

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อ การวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืช

The Establishment of Pests and Natural Enemies Database for Plant Protection Research and Development in Thailand

2. โครงการวิจัย : การจัดจำแนกชนิดและศึกษาอนุกรมวิธาน ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

Taxonomy, Biology and Species Identification by DNA Barcoding of Pests and Natural Enemies for The Plant Protection Research in Thailand

กิจกรรม : การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดย ดีเอ็นเอ บาร์โค้ด

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : DNA Barcoding for Identification Spider Fauna in genus *Latrodectus* in Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาววิมลวรรณ โชติวงศ์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : นายคมสัน หงษ์ศิริ ศูนย์ศึกษาเรียนรู้ระบบนิเวศป่าชายเลนสิรินาถราชินี

นางสาวยุวรินทร์ บุญทอบ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นายพิเชฐ เขาวนวิฒนวงศ์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

แมงมุมสกุล *Latrodectus* หรือแมงมุมแม่ข่าย (widow spider) เป็นแมงมุมที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขเนื่องจากเป็นกลุ่มแมงมุมที่มีพิษต่อระบบประสาทและพบในแปลงปลูกมันสำปะหลังซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกได้ทุกภาค จึงอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกร แมงมุมกลุ่มนี้มีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ตลอดจนสีสันบนลำตัวที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดแมงมุมโดยวิธีสัณฐานวิทยา ดังนั้นการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดช่วยในการวินิจฉัยชนิด ทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ การใช้ลักษณะทางพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำแนกและยืนยันชนิดแมงมุมสกุล *Latrodectus* โดยเก็บตัวอย่างแมงมุมแม่ข่ายจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย และสกัด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง COX1 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบแมงมุมสกุล *Latrodectus* ทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ *L. geometricus*, *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อ

ช่วยยืนยันการจำแนกแมงมุมสกุล *Latrodectus* โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตำแหน่ง COX1 จาก 58 ตัวอย่าง ได้แก่ *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง *L. thoracicus* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. tredecimguttatus* จำนวน 5 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน *L. geometricus* แยกออกมาจาก *L. thoracicus* กับ *L. tredecimguttatus* อย่างชัดเจน และความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม *L. geometricus* มีลักษณะเป็น monophyletic ในขณะที่ *L. thoracicus* กับ *L. tredecimguttatus* เป็นแมงมุมชนิดเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมแม่ม้าย *L. geometricus* มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากกลุ่ม *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ แมงมุมสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิด ต้องมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมารวมวิเคราะห์

**คำหลัก:** *Latrodectus* แมงมุมแม่ม้าย widow spider ดีเอ็นเอบาร์โค้ด พันธุกรรม

## Abstract

Spider genus *Latrodectus* or widow spiders is an important in public health medical. These spiders have an unusually potent venom containing the neurotoxin latrotoxin and found in cassava plantations, which are economic crops that can be grown in every region and may harm to farmers. Unfortunately, species of this genus are notoriously difficult to identify using morphology. Molecular diagnostic tools provide valuable support for the rapid and accurate identification of morphologically indistinct widow spider species. DNA barcoding of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COX1) gene could be employed to increase the accuracy of Spider genus *Latrodectus* identifications. The samples were collected from all regions of Thailand. A 652 -bp portion of COX1 was sequenced from 58 spider specimens. Sequences were analysed using a 'barcode' approach and also phylogenetic analysis. Species were identified using standard nucleotide BLAST from GENBANK. BLAST sequence similarity searches of GenBank showed 99-100% similarity to each other / GENBANK sequences for three species of the widow spiders complex (*L. geometricus*, *L. thoracicus* and *L. tredecimguttatus*) were found. Phylogenetic analyses (Neighbor Joining and Maximum Likelihood) of the sequences gave consistent results. Neighbor-joining distance and Maximum Likelihood analyses were used to investigate patterns of clustering of the widow spiders sequences with other *Latrodectus* from origin country. Cox1 proved effective in resolving *L. geometricus* separate from *L. thoracicus* กับ *L. tredecimguttatus* meanwhile *L. thoracicus* กับ *L. tredecimguttatus* are the same species. This study provides basic information on the number of species of spider genus *Latrodectus* present in Thailand. However, an understanding of the classification within the *Latrodectus* group will

requires further study making use of additional genes, including the potentially informative ITS and ribosomal RNA.

**Keywords:** widow spiders, *Latrodectus*, DNA barcoding, mitochondrial DNA COI gene, molecular diagnostics

## 6. คำนำ

แมงมุมสกุล *Latrodectus* หรือแมงมุมแม่ม่าย (widow spider) จัดอยู่ในวงศ์ Theridiidae นับว่าเป็นแมงมุมที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขเนื่องจากเป็นกลุ่มแมงมุมที่มีพิษ พิษของแมงมุมแม่ม่ายมีชื่อเรียกเฉพาะว่า Latrotoxin มีผลหลักต่อระบบประสาท (neurotoxin) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยพิษจะทำให้เกิดช่องว่างบริเวณปลายเซลล์ประสาท ส่งผลให้แคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) ไหลเข้าสู่ปลายเซลล์ประสาทซึ่งเป็นกลไกให้เกิดการปล่อยสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ตลอดเวลา ทำให้เกิดการส่งกระแสประสาทอย่างต่อเนื่องและมากกว่าปกติ ทำให้กล้ามเนื้อเกร็งจนเป็นอัมพาต ซึ่งสาเหตุการเสียชีวิตเกิดจากกล้ามเนื้อกระบังลมและกล้ามเนื้อหัวใจหยุดทำงาน (Cristopher *et.al.*, 2004; Shukla and Broome, 2007) แมงมุมแม่ม่ายเป็นกลุ่มแมงมุมที่มีการแพร่กระจายกว้างขวางทั่วโลก พบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั้งบริเวณที่เป็นแผ่นดินใหญ่ และเกาะในมหาสมุทร (Shukla & Broome, 2007) หลายชนิดแพร่กระจายจากการติดไปกับการขนส่งสินค้าของมนุษย์ และส่วนใหญ่มักพบอาศัยอยู่ในแหล่งชุมชน ปัจจุบันทั่วโลกพบทั้งสิ้น 31 ชนิด (Platnick, 2014) โดยในทวีปเอเชียมีรายงานการพบ 4 ชนิด คือ *L. geometricus*, *L. erythromelas*, *L. hasselti* และ *L. elegans* (Schmidt & Klaas, 1991; Knoflach & van Harten, 2002; Yoshida, 2003) จากการสืบค้นเอกสารทางวิชาการ มีงานที่เกี่ยวข้องกับแมงมุมแม่ม่ายในประเทศไทย 2 เรื่อง เรื่องแรกเป็นงานวิจัยที่กล่าวถึงการพบแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาล *L. geometricus* ในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 (พ.ศ. 2530) หรือเมื่อ 26 ปีที่แล้วที่ระดับความสูง 1,500 เมตร บนดอยสุเทพที่จังหวัดเชียงใหม่ โดย Dr. Konrad Thaler (Knoflach & van Harten, 2002) และบทความวิชาการในวารสารสารศิริราชปีที่ 32 ฉบับที่ 11 ซึ่งตีพิมพ์ในปี พ.ศ. 2523 รายงานว่ามีผู้ป่วยถูกแมงมุมกัดที่จังหวัดขอนแก่น และคาดว่าเป็นชนิด *L. curacaviensis* (Sucharit, 1980) แต่การวินิจฉัยและจำแนกชนิดของแมงมุมไม่มีความถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธานแมงมุมเนื่องจากในบทความดังกล่าวกล่าวถึงแมงมุมที่มีลักษณะตัวสีน้ำตาลและมีขนบนลำตัวจำนวนมาก อาศัยอยู่บนพื้นดินและใช้เพียงความยาวของเขี้ยว (chelicera) ในการจำแนกชนิดแมงมุม แต่ลักษณะดังกล่าวแตกต่างจากลักษณะของแมงมุมแม่ม่ายอย่างสิ้นเชิงโดยแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาลไม่มีขนบนลำตัวจำนวนมากและไม่ได้อาศัยอยู่บนพื้น และที่สำคัญความยาวของเขี้ยว (chelicera) ไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของแมงมุมได้ อย่างไรก็ตามเอกสารเหล่านี้ไม่ได้รายงานการพบแมงมุมแม่ม่ายอย่างเป็นทางการในประเทศไทย รวมถึงไม่มีตัวอย่างแมงมุมที่ใช้เป็นหลักฐานในการตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิด ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวจึงไม่สามารถนำมาอ้างอิงหรือใช้ประโยชน์ได้

แมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* ได้แยกสายวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน (monophyletic group) เพียงไม่กี่กลุ่ม โดยแบ่งเป็นสายวิวัฒนาการสองกลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มสายวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ม่ายดำ

(*Latrodectus mactans* clade) และกลุ่มสายวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ข่ายสีน้ำตาล (*Latrodectus geometricus* clade) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายชนิดที่ยังหาข้อสรุปไม่ได้ โดยในแต่ละกลุ่มสายวิวัฒนาการจะมีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ตลอดจนสีขนบนลำตัวที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน และหลายชนิดในกลุ่มเดียวกันยังสามารถผสมพันธุ์ข้ามชนิดกันและให้ลูกที่ไม่เป็นหมันได้ ทำให้เกิดปัญหาในการจำแนกทางอนุกรมวิธานของแมงมุมกลุ่มนี้เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (complex species) (Garb *et al.* 2004)

การจำแนกชนิดแมงมุมโดยใช้วิธีสัณฐานวิทยานั้นจะศึกษาแมงมุมระยะที่เป็นตัวเต็มวัยเท่านั้นและมักใช้เวลานาน ส่วนมากแมงมุมที่พบมักจะอยู่ในระยะตัวอ่อนทำให้มีปัญหาในการจำแนกเนื่องจากอวัยวะเพศยังพัฒนาการไม่สมบูรณ์ทำให้วินิจฉัยชนิดผิด และแมงมุมบางกลุ่มจะมีลักษณะที่ตัวผู้และตัวเมียมีขนาดรูปร่างที่แตกต่างกันทำให้ขาดข้อมูลในการวินิจฉัยชนิด ซึ่ง Platnick (2009) รายงานว่า ตัวอย่างแมงมุมที่ได้จากการจัดจำแนก 46% พบเพียงแค่เพศเดียวเท่านั้น และอีก 1.5% เป็นแมงมุมที่อยู่ในระยะตัวอ่อนโดยอาจจะเป็นแมงมุมที่เป็นชนิดใหม่ (new species) แต่การจำแนกโดยใช้ DNA barcoding สามารถการจำแนกชนิดแมงมุมในระยะตัวอ่อนได้ด้วย

ดังนั้นการใช้ DNA Barcoding จึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่สำคัญ ทำให้ทราบถึงชนิดและเขตการแพร่กระจายของแมงมุมที่เป็นข้อมูลล่าสุดที่มีความถูกต้องและทันสมัย อีกทั้งยังเป็นข้อมูลที่ต่างประเทศยอมรับกันทั่วโลกนอกจากนี้ยังเป็นการรวบรวมและเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมของกรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิง สืบค้น ตามหลักมาตรฐานสากล

## 7. วิธีดำเนินการ

### - อุปกรณ์

- อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง หลอดแก้วทดลอง ขวดดองตัวอย่างแมงมุมขนาดต่างๆ กัน กล่องพลาสติกใสขนาดต่างๆ กัน กระดาษทิชชู ปากคีบ พู่กัน ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน สารเคมี ได้แก่ alcohol 95%, ethyl acetate

- อุปกรณ์ในการจำแนกชนิด ได้แก่ lactic acid, 10% KOH, จานแก้ว petridish, ซิลิกาเจลสีขาวสำหรับใช้ใน column chromatography, กล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope), หลอดแก้วขนาดเล็ก

- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ เช่น ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag (Bioline, Australia), MgCl<sub>2</sub>, RNase A (0.5g/ml) และ Proteinase K Solution (0.3g/ml)

- สารเคมี และ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

### - วิธีการ

#### 1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2562)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมงมุมแม่ข่ายเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.1 การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมแม่มาตามใต้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แพลงมันสำหรับหลัง และขอบชายป่า ทั้งช่วงเวลากลางวันและกลางคืนโดยสังเกตโยที่ใช้ในการดักเหยื่อ ทำการเก็บตัวอย่างแมงมุมโดยวิธีจับโดยตรงด้วยหลอดพลาสติกใส โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ 18 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ภาคเหนือได้แก่ ลำปาง น่าน แพร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร ชัยนาท เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตกได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Global Positioning System: GPS) โดยแบ่งเป็น พื้นที่ต่างๆ ดังนี้

(1) แปลงผลไม้ พืชไร่

(2) โกดังสินค้า

(3) พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น สวนพฤกษศาสตร์ อุทยานแห่งชาติ

รายละเอียดจังหวัดที่เป็นตัวแทนพื้นที่ที่ต้องการไปเก็บตัวอย่างแมงมุมแม่มา

ปี 2560 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 2 ภาคดังนี้

(1) ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรปราการ นนทบุรี อยุธยา สระบุรี กำแพงเพชร

(2) ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ตาก และประจวบคีรีขันธ์

ปี 2561 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 2 ภาคดังนี้

(1) ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว ปราจีนบุรี ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด

(2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด นครราชสีมา ขอนแก่น เลย หนองคาย หนองบัวลำภู

ปี 2562 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 2 ภาคดังนี้

(1) ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัด เพชรบูรณ์ พิษณุโลก น่าน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง และลำพูน

(2) ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ตรัง และสงขลา

1.2 นำตัวอย่างที่ได้มาฆ่าด้วยขวดน็อคแมลงที่บรรจุด้วยสารเอทิลอะซิเตต จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 95% เพื่อนำไปศึกษาตีเอ็นเอ สำหรับตัวอย่างที่ต้องการเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ให้เก็บรักษาในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75%

1.3 บันทึกชื่อแมงมุม วันที่จับ สถานที่จับ ชื่อผู้เก็บ ลงในป้ายกระดาษขาวแผ่นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในหลอดแก้วที่ดองแมงมุม

1.4 เก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมที่ศึกษาตีเอ็นเอไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาคุณภาพของตีเอ็นเอและนำไปใช้ในการศึกษาตีเอ็นเอบาร์โค้ด

## 2. การศึกษานุกรมวิธาน (ดำเนินการปี 2560-2561)

- วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างออกจากหลอดแก้วโดยใช้ฟู่กันเขี่ยตัวอย่างให้ขึ้นมาด้านบนของหลอดแก้ว ใช้คีบคีบตัวอย่างออกมาและใช้เข็มเขี่ยเขี่ยขาแมงมุมให้กางออก วางตัวอย่างไว้ในจานแก้วที่มีซิลิกาเจลสีขาวและถูกแช่ด้วยแอลกอฮอล์ 95 % ให้เต็ม จากนั้นนำไปวางไว้ในตู้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคปรุ่น Olympus SZH-ILLD stereomicroscope สำหรับการเตรียมอวัยวะเพศเมีย (epigynum) จะใช้เข็มเขี่ยเจาะรอบๆอวัยวะเพศ จากนั้น

จึงดึง spermathecae และ copulatory duct ออกมาและนำไปแช่ในโปรตีนเนสเค (proteinase K) ประมาณ 3-5 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออกไป จากนั้นนำไปล้างในน้ำสะอาด นำ spermathecae และ copulatory duct ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็กแล้วจึงนำกลับไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม สำหรับการเตรียม pedipalps ให้ดึงออกทางด้านซ้ายของตัวแมงมุมใส่จานแก้วที่มีแอลกอฮอล์ 75% จากนั้นนำ 10% KOH มาต้มที่อุณหภูมิ 60 °C ประมาณ 5-10 นาที และนำมาเทลงในจานแก้วที่มี pedipalp ให้ท่วมตัวอย่างโดยการเทแอลกอฮอล์ 75 % ทิ้งไปก่อน แช่จนกระทั่งอวัยวะเพศผู้ขยายตัวออก จึงนำไปศึกษาดูรายละเอียดต่างๆ ใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป เมื่อจำแนกชนิดเสร็จจึงนำ pedipalp ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็กและนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม

- การจำแนกชนิด

นำตัวอย่างแมงมุม อวัยวะเพศเมีย และ อวัยวะเพศผู้ มาจำแนกชนิดด้วยคู่มือวินิจฉัยการจำแนกชนิดและจากตำราต่างๆ โดยเฉพาะเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ Yoshida (2003, 2009), Ono (2002), Song *et al.* (1999) จากนั้นบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน วัดความยาวของทั้งลำตัว ความยาวและความกว้างของ ส่วนหัวรวมกับส่วนนอก (carapace) ความยาวและความกว้างของ ส่วนท้อง (abdomen) ความยาวของขาในแต่ละปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 3 (femur), ปล้องที่ 4 (patella), ปล้องที่ 5 (tibia), ปล้องที่ 6 (metatarsus), ปล้องที่ 7 (tarsus) บันทึกรูปและบรรยายลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธาน เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

### 3. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ดำเนินการปี 2561-2562)

2.1 นำตัวอย่างแมงมุมแม่ข่ายที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit; Favorgen, Taiwan) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยใช้คีมคีบดึงขาด้านขวาของแมงมุมจำนวนหนึ่งข้าง (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน (ตัวอย่างแมงมุมที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็น Voucher specimen) เติม FATG1 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ Proteinase K Solution (0.3g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติม RNase A (0.5g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แล้วเติม FATG2 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เขย่าให้สม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน FATG Mini Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยง) เติม W1 Buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer ปริมาณ 750 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 2 นาทีอีกครั้ง ย้ายหลอด FATG Mini Column มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) 1.5 ไมโครลิตร และชะล้างอีเอ็นเอด้วยสารละลาย Elution Buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่มือต่อไปนี้

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26

แมงมุมแม่ข่าย *Latrodectus geometricus* เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

		1 reaction (ไมโครลิตร)
Green mastermix		26
ddH <sub>2</sub> O		20
Primer Forward	LCO1490	1
Primer Reverse	HCO2198	1
DNA		2
Total		50

นำปฏิกิริยา PCR ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 30 รอบ) จากนั้น final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยดผลิตภัณฑ์ PCR ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.2 % และให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 400 mp เป็นเวลา 45 นาที

2.4 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของแมงมุมแม่ข่ายที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

2.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *Cox1* ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมแม่ข่ายที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) โดย

โปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงมุมแม่มายแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thomson et al., 1994) ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ภายในและระหว่างชนิด ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007) และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor Joining (NJ) และ Maximum Likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007)

2.6 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดนำผลที่ได้มาตรวจสอบชนิดกับฐานข้อมูล Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องของข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Altschul et al., 1990) และ BOLD (Barcode of Life Data System; <http://www.boldsystems.org>) โดยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จะถูกเก็บบันทึกเพื่อจัดเตรียมฐานข้อมูลและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงตรวจสอบความถูกต้องของชนิดแมงมุมในสกุลนี้ รวมทั้งนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมงมุม กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

#### - การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมงมุมแม่มายที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วย พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่างแมงมุมแม่มายแต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง
- 3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมงมุมแม่มาย เขตการแพร่กระจาย และแนวทางการวินิจฉัยชนิด

#### - เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

สถานที่ : 1) พื้นที่ 18 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ภาคเหนือได้แก่ ลำปาง น่าน แพร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร ชัยนาท เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตกได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

- 2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

### 8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมแม่มาย



ผลจากการสำรวจชนิดแมงมุมแม่ข่ายในประเทศไทยตามได้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แผลงมันสำปะหลัง และขอบชายป่า (table 1) ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562 ในพื้นที่ 18 จังหวัด พบแมงมุมแม่ข่ายในประเทศไทย จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Latrodectus geometricus* C. L. Koch, 1841 และ *Latrodectus elegans* Thorell, 1898 จำนวน 205 ตัวอย่าง โดยแมงมุมทั้ง 2 ชนิดมีแหล่งที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกัน *L. geometricus* อาศัยในแหล่งชุมชนและใกล้ชิดกับคนและมีการกระจายตัวทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ซึ่งแตกต่างจาก *L. elegans* ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ป่าห่างไกลจากแหล่งชุมชนและมีการกระจายตัวในภาคกลาง ตะวันออก ตะวันออกเฉียงเหนือ และตะวันตก ของประเทศไทย (Figure 1)

จากการสำรวจในบางพื้นที่อย่างต่อเนื่องพบว่าประชากรของแมงมุมแม่ข่ายทั้งสองชนิดลดลงอย่างเห็นได้ชัดจากพื้นที่เดิม โดยสาเหตุเกิดมาจากแหล่งอาศัยเดิมได้มีการเปลี่ยนแปลงไป การถูกแทนเปี่ยนในวงศ์ Eurytomidae เปี่ยนไซ่ นอกจากนี้ยังพบว่าแมงมุมขยายาว Pholcidae และแมงมุม Scytodidae (Figure 6) เป็นศัตรูธรรมชาติที่ช่วยควบคุมปริมาณแมงมุมแม่ข่ายสีน้ำตาล อีกทั้งแมงมุมแม่ข่ายมีพฤติกรรมการล่าพวกเดียวกันเอง (cannibalism) จึงทำให้จำนวนประชากรลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน ยิ่งไปกว่านี้จากข่าวสารที่มีความคลาดเคลื่อนเกี่ยวกับพิษของแมงมุมแม่ข่ายสีน้ำตาลในสื่อออนไลน์ และช่องข่าวต่างๆ ทำให้ประชาชนมีการตื่นตระหนกและหวาดกลัวต่อแมงมุมทุกชนิดจึงฉีดยาพิษเพื่อทำลายแมงมุมทุกชนิดที่พบ จึงทำให้ปัจจุบันแมงมุมแม่ข่ายอยู่ในสถานะที่พบได้ยาก ยิ่งไปกว่านี้แมงมุมแม่ข่ายหลังเพลิงเป็นแมงมุมที่มีนิสัยชอบสันโดษ มีแหล่งอาศัยที่ไม่เฉพาะเจาะจง และมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้น้อยจึงทำให้มีโอกาสที่จะสูญพันธุ์

## 2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมแม่ข่ายในประเทศไทยเพื่อจำแนกชนิด ตัวอย่างแมงมุมทั้งหมดที่เก็บได้ในห้องปฏิบัติการโดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ลักษณะของ endite ลักษณะของ fovea ระยะห่างระหว่างตา ลักษณะ sternum labium maxillae ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนด้านหลังของส่วนท้อง แลบสี่เหลี่ยมหรือสี่แตรรูปร่างคล้ายนาฬิกาทรายบริเวณด้านล่างของส่วนท้อง ขนแข็งที่มีลักษณะโค้งงอเป็นฟันเลื่อยเรียงต่อกันคล้ายซี่หวีที่บริเวณขาปล้องสุดท้าย (tarsus) ของขาคู่ที่ 4 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย พบแมงมุมในสกุล *Latrodectus* ทั้งหมด 2 ชนิด สามารถจำแนกชนิดได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Latrodectus geometricus* C. L. Koch, 1841 และ *Latrodectus elegans* Thorell, 1898 จากการศึกษาโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ของ *L. geometricus* พบว่า spermatheca วางขนานชิดกัน กระจาเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) และกระจาเปาะส่วนท้าย (posterior lobes) มีขนาดเท่ากัน ส่วน copulatory duct ขดเป็นวงจำนวน 4 วง สัมพันธ์กับวงขดของ embolus ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่มี 4 วงเท่ากัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Garb et al. (2004) ส่วน *L. elegans* พบว่า spermatheca ที่กระจาเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) อยู่ในตำแหน่งห่างกัน และกระจาเปาะ

ส่วนท้ายอยู่ในตำแหน่งซิดกัน (v – shape) กระจาเปาะส่วนหน้าและส่วนท้ายมีขนาดแตกต่างกันชัดเจน ส่วน copulatory duct ขดเป็นวงจำนวน 3 วง สัมพันธ์กับลักษณะวงขดของ embolus ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่มี 3 วงเท่ากัน (Lotz, 1994; Levi, 1983)

เนื่องด้วยกลุ่มแมงมุมแม่่ายหลายชนิดมีสีสันและลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกัน (sibling species) และยังมีอีกหลายตัวอย่างที่มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาทำ้าิ่งระหว่าง *L. hasselti* และ *L. elegans* จึงทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาดีเอ็นเอ บาร์โค้ดต่อไป

สำหรับคู่มือการวินิจฉัยชนิดที่ใช้ในการจำแนกและลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมแม่่ายในสกุล *Latrodectus* แต่ละชนิดมีดังนี้

### Key to species of *Latrodectus* in Thailand

#### Female:

1. dorsum of abdomen have symmetrical markings consist loop-like brown spots, Distinct orange or dark brown hourglass marking on the ventral surface present.3(E).....2
- Abdomen black with bright red pattern on dorsum taking the shape of streaks, posterior half chevron shape extending laterally and on anterior half two curved bands (5D.); ventrally an hour-glass mark.....2
2. Seminal receptacles pararell (2B), Copulatory ducts coiled, dumb-bellshaped spermathecae paired, spermathecae ducts with 4 loops (2B).....*geometricus*
- copulatory ducts coiled three times around the seminal receptacles (4B)..... *elegans*

#### Male:

1. dorsum of abdomen have symmetrical markings consist loop-like brown spots similar with female (3F).....2

- dorsal region of the abdomen is transverse irregular bars by white and black, longitudinal orange patch at the posterior dorsal (5C).....2
- 2. – Embolus with 4 loops (2D)..... *geometricus*
- Embolus with 3 loops (4C).....*elegans*

### วงศ์ Theridiidae Sundevall, 1833 (แมงมุมขาหวี, comb-footed or cobweb spiders)

แมงมุมขาหวี เป็นแมงมุมที่มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา ประกอบด้วยสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วจำนวน 124 สกุล 2,514 ชนิด ซึ่งแต่ละสกุลจะมีรูปร่างลักษณะที่ผันแปรแตกต่างกันเช่น สกุล *Argyrodes* จะมีส่วนท้องที่ยาวมากกว่าปกติซึ่งถ้ามองด้านข้างจะเห็นเป็นลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยม สกุล *Ariamnes* ส่วนท้องมีรูปร่างลักษณะคล้ายเส้น สกุล *Proroncidia* จะมีหนามยาวรอบๆบริเวณส่วนท้อง โดยทั่วไปแมงมุมมีนิสัยแยกกันอยู่เนื่องจากถ้าอยู่รวมกันจะมีพฤติกรรมกินกันเอง (cannibalism) แต่แมงมุมขาหวีส่วนใหญ่เป็นแมงมุมที่อาศัยอยู่รวมกันเป็นสังคม (Avilés, 1997) เช่น *Anelosimus eximius* (Keyserling, 1884) จะอยู่รวมกันเป็นพันตัวและช่วยกันสร้างรังขนาดใหญ่ (Agnarsson, 2002) และเป็นที่รู้จักอย่างดีว่าสกุล *Argyrodes* ชอบอาศัยอยู่ร่วมกับแมงมุมชนิดอื่นที่เป็นเจ้าของรังแบบลักษณะ Kleptoparasitic ซึ่งเป็นรูปแบบปฏิสัมพันธ์ที่ผิดปกติโดยการที่อาศัยอยู่ร่วมกับเจ้าของรังและขโมยพวกเศษซากอาหารจากเจ้าของรัง (Elgar, 1993) ส่วนใหญ่แมงมุมวงศ์นี้พบอาศัยอยู่ในทรงพุ่มของต้นไม้ ตามใบไม้ บางชนิดอาศัยอยู่ใต้ใบไม้โดยสร้างเส้นใยยุ่งๆ กระจายคลุมตัว เช่น สกุล *Chryso* สำหรับสกุล *Nihonhimea* จะนำไปไม้แห้งมาฉีกแล้วสร้างเป็นรังนอนและสร้างเส้นใย 3 มิติเพื่อดักเหยื่อ

### สกุล *Latrodectus* Walckenaer, 1805

N.B.: ถูกพิจารณาว่าเป็น senior synonym ของ *Chacoca* Badcock, 1932 โดย Levi, 1959

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *L. 13decimguttatus* Walckenaer, 1805

#### ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

มีการจัดเรียงตาเป็น 2 แถวโดยตาด้านข้างถูกแยกออกมาจากตากกลางคู่หน้าและตาด้านหลังอย่างชัดเจน ไม่มีฟันบน chelicerae แผ่นแข็งด้านบน (carapace) มีลักษณะรูปร่างคล้ายลูกแพร์ fovea มีลักษณะเป็นหลุมตามด้านขวาง ท้องของเพศเมียมีลักษณะเป็นรูปทรงกลมป่อง ส่วนเพศผู้มีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้า สีและลวดลายของส่วนท้องมีความผันแปรตั้งแต่สีครีม แดง ไปจนกระทั่งสีดำ ส่วนเครื่องหมายที่มีลักษณะคล้ายรูปนาฬิกาทรายสีส้มที่อยู่ด้านใต้ของส่วนท้องมักจะปรากฏให้เห็น เพศเมียมีขนาดใหญ่มากโดยมีขนาดลำตัวเกือบถึง 1 เซนติเมตร เพศผู้มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมียประมาณ 4-5 เท่า บริเวณขาปล้องสุดท้าย (tarsus) ของขาคู่ที่ 4

มีขนแข็งที่มีลักษณะโค้งงอเป็นฟันเลื่อยเรียงต่อกันเป็นแถวเห็นชัดเจนคล้ายซี่หวี สร้างใยไม่เป็นระเบียบเป็นลักษณะ 3 มิติเพื่อทำรัง แต่สร้าง gumfoot lines (ภาพที่ 3B) เพื่อเป็นใยดักเหยื่อในเวลากลางคืน ขนาดspinneret คู่กลางมีขนาดเล็กกว่าคู่หน้าและคู่หลังมาก ขาคู่ที่ 1 และ 4 ยาวมากกว่าคู่ที่ 2 และ 3 และมี cololus ขนาดใหญ่

*Latrodectus geometricus* C.L. Koch, 1841 (ภาพ 3E, F)

ตัวอย่างต้นแบบ (Holotype): ปัจจุบันเก็บไว้ที่ Museum für Naturkunde, Berlin (ZMB) ประเทศเยอรมัน

#### ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Koch ในปี 1841 และพบแพร่กระจายที่ Vaterland ประเทศนอร์เวย์ อเมริกาใต้ และโคลัมเบีย ต่อมาปี 1875 Thorell ได้พบตัวอย่างที่ประเทศแอฟริกา Karsch (1878) พบตัวอย่างที่แอฟริกาใต้ จำแนกชนิดผิดและตั้งชื่อว่า *Theridium zickzack* ในปี Keyserling รายงานเพิ่มเติมว่าแมงมุมชนิดนี้แพร่กระจายไปยังแถบประเทศเขตอบอุ่นและประเทศอเมริกา จนกระทั่ง Badcock (1932) ได้จำแนกชนิดผิดโดยเขาได้คิดแมงมุมที่พบเป็น new species โดยเขาได้ตั้งชื่อ genus และ species ใหม่เป็น *Chacoca distincta* โดยให้เหตุผลว่าสกุล *Chacoca* แตกต่างจากสกุล *Latrodectus* ตรงที่ตาตั้งห่างแยกออกจากตาคู่กลางและคู่หลังอย่างชัดเจน แต่เมื่อดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียพบว่า เป็นชนิดเดียวกัน Smithers, 1944 ได้พิจารณาทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพบว่า *L. concinnus* ที่ถูกตั้งขึ้นโดย Pickard-Cambridge ในปี 1904 เป็น synonym ของ *L. geometricus* ต่อมา Caporiacco, 1949 ได้จำแนกชนิดผิดและคิดว่าเป็น new species จึงตั้งชื่อ *L. geometricus modestus*, *L. geometricus subalbicans* และ *L. geometricus obscuratus*

#### ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 2.56 มิลลิเมตร เพศเมีย 7.60 มิลลิเมตร

**หัวและอก (Carapace):** สีน้ำตาลเข้มถึงดำ มีความยาวมากกว่าความกว้าง แผ่นแข็งด้านบน (carapace) มีลักษณะรูปร่างคล้ายลูกแพร์ fovea มีลักษณะเป็นหลุมตามด้านขวาง ส่วนหัวแคบกว่าส่วนอก มี 8 ตา เรียง 2 แถว (4-4) แบบ recurve โดยแถวหน้าเรียงโค้งมากกว่าแถวหลัง ระยะห่างระหว่างตาข้างด้านหน้ากับตากลางคู่หน้ามีขนาดเท่ากัน ตาข้างของตาแถวหลังแยกห่างออกจากตาคู่กลางแถวหลังอย่างเด่นชัด sternum สีน้ำตาลอ่อนปกคลุมด้วยขน labium ยาวมากกว่าด้านกว้าง maxillae ยาวมากกว่าด้านกว้าง เห็น scapulae ชัดเจน chelicerae สีน้ำตาลเหลืองมีขนาดเล็ก ไม่มีฟันบน chelicerae ขามีสีน้ำตาลอ่อนบริเวณข้อต่อระหว่างปล้องขามีสีดำเข้ม ความยาวขา 4 ขา เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3

**ท้อง (Abdomen):** สีพื้นของส่วนท้อง (abdomen) มีความหลากหลายสูงตั้งแต่สีขาวสว่าง สีเทา สีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม ไปจนถึงสีดำ กึ่งกลางด้านบนของส่วนท้องมีจุดรูปวงกลมหรือสามเหลี่ยมสีส้ม แดง หรือสีน้ำตาลเข้ม ล้อมรอบด้วยขอบสีขาว เรียงต่อกันเป็นแถว 3 จุด เชื่อมต่อกันด้วยแถบสีเดียวกันพาดไปทางด้านท้าย

ลำตัว สองข้างของแนวกลางตัวด้านบนส่วนท้อง มีจุดสีดำ เรียงต่อกันข้างละ 4 จุด เห็นชัดในแมงมุมขนาดเล็ก ส่วนแมงมุมที่มีอายุมากจะเห็นชัดเพียงข้างละ 3 จุด แต่ละจุดมีแถบสีอ่อนเชื่อมต่อกันไปด้านข้างของส่วนท้องเกิดเป็นลวดลายสีอ่อนสลับเข้มตัดกับสีพื้นของส่วนท้อง ด้านล่างของส่วนท้องมีแถบสีส้มหรือสีแดงรูปร่างคล้ายนาฬิกาทรายเป็นลักษณะเด่น (ภาพที่ 3D) ส่วนของอวัยวะชักใย (spinnerets) ล้อมรอบด้วยแถบสีเข้มเรียงสลับกับสีอ่อนอย่างละ 6 แถบ โครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์มีส่วนของ spermatheca รูปร่างคล้ายดัมเบล 1 คู่ วางชิดขนานกัน (parallel spermatheca) (ภาพที่ 2B) โดย spermatheca แต่ละอัน มีกระเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) และกระเปาะส่วนท้าย (posterior lobes) ที่มีขนาดเท่ากัน ส่วน spermatheca เชื่อมต่อกับท่อ copulatory ducts ที่ขัดซ้อนกันจำนวนข้างละ 4 วง (ภาพที่ 2B) สำหรับโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะอยู่บริเวณด้านหน้าสุดของตัวเต็มวัยเพศผู้ จะมีส่วนของขาแปลง (palp) 1 คู่ ทำหน้าที่สำหรับเก็บน้ำเชื้อชั่วคราวและส่งถ่ายน้ำเชื้อต่อไปยังเพศเมีย โดยบนขาแปลงแต่ละข้าง มีส่วนของ embolus ที่ยาวและพันเป็นเกลียวขดเป็นวงซ้อนกัน จำนวน 4 วง (ภาพที่ 2C และ D) และมี colulus ขนาดใหญ่

**เขตการแพร่กระจาย (Distribution):** แอฟริกา อเมริกา โปแลนด์ ตะวันออกกลาง ปากีสถาน อินเดีย ไทย ญี่ปุ่น ปาปัวนิวกินี ออสเตรเลีย และฮาวาย ในประเทศไทยสามารถพบได้ทุกภาค ภาคเหนือได้แก่ ลำปาง น่าน แพร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครปฐม เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตกได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

#### *Latrodectus elegans* Thorell, 1898 (ภาพ 5C และD )

#### **ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):**

ค้นพบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1898 บริเวณภูเขา Carin Chebà ประเทศพม่า ต่อมาในปี 1909 Simon ได้พบตัวอย่างที่ ฮานอย ประเทศเวียดนามแต่เนื่องจากตัวอย่างที่พบมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *L. hasselti* จากประเทศออสเตรเลีย และใกล้เคียงกับ *L. elegans* ดังนั้นจึงตัดสินใจตั้งชื่อว่า *Latrodectus hasselti elegans* ในปี 1998 Zhu ได้จำแนกชนิดผิดโดยได้ตั้งชื่อว่าเป็น *L. mactans* ต่อมา Song, Zhu and Chen, 1999 ได้จำแนกชนิดผิดโดยได้ตั้งชื่อว่าเป็น *L. mactans* ปี 2002 ได้รายงานพบ *L. elegans* ในประเทศญี่ปุ่นโดย Ono ต่อมา Kananbala, et al. 2012 รายงานการพบ *L. elegans* ครั้งแรกที่หมู่บ้าน Thawai เมือง Ukhrul รัฐ Manipur ประเทศอินเดีย

#### **ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)**

**ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย :** เพศผู้ 2.28 มิลลิเมตร เพศเมีย 7.22 มิลลิเมตร

**หัวและอก (Carapace):** Carapace ถูกปกคลุมด้วยขนสั้นๆ สีดำกระจายตัวแบบไม่สม่ำเสมอ มีความยาวมากกว่าความกว้าง แผ่นแข็งด้านบน (carapace) มีลักษณะรูปร่างคล้ายลูกแพร์ fovea มีลักษณะเป็นหลุม

ตามด้านขวาง ส่วนหัวแคบกว่าส่วนอก มี 8 ตา เรียง 2 แถว (4-4) แบบ recurve โดยแถวหน้าเรียงโค้งมากกว่าแถวหลัง ระยะห่างระหว่างตาข้างด้านหน้ากับตากลางคู่หน้ามีขนาดเท่ากัน ตาข้างของตาแถวหลังแยกห่างออกจากตาคู่กลางแถวหลังอย่างเด่นชัด sternum สีน้ำตาลอ่อนปกคลุมด้วยขน labium ยาวมากกว่าด้านกว้าง maxillae ยาวมากกว่าด้านกว้าง เห็น scapulae ชัดเจน chelicerae สีน้ำตาลเหลืองมีขนาดเล็ก ไม่มีฟันบน chelicerae ส่วนขามีสีดำเข้ม ความยาวขา 4 ขา เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3

**ท้อง (Abdomen):** สีพื้นของส่วนท้อง (abdomen) มีสีดำสนิท ด้านบนของส่วนท้องมีแถบสีแดงหรือสีส้มสตัดพาดขวางจากข้างลำตัวด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งจำนวน 4 แถบ โดยแถบสีที่สองถึงสี่ด้านท้ายตัวเชื่อมต่อกัน (ภาพที่ 5A, D) แถบสีดังกล่าวมีรูปร่างคล้ายเปลวเพลิง สำหรับเพศผู้ส่วนท้องมีสีขาวสลัดำ ตอนท้ายด้านบนส่วนหลังมีแถบสีแดง ด้านล่างของส่วนท้องมีแถบสีแดงรูปร่างคล้ายนาฬิกาทรายซึ่งบางพื้นที่ไม่พบแถบสีแดงนี้ โครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์มีส่วนของ spermatheca รูปร่างคล้ายดัมเบล 1 คู่ วางตัวในลักษณะที่กระเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) อยู่ห่างกัน และกระเปาะส่วนท้าย (posterior lobes) อยู่ชิดกัน มองดูคล้ายตัววี (V-shaped spermatheca) โดยกระเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) มีขนาดใหญ่กว่ากระเปาะส่วนท้าย (posterior lobes) อย่างชัดเจน ส่วน spermatheca เชื่อมต่อกับท่อ copulatory ducts ที่ขดซ้อนกันจำนวนข้างละ 3 วง (ภาพที่ 4B)

สำหรับโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะอยู่บริเวณด้านหน้าสุดของตัวเต็มวัยเพศผู้ จะมีส่วนของขาแปลง (palp) 1 คู่ ทำหน้าที่สำหรับเก็บน้ำเชื้อชั่วคราวและส่งถ่ายน้ำเชื้อต่อไปยังเพศเมีย โดยบนขาแปลงแต่ละข้าง มีส่วนของ embolus ที่ยาวและพันเป็นเกลียวขดเป็นวงซ้อนกัน จำนวน 3 วง (ภาพที่ 4C) และมี colulus ขนาดใหญ่

**เขตการแพร่กระจาย (Distribution):** อินเดีย พม่า จีน และญี่ปุ่น สำหรับในประเทศไทยพบที่จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ ฉะเชิงเทรา ขอนแก่น อุบลราชธานี ลพบุรี ชลบุรี และชัยนาท

### 3. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษาค้างนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* 100 ตัวอย่าง *L. elegans* 30 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน COX1 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง *L. thoracicus* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. tredecimguttatus* จำนวน 5 ตัวอย่าง บันทึกผลนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode (ภาคผนวกที่ 1) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมงมุมแม่ข่ายที่ทำการศึกษามาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมแม่ข่ายที่รายงานในฐานข้อมูลสากล คือ Gen Bank เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมแม่ข่ายที่ทำการศึกษามีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลสูงถึง 99 - 100%

จากการศึกษาค้างนี้พบว่าแมงมุมแม่ข่ายบางตัวอย่างเมื่อนำ PCR product (ผลผลิต PCR) มาทำการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธีการ Gel electrophoresis กลับไม่แสดงแถบแบนบนแผ่นเจล จึงได้

ปรับเปลี่ยนวิธีตั้งแต่เปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extension จำนวนรอบของ cycle จนกระทั่งเปลี่ยน primer ซึ่ง primer ที่สามารถทำให้ผลผลิต PCR แสดงแถบแบนบนแผ่นเจลได้คือ

C1J1718 GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC และ

C1N2191 CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC (Simon *et al.*, 1994)

### การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus*

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* เพื่อใช้ยืนยันข้อมูลการจัดจำแนกชนิด โดยทำการวิเคราะห์ sequences ของตำแหน่ง COX1 จาก 58 ตัวอย่าง ได้แก่ *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง และ *L. elegans* จำนวน 10 ตัวอย่าง และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COX1 ของแมงมุมแม่ข่าย *Steatoda triangulosa* จำนวน 1 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COX1 ของ *L. geometricus* จาก อาร์เจนตินา ฟลอริดา และแอฟริกาใต้ ซึ่งเป็นแหล่งที่พบแมงมุมแม่ข่ายสีน้ำตาลครั้งแรกร่วมในการวิเคราะห์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor Joining (NJ) และ Maximum Likelihood (ML) พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน (Figure 8-9) โดยแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* ได้แยกกลุ่มออกมาจาก *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* อย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* พบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มมีลักษณะเป็น monophyletic ส่วนกลุ่ม *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่เหมือนกันนั้นคือเป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* สามารถจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ แต่การจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มต้องเพิ่มข้อมูลของดีเอ็นเอของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ ซึ่งยีนตำแหน่ง COX1 สามารถจำแนกได้เพียงความแตกต่างในระดับกลุ่มของ *L. geometricus* *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* เท่านั้น อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย แต่การยืนยันชนิดหรือจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มของ *Latrodectus* complex นั้นต้องมีการศึกษาต่อไป

### 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ:

จากเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยตามใต้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แผลงมันสำปะหลัง และขอบชายป่า ทั้งช่วงเวลากลางวันและกลางคืนโดยสังเกตโยที่ใช้ในการดักเหยื่อจากพื้นที่ภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ พบแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* จำนวน 205 ตัวอย่าง และในการจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบแมงมุมแม่ข่าย จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *L. geometricus* และ *L. elegans* จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอ ทำการสกัดดีเอ็นเอและพีซีอาร์ บริเวณยีน COX1 ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง และ *L. thoracicus* จำนวน 5 ตัวอย่าง *L. tredecimguttatus* จำนวน 5 ตัวอย่าง

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลทางชีวโมเลกุลของแมงมุมแม่ข่ายที่มีความซับซ้อนหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นการยากที่จะใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก และยืนยันว่า COX1 เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมงมุมแม่ข่ายกลุ่ม *Latrodectus complex* ได้ เนื่องจากยีน COX1 มีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาดนิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500 - 800 คู่เบส ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้นไพรเมอร์ที่เป็น universal primer จะสามารถเข้ามาจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้ง่ายและรวดเร็ว นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของยีน COX1 ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย และการเลือกบริเวณที่จะนำมาใช้เป็นยีนมีความสำคัญมาก เพราะหากเลือกขนาดและบริเวณที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจะทำให้สามารถนำไปใช้ได้ง่าย สะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ COX1 มีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถแสดงผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมแม่ข่ายได้เลย ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ C1J1718 และ C1N2191 แสดงผลผลิต PCR แสดงแถบแบนบนแผ่นเจล นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ Neighbor Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* แยกออกจากแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Steatoda* อย่างเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่กลุ่ม *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่เหมือนกันนั่นคือเป็นชนิดเดียวกัน เนื่องจากฐานข้อมูล *L. elegans* ไม่ได้อยู่ใน Genbank จึงทำให้ประมวลผลพันธุกรรมออกมาเป็นชนิดที่ใกล้เคียงนั่นก็คือ *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* หากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องใช้จำนวนยีนที่มากศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Garb *et al.*, 2004 ที่ใช้ยีนในการศึกษาถึง 5 ตำแหน่ง (COX1, H3, 28S rRNA, 18S rRNA, 16S rRNA) งานวิจัยของ Vink *et al.* 2008 ที่ใช้ยีนศึกษามากกว่า 1 ชนิด เช่น (COX1, ITS1, ITS2)

นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ยังช่วยยืนยันจำนวนชนิดของแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย ให้มีความสอดคล้องและทันสมัยเทียบเท่าระดับสากล ดังเช่นงานวิจัยของ Garb *et al.*, 2004 ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* ชีวภูมิศาสตร์ และประวัติการแพร่กระจาย พบว่า *geometricus* clade เป็นแมงมุมแม่ข่ายที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นและเป็นพี่น้องกับ the African *L. Rhodensis* ส่วน *mactans* clade ประกอบด้วย *Latrodectus* ชนิดอื่นที่มาจาก แอฟริกา อิสราเอล สเปน ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

เป็นองค์ความรู้และฐานข้อมูลทางด้านพันธุกรรมในการวิจัยต่อไปซึ่งจากการทดลองจะได้ชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ ที่ถูกต้อง ได้ตัวอย่างดีเอ็นเอบาร์โค้ด ของแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย สามารถนำมาใช้เพื่อจัดจำแนกชนิดแมงมุมแม่ข่ายได้อย่างถูกต้องตามมาตรฐานสากล ซึ่งหน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ หน่วยงานราชการ กระทรวงพาณิชย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ บริษัทเอกชนผู้ส่งออกมหาวิทยาลัย โรงเรียน



11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : คุณ พงศ์พัฒนา วิวรรณนาวิน ช่วยอนุเคราะห์ถ่ายภาพ คุณคมสัน หงษ์ทรศิริ คุณเซาวลิต ส่องแสงโชติ และคุณเฉลิมเกียรติ เลี่ยมยองใย ที่ช่วยอนุเคราะห์เก็บตัวอย่าง และให้ข้อมูลสถานที่การเก็บตัวอย่าง

## 12. เอกสารอ้างอิง

- Agnarsson, I. 2002. Morphological phylogeny of cobweb spiders and their relatives (Araneae, Araneoidea, Theridiidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2004, 141, 447–626p.
- Avilés, L. 1997. Causes and consequences of cooperation and permanent-sociality in spiders. In: Choe JC, Crespi BJ, eds. *The evolution of social insects and arachnids*. Cambridge: Cambridge University Press, 476–498p.
- Badcock, A. D. 1932. Reports of an expedition to Paraguay and Brazil in 1926-1927 supported by the Trustes of the Percy Sladen Memorial Fund and the Executive Committee of the Carnegie Trust for the Universities of Scotland. Arachnida from the Paraguayan Chaco. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology* 38: 1-48p.
- Bettini, S. 1964. Epidemiology of latrodectism. *Toxicon*. 2:93-101p.
- Caporiacco, L. di 1949. Aracnidi della colonia del Kenya raccolti da Toschi e Meneghetti negli anni 1944-1946. *Commentationes Pontificia Academia Scientiarum* 13: 309-492p.
- Costello, M.J., K.M. Daane. 1998. Influence of ground cover on spider populations in a  
Cristopher J. M., Tomlinson S. R., Perestenko P. V., Pomerai D. D., Duce I.R.,  
Usherwood N. R. and Bell D. R. 2004. Latrophilin is required for toxicity of black widow spider venom in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* (2004) 378, 185 -191. table grape vineyard. *Ecological. Entomology*. 23,33–40p.
- Elgar, M.A. 1993. Inter-specific associations involving spiders: kleptoparasitism, mimicry and mutualism. *Memoirs of the Queensland Museum* 33:411–430p.
- Forster, L. 1995. The behavioural ecology of *Latrodectus hasselti* (Thorell), the

- Australian redback spider (Araneae: Theridiidae): a review. Records of the Western Australian Museum. Supplements. 52, 13-24p.
- Garb, J. E., A. Gonzalez and R.G. Gillespie. 2004. The black widow spider genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae): phylogeny, biogeography and invasion history. Molecular Phylogenetics and Evolution. 31: 1127-1142p.
- Garb, J. E., A. Gonzalez and R.G. Gillespie. 2004. The black widow spider genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae): phylogeny, biogeography and invasion history. Molecular Phylogenetics and Evolution. 31: 1127-1142p. Cited C. Simon, F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87, 651–701p.
- Koch, C. L. 1841. Die Arachniden. Nürnberg, Achter Band, pp. 41-131, Neunter Band, 1-56p.
- Kananbala, A., K. Manoj, M. Bhubaneshwari, A. Binarani and M. Siliwal. 2012. The first report of the widow spider *Latrodectus elegans* (Araneae: Theridiidae) from India. Journal of Threatened Taxa 4: 2718-2722p.
- Karsch, F. 1878. Über einige von Herrn JM Hildebrandt im Zanzibargebiete erbeutete Arachniden. Zeitschrift für die Gesamten Naturwissenschaften 51: 311-322.
- Keyserling, E. 1884. Die Spinnen Amerikas II. Theridiidae. Nürnberg 1, 1-222.
- Knoflach, B. and A. van Harten. 2002. The genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae) From mainland Yemen, the Socotra Archipelago and adjacent countries. Fauna of Arabia 19: 321-361p.
- Levi, H. W., 1983. On the value of genitalic structures and coloration in separating species of widow spiders (*Latrodectus* sp.) (Arachnida:Araneae: Theridiidae). Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg 26, 195-200.
- Litovitz, T. L., W. Klein-Schwartz, K.S. Dyer, M. Shannon, S. Lee, M. Powers. 1998. Annual reports of the American Association of Poison Control Centers toxic exposure surveillance system. American Journal of Emergency Medicine. 16:443–497.
- Lotz, L.N. 1994. Revision of the genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae) in Africa.

- Navorsing van die Nasionale Museum Bloemfontein. 10 (1): 1-60.
- Müller, G.J., 1993. Black and brown widow spider bites in South Africa—a series of 45 cases. *South African Medical Journal*. 83, 399–405.
- Ono, H., 2002. Note on the Japanese red back spider and American black widows. *Orthobula's Box*. 11: 3-6p.
- Pickard-Cambridge, O. 1904. Descriptions of some new species and characters of three new genera, of Araneidea from South Africa. *Annals of the South African Museum* 3: 143-165p.
- Platnick, N.I. 2009. The world spider catalog, version 10.0. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>
- Schmidt, G. and P. Klaas. 1991. Eine neue *Latrodectus*-Spezies aus Sri Lanka (Araneida: Theridiidae). *Arachnologischer Anzeiger*. 14: 6-9p.
- Shukla, S. and V.G. Broome. 2007. First report of the brown widow spider, *Latrodectus geometricus* C. L. Koch (Araneae: Theridiidae) from India. *Current Science*. 93(6): 775-777p.
- Simon, E. 1909. Etude sur les arachnides du Tonkin (1re partie). *Bulletin Scientifique de la France et de la Belgique* 42: 69-147p.
- Smithers, R. H. N. 1944. Contributions to our knowledge of the genus *Latrodectus* (Araneae) in South Africa. *Annals of the South African Museum*. 36: 263-312p.
- Song, D. X., Z. Mingsheng and C. Jun. 1999. *The Spiders of China*. Hebei Science and Technology Publishing House. p. 398-401p.
- Sucharit, S., 1980. A poisonous spider bite by *Latrodectus* sp. from Northeast Thailand. *Siriraj. Hosp. Gaz.* 32(11): 675-676p.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24:1596-1599p.
- Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680p.

- Thorell, T. 1875. On some spiders from New-Caledonia, Madagascar and Réunion. Proceedings of the Zoological Society of London. 43(2): 130-149, Pl. XXV.
- Thorell, T. 1898. Viaggio di Leonardo Fea in Birmania e regioni vicine. LXXX. Secondo Saggio sui Ragni birmani. II. Retitelariae et Orbitelariae. Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova (2) 19[=39]: 271-378p.
- Vink, C.J, P.J. Sirvid, J. Malumbres-Olarte, J.W. Griffiths, P. Paquin and A. M. Paterson. 2008. Species status and conservation issues of New Zealand's endemic *Latrodectus* spider species (Araneae : Theridiidae). Invertebrate Systematics 22(6) 589-604p.
- World Spider Catalog. 2019. World Spider Catalog, Version 20.5. Natural History Museum Bern. Available at URL <http://wsc.nmbe.ch> (Accessed on 10/05/2019).
- Yoshida, H., 2003. The spider family Theridiidae (Arachnida: Araneae) from Japan. The arachnological Society of Japan. 224p.
- Yoshida, H. 2009. Uloboridae, Theridiidae, Ctenidae. *In*: Ono, H. (ed.) The spiders of Japan with keys to the families and genera and illustrations of the species. Tokai University Press, Kanagawa, pp. 142-147, 356-393, 467-468p.
- Zhu, M. S. 1998. Fauna Sinica: Arachnida: Araneae: Theridiidae. Science Press, Beijing, xi + 436 pp.

**Table 1 Spider Fauna in genus *Latrodectus* found in Thailand between 2016 until 2019**

Scientific name	Habitat	Location	Reference
<i>Latrodectus geometricus</i>	Restaurant	Suan Phueng, Rachaburi	W. Chotwong
C. L. Koch, 1841	Rest room	Nong Kum, Kanchanaburi	W. Chotwong
	Cricket shop	Chatuchak, Bangkok	J. Bangtha
	House	Pranburi, Prachuap Khiri Khan	W. Chotwong
	Restaurant	Nakronpathom	R. Pongpattana
	Restaurant	Lampang	R. Pongpattana
	Restaurant	Chokchai, Nakhon Ratchasima	W. Chotwong
	Cactus greenhouse	Tha Ang, Nakhon Ratchasima	W. Chotwong
	Restaurant	Nai Wiang, Nan	W. Chotwong

Restaurant	Ban Phai, Phrae	W. Chotwong
Restaurant	Wang Thong, Phitsanulok	W. Chotwong
Restaurant	Nong Ruea, Khon Kaen	J. Bangtha
Restaurant	Sao Thong Chai, Si Sa Ket	J. Bangtha
Abandoned shop	Nong Ya Lat, Sisaket	J. Bangtha
Restaurant	Khok Makham, Buri Ram	J. Bangtha
Forest	Na Chaluai, Ubon Ratchathani	J. Bangtha
Local market	Thakhanon, Surat Thani	J. Bangtha
Cricket farm	Wang Yai, Phetchabun	Phetchabun highland agric
House	Thung Phaya, Chachoengsao	J. Bangtha
	Chon Buri	R. Pongpattana

Table 1 Spider Fauna in genus *Latrodectus* found in Thailand between 2016 until 2019 (Continue)

Scientific name	Habitat	Location	Reference
<i>Latrodectus elegans</i>	Edge of forest	Pranburi, Prachuap Khiri Khan	J. Bangtha
Thorell, 1898	Cassava field	Thung Phaya, Chachoengsao	S. Chaowarit
	Edge of cassava field	Nai meuang, Khon Kaen	L. Chalermkiat
	grass	Na Chaluai, Ubon Ratchathani	R. Pongpattana
	grass	Lop Buri	R. Pongpattana
	Laterite pond	Lop Buri	R. Pongpattana
	Edge of cassava field	Thammamun, Chai Nat	L. Chalermkiat

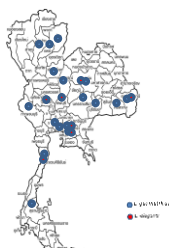
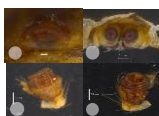
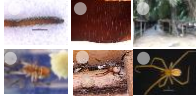


Figure 1 Distribution map of spider genus *Latrodectus* in Thailand



**Figure 2** Genitalia and Epigyne structure of *Latrodectus. geometricus* A. Epigyne

B. Spermathecae and copulatory duct C, D. left palpus show embolus with 4 loops



**Figure 3** . *Latrodectus geometricus* A. the comb on the fourth tarsus B. gumfoot lines

C. Habitat D. red abdominal “hour-glass” mark, E. Adult female with egg sac F. Adult male

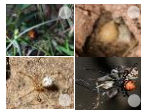




**Figure 4** Genitalia and Epigyne structure of *Latrodectus. elegans* A. Epigyne

B. Spermathecae และ copulatory duct C. Left palp of male show embolus with 3 loops

D. Left palp of male show extending embolus



**Figure 5** *Latrodectus elegans* A. Habitat B. Egg sacs C. subadult male D. subadult female



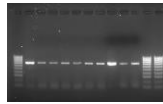


A

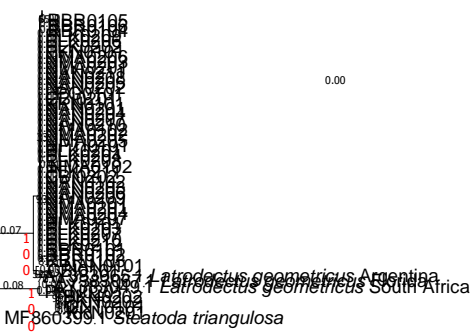


B

**Figure 6** *Scytodes fusca* A. Dorsal part B. Ventral part and epigynum



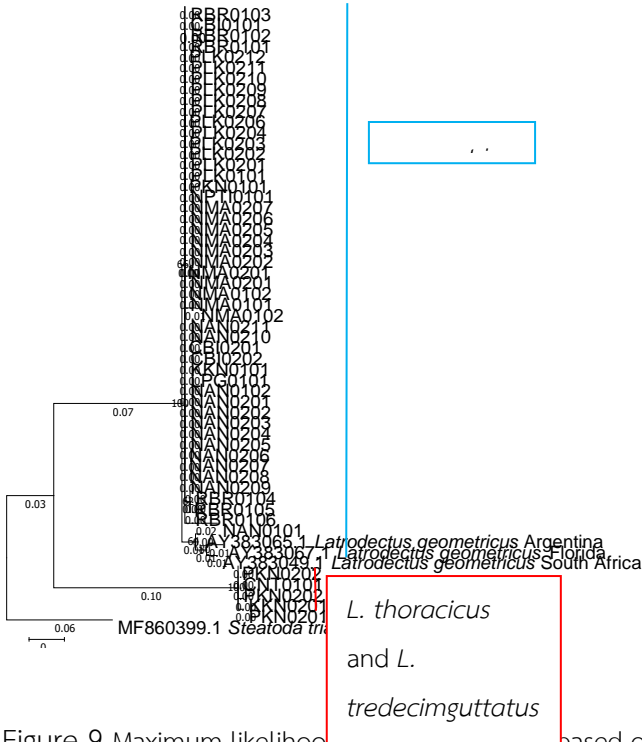
**Figure 7** PCR product จาก ยีน COX1 จากแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* (ตัวอย่าง 1 – 5) และ *L. thoracicus* (ตัวอย่าง 6 - 8) และ *L. tredecimguttatus* (ตัวอย่าง 9 - 10)



L.  
*thoracicus*  
 and L.  
*tredecimguttatus*



**Figure 8** Neighbor joining analysis phylogenetic tree based on *COX1* gene sequences. *Steatoda triangulosa* was used as outgroup. The scale bar = 0.02 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.



**Figure 9** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *COX1* gene sequences, showing the phylogenetic relationship among *Latrodectus* sp. Specimens and *Steatoda triangulosa* was used as outgroup. The number of sites are 650, and scale bar = 0.02 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

**13. ภาคผนวก**

**ภาคผนวกที่ 1** DNA Barcode ของแมงมุมแม่ข่าย *Latrodectus geometricus* เพิ่มปริมาณ DNA ด้วย *COX1* รายละเอียดของ DNA Barcode ของ แมงมุมแม่ข่าย *Latrodectus geometricus* จำนวน 10 ตัวอย่าง

### ตัวอย่างที่ 1 CBI0101

ATCGNATTAANNTTCNATCCGNNATAATATAGNAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATC  
AAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAATAGTAGAAAATAAATAAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCA  
GCTAAGTGTAAGAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCC  
CTATCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTTAAATATTTTATTTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGC  
ACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATT  
ACATTATACAACACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAGAAGCTTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAG  
CTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGNNTTGT

### ตัวอย่างที่ 2 CBI0201

AAATAGGATCCCCCTCCCTGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATTTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGA  
TAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAATAGTAGAAA  
TAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGA  
TAAAGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTT  
AAATTATTTATTTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAA  
AAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAGA  
ACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGTTGACACA

### ตัวอย่างที่ 3 LPG0101

TTGAACAAATAGGATCCCCTCCCTGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATTTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGG  
TAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAATAG  
TAGAAAATAAATAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAA  
TCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAA  
AATCTTAAATATTTATTTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTA  
CTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGA  
ATAAGAAGCTTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGATTTTTGTTGACCA

### ตัวอย่างที่ 4 NAN0101

TTTAGATTGTTGANACTCTTTCNGTGCAGGGGCAAAAAAGATCGTATTAGAATTTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAG  
GTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAATA  
GTAGAAAATAAATAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTA  
ATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCA  
AAATCTTAAATATTTATTTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATT  
ACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGA  
AATAAAAACCTTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGTTGACACA

### ตัวอย่างที่ 5 NAN0102

TAGATTGTTGACATCTTTACGTGAAGGGGAAAAAAACGATTTAGAATTTCTATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAAT  
GATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAATAGTAGA  
AATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCG  
GATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATC  
TAAATATTTATTTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTAT  
AAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAA  
GAAGCTTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGTTGACACA

### ตัวอย่างที่ 6 NAN0201

TTTAGATTTGTTGANATCTTCCGGTGGAGGGGCAAAAAAGATGTATTAGAATTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGT  
AATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAAACAAATATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGT  
AGAAAATAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAAT  
CCGGATAAAGGGGATAAATCGTTCATCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAGAGGGAGGTAATAATCAAA  
ATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTAC  
TATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACACTGATCATCCCCTAATATTCTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAA  
TAAGAACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGGTTGACAC

#### ตัวอย่างที่ 7 NAN0202

CCCTTCCCGTGCAGGGGAGAAAAAGATGTATTAATAATTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGT  
AAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAAACAAATATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAAATAAATTAAT  
AGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGA  
TAAATCGTTCATCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATAGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTTAAATTATTTAT  
TCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATT  
ACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACACTGATCATCCCCTAATATTCTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGAAGTCTTATGG  
CAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGGTTGAA

#### ตัวอย่างที่ 8 NMA0101

AAATAGGATCCCCCTCCCTGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATAATTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGA  
TAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAAACAAATATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAA  
TAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGA  
TAAAGGGGATAAATCGTTCATCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATAGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTT  
AAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAA  
AAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACACTGATCATCCCCTAATATTCTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGA  
ACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCATT

#### ตัวอย่างที่ 9 NPT0101

GGGATGATCAGTTGTATAATGTAATTGTAACCGGTCATGCTTTTGAATAATTTTTTTTATAGTAATACCAGTATTAATTGGGGGATTTGGAAATTG  
GTTGGTCCGCTAATGTTGGGTGCACCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCATTATTATTATTATTTA  
TTTTCTTATAGAAGAGATAGGGGTAGGGGAGGATGAACGATTTATCCCCCTTATCCGGATTAGAAGGCCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTG  
CTATTTTTTCTTACACTTAGCTGGGCATCTTCAATTATAGGAGCTATTAATTTTATTCTACTATTTTGAATATACGTTTATATGGAATGAGAATG  
GAGAAGGTTAGATTATTTGTTTGATCAGTGTTAATTACAGCTGTTTTACTTTTTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTGAC  
GGATCGAAATTTTAATACATCTTTTTTTGACCTGCAGGGGAGGGGATCCTATTTTGTTCACATTTGTTTTGATTTTTGNTCACCC

#### ตัวอย่างที่ 10 PLK0101

AAATAGGATCCCCCTCCCTGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATAATTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGA  
TAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAAACAAATATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAA  
TAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGA  
TAAAGGGGATAAATCGTTCATCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATAGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTT  
AAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAA  
AAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACACTGATCATCCCCTAATATTCTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGA  
ACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGTTGACCCA

รายละเอียดของ DNA Barcode ของ แมงมุมแม่ข่าย *Latrodectus elegans* จำนวน 10 ตัวอย่าง

#### ตัวอย่างที่ 1 PKN0201

TGAACTATTTMCCTCCTTTTRCAAGATTAGARGGTCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGAATTTTTCTTTACATTTTRGCAGGNGCNTCTTCTA  
TTATRGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATNAATWTACGTTTGGTTGGNATATCTATRGAARGTAAAGATTATTTGTTGNTCNGTWTNAT  
TACTGCNGTNTTNTTATTATTACATTACCTGTNTTGGCAGGGGCNATNACNATANTATTAACCTGATCGTAATTTTAATCNTCATTTTTTGATCCN  
GCAGGAGGGGGTGATCCTATNTTGTTCNACATTTGTTTTGATTTTTTGGNCANCCTGAAGTTTATTTTTANTTTTTACCGGGA

### ตัวอย่างที่ 2 PKN0202

GCAAATCANAACAAATGTTGAACAAGATAGGATCACCCCTCCTGCAGGATCAAAAAATGAAGTATTAATAATTACGATCAGTTAATAATATTGTAAT  
TGCCCTGCCAATACAGGTAATGATAATAATAATAACTGCAGTAATTTAACTGACCAAACAATAATCTTACTTTTTCTATAGATATCCCAACCA  
AACGTATATTCATAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCCCTATAATAGAAGAAGCTCCTGCTAAATGTAAAGAAAAAATTGCAAAATCTACTGATCT  
CCCTCTATGACCATCTAATCTTGATAAAGGAGGATAAATAGTTCACCCTGATCCCACTCCAATCTTCTAAAGAAGAAATAAACAATAAAATTTAA  
GAAGAAGGCAATAATCAAAATCTTAAATTTATACGAGGAAAGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGAGGAACATAATCAATTTCAAAATCCT  
CC

### ตัวอย่างที่ 3 CNT0101

GAGCTCTGATATAGCTTTTCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTGCCTTCTTTAATTTTATTGTTTATTTCTTTTAGAAGAAGTTG  
GAGTGGGATCAGGGTGAACATTTATCCTCCTTTATCAAGATTAGAGGGTCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGAATTTTTCTTTACATTTAGC  
AGGAGCTTCTTATTATAGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATGAATATACGTTTGGTTGGGATATCTATAGAAAAAGTAAGATTATTGTTT  
GGTCAGTTTTAATTACTGCAGTATTGTTATTATTACATTACCTGTATTGGCAGGGGCAATTACAATATTATAACTGATCGTAATTTAATACTTCA  
TTTTTTGATCTCGCAGGAGGGGGTGATCCTATCTGTTTCAACATTTGTTTTGATTTTTTGGCCATCCTGAAGTTTATTTTTATTTTTACCGGGA

### ตัวอย่างที่ 4 PKN0101

AGGATCCCTCCCTGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATTTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAAT  
AAAAGTAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAAACAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAA  
ATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGGTAAAGAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAA  
GGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTTAAAT  
TATTTATCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAA  
AATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACCTGATCATCCCTAATATTCTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGAACTC  
TTATGGCAGTTCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCAATATCTTTATGTTT

### ตัวอย่างที่ 5 CBI010

AATAATATAGNAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAAACAATAATCTAACCTTCTCCA  
TTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGGTAAAGAAAAATAGC  
AAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTTCTATAGAAGAAATA  
AATAATAATAAATGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTTAAATTTTATTTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACC  
AATTTCCAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACCTGATCATCCCT  
AATATTCTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGAACTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCC  
CAATATCTTTATG

### ตัวอย่างที่ 6 PKN0102

TTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAACCTGCCATAAGAGTTCTTATTGAAATTGAATTAGGTCAACCTGGAAGAATATTAGGGGATGATCAGTTGT  
ATAATGTAATTGAACCGGTCATGCTTTTGAATAATTTTTTATAGTAATACCAGTATTAATGGGGGATTTGGAAATGGTTGGTTCCGCTAATG  
TTGGGTGCACCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATTAAGATTTGATTATTACCTCCCTCATTATTATTATTTATTTCTTCTATAGAAGA  
GATAGGGGTAGGGGAGGATGAACGATTTATCCCTTTATCCGGATTAGAAGGCCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTCTATTTTTCTTTACAC  
TTAGCTGGGGCATCTTCAATTATAGGAGCTATTAATTTTATTTCTACTATTTTGAATATACGTTTATATGGAATGAGAATGGAGAAGGTTAGATTATT  
TGTTTGATCAGTGTTAATTACAGCTGTTTTACTTTTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGAGCTTACTATATTATTGACGGATCGAAATTTTAATA  
CATTTTTTTGACCTGCAGGGGAGGGGATCCTATTTGTTTCAACATTTGTTTTGATTTTTTGGTACCCT

### ตัวอย่างที่ 7 CNT0102

TTGGNCCCCTGAATTAGAGCAGGAATACATAAGAACATCTGTGTAAGACTTTTAATTCGAGCTGAATTAGGAAATCCCGGATCTTTAATTGGAGATGA  
CCAAATTTATAATACTATTGTAACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTATAAATGGAGGATTTGGTAATTGATTAGTTC  
CCCTGATATTAGGAGCCCCTGATATAGCCTTCCCACGAATAAATAATATAAGTTTTTGATTCTTACCCCTCTCTCACCTTTTAATTTCAAGAAGA  
ATCGTAGAAAATGGAGCAGGACTGTTGAACTGTCTATCCCCCTATCTTCTAATATTGCTCATGGAGGTAGTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTT  
CTTTACATTTAGCTGGTATTTTCATCGATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACCACTATTATTAATACGAGTTAATGGACTTTCATTTGATCAAATA  
CCTTTATTTGTTGAGCTGTTGGTATTACTGCTTTACTCCTTTCTTTTATCATTGCCAGTTTTAGCTGGAGCTATCACAAATATTATTAACGGATCGTAA  
TTTAAATACATCATTCTTTGATCCTGCAGGTGGAGGAGACCCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

### ตัวอย่างที่ 8 KKN0201

GAGCTCTGATATAGCTTTTCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTGCCTTCTTCTTTAATTTTATTGTTTATTTCTTCTTTAGAAGAAGTTG  
GAGTGGGATCAGGGTGAACATTTATCCTCCTTTATCAAGATTAGAGGGTCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGAATTTTTCTTTACATTTAGC  
AGGAGCTTCTTCTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTCTACTATTATGAATATACGTTTGGTTGGGATATCTATAGAAAAAGTAAGATTATTGTTT  
GGTCAGTTTTAATTACTGCAGTATTGTTATTATTATCATTACCTGTATTGGCAGGGGCAATTACAATATTATTAAGTATCGTAATTTTAACTCTCA  
TTTTTTGATCCTGCAGGAGGGGGTATCCTATTTTGTTCACATTTATTTTGATTTTTTGCCATCTGAAGTTTATATTTTAAATTTTACCGGGA

### ตัวอย่างที่ 9 KKN0202

CAAATAAATGTTGAACAAAATAGGATCACCCCTCCTGCAGGATCAAAAAATGAAGTGTAAAATTACGATCAGTTAATAATATTGTAATTGCCCT  
GCCAATACAGGTAATGATAAATAACAATACTGCAGTAATTAATAACTGACCAAAACAATAATCTTACTTTTTCTATAGATATCCCAACCAACGAT  
ATTCATAATAGTAGAAAATAAATTAATAGCCCTATAATAGAAGAAGCTCCTGCTAAATGTAAAGAAAAAATTGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTA  
TGACCCTCTAATCTTGATAAAGGAGGATAAATAGTTCCACCCTGATCCCACTCCAATTCTTCTAAAGAAGAAATAAACAATAAATAAAGAAGAAG  
GCAATAATCAAAATCTTAAATTTATTTATACGAGGAAAAGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGAGGAACTAATCAATTTCAAAATCCTCCA

### ตัวอย่างที่ 10 CBI0202

TATTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAACTGCCATAAGAGTTCTTATTCGAATTGAATTAGGTCAACCTGGAAGAATATTAGGGGATGATCAGTTG  
TATAATGTAATTGTAACCGGTCATGCTTTTGAATAATTTTTTTTATAGTAATACCAGTATTAATTGGGGATTTGGAAATGGTTGGTCCGCTAAT  
GTTGGGTGCACCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCATTATTATTATTATTCTTCTATAGAAG  
AGATAGGGGTAGGGCAGGATGAACGATTTATCCCCCTTATCCGGATTAGAAGGCCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGCTATTTTTCTTTACA  
CTTAGCTGGGGCATCTTCAATTATAGGAGCTATTAATTTTATTCTACTATTTTGAATATACGTTTATATGGAATGAGAATGGAGAAGGTTAGATTAT  
TTGTTTGTATCAGTGTAAATTACAGCTGTTTTACTTTTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTAATTTATTATTGACGGATCGAAATTTAAT  
ACATCTTTTTTTGACCCTGCAGGGGAGGGGATCCTATTTTGTTCACATTTGTTTTGATTTTTTGGTCACCCTGGAAGTTTAAA