รายงานผลการดำเนินงาน
ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง
สุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากร ของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ผู้รับผิดชอบโครงการ
อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ

รายงานผลการดำเนินงาน
ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง
สุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากร ของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ผู้รับผิดชอบโครงการ
อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ

รายงานผลการดำเนินงาน

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

ษาไทย) สุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ษาอังกฤษ) Health, Growth and Population Status of the Hawksbill Sea Turtle *Eretmochelys imbricata* at Talu Island, Prachuapkhirikhan Province

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ
อาจารย์ ดร. จิรารัช กิตนะ
รองศาสตราจารย์ ผุสตี ปริยานนท์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฏฐ์ คนซื่อ
น.ส.มุกเรขา เชี่ยวชาญชัย
น.ส.ยุพาพร วิสูตร
น.ส.ธฤษวรรณ ไตรจิตร์
น.ส.รังษิมา ผิวผ่อง
นายรชตะ มณีอินทร์
นายขัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี
นายภาณุพงศ์ ธรรมโชติ
นายธงชัย ฐิติภูรี
นายสุธิโรจน์ มีสวัสดิ์
นายพิชญุตม์ ฤกษนันทน์
นายพชร สิทธิชีวภาค

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และ เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท ที่ให้การสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นหนึ่งในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่ยังคงสภาพอุดมสมบูรณ์ เป็นที่อยู่ของสัตว์สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ซึ่งปัจจุบันหน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ และภาคเอกชนที่ดูแลเกาะทะลุ (มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และ เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท) ได้ร่วมมือกันบริหารจัดการพื้นที่หาดทรายของเกาะทะลุให้เหมาะสมกับการขึ้นทำรังวางไข่ของเต่ากระ จนประสบผลสำเร็จในการเพาะฟักไข่และอนุบาลลูกเต่าได้เป็นจำนวนมาก โดยใน ปี พ.ศ. 2557 พบการขึ้นวางไข่ของเต่ากระ 7 รัง ในระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2557 และได้ทำการย้ายไข่มาเพาะฟักยังหาดทรายกึ่งธรรมชาติจนฟักออกเป็นตัวและได้ลูกเต่ามาเลี้ยงยังบ่อในโรงเรือนอนุบาลทั้งสิ้น 706 ตัว

การตรวจสอบสุขภาวะของเต่ากระในบ่อเลี้ยงอาศัยการตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยาในภาคสนามของเต่ากระกลุ่มอายุ 1-2 ปี ที่ได้จากการเพาะฟักไข่จากฤดูการวางไข่ ปี พ.ศ. 2556 แล้วนำมาเลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลจำนวน 68 ตัว พบว่าเต่ากระมีค่าฮีมาโตคริตอยู่ในช่วงร้อยละ 5 ถึง ร้อยละ 25.5 โดยมีเฉลี่ยเท่ากับ ร้อยละ 13.29 $\pm$ 4.93 ซึ่งจัดอยู่ในช่วงอ้างอิงของเต่ากระก่อนวัยเจริญพันธุ์ (ร้อยละ 12.1-41.0)

ขนาดประชากรของเต่ากระอาจประมาณได้จากข้อมูลการทำรังวางไข่ของเต่ากระที่เกาะทะลุ ในปี พ.ศ. 2555 และ 2557 ซึ่งพบว่ามีเต่ากระเพศเมียอย่างน้อย 4 ตัว ที่ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ทำรังวางไข่ แต่ไม่สามารถระบุถึงจำนวนเต่ากระเพศผู้ได้ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (mitochondrial DNA) เพื่อตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศเมียที่ขึ้นวางไข่ ควบคู่ไปกับการศึกษาภาวะ multiple paternity ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (microsatellite DNA) เพื่อตรวจสอบว่ามีเต่าเพศผู้อย่างน้อยกี่ตัวที่ผสมพันธุ์กับเต่าเพศเมียที่วางไข่รังนี้ โดยใช้เลือดจากตัวอย่างเต่ากระอายุ 1-2 ปี ที่ใช้ศึกษาสุขภาวะและการเจริญเติบโต ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ในการตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศเมีย ยังไม่สามารถใช้บริเวณ control region ของ mitochondrial DNA เพื่อระบุอัตลักษณ์ของแม่เต่าได้ ส่วนการตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศผู้ พบว่ามี microsatellite primer อย่างน้อย 3 คู่ ที่มีศักยภาพในการใช้ตรวจสอบอัตลักษณ์ของพ่อเต่าได้

คำสำคัญ โลหิตวิทยา, ปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น, ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ, นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ, ไมโครแซทเทลไลท์

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 species, especially the hawksbill sea turtle, *Eretmochelys imbricata*. Currently, a sea turtle head start program has been established under the cooperation between the Naval Special Warfare Command of The Royal Thai Navy and the private sectors (Foundation for Siam Marine Resource Restoration and Koh Talu Island Resort). In this program, nesting beach on Talu Island is routinely monitored for nesting incidence. Upon nesting, turtle eggs will be incubated *ex situ* in a semi-natural beach until hatch and hatchlings will be raised in a hatchery for a certain period before releasing to the wild. In the 2014 nesting season (June-September 2014), 7 nests of *E. imbricata* were found on the island, and 706 turtle hatchlings has been successfully obtained from the incubation and currently raised at the hatchery.

To monitor health of turtles in the head start program, blood samples were obtained from 68 turtles hatched during the 2013 nesting season and currently raised at the hatchery. It was found that hematocrit value of these turtles was in the range of 5% to 25.5% with an average value of 13.29 $\pm$ 4.93 percent which is well within the reference range of the immature *E. imbricata* raised in captivity (12.1-41.0 percent).

Population of the hawksbill turtle in this area was initially estimated from the nesting incidence. In 2012 and 2014 nesting season, it was estimated that there are at least 4 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 from mitochondrial DNA of the hatchlings and 2) number of male turtles that sired these hatchlings from microsatellite DNA. Blood samples of the immature turtles hatched during the 2013 nesting season were subjected to DNA extraction, PCR and sequence analysis. Preliminary results showed that using control region of the mitochondrial DNA as a marker to identify female turtles is not yet successful, while using microsatellite marker to identify male turtles seemed to be feasible with at least 3 pairs of microsatellite primer.

Keywords: hematology, packed cell volume, mitochondrial DNA, nuclear DNA, microsatellite

สารบัญ

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

บทนำ 2
วัตถุประสงค์ 2
วิธีดำเนินการวิจัย 3
สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล 4
ผลการศึกษา 4
สรุปผลการศึกษา 18
เอกสารอ้างอิง 18

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 : ข้อมูลการวางไข่ของเต่ากระบนหาดทรายของเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงปี พ.ศ. 2553-2557 (รวบรวมโดยเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท) 5

ตารางที่ 2 : ข้อมูลการขึ้นทำรังวางไข่และการเพาะฟักไข่เต่ากระบริเวณเกาะทะลุ จ. ประจวบคีรีขันธ์ ในปี พ.ศ. 2557 (รวบรวมโดยเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท) 6

ตารางที่ 3 : ข้อมูล (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ลักษณะสัณฐานและน้ำหนักตัวของตัวอย่างเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2557 11

ตารางที่ 4 : ลำดับเบสและขนาดของ mitochondrial primer ที่ใช้ในการศึกษาเต่ากระที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ 14

ตารางที่ 5 : ลำดับเบส ลักษณะเด่นของเบสที่ซ้ำกันและขนาดของ microsatellite primer จำนวน 10 คู่ ที่ใช้ในการศึกษาเต่ากระ ที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ 15

ตารางที่ 6 : ผลการวิเคราะห์ microsatellite primer กับตัวอย่างเนื้อเยื่อจากซากเต่ากระที่ได้จากฐานทัพเรือสัตหีบ จ.ชลบุรี 16

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 : ภาพถ่ายทางอากาศของเกาะทะลุ แสดงบริเวณที่พักของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท (กรอบสี่เหลี่ยมเส้นทึบ) หาดทรายที่มีการทำรังวางไข่ของเต่ากระ (ลูกศรทึบ) ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชบนเกาะทะลุ (กรอบสี่เหลี่ยมเส้นประ) และ โรงเรือนอนุบาลเต่ากระ (ลูกศรเส้นประ) .. 4

ภาพที่ 2 : หาดแสม เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ เป็นหนึ่งในหาดทรายที่พบการขึ้นทำรังวางไข่ของเต่ากระในช่วงปี พ.ศ. 2553-ปัจจุบัน 6

ภาพที่ 3 : การเพาะฟักไข่เต่ากระบนหาดทรายกึ่งธรรมชาติ หน้าโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ โดยนำทรายจากธรรมชาติมากองบริเวณที่น้ำทะเลขึ้นไม่ถึงและสร้างรั้วไม้เป็นแนวกันการกัดเซาะ หลุมที่ขุดใหม่จะมีขนาดความลึกใกล้เคียงกับหลุมที่แม่เต่าขุดในธรรมชาติ และมีกรอบพลาสติกกันผู้ล่ารบกวน (ภาพเล็ก) 7

ภาพที่ 4 : ลูกเต่ากระจากไข่รังที่ 5 (วางไข่วันที่ 19 สิงหาคม) ที่พบบริเวณเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในฤดูการวางไข่ปี พ.ศ. 2557 เริ่มฟักเป็นตัวและคลานขึ้นมาพ้นทราย ในวันที่ 12 ตุลาคม พ.ศ. 2557 7

ภาพที่ 5 : บ่ออนุบาลลูกเต่ากระของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีการให้อาหารธรรมชาติทั้งปลาบดและสาหร่ายทะเล (ภาพเล็ก) วันละ 1-2 ครั้ง 8

ภาพที่ 6 : โรงเรือนอนุบาลเต่ากระของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท จ.ประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งใช้เลี้ยงลูกเต่าก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ โดยนำน้ำทะเลจากธรรมชาติมาเปลี่ยนวันละ 1-2 ครั้ง หลังคาโรงเรือนมีกระเบื้องโปร่งแสงและด้านข้างโรงเรือนเปิดโล่งเพื่อให้ได้รับแสงจากธรรมชาติ 8

ภาพที่ 7 : กิจกรรมการปล่อยเต่ากระอายุ 1-2 ปี จำนวน 90 ตัว ในวันเสาร์ที่ 11 ตุลาคม พ.ศ. 2557 เพื่อถวายเป็นพระราชกุศลเนื่องในวโรกาสพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุ 87 พรรษา 9

ภาพที่ 8 : การบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐาน และ น้ำหนักตัว ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2557 10

ภาพที่ 9 : การเจาะเลือดจากตำแหน่งแอ่งเลือดใต้กระดองหลัง (subcarapacial sinus) ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2557 10

ภาพที่ 10 : การเก็บข้อมูลทางโลหิตวิทยาในภาคสนามของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2557 (ซ้าย : การวัดค่าฮีมาโตคริต; ขวา : การเตรียมสไลด์ตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ) 11

ภาพที่ 11 : แถบเรืองแสงของสารพันธุกรรม (DNA band) ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบการสกัด DNA ทั้ง 3 วิธี (① ใช้ cell lysis buffer; ② ใช้ Proteinase K+PBS ใส่ตัวอย่างในภาคสนาม; ③ ใช้ Proteinase K+PBS ใส่ตัวอย่างที่เก็บไว้ในห้องปฏิบัติการ) 14

ภาพที่ 12 : ตัวอย่างลักษณะเบสที่ซ้ำกันที่ปรากฏบนสาย DNA ของเนื้อเยื่อชากเต่ากระที่ได้รับจากฐานทัพเรือสัตหีบ จ.ชลบุรี เมื่อวิเคราะห์ด้วย microsatellite primer ชนิด Eim8 17

ภาพที่ 13 : ลักษณะเบสที่ซ้ำกันที่ปรากฏบนสาย DNA ของตัวอย่างเลือดเต่ากระ จากเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย microsatellite primer ชนิด Eim41 17

รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) สุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

(ภาษาอังกฤษ) Health, Growth and Population Status of the Hawksbill Sea Turtle *Eretmochelys imbricata* at Talu Island, Prachuapkhirikhan Province

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ
อาจารย์ ดร. จิรารัช กิตนะ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฏฐ์ คนซื่อ
รองศาสตราจารย์ ผุสตี ปริยานนท์
น.ส.มุกเรขา เชี่ยวชาญชัย
น.ส.ยุพาพร วิสูตร
น.ส.ธฤษวรรณ ไตรจิตร์
น.ส.รังษิมา ผิวผ่อง
นายรชตะ มณีอินทร์
นายขัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี
นายภาณุพงศ์ ธรรมโชติ
นายธงชัย ฐิติภูรี
นายสุธิโรจน์ มีสวัสดิ์
นายพิชญุตม์ ฤกษนันทน์
นายพชร สิทธิชีวภาค

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน่วยงานสนับสนุน

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

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. 2558 ได้วางแผนการทำงานโดย 1) ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ศึกษา และ 2) ใช้เต่ากระที่ใช้พื้นที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์เป็นพื้นที่ทำรังวางไข่เป็นกลุ่มสัตว์เป้าหมาย

ในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งต่อยอดงานวิจัยจากความสำเร็จเบื้องต้นโดยเน้นการประเมินปัจจัยทางชีวภาพที่บ่งบอกสุขภาวะ และ การเจริญเติบโต ตลอดจนประเมินสถานภาพประชากรเบื้องต้นโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งข้อมูลด้านนิเวศสรีรวิทยาที่ได้จะช่วยในการประเมินและปรับแนวทางการจัดการในพื้นที่เกาะทะลุ และเมื่อร่วมกับข้อมูลทางประชากรที่ได้ซึ่งสามารถนำมาใช้บ่งบอกสถานภาพของเต่ากระในอ่าวไทย และเก็บรวบรวมอย่างต่อเนื่องจะเป็นประโยชน์ต่อการติดตามประชากรในระยะยาว เพื่อใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่หมู่เกาะและทะเลไทยอย่างยั่งยืน

2. วัตถุประสงค์

สำรวจสุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่ขึ้นทำรังวางไข่บริเวณพื้นที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เก็บข้อมูลเกี่ยวกับสุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่ขึ้นทำรังวางไข่บริเวณพื้นที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ดังนี้

สุขภาวะ	การเจริญเติบโต	สถานภาพประชากร
- ค่าทางโลหิตวิทยา	- การเปลี่ยนแปลงขนาด	- จำนวนเพศเมีย (ข้อมูลการขึ้นวางไข่)
- ฮอร์โมนที่สัมพันธ์กับความเครียด	- การเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก	- จำนวนเพศผู้ (microsatellite DNA)

3.2 วิธีการศึกษา

3.2.1 สำรวจการขึ้นทำรังวางไข่ของแม่เต่ากระ ในพื้นที่โครงการฯ บันทึกข้อมูลขนาดสัณฐาน แล้วทำเครื่องหมายประจำตัวเพื่อใช้ในการติดตามระยะยาว

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 5 เพื่อใช้สกัด DNA ในห้องปฏิบัติการ

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

3.2.8 ตรวจสอบ mitochondrial DNA โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ control region ของเต่ากระ เพื่อนำมาตรวจสอบจำนวนเพศเมียที่ขึ้นมาวางไข่

3.2.9 วิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในภาคสนาม และสรุปผลการศึกษา

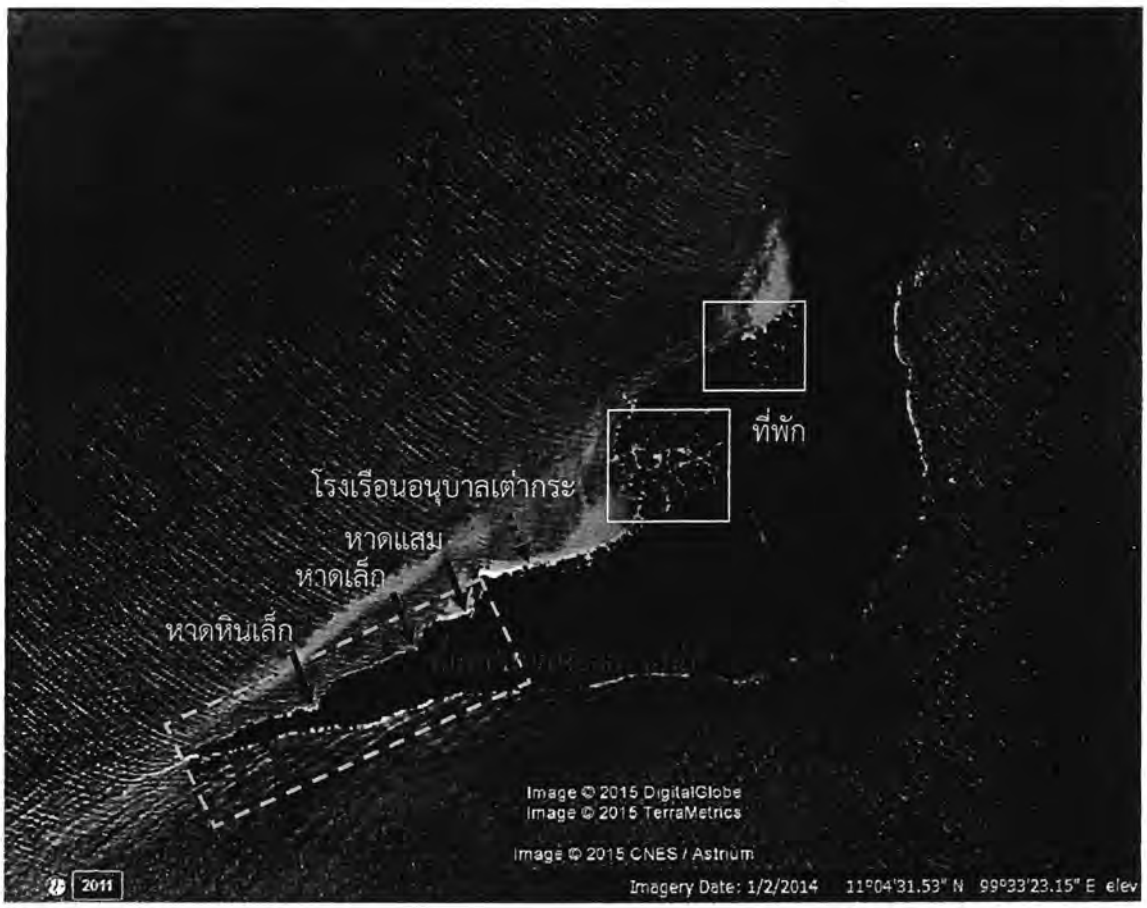
4. สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

สำรวจภาคสนามและเก็บข้อมูลทางกายภาพและชีวภาพในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ หมู่เกาะและทะเลไทย (เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์) และนำตัวอย่างมาศึกษาเพิ่มเติมที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ผลการศึกษา

5.1 การทำรังวางไข่ของเต่ากระที่เกาะทะลุ

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



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

บริเวณที่เต่ากระขึ้นวางไข่เป็นหาดทรายขนาดเล็กที่เว้าเข้ามา (ภาพที่ 1-2) จึงเป็นที่เก็บกักเศษไม้ ก้อนหิน และ เศษปะการัง ทำให้มีเศษวัสดุเหล่านี้ปะปนอยู่ในหลุมที่แม่เต่าวางไข่ และมีผลต่อการอยู่รอดของลูกเต่า จากข้อมูลของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท พบการขึ้นทำรังวางไข่ของเต่ากระอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด โดยในระยะแรกยังไม่ได้มีระบบการเพาะฟักในหาดทรายกึ่งธรรมชาติ ทำให้ไม่มีข้อมูลการออกเป็นตัวและอัตราการรอด ต่อมาในฤดูการวางไข่ปี พ.ศ. 2553 พลเรือโทวินัย กล่อมอินทร์ และเจ้าหน้าที่หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ จึงได้เข้าไปพัฒนาแนวทางในการเพาะฟักโดยอาศัยประสบการณ์จากการศึกษาวิจัยในเต่าตนุมาอย่างต่อเนื่อง (วินัย กล่อมอินทร์, 2545) ทั้งด้านการจดบันทึกข้อมูลแม่เต่า การย้ายไข่เต่าจากหาดทรายที่วางไข่ไปเพาะฟักยังหาดทรายกึ่งธรรมชาติ การอนุบาล และ การปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ จึงเริ่มมีข้อมูลเก็บอย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 1; ปรีดา เจริญพักตร์, สัมภาษณ์)

ตารางที่ 1 : ข้อมูลการวางไข่ของเต่ากระบนหาดทรายของเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงปี พ.ศ. 2553-2557 (รวบรวมโดยเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท)

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	2 ตัว	เพาะฟักที่หาดทรายกึ่งธรรมชาติ

หมายเหตุ : N/A ไม่มีข้อมูล

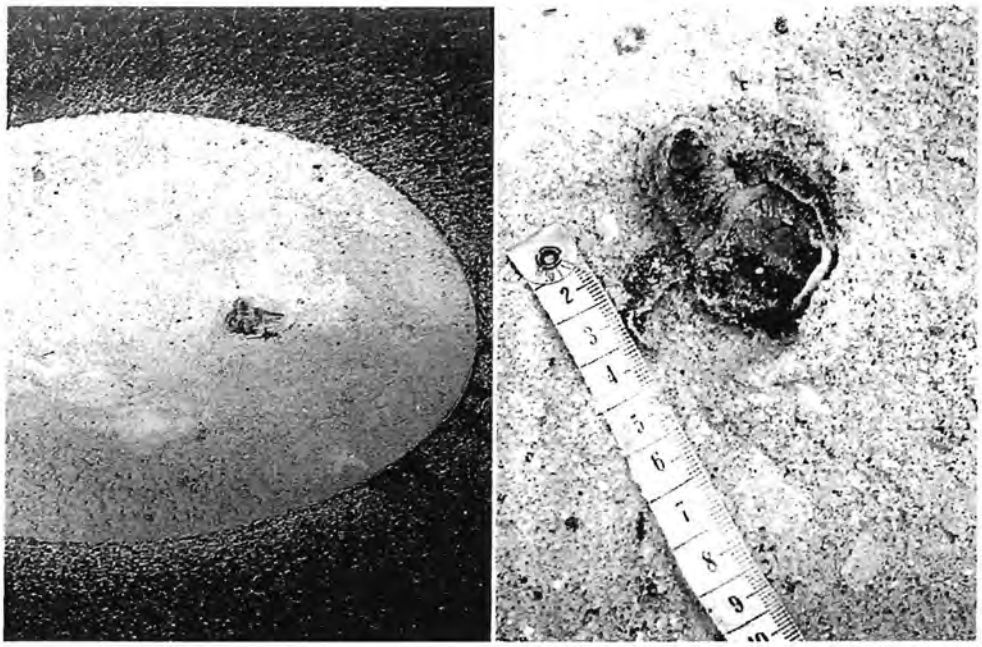
ภาพที่ 2 : หาดแสม เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ เป็นหนึ่งในหาดทรายที่พบการขึ้นทำรังวางไข่ของเต่ากระในช่วงปี พ.ศ. 2553-ปัจจุบัน

ในฤดูการวางไข่ของเต่ากระ ปี พ.ศ. 2557 พนักงานของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ทพบการขึ้นทำรังวางไข่ของเต่ากระทั้งสิ้น 7 รัง ในระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน (ตารางที่ 2) โดยได้ทำการย้ายไข่มาเพาะฟักยังหาดทรายกึ่งธรรมชาติจนฟักออกเป็นตัว (ภาพที่ 3) และนำลูกเต่ามาเลี้ยงยังบ่อในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ (ภาพที่ 4-5)

ตารางที่ 2 : ข้อมูลการขึ้นทำรังวางไข่และการเพาะฟักไข่เต่ากระบริเวณเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในปี พ.ศ. 2557 (รวบรวมโดยเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท)

รังที่	วันที่วางไข่	วันที่ออกจากไข่	ระยะเวลาฟัก	จำนวนไข่ที่วาง	จำนวนไข่ที่เสีย	จำนวนตัวที่ฟัก	จำนวนตัวตาย	จำนวนตัวคงเหลือ	อัตรารอด (%)
1	21 มิ.ย.	20 ส.ค.	60 วัน	131	28	103	2	101	77.10
2	5 ก.ค.	5 ก.ย.	62 วัน	161	11	150	1	149	92.55
3	20 ก.ค.	20 ก.ย.	62 วัน	163	27	136	4	132	80.98
4	3 ส.ค.	3 ต.ค.	61 วัน	167	35	132	-	132	79.04
5	19 ส.ค.	20 ต.ค.	60 วัน	153	21	132	-	132	86.27
6	3 ก.ย.	17 พ.ย.	75 วัน	163	115	48	-	48	29.45
7	18 ก.ย.	3 ธ.ค.	76 วัน	128	116	12	-	12	9.38
			รวม	**1,066**	353	**713**	**7**	706	**66.89**

ภาพที่ 3 : การเพาะฟักไข่เต่ากระบนหาดทรายกึ่งธรรมชาติ หน้าโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ โดยนำทรายจากธรรมชาติมากองบริเวณที่น้ำทะเลขึ้นไม่ถึงและสร้างรั้วไม้เป็นแนวกันการกัดเซาะ หลุมที่ขุดใหม่จะมีขนาดความลึกใกล้เคียงกับหลุมที่แม่เต่าขุดในธรรมชาติ และ มีกรอบพลาสติกกันผู้ล่ารบกวน (ภาพเล็ก)



ภาพที่ 4 : ลูกเต่ากระจากไข่รังที่ 5 (วางไข่วันที่ 19 สิงหาคม) ที่พบบริเวณเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในฤดูการวางไข่ปี พ.ศ. 2557 เริ่มฟักเป็นตัวและคลานขึ้นมาพ้นทราย ในวันที่ 12 ตุลาคม พ.ศ. 2557

ภาพที่ 5 : บ่ออนุบาลลูกเต่ากระของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีการให้อาหารธรรมชาติทั้งปลาบดและสาหร่ายทะเล (ภาพเล็ก) วันละ 1-2 ครั้ง

ภาพที่ 6 : โรงเรือนอนุบาลเต่ากระของเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท จ.ประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งใช้เลี้ยงลูกเต่าก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ โดยนำน้ำทะเลจากธรรมชาติมาเปลี่ยนวันละ 1-2 ครั้ง หลังคาโรงเรือนมีกระเบื้องโปร่งแสงและด้านข้างโรงเรือนเปิดโล่งเพื่อให้ได้รับแสงจากธรรมชาติ

ในปัจจุบัน (มีนาคม พ.ศ. 2558) มีการขนย้ายลูกเต่ากระบางส่วน (รังที่ 1) ไปยังเกาะแสมสาร จ. ชลบุรี เพื่อนำไปอนุบาลและใช้ในโครงการปล่อยเต่าคืนสู่ธรรมชาติ โดยที่เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ทยังเลี้ยงดูและอนุบาลเต่ากระที่ได้จากฤดูการวางไข่ปี พ.ศ. 2557 จำนวน 6 รัง (รังที่ 2-7) และมีเต่ากระอายุ 1-4 ปี ที่อนุบาลในบ่อเลี้ยงก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติดังนี้

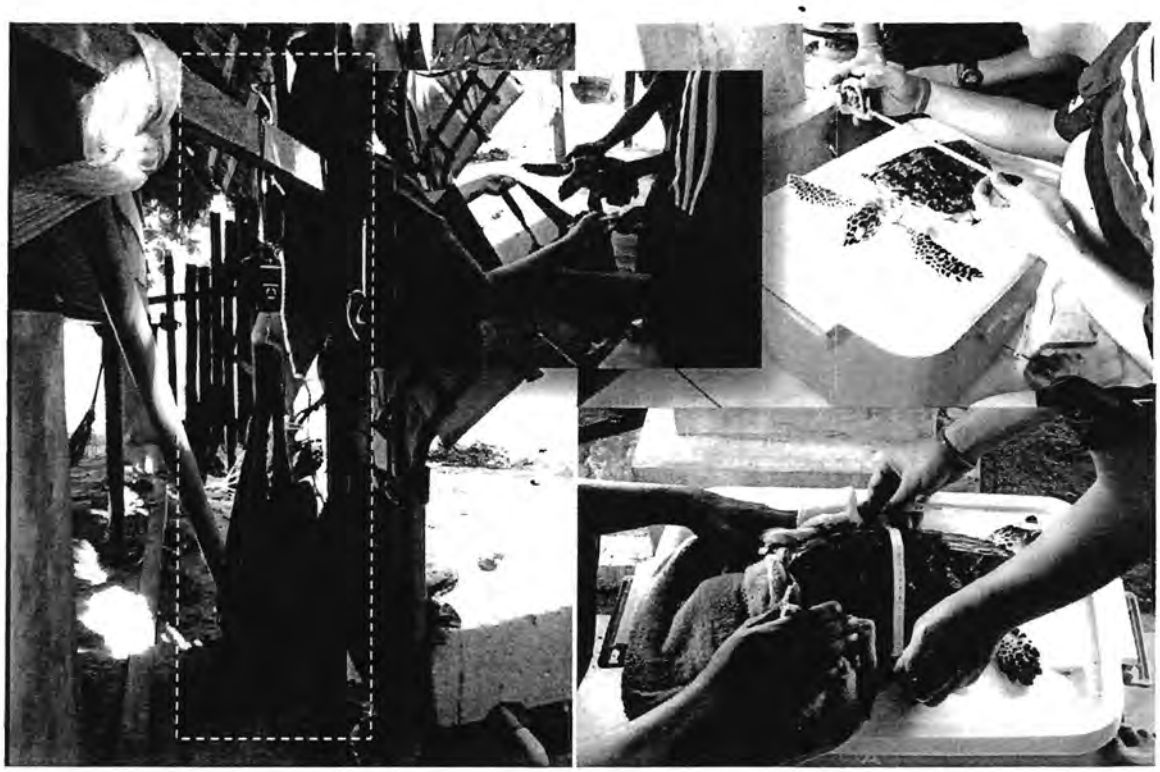
- เต่ากระอายุ 1-2 ปี จำนวน 160 ตัว
- เต่ากระอายุ 3 ปี จำนวน 22 ตัว
- เต่ากระอายุ 4 ปี จำนวน 8 ตัว

เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ทได้จัดกิจกรรมการปล่อยเต่ากระขนาดเล็ก (อายุ 1-2 ปี) คืนสู่ธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง ในโอกาสพิเศษต่าง ๆ โดยจะเปิดโอกาสให้เยาวชนและประชาชนทั่วไปได้เข้ามามีส่วนร่วม ดังกรณีโครงการปล่อยเต่ากระในวันที่ 11 ตุลาคม พ.ศ. 2557 เพื่อถวายเป็นพระราชกุศลเนื่องในวโรกาสพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุ 87 พรรษา (ภาพที่ 7) และนอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างเต่ากระขนาดใหญ่ (อายุ 3-4 ปี) ไว้จำนวนหนึ่ง เพื่อเป็นตัวอย่างสำหรับศึกษาการเติบโตในบ่อเลี้ยง และติดตามการอพยพในธรรมชาติในอนาคต (ปรีดา เจริญพักตร์, สัมภาษณ์)

ภาพที่ 7 : กิจกรรมการปล่อยเต่ากระอายุ 1-2 ปี จำนวน 90 ตัว ในวันเสาร์ที่ 11 ตุลาคม พ.ศ. 2557 เพื่อถวายเป็นพระราชกุศลเนื่องในวโรกาสพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุ 87 พรรษา

5.2 สุขภาวะและการเจริญเติบโตของเต่ากระ

คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบสุขภาวะและการเจริญเติบโตของเต่ากระ โดยเก็บข้อมูลลักษณะสัณฐาน (ความยาวและความกว้างกระดองหลัง) และน้ำหนักตัว (ภาพที่ 8) ก่อนเจาะเลือดจากตำแหน่ง subcarapacial sinus (ภาพที่ 9) เพื่อนำมาตรวจสอบลักษณะทางโลหิตวิทยาของเนื้อเยื่อเลือด ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต (hematocrit) จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง และ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (ภาพที่ 10) เพื่อใช้ประเมินสุขภาวะโดยรวมของเต่ากระต่อไป



ภาพที่ 8 : การบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐาน และ น้ำหนักตัว ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2557

ภาพที่ 9 : การเจาะเลือดจากตำแหน่งแอ่งเลือดใต้กระดองหลัง (subcarapacial sinus) ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2557

ภาพที่ 10 : การเก็บข้อมูลทางโลหิตวิทยาในภาคสนามของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2557 (ซ้าย : การวัดค่าฮีมาโตคริต; ขวา : การเตรียมสไลด์ตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ)

การสำรวจภาคสนามในช่วงเดือนตุลาคม ธันวาคม พ.ศ. 2557 คณะผู้วิจัยได้สำรวจสุขภาวะและการเจริญเติบโตของเต่ากระกลุ่มอายุ 1-2 ปี จำนวน 88 ตัว และเต่ากระกลุ่มที่มีอาการป่วยหรือผิดปรกติ จำนวน 6 ตัว (ตารางที่ 3) โดยทำการศึกษาเบื้องต้นในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 ก่อนที่จะเก็บข้อมูลเต็มรูปแบบในเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม พ.ศ. 2557

ตารางที่ 3 : ข้อมูล (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ลักษณะสัณฐานและน้ำหนักตัวของตัวอย่างเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2557

วันที่ศึกษา	กลุ่ม	จำนวน (ตัว)	น้ำหนักตัว (กิโลกรัม)	ความยาวกระดองหลัง (ซ.ม.)		ความกว้างกระดองหลัง (ซ.ม.)	
				แนวตรง	แนวโค้ง	แนวตรง	แนวโค้ง
11-12 ต.ค.	อายุ 1-2 ปี	19	2.33 ± 0.39	28.79 ± 1.79	N/A	22.72 ± 3.30	N/A
11-12 ต.ค.	ผิดปรกติ*	6	1.96 ± 1.05	24.50 ± 2.88	N/A	20.08 ± 3.54	N/A
29-30 พ.ย.	อายุ 1-2 ปี	69	2.42 ± 0.57	28.47 ± 2.47	29.98 ± 2.63	22.35 ± 1.98	26.30 ± 2.31

* <u>หมายเหตุ</u> : ประกอบด้วย 1) เต่ากระมีอาการของ fibropapillomatosis จำนวน 4 ตัว, 2) เต่ากระที่มีมีบาดแผลที่รยางค์หน้า จำนวน 1 ตัว และ 3) เต่ากระที่มีรูปร่างกระดองหลังผิดปรกติ จำนวน 1 ตัว

จากการตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยาในภาคสนาม (พฤศจิกายน-ธันวาคม พ.ศ. 2557) พบว่า เต่ากระกลุ่มอายุ 1-2 ปี (จำนวน 68 ตัว) มีค่าฮีมาโตคริตอยู่ในช่วงร้อยละ 5 ถึง ร้อยละ 25.5 โดยมีเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 13.29 ± 4.93 ซึ่งจัดอยู่ในช่วงอ้างอิงของเต่ากระก่อนวัยเจริญพันธุ์ (ร้อยละ 12.1-41.0; Whiting et al., 2014) อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณาข้อมูลรายตัวพบว่ามีเต่ากระร้อยละ 50 (34 ตัว จาก 68 ตัว) ที่มีค่าฮีมาโตคริตน้อยกว่าค่าต่ำสุดของช่วงอ้างอิง (ร้อยละ 12.1) ซึ่งอาจเป็นเนื่องจากลักษณะเฉพาะของเต่ากระที่มีค่าฮีโมโตคริตค่อนข้างต่ำอยู่แล้ว ดังรายงานของ Caliendo et al. (2010) ซึ่งแสดงค่าฮีมาโตคริตของเต่ากระที่ร้อยละ 10.5 หรือ อาจเกิดจากในการศึกษานี้ใช้การเจาะเลือดจากตำแหน่งแอ่งเลือด

ใต้กระดองหลัง (subcarapacial sinus) ซึ่งอาจได้รับน้ำเหลืองปนมาเจือจางเลือดทำให้อ่านค่าได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ซึ่งจำเป็นต้องตรวจสอบก่อนนำข้อมูลไปใช้ในการประเมินสุขภาวะ โดยปัจจุบันกำลังอยู่ในระหว่างการตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ เพิ่มเติมจากสไลด์ตัวอย่างเลือด และ ค่าทางชีวเคมีของน้ำเลือด เพื่อประกอบการประเมินสุขภาวะเบื้องต้นของเต่ากระในบ่อเลี้ยงต่อไป

5.3 สถานภาพประชากรเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ

5.3.1 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) และในฤดูการวางไข่ ปี พ.ศ. 2557 พนักงานเกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ทคาดว่าไข่ 6 รัง จาก 7 รังที่สำรวจพบเป็นไข่ที่วางโดยแม่เต่าเพียงตัวเดียว คือ แม่ศรีประจวบ ซึ่งจากข้อมูลในช่วง 2 ฤดูการวางไข่นี้ แสดงให้เห็นว่ามีแม่เต่าอย่างน้อย 4 ตัว ที่อาศัยอยู่บริเวณนี้ และ ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ทำรังวางไข่

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

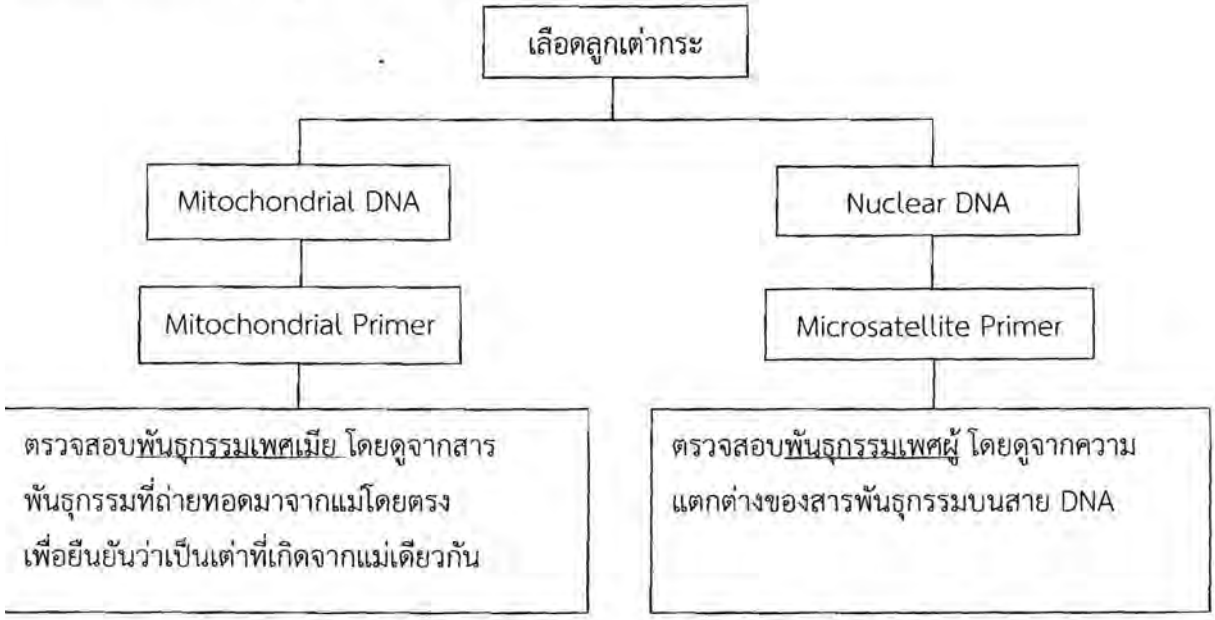
5.3.2 ประชากรเต่ากระเพศผู้ที่อาศัยบริเวณเกาะทะลุ

เต่ากระวัยเจริญพันธุ์ มีการอพยพไปมาระหว่างแหล่งอาหารและพื้นที่สืบพันธุ์ โดยเต่าเพศผู้จะไม่มีการขึ้นมาบนหาดทรายเหมือนเต่าเพศเมีย (Mortimer and Donnelly, 2008) ทำให้การศึกษาประชากรเต่าเพศผู้ทำได้ค่อนข้างยาก อย่างไรก็ดีจากปรากฏการณ์ในธรรมชาติที่เต่าเพศเมียหลายชนิดสามารถผสมพันธุ์กับเพศผู้ได้มากกว่า 1 ตัว ทำให้ลูกเต่าในแต่ละรังเกิดจากการปฏิสนธิของไข่จากเพศเมีย 1 ตัว กับอสุจิของเพศผู้มากกว่า 1 ตัว (multiple paternity; Pearse and Avise, 2001) ซึ่งเชื่อว่าการที่เต่าทะเลสามารถวางไข่ได้จำนวนมากในแต่ละรัง น่าจะเกิดจากการเก็บสะสมอสุจิจากการผสมพันธุ์หลายครั้ง (Lee and Hays, 2004) คณะผู้วิจัยจึงวางแผนที่จะติดตามตรวจสอบภาวะ multiple paternity ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (microsatellite DNA) ในเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ โดยใช้ตัวอย่างเต่ากระอายุ 1-2 ปี ที่ใช้ศึกษาสุขภาวะและการเจริญเติบโตในช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม พ.ศ. 2557 ซึ่งพบว่าเป็นเต่าที่ได้จากไข่รังเดียวกัน จำนวน 69 ตัว เพื่อตรวจสอบว่ามีเต่าเพศผู้อย่างน้อยกี่ตัวที่ผสมพันธุ์กับเต่าเพศเมียที่วางไข่รังนี้

นอกจากนี้ ในฤดูการวางไข่ปี พ.ศ. 2557 ยังมีเต่ากระที่ได้จากการฟักไข่รังที่ 2-7 อีกประมาณ 600 ตัว ที่เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ทเลี้ยงไว้ในโรงเรือนอนุบาลแบบแยกรังอย่างชัดเจน จึงสามารถใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาได้ ทั้งนี้จำเป็นต้องรอให้เต่ากระมีอายุมากขึ้นและมีขนาดใหญ่เหมาะสมที่จะเจาะเลือดได้ โดยคณะผู้วิจัยวางแผนที่จะใช้เต่ากระกลุ่มนี้ในงานวิจัยปีงบประมาณ 2559 ต่อไป

5.3.3 การศึกษาสถานภาพประชากรเต่ากระด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

การศึกษาสถานภาพประชากรเต่ากระ สามารถตรวจสอบโดยการนำเลือดลูกเต่ากระมาสกัด DNA และตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของพ่อและแม่ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ gene ในเต่าเพศผู้และเพศเมีย



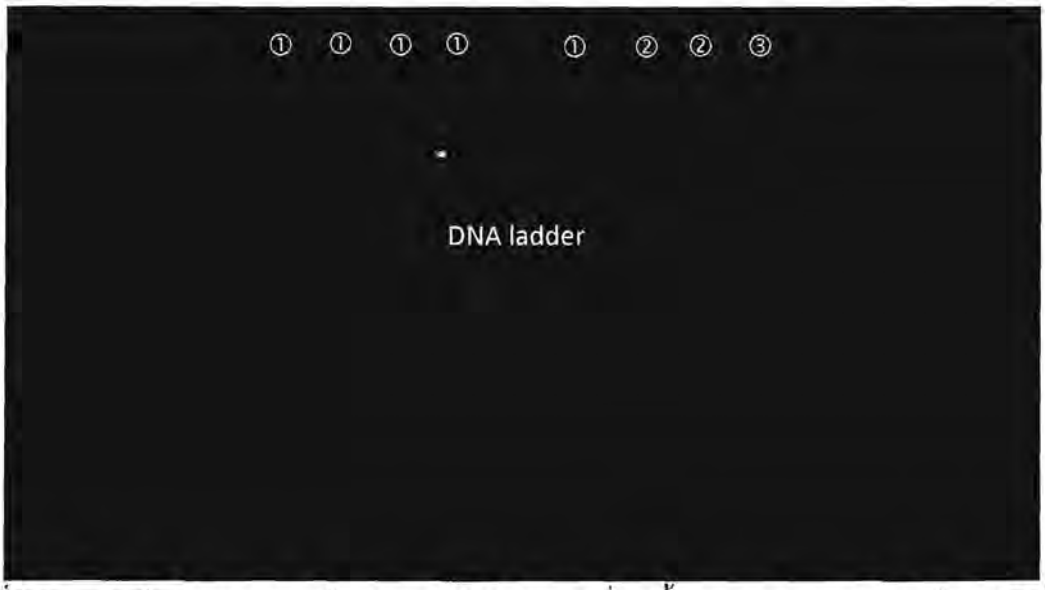
เมื่อนำตัวอย่างเลือดลูกเต่ากระมาสกัด DNA แล้วนำไปเข้ากระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอย่าง แล้วจึงนำ PCR Product ที่ได้ไปตรวจสอบหา DNA ในช่วงขนาดของ primer (bp) ที่ต้องการ บน 1% agarose gel และหากตรวจสอบพบ DNA ในช่วงที่ต้องการแล้วจึงเตรียมตัวอย่างนำส่งวิเคราะห์ผล (sequence analysis) เพื่อหาสารพันธุกรรม ก่อนตรวจสอบผล sequencing ด้วยโปรแกรม MEGA6 และนำมาวิเคราะห์ผลต่อไป

5.3.3.1 วิธีการสกัด DNA

เพื่อหาวิธีสกัด DNA ให้ได้คุณภาพจากตัวอย่างออกมาดีที่สุด จึงทำการทดสอบวิธีการสกัด DNA ทั้งหมด 3 วิธีด้วยกัน (ArchivePure DNA Tissue Kit; 5PRIME, 2007) ได้แก่

1) เก็บตัวอย่างในภาคสนามก่อนนำมาแช่แข็งในห้องปฏิบัติการตามปรกติ และใช้ cell lysis buffer เป็นสารช่วยย่อยสลายตัวอย่างเลือดและสกัดเป็น DNA ออกมา
2) ใช้ Proteinase K+PBS (Phosphate Buffer Saline) ใส่ลงในตัวอย่างเลือดที่ทำการศึกษาในภาคสนาม ก่อนนำมาเข้าสู่กระบวนการสกัด DNA ในห้องปฏิบัติการต่อไป
3) เก็บตัวอย่างในภาคสนามก่อนนำมาแช่แข็งในห้องปฏิบัติการตามปรกติ แล้วใช้ Proteinase K+PBS ใส่ลงในตัวอย่างเลือดที่เก็บมาจากภาคสนามและเข้าสู่กระบวนการสกัด DNA ต่อไป

เมื่อตรวจสอบผลการสกัด DNA ทั้ง 3 แบบ พบว่าการใช้ cell lysis buffer สามารถช่วยสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดได้ผลดีที่สุด โดยตรวจสอบจากการปรากฏแถบเรืองแสงของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้น (DNA band) บน agarose gel (ดังภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 : แถบเรืองแสงของสารพันธุกรรม (DNA band) ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบการสกัด DNA ทั้ง 3 วิธี (① ใช้ cell lysis buffer; ② ใช้ Proteinase K+PBS ใส่ตัวอย่างในภาคสนาม; ③ ใช้ Proteinase K+PBS ใส่ตัวอย่างที่เก็บไว้ในห้องปฏิบัติการ)

5.3.3.2 การศึกษา mitochondrial DNA

การศึกษา Mitochondrial DNA เพื่อตรวจสอบหาสารพันธุกรรมเพศเมีย จะต้องเลือกใช้ mitochondrial primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวอย่างบริเวณตำแหน่ง control region เพื่อให้สามารถแยกสารพันธุกรรมที่มีความแตกต่างในระดับ individual ออกจากกันได้ ในการศึกษานี้เลือกใช้ mitochondrial primer จำนวน 2 คู่ ได้แก่ TCR5 กับ TCR6 (Norman et al., 1994) และ LTCM2 กับ HDCM2 (Encalada et al., 1996) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 : ลำดับเบสและขนาดของ mitochondrial primer ที่ใช้ในการศึกษาเต่ากระที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์

Primers	Primer sequences (5' ⟶ 3')	Size range (bp)
TCR5_F	TTGTACATCTACTTATTTACCAC	400
TCR6_R	GTAGGTAGAAGTAAAAGTAGGGTATGGC	400
LTCM2	CGGTCCCCAAAACCGGAATCCTAT	510
HDCM2	GCAAGTAAAACTACCGTATGCCAGGTTA	510

จากการทดสอบหา mitochondrial primer ที่มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้กับตัวอย่าง DNA ของเต่ากระ โดยสังเกตแถบเรืองแสงของสารพันธุกรรม (DNA band) ที่เกิดขึ้นบน agarose gel พบว่า คู่ของ LTCM2 กับ HDCM2 มีการปรากฏ band ของ DNA เกิดขึ้น จึงนำ primer ชนิดนี้มาใช้หาสารพันธุกรรมเพศเมียกับเลือดเต่ากระกลุ่มอายุ 1-2 ปี จำนวน 88 ตัว และเต่ากระกลุ่มที่มีอาการป่วยหรือผิดปรกติ จำนวน 6 ตัว รวมทั้งสิ้น 94 ตัว ซึ่งสามารถนำมาหา PCR Product ได้ทั้งสิ้นจำนวน 61 ตัว แต่เมื่อนำส่งวิเคราะห์ผลกับบริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด ยังไม่สามารถแสดงสารพันธุกรรมออกมาได้ จึงทำให้ยังไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ผลต่อไปได้

5.3.3.3 การศึกษา nuclear DNA

การศึกษา Nuclear DNA เพื่อตรวจสอบหาสารพันธุกรรมเพศผู้ จะต้องเลือกใช้ microsatellite primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อลำดับเบสบนสาย DNA โดยตรวจสอบจากการปรากฏของเบสที่ซ้ำกันเกิดขึ้น ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ microsatellite primer จำนวน 10 คู่ (FitzSimmons et al., 1995; Miro-herrans et al., 2008; Zolgharnein et al, 2011) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 : ลำดับเบส ลักษณะเด่นของเบสที่ซ้ำกันและขนาดของ microsatellite primer จำนวน 10 คู่ที่ใช้ในการศึกษาเต่ากระ ที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์

Locus	Primer sequences (5' ⟶ 3')	Repeat Motif	Size range (bp)
1. Cm 58	F: GCCTGCAGTACACTCGGTATTTAT R: TCAATGAAAGTGACAGGATGTACC	$(CA)_{13}$	124-142
2. Cm72	F: CTATAAGGAGAAAGCGTTAAGACA R: CCAAATTAGGATTACACAGCCAAC	$(CA)_{33}$	231-243
3. Cm84	F: TGTTTTGACATTAGTCCAGGATTG R: ATTGTTATAGCCTATTGTTCAGGA	$(CA)_{15}$	314-350
4. Cc117	F: TCTTTAACGTATCTCCTGTAGCTC R: CAGTAGTGTCAGTTCATTGTTTCA	$(CA)_{17}$	212-245
5. Ei8	F: ATATGATTAGGCAAGGCTCTCAAC R: AATCTTGAGATTGGCTTAGAAATC	$(CA)_{19}$	194-222
6. Eim8	F: CACGACGTTGTAAAACGACTCCTTTTTTCAGATACATTTA R: CACTGCATGCATATTGA	$(GA)_{13}$	250-268
7. Eim9	F: CACGACGTTGTAAAACGACGGCGGGTGTCAATATGAT R: CTGTAGAGGATCGGAGTTGTT	$(CA)_{11}$	257-293
8. Eim17	F: CACGACGTTGTAAAACGACTGGGAGGGTCAATGGT R: CCTCCTTACAATGATACATGG	$(GT)_{17}$	266-292

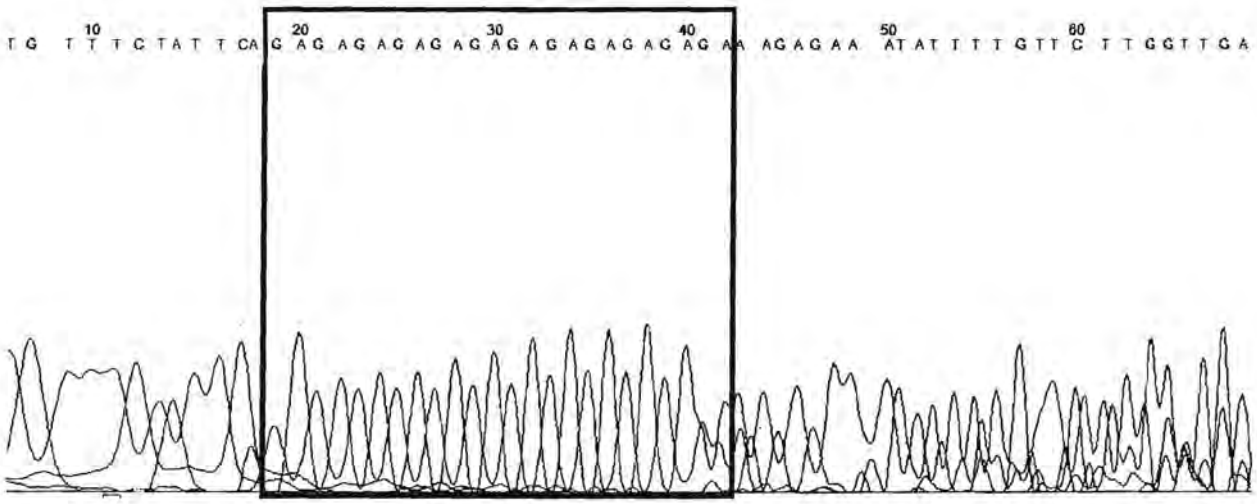
ตารางที่ 5 : ลำดับเบส ลักษณะเด่นของเบสที่ซ้ำกันและขนาดของ microsatellite primer จำนวน 10 คู่ ที่ใช้ในการศึกษาเต่ากระ ที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ (ต่อ)

Locus	Primer sequences (5' ⟶ 3')	Repeat Motif	Size range (bp)
9. Eim31	F: ATCTGACTTGGGTGTGCATAC R: CACGACGTTGTAAAACGACATCAGCTCCAGGTGTCCTAA	$(GT)_{17}$	314-342
10. Eim41	F: CACGACGTTGTAAAACGACGAAGTCCTTGGCATGCTT R: TCCTCAGCGTTGTAGTAGTCC	$(TG)_9$	335-355

ในเบื้องต้นได้นำ microsatellite primer ทั้ง 10 คู่ มาทดสอบกับเนื้อเยื่อของซากเต่ากระจากฐานทัพเรือสัตหีบ ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เพื่อหา primer ที่มีความเหมาะสมต่อการศึกษาสารพันธุกรรมเพศผู้ในเต่ากระ โดยนำส่งวิเคราะห์ผล PCR Product กับบริษัท ยูทูไบโอ (ไทยแลนด์) จำกัด เมื่อนำสารพันธุกรรมที่ได้มาวิเคราะห์ผล โดยตรวจสอบจากจำนวนเบสที่ซ้ำกันของ reference microsatellite primer พบว่ามีจำนวน primer ทั้งหมด 7 ชนิดที่สามารถนำมาวิเคราะห์สารพันธุกรรมเพศผู้ได้ ได้แก่ Cm84 Cc117 Ei8 Eim8 (ภาพที่ 12) Eim17 Eim31 และ Eim41 และมี primer 1 ชนิด คือ Eim9 ที่ไม่สามารถแสดงสารพันธุกรรมออกมาได้ ทำให้ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ผลต่อไปได้ นอกจากนี้ primer อีก 2 ชนิด คือ Cm58 และ Cm72 ตรวจพบจำนวนเบสที่ซ้ำกันไม่ตรงกับข้อมูลของ reference จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป (ตารางที่ 6)

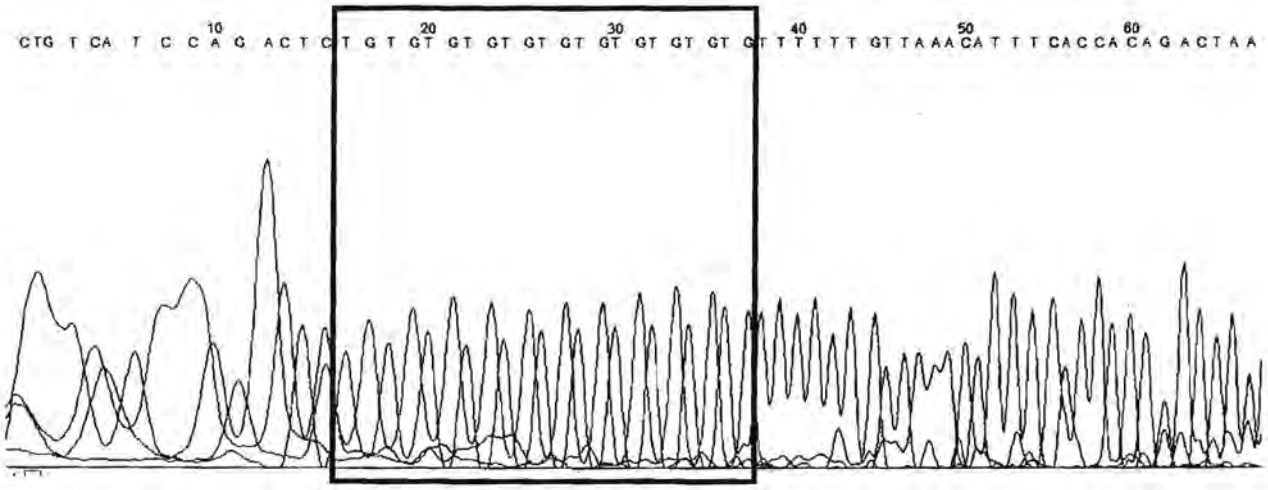
ตารางที่ 6 : ผลการวิเคราะห์ microsatellite primer กับตัวอย่างเนื้อเยื่อจากซากเต่ากระที่ได้จากฐานทัพเรือสัตหีบ จ.ชลบุรี

Locus	Repeat Motif (reference)	Repeat Motif (experiment)	Size range (bp)
1. Cm 58	$(CA)_{13}$	$(GT)_9$	~50
2. Cm72	$(CA)_{33}$	$(GT)_9$	~140
3. Cm84	$(CA)_{15}$	$(CA)_{20}$	~90
4. Cc117	$(CA)_{17}$	$(CA)_6$	~180
5. Ei8	$(CA)_{19}$	$(CA)_{16}$	~180
6. Eim8	$(GA)_{13}$	$(GA)_{12}$	~190
7. Eim9	$(CA)_{11}$	N/A	N/A
8. Eim17	$(GT)_{17}$	$(GT)_{16}$	~180
9. Eim31	$(GT)_{17}$	$(GT)_{19}$	~210
10. Eim41	$(TG)_9$	$(TG)_{12}$	~270



ภาพที่ 12 : ตัวอย่างลักษณะเบสที่ซ้ำกันที่ปรากฏบนสาย DNA ของเนื้อเยื่อซากเต่ากระที่ได้รับจากฐานทัพเรือสัตหีบ จ.ชลบุรี เมื่อวิเคราะห์ด้วย microsatellite primer ชนิด Eim8

นอกจากนี้ ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมกับเลือดเต่ากระกลุ่มอายุ 1-2 ปี ด้วย primer จำนวน 3 ชนิด คือ Eim9 Eim17 และ Eim41 เมื่อนำส่งตัวอย่าง PCR Product กับบริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ พบว่า Eim41 (ภาพที่ 13) สามารถนำมาใช้หาสารพันธุกรรมเต่าเพศผู้ได้ แต่ Eim9 และ Eim17 ยังไม่สามารถแสดงสารพันธุกรรมที่จะนำมาวิเคราะห์ผลต่อได้



ภาพที่ 13 : ลักษณะเบสที่ซ้ำกันที่ปรากฏบนสาย DNA ของตัวอย่างเลือดเต่ากระ จากเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย microsatellite primer ชนิด Eim41

6. สรุปผลการศึกษา

เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นหนึ่งในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่ยังคงสภาพอุดมสมบูรณ์ เป็นที่อยู่ของสัตว์สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ซึ่งปัจจุบันหน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ และภาคเอกชนที่ดูแลเกาะทะลุ (มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และ เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท) ได้ร่วมมือกันบริหารจัดการพื้นที่หาดทรายของเกาะทะลุให้เหมาะสมกับการขึ้นทำรังวางไข่ของเต่ากระ จนประสบผลสำเร็จในการเพาะฟักไข่และอนุบาลลูกเต่าได้เป็นจำนวนมาก โดยใน ปี พ.ศ. 2557 พบการขึ้นวางไข่ของเต่ากระ 7 รัง ในระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2557 และได้ทำการย้ายไข่มาเพาะฟักยังหาดทรายกึ่งธรรมชาติจนฟักออกเป็นตัวและได้ลูกเต่ามาเลี้ยงยังบ่อในโรงเรือนอนุบาลทั้งสิ้น 706 ตัว

การตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยาในภาคสนามของเต่ากระกลุ่มอายุ 1-2 ปี ที่ได้จากการเพาะฟักไข่จากฤดูการวางไข่ ปี พ.ศ. 2556 แล้วนำมาเลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลจำนวน 68 ตัว พบว่ามีค่าฮีมาโตคริตอยู่ในช่วงร้อยละ 5 ถึง ร้อยละ 25.5 โดยมีเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 13.29 $\pm$ 4.93 ซึ่งจัดอยู่ในช่วงอ้างอิงของเต่ากระก่อนวัยเจริญพันธุ์ (ร้อยละ 12.1-41.0) แสดงถึงสุขภาวะที่เหมาะสมของเต่ากระในบ่อเลี้ยง และควรมีการตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ เช่น จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ระดับโปรตีนในน้ำเลือด และระดับฮอร์โมนที่สัมพันธ์กับความเครียดเพื่อช่วยในการยืนยันต่อไป

จากข้อมูลการทำรังวางไข่ของเต่ากระที่เกาะทะลุ ในปี พ.ศ. 2555 และ 2557 พบว่ามีเต่ากระเพศเมียอย่างน้อย 4 ตัว ที่ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ทำรังวางไข่ แต่ไม่สามารถระบุถึงจำนวนเต่ากระเพศผู้ได้ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (mitochondrial DNA) เพื่อตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศเมียที่ขึ้นวางไข่ ควบคู่ไปกับการศึกษาภาวะ multiple paternity ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (microsatellite DNA) เพื่อตรวจสอบว่ามีเต่าเพศผู้อย่างน้อยกี่ตัวที่ผสมพันธุ์กับเต่าเพศเมียที่วางไข่รังนี้ โดยใช้เลือดจากตัวอย่างเต่ากระอายุ 1-2 ปี ที่ใช้ศึกษาสุขภาวะและการเจริญเติบโต ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ในการตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศเมีย ยังไม่สามารถใช้บริเวณ control region ของ mitochondrial DNA เพื่อระบุอัตลักษณ์ของแม่เต่าได้ ส่วนการตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศผู้ พบว่ามี microsatellite primer อย่างน้อย 3 คู่ ที่มีศักยภาพในการใช้ตรวจสอบอัตลักษณ์ของพ่อเต่าได้

7. เอกสารอ้างอิง

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.). 2554. **แผนแม่บท โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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

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.