โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

Genetic Variation of Hawkbill Sea Turtle (*Eretmochelys imbricata*) at Talu Island, Prachuap Khiri Khan Province.

ชื่อนิสิต นางสาวนันทนัช คันธารัตนกุล **เลขประจำตัว** 6032818023

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

นางสาวนันทนัช คันธารัตนกุล

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

Genetic Variation of Hawkbill Sea Turtle (*Eretmochelys imbricata*) at Talu Island, Prachuap Khiri Khan Province

Nuntanut Kantaratanakul

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Bachelor of Science in Marine Science
Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2020

หัวข้อโครงการ	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
โดย	นางสาวนันทนัช คันธารัตนกุล
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนากร
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2309499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

(ศาสตราจารย์ ดร. วรณพ วิยกาญจน์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

. อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชุนา ชวนิชย์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัทมา สิงหรักษ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมฤดี จิตประไพ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. สุธาพร บุญญเจตน์พงษ์)

Project Title	Genetic Variation of Hawkbill Sea Turtle (*Eretmochelys imbricata*) at Talu Island, Prachuap Khiri Khan Province.
By	Nantanut Kantaratanakul
Field of study	Marine Science
Advisor	Assistant Professor Sanit Piyapattanakorn, Ph.D.
Co-advisor	Assistant Professor Kornrawee Aiemsomboon, Ph.D.

Accepted by the Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Bachelor's

..... Head of Marine Science Department

(Prof. Voranop Viyakarn, Ph.D.)

PROJECT COMMITTEE

. Project Advisor

(Asst. Prof. Sanit Piyapattanakorn, Ph.D.)

Kornrawee Aiemsomboon. Project Co-Advisor

(Asst. Prof. Kornrawee Aiemsomboon, Ph.D.)

..... Member

(Assoc. Prof. Suchana Chavanich, Ph.D.)

P. Singhruck ..... Member

(Asst. Prof. Patama Singhruck, Ph.D.)

Somrudee Jitpraphai ..... Member

(Asst. Prof. Somrudee Jitpraphai, Ph.D.)

สุธาทร บุญเจตน์พงษ์ ..... Member

(Sutaporn Bunyajetpong, Ph.D.)

ชื่อโครงการ	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
ชื่อนิสิต	นางสาวนันทนัช คันธารัตนกุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนากร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์
ปีการศึกษา	2563
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

เต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) เป็นเต่าทะเลขนาดกลางที่มีแนวโน้มการลดลงของจำนวนอย่างต่อเนื่อง ด้วยผลกระทบทั้งทางตรงและอ้อมของกิจกรรมมนุษย์ ปัจจุบันเต่ากระถูกขึ้นบัญชีเป็นสัตว์ทะเลที่เข้าขั้นวิกฤต การศึกษาและวิจัยเต่ากระเพื่อการอนุรักษ์เพิ่มมากขึ้น ทั้งในเรื่องระบบนิเวศ พฤติกรรม และ พันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นการสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งอยู่ในอ่าวไทยฝั่งตะวันตก โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียน (control region) ซึ่งเป็นบริเวณที่พบอัตราการกลายพันธุ์มากที่สุด ตัวอย่างเลือดของลูกเต่ากระอายุ 8, 9 และ 14 เดือน ถูกเก็บไว้บนกระดาษกรอง โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากลูกเต่า 10 ตัว ในแต่ละช่วงอายุ สารพันธุกรรม (DNA) สกัดด้วยวิธีการสกัดโดยใช้เกลือ (salting out) ผลผลิตพีซีอาร์ของคอนโทรลรีเจียนมีขนาด 808 คู่เบส ซึ่งใช้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของลูกเต่ากระทั้งหมด 15 ตัวอย่าง (5 ตัวอย่างต่อช่วงอายุ) ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลูกเต่ากระ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากลูกเต่ากระในแต่ละช่วงอายุมาจากแม่เต่ากระตัวเดียวกัน หรือแม่เต่ากระที่มาวางไข่ที่เกาะทะลุส่วนใหญ่มีพันธุกรรมของบรรพบุรุษทางแม่ตัวเดียวกัน หรืออาจเป็นเพราะเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ไม่มีความแปรปรวนเพียงพอที่จะสำรวจความหลากหลายของเต่ากระบริเวณเกาะทะลุได้

คำสำคัญ : เต่ากระ , ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ไมโตรคอนเดรีย ดีเอ็นเอ, คอนโทรลรีเจียน

Project Title Genetic Variation of Hawkbill Sea Turtle (*Eretmochelys imbricata*) at Talu Island, Prachuap Khiri Khan Province.
Name Nantanut Kantaratanakul
Advisor Assistant Professor Sanit Piyapattanakorn, Ph.D.
Co-advisor Assistant Professor Kornrawee Aiemsomboon, Ph.D.
Academic Year 2020
Department Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

---

Abstract

Hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) is one of medium size sea turtles that the numbers are dramatically decreased via directly and indirect effected of human activities. At present, there are more concerned on the conservation of hawksbill sea turtle, large numbers of researches on ecosystem, behavior and genetic of the turtle were carried out. The objective of this study is to study on genetic diversity of hawksbill turtle at Talu island which located in Prachuab Khiri Khan province, using the partial of the nucleotide sequence of the control region in mitochondrial DNA, which is the highest mutation rate was reported. Blood of juvenile hawksbill sea turtles with 8, 9, and 14 month old in nursery hawkbill sea turtle at Talu island were collected (10 samples/age). DNA extraction was performed using salting out method. 808 bp PCR products of the control region were obtained. There was no genetic variation among 15 samples screened (5 samples/age). The result suggested that the juveniles could be from only one mother or the mothers that laid eggs at Talu island are sharing the same maternal lineage, or the genetic marker used in this study is not powerful enough to detect genetic variation of the turtles in this study.

Keywords : hawkbill sea turtle, genetic variation, mitochondria DNA, control region

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนากร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์ และคุณปรินทร อยู่คงแก้ว เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำการวิเคราะห์ข้อมูล และตรวจสอบแก้ไขโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย และ คุณปรีดา เจริญพักตร์ มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากร ทะเลสยาม ที่ให้การสนับสนุนการเก็บตัวอย่าง

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ที่ให้ทุนอุดหนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2563

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ ณ พัทธ์ ปัณฑุกำพล และสัตว์แพทย์หญิงมานามิ โมริชิตะ ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระ เพื่อให้งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณครอบครัวคันธารัตนกุล นายโชคชัย รอดสมบูรณ์ บราวนี่ และ ลาเต้ ในการช่วยตรวจสอบข้อมูล หาแหล่งข้อมูล ช่วยด้านการแปลข้อมูล และเป็นกำลังใจที่สำคัญจนโครงการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นันทนัช คันธารัตนกุล
พฤษภาคม 2563

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
Abstract ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญรูป ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการศึกษา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ 2
1.3 ขอบเขตการศึกษา 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและการศึกษาที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ชีววิทยาเต่ากระ 3
2.1.1 ลักษณะเด่นของเต่ากระ 3
2.1.2 พฤติกรรมการวางไข่เต่ากระ 3
2.2 การศึกษาพันธุกรรมของเต่าทะเลในประเทศไทย 4
2.3 ภาวะคุกคามของเต่าทะเลในปัจจุบัน 5
2.4 สถานภาพเต่าทะเลในอ่าวไทย 7
บทที่ 3 วิธีการศึกษา 9
3.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง 9
3.2 เก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระ 9
3.2.1 สัตว์ทดลอง 9
3.2.2 การเก็บตัวอย่าง 10
3.2.3 การสกัดสารพันธุกรรมจากเลือดเต่ากระ 11

3.2.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรม 11
3.2.5 การเพิ่มปริมาณ ยีน Control region ด้วยวิธี PCR 11
3.2.6 การทำ Gel electrophoresis 12
3.2.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Control region 12
3.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล 12
บทที่ 4 ผลการศึกษา และวิจารณ์ผล 13
4.1 ขนาดของเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 13
4.2 พันธุกรรมของเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 13
4.2.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ 13
4.2.2 ผลการศึกษาด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 14
4.2.3. ผลการเปรียบเทียบพันธุกรรมตัวอย่างเต่ากระ 15
บทที่ 5 สรุปผลศึกษาและข้อเสนอแนะ 17
5.1 สรุปผลการศึกษา 17
5.2 ข้อเสนอแนะ 17
เอกสารอ้างอิง 18

สารบัญรูป

รูปที่		**หน้า**
รูปที่ 1	เต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*)	3
รูปที่ 2	แหล่งวางไข่ทั้ง 2 แห่งของเต่าตนุทางฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทย	5
รูปที่ 3	แผนที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	9
รูปที่ 4	การเจาะเลือดเต่ากระบริเวณ dorsal cervical sinus	10
รูปที่ 5	1.0% (w/v) Agarose gel แสดงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดเต่ากระ (เลนที่ 1 คือ Universal DNA ladder (KAPA) และ เลนที่2-9 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้)	14
รูปที่ 6	2.0% (w/v) Agarose gel แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของ control region (เลนที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder เลนที่ 2-4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์และ NC คือ negative control)	15

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	จำนวนรังไข่เต่าทะเลบริเวณฝั่งอ่าวไทยปี พ.ศ. 2552	7
ตารางที่ 2	ความกว้าง ความยาว และน้ำหนักตัวเฉลี่ยของเต่ากระแต่ละช่วงอายุที่เก็บตัวอย่างจากโรงอนุบาลเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	13

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการศึกษา

เต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) (Linnaeus, 1766) เป็นเต่าทะเลขนาดกลาง มีการกระจายพันธุ์ในเขตอบอุ่นในมหาสมุทรทั่วโลก ได้แก่ มหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรแอตแลนติก และมหาสมุทรอินเดีย ในประเทศไทยพบว่า เต่ากระเป็นเต่าทะเล 1 ใน 4 ชนิดที่มีการรายงานเกี่ยวกับการขึ้นมาวางไข่บนชายหาดของประเทศไทย โดยจะมีฤดูวางไข่ตลอดปีทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2563) อย่างไรก็ตามจากรายงานของ National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) พบพื้นที่การวางไข่ของเต่ากระไม่มากนัก และมีจำนวนประชากรลดลงอย่างต่อเนื่อง (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556) สหภาพระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature: IUCN) จึงจัดเต่ากระเข้าไว้ใน IUCN Red List โดยถูกจัดในกลุ่ม สิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ขั้นวิกฤติ (Critically endangered species) (Mortimer and Donnelly, 2008) มีความพยายามในการแก้ปัญหาด้วยการจัดตั้งโครงการอนุบาลเต่ากระตามแนวชายฝั่งที่พบการวางไข่ในพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วโลก โดยนำเต่าที่ฟักออกจากไข่ตามธรรมชาติมาอนุบาลในบ่อเลี้ยง เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตเมื่อปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ (Head-starting Program) ในประเทศไทยมีแหล่งอนุบาลเต่าทะเลกระจายอยู่ตามชายฝั่งหลายแห่ง ภายใต้การดูแลของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กองทัพเรือ และภาคเอกชนต่าง ๆ อาทิ เช่น ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ ซึ่งอยู่ในความดูแลของหน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง (สอ.รฝ.) อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยดำเนินการอนุรักษ์และอนุบาลเต่าทะเลมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 (ชิฏิภัสร์ ณ ระนอง, 2561) และโครงการอนุรักษ์เต่ากระ ณ เกาะทะลุ อำเภอบางสะพานน้อย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งอยู่ในความดูแลของมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และหน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ และเกาะทะลุ ไอซ์แลนด์ รีสอร์ท โดยดำเนินการโครงการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 (มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม, 2563) เป็นต้น

การลดลงของประชากรเต่ากระมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น สาเหตุจากมนุษย์ การติดเครื่องมือประมง การลักลอบเก็บไข่เต่าทะเล การจับไปเป็นสินค้าเนื่องจากกระดองที่มีลายสวยงาม การทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยและพื้นที่สืบพันธุ์วางไข่ การทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและสภาพแวดล้อม อีกทั้งสาเหตุจากธรรมชาติ เช่น ข้อจำกัดทางชีววิทยาและวงจรชีวิตของเต่าทะเลที่มีอัตราการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนประชากรต่ำ การตกเป็นเหยื่อของผู้ล่าตามธรรมชาติ และการเจ็บป่วยต่าง ๆ ทำให้มีอัตราการอยู่รอดในธรรมชาติน้อย รวมถึงพฤติกรรมการวางไข่ที่เจาะจงเลือกพื้นที่ที่มีความเหมาะสมเท่านั้น โดยเต่าทะเลเพศเมียส่วนใหญ่จะเดินทางกลับมาวางไข่ในแหล่งเดิม (Schulz, 1975) เนื่องจากเต่าทะเลมีความสามารถในการตรวจจับสนามแม่เหล็กโลกในพื้นที่ต่าง ๆ ประกอบกับภายในช่องจมูกและประสาท

ตอนหน้า (olfactory) ของเต่าทะเลยังมีประสาทที่ไวต่อการรับกลิ่นหรือสารเคมีทำให้รู้คุณสมบัติทางเคมีของสภาพแวดล้อมบริเวณนั้น จึงทำให้สามารถจดจำสถานที่ต่าง ๆ ได้ดี (Bowen and Karl, 2007) นอกจากนี้เต่าทะเลยังมีพฤติกรรมการใช้ชีวิตอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มประชากร (Colony) โดยแต่ละกลุ่มจะมีเส้นทางการเดินทางที่ค่อนข้างแน่นอนซ้ำ ๆ กัน จากการศึกษา mitochondrial DNA (mtDNA) ของเต่าตนุ ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่ามีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อย 1 คู่บนสาย DNA ของเต่าตนุที่อยู่ในต่างกลุ่มประชากรกัน (จุมพล เหมะคีรินทร, 2563) การศึกษาแหล่งวางไข่ร่วมกับลักษณะทางพันธุกรรมและโครงสร้างของประชากรเต่ากระในแต่ละพื้นที่จึงมีความสำคัญในการวางแผนการจัดการอนุรักษ์ทรัพยากรเต่ากระในพื้นที่อ่าวไทยให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ดังนั้น การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จะใช้วิธีการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมคือลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียน (control region) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากกว่าบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรีย 5 - 10 เท่า และสูงกว่าในยีนในนิวเคลียส 25 - 100 เท่า อีกทั้งมีการถ่ายทอดพันธุกรรมทางแม่สอดคล้องกับการเลือกพื้นที่ที่ทำการศึกษาจากการวางไข่ของแม่เต่ากระ อีกทั้งไม่ต้องใช้ตัวอย่างในการศึกษามากเมื่อเทียบกับการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดอื่น (Boore, 1999) เหมาะสมในการนำมาศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากร (Douzery and Randi, 1997) จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรเต่ากระในครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

1.3 ขอบเขตการศึกษา

การสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเต่ากระบริเวณเกาะทะลุจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระในช่วงอายุ 8, 9 และ 14 เดือน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลพันธุกรรมของเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สามารถใช้เป็นข้อมูลในการต่อยอดเพื่อใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์เต่าทะเลต่อไป

บทที่ 2 ทฤษฎีและการศึกษาที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาเต่ากระ

2.1.1 ลักษณะเด่นของเต่ากระ

เต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) เป็นเต่าทะเลขนาดกลาง ลักษณะเด่นของเต่ากระคือ มีจะงอยปากค่อนข้างแหลมงุ้มคล้ายปากเหยี่ยว และเกล็ดบนส่วนหัวตอนหน้า (Prefrontal scute, Pf) มี 2 คู่ ซึ่งเป็นลักษณะที่ใช้จำแนกชนิดของเต่าทะเล ส่วนเกล็ดบนหลัง แถวข้าง (Costal scute) มีจำนวนข้างละ 4 เกล็ด เกล็ดอันแรกไม่ชิดกับเกล็ดขอบคอ (Nuchal scute) ลักษณะเด่นชัดอีกอย่างคือ เกล็ดบนกระดองมีลวดลายริ้ว และลักษณะเกล็ดซ้อนกันเห็นได้ชัดเจน 7 เกล็ด (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556) นอกจากนี้บริเวณของกระดองของเต่ากระจะเป็นขอบหยักไม่เรียบเหมือนเต่าชนิดอื่นๆ (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 เต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*)

2.1.2 พฤติกรรมการวางไข่เต่ากระ

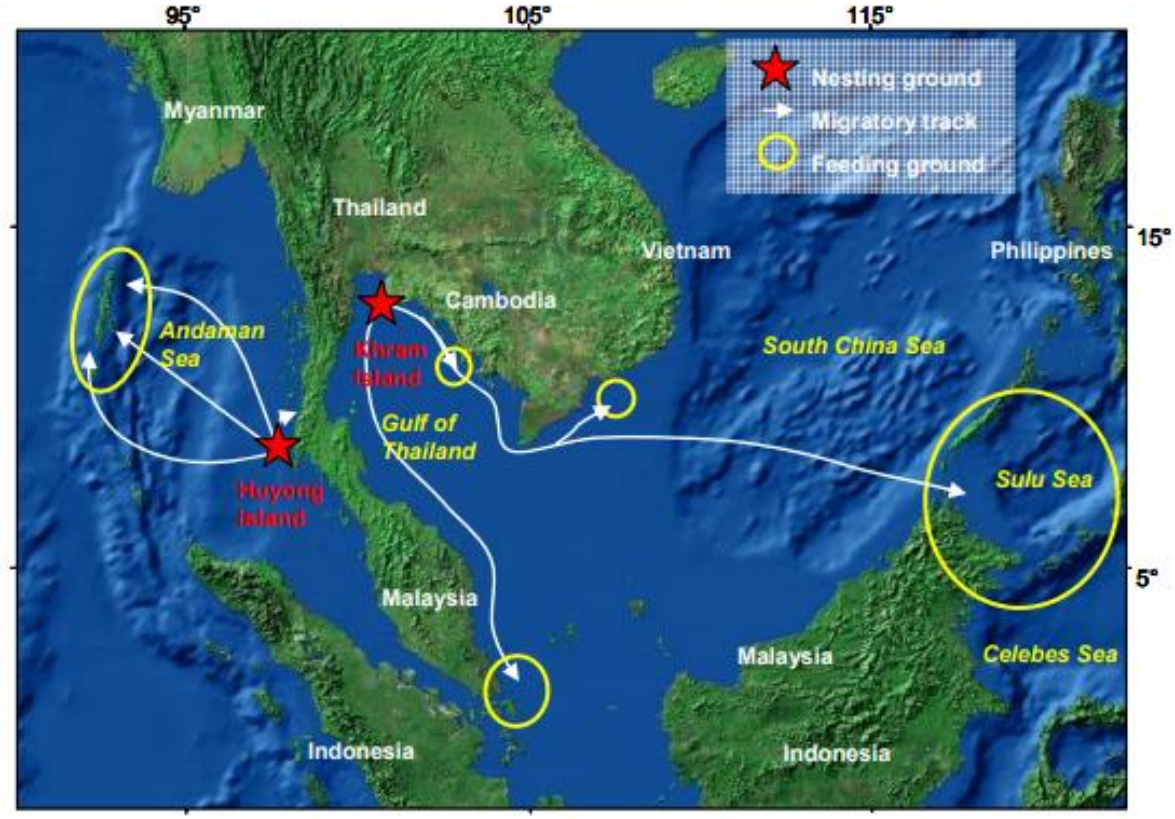
เต่ากระมีพฤติกรรมการวางไข่ที่เหมือนกับเต่าทะเลหลายชนิด มีพฤติกรรมการจดจำแหล่งกำเนิด (Habitat imprinting) และมีประสาทที่ไวต่อการรับกลิ่นหรือสารเคมีทำให้รู้คุณสมบัติทางเคมีของสภาพแวดล้อมบริเวณนั้น จึงทำให้สามารถจดจำสถานที่ต่าง ๆ ได้ดีโดยจดจำไว้ในสมองส่วนหน้า (Bowen and Karl, 2007) ทำให้เต่าตัวเมียสามารถกลับมาวางไข่ในแหล่งกำเนิดเดิมของตัวเองได้

แม่เต่ากระจะขึ้นมาวางไข่บนหาดทรายที่เงียบและสงบ ไม่มีสิ่งใดมารบกวนในช่วงเวลากลางคืน แม่เต่ากระจะเลือกพื้นที่วางไข่เหนือแนวน้ำขึ้นสูงสุด เพื่อไม่ให้ไข่เต่าจมน้ำ เมื่อเลือกที่ทำเลที่เหมาะสมได้แล้วจะทำการขุดหลุม ซึ่งแม่เต่ากระจะใช้ใบพายคู่หลังกอบทรายขึ้นมาสลับกันไปเพื่อขุดหลุม โดยความลึกในการขุดของเต่ากระประมาณ 60-80 เซนติเมตร เมื่อความลึกได้ตามที่ต้องการ จะทำการคว้านทรายก้นหลุม

ให้ก้นหลุมมีความกว้าง เมื่อแม่เต่าขุดหลุมได้ขนาดที่ต้องการแล้ว จะปล่อยไข่ลงหลุม โดยแม่เต่าใช้เวลา 20-30 นาทีในการปล่อยไข่ สำหรับแม่เต่ากระวางไข่ประมาณ 70-150 ฟอง ขนาดโดยประมาณเส้นศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร เมื่อแม่เต่าวางไข่เสร็จจะกลบหลุมทราย และเกลี่ยทรายเป็นบริเวณกว้าง ๆ เพื่อกลบรอยหลุมวางไข่ เพื่ออำพราง จากนั้นแม่เต่าจะเดินลงทะเลไป ไม่มีพฤติกรรมการดูแลไข่ (สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2556) ทั้งนี้ เต่ากระวางไข่ปีละ 1-3 ครั้ง โดยห่างกันประมาณ 2-3 อาทิตย์ (Schulz, 1975)

2.2 การศึกษาพันธุกรรมของเต่าทะเลในประเทศไทย

การศึกษาพันธุกรรมของเต่าทะเลในประเทศไทยโดยกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง ศึกษาพันธุกรรมของเต่าตนุในฝั่งพื้นที่อ่าวไทยและอันดามันในปี ค.ศ. 2001- 2002 เพื่อทราบถึงโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรของเต่าตนุในประเทศไทย เก็บตัวอย่างจากแม่เต่าที่ขึ้นมาวางไข่บริเวณเกาะครามฝั่งอ่าวไทย และเกาะหูยงฝั่งอันดามัน (Phasuk, 1992) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่เต่าตนุแต่ละฝั่งจะถูกแยกออกจากกันทางธรณีวิทยาแบ่งเป็นกลุ่มประชากรย่อย มีการติดตั้งเครื่องติดตามเพื่อสังเกตพฤติกรรมและติดตามวงจรชีวิตของเต่าตนุทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน (รูปที่ 2) ในการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคอนโทรีเจียนบริเวณไมโทรคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีแปรปรวนสูง มีอัตราการกลายพันธุ์ 5 – 10 ตำแหน่ง (Norman *et al*., 1994) โดยเก็บตัวอย่างจากเนื้อเยื่อที่ใบพายคู่หน้าของแม่เต่าขนาด 0.3 X 0.3 ตารางเซนติเมตร หลังจากที่แม่เต่าวางไข่เสร็จแล้วจากฝั่งอันดามัน 19 ตัว และฝั่งอ่าวไทย 30 ตัว โดยใช้ไพรเมอร์สี่ตัว ได้แก่ Green15552F (GTGTC CACAC AAACT AACTA CCT), Green16300R (GTCTC GGATT TAGGG GTTTG GCG), Green15579F (CTGCC GTGCC CAACA GAACA) และ Green16087R (CCAGT TTCAC TGAAT CGGCA) ในการตัดตำแหน่งคอนโทรรีเจียนที่ต้องการซึ่งสามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ถึง 438 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 49 ตัว พบว่าทะเลอันดามันมีรูปแบบพันธุกรรมที่พบทั้งหมด 3 haplotype (A1, B1, และ B3) ส่วนอ่าวไทยมีรูปแบบพันธุกรรมที่พบทั้งหมด 7 haplotype (A1, A2, A3, B1, B3, B4, B5, และ B6) โดยภาพรวมความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่าตนุในไทยจะพบค่อนข้างสูง (Kongkiat *et al*., 2003)



รูปที่ 2 แหล่งวางไข่ 2 แห่งของเต่าตนุ ทางฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทย (Kongkiat *et al*., 2003)

สำหรับการศึกษาทางพันธุกรรมของเต่ากระมีค่อนข้างน้อย เนื่องจากมีรายงานการพบเต่ากระในอ่าวไทยน้อยกว่าเต่าตนุ (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2563) จึงมีเพียงรายงานการศึกษาเบื้องต้นของ นพดล กิตนะ (2558) ในปี พ.ศ.2557 ศึกษาสุขภาวะการเจริญเติบโตและสถานภาพของประชากรเต่ากระที่เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ส่วนหนึ่งของการศึกษามีการเก็บตัวอย่างเลือดเต่าไปสกัด DNA และหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากคอนโทรลรีเจียนเพื่อตรวจสอบจำนวนเพศเมียที่ขึ้นมาวางไข่ จากตัวอย่างเต่ากระอายุ 1-2 ปี จำนวน 61 ตัว ผลการศึกษาระบุว่ายังไม่สามารถใช้บริเวณคอนโทรลรีเจียนเพื่อระบุอัตลักษณ์ของแม่เต่าได้

2.3 ภาวะคุกคามของเต่าทะเลในปัจจุบัน

เต่าทะเลทั่วโลกมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง อันเป็นผลกระทบโดยตรงจากมนุษย์ ในอดีตเต่าทะเลจำนวนมากต้องถูกล่าเพื่อนำเนื้อและไขมันมาบริโภค กระดองและซากเต่าทะเล ถูกนำมาแปรรูปเป็นเครื่องประดับตกแต่ง ไข่เต่าทะเลเกือบทั้งหมดถูกนำมาบริโภค ทำให้เต่าทะเลมีการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว กิจกรรมของมนุษย์บริเวณทะเลและชายฝั่ง ทำให้แหล่งวางไข่ แหล่งที่อยู่อาศัย และแหล่งหากินของเต่าทะเลมีจำนวนลดลง นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมที่เสื่อมโทรมลงยังส่งผลให้ประชากรเต่าทะเลมีอ่อนแอลง ในประเทศไทยสถิติการวางไข่ของเต่าทะเลลดลงมากกว่า 5 เท่า จากจำนวนมากกว่า 2,500 รังต่อปี เหลือเพียงปีละ 300-400 รังต่อปี ในช่วงเวลา 50 ปีที่ผ่านมา แม้ว่าเต่าทะเลในประเทศไทยจะได้รับ

ความคุ้มครองก็ตาม แต่สถิติการลดลงก็ยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันเต่าทะเลลดลงจนมีแนวโน้มว่าจะสูญพันธุ์ไปในไม่ช้า สาเหตุที่ทำให้เต่าทะเลลดลงมีสาเหตุสำคัญด้วยกัน 5 สาเหตุหลัก ดังนี้

1) อัตราการรอดของลูกเต่าทะเลเองในธรรมชาติต่ำมาก และใช้เวลาในการเติบโตไปจนถึงวัยเจรอญพันธุ์ค่อนข้างนาน

2) การลักลอบค้าเต่าทะเล ทั้งไข่เต่า,กระดองเต่าทะเลและเนื้อเต่าทะเล โดยลักลอบค้าไข่เต่าทะเลและเนื้อเพื่อการบริโภคของบุคคลต่างๆที่มีความต้องการมีสูงขึ้น นอกจากนี้ยังมีการนำกระดองเต่ามาทำเป็นสินค้าต่างๆ เช่น หวี กำไล สร้อย เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันยังมีการลักลอบค้า เนื่องจากความต้องการที่มีสูงขึ้น

3) การติดเครื่องมือประมงทั้งที่ไม่เจตนาและโดยตั้งใจโดยคิดเป็นประมาณร้อยละ 74- 89 ของการเกยตื้นของเต่าทะเล(กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2560) เช่นทำการประมงอวนลาก อวนลอย และเบ็ดราว บริเวณชายฝั่งหน้าแหล่งวางไข่เต่าทะเล หรือ แหล่งหาอาหารของเต่าทะเล โดยเฉพาะในช่วงฤดูการวางไข่เต่าทะเล ซึ่งเครื่องมือทำการประมงเหล่านี้ เป็นตัวการโดยตรง ที่ทำลายพันธุ์เต่าทะเลทั้งที่เจตนาและไม่ได้เจตนา ซึ่งเต่าทะเลเป็นสัตว์น้ำที่หายใจด้วยปอดเมื่อติดอวน หรือ เบ็ดอยู่ใต้น้ำนานๆ ก็จะจมน้ำตายได้ นอกจากนั้นชาวประมงบางกลุ่มทำการดักจับเต่าทะเลโดยเจตนา เพื่อนำเนื้อไปบริโภคหรือฆ่าเพื่อเอาไข่ในท้อง

4) การบุกรุกทำลายแหล่งแพร่ขยายพันธุ์ของเต่าทะเล โดยเฉพาะในจังหวัดภูเก็ตซึ่งเป็นแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญจึงมีการบุกรุกสร้างที่อยู่อาศัยเป็นจำนวนมาก ทำให้สภาพความเหมาะสมของแหล่งวางไข่เต่าทะเลเสียไป ปัจจุบันแหล่งที่เหมาะสมสำหรับวางไข่เต่าทะเลเหลือน้อยมาก

5) สภาพแวดล้อมชายฝั่งเสื่อมโทรม เต่าทะเลส่วนใหญ่อาศัยตามแนวชายฝั่ง (ยกเว้นเต่ามะเฟืองซึ่งใช้ชีวิตส่วนใหญ่อยู่ในทะเลเปิด) ดังนั้นสภาพชายฝั่งเสื่อมโทรมจากการทำการประมงที่ผิดวิธีก็ดี จากการถ่ายเทของเสียสู่ทะเลก็ดี ต่างๆ เหล่านี้ทำให้สภาพแหล่งอาหารและแหล่งอาศัยของเต่าทะเลเสียสภาพไป เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เต่าทะเลลดลง

ปัจจุบันมีการสร้างโรงเพาะเลี้ยงลูกเต่าทะเล แต่ปริมาณเต่าทะเลที่ทำการเพาะพันธุ์และปล่อยกลับสู่ทะเล ไม่สามารถชดเชยประชากรในธรรมชาติได้เนื่องจากอัตรารอดของลูกเต่าทะเลในธรรมชาติค่อนข้างต่ำ เต่าทะเลจึงลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการติดเข้ากับเครื่องมือทำการประมงใต้น้ำทำให้เต่าทะเลที่ใช้อากาศจากปอดไม่สามารถขึ้นมาหายใจและเกิดการจมน้ำตายได้ (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2554) ปัจจุบันเครื่องมือประมงนับว่ามีประสิทธิภาพมากขึ้นทำให้เต่าทะเลว่ายมาติดกับเครื่องมือเหล่านี้มากขึ้น ด้วยเหตุเช่นนี้กรมประมงจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญในการอนุรักษ์เต่าทะเลมากขึ้น จึงมีการออกประกาศห้ามทำการประมงอวนลาก ใกล้กว่า 3 กิโลเมตรจากชายฝั่ง นอกจากนี้การค้าขายเต่าทะเลเพื่อการบริภาคเนื้อเต่าและไข่เต่ายังมีมากขึ้นและการส่งออกก็มีสูงขึ้นเรื่อยๆเช่นกัน โดยเฉพาะไข่เต่าจึงมีการประกาศให้หลายแห่งของแหล่งวางของไข่เต่าเป็นพื้นที่เขตอุทยานแห่งชาติเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรทางทะเลและมีหลายแห่งเป็นพื้นที่ภายใต้การดูแลของกองทัพเรือ เช่น ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

กองทัพเรือ ซึ่งอยู่ในความดูแลของหน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง (สอ.รฝ.) อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยดำเนินการอนุรักษ์เต่าทะเลมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 (ชิฏิภัสร์ ณ ระนอง, 2561)

ปัญหาเต่าทะเลลดจำนวนลงในทุกปี เป็นปัญหาที่พบทั่วโลก ทำให้เต่าทะเลบางชนิดอย่างเช่น เต่ากระที่พบในประเทศไทยถูกสหภาพระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature: IUCN) จัดเต่ากระเข้าไว้ใน IUCN Red List โดยถูกจัดในกลุ่ม สิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ขั้นวิกฤติ (Critically endangered species) (Mortimer and Donnelly, 2008) ทำให้ในปัจจุบันทั่วโลกมีการวางแผนในการอนุรักษ์เต่าทะเลไม่ให้อยู่ในสถานะสูญพันธุ์ จึงมีการทำการวิจัยและศึกษาเพื่อการอนุรักษ์มากขึ้นอีกด้วย

2.4 สถานภาพเต่าทะเลในอ่าวไทย

จากข้อมูลของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง (2553) รายงานว่าพื้นที่ฝั่งอ่าวไทยในปี พ.ศ. 2550 พบพ่อแม่เต่าทะเลที่สมบูรณ์เพศจำนวน 400 ตัว ซึ่งมีแหล่งวางไข่บริเวณเกาะคราม จังหวัดชลบุรี โดยเต่าทะเลกลุ่มเด่นคือ เต่าตนุ รองลงมาคือ เต่ากระ ในปี พ.ศ. 2552-2553 ไม่มีรายงานการพบเต่าหญ้าและเต่ามะเฟืองในอ่าวไทยเลย จากการสำรวจบริเวณฝั่งอ่าวไทยบริเวณเกาะคราม จังหวัดชลบุรี พบว่า แม่เต่าตนุและเต่ากระในแต่ละปี ประมาณ 550 ตัว บางตัวกลับมาวางไข่ในบริเวณชายหาดเดิมได้ถึง 5 ครั้ง ในฤดูวางไข่ปีเดียวกันและมีระยะเวลาวางไข่แต่ละครั้งส่วนใหญ่ห่างกัน 10-12 วัน ในปี พ.ศ. 2552 เต่าทะเลขึ้นมาวางไข่ในประเทศไทย 502 รัง ในจำนวนนี้พบในฝั่งอ่าวไทยถึง 387 รัง คิดเป็นร้อยละ 77 ของจำนวนรังไข่ทั้งประเทศ ซึ่งในปีดังกล่าวพบแหล่งวางไข่เต่าทะเลเพิ่มเติมจากเดิมที่ได้บันทึกไว้คือ บริเวณจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี และในปี พ.ศ. 2553 มีรายงานการสำรวจ พบเต่าตนุและเต่ากระบริเวณชายหาดจังหวัดชลบุรี อ่าวนาจอมเทียน อ่าวบางละมุง เกาะคราม อ่าวบางเสร่ และอ่าวแสมสาร โดยบริเวณเกาะคราม พบแม่เต่าทะเลขึ้นมาวางไข่จำนวน 10 ตัว

ตารางที่ 1 จำนวนรังไข่เต่าทะเลบริเวณฝั่งอ่าวไทยปี พ.ศ. 2552 (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2554)

จังหวัด	พื้นที่วางไข่	จำนวนรังไข่เต่า				
		เต่าตนุ	เต่ากระ	เต่ามะเฟือง	เต่าหญ้า	รวม
ชลบุรี	เกาะคราม	188	125	-	-	313
ประจวบคีรีขันธ์	เกาะทะลุ	-	4	-	-	4
	หาดแหลมกุ่ม	1	-	-	-	1
ชุมพร	อ่าวทองทราย	-	1	-	-	1
สุราษฎร์ธานี	เกาะเต่า	5	-	-	-	5
นครศรีธรรมราช	เกาะกระ	38	25	-	-	63
รวม		232	155	0	0	387

นอกจากนี้ กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง (2554) รายงานสถานภาพทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง พ.ศ. 2550-2552 สรุปภาพรวมสถานภาพเต่าทะเลในประเทศไทย คือ บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก พบการวางไข่ของเต่าทะเล 2 ชนิด ได้แก่ เต่าตนุ และเต่ากระ บริเวณเกาะเสม็ด เกาะกุฎี เกาะทะลุ และเกาะมันใน จังหวัดระยอง จำนวน 10 รังต่อปี และบริเวณเกาะคราม และเกาะใกล้เคียง จังหวัดชลบุรี จำนวน 120-160 รังต่อปี การวางไข่มีปริมาณคงที่ แต่ในบริเวณอ่าวไทยตอนบนไม่พบการวางไข่ของเต่าทะเล ส่วนบริเวณอ่าวไทยตอนกลางพบการวางไข่ของเต่าทะเล 2 ชนิด ได้แก่ เต่าตนุและเต่ากระบริเวณหาดทับสะแก เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 2-13 รังต่อปี เกาะทองหลาง จังหวัดชุมพร จำนวน 1-5 รังต่อปี เกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 1-5 รังต่อปี และในบริเวณอ่าวไทยตอนล่างพบการวางไข่ของเต่าตนุบริเวณเกาะกระ จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 30-40 รังต่อปี และไม่มีการเปลี่ยนแปลงประชากรในพื้นที่

บทที่ 3 วิธีการศึกษา

โครงการวิจัยได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการการควบคุมดูแลการเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Protocol Review No.2123007) และได้รับอนุญาตให้เก็บตัวอย่างเลือดและครอบครองซากสัตว์ป่าเพื่อประโยชน์ในการศึกษา การวิจัย หรือการทดลองทางวิชาการจากกรมประมง ลงวันที่ 16 พฤศจิกายน 2563

3.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดของเต่ากระที่อนุบาลไว้ที่โรงอนุบาลเต่าทะเลบริเวณเกาะทะลุ อำเภอบางสะพาน-น้อย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ แสดงแผนที่เกาะทะลุ รูปที่ 3

แหล่งที่มา: ดัดแปลงจาก https://satellites.pro/Thailand_map#11.074372,99.559822,16

รูปที่ 3 แผนที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

3.2 เก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระ

3.2.1 สัตว์ทดลอง

สุ่มเลือกลูกเต่ากระ อายุ 8, 9 และ 14 เดือน ที่โรงอนุบาลเต่าทะเล จำนวน 30 ตัว โดยเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 1 ครั้ง

3.2.2 การเก็บตัวอย่าง

1) สำรวจพื้นที่ที่มีการขึ้นทำรังวางไข่ของแม่เต่ากระ รวมถึงบันทึกข้อมูลทางนิเวศวิทยาและลักษณะของถิ่นอาศัยบริเวณที่พบการขึ้นทำรังวางไข่

2) บันทึกข้อมูลอายุ น้ำหนัก (กิโลกรัม) และขนาดสัณฐานโดยวัดความกว้างและความยาวกระดองหลังตามแนวตรง (straight carapace length) ความกว้างและความยาวของกระดองหลังตามแนวโค้ง (curved carapace length) (เซนติเมตร) ด้วยสายวัดและไม้บรรทัด รวมถึงถ่ายรูปด้วยกล้องดิจิตอล และประเมินลักษณะภายนอกของเต่ากระ (นพดล กิตนะ, 2558)

3) เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มขนาด 21-23 Ga ยาว 1.0-1.5 นิ้ว และกระบอกฉีดยา เจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดส่วนลำคอของเต่า หรือบริเวณ dorsal cervical sinus ซึ่งอยู่บริเวณใต้กระดองด้าน dorsal ใกล้กับกระดูกคอชิ้นสุดท้ายซึ่งเป็นบริเวณที่เหมาะสมในการเจาะเลือดเต่าทะเล (PH Dutton, 1996) (รูปที่ 4) เก็บเลือดปริมาณตัวละ 0.5 มิลลิลิตร หยดใส่กระดาษกรอง ตากให้แห้งในที่ร่มแล้วเก็บรักษาไว้ในถุงซิปล็อคพร้อมซิลิก้าเจลดูดความชื้น

รูปที่ 4 การเจาะเลือดเต่ากระบริเวณเส้นเลือดดำส่วนลำคอ (dorsal cervical sinus)

3.2.3 การสกัดสารพันธุกรรมจากเลือดเต่ากระ

สารพันธุกรรมจากเลือดเต่ากระถูกสกัดด้วยวิธี Salting out (Miller et.al., 1988) โดยมีรายละเอียดดังนี้ ตัดกระดาษกรองที่มีหยดเลือดเต่ากระ ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มี 376 µl 1x TNE buffer (pH 8.0) (0.1M Tris-HCl (pH 8.0) 0.05M EDTA และ 0.2M NaCl), 4 µl 1% SDS และ 20 µl proteinase K (10mg/ml) หลังจากนั้นนำตัวอย่างเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างออกมาที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม 170 µl NaCl (6 M) เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 14000 rpm เป็นเวลา 7 นาที นำสารละลายใสด้านบนใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วเติม 800 µl 95% เอทานอล (AR Grade) ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที รินเอทานอลออกจากหลอดทดลอง แล้วเติม 600µl 70% เอทานอล (AR Grade) นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 14000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเอทานอลออกจากหลอดทดลองให้หมด ตากสารพันธุกรรมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 25 µl TE buffer (pH 8.0) (0.01M Tris-HCl และ 1mM EDTA) เขย่าหลอดทดลองให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4 °C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรม

สารพันธุกรรมที่สกัดได้ ปริมาณ 2 µl ผสมเข้ากับ น้ำกลั่น 4 µl และ สีย้อม RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Inc) 4 µl แล้วนำมา โหลดลงใน 1.0% (w/v) Agarose gel พร้อมกับ KAPA Universal Ladder (Kapa Biosystems, Inc.) เพื่อเปรียบเทียบขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย Run gel ที่ความต่างศักย์คงที่ ที่ 80 volts เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำมาถ่ายภาพเก็บไว้ ภายใต้แสง UV เพื่อใช้ในการประเมินปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมที่สกัดได้

3.2.5 การเพิ่มปริมาณ ยีน Control region ด้วยวิธี PCR

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในส่วนของ control region ประสบผลสำเร็จทั้งในด้านปริมาณของผลผลิตที่ได้ และความจำเฉพาะของยีนที่ทำการเพิ่มปริมาณ ขนาดของผลผลิต PCR ประมาณ 800 bpโดยมีรายละเอียดดังนี้ ปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20µl ประกอบด้วย Forward primer (5’ GCT TAA CCC TAA AGC ATT GG 3’) และ Reverse primer (5’ GTC TCG GAT TTA GGG GTT TG 3’ ’) (Abreu-Grobois *et al.,* 2006) อย่างละ 0.8 µl *Dream Taq Green* PCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific Inc.) 10 µl และ sigma water ประมาณ 7.4 µl จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้ 1) แยกสายดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวที่ 95°C นาน 5 นาที; 2) แยกสายดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวที่ 95°C นาน 45 วินาที; 3) ลดอุณหภูมิให้ไพรเมอร์ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 50°C 60 วินาที; 4) ต่อสายดีเอ็นเอที่ 72°C นาน 60 วินาที จากนั้นวนกลับไปขั้นที่ 2) อีก 34 รอบ; 5) ต่อสายยาวขั้นสุดท้ายที่ 72°C นาน 10 นาที (ปรับปรุงจาก Abreu-Grobois *et. al.,* 2006)

3.2.6 การตรวจสอบด้วย Gel electrophoresis

ผลผลิต PCR 10 µl ผสมกับสีย้อม RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Inc) 4 µl นำมาโหลดลงใน 2.0% (w/v) Agarose gel พร้อมกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc) แล้วทำการ Run gel ที่ความต่างศักย์คงที่ ที่ 80 volts เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้น นำมาถ่ายภาพเก็บไว้ ภายใต้แสง UV

3.2.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Control region

ผลผลิต PCR ทั้งหมด จะนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel extraction kit (Fermentus Inc.) ดำเนินการตามวิธีการที่ทางบริษัทระบุไว้ จากนั้นส่งผลผลิต PCR ที่บริสุทธิ์ไปให้บริษัท U2Bio เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมด จะถูกนำมาเรียงและเปรียบเทียบ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่มีชื่อว่า Bioedit (ธีระรักษ์ ศรีนวลกราย, 2551) ส่วนที่ไม่มีความชัดเจนของลำดับนิวคลีโอไทด์จะถูกตัดทิ้งไป ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ชัดเจนจะถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของแต่ละ Haplotype

บทที่ 4 ผลการศึกษา และวิจารณ์ผล

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระที่เกาะทะลุ ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2563 มีผลการศึกษาข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมเต่ากระ ดังนี้

4.1 ขนาดของเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

สุ่มเก็บตัวอย่างเต่ากระจากโรงอนุบาลเต่าทะเล โดยเป็นเต่ากระที่มีอายุ 8, 9 และ 14 เดือน โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากลูกเต่า 10 ตัว ในแต่ละช่วงอายุ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 30 ตัว วัดขนาดความกว้างและความยาวกระดองและน้ำหนักของเต่ากระแต่ละตัว จดบันทึก แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความกว้าง ความยาว และน้ำหนักตัวเฉลี่ยของเต่ากระแต่ละช่วงอายุ ที่เก็บตัวอย่างจากโรงอนุบาลเต่าทะเล เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

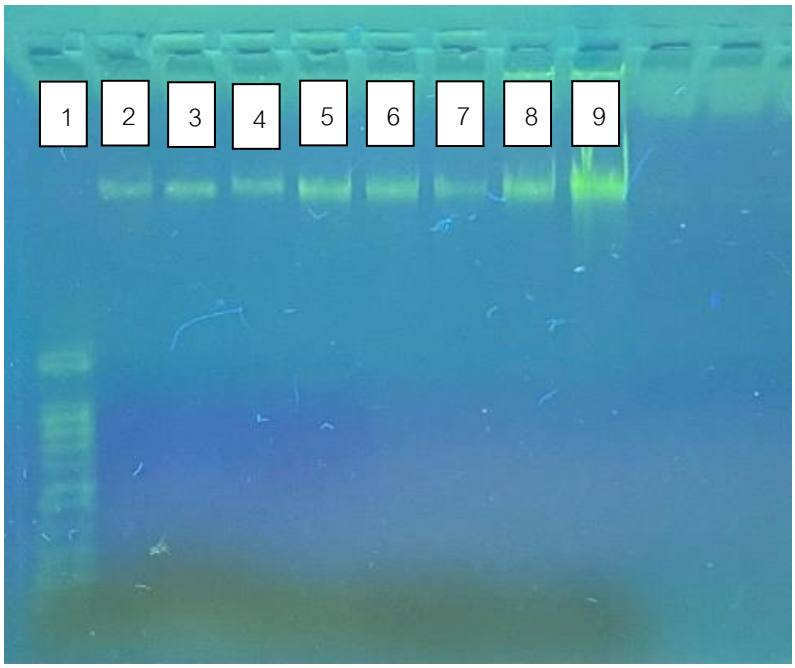
เต่ากระ	ความกว้างเฉลี่ยกระดอง (เซนติเมตร)	ความยาวเฉลี่ยกระดอง (เซนติเมตร)	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กิโลกรัม)
อายุ 8 เดือน	14.88 ± 0.79	16.93 ± 0.95	0.54 ± 0.08
อายุ 9 เดือน	17.20 ± 0.54	19.75 ± 0.95	0.82 ± 0.14
อายุ 14 เดือน	27.88 ± 2.19	30.70 ± 2.31	3.08 ± 0.56

4.2 พันธุกรรมของเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

จากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดเต่ากระ และนำมาทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) สามารถตรวจสอบตัวอย่างด้วย

4.2.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

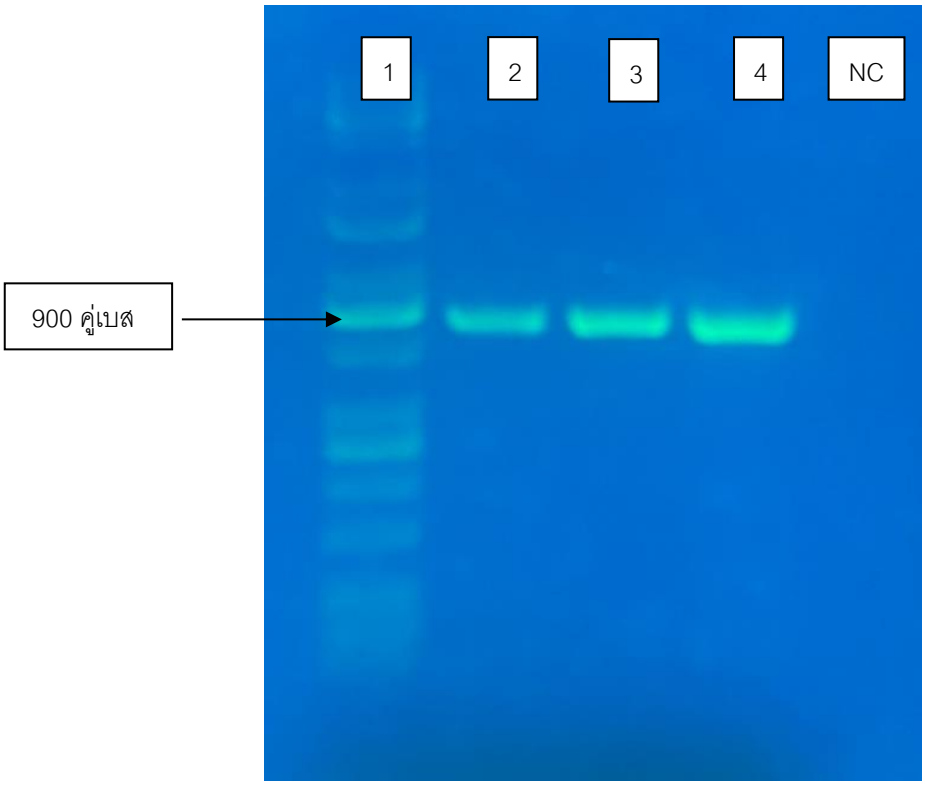
ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดเต่ากระ ด้วยวิธี salting out ได้ตรวจสอบตัวอย่างด้วยกระบวนการเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (gel electrophoresis) แสดงผลดัง รูปที่ 5



รูปที่ 5 1.0% (w/v) Agarose gel แสดงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดเต่ากระ
(เลนที่ 1 คือ Universal DNA ladder (KAPA) และ เลนที่2-9 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้)

4.2.2 ผลการศึกษาด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอเต่ากระมาใช้เทคนิค PCR โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic marker) ที่มีไพรเมอร์ในการตัดตำแหน่งที่สนใจ คือ คอนโทรลรีเจียน(Control region) ใช้ไพรเมอร์ H950 มีรหัสดังนี้ 5’GTCTCGGATTTAGGGGTTTG 3’ ซึ่งเป็น Reverse primer ใช้ตัดในตำแหน่งย้อนกลับของสายดีเอ็นเอ และไพรเมอร์ LCM15382 มีรหัสดังนี้ 5’GCTTAACCCTAAAGCATTGG 3’ ซึ่งเป็น forward primer ใช้ตัดในตำแหน่งด้านหน้าของสายดีเอ็นเอ(Abreu-Grobois *et al.,* 2006) ไพรเมอร์ทั้งสองตัวสามารถที่จะตัดสายดีเอ็นเอตำแหน่งคอนโทรลรีเจียน (Control region) ได้ 808 คู่เบส เป็นบางส่วนของคอนโทรลรีเจียน (Control region) โดยเทียบกับ ladder ขนาด ได้ตรวจสอบตัวอย่างด้วยกระบวนการอิเล็กโทรโฟรีซีส (gel electrophoresis) แสดงผลดัง รูปที่ 6



รูปที่ 6 2.0% (w/v) Agarose gel แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของ control region (เลนที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder เลนที่ 2-4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์และ NC คือ negative control)

4.2.3. ผลการเปรียบเทียบพันธุกรรมตัวอย่างเต่ากระ

ผลการศึกษา เต่ากระอายุ 8 , 9 และ 14 เดือน บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัว เมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างลำดับนิวคลีโอท์ที่มีความยาว 808 คู่เบส โดยใช้โปรแกรม Bioedit (ธีระรักษ์ ศรีนวลกราย, 2551) แสดงผลดังดรรชนีที่ 1 พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทุกตำแหน่งทั้ง 15 ตัวอย่าง นับเป็น 1 haplotype ซึ่งถือว่าไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งนี้การเก็บตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัว ได้ถูกนำมาวิเคราะห์เพียง 15 ตัว เป็นการสุ่มตัวอย่างครอบคลุมทั้ง 3 ช่วงอายุ ช่วงอายุละ 5 ตัว รวมเป็น 15 ตัว ซึ่งคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมด แต่ยังไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงไม่นำตัวอย่างที่เหลือมาวิเคราะห์ต่อ อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยศึกษาที่ตำแหน่งคอนโทรรีเจียน จากการเก็บตัวอย่างเต่ากระตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996-2014 จำนวน 173 ตัว พบความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 20 haplotypes จัดเป็น 3 clades (Nishizawa *et al*., 2016) ซึ่งมีความหลากหลายค่อนข้างสูง แต่จากการศึกษาเปรียบเทียบบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และโคลัมเบียกลับพบเพียง 2 haplotypes (Marroquin, 2017) และเมื่อพิจารณาการศึกษาในเต่าตนุ (วงศ์ Cheloniidae) บริเวณอ่าวไทย จากคอนโทรรีเจียนเช่นเดียวกัน พบความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 7 haplotypes (Kongkiat

et al., 2004) จึงสามารถยืนยันได้ว่า การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่าทะเล โดยตำแหน่งคอนโทรรีเจียนของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ยังคงเป็นตำแหน่งที่เหมาะสม หากแต่การศึกษาในครั้งนี้กลับไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องด้วยเหตุผลบางประการ

ทั้งนี้จากการศึกษาในครั้งนี้ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ที่เก็บตัวอย่างในเดือนธันวาคม 2563 พบเพียง 1 haplotype หรือไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ อาจเนื่องจาก 3 กรณี จึงทำให้ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนี้

กรณีแรก: พฤติกรรมของเต่ากระตัวเมียแต่ละตัวที่สามารถกลับมาวางไข่ได้หลายครั้งในพื้นที่เดิม โดยแม่เต่าทะเลจะมีถุงเก็บน้ำเชื้อจากตัวผู้ สามารถเก็บน้ำเชื้อไว้ได้นานถึงประมาณ 4 เดือน เพื่อผสมกับไข่แดงเมื่อพร้อม โดยไม่จำเป็นต้องผสมพันธุ์ใหม่ทุกครั้ง ซึ่งแม่เต่ากระตัวหนึ่งจะขึ้นมา วางไข่ปีละ 1-3 ครั้ง โดยห่างกันประมาณ 2-3 อาทิตย์ (Schulz, 1975) จึงมีความเป็นไปได้ที่ลูกเต่ากระบริเวณเกาะทะลุอาจมาจากแม่ตัวเดียวกันได้จากพฤติกรรมแม่เต่าดังกล่าว

กรณีที่สอง: พฤติกรรมของเต่าตัวเมียที่กลับมาวางไข่ที่แหล่งเดิมที่เคยกำเนิดขึ้นมา (Schulz, 1975) ดังเช่นการศึกษาพันธุกรรมเต่ากระบริเวณเม็กซิโก ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 4 พื้นที่ ได้แก่ อเมริกาตอนกลาง อินโดแปซิฟิก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และ โคลัมเบีย พบว่าบริเวณอเมริกาตอนกลางและอินโดแปซิฟิกพบเพียง 3 haplotypes ส่วนบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และโคลัมเบียพบเพียง 2 haplotypes (Marroquin, 2017) ซึ่งทั้ง 4 พื้นที่ถือว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ จึงมีความเป็นไปได้ที่ในหลาย ๆ พื้นที่จะมีบรรพบุรุษแม่เต่าเพียงไม่กี่ตัวทำให้พบความหลากหลายค่อนข้างต่ำ เช่นเดียวกับพื้นที่เกาะทะลุที่พบเพียง 1 haplotype จึงมีความเป็นไปได้ที่เต่าตัวเมียที่เกาะทะลุจะมีบรรพบุรุษเป็นแม่เต่าตัวเดียว อย่างไรก็ดีตัวอย่างที่ศึกษายังมีปริมาณค่อนข้างน้อย เพื่อให้เห็นภาพที่ชัดเจนในเรื่องนี้ การสำรวจในตัวอย่างที่มากขึ้นและมาจากหลากลายช่วงเวลาของการวางไข่ จึงมีความจำเป็น

กรณีที่สุดท้าย: เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจไม่มีความแปรปรวนเพียงพอ จึงควรมีการวิเคราะห์ตำแหน่งอื่น ๆ ในไมโทรคอนเดรียดีเอ็นเอร่วมด้วย เช่น ไซโตโครมบี (Cytochrome *b*) ซึ่งเป็นอีกหนึ่งบริเวณที่มีความแปรปรวนสูงเช่นเดียวกัน ดังเช่นการศึกษาพันธุกรรมของเต่ากระที่ประเทศออสเตรเลีย จำนวน 106 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ที่ตำแหน่งไซโตโครมบี พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระบริเวณออสเตรเลีย จำนวน 6 haplotypes (Broderick *et al*., 1993) หรือพิจารณาใช้ไพรเมอร์ให้ครอบคลุมทั้งหมดของคอนโทรรีเจียน (Control region) นอกจากนี้จำนวนตัวอย่างและพื้นที่เก็บตัวอย่างควรมีมากกว่านี้ เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบเจอความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระในพื้นที่อื่น ๆ

บทที่ 5 สรุปผลศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เก็บตัวอย่างในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2563 ตัวอย่างเต่ากระที่มีอายุ 8, 9 และ 14 เดือน พบว่า มีเพียง 1 haplotype ซึ่งถือว่าไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของลูกเต่ากระที่อนุบาลอยู่ที่โรงอนุบาลเต่ากระ บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระ กรณีที่ใช้ยีนตำแหน่งคอนโทรรีเจียน (Control region) มาเปรียบเทียบควรเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีความสามารถวิเคราะห์ได้ครอบคลุมทั้งหมด (complete control region) และควรพิจารณาตำแหน่งอื่น ๆ ในไมโทรคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ร่วมด้วย เช่น ไซโตโครมบี (Cytochrome *b*) ซึ่งเป็นอีกหนึ่งบริเวณที่มีความแปรปรวนสูงเช่นเดียวกัน

5.2.2 ตัวอย่างเต่ากระที่นำมาศึกษาหลากหลายทางพันธุกรรม ควรมีตัวอย่างมาจากหลายพื้นที่ และมีจำนวนตัวอย่างมากเพียงพอที่จะทำให้ทราบข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของเต่ากระบริเวณอ่าวไทยได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

5.2.3 เต่าทะเลเป็นสัตว์คุ้มครอง จำเป็นต้องได้รับการอนุมัติจากหลายหน่วยงานที่รับผิดชอบ จึงควรมีการวางแผนเก็บตัวอย่างและเผื่อระยะเวลาในการดำเนินการด้านเอกสารทางราชการ

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. ภาวะคุกคามเต่าทะเล (ออนไลน์). 2554, แหล่งที่มา: https://km.dmcr.go.th/th/c_6/d_2692 [วันที่ 20 พฤษภาคม 2564]

กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. สถานภาพเต่าทะเลในน่านน้ำไทย (ออนไลน์). 2554, แหล่งที่มา: https://km.dmcr.go.th/th/c_6/d_2688 [วันที่ 20 พฤษภาคม 2564]

กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. แหล่งวางไข่ของเต่าทะเล(ออนไลน์). 2543, แหล่งที่มา: https://km.dmcr.go.th/th/c_6/d_2692 [วันที่ 20 พฤษภาคม 2564]

กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. ระบบฐานข้อมูลกลางและมาตรฐานข้อมูลทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง: ชนิดพันธุ์เต่าทะเล. (ออนไลน์).2563, แหล่งที่มา: https://km.dmcr.go.th/th/c_6/d_973 [25 กันยายน 2563].

จุมพล เหมะคีรินทร. ตามรอย“เต่าทะเล” นักเดินทาง. (ออนไลน์). 2563. แหล่งที่มา: http://nstda.or.th/rural/public/100%20articles-stkc/68.pdf [25 กันยายน 2563].

ชิฏิภัสร์ ณ ระนอง. 2561. วงรอบวันและการตอบสนองต่อความเครียดของการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีระรักษ์ ศรีนวลกราย. 2551. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาทู *Rastrelliger brachysoma* ในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 126 หน้า.

นพดล กิตนะ. 2558. สุขภาวะ การเจริญเติบโตและสถานภาพประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีสนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 30 หน้า

มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม. ความเป็นมาของมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม. (ออนไลน์). 2563, แหล่งที่มา: http://www.siammarine.or.th/about-us.html [25 กันยายน 2563].

สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป. 2550. เต่าทะเลไทย: ชนิด ชีววิทยา การศึกษาและการอนุรักษ์. ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนล่าง.

สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์. 2556. การอนุรักษ์เต่าทะเลของไทย. ใน เต่าทะเลไทย: ชนิด ชีววิทยา การศึกษาและการอนุรักษ์. สงขลา: ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนล่าง. หน้า 34-37.

ภาษาอังกฤษ

Abreu-Grobois FA, Horrocks J, Formia A, LeRoux R, Velez-Zuazo X, Dutton P, Soares L, Meylan P, Browne D (2006) New mtDNA Dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution capacity of mixed stock analysis. Book of abstracts of the 26 th annual symposium on sea turtle biology and conservation, Crete, Greece, 3–8 April 2006, p 179

Bartol, s., Mellgren, R. and Musick, J. 2003. Visual Acuity of Juvenile Loggerhead Sea Turtles (Caretta caretta): A Behavioral Approach. International Journal of Comparative Psychology. 16(2): 143-155

Broderick, D., Moritz, C., Miller, J.D., Guinen, M., Prince, R. I. T. and Limpus, C.J. 1993. Genetic studies of the Hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata*: evidence for multiple stocks in Australian waters. Pacific Conservation Biology. 1(2): 123-131.

Boore, J.L., 1999. Survey and summary animal mitochondria genome. Nucleic acids research. 27(8), 1767 – 1780.

Bowen, B.W. and Karl, S.A. 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. Molecular Ecology. 16: 4886-4907. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03542.x

Chantrapomsyl, S. 1992. Biology and conservation of olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea Eschscholtz*) in the Andaman Sea, Southern Thailand. Phuket Marine Biological Center Research Bulletin, 57: 51- 66.

Douzery, E. and Randi, E. 1997. The mitochondrial control region of Cervidae evolutionary patterns and phylogenetic content. Molecular Biology and Evolution. 14: 1154 - 1166.

Koch, A. L., Carr, A. and Ehrenfeld, D. W. 1969. The problem of open sea navigation: the migration of the green turtle to Ascension Island. J. Theor. Biol. 22: 163–179

Kongkiat, K., Somchai, M., Masato, K. and Kouji, N. 2004. No genetic divergence between green turtle (*Chelonia mydas*) nesting populations from the Andaman Sea and the Gulf of Thailand. SEASTAR. 4: 15-19

Manton, M.L. 1979. Olfaction and behaviour. In: M. Harless & H. Morlock, Turtles: perspectives and research. Krieger, Malabar, Florida, pp. 289-301.

Marroquin, T. and Monteros, A. 2017. Genetic characterization of the Critically Endangered hawksbill turtle (Eretmochelys imbricata) from the Mexican Pacific region. Latin American Journal of Aquatic Research. 45(3): 555-562

Miller, S.A,. Dykes D.D. and Polesky H.F. 1988**.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res. 16(3):1093-1215

Mortimer J.A and Donnelly M. 2008. Eretmochelys imbricata. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. [online]. Available from: http://www.iucnredlist.org/details/8005/0 [26 September 2020].

Moritz, C., Broderick, D., Dethmers, K., FitzSimmons, N. and Limpus C. 2002. Population genetics of Southeast Asian and Western Pacific green turtles. Department of Zoology and Entomology, University of Queensland, Australia. doi:https://library.dbca.wa.gov.au/static/FullTextFiles/070983.pdf

Nishizawa, H., J. Joseph & Y.K. Chong. 2016. Spatiotemporal 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(4): 363-373

PH Dutton.1996. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies: NOAA Technical Memorandum, NOAA's National Marine Fisheries Service, Dec 1996, pp. 17-24.

Phasuk, B. 1992. Biology, culture technique and conservation of sea turtle in Thailand. Phuket Marine Biological Center Technical Paper. No. 1/1992: 114 pp.

Schulz, J.P. 1975. Sea turtles nesting in Surinam. Zoologische Verhandelingen. *143*(1): 1–141

Tabib, M., Frootan, F. and Askari Hesni M. 2014. Genetic diversity and phylogeography of hawksbill turtle in the Persian Gulf. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences. 4(4) : 51-57

Tabib, M., Zolgharnein, H., Mohammadi, M., Salari-Aliabadi, M.A., Qasemi, A., Roshani, S., Rajabi-Maham H. and Frootan F. 2011. mtDNA variation of the critically endangered hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting on Iranian islands of the Persian Gulf. Genetics and Molecular Research Journal. 10(3): 1499-1503

ดรรชนี

ดรรชนี 1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Control region (808 bp) จากเต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*) บริเวณเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (HWCR = ตัวอย่างเต่ากระ จากเกาะทะลุ)

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                     5         15         25         35         45         55
HWCR1           CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR2           CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR6           CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR7           CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR13          CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR17          CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR19          CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR21          CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR25          CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR27          CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR28          CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT
HWCR30          CTTTCAATTA AACTACCCTT TGACGCAGAA TTAAGCGCCA ACACACAAAT TTACCTATAT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    65         75         85         95        105        115
HWCR1           CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR2           CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR6           CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR7           CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR13          CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR17          CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR19          CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR21          CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR25          CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR27          CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR28          CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT
HWCR30          CCTCTACCGT GCCCAACAGA CCAATATCCG CAACACTTAC CTATGTACTA TTGTACATCT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   125        135        145        155        165        175
HWCR1           ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR2           ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR6           ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR7           ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR13          ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR17          ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR19          ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR21          ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR25          ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR27          ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR28          ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA
HWCR30          ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAG TATCGTTGAT TAATTTGGCC TAAAACATAA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   185        195        205        215        225        235
HWCR1           AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR2           AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR6           AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR7           AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR13          AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR17          AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR19          AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR21          AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR25          AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR27          AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
HWCR28          AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG
```

```
HWCR30      AATTATTGGT TTTACATAAA CCGTTCAAAT TACATGACTA TTATATAGGT AATAAAAATG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   245        255        265        275        285        295
HWCR1       AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR2       AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR6       AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR7       AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR13      AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR17      AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR19      AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR21      AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR25      AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR27      AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR28      AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT
HWCR30      AAATGATATG GGACATAACA TTAAGTAATT ATTCTCAACC ATGAATATCG TCACAGTAAT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   305        315        325        335        345        355
HWCR1       AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR2       AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR6       AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR7       AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR13      AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR17      AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR19      AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR21      AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR25      AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR27      AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR28      AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA
HWCR30      AGGTTATTTC TTAGTTTAAC TCATCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG TAAGATACAA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   365        375        385        395        405        415
HWCR1       CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR2       CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR6       CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR7       CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR13      CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR17      CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR19      CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR21      CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR25      CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR27      CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR28      CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG
HWCR30      CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTAATTTGTG GCGTACATAA CTGATCTATT CTGGCCTCTG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   425        435        445        455        465        475
HWCR1       GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR2       GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR6       GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR7       GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR13      GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR17      GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR19      GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR21      GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR25      GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR27      GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR28      GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT
HWCR30      GTTGTTTTTT CAGGCACATT AAATTGGTAA AGTTCATTCA TCTCTTTTTA AGAGGCCTCT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   485        495        505        515        525        535
HWCR1       GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR2       GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR6       GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR7       GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
```

```
HWCR13      GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR17      GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR19      GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR21      GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR25      GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR27      GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR28      GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA
HWCR30      GGTTAAATGA GTTCTATACA TTGAATTTAT AACCTGGCAT AAGGTGATTT TACTTGCATA

            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
               545        555        565        575        585        595
HWCR1       TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR2       TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR6       TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR7       TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR13      TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR17      TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR19      TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR21      TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR25      TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR27      TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR28      TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA
HWCR30      TAGTAGTCTT TTTTTTCTCT TTGTGTTCTC AGGCCCACAT AACTGATACC TGCCGAATCA

            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
               605        615        625        635        645        655
HWCR1       ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR2       ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR6       ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR7       ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR13      ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR17      ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR19      ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR21      ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR25      ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR27      ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR28      ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA
HWCR30      ATGAAACTGA ACCTACGTTT AAGATGATTG GTCGTGCAAG ATAATCAATG GTATTATTTA

            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
               665        675        685        695        705        715
HWCR1       GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR2       GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR6       GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR7       GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR13      GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR17      GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR19      GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR21      GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR25      GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR27      GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR28      GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
HWCR30      GTTAATGCTT GAAAGACATA TATTCTTATA AAAACTCACA ACAGTTATTT ACAAGCCTAA
```

```
             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                725        735        745        755        765        775
HWCR1        CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR2        CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR6        CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR7        CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR13       CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR17       CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR19       CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR21       CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR25       CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR27       CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR28       CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
HWCR30       CCTATTACAA CTATACTTTT TAGTTAAACC CCCCCACCCC CATAAACTAA CATCATGCCC
```

```
             ....|....| ....|....| ....|...
                785        795        805
HWCR1        GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR2        GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR6        GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR7        GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR13       GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR17       GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR19       GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR21       GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR25       GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR27       GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR28       GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
HWCR30       GAATAACTAT TTACTTCTTG TCAAACCC
```

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. โรงอนุบาลเต่าทะเล เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

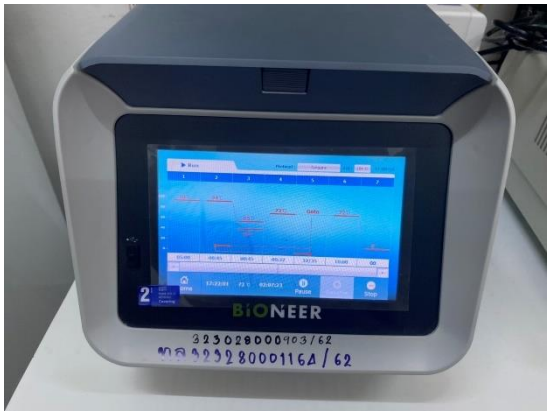
การสำรวจพื้นที่โรงอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ

ภาคผนวก ข. การเก็บตัวอย่างเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

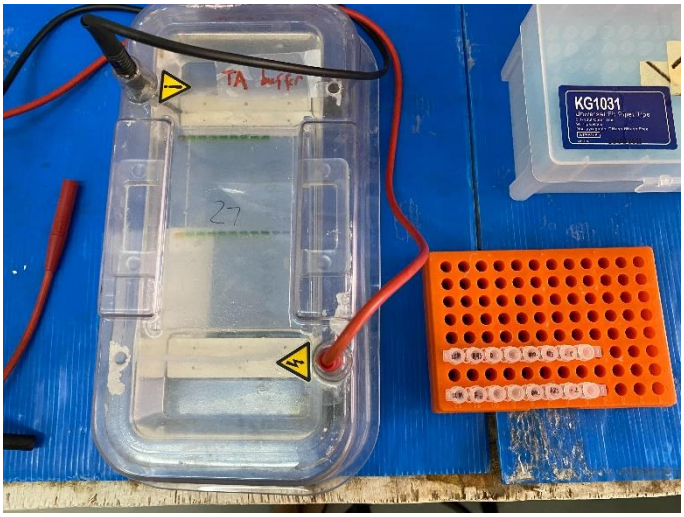
เครื่องมือในการเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ

การชั่งน้ำหนักและเจาะเลือดตัวอย่างเต่ากระ
ณ โรงอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ

ภาคผนวก ค. แสดงเครื่องมือวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ



เครื่อง Polymerase Chain Reaction



การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี gel electrophoresis