โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมงมุมสันโดษเมดิเตอร์เรเนียน (*Loxosceles rufescens* (Dufour,1820) ในประเทศไทย

Genetic diversity of the Mediterranean recluse spider (*Loxosceles rufescens* (Dufour, 1820)) in Thailand

ชื่อนิสิต นางสาวชาลิสา หอมตระหลบ **เลขประจำตัว** 5832019423

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมงมุมสันโดษเมดิเตอร์เรเนียน (*Loxosceles rufescens* (Dufour,1820) ในประเทศไทย

Genetic diversity of the Mediterranean recluse spider (*Loxosceles rufescens* (Dufour, 1820)) in Thailand

ชื่อนิสิต นางสาวชาลิสา หอมตระหลบ **เลขประจำตัว** 5832019423

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อสร้างประสบการณ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมงมุมสันโดษเมดิเตอร์เรเนียน (*Loxosceles rufescens* (Dufour,1820)) ในประเทศไทย

โดย

นางสาวชาลิสา หอมตระหลบ

รหัสนิสิต 5832019423

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ์

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ชื่อโครงการวิจัย	: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมงมุมสันโดษเมดิเตอร์เรเนียน (*Loxosceles rufescens* (Dufour,1820) ในประเทศไทย
นิสิตผู้ดำเนินการ	: นางสาวชาลิสา หอมตระหลบ
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ์
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

Loxosceles rufescens (Dufour, 1820) หรือแมงมุมสันโดษเมดิเตอร์เรเนียน เป็นแมงมุมที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน บริเวณตอนเหนือของทวีปแอฟริกา และทางตอนใต้ของทวีปยุโรป ซึ่งต่อมามีการกระจายตัวทั่วโลกทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ในปี ค. ศ. 2016 ได้มีรายงานการค้นพบ *L. rufescens* ครั้งแรกในประเทศไทยที่ถ้ำวังพระ จังหวัดกาญจนบุรี โดยมีการสันนิษฐานว่า *L. rufescens* น่าจะเข้ามาในประเทศไทยในช่วงสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่า *L. rufescens* ยังมีการกระจายตัวอยู่ในอีกสองจังหวัดนอกเหนือจากกาญจนบุรี ได้แก่ ราชบุรีและประจวบคีรีขันธ์ เพื่อตอบคำถามเกี่ยวกับการเข้ามาและการกระจายตัวของ *L. rufescens* ภายในประเทศไทย ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนของยีน Cytochrome *c* Oxidase I (*COI*) จำนวน 463 คู่เบสด้วยวิธีการสกัด DNA ทำ PCR และ direct DNA-sequencing ตัวอย่าง *L. rufescens* จำนวน 34 ตัวอย่างจากถ้ำจำนวน 6 ถ้ำในประเทศ และทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยทำการสร้าง phylogenetic tree ภายใต้ model HKY+G ประกอบกับใช้ข้อมูลยีน *COI* ของ *L. rufescens* จากตัวอย่างที่มีการศึกษาในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และ จีนมาประกอบ และใช้วิธี Bayesian inferences ด้วยการวิเคราะห์แบบ Markov Chain Monte Carlo โดยใช้จำนวน run ทั้งหมด 2,000,000,000 รอบ และทำการเก็บข้อมูลทุก ๆ 200,000 รอบ โดยมีการ burn-in ที่ 10% ผลการศึกษา พบว่า ตัวอย่างของ *L. rufescens* ในประเทศไทยมีต้นกำเนิดมาจาก mitochondrial lineage จำนวน 2 lineages (A และ B) ที่มีถิ่นกำเนิดในแถบทะเลเมดิเตอเรเนียน โดยที่ตัวอย่างจากถ้ำวังพระและถ้ำฝาโถ มีตัวอย่างที่มาจากทั้ง lineage A และ B ในขณะที่ *L. rufescens* ที่พบในถ้ำอื่นๆ ภายในประเทศมาจาก lineage B ทั้งหมด นอกจากนี้ตัวอย่างจากวัดถ้ำเขากุญชร จังหวัดราชบุรี อาจจะมี cryptic species ของแมงมุมสกุล *Loxosceles* ชนิดอื่นซ่อนอยู่ด้วย จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *L. rufescens* ในประเทศไทย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite markers) ในการวิเคราะห์และหาคำตอบที่เกี่ยวข้องกับประชากร *L. rufescens* ที่ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีรักษาผู้ป่วยที่ถูก *L. rufescens* กัดต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ถ้ำ; พิษ; แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ

Research title : Genetic diversity of the Mediterranean recluse spider (*Loxosceles rufescens* (Dufour, 1820)) in Thailand

Student name : Miss Chalisa Homtralob

Advisor : Asst. Prof. Dr. Natapot Warrit

Department : Biology

Abstract

Loxosceles rufescens (Dufour, 1820) or Mediterranean recluse spider is native to the Mediterranean but considered cosmopolitan because it has been dispersed worldwide in both tropical and temperate areas. In 2016, *L. rufescens* was discovered in Thailand at Wang Pra limestone cave in Kanchanaburi Province, assuming the spiders were introduced into Thailand during World War II. However in this study, *L. rufescens* was collected from two more provinces in Thailand: Ratchaburi and Prachuap Kirikhan. To address the questions regarding the introduction events and current distribution of *L. rufescens* in Thailand, partial Cytochrome *c* Oxidase I gene (*COI*) (463 bp) were analyzed as a result from DNA extraction, PCR amplification, and direct DNA-sequencing of 34 *L. rufescens* samples collected from 6 limestone caves in Thailand. Phylogenetic relationships were analyzed under HKY+G model using *L. rufescens* sequences deposited in GenBank from the Mediterranean, Europe, Americas, Australia, and China. Bayesian Inference (BI) method was implemented for phylogenetic analyses using Markov Chain Monte Carlo algorithm and 2,000,000,000 runs. Data were collected every 200,000 cycles with burn-in 10% to be discarded. The results suggest that samples of *L. rufescens* in Thailand comprise at least two mitochondrial lineages (lineage A and B) from the Mediterranean areas. In addition, samples collected from Wang Pra and Fa to limestone caves show both lineages living in the same area. Furthermore, sequences obtained from individuals in Wat Tum Koa Kunchon limestone may be a cryptic species relating to *L. rufescens*. This study is the first to reveal high genetic diversity of *L. rufescens* populations in Thailand. For future works, microsatellite markers will be employed to analyze the population genetic structure of *L. rufescens* populations in Thailand to complement the mtDNA works.

Keywords: Cave; Loxoscelism; Phylogenetic tree

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐพจน์ วาฤทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องการวางแผนงาน กระบวนการคิดวิเคราะห์ การค้นคว้าข้อมูล การเขียนรายงาน และตรวจแก้ ตลอดจนให้คำแนะนำเมื่อเกิดปัญหาระหว่างการทำโครงการ จนกระทั่งงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคุณเชาวลิต ส่องแสงโชติ ที่มีส่วนช่วยในการหาตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* ในประเทศไทย

ขอขอบคุณนางสาวพุธิตา ผาสุกดี นิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเทคนิคในการปฏิบัติการทางอณูชีววิทยา

ขอขอบคุณนายวรัตถ์ ศิวายพราหมณ์ นิสิตปริญญาเอก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาและ ความรู้ เกี่ยวกับแมงมุม

ขอขอบคุณสมาชิกในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะด้านกีฏวิทยา ชีววิทยาของผึ้ง ความหลากหลายของแมลงและ ไร ที่ช่วยเหลือในเรื่องการออกภาคสนามเก็บตัวอย่าง ให้คำแนะนำ และช่วยเรื่องตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ให้การสนับสนุน ตลอดจนกำลังใจตลอดการทำงาน

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาจากกองทุนสมเด็จพระบรมโอสาธิราชเจ้าฟ้ามหาวชิราลงกรณ สยามมกุฎราชกุมาร

ขอขอบคุณฝ่ายวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ ให้การอนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ตลอดจนให้ความรู้ทางด้านวิชาการตลอดระยะเวลาการศึกษา

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ..... **ก**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... **ข**

กิตติกรรมประกาศ ..... **ค**

สารบัญ ..... **ง**

สารบัญรูปภาพ ..... **ฉ**

สารบัญตาราง ..... **ช**

บทที่ 1 บทนำ **1**

ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1

วัตถุประสงค์โครงการ 2

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม **3**

2.1 ข้อมูลทั่วไปของแมงมุม *L. rufescens* 3

2.2 การกระจายตัวของแมงมุม *L. rufescens* 5

2.3 แมงมุม *L. rufescens* ในประเทศไทย 6

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ **8**

3.1. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี 8

3.2. ตัวอย่างแมงมุม 9

3.3. ขั้นตอนการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการ 9

3.4. ขั้นตอนการวิเคราะห์ผล 13

บทที่ 4 ผลการศึกษา **15**

4.1. ผลการรวบรวมตัวอย่าง 15

4.2. ผลการสกัดดีเอ็นเอ 16

4.3. ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *COI* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) 16

4.4. ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* 17

4.5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการสร้างแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) 17

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการศึกษา 19

เอกสารอ้างอิง 20

ภาคผนวก 22

ภาคผนวกที่ 1 ภาพการเก็บตัวอย่างภาคสนาม 23

ภาคผนวกที่ 2 ผลการตรวจสอบคุณภาพของสารสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* จำนวน 72 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis 24

ภาคผนวกที่ 3 ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน *COI* จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ของตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* จำนวน 72 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis 29

ภาคผนวกที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* กับฐานข้อมูลใน Genbank 34

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 แมงมุม *L. rufescens* (Copyright© 2015 James W. Beck)..... 3
ภาพที่ 2 ส่วนของ carapace ที่บริเวณ cephalothorax ที่มีสีน้ำตาลเข้มลวดลายลักษณะคล้ายไวโอลิน และดวงตา 3 คู่ที่เรียงตัวกันเป็นรูปตัว U 4
ภาพที่ 3 ท่าพักของแมงมุม *L. rufescens* (Copyright© 2018 Jeff Hollenbeck)..... 4
ภาพที่ 4 การกระจายพันธุ์ของแมงมุม *L. rufescens* ทั่วโลก โดยบริเวณสีเขียว แสดงถึง ถิ่นกำเนิดดังเดิมของแมงมุม *L. rufescens*, จุดสีแดง แสดงถึง บริเวณที่ถูกบุกรุกโดยแมงมุม *L. rufescens* (Nentwig et al., 2017)..... 5
ภาพที่ 5 แผนที่ลำดับการกระจายพันธุ์ และ Phylogenetic tree ของแมงมุม *L. rufescens* (Luo and Li, 2015) 6
ภาพที่ 6 แผนที่ประเทศไทย แสดงถึงความใกล้กันของถ้ำวังพระ (จุดสีแดง) และทางรถไฟสายมรณะ (เส้นประ)..... 7
ภาพที่ 7 สถานที่ทำการรวบรวมตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* ในประเทศไทย จุดสีม่วง: ถ้ำวังพระ จ.กาญจนบุรี, จุดสีน้ำเงิน: ถ้ำฝาโถ จ.ราชบุรี, จุดสีเขียว: ถ้ำสาริกา จ.ราชบุรี, จุดสีเหลือง: เขาถ้ำกุญชร จ.กาญจบุรี และ จุดสีแดงเข้ม: ถ้ำน้ำมนต์ฤาษี และถ้ำโกษา จ.ประจวบคีรีขันธ์..... 15
ภาพที่ 8 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์แบบ Bayesian inference (BI) โดยแถบสีแดงด้านข้างแสดงตัวอย่างที่อยู่ใน lineage A ,แถบสีน้ำเงินแสดงตัวอย่างที่อยู่ใน lineage B จุดสีม่วง แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวมาจากถ้ำวังพระ, จุดน้ำเงิน แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวมาจากถ้ำสาริกา, จุดสีเขียว แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวมาจากถ้ำฝาโถ, จุดสีแดง แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวมาจากเขาถ้ำกุญชร และตัวเลขบน node แสดงค่า posterior probability..... 18

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ของคู่ไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198 ในแต่ละปฏิกิริยา 11
ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่อง thermo cycler 12
ตารางที่ 3 สถานที่ที่ทำการรวบรวมตัวอย่าง 16

บทที่ 1 บทนำ

ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

แมงมุมสกุล *Loxosceles* Heineken and Lowe, 1832 หรือแมงมุมสันโดษสีน้ำตาล จัดอยู่ในวงศ์ Sicariidae Keyserling, 1880 แมงมุมชนิดนี้เป็นแมงมุมที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากมีพิษร้ายแรงต่อผิวหนัง โดย 10 % ของผู้ที่ถูกแมงมุมสกุลนี้จะเกิดบาดแผลอักเสบ และไหม้อย่างรุนแรง เรียกอาการทางการแพทย์ว่า Loxoscelism (David et al., 2006) โดยแมงมุมสกุล *Loxosceles* มีการกระจายตัวในแถบเขตร้อน และเขตอบอุ่นทั่วโลก ในปัจจุบันมีการสำรวจพบแมงมุมสกุลนี้แล้วจำนวน 139 ชนิด (World Spider Catalog, 2019) โดยมีบางชนิดที่พบการกระจายพันธุ์ทั่วโลก คือ *Loxosceles rufescens* Dufour, 1820

L. rufescens หรือแมงมุมสันโดษเมดิเตอร์เรเนียน เป็นแมงมุมที่มีถิ่นกำเนิดในแถบบริเวณทะเลเมดิเตอร์เรเนียน โดยในภายหลังพบว่ามีการกระจายพันธุ์ไปทั่วโลก ซึ่งมีข้อสันนิษฐานว่า อาจเกิดจากความบังเอิญผ่านทางการคมนาคม และการเคลื่อนย้ายถิ่นของมนุษย์ (Luo and Li, 2015) ในปีค.ศ. 2016 ได้มีการรายงานการค้นพบแมงมุม *L. rufescens* ครั้งแรกในประเทศไทย ณ ถ้ำวังพระ จังหวัดกาญจนบุรี (Chomphuphuang et al., 2016) ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าว ได้สันนิษฐานว่าแมงมุม *L. rufescens* ที่พบในประเทศไทยนั้น อาจจะแพร่กระจายมาจากประเทศญี่ปุ่นขณะสงครามโลกครั้งที่ 2 แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาทางอณูชีววิทยาร่วมด้วย โดยหลังจากปีค.ศ. 2016 ทางคณะวิจัยยังทำการศึกษา และค้นหาแมงมุม *L. rufescens* ต่อในอีกหลายจังหวัดโดยเน้นในภาคใต้และภาคตะวันออก ซึ่งในปัจจุบันมีการพบแมงมุม *L. rufescens* นอกเหนือจากจังหวัดกาญจนบุรีอีก 2 จังหวัด คือ จังหวัดราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ จึงมีคำถามเกี่ยวกับแมงมุมชนิดนี้ในประเทศไทยหลายประเด็น เช่น แมงมุมดังกล่าวเป็นแมงมุม *L. rufescens* จริงหรือไม่ และการที่พบแมงมุมชนิดนี้ในหลายจังหวัดของประเทศไทย เกิดจากการบุกรุก (introduction) รูปแบบใด

ยีน Cytochrome *c* oxidase I (*COI*) เป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย โดยยีนบริเวณ *COI* ได้รับความยอมรับว่าเหมาะสมที่จะใช้ในการจำแนกแมงมุมได้ถึงระดับชนิดพันธุ์ (Barrett and Hebert, 2005) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษายีนดังกล่าวในแมงมุมชนิดนี้ค่อนข้างมาก ทำให้มีข้อมูลที่จะนำใช้ในการวิเคราะห์มากพอ จึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของโครงการ คือ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมงมุม *L. rufescens* ในประเทศไทยด้วยบางส่วนของยีน *COI* โดยผลการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นฐานข้อมูลเบื้องต้นของแมงมุม *L.rufescens* ในประเทศไทย และอาจมีประโยชน์ในการพัฒนาการรักษาผู้ป่วยที่ถูกแมงมุมชนิดนี้กัดในประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์โครงการ

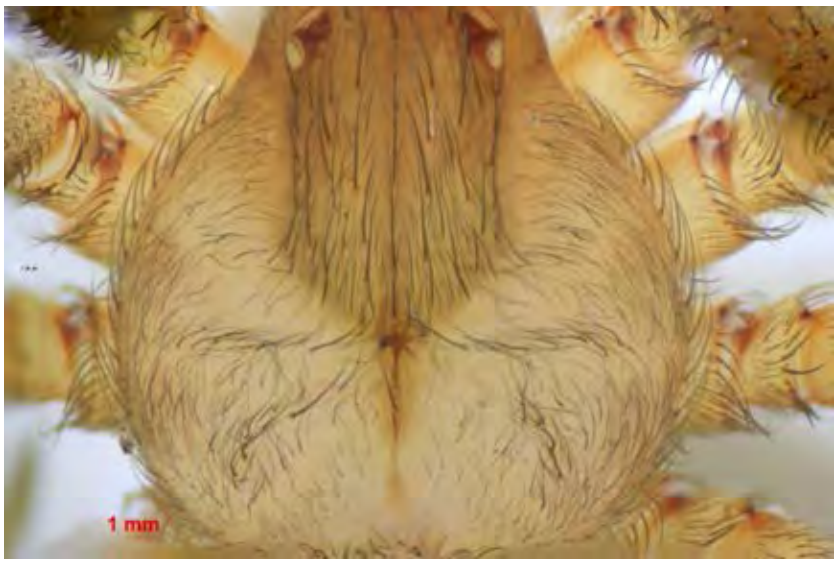
เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมงมุม *L. rufescens* ในประเทศไทยด้วยบางส่วนของยีน *COI*

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ข้อมูลทั่วไปของแมงมุม *L. rufescens*

แมงมุม *L. rufescens* (ภาพที่ 1) เป็นแมงมุมขนาดกลาง มีความยาวประมาณ 7-8 มิลลิเมตร มี carapace หรือ แผ่น cuticle แข็งบริเวณส่วน cephalothorax แบน และมีด้านยาวยาวกว่าด้านกว้าง ลักษณะเด่น คือส่วนของ carapace จะมีสีน้ำตาลเข้ม ลวดลายลักษณะคล้ายไวโอลิน มีตา 6 ตา โดยเรียงตัวเป็นคู่รูปตัว U ดังภาพที่ 2 และมีขาเรียว ยาว (Chomphuphuang et al., 2016; Nentwig et al.,2017) ลักษณะที่สำคัญอีกอย่างคือ ท่าพักของแมงมุม *L. rufescens* มีขาลักษณะเอียง มีอัตราส่วนของ femur และ tibia ค่อนข้างเท่ากัน จึงเป็นที่มาของชื่อสกุล *Loxosceles* ซึ่งมีเสียงพ้องกับคำว่า isosceles ที่มีความหมายว่าสามเหลี่ยมหน้าจั่ว โดยสังเกตได้ในภาพที่ 3

ภาพที่ 1 แมงมุม *L. rufescens* (Copyright© 2015 James W. Beck)

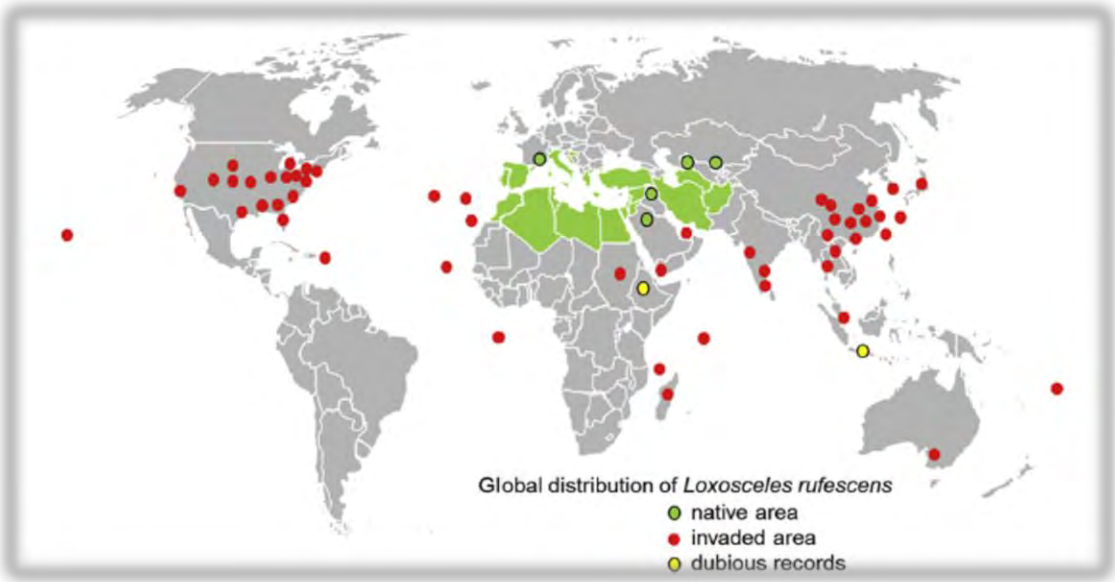


ภาพที่ 2 ส่วนของ carapace ที่บริเวณ cephalothorax ที่มีสีน้ำตาลเข้มลวดลายลักษณะคล้ายไวโอลิน และดวงตา 3 คู่ที่เรียงตัวกันเป็นรูปตัว U

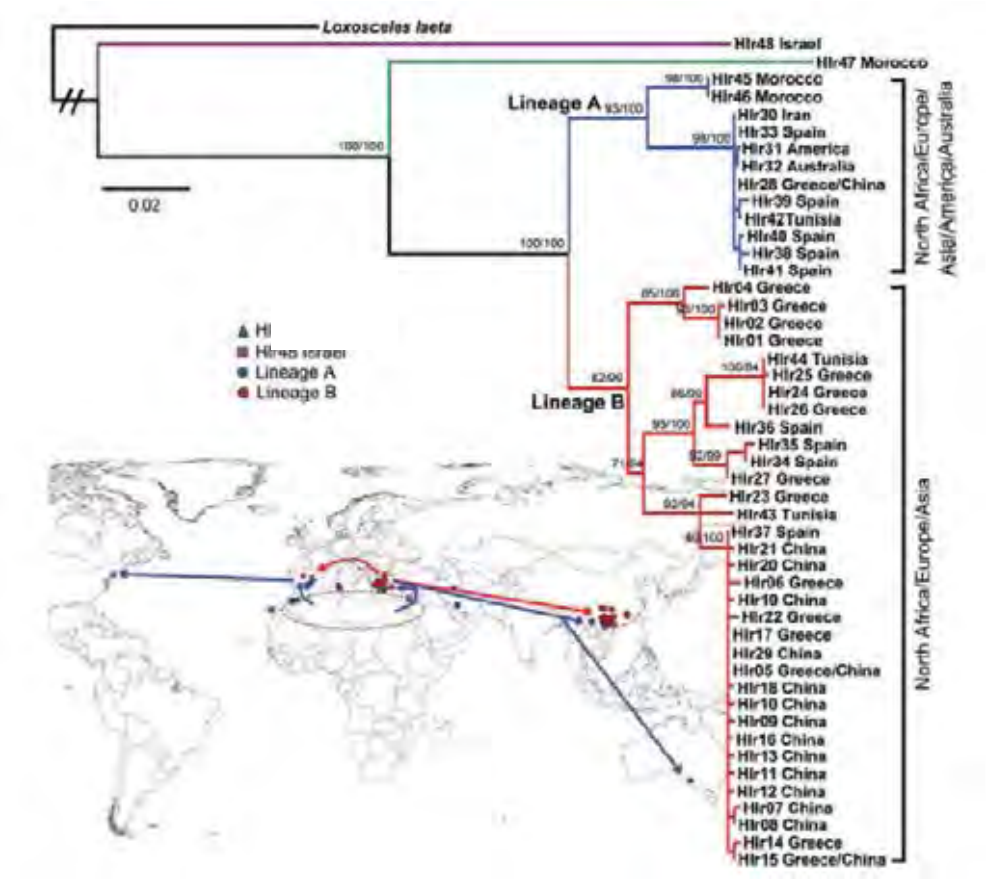
ภาพที่ 3 ท่าพักของแมงมุม *L. rufescens* (Copyright© 2018 Jeff Hollenbeck)

2.2 การกระจายตัวของแมงมุม *L. rufescens*

แมงมุม *L. rufescens* มีถิ่นกำเนิดดังเดิมอยู่ทางตอนเหนือของทวีปแอฟริกา และตอนใต้ของทวีปยุโรป บริเวณรอบ ๆ ทะเลเมดิเตอร์เนียน ตามพื้นที่สีเขียวในภาพที่ 4 (Nentwig et al., 2017) แต่ภายหลังพบการกระจายตัวทั่วโลกในเขตร้อน และเขตอบอุ่น ตามจุดสีแดงในภาพที่ 4 จากการศึกษาของ Luo และ Li ในปี 2015 ได้สันนิษฐานว่าการกระจายตัวของแมงมุม *L. rufescens* เกิดจากความบังเอิญผ่านทางคมนาคมและการเคลื่อนย้ายถิ่นฐานของมนุษย์ และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาทางอณูชีววิทยา โดยใช้ยีน *COI* และ *16S* ของไมโทคอนเดรีย จากผลการศึกษาดังกล่าวระบุว่าแมงมุม *L. rufescens* ทั้งโลกมีการกระจายตัวออกจากถิ่นกำเนิดเดิม 2 mitochondrial lineage โดยเส้นทางแรก (Lineage A) แมงมุม *L. rufescens* กระจายตัวออกจากทวีปแอฟริกาเหนือไปยังทวีปยุโรปทางเหนือของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน จากนั้นมีบางส่วนกระจายตัวไปยังทวีปอเมริกาและอีกส่วนกระจายตัวไปยังทวีปเอเชีย และทวีปออสเตรเลียตามลำดับ เส้นทางที่สอง (Lineage B) แมงมุม *L. rufescens* กระจายตัวออกจากทวีปแอฟริกาเหนือไปยังทวีปยุโรปเหนือทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และกระจายตัวต่อไปยังทวีปเอเชีย ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 4 การกระจายพันธุ์ของแมงมุม *L. rufescens* ทั่วโลก โดยบริเวณสีเขียว แสดงถึง ถิ่นกำเนิดดังเดิมของแมงมุม *L. rufescens* และจุดสีแดง แสดงถึง บริเวณที่ถูกบุกรุกโดยแมงมุม *L. rufescens* (Nentwig et al., 2017)



ภาพที่ 5 แผนที่ลำดับการกระจายพันธุ์ และ Phylogenetic tree ของแมงมุม *L. rufescens* (Luo and Li, 2015)

2.3 แมงมุม *L. rufescens* ในประเทศไทย

ในปี ค.ศ. 2016 มีการศึกษาของคุณนรินทร์ ชมภูพวงและคณะ ได้พบแมงมุม *L. rufescens* ครั้งแรกในประเทศไทย ณ ถ้ำวังพระ จังหวัดกาญจนบุรี โดยการศึกษาดังกล่าวสันนิษฐานว่าแมงมุมชนิดนี้น่าจะเข้ามาในประเทศไทยในช่วงสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 เนื่องจากบริเวณถ้ำวังพระ อยู่ใกล้กับทางรถไฟสายมรณะ ดังแผนที่ในภาพที่ 6 ซึ่งทางรถไฟสายดังกล่าวถูกสร้างขึ้นในช่วงสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยมีการขนย้ายวัสดุ และยุทโธปกรณ์ต่าง ๆ จากประเทศญี่ปุ่นผ่านทางเส้นทางนี้ จึงอาจเป็นไปได้ว่าอาจนำพาแมงมุม *L. rufescens* จากประเทศญี่ปุ่นเข้ามาในประเทศไทยด้วยความบังเอิญ อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวเป็นการศึกษาเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงเท่านั้น ประกอบกับมีรายงานการพบสายพันธุ์ซ่อนเร้น หรือ cryptic species ของแมงมุม *L. rufescens* (Duncan et al., 2010) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทางอณูชีววิทยาเกี่ยวกับ *L. rufescens* ในประเทศไทยเป็นอย่างมาก

ภาพที่ 6 แผนที่ประเทศไทย แสดงถึงความใกล้กันของถ้ำวังพระ (จุดสีแดง) และทางรถไฟสายมรณะ (เส้นประ)

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ

3.1. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุและอุปกรณ์

- กรรไกรผ่าตัด
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube)
- ถุงมือยาง
- กล่องโฟม
- ขวดรูปชมพู่
- ขวดดูแรน
- Automatic micropipette P2, P10, P20, P200 และP1000 (HWLAB Co., Ltd., Thailand)
- Electrophoresis chamber and power supply (Cosmo Bio Co., Ltd., USA)
- Analytical balances (Sarorius, Germany)
- Microwave (Samsung, Korea)
- DNA thermal cycle (Biometra, Germany)
- -20 °C Freezer
- Digital dry bath incubator (Major Science, Taiwan)
- Vortex mixture model (Hangzhou Miu Instiuments Co., Ltd)
- Centrifuge model (Hangzhou miu instrument Co., Ltd)
- Mini centrifuge combination series (Hangzhou miu instrument Co., Ltd)
- Ultraviolet Transilluminator (Spectroline®, USA)
- Mini pestle

สารเคมี

- Genomic DNA Extraction (Tiangen, China)
- Agarose (Nacalai tesque,Inc,Japan)
- 10 μM LCO1490 และ HCO2198 (forward primer และ reverse primer)
- Red safe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Inc.)
- 100 μg/μl 1000 bp DAN ladder
- 100 μg/μl 100 bp DAN ladder
- 10X PCR buffer
- 10 mM Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix
- 5 unit/μl Taq polymerase
- 50 mM MgCl2
- 1X TBE buffer
- Sterile distilled water
- HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Life Biomedical Limited, England)
- BlueJuice™ Gel Loading Buffer (6X) (Invitrogen, USA)

3.2. ตัวอย่างแมงมุม

จากการสำรวจก่อนหน้า ผู้วิจัยจึงเลือกเก็บ และรวบรวมตัวอย่างจาก 3 จังหวัด ได้แก่ จ.กาญจนบุรี, จ.ราชบุรี และ จ.ประจวบคีรีขันธ์

3.3. ขั้นตอนการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการ

3.3.1. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* ที่ยังไม่ได้สกัดดีเอ็นเอ มาทำการสกัดดีเอ็น โดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Extraction (Tiangen, China) ตามคู่มือการสกัด

ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ จากนั้นนำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ -20 ℃

3.3.2. ตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของสารสกัดดีเอ็นเอเบื้องต้นด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

นำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดข้างต้น มาทำการตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้นก่อนนำไปวิเคราะห์ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.5 % agarose gel มีขั้นตอน ดังนี้ ชั่งน้ำหนักผง agarose จำนวน 1.5 กรัม ลงในขวดดูแรน จากนั้นเติม 1X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในขวดดูแรนเช่นกัน และนำขวดดูแรนไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ จนผง agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกับ TBE buffer พักไว้ให้พออุ่น ต่อมาทำการเติม Red safe™ Nucleic Acid Staining solution ลงไป 5 ไมโครลิตร ต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยที่ Red safe™ Nucleic Acid Staining solution จะมีคุณสมบัติในการแทรกตัวจับกับคู่เบสที่อยู่ภายในสายดีเอ็นเอได้ และเมื่อส่องภายใต้แสง ultraviolet จะปรากฏแถบเรืองแสงของดีเอ็นเอ ทำการเทสารละลายในขวดดูแรนลงในถาดเทเจลที่มี plate และ comb เสียบไว้เรียบร้อย รอจน agarose gel แข็งตัว ประมาณ 25 นาที แล้วจึงทำการดึง comb ออก และยก plate ที่มี agarose gel ที่แข็งตัวแล้วลงไปใน Electrophoresis chamber จากนั้นเท 1X TBE buffer ให้ท่วม agarose gel ต่อมาทำการผสม PCR product กับ gel loading buffer ในสัดส่วน 2:1 บนพาราฟิล์ม แล้วหยอดลงในซี่ comb บน agarose gel และใช้ 1000 bp DAN ladder ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เป็น marker ในการเทียบขนาด เริ่มการทำงานของเครื่อง electrophoresis โดยกำหนดให้ปริมาณของกระแสไฟฟ้า 300 มิลลิแอมป์ และความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ agarose gel ไปส่องภายใต้แสง ultraviolet ด้วยเครื่อง UV transilluminator หากสามารถสารสกัดดีเอ็นเออยู่ในคุณภาพที่ใช้งานได้ จะเห็นแถบเรืองแสงสีเข้มและมีลักษณะจางเป็นแนวยาวลงมา จากนั้นเก็บรักษาสารสกัดดีเอ็นเอภายใต้อุณหภูมิ -20 ℃

3.3.3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *COI* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

นำสารสกัดดีเอ็นเอของแมงมุมที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน Cytochrome Oxidase I (*COI*) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') และ HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer *et al.*, 1994) เป็นต้นแบบการในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรดังตารางที่ 1 และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง thermo cycler โดยกำหนดสภาวะดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ของคู่ไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198 ในแต่ละปฏิกิริยา

สาร	**ปริมาตร (µl)**
DNA template	2
0.2 µM forward primer	0.5
0.2 µM reverse primer	0.5
10X PCR buffer	2.5
10 mM Deoxynucleotide (dNTP) solution mix	0.1
5 units/µl *Taq* DNA Polymerase	0.2
50 mM $MgCl_2$	1.0
Sterile distilled water	18.2
	25

ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่อง thermo cycler

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	94	5:00	1
Denaturation	94	0:45	47
Annealing	50	1:00	
Extension	72	1:00	
Final extension	72	7:00	1

3.3.4. การตรวจสอบขนาดของ PCR Product ของบางส่วนของยีน *COI* ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบขนาด และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยจะใช้ 1.5% agarose gel มีขั้นตอน ดังนี้ ชั่งน้ำหนักผง agarose จำนวน 1.5 กรัม ลงในขวดดูแรน จากนั้นเติม 1X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในขวดดูแรนเช่นกัน และนำขวดดูแรนไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ จนผง agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกับ TBE buffer พักไว้ให้พออุ่น ต่อมาทำการเติม Red safe™ Nucleic Acid Staining solution ลงไป 5 ไมโครลิตร ต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการเทสารละลายในขวดดูแรนลงในถาดเทเจลที่มี plate และ comb เสียบไว้เรียบร้อย รอจน agarose gel แข็งตัว ประมาณ 30 นาที แล้วจึงทำการดึง comb ออก และยก plate ที่มี agarose gel ที่แข็งตัวแล้วลงไปใน Electrophoresis chamber จากนั้นเท 1X TBE buffer ให้ท่วม agarose gel ต่อมาทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับ gel loading buffer ในสัดส่วน 2:1 บนพาราฟิล์ม แล้วหยอดลงในซี่ comb บน agarose gel และใช้ 100 bp DAN ladder ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อเป็น marker ในการเทียบขนาด เริ่มการทำงานของเครื่อง electrophoresis โดยกำหนดให้ปริมาณของกระแสไฟฟ้า 300 มิลลิแอมป์ และความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำ agarose gel ไปส่องภายใต้แสง ultraviolet ด้วยเครื่อง UV transilluminator หากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* ได้ จะปรากฏแถบเรืองแสงของดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีขนาดประมาณ 700 bp

3.3.5. Purification และ DNA sequencing ของบางส่วนของยีน *COI*

ทำการคัดเลือกตัวอย่างจากผลการเพิ่มปริมาณยีน *COI* ที่คาดว่าจะให้ผลการศึกษาได้ของในแต่ละพื้นที่ มาทำการ Purification โดยใช้ HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Life Biomedical Limited, England) และส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

3.4. ขั้นตอนการวิเคราะห์ผล

3.4.1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการสร้างแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

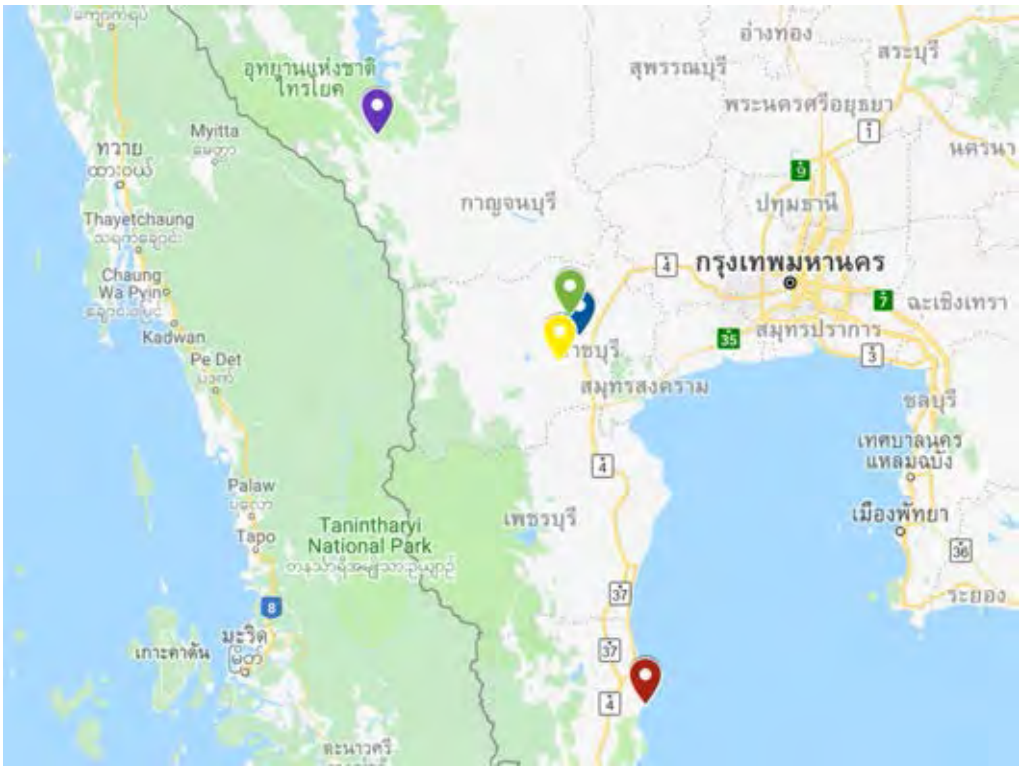
เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างแล้ว ทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยสายตา โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar et al., 2018) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (Altschul et al., 1990) ต่อมานำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาทำการจัดเรียง (multiple alignment) ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์งานวิจัยของคุณ Luo and Li และ Massa และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษาแมงมุม *L. rufescens* จากประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก เช่น จีน, โมรอคโค, สเปน, กรีก, ตูนิเซีย และอิหร่าน ผ่านโปรแกรม MEGA X โดยใช้ขั้นตอนวิธีแบบ clastalW และกำหนด outgroup ของการวิเคราะห์ คือ *L. taino* และ *L. cubana* จากนั้นนำชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำการคัดเลือกดีเอ็นเอโมเดลที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้โปรแกรม JModeltest (Posada, 2008) ต่อจากนั้นจะนำข้อมูลทั้งหมดเข้าสู่โปรแกรม Beauti (Drummond and Rambaut, 2007) เพื่อสร้างไฟล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยกำหนดค่า ดังนี้ เทคนิคการสุ่มตัวอย่างแบบ Markov Chain Monte Carlo (MCMC) จำนวนรอบการค้นหา 2,000,000,000 รอบ และทำการเก็บข้อมูลทุก ๆ 200,000 รอบ จากนั้นจะนำไฟล์ดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Bayesian inference ผ่าน The CIPRES Science Gateway (www.phylo.org) (Miller et al., 2010) โดยใช้

ขั้นตอนวิธีแบบโปรแกรม Beast จากนั้นเมื่อการวิเคราะห์เสร็จสิ้น จะนำข้อมูลไปทำการ burn-in 10% เพื่อลดความเคลื่อน เพื่อตัดการการสุ่มหาตัวอย่างในช่วงแรกที่มีความไม่เสถียรออก โดยใช้โปรแกรม Tracer (Rambaut et al., 2018) และขั้นตอนสุดท้ายจะนำข้อมูลทั้งหมดไปสร้างออกมาเป็นภาพแผนภูมิวงศ์วานวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม Figtree (Rambaut ,2009)

บทที่ 4 ผลการศึกษา

4.1. ผลการรวบรวมตัวอย่าง

ผู้วิจัยได้เลือกวิเคราะห์ตัวอย่างจาก 3 จังหวัด ได้แก่ จ.กาญจนบุรี จ.ราชบุรี และ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ประกอบด้วยถ้ำหินปูนทั้งหมด 6 ถ้ำ โดยมีตัวอย่างรวม 153 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 7 และตารางที่ 3 (ภาคผนวก 1)



ภาพที่ 7 สถานที่ทำการรวบรวมตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* ในประเทศไทย จุดสีม่วง: ถ้ำวังพระ จ.กาญจนบุรี, จุดสีน้ำเงิน: ถ้ำฝาโถ จ.ราชบุรี, จุดสีเขียว: ถ้ำสาริกา จ.ราชบุรี, จุดสีเหลือง: เขาถ้ำกุญชร จ.กาญจบุรี และ จุดสีแดงเข้ม: ถ้ำน้ำมนต์ฤาษี และถ้ำโกษา จ.ประจวบคีรีขันธ์

ตารางที่ 3 สถานที่ที่ทำการรวบรวมตัวอย่าง

ลำดับ	สถานที่	พิกัด	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)
1	ถ้ำวังพระ จ.กาญจนบุรี (WP)	14°15'03.7"N 99°04'29.4"E	29
2	ถ้ำฝาโถ จ.ราชบุรี (FT)	13°34'32.95"N 99°46'29.38"E	23
3	ถ้ำสาริกา จ.ราชบุรี (SR)	13°38'48.6"N 99°44'12.9"E	45
4	เขาถ้ำกุญชร จ.ราชบุรี (KC)	13°29'20.7"N 99°42'16.7"E	28
5	ถ้ำโกษา จ.ประจวบคีรีขันธ์ (KS)	12°20'20.5"N 99°59'54.7"E	20
6	ถ้ำน้ำมนต์ฤาษี จ.ประจวบคีรีขันธ์ (NM)	12°20'18.51"N 99°59'50.95"E	8
			153

4.2. ผลการสกัดดีเอ็นเอ

นำแมงมุม *L. rufescens* จำนวน 72 ตัวอย่าง มาทำการสกัดดีเอ็นเอ พบว่าทุกตัวอย่างมีสารสกัดดีเอ็นเอที่อยู่ในคุณภาพเหมาะสม ที่จะนำไปทำการวิเคราะห์ต่อ โดยแสดงให้เห็นจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก 2)

4.3. ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *COI* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

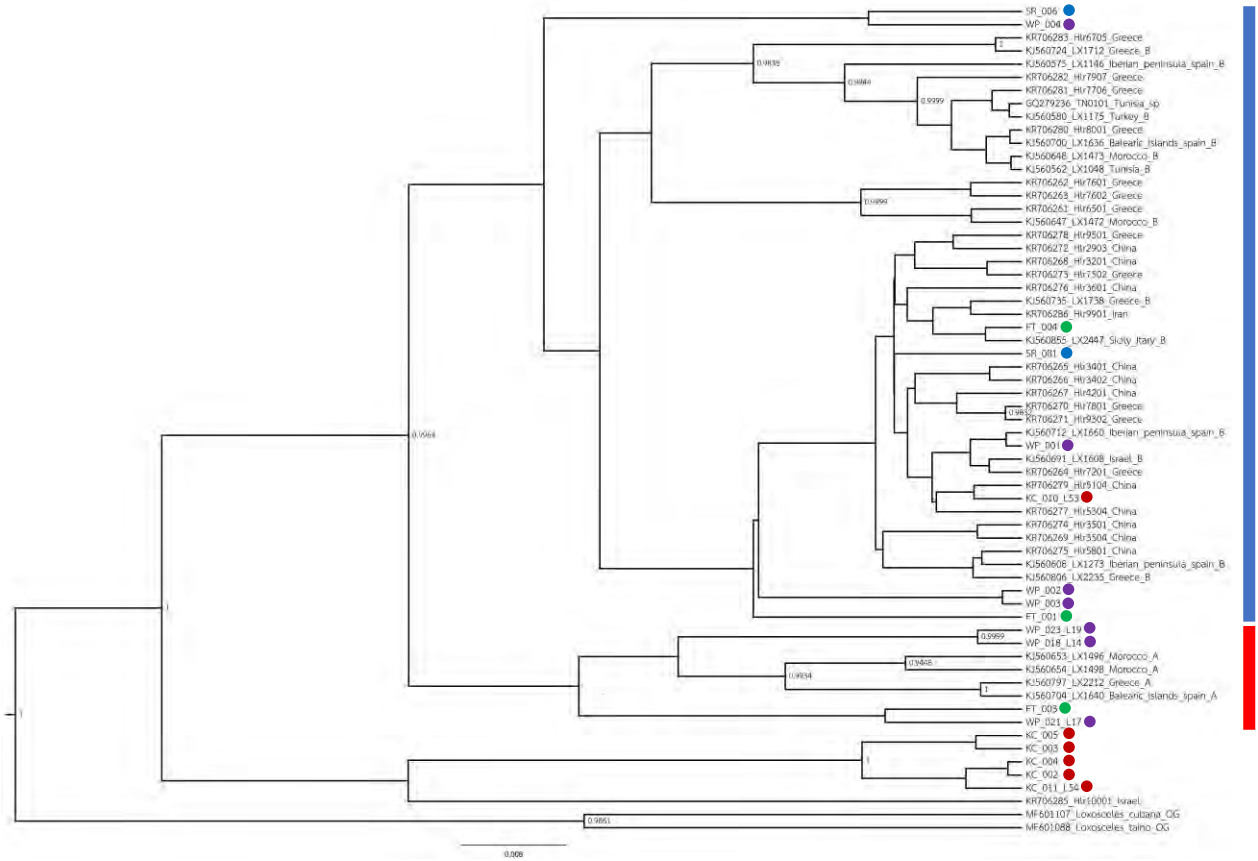
เมื่อนำสารสกัดดีเอ็นเอแมงมุม *L. rufescens* ทั้งหมด มาทำการเพิ่มปริมาณบริเวณยีน *COI* ด้วยปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *COI* ได้ครบทุกตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *COI* ได้ จะมีความยาวผลิตภัณฑ์อยู่ที่ประมาณ 700 bp (ภาคผนวกที่ 3) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกบางตัวอย่างไปวิเคราะห์ต่อจำนวน 34 ตัวอย่าง

4.4. ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI*

จากตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* ที่ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 34 ตัวอย่าง มีเพียง 18 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ชัดเจน จากนั้นเพื่อยืนยันชนิดของตัวอย่างแมงมุม ผู้วิจัยจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของสิ่งมีชีวิตก่อนหน้าใน Genbank ผ่านโปรแกรม MEGA X ซึ่งผลการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ได้ทำการศึกษาแล้วก่อนหน้า พบว่า แมงมุม *L. rufescens* ที่พบในประเทศไทยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับแมงมุม *L. rufescens* ที่มีการบันทึกไว้ก่อนหน้า โดยมีค่า Sequencing identity (%identity) ระหว่าง 90% ถึง 100% (ภาคผนวก 4)

4.5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการสร้างแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

จากการทำการค้นหาดีเอ็นเอโมเดลที่เหมาะสม พบว่าดีเอ็นเอโมเดลที่เหมาะสมคือ HKY+G จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Bayesian inference ได้แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการดังภาพที่ 8 จากแผนภูมิพบว่า ตัวอย่าง *L. rufescens* ที่พบในประเทศไทยทั้งหมดอยู่เป็น monophyletic clade กับ *L. rufescens* ประเทศอื่น ๆ โดยภายในสายวิวัฒนาการดังกล่าว มีการแบ่งออกเป็น 2 lineage ด้วยค่า posterior probability เท่ากับ 0.9964 โดยพบว่าในสายวิวัฒนาการที่ 1 (lineage A) มีตัวอย่างจากถ้ำวังพระ(WP) และถ้ำฝาโถ(FT) และในสายวิวัฒนาการที่ 2 (lineage B) มีตัวอย่างจากถ้ำวังพระ(WP), ถ้ำฝาโถ(FT), ถ้ำสาริกา(SR) และเขาถ้ำกุญชร(KC) นอกจากนี้ยังพบสายวิวัฒนาการอีกสายที่แยกออกจาก monophyletic clade ของ *L. rufescens* ด้วยค่า posterior probability เท่ากับ 1 โดยพบตัวอย่างจากเขาถ้ำกุญชร(KC) อยู่ในสายวิวัฒนาการนี้



ภาพที่ 8 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์แบบ Bayesian inference (BI) โดยแถบสีแดงด้านข้างแสดงตัวอย่างที่อยู่ใน lineage A ,แถบสีน้ำเงินแสดงตัวอย่างที่อยู่ใน lineage B จุดสีม่วง แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวมาจากถ้ำวังพระ, จุดน้ำเงิน แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวมาจากถ้ำสาริกา, จุดสีเขียว แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวมาจากถ้ำฝาโถ, จุดสีแดง แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวมาจากเขาถ้ำกุญชร และตัวเลขบน node แสดงค่า posterior probability

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลใน Genbank และผลจากแผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ ให้ผลที่สอดคล้องกัน คือ แมงมุม *L. rufescens* ที่พบในประเทศไทย น่าจะเป็นแมงมุม *L. rufescens* จริง ตามการศึกษาด้วยสัณฐานวิทยาของคุณนรินทร์ ชมภูพวง และคณะ เนื่องจากแมงมุม *L. rufescens* ที่พบในประเทศไทย ถูกจัดเป็น monophyletic clade กับแมงมุม *L. rufescens* ทั่วโลก และมีการแยกออกมาจาก outgroup (*L. taino* และ *L. cubana*) อย่างชัดเจน

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุม *L. rufescens* ในประเทศไทย พบว่า ถูกแบ่งสายวิวัฒนาการเป็น 2 สายวิวัฒนาการ หรือ lineage ด้วยค่า posterior probability ที่สูง โดยตัวอย่างจากถ้ำวังพระ และถ้ำฝาโถ พบทั้ง 2 lineage ซึ่งอาจสะท้อนให้เห็นถึงการบุกรุกเข้ามาประเทศไทยมากกว่า 1 ครั้ง หรือ multiple introduction ของแมงมุมชนิดนี้ในประเทศไทย ทั้งนี้จำเป็นจะต้องมีการศึกษานิวเคลียร์ดีเอ็นเอ หรือการวิเคราะห์ founder population ประกอบด้วย จึงจะสามารถตอบได้ว่า เกิดจาก multiple introduction จริง นอกจากนี้ยังพบสายวิวัฒนาการที่แยกมาจาก 2 lineage ดังกล่าวด้วยค่า posterior probability ที่สูงที่สุด โดยมีตัวอย่างจากเขาถ้ำกุญชรอยู่ภายในสายวิวัฒนาการนี้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแมงมุมที่เขาถ้ำกุญชร อาจมีชนิดพันธุ์ซ่อนเร้น หรือ cryptic species ก็เป็นได้ ทั้งนี้จำเป็นต้องอาศัยการศึกษาทางสัณฐานวิทยาร่วมด้วย จึงจะสามารถทราบชนิดของแมงมุมในเขาถ้ำกุญชรได้อย่างแน่ชัด

ทั้งนี้มีการรายงานศึกษาในงูมีพิษ แสดงให้เห็นว่าระดับความรุนแรงของพิษภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน แต่อยู่คนละสายวิวัฒนาการ อาจมีความรุนแรงของพิษที่แตกต่างกันได้ (Warrell et al., 2013) ดังนั้นการศึกษาอย่างลึกซึ้งทั้งในแง่สัณฐานวิทยา และอณูชีววิทยาของแมงมุม *L. rufescens* ทั้ง 2 สายวิวัฒนาการจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะการศึกษาถึงระดับความรุนแรงของพิษของแมงมุม *L. rufescens* ทั้ง 2 สายวิวัฒนาการ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยที่ถูกแมงมุมชนิดนี้กัดในประเทศไทยอย่างถูกวิธี และการให้ความรู้กับประชาชนที่ถูกต้องเกี่ยวกับแมงมุมชนิดนี้ในประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410.

Barrett, R. D. H., & Hebert, P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, *83*(3), 481–491.

Chomphuphuang, N., Sureerat Deowanish, Songsangchote, C., Sivayyapram, V., Thongprem, P., & Warrit, N. (2016). The Mediterranean recluse spider Loxosceles rufescens (Dufour, 1820) (Araneae: Sicariidae) established in a natural cave in Thailand. *Journal of Arachnology*, *44*, 142–147.

David, L., Swanson, M., Richard, S., & Vetter, M. (2006). Loxoscelism. *Clinics in Dermatology*, *24*(3), 213–221.

Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, *7*(1), 214.

Duncan, R. P., Rynerson, M. R., Ribera, C., & Binford, G. J. (2010). Diversity of Loxosceles spiders in Northwestern Africa and molecular support for cryptic species in the Loxosceles rufescens lineage. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *55*(1), 234–248.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, *3*(5), 294–299.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549.

Luo, Y., & Li, S. (2015). Global invasion history of the Mediterranean recluse spider: a concordance with human expansion. *Ecography*, *38*(11), 1080–1089.

Massa, M., Planas, E., & Carles, R. (2018). The Mediterranean as a melting pot: Phylogeography of Loxosceles rufescens (Sicariidae) in the Mediterranean Basin. *Plos One*, *1832*, 1–10.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Gateway computing environments workshop (GCE)* (pp. 1–8). Ieee.

Nentwig, W., Pantini, P., & Vetter, R. S. (2017). Distribution and medical aspects of Loxosceles rufescens, one of the most invasive spiders of the world (Araneae: Sicariidae). *Toxicon*, *132*, 19–28.

Pekár, S., Bočánek, O., Michálek, O., Petráková, L., Haddad, C. R., Šedo, O., & Zdráhal, Z. (2018). Venom gland size and venom complexity—essential trophic adaptations of venomous predators: A case study using spiders. *Molecular Ecology*, *27*(21), 4257–4269.

Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(7), 1253–1256.

Rambaut, A. (2009). FigTree, version 1.3. 1. *Computer Program Distributed by the Author, Website: Http://Treebioedacuk/Software/Figtree/[Accessed January 4, 2011]*.

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, *67*(5), 901–904.

Warrell, D. A., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., & Williams, D. (2013). New approaches & technologies of venomics to meet the challenge of human envenoming by snakebites in India. *The Indian Journal of Medical Research*, *138*(1), 38–59. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24056555

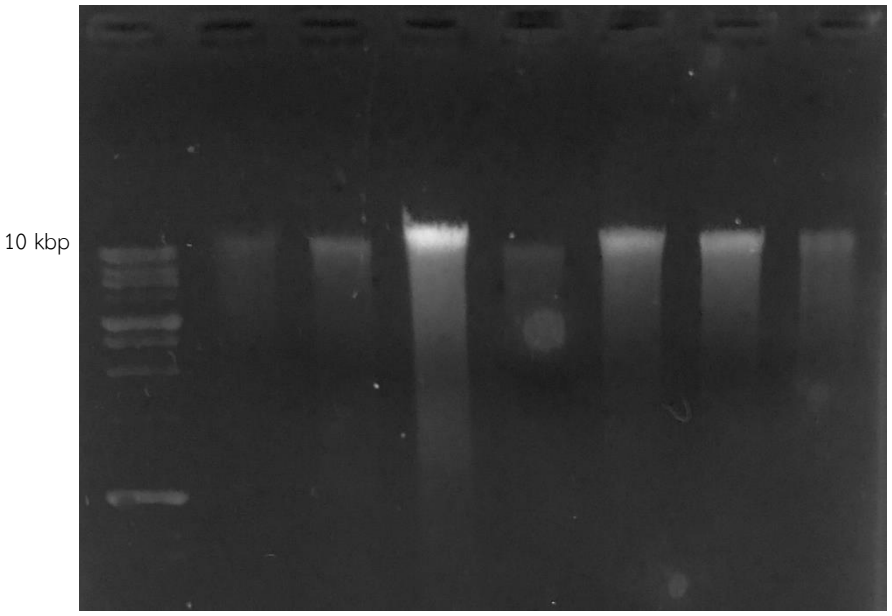
World Spider Catalog (2019). World Spider Catalog. Version 20.0. *Natural History Museum Bern*, online at http://wsc.nmbe.ch, accessed on {1 April 2019}. doi: 10.24436/2

ภาคผนวก

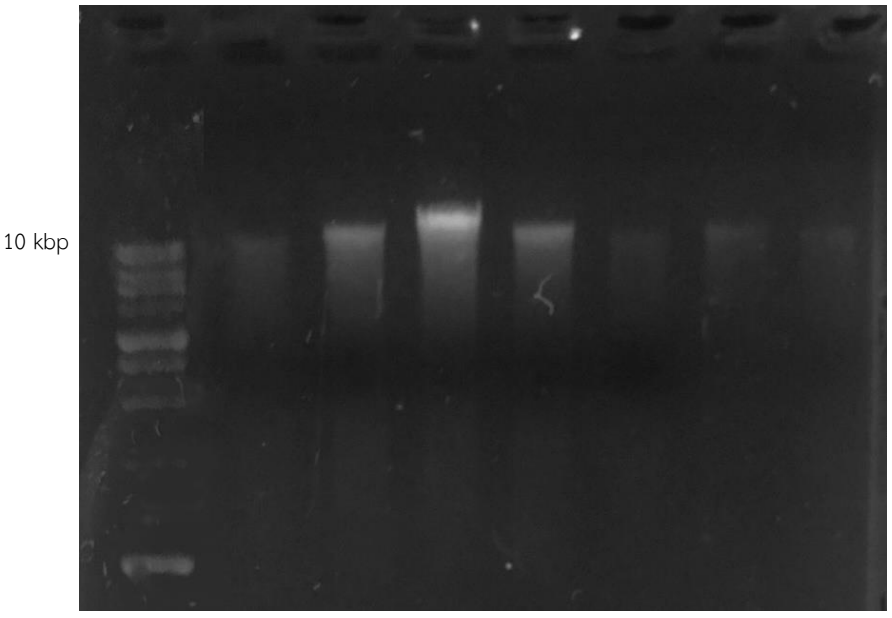
ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ภาพการเก็บตัวอย่างภาคสนาม

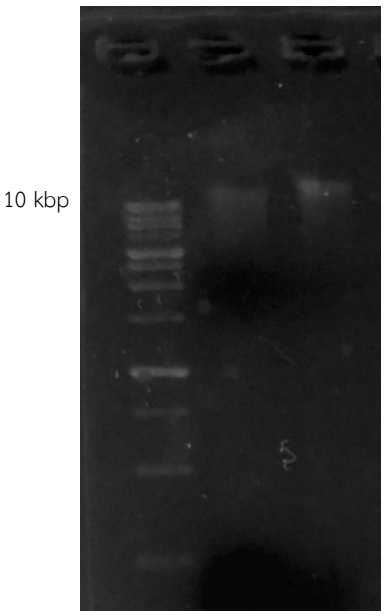
ภาคผนวกที่ 2 ผลการตรวจสอบคุณภาพของสารสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* จำนวน 72 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis



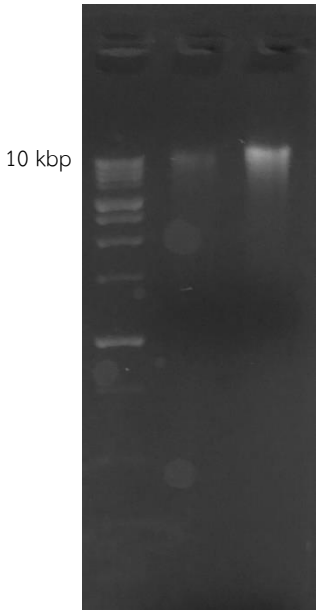
ภาพภาคผนวกที่ 2.1 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 1-7



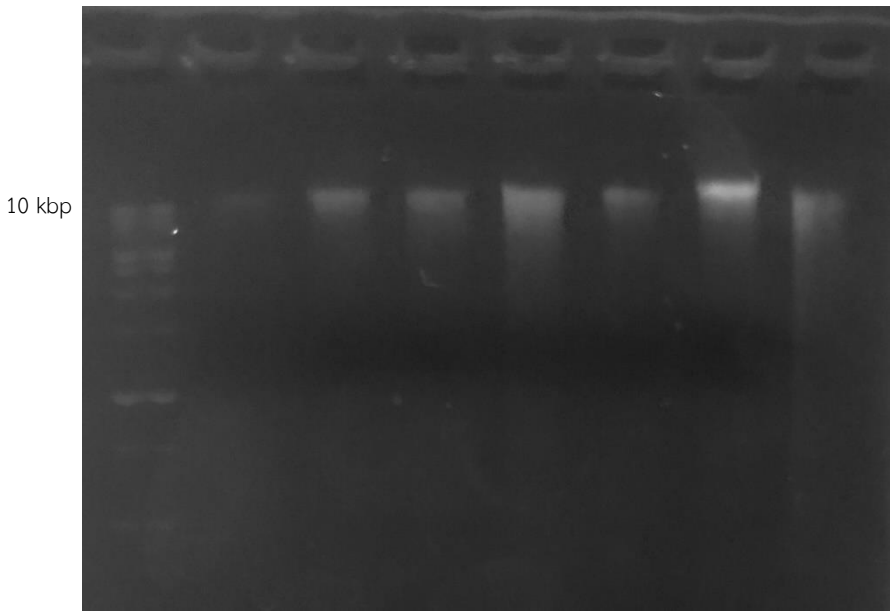
ภาพภาคผนวกที่ 2.2 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 11-17



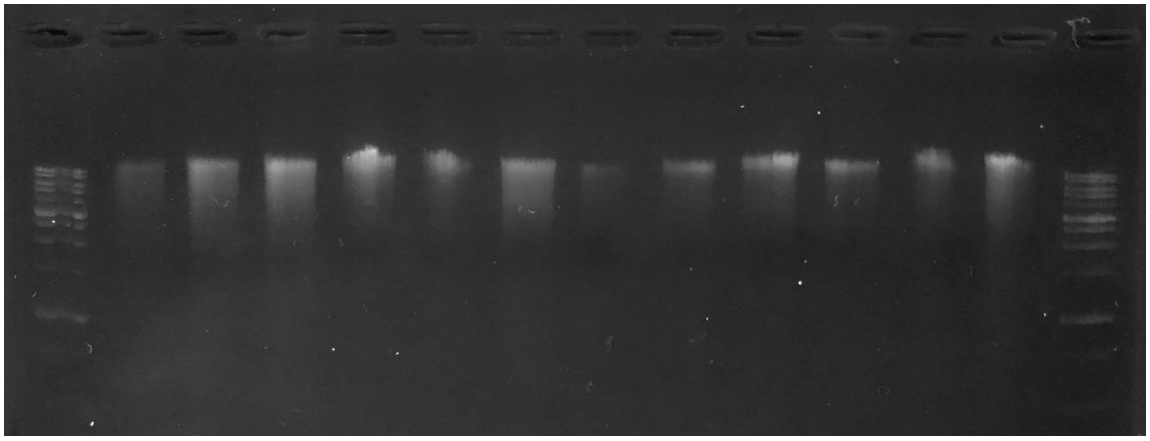
ภาพภาคผนวกที่ 2.3 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 18-19



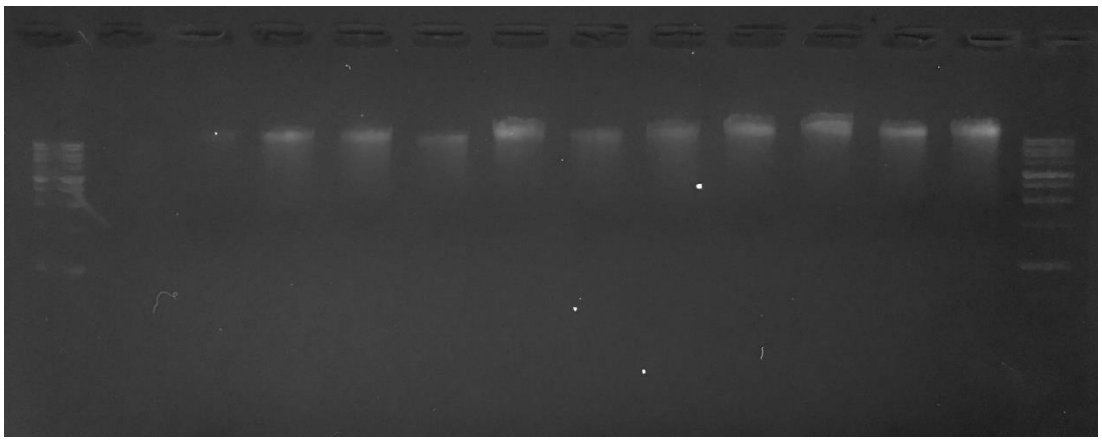
ภาพภาคผนวกที่ 2.4 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 20-21



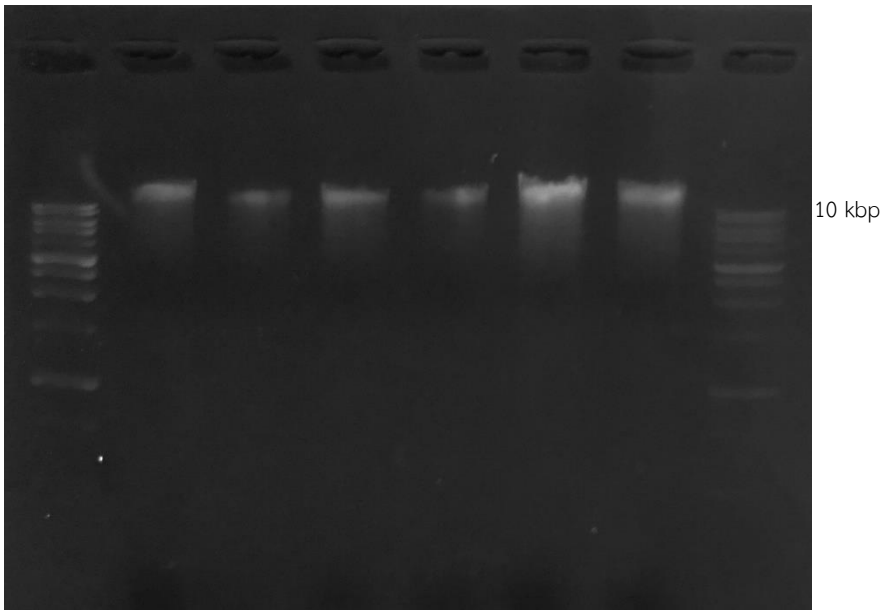
ภาพภาคผนวกที่ 2.5 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 22-28



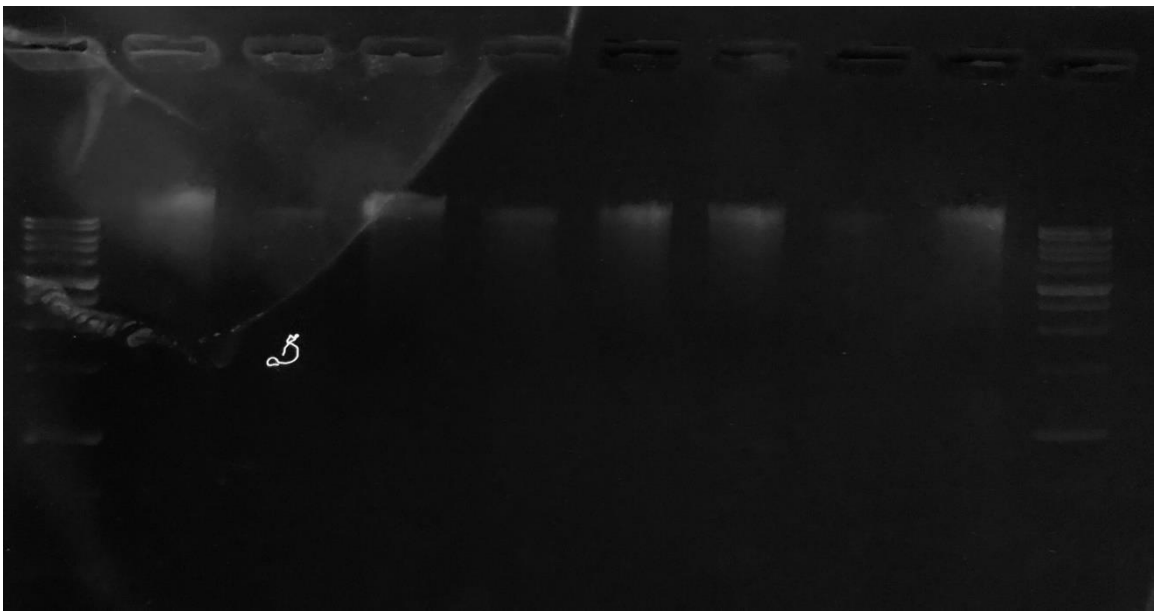
ภาพภาคผนวกที่ 2.6 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 29-40



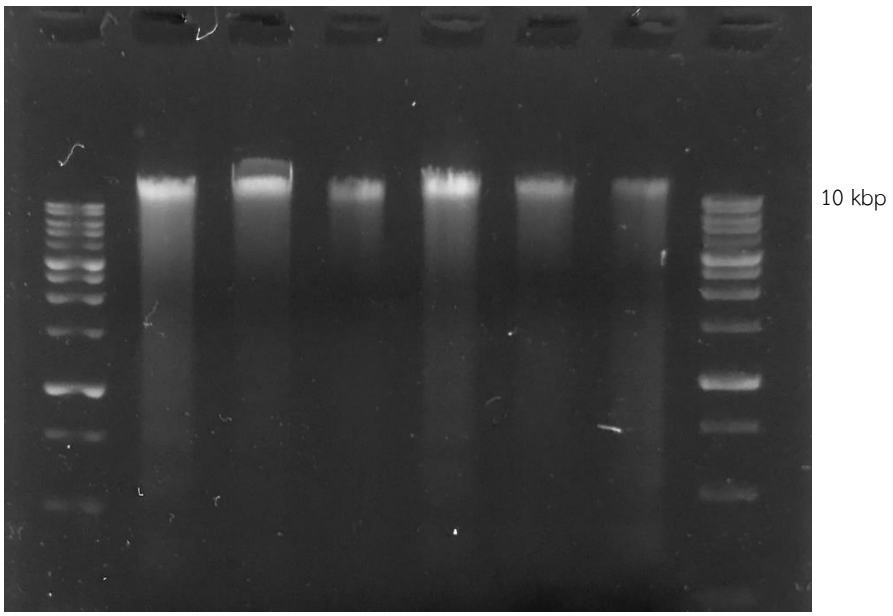
ภาพภาคผนวกที่ 2.7 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 41-52



ภาพภาคผนวกที่ 2.8 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 53-58

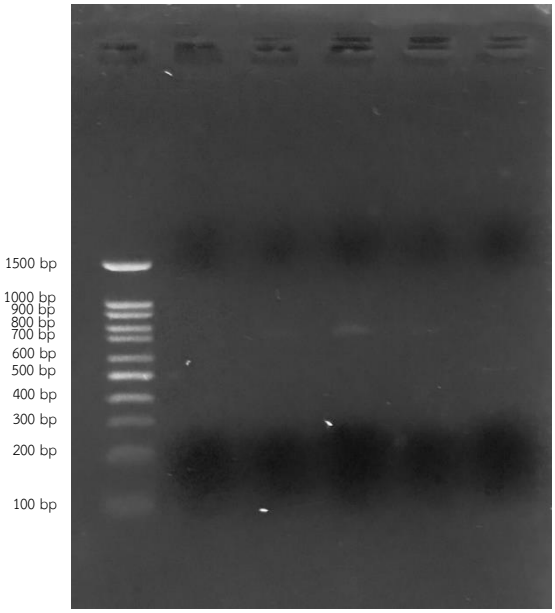


ภาพภาคผนวกที่ 2.9 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 59-66

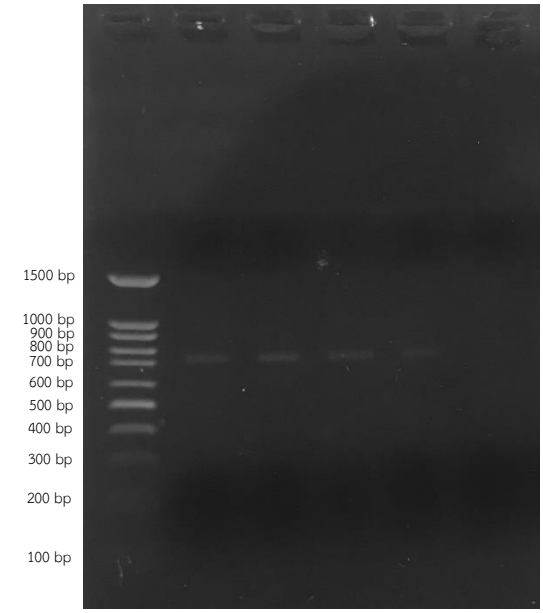


ภาพภาคผนวกที่ 2.10 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 67-72

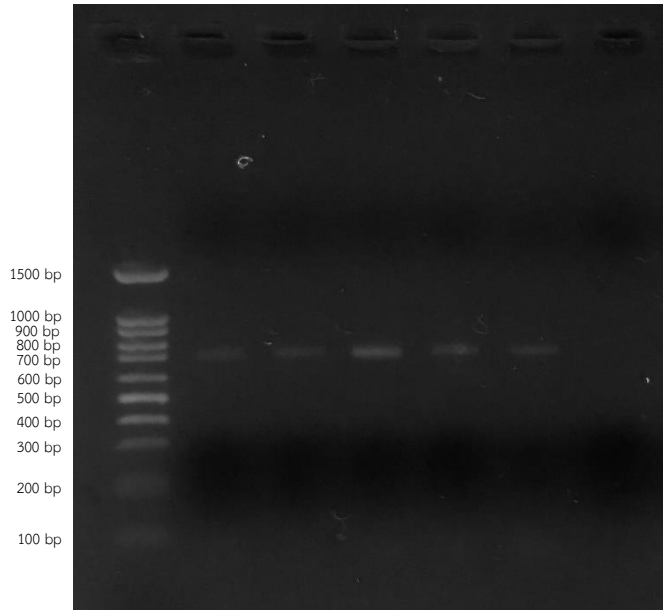
ภาคผนวกที่ 3 ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน *COI* จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ของตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* จำนวน 72 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis



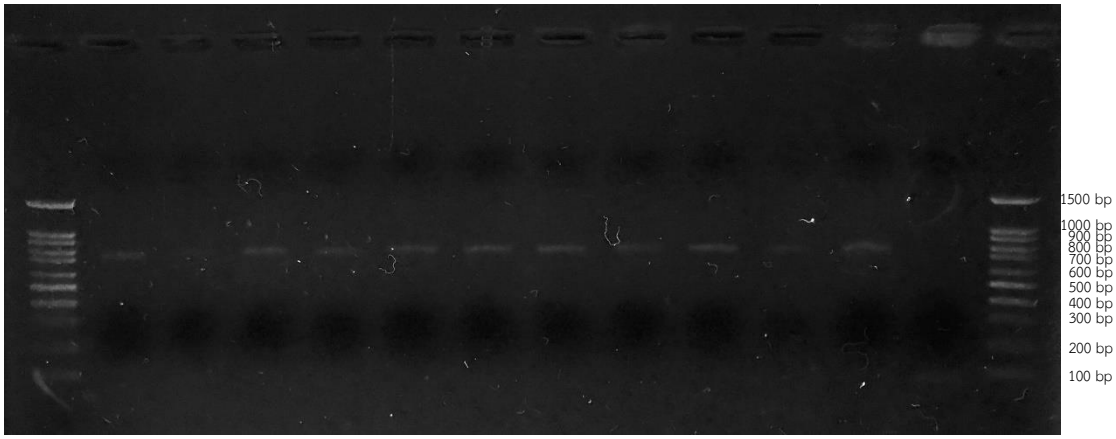
ภาพภาคผนวกที่ 3.1 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 1-4 และ negative control



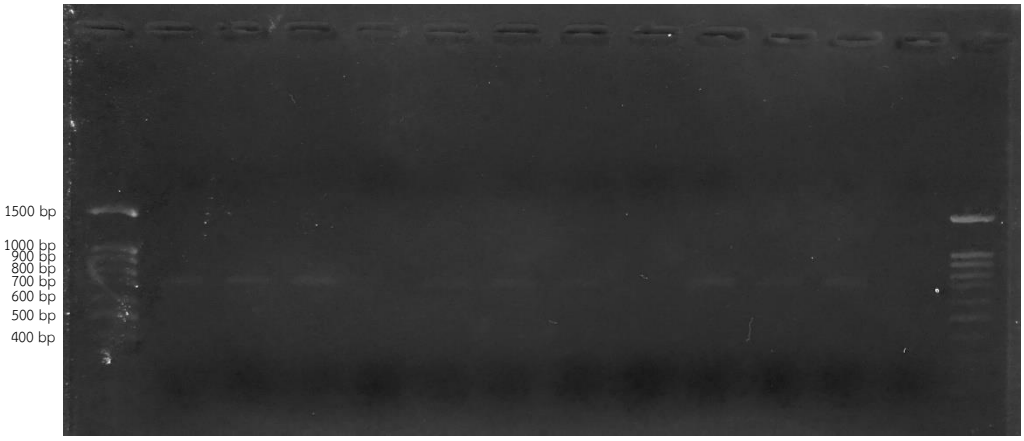
ภาพภาคผนวกที่ 3.2 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 5-8 4 และ negative control



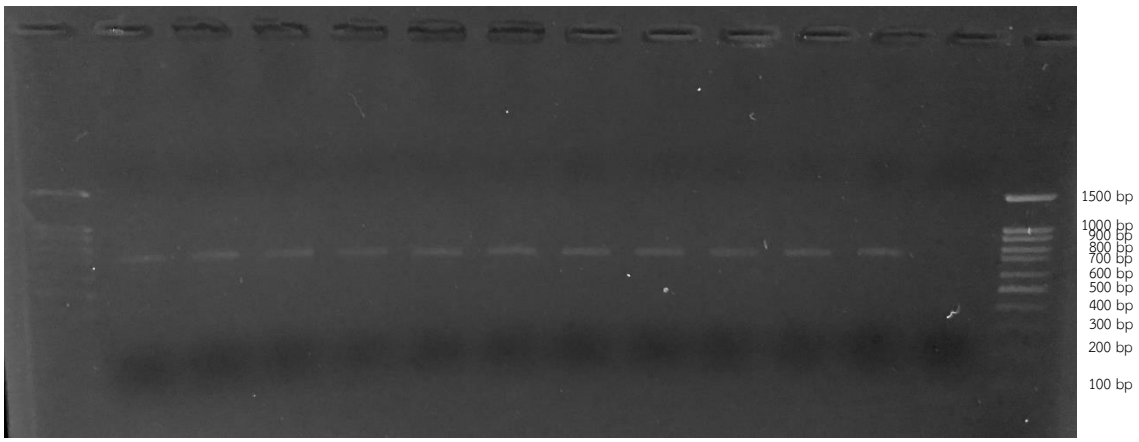
ภาพภาคผนวกที่ 3.3 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 11-16



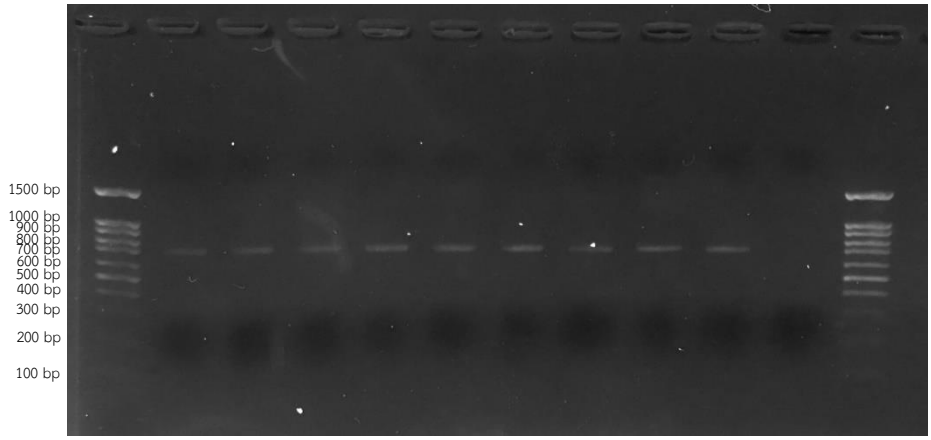
ภาพภาคผนวกที่ 3.4 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 9-10, 17-25 และ negative control



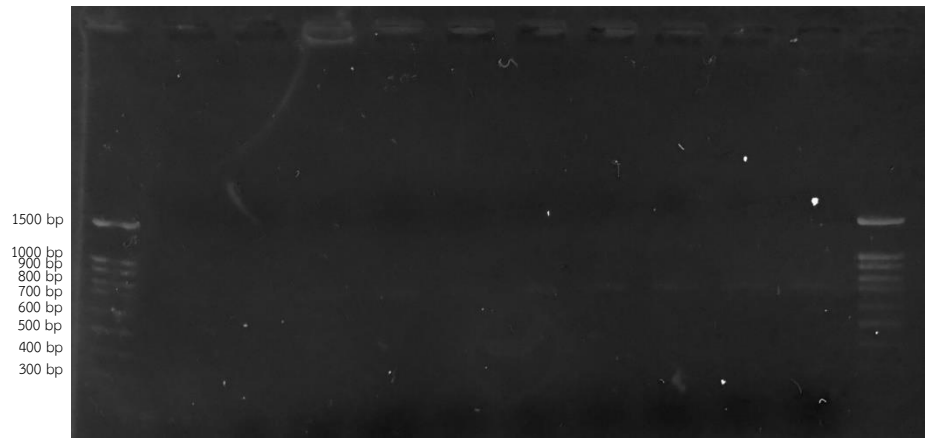
ภาพภาคผนวกที่ 3.5 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 26-36 และ negative control



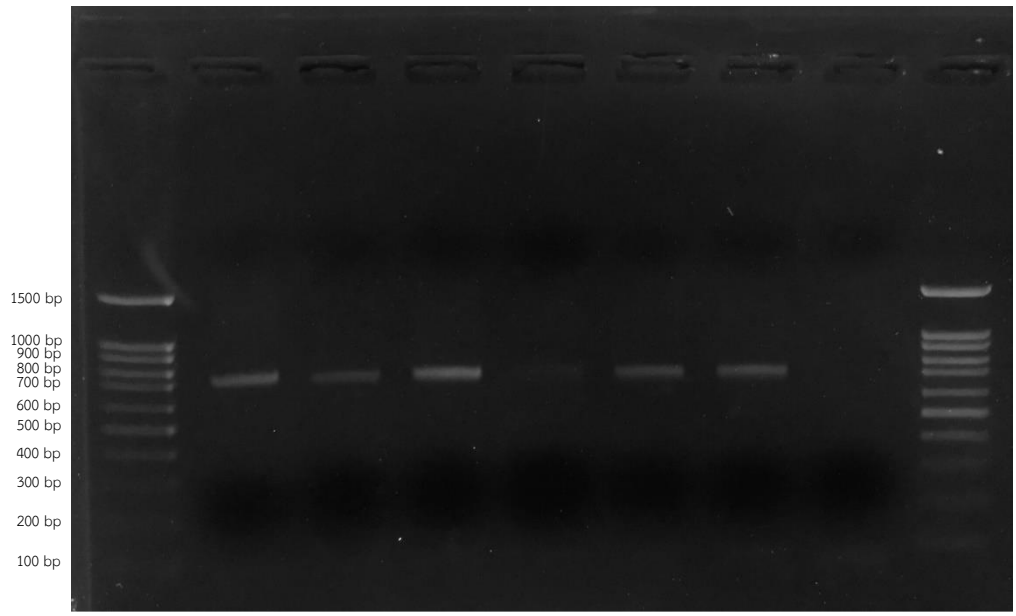
ภาพภาคผนวกที่ 3.6 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 37-47 และ negative control



ภาพภาคผนวกที่ 3.7 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 48-55 และ negative control



ภาพภาคผนวกที่ 3.8 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 57-66



ภาพภาคผนวกที่ 3.9 ผลจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ตัวอย่างที่ 67-72 และ negative control

ภาคผนวกที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างแมงมุม *L. rufescens* กับฐานข้อมูลใน Genbank

ตัวอย่าง	% identity	สิ่งมีชีวิต	Accession no.	สถานที่	อ้างอิง
WP_001	99.80%	*L. rufescens*	MH382645	Spain	Luo and Li (2015)
WP_002	99.80%	*L. rufescens*	MH382645	Spain	Luo and Li (2015)
WP_003	100%	*L. rufescens*	MH382645	Spain	Luo and Li (2015)
WP_004	98.82%	*L. rufescens*	KR706268	China	Luo and Li (2015)
WP_018_L14	94.90%	*L. rufescens*	KR706262	Greece	Luo and Li (2015)
WP_021_L17	97.27%	*L. rufescens*	KR706277	China	Luo and Li (2015)
WP_023_L19	95.10%	*L. rufescens*	KR706262	Greece	Luo and Li (2015)
FT_001	99.61%	*L. rufescens*	MH382645	Spain	Luo and Li (2015)
FT_003	97.84%	*L. rufescens*	KR706277	China	Luo and Li (2015)
FT_004	99.80%	*L. rufescens*	MH382645	Spain	Luo and Li (2015)
SR_001	99.61%	*L. rufescens*	MH382645	Spain	Luo and Li (2015)
SR_006	97.45%	*L. rufescens*	MH382645	Spain	Luo and Li (2015)
KC_002	94.24%	*L. rufescens*	MH673871	Spain	Pekár et al. (2018)

ตัวอย่าง	% identity	สิ่งมีชีวิต	Accession no.	สถานที่	อ้างอิง
KC_003	96.83%	*L. rufescens*	MH673871	Spain	Pekár et al. (2018)
KC_004	96.24%	*L. rufescens*	MH673871	Spain	Pekár et al. (2018)
KC_005	93.63%	*L. rufescens*	MH673871	Spain	Pekár et al. (2018)
KC_010_L53	99.61%	*L. rufescens*	MH382645	Spain	Luo and Li (2015)
KC_011_L54	96.44%	*L. rufescens*	MH673871	Spain	Pekár et al. (2018)