การศึกษาโครโมโซมและลักษณะการแบ่งเซลล์ของตั๊กแตนหนวดสั้นไฮโรไกลฟัส (*Hieroglyphus banian*)

Chromosome study and Cell Division in Bluish-green Rice Grasshopper (*Hieroglyphus banian*)

สุมาลี พิมพันธุ์[1]* และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง[1]

Sumalee Phimphan[1]* and Surachest Aiumsumang[1]

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

[1]Biology Program, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University

*Coressponding author E-mail : joodoof@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนไฮโรไกลฟัส (*Hieroglyphus banian*) จากตัวอย่างในจังหวัดอุดรธานี เตรียมโครโมโซมด้วยวิธีทางตรงจากอัณฑะของตั๊กแตนเพศผู้ ย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดาด้วยสีจิมซ่าความเข้มข้น 20% (v/v) และย้อมด้วยซิวเวอร์ไนเตรตเพื่อศึกษาตำแหน่งนอร์ ตรวจสอบโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ผลการศึกษา พบว่าตั๊กแตนข้าวไฮโรไกลฟัสเพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แท่ง โครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 23 เป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยออโตโซม 22 แท่ง และโครโมโซมเอ็กซ์ 1 แท่ง โดยใช้ศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสเพื่อยืนยันจำนวนโครโมโซมและระบุโครโมโซมเพศ สูตรแคริโอไทป์ของตั๊กแตนข้าวไฮโรไกลฟัส คือ 2n(23) = 22t + โครโมโซมเพศ (X0)

คำสำคัญ : โครโมโซม *Hieroglyphus banian* ตั๊กแตนไฮโรไกลฟัส

Abstract

This research aims to study the chromosome and meiotic division of Bluish-green Rice Grasshopper (*Hieroglyphus banian*). The specimens were collected in Udon Thani province. Chromosomal preparation was performed directly from their testes. Conventional staining by Giemsa 20 % (v/v) and Ag-NOR staining were applied on the metaphase chromosomes. Chromosome counting was performed on metaphase cells under a light microscope. The result reveals that the male *H. banian* has diploid (2n) chromosome number of 23, with the fundamental number of 23. All of chromosomes have found to be telocentric chromosomes which including 22 autosome and one sex-chromosome. The meiotic study has confirmed and identified the diploid number and sex chromosome. The karyotype formula of this species could be deduced as 2n(23) = 22t + sex-chromosome (X0).

Keywords : Chromosome, *Hieroglyphus banian*, Bluish-green Rice Grasshopper

บทนำ

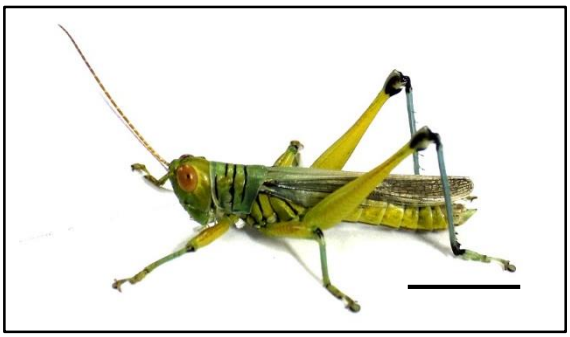
ตั๊กแตนถูกจัดอยู่ในอันดับ Orthoptera รายงานทั่วโลกพบ 22 วงศ์ [1,2] ในประเทศไทยมีรายงานพบ 10 วงศ์ วงศ์ที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดคือ วงศ์ตั๊กแตนหนวดสั้น (Acrididae) ซึ่งมีจำนวนสมาชิก 47 ชนิด [3] จากข้อมูลพบว่าการศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนในประเทศไทยยังมีรายงานน้อย ซึ่งมีรายงานการศึกษาโครโมโซมตั๊กแตนครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1952 โดย Sharman ในกลุ่มตั๊กแตนหัวตัด (Short-Horned Grasshopper) โครโมโซมในกลุ่มตั๊กแตนมีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซม (2n) เท่ากับ 23

ตั๊กแตนข้าวไฮโรไกลฟัส [*Hieroglyphus banian* (Fabricius, 1798)] มีลักษณะเด่นภายนอก คือ ตัวเต็มวัยมีสีเหลืองปนเขียวหรือสีน้ำตาลอ่อนปนเขียว ความยาวของลำตัว 30 - 50 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาล ส่วนหัวโต หน้าผากกว้าง ตรงข้อต่อมีสีเหลืองปนเขียว ตารูปไข่มีขีดยาวสีดำในดวงตา สีของนัยน์ตาสีน้ำตาลอ่อนหรือสีน้ำตาลแดง ส่วนอกเป็นทรงรูปกระบอกและมีรอยคาดขวางสีดำ 4 เส้น ปีกยาวคลุมปล้องท้องจนมิด ทิเบียของขาคู่หลังมีสีฟ้า [4] ลักษณะเฉพาะที่ใช้จำแนกตั๊กแตนชนิดข้าวไฮโรไกลฟัสคือ ส่วนปลายแพนหางมี 2 แฉก ลักษณะเรียวแหลม แฉกบนโค้งลง ส่วนแฉกล่างยาวและแหลม [5] ซึ่งในสกุล *Hieroglyphus* มีจำนวน 13 ชนิด ได้แก่ *H. acuticercus*, *H. africanus*, *H. akbari*, *H. annulicornis*, *H. banian*, *H. concolor*, *H. daganensis*, *H. indicus*, *H. kolhapurne-sis*, *H. nigrorepletus*, *H. oryzivorus*, *H. perpolita* และ *H. tonkinensis*

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้นใกล้เส้นศูนย์สูตรทำให้เกิดความหลากหลายของตั๊กแตนเป็นจำนวนมาก แต่การศึกษาโครโมโซมและแคริโอไทป์ของตั๊กแตนในประเทศไทยยังมีรายงานค่อนข้างน้อย มีรายงานการศึกษาตั๊กแตนในวงศ์ Acrididae พบว่าโครโมโซมของตั๊กแตนเพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 19 แท่ง และ 20 แท่งในเพศเมีย [6] บางชนิดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 21 แท่งในเพศผู้ และ 22 แท่งในเพศเมีย [7, 8] นอกจากนี้ยังมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แท่งในเพศผู้ และ 24 แท่งในเพศเมีย [9-11] สำหรับตั๊กแตนในสกุล *Hieroglyphus* เคยมีรายงานไว้ในชนิด *Hieroglyphus banian* มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แท่ง และมีระบบโครโมโซมเพศเป็น XX/X0 [9, 11-12] การทราบข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมของตั๊กแตนชนิดต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทยเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เนื่องจากข้อมูลการศึกษาทางพันธุกรรมยังไม่ครอบคลุมอีกหลายชนิด การทราบข้อมูลทางด้านโครโมโซมนับเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมที่สำคัญอีกประการที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านเซลล์อนุกรมวิธาน นอกจากนี้ผลของแคริโอไทป์ยังสามารถใช้ในการทำแผนที่ยีน ในการศึกษายีนดื้อยาของแมลงหรือยีนที่น่าสนใจต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

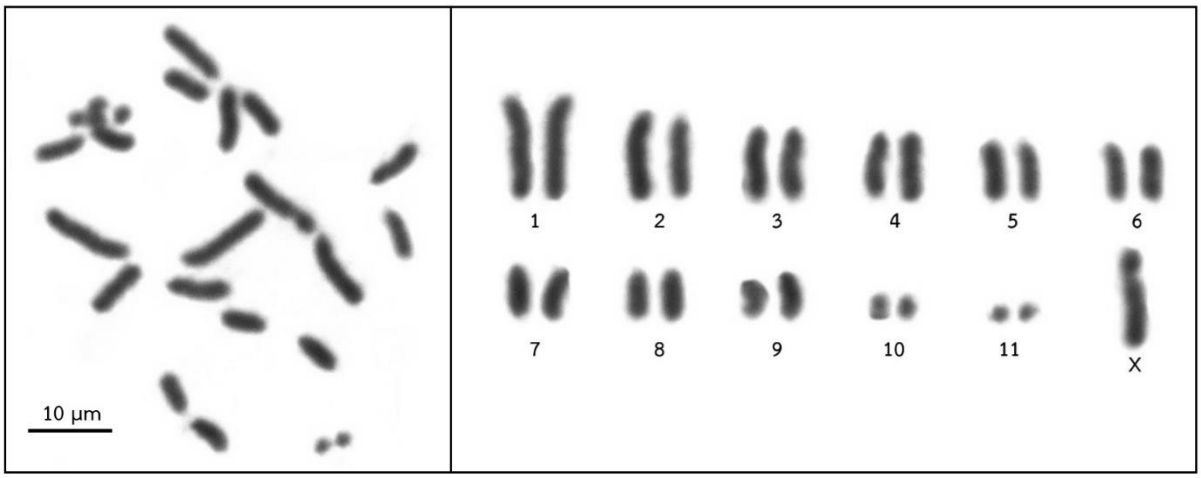
ตัวอย่างตั๊กแตนข้าวไฮโรไกลฟัสเพศผู้ 10 ตัว (ภาพที่ 1) โดยเทียบเคียงกับคำบรรยายลักษณะสัณฐานวิทยาจากเอกสารของพิสุทธิ์ เอกอำนวย [4] และรูปวิธานของสกุล *Hieroglyphus* ตามเอกสารของ Kumar and Usmani [5] ซึ่งใช้ลักษณะของสีลำตัว หนวด หัว อก โคนปีก ทิเบียของขาคู่หลัง แพนหาง และ Subgenital plate เพื่อจำแนก โดยเก็บรวบรวมจากพื้นที่จังหวัดอุดรธานี นำตั๊กแตนมาผ่านขั้นตอนการกระตุ้นด้วยสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (w/v) การเตรียมโครโมโซมตามวิธีการของ Phimphan และคณะ [13] โดยมีขั้นตอน คือ ฉีดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เข้าที่ช่องท้องของตั๊กแตนและบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นผ่าเอาอัณฑะออกมาและสับให้ละเอียดในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมล่าร์ และบ่มเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำยาคงสภาพ (Canoy’s fixative) จนครบปริมาตร 7 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิมและเทสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการเจือจางตะกอนเซลล์ในปริมาณที่เหมาะสม หยดสารละลายเซลล์แขวนลอยลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็น ปล่อยสไลด์ให้แห้งในอากาศ ย้อมสีโครโมโซมแบบคอนเว็นชันนอลด้วยสีกิมซ่าความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที และย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบซิลเวอร์ไนเตรต ดัดแปลงวิธีจาก Howell and Black [14] มีวิธีการ ดังนี้ อบสไลด์ที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน จากนั้นหยดเจลาตินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์จนท่วม ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างสไลด์โดยการจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นจนกระทั่งกระจกปิดสไลด์จะหลุดออก ผึ่งสไลด์ให้แห้ง แล้วตรวจสอบโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ถ่ายภาพเพื่อนำมาวิเคราะห์จากโครโมโซมระยะเมทาเฟส จำแนกชนิดโครโมโซมโดยอ้างอิงตามวิธีการของ Turpin and Lejeune [15]



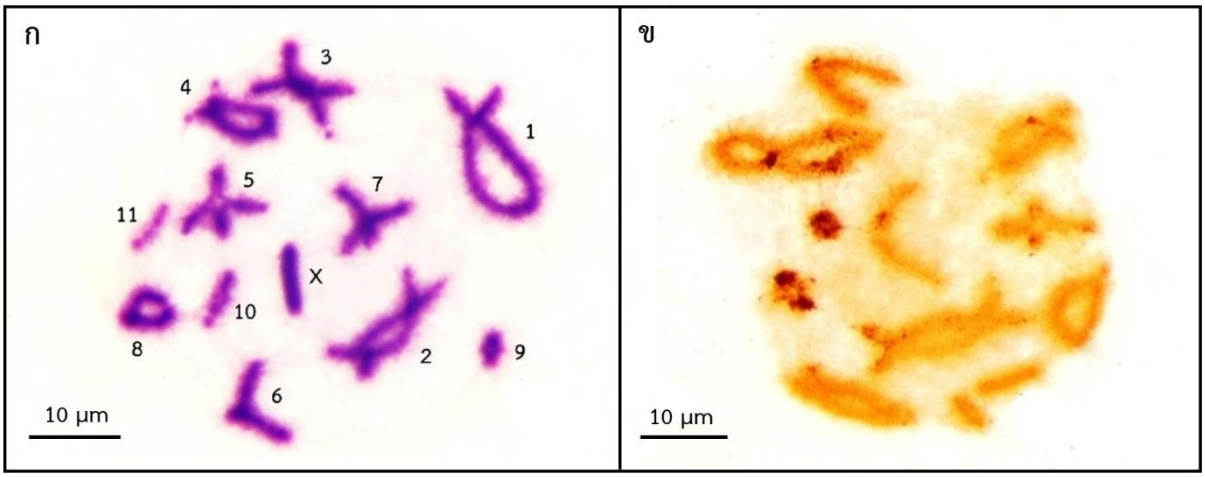
ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของตั๊กแตนไฮโรไกลฟัส (*H. banian*)

ผลการวิจัย

ตั๊กแตนข้าวไฮโรไกลฟัสเพศผู้มีชุดโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 23 แท่ง ประกอบด้วยออโตโซม 22 แท่ง และโครโมโซมเพศ 1 แท่ง เป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก (Telocentric) ทั้งหมด (ภาพที่ 2) จากการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสในระยะเมทาเฟส I ทำให้ทราบพฤติกรรมของโครโมโซม ซึ่งสามารถยืนยันจำนวนโครโมโซมและระบุโครโมโซมเพศได้ (ภาพที่ 3ก) และจากการย้อมสีแบบซิลเวอร์ไนเตรต การติดสีค่อนข้างจาง จึงไม่สามารถรายงานผลตำแหน่งนอร์ หรือตำแหน่งรอยคอดที่สองของโครโมโซมได้ (ภาพที่ 3ข)



ภาพที่ 2 เซลล์ระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของตั๊กแตนไฮโรไกลฟัส 2n=23



ภาพที่ 3 เซลล์ระยะเมทาเฟส I ของตั๊กแตนไฮโรไกลฟัส (ก) ย้อมสีแบบธรรมดา (ข) การย้อมสีแบบซิลเวอร์ไนเตรต

สรุปผลการวิจัยและวิจารณ์

โครโมโซมของตั๊กแตนข้าวไฮโรไกลฟัสมีลักษณะแบบโบราณ (Primitive) เนื่องจากมีโครโมโซมเป็นชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด ซึ่งเป็นลักษณะแคริโอไทป์แบบโบราณที่ถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษ โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Mesa and Fontanetti (1983) ที่พบว่าตั๊กแตนในวงศ์ Acrididae มีการอนุรักษ์รูปแบบของแคริโอไทป์แบบโบราณไว้สูง คือ จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 ในเพศผู้ และเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด [6] และสอดคล้องกับรายงานของ อรอนงค์ ยามเลย และ อิสสระ ปะทะวัง (2562) [12] จากผลการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสในครั้งนี้สามารถยืนยันจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์และระบุโครโมโซมเพศ โดยพบจำนวนการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟส I ทำให้เห็นลักษณะของการเข้าคู่กัน (Synapse) ของโครโมโซมคู่เหมือน (Homologous chromosome) อย่างชัดเจน 11 คู่ (23 แท่ง) ส่วนโครโมโซมเพศ 1 แท่ง จะไม่มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมคู่เหมือนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของพฤติกรรมของโครโมโซมที่พบในตั๊กแตนเพศผู้

โดยโครโมโซมเป็นหน่วยโครงสร้างที่สำคัญในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม เพื่อใช้อธิบายถึงรูปแบบการเจริญและพัฒนา รวมถึงวิวัฒนาการได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบสำหรับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน การบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรของตั๊กแตนแต่ละชนิด และตั๊กแตนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่แตกต่างกันได้ ข้อมูลที่ได้นี้จึงเป็นประโยชน์และเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาโครโมโซมตั๊กแตนชนิดอื่น ๆ ในประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] Rowell, H. and P. Flook. (2001). Caelifera. Shorthorned grasshoppers, locusts and Relatives. *Tree of Life Web Project.* Retrieved April 8, 2017.

[2] Grzimek, B., Kleiman, D.G., Geist, V. and McDade, M. C. (2004). *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. Detroit: Thomson-Gale.

[3] Chaweewan, H., Nopachon, T. and Chutima, D. (2007). *Checklists of Insects and Mites in Thailand.* Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation Ministry of Natural Resources and environment. 77-80.

[4] พิสุทธิ์ เอกอำนวย. (2556). *โลกของตั๊กแตน จิ้งหรีด 2 ตั๊กแตนต่าง ๆ Grasshoppers.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: พลัสเพรส ; 2556: 10-34.

[5] Kumar, H. and Usmani, M. (2015). A review of the genus Hieroglyphus (Acrididae: Hemiacridinae) from India, with description of a new species. *Tropical Zoology,* 28: 1-21.

[6] Mesa, A. and Fontanetti, C.S. (1983). Karyotypes of nine Brazilian species of acridids (Orthoptera, Acridoidea). *Revista Brasileira de Genetica,* 6(2): 295-305.

[7] Bugrov, A., Warchalowska-Sliwa, E. and Maryanska -Nadachowska, A. (1994). Karyotype evolution and chromosome C-banding patterns in some podismini grasshoppers (Orthoptera, Acrididae). *Caryologia,* 47(2): 183-191.

[8] Grzywacz, B., Tatsuta, H., Shikat, K. and Elżbieta, W. (2018). A comparative chromosome mapping study in Japanese Podismini grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae). *Cytogenetic and Genome Research*, 154(1): 37-44.

[9] บังอร กองอิ้ม. (2544). *ไมโตติกคาริโอไทป์ของตั๊กแตนหนวดสั้นบางชนิดในจังหวัดขอนแก่นและ สกลนคร.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

[10] Ashok, K.S. (2006). Cytology and cytotaxonomy of Acrididae: a summary. *Records of the Zoological Survey of India*, 106(3): 47-78.

[11] Koli, Y.J., Gaikwad, S.M., Bharmal, D.L. and Bhawane, G.P. (2013). Karyotypic studies of six species of grasshopper (Orthoptera: Acrididae) from Kolhapur District, Maharashtra, India. *Cytologia,* 8(3): 255-260.

[12] อรอนงค์ ยามเลย และ อิสสระ ปะทะวัง. (2562). การศึกษาแคริโอไทป์ของตั๊กแตนหัวหอกเพศผู้ (*Palaeoagraecia brunnea*) และตั๊กแตนข้าวไฮโรไกลฟัสเพศผู้ (*Hieroglyphus banian*) ในภาคเหนือของประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*, 39(3): 290-297.

[13] Phimphan, S., Sangpakdee, W., Sangpakdee, K. and Tanomtong, A. (2016). Chromosomal analysis and meiosis studies of *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae) from Thailand. *The Nucleus,* 60(1): 9-15.

[14] Howell, W.M. and Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014–1015.

[15] Turpin, R. and Lejeune, J. (1965). Les chromosomes humains (caryotype normal et variations pathologiques). *Paris: Gauthier Villars*, 6: 965-966.