พันธุศาสตร์เซลล์ของแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาว (*Tholymis tillarga*) จากการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์

Cytogenetics of Coral-Tailed Cloud Wing (*Tholymis tillarga*) from Meiotic Cell Division

อลงกลด แทนออมทอง และ มณฑิรา มณฑาทอง*

Alongklod Tanomtong Monthira Monthathong*

บทคัดย่อ

รายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาว, Tholymi stillarga (Fabricius, 1798) จากการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เตรียมโครโมโซมด้วยวิธีการบดขยี้เซลล์จากอัณฑะของแมลงปอเพศผู้ 10 ตัวย้อมสีโครโมโซมด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา ผลการศึกษาพบว่าแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวเพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 25 แท่ง จากการแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟส 1 ของการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โครโมโซมประกอบด้วย 12 ไบวาเล็นท์ และ 1 ยูนิวาเล็นท์ การตรวจสอบโครโมโซมในระยะไดอะไคนีซิสและเมทาเฟส 1พบว่าแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวมีการกำหนดเพศระบบ XO (เพศผู้ XO และเพศเมีย XX) ที่พบได้มากในแมลงอันดับแมลงปอ

กลุ่มวิจัยพันธุศาสตร์และพิษวิทยาสิ่งแวดล้อม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002
*E-mail: tanomtong@hotmail.com

Abstract

A first cytogenetically analysis of the coral-tailed cloud wing, *Tholymis tillarga* (Fabricius, 1798) from meiotic cell division was studied. Testis sample was taken from 10 male dragonflies. Dragonfly chromosome preparations were conducted by squash technique from testis. The chromosome was stained by conventional staining techniques.The results showed that the diploid chromosome number of male*T. tillargawas* 2n=25 (n = 12+X). We found that during metaphase I on meiosis the homologous chromosomes showed synapsis, which can be defined as the 12 bivalents and 1 univalent. Most of meiotic cell divisions were at diakinesis and metaphase I. Then, the sex determination system could be analyzed as an XO system (XO in male and XX in female) which is the most frequent sex determining system in the order Odonata.

บทนำ

แมลงปอบ้านจุดสีน้ำตาลขาว, *Tholymis tillarga* (Fabricius, 1798) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของแมลงปอบ้าน (Dragonfly) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในไฟลัม (Phylum) Arthropoda ชั้น (Class) Insect อันดับ (Order) Odonata อันดับย่อย (Suborder) Anisopteraและวงศ์ (Family) Libellulidae ลักษณะทั่วไปของแมลงปอบ้านจุดสีน้ำตาลขาว จะมีลำตัวยาวเรียว ปลายท้องแหลม มีปากแบบกัดกินขนาดใหญ่ เส้นหนวดสั้นเล็กเป็นแบบเส้นขน (Setacrous) ตาเป็นแบบตารวมขนาดใหญ่เต็มศีรษะ ปีกยาว 2 คู่ เนื้อปีกใส แบบเยื่อ (Membrane) แต่ละปีกด้านหน้าบริเวณกึ่งกลางปีกมีลักษณะคล้ายรอยต่อเรียกว่าโนดัส (Nodus) บริเวณด้านหน้าปีกใกล้ปลายปีกมีแถบสีดำเรียกว่าสติกมา (Stigma) สีที่ปีกบริเวณกลางปีกจะมีจุดสีน้ำตาลและจุดสีขาว ขามีทาร์ไซ (Tarsi) 3 ปล้อง และส่วนท้องยาวเรียวเล็กกว่าส่วนอก (ภาพที่ 1) (พิสุทธิ์ เอกอำนวย, 2538; Pinratana & Hamalainen, 1999; Ferro., et al,2009)

พันธุศาสตร์เซลล์ (Cytogenetics) เป็นศาสตร์ที่เกี่ยวกับการศึกษาโครโมโซม (Chromosome) ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างที่สำคัญในการถ่ายทอดพันธุกรรมของเซลล์ เป็นที่อยู่ของหน่วยพันธุกรรมหรือยีน (Gene) ที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid : DNA) ทำหน้าที่กำหนดควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตไปสู่รุ่นลูกหลาน ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทำให้การแสดงออกในสิ่งมีชีวิตมีรูปแบบแตกต่างกัน มีผลต่อการเจริญ การพัฒนา และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์ในประเทศไทยจะทำให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถจะนำมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ได้แก่ การนำไปใช้จัดจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ใช้ในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากความผิดปกติของโครโมโซม เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำแผนที่ยีน (Gene mapping) บนโครโมโซมเพื่อปรับปรุงพันธุ์สัตว์ในการอนุรักษ์และขยายพันธุ์ รวมถึงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้า (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

จากการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของแมลงปอบ้านที่อยู่ในวงศ์ Libellulidae ของ Klauta (1964), (1969) และ Mola., et al (1999) พบว่าแมลงปอบ้านในวงศ์นี้ทั้งหมดเพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (Diploid, 2n) เท่ากับ 25 แท่ง (n = 12+X) เหมือนกันทั้งหมด และเกือบทุกชนิดมีระบบการกำหนดเพศแบบ XO (เพศผู้ XO เพศเมีย XX) ยกเว้นในแมลงปอบ้านชนิด Oligoclada laetitia และ Micrathyria ungulate เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 23 แท่งและมีการกำหนดเพศระบบ X1X2Y/X1X1X2X2 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของแมลงปอบ้านจุดสีน้ำตาลขาวในครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษา ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในศึกษาพันธุศาสตร์ขั้นสูง และด้านอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมโครโมโซมจากอัณฑะดัดแปลงจาก Supiwong.,et al, (2013)

1.1 นำแมลงปอบ้านจุดสีน้ำตาลขาวเพศผู้จำนวน 10 ตัว ฉีดโคซิซิน (Colchicine) ความเข้มข้น 0.05% เข้าบริเวณปล้องท้องปล้องที่ 2 ปริมาณของโคซิซินที่ฉีดคำนวณจากอัตราส่วนของน้ำหนักตัวในอัตราส่วน 100 กรัม น้ำหนักตัวต่อโคซิซิน 1 มล เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

1.2 ทำการผ่าตัดบริเวณช่องท้องของแมลงปอจากปล้องท้องปล้องที่ 2-10 ตัดเฉพาะตัวอย่างอัณฑะที่อยู่บริเวณปล้องท้องปล้องที่ 7-8 ซึ่งอัณฑะของแมลงปอจะแนบอยู่ด้านข้างของลำไส้ส่วนปลายทั้ง 2 ด้าน (ภาพที่ 2)

1.3 นำอัณฑะมาแช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride: KCl) ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ (M) ใช้กรรไกรสับตัวอย่างอัณฑะให้ละเอียดเป็นเวลา 45 นาที

1.4 ย้ายไปใส่หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 15 มล จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,250 รอบ/นาที (rpm) เป็นเวลา 8 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป

1.5 ทำการตรึงเซลล์ (Fixation) ด้วย Canoy's fixation โดยเติมน้ำยาตรึงเซลล์ที่เตรียมใหม่และเย็นจัด (Fresh-cold fixative) ซึ่งเตรียมจากเมทานอล (Methanol): กรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial acetic acid) ในอัตราส่วน 3: 1 และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,250 rpm เป็นเวลา 8 นาทีจำนวน 2-3 ครั้ง จนได้ตะกอนขาวที่ก้นหลอด ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไปเกือบหมดเหลือไว้เฉพาะสารละลายเหนือเซลล์ประมาณ 0.5–1.0 มล

1.6 เติมน้ำยาตรึงเซลล์อีกประมาณ 1–2 มล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนเซลล์ใช้ไมโครปิเปต (Micropipette) ดูดและหยดสารละลายตะกอนเซลล์ลงบนสไลด์ที่แห้งและ

สะอาดโดย โดยหยดเหนือสไลด์ประมาณ 30 เซนติเมตร เมื่อสไลด์แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาตรวจโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) เลือกสไลด์ที่เซลล์กระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกันไว้ย้อมสีเพื่อศึกษาต่อไป

2. การย้อมสีโครโมโซม

ย้อมสีโครโมโซมแบบแบบธรรมดา (Conventional staining technique) ด้วยสีจิมซ่าความเข้มข้น 20% ที่เตรียมจาก Stock Giemsa's solution ใน Sorensen buffer นำสไลด์ที่เตรียมไว้มาย้อมสีเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา ทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้ง

3. การตรวจสอบโครโมโซม

นำสไลด์ที่ย้อมด้วยสีจิมซ่ามาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและถ่ายรูปแบบดิจิตอลที่กำลังขยาย 1,000x โดยศึกษาการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่างๆ ของพฤติกรรมโครโมโซม

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

เป็นรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ครั้งแรกของแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวเพศผู้ จากการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Meiotic cell division) ย้อมสีแบบธรรมดาด้วยสี Giemsa's พบว่าแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวเพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 25 แท่ง (n = 12+X) สำหรับในเพศเมียจะมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 แท่ง (n = 12+XX) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของแมลงปอในวงศ์ Libellulidae โดย Klauta (1964) และ (1969) ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในแมลงปอSympetrum stiriolatum ที่อาศัยอยู่ในประเทศลักเซมเบิร์ก และแมลงปอ *Nesogonia blackburni* ที่อาศัยอยู่ในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนที่นำมาศึกษา คือ อัณฑะ ย้อมสีแบบธรรมดาด้วยสี lacto-acetic-orcein พบว่าแมลงปอเพศผู้ทั้งสองชนิดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 25 แท่ง (n = 12+X) นอกจากนี้ในรายงานการศึกษาของ Molaและคณะ (1999) ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในแมลงปอ *Planiplax erythropyga, Micrathyria spuria* และ *M. hesperis* ศึกษาจากอัณฑะด้วยวิธีการบดขยี้เซลล์ ย้อมสีธรรมดาด้วยสี Propionic haematoxylin 2% พบว่าแมลงปอเพศผู้ทั้งสามชนิดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 25 แท่ง (n = 12+X) เช่นเดียวกัน

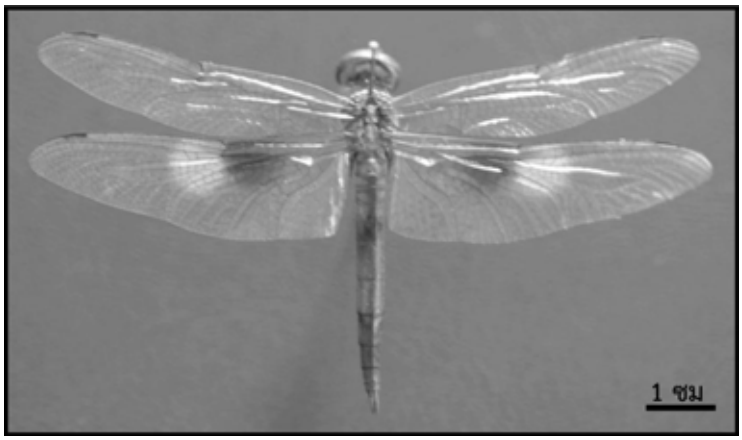
การศึกษาการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นแรก (First meiotic cell division) ระยะเมทาเฟส 1 (Metaphase I) พบว่าโครโมโซมคู่เหมือน (Homologous chromosome) มีการจับคู่กันเป็น 12 ไบวาเล็นท์ (Bivalents) และไม่มีการจับคู่กัน 1 ยูนิวาเล็นท์ (Univalent) (ภาพที่ 3) สามารถที่จะนำมาจัดเป็นคาริโอไทป์ (Karyotype) ได้โดยการจับคู่กันของโครโมโซมคู่เหมือนที่เป็นไบวาเล็นท์จะเป็นชนิดวงแหวนทั้งหมด (12 ring bivalents) แสดงให้เห็นว่าโครโมโซมร่างกายของแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวเป็นชนิดเมทาเซนทริก

(Metacentric) หรือซับเมทาเซนทริก (Sub-metacentric) ทั้งหมดจำนวน 24 แท่ง นอกจากนี้โครโมโซมที่ไม่มีการจับคู่กัน 1 ยูนิวาเล็นท์ จะมีขนาดที่เล็กมาก (Dot like) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับโครโมโซมที่จับคู่กันเป็นไบวาเล็นท์ (ภาพที่ 4)

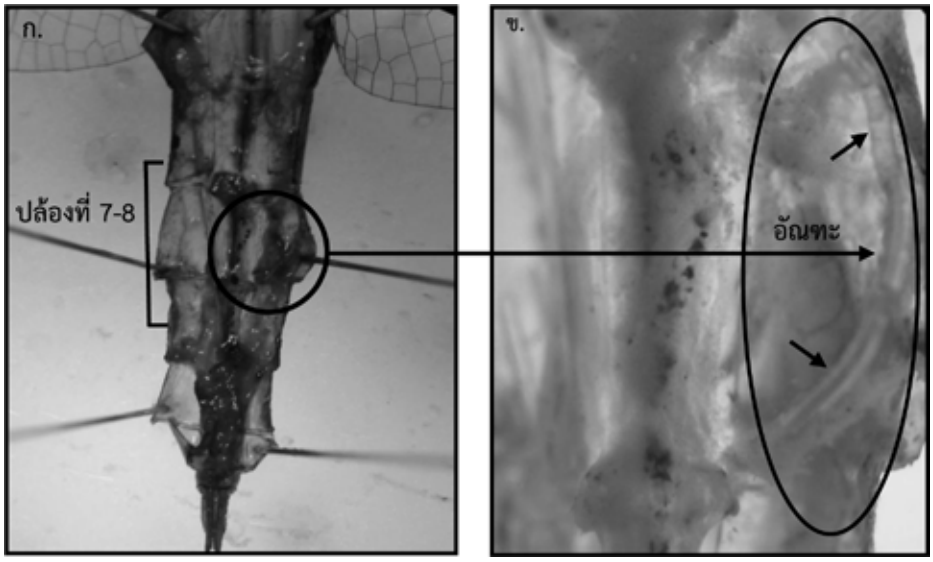
ในการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นแรกระยะโพรเฟส1 (Prophase I) ได้แก่ ระยะเลปโททีน (Leptotene) จะมีขนาดของนิวเคลียสและเซลล์ใหญ่มาก โครโมโซมที่เป็นเส้นยาวจะหดตัวสั้นลงและ มองเห็นเส้นขนาดเล็กยาวเป็นสายโครมาทิน (Chromatin) (ภาพที่ 5 ข.) ระยะไซโกทีน (Zygotene) โครโมโซมที่เป็นคู่เหมือนเคลื่อนตัวมาเรียงจับคู่ซึ่งกันและกัน การจับคู่กันระหว่างโครโมโซมที่เป็นคู่เหมือนจะเริ่มบางจุดตามความยาวของโครโมโซมก่อน แล้วการแนบสนิทจะเคลื่อนไปจนตลอดเส้นของโครโมโซม (ภาพที่ 5 ค.) ระยะพะคีทีน (Pachytene) โครโมโซมจะหดสั้นลงไปอีก ผลของการหดตัวของโครโมโซมในลักษณะที่ไม่เท่ากันในแต่ละตำแหน่ง ทำให้ย้อมสีแท่งโครโมโซมเข้มและจางไม่เท่ากัน (ภาพที่ 5 ง.) ระยะดิโพลทีน (Diplotene) โครโมโซมคู่เหมือนที่เข้าคู่จะเริ่มแยกออกจากกัน อาจมีบางส่วนของนอนซิดเทอร์โครมาทิด (Non-sister chromatid) ยังติดกันอยู่หรือไขว้กันเรียกว่าไคแอสม่า (Chiasma) (ภาพที่ 5 จ.) และระยะไดอะไคนีซิส (Diakinesis) โครโมโซมจะมีการหดตัวสั้นลงอีก

ตำแหน่งของการไขว้จะเคลื่อนไปอยู่ตรงปลายแขนของโครมาทิด ไบวาเลนต์จะมีลักษณะคล้ายวงแหวนเนื่องจากมีแขนของโครมาทิดที่ไขว้กันอยู่ (ภาพที่ 5 ฉ.) (อมรา คัมภิรานนท,2546; อลงกลด แทนออมทอง, 2553)

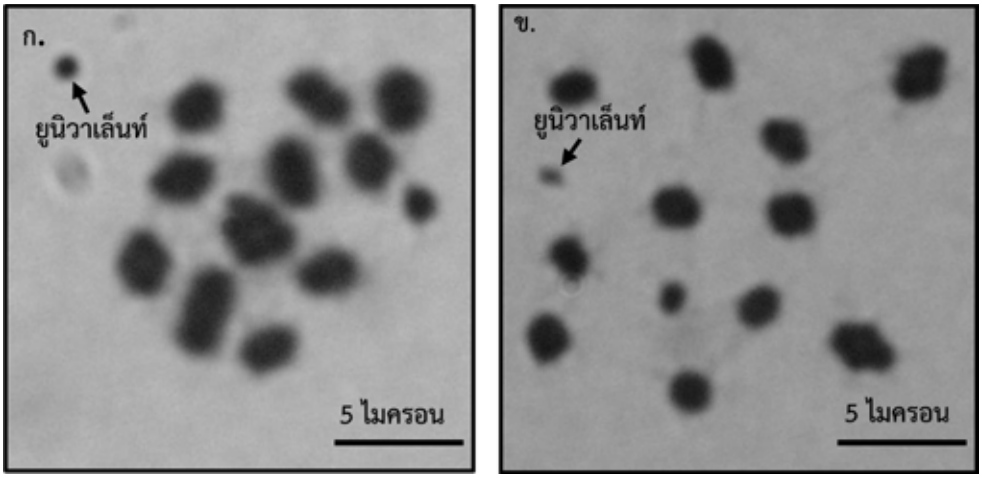
แมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวมีการกำหนดเพศระบบ XO (XO system) โดยแมลงปอเพศผู้มีโครโมโซมเพศ XO (2n = 25 แท่ง) และเพศเมียมีโครโมโซมเพศ XX (2n = 26 แท่ง) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของแมลงปอในวงศ์ Libellulidae โดย Klauta (1964), (1969) พบว่าในแมลงปอ *S. stiriolatum* และแมลงปอ *N. blackburni* มีการกำหนดเพศระบบ XO สำหรับ Mola, et al., (1999) พบว่าในแมลงปอ *P. erythropyga, M. spuria* และ *M. hesperis* มีการกำหนดเพศระบบ XO เช่นเดียวกัน ยกเว้นในแมลงปอบ้านชนิด *O. laetitia* และ *M. ungulate* เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 23 แท่ง ($n = 10+X_1X_2Y$) และเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 24 แท่ง ($n = 11+X_1X_2$)



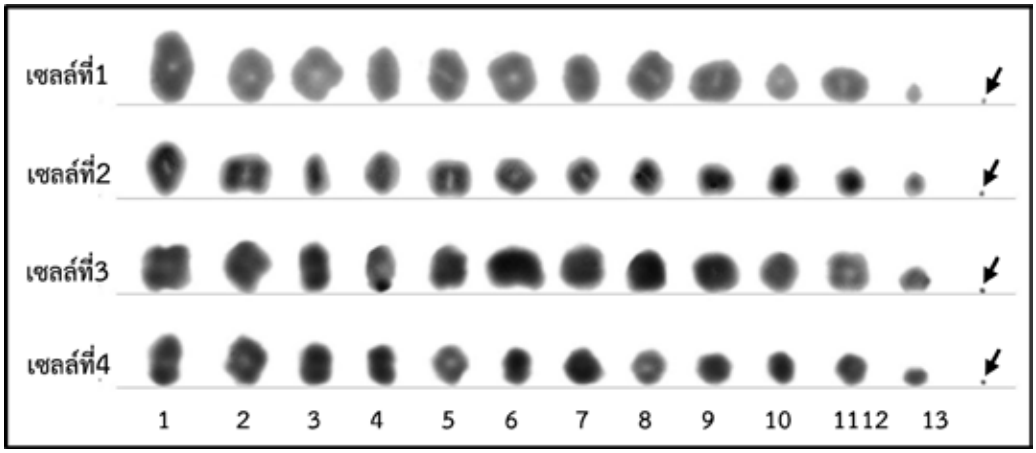
ภาพที่ 1. ลักษณะแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาว (*Tholymi stillarga*) โดยมีลักษณะที่สำคัญ คือ มีจุดสีขาวและน้ำตาลอยู่บนปีกคู่ล่าง



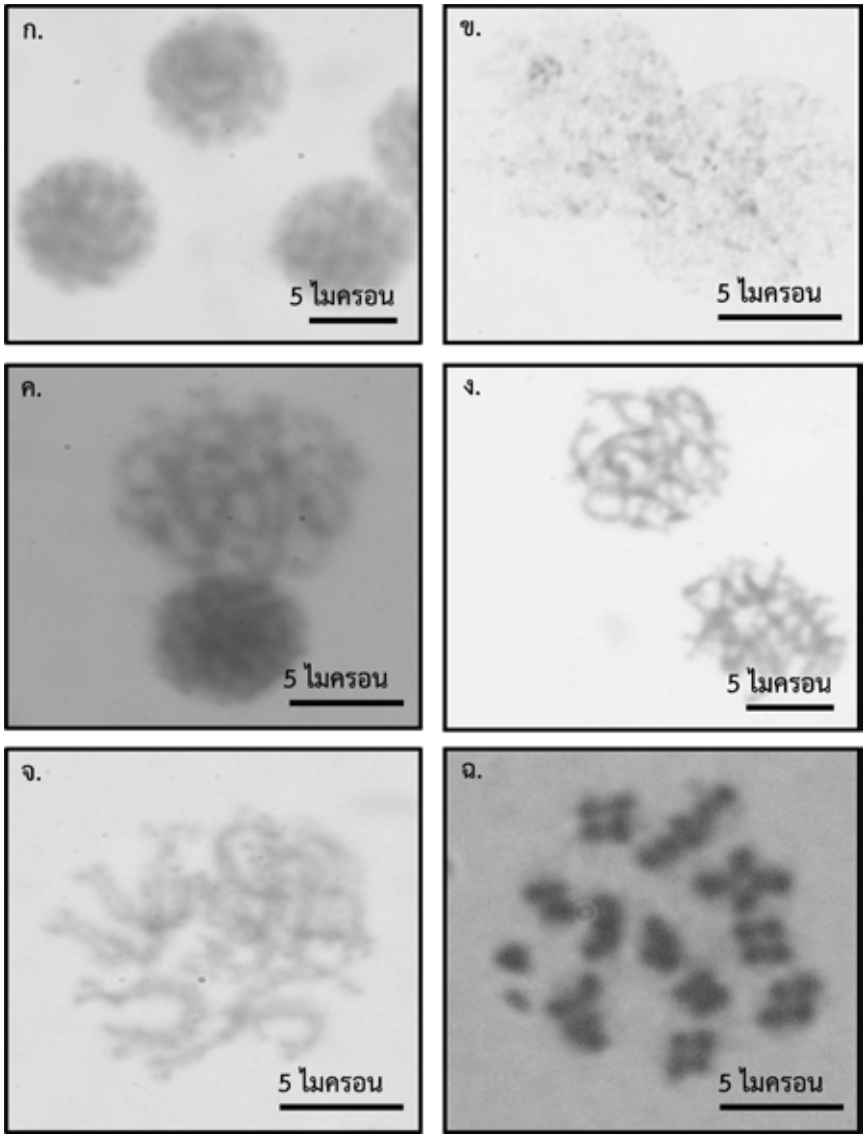
ภาพที่ 2. ตำแหน่งอัณฑะของแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวที่ใช้ในการศึกษาจะอยู่ในตำแหน่งปล้องหางที่ 7-8



ภาพที่ 3. โครโมโซมระยะเมทาเฟส 1 จากการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นแรกของแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวเพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 25 แท่ง กำหนดเพศระบบ XO ประกอบด้วย 12 ไบวาเล็นท์ และ 1 ยูนิวาเล็นท์ ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 4. แคริโอไทป์จากโครโมโซมระยะเมทาเฟส 1 ของแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวเพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 25 แท่ง กำหนดเพศระบบ XO ประกอบด้วย 12 ไบวาเล็นท์ และ 1 ยูนิวาเล็นท์ (ลูกศรชี้) ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 5. โครโมโซมของแมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวเพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 25 แท่ง ระยะอินเทอร์เฟส (ก.) และโพรเฟส1 ได้แก่ ระยะเลปโททีน (เริ่มเห็นสายโครมาทิน, ข.) ไซโกทีน (โครโมโซมคู่เหมือนเริ่มแนบชิด, ค.) พะคีทีน (โครโมโซมคู่เหมือนแนบชิดเสร็จ, ง.) ดิโพลทีน (มีไคแอสม่า และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซม, จ.) และระยะไดอะไคนีซิส (แขนไคแอสม่าเลื่อนไปตรงปลายแท่งโครมาทิด, ฉ.) ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา

สรุปผลการศึกษา

แมลงปอบ้านจุดน้ำตาลขาวเพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 25 แท่ง (n = 12+X) การแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟส 1 พบโครโมโซมประกอบด้วย 12 ไบวาเล็นท์ และ 1 ยูนิวาเล็นท์ และมีการกำหนดเพศระบบ XO (เพศผู้ XO และเพศเมีย XX)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากกลุ่มวิจัยพันธุศาสตร์ และพิษวิทยาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

พิสุทธิ์ เอกอำนวย. (2538). *โลกของแมลงปอ1*. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ต้นอ้อแกรมมี. กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภิรานนท์. (2546). *พันธุศาสตร์ของเซลล์*. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อลงกลด แทนออมทอง. (2553). *พันธุศาสตร์เซลล์*. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

Ferro,M. L., Sites, R. W. & Vitheepradit, A. (2009). Contributions to the faunistics of Odonata in Thailand. *Insecta Mundi*, 0104, 1-24.

Klauta,B. (1964). The chromosome behavior in spermatogenetic meiosis of the dragonfly Sympetrumstriolatum (Charp.) (Odonata: Libellulidae) from Luxembourg. *Institute of Genetics*, 54-60.

Klauta,B. (1969). The chromosome of the Hawaiian endemic dragonflies, Megalagrionoahuense (Blackburn) (Coenagrionidae: Pseudoagrioninae) and Nesogoniablackburni (McLachlan), (Libellulidae: Sympetrinae), with a note on the cytotaxonomicaffinities between the genera Nesogonia Kirby, and Sympetrum Newman (Odonata). *Institute of Genetics*, 2, 429-433.

Mola, L. M., Papeschi, A. G. & Taboada Carrillo, E. (1999). Cytogeneties of seven species of dragonflies. A novel sex chromosome determining system in Micrath yriaungulata. *Hereditas*, 131,147-153.

Pinratana, A. and Hamalainen, M. (1999). *Atlas of the Dragonflies of Thailand*. Brothers of St. Gabriel in Thailand, Bangkok.

Supiwong, W., Tanomtong, A., Jumrusthanasan, S., Khakhong, S., Neeratanaphan, L. Sanoamuang, L. (2013). Standardized karyotype and ideogram of titan triggerfish, Balisto-idesviridescens (Tetraodontiformes, Balistidae) in Thailand. *Cytologia*, *78* (4), 345-351.