7 ไฟลัม ได้แก่ Protozoa, Cnidaria, Rotifera, Annelida, Arthropoda, Mollusca, และ Chordata ไฟลัมที่พบเป็นกลุ่มเด่นคือ ไฟลัม Chordata ชนิดเด่นพบในเดือนมิถุนายน คือกลุ่มของโคพีพอด ส่วนกลุ่มของโรติเฟอร์และไรน้ำพบมากในเดือนกันยายน

ส่วนการศึกษาแพลงก์ตอนสัตว์บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และโสภณ อ่อนคง (2543) การสำรวจปริมาณและการแพร่กระจายของแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ และคุณภาพน้ำบริเวณชายฝั่งทะเล อ่าวละงู อำเภอละงู จังหวัดสตูล ดำเนินการระหว่างเดือนธันวาคม 2540 – สิงหาคม

2541 จำนวน 8 สถานี ครอบคลุมพื้นที่ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลบริเวณบ้านปากบารา ถึงบริเวณชายฝั่งทะเลบ้านบากันโต๊ะทิด พบแพลงก์ตอนสัตว์จำนวน 4 กลุ่ม 6 สกุล โดยพบ Nauplius และ Copepod แพร่กระจายทั่วอ่าวละงู ปริมาณความชุกชุมเฉลี่ยของแพลงก์ตอนพืชมากที่สุดที่ระยะห่างฝั่ง 100 เมตร ขณะที่แพลงก์ตอนสัตว์มีปริมาณความชุกชุมเฉลี่ยมากที่สุดที่ระยะห่างฝั่ง 1,000 เมตร ตลอดระยะเวลาที่ศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำบริเวณชายฝั่งอยู่ในช่วงมาตรฐานคุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง

ดังนั้นการจัดหมวดหมู่สิ่งมีชีวิตของแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดเล็กจึงให้ความสำคัญกับข้อมูลพันธุกรรมมากขึ้น เพื่อช่วยลดปัญหาในการจัดจำแนกกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายกัน และ เพื่อทบทวนความสอดคล้องระหว่างอนุกรมวิธานและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยมักจะเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่สอดคล้องกับระดับทางวิวัฒนาการที่ต้องการศึกษา (ระหว่างสกุล ชนิด ชนิดย่อยหรือ ระหว่างประชากรของสัตว์ชนิดเดียวกัน (Hillis and Moritz, 1990) ข้อมูลเครื่องหมายพันธุกรรมที่นิยมใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสกุล และชนิด ได้แก่ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA และ COI (Blanco-Bercial et al., 2011; Bucklin et al., 1996; Bucklin et al., 1999; Paul et al., 2003) บนไมโทคอนเดรีย และ ยีน 18S rRNA ในนิวเคลียส (Wyngaard et al., 2010)

แผนแม่บทโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ระยะ 5 ปีที่สี่ จึงกำหนดพื้นที่เป้าหมายของการสำรวจทรัพยากรกายภาพและชีวภาพ ในบริเวณ หมู่เกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะขาม เกาะจวง เกาะจาน และหมู่เกาะจระเข้ เพื่อเป็นการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่นในการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์แก่ทรัพยากรธรรมชาติทางทะเล และถ่ายทอดองค์ความรู้ให้กับนักเรียนในท้องถิ่นและนักเรียนชุมชนใกล้เคียงเพื่อปลุกจิตสำนึกในการหวงแหนและการอนุรักษ์ทรัพยากรชีวภาพ อันนำไปสู่การเพิ่มพูนความอุดมสมบูรณ์ แก่ทรัพยากรและการเพิ่มศักยภาพของชุมชนอีกด้วย ดังนั้นเพื่อให้เป็นประโยชน์ต่อผู้ศึกษาวิจัยในภายหน้าและมีคู่มือในการจัดจำแนกชนิดของโคพีพอดเพิ่มขึ้น จึงเห็นควรที่จะมีผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับโคพีพอด และตัวอย่างที่ศึกษานั้นภายหลังจากการจัดจำแนกแล้วทำการจัดเก็บไว้ที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลเพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงของพิพิธภัณฑ์อ้างอิงวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การกำหนดพื้นที่ และสถานี

การกำหนดสถานีเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์โดยคัดเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษา ได้แก่ บริเวณเกาะแสมสาร เกาะจระเข้ เกาะปลาหมึก และเกาะจวง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (ดังแสดงในภาพที่ 1)

วิธีดำเนินการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่าง ปีละ 5 ครั้ง (เดือนเว้นเดือน) เริ่มตั้งแต่เดือน มกราคม ถึงเดือนกันยายน โดยเก็บตัวอย่างด้วยถุงลากแพลงก์ตอนขนาด 100 ไมโครเมตร เก็บรักษาตัวอย่างในขวดพลาสติก ด้วยฟอร์มาลิน 4 % นำมานับจำนวนและจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในห้องปฏิบัติการของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล เพื่อทำการศึกษาลักษณะภายนอกและนับจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้นขวดละ 3 ซ้ำ ส่วนลักษณะทางพันธุกรรมของโคพีพอดจะทำการเก็บตัวอย่าง 3 ครั้งต่อปี คือเดือนพฤศจิกายน มีนาคม และเดือนกรกฎาคม เก็บตัวอย่างด้วยถุงลากแพลงก์ตอนขนาด 330 ไมโครเมตร ใส่ในขวดแก้วฝาปิดสนิทเก็บรักษาตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 99.8 % นำกลับมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อการแยกชนิดโดยสัณฐาน และเครื่องหมายพันธุกรรมโดยใช้ตัวอย่างชนิดละประมาณ 5 ตัวอย่าง ซึ่งใช้ตัวเต็มวัยเพศเมียครั้งละ 5 ตัวอย่าง ทั้งนี้สำหรับกลุ่มที่มีการ

แพร่กระจายในหลายพื้นที่ อาจมีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ตัวอย่างจากต่างแหล่ง เพื่อประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิด ระหว่างประชากรในแต่ละปีงบประมาณ จะทำการวิเคราะห์ความหลายหลายทางพันธุกรรมของโคพีพอด

เมื่อนับจำนวนและแยกกลุ่มของแพลงก์ตอนสัตว์แล้ว โคพีพอดที่ใช้ในการจำแนกชนิด พร้อมตัดชิ้นส่วนรยางค์ออกเป็นส่วนๆ เช่น ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และวางชิ้นส่วนตามลำดับของรยางค์ บนสไลด์ที่หยดด้วย lactophenol และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์เม้าท์ด้วยน้ำยาทาเล็บ จากนั้นนำมาจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบในการจัดจำแนกกลุ่มของแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดใหญ่ใช้เอกสารอ้างอิงของ สุนีย์ (2527), (1986) และ Suwanrumpha (1987); Naomi and et al. (2006); Omori (1975) ส่วนในระดับชนิด (species level) สุนีย์ 2527; Suwanrumpha 1987; Huys and Boxhall 1991; Nishida 1985; Walter 1986

ภาพที่ 1 สถานีเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์ จาก 4 สถานี บริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ปี 2557

การจำแนกชนิดแพลงก์ตอนสัตว์

เมื่อนับจำนวนและแยกกลุ่มของแพลงก์ตอนสัตว์แล้ว โคพีพอดที่ใช้ในการจำแนกชนิด พร้อมตัดชิ้นส่วนรยางค์ออกเป็นส่วนๆ เช่น ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และวางชิ้นส่วนตามลำดับของรยางค์ในสไลด์หลุมที่หยดด้วย lactophenol จากนั้นนำมาจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบในการจัดจำแนกกลุ่มของแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดใหญ่ใช้เอกสารอ้างอิงของ สุนีย์ (2527), (1986) และ Suwanrumpha (1987) ; Naomi et al. (2006); Omori (1975) ส่วนในระดับชนิด (Species level) ทำการเปรียบเทียบจากเอกสารอ้างอิงต่างๆ เช่น การรวบรวมข้อมูลของ http://copepodes.obs-banyuls.fr/en/index.php

13.3เครื่องหมายพันธุกรรม

รวบรวมตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์ที่จะนำไปวิเคราะห์ทางพันธุกรรม

ทำการเก็บรักษาตัวอย่างโคพีพอดในแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 99.8 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีของ http://www.ZooGene.org. และนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการโดยมีขั้นตอนการปฏิบัติดังต่อไปนี้คือ

1. การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อของตัวอย่างของโคพีพอดหรือแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มอื่น
2. การเพิ่มจำนวน DNA ทำการขยายเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ พีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) โดยต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการบางช่วง แล้วจึงสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น 2 สายของ 16S ลำดับเบส20เบส sequence (5’ to 3’) 16S-167 Forward primer5’ GACGAGAAGACCCTATGAAG และ 16SBR-H Reverse primer5’ CCGGTTTGAACTCAGATCATGTอีกทั้งอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละรอบ ที่เป็นจุดเริ่มต้นการเพิ่มดีเอ็นเอของสัตว์ในกลุ่มโคพีพอดด้วย Denaturation temperature 94 °C นาน 1 นาที45°C _นาน 2 นาที 72 °C นาน 3 นาที_จำนวน 40 รอบ ประมาณ 4 ชั่วโมง 39 นาที ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย บัฟเฟอร์5 μl 10X, 50μM, MgCl2 ปริมาตร 4μl , 2 mMdNTPs ปริมาตร 5 μl, 10 μM primerสาย F และ สาย R ปริมาตรละ 0.5μl solutions, TAQ polymerase ปริมาตร0.25 μl (ดัดแปลงจาก Ueda,& Bucklin, 2006) และ วิธีการ cytochrome oxidase I (COI) ที่ใช้ primer ของ (Paul, 2003)
3. การแยก DNA ที่มีน้ำหนัก โมเลกุลต่างกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gelelectrophoresis) การแยก DNA ที่มีน้ำหนัก โมเลกุลต่างกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gelelectrophoresis) 1% ตำแหน่งของดีเอ็นเอบนเจลจะวิเคราะห์ได้โดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะสอดแทรกระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจล
4. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ที่ทำความสะอาดแล้ว ด้วยชุดทำความสะอาดผลผลิต PCR สำเร็จรูป ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (บริษัท BioDesign ประเทศไทย)และ บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. จัดและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ความสอดคล้องกันระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ และ ความชัดเจนของ peak) ด้วยซอฟท์แวร์ Sequence Scanner v. 1 (Applied Biosystems, USA) จากนั้นจัดเรียง (align) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แก้ไขแล้วของตัวอย่าง (ทั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ในครั้งนี้ และ จากฐานข้อมูล GenBank) โดยใช้ซอฟท์แวร์ BioEdit version 7.1 (Hall 1999) หลักการของการ align คือ การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อยสองเส้นให้มีจำนวนนิวคลีโอไทด์

เหมือนกันมากที่สุด และ มีจำนวนช่องว่างที่เพิ่ม (gap) น้อยที่สุด การ align จะบ่งบอกตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายนิวคลีโอไทด์

2. เปรียบเทียบระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายนิวคลีโอไทด์ โคพีพอดโดยใช้ข้อมูลดังต่อไปนี้ คือ (1) ค่าเฉลี่ยจำนวนเบสองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Bases Composition) (2) ค่าความหลากหลายนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Diversity: π) (3) จำนวนรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Number of Haplotype: *h*) และ (4) จำนวนตำแหน่งที่มีความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ (Variable sites) และที่สามารถนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Parsimony informative sites) ค่าดัชนีเหล่านี้สามารถคำนวณได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA 5.1 (Tamura et al., 2007) และ DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003)

3. ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้แผนภูมิต้นไม้ ที่สร้างจากข้อมูลสัณฐาน และ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีนบนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ และยีนในนิวเคลียส) โดยวิธีต่อไปนี้ คือ (1) Maximum Parsimony (Mega 6.06, Tamura et al., 2007) ซึ่งเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งในแต่ละหน่วยอนุกรมวิธาน แผนภูมิที่ดีที่สุดจะเป็นแผนภูมิฯ ที่มีจำนวนการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างหน่วยอนุกรมวิธาน น้อยที่สุด (2) Maximum likelihood และ (3) cluster analysis ซึ่งสร้างจากข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มของหน่วยอนุกรมวิธาน ได้จากการสุ่มข้อมูล Parsimony information sites (bootstrap)จำนวน100-1000ครั้ง (ได้ 100-1000แผนภูมิฯ) นำเสนอการแผนภูมิฯ ที่จัดกลุ่มโดยรวม (Consensus Tree) แบบ Majority Rule (จะนำเสนอการจัดกลุ่มเฉพาะที่ปรากฏในแผนภูมิมากกว่า 50%) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชนิดจะรวมถึงตัวอย่างของพื้นที่เป้าหมาย และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคพีพอดที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/