



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การระบาดของเชื้อ *Nosema ceranae* และความรุนแรงของโรค
ในผึ้งหลวง (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) ในประเทศไทย

Distribution and virulence of *Nosema ceranae* in Thai giant
honeybee, *Apis dorsata* Fabricius, 1793

หัวหน้าโครงการ: รศ. ดร. กัญทิมา สุวรรณพงศ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล(งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802064

สัญญาเลขที่ 5/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การระบาดของเชื้อ *Nosema ceranae* และความรุนแรงของโรค
ในผึ้งหลวง (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) ในประเทศไทย
Distribution and virulence of *Nosema ceranae* in Thai giant
honeybee, *Apis dorsata* Fabricius, 1793

รองศาสตราจารย์ ดร. กัณทิมา สุวรรณพงษ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 – 30 กันยายน พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 5/2560 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัยผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนสนับสนุนสถานที่ในการดำเนินการวิจัย รวมทั้งอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ช่วยเหลือให้คำแนะนำ ในการเสนอโครงการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยของมหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความสะดวกในการดำเนินการวิจัยด้วยดีเสมอมา คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้อ่าน หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้วิจัยก็ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย และยินดีรับข้อเสนอแนะของผู้อ่านด้วยความยินดี

รศ. ดร. กันทิมา สุวรรณพงศ์

หัวหน้าโครงการฯ

ธันวาคม 2561

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research grant of Burapha University through National research Council of Thailand (Grant no. 5/2560). We wish to thank the bee research unit of Burapha University, Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University for research facilities. We also wish to thank the research team of NRPM of Thailand for their helpful suggestions for the proposal submission. Our special thank also go to the research staffs of research division of Burapha University for their support throughout the research period. We hope that this report would be helpful for all readers who might probably have the feedback, corrections, comments, inspiration, and most of all for reading.

Associate Professor Guntima Suwannapong

A head of research team

December 2018

การระบาดของเชื้อ *Nosema ceranae* และความรุนแรงของโรคในผึ้งหลวง (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) ในประเทศไทย

บทคัดย่อ

ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) เป็นผึ้งพื้นเมืองของประเทศไทยที่มีขนาดลำตัวและรังขนาดใหญ่ที่สุด ให้น้ำผึ้งและผลิตภัณฑ์ผึ้งที่เป็นประโยชน์ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่สำคัญต่อระบบนิเวศน์เนื่องจากทำหน้าที่ผสมเกสรให้พืชชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะพืชอาหารหลัก (crop plants) ของประเทศไทย และประเทศอื่นในภูมิภาคเอเชีย แต่ในปัจจุบันจำนวนประชากรของรังผึ้งหลวงลดจำนวนลงอย่างมากเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ โดยเฉพาะ โรคโนซีมา (Nosemosis) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผึ้งชนิดต่างๆ ท้องร่วงและตายในที่สุด รวมถึงผึ้งพื้นเมืองของประเทศไทยด้วย วัตถุประสงค์ของการวิจัย คือ สืบสวนการติดเชื้อ *Nosema* ในผึ้งหลวงจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย และยังตรวจสอบความรุนแรงของ *Nosema ceranae* ในผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานภายหลังการติดเชื้อ เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยการวัดประสิทธิภาพการติดเชื้อ อัตราการติดเชื้อระหว่างเซลล์ที่ติดเชื่อต่อเซลล์ที่ไม่ติดเชื่อจำนวนร้อยเซลล์, ระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือด และปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาลิงค์ การจัดจำแนกระบุสปีชีส์ของเชื้อ *Nosema* ใช้ทั้งลักษณะทางกายภาพของ *Nosama* สปอร์ และวิเคราะห์ผลด้วย qPCR นอกจากนี้ยังได้ทดลองใช้สารละลายไคโตซาน สำหรับควบคุมโรคโนซีมาในผึ้งหลวง ผลการทดลองพบว่า พบการติดเชื้อ *Nosema* ผึ้งหลวงทุกพื้นที่ทำการสำรวจ และผลการวิเคราะห์ด้วย qPCR พบทั้ง *N. ceranae* และ *N. apis* นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นสูงส่งผลให้ประสิทธิภาพการติดเชื้อและอัตราการติดเชื้อสูงขึ้น และที่น่าสนใจก็คือ สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ทำให้ประสิทธิภาพการติดเชื้อและอัตราการติดเชื้อลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ สารละลายไคโตซาน ยังทำให้ระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือด ปริมาณโปรตีนในต่อมไฮโปฟาลิงค์ และการรอดชีวิตของผึ้งหลวงเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สารละลายไคโตซานควรได้รับการพิจารณาเพื่อเป็นทางเลือกของการใช้สารจากธรรมชาติในรักษาโรคโนซีมา

คำสำคัญ: โนซีมา, ผึ้งหลวง, สารละลายไคโตซาน

Distribution and virulence of *Nosema ceranae* in Thai giant honeybee, *Apis dorsata* Fabricius, 1793

Abstract

Apis dorsata are the largest native species of Thai honey bees, not only having the biggest body sizes, but also having ability to produce many high value of hive products since they have huge number of colony population. Foragers of this species play the important role in pollination of various plants, especially crop plants of Thailand and other countries in Asia. Nowadays, the honey bee population are decreasing due to the combination among many factors particularly *Nosema* disease, caused diarrhea in all honey bee species including native species of Thailand. We aims to investigate the distribution of *Nosema* infection in *A. dorsata* from difference regions of Thailand, and also to determine the virulence of *Nosema ceranae* after experimental infection in its workers for 30 days by measuring the infectivity, the infection ratios between infected cells to non-infected cells, trehalose levels in haemolymph, and protein contents of the hypopharyngeal glands. The identification of *Nosema* species using both morphological characteristics and qPCR was investigated. Moreover, the use of chitosan for the control of Nosemosis in *A. dorsata* was examined. The results showed that, *Nosema* infections of *A. dorsata* were found in all survey areas. The qPCR products of all bee samples revealed that they were *N. ceranae*, and *N. apis*. It was shown that increasing doses of *Nosema* caused increasing infection ration and infectivity. Interestingly, bee treated with 1 ppm chitosan had a lowest infection ratio and infectivity compared to those of others.

In addition, chitosan treated bees had significantly higher trehalose levels in haemolymph, hypopharyngeal gland protein contents, and higher survival compared to those of untreated bees. Chitosan could therefore be considered as a possible viable alternative way for the control of Nosemosis to improve bee health.

Keyword: *Apis dorsata*, Chitosan, *Nosema ceranae*

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
Abstract.....	ค
สารบัญเรื่อง.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ ๑ บทนำ (Introduction).....	1
๑.๑ ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
๑.๒ ขอบเขตการวิจัย.....	3
๑.๓ วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	4
๑.๔ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ ๒ บททบทวนวรรณกรรม (Literature Reviews).....	5
๒.๑ เชื้อโนซีมา.....	5
๒.๒ วงชีวิตและการแพร่เชื้อของโนซีมา.....	8
๒.๓ ผลกระทบของเชื้อโนซีมาต่อผึ้ง.....	10
๒.๔ ต่อมไฮโปฟาริงค์.....	12
๒.๕ ทางเดินอาหารของผึ้ง.....	14
๒.๖ ผึ้งหลวง (<i>Apis dorsata</i> Fabricius, 1793).....	16
๒.๗ พรอพอลิส.....	19
บทที่ ๓ วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods).....	22
๓.๑ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี.....	22
๓.๒ ตัวอย่างที่ใช้ทดลอง.....	25
๓.๓ บริเวณที่ศึกษา.....	25
๓.๔ วิธีการดำเนินการวิจัย.....	26
บทที่ ๔ ผลการศึกษา (Results).....	38
บทที่ ๕ สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Conclusions and Discussions).....	55
บรรณานุกรม.....	59
ภาคผนวก.....	64
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด.....	78

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ ๓.๑ แสดงพิกัดภูมิศาสตร์ บริเวณที่เก็บตัวอย่างฝั้งหลวงเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ <i>Nosema</i> spp.....	25
ตารางที่ ๔.๑ พิกัดที่เก็บตัวอย่างฝั้งหลวงจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย.....	39
ตารางที่ ๔.๒ ผลการตรวจการติดเชื้อ <i>Nosema</i> จากทางเดินอาหารส่วนกลางของฝั้งหลวง <i>A. dorsata</i> จำนวน ๕๐ ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจากรังที่เขาใหญ่ พิกัด ละติจูด 14,434,960 ลองจิจูด101,413,342.....	39
ตารางที่ ๕.๑ สรุปผลการทดลองการศึกษาผลของสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ต่อฝั้งหลวงวาระฝั้งงานหลังได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว.....	56

สารบัญญภาพ

เรื่อง	หน้า
รูปที่ ๒.๑ ภาพสปอร์ไต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM) ของ <i>N. ceranae</i> (A) และ <i>N. apis</i> (B).....	6
รูปที่ ๒.๒ ภาพไต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของสปอร์ <i>N. neumannii</i> n. sp. (A) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าสปอร์ของ <i>N. ceranae</i> (B) และ <i>N. apis</i> (C). ส่วนภาพ D, E และ F เป็นภาพสปอร์ไต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM) ของ <i>N. neumannii</i> n. sp. ประกอบไปด้วย electron dense exospore (Ex) และ electron lucent endospore (En). ขนาดของสปอร์ของ <i>N. neumannii</i> n. sp. ยาว $2.36 \pm 0.14 \mu\text{m}$ กว้าง $1.78 \pm 0.06 \mu\text{m}$	7
รูปที่ ๒.๓ แผนภาพของ microsporidian spore ที่แสดง life cycle ในระยะ merogony และ sporogony ของ <i>Nosema</i> sp.....	9
รูปที่ ๒.๔ วงจรชีวิต (life cycle) ของเชื้อ <i>Nosema</i>	10
รูปที่ ๒.๕ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ของต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal gland) ของผึ้งม้าม (<i>Apis andreniformis</i>) วรรณะผึ้งงาน.....	12
รูปที่ ๒.๖ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งโพรง ย้อมด้วย PAS.....	13
รูปที่ ๒.๗ ภาพวาดทางเดินอาหารของผึ้งแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และทางเดินอาหารส่วนท้าย(hindgut).....	14
รูปที่ ๒.๘ ทางเดินอาหารของผึ้งที่ติดเชื้อ <i>Nosema</i> (ภาพล่าง) และไม่ติดเชื้อ (ภาพบน).....	15
รูปที่ ๒.๙ ผึ้งหลวง (<i>Apis dorsata</i> , giant honey bees).....	16
รูปที่ ๒.๑๐ รังผึ้งหลวง (<i>Apis dorsata</i> , giant honey bees) ห้อยติดฝ้าเพดานของอาคารบ้านเรือน.....	17
รูปที่ ๒.๑๑ รังผึ้งหลวง (<i>Apis dorsata</i> , giant honey bees) ห้อยติดกิ่งไม้ใหญ่บนต้นไม้สูง.....	18
รูปที่ ๒.๑๒ รังผึ้งหลวง (<i>Apis dorsata</i> , giant honey bees) ห้อยติดกับต้นมะพร้าว.....	18

สารบัญญภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รูปที่ ๒.๑๓ โครงสร้างของสารประเภท flavonoids และ phenolics ที่พบใน green propolis ของผึ้งพันธุ์ (<i>Apis mellifera</i>).....	20
รูปที่ ๒.๑๔ พรอพอลิสบนขอบของรังของผึ้งพันธุ์ (<i>Apis mellifera</i>).....	21
รูปที่ ๓.๑ บริเวณที่เก็บตัวอย่างผึ้งหลวงเพื่อตรวจการติดเชื้อ <i>Nosema</i>	25
รูปที่ ๓.๒ การนับจำนวนสปอร์ <i>N. ceranae</i> โดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer).....	27
รูปที่ ๔.๑ บริเวณที่เก็บตัวอย่างผึ้งหลวงเพื่อตรวจการติดเชื้อ <i>Nosema</i> จากการเพิ่มการสำรวจระยะเวลาช่วงที่ ๒ ระหว่างพฤษภาคม ๒๕๕๙ - สิงหาคม ๒๕๕๙.....	38
รูปที่ ๔.๒ สปอร์ของเชื้อ <i>Nosema</i> แยกออกจากทางเดินอาหารส่วนกลาง ผึ้งหลวงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ซ้าย) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(ขวา).....	41
รูปที่ ๔.๓ PCR products โดย qPCR ของ <i>N. ceranae</i> ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวง ที่เก็บจาก จังหวัดแพร่.....	41
รูปที่ ๔.๔ PCR products ของ <i>N. ceranae</i> ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงที่เก็บจากบริเวณเขาใหญ่ นครราชสีมา (A01-A12).....	42
รูปที่ ๔.๕ PCR products ของ <i>N. ceranae</i> ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงที่เก็บจากบริเวณดอยขุนตาล จังหวัดลำปาง (A01-A12).....	42
รูปที่ ๔.๖ PCR products ของ <i>N. ceranae</i> ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงที่เก็บจากบริเวณอำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี (F01-F12).....	43
รูปที่ ๔.๗ PCR products ของ <i>N. ceranae</i> ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงที่เก็บจากบริเวณอำเภอมะริม จังหวัดเชียงใหม่ (D01-D12).....	43
รูปที่ ๔.๘ อัตราการรอดชีวิตของผึ้งหลวงกลุ่มควบคุม (Control) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (ภาพ a), กลุ่มที่ติดเชื้อ <i>N. ceranae</i> ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว (ภาพ b) และกลุ่มที่ติดเชื้อ <i>N. ceranae</i> แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (ภาพ c) เป็นเวลา 30 วัน	45

สารบัญญภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
<p>รูปที่ ๔.๙ ค่าเฉลี่ย (mean± SE) อัตราการติดเชื้อ (infection rate) ของผึ้ง <i>A. dorsata</i> หลังรับเชื้อ <i>N. ceranae</i> ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm และผึ้ง <i>A. dorsata</i> ที่ได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซาน.....</p>	46
<p>รูปที่ ๔.๑๐ ค่าเฉลี่ย (mean± SE) ของจำนวนสปอร์ <i>N. ceranae</i> ที่สกัดได้จากลำไส้ส่วนกลางของผึ้ง <i>A. dorsata</i> หลังรับเชื้อ <i>N. ceranae</i> ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm และผึ้ง <i>A. dorsata</i> ที่ได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซาน หลังการรับเชื้อ 10 วัน.....</p>	47
<p>รูปที่ ๔.๑๑ ค่าเฉลี่ย (mean± SE) อัตราการติดเชื้อ (infection ratio) ของผึ้ง <i>A. dorsata</i> หลังรับเชื้อ <i>N. ceranae</i> ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm และผึ้ง <i>A. dorsata</i> ที่ได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซาน.....</p>	48
<p>รูปที่ ๔.๑๒ ค่าเฉลี่ย (mean± SE) ระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวง วรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (Nosama+ch) กลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> (Control) กลุ่มที่ได้เชื้อ <i>N. ceranae</i> อย่างเดียว (Nosema) และกลุ่มที่ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm อย่างเดียว (Chitosan) หลังการรับเชื้อ 10 วัน.....</p>	49
<p>รูปที่ ๔.๑๓ ค่าเฉลี่ย (mean± SE) ปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวง วรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (Nosama+ch) กลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> (Control) กลุ่มที่ได้เชื้อ <i>N. ceranae</i> อย่างเดียว (Nosema) และกลุ่มที่ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นอย่างเดียว (Chitosan) หลังการรับเชื้อ 10 วัน.....</p>	51
<p>รูปที่ ๔.๑๔ เนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงวรณะผึ้งงาน ที่ไม่ได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> (กลุ่มควบคุม) ย้อมด้วยสี PAS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....</p>	52

สารบัญญภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รูปที่ ๔.๑๕ เนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน ที่ไม่ได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> 500,000 สปอร์ต่อตัว แต่ได้รับสารละลาย โคโตซานความเข้มข้น 1 ppm หลังป้อนเชื้อวันที่ 10 ย้อมด้วยสี PAS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	53
รูปที่ ๔.๑๖ เนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน ที่ได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วไม่ให้สารละลาย โคโตซานความเข้มข้น 1 ppm หลังป้อนเชื้อวันที่ 10 ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	53
รูปที่ ๔.๑๗ เนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน ที่ได้รับเชื้อ <i>N. ceranae</i> 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลาย โคโตซานความเข้มข้น 1 ppm หลังป้อนเชื้อวันที่ 10 ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	54
รูปที่ ๕.๑ บริเวณที่เก็บตัวอย่างผึ้งหลวงและตรวจพบการติดเชื้อ <i>Nosema</i> จากการเพิ่มการสำรวจระยะเวลาช่วงที่ ๒ ระหว่างพฤษภาคม ๒๕๕๙ – สิงหาคม ๒๕๕๙.....	55

บทที่ ๑

บทนำ

(Introduction)

๑.๑ ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Research Rationale)

ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) เป็นผึ้งพื้นเมืองของประเทศไทยที่มีขนาดลำตัวและรังขนาดใหญ่ที่สุด ให้น้ำผึ้งและผลิตภัณฑ์ผึ้งที่เป็นประโยชน์ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่สำคัญต่อระบบนิเวศน์เนื่องจากทำหน้าที่ผสมเกสรให้พืชชนิดต่าง ๆ มากกว่า 59 ชนิด โดยเฉพาะพืชอาหารหลัก (crop plants) ของประเทศไทย (Suwannapong, Maksong, Yemor, Junsuri, & Benbow, 2013) และประเทศอื่นในภูมิภาคเอเชีย (Baker, Cruden, & Baker, 1971; McGregor, 1976) แต่ในปัจจุบันจำนวนประชากรของรังผึ้งหลวงลดจำนวนลงอย่างมาก เนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น การขาดแคลนที่อยู่อาศัย เนื่องจากการตัดไม้ทำลายป่าซึ่งเป็นถิ่นที่อยู่อาศัย ทำรังและแหล่งอาหารของผึ้งหลวง การถูกล่าจากมนุษย์ (bee hunter) เพื่อเอาน้ำผึ้งเนื่องจากเป็นผึ้งที่มีรังขนาดใหญ่ ให้น้ำผึ้งปริมาณมาก รวมทั้งผลิตภัณฑ์ผึ้งชนิดอื่นที่มนุษย์ต้องการ การเก็บน้ำหวานหรือเกสรที่มีการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงและสารกำจัดศัตรูพืช รวมทั้งเชื้อโรค ที่ทำให้ผึ้งตาย ที่สำคัญที่พบระบาดมากทั่วโลกในผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ได้แก่ โรคโนซีมา ซึ่งพบรายงานการติดเชื้อชนิดนี้ในผึ้งพื้นเมืองของประเทศไทยด้วยเช่นกัน (Peters, Suwannapong, Pelin, & Corradi, 2018; Suwannapong, Maksong, Phainchajoen, Benbow, & Mayack, 2018; Suwannapong, Maksong, Seanbualuang, & Benbow, 2010; Suwannapong, Yemor, Boonpakdee, & Benbow, 2011; Yemor, Phiancharoen, Eric Benbow, & Suwannapong, 2015) ซึ่งโรคโนซีมา เป็นสาเหตุให้ผึ้งท้องร่วงและตายในที่สุด ซึ่งปัจจุบันมีการระบาดไปทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยเรา โรคโนซีมา เกิดจากการที่ผึ้งติดเชื้อ 2 ชนิดคือ *Nosema apis* และ *N. ceranae* เป็นปรสิตภายในเซลล์ที่ก่อความเสียหายอย่างรุนแรงในผึ้งงานระยะตัวเต็มวัยที่พบการระบาดอยู่ทั่วโลก โดยมีรายงานว่าก่อให้เกิดความเสียหายอย่างเห็นได้ชัดกับผึ้งที่มีการติดเชื้อ โดยทำให้ผึ้งท้องเสียอย่างรุนแรง มีอายุสั้นลง ส่งผลต่อพฤติกรรมต่างๆ ภายในรังผึ้ง เช่น การหาอาหารลดลง การเลี้ยงดูตัวอ่อนลดลงเนื่องจากผลิตนมผึ้ง (royal jelly) ได้น้อยลง ตลอดจนการวางไข่ของนางพญา ซึ่งลดจำนวนหรือหยุดวางไข่ เป็นต้น ซึ่งลักษณะต่าง ๆ เหล่านี้เป็นสาเหตุทำให้ จำนวนประชากรของผึ้งภายในรังลดลง ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ผึ้ง (bee products) ลดลง และที่สำคัญทำให้ประชากรของแมลงที่ทำหน้าที่ถ่ายละอองเกสร (pollinators) ลดจำนวนลงด้วย ผลพวงตามาคือ พืชผลทางการเกษตรที่ต้องการผึ้งเป็นแมลงถ่ายละอองเกสรให้ผลผลิตต่ำลง นอกจากนี้ ยังไม่มีการรายงานการศึกษาการระบาดของเชื้อ *Nosema* ทั้งสองชนิดต่อผึ้งหลวง ในประเทศไทยและในโลก ดังนั้นการศึกษาสำรวจการแพร่กระจาย การ

แยกชนิดสายพันธุ์และการติดเชื้อโนซีมาในผึ้งแต่ละชนิดที่มีในประเทศไทย จะเป็นข้อมูลที่สำคัญ ต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงผึ้ง การอนุรักษ์ผึ้งพันธุ์พื้นเมืองที่นับวันลดน้อยลงเนื่องจากปัญหาการใช้สารเคมี ตลอดจน การนำไปประยุกต์ใช้เป็นข้อมูลโรคของแมลงกลุ่มอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงผึ้ง เช่นผีเสื้อหนอนไหมที่เลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมและแมลงอื่น ๆ ที่มีรายงานการระบาดของเชื้อ *Nosema* นอกจากนี้โรคชนิดนี้ยังเป็นโรคที่นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกมีความตื่นตัวและให้ความสำคัญในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ *Nosema* มากเนื่องจาก เชื่อกันว่าเชื้อชนิดนี้ อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด CCD (colony collapse disorder) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่ประชากรของผึ้งหายไปจากรัง จำนวนมาก ทำให้ประชากรภายในรังลดลงอย่างกะทันหัน โดยไม่ทราบสาเหตุ ประกอบกับข้อมูลรายงานการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ผึ้ง (*Apis mellifera*) ระหว่างเชื้อ *N. apis* ซึ่งเดิมพบในผึ้งพันธุ์ สามารถเข้าไประบาดในผึ้งโพรง (*A. cerana*) และในทางกลับกัน *N. ceranae* ซึ่งเดิมพบเป็นเชื้อที่ระบาดในผึ้งโพรง สามารถเข้าไประบาดในเซลล์ของผึ้งพันธุ์ได้เช่นกันและก่อให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ และประชากรโดยรวมของผึ้งภายในรังมากกว่า *N. apis* อย่างชัดเจน ทำให้นักวิจัยผึ้งทั่วโลก รวมทั้งเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งมีความกังวล เกี่ยวกับการระบาดของเชื้อ *N. ceranae* ที่อาจทำให้ประชากรของผึ้งพันธุ์เสียหายจำนวนมากหรืออาจส่งผลให้ประชากรของผึ้งชนิดดังกล่าวในฟาร์มหายไปจนไม่สามารถนำไปใช้ในถ่ายละอองเกสรในสวนผลไม้หรือพืชที่ต้องการผึ้งชนิดนี้ถ่ายละอองเกสรได้ ประกอบกับผึ้งพันธุ์เป็นผึ้งที่ใช้เลี้ยงในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งทั่วโลก ดังนั้นการศึกษาวินิจฉัยเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากเชื้อ *Nosema* จึงเป็นที่สนใจในศึกษากันมากทั่วโลก ดังนั้นหากมีการระบาดข้ามสายพันธุ์ผึ้ง จากผึ้งโพรง ผึ้งพันธุ์ ผึ้งมิม ไปสู่ผึ้งหลวง เนื่องจากผึ้งเหล่านี้ใช้แหล่งอาหารจากพืชอาหารผึ้งร่วมกัน อาจส่งผลต่อประชากรผึ้งหลวงได้เช่นกัน ส่งผลให้ จำนวนแมลงถ่ายละอองเรณู อาจลดลงอย่างมาก ส่งผลต่อผลผลิตทางการเกษตร และต่อระบบนิเวศน์ ที่เสียสมดุลไป

นอกจากนี้มียางานเกี่ยวกับผึ้งที่ได้รับเชื้อ *Nosema* จะทำให้ผึ้งมีสภาวะเครียดในเรื่องของสารอาหารพลังงานในเซลล์ (energetic stress) โดย Mayack and Naug (2009) ได้รายงานว่ามีเมื่อผึ้ง *A. mellifera* ได้รับเชื้อ *N. ceranae* จะทำให้ระดับน้ำตาลทรีฮาโลส (trehalose) ในเลือดต่ำลง ส่งผลให้ผึ้งแสดงพฤติกรรมการบิน proboscis มากขึ้น เนื่องจากความหิว ซึ่งเนื่องมาจากทางเดินอาหารส่วนกลางโดนทำลาย กระทบต่อการย่อยอาหารทำให้ได้สารอาหารไม่เพียงพอ (Mayack & Naug, 2009, 2010, 2013) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษา ระดับน้ำตาล trehalose ใน haemolymph ของผึ้งที่ได้รับการติดเชื้อ *N. ceranae* เมื่อผึ้งได้รับเชื้อในปริมาณต่าง ๆ และที่อุณหภูมิต่าง ๆ ด้วย เนื่องจาก มีรายงานว่า *N. ceranae* ทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำ ได้ดีกว่า *N. apis* อย่างไรก็ตามถ้าหากอุณหภูมิสูงเกิน 33 องศาเซลเซียสจะทำให้อัตราการรอดชีวิตต่ำลงเมื่อเก็บเชื้อไว้เป็นเวลานาน (Sanchez Collado, Higes, Barrio, & Martin-Hernandez, 2014) จึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาเป็นอย่างยิ่งว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงระดับหนึ่ง ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อผึ้ง

แต่อาจสามารถทำลายเชื้อชนิดนี้ได้ ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมและเป็นแนวทางในการกำจัดเชื้อชนิดนี้ได้

การศึกษาการติดเชื้อโนซีมาที่ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของผึ้งหลวง มีความสำคัญมากเช่นเดียวกัน เนื่องจากมีรายงานการติดเชื้อในทางเดินอาหารส่วนกลางในผึ้งพันธุ์และผึ้งชนิดอื่นที่ถือเป็นผึ้งพื้นเมืองของไทย โดยผึ้งที่ได้รับเชื้อปริมาณมาก ๆ จะเกิดอาการท้องร่วงและตายในที่สุด มีกลิ่นเน่าเหม็น เนื่องจากเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะเข้าไปเจริญและแพร่พันธุ์ในทางเดินอาหารส่วนกลาง ทำให้เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลางเสียหาย ไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์ และย่อยอาหารได้ ผลทำให้อาหารที่ผึ้งกินเข้าไปไม่สามารถย่อยได้ โดยเฉพาะอาหารพวกโปรตีนที่ผึ้งได้จากการกินเกสรของดอกไม้ (pollen grains) นอกจากนี้พฤติกรรมการหาอาหารของผึ้งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายและรับเชื้อ *Nosema* เนื่องจากผึ้งที่อาศัยอยู่ในบริเวณใกล้กันที่มีอาณาเขตในการหาอาหารทับซ้อนกัน ผึ้งมักมีการใช้แหล่งอาหารเหล่านี้ร่วมกัน ดังนั้นผึ้งงานหาอาหารที่มีเชื้อ *Nosema* มีโอกาสปล่อยเชื้อไปตามแหล่งอาหารต่าง ๆ ขณะหาอาหาร ทำให้สปอร์ของเชื้อสามารถแพร่ไปยังผึ้งจากรังอื่น ๆ หรือผึ้งชนิดอื่น ๆ ที่มาหาอาหารในดอกไม้ดอกเดียวกันหรือแหล่งอาหารอื่นที่ใช้ร่วมกันได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาอัตราการติดเชื้อโนซีมาของผึ้งชนิดนี้ เมื่อให้เชื้อในระดับที่กำหนดระดับต่าง ๆ โดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานจากรายงานการศึกษาในผึ้งชนิดอื่นของประเทศไทย ระยะเวลาที่เมื่อผึ้งได้รับเชื้อจนกระทั่งผึ้งตาย และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอัตราการติดเชื้อ *N. ceranae* เมื่อผึ้งได้รับ เชื้อปริมาณต่าง ๆ และเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ ตรวจวัด อัตราการตาย การติดเชื้อ ระดับน้ำตาล trehalose ใน haemolymph วัดปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) ระหว่างผึ้งกลุ่มที่ได้รับเชื้อ กับกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ และเปรียบเทียบผึ้งที่ได้รับสารสกัดพรอพอริสจากชันโรง (*Trigona apicalis*) กับผึ้งที่ไม่ได้รับสารสกัดพรอพอริสจากชันโรง

๑.๒ ขอบเขตการวิจัย (Scope of the study)

ศึกษาผลของสารสกัดพรอพอริสจากชันโรงอัตราการติดเชื้อของผึ้งงานอายุ 1 วัน ของผึ้งหลวง (*A. dorsata*) เมื่อให้เชื้อ *N. ceranae* ทางปาก ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ต่อตัว โดยละลายในสารละลาย 50% ซูโครส ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุม ความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสม วัดผลจากร้อยละของการติดเชื้อ (infection ratio) โดยนับจำนวนผึ้งที่ติดเชื้อ (infected bees) กับผึ้งที่ไม่ติดเชื้อ (non infected bees) และนับจำนวนสปอร์ในผึ้งแต่ละตัวที่ตายในแต่ละวัน โดยใช้ Haemocytometer

ศึกษาอัตราการตาย (bee mortality) และร้อยละของการติดเชื้อของเซลล์ (infected cells) กับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ (non infected cells) ของเซลล์เยื่อทางเดินอาหารส่วนกลางและเซลล์ของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้ง ตลอดจนศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ของต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) และเยื่อผิวของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) เมื่อได้รับเชื้อความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ต่อตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) ตลอดจนศึกษา การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาล trehalose ใน haemolymph, ระดับเอนไซม์ protease ในทางเดินอาหารส่วนกลาง และต่อการสร้างโปรตีนในนมผึ้งของผึ้งหลวง วรรณะผึ้งงาน

๑.๓ วัตถุประสงค์ของโครงการ

ศึกษาการระบาดของเชื้อ *N. ceranae* ในผึ้งหลวง (*A. dorsata*) ในประเทศไทย และความรุนแรงของโรคในหึ่งปฏิบัติการ รวมทั้งผลของสารสกัดพรอพอลิส (propolis) จากชันโรง (stingless bee) ชนิด *Trigona apiicalis* ต่ออัตราการติดเชื้อ *N. ceranae* ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ต่อตัว ของเซลล์เยื่อทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของผึ้ง อัตราการตาย อัตราการติดเชื้อ การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาล trehalose ใน haemolymph, ระดับเอนไซม์ protease ในทางเดินอาหารส่วนกลาง และต่อการสร้างโปรตีนในนมผึ้งของผึ้งหลวง วรรณะผึ้งงาน ของผึ้งหลวง

๑.๔ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จะเห็นได้ว่าการระบาดของเชื้อ *Nosema* นี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายหลายด้าน เช่น ทางเศรษฐกิจ อย่างเห็นได้ชัดเนื่องจากเป็นสาเหตุหลักในการทำให้ประชากรผึ้งลดจำนวนลง และไม่มีคุณภาพ นอกจากนี้ยังส่งผลเสียหายต่อระบบนิเวศน์โดยรวม ทำให้การแพร่พันธุ์ของพืชบางกลุ่มลดลง เป็นต้น ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้เลี้ยงผึ้งและนักวิทยาศาสตร์ที่ทำงานวิจัยเกี่ยวกับผึ้งและชีววิทยาของผึ้ง เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาและหาวิธีการป้องกันกำจัดที่เหมาะสมต่อไป

บทที่ ๒

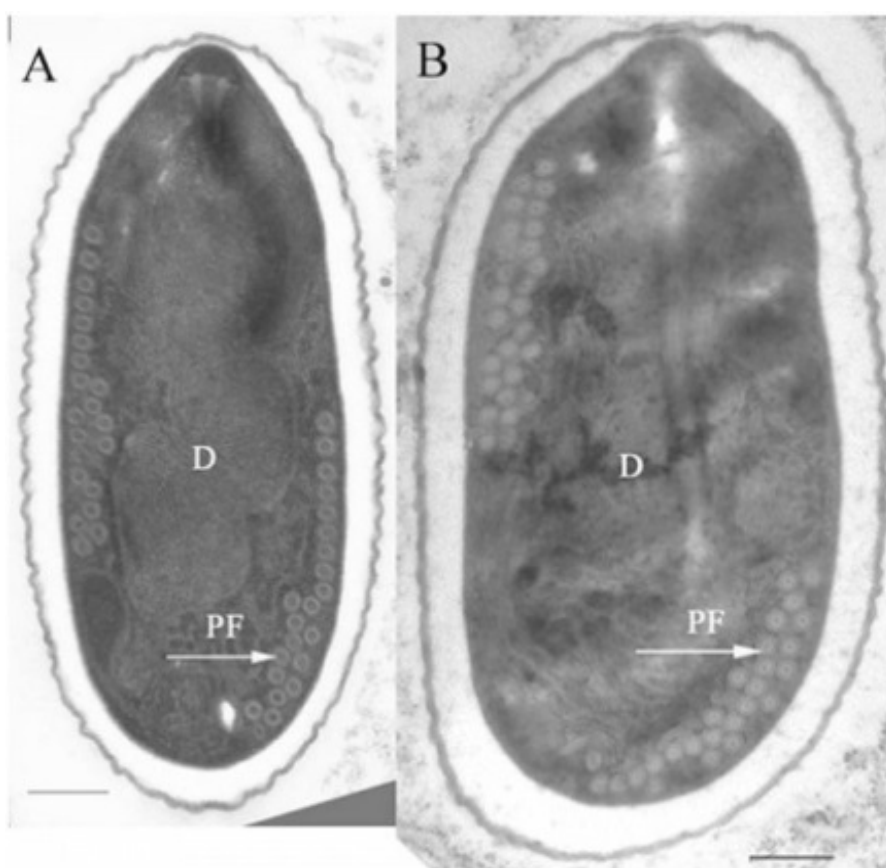
บทบทวนวรรณกรรม (Literature Reviews)

๒.๑ เชื้อโนซีมา (*Nosema*)

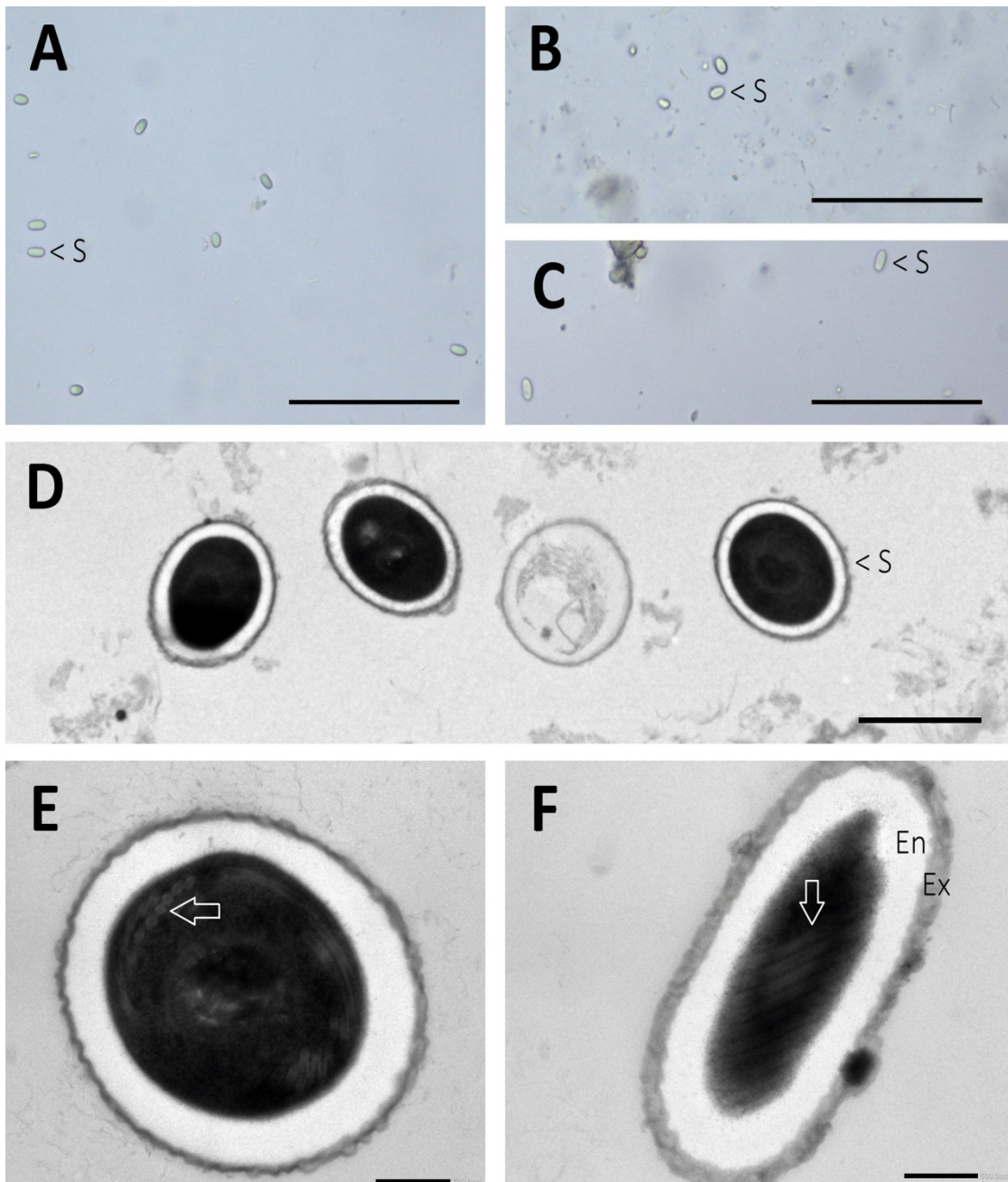
Nosema จัดเป็น Microsporidia ซึ่งถือเป็นปรสิตภายในเซลล์กลุ่มใหญ่ที่แพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติและพบได้ทั่วโลก (Andrew Matheson, 1996) ซึ่งปัจจุบันมีมากกว่า 150 ชนิด (species) เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrates) รวมถึงแมลง (insects) อย่างน้อย 12 อันดับ (orders) มักจะพบบ่อยในแมลงที่อยู่ในอันดับ Lepidoptera และ Hymenoptera (Higes, Garcia-Palencia, Martin-Hernandez, & Meana, 2007) โดยก่อให้เกิดโรคที่มีชื่อว่า **Nosema disease** (Bailey & Ball, 1991; Fries, 1989) เชื้อชนิดนี้จะทำให้ระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของเจ้าบ้าน (hosts) เสียหาย ทำให้เกิดอาการท้องร่วงและ เชื้อมีความสามารถต้านทานต่อระบบภูมิคุ้มกันของตัวเจ้าบ้านที่เชื้อเข้าไปอาศัยอยู่ (de Graaf, Sittig, & Denier van der Gon, 1994; Fries, Martín, Meana, García-Palencia, & Higes, 2006) สำหรับ *Nosema* ที่ก่อให้เกิดโรคในผึ้ง (honeybees) ที่รายงานมี 3 ชนิด คือ *N. apis* (Zander, 1909) *N. ceranae* (Fries, Feng, da Silva, Slemenda, & Pieniazek, 1996) และ *N. neumannii* n. sp. (Chemurot, De Smet, Brunain, De Rycke, & de Graaf, 2017) โดย *N. apis* เป็นปรสิตในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ซึ่งเป็นผึ้งพื้นเมืองของยุโรปปัจจุบันถูกนำมาเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมทั่วโลก ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Zander ในปี 1909 ในผึ้งพันธุ์ โดยเชื้อชนิดนี้จะติดเชื้อในเนื้อเยื่อผิวของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของผึ้งงานตัวเต็มวัยเป็นสาเหตุทำให้ระบบย่อยอาหารผิดปกติ อาหารไม่ย่อยและเกิดอาการท้องเสียทำให้ผึ้งมีอายุสั้นและส่งผลให้จำนวนประชากรภายในรังลดลงอย่างรวดเร็ว (Anderson & Giacon, 1992; Hassanein, 1953; Higes et al., 2007; Rinderer & Dell Elliott, 1977) ในอดีตพบโรคโนซีมาเฉพาะในยุโรปและเกิดจากเชื้อ *N. apis* เท่านั้น (Chen, Evans, Smith, & Pettis, 2008; Ellis & Munn, 2005) ต่อมาได้มีผู้ศึกษาพบว่าโรคโนซีมามีการระบาดทั้งในภูมิภาคเอเชียและยุโรป โดยพบ *Nosema* ในผึ้งโพรง (*A. cerana*) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *N. ceranae* ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Fries และคณะ ในปี 1996 (Fries et al., 1996; Fries et al., 2006) และในปี ค.ศ. 2017 มีการค้นพบเชื้อโนซีมาสปีชีส์ใหม่คือ *N. neumannii* n. sp. ถูกพบครั้งแรกในผึ้งพันธุ์ในสาธารณรัฐยูกันดา โดย Chemurot และคณะ

ซึ่งเชื้อทั้งสามชนิดนี้มีความแตกต่างกันหลายประการเช่น SSUrRNA sequences (โดยใช้เทคนิค PCR เพื่อแยกความแตกต่างของ 16S rRNA ของทั้งสามชนิด (Chemurot et al., 2017; Chen et al., 2008; Fries et al., 1996; Fries et al., 2006; Huang, Jiang, Chen, & Wang,

2007; Williams, Shafer, Rogers, Shutler, & Stewart, 2008) ขนาดของสปอร์เมื่อส่องใต้กล้อง transmission electron microscopy (TEM) พบว่าสปอร์ของ *N. neumannii* n. sp. ยาว $2.36 \pm 0.14 \mu\text{m}$ และกว้าง $1.78 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า *N. ceranae* และ *N. apis* (Chemurot et al., 2017; Williams et al., 2008) จำนวน polar filament coils ของ *N. ceranae* มีจำนวน 20-23 filaments, *N. apis* มีจำนวน 30-44 filaments (Fries, 1989) และ *N. neumannii* n. sp. มีจำนวน 10-12 (รูปที่ ๒.๑-๒.๒) filaments (Chemurot et al., 2017) โดยเชื้อชนิดนี้เข้าไปติดและทำความเสียหายบริเวณกระเพาะอาหาร (ventriculus) ของผึ้งโพรง ทำให้บริเวณดังกล่าวมีลักษณะสีขาวขุ่นและบวมโป่งออก (Fries et al., 1996) นอกจากนี้มีรายงานการแพร่กระจายของเชื้อ *N. ceranae* จากผึ้งโพรง (*A. cerana*) สู่มดพันธุ์ (*A. mellifera*) ที่อยู่ในเอเชีย ยุโรป อเมริกาเหนือ อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ (Fries et al., 2006; Huang et al., 2007; Klee et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2007; Williams et al., 2008)



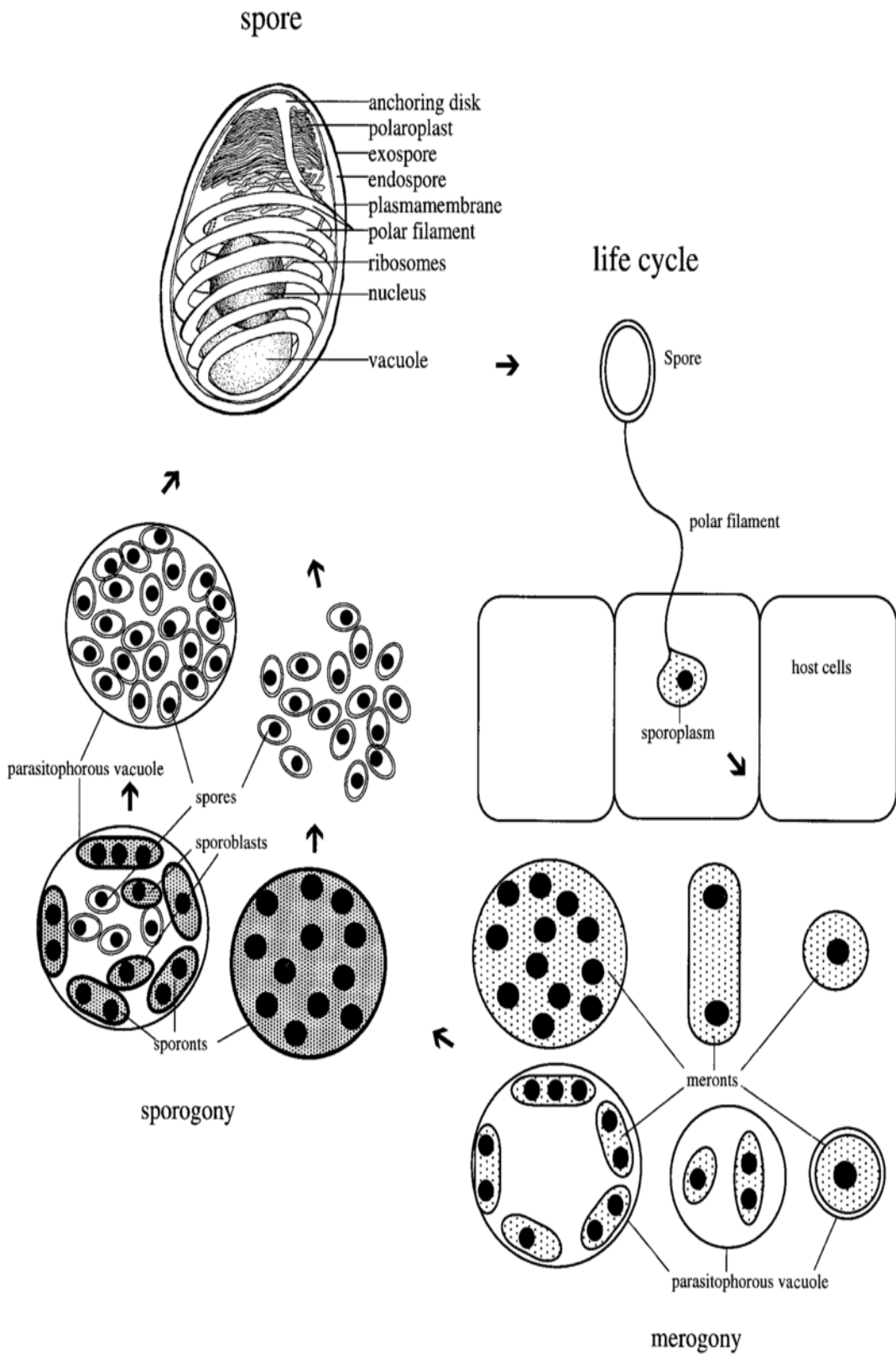
รูปที่ ๒.๑ ภาพสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM) ของ *N. ceranae* (A) และ *N. apis* (B); PF, polar filament (Fries et al., 2006)



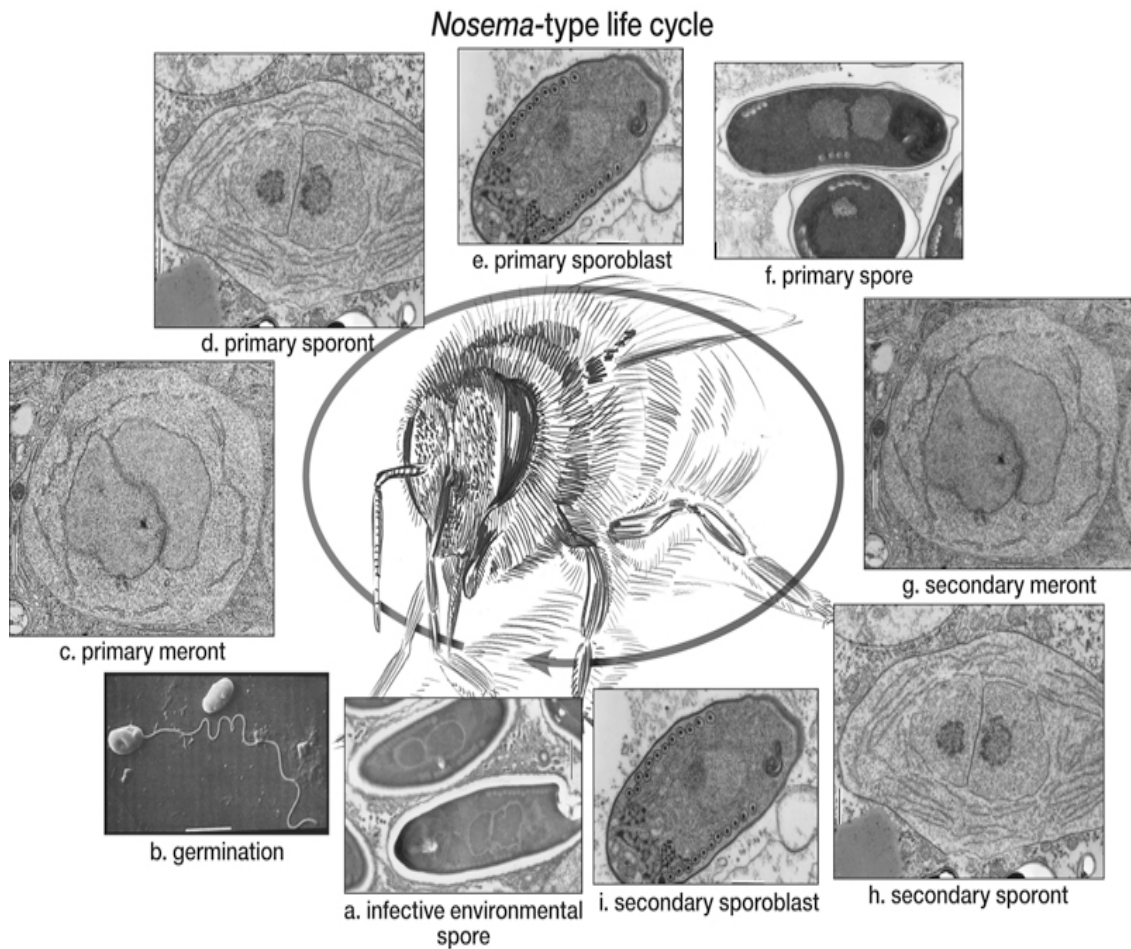
รูปที่ ๒.๒ ภาพไตกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของสปอร์ *Nosema neumanni* n. sp. (A) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าสปอร์ของ *N. ceranae* (B) และ *N. apis* (C). ส่วนภาพ D, E และ F เป็นภาพสปอร์ไตกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM) ของ *N. neumanni* n. sp. ประกอบไปด้วย electron dense exospore (Ex) และ electron lucent endospore (En). ขนาดของสปอร์ของ *N. neumanni* n. sp. ยาว $2.36 \pm 0.14 \mu\text{m}$ กว้าง $1.78 \pm 0.06 \mu\text{m}$. Scale bars: ในภาพ A, B และ C เท่ากับ $50 \mu\text{m}$; ในภาพ D เท่ากับ $2 \mu\text{m}$ และในภาพ E และ F 500 nm . (Chemurot et al., 2017)

๒.๒ วงชีวิตและการแพร่เชื้อของโนซีมา (Life cycle and distribution of *Nosema*)

การติดต่อของโรคหรือการติดเชื้อ เกิดได้โดยการป้อนอาหารโดยส่งต่อจากปากของผึ้งงานตัวหนึ่งสู่ผึ้งอีกตัวหนึ่งที่เรียกว่า trophallaxis (Webster, 1993) รวมทั้งการนำเอาส่วนของรังที่มีสปอร์ของเชื้อปนอยู่เข้าปาก (ingestion of infected comb) หรือมาจากแหล่งน้ำที่ผึ้งนำเข้ามาใช้ในรัง (Bailey & Ball, 1991) เมื่อสปอร์ของเชื้อ *Nosema* เข้าสู่ร่างกายทางปาก สปอร์จะเริ่มพัฒนาภายใน 30 นาที ในกระเพาะอาหาร (ventriculus) และทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) โดยเฉพาะที่บริเวณเยื่อบุผิว (epithelium) ของ ventricular fold โดยการยื่น polar tube ที่เป็นตัวนำเอา sporoplasm (รูปที่ ๒.๓) ของเชื้อ เข้าไปในเซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลาง โดยเชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 6-10 วัน (Bailey & Ball, 1991) (รูปที่ ๒.๔) สปอร์ของโนซีมาสามารถเจาะผ่านทะเลาะระหว่างเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียงทำให้เซลล์ปกติติดเชื้อ (Bailey & Ball, 1991; de Graaf, Sittig, & Denier van der Gon, 1994) เชื้อที่แพร่พันธุ์และเพิ่มจำนวนในร่างกายจะบวมและพังกตัวในร่างกายของผึ้งงานที่ยังมีชีวิตอยู่ นอกจากนี้สปอร์ของเชื้อยังอาจอยู่ที่ไขผึ้งที่เป็นส่วนประกอบของรัง ปนอยู่ในน้ำผึ้ง และส่วนอื่น ๆ ในรังผึ้ง (Cantwell & Shimanuki, 1970) สปอร์ที่อยู่เซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางจะถูกกำจัดออกจากทางเดินอาหาร โดยการขจัดเนื้อเยื่อของทางเดินอาหารปกติ พร้อมกับการขับน้ำย่อยออกอยู่แล้ว ทำให้สปอร์สามารถเข้าสู่เซลล์อื่น ๆ ของทางเดินอาหารได้และมีสปอร์บางส่วนผ่านต่อไปยังลำไส้ (intestine) และหลุดออกมา กับอุจจาระ (feces) ของผึ้งสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกและสามารถเข้าสู่ผึ้งตัวต่อไปได้ใหม่ เมื่อผึ้งมาสัมผัสบริเวณที่มีอุจจาระที่มีสปอร์ปนต่อไป (Malone, Giaccon, & Newton, 1995; Matheson, 1993) พบการระบาดของโรคโนซีมาในฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วง มักมีการระบาดน้อยในฤดูร้อน (summer) ช่วงฤดูนี้ผึ้งจะมีสปอร์อยู่ภายในร่างกายเล็กน้อย ทำให้ไม่แสดงอาการของโรคและไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อประชากรภายในรังผึ้งนอกจากนี้สปอร์บางส่วนยังติดอยู่ที่รวงรังและจะแพร่พันธุ์ใหม่อย่างรวดเร็วอีกครั้งเมื่อเริ่มเข้าสู่ฤดูใบไม้ร่วง (autumn) ซึ่งส่งผลให้สูญเสียประชากรผึ้งเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว (L. Malone, A. et al., 1995) และเสียหายหนักมากในฤดูหนาว (winter) และจะลดลงอีกครั้งเมื่ออุณหภูมิอุ่นขึ้นในช่วงหน้าร้อน



รูปที่ ๒.๓ แผนภาพของ microsporidian spore ที่แสดง life cycle ในระยะ merogony และ sporogony ของ *Nosema* sp. (Franzen & Müller, 1999)



รูปที่ ๒.๔ วงจรชีวิต (life cycle) ของเชื้อ *Nosema* (Solter, 2010)

๒.๓ ผลกระทบของเชื้อโนซีมาต่อผึ้ง (Effect of *Nosema* on bees)

ไม่พบการติดเชื้อของ *Nosema* ในผึ้งระยะตัวหนอน (larvae) แต่สามารถพบได้ในผึ้งตัวเต็มวัย (adult) บางครั้งผึ้งที่ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการเฉพาะของโรคแต่สามารถตรวจสอบได้โดยการตรวจดูทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งโดยจะพบสปอร์ของ *Nosema* ในกรณีที่ได้รับเชื้อปริมาณมาก ๆ ทำให้ผึ้งที่ได้รับเชื้อเกิดอาการท้องร่วงและตายในที่สุดเนื่องจากเชื้อเข้าไปทำลายเซลล์ ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางเสียหาย ไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์มาย่อยเกสรที่กินเข้าไปได้ (de Graaf et al., 1994; L. Malone, A., Giacón, & Newton, 1995; A. Matheson, 1993) ตัวอย่าง ในผึ้งหาอาหารของผึ้งพันธุ์ เมื่อได้รับเชื้อจำนวน 100,000 สปอร์ต่อตัว โดยป้อนปนกับสารละลายน้ำตาล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จะมีผลทำให้ทางเดินอาหารส่วนกลางผลิตโปรติโอไลติกเอ็นไซม์ (proteolytic enzyme) ได้น้อยลง (L. Malone & Gatehouse, 1998) และส่งผลให้ผึ้งมีอายุสั้นลง (Ritter, 2001) ส่งผลทำให้ลดจำนวนประชากรภายในรังอย่างรวดเร็ว (Hassanein, 1953; L. Malone, A. et al.,

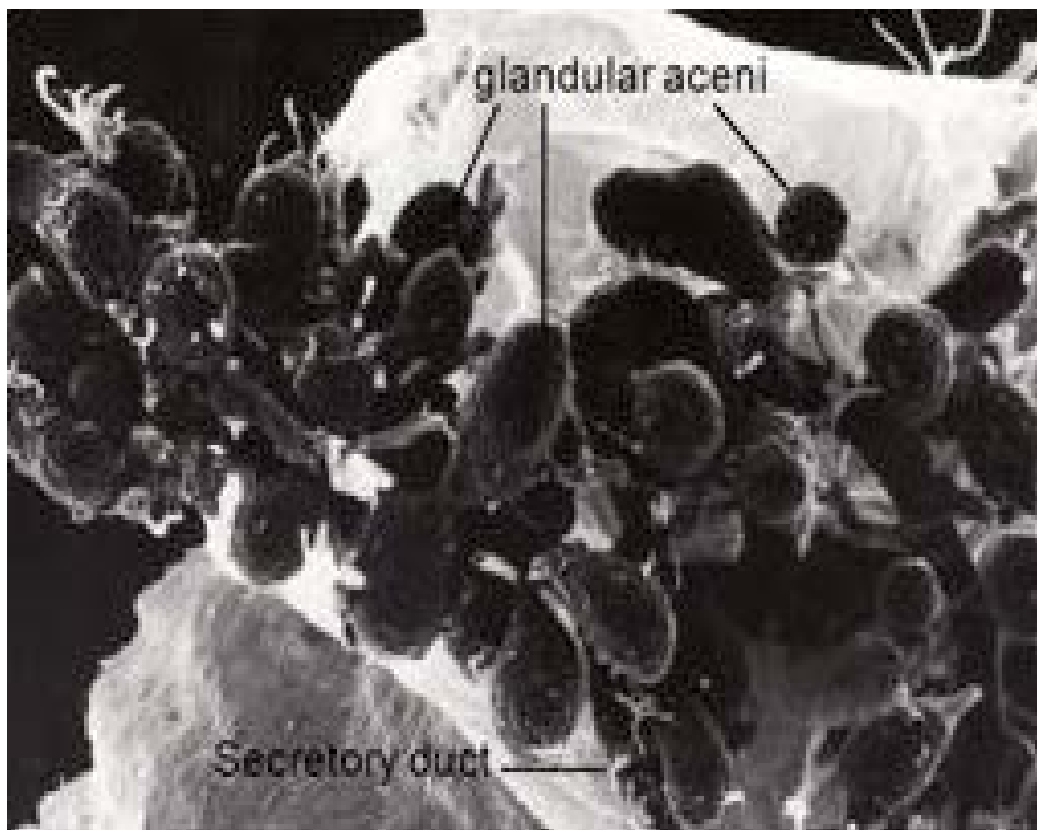
1995; Rinderer & Sylvester, 1978) การติดเชื้อในผึ้งงานกลุ่มหาอาหาร (foragers) จะทำให้การเก็บเกสรดอกไม้และน้ำหวานลดลง ทำให้รังขาดแคลนอาหาร สุขภาพโดยรวมของประชากรภายในรังอ่อนแอ ทำให้ผึ้งเกิดอาการท้องเสียและตายในที่สุด ประชากรภายในรังลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลผลิตภายในรัง (bee products) ลดลงรวมทั้งผลผลิตทางการเกษตร (crop production) เนื่องจากขาดแมลงถ่ายละอองเรณู (Anderson & Giaccon, 1992; Fries, Ekbohm, & Villumstad, 1984; Goodman, Houten, Perry, & Blackmann, 1990) หากผึ้งพยาบาล (nurse bees) ได้รับเชื้อชนิดนี้ส่งผลให้การเจริญของต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) ลดลง หรือหยุดชะงัก ซึ่งมีผลต่อการผลิตนมผึ้ง (royal jelly) ได้ไม่เต็มที่ ส่งผลทำให้ผึ้งพยาบาลสูญเสียความสามารถในการเลี้ยงดูตัวอ่อน (Clark, 1980) จากการศึกษาการใช้เชื้อ *Nosema apis* จำนวน 5,000 สปอร์ ต่อตัว แก่ผึ้งงานของผึ้งพันธุ์อายุ 1 วัน พบว่าต่อมไฮโปฟาริงค์ไม่เจริญและฝ่อไปในที่สุด (Der- I. Wang & Moeller, 1971) ส่งผลต่อเนื่องถึงคุณภาพของประชากรผึ้งภายในรังเนื่องจากได้โปรตีนคุณภาพต่ำและไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต (Anderson & Giaccon, 1992; Clark, 1980; Fries et al., 1984; Goodwin, Perry, & Houten, 1994) ส่งผลต่อเนื่องถึงคุณภาพของประชากรผึ้งภายในรัง และหากผึ้งนางพญา ผลเสียหายโดยรวมทำให้ประชากรผึ้งลดน้อยลงและไม่มีคุณภาพ ผลคือทำให้ผลิตภัณฑ์ผึ้งชนิดต่าง ๆ ลดลงอย่างมาก หรือผึ้งอาจตายยกรัง นอกจากนี้ยังทำให้ระบบนิเวศน์ขาดแคลนแมลงถ่ายละอองเกสรที่สำคัญ โดยเฉพาะในพืชเศรษฐกิจทั้งหลาย ส่งผลให้การติดผลของพืชลดลง ตลอดจนทำให้ความหลากหลายของชนิดพืชลดลงไปด้วย โดยเฉพาะถ้าหากมีการระบาดของเชื้อ *Nosema* ในประชากรของผึ้งต่อเนื่องและยาวนาน (Der-I Wang & Moeller, 1969; Der- I. Wang & Moeller, 1971)

นอกจากนี้ยังมีรายงานผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่อระดับน้ำตาลใน haemolymph เนื่องจากเมื่อผึ้งงานที่ได้รับเชื้อจะทำให้ทางเดินอาหารส่วนกลางเสียหาย (Suwannapong et al., 2010; Suwannapong et al., 2011) มีอัตราการติดเชื้อในเซลล์มาก ทำให้ผึ้งไม่สามารถย่อยอาหารได้ ทำให้มีผลต่อการขาดสารอาหารพลังงานในเซลล์ ส่งผลให้เกิดสภาวะเครียดของพลังงาน ในผึ้งพันธุ์ (energetic stress) (Mayack & Naug, 2009, 2010) โดยพบว่าระดับน้ำตาล trehalose ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่และเป็นน้ำตาลหลักที่พบในเลือดผึ้ง ลดต่ำลงและต่ำกว่าผึ้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ

อุณหภูมิที่เก็บรักษาเชื้อ *N. ceranae* และ *N. apis* ยังมีผลต่อการมีชีวิต (viability) ของเชื้อโนซีมา ทั้งสองชนิดด้วย โดย *N. ceranae* สามารถทนต่อสภาวะที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ *N. apis* และยังพบว่าอุณหภูมิต่ำที่ -20 องศาเซลเซียสทำให้อัตราการรอดชีวิตของ *N. ceranae* ต่ำมาก (Sanchez Collado et al., 2014)

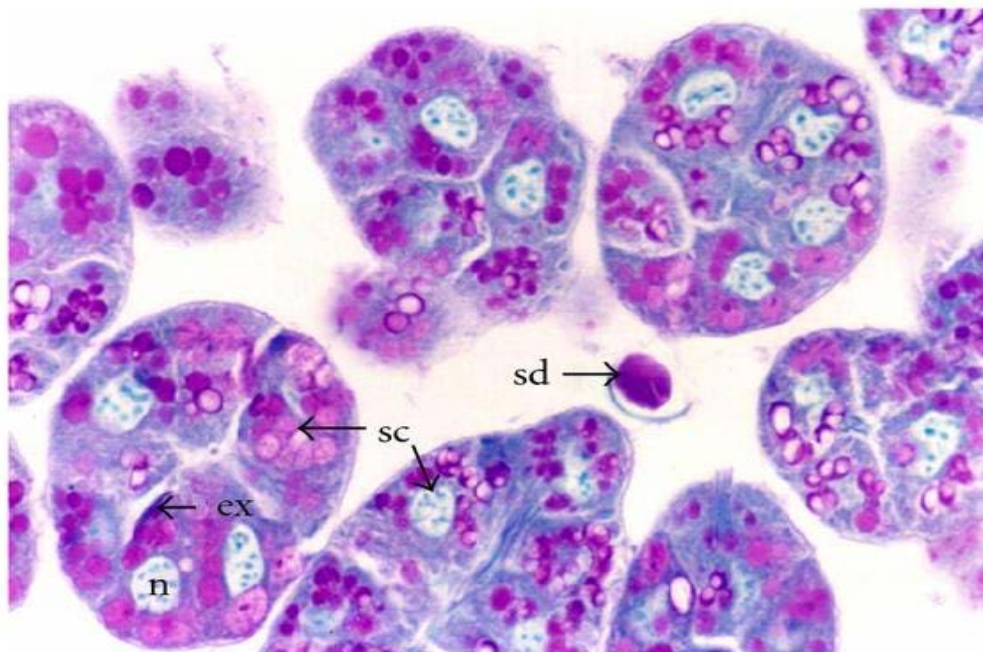
๒.๔ ต่อมไฮโปฟาริงค์ (Hypopharyngeal glands)

ต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) เป็นต่อมมีท่อ (exocrine glands) มีอยู่หนึ่งคู่ตั้งอยู่บนส่วนหัว เรียงตัวเป็นสายยาว ข้างตาประกอบ (compound eyes) ทั้งสองข้าง โครงสร้างต่อมมีลักษณะเป็นกระเปาะที่แตกแขนงซับซ้อน (compound alveolar glands) (รูปที่ ๒.๕-๒.๖) ทำหน้าที่ผลิตนมผึ้ง (royal jelly) ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารอาหารประเภทโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เพื่อเลี้ยงดูตัวอ่อนของผึ้งงาน (workers) อายุ 1-3 วันและนางพญา (queen) ตลอดอายุขัย (Brouwers, 1982) ถ้าต่อมเจริญดีจะสามารถผลิตนมผึ้งที่มีคุณภาพดี คือมีคุณค่าทางอาหารสูงโดยเฉพาะพวกโปรตีนและกรดอะมิโน ส่งผลให้ตัวอ่อนมีความแข็งแรงและเมื่อได้อาหารที่สมบูรณ์จะได้ผึ้งงานตัวเต็มวัยที่แข็งแรง ทำให้รังแข็งแรง (strong colony) นอกจากนี้จะทำให้นางพญาได้รับอาหารที่ดี มีคุณภาพสูง ทำให้นางพญามีสุขภาพดี วางไข่ได้มาก ผลิตเฟอโรโมนควบคุมรังได้ดี ทำให้ควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ภายในรังได้ปกติ (Graham, 1992; Otani *et al.*, 1985; Otis, 1991; Seeley, 1985)



รูปที่ ๒.๕ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ของต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal gland) ของผึ้งม้าม (*Apis andreniformis*) วรรณะผึ้งงาน (Suwannapong, *et al.*, 2011)

ต่อมไฮโปฟาริงจในผึ้งที่อายุน้อยจะยังไม่เจริญดีและจะเจริญเต็มที่เมื่อผึ้งเข้าสู่ระยะผึ้งพยาบาล (nurse bees) และยังคงเจริญดีในระยะเวลาทำงานระยะหาอาหารซึ่งเป็นกลุ่มผึ้งที่มีอายุมากกว่าผึ้งพยาบาล ต่อมาผึ้งจะเปลี่ยนไปทำหน้าที่ผลิตเอ็นไซม์อินเวอร์เทส (invertase) และกลูโคซิเดส (glucosidase) แทนซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตน้ำผึ้ง (honey) จากน้ำหวาน (nectar) จากดอกไม้ และต่อมาผึ้งจะเริ่มเสื่อมสลายเมื่อผึ้งเข้าสู่ระยะผึ้งทหาร (guardian bees) (Brouwers, 1982; Huang and Otis, 1989; Otani *et al.*, 1985; Simpson, 1968; Suwannapong *et al.*, 2007) และเนื่องจากผึ้งเป็นแมลงสังคมแท้ชั้นสูง (highly eusocial insect) ที่แบ่งหน้าที่การทำงานออกเป็นวรรณะต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ วรรณะผึ้งงาน (workers) ผึ้งนางพญา (queen) และผึ้งตัวผู้ (drones) ในขณะเดียวกันในกลุ่มของวรรณะผึ้งงานยังแบ่งหน้าที่การทำงานออกเป็นกลุ่มย่อยอีกได้แก่ ผึ้งทำความสะอาด (house cleansing bees) มีอายุตั้งแต่โผล่ออกมาจากเซลล์ของดักแด้ถึง 3 วัน ผึ้งพยาบาลมีอายุในช่วง 3-16 วัน มีหน้าที่ผลิตนมผึ้งเพื่อเลี้ยงดูตัวอ่อนและนางพญา ผึ้งงานกลุ่มหาอาหารมีอายุ 16-28 วัน มีหน้าที่หาอาหาร เช่นการเก็บเกสรจากดอกไม้เพื่อผลิตน้ำผึ้ง และกลุ่มผึ้งป้องกันรัง เป็นผึ้งที่มีอายุมากที่สุด (Seeley, 1985) ทำให้สนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางจุลกายวิภาค อัลตราสตรักเจอร์และอัตราร้อยละการติดเชื้อ ปริมาณโปรตีนของต่อมน้ำ ระหว่างผึ้งได้รับเชื้อของ *N. ceranae* ความเข้มข้นที่กำหนดระดับต่าง ๆ กับผึ้งปกติ ในผึ้งทั้ง 5 ชนิดที่มีในประเทศไทย

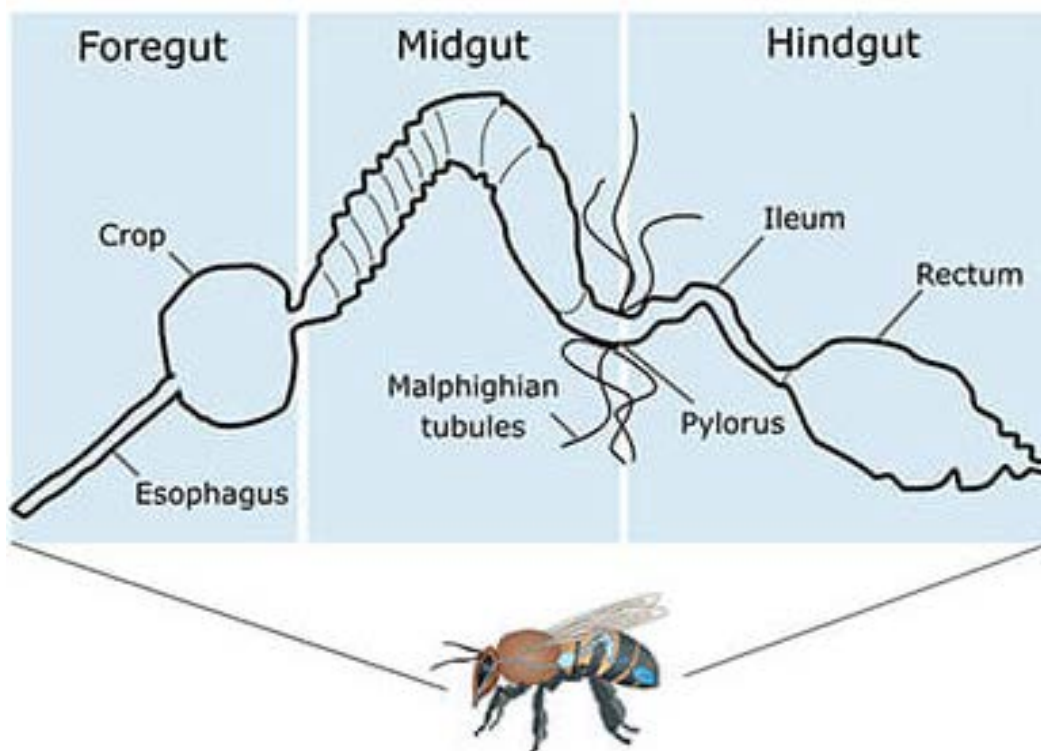


รูปที่ ๒.๖ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งโพรงย้อมด้วย PAS, ex: extracellular space; n: nucleus; sc: secretory unit; sd: secretory duct (Suwannapong *et al.*, 2010)

๒.๕ ทางเดินอาหารของผึ้ง (Honeybee gut)

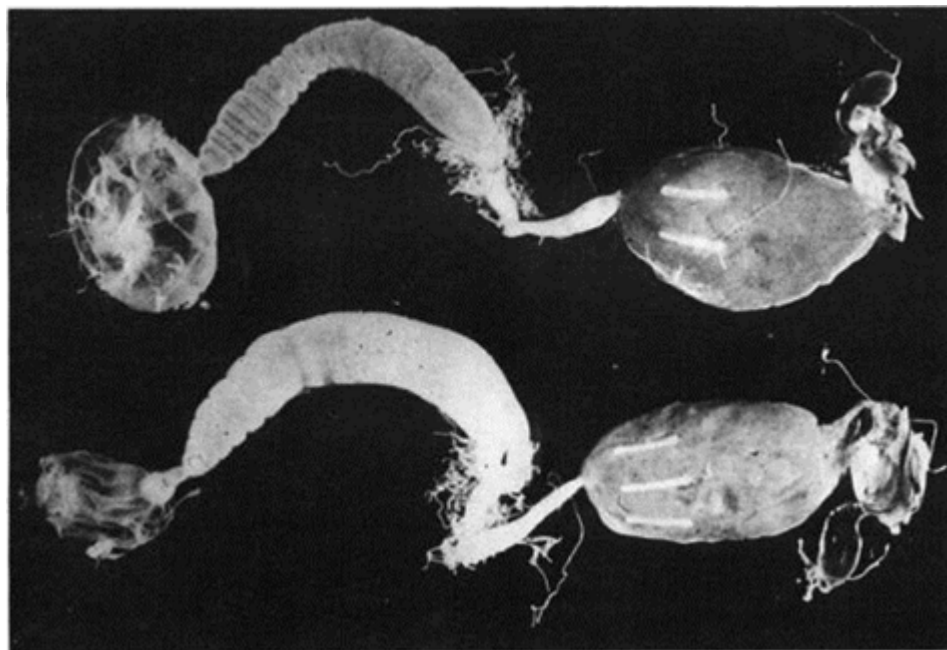
ผึ้งประกอบด้วยท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut) (รูปที่ ๒.๗) โดย

ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) เริ่มจากช่องปาก (cibarium) ถัดลงไปเป็นส่วนที่แคบเข้าและมีกล้ามเนื้อหนาเรียกบริเวณนี้ว่า คอหอย (pharynx) ซึ่งถัดจากคอหอยไปเป็นท่อทางยาวแคบเรียกหลอดอาหาร (esophagus) ซึ่งเริ่มจากส่วนนอกยาวไปจนถึงส่วนหน้าของช่องท้องเชื่อมติดต่อกับกระเพาะเก็บน้ำผึ้ง (honey crop) ที่มีการพัฒนาขยายใหญ่ พบในผึ้งงานเท่านั้น กระเพาะเก็บน้ำผึ้งยังทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำหวานจากดอกไม้ให้เป็นน้ำผึ้ง ได้ด้วยการปล่อยเอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) จากต่อมน้ำลาย มาเพื่อย่อย ซูโครส (sucrose) ให้ได้เป็นกลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) ขณะที่ผึ้งบินกลับรัง (สิริวัฒน์, 2532; Snodgrass, 1935) ทางเดินอาหารส่วนนี้เป็นทางผ่านของเชื้อ *Nosema* เพื่อทำลายเชื้อส่งต่อไปที่ทางเดินอาหารส่วนถัดไป ยังไม่มีรายงานการแพร่กระจายหรือความเสียหายของทางเดินอาหารส่วนนี้จากโรค *Nosema*



รูปที่ ๒.๗ ภาพวาดทางเดินอาหารของผึ้งแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut) (McAfee, 2018)

ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) เริ่มต้นจากส่วนโพรเวนตริกิวลัส (proventriculus) ซึ่งเชื่อมต่อจากกระเพาะเก็บน้ำผึ้งเป็นท่อสั้น และแคบ ท่อนี้ยื่นเข้าไปในกระเพาะเก็บน้ำหวานมีลิ้นเปิดปิด ประกอบด้วยเนื้อเยื่อรูปสามเหลี่ยม 4 อัน ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้มน้ำผึ้งในกระเพาะเก็บน้ำหวานไหลไปรวมกับอาหารในทางเดินอาหารส่วนกลางหรือเวนตริกิวลัส (ventriculus) และเชื่อว่าทำหน้าที่ในการแยกเกสรดอกไม้ออกจากน้ำหวานที่ผ่านมาจากกระเพาะเก็บน้ำผึ้ง ท่อเวนตริกิวลัสเป็นท่อนำอาหารที่มีขนาดยาวที่สุดของทางเดินอาหารเป็นท่อกลมยาวขนาดใหญ่ขดเป็นรูปตัว U (U-shape) (รูปที่ ๒.๘) อยู่ในส่วนท้องผนังชั้นในที่ติดอยู่กับช่องภายในเวนตริกิวลัสเคลือบด้วยเยื่อเมือก (gelatinous mass) ซึ่งมีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหารกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งเอนไซม์ถูกสร้างขึ้นมาจากเซลล์บุผิว (epithelial cells) และจะหลั่งออกมาจากเยื่อเมือกเมื่อมีอาหารอยู่ในเวนตริกิวลัส ทางเดินอาหารส่วนกลางทำหน้าที่ย่อยอาหารที่ยังไม่ได้ย่อยจากทางเดินอาหารส่วนต้น โดยเฉพาะอาหารประเภทโปรตีน ที่สำคัญคือพวกละอองเรณูหรือเกสรของดอกไม้ (pollen grains) และทำหน้าที่ดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้วทั้งหมดเข้าสู่เซลล์ต่างๆ ในทางเดินอาหารนี้ด้วย (สิริวัฒน์, 2532; Snodgrass, 1935) ผึ้งที่ได้รับเชื้อ *Nosema* จะทำให้เซลล์ของเยื่อบุผิวบริเวณนี้เสียหาย ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถย่อยพวกเรณูที่ผึ้งกินเข้าไปได้ ผลคือพบเกสรผึ้งหรือเรณูจำนวนมากในผึ้งที่ติดเชื้อ เมื่อติดเชื้อจำนวนมากจะทำให้ผึ้งท้องเสียและตายในที่สุดเนื่องจากเซลล์บริเวณนี้ถูกทำลายเสียหายหนัก (Anderson and Giaccon, 1992; Hassanein, 1953; Rinderer and Elliott, 1977; Higes et al., 2007a)



รูปที่ ๒.๘ ทางเดินอาหารของผึ้งที่ติดเชื้อ *Nosema* (ภาพล่าง) และไม่ติดเชื้อ (ภาพบน) (Various, 1991)

ทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut) เริ่มต้นจากลำไส้เล็ก (intestine) ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับ เวนทริคูลัสบริเวณที่เชื่อมต่อกันนี้จะมีท่อขับถ่าย มัลพีเจียลทิวบูล (Malpighian tubules) เป็นท่อเล็กๆ ยาวจำนวนมากทำหน้าที่ขับถ่ายของเสีย เช่น กรดยูริก (uric acid) และเกลือต่างๆ จากเลือดไปยังลำไส้ใหญ่ถัดจากลำไส้เล็กเป็นไส้ตรงหรือเรคตัม (rectum) ทั้งลำไส้เล็กและไส้ตรงทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหารและน้ำที่ย่อยแล้วเป็นครั้งสุดท้ายแล้วปล่อยกากอาหารที่เหลืออยู่ออกสู่ภายนอก ร่างกายทางทวารหนัก (anus) (สิริวัฒน์, 2532; Snodgrass, 1935) พบว่าผึ้งที่ได้รับเชื้อ *N. apis* ทางเดินอาหารส่วนนี้จะประกอบด้วยเกสร (pollen grains) ที่ไม่ถูกย่อยกระจายอยู่เต็มทางเดินอาหารส่วนท้ายนี้ ทำให้บวม โป่งออกและมีสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ ๒.๘) (de Graaf *et al.*, 1994; Higes *et al.*, 2006)

๒.๖ ผึ้งหลวง (*Apis dorsata* Fabricius, 1793)

ผึ้งหลวง *A. dorsata* มีขนาดของลำตัวและรังใหญ่ที่สุด บริเวณส่วนท้องมีสีดำสลับเหลืองอ่อน (รูปที่ ๒.๙) มักสร้างรังบนอาคาร (รูปที่ ๒.๑๐) หน้าผาสูง และต้นไม้สูงห่างจากพื้นดิน ประมาณ 30-60 เมตร (รูปที่ ๒.๑๑) ลักษณะวางรัง เป็นชั้นเดียวรูปครึ่งวงกลมไม่มีที่ปกปิด ขนาดรัง ประมาณ 0.5 x 1.2 เมตร (รูปที่ ๒.๑๒) นิยสร้ายกว่าผึ้งชนิดอื่นๆ พบแพร่กระจายอยู่ทุกประเทศ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขึ้นไปจนถึงประเทศจีนตอนใต้ พม่า ศรีลังกา อินเดีย ปากีสถาน นอกจากนี้ยังมีรายงานพบที่เกาะนิวกินี ประเทศออสเตรเลีย ในระบบนิเวศน์ผึ้งหลวงทำหน้าที่เป็นแมลงถ่ายละอองเกสรให้กับพืชดอกหลายชนิดเช่นลำไย ลิ้นจี่ พักทอง ทานตะวัน ทูเรียน พืชตระกูลถั่ว พืชตระกูลแตง ข้าวโพด มะพร้าว ยางพารา เป็นต้น (Suwannapong *et al.*, 2013)



รูปที่ ๒.๙ ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*, giant honey bees) (Naree, 2018)

นอกจากนี้ผึ้งหลวงยังให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ หลายชนิดเช่น น้ำผึ้ง ซึ่งเชื่อว่ามีคุณค่าสูง เมื่อเทียบกับน้ำผึ้งจากผึ้งชนิดอื่นเนื่องจากผึ้งหลวงเก็บน้ำหวานและเกสรจากดอกไม้จำนวนมากหลายชนิด ทำให้ประกอบด้วยเกสรที่มีความหลากหลายโดยเฉพาะดอกไม้ป่าซึ่งอาจมีพืชสมุนไพรปนในสัดส่วนที่มากกว่า เมื่อเทียบกับน้ำผึ้งจากผึ้งชนิดอื่น โดยเฉพาะน้ำผึ้งที่ได้จากการเก็บจาก monoculture crop เช่น สวนลำไย สวนลิ้นจี่อย่างเดียว เป็นต้น จึงเป็นที่ต้องการ ของมนุษย์ อนึ่ง ประชากรผึ้งหลวงมีจำนวนลดลงอย่างมากเนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น การตัดไม้ทำลายแหล่งทำรัง และแหล่งอาหารของผึ้ง การล่าจากมนุษย์ การใช้สารกำจัดศัตรูพืช รวมทั้งโรคผึ้ง โดยเฉพาะโรคโนซีมา (Nosemosis) เมื่อผึ้งหลวงได้รับเชื้อ *Nosema* ที่ระดับต่าง ๆ ที่กำหนด น่าจะส่งผลกระทบต่อการทำกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายอาจถึงขั้นร้ายแรง ที่น่าจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาในระดับลึกต่อไป ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนาการวิจัยเพื่อนำข้อมูลของความแตกต่างจากความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตมาใช้ประโยชน์ให้สูงสุด ไม่ว่าจะเป็นเรื่ององค์ความรู้ เกษตรกรรมและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง



รูปที่ ๒.๑๐ รังผึ้งหลวง (*Apis dorsata*, giant honey bees) ห้อยติดฝ้าเพดานของอาคารบ้านเรือน (Suwannapong, 2018)



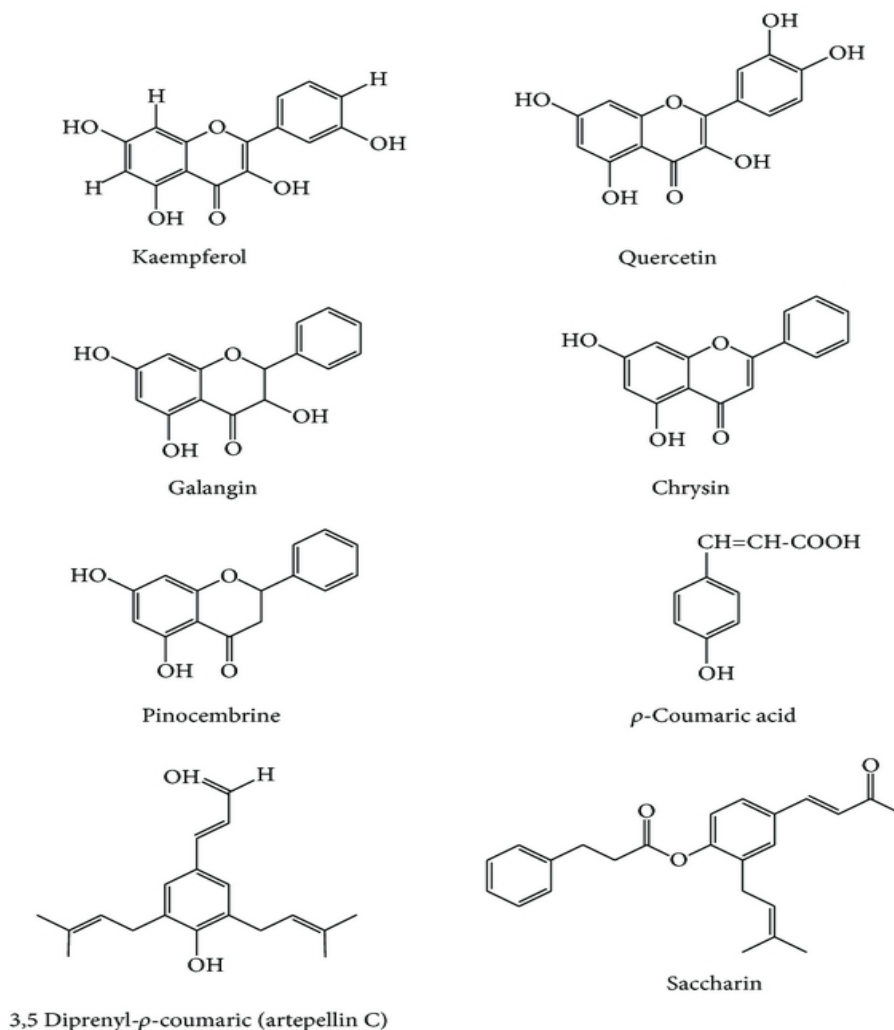
รูปที่ ๒.๑๑ รังผึ้งหลวง (*Apis dorsata*, giant honey bees) ห้อยติดกิ่งไม้ใหญ่บนต้นไม้สูง (Suwannapong, 2018)



รูปที่ ๒.๑๒ รังผึ้งหลวง (*Apis dorsata*, giant honey bees) ห้อยติดกับต้นมะพร้าว (Suwannapong, 2018)

๒.๗ พรอพอลิส (Propolis)

พรอพอลิส เป็นผลิตภัณฑ์ผึ้งที่ได้จากยางไม้ (resins) ประกอบด้วย ยางไม้ (50-70%), ไชผึ้ง (30-50%), เกสรผึ้ง (10%) และน้ำมันหอมระเหย (5-10%) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารต่าง ๆ มากกว่า 180 ชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและถิ่นที่อยู่อาศัย ตลอดจนฤดูกาลที่ผึ้งไปเก็บมา ผึ้งที่พบการสร้างพรอพอลิสได้แก่ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ผึ้งมีมเล็ก (*A. andreniformis*) ผึ้งมีม (*A. florea*) ผึ้งหลวง (*A. dorsata*) ส่วนผึ้งโพรงไม่พบการสร้างพรอพอลิส จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าผึ้งโพรงน่าจะมีวิธีการหรือผลิตสารที่ผสมอยู่ในไขผึ้งหรือผลิตภัณฑ์อื่นที่สามารถทำให้สามารถกำจัดเชื้อโรคหรือพวกแบคทีเรียที่เซลล์ของรวงรังแก่ตัวอ่อนได้ ดังนั้นการศึกษาอัตราการติดเชื้อ *Nosema* ของผึ้งโพรง นำข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง โดยเฉพาะการทดสอบการยับยั้งด้วย พรอพอลิส ในผึ้งชนิดนี้น่าจะให้ผลที่แตกต่างจากผึ้งชนิดอื่นในประเทศไทย รวมทั้งน่าจะให้ผลแตกต่างจากผึ้งต่างประเทศ ด้วยเช่นกัน พรอพอลิสประกอบด้วย phenolic compounds ที่สำคัญหลายชนิด เช่น quercetin , caffeic acid และ ferueic acid ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เอสเทอร์ (ester) กรดฟีโนอิก (phenolic acid) เทอร์ปีน (terpenes) กรดเบนโซอิก (benzoic acid) กรดซินนามิก (cinnamic acid) กรดคาฟอิก (caffeic acid) กรดซินนาปิก (sinapic acid) กรดไอโซเฟอรูลิก (isoferulic acid) และคริสซิน (chrysin) (Usami *et al.*, 2004) (รูปที่ ๒.๑๓) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอื่นๆ เช่น แมกนีเซียม ทองแดง แคลเซียม ธาตุเหล็ก สังกะสี และ วิตามินต่าง ๆ เช่น วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง วิตามินบีหก วิตามินซี และวิตามินอี เป็นต้น (Castaldo and Capasso, 2002) พรอพอลิสมีสีน้ำตาลจนถึงเกือบดำ หรือบางพื้นที่มีสีเขียวหรือขาว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยางไม้ และฤดูกาล ดังนั้นชนิดของสาร สัดส่วนของสารที่เป็นองค์ประกอบของพรอพอลิส จะแตกต่างกันในผึ้งแต่ละชนิดด้วยเช่นกัน (Bankova, Castro and Marcucci, 2000) ผึ้งใช้พรอพอลิส ในการอุดรอยต่อ (sealing) ต่าง ๆ และยึดรวงรัง บางทีจึงถูกเรียกว่า “กาวผึ้ง” (bee glue) ใช้ในการซ่อมแซมรัง หรือใช้อุดหน้าทางเข้ารัง เพื่อลดขนาดรูเปิดเข้ารังให้พอดีเพื่อสะดวกในการดูแล และป้องกันรังผึ้งจากศัตรูไม่ให้เข้ามาในรัง ตลอดจนรักษาความสะอาด และป้องกันการระบาดของเชื้อโรคร้ายในรังด้วย ใช้หุ้มซากของศัตรูที่มีขนาดใหญ่และตายอยู่ในรังไม่สามารถจะนำออกไปทิ้งนอกรังได้เพื่อไม่ให้เชื้อโรคเจริญและแพร่เข้ามาในรังได้ (รูปที่ ๒.๑๔) นอกจากนี้ยังใช้เคลือบรวงรังเพื่อให้แต่ละเซลล์ที่นางพญาจะวางไข่มีสภาพสะอาดปลอดจากเชื้อและปกป้องรังจากศัตรูไม่ให้เข้ามาในรัง (Russo, Longo & Vanella, 2008) สารสกัดจากพรอพอลิสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ได้มากกว่า 15 ชนิด จากการใช้พรอพอลิสทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการสามารถยับยั้งได้ดีเมื่อเทียบกับ คลอแรมเฟนิคอล(chloramphenicol) เซฟาดีน (cefradine) และ โพลีไมซิส บี (polymyxin B) (Castaldo and Capasso, 2002)



รูปที่ ๒.๑๓ โครงสร้างของสารประเภท flavonoids และ phenolics ที่พบใน green propolis ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) (Toreti, 2013)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของพรอพอลิสซึ่งสารประกอบในการต้านอนุมูลอิสระของ โดยเฉพาะสารในกลุ่ม flavonoids ที่พบในพรอพอลิสนั้นช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของวิตามินชนิดต่าง ๆ รวมถึงกรดไขมันที่จำเป็นบางชนิดอีกด้วย (Sroka, 2006) สารสกัดจากพรอพอลิสมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยสารที่มีบทบาทสำคัญในพรอพอลิสที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ มะเร็งคือ quercetin, caffeic acid, cleerodane diterpendoid โดย cleerodane และ diterpendoid มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมากที่สุด สารอพิจินิน (apigenin) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีอยู่ในน้ำผึ้ง และพรอพอลิสสามารถยับยั้งเนื้องอกได้ (Munoz *et al.*, 2007; Saforcin, 2007; Yaghoubi *et al.*, 2007)



รูปที่ ๒.๑๔ พรอพอลิสนขอบของรังของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) (Lee, 2011)

จากรายงานการใช้สารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง (*Trigona apicalis*) ด้วยเอธานอล ใน ผึ้งมัมและผึ้งโพรง พบว่าสารสกัดดังกล่าวทำให้ผึ้งงานของผึ้งทั้งสองชนิดที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* ระดับ 80,000 สปอร์ต่อตัว มีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น มีอัตราการติดเชื้อในเซลล์ลดลงมีปริมาณ โปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Suwannapong *et al.*, 2012, 2014)

งานวิจัยในครั้งนี้สนใจนำเอาพรอพอลิสของผึ้งในประเทศไทยมาเพื่อใช้ในการยับยั้งการ เจริญของเชื้อ *N. ceranae* ในผึ้งหลวง เนื่องจากในพรอพอลิสมีสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราได้หลายชนิด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าพรอพอลิสของชันโรงอาจสามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อ *N. ceranae* ในผึ้งหลวง ที่ได้เชื้อ *N. ceranae* ในปริมาณต่าง ๆ ที่สูงขึ้น

บทที่ ๓
วิธีดำเนินการวิจัย
(Materials and Methods)

๓.๑ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี (Materials, Chemicals)

๓.๑.๑ อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Rotary microtome; Leica, Germany)
- กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope; Nikon, Japan)
- เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer; Heidolph, Germany)
- เครื่องผสมสาร (Vortex; Scientific Industries, USA)
- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer; Shimadzu, Australia)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator; Memmert, Germany)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance; Sartorius analytic, Germany)
- อ่างน้ำร้อน (Water bath; Memmert, Germany)
- ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer; BOECO, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- หลอดแคพิลลารี (Capillary tube; BIOMED GROUP, Thailand)
- สไลด์ (Slide; Sail brand, China)
- กระจกปิดสไลด์ (Cover glass; DURAN Group, Germany)
- ปากคีบ (Forceps; Dumont, Switzerland)
- ปีกเกอร์ (Beaker; Pyrex, Germany)
- ใบมีดสำหรับตัดเนื้อเยื่อ (Microtome blade; Feather, Japan)
- หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ (Microcentrifuge tube; QSP, USA)
- ไมโครปิเปต (Micropipette; Gilson, France)
- ปิเปตทิป (Micropipette tips BIOLOGIX GROUP, USA)
- ขวดเก็บตัวอย่าง (Vials)
- กรงเลี้ยงผึ้ง (Bee cages size 80x130x135 mm²)
- กระดาษกรอง (Filter paper; Whatmann Internation Ltd., England)
- ภาชนะย้อมสี (Staining jars)
- พาราฟิล์ม (Parafilm; EMS, USA)

- ช้อนตักสาร (Spatula)
- การกระดาษชั่งสาร (Weighting papers)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermocycler, TProfessional Biometra, Germany)
- ลูกแก้ว (Glass beads)

๓.๑.๒ สารเคมีสำหรับศึกษาไตกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM)

- ฟอรัมาลดีไฮด์ (Formaldehyde; Univar, Australis)
- เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol; J.T Baker, Malaysia)
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; Merk, Germany)
- กรดอะซิติก (Acetic acid; Analar, England)
- เบสสิคฟุชซิน (Basic fuchsin; Labchem, Australia)
- ไลท์กรีน (Light green; Fluka, Switzerland)
- กรดพีริออดิก (Periodic acid; Merck Chemical)
- เพอร์มัท (Permout; Fisher Chemical, USA)
- ไชลีน (Xylene; Panreac, England)
- พาราพลาสติก (Paraplast; Oxford, USA)
- โซเดียมไบซัลไฟต์ (Sodium bisulfite)
- น้ำกลั่น (Distilled water)

๓.๑.๓ สารเคมีสำหรับวัดโปรตีนโดยวิธี Bradford Protein Assay

- โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; Sigma Chemical Company, USA)
- คูแมซีบลู (Coomassie blue; Sigma Chemical Company, USA)
- กลีเซอริน (Glycerin; Ajax, Australia)
- เมทานอล (Methanol; Sigma Chemical Company, USA)
- กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid; Merck KGaA, Germany)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; NSW 2147, Australia)
- น้ำกลั่น (Distilled water)

๓.๑.๔ สารเคมีสำหรับวัดระดับน้ำตาลทรีฮาโลส Trehalose Assay

- แอนโทรน (Anthrone; HIMEDIA, India)
- กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid; 95-97%, Merck, Germany)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; Assay 99%, UNIVAR, USA)
- น้ำกลั่น (Distilled water)

๓.๑.๕ สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ ชนิดของเชื้อโนซีมาโดยวิธี qPCR

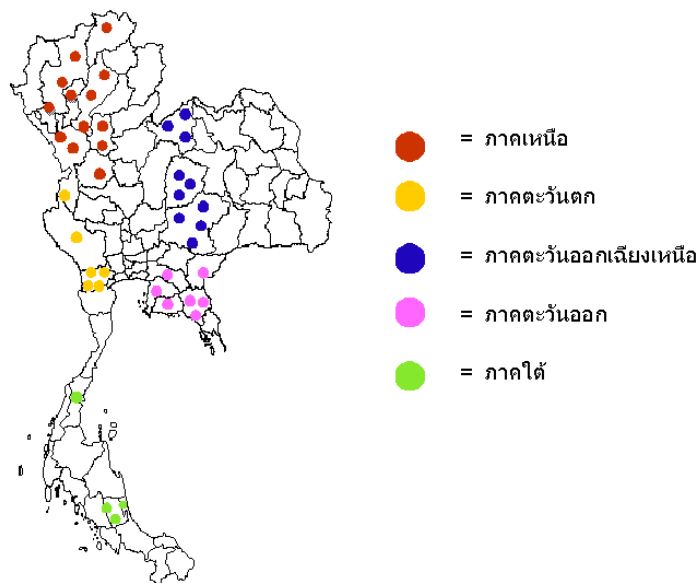
- สารละลาย Chelex ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (5% Chelex solution, Qiagen, Germany)
- เอทานอล (Ethanol, Qiagen, Germany)
- ไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen, Qiagen, Germany)
- เอนไซม์โปรตีนเนสเค (Proteinase K, Qiagen, Germany)
- สารละลาย RNase A ความเข้มข้น 100 mg/ml (100 mg/ml RNase A stock solution, Qiagen, Germany)
- พอลิเมอเรส GoTaq® (0.5 U of GoTaq® polymerase, Promega, USA)
- นิวคลีโอไทด์ (dNTP, Promega, USA)
- บัฟเฟอร์ AP1 (Buffer AP1, Qiagen, Germany)
- บัฟเฟอร์ AP2 (Buffer AP2, Qiagen, Germany)
- บัฟเฟอร์ AP3/E (Buffer AP3/E, Qiagen, Germany)
- บัฟเฟอร์ AE (Buffer AE, Qiagen, Germany)
- บัฟเฟอร์ AW (Buffer AW, Qiagen, Germany)
- บัฟเฟอร์ปฏิกิริยา GoTaq® (2x GoTaq® reaction buffer, Promega, USA)
- ชุด DNeasy Plant Mini Kit (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Germany)
- ชุด QIAshredder Mini spin column (QIAshredder Mini spin column (lilac), Qiagen, Germany)
- ชุด DNeasy Mini spin column (DNeasy Mini spin column, Qiagen, Germany)
- ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด Mnapis-F (Mnapis-F forward primer:
5'-GCATGTCTTTGACGACTATG-3')
- ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด Mnbombi-F (Mnbombi-F forward primer:
5'-TTTATTTTATGTRYACMGAG-3')
- ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด Mnceranae-F (Mnceranae-F forward primer:
5'- CGTTAAAGTGTAGATAAGATGTT-3')
- ไพรเมอร์รีเวิร์ส Muniv-R (Muniv-R reverse primer: 5'-
GACTTAGTAGCCGTCTCTC-3')

๓.๒ ตัวอย่างที่ใช้ทดลอง (Specimens)

- ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) วรรณะผึ้งงาน (workers)
- สปอร์ *Nosema ceranae*

๓.๓ บริเวณที่ศึกษา (Study site)

๓.๓.๑ เก็บตัวอย่างผึ้งหลวงตัวเต็มวัยจากบริเวณ ต่างๆ ทั่วประเทศไทย ดังแสดงในรูปที่ ๓.๑ และตารางที่ ๓.๑



รูปที่ ๓.๑ บริเวณที่เก็บตัวอย่างผึ้งหลวงเพื่อตรวจการติดเชื้อ *Nosema*

ตารางที่ ๓.๑ แสดงพิกัดภูมิศาสตร์ บริเวณที่เก็บตัวอย่างผึ้งหลวงเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ

Nosema spp.

กลุ่มตัวอย่าง ผึ้งหลวง	ภูมิภาค ของประเทศไทย	พิกัดภูมิศาสตร์	
		Latitude	Longitude
AD _N 1- AD _N 36	ภาคเหนือ	17.974133-20.360313	99.587304-99.923476
AD _W 1- AD _W 18	ภาคตะวันตก	13.539033-14.859500	99.328372-98.620979
AD _{NE} 1- AD _{NE} 30	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	14.419667-17.699735	98.852304-101.676645
AD _E 1- AD _E 21	ภาคตะวันออก	13.283178-12.736600	100.926633-102.217006
AD _S 1- AD _S 14	ภาคใต้	78.049007-76.614614	101.887999-100.081209

๓.๓.๒ การศึกษาทดลองเกี่ยวกับการติดเชื้อ (Experimental infection) *N. ceranae* ใน ผึ้งหลวง ทำการศึกษาทดลอง ณ ห้องทดลองของภาควิชาชีววิทยา ห้อง BS 3108 อาคาร วิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

๓.๓.๓ การวิเคราะห์ชนิดของเชื้อโนซีมา โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล (Molecular identification of Nosema species) ณ ห้องปฏิบัติการ Martin-Luther-University, Institute of Biology/Zoology, Hoher Weg 8, Halle (Saale), Germany ร่วมกับ Professor Dr. Robert J. Paxton, และที่ Department of Entomology, University of Hamburg, Hamburg, Germany (ร่วมกับ Professor Dr. Martin Husemann)

๓.๔ วิธีการดำเนินการวิจัย

๓.๔.๑ การศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ *Nosema ceranae* และการเพิ่มจำนวนเชื้อในห้องปฏิบัติการ

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๑.๑ สุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งงานระยะตัวเต็มวัยของผึ้งหลวง (*A. dorsata*) จากภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศ

๓.๔.๑.๒ สุ่มเก็บผึ้งงานจำนวน 50 ตัว/รัง/ชนิด/บริเวณ

๓.๔.๑.๓ นำผึ้งตัวอย่างใส่ลงในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70% (v/v) ที่บรรจุอยู่ในขวดที่มีฝาปิดสนิท เพื่อนำกลับไปตรวจนับหาเชื้อละอองน้ำจำนวนสปอร์ในห้องปฏิบัติการ (โดยใช้ Hemocytometer)

๓.๔.๑.๔ นำตัวอย่างผึ้งมาตัดเอาทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ออก โดยใช้ปากคีบปลายแหลมขนาดเล็ก

๓.๔.๑.๕ นำทางเดินอาหารส่วนกลางใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml/ทางเดินอาหารของผึ้ง 20 ตัว ที่ภายในบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตรแล้วบดด้วย homogenizer ขนาดเล็ก

๓.๔.๑.๖ นำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 g เป็นเวลา 10 นาที

๓.๔.๑.๗ ใช้ Pasture pipette ดูดเอาส่วนที่เป็นตะกอนสีขาวออกมาแล้วใส่ลงใน micro-centrifuge tube ขนาด 1.5 ml อีกอันหนึ่งที่ภายในบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร

๓.๔.๑.๘ นำเอา micro-centrifuge tube ในข้อ ๓.๔.๑.๗ ไป vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนับเซลล์ ด้วยเครื่อง Hemocytometer (ในกรณีที่พบสปอร์ของโนซีมา)

๓.๔.๑.๙ บันทึกจำนวนสปอร์ต่อ 1 ไมโครลิตร

๓.๔.๑.๑๐ ทำเช่นเดียวกันในฝั้่งทุกชนิด และทุกบริเวณศึกษา จนได้จำนวนสปอร์ เพียงพอต่อความต้องการ

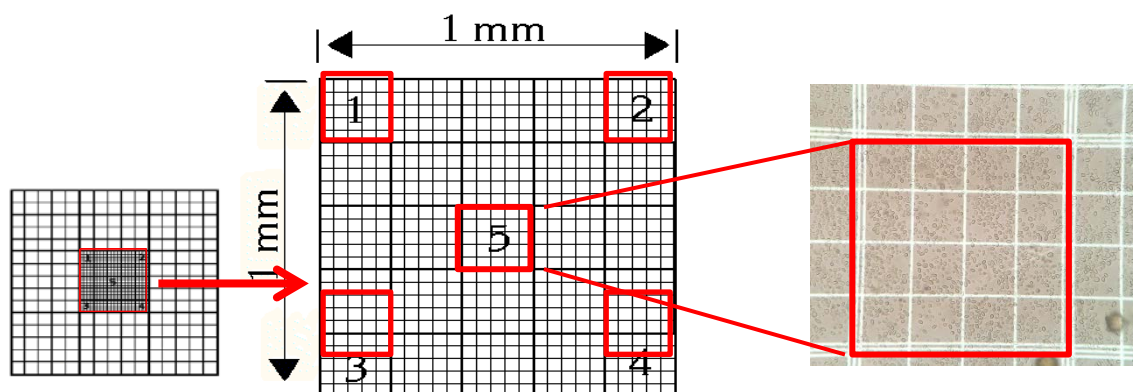
๓.๔.๑.๑๑ นำสปอร์ที่ได้ไปป้อนให้กับฝั้่งงานของฝั้่งพันธ์อายุ 1 วัน โดยใช้ 0.5×10^6 สปอร์ต่อฝั้่ง 1 ตัว แล้วเลี้ยงใน incubator ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % นำฝั้่งที่ตายในแต่ละวันมาตรวจนับ โนซีมาเพื่อเก็บไว้สำหรับการทดลองต่อไป

๓.๔.๒ การนับจำนวนสปอร์ *Nosema ceranae* (Spore Counting)

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๒.๑ ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ที่ผสมในน้ำกลั่นจากหลอดไมโครเซ็นทรีฟวัก์บรรจุลงใน ฮีโมไซโตมิเตอร์ปริมาตร 6.8 μl ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

๓.๔.๒.๒ นับจำนวนสปอร์ *N. ceranae* ในช่อง 5 ช่อง (1, 1) (1, 5) (3, 3) (5, 1) (5, 5) จากทั้งหมด 25 ช่องของฮีโมไซโตมิเตอร์ ดังภาพที่ ๓.๒



รูปที่ ๓.๒ การนับจำนวนสปอร์ *N. ceranae* โดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer)

นับจำนวนสปอร์และนำไปคำนวณจำนวนสปอร์/ปริมาตร ได้ดังนี้
จากปริมาตรของเหลวในฮีโมไซโตมิเตอร์ เท่ากับ ความกว้าง x ความยาว x ความลึก

เท่ากับ 1 มม. X 1 มม. X 0.1 มม.

เท่ากับ 0.1 ลบ.มม. หรือ 0.0001 ลบ.ซม.

เท่ากับ 10^{-4} มล.

ดังนั้น จำนวนเซลล์ (Cell count) = $x \text{ cell} \times (25/5) \text{ ช่อง} \times 10^4 \text{ เซลล์/มิลลิลิตร}$

หรือ $x \text{ cell} \times (25/5) \text{ ช่อง} \times 10 \text{ เซลล์/ไมโครลิตร}$

๓.๔.๓ ศึกษาอัตราการตาย (Mortality) ของผึ้งงานของผึ้งหลวง หลังจากที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* ระดับต่าง ๆ

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๓.๑ นำคอนผึ้งหลวงที่ประกอบด้วยดักแด้ที่กำลังจะออกมาเป็นตัวเต็มวัย จากรังของบริเวณที่พบในสถานที่ต่าง ๆ ใส่ในกรงผึ้งแล้วนำมาใส่ใน incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % เพื่อให้ผึ้งฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย โดยใช้เวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง

๓.๔.๓.๒ นำผึ้งตัวเต็มวัยที่ฟักออกมา (ซึ่งถือว่าเป็นผึ้งงานอายุ 1 วัน) จาก incubator

๓.๔.๓.๓ แบ่งผึ้งออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มละ 50 ตัว/รัง ชนิดละ 3 รัง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ปริมาตร 2 ไมโครลิตร/ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซิมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซิมา ความเข้มข้น ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ไม่ให้สารละลายไคโตซาน

กลุ่มที่ 4 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซิมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm

๓.๔.๓.๔ นำผึ้งในข้อ ๓.๔.๓.๓ ใส่ในกรงเลี้ยงขนาดเล็ก (Bee cage) ขนาด $80 \times 135 \times 130 \text{ mm}^3$ (ผาด้านหน้ามีแผ่นเลื่อนเพื่อสะดวกต่อการนำเอาผึ้งออก ผังด้านหลังในกรงบรรจุ queen pheromone ที่ยึดติดกับกระดาษแข็งยึดไว้แน่นกับกรง) โดยแยกใส่กรงละ 50 ตัว/treatment ผึ้งแต่ละกลุ่มในแต่ละกรงจะให้อาหารโดยใช้ สารละลายซูโครส 50% เกสรผสม สารละลายน้ำตาลซูโครส 50% และน้ำกลั่น

๓.๔.๓.๕ นำกรงผึ้งทั้งหมด ใส่ใน Incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 50%

๓.๔.๓.๖ ตรวจสอบอัตราการตายของผึ้งแต่ละกลุ่มทุกวัน จนกระทั่งผึ้งตายหมด

๓.๔.๓.๗ ตรวจสอบเชื้อและนับจำนวนสปอร์ของผึ้งแต่ละตัวของกลุ่มที่ให้เชื้อโดยใช้วิธีการเดียวกันกับข้างต้น

๓.๔.๓.๘ บันทึกข้อมูลเพื่อนำวิเคราะห์ ค่าทางสถิติต่อไป

๓.๔.๔ ศึกษาอัตราการติดเชื้อ *Nosema ceranae* โดยศึกษาร้อยละระหว่างเซลล์ที่มีสปอร์ (infected cells) กับเซลล์ที่ไม่มีสปอร์ (non infected cells) ของเซลล์เยื่อทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานผึ้งหลวง

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๔.๑ นำคอนผึ้งหลวงที่ประกอบด้วยดักแด้ที่กำลังจะออกมาเป็นตัวเต็มวัย จากรังของบริเวณที่พบในสถานที่ต่าง ๆ ใสในกรงผึ้งแล้วนำมาใส่ใน incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % เพื่อให้ผึ้งฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย โดยใช้เวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง

๓.๔.๔.๒ นำผึ้งตัวเต็มวัยที่ฟักออกมา (ซึ่งถือว่าเป็นผึ้งงานอายุ 1 วัน) จาก incubator

๓.๔.๔.๓ แบ่งผึ้งออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มละ 50 ตัว/รัง ชนิดละ 3 รัง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ปริมาตร 2 ไมโครลิตร/ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น ความเข้มข้น 1.0×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ไม่ให้สารละลายไคโตซาน

กลุ่มที่ 4 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm

๓.๔.๔.๔ นำผึ้งในข้อ ๓.๔.๔.๓ ใสในกรงเลี้ยงขนาดเล็ก (Bee cage) ขนาด $80 \times 135 \times 130 \text{ mm}^3$ (ผาด้านหน้ามีแผ่นเลื่อนเพื่อสะดวกต่อการนำเอาผึ้งออก ผนังด้านหลังในกรงบรรจุ queen pheromone ที่ยึดติดกับกระดาษแข็งยึดไว้แน่นกับกรง) โดยแยกใส่กรงละ 50 ตัว/treatment ผึ้งแต่ละกลุ่มในแต่ละกรงจะให้อาหารโดยใช้ สารละลายซูโครส 50% เกสรผสม สารละลายน้ำตาลซูโครส 50% และน้ำกลั่น

๓.๔.๔.๕ นำกรงผึ้งทั้งหมด ใสใน Incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 50%

๓.๔.๔.๖ นำผึ้งแต่ละกรง ในวันที่ 10 และ วันที่ 15 มา กรงละ 10 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว มาดึงเอาทางเดินอาหารส่วนกลางออกมาเพื่อไปเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

๓.๔.๔.๗ นับจำนวนเซลล์ที่พบสปอร์ในหนึ่งร้อยเซลล์ เพื่อหาร้อยละของการติดเชื้อภายในเซลล์ (infection ratio) และศึกษาโครงสร้างของเซลล์

๓.๔.๔.๘ นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ

๓.๔.๕ ขั้นตอนสำหรับการเตรียมการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM)
(Protocol for studying by light microscopy)

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๕.๑ นำตัวอย่างฝังแต่ละกลุ่ม มาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Paraffin technique (Modified Humason, 1972) ดังนี้

นำตัวอย่างทางเดินอาหารใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง (Vials) แช่ในน้ำยารักษาสภาพ Bouin's fluid solution

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ล้างด้วย 70% ethanol 3 ครั้ง จนสีเหลืองจางลง



ดึงน้ำออกโดยแช่ตัวอย่างใน ethanol 70%, 90%, 90% และ 95% อย่างละ 6 ชั่วโมง



นำตัวอย่างแช่ใน n-butyl 1 ชั่วโมง



นำตัวอย่างแช่ใน xylene : paraplast ในอัตราส่วน

2 : 1

1 : 1

1 : 2

ชั้นละ 1 ชั่วโมงตามลำดับในตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 58°C



แช่ตัวอย่างใน pure paraplast 1 ชั่วโมง



ฝังตัวอย่างใน pure paraplast แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

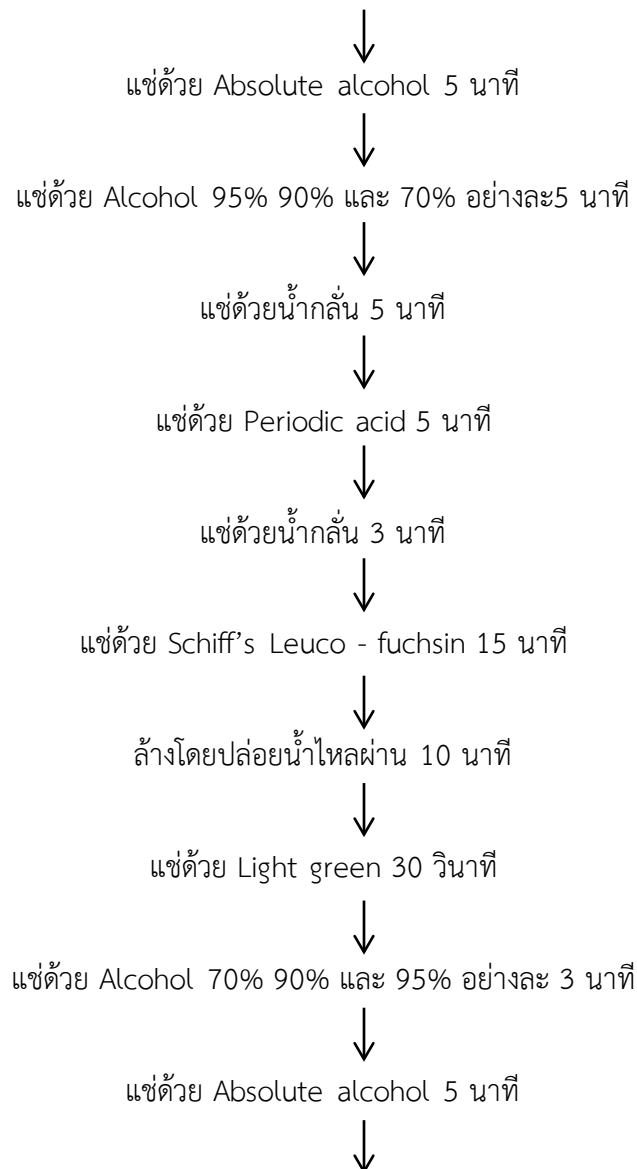
๓.๔.๕.๒ ตัดตัวอย่างด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Rotary microtome) มีความหนา 6 μm แล้วติดตัวอย่างลงบนสไลด์ย้อมด้วยสี Periodic acid – Schiff's reagent (PAS)

๓.๔.๕.๓ ทำการศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง นับจำนวนเซลล์ที่ติดเชื่อกับไม่ติดเชื่อกัน และคำนวณร้อยละของเซลล์ที่ติดเชื่อกันและไม่ติดเชื่อกัน บันทึกผลโดยการถ่ายรูปลักษณะของเนื้อเยื่อที่พบ

๓.๔.๖ การย้อมสีทางเดินอาหารส่วนกลางของมด (Midgut) ด้วยสี Periodic acid – Schiff's reagent (PAS)

วิธีปฏิบัติ

แช่สไลด์ใน Staining jar ที่มี Xylene ซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที



↓
 แช่ด้วย Xylene ซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
 ↓
 แล้วหยด Permout ลงบนสไลด์เพื่อให้สไลด์ติดถาวร

๓.๔.๗ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและอัตราการติดเชื้อ *Nosema ceranae*

ศึกษาร้อยละระหว่างเซลล์ที่มีสปอร์ (infected cells) กับเซลล์ที่ไม่มีสปอร์ (non infected cells) ของเซลล์สร้างสาร (secretory cells) ของต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) ของผึ้งงานกลุ่มผึ้งพยาบาล (nurse bees)

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๗.๑ นำคอนผึ้งหลวงที่ประกอบด้วยดักแด้ที่กำลังจะออกมาเป็นตัวเต็มวัย จากรังของบริเวณที่พบในสถานที่ต่าง ๆ ใส่ในกรงผึ้งแล้วนำมาใส่ใน incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % เพื่อให้ผึ้งฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย โดยใช้เวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง

๓.๔.๗.๒ นำผึ้งตัวเต็มวัยที่ฟักออกมา (ซึ่งถือว่าเป็นผึ้งงานอายุ 1 วัน) จาก incubator

๓.๔.๗.๓ แบ่งผึ้งออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มละ 50 ตัว/รัง ชนิดละ 3 รัง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ปริมาตร 2 ไมโครลิตร / ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น ความเข้มข้น 1.0×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ไม่ให้สารละลายไคโตซาน

กลุ่มที่ 4 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm 50

๓.๔.๗.๔ นำผึ้งในข้อ ๓.๔.๗.๓ ใส่ในกรงเลี้ยงขนาดเล็ก (Bee cage) ขนาด $80 \times 135 \times 130 \text{ mm}^3$ (ผาด้านหน้ามีแผ่นเลื่อนเพื่อสะดวกต่อการนำเอาผึ้งออก ผังด้านหลังในกรงบรรจุ queen pheromone ที่ยึดติดกับกระดาษแข็งยึดไว้แน่นกับกรง) โดยแยกใส่กรงละ 50 ตัว/treatment ผึ้งแต่ละกลุ่มในแต่ละกรงจะให้อาหารโดยใช้ สารละลายซูโครส 50% เกสรผสม สารละลายน้ำตาลซูโครส 50% และน้ำกลั่น

๓.๔.๗.๕ นำกรงผึ้งทั้งหมด ใส่ใน Incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 50%

๓.๔.๗.๖ นำผึ้งแต่ละกรง ในวันที่ 10 และ วันที่ 15 มา กรงละ 10 ตัว โดยแบ่ง ออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว มาตั้งเอาทางเดินอาหารส่วนกลางออกมาเพื่อไปเตรียมตัวอย่างเพื่อ ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

๓.๔.๗.๗ นับจำนวนเซลล์ที่พบสปอร์ในหนึ่งร้อยเซลล์ เพื่อหาร้อยละของการติดเชื้อ ภายในเซลล์ (Infection ratio) รวมทั้งศึกษาโครงสร้างของเซลล์ และนำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ

๓.๔.๘ ศึกษาผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่อระดับน้ำตาล Trehalose ใน Haemolymph ของผึ้งหลวง

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๘.๑ นำคอนผึ้งหลวงที่ประกอบด้วยดักแด้ที่กำลังจะออกมาเป็นตัวเต็มวัย จากรัง ของบริเวณที่พบในสถานที่ต่าง ๆ ใส่ในกรงผึ้งแล้วนำมาใส่ใน incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 องศา เซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % เพื่อให้ผึ้งฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย โดยใช้เวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง

๓.๔.๘.๒ นำผึ้งตัวเต็มวัยที่ฟักออกมา (ซึ่งถือว่าเป็นผึ้งงานอายุ 1 วัน) จาก incubator

๓.๔.๘.๓ แบ่งผึ้งออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มละ 50 ตัว/รัง ชนิดละ 3 รัง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ปริมาตร 2 ไมโครลิตร/ ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น ความเข้มข้น 1.0×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ไม่ให้สารละลายไคโตซาน

กลุ่มที่ 4 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm

๓.๔.๘.๔ นำผึ้งในข้อ **๓.๔.๘.๓** ใส่ในกรงเลี้ยงขนาดเล็ก ขนาด $80 \times 135 \times 130 \text{ mm}^3$ (ผาด้านหน้ามีแผ่นเลื่อนเพื่อสะดวกต่อการนำเอาผึ้งออก ผ่นด้านหลังในกรงบรรจุ Queen pheromone ที่ยึดติดกับกระดาษแข็งยึดไว้แน่นกับกรง) โดยแยกใส่กรงละ 50 ตัว/treatment ผึ้งแต่ละกลุ่มในแต่ละกรงจะให้อาหารโดยใช้ สารละลายซูโครส 50% เกสรผสมสารละลายน้ำตาลซูโครส 50% และน้ำกลั่น

๓.๔.๘.๕ นำกรงฝิ่งทั้งหมด ใส่ใน Incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 50%

๓.๔.๘.๖ นำฝิ่งแต่ละกรง ในวันที่ 3 6 10 และ วันที่ 14 มา กรงละ 10 ตัว เพื่อดูเอา Haemolymph ให้ได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตรต่อกลุ่ม เพื่อไปเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาระดับของน้ำตาล Trehalose ใน Haemolymph (Suwannapong et al., 2014, under review in journal of Plos one)

๓.๔.๘.๗ นับจำนวนเซลล์ที่พบสปอร์ในหนึ่งร้อยเซลล์ เพื่อหาร้อยละของการติดเชื้อภายในเซลล์ (infection ratio) และศึกษาโครงสร้างของเซลล์

๓.๔.๘.๘ นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ

๓.๔.๙ การวัดระดับน้ำตาลทรีฮาโลส (Trehalose Assay)

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๙.๑ นำฝิ่งหลวงกลุ่มติดเชื้อและกลุ่มควบคุมในวันที่ 6 10 และ 14 ออกจากกรงกรงละ 10 ตัว จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °c เวลา 5 นาที แล้วนำฝิ่งมาเก็บตัวอย่าง Haemolymph

๓.๔.๙.๒ ใช้หลอดแคพิลลารีดูด Haemolymph 5 µl ต่อตัวแล้วใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย normal saline 45 µl

๓.๔.๙.๓ เติมสารละลาย Anthrone 2.9 ml แล้วนำไปปั่นด้วย Vortexer 30 วินาที ก่อนนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดทิ้งไว้ 15 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็นทิ้งไว้ 20 นาที

๓.๔.๙.๔ อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 620 nm และสร้างกราฟมาตรฐานด้วยสารละลาย Trehalose ที่เตรียมขึ้น แล้วนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม PAST ต่อไป

๓.๔.๑๐ ศึกษาผลเชื้อ *Nosema ceranae* ต่อปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของฝิ่งหลวง

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๑๐.๑ นำคอนฝิ่งหลวงที่ประกอบด้วยดักแด้ที่กำลังจะออกมาเป็นตัวเต็มวัย จากรังของบริเวณที่พบในสถานที่ต่าง ๆ ใส่ในกรงฝิ่งแล้วนำมาใส่ใน incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % เพื่อให้ฝิ่งฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย โดยใช้เวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง

๓.๔.๑๐.๒ นำผึ้งตัวเต็มวัยที่ฟักออกมา (ซึ่งถือว่าเป็นผึ้งงานอายุ 1 วัน) จาก incubator

๓.๔.๑๐.๓ แบ่งผึ้งออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มละ 50 ตัว/รัง ชนิดละ 3 รัง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ปริมาตร 2 ไมโครลิตร/ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น ความเข้มข้น 1.0×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ไม่ให้สารละลายไคโตซาน

กลุ่มที่ 4 ป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมา ความเข้มข้น 0.5×10^6 สปอร์ / 2 ไมโครลิตร (ป้อนปริมาตร 2 ไมโครลิตร) / ผึ้ง 1 ตัว ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm

๓.๔.๑๐.๔ นำผึ้งในข้อ **๓.๔.๑๐.๓** ใส่ในกรงเลี้ยงขนาด $80 \times 135 \times 130 \text{ mm}^3$ (ผาด้านหน้ามีแผ่นเลื่อนเพื่อสะดวกต่อการนำเอาผึ้งออก ผ่นังด้านหลังในกรงบรรจุ queen pheromone ที่ยึดติดกับกระดาษแข็งยึดไว้แน่นกับกรง) โดยแยกใส่กรงละ 50 ตัว/treatment ผึ้งแต่ละกลุ่มในแต่ละกรงจะให้อาหารโดยใช้ สารละลายซูโครส 50% เกสรผสมสารละลายน้ำตาลซูโครส 50% และน้ำกลั่น

๓.๔.๑๐.๕ นำกรงผึ้งทั้งหมด ใส่ใน Incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34°C ความชื้นสัมพัทธ์ 50%

๓.๔.๑๐.๖ นำผึ้งแต่ละกรง ในวันที่ 3 6 10 และ วันที่ 14 มา กรงละ 10 ตัว เพื่อนำมาผ่าตัดเอาต่อมไฮโปฟาริงค์ออกและนำไปวัดค่า โปรตีนโดยใช้ Bradford standard assay (Bradford, 1976)

๓.๔.๑๐.๗ นับจำนวนเซลล์ที่พบสปอร์ในหนึ่งร้อยเซลล์ เพื่อหาร้อยละของการติดเชื้อภายในเซลล์ (infection ratio) และศึกษาโครงสร้างของเซลล์

๓.๔.๑๐.๘ นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ

๓.๔.๑๑ การวัดปริมาณโปรตีนบริเวณต่อมไฮโปฟาริงจ์ (Hypopharyngeal gland protein contents: Bradford assay)

วิธีปฏิบัติ

๓.๔.๑๑.๑ นำผึ้งหลวงกลุ่มติดเชื้อและกลุ่มควบคุมในวันที่ 6 10 และ 14 ออกจากกรงกรงละ 10 ตัว จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °c เวลา 5 นาที แล้วทำการผ่าต่อมไฮโปฟาริงจ์ (Hypopharyngeal gland) ทั้งสองข้างใส่ลงใน 1.5 ml micro-centrifuge tubes ที่มี phosphate buffer 50 µl ที่ค่า pH 7.8 และแช่ไว้ในน้ำแข็ง เมื่อผ่าครบทั้ง 10 ตัวแล้วให้นำไปปั่นเหวี่ยงด้วย micro-centrifuge ที่ 1,000 g เป็นเวลา 2 นาที

๓.๔.๑๑.๒ ปิเปตสารละลาย supernatant เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งแต่ละตัว โดยใช้วิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976)

๓.๔.๑๑.๓ เตรียมกราฟมาตรฐานจาก bovine serum albumin (BSA) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนในช่วงคลื่น 595 nm โดยใช้ Shimadzu UV-visible spectrophotometer (UV-1610)

๓.๔.๑๑.๔ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยการเปรียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยให้โปรแกรม PAST ต่อไป

๓.๔.๑๒ การวิเคราะห์ชนิดของเชื้อ *Nosema ceranae* โดยอาศัยการจำแนกทางชีวโมเลกุล (molecular identification)

วิธีปฏิบัติ

ทำ ณ ห้องปฏิบัติการ Martin-Luther-University, Institute of Biology/Zoology, Hoher Weg 8, Halle (Saale), Germany

๓.๔.๑๒.๑ นำตัวอย่างผึ้งงานที่เก็บจากแต่ละบริเวณของประเทศไทย มาตั้งเอาทางเดินอาหารส่วนกลางออกเพื่อนำไปสกัดเอาดีเอ็นเอ

๓.๔.๑๒.๒ นำไปสกัด DNA และนำไปจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิค qPCR (Higes et al., 2013)

๓.๕ ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุขั้นตอนอย่างละเอียด)

๓.๕.๑ ระยะเวลาที่ทำการวิจัยจะทำต่อเนื่องโดยใช้เวลาเบื้องต้น 3 ปี เริ่มตั้งแต่รับเงินสนับสนุนงวดแรกในปีงบประมาณ 2559 จนถึงปี 2561

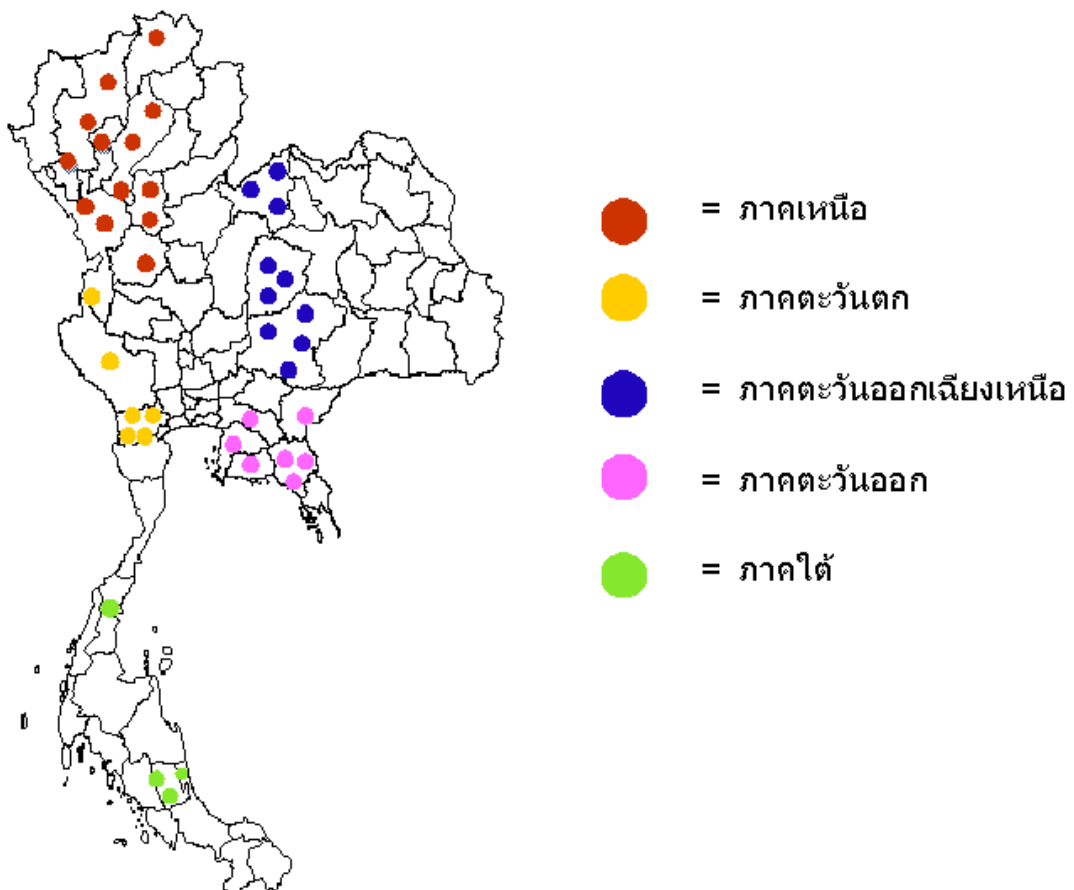
๓.๕.๒ สถานที่เก็บตัวอย่าง ทุกภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้

๓.๕.๓ สถานที่ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ห้อง BS 3108-3110 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จ. ชลบุรี และ ณ ห้องปฏิบัติการ Martin-Luther-University, Institute of Biology/Zoology, Hoher Weg 8, Halle (Saale), Germany

บทที่ 4
ผลการศึกษา
(Results)

๔.๑ การระบาดของเชื้อ *Nosema ceranae* ในประเทศไทย

การระบาดของเชื้อ *Nosema ceranae* โดยตรวจนับสปอร์ในห้องปฏิบัติการ (โดยใช้ Hemocytometer) จากรังผึ้งที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทยพบการระบาดทุกพื้นที่ ทำการศึกษาเพิ่มเติมในบริเวณใกล้เคียงกับที่เคยสำรวจ (รูปที่ ๔.๑) โดยสำรวจเพิ่มเติมในระยะเวลาช่วงที่ ๒ ระหว่างพฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๙- สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๙ รวมทั้งสิ้น ๑๑๔ รัง ติดเชื้อ *Nosema* ทั้งสิ้น ๘๒ รัง จำนวนตัวอย่างผึ้งงานของผึ้งหลวงทั้งหมดวิเคราะห์ผลด้วย qPCR พบ *Nosema ceranae* และ *Nosema* อื่น รูปที่ ๔.๓-๔.๘



รูปที่ ๔.๑ บริเวณที่เก็บตัวอย่างผึ้งหลวงเพื่อตรวจการติดเชื้อ *Nosema* จากการเพิ่มการสำรวจ ระยะเวลาช่วงที่ ๒ ระหว่างพฤษภาคม ๒๕๕๙ - สิงหาคม ๒๕๕๙ :วงกลมแสดงตำแหน่งที่ เก็บตัวอย่าง; สีแสดงภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ที่เก็บตัวอย่าง

ตารางที่ ๔.๑ พิกัดที่เก็บตัวอย่างผึ้งหลวงจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

กลุ่มตัวอย่าง ผึ้งหลวง	ภูมิภาค ของประเทศไทย	พิกัดภูมิศาสตร์	
		Latitude	Longitude
AD _N 1- AD _N 36	ภาคเหนือ	17.974133-20.360313	99.587304-99.923476
AD _W 1- AD _W 18	ภาคตะวันตก	13.539033-14.859500	99.328372-98.620979
AD _{NE} 1- AD _{NE} 30	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	14.419667-17.699735	98.852304-101.676645
AD _E 1- AD _E 21	ภาคตะวันออก	13.283178-12.736600	100.926633-102.217006
AD _S 1- AD _S 14	ภาคใต้	78.049007-76.614614	101.887999-100.081209

ตารางที่ ๔.๒ ผลการตรวจการติดเชื้อ *Nosema* จากทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวง

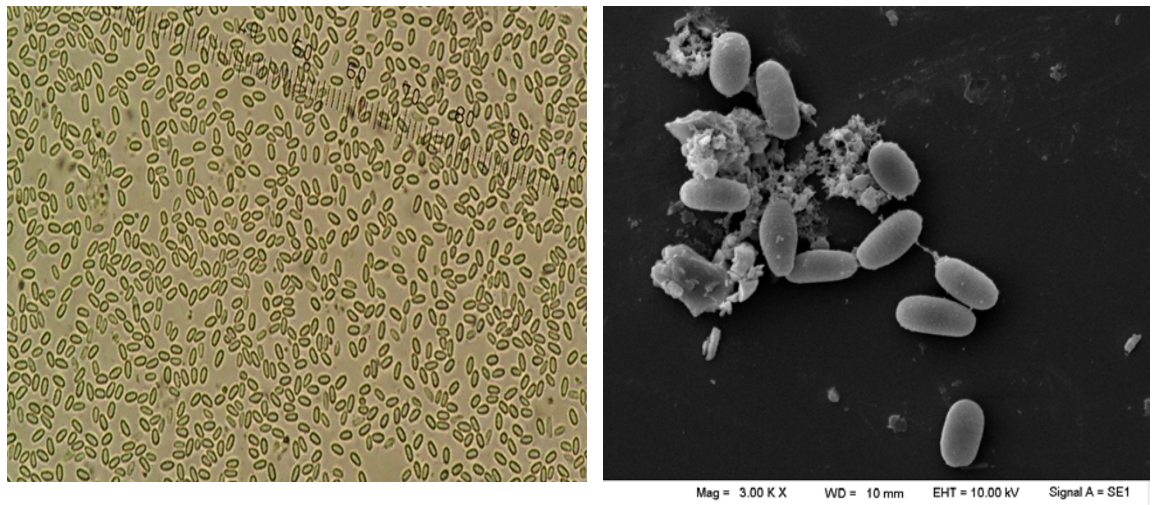
A. dorsata จำนวน ๕๐ ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจากรังที่เขาใหญ่ พิกัด ละติจูด 14,434,960 ลองจิจูด 101,413, 342

ตัวอย่างผึ้งหลวง	การติดเชื้อ <i>Nosema</i>
ตัวที่ 1	-
ตัวที่ 2	-
ตัวที่ 3	-
ตัวที่ 4	-
ตัวที่ 5	-
ตัวที่ 6	-
ตัวที่ 7	-
ตัวที่ 8	-
ตัวที่ 9	-
ตัวที่ 10	-
ตัวที่ 11	-
ตัวที่ 12	-
ตัวที่ 13	-
ตัวที่ 14	-
ตัวที่ 15	-
ตัวที่ 16	-
ตัวที่ 17	+
ตัวที่ 18	-
ตัวที่ 19	-
ตัวที่ 20	-
ตัวที่ 21	-

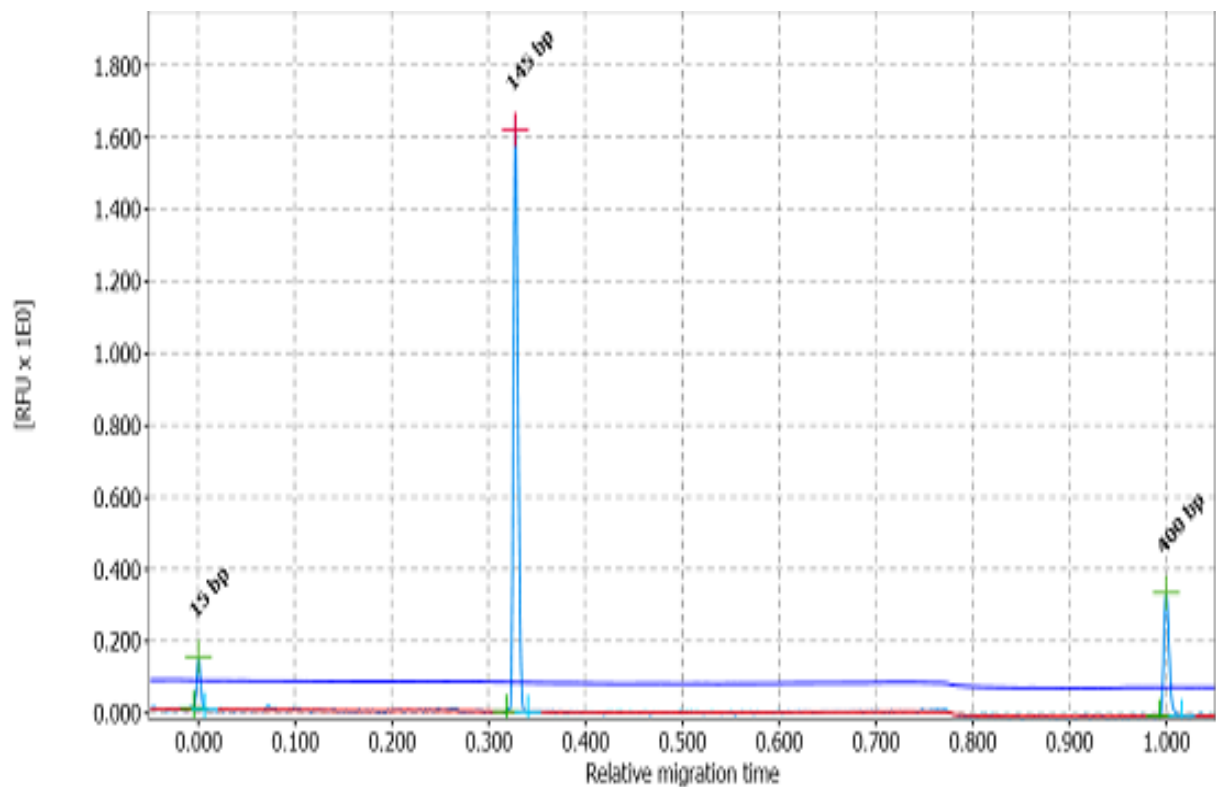
ตัวที่ 22	-
ตัวที่ 23	-
ตัวที่ 24	-
ตัวที่ 25	-
ตัวที่ 26	-
ตัวที่ 27	-
ตัวที่ 28	-
ตัวที่ 29	-
ตัวที่ 30	-
ตัวที่ 31	-
ตัวที่ 32	+
ตัวที่ 33	-
ตัวที่ 34	+
ตัวที่ 35	-
ตัวที่ 36	-
ตัวที่ 37	-
ตัวที่ 38	-
ตัวที่ 39	+
ตัวที่ 40	-
ตัวที่ 41	-
ตัวที่ 42	-
ตัวที่ 43	-
ตัวที่ 44	-
ตัวที่ 45	-
ตัวที่ 46	-
ตัวที่ 47	-
ตัวที่ 48	-
ตัวที่ 49	-
ตัวที่ 50	-

หมายเหตุ - ไม่พบ สปอร์ของ *Nosema*

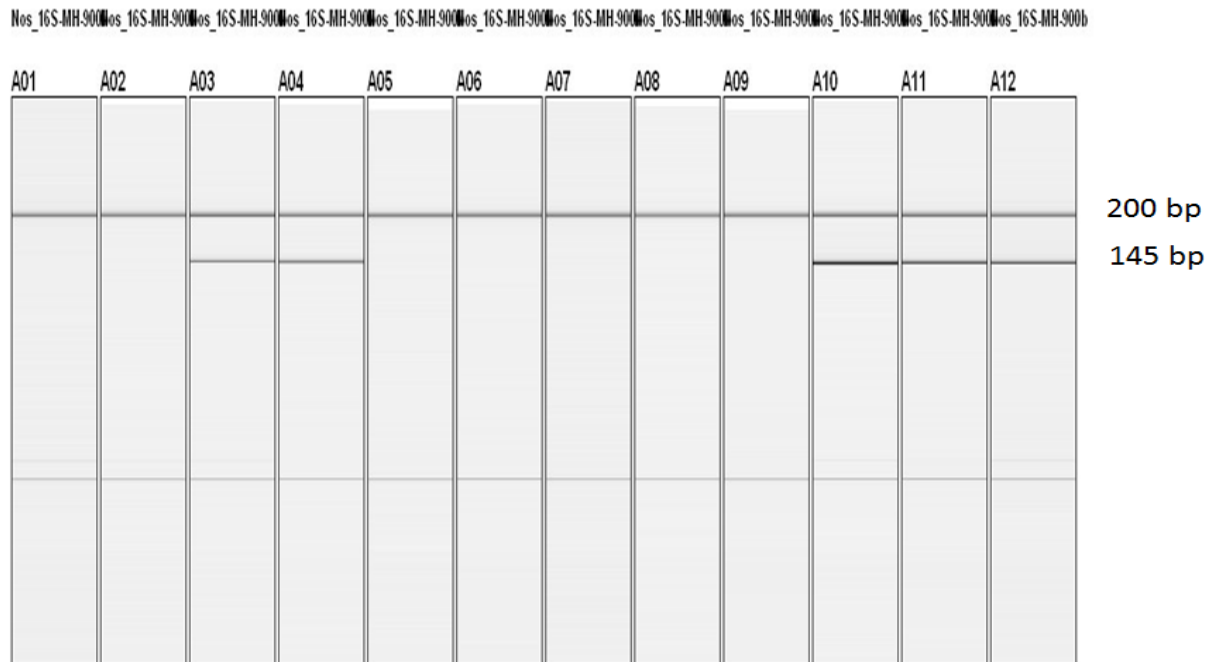
+ พบ สปอร์ของ *Nosema*



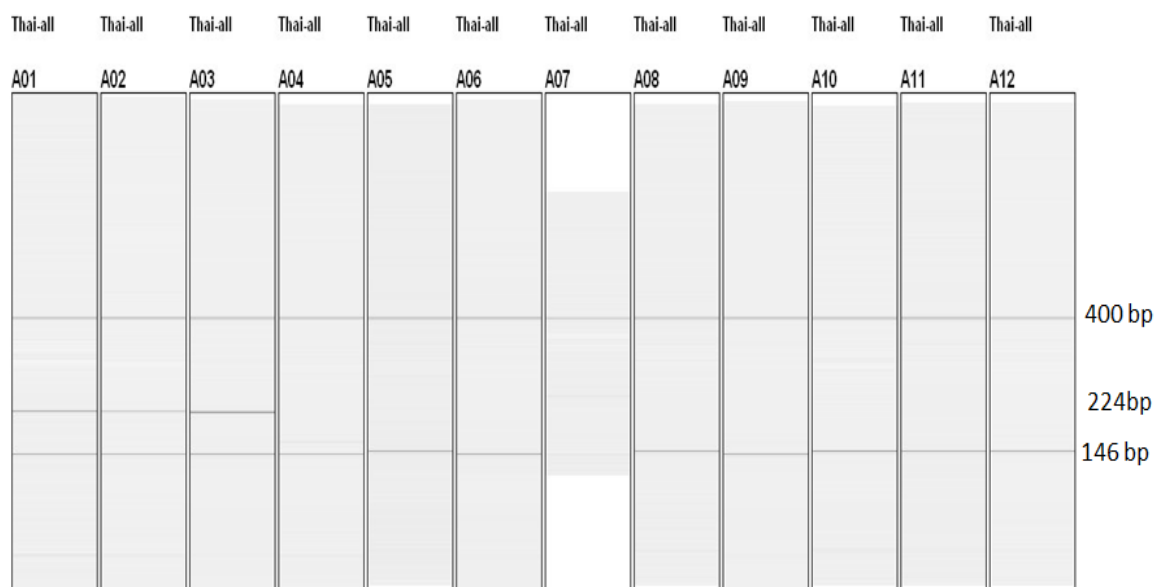
รูปที่ ๔.๒ สปอร์ของเชื้อ *Nosema* แยกออกจากทางเดินอาหารส่วนกลางฝั้งหลวงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ซ้าย) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ขวา)



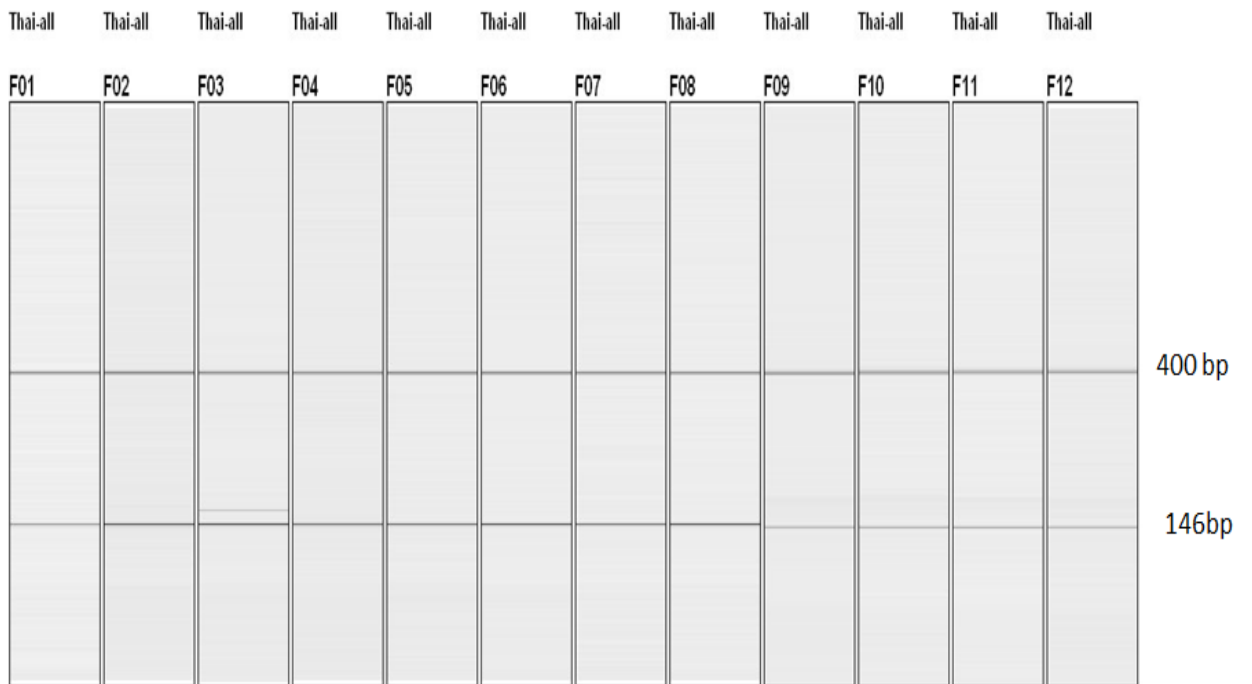
รูปที่ ๔.๓ PCR products โดย qPCR ของ *N. ceranae* ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของฝั้งหลวง ที่เก็บจาก จังหวัดแพร่ ซึ่ง 15 bp peak = marker, a 145 bp = *N. ceranae* และ a 400 bp = a marker



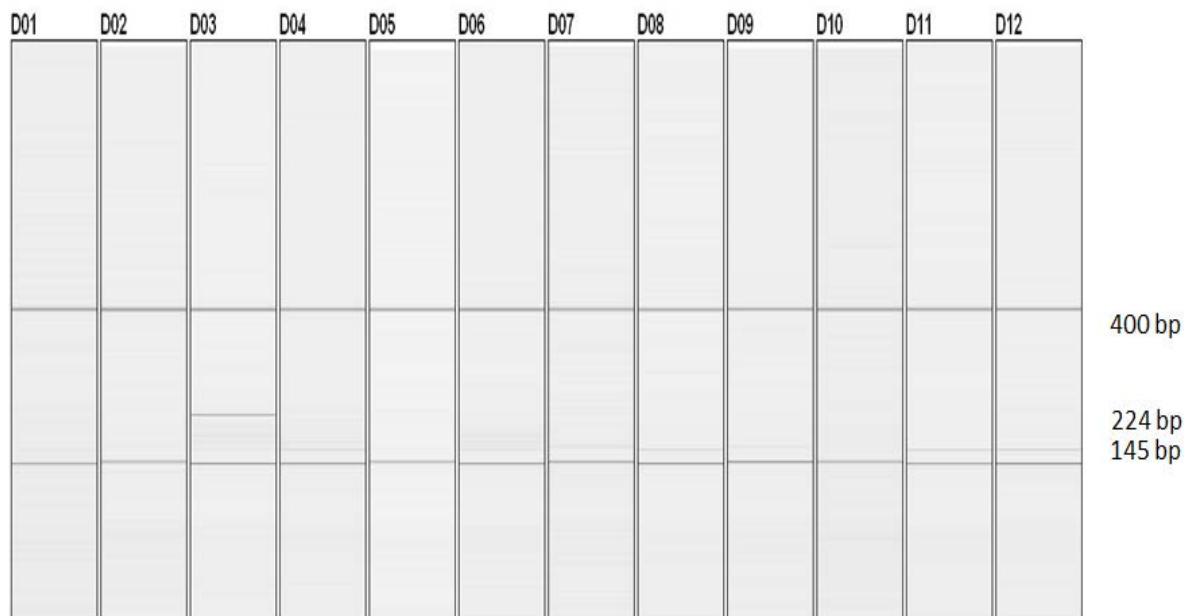
รูปที่ ๔.๔ PCR products ของ *N. ceranae* ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวง ที่เก็บจากบริเวณเขาใหญ่ นครราชสีมา (A01-A12) ; a 145 bp = *N. ceranae* และ a 100 bp = a marker พบเชื้อ *N. ceranae* รังที่ 3 4 10 11 และ 12 จาก 12 รัง



รูปที่ ๔.๕ PCR products ของ *N. ceranae* ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวง ที่เก็บจากบริเวณดอยขุนตาล จังหวัดลำปาง (A01-A12) ; a 145 bp = *N. ceranae* และ a 100, 400 bp = markers พบเชื้อ *N. ceranae* ทั้งหมด 11 รัง จาก 12 รัง ยกเว้น รังที่ 7 และพบเชื้อ *N. apis* รังที่ 1 2 และ 3



รูปที่ ๔.๖ PCR products ของ *N. ceranae* ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวง ที่เก็บจากบริเวณอำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี (F01-F12) ; a 145 bp = *N. ceranae* และ a 400 bp = a marker พบเชื้อ *N. ceranae* ทั้ง 12 รัง



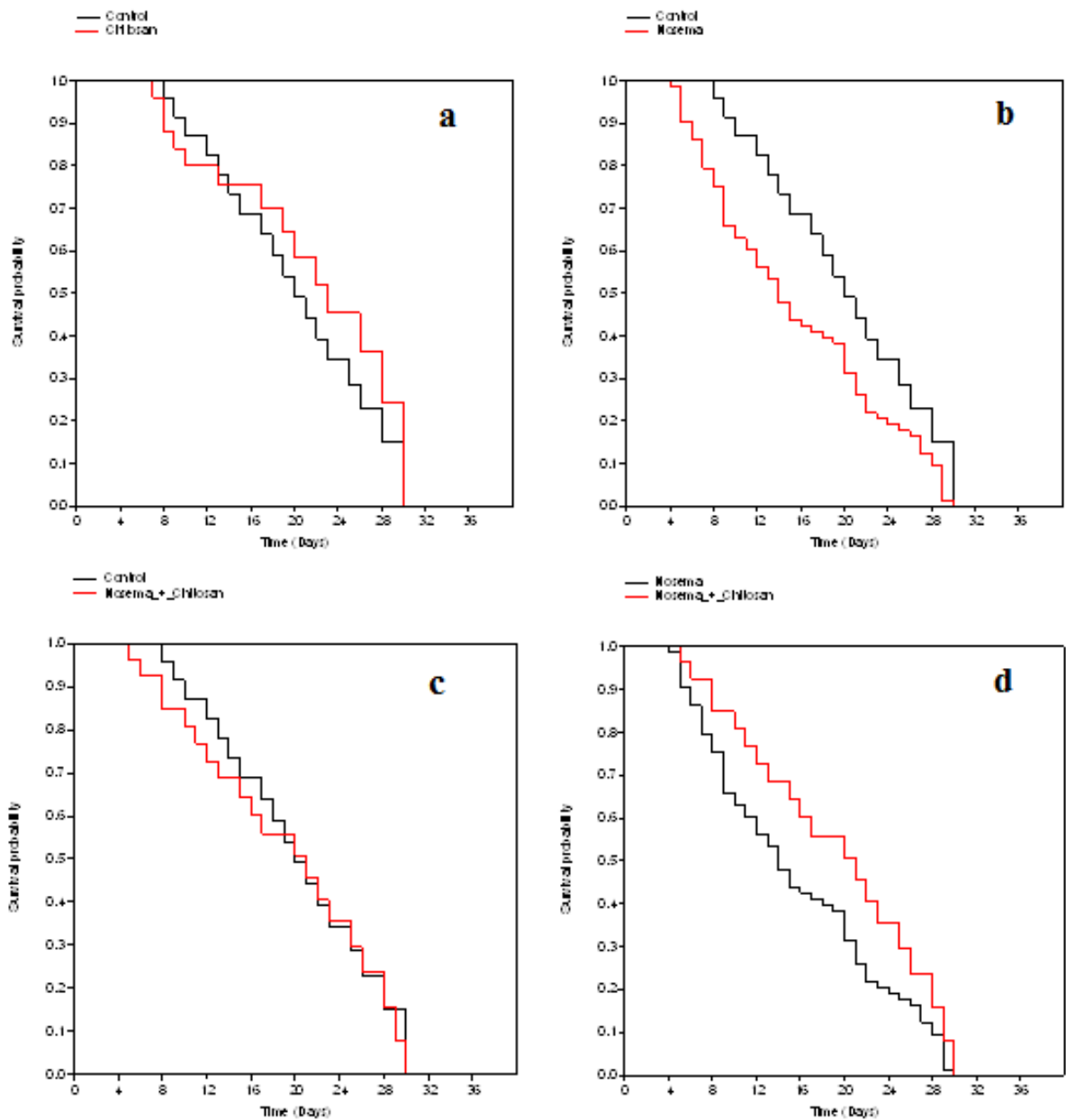
รูปที่ ๔.๗ PCR products ของ *N. ceranae* ที่พบในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวง ที่เก็บจากบริเวณอำเภอมะริม จังหวัดเชียงใหม่ (D01-D12) ; a 145 bp = *N. ceranae* และ a 400 bp = a marker พบเชื้อ *N. ceranae* ทั้ง 12 รัง และพบเชื้อ *N. apis* รังที่ 3

๔.๒ ผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่ออัตราการตาย (Mortality) ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน

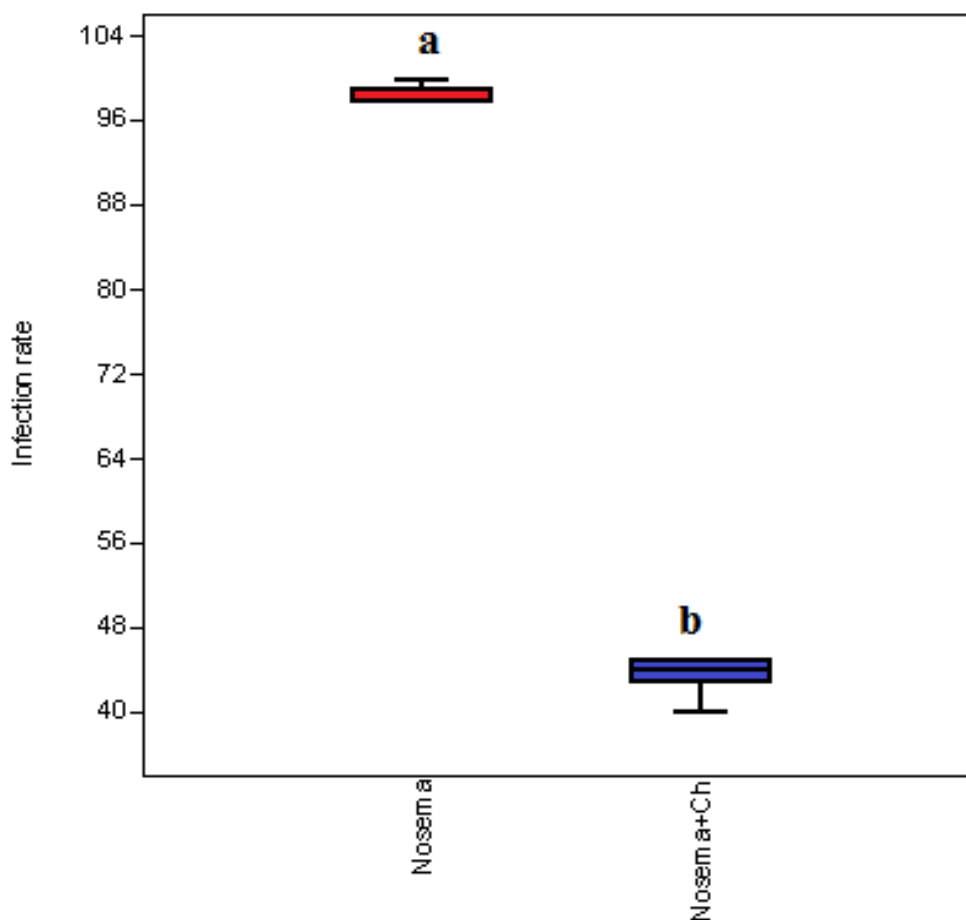
จากการทดลองหาอัตราการรอดชีวิตของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว โดยวิธี force feeding แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm พบว่าอัตราการรอดชีวิตของผึ้งหลวงในกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm สูงกว่าผึ้งหลวงในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0191$) ดังรูปที่ ๔.๘ (ภาพ d) ส่วนอัตราการรอดชีวิตของผึ้งหลวงในกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ไม่แตกต่างจากผึ้งหลวงในกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* ($p = 0.7414$) ดังรูปที่ ๔.๘ (ภาพ c) แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ไม่ได้ช่วยส่งเสริมผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานให้มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้นจากผึ้งในกลุ่มปกติแต่สารละลายไคโตซานช่วยลดอัตราการตายของผึ้งที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* ได้

๔.๓ ผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่ออัตราการติดเชื้อ (infection rate) ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน

จากการทดลองหาอัตราการติดเชื้อของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ด้วยการนับจำนวนผึ้งหลวงที่ติดเชื้อต่อจำนวนผึ้งหลวงที่ไม่ติดเชื้อ หลังจากทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่าอัตราการติดเชื้อของผึ้งหลวงในกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ต่ำกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ดังรูปที่ ๔.๙ โดยอัตราการติดเชื้อ (infection rate) ของผึ้งหลวงกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* อย่างเดียว และกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซาน เท่ากับ 98.80 ± 0.37 และ 43.40 ± 0.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยลดอัตราการติดเชื้อ *N. ceranae* ของผึ้งหลวง



รูปที่ ๔.๘ อัตราการรอดชีวิตของผึ้งหลวงกลุ่มควบคุม (Control) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (ภาพ a), กลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว (ภาพ b) และกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (ภาพ c) เป็นเวลา 30 วัน (Log rank; $\text{Chi}^2 = 0.5144, p = 0.4732, \text{Chi}^2 = 7.2018, p = 0.0073$ และ $\text{Chi}^2 = 0.1089, p = 0.7414$ ตามลำดับ) อัตราการรอดชีวิตของผึ้งหลวงกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (ภาพ d) เป็นเวลา 30 วัน (Log rank; $\text{Chi}^2 = 5.4896, p = 0.0191$)

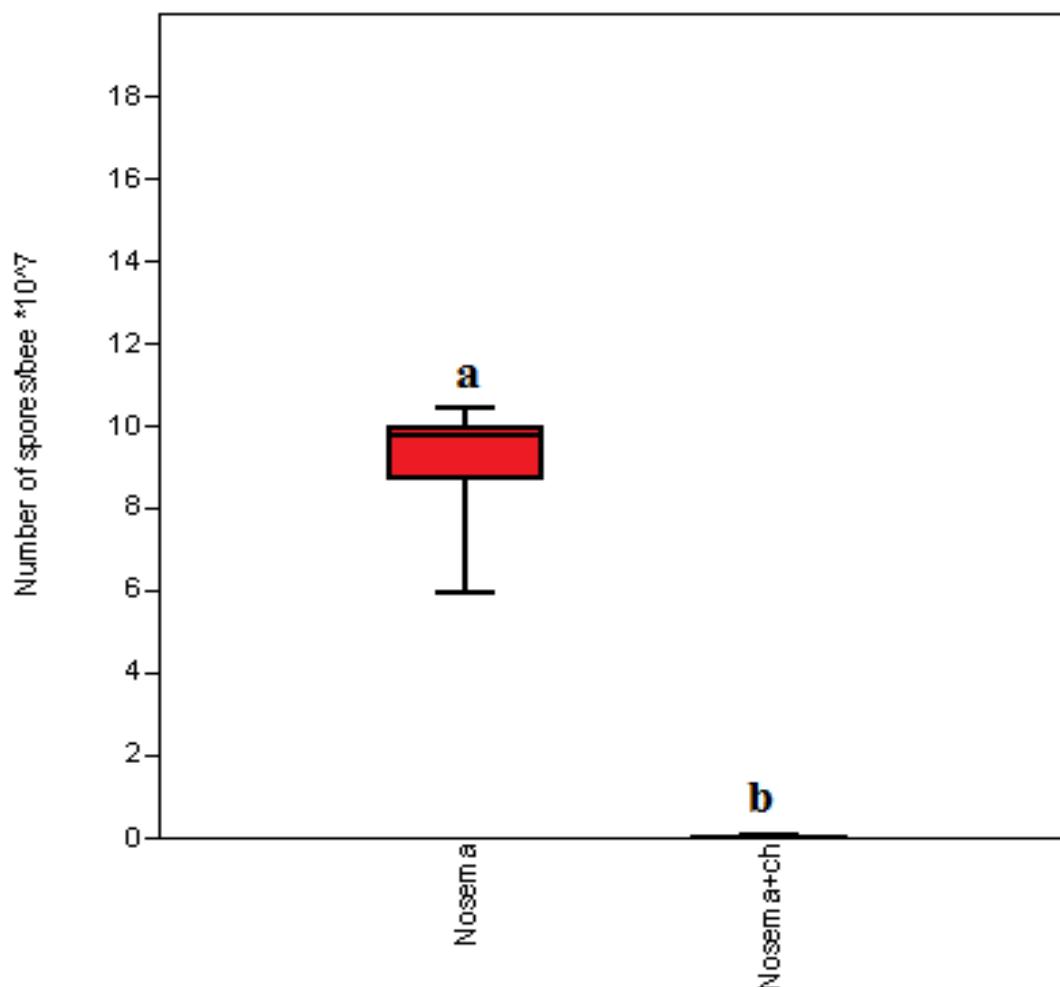


รูปที่ ๔.๙ ค่าเฉลี่ย (mean± SE) อัตราการติดเชื้อ (infection rate) ของผึ้ง *A. dorsata* หลังรับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm และผึ้ง *A. dorsata* ที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซาน; อักษรที่แตกต่างแสดงถึงค่านัยสำคัญทางสถิติที่แตกต่างกัน (ANOVA; $F_1=3069, p < 0.0001$)

๔.๔ ผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่อประสิทธิภาพการติดเชื้อ (infectivity) ในเซลล์ลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน

จากการทดลองหาประสิทธิภาพการติดเชื้อในเซลล์ลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ด้วยการนับจำนวนสปอร์ของ *N. ceranae* ที่สกัดได้จากลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงในวันที่ 10 หลังจากรับเชื้อ พบว่าจำนวนสปอร์ของ *N. ceranae* ที่สกัดจากผึ้งหลวงในกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm น้อยกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซาน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ดังรูปที่ ๔.๑๐

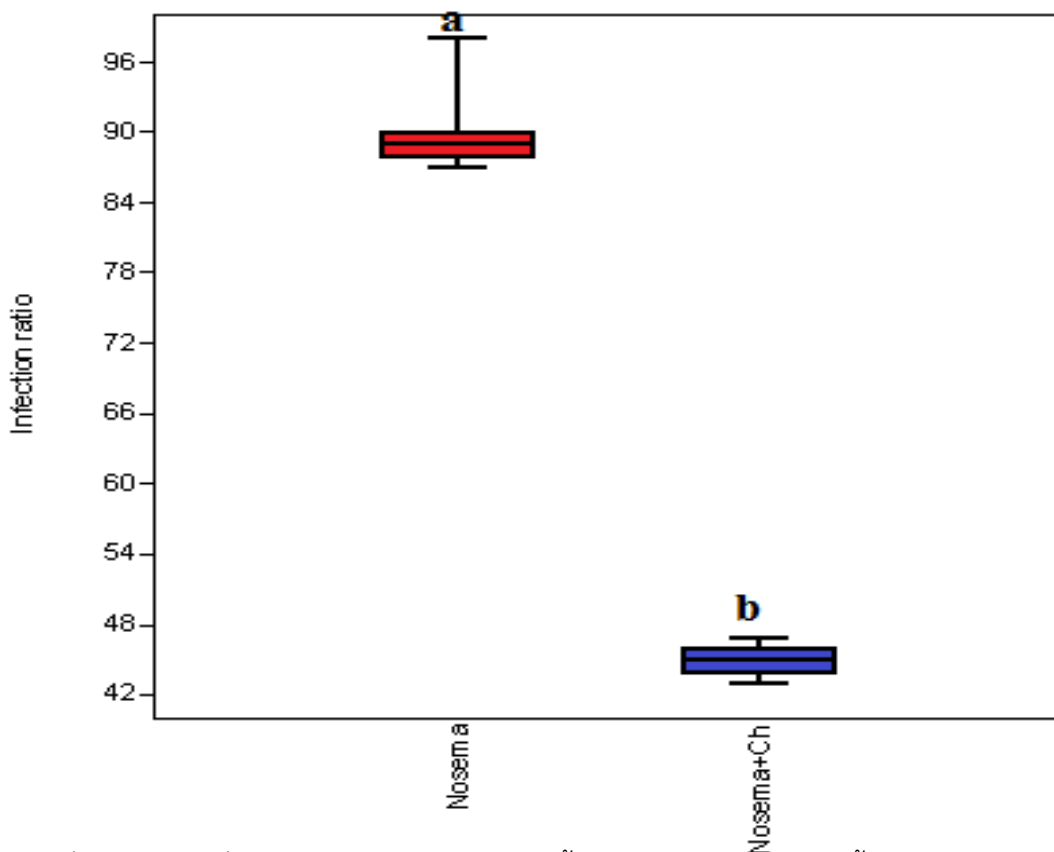
โดยจำนวนสปอร์ของ *N. ceranae* ที่สกัดได้จากลำไส้ส่วนกลาง (infectivity) ของผึ้งหลวงในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* อย่างเดียว และกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานเท่ากับ $9.32 \pm 0.32 \times 10^7$ และ $5.18 \pm 0.69 \times 10^5$ สปอร์ต่อตัว ตามลำดับ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยลดประสิทธิภาพการติดเชื้อของ *N. ceranae* ในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวง



รูปที่ ๔.๑๐ ค่าเฉลี่ย (mean \pm SE) ของจำนวนสปอร์ *N. ceranae* ที่สกัดได้จากลำไส้ส่วนกลางของผึ้ง *A. dorsata* หลังรับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm และผึ้ง *A. dorsata* ที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซาน หลังการรับเชื้อ 10 วัน; อักษรที่แตกต่างแสดงถึงค่านัยสำคัญทางสถิติที่แตกต่างกัน (ANOVA; $F_1=509.7$, $p < 0.0001$)

๔.๕ ผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่ออัตราการติดเชื้อในเซลล์ลำไส้ส่วนกลาง (infection ratio) ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน

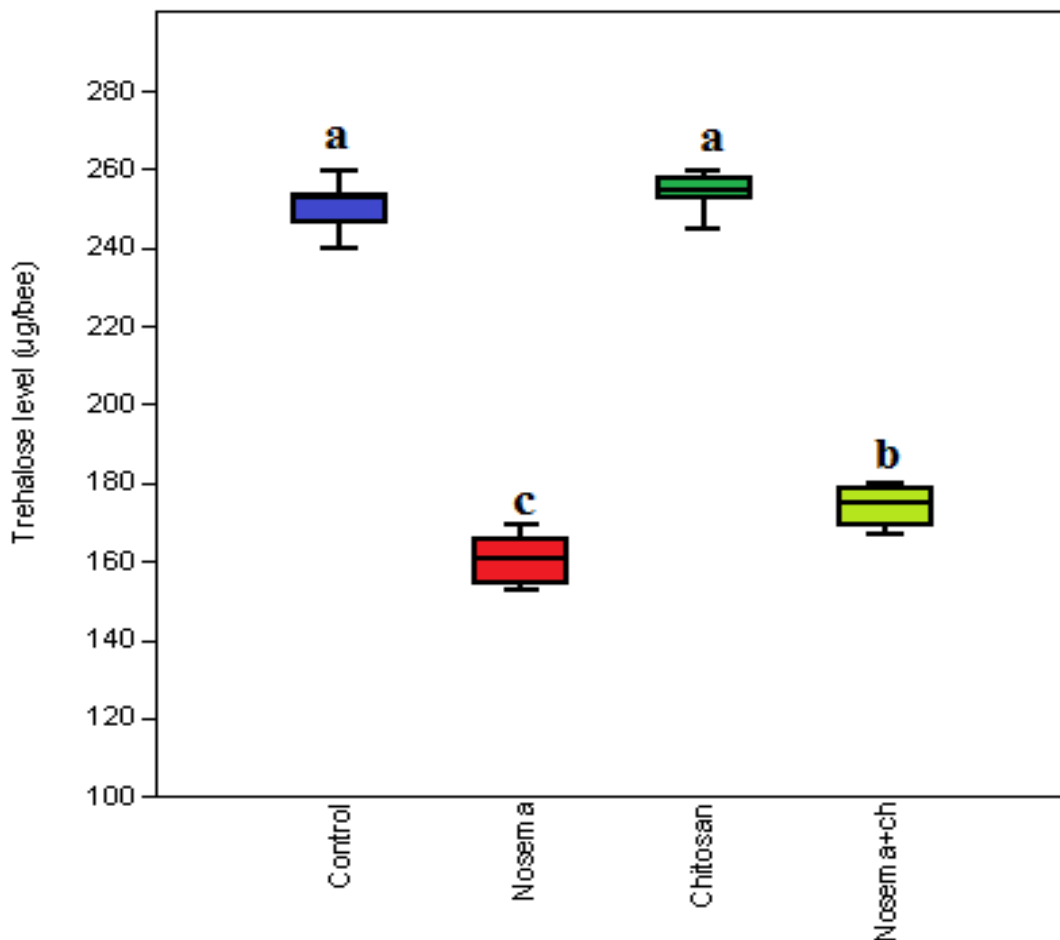
จากการทดลองหาอัตราการติดเชื้อในเซลล์ลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ด้วยการนับจำนวนเซลล์ในลำไส้ส่วนกลางที่ติดเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ ของวันที่ 10 หลังการรับเชื้อ พบว่าอัตราการติดเชื้อในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงในกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ต่ำกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ดังรูปที่ ๔.๑๑ โดยอัตราการติดเชื้อในลำไส้ส่วนกลาง (infection ratio) ของผึ้งหลวงในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* อย่างเดียว และกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซาน เท่ากับ 88.00 ± 0.71 และ 45.00 ± 0.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยลดอัตราการติดเชื้อ *N. ceranae* ในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงได้



รูปที่ ๔.๑๑ ค่าเฉลี่ย (mean \pm SE) อัตราการติดเชื้อ (infection ratio) ของผึ้ง *A. dorsata* หลังรับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm และผึ้ง *A. dorsata* ที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซาน; อักษรที่แตกต่างแสดงถึงค่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่แตกต่างกัน (ANOVA; $F_1=472.7$, $p < 0.0001$)

๔.๖ ผลของเชื้อ *N. ceranae* ต่อระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน

จากการทดลองหาระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm โดยเก็บตัวอย่างมาทดสอบ ในวันที่ 10 หลังจากได้รับเชื้อ พบว่าระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm สูงกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารสกัดพอลิซอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0002$) ดังรูปที่ ๔.๑๒ แต่ ต่ำกว่า กลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0002$) ดังรูปที่ ๔.๑๒

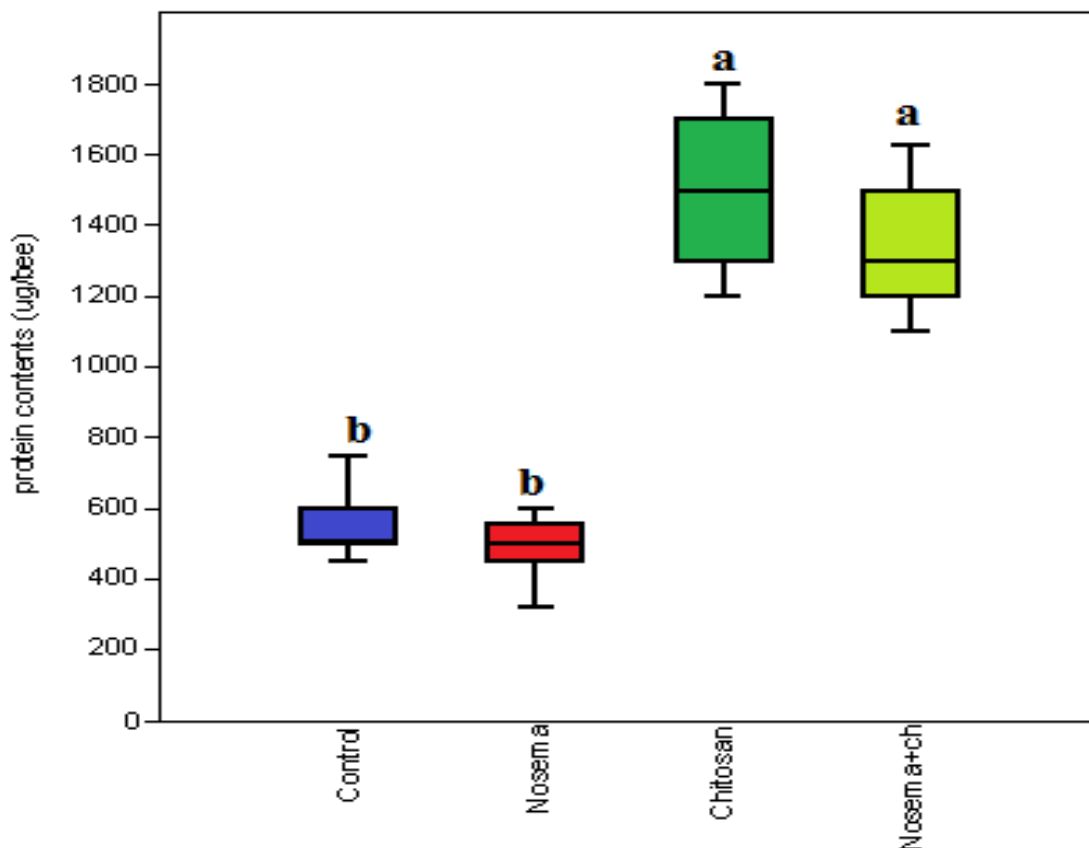


รูปที่ ๔.๑๒ ค่าเฉลี่ย (mean± SE) ระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (Nosema+ch) กลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* (Control) กลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* อย่างเดียว (Nosema) และกลุ่มที่ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm อย่างเดียว (Chitosan) หลังการรับเชื้อ 10 วัน; อักษรที่แตกต่างแสดงถึงค่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่แตกต่างกัน (ANOVA; $F_3=278.8, p < 0.0001$)

ส่วนระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงกลุ่มที่ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm อย่างเดียว สูงกว่า กลุ่มที่ได้เชื้อ *N. ceranae* อย่างเดียว (Nosema) และกลุ่มที่ได้เชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (Nosama+ch) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0002$) ดังรูปที่ ๔.๑๒ โดยระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* (Control) กลุ่มที่ได้เชื้อ *N. ceranae* อย่างเดียว (Nosema) กลุ่มที่ให้สารละลายไคโตซานอย่างเดียว (Chitosan) และกลุ่มที่ได้เชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซาน (Nosama+ch) เท่ากับ 250.80 ± 3.40 , 161.00 ± 3.21 , 254.20 ± 2.60 และ 174.20 ± 2.52 ไมโครกรัมต่อตัว ตามลำดับ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยส่งเสริมกระบวนการที่ทำให้ระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานที่ติดเชื้อ *N. ceranae* สูงขึ้น

๔.๗ ผลของเชื้อ *N. ceranae* ต่อปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน

จากการทดลองหาปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm โดยเก็บตัวอย่างมาทดสอบ ในวันที่ 10 หลังจากได้รับเชื้อ พบว่าปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm สูงกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารสกัดพอลิซอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0002$) และสูงกว่า กลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0002$) แต่ไม่ต่างจากกลุ่มที่ให้สารละลายไคโตซานอย่างเดียว (Chitosan) ($p = 0.5694$) ดังรูปที่ ๔.๑๓ โดยปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* (Control) กลุ่มที่ได้เชื้อ *N. ceranae* อย่างเดียว (Nosema) กลุ่มที่ให้สารละลายไคโตซานอย่างเดียว (Chitosan) และกลุ่มที่ได้เชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซาน (Nosama+ch) เท่ากับ 562.00 ± 52.86 , 486.00 ± 48.74 , $1,500.00 \pm 114.02$ และ $1,346.00 \pm 97.04$ ไมโครกรัมต่อตัว ตามลำดับ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยส่งเสริมกระบวนการผลิตโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานทั้งที่ติดเชื้อ *N. ceranae* และไม่ติดเชื้อ



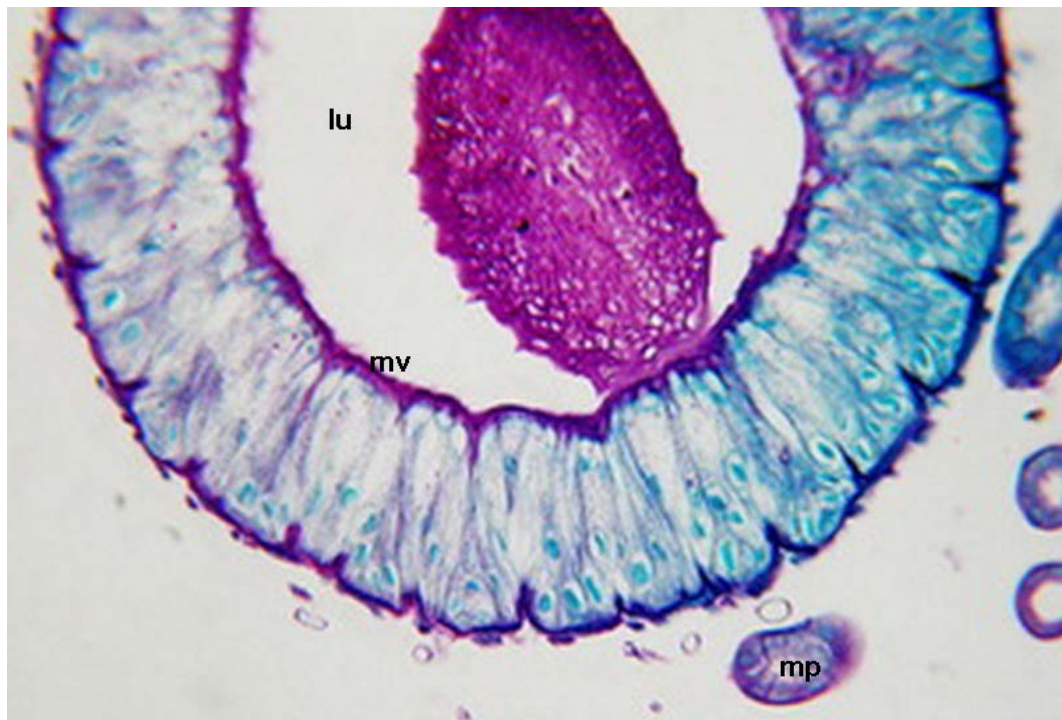
รูปที่ ๔.๑๓ ค่าเฉลี่ย (mean± SE) ปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน หลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm (Nosama+ch) กลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* (Control) กลุ่มที่ได้เชื้อ *N. ceranae* อย่างเดียว (Nosema) และกลุ่มที่ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นอย่างเดียว (Chitosan) หลังการรับเชื้อ 10 วัน; อักษรที่แตกต่างแสดงถึงค่านัยสำคัญทางสถิติที่แตกต่างกัน (ANOVA; $F_3=39.78$, $p < 0.0001$)

๔.๘ ผลของเชื้อ *N. ceranae* ต่ออัตราการติดเชื้อในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวง

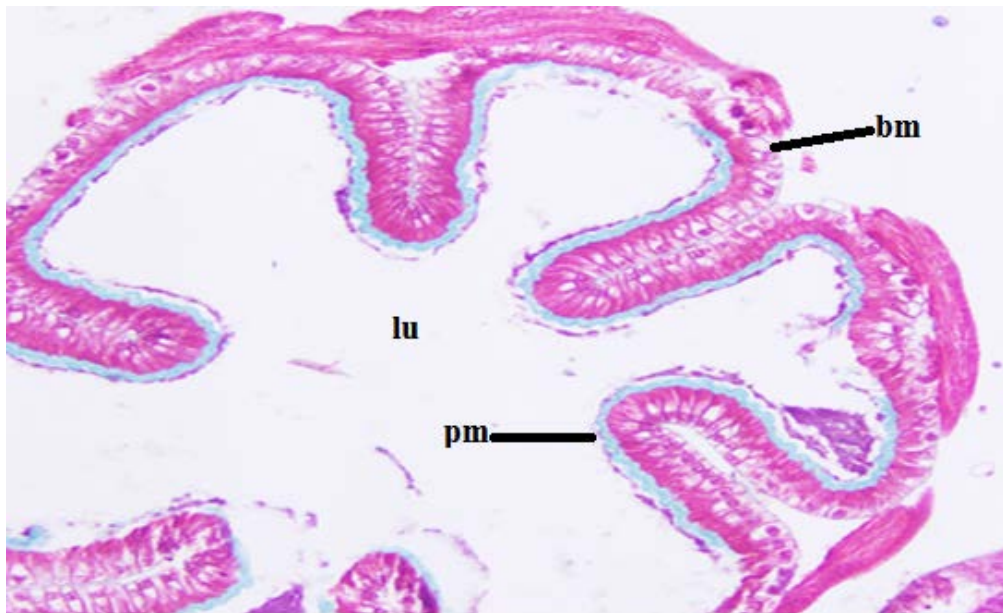
จากการทดลองหาอัตราการติดเชื้อในเซลล์ลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 (500K) สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ด้วยการนับจำนวนเซลล์ในลำไส้ส่วนกลางที่ติดเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ โดยการตัดเนื้อเยื่อ

ทางเดินอาหารส่วนกลาง ย้อมด้วยสี Periodic acid Schiff's reagent (PAS) พบสปอร์ของเชื้อ *N. ceranae* ติดสีชมพูม่วงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากโครงสร้างของเยื่อหุ้มสปอร์ประกอบด้วยสารอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรต จะเห็นสปอร์ติดสีชมพูกระจาย อยู่ทั่วเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานที่ได้รับเชื้อไปแล้ว 10 วัน (day10 p.i.) โดยพบสปอร์ มากบริเวณฐานของเซลล์ (basement membrane) กระจายไปจนถึงยอดเซลล์ (apical part) และเริ่มพบว่าบริเวณปลายอิสระ (free end) มีการเสียหายของไมโครวิลไล และเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่ไม่พบสปอร์ ในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ *Nosema* ดังรูปที่ ๔.๑๔-๔.๑๗

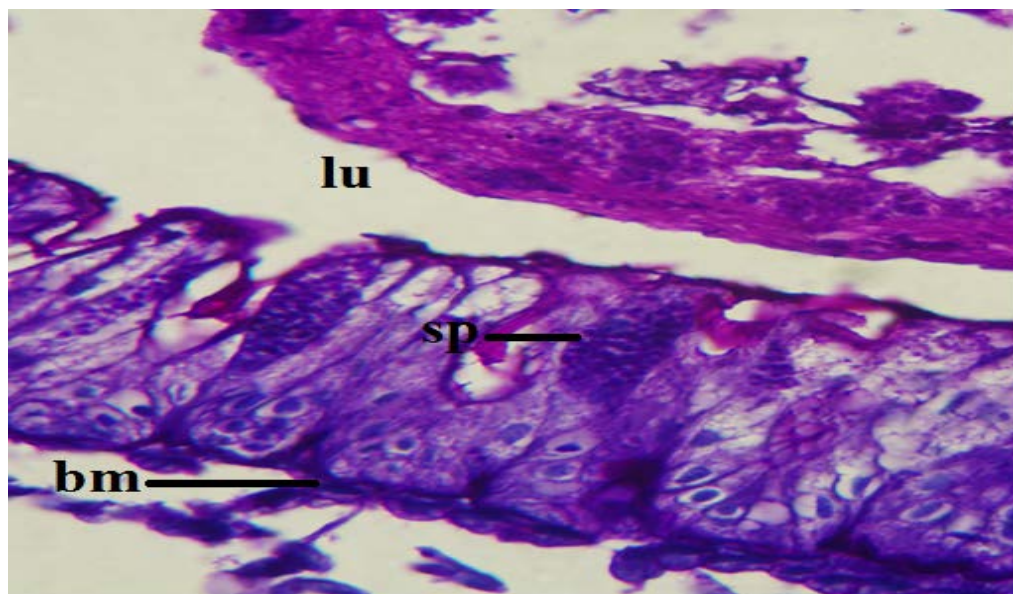
นอกจากนี้ยังพบว่าในชั้น peritrophic membrane ในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ แล้วให้สารละลายโคโตซานความเข้มข้น 1 ppm มีความหนาเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับสารละลายโคโตซาน ดังรูปที่ ๔.๑๗



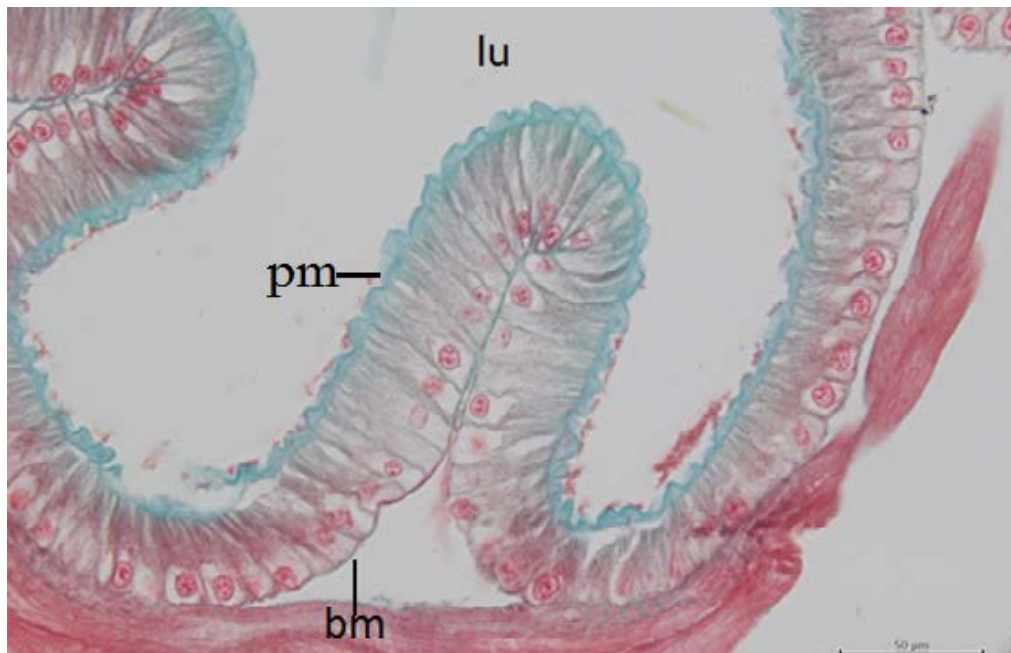
รูปที่ ๔.๑๔ เนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน ที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* (กลุ่มควบคุม) ย้อมด้วยสี PAS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง, อักษรย่อ: lu, a lumen of the midgut; mp, mulpighain tubule; mv, microvilli



รูปที่ ๔.๑๕ เนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน ที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* 500,000 สปอร์ต่อตัว แต่ได้รับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm หลังป้อนเชื้อวันที่ 10 ย้อมด้วยสี PAS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง, อักษรย่ออักษรย่อ: bm, basement membrane; lu, a lumen of the midgut; pm, peritrophic membrane



รูปที่ ๔.๑๖ เนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน ที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วไม่ให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm หลังป้อนเชื้อวันที่ 10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง, อักษรย่อ: bm, basement membrane; lu, a lumen of the midgut; sp, *N. ceranae* spores

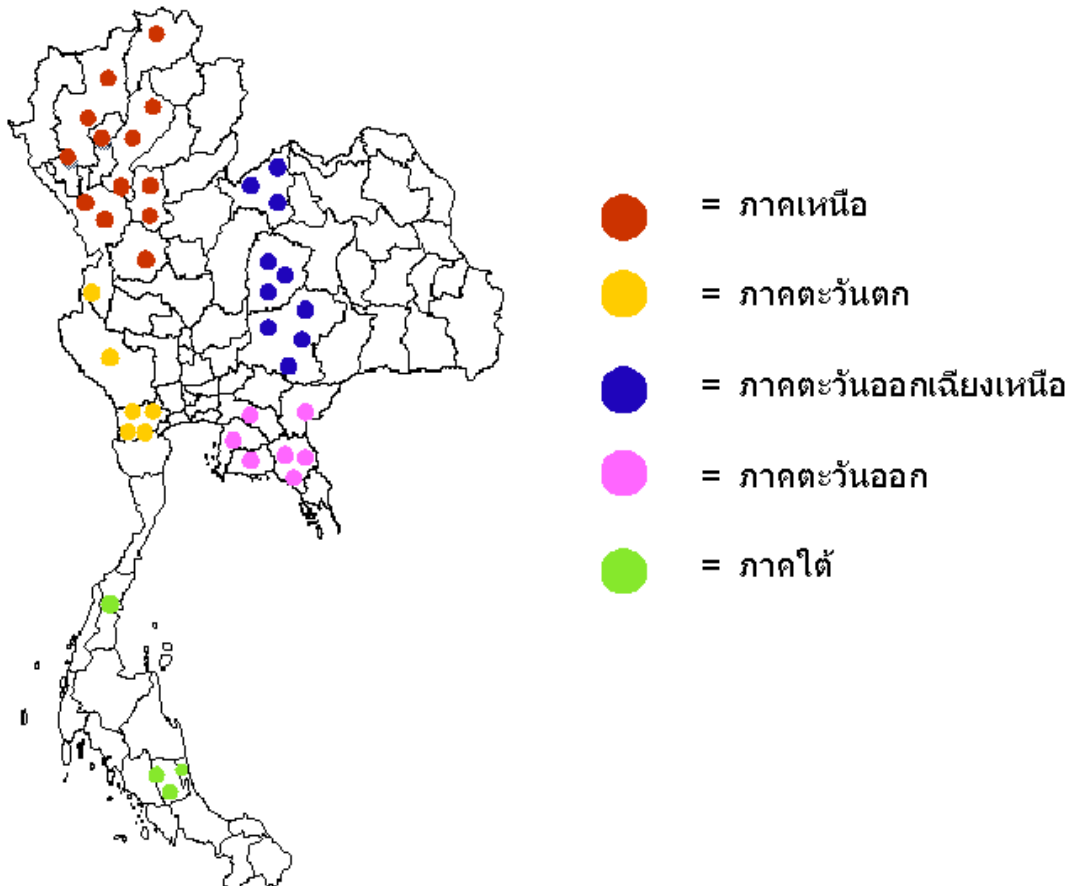


รูปที่ ๔.๑๗ เนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน ที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายโคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ป้อนเชื้อวันที่ 10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง, อักษรย่อ: bm, basement membrane; lu, a lumen of the midgut; pm, peritrophic membrane

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Conclusions and Discussions)

จากผลการศึกษาการระบาดของเชื้อ *Nosema ceranae* โดยตรวจนับสปอร์ในห้องปฏิบัติการ (โดยใช้ Hemocytometer) จากรังผึ้งที่เก็บจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ของประเทศไทยพบการระบาดทุกพื้นที่ โดยสำรวจเพิ่มเติมในระยะเวลาช่วงที่ ๒ ระหว่างพฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๙- สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๙ (รูปที่ ๕.๑) รวมทั้งสิ้น ๑๑๔ รัง ติดเชื้อ *Nosema* ทั้งสิ้น ๘๒ รัง จำนวนตัวอย่างฝั้่งงานของฝั้่งหลวงทั้งหมดวิเคราะห์ผลด้วย qPCR พบ *N. ceranae* และ *N. apis*



รูปที่ ๕.๑ บริเวณที่เก็บตัวอย่างฝั้่งหลวงและตรวจพบการติดเชื้อ *Nosema* จากการเพิ่มการสำรวจระยะเวลาช่วงที่ ๒ ระหว่างพฤษภาคม ๒๕๕๙ - สิงหาคม ๒๕๕๙ :วงกลมแสดงตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง; สีแสดงภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ที่เก็บตัวอย่าง

ตารางที่ ๕.๑ สรุปผลการทดลองการศึกษาผลของสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ต่อผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว

กลุ่ม	Infection rate (%)	Infectivity (spores/bee)	Infection ratio (%)	Trehalose level (µg/bee)	Protein contents (µg/bee)	Remark
Control	na	na	na	250.80 ±3.40 ^a	562.00 ±52.86 ^b	
Nosema (500,000 spores/bee)	98.80 ±0.37 ^a	9.32±0.32 × 10 ^{7a}	88.00 ±0.71 ^a	161.00 ±3.21 ^c	486.00 ±48.74 ^b	
Chitosan (1 ppm)	na	na	na	254.20 ±2.60 ^a	1,500.00 ±114.02 ^a	
Nosema +chitosan	43.40 ±0.93 ^b	5.18±0.69 × 10 ^{5b}	45.00 ±0.71 ^b	174.20 ±2.52 ^b	1,346.00 ±97.04 ^a	

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันแสดงนัยสำคัญทางสถิติที่แตกต่างกัน, na หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

เชื้อ *N. ceranae* ทำให้ผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ ก่อให้เกิดโรคที่มีชื่อว่า **Nosema disease** (Bailey & Ball, 1991; Fries, 1989) ทำให้ระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงเสียหาย เป็นสาเหตุทำให้ระบบย่อยอาหารผิดปกติ อาหารไม่ย่อยและเกิดอาการท้องเสียทำให้ผึ้งมีอายุสั้นลง (Anderson & Giacon, 1992; Hassanein, 1953; Higes et al., 2007; Rinderer & Dell Elliott, 1977) เมื่อทดลองให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm แก่ผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว พบว่าอัตราการรอดชีวิตของผึ้งหลวงสูงขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อ แต่ไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ไม่ได้ช่วยส่งเสริมผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานให้มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้นจากผึ้งในกลุ่มปกติแต่สารละลายไคโตซานช่วยลดอัตราการตายของผึ้งที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* ได้

จากการทดลองหาอัตราการติดเชื้อของ *N. ceranae* ในผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm พบว่าอัตราการติดเชื้อของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ

กลุ่มที่ติดเชื้อ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยลดอัตราการติดเชื้อ *N. ceranae* ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน

จากการทดลองหาประสิทธิภาพการติดเชื้อของ *N. ceranae* ในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm พบว่าจำนวนสปอร์ของ *N. ceranae* ที่สกัดจากผึ้งหลวงในกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm น้อยกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยลดประสิทธิภาพการติดเชื้อของ *N. ceranae* ในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวง

จากการทดลองหาอัตราการติดเชื้อในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm พบว่าอัตราการติดเชื้อในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงในกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ต่ำกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยลดอัตราการติดเชื้อ *N. ceranae* ในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงได้

จากการทดลองหาระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm พบว่าระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm สูงกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยส่งเสริมกระบวนการที่ทำให้ระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานที่ติดเชื้อ *N. ceranae* สูงขึ้น สารละลายไคโตซานยังช่วยลดสภาวะเครียดทางพลังงานเมื่อผึ้งติดเชื้อ (Energetic stress) เนื่องจากสารละลายไคโตซานช่วยเพิ่มระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งเมื่อติดเชื้อ ซึ่งดัชนีที่วัดการเกิดสภาวะเครียดทางพลังงานเมื่อผึ้งติดเชื้อคือค่าระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดต่ำ (Mayack & Naug, 2009, 2010)

จากการทดลองหาปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* ที่ระดับ 500,000 สปอร์ต่อตัว แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm พบว่าปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงกลุ่มที่ติดเชื้อ *N. ceranae* แล้วให้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm สูงกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* แต่ไม่ได้ให้สารสกัดพอลิฟอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm ช่วยส่งเสริมกระบวนการผลิตโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน โดยการสร้างโปรตีนในต่อมไฮโปฟาริงค์จำเป็นต้องใช้พลังงานและโปรตีน ซึ่งพลังงานหลักของผึ้งก็คือน้ำตาลทรีฮาโลส และแหล่งโปรตีนหลัก

ของผึ้งก็คือเกสรผึ้ง เมื่อผึ้งติดเชื้อ *N. ceranae* ทำให้ระบบทางเดินอาหารเสียหายส่งผลต่อการดูดซึมอาหารทำให้ได้โปรตีนและพลังงานสำหรับนำไปสร้างโปรตีนในต่อมไฮโปฟาริงค์มีปริมาณน้อย ระดับโปรตีนในต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงานหลังได้รับเชื้อ *N. ceranae* จึงต่ำ แต่เมื่อผึ้งได้รับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 ppm สารละลายนี้จะช่วยลดการติดเชื้อได้ โดยกลุ่มที่ให้สารละลายไคโตซานชั้น peritrophic membrane ในทางเดินอาหารส่วนกลางจะมีความหนาเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ให้สารละลายไคโตซาน ชั้นที่หนานี้จะช่วยป้องกันการบุกรุกของเชื้อ *Nosema* ได้ ทำให้อัตราการติดเชื้อลดลง ระบบทางเดินอาหารก็ทำงานได้ดีกว่าที่ผึ้งกลุ่มที่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซาน จึงดูดซึมโปรตีนและพลังงานได้มากกว่าผึ้งกลุ่มที่ไม่ได้ให้สารให้สารละลายไคโตซาน และส่งผลให้ต่อมไฮโปฟาริงค์ผลิตโปรตีนได้สูงกว่าผึ้งกลุ่มที่ไม่ได้ให้สารละลายไคโตซาน

บรรณานุกรม
(Bibliography)

- Anderson, D. L., & Giaccon, H. (1992). Reduced Pollen Collection by Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies Infected with *Nosema apis* and Sacbrood Virus. *Journal of Economic Entomology*, 85(1), 47-51. doi:10.1093/jee/85.1.47
- Bailey, L., & Ball, B. V. (1991). 6 - MICROSPORA AND PROTOZOA. In L. Bailey & B. V. Ball (Eds.), *Honey Bee Pathology (Second Edition)* (pp. 64-77). London: Academic Press.
- Baker, H. G., Cruden, R. W., & Baker, I. (1971). Minor Parasitism in Pollination and Its Community Function: The Case of *Ceiba acuminata*. *Bioscience*, 21(22), 1127.
- Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R., & de Graaf, D. C. (2017). *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. 61(Pt A), 13-19. doi:10.1016/j.ejop.2017.07.002
- Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., & Pettis, J. S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J Invertebr Pathol*, 97(2), 186-188. doi:10.1016/j.jip.2007.07.010
- Clark, T. B. (1980). A second microsporidian in the honeybee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 35(3), 290-294. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(80\)90164-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(80)90164-0)
- de Graaf, J. B., Sittig, A. C., & Denier van der Gon, J. J. (1994). Misdirections in slow, goal-directed arm movements are not primarily visually based. *Exp Brain Res*, 99(3), 464-472.
- Ellis, J. D., & Munn, P. A. (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86(4), 88-101. doi:10.1080/0005772X.2005.11417323
- Franzen, C., & Müller, A. (1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clinical microbiology reviews*, 12(2), 243-285.

- Fries, I. (1989). Observations on the Development and Transmission of *Nosema Apis* Z. In the Ventriculus of the Honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 28(2), 107-117. doi:10.1080/00218839.1989.11100830
- Fries, I., Ekbohm, G., & Villumstad, E. (1984). *Nosema Apis*, Sampling Techniques and Honey Yield. *Journal of Apicultural Research*, 23(2), 102-105. doi:10.1080/00218839.1984.11100617
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniasek, N. J. (1996). *Nosema ceranae* n. sp.(Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32(3), 356-365.
- Fries, I., Martín, R., Meana, A., García-Palencia, P., & Higes, M. (2006). Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45(4), 230-233. doi:10.1080/00218839.2006.11101355
- Goodman, M., Houten, A. t., Perry, J., & Blackmann, R. (1990). Cost benefit analysis of using fumagillin to treat nosema. *New Zealand Beekeeper*(208), 11-12.
- Goodwin, R. M., Perry, J. H., & Houten, A. T. (1994). The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. *Journal of Apicultural Research*, 33(4), 209-212. doi:10.1080/00218839.1994.11100873
- Hassanein, M. (1953). The influence of infection with *Nosema apis* on the activities and longevity of the worker honeybee. *Annals of Applied Biology*, 40(2), 418-423.
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R., & Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporida). *J Invertebr Pathol*, 94(3), 211-217. doi:10.1016/j.jip.2006.11.001
- Huang, W.-F., Jiang, J.-H., Chen, Y.-W., & Wang, C.-H. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 38(1), 30-37.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., . . . Paxton, R. J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*, 96(1), 1-10. doi:10.1016/j.jip.2007.02.014

- Malone, L., A., Giacom, H., A., & Newton, M., R. (1995). Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis*. *Z. Apidologie*, 26(6), 495-502.
- Malone, L., & Gatehouse, S. (1998). *Effects of Nosema apis Infection on Honey Bee (Apis mellifera) Digestive Proteolytic Enzyme Activity* (Vol. 71).
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E., & Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6331-6338.
doi:10.1128/AEM.00270-07
- Matheson, A. (1993). World Bee Health Report. *Bee World*, 74(4), 176-212.
doi:10.1080/0005772X.1993.11099183
- Matheson, A. (1996). World bee health update 1996. *Bee World*, 77(1), 45-51.
doi:10.1080/0005772X.1996.11099281
- Mayack, C., & Naug, D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol*, 100(3), 185-188.
doi:10.1016/j.jip.2008.12.001
- Mayack, C., & Naug, D. (2010). Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J Insect Physiol*, 56(11), 1572-1575.
doi:10.1016/j.jinsphys.2010.05.016
- Mayack, C., & Naug, D. (2013). Individual energetic state can prevail over social regulation of foraging in honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67(6), 929-936. doi:10.1007/s00265-013-1517-6
- McGregor, S. E. (1976). *Insect pollination of cultivated crop plants* (Vol. 496):
Agricultural Research Service, US Department of Agriculture Washington, DC.
- Peters, M. J., Suwannapong, G., Pelin, A., & Corradi, N. (2018). Genetic and Genome Analyses Reveal Genetically Distinct Populations of the Bee Pathogen *Nosema ceranae* from Thailand. *Microb Ecol*. doi:10.1007/s00248-018-1268-z
- Rinderer, T. E., & Dell Elliott, K. (1977). Worker Honey Bee Response to Infection with *Nosema apis*: Influence of Diet. *Journal of Economic Entomology*, 70(4), 431-433. doi:10.1093/jee/70.4.431

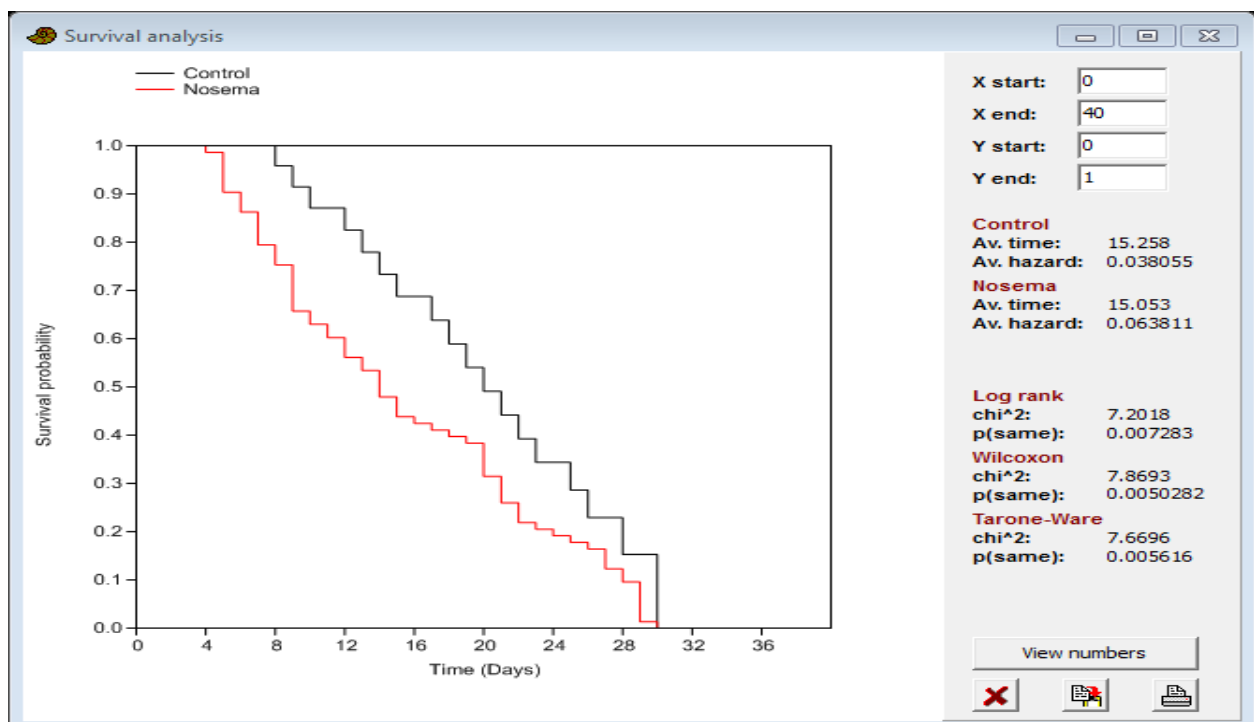
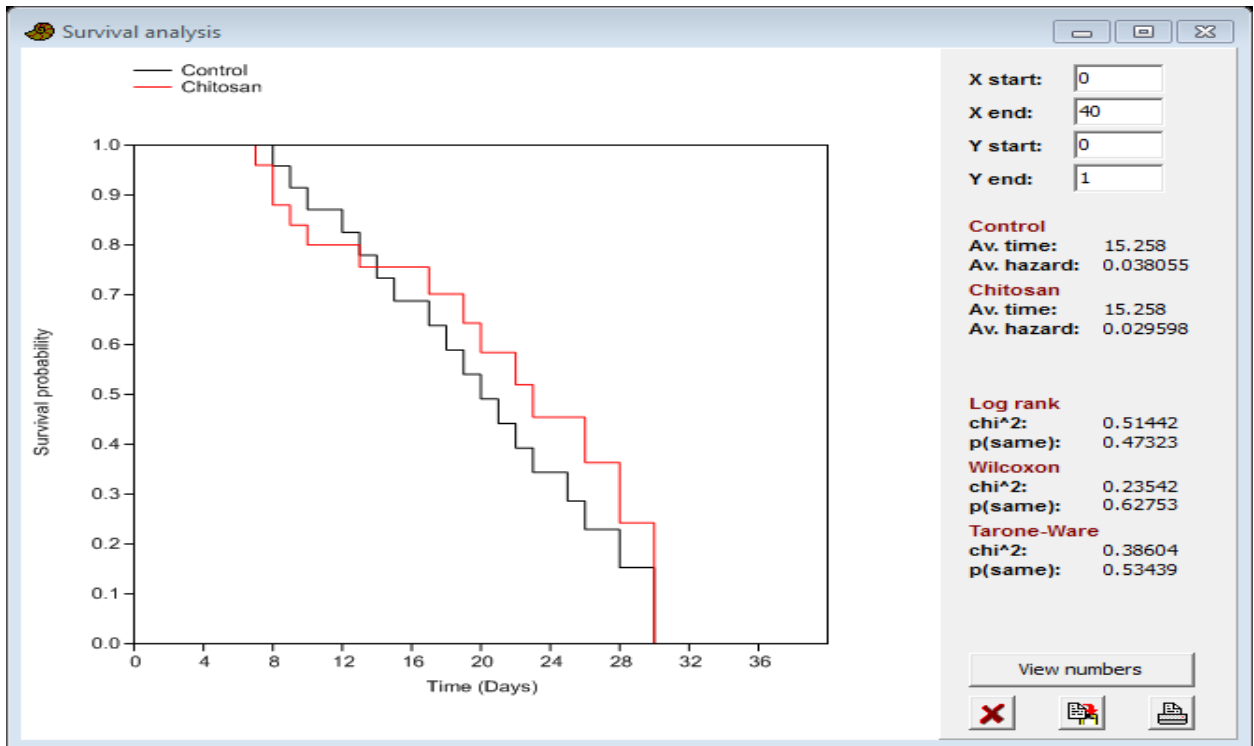
- Rinderer, T. E., & Sylvester, H. A. (1978). Variation in Response to *Nosema apis*, Longevity, and Hoarding Behavior in a Free-Mating Population of the Honey Bee1, 2. *Annals of the Entomological Society of America*, 71(3), 372-374. doi:10.1093/aesa/71.3.372
- Ritter, W. (2001). *Enfermedades de las abejas*. . In: Acribia S.A. (Ed.), Spain.: Zara-goza.
- Sanchez Collado, J. G., Higes, M., Barrio, L., & Martin-Hernandez, R. (2014). Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitol Res*, 113(5), 1695-1701. doi:10.1007/s00436-014-3814-z
- Solter, L. F. (2010). *Managed Pollinator CAP Coordinated Agricultural Project A National Research and Extension Initiative to Reverse Pollinator Decline Microsporidia: Friend, Foe (and Intriguing Creatures)* (Vol. 150).
- Suwannapong, G., Maksong, S., Phainchajoen, M., Benbow, M. E., & Mayack, C. (2018). Survival and health improvement of *Nosema* infected *Apis florea* (Hymenoptera: Apidae) bees after treatment with propolis extract. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(2), 437-444. doi:10.1016/j.aspen.2018.02.006
- Suwannapong, G., Maksong, S., Seanbualuang, P., & Benbow, M. E. (2010). Experimental infection of red dwarf honeybee, *Apis florea*, with *Nosema ceranae*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(4), 361-364. doi:10.1016/j.aspen.2010.07.003
- Suwannapong, G., Maksong, S., Yemor, T., Junsuri, N., & Benbow, M. E. (2013). Three species of native Thai honey bees exploit overlapping pollen resources: Identification of bee flora from pollen loads and midguts from *Apis cerana*, *A. dorsata* and *A. florea*. *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 196-201. doi:10.3896/IBRA.1.52.5.05
- Suwannapong, G., Yemor, T., Boonpakdee, C., & Benbow, M. E. (2011). *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(2), 236-241. doi:10.1016/j.jip.2010.10.003
- Wang, D.-I., & Moeller, F. (1969). Histological comparisons of the development of hypopharyngeal glands in healthy and *Nosema*-infected worker honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14(2), 135-142.

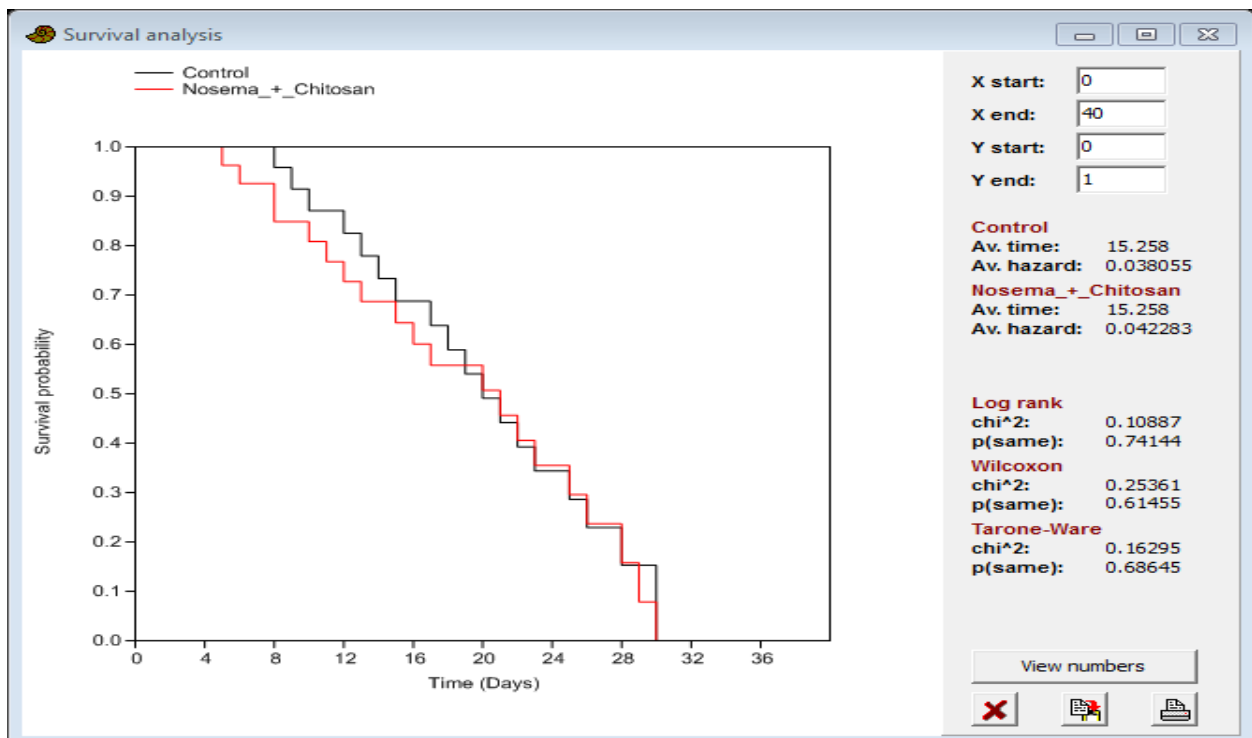
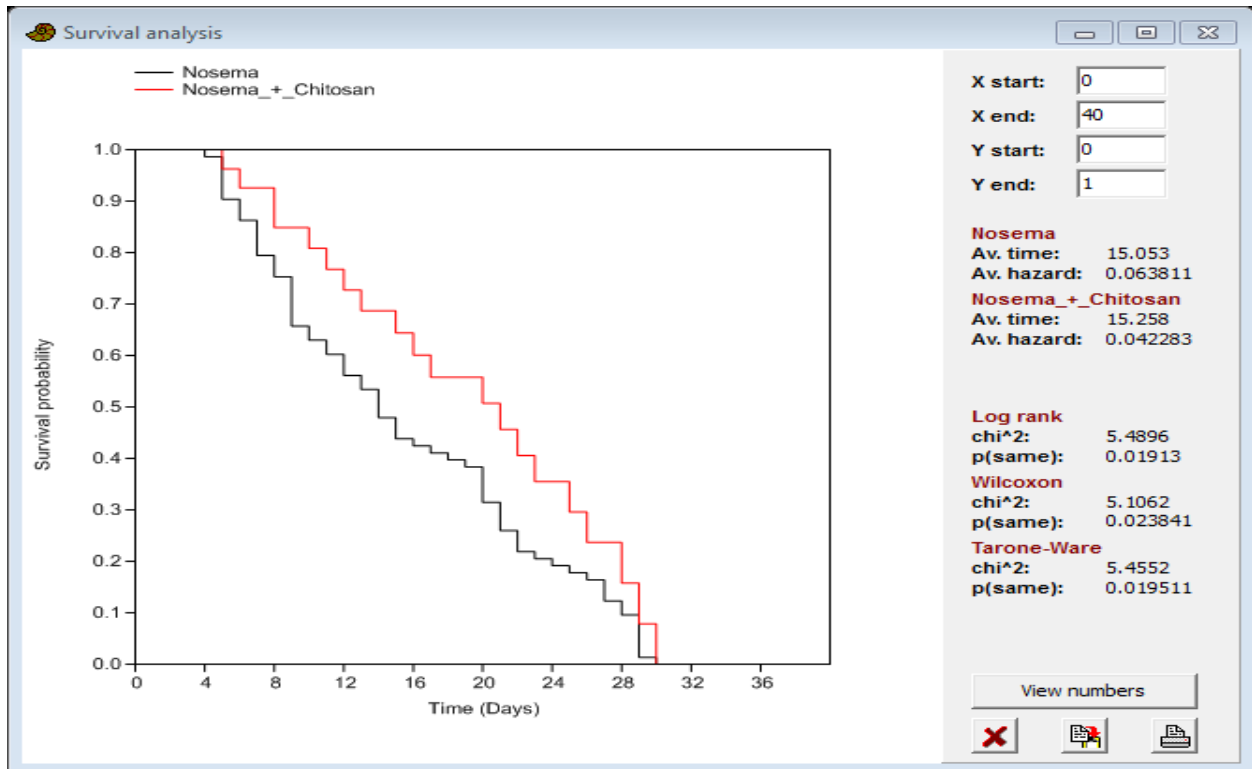
- Wang, D.-I., & Moeller, F. E. (1971). Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of worker honey bees infected by *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17(3), 308-320. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90002-4)
- Williams, G. R., Shafer, A. B., Rogers, R. E., Shutler, D., & Stewart, D. T. (2008). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *J Invertebr Pathol*, 97(2), 189-192. doi:10.1016/j.jip.2007.08.005
- Yemor, T., Phiancharoen, M., Eric Benbow, M., & Suwannapong, G. (2015). Effects of stingless bee propolis on *Nosema ceranae* infected Asian honey bees, *Apis cerana*. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 468-473. doi:10.1080/00218839.2016.1162447
- Zander, E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung*, 31, 196-204.

ภาคผนวก
(Appendix)

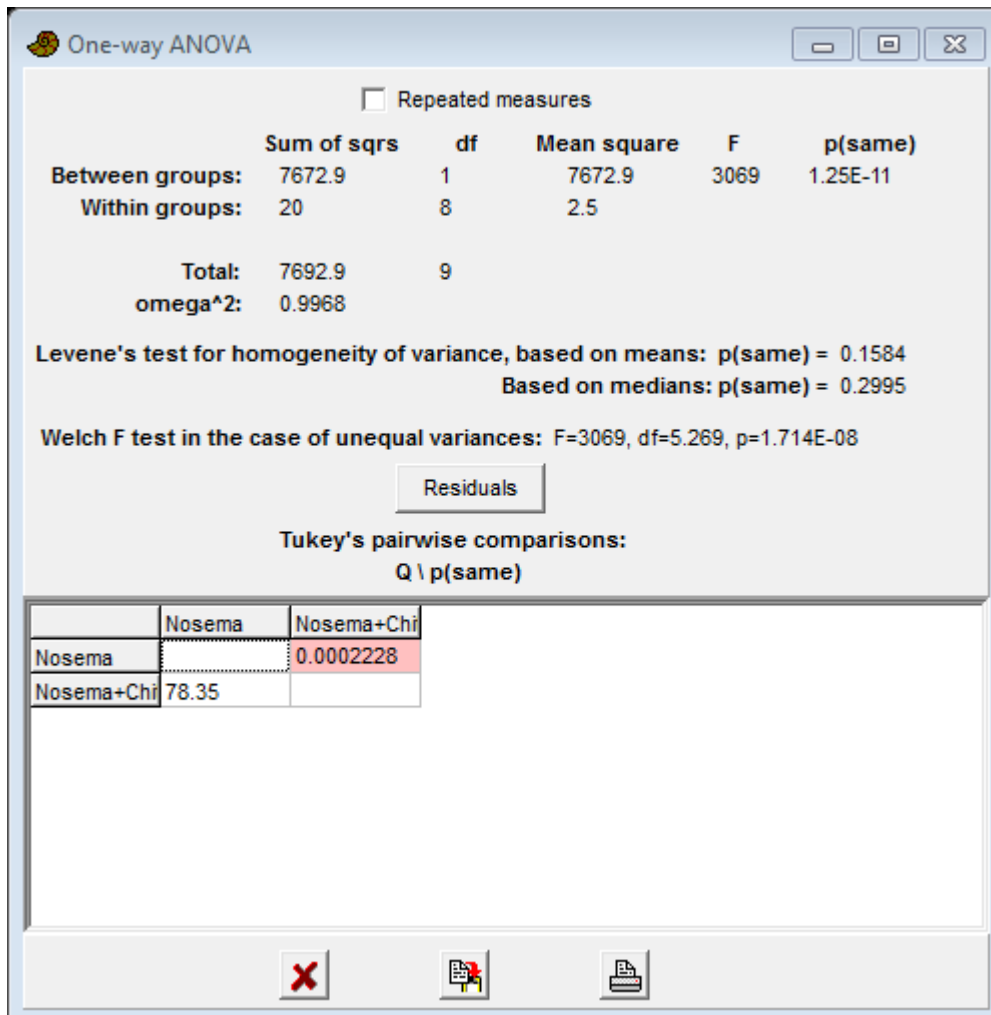
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม PAST

1. ผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่ออัตราการตาย (Mortality) ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน

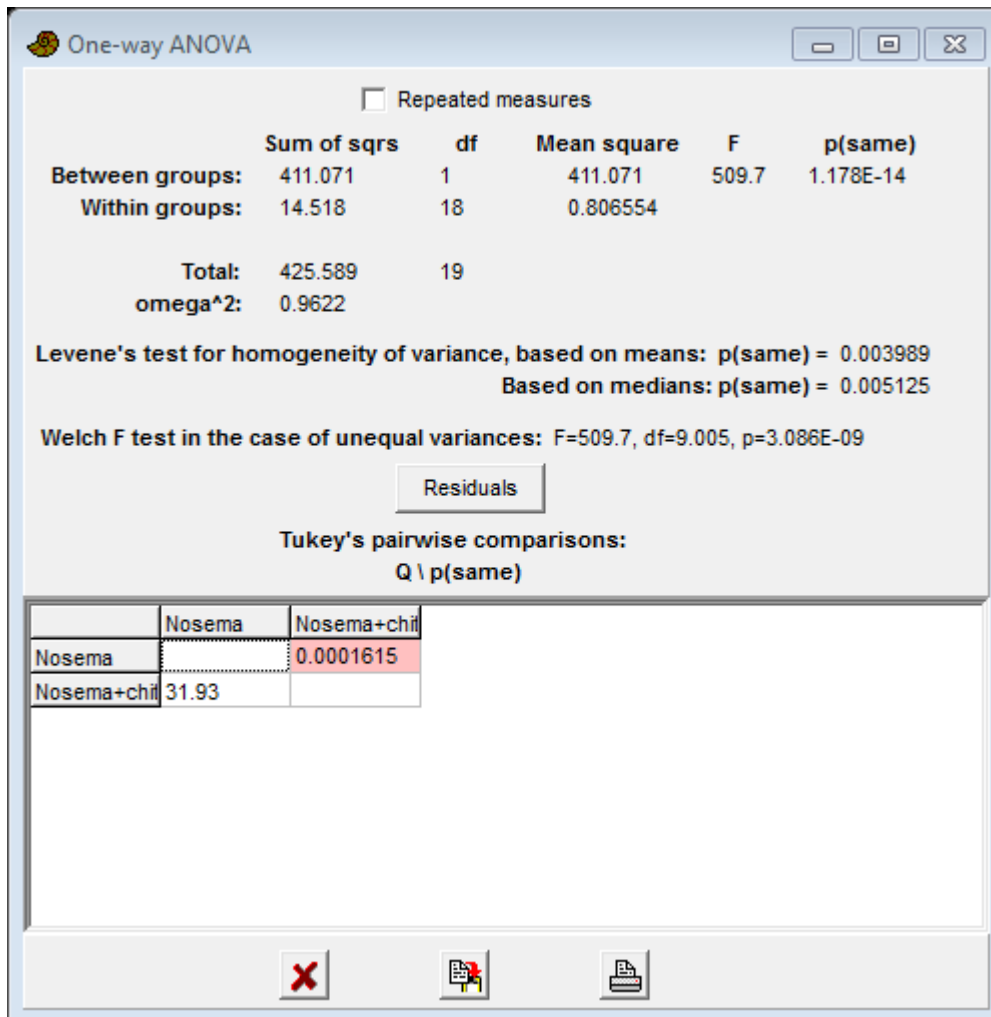




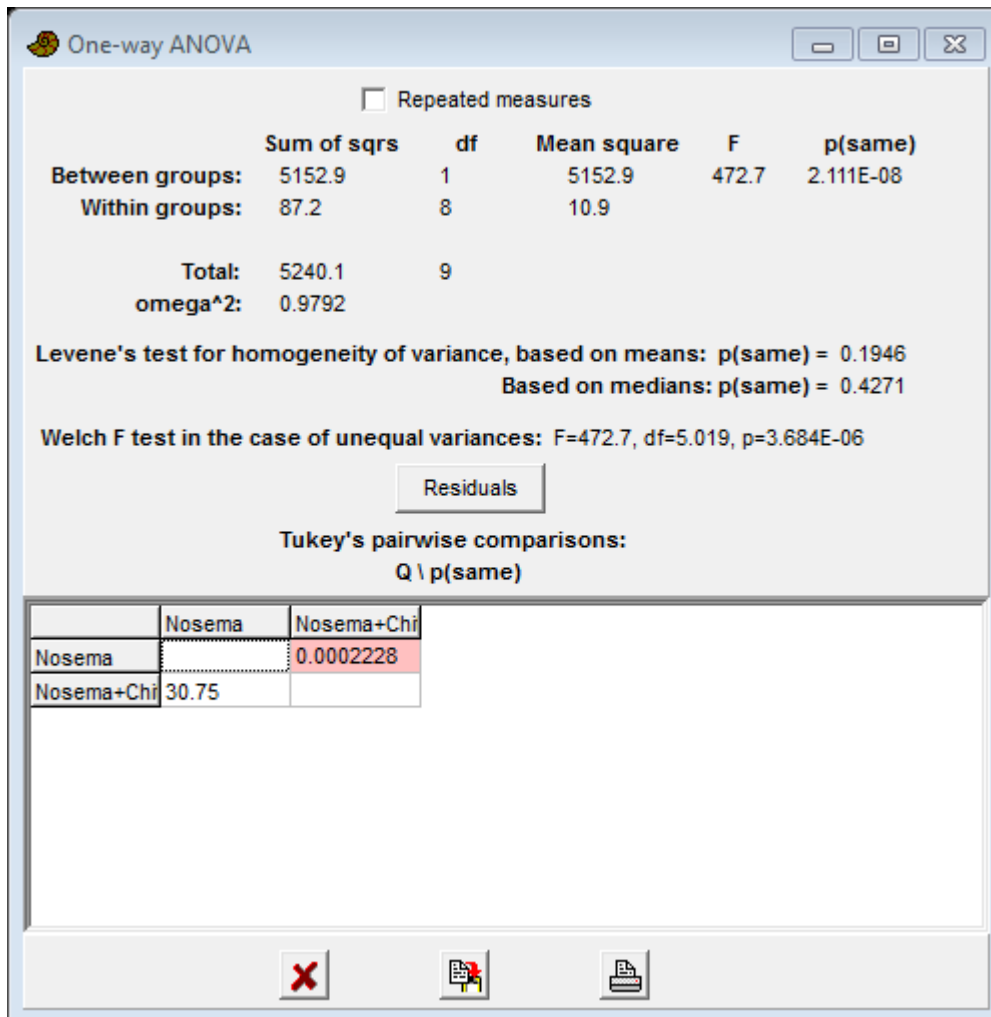
2. ผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่ออัตราการติดเชื้อ (infection rate) ของผึ้งหลวงวรรณะ
ฝักงาน



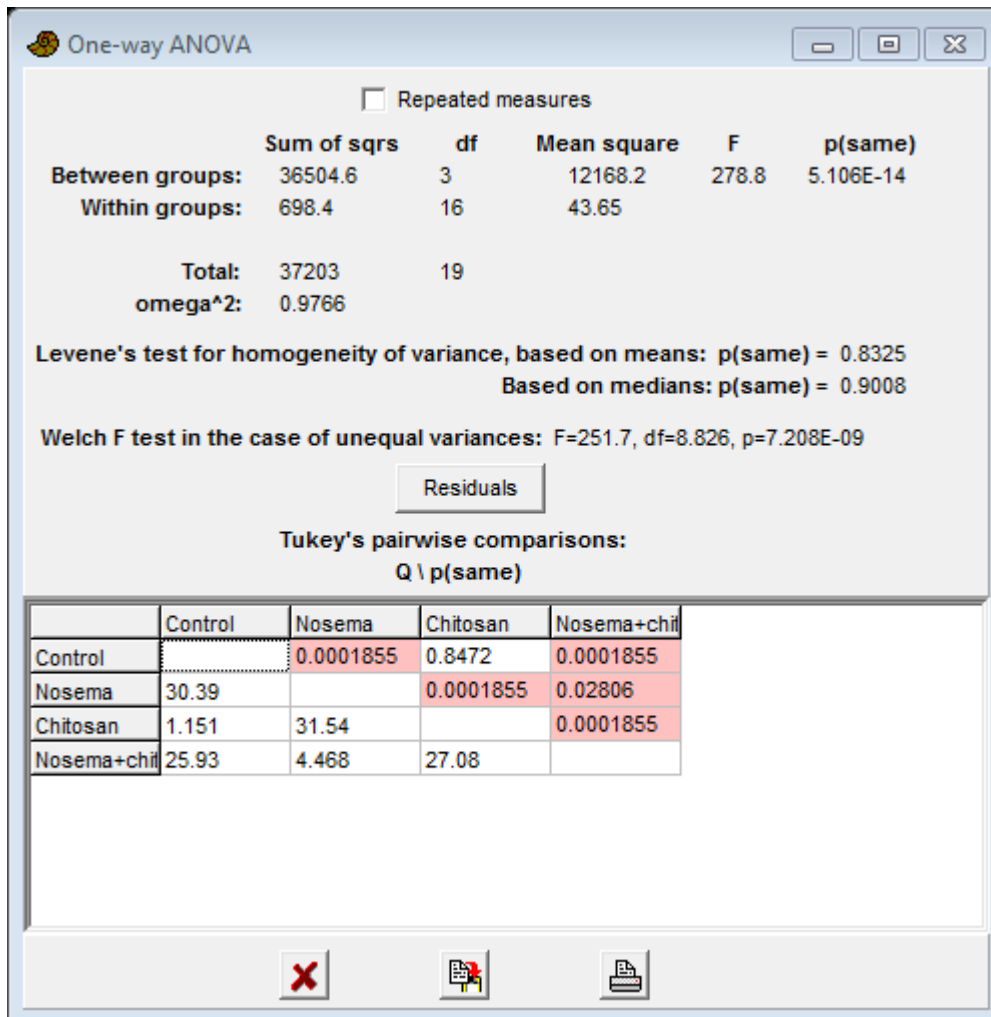
3. ผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่อประสิทธิภาพการติดเชื้อ (infectivity) ในเซลล์ลำไส้ ส่วนกลางของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน



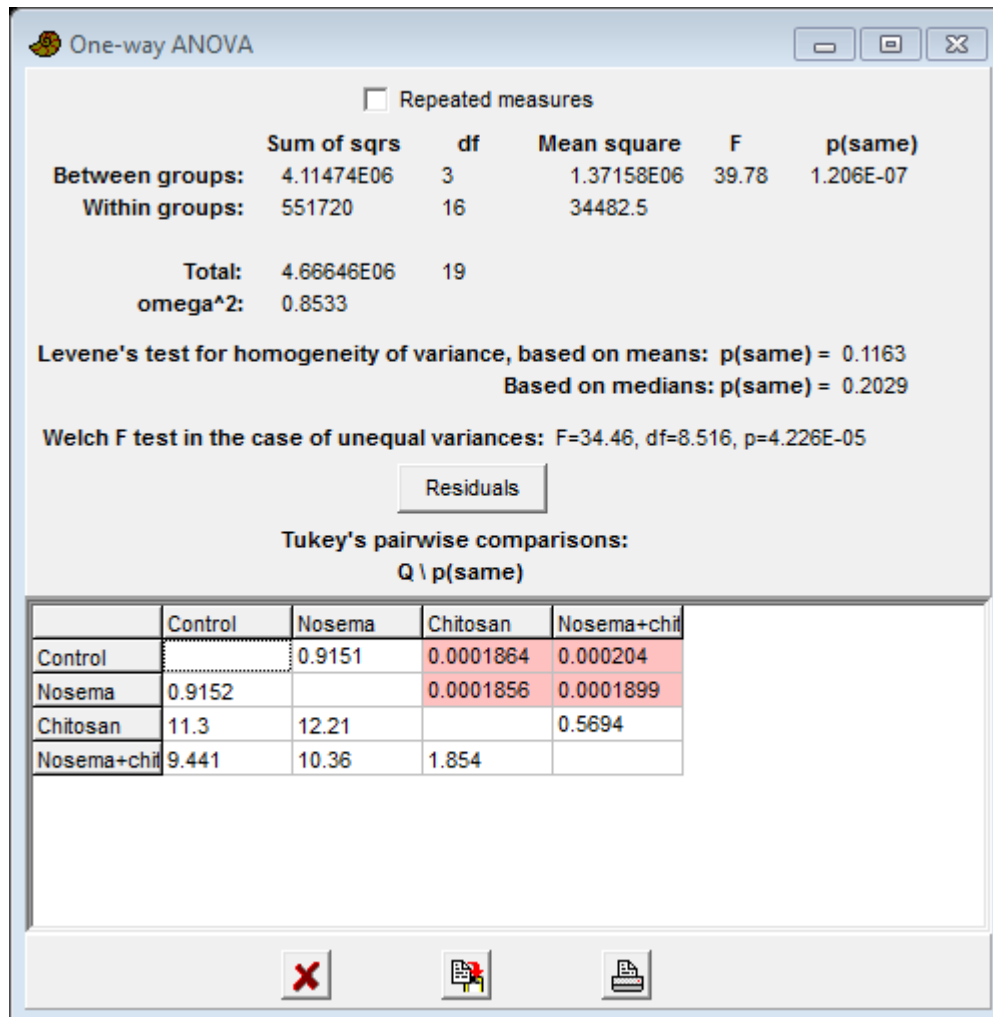
4. ผลของเชื้อ *Nosema ceranae* ต่ออัตราการติดเชื้อในเซลล์ลำไส้ส่วนกลาง (infection ratio) ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน



5. ผลของเชื้อ *N. ceranae* ต่อระดับน้ำตาลทรีฮาโลสในน้ำเลือดของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน



6. ผลของเชื้อ *N. ceranae* ต่อปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งหลวงวรรณะผึ้งงาน



ประมวลภาพการทำวิจัย

กิจกรรม	คำอธิบาย
	<p>ภาพลงพื้นที่ไปเก็บตัวอย่างผึ้งหลวงที่ จังหวัดสมุทรสาคร</p>
	<p>ภาพลงพื้นที่ไปเก็บตัวอย่างผึ้งหลวงที่ จังหวัดสมุทรสาคร</p>
	<p>ภาพลงม่น (พรานตีผึ้งหลวง) กำลังปีนต้น มะม่วงไปเก็บตัวอย่างผึ้งหลวง จังหวัดสมุทรสาคร</p>



ภาพลุงมัน (พรานตีผึ้งหลวง) กำลังปีนต้น
มะพร้าวไปเก็บตัวอย่างผึ้งหลวง
จังหวัดสมุทรสาคร



ภาพลุงมัน (พรานตีผึ้งหลวง) กำลังปีนต้น
มะม่วงและใช้ควั่นรผึ้งหลวงเพื่อเก็บ
ตัวอย่าง
จังหวัดสมุทรสาคร



ภาพรังผึ้งหลวงบนกิ่งของต้นมะม่วง
จังหวัดสมุทรสาคร

	<p>ภาพลงพื้นที่ไปเก็บตัวอย่างผึ้งหลวงที่ จังหวัดนครราชสีมา</p>
	<p>ภาพลงพื้นที่ไปเก็บตัวอย่างผึ้งหลวงที่ จังหวัดนครราชสีมา</p>
	<p>ภาพถ่ายร่วมกับชาวบ้านผู้นำทางไปเก็บ ตัวอย่างผึ้งหลวง จังหวัดลำปาง</p>

	<p>ภาพการเก็บตัวอย่างพืชหลวงบริเวณลำธาร จังหวัดลำปาง</p>
	<p>ภาพรังผึ้งหลวงจำนวนมากที่อยู่บนต้นผึ้ง จังหวัดลำปาง</p>
	<p>ภาพถ่ายประธานและคณะกรรมการในการ สอบดุขุฎีนิพนธ์ของนิสิตปริญญาเอกใน หน่วยวิจัยผึ้ง</p>



ภาพถ่ายรังผึ้งสำหรับนำผึ้งพันธุ์มาใช้ในการเพิ่มจำนวน (propagation) สปอร์ของ *Nosema* มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี



ภาพถ่ายผึ้งพันธุ์สำหรับนำใช้ในการเพิ่มจำนวน (propagation) สปอร์ของ *Nosema* มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี



ภาพถ่ายการป้อนเชื้อ *Nosema* ในผึ้งหลวงสำหรับการทดลอง มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี



ภาพถ่ายกรงที่ใช้ในการเลี้ยงผึ้งทดลอง
ในกรงจะเตรียม
น้ำเปล่า (ขวดติดสติ๊กเกอร์สีเขียว)
สารละลายซูโครสความเข้มข้น 50
เปอร์เซ็นต์ (ขวดติดสติ๊กเกอร์สีเหลือง)
Queen pheromone และ bee bread
สำหรับเลี้ยงผึ้ง



ภาพถ่ายกรงผึ้งทดลองที่เลี้ยงในตู้ควบคุม
อุณหภูมิ 33 ± 1 องศาเซลเซียส