



**ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ
ของปลิงทะเลลูกบอล (*Phyllophorella kohkutiensis*) ในน่านน้ำไทย**
Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships
of Ball Sea Cucumber (*Phyllophorella kohkutiensis*) in Thai Waters

ทรรศิน ปณิธานะรักษ์

Thadsin Panithanarak

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

Institute of Marine Science, Burapha University

Received : 8 July 2020

Revised : 8 October 2020

Accepted : 16 November 2020

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน มีการทำประมงปลิงทะเลลูกบอล (*Phyllophorella kohkutiensis*) ซึ่งพบครั้งแรกในประเทศไทย เพิ่มมากขึ้นทั้งฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน แต่ข้อมูลพื้นฐานซึ่งมีความสำคัญต่อการบริหารจัดการทรัพยากรปลิงทะเลชนิดนี้ยังไม่มี การศึกษาในประเทศไทย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม ยืนยันการจำแนกชนิด และตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลิงทะเลลูกบอลที่พบในน่านน้ำไทย โดยการวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน cytochrome c oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่าปลิงทะเลลูกบอล จาก ต. เกาะสาหร่าย อ. เมือง จ. สตูล (N = 15) อ่าวบ้านดอน อ. ท่าฉาง จ. สุราษฎร์ธานี (N = 15) และเกาะช้าง จ. ตรวด (N = 2) มีความหลากหลายของแฮพลไทป์สูง ($h = 0.675 \pm 0.089$) แต่มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ต่ำ ($\pi = 0.00192 \pm 0.00054$) ตัวอย่างปลิงทะเลทั้งหมดเป็นชนิดเดียวกัน คือ ชนิด *Phyllophorella kohkutiensis* มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (distance measure = Kimura 2-parameter) ระหว่าง 0-1.07% สอดคล้องกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลิงทะเลลูกบอลกับปลิงทะเลชนิดอื่นโดยการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ maximum parsimony และ neighbor-joining ที่จัดปลิงทะเลลูกบอลอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด

คำสำคัญ : ปลิงทะเลลูกบอล ; *Phyllophorella kohkutiensis* ; น่านน้ำไทย ; COI



Abstract

Ball sea cucumbers (*Phyllophorella kohkutiensis*) were originally found in Thailand. They have been increasingly fishing from both the Gulf of Thailand and the Andaman Sea. Nevertheless, basic knowledge essentially required for the species management has never been reported in Thailand. This study aimed to investigate genetic diversity, confirm the species identification and examine phylogenetic relationships of ball sea cucumbers in Thai waters, by analyzing DNA sequence variation at cytochrome c oxidase subunit I in mitochondrial DNA. The results suggested that ball sea cucumbers from Tumbon Koh Sarai, Amphur Muang, Satun Province (N = 15), Ban Don Bay, Amphur Tha Chang, Surat Thani Province (N = 15) and Koh Chang, Trat Province (N = 2) showed high haplotype diversity ($h = 0.675 \pm 0.089$) but their nucleotide diversity was low ($\pi = 0.00192 \pm 0.00054$). All ball sea cucumbers were the same species which was *Phyllophorella kohkutiensis*. Pairwise genetic distances between sea cucumber samples (distance measure = Kimura 2-parameter) were ranging from 0-1.07%. This is consistent with phylogenetic analysis between ball sea cucumbers and other sea cucumber species. Phylogenetic trees based on maximum parsimony and neighbor-joining methods showed that ball sea cucumbers were clustered within a single clade.

Keywords : ball sea cucumber ; *Phyllophorella kohkutiensis* ; Thai waters ; COI



บทนำ

ปลิงทะเลลูกบอล (*Phyllophorella kohkutiensis* Heding & Panning, 1954) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล จัดอยู่ในไฟลัม Echinodermata ชั้น Holothuroidea อันดับ Dendrochirotida วงศ์ Phyllophoridae ปลิงทะเลในวงศ์นี้มีการรายงานในประเทศไทยทั้งหมด 13 ชนิด (Putchakarn *et al.*, 2017) ปลิงทะเลลูกบอลพบครั้งแรกบริเวณเกาะภูเก็ต จ. ตราด ในปี พ.ศ. 2443 ในรัชสมัยพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าฯ และตีพิมพ์เป็นชนิดใหม่ของโลกในปี พ.ศ. 2497 (Heding & Panning, 1954) ปลิงทะเลชนิดนี้พบแพร่กระจายทั่วไปในทะเลจีนใต้ตั้งแต่อำเภอตงเกี๋ย (Liao & Pawson, 2001) ประเทศเวียดนาม (Cherbonnier, 1961) เกาะภูเก็ต อำเภอไทย (Heding & Panning, 1954) ลงไปทางทิศใต้จนถึงประเทศสิงคโปร์ (Ong *et al.*, 2016) และในทะเลอันดามันพบตั้งแต่จังหวัดระนองลงไปจนถึงจังหวัดสตูล (S. Putchakarn, personal communication, October 9, 2020) ปลิงทะเลลูกบอลมักพบฝังตัวอยู่ตามพื้นในหาดโคลนถึงโคลนปนทราย แหล่งหญ้าทะเล และป่าชายเลนที่มีความเค็มสูง (Heding & Panning, 1954) ปลิงทะเลลูกบอลมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศเช่นเดียวกับสัตว์ในกลุ่มปลิงทะเลชนิดอื่น โดยทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายตะกอนสารอินทรีย์ในระบบนิเวศให้มีขนาดเล็กลง ทำให้แบคทีเรียและผู้ย่อยสลายอื่น ๆ นำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น (Uthicke *et al.*, 2009) นอกจากนี้แล้วปลิงทะเลลูกบอลยังมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นอาหาร สกัดเป็นยารักษาโรค และเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในปัจจุบันการทำประมงปลิงทะเลลูกบอลมีเพิ่มมากขึ้นทั้งในฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน โดยเฉพาะในพื้นที่จังหวัดชายฝั่งทะเลของไทย เช่น จ. สุราษฎร์ธานี และ จ. สตูล เป็นต้น ดังที่เห็นจากข่าวการลักลอบเข้ามาจับปลิงทะเลลูกบอลอย่างต่อเนื่องโดยชาวประมงจากประเทศเพื่อนบ้าน (S. Putchakarn, personal communication, October 9, 2020) รวมถึงการดัดแปลงเครื่องมือทำการประมงประเภทคราดติดกับเรือประมงพาณิชย์ ซึ่งเป็นการใช้เครื่องมือประมงที่ผิดกฎหมายในการลักลอบจับปลิงทะเลลูกบอลในพื้นที่ชายฝั่ง 3 ไมล์ทะเล ดังที่เป็นข่าวในพื้นที่ของ จ. สตูล เป็นต้น (Department of Marine and Coastal Resources, 2020) การใช้ประโยชน์จากปลิงทะเลลูกบอลมีทั้งในรูปแบบของปลิงทะเลสดและการแปรรูปเป็นปลิงทะเลตากแห้ง โดยปลิงทะเลที่จับได้ส่วนมากจะถูกส่งเป็นสินค้าส่งออกต่างประเทศ ส่วนปลิงทะเลที่เหลือจากการส่งออกจะใช้บริโภคในครัวเรือน แม้ว่าปลิงทะเลลูกบอลจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง แต่ผลผลิตของปลิงทะเลลูกบอลมีปริมาณไม่ชัดเจนและไม่มีการบันทึกจำนวนปลิงทะเลที่มีการส่งออก (S. Putchakarn, personal communication, October 9, 2020)

การเพิ่มขึ้นของการทำประมงปลิงทะเลลูกบอลในประเทศไทยทำให้การจัดจำแนกชนิดปลิงทะเลอย่างถูกต้องมีความจำเป็นต่อการบริหารจัดการและการอนุรักษ์ทรัพยากรปลิงทะเลชนิดนี้เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน การจัดจำแนกชนิดปลิงทะเลโดยวิธีอนุกรมวิธานอาศัยการศึกษาสัณฐานวิทยา เช่น จำนวนหนวด ลักษณะวงแหวนหินปูน (calcareous ring) และตำแหน่งของเท้าเทียม (tube feet) ร่วมกับการศึกษาลักษณะของออสซิเคิล (ossicles) หรือเกล็ดหินปูนที่พบบริเวณผนังลำตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการศึกษาลักษณะของออสซิเคิลเป็นวิธีการที่ใช้เวลานานและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ (Madduppa *et al.*, 2017) การจัดจำแนกชนิดโดยวิธีอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมมีความไม่แน่นอนและประสบปัญหาบ่อยครั้งเนื่องมาจากลักษณะทางอนุกรมวิธานที่ใช้ในการจัดจำแนกมีความซับซ้อน ลักษณะทางอนุกรมวิธานบางลักษณะมีความหลากหลายสูง เช่น จำนวนหนวดในสกุล *Phyrella* (Michonneau & Paulay, 2014) และอาจมีชื่อเรียกได้หลายแบบขึ้นอยู่กับผู้เชี่ยวชาญในการจำแนกชนิด อีกทั้งในบางการศึกษาอาศัยการจำแนกจากลักษณะทางอนุกรมวิธานเพียงลักษณะเดียว เช่น การจำแนกในระดับวงศ์และสกุลของปลิงทะเลในอันดับ Dendrochirotida (Michonneau & Paulay, 2014) เป็นต้น การ



จำแนกชนิดตัวอย่างในระยะวัยอ่อน (juvenile) และระยะที่เป็นแพลงก์ตอนตัวคราว (meroplanktonic larva) ทำได้ยากกว่าปกติและคู่มือในการจำแนกชนิดมีน้อยมาก (Laakmann *et al.*, 2016) การศึกษาสัณฐานวิทยาจากตัวอย่างที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ทำได้ยากเพราะตัวอย่างไม่สมบูรณ์ เช่น ปลิงทะเลในอันดับ Aspidochirotida และ Dendrochirotida (Byrne *et al.*, 2010; Michonneau & Paulay, 2014) และการจำแนกชนิดโดยวิธีอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมจากสัณฐานวิทยาและลักษณะของออสซิเคิลใช้แยกชนิดซ่อนเร้น (cryptic species) ไม่ได้ (บทนำใน Byrne *et al.*, 2010) ในปัจจุบันจึงมีการทบทวนการจัดจำแนกชนิดปลิงทะเลโดยการศึกษาการจัดจำแนกชนิดด้วยวิธีอนุกรมวิธานร่วมกับการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น การทบทวนการจัดจำแนกชนิดปลิงทะเลในสกุล *Phyrella* (Michonneau & Paulay, 2014)

ประเทศไทยยังขาดข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่ใช้ในการประเมินสถานภาพเบื้องต้นของปลิงทะเลลูกบอลในธรรมชาติ เช่น นิเวศวิทยาการแพร่กระจาย ชีววิทยาการสืบพันธุ์ และข้อมูลพันธุกรรมในระดับชนิดและประชากร ในประเทศสิงคโปร์มีการจัดสถานะของปลิงทะเลลูกบอลในสกุลเดียวกัน (*Phyllophorella*) ชนิด *Phyllophorella spiculata* (Tennis-ball sea cucumber) ว่าเกือบอยู่ในข่ายใกล้การสูญพันธุ์ (vulnerable) ตามบัญชีแดงของประเทศสิงคโปร์ (The Singapore Red Data Book) โดยสาเหตุหลักมาจากการทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยโดยการบุกเบิกพื้นที่หรือกิจกรรมของมนุษย์ตลอดแนวชายฝั่งซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศที่ปลิงทะเลอยู่อาศัย (Davison *et al.*, 2008) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม ยืนยันการจำแนกชนิดและตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลิงทะเลลูกบอลที่พบในน่านน้ำไทย โดยการวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ยีน COI นิยมใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรสัตว์ (Hebert *et al.*, 2003) ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI มีความหลากหลายในระดับที่เหมาะสมต่อการจำแนกชนิดสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลในไฟลัม Echinodermata (ได้แก่ ดาวขนนก ดาวทะเล ดาวเปราะ เม่นทะเล เม่นหัวใจ เหยี่ยวทะเล และปลิงทะเล) (Laakmann *et al.*, 2016) จากรายงานการศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์ของสัตว์ในกลุ่มปลิงทะเล (ชั้น Holothuroidea) ที่มีมาก่อนหน้านี้พบว่ายีน COI มีคุณสมบัติเหมาะสมในการศึกษาการจัดจำแนกชนิด การค้นพบชนิดซ่อนเร้น (cryptic species) การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Arndt *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 2010; Michonneau & Paulay, 2014; Miller *et al.*, 2017) และการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (Skillings *et al.*, 2014; Soliman *et al.*, 2016)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปลิงทะเลลูกบอลจำนวน 32 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 – มกราคม พ.ศ. 2563 จากพื้นที่ ต. เกาะสาหร่าย อ. เมือง จ. สตูล จำนวน 3 สถานี ๆ ละ 5 ตัวอย่าง อ่าวบ้านดอน อ. ท่าฉาง จ. สุราษฎร์ธานี จำนวน 3 สถานี ๆ ละ 5 ตัวอย่าง และช่องเกาะช้าง ระหว่างอ่าวตราดของแผ่นดินใหญ่กับเกาะช้าง จ. ตราด จำนวน 1 สถานี 2 ตัวอย่าง เพื่อการศึกษาวิเคราะห์ทางพันธุกรรม โดยตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของปลิงทะเลบริเวณเท้าเทียม (tube feet) ความยาวประมาณ 0.5 - 1 เซนติเมตร แล้วนำไปเก็บรักษาในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute ethanol) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างปลิงทะเลลูกบอลจากการศึกษานี้ผ่านการจัดจำแนกชนิดว่าเป็นปลิงทะเลลูกบอลชนิด *Phyllophorella kohkutiensis* จากผู้เชี่ยวชาญ (ดร. สุเมตต์ ปลูกฉากร นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล



มหาวิทยาลัยบูรพา โดยใช้เอกสารจัดจำแนกชนิดของ Heding & Panning (1954) และ Ong *et al.* (2016) การจัดจำแนกชนิดดูจากอวัยวะภายนอกและภายใน ลักษณะและจำนวนหนวด ลักษณะวงแหวนหินปูน (calcareous ring) ตำแหน่งของเท้าเทียม (tube feet) และลักษณะของออสซิเคิล (ossicles) ที่บริเวณผิวหนังตามลำตัวส่วนต่าง ๆ ของปลิงทะเล

2. การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์จำนวน 32 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอ เริ่มจากการตัดชิ้นของเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy kit (Qiagen) ที่ออกแบบมาเพื่อสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสัตว์และปฏิบัติตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอดังที่แนบไว้ในชุดสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากยีนบริเวณ mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) ขนาด 690 bp ซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมในการศึกษาการจำแนกชนิดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลิงทะเล (Arndt *et al.*, 1996) โดยใช้ไพรเมอร์ COIe-F: ATAATGATAGCGGRTTTGG และ COIe-R: GCTCGTGTRTCTACRTCCAT (Arndt *et al.*, 1996) การขยายปริมาณดีเอ็นเอใช้วิธีการใน Wen *et al.* (2011) โดยในปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งมีปริมาตรรวม 50 μ L ประกอบด้วย 100 μ M dNTP (2 μ L), 1xPCR buffer (5 μ L), 0.2 μ M primer (1 μ L), 1.5 mM $MgCl_2$ (1.5 μ L), 2 unit Taq DNA polymerase (0.4 μ L) และ 1 μ g template DNA (1 μ L)

ขั้นตอนในปฏิกิริยา PCR อ้างอิงจาก Wen *et al.* (2011) โดยเริ่มจากการแยกสายดีเอ็นเอในช่วงเริ่มต้น (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 40 รอบของการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที การจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสายเดี่ยว (annealing) ที่ 50 °C เป็นเวลา 30 วินาที (บางตัวอย่างไม่เกิดผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) ที่อุณหภูมินี้ จึงใช้อุณหภูมิ 42 °C แทน ซึ่งได้จากการตรวจหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมด้วยการทำ PCR gradient ที่กำหนดให้มีอุณหภูมิ annealing ในช่วง 42 °C จนถึง 52 °C) และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (extension) ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที ปิดท้ายขั้นตอนด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

ทำผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำผลผลิตดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ QIAquick PCR purification kit (Qiagen) และนำผลผลิตดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ส่งไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริษัท Macrogen Inc. กรุงโซล ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้วิธี standard sequencing

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลิงทะเลลูกบอล 32 ตัวอย่าง ด้วยสายตาเพื่อยืนยันความถูกต้องของการอ่านค่านำผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างจาก forward และ reverse ไพรเมอร์มาเปรียบเทียบและรวมกันเป็นเส้นเดียว (sequence assembly) โดยใช้โปรแกรม CAP3 (Huang & Madan, 1999, <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) จากนั้นจึงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) รวมถึงเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ของปลิงทะเลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.1 ความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรม

ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลิงทะเลลูกบอลทั้งหมดโดยการคำนวณ จำนวนแฮพลไทป์ (H), ค่าความหลากหลายของแฮพลไทป์และนิวคลีโอไทด์ (haplotype diversity, h และ nucleotide diversity, π) ตำแหน่งที่



แสดงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (segregating/polymorphic sites, S) และ average number of nucleotide differences (K) โดยใช้โปรแกรม DnaSP 6.12.01 (Rozas *et al.*, 2017) ตรวจสอบและเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลิงทะเลลูกบอลบริเวณเกาะสาหร่าย จ. สตูล อ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะช้าง จ. ตรวด วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรเกาะสาหร่าย อ่าวบ้านดอน และเกาะช้าง โดยการคำนวณค่า pairwise F_{ST} (distance method: pairwise difference) ด้วยโปรแกรม Arlequin ver 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005)

3.2 ระยะห่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

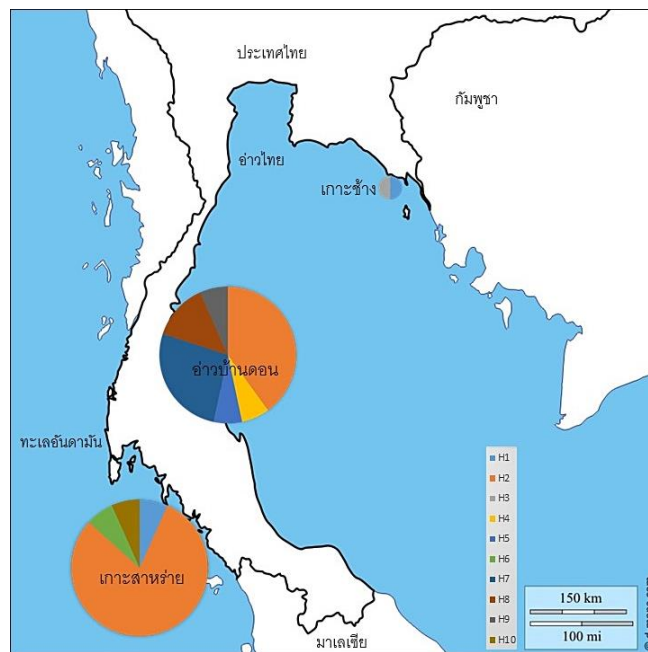
ตรวจสอบระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างปลิงทะเลลูกบอล โดยการคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ของตัวอย่าง (pairwise genetic distance, distance measure = Kimura 2-parameter) โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta 10 (Swofford, 2002) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships) ของปลิงทะเลลูกบอลและปลิงทะเลชนิดอื่น ๆ จากการสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ใกล้เคียงกับปลิงทะเลลูกบอลในการศึกษานี้ โดยการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) แบบ maximum parsimony (MP) และ distance-based neighbor joining (NJ) สำหรับการสร้างแผนผังฯ แบบ MP เริ่มจากการค้นหาแผนผังฯ ที่ดีที่สุดโดยวิธี heuristic search แบบ simple sequence addition โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta 10 (Swofford, 2002) แผนผังฯ แบบ MP ในช่วงเริ่มต้นสร้างโดยวิธี stepwise addition และ branches swapped โดยการทำ tree-bisection-reconnection (TBR) ยืนยันผลการสร้างแผนผังฯ ด้วยค่าความเชื่อมั่นทางสถิติจากวิธี bootstrapping จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta 10 (Swofford, 2002) สำหรับแผนผังฯ แบบ NJ การจัดทำแผนผังฯ เริ่มจากการตรวจสอบหาโมเดลของ DNA substitution ที่เหมาะสมกับข้อมูลโดยใช้โปรแกรม MODELTEST 3.06 (Posada & Crandall, 1998) และสร้างแผนผังฯ โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta 10 (Swofford, 2002) จากนั้นจึงยืนยันผลการสร้างแผนผังฯ ด้วยวิธีการเดียวกับการสร้างแผนผังฯ แบบ MP

ผลการวิจัย

จากการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลิงทะเลลูกบอลบริเวณยีน COI จำนวน 32 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI มีขนาด 658 bp จำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 10 รูปแบบ (10 แฮปโลไทป์) แทนด้วย H1 ถึง H10 แฮปโลไทป์ที่พบมากที่สุด คือ H2 พบในปลิงทะเล 18 ตัวอย่าง (12 ตัวอย่าง จากเกาะสาหร่าย จ. สตูล และ 6 ตัวอย่าง จากอ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี, ตารางที่ 1) แฮปโลไทป์ที่พบรองลงมา คือ H7 พบในปลิงทะเล 4 ตัวอย่างจากอ่าวบ้านดอนทั้งหมด แฮปโลไทป์ H1 พบในปลิงทะเล 2 ตัวอย่างจากเกาะสาหร่ายและเกาะช้าง จ. ตรวด แฮปโลไทป์ H8 พบในปลิงทะเล 2 ตัวอย่างจากอ่าวบ้านดอนทั้งหมด แฮปโลไทป์อื่น ๆ (H3 ถึง H6, H9 และ H10) พบในปลิงทะเล 1 ตัวอย่าง/แฮปโลไทป์ (การแพร่กระจายของแฮปโลไทป์ในแต่ละพื้นที่แสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1) ปลิงทะเลบริเวณเกาะสาหร่ายส่วนใหญ่ (80%) มีแฮปโลไทป์ H2 (ภาพที่ 1) สำหรับปลิงทะเลบริเวณอ่าวบ้านดอน 40% ของประชากรมีแฮปโลไทป์ H2 และ 27% เป็นแฮปโลไทป์ H7 นอกจากนี้ยังพบว่าแฮปโลไทป์ (พบตั้งแต่ 2 ตัวอย่างขึ้นไป) ที่พบเฉพาะในประชากรอ่าวบ้านดอน (ไม่พบในประชากรอื่น) ได้แก่ H7 และ H8 (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) สำหรับปลิงทะเลของเกาะช้างพบแฮปโลไทป์ H1 และ H3 อย่างละ 50% (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 การแพร่กระจายของแฮปโลไทป์ของปลิงทะเลลูกบอล (H1 ถึง H10) ในแต่ละพื้นที่ เก็บตัวอย่าง ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละพื้นที่

แฮปโลไทป์	จำนวนตัวอย่าง		
	เกาะสาหร่าย (15)	อ่าวบ้านดอน (15)	เกาะช้าง (2)
H1	1	0	1
H2	12	6	0
H3	0	0	1
H4	0	1	0
H5	0	1	0
H6	1	0	0
H7	0	4	0
H8	0	2	0
H9	0	1	0
H10	1	0	0



ภาพที่ 1 การแพร่กระจายของแฮปโลไทป์ (H1 ถึง H10) ที่พบในปลิงทะเลลูกบอลจากบริเวณเกาะช้าง จ. ตรัง อ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะสาหร่าย จ. สตูล ความถี่ของแต่ละแฮปโลไทป์ที่พบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ในแผนภูมิรูปวงกลม ขนาดของแผนภูมิเป็นสัดส่วนกับขนาดของประชากร (จำนวนตัวอย่างปลิงทะเล)



เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 10 แฮปโลไทป์ พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ที่แสดงความแตกต่างกัน 13 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) ซึ่งเกิดจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์แบบ transition และ transversion เมื่อเปรียบเทียบระหว่างคู่ของแฮปโลไทป์พบว่ามี ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2 - 4 ตำแหน่ง

ตารางที่ 2 ตำแหน่งความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymorphic sites) บริเวณยีน cytochrome c oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (COI) จำนวน 13 ตำแหน่ง เปรียบเทียบระหว่างแฮปโลไทป์ของปลิงทะเลลูกบอล (H1 ถึง H10) ตัวเลขบนลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ (ขนาด 658 bp) เครื่องหมาย . แสดงนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันกับแฮปโลไทป์ H1

แฮปโลไทป์	ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์												
	0	1	1	1	3	3	3	4	4	4	5	5	5
	1	3	5	8	2	3	4	5	9	9	3	3	5
	5	5	0	0	1	1	8	3	5	8	1	9	5
H1	C	T	C	C	T	T	C	T	A	C	T	T	C
H2	T	T
H3	A	C	.	T	T
H4	T	.	T	.	.	.	T
H5	C	.	T	T
H6	C	T	T
H7	.	.	T	.	.	.	T	T
H8	T	.	.	.	C	.	T
H9	T	C	T
H10	T	C	T

การศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลิงทะเลลูกบอลที่พบบริเวณเกาะสาหร่าย จ. สตูล อำเภอบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะช้าง จ. ตรัง กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลิงทะเลบริเวณยีน COI ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ปลิงทะเลลูกบอลมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันกับปลิงทะเล *Phyrella mookiei* (accession number KX874346) มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ Max Score = 776, Query Cover = 99% และ Percent Identity = 87.71%

ความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรม

เมื่อคำนวณความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลิงทะเลลูกบอลบริเวณยีน COI ซึ่งมีขนาด 658 bp พบว่า มีตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymorphic sites) จำนวน 13 ตำแหน่ง พบแฮปโลไทป์ (H) จำนวน 10 แฮปโลไทป์ ค่าความหลากหลายของแฮปโลไทป์ (haplotype diversity, h) มีค่าเท่ากับ 0.675 ± 0.089 ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity, π) มีค่าเท่ากับ 0.00192 ± 0.00054 ค่า average number of nucleotide differences (K) มีค่าเท่ากับ 1.260 เมื่อคำนวณความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลิงทะเลลูกบอลในแต่ละประชากรตาม



พื้นที่ศึกษา พบว่าค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลิงทะเลบริเวณเกาะช้าง จ. ตราด มีค่าสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ อ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะสาหร่าย จ. สตูล ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ จำนวนแฮพโลไทป์ (H), ความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (h), ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (π) ตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (S) และ average number of nucleotide differences (K) ของประชากรปลิงทะเลลูกบอลบริเวณเกาะสาหร่าย จ. สตูล เปรียบเทียบกับประชากรอ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะช้าง จ. ตราด

ประชากร	N	H	h	π	S	K
เกาะสาหร่าย	15	4	0.371 ± 0.153	0.00081 ± 0.00039	4	0.533
อ่าวบ้านดอน	15	6	0.790 ± 0.079	0.00162 ± 0.00029	5	1.067
เกาะช้าง	2	2	1.000 ± 0.500	0.00608 ± 0.00304	4	4.000
รวม	32	10	0.675 ± 0.089	0.00192 ± 0.00054	13	1.260

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรเกาะสาหร่าย จ. สตูล อ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะช้าง จ. ตราด โดยการคำนวณค่า population pairwise F_{ST} (distance method: pairwise difference) พบว่าประชากรจากเกาะช้างแสดงความแตกต่างกับประชากรเกาะสาหร่ายและอ่าวบ้านดอนอย่างมีนัยสำคัญ ($F_{ST} = 0.76828, p = 0.01855 \pm 0.0046$ และ $F_{ST} = 0.68498, p = 0.00391 \pm 0.0019$ ตามลำดับ, number of permutations = 1,023) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่า population pairwise F_{ST} (distance method: Pairwise difference) (ในตารางซ้าย-ล่าง) และค่า F_{ST} P-value (ในตารางขวา-บน) ที่ได้จากการเปรียบเทียบระหว่างคู่ของประชากรจากเกาะสาหร่าย จ. สตูล อ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะช้าง จ. ตราด

	เกาะสาหร่าย	อ่าวบ้านดอน	เกาะช้าง
เกาะสาหร่าย	-	0.06250 ± 0.0074	0.01855 ± 0.0046
อ่าวบ้านดอน	0.07692	-	0.00391 ± 0.0019
เกาะช้าง	0.76828	0.68498	-

ระยะห่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (pairwise genetic distance, distance measure = Kimura 2-parameter) ระหว่างตัวอย่างปลิงทะเลลูกบอลมีค่าอยู่ระหว่าง 0% (พบในการเปรียบเทียบภายในตัวอย่างของ (1) เกาะสาหร่าย และ (2) อ่าวบ้านดอน และการเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างจาก (1) เกาะสาหร่ายกับเกาะช้าง และ (2) เกาะสาหร่ายกับอ่าวบ้านดอน) ถึง

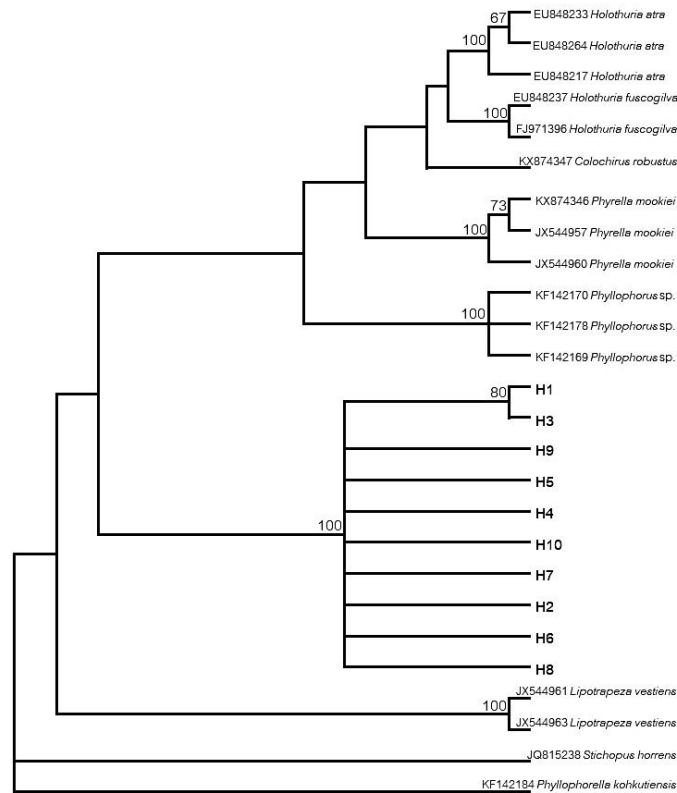


1.07% (พบในการเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างจาก (1) เกาะช้างกับอ่าวบ้านดอน และ (2) เกาะช้างกับเกาะสาหร่าย) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (pairwise genetic distance, distance measure = Kimura 2-parameter) ภายในประชากรเกาะสาหร่าย จ. สตูล อ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะช้าง จ. ตรวด (ตัวเลขในวงเล็บ) และระหว่างประชากร ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์

	เกาะสาหร่าย	อ่าวบ้านดอน	เกาะช้าง
เกาะสาหร่าย	(0)	0-0.46	0-1.07
อ่าวบ้านดอน	-	(0)	0.31-1.07
เกาะช้าง	-	-	(0.61)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณยีน COI ของปลิงทะเลลูกบอลจำนวน 10 แสโพลไทป์กับปลิงทะเลชนิดอื่น ๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 1 ลำดับฯ ได้แก่ ปลิงทะเลจากวงศ์ Phyllophoridae ชนิด *Phyrella mookiei* จำนวน 3 ลำดับฯ (accession numbers KX874346, JX544960 และ JX544957) ชนิด *Lipotrapeza vestiens* จำนวน 2 ลำดับฯ (accession numbers JX544961 และ JX544963) ชนิด *Phyllophorus* sp. จำนวน 3 ลำดับฯ (accession numbers KF142170, KF142169 และ KF142178) ปลิงทะเลจากวงศ์ Cucumariidae ชนิด *Colochirus robustus* จำนวน 1 ลำดับฯ (accession number KX874347) ปลิงทะเลจากวงศ์ Holothuriidae ชนิด *Holothuria atra* จำนวน 3 ลำดับฯ (accession numbers EU848264, EU848233 และ EU848217) และ *H. fuscogilva* จำนวน 2 ลำดับฯ (accession numbers EU848237 และ FJ971396) และปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* จำนวน 1 ลำดับฯ (accession number KF142184) โดยการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ maximum parsimony (total character = 618, parsimony informative character = 183) root ด้วย outgroup คือ ปลิงทะเลจากวงศ์ Stichopodidae (มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลิงทะเลในวงศ์ Phyllophoridae, Cucumariidae และ Holothuriidae ที่เป็น ingroup) ชนิด *Stichopus horrens* (accession number JQ815238) พบแผนผังฯ ที่ดีที่สุดจากวิธีการค้นหาแบบ heuristic จำนวน 8 แผนผังฯ โดยแผนผังฯ แบบ 50% majority-rule consensus ของ 8 แผนผังฯ แสดงในภาพที่ 2 จากแผนผังฯ พบว่าปลิงทะเลลูกบอลทั้งหมดในการศึกษานี้จัดอยู่ในกลุ่ม (clade) เดียวกัน แยกจากปลิงทะเลชนิดอื่นอย่างชัดเจน โดยมีค่าความเชื่อมั่นสูงจาก bootstrap support 100% กลุ่มของปลิงทะเลลูกบอลในการศึกษานี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มของปลิงทะเลชนิด *Phyllophorus* sp., *Phyrella mookiei*, *Colochirus robustus*, *Holothuria fuscogilva* และ *Holothuria atra* แต่มีค่าความเชื่อมั่นต่ำจาก bootstrap support น้อยกว่า 50% (ภาพที่ 2) จากแผนผังฯ ปลิงทะเลชนิดเดียวกัน (*Phyllophorus* sp., *Phyrella mookiei*, *Holothuria fuscogilva*, *Holothuria atra* และ *Lipotrapeza vestiens*) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันแยกจากกลุ่มของปลิงทะเลชนิดอื่นด้วยค่าความเชื่อมั่นสูง (bootstrap support 100%) ยกเว้นปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* (accession number KF142184) ที่ไม่รวมอยู่ในกลุ่มของปลิงทะเลลูกบอลในการศึกษานี้ (H1-H10) และมีตำแหน่งอยู่บริเวณฐานของแผนผังฯ

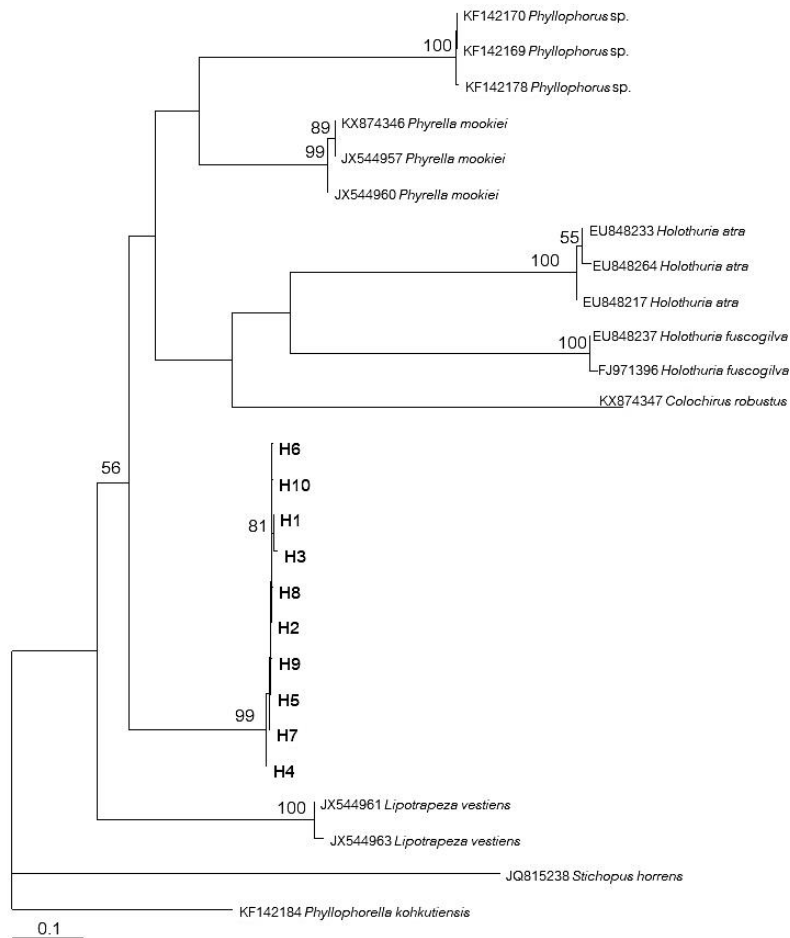


ภาพที่ 2 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ Maximum Parsimony (50% majority-rule consensus of 8 trees) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแฮปโลไทป์ของปลิงทะเลลูกบอล (H1 ถึง H10) และปลิงทะเลชนิดอื่นจากฐานข้อมูล GenBank (แทนด้วย accession number ตามด้วยชื่อชนิดของปลิงทะเล) ตัวเลขบนแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงค่า bootstrap support ที่มากกว่า 50% จากการวิเคราะห์ 1,000 ครั้ง แผนผังฯ root ด้วย outgroup คือ ปลิงทะเลชนิด *Stichopus horrens*

จากการวิเคราะห์ข้อมูลแฮปโลไทป์ของปลิงทะเลลูกบอลที่พบในน่านน้ำไทยกับปลิงทะเลชนิดอื่น ๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันจากฐานข้อมูล GenBank โดยมี outgroup คือ ปลิงทะเลชนิด *Stichopus horrens* พบว่าโมเดลของ DNA substitution ที่เหมาะสมที่สุดจากการคัดเลือกด้วยการใช้โปรแกรม Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) โดยการคัดเลือกด้วยวิธี hierarchical likelihood ratio tests (hLRT) คือ TrN+G (Tamura & Nei, 1993) ซึ่งมีค่า nucleotide frequencies A = 0.3665, C = 0.2631, G = 0.1261 และ T = 0.2444 gamma correction = 0.1388 สำหรับการคัดเลือกโดยวิธี Akaike information criterion (AIC) โมเดลที่เหมาะสมที่สุด คือ GTR+I+G (Rodriguez *et al.*, 1990) ซึ่งมีค่า nucleotide frequencies A = 0.3266, C = 0.2726, G = 0.1805 และ T = 0.2203 frequency of invariable sites = 0.5551 gamma correction = 1.0519 จากแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างโดยวิธี distance-based neighbor-joining พบว่าแผนผังฯ ที่สร้างขึ้นโดยใช้โมเดลทั้งสองโมเดลที่กล่าวมาข้างต้นมีลักษณะไม่แตกต่างกัน โดยในที่นี้จะแสดงแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างโดยการใช้โมเดล TrN+G (ภาพที่ 3) จากแผนผังฯ ปลิงทะเลลูกบอลทั้งหมดในการศึกษานี้



จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน มีค่าความเชื่อมั่นสูงจาก bootstrap support 99% กลุ่มของปลิงทะเลลูกบอลในการศึกษานี้ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มของปลิงทะเลชนิด *Phyllophorus* sp., *Phyrella mookiei*, *Colochirus robustus*, *Holothuria fuscogilva* และ *Holothuria atra* แต่มีค่าความเชื่อมั่นต่ำจาก bootstrap support 56% จากแผนผังฯ ปลิงทะเลชนิดเดียวกัน (*Phyllophorus* sp., *Phyrella mookiei*, *Holothuria fuscogilva*, *Holothuria atra* และ *Lipotrapeza vestiens*) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันแยกจากกลุ่มของปลิงทะเลชนิดอื่นด้วยค่าความเชื่อมั่นสูง (bootstrap support 99-100%) ยกเว้นปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* (accession number KF142184) ที่ไม่รวมอยู่ในกลุ่มของปลิงทะเลลูกบอลในการศึกษานี้ และมีตำแหน่งอยู่บริเวณฐานของแผนผังฯ



ภาพที่ 3 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสร้างโดยวิธี distance-based neighbor-joining โมเดลที่ใช้คือ TrN+G แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแฮปโลไทป์ของปลิงทะเลลูกบอล (H1 ถึง H10) และปลิงทะเลชนิดอื่นจากฐานข้อมูล GenBank (แทนด้วย accession number ตามด้วยชื่อชนิดของปลิงทะเล) ตัวเลขบนแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงค่า bootstrap support ที่มากกว่า 50% จากการวิเคราะห์ 1,000 ครั้ง แผนผังฯ root ด้วย outgroup คือ ปลิงทะเลชนิด *Stichopus horrens*



วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลิงทะเลลูกบอลในพื้นที่เกาะสาหร่าย จ. สตูล อ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะช้าง จ. ตรัง โดยการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน COI ซึ่งมีขนาด 658 bp โดยภาพรวมปลิงทะเลลูกบอลมีความหลากหลายของแฮพลไทป์สูง (haplotype diversity, $h = 0.675$) แต่มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ต่ำ (nucleotide diversity, $\pi = 0.00192$) สอดคล้องกับรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบบริเวณยีน COI ในรายงานการศึกษาปลิงทะเลชนิดอื่นที่มีมาก่อนหน้านี้ (Soliman *et al.*, 2016) เช่น ปลิงทะเล *Holothuria edulis* ในบริเวณชายฝั่งทางตะวันตกและตะวันออกของเกาะโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น ($h = 0.59-0.77$, $0.25-0.54$ และ $\pi = 0.0015-0.0039$, $0.0022-0.0034$ สำหรับประชากรทางตะวันตกและตะวันออก ตามลำดับ) (Soliman *et al.*, 2016) และปลิงทะเลในสกุล *Holothuria* ชนิดอื่น เช่น *H. mammata*, *H. polii*, *H. arguinensis*, *H. atra* และ *H. whitmaei* (วิเคราะห์ผลการศึกษาใน Soliman *et al.*, 2016) เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากร พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเกาะช้างมีค่ามากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ประชากรอ่าวบ้านดอนและเกาะสาหร่ายตามลำดับ ผลการศึกษาอาจแสดงให้เห็นถึงสถานภาพของประชากรเกาะช้างที่อาจมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจริงหรืออาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างจากเกาะช้างมีจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรอื่น จึงไม่สามารถนำมาคำนวณเพื่อประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แท้จริงของประชากรได้ การตรวจพบความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำของประชากรเกาะสาหร่ายอาจเป็นผลจากการที่ประชากรส่วนมากเปลี่ยนรูปแบบการสืบพันธุ์ จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) เป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ทำให้การแลกเปลี่ยนของยีน (gene flow) ในประชากรลดน้อยลง เช่นเดียวกันกับสมมุติฐานในการเปลี่ยนรูปแบบการสืบพันธุ์ของปลิงทะเล *Holothuria edulis* บริเวณเกาะโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น จนทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรลดน้อยลง ทั้งนี้เนื่องมาจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น การพัฒนาพื้นที่ชายฝั่งซึ่งไปทำลายระบบนิเวศ และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลหลายชนิด (Soliman *et al.*, 2016) จากรายงานการศึกษากิจการจัดการทรัพยากรประมงชายฝั่งของชุมชนชาวประมงพื้นบ้านใน ต. เกาะสาหร่าย อ. เมือง จ. สตูล โดย Jussapalo (2016) พบว่าชุมชนมีปัญหาและอุปสรรคในการจัดการทรัพยากรประมงชายฝั่งหลายประการ เช่น สัตว์น้ำเศรษฐกิจมีปริมาณลดลง มีการใช้เครื่องมือผิดกฎหมาย มีการจับสัตว์น้ำวัยอ่อนหรือยังไม่ได้ขนาด และประชาชนส่วนใหญ่ขาดจิตสำนึกในเรื่องการอนุรักษ์ เป็นต้น สาเหตุที่ความหลากหลายของประชากรปลิงทะเลลูกบอลบริเวณเกาะสาหร่ายอยู่ในระดับต่ำจึงอาจเป็นผลกระทบมาจากปัญหาและอุปสรรคในการจัดการทรัพยากรประมงชายฝั่งของชุมชนในอดีตที่ผ่านมา แต่ในปัจจุบัน ผลจากงานวิจัยทำให้เกิดเครือข่ายในการจัดการทรัพยากรประมงชายฝั่ง โดยในปัจจุบันการจัดการทรัพยากรประมงชายฝั่งได้ผนวกเข้ากับการท่องเที่ยวเชิงอนุรักษ์ ทำให้เกิดแหล่งเรียนรู้และแหล่งทำกิจกรรมเพื่อฟื้นฟูทรัพยากรประมง (Jussapalo, 2016) อ่าวบ้านดอนเป็นอีกหนึ่งพื้นที่ที่ประสบปัญหาจากการบุกรุกพื้นที่ชายฝั่ง เนื่องจากมีการพัฒนาต่าง ๆ เข้ามาในพื้นที่อย่างรวดเร็ว เช่น การบุกรุกถางป่าชายเลนเพื่อทำนาเกลือแบบธรรมชาติ การเปลี่ยนสภาพนาข้าวเป็นบ่อเลี้ยงกุ้ง เป็นต้น ทำให้เกิดการทำลายป่าชายเลนซึ่งเป็นแหล่งอาศัยและแหล่งอนุบาลสัตว์น้ำ ผลจากงานวิจัยเพื่อท้องถิ่นในการฟื้นฟูทรัพยากรชีวภาพทางทะเลบริเวณพื้นที่อ่าวบ้านดอนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 เป็นต้นมา ทำให้ระบบนิเวศในพื้นที่อ่าวบ้านดอนค่อย ๆ ฟื้นตัวกลับมา ถึงแม้ว่าปัญหาของอ่าวบ้านดอนยังไม่หมดไปจากพื้นที่ แต่ผลจากงานวิจัยที่ผ่านมา ก็สามารถฟื้นฟูทรัพยากรให้กลับมาได้มาก (Community Based Research Division, 2017) พื้นที่ศึกษาทั้งสองบริเวณเคย



ประสบปัญหาการทำลายทรัพยากรธรรมชาติแต่ได้รับการฟื้นฟูแล้ว ดังนั้นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของทั้งสองบริเวณจึงไม่น่าจะแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังพบปัญหาการใช้เครื่องมือประมงที่ผิดกฎหมายในการลักลอบจับปลิงทะเลลูกบอลในพื้นที่เกาะสาหร่าย จ. สตูล ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศชายฝั่ง เช่น การทำลายทรัพยากรหญ้าทะเล ปะการัง สัตว์น้ำวัยอ่อน จำพวกปูและหอยชนิดต่าง ๆ ที่ฝังตัวและหากินบริเวณพื้นทรายใต้ทะเล (Department of Marine and Coastal Resources, 2020) และอาจมีผลกระทบต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลิงทะเลลูกบอลในพื้นที่เกาะสาหร่ายด้วยความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีค่าต่ำของประชากรเกาะสาหร่าย อาจแสดงถึงแนวโน้มของประชากรที่ต่อไปอาจมีขนาดเล็กลง ถ้าหากไม่มีการควบคุมการจับปลิงทะเลลูกบอล เมื่อประชากรมีขนาดเล็กและมีการผสมพันธุ์ภายในประชากร (inbreeding) มากกว่าการผสมพันธุ์ระหว่างประชากร อาจส่งผลกระทบต่ออัตราการสืบพันธุ์และการอยู่รอด และส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เนื่องมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ลดลง นอกจากนี้ยังส่งผลให้ความสามารถในการปรับตัวของประชากรเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปและการคงอยู่ของประชากรในระยะยาวลดลงด้วย

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลิงทะเลลูกบอลของเกาะช้าง จ. ตรัง (อ่าวไทยฝั่งตะวันออก) กับเกาะสาหร่าย จ. สตูล (ทะเลอันดามัน) และเกาะช้าง (อ่าวไทยฝั่งตะวันออก) กับอ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี (อ่าวไทยฝั่งตะวันตก) อาจอธิบายได้จากลักษณะทางชีววิทยาบางประการของปลิงทะเล (ชั้น Holothuroidea) ที่สนับสนุนการเกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากร เช่น ปลิงทะเลมีการเคลื่อนที่ต่ำในระยะตัวเต็มวัย การเข้าสู่ระยะสมบูรณ์เพศซ้ำ การสืบพันธุ์ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประชากร และอัตราการเพิ่มขึ้นของสมาชิกใหม่ในประชากรต่ำ (บทนำ ใน Skillings *et al.*, 2014) นอกจากนี้แล้ว ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรระหว่างเกาะช้างกับเกาะสาหร่าย และเกาะช้างกับอ่าวบ้านดอนอาจสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรระหว่างอ่าวไทยฝั่งตะวันออกกับทะเลอันดามัน และอ่าวไทยฝั่งตะวันออกกับอ่าวไทยฝั่งตะวันตก ที่มีการจำกัดการแพร่กระจายของประชากรจากสภาพทางภูมิศาสตร์และการไหลเวียนของกระแสน้ำ เช่นเดียวกับที่พบในสัตว์ทะเลชนิดอื่น ๆ เช่น ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอ่าวไทยฝั่งตะวันออกกับทะเลอันดามันที่ตรวจพบในหอยลาย (*Paphia undulata*) (Donrung *et al.*, 2011) ม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*) (Panithanarak *et al.*, 2010) ปลาเก๋า (*Epinephelus coioides*) (Antoro *et al.*, 2006) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Klinbunga *et al.*, 2001) และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอ่าวไทยฝั่งตะวันออกกับอ่าวไทยฝั่งตะวันตกที่ตรวจพบในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Klinbunga *et al.*, 2001; Tassanakajon, 2003; Khamnamtong *et al.*, 2009) และกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) (Wanna *et al.*, 2004) เป็นต้น ในทางตรงกันข้ามประชากรปลิงทะเลลูกบอลของเกาะสาหร่ายไม่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมกับประชากรอ่าวบ้านดอน ประชากรส่วนใหญ่ของเกาะสาหร่ายและอ่าวบ้านดอนมีแฮปโลไทป์เหมือนกัน แสดงว่ายังมีการแลกเปลี่ยนของยีนระหว่างทั้งสองประชากร ซึ่งอาจเกิดขึ้นในระยะที่เป็นแพลงก์ตอนชั่วคราว มีการศึกษาพบว่าปลิงทะเลบางชนิดมีระยะที่เป็นแพลงก์ตอนอยู่นาน 18-25 วัน (Laxminarayana, 2005) ซึ่งทำให้เกิดการแพร่กระจายและการขยายขอบเขตของการแพร่กระจายในระยะที่เป็นแพลงก์ตอนชั่วคราว (Skillings *et al.*, 2014) หรืออาจเป็นเพราะทั้งสองประชากรมีบรรพบุรุษหรือมีวิวัฒนาการร่วมกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น การยืนยันความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลิงทะเลลูกบอลในน่านน้ำไทยต้องมีการศึกษาตัวอย่างเพิ่มเติม ทั้งการเพิ่มจำนวนตัวอย่างต่อแหล่งที่พบ (อย่างน้อย 30 ตัวอย่างหากเป็นไปได้) และเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมให้ครอบคลุมพื้นที่ที่พบการแพร่กระจายของปลิงทะเลลูกบอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากบริเวณ



เกาะช้าง จ. ตรวด ซึ่งเป็นตัวแทนของประชากร่าวไทยฝั่งตะวันออก ประชากรเกาะช้างในการศึกษานี้มีจำนวนตัวอย่างน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจากพื้นที่อื่นจึงไม่สามารถนำมาคำนวณเพื่อประมาณความแตกต่างทางพันธุกรรมที่แท้จริงของประชากรได้ นอกจากนี้แล้ว ควรมีการศึกษาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอื่นเพิ่มเติม โดยคัดเลือกจากบริเวณที่พบความผันแปรในนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย

ปลิงทะเลลูกบอลมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI คล้ายกับปลิงทะเลชนิด *Phyrella mookiei* (accession number KX874346) มากที่สุด และมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* (accession number KF142184) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกัน จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความผิดพลาดในการจัดจำแนกชนิดปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* (accession number KF142184) ตัวอย่างนี้พบบริเวณตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศออสเตรเลียและเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ Museum of Victoria เมืองเมลเบิร์น รัฐวิกตอเรีย ประเทศออสเตรเลีย (Michonneau & Paulay, 2014) การพบตัวอย่างปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* บริเวณน่านน้ำของประเทศออสเตรเลียอยู่นอกขอบเขตการแพร่กระจายของปลิงทะเลชนิดนี้ซึ่งอ้างอิงจากรายงานการสำรวจที่ผ่านมา (Heding & Panning, 1954; Cherbonnier, 1961; Liao & Pawson, 2001; Ong *et al.*, 2016; S. Putchakarn, personal communication, October 9, 2020, รายละเอียดในบทสนทนา) โดยทั่วไป สันฐานวิทยาของปลิงทะเลชนิด *Phyrella mookiei* แตกต่างจากปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* โดยปลิงทะเล *Phyrella mookiei* ลำตัวมีลักษณะเป็นแท่งยาวค่อนข้างบาง ผนังลำตัวนิ่มและมีเท้าเทียมกระจายอยู่ทั่วลำตัวอย่างหนาแน่น มีสีเบจจนถึงสีชาควรมี (Michonneau & Paulay, 2014) ส่วนปลิงทะเลลูกบอล ลำตัวมีลักษณะกลมรีคล้ายพระจันทร์เสี้ยว เมื่อพองตัวจะมีรูปร่างกลมคล้ายลูกบอล ผนังลำตัวค่อนข้างหนาและลำตัวค่อนข้างแข็ง มีเท้าเทียมกระจายอยู่ทั่วลำตัว มีสีดำเข้มจนถึงสีน้ำตาลและมีสีขาวเป็นหย่อม ๆ (S. Putchakarn, personal communication, October 9, 2020)

การศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลิงทะเลลูกบอลจากเกาะสาหร่าย จ. สตูล อ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี และเกาะช้าง จ. ตรวด โดยการวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI พบว่าตัวอย่างปลิงทะเลลูกบอลทั้งหมดเป็นชนิดเดียวกัน คือ ชนิด *Phyllophorella kohkutiensis* มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดตั้งแต่ 0-1.07% ใกล้เคียงกับค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของปลิงทะเลที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ เช่น การศึกษาปลิงทะเลสกุล *Stichopus* พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำสุด 0% ในชนิด *S. chloronotus* และสูงสุด 1.2% ในชนิด *S. horrens* (Byrne *et al.*, 2010) จากรายงานการศึกษาค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของสัตว์ในกลุ่ม echinoderm (ได้แก่ ดาวขนนก ดาวทะเล ดาวเปราะ เม่นทะเล เม่นหัวใจ เหยี่ยวทะเล และปลิงทะเล) โดยภาพรวมพบค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าระหว่าง 0-3.04% (Ward *et al.*, 2008), < 2% (Corstorphine, 2010) และ 0-3.55% (Laakmann *et al.*, 2016) ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจากรายงานการศึกษาของสัตว์ในกลุ่ม echinoderm มีค่าสูงสุดมากกว่าค่าที่พบในปลิงทะเล ทั้งนี้เนื่องมาจากความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดของดาวเปราะ (ชั้น Ophiuroidea) มีค่าสูง (Ward *et al.*, 2008; Laakmann *et al.*, 2016) ผลการศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรมสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลิงทะเลลูกบอลกับปลิงทะเลชนิดอื่น ๆ โดยพบว่าปลิงทะเลลูกบอลจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ maximum parsimony และ neighbor-joining แสดงผลการศึกษาที่สอดคล้องกัน โดยพบว่าปลิงทะเลลูกบอลมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มของปลิงทะเลชนิด *Phyllophorus* sp., *Phyrella mookiei*, *Colochirus robustus*,



Holothuria fuscogilva และ *Holothuria atra* อย่างไรก็ตาม ค่าความเชื่อมั่นจากความสัมพันธ์ของปลิงทะเลลูกบอลในการศึกษานี้กับปลิงทะเลชนิดอื่นที่กล่าวมาข้างต้นมีค่าต่ำ (น้อยกว่า 50% และเท่ากับ 56% ตามลำดับ) จึงไม่อาจยืนยันความสัมพันธ์ได้ ปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* (accession number KF142184) ไม่รวมอยู่ในกลุ่มของปลิงทะเลลูกบอลในการศึกษานี้ทั้งที่เป็นชนิดเดียวกัน ไม่แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลิงทะเลที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกัน (วงศ์ Phyllophoridae สกุล *Phyllophorus* และ *Phyrella*) และมีตำแหน่งอยู่บริเวณฐานของแผนผังฯ แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* (accession number KF142184) ไม่ใช่ลำดับฯ ของปลิงทะเลลูกบอล *Phyllophorella kohkutiensis* (ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Kimura 2-parameter) 16.40-17.21%) หรือปลิงทะเลชนิดอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลิงทะเลลูกบอล (ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Kimura 2-parameter) 17.83-22.07%) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความผิดพลาดของการจัดจำแนกชนิดจากตัวอย่างที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ซึ่งอาจอยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์ การศึกษานี้และการศึกษาที่ผ่านมายืนยันประสิทธิภาพของยีน COI ในการจัดจำแนกชนิดสัตว์ในกลุ่ม echinoderms โดยเฉพาะในกรณีที่มีการจัดจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานมีความไม่แน่นอน เช่น การทบทวนการจัดจำแนกชนิดสัตว์ในกลุ่ม echinoderm ชั้น Asterozoa, Ophiurozoa, Echinozoa และ Holothurozoa ที่พบบริเวณทะเลเหนือ (North Sea) (Laakmann *et al.*, 2016) และการทบทวนการจัดจำแนกชนิดปลิงทะเลในสกุล *Phyrella* (Michonneau & Paulay, 2014) เป็นต้น การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ยังทำให้ได้ฐานข้อมูลทางพันธุกรรมซึ่งช่วยในการจัดจำแนกชนิดของสัตว์ในกลุ่ม echinoderm ได้ในทุกๆ ของวงจรชีวิต เช่น ระยะเวลาอ่อน (juvenile) และระยะที่เป็นแพลงก์ตอนชั่วคราว (meroplanktonic larva) นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ยังมีความสำคัญต่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Arndt *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 2010; Michonneau & Paulay, 2014; Miller *et al.*, 2017) รวมถึงการตรวจหาชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานใกล้เคียงกันมากซึ่งยากต่อการจำแนกโดยวิธีอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (sibling species) และชนิดซ่อนเร้น (cryptic species) (Laakmann *et al.*, 2016)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาและวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณยีน COI ในไมโทคอนเดรียจากตัวอย่างปลิงทะเลลูกบอลที่สำรวจพบในพื้นที่ ต. เกาะสาหร่าย อ. เมือง จ. สตูล อ่าวบ้านดอน อ. ท่าฉาง จ. สุราษฎร์ธานี และช่องเกาะช้าง ระหว่างอ่าวตราดของแผ่นดินใหญ่กับเกาะช้าง จ. ตราด พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับชนิดของปลิงทะเลลูกบอลมีความหลากหลายของแฮพลอไทป์สูง แต่มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ต่ำ สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากร ปลิงทะเลลูกบอลจากเกาะช้างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุด รองลงมาคือประชากรจากอ่าวบ้านดอนและเกาะสาหร่าย ตามลำดับ ประชากรจากเกาะช้างแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญกับประชากรจากอ่าวบ้านดอนและเกาะสาหร่าย ตรงกันข้ามกับประชากรจากอ่าวบ้านดอนและเกาะสาหร่ายที่ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม ประชากรเกาะช้างในการศึกษานี้มีจำนวนตัวอย่างน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจากพื้นที่อื่นจึงไม่สามารถนำมาคำนวณเพื่อประมาณความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรมที่แท้จริงของประชากรได้ ผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการยืนยันว่าปลิงทะเลลูกบอลทั้งหมด



เป็นชนิดเดียวกัน คือ ชนิด *Phyllophorella kohkutiensis* ปลิงทะเลชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและแยกจากปลิงทะเลชนิดอื่นอย่างชัดเจน

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ ดร. สุเมตต์ ปุจฉากการ และผู้ทรงคุณวุฒิทั้งสองท่านที่ให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขบทความวิจัย งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการ “ลักษณะทางพันธุกรรม ซีวีวิทยาพื้นฐาน และนิเวศวิทยาของปลิงทะเลลูกบอล (*Phyllophorella kohkutiensis*) ในน่านน้ำไทย” ได้รับทุนสนับสนุนจากฝ่ายบริหารวิจัยเพื่อสนับสนุนยุทธศาสตร์ชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2562

เอกสารอ้างอิง

- Antoro, S., Na-Nakorn, U. & Koedprang, W. (2006). Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. *Marine Biotechnology*, 8, 17-26.
- Arndt, A., Marquez, C., Lambert, P. & Smith, M.J. (1996). Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6, 425-437.
- Byrne, M., Rowe, F. & Uthicke, S. (2010). Molecular taxonomy, phylogeny and evolution in the family Stichopodidae (Aspidochirotida: Holothuroidea) based on COI and 16S mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 1068-1081.
- Cherbonnier, G. (1961). Holothuries récoltées par A. Gallardo dans la Baie de Nha-Trang (Sud Viet-Nam) (suite). *Bulletin Muséum National Histoire Naturelle Paris, 2 série*, 32, 425-435.
- Community Based Research Division. (2017). The villagers research in Ban Don Bay. *Research Society Organization Journal*, 99, 20. (in Thai)
- Corstorphine, E.A. (2010). *DNA barcoding of echinoderms: species diversity and patterns of molecular evolution*. Master Thesis, University of Guelph, Ontario, Canada.



- Davison, G.W.H., Ng, P.K.L. & Chew, H.H. (2008). *The Singapore Red Data Book: Threatened plants and animals of Singapore*. Singapore: Nature Society. 285 pp.
- Department of Marine and Coastal Resources. (2020). *DMCR News, November 16, 2019*. Retrieved April 23, 2020, from <https://www.dmcr.go.th/detailAll/36704/nws/22> (in Thai)
- Donrung, P., Tunkijjanukij, S., Jarayabhand, P. & Poompuang, S. (2011). Spatial genetic structure of the surf clam *Paphia undulata* in Thailand waters. *Zoological Studies*, 50(2), 211-219.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., & deWaard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270, S96–S99.
- Heding, S.G. & Panning, A. (1954). Phylloporidae. Eine Bearbeitung der polytentaculaten dendrochiroten Holothurien des Zoologischen Museums in Kopenhagen. *Spolia Zoologica Musei Hauniensis [=Skifter udgivet af Universitetets Zoologiske Museum København]*, 13, 209 pp., 102 figs.
- Huang, X. & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9, 868-877.
- Jussapalo, S. (2016). Potential of self-reliance community coastal fishery resources management in Tumbon Koh Sarai, Amphur Muang, Satun Province. *Silpakorn University Journal*, 36(1), 49-65. (in Thai)
- Khamnamtong, B., Klinbunga, S. & Menasveta, P. (2009). Genetic diversity and geographic differentiation of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand analyzed by mitochondrial *COI* sequences. *Biochemical Genetics*, 47, 42-55.
- Klinbunga, S., Siludjai, D., Wudthijinda, W., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. & Menasveta, P. (2001). Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. *Marine Biotechnology*, 3, 428-438.



- Laakmann, S., Boos, K., Knebelsberger, T., Raupach, M.J. & Neumann, H. (2016). Species identification of echinoderms from the North Sea by combing morphology and molecular data. *Helgoland Marine Research*, 70, 1-18.
- Laxminarayana, A. (2005). Induced spawning and larval rearing of the sea cucumbers, *Bohadschia marmorata* and *Holothuria atra* in Mauritius. *SPC Beche-de-mer Information Bulletins*, 22, 48–52.
- Liao, Y. & Pawson, D.L. (2001). Dendrochirote and dactylochirote sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) of China, with descriptions of eight new species. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 114(1), 58-90.
- Madduppa, H., Taurusman, A.A., Subhan, B., Anggraini, N.P., Fadillah, R. & Tarman, K. (2017). Short Communication: DNA barcoding reveals vulnerable and not evaluated species of sea cucumbers (Holothuroidea and Stichopodidae) from Kepulauan Seribu reefs, Indonesia. *Biodiversitas*, 18(3), 893-898.
- Michonneau, F. & Paulay, G. (2014). Revision of the genus *Phyrella* (Holothuroidea: Dendrochirotida) with the description of a new species from Guam. *Zootaxa*, 3760(2), 101-140.
- Miller, A.K., Kerr, A.M., Paulay, G., Reich, M., Wilson, N.G., Carvajal, J.I. & Rouse, G.W. (2017). Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 111, 110-131.
- Ong, J.Y., Wirawati, I. & Wong, H.P.-S. (2016). Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) collected from the Singapore strait. *Raffles Bulletin of Zoology*, 34, 666-717.
- Panithanarak, T., Karuwancharoen, R., Na-Nakorn, U. & Nguyen, T.T.T. (2010). Population genetics of the spotted seahorse (*Hippocampus kuda*) in Thai waters: implications for conservation. *Zoological Studies*, 49(4), 564-576.



- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817-818.
- Putchakarn, S., Mucharin, A., Komkham, P. & Pangsuk, B. (2017). *Checklist of Echinoderms in Thailand*. Bangkok: Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning. 150 pp. (in Thai)
- Rodriguez, F., Oliver, J.L., Marin, A. & Medina, J.R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, 142(4), 485-501.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolutions*, 34, 3299-3302.
- Skillings, D.J., Bird, C.E. & Toonen, R.J. (2014). Comparative population structure of two edible Indo-Pacific coral reef sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Bulletin of Marine Science*, 90(1), 359-378.
- Soliman, T., Fernandez-Silva, I. & Reimer, J.D. (2016). Genetic population structure and low genetic diversity in the over-exploited sea cucumber *Holothuria edulis* Lesson, 1830 (Echinodermata: Holothuroidea) in Okinawa Island. *Conservation Genetics*, 17, 811-821.
- Swofford, D.L. (2002). *PAUP*-phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.0b10*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- Tassanakajon, A. (2003). Genetic diversity and population structure of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in Thailand revealed by microsatellite markers. *Journal of Research Methodology*, 16(3), 359-373. (in Thai)



- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882.
- Uthicke, S., Schaffelke, B. & Byrne, M. (2009). A boom–bust phylum? Ecological and evolutionary consequences of density variations in echinoderms. *Ecological Monographs*, 79, 3–24.
- Wanna, W., Rolland, J.-L., Bonhomme, F. & Phongdara, A. (2004). Population genetic structure of *Penaeus merguensis* in Thailand based on nuclear DNA variation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311, 63-78.
- Ward, R.D., Holmes, B.H. & O' Hara, T.D. (2008). DNA barcoding discriminates echinoderm species. *Molecular Ecology Resources*, 8, 1202–1211.
- Wen, J., Hu, C., Zhang, L. & Fan, S. (2011). Genetic identification of global commercial sea cucumber species on the basis of mitochondrial DNA sequences. *Food Control*, 22, 72-77.