บทที่ 1

บทนำ

เต่าตนุ (green turtle) เป็นเต่าทะเลชนิดหนึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Chelonia mydas* จัดเป็นสัตว์เลื้อยคลาน (reptilian) เช่นเดียวกับงู กิ้งก่าและจระเข้ เนื่องจากเป็นสัตว์เลือดเย็นที่มีกระดูกสันหลัง รอบลำตัวมีเกล็ดแข็งหุ้มอยู่ หายใจด้วยปอด มีหัวใจ 3 ห้อง วางไข่บนบก เปลือกไข่ของสัตว์พวกนี้ส่วนใหญ่นิ่มคล้ายหนังและมีสีขาว รายงานเกี่ยวกับซากดึกดำบรรพ์ระบุว่าต้นตระกูลของเต่าทะเลมีอายุอยู่ในช่วงปลายของยุค Jurassic หรือ ประมาณ 208 - 144 ล้านปีที่ผ่านมา (Internet information of Sea World, Inc., 1994) ในปัจจุบันพบเต่าทะเลทั่วโลกเพียง 2 แฟมมิลี (family) 5 จีนัส (genus) 8 สปีชีส์ (species) โดยพบกระจายอยู่ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น สำหรับในประเทศไทยมีเต่าทะเลทั้ง 2 แฟมมิลี คือ แฟมมิลี Cheloniidae หรือพวกที่กระดองเป็นเกล็ดแข็ง (hard-shell turtle) พบ 3 สปีชีส์ ได้แก่ เต่าตนุ *Chelonia mydas* เต่ากระ *Eretmochelys imbricata* และเต่าหญ้า *Lepidochelys olivacea* สำหรับแฟมมิลี Dermochelyidae หรือพวกกระดองหนัง (skin, rubbery) พบ 1 สปีชีส์ คือ เต่ามะเฟือง *Dermochelys coriacea* (บุญเลิศ ผาสุก, 2535) โดยเต่าตนุและเต่ากระมีการกระจายทั้งฝั่งทะเลด้านอ่าวไทยและอันดามัน ส่วนเต่าหญ้าและเต่ามะเฟืองพบเฉพาะฝั่งทะเลอันดามัน ปัจจุบันเต่าทะเลเหล่านี้มีจำนวนลดลงมากเนื่องจากสาเหตุสำคัญๆ คือ สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยงแปลงไปไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเต่าทะเลและความต้องการใช้ประโยชน์จากเต่าทะเลของมนุษย์ เช่น การนำเนื้อและไข่โดยเฉพาะจากเต่าตนุซึ่งมีรสชาดเป็นที่นิยมและมีคุณค่าทางโภชนาการสูงมารับประทาน (ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2) การนำ

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของเนื้อเต่าทะเลเปรียบเทียบกับเนื้อสัตว์อื่นๆ

ชนิดของเนื้อ	โปรตีน (%)	ไขมัน(%)	พลังงาน (แคลอรี/100กรัม)
เนื้อเต่าทะเล[1]	23.00	0.20	102
ปลารัง[2]	21.94	4.17	ไม่มีข้อมูล
เนื้อไก่[1]	21.00	2.00	109
ปลาทู[2]	20.63	4.28	ไม่มีข้อมูล
เนื้อวัวสันนอก[1]	19.00	19.00	247
กุ้งแชบ๊วย กุ้งขาว[2]	18.86	0.94	ไม่มีข้อมูล
ปูทะเล[2]	17.45	0.58	ไม่มีข้อมูล
หมึกกล้วย[2]	15.55	0.22	ไม่มีข้อมูล
หอยแมลงภู่[2]	10.76	1.07	ไม่มีข้อมูล

1-ข้อมูลจาก Mariculture 2 - ข้อมูลจากมัทนา แสงจินดาวงษ์, 2523 อ้างถึงในบุญเลิศ ผาสุก, 2524

ตารางที่ 2 คุณค่าทางโภชนาการของไข่เต่าทะเลเปรียบเทียบกับไข่เป็ดและไข่ไก่ต่อฟอง

ชนิดของไข่	โปรตีน (%)	วิตามิน B1 (µg)	วิตามิน B2 (µg)	ฟอสฟอรัส (mg)	เหล็ก (mg)	แคลเซียม (mg)	พลังงาน (cal.)
เต่าทะเล	92.80	453	442	227.85	1.95	93.58	121.36
เป็ด	87.37	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	214.46	0.91	156.12	189.76
ไก่	86.36	100	290	204.39	1.60	125.93	146.56

ข้อมูลจาก Penyapol , A., 1957 อ้างถึงในบุญเลิศ ผาสุก, 2524

น้ำมันจากเต่าทะเลมาทาเรือหรือผสมในเครื่องสำอางค์ และการนำกระดองมาทำเครื่องประดับ ประเทศไทยเคยส่งกระดองเต่าทะเลเป็นสินค้าออกมีปริมาณมากเป็นอันดับ 2 รองจากประเทศอินโดนีเซียโดยส่งออกเฉลี่ยปีละประมาณ 35,000 กิโลกรัมในระหว่างปี พ.ศ. 2516-2521 (บุญเลิศ ผาสุก, 2524) ซึ่งมูลค่าการส่งออกเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (ตารางที่ 3) จนกระทั่งปี พ.ศ.2531 กระแสแห่งการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าและพืชพันธุ์จากทั่วโลกรุนแรงขึ้นอีกทั้งผู้รักษากฎหมายเข้มงวดขึ้นจึงทำให้การทำประมงเต่าทะเลอยู่ในความควบคุมมากขึ้น

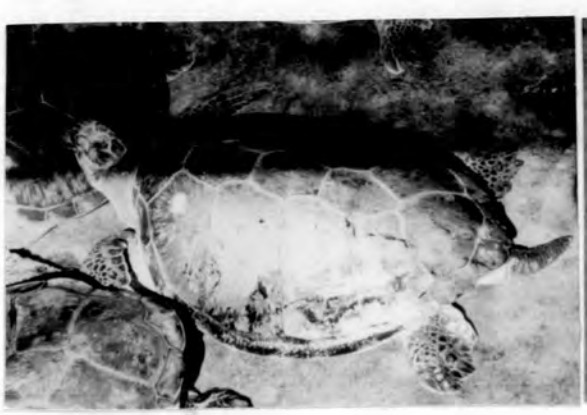
ในประเทศไทยกฎหมายและการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลมีมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2490 คือ พรบ. การประมงซึ่งระบุว่า ห้ามจับ ดัก ล่อ ทำอันตรายหรือฆ่าเต่าทะเลทุกชนิด ต่อมาในปี พ.ศ.2493 กองทัพเรือออกประกาศตาม พรบ.ว่าด้วยเขตปลอดภัยทางราชการและสงวนบริเวณสถานีทหารเรือสัตหีบไว้เป็นเขตปลอดภัยและดำเนินการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลและกระทะเล หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2522 สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถทรงจัดตั้งโครงการสมเด็จฯอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลขึ้นที่เกาะมันใน อ.แกลง จ.ระยอง และในปี พ.ศ.2528 กระทรวงพาณิชย์ออกประกาศแก้ไข พรบ. การประมงโดยห้ามมีกระดองและผลิตภัณฑ์จากเต่าทะเลไว้ในครอบครอง ในปัจจุบันมีงานอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลเกิดขึ้นหลายโครงการรวมถึงการส่งเสริมให้ภาคเอกชนสนใจทำฟาร์มเลี้ยงเต่าทะเลเพื่อการค้าและการอนุรักษ์ (บุญเลิศ ผาสุก, 2535) ซึ่งโครงการทำฟาร์มเลี้ยงเต่าทะเลเพื่อการค้าและการอนุรักษ์ยังอยู่ในขั้นเริ่มต้น เนื่องจากความรู้เกี่ยวกับการดำรงชีวิตอยู่ของเต่าทะเลมีน้อย วัตถุประสงค์ในช่วงแรกจึงเป็นการศึกษาชีววิทยาของเต่าทะเล จากรายงานการรอดชีวิตของลูกเต่าทะเลในรังที่ฟักตามธรรมชาติมีเพียง 0.1% และเต่าทะเลเพศเมียจะสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ก็ต่อเมื่อมีอายุ 15 ปีขึ้นไป (บุญเลิศ ผาสุก, 2524) ทำให้งานในโครงการอนุรักษ์พันธุ์เริ่มต้นที่การเพิ่มอัตราการรอดของลูกเต่าทะเลและการเพิ่มจำนวนพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ก่อน โดยการเก็บไข่เต่า

ตารางที่ 3 ปริมาณมูลค่าและประเทศที่ไทยส่งออกกระดองเต่าทะเลระหว่างปี พ.ศ.2516-2521

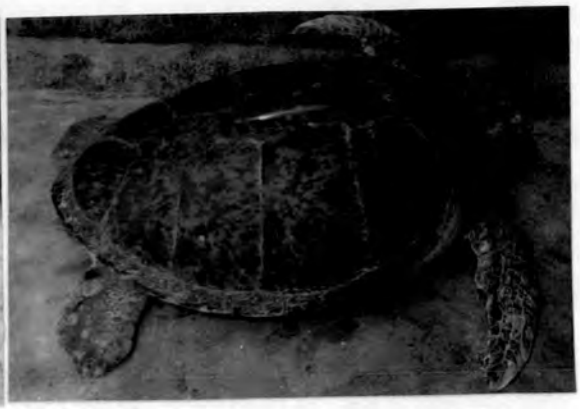
ปี	2516	2517	2518	2519	2520	2521	รวม		
ประเทศ	ปริมาณ (กก.)	ปริมาณ (กก.)	ปริมาณ (กก.)	ปริมาณ (กก.)	ปริมาณ (กก.)	ปริมาณ (กก.)	มูลค่า (บาท)	ปริมาณ (กก.)	%
ฮ่องกง	6,250	7,672	9,578	16,859	28,031	26,990	280,583	95,380	61.52
ไต้หวัน	8,050	6,750	1,000	7,000	4,910	20,500	217,485	48,210	31.09
สิงคโปร์	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	5,000	5,628	387,952	10,625	6.85
เกาหลีใต้	200	100	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	500	47,210	800	0.52
ญี่ปุ่น	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	33	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	33	0.02
รวม	14,500	14,522	10,611	23,859	37,941	53,618	933,230	155,051	100.00

ข้อมูลจากกรมศุลกากร อ้างถึงในบุญเลิศ ผาสุก, 2524

จากรังในธรรมชาติมาเพาะฟักและทำการอนุบาลลูกเต่าทะเลจนมีอายุประมาณ 4 - 6 เดือน ซึ่งลูกเต่าทะเลจะโตและแข็งแรงพอที่จะช่วยตัวเองได้จึงปล่อยลูกเต่าส่วนหนึ่งกลับสู่ทะเล อีกส่วนหนึ่งจะเลี้ยงไว้เพื่อเป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ต่อไป ในการอนุบาลลูกเต่าทะเลมักพบปัญหาหลายประการ ปัญหาที่พบมากคือลูกเต่ามักจะกัดกันเอง นอกจากนั้นยังพบโรคและอาการต่างๆ เช่น โรคกระดองและหนังเปื่อย ตัวซีด ติดเชื้อโรค ติดพยาธิ ตาบวม ท้องอืด ท้องแตก หรือไม่กินอาหาร ซึ่งปัญหาต่างๆ เหล่านี้มักจะแก้ไขโดยทำการรักษาตามอาการทันทีที่พบพร้อมทั้งแยกลูกเต่าทะเลเป็นโรคออกจากบ่อก่อนที่จะลุกลามติดต่อไปยังตัวอื่นซึ่งบางครั้งก็อาจสายเกินไป ดังนั้นจึงควรให้การดูแลเอาใจใส่ลูกเต่าอย่างทั่วถึงและไม่เลี้ยงลูกเต่าทะเลในบ่อเดียวกันให้มีจำนวนมากเกินไป งานที่ค่อนข้างประสบปัญหาอีกงานหนึ่งคือการคัดเพศลูกเต่าทะเลเพื่อเลี้ยงเป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ เนื่องจากเพศของเต่าทะเลจะสามารถระบุได้เมื่อมีอายุอย่างน้อย 6 ปี ขึ้นไป โดยจะสามารถสังเกตุได้จากลักษณะเฉพาะเพศขั้นที่ 2 (external secondary sexual characteristics) โดยหางของเต่าทะเลเพศผู้จะยาวและเรียวแหลมกว่าเต่าทะเลเพศเมีย (รูปที่ 1) ดังนั้นการสุ่มเก็บลูกเต่าทะเลเพื่อเลี้ยงเป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์จึงไม่ใช่หนทางที่ดีเพราะไม่อาจทราบได้ว่าลูกเต่าที่เก็บไว้เป็นเพศใดและอาจจะได้เต่าทะเลทั้งสองเพศไม่สมดุลย์กันหรือได้เพศใดเพียงเพศเดียว มีรายงานว่าอุณหภูมิในการบ่มไข่มีผลต่อการกำหนดเพศของสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิดรวมทั้งเต่าทะเลด้วย เช่น Morreale และคณะรายงานไว้เมื่อปี ค.ศ.1982 ว่าเมื่อใช้อุณหภูมิในการบ่มไข่ต่ำกว่า 28°C ลูกเต่าตนุที่ฟักได้จะเป็นเพศผู้กว่าร้อยละ 90 และเมื่อใช้อุณหภูมิในการบ่มไข่สูงกว่า 29.5 °C ลูกเต่าตนุที่ฟักได้จะเป็นเพศเมียกว่าร้อยละ 95 เปอร์เซนต์ ในปี ค.ศ.1990 Janzen ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราส่วนระหว่างเพศในเต่าหลายชนิดและรายงานว่าเต่าแต่ละชนิดมีระดับอุณหภูมิที่มีผลต่อการกำหนดเพศต่างกัน เช่น ในเต่า *Chrysemys picta* ซึ่งเป็นเต่าน้ำจืดชนิดหนึ่งเมื่อใช้อุณหภูมิในการบ่มไข่ต่ำกว่า



ก



ข

ค

ง

<u>รูปที่1</u> ลักษณะหางเต่าทะเล ก) เต่าตนุเพศผู้ ข) เต่าตนุเพศเมีย

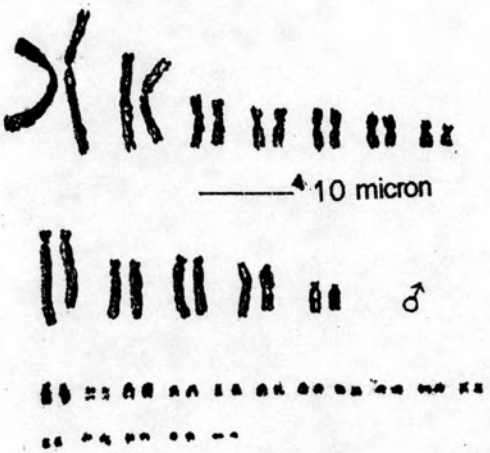
ค) เต่าหญ้าเพศผู้ ง) เต่าหญ้าเพศเมีย

26.5°C เพศของลูกเต่าที่ฟักได้จะเป็นเพศผู้และเมื่ออุณหภูมิในการบ่มไข่สูงกว่า 29°C เพศของลูกเต่าที่ฟักได้จะเป็นเพศเมียโดยอุณหภูมิในช่วง 26.5-29°C อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียของลูกเต่าที่ฟักได้จะมีค่าแตกต่างกันไป (ภาคผนวกที่ 1) ขณะที่ในเต่า *Caretta caretta* ซึ่งเป็นเต่าทะเลชนิดหนึ่งเมื่อใช้อุณหภูมิในการบ่มไข่ต่ำกว่า 26°C เพศของลูกเต่าที่ฟักได้จะเป็นเพศผู้และเมื่ออุณหภูมิในการบ่มไข่สูงกว่า 30.5°C เพศของลูกเต่าที่ฟักได้จะเป็นเพศเมีย โดยมีอุณหภูมิในช่วง 26-30.5°C เป็นอุณหภูมิช่วงที่มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียของลูกเต่าที่ฟักได้มีค่าแตกต่างกัน (ภาคผนวกที่ 2) ซึ่งอัตราส่วนระหว่างเพศผู้ต่อเพศเมียนี้ไม่ได้สูงขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นเสมอไปและในแต่ละระดับอุณหภูมิอาจจะมีค่าอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียได้หลายค่า ซึ่งเป็นผลจากปัจจัยอื่นๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในปี ค.ศ. 1992 Etcherberg และคณะได้ทำการทดลองบ่มไข่เต่า *Trachemys scripta* ที่อุณหภูมิ 29°C พบว่าเมื่อความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอน-ไดออกไซด์สูงขึ้นแนวโน้มของลูกเต่าที่ฟักได้จะเป็นเพศเมียสูงขึ้นด้วย ด้วยเหตุนี้ทำให้อัตราส่วนระหว่างเพศผู้ต่อเพศเมียของลูกเต่าทะเลที่ฟักได้ในรังเดียวกันจะมีค่าสูงหรือต่ำได้ขึ้นกับอุณหภูมิและปัจจัยที่มีผลในขณะบ่มไข่นั้น นอกจากอุณหภูมิและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้วแล้วยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเพาะฟักไข่ของเต่าทะเลด้วย เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงเวลาการเพาะฟักจะมีผลต่ออัตราส่วนระหว่างเพศและระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะฟัก (Merchant - Larios and Villalpando, 1992) นอกจากนั้นความชื้นจะมีผลต่อขนาดของลูกเต่าที่ฟักได้ ปริมาณก๊าซออกซิเจนมีผลต่ออัตราการรอดชีวิต (Etcherberg,1992) เป็นต้น ด้วยเหตุนี้การทำรังฟักไข่เต่าทะเลบนหาดในเขตอนุรักษ์เพื่อกำหนดเพศโดยการควบคุมอุณหภูมิจึงทำได้ยากแม้ว่าการขุดหลุมวางไข่ที่มีความลึกต่างกันหรือสถานที่ทำรังที่ต่างกัน เช่น การทำรังฟักใต้ร่มไม้หรือกลางแดดจะสามารถทำให้อุณหภูมิในรังฟักแตกต่างกันได้นอกจากนั้นอุณหภูมิของอากาศและความชื้นของทรายใน

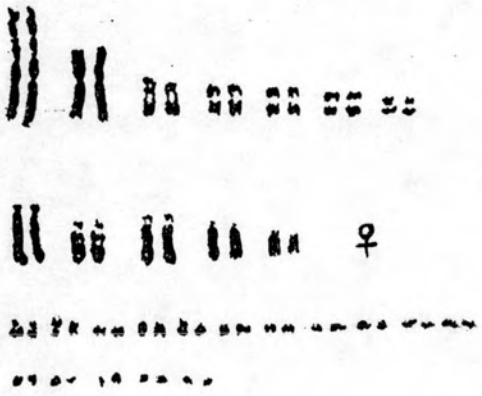
รังฟักในแต่ละช่วงเวลาของวันจะต่างกันออกไปทำให้การควบคุมอุณหภูมิในรังฟักที่หาดในธรรมชาติเป็นไปได้ยาก ดังนั้นการคาดเดาเพศของลูกเต่าที่ฟักได้จึงมีข้อผิดพลาดสูง

การที่สามารถตรวจเพศเต่าทะเลวัยอ่อน (juvennile sea turtle) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำตั้งแต่ระยะที่ลูกเต่ายังเล็ก (4-6 เดือน) ก่อนมีการปล่อยลงทะเลจะทำให้สามารถคัดเพศของลูกเต่าทะเลเพื่อเลี้ยงเป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ได้โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองงบประมาณในการเลี้ยงดูจนถึงอายุ 6 ปี นอกจากนั้นจะเอื้ออำนวยให้งานวิจัยอื่นๆ ทำได้สะดวกขึ้น เช่น การหาปัจจัยแรกที่มีผลต่อการพัฒนาโกแนด (gonad) ไปเป็นอัณฑะหรือรังไข่ การหาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการกำหนดเพศ การหาภาวะที่เหมาะสมในการฟักไข่เพื่อให้ได้ลูกเต่าทะเลเพศที่ต้องการ เป็นต้น การศึกษาเพื่อตรวจความแตกต่างระหว่างเพศของเต่าทะเลในระยะแรกใช้การผ่าเพื่อดูความแตกต่างของอวัยวะภายใน เช่น โกแนด การหาวิธีการตรวจเพศเช่นนี้จึงไม่เหมาะสมจะนำมาใช้ในงานด้านอนุรักษ์เพราะเต่าจะเสียชีวิตหลังได้รับการตรวจ การตรวจเพศของเต่าทะเลโดยที่ตัวเต่าทะเลยังมีชีวิตอยู่ได้มีผู้ทดลองทำอยู่หลายวิธี เช่น การย้อมโครโมโซม (karyotype) ของเต่าทะเลเพื่อดูความแตกต่างของรูปร่างลักษณะ (morphology) ของโครโมโซม โดยในปี ค.ศ.1952 Makino ได้ทดลองทำ karyotype ของเต่าตนุและรายงานว่าในเต่าตนุเพศผู้มีจำนวนโครโมโซม 56 แท่ง ส่วนในเต่าตนุเพศเมียมีจำนวนไมโครโซม 55 แท่ง แต่ต่อมา Bickham และคณะ (1980) ทดลองทำ banded karyotype ของเต่าตนุและไม่พบความแตกต่างกันทั้งด้านลักษณะและจำนวนของโครโมโซมระหว่างเต่าตนุเพศผู้และเพศเมียโดยในเต่าตนุทั้ง 2 เพศ จะพบจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 56 แท่ง เป็นแมกโคร-โครโมโซมจำนวน 12 คู่ และไมโครโครโมโซมจำนวน 16 คู่ (รูปที่ 2) ในปี ค.ศ.1978 Owen และคณะ (อ้างถึงใน Bjorndal, 1982) ได้ทำการตรวจเพศในเต่าทะเลวัยอ่อนโดยการสอดกล้องจุลทรรศน์ขนาดเล็ก (proctoscope) เข้าไปในช่อง cloaca เพื่อดูความแตกต่างกันของอวัยวะสืบพันธุ์

ก



ข

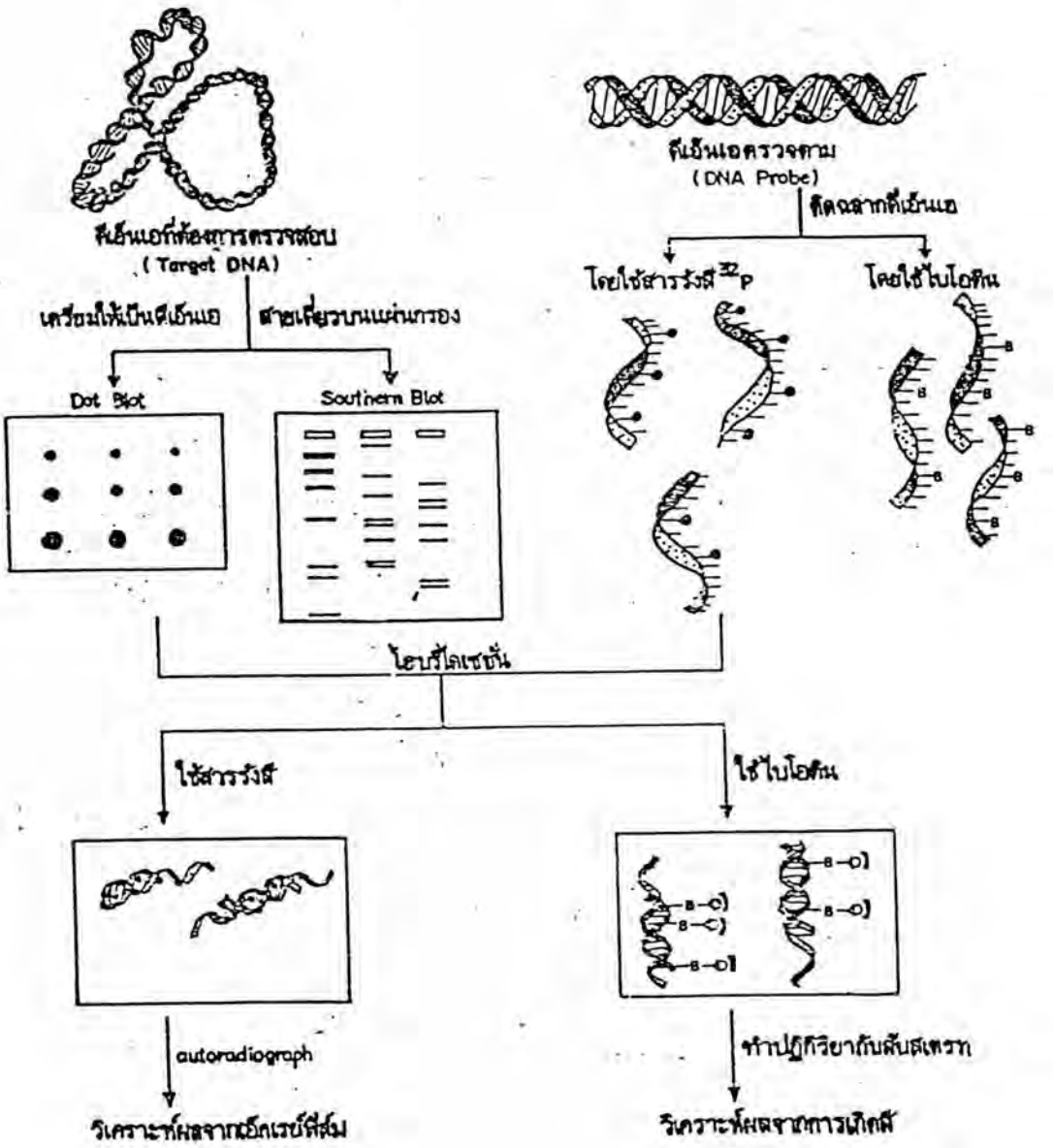


<u>รูปที่ 2</u> ลักษณะโครโมโซมของเต่าตนุ ก) karyotype ของเต่าตนุเพศผู้

ข) G-band karyotype ของเต่าตนุเพศเมีย

ของเต่าทะเลที่มีอายุประมาณ 4 ปี พบว่าวิธีนี้ได้ผลไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากอวัยวะสืบพันธุ์ในเต่าทะเลเพิ่งเริ่มพัฒนา ทำให้เห็นความแตกต่างในบางตัวได้ไม่ชัดเจน ในปีเดียวกันนี้ Owen ได้ทดลองตรวจเพศโดยวัดระดับ androgen ซึ่งเป็นสเตรอยด์ฮอร์โมนพบว่าในเต่าทะเลเพศผู้มีระดับ androgen ในเลือดสูงกว่าเต่าทะเลเพศเมียและการวัดระดับฮอร์โมน androgen นี้สามารถทำได้ ก่อนการแสดงออกของลักษณะเฉพาะเพศขั้นที่ 2 จะเกิดขึ้น วิธีนี้จึงใช้ได้ผลดีกับเต่าทะเลที่มีอายุ 4 ปีขึ้นไป ต่อมาในปี ค.ศ.1987 Pieau (อ้างถึงใน Janzen, 1991) ได้ทำการแยกเพศโดยการตรวจ H-Y antigen ในเต่า *Emys orbicularis* ซึ่งเป็นเต่าน้ำจืดชนิดหนึ่งพบว่าให้ผลบวกเฉพาะในโกแนดของเต่าเพศเมียเท่านั้นแต่วิธีนี้ใช้ไม่ได้ผลกับเต่าชนิดอื่น

สำหรับเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) นั้นมีผู้นำมาใช้ทดลองตรวจหาเพศของสิ่งมีชีวิตอยู่หลายชนิด เทคนิคที่นิยมใช้และให้ผลเป็นที่น่าพอใจได้แก่ เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) หลักการของเทคนิคนี้อาศัยการจับกันของเบสคู่สมระหว่างชิ้นดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และโครโมโซมัลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจโดยเบสที่เป็นคู่สมจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ขั้นตอนการทำเริ่มจากการนำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจมาทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพเป็นสายเดี่ยว (denature) แล้วย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปตรึงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสหรือไนลอนเมมเบรน จากนั้นจึงนำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่เสียสภาพเป็นสายเดี่ยวในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิที่เหมาะสม (รูปที่ 3) เทคนิคไฮบริไดเซชันนี้มีการดัดแปลงไปเป็นรูปแบบต่างๆ เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งาน เช่น in situ hybridization เซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชัน (Southern-blot hybridization) และ ดอทบลอทไฮบริไดเซชัน (dot-blot hybridization)

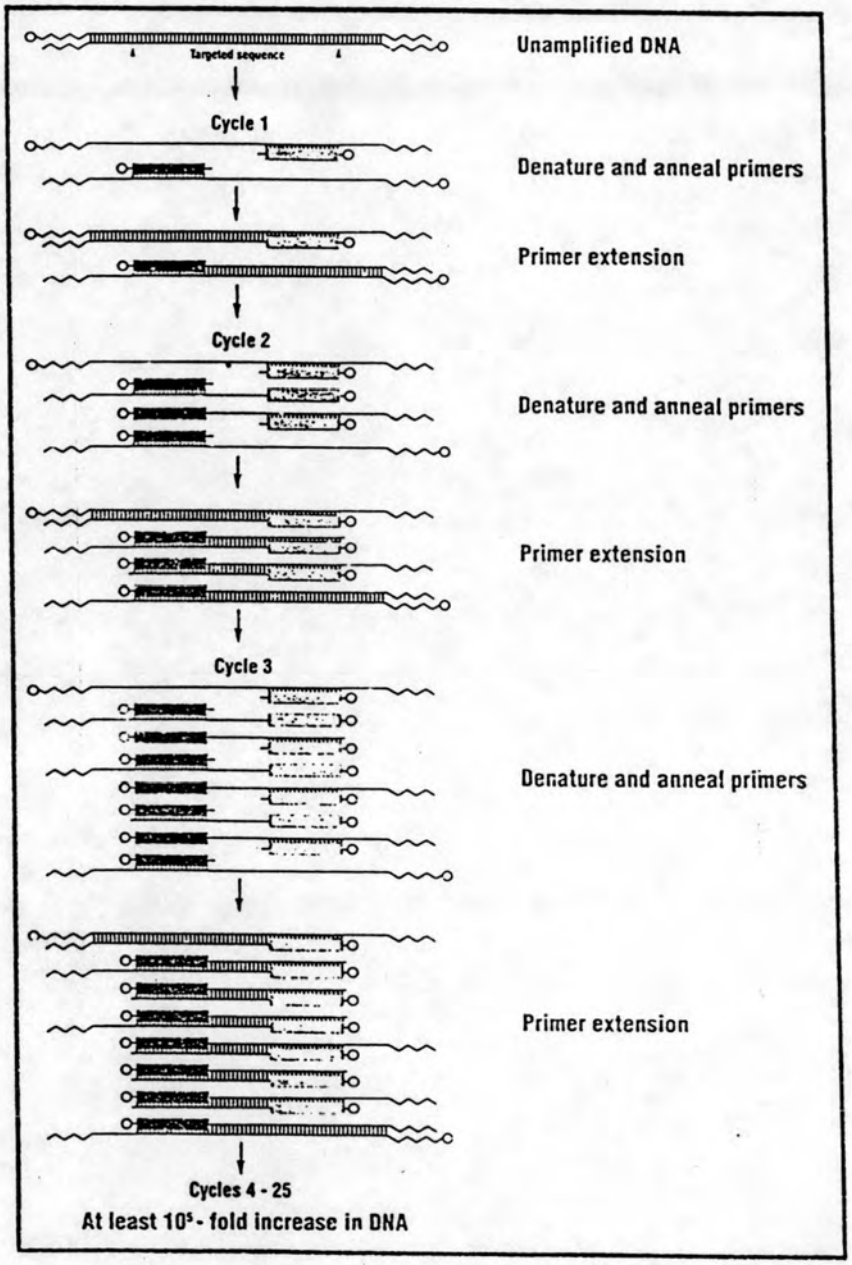


รูปที่ 3 เทคนิคไฮบริไดเซชัน

in situ hybridization ถูกนำมาใช้ตรวจหาเพศในสัตว์เลื้อยคลาน โดยในปี ค.ศ.1980 Singh ได้แยก Bkm sequence จากงู *Bungarus fasciatus* และ นำมาทำ in situ hybridization พบว่า Bkm sequence มีการกระจายอย่างหนาแน่นบน W โครโมโซมซึ่งเป็นโครโมโซมเพศในงูซึ่งมีระบบการระบุเพศเป็นแบบ female heterogametic คือในงูเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น WZ ส่วนในงูเพศผู้มีโครโมโซมเพศเป็น ZZ ระบบการระบุเพศแบบนี้พบในสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิดในขณะที่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีระบบการระบุเพศเป็นแบบ male heterogametic คือในเพศผู้มีโครโมโซมเพศเป็น XY และในเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น XX ต่อมาในปี ค.ศ.1984 Jones รายงานว่าพบ GATA และ GACA repeats เป็นลักษณะเฉพาะของ Bkm sequence และเป็น sex-specific sequence ที่แยกได้จากโครโมโซมเพศของงูหลายชนิด ซึ่งในปี ค.ศ. 1987 Nakamura ได้ทำการตรวจความแตกต่างระหว่างเพศของเต่า *Lepidochelys kempi* และจระเข้ *Alligator mississippiansis* โดยใช้ GATA และ GACA repeats เป็นดีเอ็นเอติดตามในเทคนิคเซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชัน ผลการทดลองปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศของเต่าและจระเข้ที่ทำการตรวจแต่อย่างใด อย่างไรก็ตาม Singh (1990) ได้รายงานว่า Bkm sequence เป็นลำดับเบสที่พบบน W และ Y โครโมโซมในสัตว์อื่นอีกหลายชนิด เช่น แมลงหวี่ หนู ไก่ และม้า เป็นต้น ในปี ค.ศ.1989 Nakamura ได้ทดลองใช้ดีเอ็นเอติดตามจากยีนของ phosphoglycerate kinase-1 และยีนของ hypoxanthine phosphoribosyl transferase ตรวจเพศของเต่า *L. kempi* และจระเข้ *A. mississippiansis* พบว่าดีเอ็นเอติดตามนี้มีความจำเพาะต่อเพศผู้ในสัตว์ทดลองทั้งสองชนิด สำหรับในเต่าตนุ Demas และคณะ (1990) ได้ทำเซาท์เทิร์นบรอทไฮบริไดเซชันโดยนำ Bkm sequence มาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเพศบนโครโมโซมของเต่าตนุและเต่า *L. kempi* ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) พบว่า Bkm sequence สามารถจับกับชิ้นดีเอ็นเอในเต่าต่างเพศได้ขนาดต่างกันโดยพบแถบไฮบริดดีเอ็นเอ

ขนาด 16.6 Kb เฉพาะในโครโมโซมของเต่า *L. kempi* เพศผู้ที่ถูกย่อยด้วย *Bst*N I และเมื่อย่อยโครโมโซมดีเอ็นเอของเต่าตนุด้วย *Sau*3A I แล้วนำมาทำเซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชันจะพบแถบไฮบริดดีเอ็นเอขนาด 6.3 Kb เฉพาะในเพศผู้และพบแถบไฮบริด ดีเอ็นเอขนาด 7.5 Kb เฉพาะในเพศเมียเท่านั้น สำหรับเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมเทคนิคอื่นๆ ที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจทางดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบัน คือ เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่บริเวณจำเพาะโดยใช้ไพรเมอร์ (DNA primer) จำเพาะ 2 สาย ทั้งนี้ต้องทราบลำดับเบสบริเวณปลาย 5' และ 3' ของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มจำนวนเพื่อใช้สังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ นอกจากนั้นต้องใช้ dNTP และเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะทำหน้าที่สร้างสายดีเอ็นเอ (extension) ต่อจากดีเอ็นเอไพรเมอร์เมื่อดีเอ็นเอตัวอย่างถูกทำให้แยกเป็นสายเดี่ยว (denature) โดยใช้ความร้อนแล้วจึงลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ชิ้นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทั้งสองเข้าไปเกาะ (annealing) จากนั้นจึงปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR จะถูกนำมาวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส หลังย้อมชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วจึงนำเจลมาตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) เพื่อหาความแตกต่างของจำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอ

จากการค้นพบ *Taq* DNA polymerase ที่สามารถทนความร้อนสูงได้จากแบคทีเรีย *Termus aquaticus* ที่อาศัยในน้ำพุร้อนทำให้สามารถสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายๆ รอบ โดยการตั้งเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติเพื่อให้ผ่านขั้นตอน denature, annealing และ extension ได้หลายๆ ครั้ง (รูปที่ 4) เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ใช้งานง่าย สะดวก ต้องการดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template) เพียงปริมาณน้อยและให้ผลรวดเร็ว ทำให้เทคนิคนี้ถูกดัดแปลงไปใช้ในรูปแบบ



<u>รูปที่ 4</u> หลักการของเทคนิค PCR

ต่างๆ เช่น PCR-based DNA fingerprinting, PCR-RAPD (PCR-Random Amplified Polymorphic DNA) และ PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) เทคนิค PCR-RAPD เป็นเทคนิค PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์แบบสุ่มสายสั้นๆ (10-20 เบส) เพียงชนิดเดียวและไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของปลายชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่ม เมื่อดีเอ็นเอไพรเมอร์นี้เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอตัวอย่างได้ในบริเวณ ทิศทางและระยะห่างระหว่างตำแหน่งที่ไพรเมอร์เส้นบนและเส้นล่างเข้าไปเกาะมีความเหมาะสม *Taq* DNA polymerase จะทำหน้าที่สร้างสายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอไพรเมอร์ชิ้นดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR จะถูกนำมาวิเคราะห์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เทคนิค PCR ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ เช่น การตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม โรคติดเชื้อจากเชื้อไวรัส ตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรมของทารกในครรภ์ รวมถึงการตรวจเพศของทารกในครรภ์ด้วย (วัชรี อัศฎทิพพหลคุณ และมนตรี อัศฎทิพพหลคุณ, 2536) สำหรับงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอบ่งชี้ (DNA marker) ที่ใช้ระบุเพศของเต่าตนุโดยจำลอง GATA repeats ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ Bkm sequence มาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามในเซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชัน รวมทั้งใช้ลำดับเบสนี้เป็นดีเอ็นเอไพรเมอร์สำหรับทำ PCR