รายงานผลการดำเนินงาน

ปีงบประมาณ 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

สุขภาวะ นิเวศสรีรวิทยา และประชากรของเต่าทะเลในระบบนิเวศเกาะ

ผู้รับผิดชอบโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชฎฐ์ คนซื่อ

น.ส.มุกเรขา เชี่ยวชาญชัย

น.ส.ธฤษวรรณ ไตรจิตร์

นายรชตะ มณีอินทร์

นายสุธิโรจน์ มีสวัสดิ์

อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ

รองศาสตราจารย์ผุสตี ปริยานนท์

น.ส.ยุพาพร วิสูตร

น.ส.รังษิมา ผิวผ่อง

นายขัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี

นายพชร สิทธิชีวภาค

นายวรภัทร สวัสดิ์วงษ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

(ภาษาไทย) **สุขภาวะ นิเวศสรีรวิทยา และประชากรของเต่าทะเล ในระบบนิเวศเกาะ**

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

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
รองศาสตราจารย์ ผุสตี ปริยานนท์
น.ส.มุกเรขา เชี่ยวชาญชัย
น.ส.ธฤษวรรณ ไตรจิตร์
นายรชตะ มณีอินทร์
นายสุธิโรจน์ มีสวัสดิ์
นายวรภัทร สวัสดิ์วงษ์
อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชฏฐ์ คนซื่อ
น.ส.ยุพาพร วิสูตร
น.ส.รังษิมา ผิวผ่อง
นายขัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี
นายพชร สิทธิชีวภาค

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และ เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ท ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

เกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ เป็นหนึ่งในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่ยังคงสภาพอุดมสมบูรณ์ เป็นที่อยู่ของสัตว์สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ซึ่งปัจจุบันกองทัพเรือและภาคเอกชนที่ดูแลเกาะ ได้ร่วมมือกันบริหารจัดการพื้นที่หาดทรายให้เหมาะสมกับการขึ้นทำรังวางไข่ จนประสบผลสำเร็จในการเพาะฟักไข่และอนุบาลลูกเต่าได้เป็นจำนวนมากก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ

การนำลูกเต่าทะเลจากธรรมชาติมาทำการเพาะฟัก และอนุบาลให้แข็งแรง ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของลูกเต่าทะเล ส่งผลดีต่อการอนุรักษ์ประชากรของเต่าทะเลในธรรมชาติ แต่การเลี้ยงเต่าทะเลในบ่อเลี้ยง อาจทำให้เต่าเกิดความเครียดได้ และส่งผลต่อสุขภาวะของเต่าทะเล การประเมินความเครียด และสุขภาวะของเต่ากระในบ่อเลี้ยงจึงเป็นเรื่องสำคัญ ที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเลี้ยงเต่ากระให้ดียิ่งขึ้น ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างความเครียดและค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินความเครียดและสุขภาวะของเต่ากระ โดยเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระกลุ่มที่สุขภาพปกติ (28 ตัว) และ กลุ่มที่ป่วย (31 ตัว) ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 นำมาตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยาและวัดปริมาณคอร์ติโคสเตอโรนในพลาสมาด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay พบว่าเต่ากระกลุ่มปกติ และ กลุ่มที่ป่วย มีค่าทางโลหิตวิทยาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ ร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (70.85 และ 63.95 ในเดือนกันยายน กับ 77.89 และ 69.40 ในเดือนพฤศจิกายน) ร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (4.14 และ 5.78) ร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิล (23.91 และ 28.54 ในเดือนกันยายน กับ 16.28 และ 24.35 ในเดือนพฤศจิกายน) และอัตราส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (0.34 และ 0.46 ในเดือนกันยายน กับ 0.21 และ 0.37 ในเดือนพฤศจิกายน) และพบความแตกต่างของระดับคอร์ติโคสเตอโรน (9.64 และ 21.87 ng/mL) โดยเต่าทั้งหมดมีฮอร์โมนในช่วง 3.51-42.72 ng/mL ทั้งนี้ไม่พบสหสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างระดับคอร์ติโคสเตอโรนกับค่าทางโลหิตวิทยา ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินความเครียดและสุขภาวะของเต่ากระต่อไปในอนาคต

ขนาดประชากรของเต่ากระอาจประมาณได้จากข้อมูลการทำรังวางไข่ของเต่ากระที่เกาะทะลุ ในปี พ.ศ. 2555 และ 2558 ซึ่งพบว่ามีเต่ากระเพศเมียอย่างน้อย 6 ตัว ที่ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ทำรังวางไข่ แต่ไม่สามารถระบุถึงจำนวนเต่ากระเพศผู้ได้ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เพื่อตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศเมียที่ขึ้นวางไข่ ควบคู่ไปกับการศึกษาภาวะ multiple paternity เพื่อตรวจสอบว่ามีเต่าเพศผู้อย่างน้อยกี่ตัวที่ผสมพันธุ์กับเต่าเพศเมียที่วางไข่รังนี้ โดยใช้เลือดจากตัวอย่างเต่ากระอายุ 1-2 ปี ที่ใช้ศึกษาสุขภาวะและการเจริญเติบโต ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ในการตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศเมีย สามารถใช้บริเวณ control region ของ mitochondrial DNA ระบุอัตลักษณ์ของแม่เต่าได้ ส่วนการตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศผู้ พบว่ามี microsatellite primer อย่างน้อย 3 คู่ ที่มีศักยภาพในการใช้ตรวจสอบอัตลักษณ์ของพ่อเต่าได้

คำสำคัญ สุขภาวะ, โลหิตวิทยา, คอร์ติโคสเตอโรน, ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ, นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

Abstract

Talu Island in Prachuab Khiri Khan province is one of the protected area of the Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn. The island ecosystem is rich in biodiversity with a presence of important reptile, especially the hawksbill sea turtle, *Eretmochelys imbricata*. Currently, a sea turtle head start program has been established under the cooperation between the Royal Thai Navy and the private sectors. In this program, nesting beach on Talu Island is routinely monitored. 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.

To monitor health of turtles in the head start program, the current study thus aims to evaluate correlation between stress and hematological parameters of the hawksbill turtle in captivity. Blood samples were collected from normal (n=28) and sick (n=31) hawksbill turtles raised at Talu Island in September and November 2016. All samples were subjected to hematological evaluation and measurement for plasma corticosterone level by an ELISA. The results indicate that normal and sick turtles showed significant differences in percentage of lymphocyte (70.85 vs. 63.95 in September and 77.89 vs. 69.40 in November), percentage of monocyte (4.14 vs. 5.78), percentage of heterophil (23.91 vs. 28.54 in September and 16.28 vs. 24.35 in November) and heterophil to lymphocyte ratio (0.34 vs. 0.46 in September and 0.21 vs. 0.37 in November). There was also a significant difference in plasma corticosterone level (9.64 vs. 21.87 ng/mL) with the general range of 3.51- 42.72 ng/mL. However, significant correlation between corticosterone level and hematological parameters was not found. These hematological parameters and corticosterone levels can be used for evaluation of stress and health of the hawksbill turtle in the future.

Population of the hawksbill turtle in this area was initially estimated from the nesting incidence. During 2012-2015 nesting season, it was estimated that at least 6 female hawksbill turtles used this island as their nesting sites. However, it is still not possible to estimate number of male turtles. In this study, molecular biology techniques have been employed to estimate 1) number of nesting female turtles and 2) number of male turtles that sired these hatchlings. 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 control region of the mitochondrial DNA can be used as a marker to identify female, while at least 3 pairs of microsatellite primer is feasible to be used to identify male turtles.

Keywords: nesting ecology, hematology, packed cell volume, mitochondrial DNA, nuclear DNA

สารบัญ

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

บทนำ 2
วัตถุประสงค์ 2
วิธีดำเนินการวิจัย 3
สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล 4
สัตว์ทดลอง 4
ผลการศึกษา 4
สรุปผลการศึกษา 32
เอกสารอ้างอิง 33

สารบัญตาราง

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

ตารางที่ 2: ค่าความยาวตามความโค้งของกระดองหลัง (เซนติเมตร) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 10

ตารางที่ 3: น้ำหนักตัว (กิโลกรัม) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 11

ตารางที่ 4: ค่าฮีมาโตคริตของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 13

ตารางที่ 5: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง (10^5 เซลล์ต่อไมโครลิตร) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 14

ตารางที่ 6: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (10^3 เซลล์ต่อไมโครลิตร) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 15

ตารางที่ 7: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 17

ตารางที่ 8: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 18

ตารางที่ 9: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 19

ตารางที่ 10: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 21

ตารางที่ 11: ค่า H:L ratio ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 22

ตารางที่ 12: ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 23

ตารางที่ 13: สหสัมพันธ์ระหว่างระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 25

ตารางที่ 14: ลำดับเบสและขนาดของ mitochondrial primer ที่ใช้ในการศึกษาเต่ากระที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 29

ตารางที่ 15: ลำดับเบส ลักษณะเด่นของเบสที่ซ้ำกันและขนาดของ microsatellite primer จำนวน 10 คู่ ที่ใช้ในการศึกษาเต่ากระ ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 30
ตารางที่ 16: ผลการวิเคราะห์ microsatellite primer กับตัวอย่างเนื้อเยื่อจากซากเต่ากระที่ได้จากฐานทัพเรือสัตหีบ จังหวัดชลบุรี 31

สารบัญภาพ

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

ภาพที่ 2: กิจกรรมการปล่อยเต่ากระ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช บรมนาถบพิตร เนื่องในโอกาสมหามงคลเสด็จเถลิงถวัลยราชสมบัติครบ 70 ปี และ เพื่อเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช บรมนาถบพิตร เนื่องในโอกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 7 รอบ ในวันที่ 5 กันยายน พ.ศ. 2559 7

ภาพที่ 3: การบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐาน และ น้ำหนักตัว ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 8

ภาพที่ 4: การเจาะเลือดจากตำแหน่งแอ่งเลือดใต้กระดองหลัง (subcarapacial sinus) ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 8

ภาพที่ 5: การเก็บข้อมูลทางโลหิตวิทยาในภาคสนามของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ซ้าย: การวัดค่าฮีมาโตคริต; ขวา: การเตรียมสไลด์ตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ) 9

ภาพที่ 6: สัญลักษณ์ของกลุ่มสำหรับการแสดงผลการวิเคราะห์แบบแยกเดือน 9

ภาพที่ 7: สัญลักษณ์ของกลุ่มสำหรับการแสดงผลการวิเคราะห์แบบรวมเดือน 9

ภาพที่ 8: ค่าความยาวตามความโค้งของกระดองหลังของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 10

ภาพที่ 9: ค่าความยาวตามความโค้งของกระดองหลังของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U test) 11

ภาพที่ 10: น้ำหนักของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 12

ภาพที่ 11: น้ำหนักของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 12

ภาพที่ 12: ค่าฮีมาโตคริตของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U test) 13

ภาพที่ 13: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 14

ภาพที่ 14: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U test) 15
ภาพที่ 15: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 15
ภาพที่ 16: ลักษณะสัณฐานของเซลล์เม็ดเลือดขาวของเต่ากระ (ก. ลิมโฟไซต์ ข. โมโนไซต์ ค. เฮเทอโรฟิล ง. อีโอสิโนฟิล) 16
ภาพที่ 17: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 17
ภาพที่ 18: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 18
ภาพที่ 19: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U test) 19
ภาพที่ 20: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 20
ภาพที่ 21: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 20
ภาพที่ 22: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U test) 21
ภาพที่ 23: ค่า H:L ratio ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 22
ภาพที่ 24: ค่า H:L ratio ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 22
ภาพที่ 25: ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test) 23
ภาพที่ 26: ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (Student's t-test) 24
ภาพที่ 27 : 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) 28

ภาพที่ 28 : ตัวอย่างลักษณะเบสที่ซ้ำกันที่ปรากฏบนสาย DNA ของเนื้อเยื่อชากเต่ากระที่ได้รับจากฐานทัพเรือสัตหีบ จ.ชลบุรี เมื่อวิเคราะห์ด้วย microsatellite primer ชนิด Eim8 31
ภาพที่ 22 : ลักษณะเบสที่ซ้ำกันที่ปรากฏบนสาย DNA ของตัวอย่างเลือดเต่ากระ จากเกาะทะลุ จ.ประจวบคีรีขันธ์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย microsatellite primer ชนิด Eim41 32

รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) สุขภาวะ นิเวศสรีรวิทยา และประชากรของเต่าทะเลในระบบนิเวศเกาะ

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

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชฏฐ์ คนซื่อ
รองศาสตราจารย์ผุสตี ปริยานนท์
น.ส.มุกเรขา เชี่ยวชาญชัย
น.ส.ยุพาพร วิสูตร
น.ส.ธฤษวรรณ ไตรจิตร์
น.ส.รังษิมา ผิวผ่อง
นายรชตะ มณีอินทร์
นายขัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี
นายสุธิโรจน์ มีสวัสดิ์
นายพชร สิทธิชีวภาค
นายวรภัทร สวัสดิ์วงษ์

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. 2560 ได้วางแผนการทำงานโดย 1) ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ศึกษา และ 2) ใช้เต่ากระที่ใช้พื้นที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์เป็นพื้นที่ทำรังวางไข่เป็นกลุ่มสัตว์เป้าหมาย

ในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งต่อยอดงานวิจัยจากความสำเร็จเบื้องต้นโดยเน้นการประเมินปัจจัยทางชีวภาพที่บ่งบอกสุขภาวะ และ การเจริญเติบโต ตลอดจนประเมินสถานภาพประชากรเบื้องต้นโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งข้อมูลด้านนิเวศสรีรวิทยาที่ได้จะช่วยในการประเมินและปรับแนวทางการจัดการในพื้นที่เกาะทะลุ และเมื่อร่วมกับข้อมูลทางประชากรที่ได้ซึ่งสามารถนำมาใช้บ่งบอกสถานภาพของเต่ากระในอ่าวไทย และเก็บรวบรวมอย่างต่อเนื่องจะเป็นประโยชน์ต่อการติดตามประชากรในระยะยาว เพื่อใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่หมู่เกาะและทะเลไทยอย่างยั่งยืน

2. วัตถุประสงค์

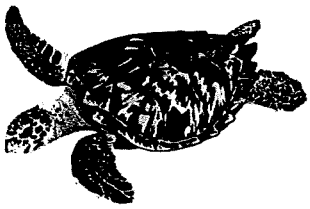
2.1 เพื่อสนองพระราชดำริ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)

2.2 เพื่อสำรวจสุขภาวะ นิเวศสรีรวิทยา และประชากรของเต่าทะเลที่ขึ้นทำรังวางไข่บริเวณพื้นที่หมู่เกาะและทะเลไทยของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เก็บข้อมูลเกี่ยวกับนิเวศวิทยาการทำรังวางไข่ สุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่ขึ้นวางไข่บริเวณพื้นที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ดังนี้



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

3.2 วิธีการศึกษา

3.2.1 สำรวจการขึ้นทำรังวางไข่ของแม่เต่ากระ ในพื้นที่โครงการฯ

3.2.2 บันทึกพิกัดภูมิศาสตร์และข้อมูลทางนิเวศวิทยา และลักษณะของถิ่นอาศัยย่อยของบริเวณที่พบการขึ้นทำรังวางไข่

3.2.3 เก็บข้อมูลขนาดสัณฐาน และ น้ำหนัก ของลูกเต่าที่อนุบาลไว้ในบ่อเพาะเลี้ยงของเกาะทะลุ เพื่อใช้ในการติดตามการเจริญเติบโต

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

3.2.5 นำตัวอย่างเลือดมาปั่นแยกเพื่อเก็บน้ำเลือดมาตรวจสอบระดับฮอร์โมนที่สัมพันธ์กับความเครียด (corticosterone) ในห้องปฏิบัติการ

3.2.6 เก็บเซลล์เม็ดเลือดที่ตกตะกอนจากการปั่นแยกในข้อ 3.2.5 เพื่อใช้สกัด DNA ในห้องปฏิบัติการ

3.2.7 ตรวจสอบ mitochondrial DNA โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ control region ของเต่ากระ เพื่อนำมาตรวจสอบจำนวนเพศเมียที่ขึ้นมาวางไข่

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

3.2.9 วิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในภาคสนาม และสรุปผลการศึกษา

4. สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

สำรวจภาคสนามและเก็บข้อมูลทางกายภาพและชีวภาพในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ หมู่เกาะและทะเลไทย (เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์) และนำตัวอย่างมาศึกษาเพิ่มเติมที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. สัตว์ทดลอง

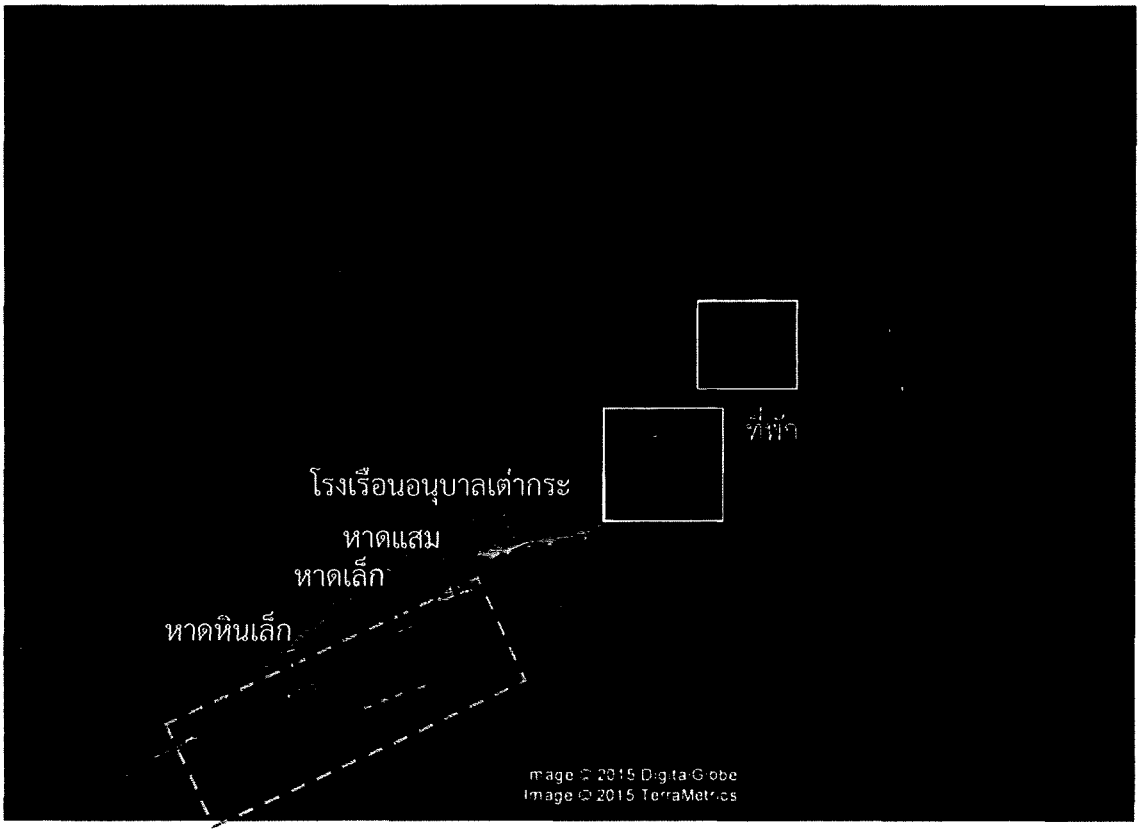
โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง "สุขภาวะ การเจริญเติบโต และสถานภาพประชากรของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์" ซึ่งได้รับอนุญาตให้ทำการประมงเพื่อประโยชน์ทางวิชาการจากกรมประมง (หนังสืออนุญาตเลขที่ 11/2559 ลงวันที่ 23 กันยายน 2559) และขั้นตอนในการกระทำต่อสัตว์ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการการควบคุมดูแลการเลี้ยง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

6. ผลการศึกษา

6.1 การทำรังวางไข่ของเต่ากระที่เกาะทะลุ

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

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



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

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

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

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

เมื่อย้ายไข่มาเพาะฟักยังหาดทรายกึ่งธรรมชาติจนฟักออกเป็นตัว เกาะทะลุไอส์แลนด์รีสอร์ทได้เลี้ยงอนุบาลเต่ากระจนมีอายุ 1-2 ปี ก่อนจะปล่อยคืนสู่ธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง และในโอกาสพิเศษต่าง ๆ จะเปิดโอกาสให้เยาวชนและประชาชนทั่วไปได้เข้ามามีส่วนร่วม ดังกรณีโครงการปล่อยเต่ากระในวันที่ 5 กันยายน พ.ศ. 2559 เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช บรมนาถบพิตร เนื่องในโอกาสมหามงคลเสด็จเถลิงถวัลยราชสมบัติครบ 70 ปี และ เพื่อเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช บรมนาถบพิตร เนื่องในโอกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 7 รอบ (ภาพที่ 2) และนอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างเต่ากระขนาดใหญ่ (อายุ 3-4 ปี) ไว้จำนวนหนึ่ง เพื่อเป็นตัวอย่างสำหรับศึกษาการเติบโตในบ่อเลี้ยง และ ติดตามการอพยพในธรรมชาติในอนาคต (ปรีดา เจริญพักตร์, สัมภาษณ์)

ภาพที่ 2: กิจกรรมการปล่อยเต่ากระ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช บรมนาถบพิตร เนื่องในโอกาสมหามงคลเสด็จเถลิงถวัลยราชสมบัติครบ 70 ปี และ เพื่อเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช บรมนาถบพิตร เนื่องในโอกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 7 รอบ ในวันที่ 5 กันยายน พ.ศ. 2559

6.2 สุขภาวะและการเจริญเติบโตของเต่ากระ

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

ภาพที่ 3: การบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐาน และ น้ำหนักตัว ของเต่ากระที่เลี้ยงในโรงเรือนอนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

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

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

ในโครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ได้พิจารณาใช้เต่ากระอายุประมาณ 6-12 เดือน จากบ่ออนุบาลลูกเต่ากระ เกาะทะลุ อำเภอบางสะพานน้อย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 2 ครั้ง ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 และในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 แบ่งเป็นเต่าที่ปกติจำนวนอย่างน้อย 28 ตัว และเต่าที่มีอาการป่วย ซึ่งมีอาการผิดปกติต่าง ๆ เช่น มีแผลถลอก แผลเปื่อย อาการบวมตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย และหางขาด เป็นต้น จำนวน 31 ตัว

จากการศึกษาสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ เต่าปกติในเดือนกันยายน เต่าป่วยในเดือนกันยายน เต่าปกติในเดือนพฤศจิกายน และเต่าป่วยในเดือนพฤศจิกายนโดยข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างเดือน ถ้ามีความแตกต่างของข้อมูลจากทั้งสองเดือน จะแสดงผลแบบแยกเดือน โดยใช้สัญลักษณ์ดังแสดงในภาพที่ 6 แต่ถ้าไม่มีความแตกต่างของข้อมูลระหว่างเดือน จะแสดงผลแบบรวมเดือน โดยใช้สัญลักษณ์ดังแสดงในภาพที่ 7 จากนั้นข้อมูลจะถูกวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ปกติและกลุ่มที่ป่วยตามลำดับ

ภาพที่ 6: สัญลักษณ์ของกลุ่มสำหรับการแสดงผลการวิเคราะห์แบบแยกเดือน

ภาพที่ 7: สัญลักษณ์ของกลุ่มสำหรับการแสดงผลการวิเคราะห์แบบรวมเดือน

6.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

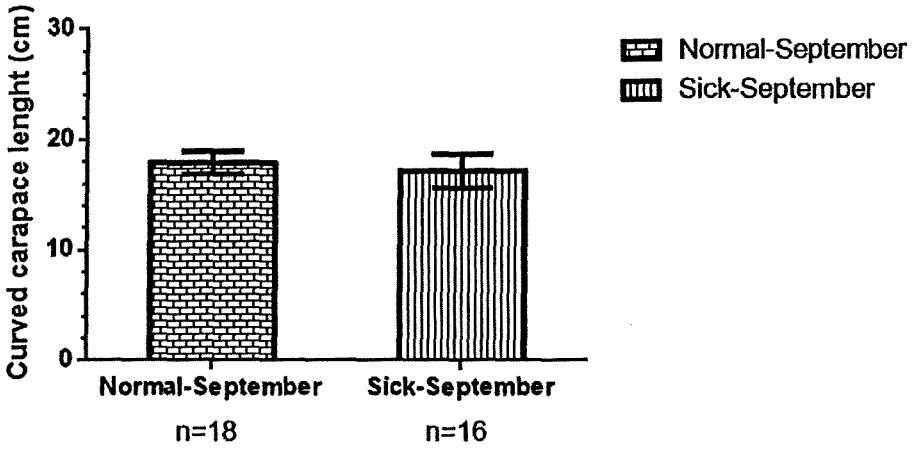
จากการศึกษาครั้งนี้ ทำการเก็บข้อมูลความยาวตามความโค้งของกระดองหลัง (curved carapace length) และชั่งน้ำหนัก ได้ผลการศึกษาดังนี้

6.2.1.1 ความยาวตามความโค้งของกระดองหลัง (ตารางที่ 2)

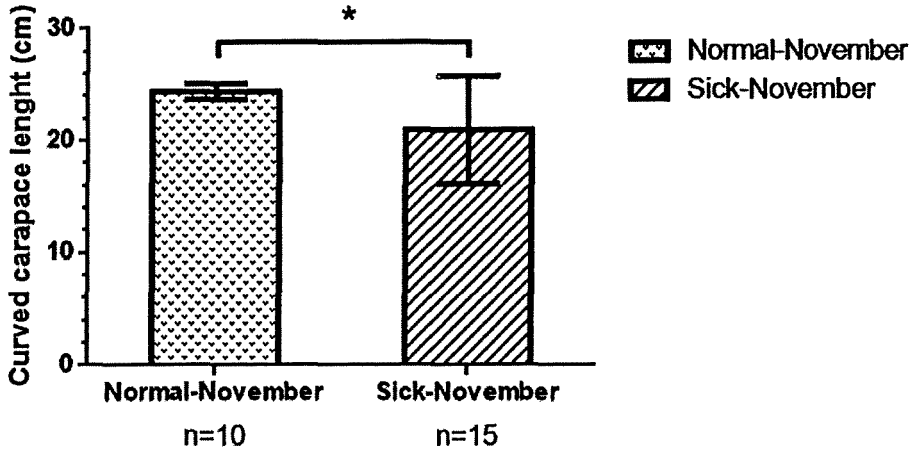
ข้อมูลมีความแตกต่างกันระหว่างเดือน ในเดือนกันยายนไม่พบความแตกต่างระหว่างเต่ากลุ่มที่ปกติกับเต่ากลุ่มที่ป่วย (ภาพที่ 8) และในเดือนพฤศจิกายนพบว่าเต่ากลุ่มที่ปกติ มีความยาวตามความโค้งของกระดองหลังมากกว่าเต่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$, ภาพที่ 9)

ตารางที่ 2: ค่าความยาวตามความโค้งของกระดองหลัง (เซนติเมตร) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	18	17.9 ± 1.0
	ป่วย	16	17.2 ± 1.5
พฤศจิกายน	ปกติ	10	24.4 ± 0.7
	ป่วย	15	21.0 ± 4.8



ภาพที่ 8: ค่าความยาวตามความโค้งของกระดองหลังของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)



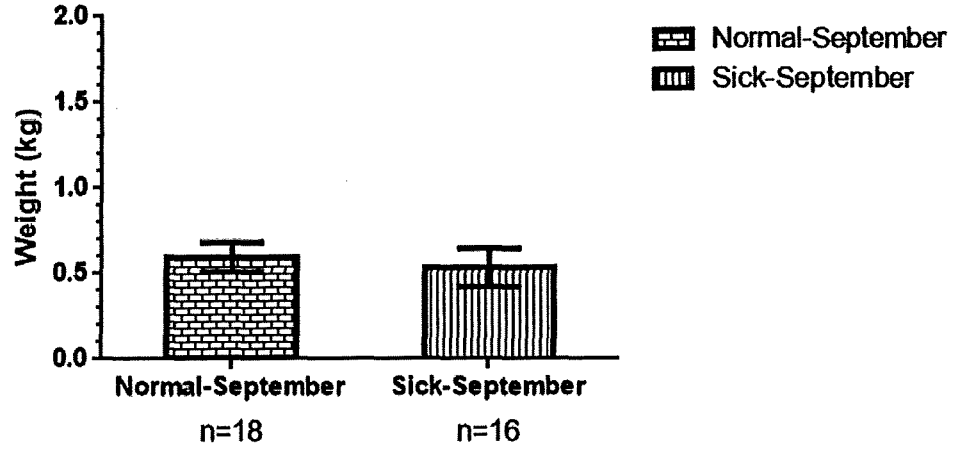
ภาพที่ 9: ค่าความยาวตามความโค้งของกระดองหลังของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U test)
หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

6.2.1.2 น้ำหนักตัว (ตารางที่ 3)

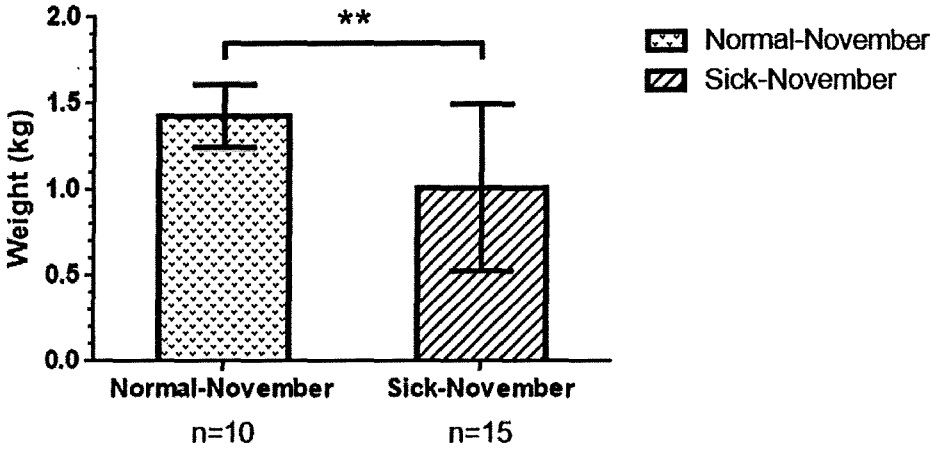
ข้อมูลมีความแตกต่างระหว่างเดือน ในเดือนกันยายนไม่พบความแตกต่างระหว่างเต่ากลุ่มที่ปกติกับเต่ากลุ่มที่ป่วย (ภาพที่ 10) และในเดือนพฤศจิกายนพบว่าเต่ากลุ่มที่ปกติ มีน้ำหนักมากกว่าเต่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 11)

ตารางที่ 3: น้ำหนักตัว (กิโลกรัม) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	18	0.600 ± 0.085
	ป่วย	16	0.536 ± 0.112
พฤศจิกายน	ปกติ	10	1.430 ± 0.183
	ป่วย	15	1.014 ± 0.485



ภาพที่ 10: น้ำหนักของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)



ภาพที่ 11: น้ำหนักของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)

หมายเหตุ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.01$

จากการวัดความยาวตามความโค้งของกระดองหลัง และชั่งน้ำหนักเต่ากระในแต่ละกลุ่ม พบว่า ในเดือนพฤศจิกายน เต่ากระกลุ่มที่ปกติมีค่าความยาวตามความโค้งของกระดองหลังมากกว่าเต่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ (24.4 ± 0.7 และ 21.0 ± 4.8 เซนติเมตร) และเต่ากระกลุ่มที่ปกติมีน้ำหนักมากกว่าเต่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ (1.430 ± 0.183 และ 1.014 ± 0.485 กิโลกรัม) อาจเกิดจากเต่าที่ป่วยในเดือนพฤศจิกายนจำนวนหลายตัว มีอาการป่วย ติดเชื้อ และการอักเสบมาก ทำให้เต่าที่ป่วยสามารถเติบโตได้ช้ากว่าปกติ เนื่องจากต้องนำพลังงานบางส่วนไปใช้ในกระบวนการอักเสบของแผล ซึ่งถูกอธิบายไว้ในการศึกษาอาการแผลอักเสบที่ผิวหนังแบบ ulcerative dermatitis ในเต่าตนุ ซึ่งพบว่าเต่าที่มีอาการ UD จะมีขนาดเล็กกว่าเต่าที่ปกติ (Munoz et al., 2013) ในขณะที่ เต่าที่ป่วยในเดือนกันยายน ไม่สามารถสังเกตความแตกต่างของความยาวตามความโค้งของกระดองหลัง และน้ำหนัก

6.2.2 ค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระ

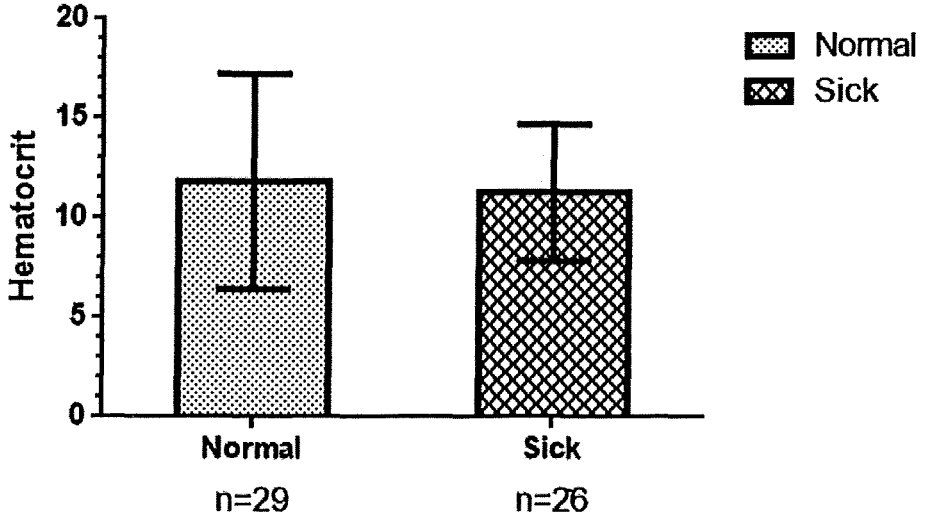
จากการศึกษานี้ ได้เก็บข้อมูลค่าทางโลหิตวิทยาทั้งหมด 5 ค่า ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต ค่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง ค่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด และอัตราส่วนเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (H:L ratio) ได้ผลการศึกษาดังนี้

6.2.2.1 ค่าฮีมาโตคริต (ตารางที่ 4)

ค่าฮีมาโตคริตของเต่ากระไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเดือน และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ปกติกับกลุ่มที่ป่วย (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 4: ค่าฮีมาโตคริตของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	17	11.8 ± 5.3
	ป่วย	15	11.0 ± 3.6
พฤศจิกายน	ปกติ	9	11.9 ± 5.9
	ป่วย	14	11.6 ± 3.3
รวมเดือน	ป่วย	29	11.3 ± 3.4
	ปกติ	26	11.8 ± 5.4



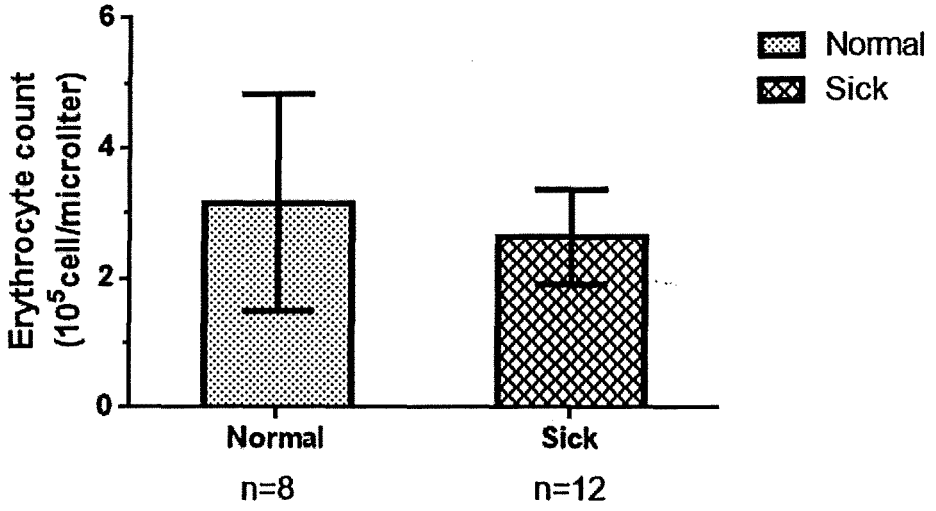
ภาพที่ 12: ค่าฮีมาโตคริตของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U test)

6.2.2.2 <u>จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง</u> (ตารางที่ 5)

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงของเต่ากระไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเดือน และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ปกติกับกลุ่มที่ป่วย (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 5: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง (10^5 เซลล์ต่อไมโครลิตร) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	5	2.9 ± 1.5
	ป่วย	5	2.9 ± 0.4
พฤศจิกายน	ปกติ	3	3.6 ± 2.3
	ป่วย	7	2.5 ± 0.9
รวมเดือน	ป่วย	8	3.2 ± 1.7
	ปกติ	12	2.6 ± 7.3



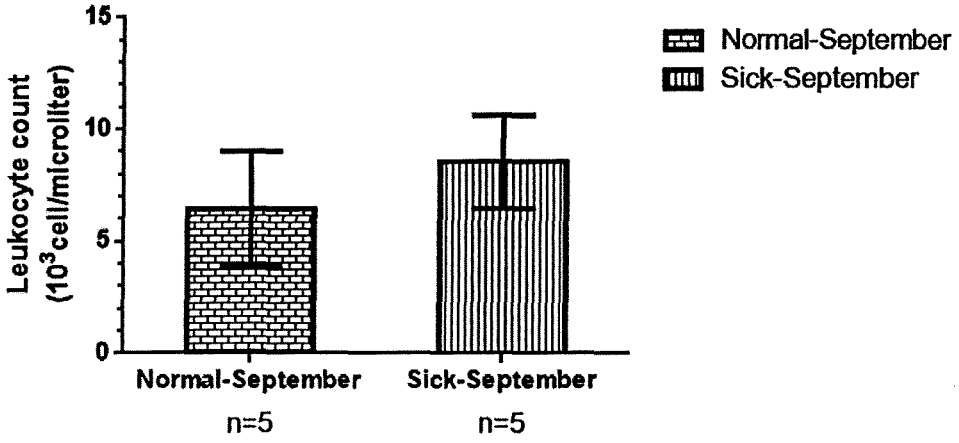
ภาพที่ 13: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)

6.2.2.3 <u>จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว</u> (ตารางที่ 6)

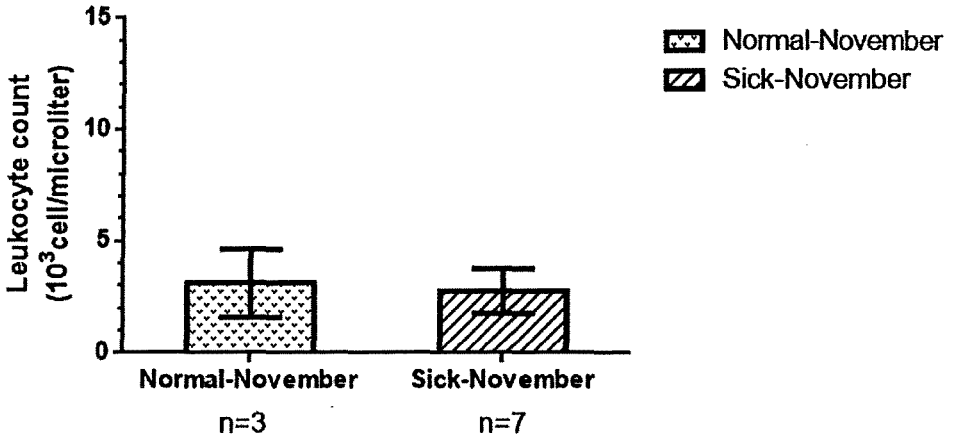
จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความแตกต่างระหว่างเดือน และไม่พบความแตกต่างระหว่างเต่ากลุ่มที่ปกติกับเต่ากลุ่มที่ป่วยในแต่ละเดือน (ภาพที่ 14 และ 15)

ตารางที่ 6: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (10^3 เซลล์ต่อไมโครลิตร) ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	5	6.5 ± 2.6
	ป่วย	5	8.6 ± 2.1
พฤศจิกายน	ปกติ	3	3.1 ± 1.5
	ป่วย	7	2.8 ± 1.0



ภาพที่ 14: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U test)



ภาพที่ 15: จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)

6.2.2.4 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด

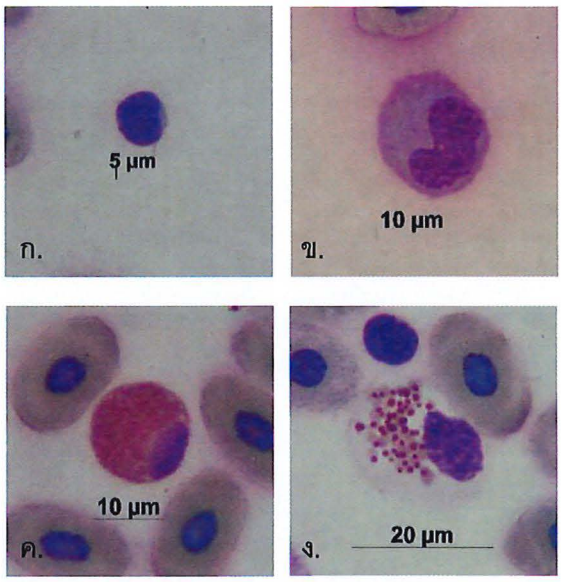
ลักษณะสัณฐานของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบในการศึกษาครั้งนี้ (ภาพที่ 16) มีดังนี้

1. เซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดเล็ก ไม่มี specific granule มีปริมาณไซโตพลาสซึมน้อย นิวเคลียสมีโครมาตินที่ขดแน่น เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa นิวเคลียสติดสีม่วงทึบ

2. เซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความแปรผันของขนาดและรูปร่าง ของเซลล์และนิวเคลียสสูง ไม่มี specific granule นิวเคลียสมีโครมาตินที่ขดแน่นน้อยกว่าลิมโฟไซต์ เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa นิวเคลียสจึงติดสีม่วงจางกว่าลิมโฟไซต์

3. เซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิล เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดใหญ่ มี fusiform specific granule ที่ย้อมติดสีกรด ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีกรด และมีนิวเคลียสอยู่ชิดขอบเซลล์

4. เซลล์เม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิล เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดใหญ่ มี specific granule รูปร่างเป็นถุงกลมซึ่งย้อมติดสีกรด นิวเคลียสใส ไม่ติดสี และมีนิวเคลียสอยู่ชิดขอบเซลล์



ภาพที่ 16: ลักษณะสัณฐานของเซลล์เม็ดเลือดขาวของเต่ากระ (ก. ลิมโฟไซต์ ข. โมโนไซต์ ค. เฮเทอโรฟิล ง. อีโอสิโนฟิล)

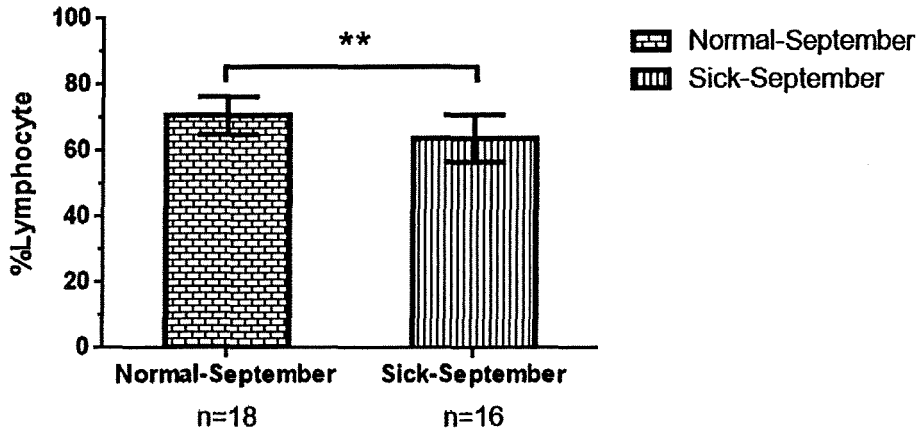
จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิล จึงได้ค่าสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 4 ชนิด ดังนี้

สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (ตารางที่ 7) ข้อมูลมีความแตกต่างกันระหว่างเดือน ในเดือนกันยายนพบว่าเต่ากลุ่มที่ปกติมีสัดส่วนลิมโฟไซต์สูงกว่าเต่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ (70.85 ± 5.66 และ 63.95 ± 7.13; $p<0.01$, ภาพที่ 17) และเดือนพฤศจิกายนพบว่าเต่ากลุ่มที่ปกติมีสัดส่วนลิมโฟไซต์สูงกว่าเต่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ (77.89 ± 5.75 และ 69.40 ± 9.19; $p<0.05$, ภาพที่ 18) การที่เต่ากลุ่มปกติมีสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์สูงกว่าเต่าที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งเดือนกันยายน และ

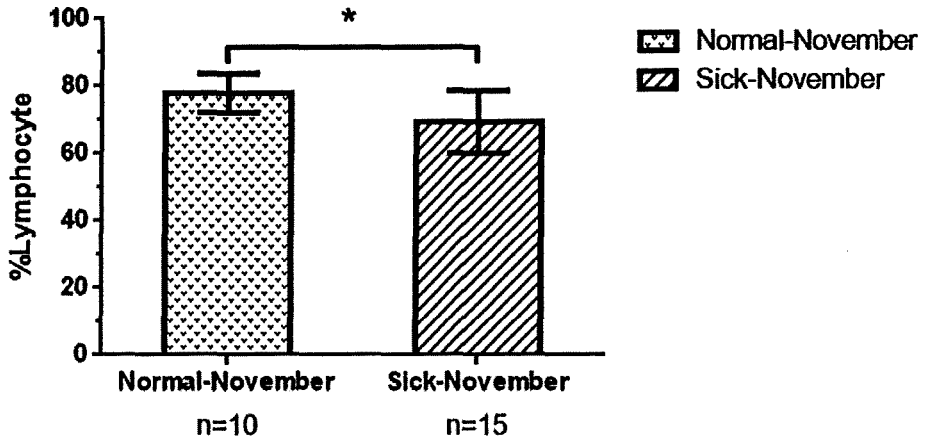
เดือนพฤศจิกายน สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า สัดส่วนของลิมโฟไซต์มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเมื่อเกิดอาการป่วย และมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อสัตว์เกิดความเครียด (Arikan and Cicek, 2014, Davis et al., 2008)

ตารางที่ 7: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	18	70.85 ± 5.66
	ป่วย	16	63.95 ± 7.13
พฤศจิกายน	ปกติ	10	77.89 ± 5.75
	ป่วย	15	69.40 ± 9.19



ภาพที่ 17: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)
หมายเหตุ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.01$

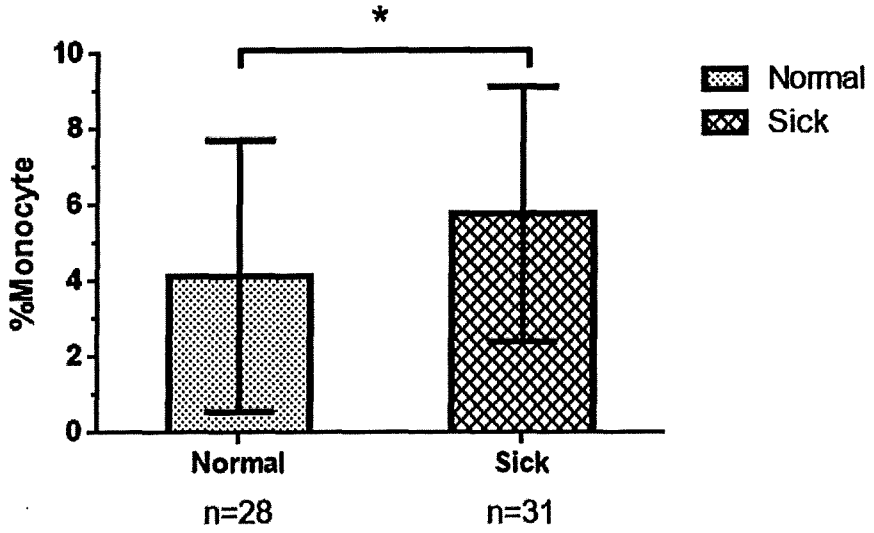


ภาพที่ 18: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)
หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (ตารางที่ 8) ข้อมูลไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเดือน และเมื่อนำข้อมูลทั้งสองเดือนมาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าเต่ากลุ่มที่ปกติมีสัดส่วนโมโนไซต์ต่ำกว่าเต่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ (4.14 ± 3.57 และ 5.78 ± 3.36; $p<0.05$, ภาพที่ 19) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า สัตว์เลื้อยคลานจะมีสัดส่วนโมโนไซต์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีอาการป่วยแบบอักเสบ หรือมีการติดเชื้อ (Campbell, 2015)

ตารางที่ 8: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	18	3.90 ± 3.13
	ป่วย	16	6.14 ± 2.91
พฤศจิกายน	ปกติ	10	4.57 ± 4.41
	ป่วย	15	5.40 ± 3.85
รวมเดือน	ป่วย	28	4.14 ± 3.57
	ปกติ	31	5.78 ± 3.36

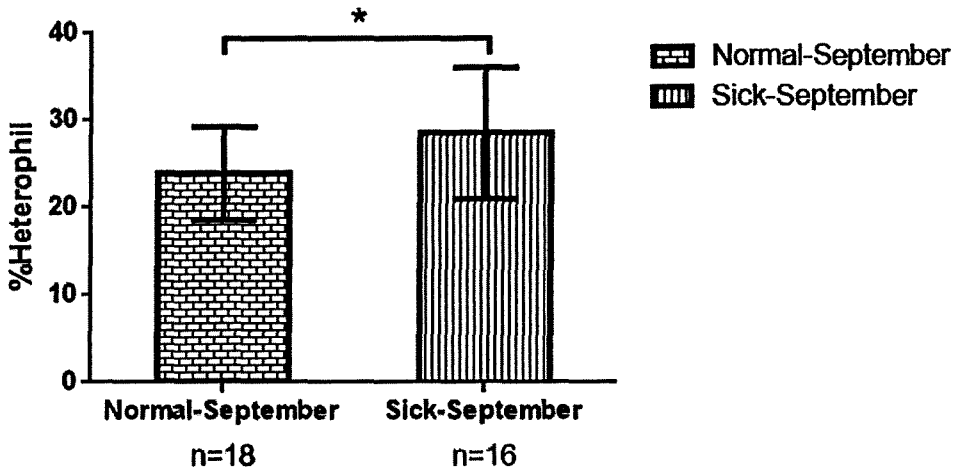


ภาพที่ 19: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U test)
หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

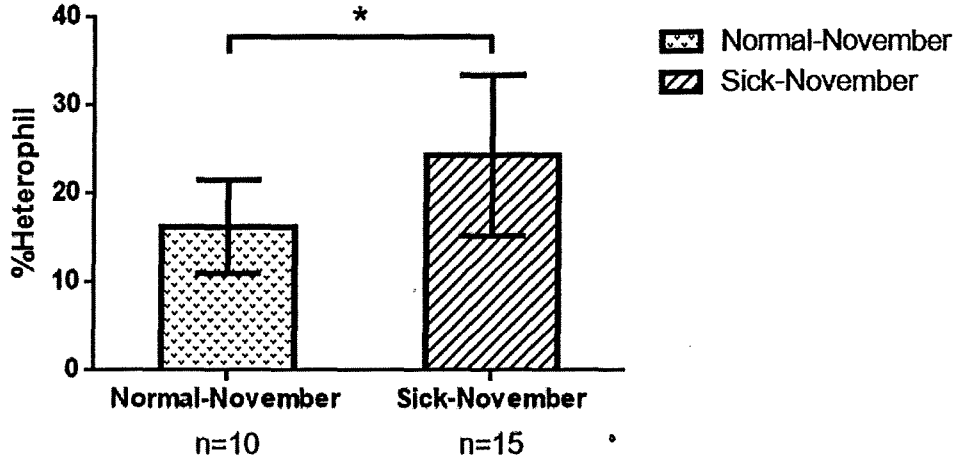
สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิล (ตารางที่ 9) ข้อมูลมีความแตกต่างกันระหว่างเดือน และทั้งสองเดือนพบว่าเต่ากลุ่มที่ปกติมีสัดส่วนเฮเทอโรฟิลต่ำกว่าเต่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$, ภาพที่ 20 และ 21) ทั้งเดือนกันยายน (23.91 ± 5.37 และ 28.54 ± 7.55) และเดือนพฤศจิกายน (16.28 ± 5.27 และ 24.35 ± 9.11) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า สัดส่วนของเฮเทอโรฟิลมีความเกี่ยวข้องกับความเครียดของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก โดยความเครียด จะทำให้สัตว์ตอบสนองด้วยการมีสัดส่วนเม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลสูงขึ้น จากการนำเฮเทอโรฟิลจากไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือด และลดการนำเฮเทอโรฟิลออกจากกระแสเลือด (Davis et al., 2008)

ตารางที่ 9: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	18	23.91 ± 5.37
	ป่วย	16	28.54 ± 7.55
พฤศจิกายน	ปกติ	10	16.28 ± 5.27
	ป่วย	15	24.35 ± 9.11



ภาพที่ 20: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)
หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

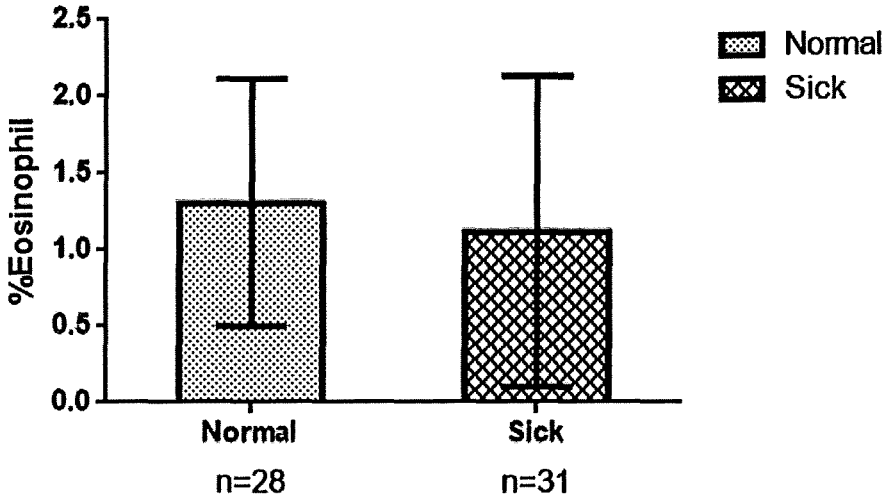


ภาพที่ 21: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)
หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิล (ตารางที่ 10) ข้อมูลไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเดือนและไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ปกติกับกลุ่มที่ป่วย (ภาพที่ 22)

ตารางที่ 10: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	18	1.33 ± 0.93
	ป่วย	16	1.37 ± 1.17
พฤศจิกายน	ปกติ	10	1.26 ± 0.56
	ป่วย	15	0.85 ± 0.76
รวมเดือน	ป่วย	28	1.31 ± 0.81
	ปกติ	31	1.12 ± 1.01



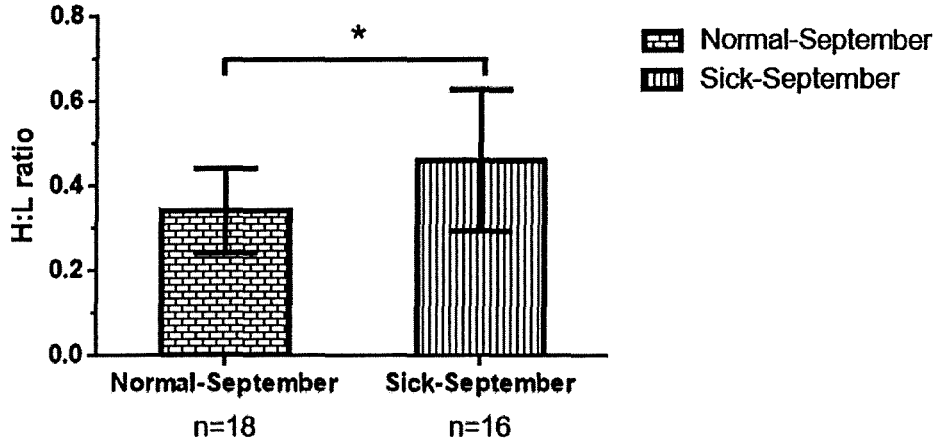
ภาพที่ 22: สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Mann-Whitney U_0 test)

6.2.2.5 <u>อัตราส่วนเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์</u> (H:L ratio, ตารางที่ 11)

จากข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าค่า H:L ratio มีความเกี่ยวข้องกับความเครียด หรือระดับฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก โดยสัตว์ที่มีความเครียดจะมีค่า H:L ratio สูงขึ้น (Davis et al., 2008) ดังนั้นการศึกษานี้จึงพิจารณาค่า H:L ratio ด้วย และจากผลการศึกษาพบว่าค่า H:L ratio มีความแตกต่างระหว่างเดือน และทั้งสองเดือนพบว่าเต่ากลุ่มที่ปกติมีค่า H:L ratio ต่ำกว่าเต่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$, ภาพที่ 23 และ 24) ทั้งในเดือนกันยายน (0.34 ± 0.10 และ 0.46 ± 0.17) และเดือนพฤศจิกายน (0.21 ± 0.08 และ 0.37 ± 0.20) จึงอาจใช้ค่า H:L ratio ในการประเมินสุขภาวะ และเฝ้าระวังโรคในเต่ากระได้เช่นกัน

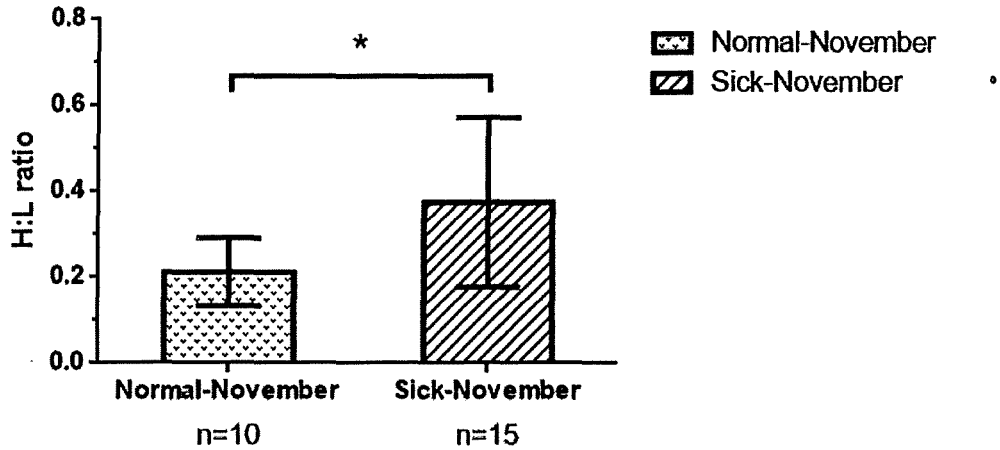
ตารางที่ 11: ค่า H:L ratio ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	18	0.34 ± 0.10
	ป่วย	16	0.46 ± 0.17
พฤศจิกายน	ปกติ	10	0.21 ± 0.08
	ป่วย	15	0.37 ± 0.20



ภาพที่ 23: ค่า H:L ratio ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)

หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$



ภาพที่ 24: ค่า H:L ratio ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)

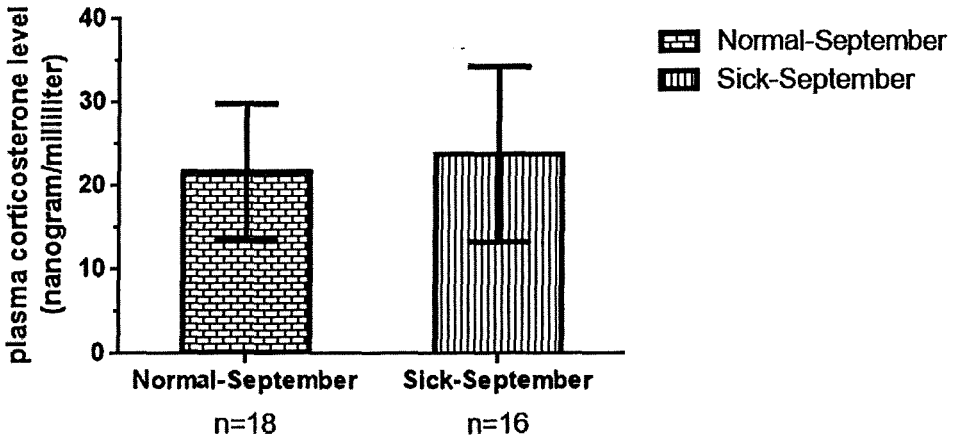
หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

6.2.3 ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระ (ตารางที่ 12)

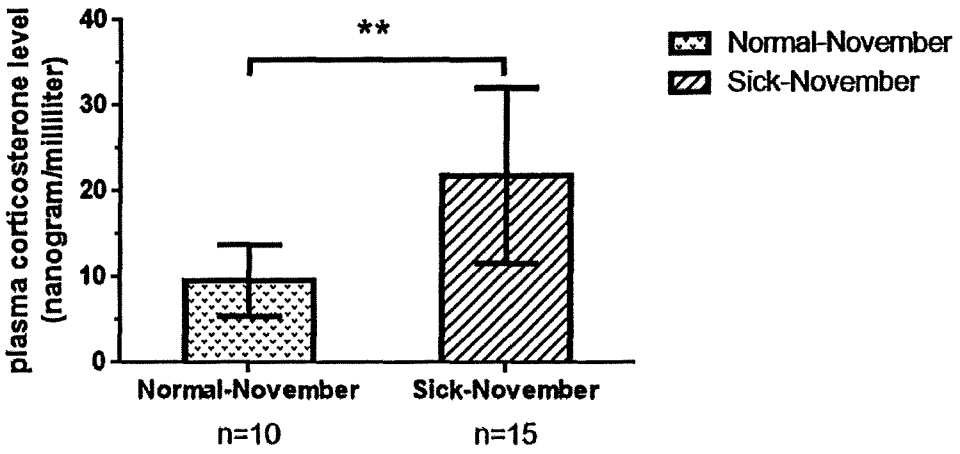
จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนมีความแตกต่างกันระหว่างเดือน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 3-43 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ในเดือนกันยายนไม่พบความแตกต่างระหว่างเต่ากลุ่มที่ปกติและกลุ่มที่ป่วย (21.71 ± 8.20 และ 23.82 ± 10.50; ภาพที่ 25) และในเดือนพฤศจิกายน พบว่าเต่ากลุ่มที่ปกติมีระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนต่ำกว่ากลุ่มที่ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ (9.64 ± 4.18 และ 21.87 ± 10.23; $p<0.01$, ภาพที่ 26) ซึ่งแตกต่างจากระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในการศึกษาของ Jessop et al. ในปี 2003 ที่ตรวจสอบด้วย radioimmunoassay ซึ่งพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0-14 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Jessop et al., 2003) อาจเกิดจากเต่าที่ศึกษามีอายุแตกต่างกัน และมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันด้วย

ตารางที่ 12: ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

เดือน	กลุ่ม	N	Mean ± SD
กันยายน	ปกติ	18	21.71 ± 8.20
	ป่วย	16	23.82 ± 10.50
พฤศจิกายน	ปกติ	10	9.64 ± 4.18
	ป่วย	15	21.87 ± 10.23



ภาพที่ 25: ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 (ทดสอบด้วย Student's t-test)



ภาพที่ 26: ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 (Student's t-test)

หมายเหตุ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.01$

6.2.4 สหสัมพันธ์ระหว่างความเครียดและค่าทางโลหิตวิทยา (ตารางที่ 13)

เมื่อตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและค่าทางโลหิตวิทยาที่ได้จากการศึกษา ไม่พบสหสัมพันธ์ระหว่างค่าดังกล่าว จึงอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาค่าอื่น ๆ มาใช้ในการประเมินความเครียดของเต่ากระ แทนค่าทางโลหิตวิทยาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 13: สหสัมพันธ์ระหว่างระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในเดือนกันยายน และ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559

parameter	Hematocrit	Erythrocyte count	Leukocyte count	%Lymphocyte	%Monocyte	%Heterophil	%Eosinophil	H:L ratio	Corticosterone level
Hematocrit	-	r=0.783 p=0.000	r=0.246 p=0.324	r=-0.223 p=0.101	r=0.106 p=0.441	r=0.211 p=0.121	r=-0.060 p=0.664	r=0.213 p=0.119	r=0.033 p=0.811
Erythrocyte count		-	r=0.358 p=0.122	r=-0.291 p=0.214	r=0.202 p=0.394	r=0.441 p=0.051	r=-0.143 p=0.548	r=0.368 p=0.110	r=-0.186 p=0.432
Leukocyte count			-	r=-0.527 p=0.017	r=0.407 p=0.075	r=0.514 p=0.020	r=0.057 p=0.811	r=0.518 p=0.019	r=0.008 p=0.973
%Lymphocyte				-	r=-0.236 p=0.072	r=-0.907 p=0.000	r=-0.100 p=0.452	r=-0.928 p=0.000	r=-0.253 p=0.053
%Monocyte					-	r=-0.137 p=0.302	r=-0.209 p=0.112	r=-0.053 p=0.688	r=0.062 p=0.639
%Heterophil						-	r=0.068 p=0.607	r=0.987 p=0.000	r=0.235 p=0.073
%Eosinophil							-	r=0.049 p=0.714	r=0.010 p=0.940
H:L ratio								-	r=0.222 p=0.091

อาการผิดปกติที่พบในเต่าที่ป่วยในการศึกษานี้ มีสาเหตุแตกต่างกันไป เช่น แผลอักเสบบนผิวหนัง หางขาด และแผลลึกที่ตา มีความเกี่ยวข้องกับการกัดกัน และติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด แผลหลุมที่กระดอง ก็อาจมีการติดเชื้อแบคทีเรีย และภาวะทวารร่วมอักเสบ อาจเกี่ยวข้องกับการพบปรสิต เป็นต้น ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยจำแนกเต่าที่ป่วยตามลักษณะอาการเพื่อหาค่าทางโลหิตวิทยาในการประเมินสุขภาวะ และความเครียดของเต่าที่จำเพาะกับโรคแต่ละชนิด

6.3 สถานภาพประชากรเต่ากระบริเวณเกาะทะลุ

6.3.1 ประชากรเต่ากระเพศเมียที่อาศัยบริเวณเกาะทะลุ

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

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

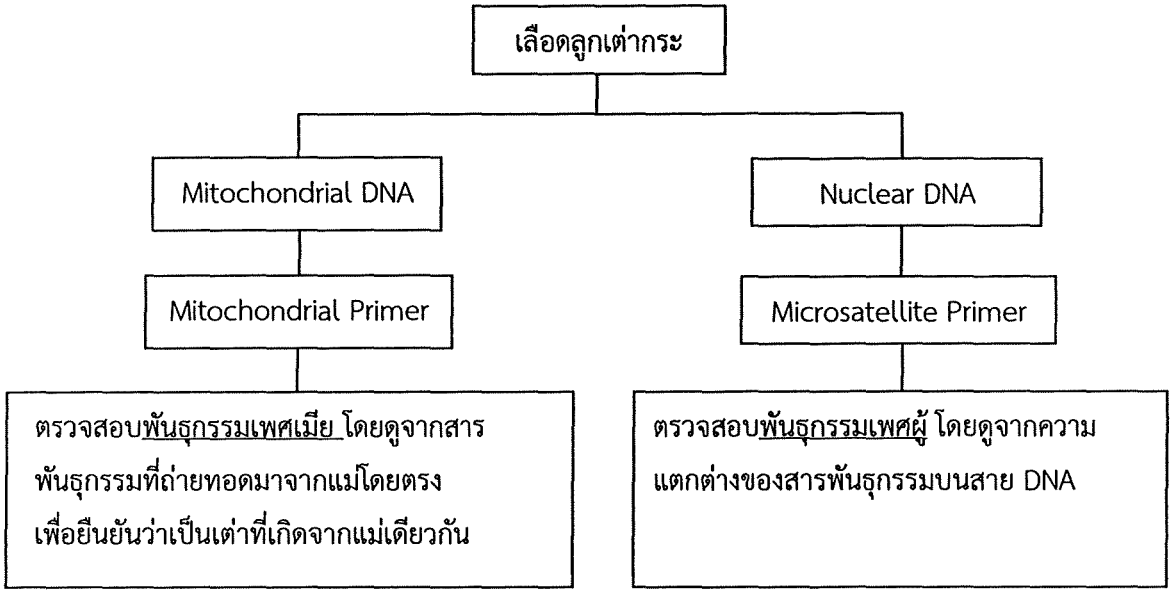
6.3.2 ประชากรเต่ากระเพศผู้ที่อาศัยบริเวณเกาะทะลุ

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

6.3.3 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

6.3.3.1 วิธีการสกัด DNA

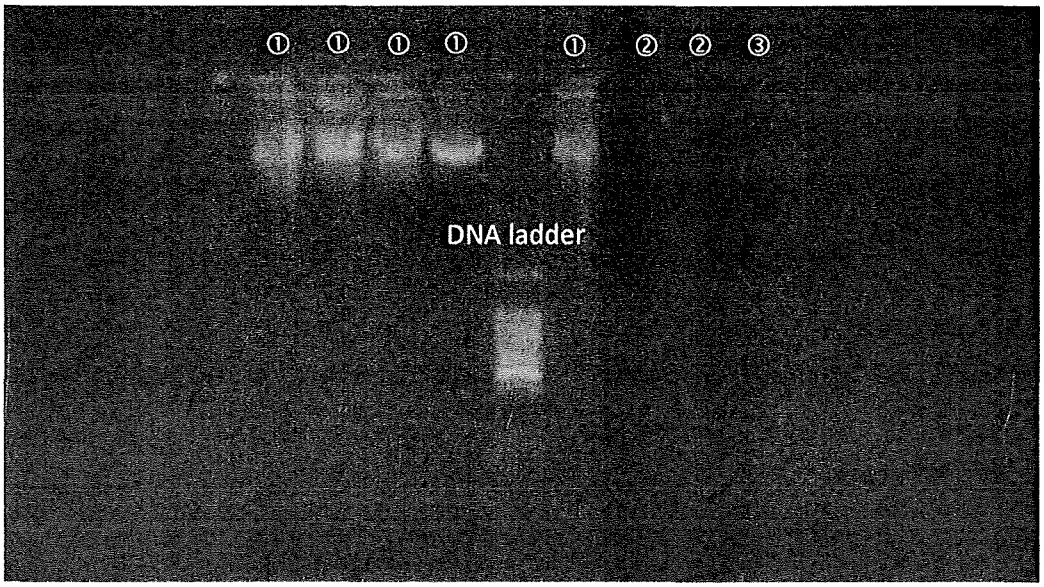
เพื่อหาวิธีสกัด DNA ให้ได้คุณภาพจากตัวอย่างออกมาดีที่สุด จึงทำการทดสอบวิธีการสกัด DNA ทั้งหมด 3 วิธีด้วยกัน (ArchivePure DNA Tissue Kit; 5PRIME,.2007) ได้แก่

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 27)



ภาพที่ 27: 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)

6.3.3.2 <u>การศึกษา mitochondrial DNA</u>

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 14 .

ตารางที่ 14: ลำดับเบสและขนาดของ mitochondrial primer ที่ใช้ในการศึกษาเต่ากระที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

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 และวางแผนที่จะส่งตัวอย่างไปหาลำดับเบสเพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ mitochondrial DNA ของเต่ากระกลุ่มตัวอย่างเหล่านี้ต่อไป

6.3.3.3 <u>การศึกษา nuclear DNA</u>

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 15

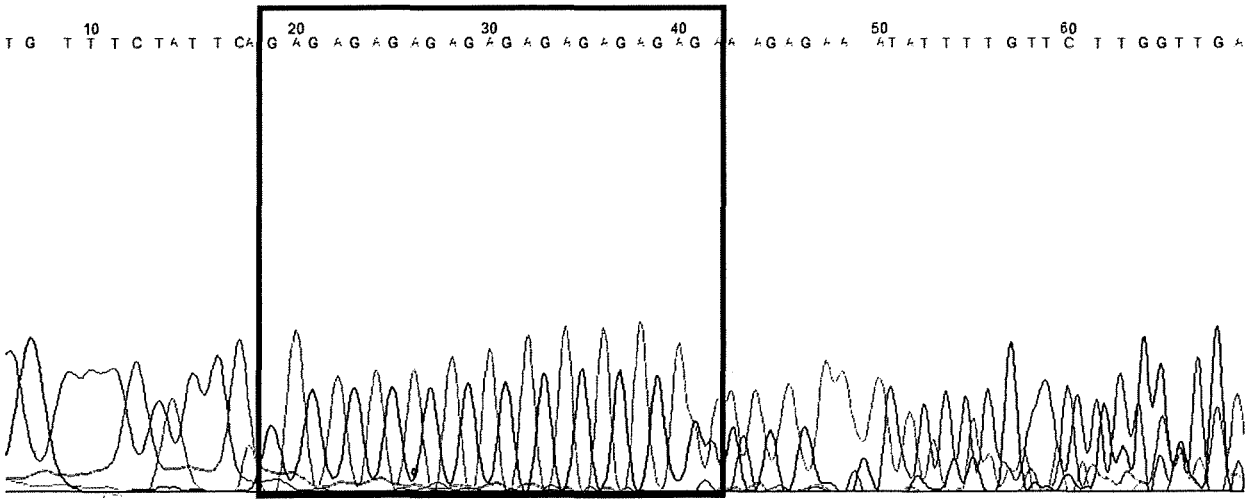
ตารางที่ 15: ลำดับเบส ลักษณะเด่นของเบสที่ซ้ำกันและขนาดของ microsatellite primer จำนวน 10 คู่ ที่ใช้ในการศึกษาเต่ากระ ที่เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

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
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 28) Eim17 Eim31 และ Eim41 และมี primer 1 ชนิด คือ Eim9 ที่ไม่สามารถแสดงสารพันธุกรรมออกมาได้ ทำให้ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ผลต่อไปได้ นอกจากนี้ primer อีก 2 ชนิด คือ Cm58 และ Cm72 ตรวจพบจำนวนเบสที่ซ้ำกันไม่ตรงกับข้อมูลของ reference และกำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาเพิ่มเติม (ตารางที่ 16)

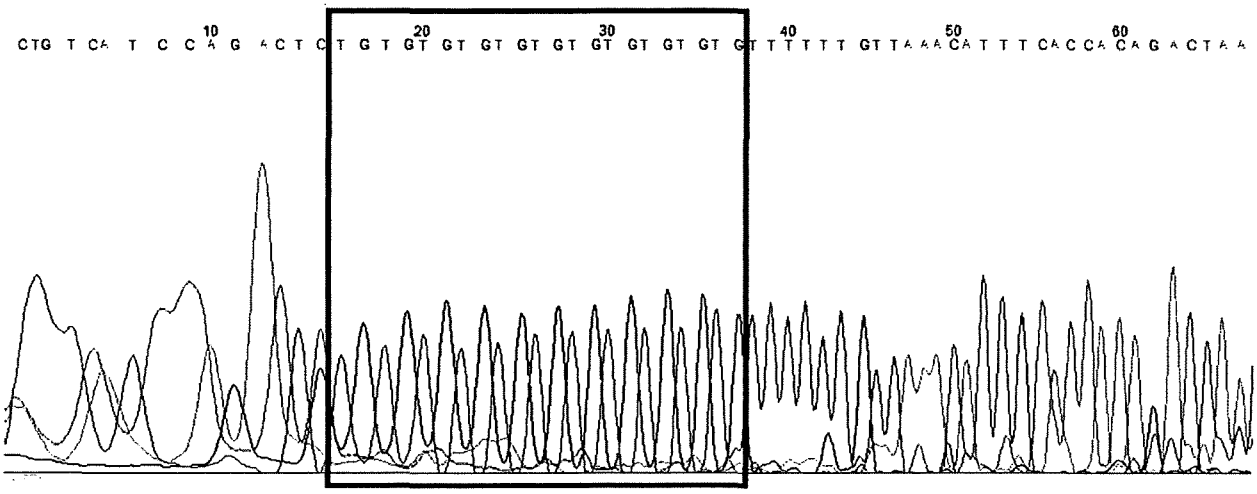
ตารางที่ 16: ผลการวิเคราะห์ microsatellite primer กับตัวอย่างเนื้อเยื่อจากซากเต่ากระที่ได้จากฐานทัพเรือสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

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 28: ตัวอย่างลักษณะเบสที่ซ้ำกันที่ปรากฏบนสาย DNA ของเนื้อเยื่อซากเต่ากระที่ได้รับจากฐานทัพเรือสัตหีบ จังหวัดชลบุรี 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 29) สามารถนำมาใช้หาสารพันธุกรรมเต่าเพศผู้ได้ แต่ Eim9 และ Eim17 ยังไม่สามารถแสดงสารพันธุกรรมที่จะนำมาวิเคราะห์ผลต่อได้



ภาพที่ 29: ลักษณะเบสที่ซ้ำกันที่ปรากฏบนสาย DNA ของตัวอย่างเลือดเต่ากระ จากเกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย microsatellite primer ชนิด Eim41

7. สรุปผลการศึกษา

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

เมื่อสำรวจภาคสนาม พบว่าสามารถระบุพิกัดตำแหน่งที่เต่ากระขึ้นวางไข่ได้ 23 หลุม โดยตำแหน่งหลุมอยู่ห่างจากระดับน้ำทะเลขึ้นสูงสุด 2.75-21.57 เมตร และมีความสูงกับความชันเทียบกับตำแหน่งน้ำทะเลขึ้นสูงสุดเป็น 0.33-3.46 เมตร และ 5.106-18.637 องศา ตามลำดับ ลักษณะทางกายภาพของหลุม เป็นหาดทรายที่มีอนุภาคทรายขนาดใหญ่กว่า 0.3 มิลลิเมตร เป็นส่วนใหญ่ และมีค่า pH กับความเค็มของทรายในช่วง 6-7 และ 2-6 ppt ตามลำดับ เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของหาดทรายเป็นเวลา 60 วันในช่วงฤดูการวางไข่ พบว่าตำแหน่งที่เต่าเลือกวางไข่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงแคบเพียง 1-1.8 °C โดยในหลุมตัวแทน 5 หลุม มีค่าอุณหภูมิต่ำสุด-สูงสุดเป็น 26.4-29.4 °C ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเอ็มบริโอเต่าทะเล เมื่อนำข้อมูลทางกายภาพของบริเวณที่เต่าเลือกทำรังวางไข่เปรียบเทียบกับบริเวณที่เต่าไม่เลือกทำรังวางไข่ที่อยู่ห่าง 3 เมตร จากปากหลุม ไปทางด้านบน-ล่าง-ซ้าย-ขวา พบแนวโน้มความแตกต่างของขนาดอนุภาคทรายโดยตำแหน่งที่เต่าไม่เลือกทำรังวางไข่มีอนุภาคทรายขนาดเล็ก (< 0.090 มิลลิเมตร) ในสัดส่วนมากกว่า นอกจากนี้ ยังพบว่าตำแหน่งที่แม่เต่าเลือกทำรังวางไข่ มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในหลุมแตกต่างจากบริเวณที่แม่เต่าไม่เลือกวางไข่อย่างมีนัยสำคัญ

ข้อมูลจากการศึกษานี้อาจนำไปใช้เป็นแนวทางในการรักษาสภาพแวดล้อมของหาดทรายให้เหมาะสมต่อการวางไข่ของเต่ากระในอนาคต

การตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างความเครียดและค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินความเครียดและสุขภาวะของเต่ากระ โดยเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระกลุ่มที่สุขภาพปกติ (28 ตัว) และ กลุ่มที่ป่วย (31 ตัว) ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ ในเดือนกันยายน และพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 นำมาตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยาและวัดปริมาณคอร์ติโคสเตอโรนในพลาสมาด้วยเทคนิค ELISA พบว่าเต่ากระกลุ่มปกติ และ กลุ่มที่ป่วย มีค่าทางโลหิตวิทยาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ ร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (70.85 และ 63.95 ในเดือนกันยายน กับ 77.89 และ 69.40 ในเดือนพฤศจิกายน) ร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (4.14 และ 5.78) ร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิล (23.91 และ 28.54 ในเดือนกันยายน กับ 16.28 และ 24.35 ในเดือนพฤศจิกายน) และอัตราส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (0.34 และ 0.46 ในเดือนกันยายน กับ 0.21 และ 0.37 ในเดือนพฤศจิกายน) และพบความแตกต่างของระดับคอร์ติโคสเตอโรน (9.64 และ 21.87 ng/mL) โดยเต่าทั้งหมดมีฮอร์โมนในช่วง 3.51-42.72 ng/mL ทั้งนี้ไม่พบสหสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างระดับคอร์ติโคสเตอโรนกับค่าทางโลหิตวิทยา ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินความเครียดและสุขภาวะของเต่ากระต่อไปในอนาคต

จากข้อมูลการทำรังวางไข่ของเต่ากระที่เกาะทะลุ ในปี พ.ศ. 2555 และ 2558 พบว่ามีเต่ากระเพศเมียอย่างน้อย 6 ตัว ที่ใช้เกาะทะลุเป็นพื้นที่ทำรังวางไข่ แต่ไม่สามารถระบุถึงจำนวนเต่ากระเพศผู้ได้ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (mitochondrial DNA) เพื่อตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศเมียที่ขึ้นวางไข่ ควบคู่ไปกับการศึกษาภาวะ multiple paternity ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (microsatellite DNA) เพื่อตรวจสอบว่ามีเต่าเพศผู้อย่างน้อยกี่ตัวที่ผสมพันธุ์กับเต่าเพศเมียที่วางไข่รังนี้ โดยใช้เลือดจากตัวอย่างเต่ากระอายุ 1-2 ปี ที่ใช้ศึกษาสุขภาวะและการเจริญเติบโต ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สามารถใช้บริเวณ control region ของ mitochondrial DNA เพื่อระบุอัตลักษณ์ของแม่เต่าได้ ส่วนการตรวจสอบจำนวนเต่ากระเพศผู้ พบว่ามี microsatellite primer อย่างน้อย 3 คู่ ที่มีศักยภาพในการใช้ตรวจสอบอัตลักษณ์ของพ่อเต่าได้

8. 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.

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

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.

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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

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

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