



## แคริโอไทป์ของตั๊กแตนข้าวปีกสั้น (*Pseudoxya diminuta* Walker, 1871) ในประเทศไทย Karyotype of Short-winged Rice Grasshopper (*Pseudoxya diminuta* Walker, 1871) in Thailand

สุมาลี พิมพันธ์<sup>1</sup> และ วิวรรณ์ แสงภักดี<sup>2\*</sup>

Sumalee Phimphan<sup>1</sup> and Wiwat Sangpakdee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

<sup>2</sup>สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

<sup>1</sup>Biology Program, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University

<sup>2</sup>Biology Program, Faculty of Science, UdonThani Rajabhat University

\*Corresponding author; E-mail: wiwatsang@gmail.com

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครโมโซมและแคริโอไทป์ของตั๊กแตนข้าวปีกสั้น (*Pseudoxya diminuta* Walker, 1871) ซึ่งเป็นการรายงานครั้งแรกของลักษณะโครโมโซมในตั๊กแตนชนิดนี้ในประเทศไทย เก็บตัวอย่างจากจังหวัดอุดรธานี เตรียมโครโมโซมโดยวิธีตรงจากอวัยวะของตั๊กแตน ย้อมสีแบบคอนเว็นชันนอลและแบบซิลเวอร์นอร์ ผลการศึกษาพบว่า ตั๊กแตนข้าวปีกสั้นเพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แท่ง และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 23 แคริโอไทป์ประกอบด้วยออโทโซมชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 14 แท่ง ขนาดกลาง 2 แท่ง และขนาดเล็ก 6 แท่ง โครโมโซมเพศ X เป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แท่ง นอกจากนี้ยังตรวจพบบี-โครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกขนาดเล็กจำนวน 2 ถึง 4 แท่ง ในบางเซลล์ และพบนิวคลีโอลาร์ออร์แกเนลล์เชอร์รี่เจียน (นอร์) อยู่ใกล้กับเซ็นโทรเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่งรวมทั้งบี-โครโมโซมด้วย สูตรแคริโอไทป์ของตั๊กแตนชนิดนี้คือ  $2n (23) = L^1_4 + M^1_2 + S^1_6 + \text{โครโมโซมเพศ (XO)}$

**คำสำคัญ:** โครโมโซม แคริโอไทป์ ตั๊กแตนข้าวปีกสั้นประเทศไทย

### Abstract

This research aims to study the chromosome and karyotype of short-winged rice grasshopper (*Pseudoxya diminuta* Walker, 1871) which reported for the first time on chromosome feature of this species in Thailand. The specimens were collected in Udon Thani province. Chromosomal preparation was performed directly from their testes. Conventional and Ag-NOR staining were applied on the metaphase chromosomes. The result reveals that the male short-winged rice grasshopper has diploid chromosome number of

$2n = 23$  and has the number of fundamental (NF) = 23. The autosomes in the karyotype compose of 14 large telocentric, 2 medium telocentric and 6 small telocentric chromosomes. The sex-chromosome (X) is a large telocentric chromosome. Besides, 2-4 of B-chromosomes are detected in some mitotic cells and the nucleolar organizer regions (NOR) are found close to the centromeric position of all chromosomes and B-chromosomes as well. The karyotype formula can be deduced as followed:  $2n (23) = L^1_4 + M^1_2 + S^1_6 + \text{sex-chromosome (XO)}$

**Keywords:** Chromosome, Karyotype, Short-winged rice grasshopper, Thailand

## บทนำ

ตั๊กแตนเป็นแมลงที่มีความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์มากทั้งในเชิงบวกและเชิงลบ เนื่องจากตั๊กแตนมีปากแบบกัดกินและส่วนใหญ่กินพืชเป็นอาหาร จึงจัดเป็นแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดที่มนุษย์ปลูก และพืชที่ขึ้นเองในป่า ในทางตรงข้ามตั๊กแตนนับเป็นอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีนของมนุษย์และสัตว์ ปัจจุบันจำนวนประชากรของตั๊กแตนลดลงอย่างรวดเร็วหรือบางชนิดแทบจะสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทยเนื่องจากการใช้สารเคมีป้องกันศัตรูพืช ตั๊กแตนเป็นแมลงที่มีความหลากหลายของชนิดค่อนข้างมาก ประกอบด้วยหลายวงศ์ (family) จากข้อมูลพบว่าทั่วโลกมีประมาณ 22 วงศ์ [1, 2] สำหรับประเทศไทยมีรายงานไว้ 10 วงศ์ วงศ์ที่พบบ่อยที่สุดคือวงศ์ของตั๊กแตนหนวดสั้น (Acrididae) ซึ่งมีจำนวน 47 ชนิด [3]

ตั๊กแตนข้าวปีกสั้น หรือ Short-winged rice grasshopper (*Pseudoxya diminuta* Walker, 1871) จัดอยู่ในอันดับ Orthoptera เป็นตั๊กแตนที่อยู่ในกลุ่มตั๊กแตนหนวดสั้น (short horned grasshoppers หรือ locusts) จัดอยู่ในวงศ์ Acrididae เป็นตั๊กแตนขนาดเล็กเมื่อเทียบกับตั๊กแตนป่าทั้งก้า (Bombay locust) ลำตัวมีสีน้ำตาลหรือเขียวปนเหลือง ปีกคู่หน้าสั้นซึ่งยาวไม่ถึงปลายท้องพีเมออร์ซาคู่หลังมีสีเหลืองปนเขียวไปจนถึงน้ำตาลแดง

และมีแถบข้างลำตัวสีขาว กินพืชเป็นอาหารโดยส่วนใหญ่เป็นพืชตระกูลหญ้า [4] (Figure1) ปัจจุบันยังไม่พบรายงานว่าตั๊กแตนชนิดนี้สร้างความเสียหายกับพืชผลทางการเกษตร อย่างไรก็ตามตั๊กแตนชนิดนี้จัดเป็นอาหารที่สำคัญในห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศ



5 mm

**Figure 1.** Common characteristic of short-winged rice grasshopper (male)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้น ใกล้เคียงเส้นศูนย์สูตรทำให้เกิดความหลากหลายของตั๊กแตนเป็นจำนวนมาก แต่การศึกษาโครโมโซมและแคโรไทป์ของตั๊กแตนในประเทศไทยยังมีรายงานค่อนข้างน้อย การศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนครั้งแรกได้รายงานเมื่อปี ค.ศ.1952 โดย Sharman ในกลุ่มตั๊กแตนหัวตัด หลังจากนั้นจึงเริ่มมีรายงานการศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนในปี ค.ศ.1985 อาทิเช่น Fox และ Santos ศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตน *Oxyavelox* พบว่ามี



จำนวนโครโมโซมเท่ากับ 23 แท่ง เป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก [5] ต่อมา Ma และคณะ (1989) ได้ศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนหนวดยักษ์ 5 ชนิดในประเทศจีน ได้แก่ *O.chinensis*, *O. shanghaiensis*, *O. hylaintricatea*, *O. agavisa* และ *O. adentata* ซึ่งพบว่าตั๊กแตนทั้ง 5 ชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แท่ง [6] และต่อมา Ma และคณะได้ศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนในประเทศจีน จำนวน 7 ชนิด โดยมีชนิดใหม่ที่เพิ่มเข้ามาจากรายงานครั้งก่อน คือ *O. bicingula*, *O. apicocingula* และ *O. flave* ซึ่งพบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แท่ง เป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกทั้งหมด [7] จากนั้นมีการศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนอีกหลายชนิดที่อยู่ต่างสกุลกัน ได้แก่ *Acridae xaltata*, *Phlaeoba antennata*, *Gastrimargus africanus africanus*, *Parahieroglyphus bilineatus* และ *Hieroglyphus banian* ซึ่งพบว่าตั๊กแตนเหล่านี้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แท่ง เป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกทั้งหมด [8] และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานการศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนข้าวเล็กจีนในประเทศไทย ผลการศึกษาพบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แท่ง เป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกทั้งหมด [9] การทราบข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมของตั๊กแตนชนิดต่างๆ ที่พบในประเทศไทยเป็นเรื่องที่น่าสนใจเนื่องจากข้อมูลการศึกษาทางพันธุกรรมยังไม่ครอบคลุมอีกหลายชนิด ข้อมูลที่ได้จึงนับเป็นประโยชน์ต่อวงการวิชาการเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ผลของแครีโอไทป์ยังสามารถใช้ในการทำแผนที่ยีนในการศึกษายีนด้อยของแมลงหรือยีนที่น่าสนใจต่อไปในอนาคต

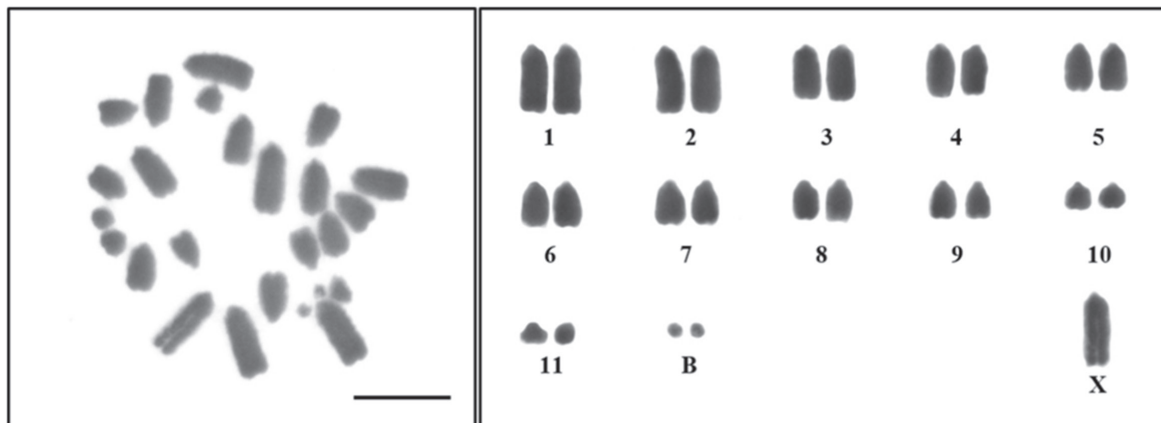
## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะโครโมโซมและแครีโอไทป์ของตั๊กแตนข้าวปึกสั้น

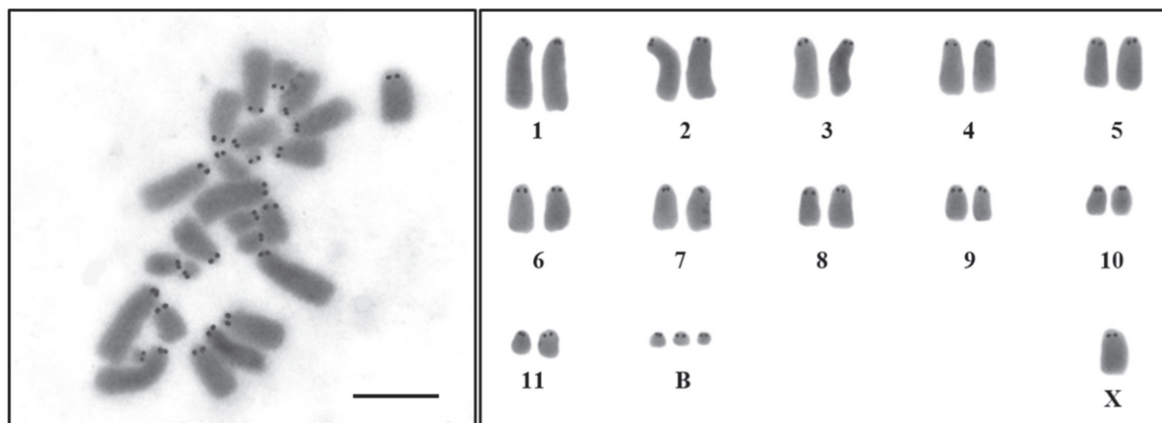
## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนข้าวปึกสั้นเฉพาะเพศผู้ โดยเก็บตัวอย่างจากทุ่งหญ้าในเขตจังหวัดอุดรธานี จำนวน 30 ตัว เตรียมโครโมโซมโดยตรงจากถุงอัมตะ ทำการย้อมสีเพื่อศึกษาโครโมโซมโดยการย้อมสีแบบคอนเว็นชันนอลและแบบซิลเวอร์เนอร์ จัดแครีโอไทป์ตามวิธีการของ Levan และคณะ [10]

การเตรียมโครโมโซมดัดแปลงจากวิธีการของ Phimphan และคณะ [9] โดยมีขั้นตอน คือ ฉีดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เข้าที่ช่องท้องของตั๊กแตนและบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นผ่าเอาอัมตะออกมาและสับให้ละเอียดในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ และบ่มเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำยาคงสภาพ (Canoy's fixative) จนครบปริมาตร 7 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิมและเทสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการเจือจางตะกอนเซลล์ในปริมาณที่เหมาะสมหยดสารละลายเซลล์แขวนลอยลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็น ปล่อยให้แห้งในอากาศ ย้อมสีโครโมโซมแบบคอนเว็นชันนอลด้วยสีกิมซ่าความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที และย้อมสีโครโมโซมแบบซิลเวอร์เนอร์โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Howell and Black [11]



**Figure 2.** Metaphase chromosome and karyotype of male short-winged rice grasshopper  $2n = 23$  (XO) with two B-chromosomes by conventional staining, scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3.** Metaphase chromosome and karyotype of male Short-winged rice grasshopper  $2n = 23$  (XO) with three B-chromosomes by Ag-NOR staining, scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

### ผลการทดลอง

จากการศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนข้าวปีกสั้น พบว่าตั๊กแตนข้าวปีกสั้นเพศผู้ที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 23 แห่ง แคริโอไทป์ประกอบด้วยออโทโซม (autosome) ชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 14 แห่ง ขนาดกลาง 2 แห่ง และขนาดเล็ก 6 แห่ง ส่วนโครโมโซมเพศเป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แห่ง (Figure 2) และพบตำแหน่งนอร์ปรากอยู่บริเวณใกล้กับตำแหน่งของเซนโทรเมียร์บนโครโมโซมทุกแห่ง (Figure 3) นอกจากนี้ยังตรวจพบ บี-โครโมโซม ซึ่งมีจำนวนแปรผันได้ตั้งแต่ 0-4 แห่ง (Figure 4) โครโมโซมเพศเป็นระบบ XO ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลทางพันธุกรรมของตั๊กแตนชนิดอื่นที่รายงานใน ตั๊กแตนค่าความยาวเฉลี่ยของโครโมโซม ค่าความยาวสัมพัทธ์ (Relative length, RL) และค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ (Centromeric index, CI) จากทั้งหมด 10 เมทาเฟส แสดงใน Table 1

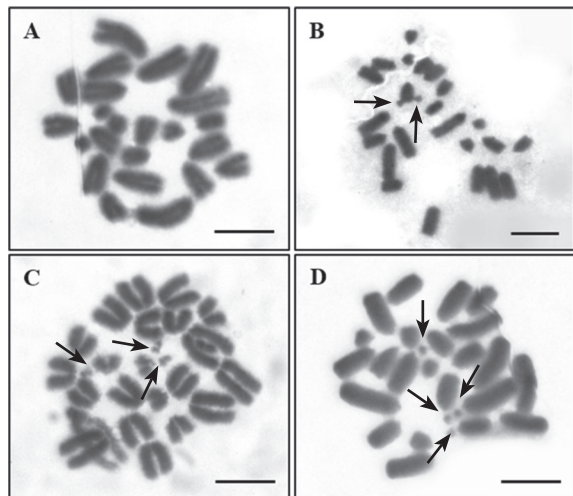


**Table 1.** Mean of length of short arm chromosome (Ls), length of long arm chromosome (LI), length of total chromosomes (LT), relative length (RL) and centromeric index (CI) from 10 metaphases of *Pseudoxya diminuta*

Chromosome pair	Ls	LI	LT	CI±SD	RL±SD	Chromosome size	Chromosome type
1	0	24.917	24.917	0.912±0.019	0.118±0.001	Large	Telocentric
2	0	23.680	23.680	0.907±0.013	0.112±0.004	Large	Telocentric
3	0	20.519	20.519	0.998±0.012	0.097±0.002	Large	Telocentric
4	0	18.972	18.972	0.990±0.008	0.089±0.004	Large	Telocentric
5	0	16.824	16.824	0.983±0.013	0.079±0.004	Large	Telocentric
6	0	15.922	15.922	0.972±0.014	0.075±0.001	Large	Telocentric
7	0	15.057	15.057	0.972±0.012	0.071±0.002	Large	Telocentric
8	0	14.161	14.161	0.958±0.008	0.067±0.002	Medium	Telocentric
9	0	12.829	12.829	0.959±0.006	0.061±0.003	Small	Telocentric
10	0	9.744	9.744	0.902±0.007	0.046±0.003	Small	Telocentric
11	0	7.996	7.996	0.974±0.003	0.038±0.002	Small	Telocentric
X	0	25.833	25.833	0.920±0.008	0.122±0.004	Large	Telocentric

## อภิปรายผล

แคโรไทป์ของตั๊กแตนข้าวปีกสั้นเพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แห่ง และมีสกุล *Oxya* [5, 6, 7], *Caryanda* [13], *Acrida*, *Phlaeoba*, *Gastrimargus*, *Parahieroglyphus* และ *Hieroglyphus* [8] แคโรไทป์ของตั๊กแตนข้าวปีกสั้นประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด จากการย้อมแถบสีแบบซิลเวอร์เนอร์พบว่าตำแหน่งเนอร์อยู่ใกล้กับเซ็นโทรเมียร์ของโครโมโซมทุกแห่งรวมทั้งพบอยู่บนบี-โครโมโซมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yoshimura และคณะ [14] และสอดคล้องกับรายงานของ Phimphan และคณะ [9] ที่ได้รายงานไว้ในตั๊กแตนสกุล *Oxya*



**Figure 4.** Metaphase without B-chromosome (A), with present of two B-chromosomes (B), three B-chromosomes (C), and four B-chromosomes (D), scale bars = 10  $\mu$ m.



การเกิดความแปรผันในสิ่งมีชีวิตชนิดใดก็ตาม เนื่องจากอิทธิพลของบี-โครโมโซมจะมีผลทำให้การเจริญพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นลดลงเนื่องจากยีนบนบี-โครโมโซมควบคุมเกี่ยวกับนอน-ดิสจังก์ชัน (non-disjunction) คือทำให้กระบวนการแยกของโครมาทิด (chromatid) เกิดขึ้นอย่างช้าลง อย่างไรก็ตามข้อมูลอีกด้านหนึ่งชี้ให้เห็นว่าการมีจำนวน บี-โครโมโซมที่มากขึ้นภายในเซลล์จะส่งผลให้โครมาทิน (chromatin) ของโครโมโซมปกติมีความยาวมากขึ้น และจะชักนำให้เกิดกระบวนการครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) มากขึ้นเช่นกัน [15]

### สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาโครโมโซมของตั๊กแตนข้าวปีกสั้นในครั้งนี้นับเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมที่สำคัญอีกมิติหนึ่งที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านเซลล์อนุกรมวิธาน นำไปสู่การศึกษาเพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ของตั๊กแตนที่หายากหรืออาจใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย และอาจสามารถประยุกต์ใช้ในด้าน การปรับปรุงพันธุ์เพื่อการขยายพันธุ์ตั๊กแตนอันเป็นแหล่งโปรตีนที่เป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ที่สนับสนุนงบประมาณและสถานที่ทำวิจัย และขอขอบพระคุณ ศ.ดร.อลงกลด แทนอมทอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ปรึกษางานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

### 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. พิสุทธิ เอกอำนาจ. 2556. ตั๊กแตนต่างๆ Grasshoppers. กรุงเทพฯ: บริษัท พลัสเพรส จำกัด.
5. Fox, D.P. and Santos, J.L. 1985. N-bands and nucleolus expression in *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Heredity*. 54: 333-41.
6. Ma, E.B. and Zheng, Z.M. 1989. Comparisons of karyotypes and chromosome C-banding patterns in five species of *Oxya*. *Acta Entomol Sin.* 32(4): 399-405.
7. Ma, E.B., Guo, Y.P. and Zheng, Z.M. 1994. Cytotaxonomic study of *Oxya* species in China (Orthoptera: Acridoidea). *Insect Science*. 1 (2) : 101-109.
8. Koli, J.Y., Gaikwad, M.S., Bharmal, L.D., and Bhawane, P.G. 2013. Karyotypic Studies of Six Species of Grasshopper (Orthoptera: Acrididae) from Kolhapur District, Maharashtra, India. *Cytologia*. 78(3): 255-260.



9. Phimphan, S., Sangpakdee, W., Sangpakdee, K. and Tanomtong A. 2016. Chromosomal analysis and meiosis studies of *Oxyachinensis* (Orthoptera: Acrididae) from Thailand. *The Nucleus*. 60(1): 9-15.
10. Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220.
11. 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.
12. Chaiyasut, K. 1989. Cytogenetics and cytotaxonomy of the family zephyranthes. Bangkok: Chulalongkorn University.
13. Qing, L., Xiaohong, O. and Hongjie, G. 2012. C-banding karyotypes of two *Caryanda* (Orthoptera: Catantopidae) species with short wings from China. *Am Entomol Soc.* 122 (1): 1-9.
14. Yoshimura A., Obara Y., Ando Y. and Kayano H. 2005. Comparative karyotype analysis of grasshoppers in the genus *Oxya* (Orthoptera, Catantopidae) by differential staining techniques. *Cytologia*. 70: 109-17.
15. Darlington, C.D. 1965. Cytology Part II : Recent Advances in Cytology, 1937-1964. London : J. and A. Churchill Ltd.