รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2561

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) **สุขภาวะ นิเวศสรีรวิทยา และประชากรของเต่าทะเล ในระบบนิเวศเกาะ**

(ภาษาอังกฤษ) **Health, Ecophysiology and Population of Sea Turtle** in **Island Ecosystem**

คณะผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชฎฐ์ คนซื่อ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย งามประเสริฐวงศ์
รองศาสตราจารย์ผุสตี ปริยานนท์
น.ส.มุกเรขา เชี่ยวชาญชัย น.ส.ยุพาพร วิสูตร
น.ส.ธฤษวรรณ ไตรจิตร์ น.ส.รังษิมา ผิวผ่อง
นายรชตะ มณีอินทร์ นายขัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี
นายสุธิโรจน์ มีสวัสดิ์ นายพชร สิทธิชีวภาค
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน่วยงานสนับสนุน

- โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)
- มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม
- เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตน ราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และ เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ เป็นหนึ่งในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ฯ ที่ยังคงสภาพอุดมสมบูรณ์ เป็นที่อยู่ของสัตว์สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ซึ่งปัจจุบันกองทัพเรือและภาคเอกชนที่ดูแลเกาะ ได้ร่วมมือกันบริหารจัดการพื้นที่หาดทรายให้เหมาะสมกับการขึ้นทำรังวางไข่ และ ติดตามประเมินขนาดของประชากรอย่างต่อเนื่อง โดยขนาดประชากรของเต่ากระอาจประมาณได้จากข้อมูลการทำรังวางไข่ของเต่ากระที่เกาะทะลุ ในปี พ.ศ. 2555 และ 2558 ซึ่งพบว่ามีเต่ากระเพศเมียอย่างน้อย 6 ตัว ที่ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ทำรังวางไข่ แต่ไม่สามารถระบุถึงจำนวนเต่ากระเพศผู้ได้ โครงการในปีงบประมาณ 2561 จึงได้พัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลประยุกต์ใช้ศึกษาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและนิวเคลียร์ดีเอ็นเอของลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 เพื่อตรวจสอบรูปแบบสารพันธุกรรมที่ลูกเต่าได้รับจากเต่ากระเพศเมียและเต่ากระเพศผู้ และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการประเมินขนาดประชากรของเต่ากระที่มีแหล่งผสมพันธุ์และแหล่งวางไข่ บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ผลการศึกษาพบว่าภาวะพหุสัณฐานของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของลูกเต่ากระจำนวน 5 รัง รวมทั้งสิ้น 42 ตัว มีรูปแบบสารพันธุกรรม 1 แฮพโพลไทป์ และมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเท่ากับ 0 แสดงให้เห็นว่าลูกเต่ากระเกิดมาจากเต่าเพศเมียตัวเดียวหรืออาจเกิดมาจากเต่าเพศเมียหลายตัวที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกัน ส่วนการศึกษาภาวะพหุสัณฐานของไมโครแซทเทลไลต์ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอของลูกเต่ากระจำนวน 5 รัง รวมทั้งสิ้น 214 ตัว สามารถอนุมานจำนวนเต่ากระเพศผู้ได้ 1-4 ตัว จากจำนวนเต่ากระวัยเจริญพันธุ์ที่น้อยมาก ประกอบกับแนวโน้มการเกยตื้นของเต่ากระที่สูงขึ้นในช่วง 5-10 ปีที่ผ่านมา แสดงถึงสถานการณ์ที่น่ากังวลเกี่ยวกับสถานภาพประชากรของสัตว์ที่มีความเสี่ยงขั้นวิกฤติต่อการสูญพันธุ์ชนิดนี้ และเสนอแนะว่าการวางแผนการจัดการด้านการประมงและขยะทะเลในอ่าวไทยมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่ากระและสัตว์ทะเลใกล้สูญพันธุ์ชนิดอื่น ๆ

คำสำคัญ เต่ากระ, ไมโครแซทเทลไลต์, ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ, นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ, ประชากร

Abstract

Talu Island in Prachuab Khiri Khan province is one of the protected area of the Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn. The island ecosystem is rich in biodiversity with a presence of important reptile, especially the hawksbill sea turtle, *Eretmochelys imbricata*. Currently, a sea turtle head start program and a potential long-term population monitoring program have been established under the cooperation between the Royal Thai Navy and the private sectors. Population of the hawksbill turtle in this area was initially estimated from the nesting incidence. During 2012-2015 nesting season, it was estimated that at least 6 female hawksbill turtles used this island as their nesting sites. However, it is still not possible to estimate number of male turtles. In this study, molecular biology techniques have been employed to estimate 1) number of nesting female turtles and 2) number of male turtles that sired these hatchlings. In nesting season of 2014, mtDNA polymorphism of 42 juvenile turtles representing 5 nests revealed only one haplotype (h=0, π=0), indicating that these 5 nests were potentially laid by one single female or several maternally related females. While analysis of microsatellite polymorphism in nuclear DNA of 214 juvenile turtles from 5 nests revealed the estimated number of male hawksbill turtles of 1 to 4 individuals. The low number of adult hawksbill turtles together with an increasing number of stranded turtles in the Gulf of Thailand during the past 5-10 years further bring about concerns over the population status of this critically endangered species and suggest that management plan for fishery and marine debris in the Gulf of Thailand are crucial for conservation of the hawksbill turtle as well as other marine endangered species.

Keywords: hawksbill turtle, microsatellite, mitochondrial DNA, nuclear DNA, population

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ..... i
บทคัดย่อภาษาไทย..... ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... iii
สารบัญ iv
สารบัญตาราง v
สารบัญภาพ vi

บทนำ 2
วัตถุประสงค์ 2
วิธีดำเนินการวิจัย 3
สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล 4
สัตว์ทดลอง 4
ผลการศึกษา 4
สรุปผลการศึกษา 28
เอกสารอ้างอิง 31

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1: ข้อมูลการวางไข่ของเต่ากระบนหาดทรายของเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงปี พ.ศ. 2553-2559 (รวบรวมโดยเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท; N/A = ไม่มีข้อมูล) 5

ตารางที่ 2: ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของเต่ากระ เกาะทะลุ และเกาะมันใน ปี พ.ศ. 2561 13

ตารางที่ 3: การวางไข่ของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* บนเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในปี พ.ศ. 2557 (มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม, 2558) 14

ตารางที่ 4: การประมาณจำนวนเต่ากระเพศผู้ *Eretmochelys imbricata* จากจีโนไทป์และรูปแบบอัลลีลของลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 25

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1: ภาพถ่ายทางอากาศของเกาะทะลุ แสดงบริเวณที่พักของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท (กรอบสี่เหลี่ยมเส้นทึบ) หาดทรายที่มีการทำรังวางไข่ของเต่ากระ (ลูกศรทึบ) ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชบนเกาะทะลุ (กรอบสี่เหลี่ยมเส้นประ) และ โรงเรือนอนุบาลเต่ากระ (ลูกศรเส้นประ) .. 5

ภาพที่ 2: กิจกรรมการปล่อยเต่ากระของมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และ เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท 7

ภาพที่ 3: การบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐาน และ น้ำหนักตัว ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 8

ภาพที่ 4: การเจาะเลือดจากตำแหน่งแอ่งเลือดใต้กระดองหลัง (subcarapacial sinus) ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ 8

ภาพที่ 5: การเก็บข้อมูลทางโลหิตวิทยาในภาคสนามของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ (ซ้าย: การวัดค่าฮีมาโตคริต; ขวา: การเตรียมสไลด์ตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ) 9

ภาพที่ 6: การเปรียบเทียบคุณภาพตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 19 ตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1.5 กิโลเบส ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 10

ภาพที่ 7: ผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product; ~800 base pairs) ที่ผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (purification) โดยเปรียบเทียบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 15 ตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1.5 กิโลเบส ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 11

ภาพที่ 8: การแปลผลและจัดเรียงข้อมูลลำดับเบสของลูกเต่ากระด้วย MUSCLE algorithm ในโปรแกรม MEGA-X 12

ภาพที่ 9: พื้นที่ที่พบเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก; 1 บริเวณอ่าวเปอร์เซีย ประเทศอิหร่านและประเทศซาอุดิอาระเบีย; 2 เกาะ Amirantes เกาะ Platte เกาะ Granitic ประเทศเซเชลส์ และ หมู่เกาะซาโลมอนในมหาสมุทรอินเดีย; 3 เกาะทะลุและเกาะมันใน ประเทศไทย; 4 คาบสมุทรมาเลเซีย เกาะเรดัง รัฐมะละกา และ รัฐยะโฮร์ ประเทศมาเลเซีย; 5 เกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย; 6 เกาะ Rosemary และ เกาะ Varanus ประเทศออสเตรเลีย; 7 Arnhem ประเทศออสเตรเลีย; 8 เกาะ Milman รัฐควีนส์แลนด์; 9 หมู่เกาะโซโลมอน (ดัดแปลงข้อมูลจาก Outline World Map Image, 2009) 16

ภาพที่ 10: Haplotype network แสดงการแบ่งกลุ่มรูปแบบพันธุกรรม จำนวน 64 แฮพโพลไทป์ (567 คู่เบส) ของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก โดยมีลำดับเบสที่แตกต่างกันอย่างน้อย 66 ตำแหน่ง 18

ภาพที่ 11: แผนภูมิต้นไม้แสดงการแบ่งกลุ่มประชากรเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก ด้วยวิธีการคำนวณความเป็นไปได้แบบ maximum likelihood โดยใช้โมเดล Tamura 3 – parameter 19

ภาพที่ 12: แผนภูมิต้นไม้แสดงการแบ่งกลุ่มของประชากรเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก ด้วยวิธีการคำนวณความเป็นไปได้แบบ Bayesian inference 20

ภาพที่ 13: การเปรียบเทียบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product; ~230 – 300 base pairs) กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1.5 กิโลเบส โดยใช้ microsatellites primer จำนวน 3 loci กับตัวอย่างจำนวน 4 ตัว ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 21

ภาพที่ 14: กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอ (แกนตั้ง) และ ขนาดอัลลีล (แกนนอน) ในภาวะพหุสัณฐานไมโครแซทแทลไลต์ (microsatellite polymorphism) ของลูกเต่ากระ 22

ภาพที่ 15: ค่าความถี่อัลลีล (allele frequency) ของตำแหน่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ตำแหน่ง (loci) ได้แก่ Ei8 Eim8 Eim9 Eim17 Eim31 และ Eim41 จากลูกเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 24

1. บทนำ

พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ประกอบด้วยระบบนิเวศอันหลากหลายตั้งแต่ระบบนิเวศบก ระบบนิเวศน้ำจืด และระบบนิเวศทะเล ที่ยังคงสภาพอุดมสมบูรณ์ (โครงการ อพ.สธ., 2554) จากผลการศึกษาในภาคสนามที่ผ่านมาพบว่าพื้นที่โครงการในหลายบริเวณมีความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์เลื้อยคลานค่อนข้างสูง มีสัตว์เลื้อยคลานชนิดสำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มเต่าทะเล (อันดับ Testudines) ซึ่งเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง จึงสมควรอย่างยิ่งที่จะต้องอนุรักษ์พื้นที่บริเวณนี้ไว้ ซึ่งการบริหารจัดการและอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืนจำเป็นต้องอาศัยองค์ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับทรัพยากรในพื้นที่ ซึ่งรวมถึงข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของทรัพยากรสิ่งมีชีวิต และลักษณะทางชีววิทยาด้านต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตนั้น

เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นหนึ่งในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ประกอบด้วยระบบนิเวศอันหลากหลายตั้งแต่ระบบนิเวศบก ระบบนิเวศน้ำจืด และระบบนิเวศทะเล ที่ยังคงสภาพอุดมสมบูรณ์ จากผลการศึกษาในภาคสนามที่ผ่านมาพบว่าพื้นที่โครงการมีสัตว์เลื้อยคลานชนิดสำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ซึ่งปัจจุบันหน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ และภาคเอกชนที่ดูแลเกาะทะลุ ได้ร่วมมือกันบริหารจัดการพื้นที่หาดทรายของเกาะทะลุให้เหมาะสมกับการขึ้นทำรังวางไข่ของแม่เต่ากระจนประสบผลสำเร็จในการเพาะฟักไข่และอนุบาลลูกเต่าได้เป็นจำนวนมาก

อนึ่ง คณะผู้วิจัยได้เริ่มสำรวจสุขภาวะและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่โครงการ อพ.สธ. หมู่เกาะและทะเลไทย นับตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 เริ่มจากสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Testudines โดยใช้เต่าตะนุจากเกาะหูยง อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะสิมิลัน เป็นต้นแบบ และยังมีประสบการณ์การศึกษาประชากรของเต่าในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลอีกด้วย โดยในปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 ได้วางแผนการทำงานโดย 1) ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ศึกษา และ 2) ใช้เต่ากระที่ใช้พื้นที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์เป็นพื้นที่ทำรังวางไข่เป็นกลุ่มสัตว์เป้าหมาย

ในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งต่อยอดงานวิจัยจากความสำเร็จเบื้องต้นโดยเน้นการประเมินปัจจัยทางชีวภาพที่บ่งบอกสุขภาวะ และ การเจริญเติบโต ตลอดจนประเมินสถานภาพประชากรเบื้องต้นโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งข้อมูลด้านนิเวศสรีรวิทยาที่ได้จะช่วยในการประเมินและปรับแนวทางการจัดการในพื้นที่เกาะทะลุ และเมื่อร่วมกับข้อมูลทางประชากรที่ได้ซึ่งสามารถนำมาใช้บ่งบอกสถานภาพของเต่ากระในอ่าวไทย และเก็บรวบรวมอย่างต่อเนื่องจะเป็นประโยชน์ต่อการติดตามประชากรในระยะยาว เพื่อใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่หมู่เกาะและทะเลไทยอย่างยั่งยืน

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อสนองพระราชดำริ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)

2.2 เพื่อสำรวจสุขภาวะ นิเวศสรีรวิทยา และประชากรของเต่าทะเลที่ขึ้นทำรังวางไข่บริเวณพื้นที่หมู่เกาะและทะเลไทยของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เก็บข้อมูลเกี่ยวกับนิเวศวิทยาการทำรังวางไข่ สุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่ขึ้นวางไข่บริเวณพื้นที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ดังนี้

นิเวศวิทยาการทำรังวางไข่	สุขภาวะและการเจริญเติบโต	สถานภาพประชากร
- การทำรังวางไข่บนเกาะทะลุ	- ค่าทางโลหิตวิทยา	- จำนวนเพศเมีย (ข้อมูลการขึ้นวางไข่)
- นิเวศวิทยาการทำรังวางไข่	- ฮอร์โมนที่สัมพันธ์กับความเครียด	- จำนวนเพศผู้ (microsatellite DNA)

3.2 วิธีการศึกษา

3.2.1 สำรวจการขึ้นทำรังวางไข่ของแม่เต่ากระ ในพื้นที่โครงการฯ

3.2.2 บันทึกพิกัดภูมิศาสตร์และข้อมูลทางนิเวศวิทยา และลักษณะของถิ่นอาศัยย่อยของบริเวณที่พบการขึ้นทำรังวางไข่

3.2.3 เก็บข้อมูลขนาดสัณฐาน และ น้ำหนัก ของลูกเต่าที่อนุบาลไว้ในบ่อเพาะเลี้ยงของเกาะทะลุ เพื่อใช้ในการติดตามการเจริญเติบโต

3.2.4 เก็บตัวอย่างเลือดของเต่ากระ (แม่เต่า และ ลูกเต่า) เพื่อนำมาตรวจสอบลักษณะทางโลหิตวิทยาของเนื้อเยื่อเลือด เช่น ค่าฮีมาโตคริต, จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง และ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อใช้ประเมินสุขภาวะโดยรวมของเต่าในธรรมชาติ

3.2.5 นำตัวอย่างเลือดมาปั่นแยกเพื่อเก็บน้ำเลือดมาตรวจสอบระดับฮอร์โมนที่สัมพันธ์กับความเครียด (corticosterone) ในห้องปฏิบัติการ

3.2.6 เก็บเซลล์เม็ดเลือดที่ตกตะกอนจากการปั่นแยกในข้อ 3.2.5 เพื่อใช้สกัด DNA ในห้องปฏิบัติการ

3.2.7 ตรวจสอบ mitochondrial DNA โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ control region ของเต่ากระ เพื่อนำมาตรวจสอบจำนวนเพศเมียที่ขึ้นมาวางไข่

3.2.8 ตรวจสอบ microsatellite DNA โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเต่ากระ อย่างน้อย 5 คู่ เพื่อนำมาตรวจสอบภาวะ multiple paternity ในลูกเต่าที่ได้จากไข่รังเดียวกัน

3.2.9 วิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในภาคสนาม และสรุปผลการศึกษา

4. สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

สำรวจภาคสนามและเก็บข้อมูลทางกายภาพและชีวภาพในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ หมู่เกาะและทะเลไทย (เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์) และนำตัวอย่างมาศึกษาเพิ่มเติมที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. สัตว์ทดลอง

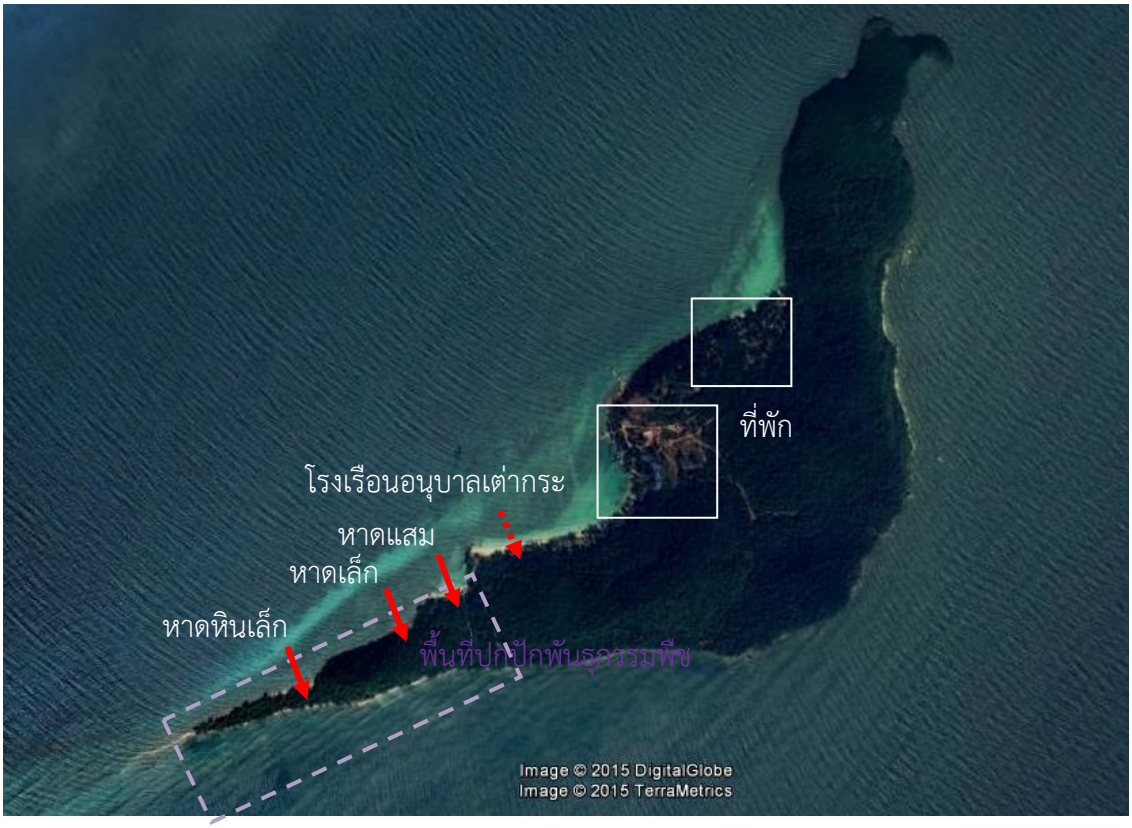
โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง “สุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์” ซึ่งได้รับอนุญาตให้ทำการประมงเพื่อประโยชน์ทางวิชาการจากกรมประมง (หนังสืออนุญาตเลขที่ 11/2559 ลงวันที่ 23 กันยายน 2559) และขั้นตอนในการกระทำต่อสัตว์ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการการควบคุมดูแลการเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Animal Use Protocol Number 1623013)

6. ผลการศึกษา

6.1 การทำรังวางไข่ของเต่ากระที่เกาะทะลุ

พื้นที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ภาพที่ 1) ประกอบไปด้วยพื้นที่บ้านพักและสิ่งอำนวยความสะดวกในความดูแลของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท พื้นที่เขาและป่าธรรมชาติ และพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช โครงการ อพ.สธ. ซึ่งในบริเวณนี้มีหาดทรายขนาดเล็กที่เต่ากระขึ้นมาทำรังวางไข่อยู่ด้วย

จากข้อมูลของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท พบการขึ้นทำรังวางไข่ของเต่ากระอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด โดยในระยะแรกยังไม่ได้มีระบบการเพาะฟักในหาดทรายกึ่งธรรมชาติ ทำให้ไม่มีข้อมูลการออกเป็นตัวและอัตราการรอด ต่อมาในฤดูการวางไข่ปี พ.ศ. 2553 พลเรือโทวินัย กล่อมอินทร์ และ เจ้าหน้าที่หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ จึงได้เข้าไปพัฒนาแนวทางในการเพาะฟักโดยอาศัยประสบการณ์จากการศึกษาวิจัยในเต่าตนุมาอย่างต่อเนื่อง (วินัย กล่อมอินทร์, 2545) ทั้งด้านการจดบันทึกข้อมูลแม่เต่า การย้ายไข่เต่าจากหาดทรายที่วางไข่ไปเพาะฟักยังหาดทรายกึ่งธรรมชาติ การอนุบาล และ การปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ จึงเริ่มมีข้อมูลเก็บอย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 1; ปรีดา เจริญพักตร์, สัมภาษณ์)



ภาพที่ 1: ภาพถ่ายทางอากาศของเกาะทะลุ แสดงบริเวณที่พักของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท (กรอบสี่เหลี่ยมเส้นทึบ) หาดทรายที่มีการทำรังวางไข่ของเต่ากระ (ลูกศรทึบ) ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชบนเกาะทะลุ (กรอบสี่เหลี่ยมเส้นประ) และ โรงเรือนอนุบาลเต่ากระ (ลูกศรเส้นประ)

ตารางที่ 1: ข้อมูลการวางไข่ของเต่ากระบนหาดทรายของเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงปี พ.ศ. 2553-2559 (รวบรวมโดยเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท; N/A = ไม่มีข้อมูล)

ปี	จำนวนรัง	จำนวนไข่	จำนวนแม่เต่า	หมายเหตุ
พ.ศ. 2553	N/A	N/A	N/A	เริ่มวางระบบเพาะฟักที่หาดทรายเดิม พบการรบกวนค่อนข้างมาก อัตราการรอดต่ำ
พ.ศ. 2554	N/A	N/A	N/A	เริ่มวางระบบย้ายไข่มาเพาะฟักที่หาดทรายกึ่งธรรมชาติ แต่อัตราการรอดยังไม่ดีนัก
พ.ศ. 2555	17	2,219 ฟอง	4 ตัว	เพาะฟักที่หาดทรายกึ่งธรรมชาติ
พ.ศ. 2556	N/A	700 ฟอง	N/A	เพาะฟักที่หาดทรายกึ่งธรรมชาติ
พ.ศ. 2557	7 รัง	1,066 ฟอง	1 ตัว	เพาะฟักที่หาดทรายกึ่งธรรมชาติ
พ.ศ. 2558	26 รัง	มากกว่า 3,234 ฟอง	3 ตัว	เพาะฟักที่หาดทรายกึ่งธรรมชาติ
พ.ศ. 2559	9 รัง	มากกว่า 975 ฟอง	อย่างน้อย 1 ตัว	เพาะฟักที่หาดทรายกึ่งธรรมชาติ

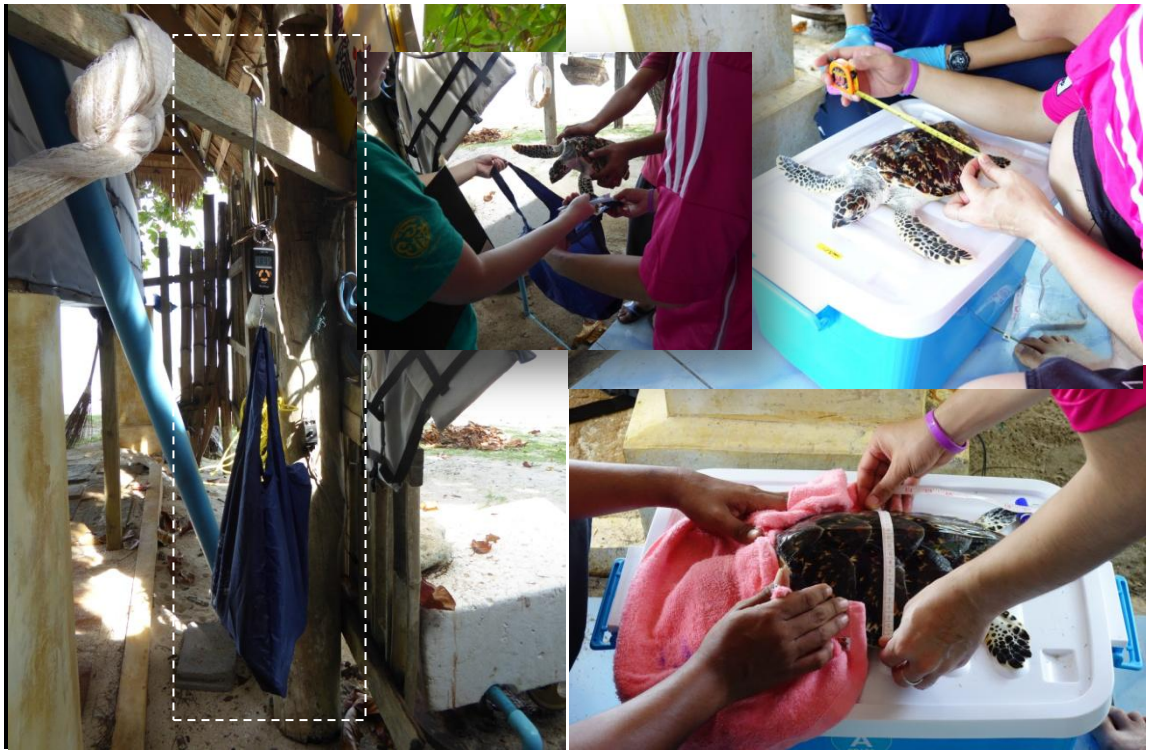
จากรายงาน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 พบการขึ้นวางไข่ของเต่ากระ 26 รัง ในระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 และมีจำนวนไข่ต่อหลุม 95-179 ฟอง เมื่อสำรวจภาคสนามพบว่าสามารถระบุพิกัดตำแหน่งที่เต่ากระขึ้นวางไข่ได้ 23 หลุม โดยตำแหน่งหลุมอยู่ห่างจากระดับน้ำทะเลขึ้นสูงสุด 2.75-21.57 เมตร และมีความสูงกับความชันเทียบกับตำแหน่งน้ำทะเลขึ้นสูงสุดเป็น 0.33-3.46 เมตร และ 5.106-18.637 องศา ตามลำดับ ลักษณะทางกายภาพของหลุม เป็นหาดทรายที่มีอนุภาคทรายขนาดใหญ่กว่า 0.3 มิลลิเมตร เป็นส่วนใหญ่ และมีค่า pH กับความเค็มของทรายในช่วง 6-7 และ 2-6 ppt ตามลำดับ เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของหาดทรายเป็นเวลา 60 วันในช่วงฤดูการวางไข่ พบว่าตำแหน่งที่เต่าเลือกวางไข่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงแคบเพียง 1-1.8 °C โดยในหลุมตัวแทน 5 หลุม มีค่าอุณหภูมิต่ำสุด-สูงสุดเป็น 26.4-29.4 °C ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเอ็มบริโอเต่าทะเล เมื่อนำข้อมูลทางกายภาพของบริเวณที่เต่าเลือกทำรังวางไข่เปรียบเทียบกับบริเวณที่เต่าไม่เลือกทำรังวางไข่ที่อยู่ห่าง 3 เมตร จากปากหลุม ไปทางด้านบน-ล่าง-ซ้าย-ขวา พบแนวโน้มความแตกต่างของขนาดอนุภาคทรายโดยตำแหน่งที่เต่าไม่เลือกทำรังวางไข่มีอนุภาคทรายขนาดเล็ก (< 0.090 มิลลิเมตร) ในสัดส่วนมากกว่า นอกจากนี้ ยังพบว่าตำแหน่งที่แม่เต่าเลือกทำรังวางไข่ มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในหลุมแตกต่างจากบริเวณที่แม่เต่าไม่เลือกวางไข่อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นแนวทางในการรักษาสภาพแวดล้อมของหาดทรายให้เหมาะสมต่อการวางไข่ของเต่ากระในอนาคต

เมื่อย้ายไข่มาเพาะฟักยังหาดทรายกึ่งธรรมชาติจนฟักออกเป็นตัว เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ทได้เลี้ยงอนุบาลเต่ากระจนมีอายุ 1-2 ปี ก่อนจะปล่อยคืนสู่ธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง และในโอกาสพิเศษต่าง ๆ จะเปิดโอกาสให้เยาวชนและประชาชนทั่วไปได้เข้ามามีส่วนร่วม (ภาพที่ 2) และนอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างเต่ากระขนาดใหญ่ (อายุ 3-4 ปี) ไว้จำนวนหนึ่ง เพื่อเป็นตัวอย่างสำหรับศึกษาการเติบโตในบ่อเลี้ยง และติดตามการอพยพในธรรมชาติในอนาคต (ปรีดา เจริญพักตร์, สัมภาษณ์)

ภาพที่ 2: กิจกรรมการปล่อยเต่ากระของมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และ เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท

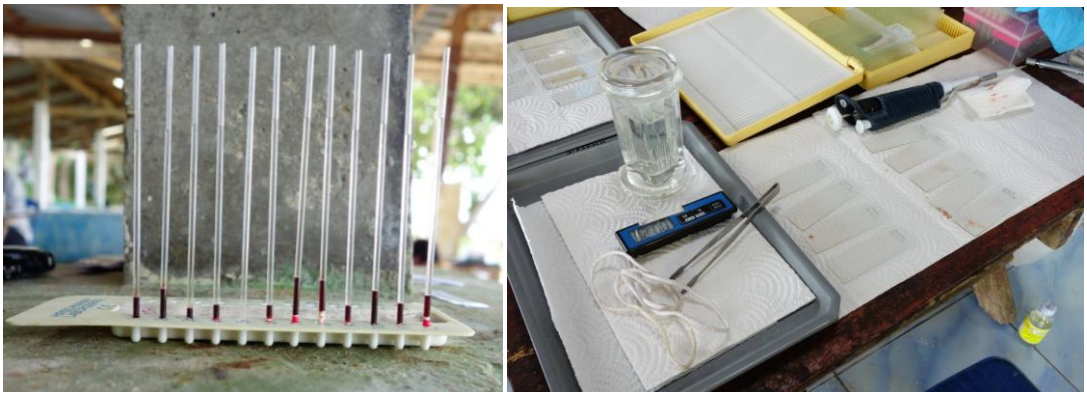
6.2 สุขภาวะและการเจริญเติบโตของเต่ากระ

การนำลูกเต่าทะเลจากธรรมชาติมาทำการเพาะฟัก และอนุบาลให้แข็งแรง ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของลูกเต่าทะเล ส่งผลดีต่อการอนุรักษ์ประชากรของเต่าทะเลในธรรมชาติ ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา Headstart program สำหรับเต่าทะเลถูกดำเนินการขึ้นในหลายแห่งทั่วโลก และประสบความสำเร็จ เช่น กรณีของเต่า *Lepidochelys kempii* ที่เกาะ Padre ประเทศสหรัฐอเมริกา (Bowen et al., 1994) แต่การเลี้ยงเต่าทะเลในบ่อเลี้ยง อาจทำให้เต่าเกิดความเครียดได้ และส่งผลต่อสุขภาวะของเต่าทะเล การประเมินความเครียด และสุขภาวะของเต่ากระในบ่อเลี้ยงจึงเป็นเรื่องสำคัญ ที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเลี้ยงเต่ากระให้ดียิ่งขึ้น คณะผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างความเครียดและค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระในบ่อเลี้ยงโดยเก็บข้อมูลลักษณะสัณฐาน และน้ำหนักตัว (ภาพที่ 3) ก่อนเจาะเลือดจากตำแหน่ง subcarapacial sinus (ภาพที่ 4) เพื่อนำมาตรวจสอบลักษณะทางโลหิตวิทยา ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต (hematocrit) และ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (ภาพที่ 5) และวัดปริมาณคอร์ติโคสเตอโรนในพลาสมาด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay ดังปรากฏในรายงานผลการดำเนินงานโครงการประจำปีงบประมาณ 2560



ภาพที่ 3: การบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐาน และ น้ำหนักตัว ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ภาพที่ 4: การเจาะเลือดจากตำแหน่งแอ่งเลือดใต้กระดองหลัง (subcarapacial sinus) ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์



ภาพที่ 5: การเก็บข้อมูลทางโลหิตวิทยาในภาคสนามของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ (ซ้าย: การวัดค่าฮีมาโตคริต; ขวา: การเตรียมสไลด์ตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ)

6.3 สถานภาพประชากรเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ

6.3.1 ประชากรเต่ากระเพศเมียที่อาศัยบริเวณเกาะทะลุ

จากข้อมูลของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท (ตารางที่ 1) พบเต่ากระเพศเมียขึ้นทำรังวางไข่อย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด โดยในฤดูการวางไข่ ปี พ.ศ. 2555 มีแม่เต่าที่ขึ้นมาวางไข่ คือ แม่ศรีประจวบ แม่นกแก้ว แม่เพรียง และ แม่ศรีบางสะพาน ซึ่งแต่ละตัววางไข่จำนวน 6, 4, 4 และ 3 รัง (ตามลำดับ) ในฤดูการวางไข่ ปี พ.ศ. 2557 พนักงานเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ทคาดว่าไข่ 6 รัง จาก 7 รังที่สำรวจพบ เป็นไข่ที่วางโดยแม่เต่าเพียงตัวเดียว คือ แม่ศรีประจวบ และ ในฤดูการวางไข่ ปี พ.ศ. 2558 ซึ่งพบการทำรังวางไข่ถึง 26 รัง เชื่อว่ามีแม่เต่าที่ขึ้นมาวางไข่ คือ แม่ศรีประจวบ แม่ศรีสยาม และ แม่ศรีจันทร์ ซึ่งจากข้อมูลในช่วง 3 ฤดูการวางไข่นี้ แสดงให้เห็นว่ามีแม่เต่าอย่างน้อย 6 ตัว ที่อาศัยอยู่บริเวณนี้ และ ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ทำรังวางไข่

จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าเต่า 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ถึง 6 รัง ในแต่ละฤดูการวางไข่ แต่อย่างไรก็ดีเนื่องจากผู้บันทึกไม่ได้พบตัวแม่เต่าทุกครั้งจึงอาจมีข้อผิดพลาดในการบันทึก ซึ่งน่าจะต้องศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (mitochondrial DNA) เพื่อตรวจสอบจำนวนแม่เต่าที่ขึ้นวางไข่ต่อไป

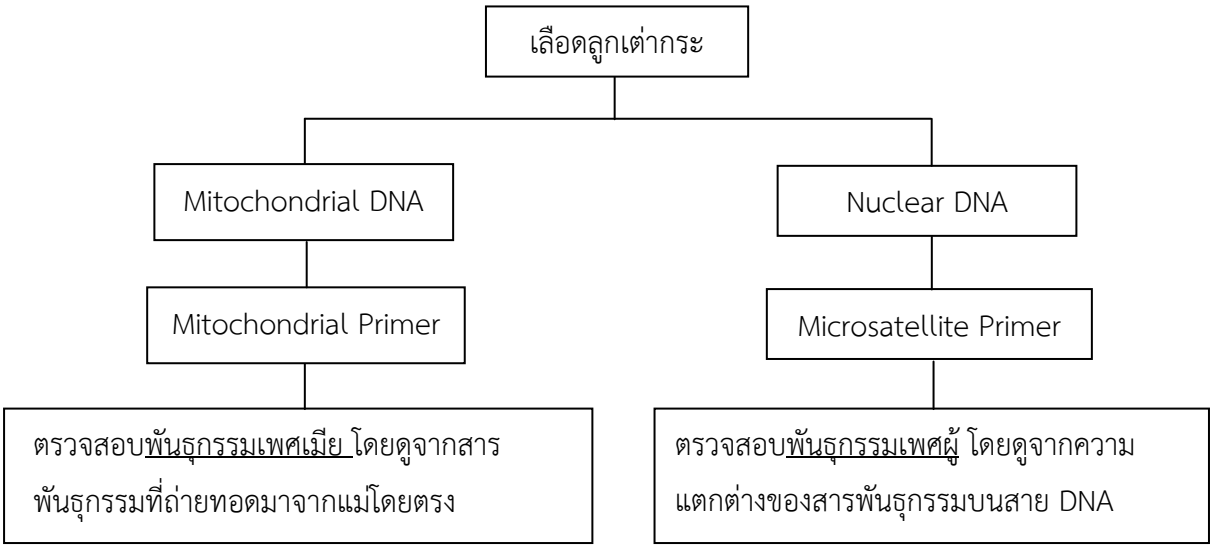
6.3.2 ประชากรเต่ากระเพศผู้ที่อาศัยบริเวณเกาะทะลุ

เต่ากระวัยเจริญพันธุ์ มีการอพยพไปมาระหว่างแหล่งอาหารและพื้นที่สืบพันธุ์ โดยเต่าเพศผู้จะไม่มีการขึ้นมาบนหาดทรายเหมือนเต่าเพศเมีย (Mortimer and Donnelly, 2008) ทำให้การศึกษาประชากรเต่าเพศผู้ทำได้ค่อนข้างยาก อย่างไรก็ดีจากปรากฏการณ์ในธรรมชาติที่เต่าเพศเมียหลายชนิดสามารถผสมพันธุ์กับเพศผู้ได้มากกว่า 1 ตัว ทำให้ลูกเต่าในแต่ละรังเกิดจากการปฏิสนธิของไข่จากเพศเมีย 1 ตัว กับอสุจิของเพศผู้มากกว่า 1 ตัว (multiple paternity; Pearse and Avise, 2001) ซึ่งเชื่อว่าการที่เต่าทะเลสามารถวางไข่ได้จำนวนมากในแต่ละรัง น่าจะเกิดจากการเก็บสะสมอสุจิจากการผสมพันธุ์หลาย

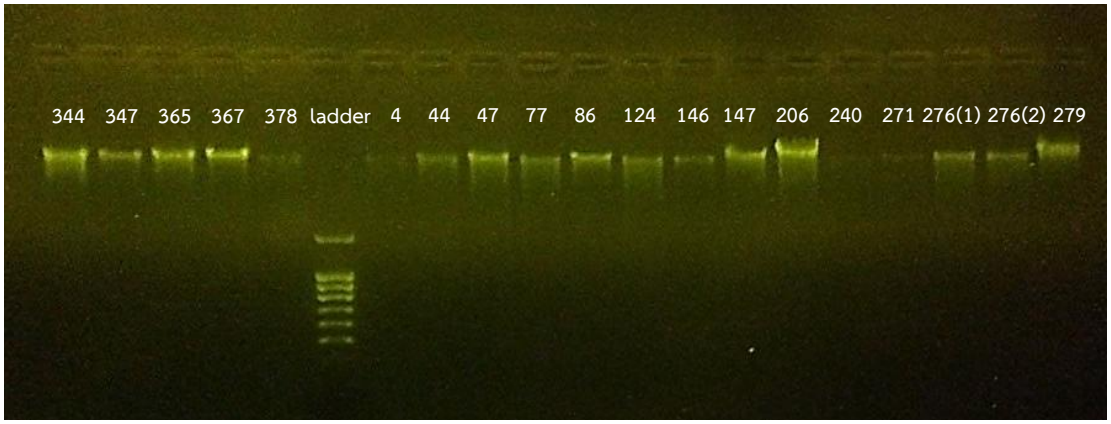
ครั้ง (Lee and Hays, 2004) คณะผู้วิจัยจึงวางแผนที่จะติดตามตรวจสอบภาวะ multiple paternity ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (microsatellite DNA) ในเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ

6.3.3 การศึกษาสถานภาพประชากรเต่ากระด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

การศึกษาสถานภาพประชากรเต่ากระ สามารถตรวจสอบโดยการนำเลือดลูกเต่ากระมาสกัด DNA และตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของพ่อและแม่ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ gene ในเต่าเพศผู้และเพศเมีย



เมื่อนำตัวอย่างเลือดลูกเต่ากระมาสกัด DNA โดยเทคนิคการตกตะกอนด้วยเอทานอล (ethanol precipitation) โดยใช้ BioFACT™ Genomic DNA Prep Kit มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1% และความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 V เป็นเวลา 40 นาที ได้ผลดังภาพที่ 6

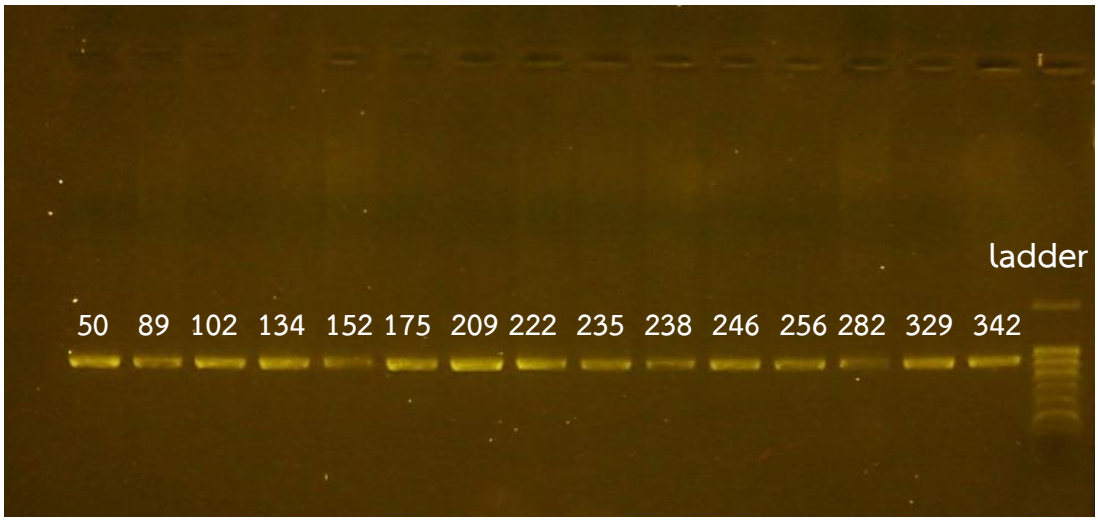


ภาพที่ 6: การเปรียบเทียบคุณภาพตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 19 ตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1.5 กิโลเบส ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพมาศึกษาภาวะพหุสัณฐานของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และ ภาวะพหุสัณฐานของไมโครแซทเทลไลต์บนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

6.3.3.1 การศึกษาภาวะพหุสัณฐานของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

1) ทดสอบและคัดเลือก mitochondrial primer ที่มีความเหมาะสมต่อการจำลองและสังเคราะห์สารพันธุกรรมบริเวณ control region เพื่อตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของลูกเต่ากระที่ได้รับจากเต่ากระเพศเมีย (แม่เต่า) จำนวน 38 ตัว โดยเลือกใช้คู่ primer ของ LCM15382 และ H950 ในการศึกษาครั้งนี้
2) เตรียมสารละลาย master mix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นำใส่เครื่อง MJ Research PTC – 200 dual thermal cycler เพื่อเข้าสู่กระบวนการ polymerase chain reaction (PCR)
3) แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product; ~800 base pairs) ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร เพื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1.5 กิโลเบส
4) เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีคุณภาพเหมาะสม นำไปทำให้สารละลายมีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (purification) ด้วยเทคนิค spin column-based nucleic acid purification ของ NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit

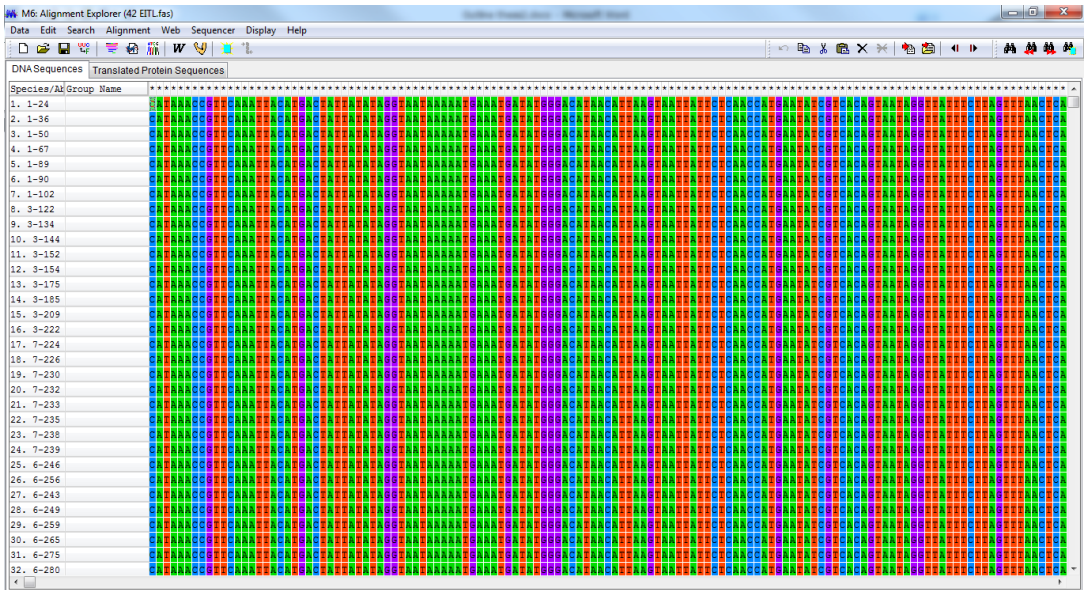


ภาพที่ 7: ผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product; ~800 base pairs) ที่ผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (purification) โดยเปรียบเทียบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 15 ตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1.5 กิโลเบส ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

5) วิเคราะห์ลำดับเบสที่อยู่ในสารพันธุกรรม (DNA sequencing) จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยบริการจากบริษัท Bioneer ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

6) ตรวจสอบข้อมูลลำดับเบสของจีโนไทป์บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

- ตรวจสอบผลการวิเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA sequence) ของเต่ากระ โดยการนำข้อมูลลำดับเบสไป BLAST ใน GenBank
- จัดเรียงข้อมูลลำดับเบส (sequence alignment) ของลูกเต่ากระแต่ละตัว เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วย MUSCLE algorithm ในโปรแกรม MEGA-X



ภาพที่ 8: การแปลผลและจัดเรียงข้อมูลลำดับเบสของลูกเต่ากระด้วย MUSCLE algorithm ในโปรแกรม MEGA-X

- วิเคราะห์จำนวนแฮพโพลไทป์ (haplotype) และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ด้วยข้อมูลลำดับเบสลูกเต่ากระในโปรแกรม DnaSP5
- จำแนกลูกเต่ากระที่มีแฮพโพลไทป์รูปแบบเดียวกัน และประเมินจำนวนเต่ากระเพศเมีย
- วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระในประเทศไทยเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรเต่ากระที่พบในประเทศแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก ด้วยการคำนวณค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic differentiation: F_{st}) ในโปรแกรม Alrequin 3.5
- หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์ด้วยข้อมูลพันธุกรรม (molecular phylogenetics) ของเต่ากระที่พบในประเทศแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก โดยการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ 3 รูปแบบ ได้แก่ 1) Haplotype network ด้วยโปรแกรม PopART, 2) Maximum likelihood ด้วยโปรแกรม MEGA-X โดยวิเคราะห์และเลือกใช้โมเดล Tamura 3 – parameter ที่มีความเหมาะสมที่สุดในการสร้างแผนภูมิต้นไม้ และ 3) Bayesian inference ด้วยโปรแกรม MrBayes โดยกำหนดการสุ่มตัวอย่างจำนวน 20,000 ตัวอย่าง และ ตั้งค่า Burn-in 50,000 รอบ

ในปี พ.ศ. 2557 ได้รวบรวมข้อมูลการขึ้นวางไข่ของเต่ากระเพศเมีย จำนวนไข่ และจำนวนลูกเต่ากระแรกเกิดจากบันทึกข้อมูลของมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และเก็บตัวอย่างเลือดจากลูกเต่ากระจำนวน 5 รัง รวมทั้งสิ้น 379 ตัว เพื่อนำไปศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ เก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระเพิ่มเติมจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล เกาะมัน-ใน จังหวัดระยอง จำนวน 32 ตัวซึ่งมีช่วงอายุที่แตกต่างกัน สำหรับนำมาใช้ตรวจสอบความเหมาะสมของ primer ในการจำแนกความแตกต่างของลำดับเบสในเต่ากระเท่านั้น

นำตัวอย่างมาศึกษาภาวะพหุสัณฐานของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA polymorphism) โดยสุ่มตัวอย่างเลือดลูกเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 6 – 9 ตัวต่อรัง และ ตัวอย่างเลือดเต่ากระจำนวน 31 ตัวจากเกาะมันใน จังหวัดระยอง มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) ด้วยคู่ primer ของ LCM15382 และ H950 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำมีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับเบสภายในรูปแบบพันธุกรรม (DNA sequencing) เมื่อแปลผลและวิเคราะห์ข้อมูลจีโนไทป์ของเต่ากระทั้ง 2 พื้นที่ พบว่า ลูกเต่ากระ เกาะทะลุ มีรูปแบบพันธุกรรม 1 แฮพโพลไทป์ (haplotype) และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) เท่ากับ 0 สำหรับเต่ากระ เกาะมันใน พบรูปแบบพันธุกรรมทั้งหมด 9 แฮพโพลไทป์ที่มีค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ (haplotype diversity) เท่ากับ 0.714 ± 0.058 และค่าความหลากหลายของลำดับเบส (nucleotide diversity) เท่ากับ 0.0032 โดยมีรูปแบบพันธุกรรมของเกาะทะลุรวมอยู่ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2: ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของเต่ากระ เกาะทะลุ และ เกาะมันใน ปี พ.ศ. 2561

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	**จำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ**	**จำนวนลำดับเบส**	H	S	h±SD	π
เกาะทะลุ	38	536	1	0	0	0
เกาะมันใน	31	715	9	12	0.714±0.058	0.0032

หมายเหตุ: 1. H คือ จำนวนแฮพโพลไทป์ (haplotype number)

2. S คือ ตำแหน่งของลำดับเบสที่มีความแตกต่าง (polymorphic site)

3. h±SD คือ ค่าความหลากหลายของรูปแบบพันธุกรรม±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4. π คือ ค่าความหลากหลายของลำดับเบส

จากการศึกษาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของเต่ากระ เกาะทะลุ และ เกาะมันใน พบว่า คู่ primer ของ LCM15382 และ H950 มีความเหมาะสมต่อการจำลองและสังเคราะห์สารพันธุกรรมบริเวณ control region เพื่อใช้ตรวจสอบลำดับในไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอที่

ได้รับจากเต่ากระเพศเมียโดยตรง โดยสารพันธุกรรม 1 แฮพโพลไทป์ที่พบในลูกเต่ากระ เกาะทะลุ ปี พ.ศ. 2557 อาจแสดงว่า 1) ลูกเต่ากระเกิดมาจากเต่ากระเพศเมียตัวเดียวกันหรือ 2) ลูกเต่ากระอาจเกิดมาจากเต่ากระเพศเมียหลายตัวที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกัน เนื่องจากเต่าเพศเมียหรือแม่เต่าจะส่งผ่านรูปแบบพันธุกรรมแบบเดียวกันให้กับลูกเต่าทุกตัวในรุ่นถัดไป จึงทำให้ลูกเต่าทุกตัวมีรูปแบบพันธุกรรมเหมือนกันและสามารถถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวไปยังลูกเต่ารุ่นถัด ๆ ไปได้ (Freeland et al., 2011)

เมื่อพิจารณาข้อมูลการขึ้นวางไข่ของเต่ากระเพศเมียในปี พ.ศ. 2557 จากบันทึกข้อมูลของมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม แสดงข้อมูลที่สอดคล้องกับการศึกษาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ กล่าวคือ ลูกเต่ากระ เกาะทะลุ เกิดมาจากเต่ากระเพศเมียตัวเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า เต่ากระเพศเมียสามารถวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งในฤดูวางไข่ (multiple nesting) โดยมีช่วงเวลาการวางไข่แต่ละครั้งประมาณ 15 วัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3: การวางไข่ของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* บนเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในปี พ.ศ. 2557 (มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม, 2558)

รัง	จำนวนไข่ (ฟอง)	จำนวนตัวอย่าง	วันที่วางไข่ (พ.ศ. 2557)	ระยะห่างจากการวางไข่ครั้งก่อนหน้า (วัน)
1	131	113	21 มิถุนายน	-
2	161	-	5 กรกฎาคม	14
3	163	110	20 กรกฎาคม	15
4	167	-	3 สิงหาคม	14
5	153	98	19 สิงหาคม	16
6	163	41	3 กันยายน	15
7	128	17	18 กันยายน	15

ผลการศึกษาที่แสดงว่าเต่ากระเพศเมียสามารถวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งในฤดูวางไข่ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Allen et al. (2010) ที่ศึกษาและติดตามเต่ากระบริเวณเกาะ Cousin และ เกาะ Cousine ประเทศเซเชลส์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 – 2009 โดยในช่วงปี ค.ศ. 2006 – 2009 พบเต่ากระเพศเมียขึ้นสำรวจและวางไข่บริเวณพื้นที่ทั้ง 2 เกาะ และสามารถวางไข่ได้ 0 – 7 รังในฤดูวางไข่ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 2.6 รังต่อเต่ากระเพศเมีย 1 ตัว อีกทั้งยังสอดคล้องกับบันทึกข้อมูลการขึ้นวางไข่ของเต่ากระเพศเมีย โดยมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และเกาะทะลุ ไอส์แลนด์ รีสอร์ท ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเต่ากระเพศเมีย 1 ตัวมีค่าเฉลี่ยการวางไข่ 2 – 7 รัง

เมื่อนำข้อมูลทางพันธุกรรมของเต่ากระที่พบในประเทศไทยมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic differentiation) ของเต่ากระที่พบในแถบมหาสมุทรอินเดีย –

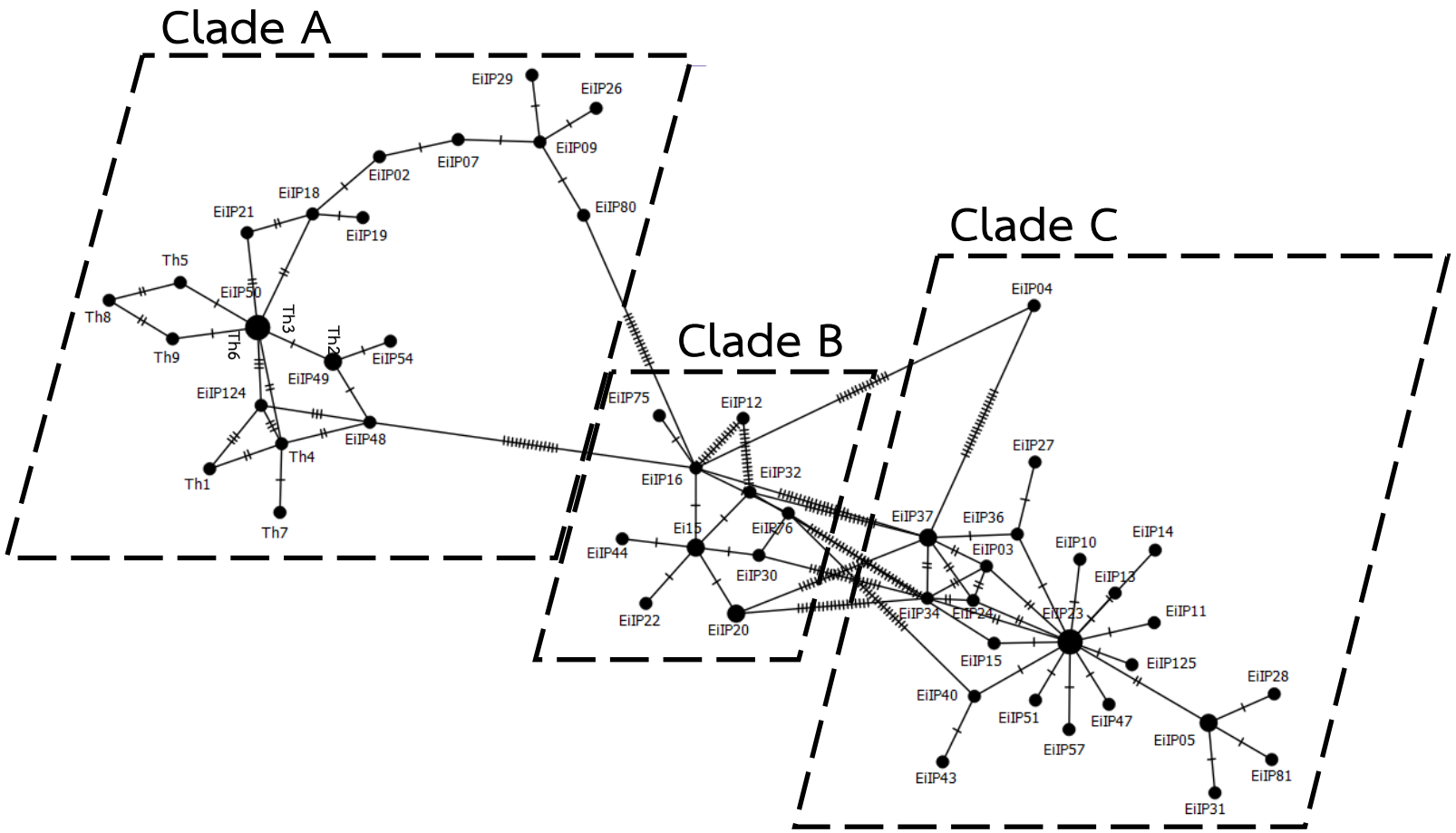
มหาสมุทรแปซิฟิก (ภาพที่ 9; Vargas et al., 2015; Nishizawa et al., 2016) โดยแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่

1. บริเวณอ่าวเปอร์เซีย ประเทศอิหร่าน และ ประเทศซาอุดิอาระเบีย
2. เกาะ Amirantes เกาะ Platte เกาะ Granitic ประเทศเซเชลส์ และ หมู่เกาะซาโลมอนในมหาสมุทรอินเดีย
3. เกาะทะลุ และ เกาะมันใน ประเทศไทย
4. คาบสมุทรมาเลเซีย เกาะเรดัง รัฐมะละกา และ รัฐยะโฮร์ ประเทศมาเลเซีย
5. เกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย
6. เกาะ Rosemary และ เกาะ Varanus ประเทศออสเตรเลีย
7. Arnhem ประเทศออสเตรเลีย
8. เกาะ Milman รัฐควีนส์แลนด์
9. หมู่เกาะโซโลมอน

ภาพที่ 9: พื้นที่ที่พบเต่ากระ *Eretmochelys imbricate* ในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก; 1 บริเวณอ่าวเปอร์เซีย ประเทศอิหร่านและประเทศซาอุดิอาระเบีย; 2 เกาะ Amirantes เกาะ Platte เกาะ Granitic ประเทศเซเชลส์ และ หมู่เกาะซาโลมอนในมหาสมุทรอินเดีย; 3 เกาะทะลุและเกาะมันใน ประเทศไทย; 4 คาบสมุทรมาเลเซีย เกาะเรดัง รัฐมะละกา และ รัฐยะโฮร์ ประเทศมาเลเซีย; 5 เกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย; 6 เกาะ Rosemary และ เกาะ Varanus ประเทศออสเตรเลีย; 7 Arnhem ประเทศออสเตรเลีย; 8 เกาะ Milman รัฐควีนส์แลนด์; 9 หมู่เกาะโซโลมอน (ดัดแปลงข้อมูลจาก Outline World Map Image, 2009)

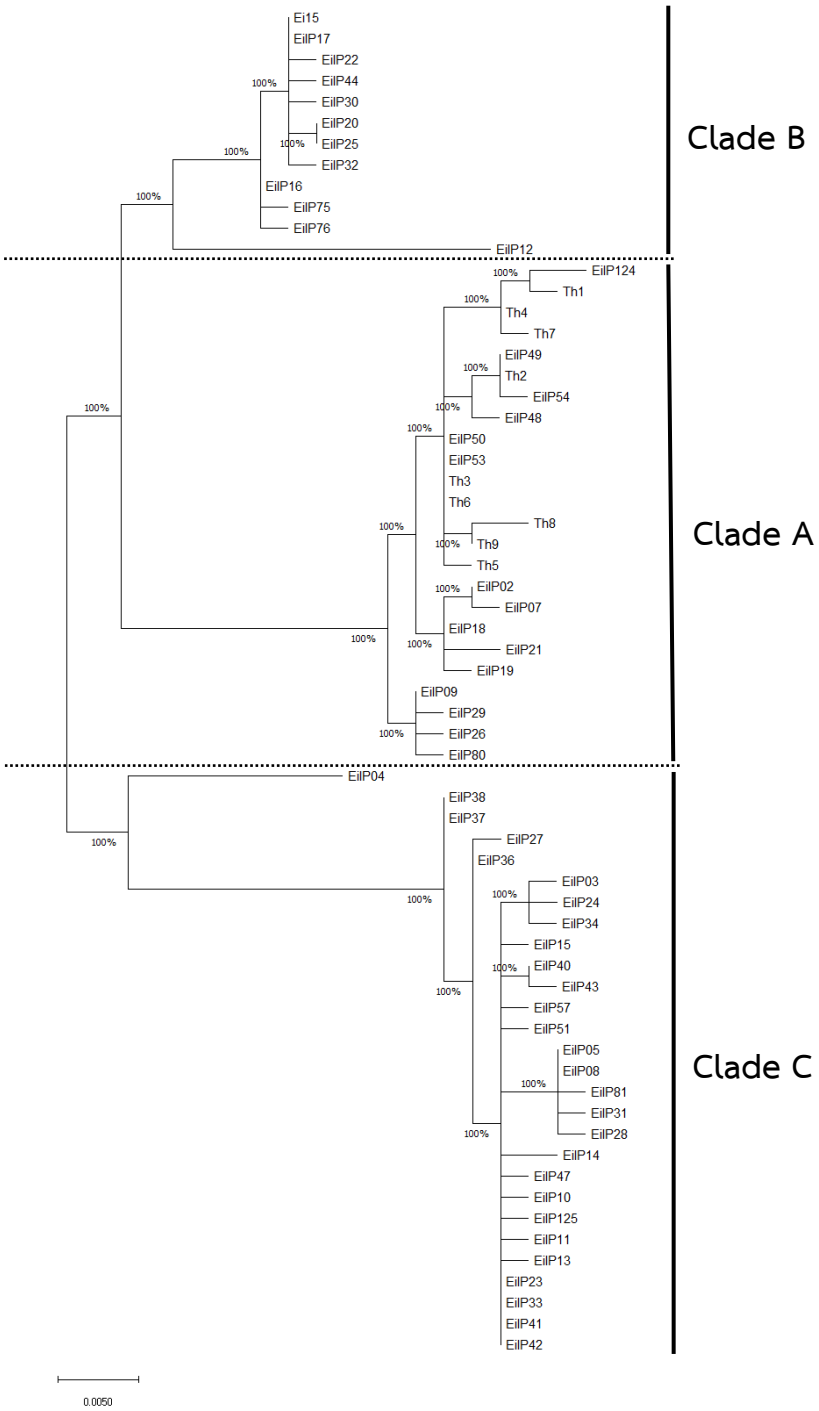
จากผลการวิเคราะห์พบว่าเต่ากระที่พบในประเทศไทยมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเต่ากระในแถบฝั่งตะวันออกของประเทศมาเลเซีย Arnhem ประเทศออสเตรเลีย และ เกาะ Milman รัฐควีนส์แลนด์ (F_{st} = 0.36 – 0.47) ในทางตรงกันข้ามกลับมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับเต่ากระที่พบในหมู่เกาะต่าง ๆ ของมหาสมุทรอินเดีย ฝั่งตะวันตกของประเทศมาเลเซีย หมู่เกาะโซโลมอน ฝั่งตะวันตกของประเทศออสเตรเลีย ประเทศอิหร่าน และ ประเทศซาอุดิอาระเบียในบริเวณอ่าวเปอร์เซียเป็นอย่างมาก (F_{st} = 0.52 – 0.94)

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์ด้วยข้อมูลระดับโมเลกุล (molecular phylogenetic) ของเต่ากระที่อาศัยอยู่ในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิกทั้งหมด พบความสอดคล้องของการแบ่งกลุ่มประชากรเต่ากระในแผนภูมิต้นไม้ทั้ง 3 รูปแบบ กล่าวคือ การวิเคราะห์ haplotype network (ภาพที่ 10) การวิเคราะห์ maximum likelihood (ภาพที่ 11) และการวิเคราะห์ Bayesian inference (ภาพที่ 12) โดยกลุ่มประชากรเต่ากระแบ่งออกเป็น 3 clade ได้แก่ clade A ประกอบด้วย เต่ากระที่พบในประเทศไทย ประเทศมาเลเซีย Arnhem ประเทศออสเตรเลีย เกาะ Milman รัฐควีนส์แลนด์ และ หมู่เกาะในมหาสมุทรอินเดีย สำหรับ clade B ประกอบด้วยเต่ากระที่พบในมหาสมุทรอินเดียเป็นส่วนใหญ่ รวมถึงเต่ากระที่พบทางฝั่งตะวันออกของประเทศมาเลเซีย และ clade C ประกอบด้วยเต่ากระที่อาศัยอยู่ในอ่าวเปอร์เซีย มหาสมุทรอินเดีย ฝั่งตะวันออกของประเทศมาเลเซีย ประเทศออสเตรเลีย รัฐควีนส์แลนด์ และหมู่เกาะโซโลมอน จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์ด้วยข้อมูลระดับโมเลกุลของเต่ากระในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิกสามารถยืนยันได้ว่าเต่ากระมีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนเพื่อหาแหล่งอาหารและแหล่งวางไข่ที่เหมาะสมต่อประชากรรุ่นถัดไป



ภาพที่ 10: Haplotype network แสดงการแบ่งกลุ่มรูปแบบพันธุกรรม จำนวน 64 แฮพโพลไทป์ (567 คู่เบส) ของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก โดยมีลำดับเบสที่แตกต่างกันอย่างน้อย 66 ตำแหน่ง

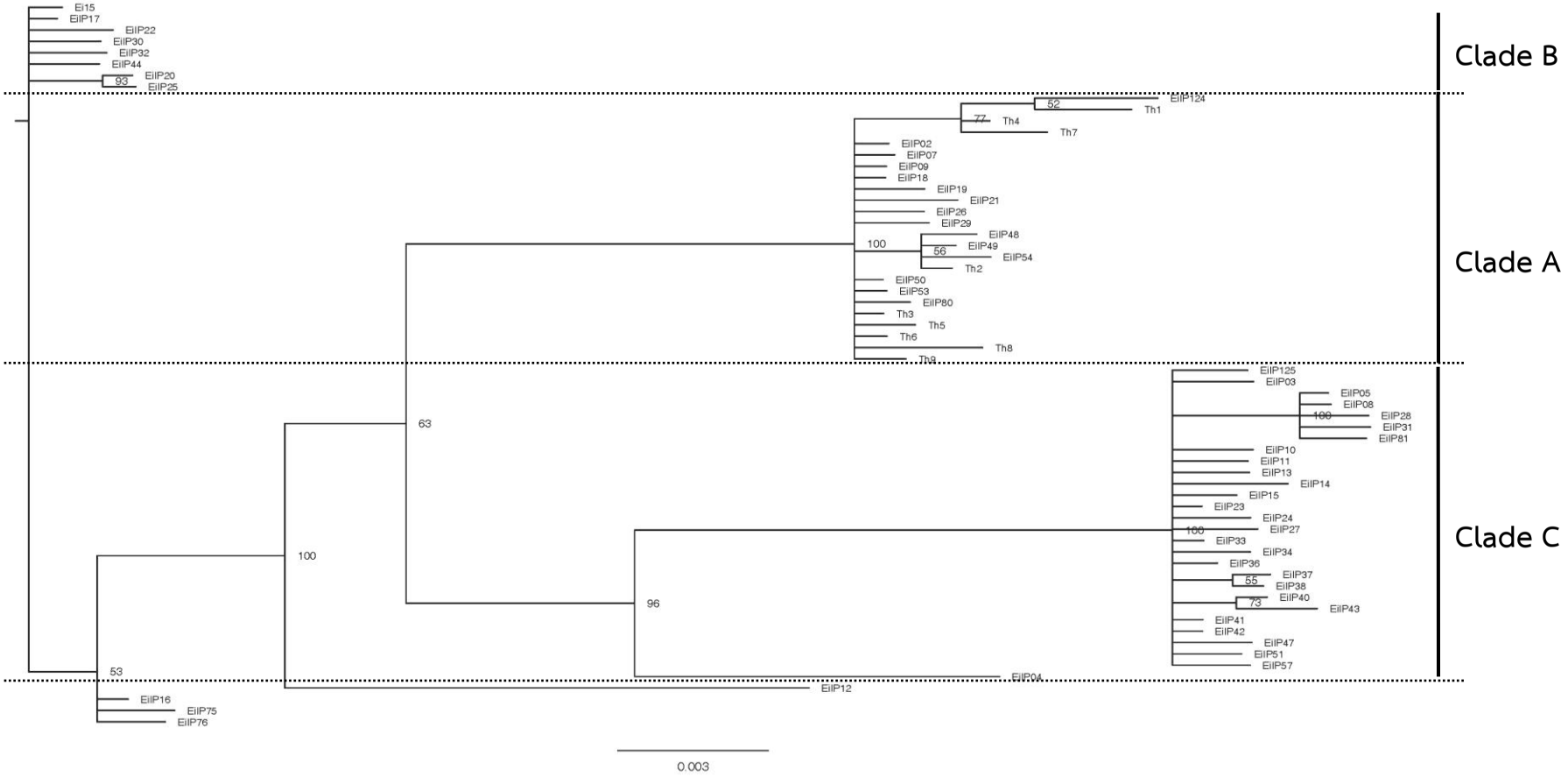
หมายเหตุ: ข้อมูลทางพันธุกรรมของเต่ากระที่พบในประเทศไทยแสดงด้วยสัญลักษณ์ Th1 ถึง Th9



ภาพที่ 11: แผนภูมิต้นไม้แสดงการแบ่งกลุ่มประชากรเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก ด้วยวิธีการคำนวณความเป็นไปได้แบบ maximum likelihood โดยใช้โมเดล Tamura 3 – parameter

หมายเหตุ: 1. ตัวเลขบริเวณ node แสดงถึงค่าความน่าจะเป็นของแผนภูมิต้นไม้

2. ข้อมูลทางพันธุกรรมของเต่ากระที่พบในประเทศไทยแสดงด้วยสัญลักษณ์ Th1 ถึง Th9



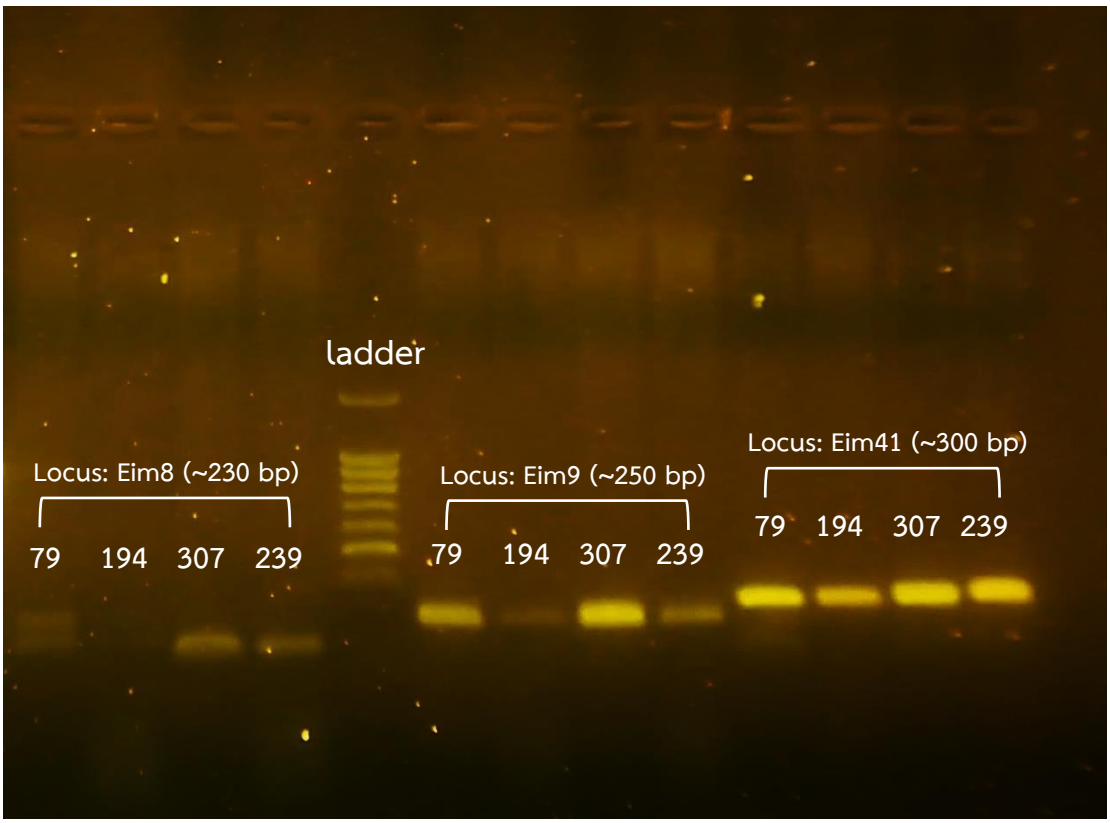
ภาพที่ 12: แผนภูมิต้นไม้แสดงการแบ่งกลุ่มของประชากรเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก ด้วยวิธีการคำนวณความเป็นไปได้แบบ Bayesian inference

หมายเหตุ: 1. ตัวเลขบริเวณ node แสดงถึงค่าความน่าจะเป็นของแผนภูมิต้นไม้

2. ข้อมูลทางพันธุกรรมของเต่ากระที่พบในประเทศไทยแสดงด้วยสัญลักษณ์ Th1 ถึง Th9

6.3.3.2 การศึกษาภาวะพหุสัณฐานของไมโครแซทเทลไลต์บนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

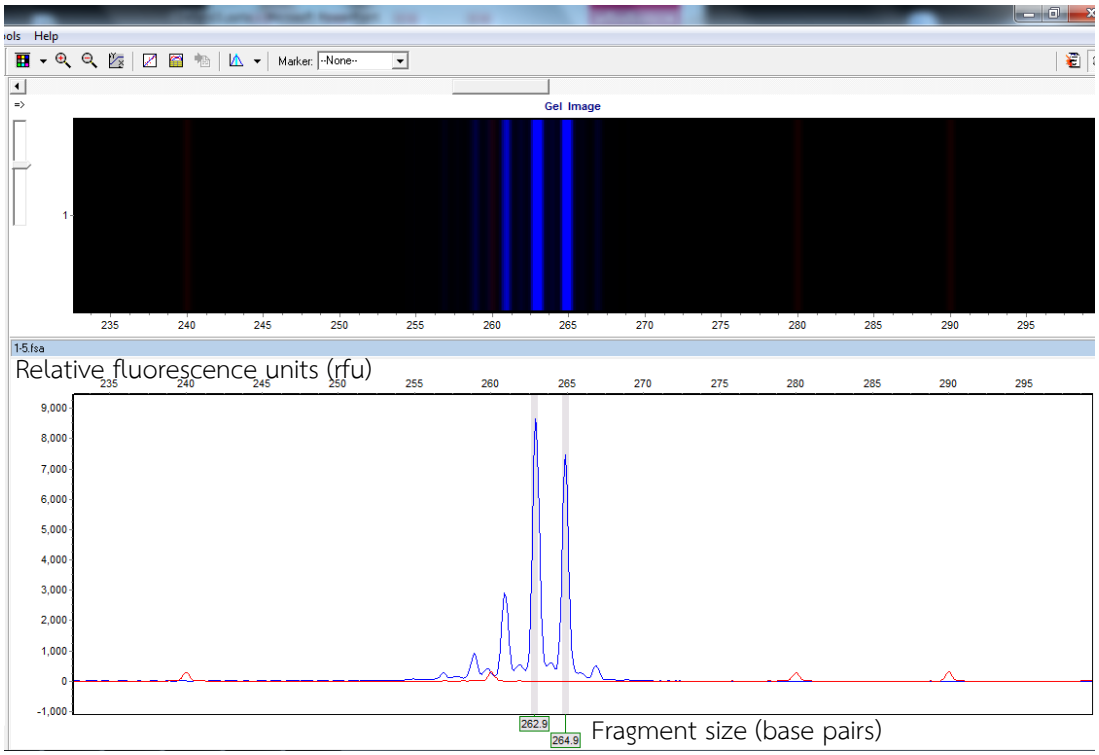
1) ทดสอบและคัดเลือก microsatellites primer ที่มีความเหมาะสมต่อการจำลองและสังเคราะห์สารพันธุกรรม ในการศึกษานี้เลือกใช้ primer จำนวน 6 คู่ ที่ผ่านการตรวจสอบค่าสมดุลฮาร์ดี – ไวน์เบิร์ก (Hardy – Weinberg Equilibrium) ได้แก่ Ei8 Eim8 Eim9 Eim17 Eim31 และ Eim41 (FitzSimmons et al., 1995; Miro-Herrans et al., 2008) นำไปติดสารเรืองแสง (fluorescent label) สำหรับใช้ตรวจสอบการมีหลายพ่อ (multiple paternity) ของลูกเต่ากระจากแต่ละรังจำนวนรวมทั้งสิ้น 214 ตัว
2) เตรียมสารละลาย master mix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร นำใส่เครื่อง MJ Research PTC-200 dual thermal cycler เพื่อเข้าสู่กระบวนการ PCR
3) แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product; ~180 – 340 base pairs) ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร เพื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1.5 กิโลเบส



ภาพที่ 13: การเปรียบเทียบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product; ~230 – 300 base pairs) กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1.5 กิโลเบส โดยใช้ microsatellites primer จำนวน 3 loci กับตัวอย่างจำนวน 4 ตัว ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

4) วิเคราะห์ขนาดของอัลลีล (allele size) โดยการทำ microsatellite fragment analysis ด้วยเทคนิค capillary electrophoresis ด้วยบริการจากบริษัท Macrogen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี ตรวจสอบข้อมูลอัลลีลหรือลักษณะจีโนไทป์ของลูกเต่ากระที่พบในแต่ละตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์บนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

- นำผลการวิเคราะห์ microsatellite fragment ของลูกเต่ากระมาแปลผลข้อมูลด้วยโปรแกรม GeneMarker 4.1 ด้วยขนาดมาตรฐาน (size standard) HD 400 และใช้สีแดงเป็นค่าสีมาตรฐาน (standard color)



ภาพที่ 14: กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอ (แกนตั้ง) และ ขนาดอัลลีล (แกนนอน) ในภาวะพหุสัณฐานไมโครแซทแทลไลต์ (microsatellite polymorphism) ของลูกเต่ากระ

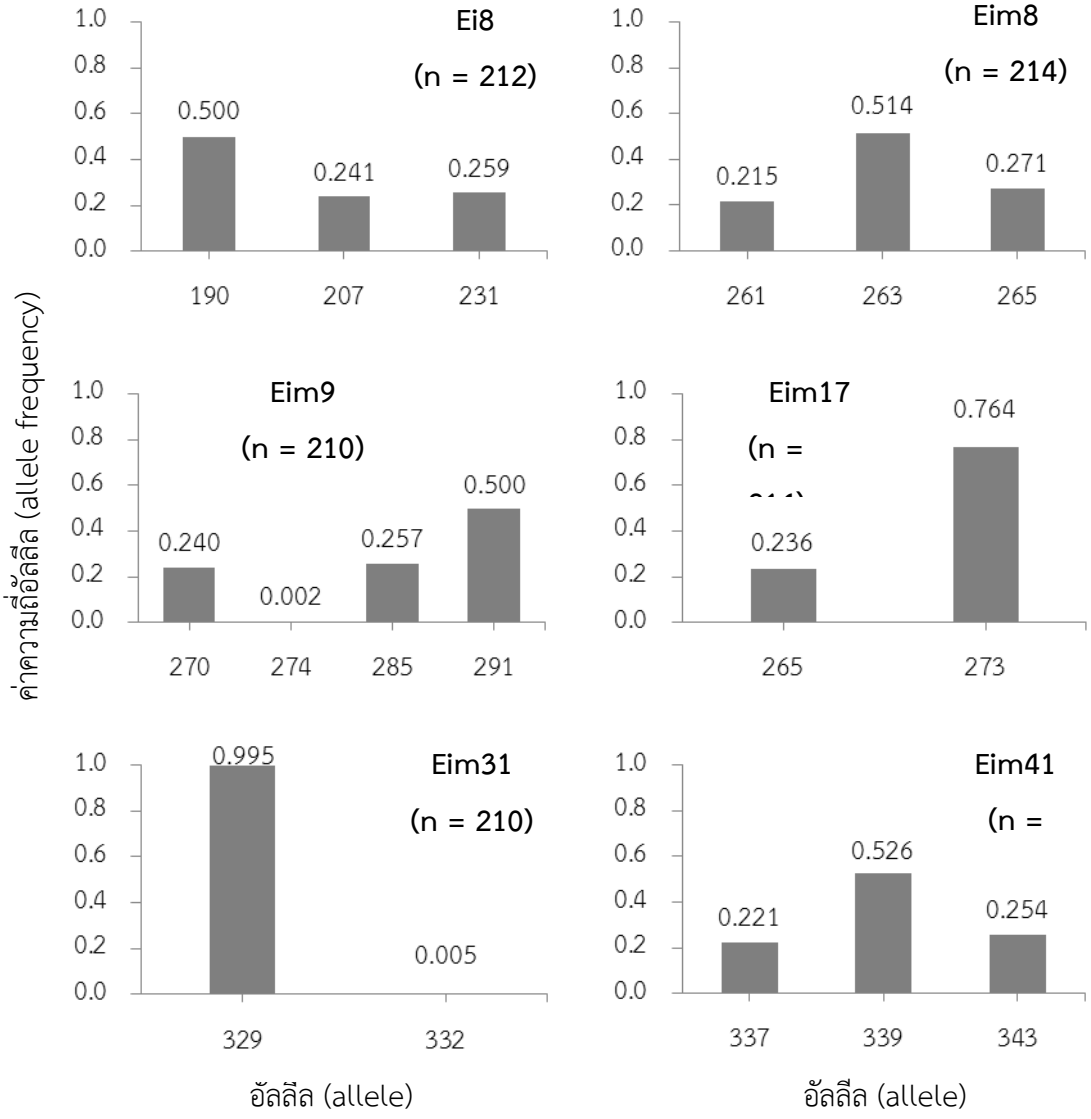
- บันทึกข้อมูลจีโนไทป์ของลูกเต่ากระแต่ละรังที่พบบนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทุกตำแหน่ง และวิเคราะห์จำนวนอัลลีล (allelic richness)
- คาดการณ์จำนวนเต่ากระเพศผู้น้อยที่สุด – มากที่สุด ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทุกตำแหน่ง

จากตัวอย่างเลือดลูกเต่ากระจำนวน 5 รังที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 นำตัวอย่างมาศึกษาภาวะพหุสัณฐานของไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite polymorphism) โดยสุ่มตัวอย่างเลือดลูกเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 17 – 54 ตัวต่อรัง รวมทั้งสิ้น 214 ตัว มาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่ติดสารเรืองแสง

(fluorescent label) และมีความจำเพาะต่อตำแหน่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ผ่านการตรวจสอบค่าสมดุลฮาร์ดี – ไวน์เบิร์ก (Hardy – Weinberg Equilibrium) จำนวน 6 ตำแหน่ง (loci) ได้แก่ Ei8 Eim8 Eim9 Eim17 Eim31 และ Eim41 เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ PCR ส่งวิเคราะห์ microsatellite fragment เพื่ออ่านค่าจีโนไทป์ของลูกเต่ากระซึ่งแสดงในรูปแบบขนาดของอัลลีล (allele size) โดยจากการแปลผลและวิเคราะห์ข้อมูล พบว่า ตำแหน่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมเหล่านี้ มีค่าความถี่อัลลีล (allele frequency) ระหว่าง 0.002 – 0.995 (ภาพที่ 15)

เมื่อนำผลการศึกษาภาวะพหุสัณฐานของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอซึ่งตรวจสอบพบเต่ากระเพศเมีย (แม่เต่า) จำนวน 1 ตัวจากข้อมูลสารพันธุกรรมของลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (หัวข้อ 6.3.3.1) มาพิจารณาร่วมกับทฤษฎีการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจากรุ่นพ่อ – แม่สู่รุ่นลูกอย่างละ 1 อัลลีล (Freeland et al., 2011) เพื่อคาดการณ์จำนวนเต่ากระเพศผู้ (พ่อเต่า) บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยจะพิจารณาจากข้อมูลจีโนไทป์แบบโฮโมไซโกสของลูกเต่ากระในทุกรัง (ตารางที่ 4) เพื่อหาจีโนไทป์ของเต่ากระเพศเมีย และประเมินจำนวนเต่ากระเพศผู้จากข้อมูลอัลลีลที่เหลือของลูกเต่ากระในทุกรัง โดยสามารถแบ่งการประเมินจำนวนเต่ากระเพศผู้ (พ่อเต่า) ออกเป็น 2 กรณี คือ

1. เต่ากระเพศผู้มีรูปแบบอัลลีลเป็นเฮเทอโรไซโกต (heterozygote) จะพบจำนวนเต่ากระเพศผู้อย่างน้อย 1 ตัว
2. เต่ากระเพศผู้มีรูปแบบอัลลีลเป็นโฮโมไซโกต (homozygote) พบจำนวนเต่ากระเพศผู้สูงสุด 4 ตัว (multiple paternity)



ภาพที่ 15: ค่าความถี่อัลลีล (allele frequency) ของตำแหน่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ตำแหน่ง (loci) ได้แก่ Ei8 Eim8 Eim9 Eim17 Eim31 และ Eim41 จากลูกเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ตารางที่ 4: การประมาณจำนวนเต่ากระเพศผู้ *Eretmochelys imbricata* จากจีโนไทป์และรูปแบบอัลลีลของลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ตำแหน่ง (Locus)	จีโนไทป์ลูกเต่า	รัง					จีโนไทป์เต่ากระเพศเมีย	การคาดการณ์จำนวนเต่ากระเพศผู้	
		1	3	5	6	7		ต่ำสุด	สูงสุด
Ei8 (n = 212)	190/190	13	8	18	12	5	190/207	2	3
	190/207	8	19	6	8	4			
	190/231	14	13	10	13	-			
	207/207	-	1	-	-	-			
	207/231	14	13	17	8	8			
	unknown	2	-	-	-	-			
Eim8 (n = 214)	261/263	13	7	13	9	5	263/265	1	2
	261/265	7	13	11	11	4			
	263/263	11	15	15	8	3			
	263/265	20	19	12	13	5			

ตารางที่ 4: การประมาณจำนวนเต่ากระเพศผู้ *Eretmochelys imbricata* จากจีโนไทป์และรูปแบบอัลลีลของลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ต่อ)

ตำแหน่ง (Locus)	จีโนไทป์ลูกเต่า	รัง					จีโนไทป์เต่ากระเพศเมีย	การคาดการณ์จำนวนเต่ากระเพศผู้	
		1	3	5	6	7		ต่ำสุด	สูงสุด
Eim9 (n = 210)	270/285	11	11	20	11	4	285/291	2	4
	270/291	13	16	7	6	2			
	274/285	-	1	-	-	-			
	285/291	14	8	14	10	4			
	291/291	12	17	10	13	6			
	unknown	1	1	-	1	1			
Eim17 (n = 214)	265/273	22	25	24	20	10	273/273	1	2
	273/273	29	29	27	21	7			

ตารางที่ 4: การประมาณจำนวนเต่ากระเพศผู้ *Eretmochelys imbricata* จากจีโนไทป์และรูปแบบอัลลีลของลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ต่อ)

ตำแหน่ง (Locus)	จีโนไทป์ลูกเต่า	รัง					จีโนไทป์เต่ากระเพศเมีย	การคาดการณ์จำนวนเต่ากระเพศผู้	
		1	3	5	6	7		ต่ำสุด	สูงสุด
Eim31 (n = 210)	329/329	50	52	48	41	17	329/329	1	2
	329/332	-	2	-	-	-			
	unknown	1	-	3	-	-			
Eim41 (n = 213)	337/339	10	13	12	8	6	337/339	1	2
	337/343	9	11	13	9	3			
	339/339	14	15	11	11	5			
	339/343	17	15	15	13	3			
	unknown	1	-	-	-	-			

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์ในการประเมินขนาดประชากรของเต่ากระได้ โดยพิจารณาจากข้อมูลจีโนไทป์ของลูกเต่ากระร่วมกับทฤษฎีการถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมจากรุ่นพ่อ – แม่สู่รุ่นลูก อาจสรุปได้ว่าพบเต่ากระเพศผู้จำนวน 1 – 4 ตัว (ต่ำสุด – สูงสุด) ที่เป็นพ่อของลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ทั้งนี้หากมีข้อมูลทางพันธุกรรมของเต่ากระเพศเมีย (แม่เต่า) จะช่วยให้การประเมินขนาดประชากรสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การตรวจพบจำนวนเต่ากระเพศผู้มากกว่า 1 ตัวที่มีแหล่งผสมพันธุ์และวางไข่บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในปี พ.ศ. 2557 สอดคล้องกับการศึกษาภาวะการมีพ่อหลายตัว (multiple paternity) ของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในรัฐซาบาห์ ประเทศมาเลเซีย โดยตรวจพบจำนวนเต่ากระเพศผู้ 2 ตัว จากลูกเต่ากระที่ทราบจีโนไทป์ของเต่ากระเพศเมีย โดยการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 5 ตำแหน่ง (Joseph and Shaw, 2010) นอกจากนี้ ยังตรวจพบจำนวนเต่ามะเฟืองเพศผู้ *Dermochelys coriacea* อย่างน้อย 2 หรือ 3 ตัว บริเวณ Playa Gandoca ประเทศคอสตาริกา จากการศึกษาในลูกเต่ามะเฟืองด้วยการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 5 ตำแหน่ง (Figgener et al., 2016) และในการศึกษาลูกเต่าตนุ *Chelonia mydas* ด้วยการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ตำแหน่ง พบจำนวนเต่าตนุเพศผู้อย่างน้อย 2 ตัว หรือ 3 ตัว บริเวณชายฝั่ง Kosgoda ประเทศศรีลังกา (Ekanayake et al., 2013) เช่นกัน

7. สรุปผลการศึกษา

เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นหนึ่งในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่ยังคงสภาพอุดมสมบูรณ์ เป็นที่อยู่ของสัตว์สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ซึ่งปัจจุบันหน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ และภาคเอกชนที่ดูแลเกาะทะลุ (มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และ เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท) ได้ร่วมมือกันบริหารจัดการพื้นที่หาดทรายของเกาะทะลุให้เหมาะสมกับการขึ้นทำรังวางไข่ของเต่ากระ จนประสบผลสำเร็จในการเพาะฟักไข่และอนุบาลลูกเต่าได้เป็นจำนวนมาก โดยในระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ปี พ.ศ. 2558 พบการขึ้นวางไข่ของเต่ากระ 26 รัง และมีจำนวนไข่ต่อหลุม 95-179 ฟอง ซึ่งได้ทำการย้ายไข่มาเพาะฟักยังหาดทรายกึ่งธรรมชาติจนฟักออกเป็นตัว

การนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาขนาดประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีความเสี่ยงขั้นวิกฤติต่อการสูญพันธุ์ (critically endangered species: CR) ถูกระบุไว้ในบัญชีหมายเลข 1 ของอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศด้านชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: CITES) และถูกจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 1 ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ของประเทศไทย จะช่วยให้สามารถศึกษาได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้นทั้งในกลุ่มประชากรเต่ากระเพศเมียและเต่ากระเพศผู้ รวมถึงสามารถนำข้อมูลไปใช้ประกอบการตัดสินสถานภาพ

การอนุรักษ์และการคุ้มครองเต่ากระได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในการศึกษานี้จะนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาศึกษาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและนิวเคลียร์ดีเอ็นเอของลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 เพื่อตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมที่ลูกได้รับจากเต่ากระเพศเมีย (แม่เต่า) และเต่ากระเพศผู้ (พ่อเต่า) และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการประเมินขนาดประชากรของเต่ากระวัยเจริญพันธุ์ที่มีแหล่งผสมพันธุ์และแหล่งวางไข่บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

การศึกษาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ control region เพื่อประเมินจำนวนเต่ากระเพศเมียหรือแม่เต่าจากตัวอย่างเลือดของลูกเต่ากระโดยใช้ mitochondrial primer จำนวน 1 คู่ คือ คู่ของ LCM15382 กับ H950 สำหรับใช้ตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอซึ่งลูกเต่ากระจะได้รับการถ่ายทอดมาจากเต่ากระเพศเมียหรือแม่เต่าโดยตรงเท่านั้น จากการศึกษา ภาวะพหุสัณฐาณของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของลูกเต่ากระจากเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 5 รัง รวมทั้งสิ้น 38 ตัว พบรูปแบบพันธุกรรมเพียง 1 แฮพโพลไทป์ และมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเท่ากับ 0 ในขณะที่เมื่อทดลองใช้ mitochondrial primer ชุดเดียวกันในการศึกษาภาวะพหุสัณฐาณของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของเต่ากระจากเกาะมันใน จังหวัดระยอง จำนวน 31 ตัว พบความหลากหลายของแฮพโพลไทป์เท่ากับ 0.714 ± 0.058 และความหลากหลายของลำดับเบสเท่ากับ 0.0032 โดยมีรูปแบบพันธุกรรมทั้งหมด 9 แฮพโพลไทป์ ซึ่งในจำนวนนี้มีแฮพโพลไทป์ของเกาะทะลุรวมอยู่ด้วย จึงเป็นข้อพิสูจน์ได้ว่า คู่ของ primer LCM15382 กับ H950 ที่ใช้ในการศึกษามีความเหมาะสมต่อการจำลองและสังเคราะห์สารพันธุกรรม บริเวณ control region เพื่อใช้ตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของเต่ากระ

ข้อมูลจำนวนแฮพโพลไทป์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ แสดงให้เห็นว่า ลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 เกิดมาจากเต่ากระเพศเมียตัวเดียวกันหรืออาจเกิดมาจากเต่ากระเพศเมียหลายตัวที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกัน เนื่องจากเต่ากระเพศเมีย (แม่เต่า) จะส่งผ่านรูปแบบพันธุกรรมแบบเดียวกันให้กับลูกเต่ากระทุกตัวในรุ่นถัดไป ทำให้ลูกเต่ากระทุกตัวมีรูปแบบพันธุกรรมที่เหมือนกัน เมื่อนำผลการศึกษามาตรวจสอบร่วมกับบันทึกข้อมูลภาคสนามของมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม พบว่า มีความสอดคล้องของข้อมูล กล่าวคือ ในปี พ.ศ. 2557 พบการขึ้นวางไข่ของเต่ากระเพศเมียจำนวน 1 ตัว และเมื่อพิจารณาบันทึกข้อมูลวันที่ขึ้นวางไข่ของเต่ากระเพศเมียในฤดูวางไข่ช่วงเดือน มิถุนายน – กันยายน พ.ศ. 2557 พบว่า เต่ากระเพศเมียสามารถวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งในฤดูวางไข่ โดยมีระยะห่างของการขึ้นวางไข่แต่ละครั้งประมาณ 15 วัน

ข้อมูลรูปแบบพันธุกรรมของเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สามารถนำไปใช้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากรของเต่ากระที่พบในพื้นที่อื่นได้ โดยเมื่อนำข้อมูลรูปแบบพันธุกรรมของเต่ากระ จากเกาะทะลุ และ เกาะมันใน ซึ่งถือเป็นตัวแทนเต่ากระที่พบในบริเวณประเทศไทย มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากรเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่พบในประเทศอื่นแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิก ได้แก่ อ่าวเปอร์เซีย ประเทศซาอุดิอาระเบียและประเทศอิหร่าน หมู่เกาะซาโลมอนและหมู่เกาะของประเทศเซเชลส์ ในมหาสมุทรอินเดีย ประเทศมาเลเซีย รัฐควีนส์แลนด์

ประเทศออสเตรเลีย และ หมู่เกาะโซโลมอน พบว่า เต่ากระประเทศไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{st}) จากกลุ่มประชากรเต่ากระของประเทศอื่นในแถบแถบมหาสมุทรอินเดีย – มหาสมุทรแปซิฟิกที่ $p<0.0001$ โดยมีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับเต่ากระในแถบฝั่งตะวันออกของประเทศมาเลเซีย Arnhem ประเทศออสเตรเลีย และ เกาะ Milman รัฐควีนส์แลนด์ (F_{st} = 0.36 – 0.47) แสดงให้เห็นว่าเต่ากระที่พบในบริเวณอ่าวไทยมีการกระจายตัวอย่างกว้างขวาง และมีแนวโน้มการเคลื่อนที่ไปยังแหล่งอาหาร แหล่งผสมพันธุ์ รวมถึงแหล่งวางไข่ที่ยังมีความอุดมสมบูรณ์ตามแนวทะเลและมหาสมุทรของประเทศดังกล่าว จึงแสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการพัฒนาความร่วมมือระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่ากระที่พบแหล่งอาศัยและแหล่งหาอาหารในพื้นที่หลายภูมิภาค

จากพฤติกรรมการจับคู่และสามารถผสมพันธุ์ได้หลายครั้งในช่วงฤดูผสมพันธุ์ของเต่าทะเลเพศเมียและเต่าทะเลเพศผู้ (National Marine Fisheries Service and U.S. Fish and Wildlife Service, 2013) ประกอบกับลักษณะทางกายวิภาคของเต่าทะเลเพศเมียที่มีโครงสร้างสำหรับเก็บสเปิร์มของเต่าเพศผู้เพื่อรอช่วงเวลาที่เหมาะสม (Pearse and Avise, 2001) ทำให้ในไข่เต่าทะเล 1 รังอาจมีสเปิร์มของเต่าเพศผู้ผสมอยู่มากกว่า 1 ตัว ในการศึกษานี้จึงใช้ microsatellite primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมจำนวน 6 ตำแหน่ง (loci) ได้แก่ Ei8 Eim8 Eim9 Eim17 Eim31 และ Eim41 เพื่อประเมินจำนวนเต่ากระเพศผู้หรือพ่อเต่า จากการพิจารณาภาวะพหุสัณฐานของไมโครแซทเทลไลต์ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอของลูกเต่ากระ 5 รัง (214 ตัว) พบค่าความถี่ของอัลลีล (allele frequency) ระหว่าง 0.002 – 0.995 และเมื่อนำผลการศึกษาภาวะพหุสัณฐานของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ตรวจสอบพบเต่ากระเพศเมีย (แม่เต่า) จำนวน 1 ตัว มาพิจารณาร่วมกับทฤษฎีการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจากรุ่นพ่อ – แม่สู่รุ่นลูกอย่างละ 1 อัลลีล โดยสังเกตจากข้อมูลจีโนไทป์แบบโฮโมไซโกตของลูกเต่ากระในทุกรังเพื่อหาจีโนไทป์ของเต่ากระเพศเมีย และประเมินจำนวนเต่ากระเพศผู้จากข้อมูลอัลลีลที่เหลือของลูกเต่ากระในทุกรัง พบว่า มีจำนวนเต่ากระเพศผู้ 1 – 4 ตัว (ประมาณการต่ำสุด – สูงสุด) ที่เป็นพ่อของลูกเต่ากระที่เกิดในปี พ.ศ. 2557 ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ทั้งนี้ หากมีข้อมูลทางพันธุกรรมของเต่ากระเพศเมีย (แม่เต่า) จะช่วยให้การประเมินขนาดประชากรสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อประเมินขนาดประชากรของเต่ากระ พบว่ามีจำนวนเต่ากระเพศเมียและเต่ากระเพศผู้ที่มีแหล่งผสมพันธุ์และแหล่งวางไข่บริเวณเกาะทะลุค่อนข้างน้อย ซึ่งอาจมีสาเหตุหรือปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อประชากรของเต่ากระ โดยจากการสืบค้นข้อมูลการพบเห็นเต่ากระในบริเวณอ่าวไทยย้อนหลังประมาณ 20 ปี (พ.ศ. 2538 – 2561) พบว่า เต่ากระร้อยละ 67 หรือคิดเป็นจำนวน 169 ตัว ถูกพบในรูปแบบการเกยตื้นทั้งแบบไม่มีชีวิตและแบบมีชีวิต โดยปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบต่อการเกยตื้นของเต่ากระในบริเวณอ่าวไทย คือ การบาดเจ็บหรือการเสียชีวิตจากเครื่องมือประมง เช่น อวนลอย อวนจม อวนถ่วง ประกอบกับปัญหาขยะทะเลที่มาจากการประมง กิจกรรมชายฝั่งและการท่องเที่ยวของมนุษย์ โดยเต่าทะเลมักถูกขยะทะเลพันยึดบริเวณภายนอกร่างกายซึ่งส่งผลต่อการว่ายน้ำและการดำน้ำของเต่ากระ รวมถึงการกินขยะทะเลที่มีองค์ประกอบของพลาสติกหรือการได้รับมลพิษจากขยะทะเลเข้าไปในร่างกายและทางเดินอาหาร ก็ส่งผลให้เต่าทะเลป่วยอย่างรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้

8. เอกสารอ้างอิง

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.). 2554. **แผนแม่บท โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ระยะ 5 ปีที่ห้า (ตุลาคม 2554 – กันยายน 2559)**. กรุงเทพมหานคร: เวิร์ค สแควร์.

วินัย กล่อมอินทร์. 2545. **แหล่งวางไข่เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) เกาะหูยง: ชีววิทยาและการอนุรักษ์**. วิทยาลัยการทัพเรือ สถาบันวิชาการทหารเรือชั้นสูง. 103 หน้า.

สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์. 2544. **ชีววิทยาและการอนุรักษ์เต่าทะเลไทย**. เอกสารวิชาการ กลุ่มสัตว์ทะเลหายาก สถาบันวิจัยชีววิทยาและประมงทะเล จังหวัดภูเก็ต. 18 หน้า.

Aida, T.M., Ximena, V., Jenny, P.A., and Mcmillan, W.O. 2008. Isolation and characterization of novel microsatellites from the critically endangered hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). **Molecular Ecology Resources** 8: 1098–1101.

Allen, Z.C., Shah, N.J., Grant, A., Derand, G.D. and Bell, D. 2010. Hawksbill turtle monitoring in Cousin Island Special Reserve, Seychelles: An eight-fold increase in annual nesting numbers. **Endangered Species Research** 11: 195-200.

Andrade, F. and Ferreira, M.A. 2006. A simple method of measuring beach profiles. **Journal of Coastal Research** 22: 995-999.

Arikan, H. and Cicek, K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: A review. **North-Western Journal of Zoology** 10: 190-209.

Bowen, B.W., Conant, T.A., and Hopkins-Murphy, S.R. 1994. Where are they Now? The Kemp's ridley headstart project. **Conservation Biology** 8: 853-856.

Caliendo, V., McKinney, P., Robinson, D., Bravenstock, W., and Hyland, K. 2010. Plasma biochemistry and hematology values in juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) undergoing rehabilitation. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery** 20: 117-121.

Campbell, T.W. 2015. **Exotic Animal Hematology and Cytology**. 4th ed. Iowa: John Wiley & Sons.

Davis, A.K., Maney, D.L., and Maerz, J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. **Functional Ecology** 22: 760-772.

Ekanayake, E.M.L., Kapurusinghe, T., Saman, M.M., Rathnakumara, D.S., Samaraweera, P., Ranawana, K. and Rajakaruna, R.S. 2013. Paternity of green turtle (*Chelonia mydas*) clutches laid at Kosgoda, Sri Lanka. **Herpetological Conservation and Biology** 8: 27-37.

Encalada, S.E., Lahanas, P.N., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Miyamoto, M.M., and Bowen, B.W. 1996. Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. **Molecular Ecology** 5: 473–483.

Figgener, C., Chacón-Chaverri, D., Jensen, M.P. and Feldhaar, H. 2016. Paternity re-visited in a recovering population of Caribbean leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 475: 114-123.

FitzSimmons, N.N., Moritz, C., and Moore, S.S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology and Evolution** 12: 432-440.

Flint, M., Morton, J.M., Limpus, C.J., Patterson-Kane, J.C., Murray, P.J., and Mills, P.C. 2010. Development and application of biochemical and haematological reference intervals to identify unhealthy green sea turtles (*Chelonia mydas*). **The Veterinary Journal** 185: 299-304.

Freeland, J.R., Kirk, H. and Petersen, S.D. 2011. **Molecular Ecology**. 2nd ed. Singapore: Wiley-Blackwell.

Gross, W.B. and Siegel, H.S. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Diseases** 27: 972-979.

Hossein, Z., Mohammad, A.S., Ali, M.F., and Somayeh, R. 2011. Genetic population structure of Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricta*) using microsatellite analysis. **Iranian Journal of Biotechnology** 9: 56-62.

Jessop, T.S., Sumnera, J.M., Limpus, C.J., and Whittier, J.M. 2003. Interplay between plasma hormone profiles, sex and body condition in immature hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) subjected to a capture stress protocol. **Comparative Biochemistry and Physiology** 137A: 197-204.

Joseph, J. and Shaw, P.W. 2010. Multiple paternity in egg clutches of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*). **Conservation Genetics** 12: 601-605.

Lee, P.L. and Hays, G.C. 2004. Polyandry in a marine turtle: Females make the best of a bad job. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 101: 6530-6535.

Miro-Herrans, A.T., Velez-Zuazo, X., Acevedo, J.P., and Mcmillan W.O. 2008. Isolation and characterization of novel microsatellites from the critically endangered hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). **Molecular Ecology Resources** 8: 1098–1101.

Mortimer, J.A. and Donnelly, M. 2008. *Eretmochelys imbricata*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2014.3 [www.iucnredlist.org]

Muñoz, F.A., Estrada-Parra, S., Romero-Rojas, A., Gonzalez-Ballesteros, E., Work, T.M., Villaseñor-Gaona, H., and Estrada-Garcia, I. 2013. Immunological evaluation of captive green sea turtle (*Chelonia mydas*) with ulcerative dermatitis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 44: 837-844.

Nancy, N.F., Craig, M., and Stephen, S.M. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology Evolution** 12: 432-440.

Nishizawa, H., Joseph, J. and Chong, Y.K. 2016. Spatio-temporal patterns of mitochondrial DNA variation in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Southeast Asia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 474: 164-170.

Norman, J.A., Moritz, C., and Limpus, C.J. 1994. Mitochondrial DNA control region polymorphisms: Genetic markers for ecological studies of marine turtles. **Molecular Ecology** 3: 363-373.

Outline Worlds Map Images. 2009. **White-transparent Political World Map** [Online]. Available from: http://www.outline-world-map.com/white-transparent-political-world-map-b5a [2016, May 20]

Pearse, D.E. and Avise, J.C. 2001. Turtle mating systems: Behaviour, sperm storage, and genetic paternity. **Journal of Heredity** 92: 206–211.

Pearse D.E., Janzen F.J., and Avise J.C. 2002. Multiple paternity, sperm storage, and reproductive success of female and male painted turtles (*Chrysemys picta*) in nature. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 51:164–171

Samour, J.H., Howlett, J.C., Silvanose, C., Hasbun, C.R., and Al-Ghais, S.M. 1998. Normal hematology of free-living green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the United Arab Emirates. **Comparative Haematology International** 8: 102-107.

Santos, K.C., Livesey, M., Fish, M., and Lorences, A.C. 2015. Climate change implications for the nest site selection process and subsequent hatching success of a green turtle population. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change** DOI: 10.1007/s11027-015-9668-6

Tharp, G.D. and Woodman, D.A. 2002. **Experiments in Physiology**, 8th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. pp. 211-235.

Vargas, S.M., Jensen, M.P., Ho, S.Y., Mobaraki, A., Broderick, D., Mortimer, J.A., Whiting, S.D., Miller, J., Prince, R.I., Bell, I.P., Hoenner, X., Limpus, C.J., Santos, F.R. and FitzSimmons, N.N. 2015. Phylogeography, genetic diversity, and management units of hawksbill turtles in the Indo-Pacific. **Journal of Heredity** 107: 199-213.

Whiting, S.D., Guinea, M.L., Fomiatti, K., Flint, M., and Limpus, C.J. 2014. Plasma biochemical and PCV ranges for healthy, wild, immature hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) sea turtles. **Veterinary Record** 174: 608. doi: 10.1136/vr.101396

Wood, F.E. and Ebanks, G.K. 1984. Blood cytology and hematology of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. **Herpetologica** 40: 331-336.

Work, T.M. and Balazs, G.H. 1999. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases** 35: 804-807.

Zar, J.H. 1999. **Biostatistical Analysis,** 4th ed. Upper Saddle River, NJ. Prentice-Hall.

Zhang, F., Gu, H., and Li, P. 2011. A review of chelonian hematology. **Asian Herpetological Research** 2: 12-20.

Zolgharnein, H., Salari-Aliabadi, M.A., Forougmand, A.M., and Roshani, S. 2011. Genetic population structure of hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) using microsatellite analysis. **Iranian Journal of Biotechnology** 9: 56-62.