



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การศึกษาวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของยีนที่สังเคราะห์เส้นใยโครงสร้างหลักในใยแมงมุม (*MaSp1*)  
Molecular phylogenetic study of spider dragline silk gene (*MaSp1*)

ชื่อนิสิต นางสาวกชกร วรนิตย์

เลขประจำตัว 5932001123

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของยีนที่สังเคราะห์เส้นใยโครงสร้างหลักในใยแมงมุม (*MaSp1*)

Molecular phylogenetic study of spider dragline silk gene (*MaSp1*)

นางสาวกชกร วรนิത്യ์

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การศึกษาวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของยีนที่สังเคราะห์เส้นใยโครงสร้างหลัก ในใยแมงมุม ( <i>MaSp1</i> )
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวกชกร วรรณิตย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ
ภาควิชา	: ชีววิทยา

---

### บทคัดย่อ

ใยแมงมุม (spider silk) เป็นเส้นใยโปรตีนที่แมงมุมสร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต ซึ่งใยแมงมุมถือเป็นวัสดุชีวภาพที่มีความโดดเด่นหลายประการ และมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมในหลากหลายด้าน โดยทั่วไปสามารถจำแนกประเภทของใยตามหน้าที่การใช้งานและชนิดของต่อมที่ใช้สร้างใยได้ 7 ชนิด ทั้งนี้ชนิดของเส้นใยที่มีความสำคัญและมีข้อมูลทางการศึกษามากที่สุดคือ เส้นใยโครงสร้างหลัก (dragline silk) ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน Major ampullate Spidroin 1 (*MaSp1*) และยีน Major ampullate Spidroin 2 (*MaSp2*) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมเกี่ยวกับวิวัฒนาการของยีนที่ผลิตเส้นใยโครงสร้างหลักในใยแมงมุม อย่างยีน *MaSp1* ยังมีอยู่ไม่มากนัก ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ศึกษาได้เลือกตัวอย่างที่นำมาใช้ทั้งหมด 13 สปีชีส์ โดยมี 3 สปีชีส์มาจากการทำ 10x Genomic Sequencing และตัวอย่างแมงมุมอีก 10 สปีชีส์มาจาก Spider Assembly Genome โดยดาวนโหลดจากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมทั้ง 13 สปีชีส์มาระบุตำแหน่งของยีน *MaSp1* ที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลดังกล่าว และนำไปสร้างแผนภูมิมวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *MaSp1* ระหว่างชนิดของแมงมุมทั้ง 13 สปีชีส์ ด้วยการวิเคราะห์แบบ Bayesian Inference (BI) ผลจากการสร้างแผนภูมิมวิวัฒนาการพบว่า แมงมุมวงศ์ Nephilidae และแมงมุมวงศ์ Araneidae ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ เนื่องจากเป็นแมงมุมในกลุ่มที่สร้างใยกลม (Orb-weaver spider) และนอกจากนั้นแมงมุมกลุ่มดังกล่าวยัง clade กับแมงมุมกลุ่ม Theridiidae เนื่องจากแมงมุม *Latrodectus* sp., *Nephila* sp. และ *Argiope* sp. มีบรรพบุรุษร่วมกันเมื่อ 135–160 ล้านปีก่อน อย่างไรก็ตามลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *MaSp1* ไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ภายในแมงมุมกลุ่มอื่นได้

**คำสำคัญ:** ใยแมงมุม, แผนภูมิมวิวัฒนาการ, ลำดับนิวคลีโอไทด์, เส้นใยโครงสร้างหลัก

Research Title : Molecular phylogenetic study of spider dragline silk gene  
(*MaSp1*)  
Student name : Miss Kochakorn Woranit  
Advisor : Assistant Professor Natapot Warrit, Ph.D.  
Department of : Biology

---

### ABSTRACT

Spider silk is a protein fiber spun by spider use for life existence. Spider silk is also biological materials that have outstanding benefits and importance for industry. All spider silk can produce 7 different types for different uses and glands. Dragline silk is the most important silk and most of study specific to this type. This silk controlled by Major ampullate Spidroin 1 gene (*MaSp1*) and Major ampullate Spidroin 2 gene (*MaSp2*). Nevertheless, there are few studies about evolution of dragline silk gene. In this study, we select 13 species for taxa selection. There are 3 species from 10x Genomic Sequencing and 10 species from Spider Assembly Genome downloaded from GenBank. Then, annotated *MaSp1* gene position in nucleotide sequence from 13 species. After that, utilized for Phylogenetic analysis using Bayesian Inference (BI). The phylogenetic analysis reveals that spider from family Nephilidae are grouped in the same clade with family Araneidae that correspond with previous study because they are Orb-weaver spider. In addition, spiders from 2 families are claded together with spiders from family Theridiidae due to *Latrodectus* sp., *Nephila* sp. and *Argiope* sp., have common ancestor since 135–160 MYA, Nevertheless, *MaSp1* gene cannot resolve the relationship among another group of spiders.

**Keywords:** Spider silk, Phylogenetic tree, nucleotide sequence, dragline silk

### กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนการเก็บตัวอย่าง การวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ Yong-Chao Su, Kaohsiung Medical University, Department of Biomedical Science and Environmental Biology, PhD ที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในการเรียนรู้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนาและอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2562 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านกัญชาวิทยา ความหลากหลายทางด้านพืช แมงมุม และไรภาคีชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบคุณ Ecology and Evolutionary Genomics laboratory (PI: Yong-Chao Su) Dept. of Biomedical Science and Environmental Biology, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung City, Taiwan ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคชีววิทยาและคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ .....	ก
ABSTRACT .....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ .....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ .....	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	2
2.1. การจัดจำแนกแมงมุมตามหลักอนุกรมวิธาน.....	2
2.2. ชนิดและโครงสร้างของเส้นใยแมงมุม .....	4
2.2.1. ต่อมที่ใช้ในการผลิตเส้นใยและชนิดของเส้นใยแมงมุม .....	4
2.2.2. ประเภทของใยแมงมุม (spider web) .....	5
2.2.3. ไยกกลม (Orb web) และแมงมุมที่สร้างไยกกลม (Orb-weaver spider).....	6
2.2.4. โครงสร้างของเส้นใยแมงมุม.....	8
2.3. คุณสมบัติของเส้นใยแมงมุมและการประยุกต์ใช้ประโยชน์.....	11
2.3.1. คุณสมบัติของเส้นใยแมงมุม .....	11
2.3.2. การประยุกต์ใช้ประโยชน์ .....	11
2.4. การแสดงออกของยีน <i>MaSp1</i> (Major ampullate Spidroin 1).....	11
2.5. กลไกการเกิด Concerted Evolution .....	12
2.6. Illumina Sequencing/ 10x Genomic Sequencing .....	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน .....	13
3.1. Taxa Selection .....	13
3.2. RNA Extraction .....	13
3.3. 10x Genomic Sequencing.....	13
3.4. การระบุตำแหน่งยีน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และการสร้างแผนภูมิวงศ วานทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree).....	14
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	15
4.1. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน <i>MaSp1</i> ของ Taxa Selection กับ ฐานข้อมูลใน GenBank .....	15

4.2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการสร้างแผนภูมิจีนวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) .....	15
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา .....	18
5.1. แผนภูมิจีนวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากยีน <i>MaSp1</i> เปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า .....	18
5.2 การแสดงออกของโปรตีน และวิวัฒนาการของยีน <i>MaSp1</i> และยีนอื่น .....	18
5.2.1. การแสดงออกของโปรตีนจากต่อม Major ampullate ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนจากต่อมสร้างเส้นใยประเภทอื่น .....	18
5.2.2. วิวัฒนาการของยีน <i>MaSp1</i> และ Spidroin gene อื่น .....	19
5.3 รูปแบบ topology ของแมงมุมกลุ่มอื่นที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า .....	19
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ .....	21
6.1. สรุปผลการศึกษา .....	21
6.2. ข้อเสนอแนะ .....	21
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ .....	21
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต .....	21
เอกสารอ้างอิง .....	22
ภาษาไทย.....	22
ภาษาอังกฤษ.....	22
ภาคผนวกที่ 1 Taxa Selection .....	26
ภาคผนวกที่ 2 ยีน <i>MaSp1</i> ที่ได้จากการกระบวนการ blast.....	29
ภาคผนวกที่ 3 การตั้งค่าโปรแกรม .....	30
ภาคผนวกที่ 4 แผนภูมิจีนวิวัฒนาการ (Phylogenomic tree) .....	32

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 Diagnosis Character ที่ใช้ในการจัดจำแนกแมงมุม .....	2
ภาพที่ 2-2 Diagnosis Character ที่ใช้ในการจัดจำแนกแมงมุมกลุ่ม Mesothelae.....	3
ภาพที่ 2-3 Diagnosis Character ที่ใช้ในการจัดจำแนกแมงมุมกลุ่ม Opisthothelae โดยอยู่ในกลุ่ม Infraorder Araneomorphae .....	3
ภาพที่ 2-4 Diagnosis Character ที่ใช้ในการจัดจำแนกแมงมุมกลุ่ม Opisthothelae โดยอยู่ในกลุ่ม Infraorder Mygalomorphae .....	3
ภาพที่ 2-5 Microdissection ของต่อมที่ใช้ในการผลิตเส้นใย 7 ชนิด บริเวณ Abdomen ของแมงมุม <i>Nephila Clavipes</i> .....	4
ภาพที่ 2-6 เส้นใยแมงมุม 7 ชนิด จำแนกประเภทของใยตามหน้าที่การใช้งานและชนิด ของต่อมที่ใช้สร้างใยของแมงมุม <i>Araneus Diadematus</i> .....	5
ภาพที่ 2-7 ใยแมงมุมประเภท Cob Web และ Sheet Web.....	6
ภาพที่ 2-8 Stabilimenta ในใยกลม (Orb Web).....	7
ภาพที่ 2-9 Hierarchical Structure ของเส้นใยจากต่อม Major Ampullate.....	9
ภาพที่ 2-10 Spidroin Molecular Organization .....	10
ภาพที่ 2-11 Homogenization ที่เกิดขึ้นผ่านกระบวนการ Recombination.....	12
ภาพที่ 4-1 Phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>MaSp1</i> ใช้วิธีวิเคราะห์ แบบ Bayesian Inference (BI).....	16
ภาพที่ 4-2 Phylogenetic tree (Collapsed clade) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>MaSp1</i> ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Bayesian Inference (BI).....	17



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ใยแมงมุม (spider silk) เป็นเส้นใยโปรตีนที่แมงมุมสร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต ไม่ว่าจะเป็นการใช้สำหรับสร้างรังที่เหมาะสม ใช้สำหรับล่าเหยื่อ และเพื่อปกป้องไข่หรือตัวอ่อน (Nentwig and Heimer, 1987) ใยแมงมุมถือว่าเป็นวัสดุชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่โดดเด่นหลายประการ เช่น มีความแข็งแรงและสามารถรับน้ำหนักได้มากกว่าเส้นใยโลหะหรือเส้นใยเหล็กกล้าที่มีความหนาแน่นเท่ากัน มีความยืดหยุ่นสูง และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Babb et al., 2017) โดยทั่วไปสามารถจำแนกประเภทของใยตามหน้าที่การใช้งานและชนิดของต่อมที่ใช้สร้างใยได้ 7 ชนิด (Babb et al., 2017; Blamires et al., 2017) โดยชนิดของเส้นใยที่มีความสำคัญคือ เส้นใยที่ผลิตจาก Major ampullate gland โดยจะผลิตเส้นใยโครงสร้างหลัก (dragline silk) ซึ่งเป็นเส้นใยแกนกลางเพื่อใช้ในการดักจับเหยื่อและใช้ในการโรยตัวของแมงมุมลงมาจากที่สูง (Garb et al., 2010)

องค์ประกอบหลักของเส้นใยแมงมุมคือโปรตีน Spidroin ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ มีขนาดโมเลกุลประมาณ 350 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2,500–3,500 ตัว โครงสร้างของ Spidroin สามารถแบ่งได้สามส่วนได้แก่ N-terminal, C-terminal และ repetitive region ปัจจุบันเส้นใยแมงมุมที่มีข้อมูลทางการศึกษามากที่สุดคือ เส้นใยโครงสร้างหลัก โดยเส้นใยชนิดนี้จะถูกสร้างจาก Major ampullate gland ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน MaSp1 และ MaSp2 (Blamires et al., 2017; Eisoldt et al., 2011) ที่ทำการสร้างโปรตีน Spidroin

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมเกี่ยวกับวิวัฒนาการของยีนที่ผลิตเส้นใยโครงสร้างหลักในใยแมงมุม ยังมีอยู่ไม่มากนัก ทำให้ยังขาดแคลนข้อมูลทางวิวัฒนาการของยีนดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้ต้องการศึกษาวิวัฒนาการของยีน MaSp1 หรือ Major ampullate Spidroin 1 ที่สังเคราะห์เส้นใยโครงสร้างหลัก (dragline silk) ในใยแมงมุม ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยเสริมข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของยีนที่ผลิตเส้นใยโครงสร้างหลัก ซึ่งสามารถนำไปวิจัยต่อยอดความรู้เกี่ยวกับการคัดเลือกสายพันธุ์แมงมุมที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเส้นใยดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการพัฒนาเส้นใยสังเคราะห์ต่อไปในอนาคต

#### 1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

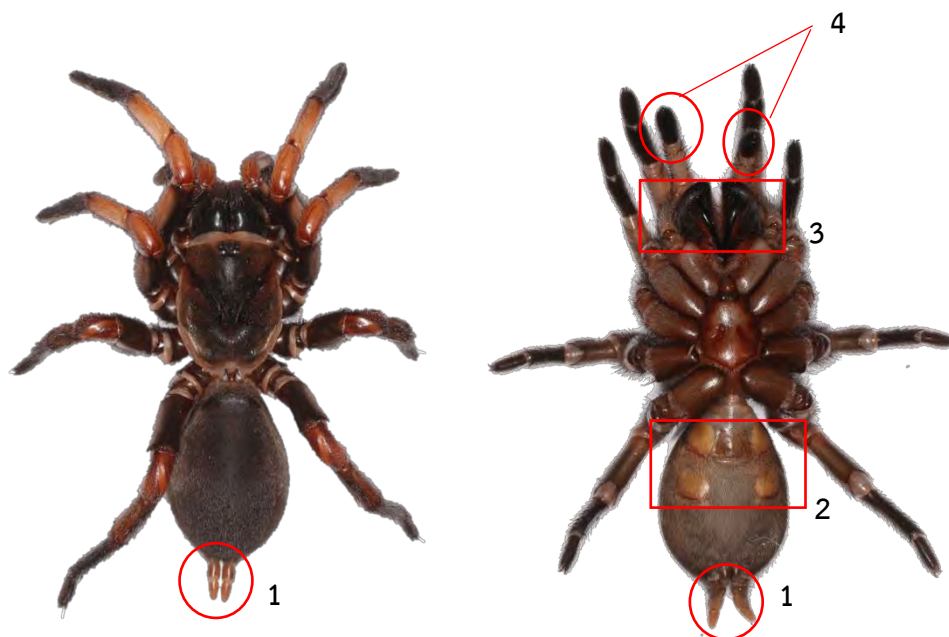
ศึกษาวิวัฒนาการของยีนที่สังเคราะห์เส้นใยโครงสร้างหลักในใยแมงมุม (*MaSp1*)

## บทที่ 2

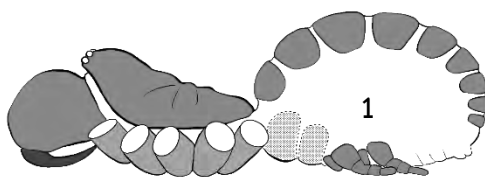
### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1. การจัดจำแนกแมงมุมตามหลักอนุกรมวิธาน

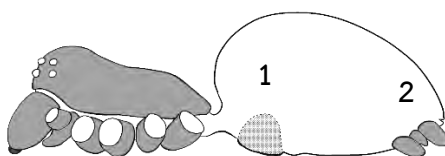
แมงมุมเป็นสัตว์ขาปล้องที่มีความหลากหลายสูง โดยปัจจุบันมีการค้นพบแมงมุมมากถึง 48,642 สปีชีส์ (World Spider Catalog 2020) แมงมุมอยู่ phylum arthropoda อันดับ Araneae ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 order หลักได้แก่ Mesothelae และ Opisththelae โดยมีลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกแมงมุมดังนี้ spinneret อวัยวะที่ใช้ในการพ่นใย chelicerae เขี้ยวหรือเปรียบเสมือนฟันของแมงมุม pedipalp ใช้ในการจับยึดอาหาร โดยสามารถใช้ลักษณะดังกล่าวมาจัดจำแนกแมงมุม ออกเป็น 3 กลุ่มหลัก โดย Mesothelae จะมี spinneret อยู่บริเวณกลาง abdomen และในกลุ่ม opisththelae จะมี spinneret จะอยู่บริเวณปลาย abdomen โดยในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 infraorder ย่อยโดยใช้จำนวนของ book lung หรือแผงปอดเข้ามาจัดจำแนก โดย Araneomorph จะมี book lung 1 คู่ ส่วน mygalomorph จะมี book lung 2 คู่ (Xu et al. 2015)



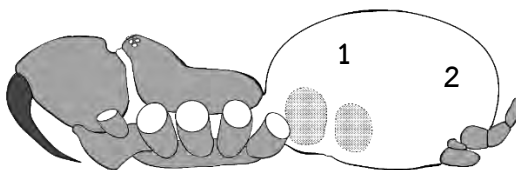
ภาพที่ 2-1 Diagnosis character ที่ใช้ในการจัดจำแนกแมงมุม หมายเลข 1 คือตำแหน่งของ spinneret หมายเลข 2 คือตำแหน่งของ book lung หมายเลข 3 คือตำแหน่งของ chelicerae และ หมายเลข 4 คือตำแหน่งของ pedipalp (ภาพโดยชวกร ชุนเศรษฐ์)



ภาพที่ 2-2 Diagnosis character ที่ใช้ในการจัดจำแนกแมงมุมกลุ่ม Mesothelae หมายเลข 1 คือ ตำแหน่งของ spinneret อยู่บริเวณกลาง abdomen (ภาพโดยชวกร ชุนเศรษฐ์)



ภาพที่ 2-3 Diagnosis character ที่ใช้ในการจัดจำแนกแมงมุมกลุ่ม Opisthothelae โดยอยู่ในกลุ่ม infraorder Araneomorphae หมายเลข 1 คือตำแหน่งของ book lung 1 คู่ และหมายเลข 2 คือ ตำแหน่งของ spinneret อยู่บริเวณปลาย abdomen (ภาพโดยชวกร ชุนเศรษฐ์)

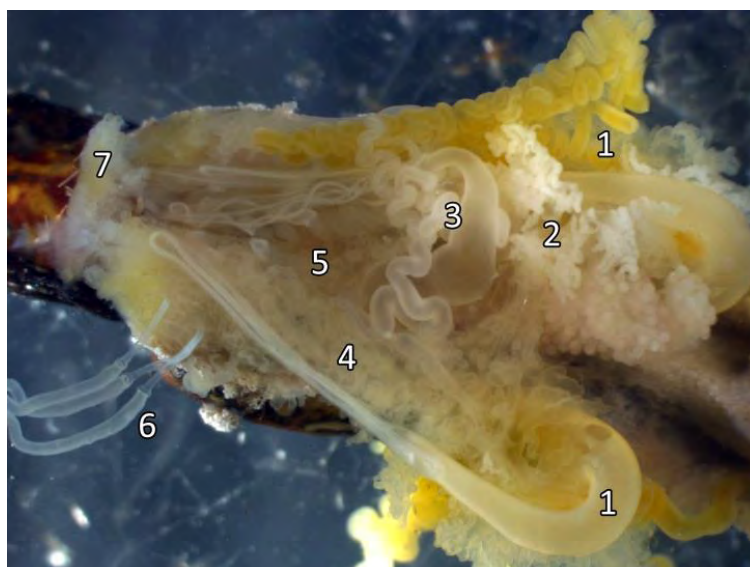


ภาพที่ 2-4 Diagnosis character ที่ใช้ในการจัดจำแนกแมงมุมกลุ่ม Opisthothelae โดยอยู่ในกลุ่ม infraorder Mygalomorphae หมายเลข 1 คือตำแหน่งของ book lung 2 คู่ และหมายเลข 2 คือ ตำแหน่งของ spinneret อยู่บริเวณปลาย abdomen (ภาพโดยชวกร ชุนเศรษฐ์)

## 2.2. ชนิดและโครงสร้างของเส้นใยแมงมุม

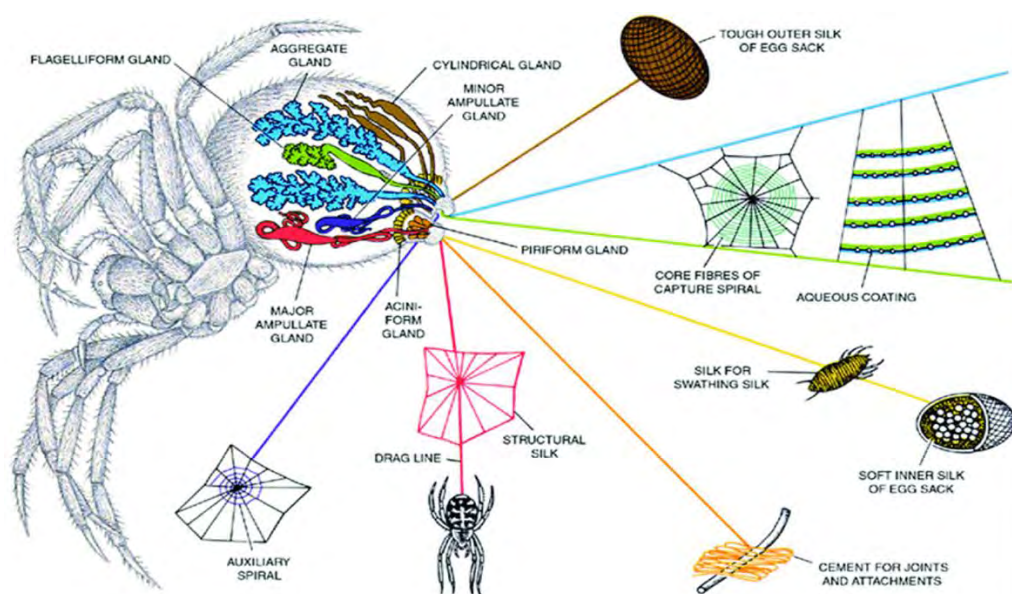
### 2.2.1. ต่อมที่ใช้ในการผลิตเส้นใยและชนิดของเส้นใยแมงมุม

เส้นใยแมงมุมสามารถแบ่งออกได้เป็น 7 ชนิด จำแนกประเภทของใยตามหน้าที่การใช้งาน และชนิดของต่อมที่ใช้สร้างใย เส้นใยแมงมุมแต่ละชนิดนั้นจะผลิตจากต่อมที่ใช้ในการสร้างใยที่แตกต่างกัน ดังนี้ 1. ต่อม major ampullate จะผลิตเส้นใย dragline มีหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของใยแมงมุมที่มีลักษณะเป็นตาข่าย โดยซึ่งจากจุดศูนย์กลางของรังและแผ่ออกเป็นแนวรัศมี 2. ต่อม minor ampullate จะผลิตเส้นใยที่ต่อจากโครงหลักของเส้นใย dragline 3. ต่อม flagelliform จะผลิตเส้นใยที่เป็นแกนหลักของใยแมงมุม 4. ต่อม aggregate จะผลิตเส้นใยที่มีลักษณะเป็นหยดเหนียวสำหรับเชื่อมเส้นใยย่อยเข้ากับเส้นใยที่เป็นแกนหลัก 5. ต่อม piriform หรือ pyriform จะผลิตเส้นใยสำหรับยึดเกาะ โดยผลิตเส้นใยสำหรับเชื่อมหรือยึดเส้นใย dragline เข้ากับที่ยึดเกาะจำพวกกิ่งไม้ เป็นต้น 6. ต่อม tubiliform หรือ cylindriform จะผลิตเส้นใยสำหรับห่อหุ้มไขชั้นนอกในแมงมุมเพศเมีย และ 7. ต่อม aciniform จะผลิตเส้นใยสำหรับจับเหยื่อและห่อหุ้มไข (Garb et al., 2010; Penney et al., 2013)



ภาพที่ 2-5 Microdissection ของต่อมที่ใช้ในการผลิตเส้นใย 7 ชนิด บริเวณ abdomen ของแมงมุม *Nephila clavipes* หมายเลข 1 คือต่อม major ampullate หมายเลข 2 คือต่อม flagelliform หมายเลข 3 คือต่อม minor ampullate หมายเลข 4 คือต่อม aggregate หมายเลข 5 คือต่อม aciniform หมายเลข 6 คือต่อม tubiliform และหมายเลข 7 คือต่อม piriform

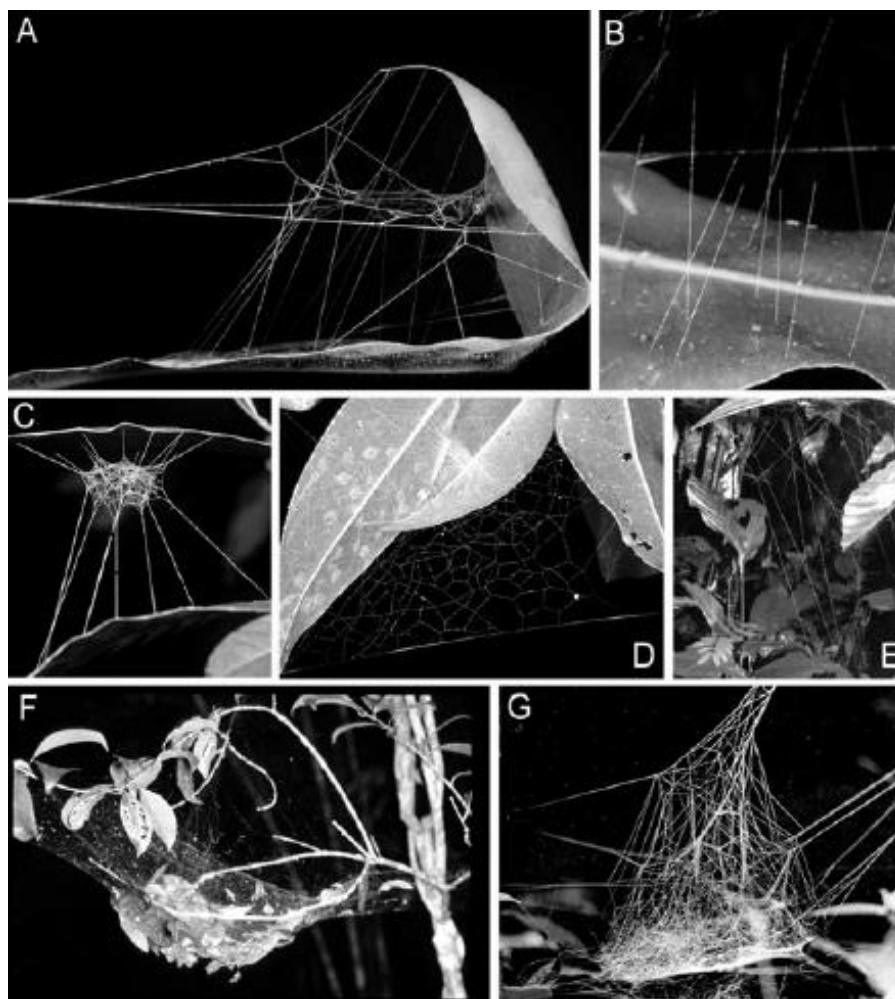
(Vierra et al., 2011)



ภาพที่ 2-6 เส้นใยแมงมุม 7 ชนิด จำแนกประเภทของใยตามหน้าที่การใช้งานและชนิดของต่อมที่ใช้สร้างใยของแมงมุม *Araneus diadematus* สีแดงหมายถึงเส้นใย dragline ที่สร้างจากต่อม major ampullate สีม่วงหมายถึงเส้นใยที่สร้างจากต่อม minor ampullate สีเขียวหมายถึงเส้นใยที่สร้างจากต่อม flagelliform สีน้ำเงินหมายถึงเส้นใยที่สร้างจากต่อม aggregate สีน้ำตาลหมายถึงเส้นใยที่สร้างจากต่อม cylindrical สีเหลืองหมายถึงเส้นใยที่สร้างจากต่อม aciniform และสีส้มหมายถึงเส้นใยที่สร้างจากต่อม pyriform (Zheng and Ling, 2018)

## 2.2.2. ประเภทของใยแมงมุม (spider web)

ใยแมงมุมเกิดจากการปั่นของเส้นใยแมงมุมหลากหลายประเภทจนเกิดเป็นรูปร่างของใยที่หลากหลายตามลักษณะการใช้งาน ขนาดของเหยื่อ พฤติกรรมของแมงมุม สิ่งแวดล้อม หรือสิ่งที่จะมาทำอันตรายกับตัวใย (Harmer et al., 2010) ตัวอย่างของใยแมงมุม เช่น ใยแมงมุมประเภท Trapdoor สร้างใยที่สามารถเปิดปิดได้ โดยอาศัยวัสดุตามธรรมชาติมาเป็นส่วนหนึ่งของตัวใย และใยดังกล่าวสามารถเปิดปิดได้ พบในแมงมุมกลุ่ม Mesothelae และ Mygalomorph ใยแมงมุมประเภท Cob web สร้างใยระหว่างใบไม้ กิ่งไม้ หรือวัสดุตามธรรมชาติ ในแมงมุมวงศ์ Theridiidae ใยประเภท Sheet web เป็นใยที่ลักษณะคล้าย Cob web แต่แตกต่างกันตรงที่ไม่มีมิติหรือมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ในแมงมุมวงศ์ Linyphiidae เป็นต้น ใยประเภท Orb web หรือใยกลม เป็นใยแมงมุมที่มีการศึกษามาก ใยประเภทนี้มีความเหนียวและความแข็งแรงมาก มักเรียกแมงมุมกลุ่มที่ทำการสร้างใยประเภทนี้ว่า Orbiculariae หรือ Orb-weaver spider (Coddington and Levi, 1991; Garrison et al., 2016)

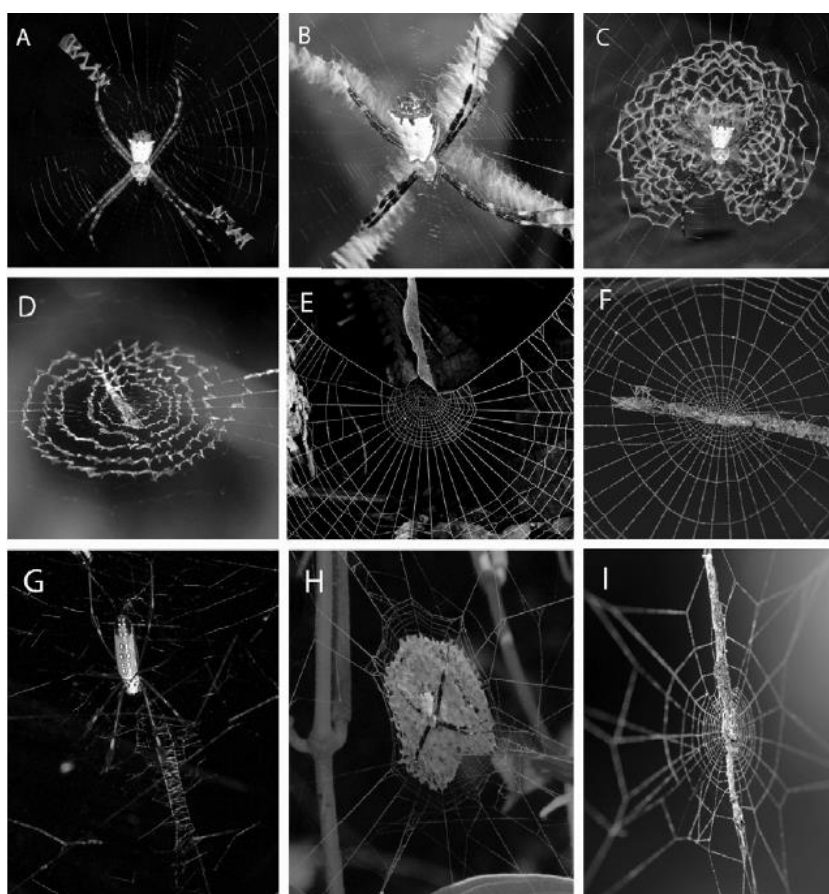


ภาพที่ 2-7 ไยแมงมุมประเภท Cob web และ Sheet web ภาพ A-F คือใยแมงมุมประเภท Cob web. โดยภาพ A-B ไยที่สร้างจากแมงมุม *Parasteatoda (Achaearanea) valoka*. ภาพ C ไยแมงมุมประเภท Cob web ที่มีชื่อว่า Star web เป็นใยที่สร้างจาก juvenile ของแมงมุม *Parasteatoda (Achaearanea)* sp. ภาพ D ไยที่สร้างจากแมงมุม *Theridion* sp. ภาพ E ไยที่สร้างจากแมงมุม *Helvibis cf. thorelli* ภาพ F ไยที่สร้างจากแมงมุม *Anelosimus* sp. และภาพ G ไยแมงมุมประเภท Sheet web ในแมงมุม *Dubiaranea* sp. (Linyphiidae) (Blackledge et al., 2011)

### 2.2.3. ไยกลม (Orb web) และแมงมุมที่สร้างใยกลม (Orb-weaver spider)

ใยกลม (Orb web) เป็นหนึ่งในประเภทใยแมงมุมที่แมงมุมสร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต โดยเรียกแมงมุมกลุ่มที่ทำการสร้างใยประเภทนี้ว่า Orbiculariae โดยประกอบไปด้วยแมงมุม 7 วงศ์ ใยประเภทนี้มีลักษณะที่จดจำได้ง่ายเนื่องจากรูปร่างของใยค่อนข้างกลม ในบางครั้งอาจเรียกว่า wagon wheel หรือใยที่มีลักษณะคล้ายล้อรถของรถบรรทุก ใยกลมนั้นแตกต่างจากใยประเภทอื่นคือ

มีรูปร่าง 2 มิติ ประกอบด้วย spiral silk ที่มีความเหนียวและมี stereotypic pattern ไยกลมประกอบด้วยคือ adhesive capture spiral และ viscid spiral ที่สร้างจากเส้นใยจากต่อม Flagelliform และเส้นใยที่สร้างจากต่อม Aggregate ในระหว่างที่ทำการปั่นใย มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของใยตั้งแต่ < 2 cm. (Anapidae) จนไปถึงขนาดประมาณ 2 m. (*Caerostris darwini*) โดยรูปร่างของไยกลมจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพฤติกรรมและรูปแบบของการปั่นใย (Blackledge et al., 2011)



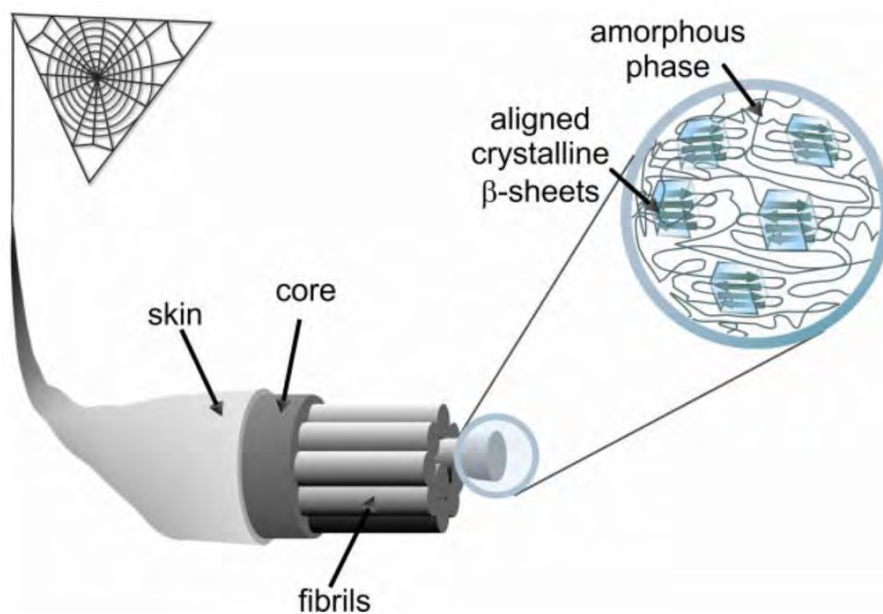
ภาพที่ 2-8 Stabilimenta ในไยกลม (Orb web) . ภาพ A-C ไยกลมที่สร้างจากแมงมุม *Argiope argentata* (Costa Rica). ภาพ D ไยกลมที่สร้างจาก *Uloborus glomus* (USA). ภาพ E ไยกลมที่สร้างจาก unidentified araneid (New Britain). ภาพ F ไยกลมที่สร้างจาก *Cyclosa caroli* (Costa Rica). ภาพ G-I แมงมุมบริเวณจุดศูนย์กลางใยเพื่อลอกคราบหรือวางไข่. ภาพ G แมงมุม *Nephila clavipes* (Costa Rica). ภาพ H *Argiope argentata* (Costa Rica). ภาพ I *Cyclosa caroli* (Costa Rica) (Blackledge et al., 2011)

#### 2.2.4. โครงสร้างของเส้นใยแมงมุม

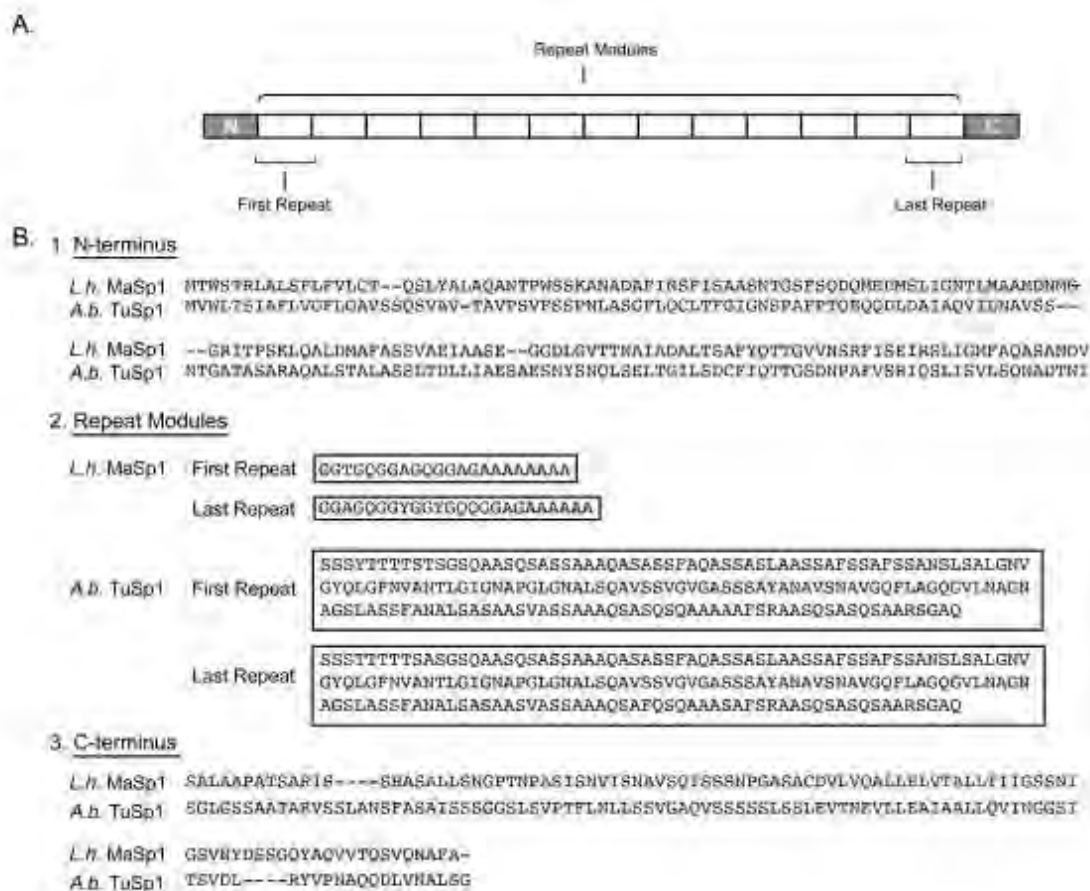
องค์ประกอบหลักของเส้นใยแมงมุมคือโปรตีน Spidroin ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ มีขนาดโมเลกุลประมาณ 350 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2,500–3,500 ตัว โครงสร้างของ Spidroin สามารถแบ่งได้สามส่วนได้แก่ N-terminal, C-terminal และ repetitive region โดยสองส่วนแรกจะเป็นบริเวณที่อยู่ส่วนปลายของสายโปรตีน เป็นส่วนที่ไม่พบลำดับชุดซ้ำ (tandem repeat) ของกรดอะมิโน ทั้งสองบริเวณนี้ 30–400 ตัว และลำดับอะมิโนในแต่ละชุดซ้ำจะแตกต่างกันไปในแมงมุมแต่ละชนิด (Eisoldt et al., 2011)

Repetitive region แบ่งเป็น 2 โครงสร้างหลักคือ โครงสร้างแรกคือ crystal domain หรือ  $\beta$  sheet ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงคิดเป็นสัดส่วน 50-70% ของโปรตีนทั้งหมดในเส้นใย เกิดจากสายโซ่ยาวของกรดอะมิโนที่เรียงชิดติดกันจนเกิดเป็นลักษณะของผลึก โดยมีลักษณะการเรียงลำดับของกรดอะมิโน 2 รูปแบบ คือ poly (A) และ poly (GA) รูปแบบแรกประกอบด้วยกรดอะมิโน อะลานีน (A: alanine) เพียงชนิดเดียว รูปแบบที่สองประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ อะลานีน (A: alanine) และ กวานีน (G: guanine) โครงสร้างต่อมาคือ amorphous หรือ  $\beta$  spiral ทำหน้าที่ให้ความยืดหยุ่น มีลักษณะการเรียงลำดับของกรดอะมิโน 2 รูปแบบ คือ GGX หรือ GPG(X)<sub>n</sub> ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเส้นใย รูปแบบแรกประกอบด้วยกรดอะมิโน กวานีน (G: guanine) และ X แทนสัญลักษณ์ A, Q, Y และ S หมายถึงกรดอะมิโนดังต่อไปนี้ อะลานีน (A: alanine), กลูตามีน (Q: glutamine), ไทโรซีน (Y: tyrosine) และ เซอรีน (S: serine) โดยรูปแบบที่สองประกอบด้วยกรดอะมิโน กวานีน (G: guanine) โพรลีน (P: proline) และ X แทนกรดอะมิโนรูปแบบเดียวกันกับการเรียงลำดับกรดอะมิโนของรูปแบบแรก (ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ, 2549; Gatesy et al., 2001)





ภาพที่ 2-9 Hierarchical structure ของเส้นใยจากต่อม major ampullate. ที่ระดับ macroscopic แสดงผิวชั้นนอกสุดของเส้นใย. ที่ระดับ microscopic แสดงแกนหลัก (core) ที่ระดับ sub-microscopic แสดงโครงสร้างของเส้นใย. จากภาพระดับ nanoscopic แสดงโครงสร้างของ repetitive regions ประกอบด้วย Crystalline  $\beta$ -sheet และ amorphous phase (Humenik et al., 2011)



ภาพที่ 2-10 Spidroin molecular organization ภาพ A. Schematic of spidroin primary structure แสดงโครงสร้างหลัก 3 ส่วนคือ repetitive regions N-terminal และ C-terminal ภาพ B. การเปรียบเทียบ full-length ของ spidroin paralogs ในการแสดงออกของโปรตีนของยีน MaSp1 จากแมงมุม *Latrodectus hesperus* (L.h.) และยีน TuSp1 จากต่อม ของแมงมุม *Argiope bruennichi* (A.b.) แสดง (1) N-terminal domains (2) ลำดับชุดซ้ำแรกและลำดับชุดซ้ำสุดท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (3) C-terminal domains (Garb et al., 2010)

## 2.3. คุณสมบัติของเส้นใยแมงมุมและการประยุกต์ใช้ประโยชน์

### 2.3.1. คุณสมบัติของเส้นใยแมงมุม

ใยแมงมุมถือว่าเป็นวัสดุชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่โดดเด่นหลายประการ เช่น มีความแข็งแรง และสามารถรับน้ำหนักได้มากกว่าเส้นใยโลหะหรือเส้นใยเหล็กกล้าที่มีความหนาแน่นเท่ากัน มีความยืดหยุ่นสูง และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Babb et al., 2017) จากการทดสอบความยืดหยุ่นของวัสดุด้วยค่าโมดูลัสของยัง (modulus of electricity) พบว่าใยแมงมุนั้นมีค่าสูงถึง 1.7 จิกะปาสคาล (GPa) ซึ่งหากเทียบกับวัสดุอื่น อาทิ เหล็ก มีค่าโมดูลัสของยัง (modulus of electricity) เท่ากับ 1.5 จิกะปาสคาล (GPa) นอกจากนี้ใยแมงมุนั้นยังมีความหนาแน่น 1.3 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร ( $\text{g/cm}^3$ ) ในขณะที่เหล็กมีความหนาแน่น 7.8 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร ( $\text{g/cm}^3$ ) นั้นแสดงว่าใยแมงมุนั้นมีความยืดหยุ่นต่อน้ำหนักของเส้นใยมีค่าสูงกว่าเหล็ก ทำให้ใยแมงมุมสามารถดูดซับพลังงานจากแรงกระแทกได้มากโดยที่ไม่ขาดง่าย (พงษ์, 2011; ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ, 2549; Tokareva et al., 2013)

### 2.3.2. การประยุกต์ใช้ประโยชน์

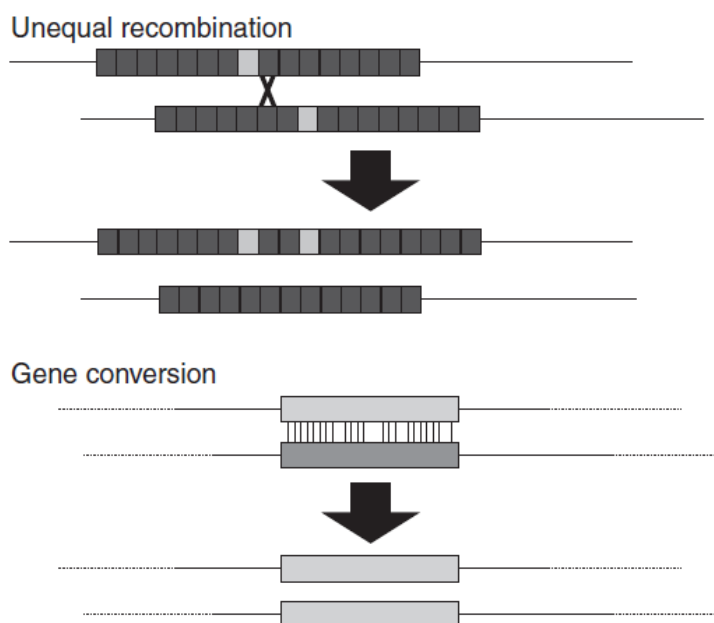
ปัจจุบันได้มีการนำเส้นใยแมงมุมไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในหลากหลายอุตสาหกรรม โดยเทคนิคพันธุวิศวกรรม เช่น ด้านการแพทย์ เป็นองค์ประกอบของการสร้างเอ็นยึดกระดูกหรือเอ็นยึดกล้ามเนื้อใหม่สำหรับเย็บปิดบาดแผล การนำส่งยาภายในร่างกาย นอกจากนี้ยังนำไปเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเสื่อเกราะกันกระสุน หรือชุดนักบินอวกาศ (ภาคภูมิ 2540; Penney, 2013; Vendrely and Scheibel, 2007)

## 2.4. การแสดงออกของยีน *MaSp1* (Major ampullate Spidroin 1 gene)

เส้นใยโครงสร้างหลัก (Dragline silk) ที่ผลิตจากต่อม major ampullate มียีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนอยู่ 2 ชนิด คือยีน *MaSp1* (Major ampullate Spidroin 1) และยีน *MaSp2* (Major ampullate Spidroin 2) โดยเป็นยีน paralog ซึ่งกันและกัน และมีวิวัฒนาการร่วมกันแบบลู่เข้า (Convergent evolution) ผ่านกระบวนการหลักคือ intergenic recombination และกระบวนการ recombination, selection และ interaction ของทั้ง 2 ยีน ภายในสปีชีส์เดียวกันของงูโครงสร้าง N-terminal และ C-terminal ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวจึงมีลักษณะคล้ายคลึง และนอกจากนั้นบริเวณ repetitive region ยังเกิด intergenic pairing ใน meiosis ทำให้โครงสร้างของ poly-Alanine และ GGX ซึ่งเป็นรูปแบบลำดับชุดซ้ำของกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกันอีกด้วย (Ayoub et al., 2007; Sponner et al., 2005)

## 2.5. กลไกการเกิด Concerted Evolution

Concerted Evolution คือ เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในลำดับชุดซ้ำของดีเอ็นเอ โดยลำดับชุดซ้ำนั้นสามารถเพิ่มจำนวนจาก 2-3 copies จนไปถึงระดับล้าน copies ตามชนิดของสิ่งมีชีวิตหรือ gene family โดยเกิดผ่านกระบวนการ Homogenization ซึ่งเกิดผ่าน 2 กลไกคือ Gene conversion และ Unequal Crossing Over (UCO) (Ganley, 2013; Mercer, 2017)



ภาพที่ 2-11 Homogenization ที่เกิดขึ้นผ่านกระบวนการ recombination ผ่าน 2 กลไก กลไกแรกคือ Unequal recombination ผลจากกลไกนี้จะทำให้เกิด deletion และ duplication ต่อมาคือ Gene conversion มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณชุดซ้ำ ทำให้เกิดการเปลี่ยนลำดับชุดซ้ำหนึ่งไปเป็นอีกลำดับชุดซ้ำหนึ่งได้ (Ganley, 2013)

## 2.6. Illumina Sequencing/ 10x Genomic Sequencing

การ sequencing ที่ใช้เทคนิค Illumina เกิดขึ้นเมื่อช่วงปลาย 2012 โดยสร้างกลไกที่เรียกว่า Long-read sequencing เพื่อวิเคราะห์ genome เทคโนโลยีดังกล่าวจะมีการทำให้ดีเอ็นเอแตกหักเป็น fragment ที่มีขนาดประมาณ 10 kilobases หลังจากนั้น fragment เหล่านี้จะมีการ amplified, sheared และติด barcode เพื่อให้สามารถ sequence บน Illumina sequencing platform ได้ หลังจากนั้นจะมีการ assembly ของ short sequence reads เพื่อสร้าง long-read molecules หรือ long fragment ได้ (Dijk et al., 2018)

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงาน

#### 3.1. Taxa Selection

ชนิดของตัวอย่างที่นำมาใช้ในครั้งนี้มีทั้งหมด 13 ชนิด โดยมี 3 ชนิดมาจากการทำ Whole Genome Sequencing (WGS) ได้แก่ *Liphistius maewongensis*, *Argiope* sp. และ *Macrothele* sp. โดยทำการเก็บตัวอย่างมาจากแหล่งอาศัยในธรรมชาติที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อำเภอคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร, University of Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica และจากแหล่งอาศัยในธรรมชาติที่ไต้หวัน ตามลำดับ โดยตัวอย่างที่เก็บได้จะถูกนำมารักษาสภาพใน 95% ethanol ก่อนนำมาเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C ที่ศูนย์ความเป็นเลิศด้านกัญญาวิทยา ความหลากหลายทางด้านพืช แมงมุม และไร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Ecology and Evolutionary Genomics laboratory (EEG laboratory), Dept. of Biomedical Science and Environmental Biology, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung City, Taiwan และตัวอย่างแมงมุมอีก 10 ชนิดมาจาก Spider Assembly Genome โดยดาวน์โหลดจากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ *Acanthoscurria geniculata*, *Anelosimus studiosus*, *Dysdera sylvatica*, *Latrodectus hesperus*, *Loxosceles reclusa*, *Parasteatoda tepidariorum*, *Pardosa pseudoannulata*, *Stegodyphus mimosarum*, *Stegodyphus dumicola* และ *Nephila clavipes*

#### 3.2. RNA Extraction

ทำการสกัด RNA จากตัวอย่างแมงมุมทั้ง 4 ชนิดที่เก็บมาจากแหล่งอาศัยในธรรมชาติ โดยใช้ชุดสกัด RNA SV Total RNA Isolation (Promega, USA) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้ใน 1.5% agarose gel ด้วยวิธี gel electrophoresis และเก็บรักษา RNA ภายใต้อุณหภูมิ -20 °C ที่ Ecology and Evolutionary Genomics laboratory (EEG laboratory), Dept. of Biomedical Science and Environmental Biology, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung City, Taiwan

#### 3.3. 10x Genomic Sequencing

ส่งตัวอย่างดังกล่าวไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท WELGENE 115, Taipei City, Nangang District, Yuanqu Street, 3號 ไต้หวัน

### 3.4. การระบุตำแหน่งยีน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และการสร้างแผนภูมิวงศ์วานทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมงมุม 3 ชนิดจากวิธี 10x Genomic Sequencing ที่ส่งไปวิเคราะห์ที่ได้หวั่น เปรียบเทียบกับตัวอย่างแมงมุม 10 ชนิดจาก Spider assembly genome ที่ดาวน์โหลดจากฐานข้อมูล GenBank จะนำข้อมูลทั้งหมดมาระบุตำแหน่งของยีน *MaSp1* โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีนใน GenBank ต่อมาทำการ Blast ข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *MaSp1* ของแมงมุมทั้งหมดบน server ของ EEG laboratory ด้วย Command Line Blast หลังจากนั้นทำการ Align ข้อมูล DNA ที่ได้ด้วยโปรแกรม Geneious ver.8 และสร้างแผนภูมิวงศ์วานทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม BEAST ver. 1.10.4

## บทที่ 4 ผลการศึกษา

### 4.1. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน *MaSp1* ของ Taxa Selection กับ

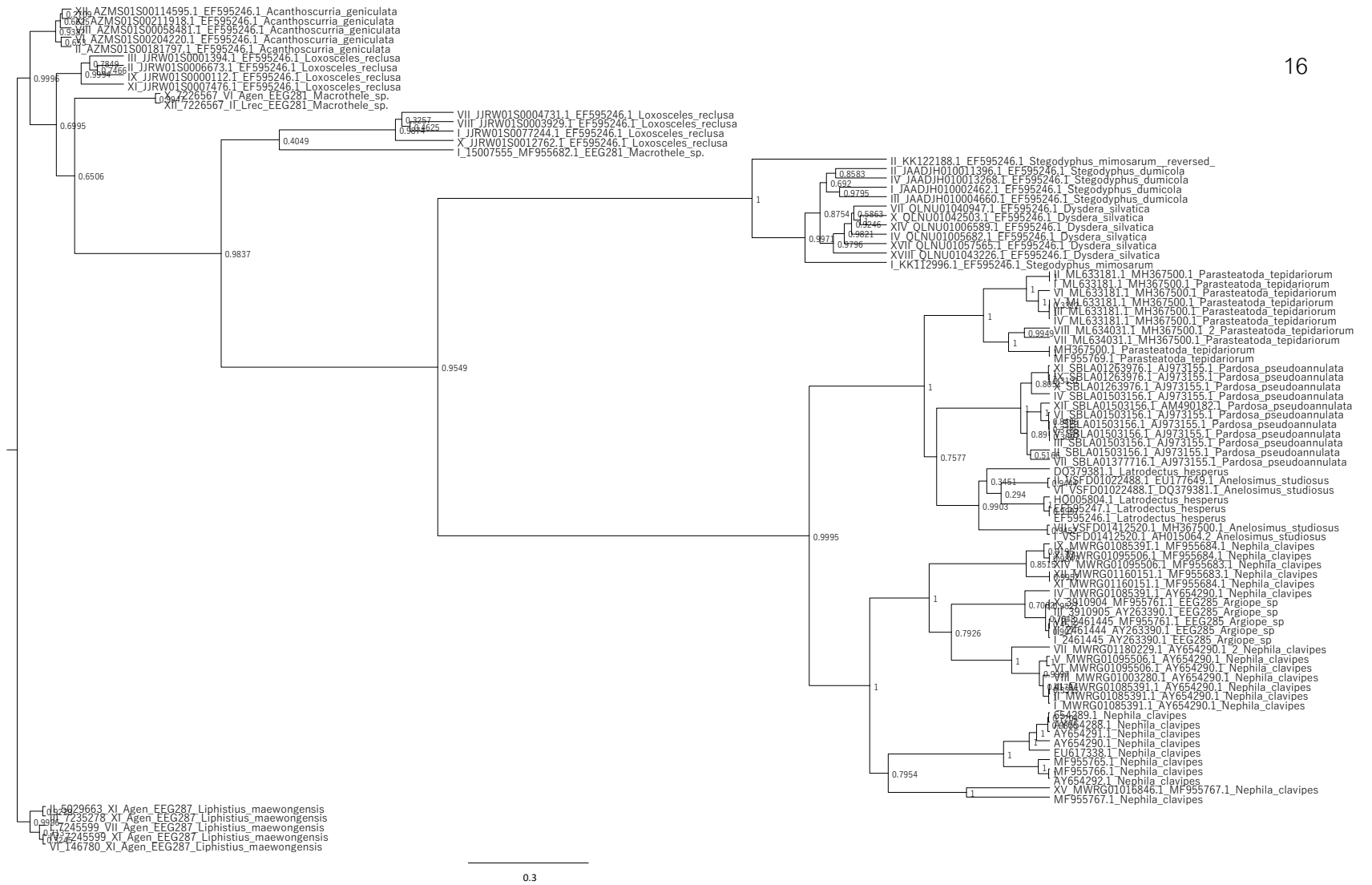
#### ฐานข้อมูลใน GenBank

เพื่อยืนยันชนิดของยีนที่ใช้ในการผลิตเส้นใย ผู้ศึกษาจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์เส้นใยทุกประเภทมาใช้ในการเปรียบเทียบ โดยดาวน์โหลดจากฐานข้อมูล GenBank มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดจากแมงมุม 13 สปีชีส์ ต่อมาทำการแยกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับยีน *MaSp1* ซึ่งดาวน์โหลดจากฐานข้อมูล GenBank และยีน *MaSp1* ของแมงมุม 3 สปีชีส์ที่มีการอัปโหลดไว้ในฐานข้อมูลซึ่งตรงกับแมงมุมใน taxa selection คือ *Latrodectus hesperus*, *Parasteatoda tepidariorum* และ *Nephila clavipes* ทั้ง 3 กระบวนการนำมาวิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวด้วยโปรแกรม Command Line Blast ซึ่งผลการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ยืนยันได้จากค่า Sequencing identity (%) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MaSp1* ที่ได้จากตัวอย่างแมงมุมทั้ง 13 สปีชีส์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *MaSp1* ที่มีการบันทึกไว้ก่อนหน้านี้ โดยตัวอย่างแมงมุมส่วนใหญ่มีค่า Sequencing identity (%) ประมาณ 65–90 %

### 4.2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการสร้างแผนภูมิมงศ์วานวิวัฒนาการ

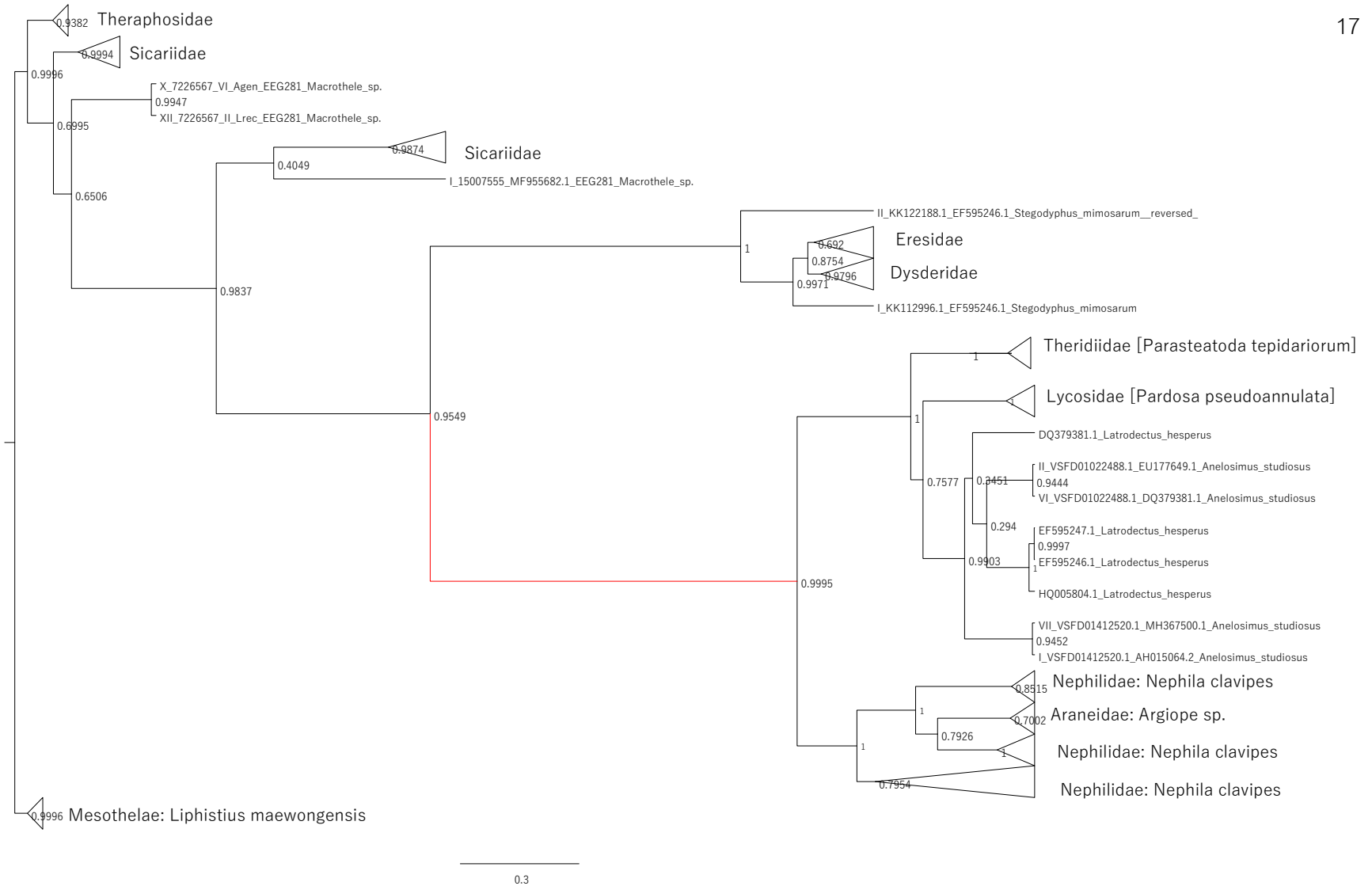
#### (Phylogenetic tree)

จากการวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ยีน *MaSp1* พบว่าแมงมุมวงศ์ Nephilidae และ วงศ์ Araneidae ถูกจัดเป็น monophyletic group และแมงมุมวงศ์ Theridiidae ถูกจัดเป็น Paraphyletic group กับแมงมุมวงศ์ Nephilidae และวงศ์ Araneidae จากความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการดังกล่าวมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ จากการสร้างแผนภูมิมงศ์วานวิวัฒนาการโดยการศึกษา ortholog ของ genome ในแมงมุม (Garrison et al., 2016) โดยการวิเคราะห์ด้วย Bayesian Inference (BI) มีค่า posterior probability ระหว่าง node หลัก อยู่ระหว่าง 0.6506–0.9996 (ภาพที่ 4-2)



ภาพที่ 4-1 Phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MaSp1* ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Bayesian Inference (BI) มี outgroup ได้แก่ *Liphistius maewongensis* ตัวเลขบน node แสดงค่า posterior probability





ภาพที่ 4-2 Phylogenetic tree (Collapsed clade) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MaSp1* ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Bayesian Inference (BI) มี outgroup ได้แก่ *Liphistius maewongensis* ตัวเลขบน node แสดงค่า posterior probability  
 หมายเหตุ: clade แดงแทนแมงมุมกลุ่มที่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า (ภาคผนวกที่ 4)

## บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

### 5.1. แผนภูมิมิวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากยีน *MaSp1* เปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MaSp1* ไปวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิมิวงศ์วานวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม BEAST รุ่น 1.10.4 ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ Bayesian Inference (BI) ให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ คือตัวอย่างแมงมุมที่คัดเลือกมาศึกษาในครั้งนี้พบว่า แมงมุมวงศ์ Nephilidae ได้แก่ *Nephila clavipes* และ วงศ์ Araneidae ได้แก่ *Argiope* sp. ถูกจัดเป็น Monophyletic group และยังถูกจัดเป็น Paraphyletic group กับแมงมุมวงศ์ Theridiidae (ภาพที่ 4-2) ซึ่งได้แก่ *Anelosimus studiosus*, *Latrodectus hesperus* และ *Parasteatoda tepidariorum* จากข้อมูลทางแผนภูมิมิวงศ์วานวิวัฒนาการ ที่ใช้การศึกษาวิวัฒนาการของยีนที่ผลิตเส้นใยโครงสร้างหลักในใยแมงมุมของยีน *MaSp1* ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่ารูปแบบ topology ให้ผลไปในทางเดียวกับ แผนภูมิมิวงศ์วานวิวัฒนาการ โดยการศึกษา ortholog จากจีโนมของแมงมุมในงานวิจัยก่อนหน้า (ภาคผนวกที่ 4) (Garrison et al., 2016) (ภาพที่ 4-3) เนื่องจาก *Nephila clavipes* และ *Ariope* sp. เป็นแมงมุมที่สังเคราะห์ใยแบบกลม (Orb-weaver spider) และแมงมุมกลุ่มนี้มีบรรพบุรุษร่วมกันเมื่อ 125 ล้านปีก่อน ดังนั้นโครงสร้างและการใช้ประโยชน์จากเส้นใยโครงสร้างหลัก จึงมีลักษณะใกล้เคียงกัน และถูกจัดเป็น monophyletic group (Babb et al., 2017; Garrison et al., 2016; Gatesy, 2001) ในขณะที่ *Latrodectus* sp., *Nephila* sp. และ *Argiope* sp. มีบรรพบุรุษร่วมกันเมื่อ 135–160 ล้านปีก่อน มี ortholog ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MaSp1* ระหว่างสกุลดังกล่าวมีรูปแบบคล้ายคลึงกัน จึงจัดอยู่ใน clade หลักเดียวกัน (Ayoub et al., 2007)

### 5.2. การแสดงออกของโปรตีน และวิวัฒนาการของยีน *MaSp1* และ Spidroin gene อื่น

#### 5.2.1. การแสดงออกของโปรตีนจากต่อม Major ampullate ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนจากต่อมสร้างเส้นใยประเภทอื่น

ในบางสปีชีส์มีจำนวน sequence ของยีน *MaSp1* มากกว่าสปีชีส์อื่น รวมถึงมีรูปแบบ topology มากกว่า 1 รูปแบบ ในสปีชีส์เดียวกัน เช่น แมงมุม *Nephila clavipes* มีต่อมที่ใช้ในการสร้างใยครบ 7 ชนิด ทำให้สามารถสังเคราะห์เส้นใยได้ทั้ง 7 ชนิด ซึ่งต่อมสร้างใยแต่ละชนิดจะวิวัฒนาการสูงสุดในสปีชีส์นี้ อีกทั้งต่อม major ampullate ที่สร้างใยโครงสร้างหลักมีการแสดงออก

ของโปรตีน Spidroin มากกว่าต่อมสร้างใยประเภทอื่น จึงส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีนจากต่อมดังกล่าวระหว่างต่อมสร้างเส้นใยอื่นด้วย ดังนั้นจำนวน sequence ของยีน *MaSp1* มากกว่าสปีชีส์อื่นๆ เช่น มีการแสดงออกภายในต่อม tubiliform (Babb et al., 2017; Guerette et al., 1996; Hinman and Lewis, 1992)

### 5.2.2. วิวัฒนาการของยีน *MaSp1* และยีนอื่น

จากความสัมพันธ์ภายใน clade ของแต่ละสปีชีส์จะพบว่า จำนวนและลักษณะ sequences ที่ได้ของแต่ละสปีชีส์จะแตกต่างกัน รวมถึงความยาวของ base pair ในแต่ละ sequences ด้วย (ภาคผนวกที่ 2) จากผลของแผนภูมิวิวัฒนาการ จำนวน sequences จากสปีชีส์เดียวกัน บาง sequences ถูกจัดรวมกับสปีชีส์อื่น เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MaSp1* ในแมงมุม *Macrothele* sp. ที่มีบาง sequences ถูกจัดรวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MaSp1* กับแมงมุมสปีชีส์อื่น โดยแมงมุมสปีชีส์ดังกล่าวเป็นแมงมุมกลุ่ม Mygalomorph โดยแมงมุมกลุ่มนี้จะได้รับผลของกลไกภายในเซลล์อย่าง intragenic homogenization น้อยกว่าแมงมุมกลุ่ม Araneomorph ดังนั้นความคล้ายคลึงของแต่ละ repetitive unit ในยีน *MaSp1* ภายในสปีชีส์เดียวกันจึงน้อยกว่าความคล้ายคลึงของ repetitive unit ของแมงมุมกลุ่ม Araneomorph และอาจไปคล้ายคลึงกับ repetitive unit ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MaSp1* ในสปีชีส์อื่น นอกจากนี้ความหลากหลายของกรดอะมิโนใน repetitive unit ยังต่ำกว่าแมงมุมกลุ่ม Araneomorph ซึ่งเป็นลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเฉพาะของแมงมุมกลุ่ม Mygalomorph จึงทำให้ได้ sequences ที่มีจำนวนของ base pair น้อยกว่ากว่าเมื่อเทียบกับแมงมุมสปีชีส์อื่นในกลุ่ม Araneomorph อีกด้วย (Babb et al., 2017; Chaw et al., 2014; Ganley, 2013; Garb et al., 2007)

### 5.3. รูปแบบ topology ของแมงมุมกลุ่มอื่นที่แสดงผลไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า

จากการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของยีนที่สังเคราะห์เส้นใยโครงสร้างหลักในใยแมงมุม (*MaSp1*) ให้รูปแบบของ topology ของแมงมุมทุกกลุ่มที่นอกเหนือจากแมงมุมวงศ์ Nephilidae, Araneidae และ Theridiidae ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าในการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ จากการศึกษา ortholog จาก genome ในรูปแบบของ RNA transcriptome (Garrison et al., 2016) เนื่องจากการศึกษายีนที่ผลิตเส้นใยโครงสร้างหลักนั้นเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีน โดยยีนที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีนในตัวของแมงมุมนั้นมีหลากหลายชนิด และโปรตีนที่ใช้ในการผลิตเส้นใยนั้นเป็นโปรตีนของสารชีวโมเลกุลเพียงชนิดหนึ่งเท่านั้น จึงทำให้ผลการศึกษาดังกล่าวแตกต่างจากการศึกษาทั้งจีโนมของแมงมุม นอกจากนั้นแล้วในกลุ่มที่ไม่สอดคล้อง

กับแมงมุมกลุ่มอื่น พบว่าค่า posterior probability ของความสัมพันธ์ภายในกลุ่มค่อนข้างต่ำ อยู่ระหว่าง 0.2709-1

## บทที่ 6

### สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

#### 6.1. สรุปผลการศึกษา

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *MaSp1* มีรูปแบบ topology ในแมงมุมกลุ่มที่มีการสร้างใยแบบกลม (Orb-weaver spider) ซึ่งมีบรรพบุรุษร่วมกันและมีวิวัฒนาการสูงสุด แมงมุมวงศ์ Nephilidae และ วงศ์ Araneidae ถูกจัดเป็น monophyletic group และแมงมุมวงศ์ Theridiidae ถูกจัดเป็น Paraphyletic group กับแมงมุมวงศ์ Nephilidae และวงศ์ Araneidae จากความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการดังกล่าวมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ

#### 6.2. ข้อเสนอแนะ

##### 6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยสร้างเสริมข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของยีนที่ผลิตเส้นใยโครงสร้างหลัก ซึ่งสามารถนำไปวิจัยต่อยอดความรู้เกี่ยวกับการคัดเลือกสายพันธุ์แมงมุมที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเส้นใยดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการพัฒนาเส้นใยสังเคราะห์ต่อไปในอนาคต

##### 6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

ควรมีการศึกษาวิวัฒนาการของยีน *MaSp2* ที่มีการแสดงออกร่วมกันกับยีน *MaSp1* ในการสร้างเส้นใยโครงสร้างหลัก เนื่องจากจะทำให้การบอกวิวัฒนาการของแมงมุมจากยีนที่ผลิตเส้นใยดังกล่าวมีความสมบูรณ์มากขึ้น หรือควรมีการศึกษาวิวัฒนาการของยีนที่ผลิตเส้นใยครบ 7 ชนิด จากต่อมสร้างเส้นใยทั้ง 7 ชนิด จะทำให้การบอกวิวัฒนาการของแมงมุมโดยใช้ยีนที่สังเคราะห์เส้นใยมีความครบถ้วน สมบูรณ์ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากยิ่งขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

### ภาษาไทย

- จุรีรัตน์ ประसार. 2549. ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ. วารสารเทคโนโลยีวัสดุ. 42:66-68.
- ประสิทธิ์ วงษ์พรหม. 2551. ศูนย์ธรรมชาติศึกษาไทย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.thai-nec.org> [9 กุมภาพันธ์ 2563]
- พงษ์ ทรงพงษ์. 2554. คู่มือสื่อการสอนวิชาฟิสิกส์. สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน, หน้า 23. ฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ภาคภูมิ เต็งอำนวยการ. 2540. การดูดซึมยาจากทางเดินอาหารและการเอื้อประโยชน์ในร่างกาย. ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

- Ayoub, N. A., Garb, J. E., Tinghitella, R. M., Collin, M. A., & Hayashi, C. Y. 2007. Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes. *PLoS ONE*. 6:1–13.
- Babb, P.L., Lahens, N.F., Correa-Garhwal, S.M., Nicholson, D.N., Kim, E.J., Hogenesch, J.B., Kuntner, M., Higgins, L., Hayashi, C.Y. and Agnarsson, I. 2017. The *Nephila clavipes* genome highlights the diversity of spider silk genes and their complex expression. *Nature Genetics*. 49: 895-906.
- Blamires, S.J., Blackledge, T.A. and Tso, I.M. 2017. Physicochemical property variation in spider silk: Ecology, evolution and synthetic production. *Annual Review of Entomology*. 62: 443–460.
- Blackledge, T.A., Kuntner, M. and Agnarsson, I. 2011. The Form and Function of Spider Orb Webs. *Advances in Insect Physiology Spider Physiology and Behaviour. Advances in Insect Physiology*. 41:175–262.
- Chaw, R., Zhao, Y., Wei, J., Ayoub, N. A., Allen, R., Atrushi, K. and Hayashi, C.Y. 2014. Intragenic homogenization and multiple copies of prey-wrapping silk genes in *Argiope* garden spiders. *BMC Evolutionary Biology*. 14:1–32.
- Coddington, J.A. and Levi, H.W. 1991. Systematics and Evolution of Spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 565–592.
- Dijk, E.L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D. and Thermes, C. 2018. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*. 34: 666–681.

- Eisoldt, L., Smith, A., and Scheibel, T. 2011. Decoding the secrets of spider silk. *Materials Today*. 14: 80–86.
- Ganley, A. 2013. Concerted Evolution. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2:126-130.
- Garb, J.E., Dimauro, T., Lewis, R.V. and Hayashi, C.Y. 2007. Expansion and Intragenic Homogenization of Spider Silk Genes since the Triassic: Evidence from Mygalomorphae (Tarantulas and Their Kin) Spidroins. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 2454–2464.
- Garb, E.J., Nadia, A.A. and Hayashi, Y.C. 2010. Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains. *Biomedical Central of Evolutionary Biology*. 10: 1–16.
- Garrison L.N., Rodriguez J., Agnarsson I., Coddington A.J., Griswold E.C., Hamilton A.C., Hedin M., Kocot M.K., Ledford M.J. and Bond E.J. 2016. Spider phylogenomics: untangling the Spider Tree of Life. *PeerJ*. 4: 1–35.
- Gatesy, J. 2001. Extreme Diversity, Conservation, and Convergence of Spider Silk Fibroin Sequences. *Science*. 291: 2603–2605.
- Guerette, P.A., Ginzinger, D.G., Weber, B.H. and Gosline, J.M. 1996. Silk Properties Determined by Gland-Specific Expression of a Spider Fibroin Gene Family. *Science*: 272: 112–115.
- Harmer, A.M., Blackledge, T.A., Madin, J.S. and Herberstein, M.E. 2010. High-performance spider webs: Integrating biomechanics, ecology and behaviour. *Journal of The Royal Society Interface*. 8: 457–471.
- Hinman, M.B. and Lewis, R.V. 1992. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber. 267: 19320–19324.
- Humenik, M., Smith, A. M. and Scheibel, T. 2011. Recombinant Spider Silks—Biopolymers with Potential for Future Applications. *Polymers*. 3: 640–661.
- Mercer, J. 2017. Unequal Crossing Over. *Module in Life Sciences*. 1: 1–6.
- Natural History Museum. World Spider Catalog Version 21.0. [online] ref: <https://wsc.nmbe.ch/> [14<sup>th</sup> February 2020]
- Nentwig, W. and Heimer, S. 1987. Ecological aspects of spider webs. In: *Ecophysiology of Spiders*, pp. 211–225. Springer.
- Penney D. 2013. *Spider Research in the 21st Century trends & perspectives*, pp. 256–271. United Kingdom: Siri Scientific Press.

- Sponner, A., Schlott, B., Vollrath, F., Unger, E., Grosse, F. and Weisshart, K. 2005. Characterization of the Protein Components of *Nephila clavipes* Dragline Silk. *Biochemistry*: 44: 4727–4736.
- Tokareva O., Jacobsen M., Buehler M., Wong J. and Kaplan L., D. 2013. Structure-Function-Property-Design Interplay in Biopolymers: Spider Silk. *Acta Biomaterialia*. 10:1612–1619
- Vendrey C. and Scheibel T. 2007. Biotechnological Production of Spider-Silk Proteins Enables New Applications. *Macromolecular Bioscience*. 7:3–4
- Vierra, C., Hsia, Y., Gnesa, E., Tang, S., and Jeffery, F. 2011. Spider Silk Composites and Applications. *Metal, Ceramic and Polymeric Composites for Various Uses*. pp. 303–324.
- Xu, X., Liu, F., Cheng, R., Chen, J., Xu, X., Zhang, Z., Ono, H., Pham, D.S., Norma-Rashid, Y., Arnedo, M.A., Kuntner, M. and Li, D. (2015). Extant primitively segmented spiders have recently diversified from an ancient lineage. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 282: 1–10.
- Zheng, K., and Ling, S. 2018. De Novo Design of Recombinant Spider Silk Proteins for Material Applications. *Biotechnology*. 14: 1–6.



ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 2 Taxa Selection

ตารางภาคผนวก แมงมุมที่คัดเลือกมาศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้

Suborder	Infraorder	Spider Assembly Genome [GenBank]	Family
Opisthothelae	Mygalomorph	<i>Acanthoscurria geniculata</i>	Theraphosidae
	Araneomorph	<i>Anelosimus studiosus</i>	Theridiidae
		<i>Latrodectus hesperus</i>	
		<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	
		<i>Dysdera silvatica</i>	Dysderidae
		<i>Loxosceles reclusa</i>	Sicariidae
		<i>Pardosa pseudoannulata</i>	Lycosidae
		<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Eresidae
		<i>Stegodyphus dumicola</i>	
		<i>Nephila clavipes</i>	Araneidae
		Spider Whole Genome Sequencing [EEG LAB]	Family
	Mygalomorph	[EEG281] <i>Macrothele</i> sp.	Hexathelidae
Araneomorph	[EEG285] <i>Argiope</i> sp.	Araneidae	
Mesothelae	[EEG287] <i>Liphistius maewongensis</i>	Liphistiidae	

ตารางภาคผนวก Specimen location ของแมงมุม 3 สปีชีส์

DNA No.	S.N.	Species	Family	Collecting site	Date	latitude	longitude	Altitude (M)	No. of ind.	Female	Collector	Note
EEG287	SU1631	<i>Liphistius maewongensis</i>	Liphistiidae	Mae Wong National Park, Klonglan District, Kamphaeng Phet, Thailand	December 23, 2015	N16°05.670'	E99°07'43.7"	1262	1	1	Warrit. N	
EEG281	SU1632	<i>Macrothele</i> sp.	Hexathelidae	Taiwan					1	1		
EEG285	SU1633	<i>Argiope</i> sp.	Araneidae	University of Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica	October 2016	N9.936000	W84.051000	1200	1	1	L. Segura-Hernández	RCCA RA_00201

ตารางภาคผนวก Assembly Statistic ของแมงมุม 10 สปีชีส์ จากฐานข้อมูล GenBank

Organism	Molecule	Total Length	Scaffold Count	Ungapped Length	Scaffold N50	Spanned Gaps	Unspanned Gaps
<i>Acanthoscurria geniculata</i>	All	7,178,402,394	4,986,575	5,102,162,438	20,294	7,492,117	0
<i>Anelosimus studiosus</i>	Unplaced	2,033,432,615	956,665	1,546,587,525	4,793	2,052,696	0
<i>Latrodectus hesperus</i>	Unplaced	1,233,806,489	161,595	1,206,197,093	39,474	39,913	0
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	Unplaced	1,228,972,128	59,853	1,209,990,961	765,179	24,382	0
<i>Dysdera silvatica</i>	All	1,359,251,851	65,201	1,355,735,813	38,019	20,680	0
<i>Loxosceles reclusa</i>	All	3,262,478,678	143,665	1,793,252,803	63,237	1,174,058	0
<i>Pardosa pseudoannulata</i>	All	4,207,954,893	609,908	4,079,843,331	711,396	200,557	0
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	unplaced	2,738,704,917	68,653	2,694,162,817	480,636	105,511	0
<i>Stegodyphus dumicola</i>	unplaced	2,551,871,595	16,531	2,551,871,244	254,130	4	0
<i>Nephila clavipes</i>	All	2,439,301,466	180,236	1,756,369,787	62,959	286,889	0

### ภาคผนวกที่ 2 ยีน *MaSp1* ที่ได้จากการกระบวนการ blast

ตารางภาคผนวก ยีน *MaSp1* ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MaSp1* ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank

Spider Assembly Genome [GenBank]	Base pairs	Copy	Part of Spidroin structure	
			N/C terminal	Repetitive regions
<i>Acanthoscurria geniculata</i>	121–146	5	+	
<i>Anelosimus studiosus</i>	75–125	4		+
<i>Latrodectus hesperus</i>	117–429	7	+	
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	188–1,024	8	+	+
<i>Dysdera silvatica</i>	414–507	6	+	
<i>Loxosceles reclusa</i>	126–371	8	+	
<i>Pardosa pseudoannulata</i>	132–1,164	11		+
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	150–208	2	+	
<i>Stegodyphus dumicola</i>	354–606	4	+	
<i>Nephila clavipes</i>	89–740	14	+	+
Spider Whole Genome Sequencing [EEG LAB]	Base pairs	Copy	Part of Spidroin structure	
			N/C terminal	Repetitive regions
EEG281 <i>Macrothele</i> sp.	41–105	3	+	
EEG285 <i>Argiope</i> sp.	248–304	5	+	
EEG287 <i>Liphistius maewongensis</i>	32–41	5	+	

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + หมายถึงภายใน sequences พบโครงสร้างของโปรตีน spidroin

ตารางภาคผนวก ยีน *MaSp1* ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของสปีชีส์ที่ตรงกับ Taxa selection

Spider Assembly Genome [GenBank]	Base pairs	Copy	Part of Spidroin structure		Note
			N/C terminal	Repetitive regions	
<i>Latrodectus hesperus</i>	291–9,387	4	+	+	Complete Coding Sequence
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	387–1,749	2		+	
<i>Nephila clavipes</i>	375–1,293	9	+	+	

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + หมายถึงภายใน sequence พบโครงสร้างของโปรตีน spidroin

### ภาคผนวกที่ 3 การตั้งค่าโปรแกรม

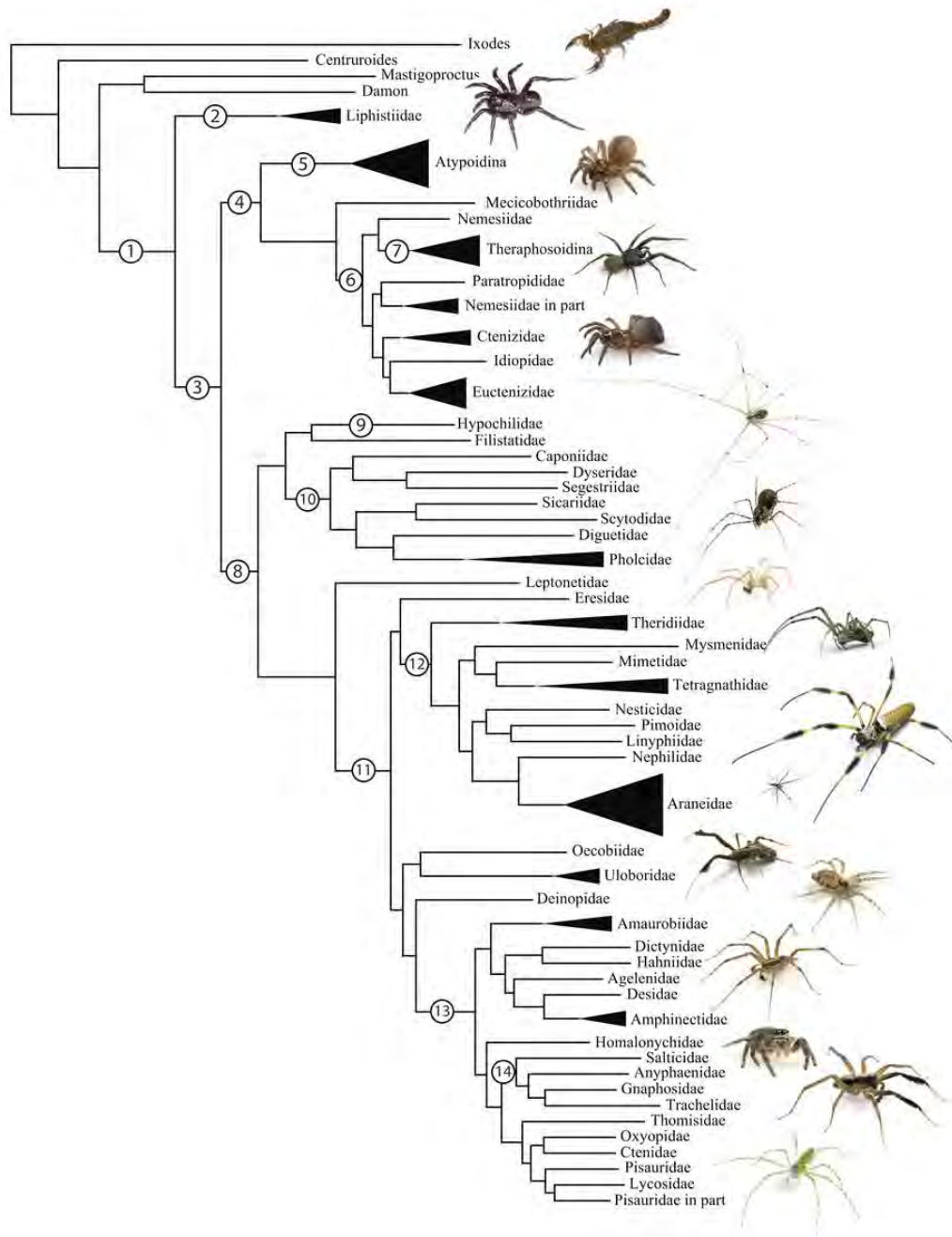
ตารางภาคผนวก การตั้งค่าโปรแกรมในการ Alignment

	Multiple Alignment	Algorithm/Function	Note
Within— species	Geneious Alignment	Automatically determine direction, Alignment type: Global alignment with free end gaps and Cost Matrix: 65% similarity (5.0/-4.0)	Default setting
Across— species	ClustalW Alignment (Consensus Align: all sequence)	Cost Matrix: IUB, Gap open cost: 15 and Gap extend cost: 6.66	Default setting

ตารางภาคผนวก การตั้งค่าโปรแกรมในการสร้างแผนภูมิวงค์วานวิวัฒนาการ

Algorithm/Function	Algorithm/Function	Mode
Sites	Substitution model	GTR
	Base frequencies	Estimated
	Site Heterogeneity model	G
Trees	Tree Prior	Speciation: Yule process and
	Tree Model	Random Starting Tree
MCMC	Length of chain	20,000,000
Burnin 10%		2,000,000

ภาคผนวกที่ 4 แผนภูมิมงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenomic tree)



ภาพภาคผนวก แผนภูมิมงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenomic tree) โดยตัวเลขใน node แทนแฉง  
 มุมกลุ่มใหญ่แต่ละกลุ่ม (ตารางภาคผนวก) และรูปภาพแทนแฉงมุมในแต่ละ genus ดังนี้ Scorpion,  
 Mesothelae, Antrodiaetidae, Paratropididae, Ctenizidae, Pholcidae, Scytodidae,  
 Theridiidae, Tetragnathidae, Nephilidae, Uloboridae, Oecobiidae, Agelenidae,  
 Salticidae, Lycosidae และ Oxyopidae (Garrison et al., 2016)



## ตารางภาคผนวก Major spider lineages (Garrison et al., 2016)

Lineage	Composition and placement	Description/characteristics
<sup>1</sup> Araneae	All spiders	Cosmopolitan; cheliceral venom glands, ability to produce silk from abdominal silk glands; male pedipalps modified for sperm transfer
<sup>2</sup> Mesothelae	Plesiomorphic sister group to all living spiders	SE Asia; mid ventrally positioned spinnerets; distinct dorsal abdominal tergites, very narrow sternum
<sup>3</sup> Opisthothelae	The two major spider lineages	Typical terminal spinneret placement and sternal morphology
<sup>4</sup> Mygalomorphae	Trapdoor, baboon and funnel spiders, tarantulas, and their kin	Paraxial chelicerae with venom glands; most lead sedentary lives in burrows; lack anterior median spinnerets; often large and hirsute; two pairs of book lungs
<sup>5</sup> Atypoidina	Sister group to remaining mygalomorphs	Most species with vestigial abdominal tergites and unique modifications to male pedipalp
<sup>6</sup> Avicularoidea	All remaining mygalomorph taxa	Includes major mygalomorph families, nearly half of which are likely not monophyletic
<sup>7</sup> Theraphosoidina	Comprises families Theraphosidae and Barychelidae	Includes the typically large and hirsute tarantulas and baboon spiders
<sup>8</sup> Araneomorphae	Over 90% of all spider diversity	Anterior median spinnerets fused to form a cribellum (later lost multiple times)
<sup>9</sup> Paleocribellatae	Comprises single family Hypochilidae; hypothesized sister group to all other araneomorphs	Hypochilid synapomorphies, e.g., cheliceral depression; also retain a number of primitive traits including two pairs of booklungs

Neocribellatae	Remaining spider lineages	Paracribellum (complimentary spinning field to cribellum); extension of venom gland into prosoma
Austrochiloidea	Families Austrochilidae and Gradungulidae; sister group to all other neocribellate lineages	Gondwanan taxa with notched tarsal organs; typically with two pairs of booklungs–posterior pair modified as tracheae in some taxa
<sup>10</sup> Haplogynae	Neocribellate lineage with simple genitalia; includes spitting spiders and cellar spiders	Spinnerets lack tartipores; mating with palps inserted simultaneously; in some taxa female genital opening lacks an epigynum; chelicerae fused at base, synspermia, male palpal organ simple
<sup>11</sup> Entelegynae	Comprises all remaining spider lineages with complex genitalia	Female genitalia with a flow through system of separate copulatory and fertilization ducts; male palpal organ typically under hydraulic control
Palpimanoidea	Comprises a number of enigmatic families	Araneophages with lateral scopulae on anterior legs
Eresoidea	Includes 3 families: Eresidae, Hersiliidae, Oecobiidae; sister to remaining entelegynes	Controversial superfamily; oecobiids and hersiliids share a unique attack behavior
Orbiculariae	Comprises the Deinopoidea and Araneoidea	Members of this lineage include cribellate and ecribellate orb-web weavers as well as derived araneoids that use adhesive threads to construct sheet and cob-webs
Deinopoidea	Includes the cribellate orbicularian families Uloboridae and Deinopidae	Construct cribellate orb web; long considered sister group to adhesive orb web weavers on basis of behavioral web construction data

<sup>12</sup> Araneoidea	Spider superfamily that includes adhesive orb web weaving taxa and others	Members of this lineage all use adhesive threads; monophyly supported by a number of spinning and other morphological characteristics
<sup>13</sup> RTA	Large diverse lineage of spiders that includes wolf, jumping, running, fishing, and crab spiders	Defined primarily by the presence of a projection on the male palp—the retrolateral tibial apophysis (RTA)
<sup>14</sup> Dionycha	Subclade of the RTA lineage, comprises about 1/3 of all spider diversity	Defined as a group based on their two clawed condition with flanking tufts of setae for adhesion to smooth surfaces
Lycosoidea	Large superfamily comprising 10 families including fishing and wolf spiders	Monophyly of this superfamily is based on a number of morphological features (not universal) including a grate-shaped tapetum, an oval-shaped calamistrum, and male palpal features