

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาโรคของผึ้งพื้นเมืองในประเทศไทย

โดย

ศาสตราจารย์ ดร.สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ

สถาบันวิจัยบริการ
30 พฤศจิกายน 2550
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย

การศึกษาโรคของผึ้งพื้นเมืองในประเทศไทย

ชื่อผู้วิจัย

ศาสตราจารย์ ดร.สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ

รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ

30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2550

บทคัดย่อ

โรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียนที่เกิดในผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* แล้วแพร่มาถึงผึ้งโพรง *Apis cerana* พบระบาดทั่วไปในยุโรป เอเชีย และแอฟริกา ส่วนมากตัวอ่อนที่ตายด้วยโรคเน่ายูโรเปียนเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus alvei* (Cheshire and Cheyne, 1885) ซึ่งเป็นเชื้อที่ย้อมแกรมแล้วติดสี แกรมบวก (gram-positive rod) colony สามารถเคลื่อนที่ได้ และสร้าง spore รูปไข่ นอกจากนี้ยังมีเชื้อ *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* และ *Achromobacter Eurydice* ร่วมในการเกิดโรค แต่พบว่าแบคทีเรีย 4 ชนิดนี้ถูกพบในรังที่เป็นโรคน้อยกว่าการพบเชื้อชนิด *P. alvei* การศึกษาตัวอ่อนผึ้งหลวง *Apis dorsata* จากรังที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดสมุทรสงครามทุกรังพบตัวอ่อนที่อยู่ในสภาพปกติไม่มีการติดโรค เนื้อเยื่อที่ศึกษาประกอบด้วย เนื้อเยื่อระบบทางเดินอาหาร ตั้งแต่ปากถึงทวารและต่อมน้ำลาย ระบบแลกเปลี่ยนก๊าซ ซึ่งประกอบด้วย ช่องลม ท่อลมและถุงลม ระบบขับถ่ายซึ่งมีท่อมัลพิเกียนจำนวน 5-6 ท่อ ระบบไหลเวียนเลือด หัวใจ แอ่งรับเลือด และเม็ดเลือด 4 ชนิด ระบบประสาทประกอบด้วย สมองและปมประสาทบริเวณใต้หลอดอาหาร ที่ส่วนอกและส่วนท้อง รวม 13 ปม และจากการศึกษาผึ้งโพรงที่หน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสมุทรสงคราม พบว่ามีตัวอ่อนของผึ้งโพรง *Apis cerana* ตายด้วยลักษณะของการเกิดโรคเน่ายูโรเปียน คือ ลำตัวจะงอเป็นรูปตัว C สีลำตัวจะเปลี่ยนเป็น สีเทา และน้ำตาลในระยะต่อมา มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว จึงนำตัวอย่างตัวอ่อนที่ตายมาศึกษาโดยการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคออกมา พบว่าสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างน้อย 5 ชนิด พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด และเชื้อรา 2 ชนิด จึงนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมาศึกษาด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาพบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด อาจจะไม่ใช่แบคทีเรียชนิด *P. alvei* เนื่องจากลักษณะสำคัญของ *P. alvei* คือ โคไลนีสามารถเคลื่อนที่ได้แต่โคไลนีของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่แยกได้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ทั้งนี้การที่จะทำการ identify ชนิดของแบคทีเรียจนถึง species ต้องการข้อมูลจากการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อของตัวอ่อนผึ้งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียน พบว่า เซลล์และเนื้อเยื่อของระบบต่าง ๆ ทุกระบบถูกทำลาย ทางเดินอาหารถูกทำลายเหลือเพียงบางส่วนของถุงพักอาหาร ช่องลมและท่อลมถูกทำลาย บริเวณหัวใจและแอ่งรับเลือดสลายตัว สมองและปมประสาทส่วนต่าง ๆ ถูกทำลาย

Project Title	Study of native honey bee disease in Thailand
Name of the Investigators	Prof. Dr. Siriwat Wongsiri Assoc. Prof. Dr. Kingkaew Wattanasirmit Assist. Prof. Dr. Chanpen Chanchao
Year	2007

Abstract

European foulbrood in *Apis cerana* widely spreads in Europe, America, Asia, and Africa. *Paenibacillus alvei* is the most well known cause of the death in larva (Cheshire and Cheyne, 1885). *P. alvei* is gram-positive rod, colony swarming, and oval spore forming. In addition, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, and *Achromobacter eurydice* are the cause of this disease but less found. Alternatively, histological study was used to determine the condition of infectious tissue. Larvae of *A. dorsata* from Chiang Mai and Samut Songkram were collected and dissected. The result indicated that all larvae were not infected. Dissected tissues were composed of digestive system (from the mouth to the anus), respiratory system (alveolus, trachea, and terminal sac), excretory system which comprises of 5-6 Mulpighian tubules, circulatory system (heart, hemocoel, and 4 kinds of blood cells), and neural system (brain and 13 ganglia at the esophagus region, thorax region, and abdominal region). From the field trip study at Bee Biology Research Unit of Chulalongkorn University in Samut Songkram, sick larvae of European foulbrood were determined by the C-shape looking, the change of body color to gray and brown, and the sour smell. Then, the interesting specimens were collected in order to isolate the pathogenic microorganisms in a laboratory. There were at least 5 kinds of pathogenic microorganisms, 3 of 5 pathogens were bacteria while the rest were fungi. *P. alvei* might not be included in those kinds of pathogenic bacteria because colonies of those 3 pathogenic bacteria were not swarming at all. More experiments on microbial diagnosis should be performed. In addition, histology of infected larvae of *A. cerana* was examined. It was found that all tissue and cells of all systems mentioned above were damaged. In digestive system, only crop remained. Alveolus and trachea of respiratory system were damaged. Also, heart and hemocoel (circulatory system) together with brain and ganglia (neural system) were obliterated.

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
สารบัญ.....	iv
สารบัญตาราง.....	v
สารบัญรูป.....	vi
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
วิธีการวิจัย.....	5
ผลการวิจัย.....	7
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	59
เอกสารอ้างอิง.....	62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตารางแสดงลักษณะโดยทั่วไปของ <i>Paenibacillus alvei</i>	3
ตารางที่ 2 ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอ่อนผึ้งโพรงที่ตายด้วยลักษณะของการเกิดโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียน.....	7



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้งหลวงอายุ 3 วัน ที่บริเวณทางเดินอาหารส่วนต้น	13
รูปที่ 2 แสดงถุงพักอาหาร.....	14
รูปที่ 3 แสดงรอยต่อบริเวณ proventriculus กับกระเพาะ.....	14
รูปที่ 4 แสดงรอยต่อของ proventriculus กับกระเพาะบริเวณ proventricular valves.....	14
รูปที่ 5 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางบริเวณ ventriculus หรือกระเพาะ.....	15
รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของ ventriculus ในบริเวณส่วนท้องของตัวอ่อน.....	16
รูปที่ 7 ภาพขยายเยื่อบุผิวกระเพาะตัวอ่อนผึ้ง.....	17
รูปที่ 8 แสดงทางเดินอาหารส่วนท้าย.....	17
รูปที่ 9 แสดงลำไส้ใหญ่ส่วน colon.....	18
รูปที่ 10 แสดงลำไส้ใหญ่ส่วน colon และ rectum.....	18
รูปที่ 11 แสดงบริเวณทวารหนัก และลำไส้ใหญ่ส่วน rectum.....	19
รูปที่ 12 แสดงต่อมสร้างเส้นใย silk gland บริเวณใต้ปากและลำตัว.....	19
รูปที่ 13 แสดงรายละเอียดต่อมสร้างเส้นใยตัดตามขวาง.....	20
รูปที่ 14 แสดงภาพขยายบริเวณลำไส้เล็กที่มี ท่อมัลทิเกียน.....	20

รูปที่ 15 แสดงภาพขยาย malpighian tubule ที่แทรกระหว่างรอยต่อของกระเพาะกับลำไส้เล็ก.....	21
รูปที่ 16 แสดงตำแหน่งท่อขับถ่ายของเสีย malpighian tubule.....	21
รูปที่ 17 แสดงโครงสร้างท่อ malpighian tubule ตามแนวขวาง โครงสร้างผนังท่อประกอบด้วยเซลล์รูปแบนบาง ภายใน lumen มีผลึกสารย้อมติดสีชมพู.....	22
รูปที่ 18 แสดงท่อขับถ่ายของเสีย malpighian tubule ที่แทรกระหว่างhaematocyte.....	22
รูปที่ 19 แสดงระบบแลกเปลี่ยนก๊าซหรือระบบหายใจตลอดความยาวของตัวอ่อนในบริเวณส่วนหัวและส่วนอก.....	23
รูปที่ 20 แสดงช่อง spiracle ที่มีท่อลม trachea เชื่อมต่อระหว่างช่อง spiracle ในแนวด้านข้างของลำตัวเป็นสายหลักตลอดแนวส่วนท้อง.....	23
รูปที่ 21 แสดงภาพขยายช่อง spiracle ตามแนวขวาง.....	24
รูปที่ 22 ภาพแสดงช่อง spiracle และท่อลม trachea.....	25
รูปที่ 23 แสดงช่องเปิด spiracle บริเวณหัวและระบบท่อลม.....	26
รูปที่ 24 แสดงระบบท่อลมในบริเวณส่วนหัว ส่วนอกและส่วนท้อง.....	26
รูปที่ 25 แสดงโครงสร้างท่อลม ที่ประกอบด้วย simple cuboidal epithelium เยื่อชั้น cuticular intima.....	27
รูปที่ 26 แสดงการแตกสาขาของท่อลมตามลำดับจากท่อลมขนาดใหญ่.....	28
รูปที่ 27 แสดงการแตกสาขาย่อยของท่อลม trachea ลงไปเป็นท่อลมฝอย tracheole.....	28

รูปที่ 28 แสดงรอยต่อเชื่อมระหว่างท่อลม trachea กับท่อลมฝอย tracheole ในบริเวณกลุ่มเซลล์เม็ดเลือด.....	29
รูปที่ 29 แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของระบบแลกเปลี่ยนก๊าซหรือ ระบบหายใจซึ่งประกอบด้วยช่อง spiracle ท่อลมใหญ่ ท่อลมย่อยและถุงลม.....	29
รูปที่ 30 แสดงภาพขยายของถุงลม air sac บริเวณใกล้กับท่อลมขนาดต่าง ๆ.....	30
รูปที่ 31 แสดง dorsal sinus ในช่วง aorta ซึ่งอยู่ในบริเวณส่วนหัวและอกและ dorsal vessel หรือ heart ในบริเวณส่วนท้อง.....	30
รูปที่ 32 แสดง aorta บริเวณส่วนหัว อก และ dorsal vessel หรือหัวใจ.....	31
รูปที่ 33 แสดง dorsal sinus ในบริเวณที่เป็น dorsal vessel หรือหัวใจซึ่งมีเยื่อเกี่ยวพัน pericardial septum.....	31
รูปที่ 34 แสดง ventral sinus หรือ perineural sinus และ ventral diaphragm อยู่ด้านล่างบริเวณส่วนท้องของตัวอ่อน.....	32
รูปที่ 35 แสดงหัวใจ 3 ห้องเหนือบริเวณ midgut หรือ ventriculus.....	32
รูปที่ 36 แสดงช่อง ostia ของหัวใจที่มีกลุ่ม haematocyte อยู่ภายในช่อง บริเวณ pericardial septum ในส่วนท้องเหนือ mid gut ของตัวอ่อน.....	33
รูปที่ 37 แสดงหัวใจทั้ง 4 ห้อง เหนือบริเวณ mid gut และรู ostia.....	33
รูปที่ 38 แสดงหัวใจ 3 ห้อง ที่มี ostia และ pericardial septum.....	34
รูปที่ 39 แสดงโครงสร้าง dorsal vessel หรือหัวใจตัวอ่อนซึ่งประกอบด้วย pericardial septum กั้นระหว่าง dorsal sinus.....	35

รูปที่ 40 แสดง dorsal vessel ส่วนต้นซึ่งเป็น aorta 3 ห้อง บริเวณส่วนหน้าของ heart ในช่อง อก ตัวอ่อนผึ้ง.....	36
รูปที่ 41 แสดงเนื้อเยื่อในระบบไหลเวียนเลือดของตัวอ่อนผึ้งซึ่งประกอบด้วยน้ำเลือด haemolymph และเม็ดเลือดชนิดที่อยู่ในระยะวัยอ่อน prohaematocyte.....	36
รูปที่ 42 แสดงเม็ดเลือดชนิด prohaematocyte ในบริเวณหัวใจและช่องว่างในบริเวณลำตัวใต้ pericardial septum.....	37
รูปที่ 43 แสดงเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ prohaematocyte plasmatocyte.....	37
รูปที่ 44 แสดงรูปร่างลักษณะของ plasmatocyte.....	38
รูปที่ 45 แสดงรูปร่างลักษณะของ granulocyte เปรียบเทียบกับ plasmatocyte granulocyte.....	38
รูปที่ 46 แสดงเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในบริเวณช่องว่างภายในลำตัวใกล้ๆ ท่อลม trachea และท่อ ขับถ่ายของเสีย malpighian tubule.....	39
รูปที่ 47 A-B แสดงลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือด adipohaematocyte หรือ spheroidocyte และ เม็ดเลือดชนิด granulocyte.....	40
รูปที่ 48 แสดงเม็ดเลือดชนิด adipohaematocyte เปรียบเทียบกับ plasmatocyte และ granulocyte.....	41
รูปที่ 49 แสดงระบบประสาทของตัวอ่อนผึ้งหลวงที่บริเวณส่วนหัว.....	41
รูปที่ 50 แสดง brain ตัวอ่อนผึ้งที่อยู่เหนือทางเดินอาหารส่วนต้นบริเวณหลอดอาหาร และมีปม ประสาทปมที่หนึ่ง suboesophageal ganglion.....	42
รูปที่ 51 แสดง brain และ suboesophageal ganglion.....	43

รูปที่ 52 ภาพขยายสมองตัวอ่อนผึ้งหลวง แสดงลักษณะโครงสร้างเซลล์ประสาท.....	44
รูปที่ 53 ภาพขยายสมอง แสดงโครงสร้างที่ประกอบด้วย multipolar neuron, glial cell, myelinated fiber, non - myelinated fiber และ capsule หุ้มสมอง.....	45
รูปที่ 54 แสดงปมประสาทบริเวณส่วนอกปมที่ 1 และ 2 และปมประสาท บริเวณส่วนท้อง ปมที่ 1-4.....	46
รูปที่ 55 ภาพขยายปมประสาทส่วนอก thoracic ganglion ปมที่ 1 และปมที่ 2.....	47
รูปที่ 56 ภาพขยายปมประสาทส่วนอกปมที่ 1.....	47
รูปที่ 57 แสดงภาพขยายปมประสาทส่วนอก thoracic ganglion ปมที่ 2.....	48
รูปที่ 58 แสดง ventral nerve cord บริเวณปมประสาทส่วนอกปมที่ 2 และปมประสาทส่วนท้อง adominal ganglion ปมที่ 1-5.....	48
รูปที่ 59 แสดง ventral nerve cord บริเวณส่วนท้อง ซึ่งมี abdominal ganglion ปมที่ 4 5 และ 6.....	49
รูปที่ 60 แสดง ventral nerve cord ในบริเวณส่วนท้องใต้ทางเดินอาหารส่วน ventriculus และ ไส้ rectum ของ hind gut.....	49
รูปที่ 61 แสดงปมประสาทส่วนท้อง abdominal ganglion ปมที่ 7 8.....	50
รูปที่ 62 ภาพขยายของ abdominal ganglion ปมที่ 7 และ 8 ซึ่งเชื่อมติดกันเป็นปมขนาดใหญ่	50
รูปที่ 63 แสดงตัวอ่อนผึ้งโพรง <i>Apis cerena</i> ที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียนบริเวณหัวและลำตัว	51

รูปที่ 64 แสดงตัวอ่อนที่ที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียนบริเวณส่วน ventriculus.....	52
รูปที่ 65 ตัวอ่อนผึ้งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียน แสดงบริเวณของท่อของต่อมใกล้กับถุงเก็บ เกสรดอกไม้.....	52
รูปที่ 66 ตัวอ่อนผึ้งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียน แสดงบริเวณส่วนกลางของลำตัว ซึ่งมีท่อ ของต่อมน้ำลาย.....	53
รูปที่ 67 ตัวอ่อนผึ้งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียน.....	53
รูปที่ 68 แสดงกลุ่มเซลล์ที่ตายและกลุ่มเซลล์ haemocyte ที่ได้รับความเสียหาย.....	54
รูปที่ 69 แสดงกลุ่มเซลล์ที่ถูกทำลาย กระจายทั่วๆ ไป บริเวณชั้นผิวของตัวอ่อน.....	54
รูปที่ 70 แสดงกลุ่มเซลล์ของตัวอ่อนผึ้งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียน ที่ได้รับความเสียหาย	55
รูปที่ 71 แสดงกลุ่มของเซลล์ที่ตาย.....	55
รูปที่ 72 แสดงเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายเสียหาย.....	56
รูปที่ 73 แสดงบริเวณท่อลมขนาดใหญ่ ของตัวอ่อนผึ้งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียนประกอบ ด้วยกลุ่มเซลล์ของท่อลมและกลุ่มเซลล์ของต่อมในบริเวณใกล้ท่อลม.....	56
รูปที่ 74 แสดงเนื้อเยื่อตัวอ่อนปกติผึ้งโพรง <i>Apis cerana</i> อายุ 3 วัน.....	57
รูปที่ 75 แสดงทางเดินอาหารส่วนต้น และส่วนกลางของตัวอ่อนปกติผึ้งโพรง <i>Apis cerana</i> อายุ 3 วัน.....	58
รูปที่ 76 แสดงเนื้อเยื่อระบบไหลเวียนเลือดบริเวณหัวใจ.....	58

รูปที่ 77 แสดงเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular haematocyte prohaematocyte plasmalocyte
spheroidocyte..... 59



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผึ้งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างยิ่งชนิดหนึ่งตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากมนุษย์สามารถนำผลิตภัณฑ์จากผึ้งมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น การนำน้ำผึ้งมารับประทาน และประกอบอาหาร นำมาผสมในเครื่องสำอางค์ นำมาใช้เป็นยารักษาโรค นอกจากนี้ยังมีการนำไขผึ้ง นมผึ้ง และเกสรดอกไม้ที่ผึ้งเก็บมาได้ มาใช้ประโยชน์อีกด้วย ประโยชน์ที่สำคัญยิ่งของผึ้งคือการช่วยเกษตรกรในการผสมเกสรพืชต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นพืชสวน หรือพืชไร่ก็ตาม เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้เพียงพอ กับความต้องการของผู้ผลิตและผู้บริโภค (Wongsiri et al., 2000)

เมื่อผึ้งเป็นสัตว์ที่มีประโยชน์มากมายเช่นที่ได้กล่าวมา จึงมีผู้ที่นิยมเลี้ยงผึ้งเป็นจำนวนมากทั่วโลก ทั้งทวีปยุโรป เอเชีย และ ออสเตรเลีย ไม่ว่าจะเป็นประเทศไทย จีน ญี่ปุ่น แคนาดา ออสเตรเลีย และประเทศไทย เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยได้มีการเลี้ยงผึ้งโพรงพันธุ์พื้นเมืองหลายร้อยปีแล้ว โดยใช้โพรงไม้ ท่อซีเมนต์ โถง หรือไห เป็นวัสดุสำหรับให้ผึ้งเข้าไปทำรังอยู่และเช่นเดียวกับผู้เลี้ยงผึ้งทั่วโลกที่ประสบปัญหาในการเลี้ยงผึ้ง กล่าวคือ การเป็นโรคในผึ้ง การมีตัวเบียนในรัง เช่น ไร รวมทั้งปัญหาการหนีรัง เป็นต้น (Djordjevic et al., 1999)

ปัญหาโรคระบาดในผึ้งนั้น ทั้งเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้ง และนักวิทยาศาสตร์ ต่างก็ให้ความสนใจในสาเหตุของการเกิดโรค รวมทั้งการรักษาโรคที่เกิดขึ้นด้วย โดยมุ่งความสนใจไปที่โรคที่เกิดจากเชื้อต่างๆ ทั้งไวรัส รา และแบคทีเรีย โดยโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียนซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียก็เป็นหนึ่งในโรคที่นักวิทยาศาสตร์และผู้เลี้ยงผึ้งให้ความสนใจศึกษา เนื่องจากเป็นโรคระบาดที่แพร่กระจายไปในหลายทวีปทั่วโลก ส่งผลให้เกิดความเสียหายในการประกอบกิจการเลี้ยงผึ้งเป็นอย่างมาก (Shimanuki & Knox, 1997)

โรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียน (European foulbrood disease) กระจายตัวได้อย่างรวดเร็วและเข้าทำลายผึ้งอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะผึ้งที่อยู่ในระยะกำลังเพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็ว โรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดร่วมกัน คือ *Melissococcus pluton*, *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* และ *Achromobacter eurydice* เริ่มแรก *M. pluton* จะเข้าไปอยู่ในทางเดินอาหารของตัวอ่อนแล้วเจริญพันธุ์เพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยอาศัยอาหารในท่อทางเดินอาหารของผึ้ง เมื่อจำนวนของเชื้อโรคเพิ่มมากขึ้น เชื้อโรคจะแย่งอาหารในทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้ง ทำให้ตัวอ่อนอดอาหารและตายในที่สุด ส่วนเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นเข้าร่วมในการทำลายตัวอ่อนต่อจาก *M. pluton* ซึ่งมี *Paenibacillus alvei*, *E. faecalis*, *Enterococcus faecium* และ *Achromobacter eurydice* เข้าไปร่วมทำลายตัวอ่อนผึ้งด้วย (Cai J & Collins, 1994; Williams, 2000)

อาการของโรคที่สามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนดังนี้

1. ตัวอ่อนที่มีอายุ 4-5 วัน มักจะตายมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยวแต่ไม่รุนแรงนัก
2. ตัวอ่อนงอตัวเป็นรูปตัว C มีสีปรากฏตามลำตัวเป็นสีเหลือง ต่อมาลำตัวจะเหี่ยวย่นลง และบิดตัวยุบแห้ง จากนั้นก็จะตาย อาจแห้งเป็นสะเก็ด
3. ตัวอ่อนที่เข้าดักแด้แล้วจะถูกกักฝาปิดหลอดรัง ทำให้มองเห็นส่วนหัวและตัวยุบแห้ง สีลำตัวจะเปลี่ยนเป็นสีเทาและน้ำตาลในระยะต่อมา
4. ตัวอ่อนตัวที่เน่า จะมีของเหลวเน่าเยิ้ม อยู่ภายในหลอดรัง ถ้าใช้ไม้จิ้มฟันหรือ ก้านไม้ขีดจุ่มลงไปแล้วยกขึ้นมา ของเหลวนั้นไม่เหนียวยืด
5. การปิดหลอดรังฝั่งตัวอ่อน ไม่สม่ำเสมอจะเห็นหลอดรังที่ว่างเปล่าสลับกับหลอดรังที่ปิดเป็นหย่อมๆ

เมื่อทราบถึงลักษณะของการเกิดโรคแล้ว ผู้เลี้ยงผึ้งควรรู้จักกับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคด้วยคือ

P. alvei ซึ่งมีลักษณะดังนี้

ชื่อ : *Paenibacillus alvei* (Cheshire and Cheyne, 1885)

ชื่ออื่น : *Bacillus alvei* (basonym)

แหล่งอาศัย : ดิน น้ำนม ตัวอ่อนของยุง wax moth และมนุษย์

การเคลื่อนที่ : swarming colony

Gram strain : Gram – positive rod

รูปร่างของ spore : oval (central to terminal)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1. แสดงลักษณะโดยทั่วไปของ *P. alvei* (Djordjevic et al., 2000).

Characteristics	<i>Paenibacillus alvei</i>
Rod	
Width, μm	0.5 – 0.8
Length, μm	2 – 5
Gram reaction	+
Motility	+
Catalase	+
Temperature for growth, C	35 – 45
Maximum	15 – 20
Minimum	-
Acid from arabinose, xylose and mannitol	+
Growth in	
Anaerobic agar	+
Sabouraud dextrose broth and/ or agar	-
0.001% lysozyme	+
Production of	
Dihydroxyacetone	+
Indole	+
NO_3^- to NO_2^-	-
Decomposition of Casein	+

โดยจะศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในตัวอ่อนของผึ้งโพรงที่เลี้ยงที่หน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสมุทรสาคร พบว่ามีตัวอ่อนของผึ้งโพรงตายด้วยลักษณะของการเกิดโรคเน่ายุโรเปียนคือ ลำตัวจะงอเป็นรูปตัว C สีลำตัวจะเปลี่ยนเป็นสีเทา และน้ำตาล ในระยะต่อมามีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว จึงนำตัวอย่างตัวอ่อนที่ตายมาศึกษาโดยการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคออกมาศึกษาด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบว่าเป็นชนิดเดียวกับที่ทำให้เกิดโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียนหรือไม่

การศึกษาทางจุลชีววิทยาเพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกมาได้มีหลายวิธีซึ่งในการศึกษานี้ทำการทดลอง 4 วิธี คือ การตรวจ gram stain การเคลื่อนที่ของโคโลนีด้วยวิธี Hanging-

drop technique การทำ Catalase test และทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียาปฏิชีวนะ (Bergey, 1974)

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาตัวอ่อนผิ้วโพรงที่เป็นโรค

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งของแบคทีเรีย Nutrient agar (NA)

เพื่อเป็นอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอ่อนที่เป็นโรคตาย โดยเตรียมได้จากสารดังต่อไปนี้ 0.3 g Bacto beef extract, 0.5 g Bacto peptone และ 1.5 g Bacto agar เติลงใน flask ละลายในน้ำกลั่น 100 ml นำไปใส่ในเครื่อง autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วเทลง petridish (ประมาณ 6 plates) เก็บที่อุณหภูมิประมาณ 4°C

1.2 การเพาะเชื้อ (inoculation) ลงใน NA

เตรียม petridish ที่เตรียม NA ไว้แล้ว 6 plates ปิดฝา petridish ด้วย parafilm เพื่อป้องกันการเคลื่อนที่เปิดของฝาป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น เดินทางไปเก็บตัวอย่างตัวอ่อนของผิ้วโพรงที่ตายด้วยโรคเน่ายุโรเปียนที่หน่วยวิจัยชีววิทยาของผิ้ว จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสมุทรสาคร โดยการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนของผิ้วที่มีลักษณะการตายด้วยโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียน คือ ลำตัวจะงอเป็นรูปตัว C สีลำตัวเป็นสีเทา และน้ำตาล มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว จึงนำตัวอย่างตัวอ่อนที่ตายมาศึกษาโดยใช้ needle loop จุ่มลงไปในตัวอ่อนที่ตายในลักษณะข้างต้น โดยแยกเป็น 2 พวกคือตัวอ่อนตายแห้งเป็นสะเก็ด และเป็นของเหลว แล้วนำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เตรียมไปทั้งหมด 6 plates ด้วยวิธี sterile technique คือ เผา needle loop ด้วยไฟจากตะเกียง alcohol และลดฝาของ petridish ด้วยเปลวไฟก่อนการ streak ทุกครั้ง นำเชื้อที่ได้กลับมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

1.3 การตรวจ Gram stain

การย้อมสีแบบแกรม มีหลักดังนี้ ขั้นแรกเมื่อย้อมด้วยสีย้อมที่เป็นต่างคือ Crystal violet แล้วใส่ modant คือ Gram $-I_2$ จะทำให้ cell ทุก cell ติดสี Crystal violet ทั้งหมด ต่อมาล้างออกด้วยสารล้างสีคือ 95% Ethyl alcohol cell บางพวกจะทนต่อการล้างสีออกได้ จะยังคงติดสีเดิมอยู่ เรียก cell เหล่านี้ว่าแกรมบวก (gram positive) ส่วน cell ที่ถูกล้างสีออกเรียกว่า แกรมลบ (gram negative) ซึ่งจะติดสีย้อมที่เป็นต่างตัวที่ 2 คือ Safronin O ขั้นตอนต่างๆในการย้อมมีดังนี้

1. กระจายเชื้อที่แยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยว (Single colony) ที่เป็น pure culture ลงบน slide ด้วย needle loop ทำให้แห้งในอากาศ แล้วผ่านเปลวไฟจากตะเกียง alcohol

2. ย้อมสี Crystal violet 1 นาที
3. ล้างด้วยน้ำ
4. ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน (Gram -I₂) 1 นาที
5. ล้างด้วยน้ำ
6. ล้างสีออกโดยใช้ 95% Ethyl alcohol โดยเอียง Slide ให้ 95% Ethyl alcohol ไหลผ่าน สังเกตดูที่ Crystal violet ที่ถูกชะออกมา เมื่อสีเริ่มจางหยุดปฏิบัติการด้วยการจุ่มน้ำ
7. ซับให้แห้ง
8. ย้อมสี Safronin O นาน 20-30 วินาที
9. ล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้ง
10. ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน สังเกตการณ์ติดสีที่เกิดขึ้น

1.4 การเคลื่อนที่ของโคโลนี (Hanging-drop technique)

ใช้เพื่อการศึกษาแบคทีเรียชนิดที่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากต้องใช้ cell ที่มีชีวิตในการศึกษา จึงไม่สามารถย้อมสี cell ได้ วิธีการศึกษามีดังต่อไปนี้

1. ปั้นดินน้ำมันเป็นก้อนกลม วางที่มุมทั้ง 4 มุมของ cover glass
2. ใช้ needle loop ตะเข็บตรงกลางของ cover glass ที่มีหยดน้ำหยดอยู่ 1 หยด และกระจายเชื้อโดยใช้ needle loop
3. นำ slide มาคว่ำลงบน cover glass โดยให้หยดเชื้ออยู่ตรงกลางบริเวณหลุมของ slide
4. หายทั้งหมดขึ้น นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า สังเกตลักษณะการเคลื่อนที่ที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.5 Catalase Test

Catalase เป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรียส่วนใหญ่ ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาสลาย H₂O₂ แล้วเกิด O₂ ขึ้น ดังปฏิกิริยา $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

แบคทีเรียบางชนิดไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่ Genus *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Clostridium* ซึ่งเรียกว่าเป็นพวก catalase negative ส่วนพวกที่เป็น catalase positive มีแนวโน้มที่จะเป็นพวก anaerobes เนื่องจากเอนไซม์ในปฏิกิริยาการหายใจตัวสุดท้าย จะทำให้ปฏิกิริยากับ O₂ แล้วเกิดเป็น H₂O₂ ซึ่งจะเป็นพิษต่อ cell ดังนั้น catalase จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นมากสำหรับการเจริญของจุลชีพที่ต้องการ O₂ ส่วนใหญ่ (Aquilanti et al., 2007; Kaban et al., 2008) วิธีการทดลองมีดังนี้

1. หยด 3% H₂O₂ ลงบน slide
2. ใช้ needle loop ตะเข็บแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาลงใน 3% H₂O₂ ที่เตรียมไว้

3. สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

1.6 ทดสอบการเจริญใน NA ที่มียาปฏิชีวนะ

เตรียมยาปฏิชีวนะซึ่งในการศึกษารั้งนี้ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{m}$ Ampicillin ใส่ลงใน NA ที่เตรียมไว้ซึ่งผ่านการ autoclave และทิ้งไว้ให้อุณหภูมิต่ำลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงใน petridish ที่เตรียมไว้ 6 plates และ NA ที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะอีก 6 plates เพื่อทำการทดลอง 2 ซ้ำ

นำ needle loop และเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษามา 1 loop แล้วใส่เชื้อ 1 loop ลงใน 1 ml Nutrient broth (NB) ใน sterile eppendorf โดยเตรียม NB ได้วิธีเดียวกับ NA แต่ไม่ต้องซั่ง Bacto agar ใส่ลงไปขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เขย่าให้เชื้อแบคทีเรียผสมดีกับ NB แล้ว pipette เชื้อใน NB ขึ้นมา 200 μl ด้วย micropipette หยดลงใน petridish + NA ให้ทั่ว และทำวิธีเดียวกันกับ petridish + NA + 100 $\mu\text{g}/\text{mol}$ Ampicillin จากนั้น spread plate ให้ทั่วด้วย glass rod ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-5 วัน สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น

หมายเหตุ : ทุกการทดลองทำใน lamina flow hood และใช้ sterile technique

2. การศึกษาเนื้อเยื่อตัวอ่อนฝัง

2.1 การศึกษาเนื้อเยื่อตัวอ่อนของฝังหลวง

การวิจัยครั้งนี้ได้นำตัวอย่างตัวอ่อนของฝังหลวง จากรังที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่ 22 รัง จังหวัดสมุทรสาคร 10 รัง มาศึกษาพบว่าตัวอ่อนทุกรังอยู่ในสภาพปกติ ไม่เป็นโรค ดังนั้นจึงนำเนื้อเยื่อปกติมาศึกษาระบบต่าง ๆ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร ระบบขับถ่ายของเสีย ระบบแลกเปลี่ยนก๊าซหรือระบบหายใจ ระบบไหลเวียนเลือดและระบบประสาท โดยการดองด้วยน้ำยาฟอर्मาลิน 10% แล้วตัดเนื้อเยื่อตัวอ่อนโดยใช้พาราฟินเทคนิค แล้วย้อมสี H+E เพื่อทำสไลด์ถาวรศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงพร้อมบันทึกภาพ

2.2 การศึกษาเนื้อเยื่อของฝังโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนยูเปียน

นำตัวอ่อนฝังโพรงที่เป็นโรคมาดองด้วยน้ำยาฟอर्मาลิน 10% แล้วตัดเนื้อเยื่อตัวอ่อนโดยใช้พาราฟินเทคนิค แล้วย้อมสี H+E เพื่อทำสไลด์ถาวรศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงพร้อมบันทึกภาพ

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาตัวอ่อนฝังโพรงที่เป็นโรค

1.1 การเพาะเชื้อ (inoculation) ลงใน NA

หลังจากเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บตัวอย่างจากตัวอ่อนที่ตายด้วยลักษณะของการตายด้วยโรคเน่ายุโรเปียนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน พบว่า เกิดเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอย่างน้อย 5 ชนิด โดยสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นออกจากกันได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ 2 ชนิดเป็นเชื้อรา และอีก 3 ชนิดเป็นเชื้อแบคทีเรียและให้ชื่อในการศึกษาว่า C, D และ E โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอ่อนฝังโพรงที่ตายด้วยลักษณะของการเกิดโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียน

	Configuration	Margin	Elevation
C	Filamentous	Hair-lock-like	Flat
D	Round	Smooth	Convex
E	Round with raised margin	Smooth	Umbonate

1.2 การตรวจ Gram Stain

เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมันแล้วสังเกตการณ์ติดสีที่เกิดขึ้น พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดเป็นแบคทีเรียชนิดแท่งที่ย้อมติดสีแกรมบวก หรือ gram-positive และมีการสร้าง spore รูปไข่ ที่บริเวณ central ถึง terminal

1.3 การเคลื่อนที่ของโคโลนี (Hanging – drop technique)

เมื่อนำ slide ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วสังเกตลักษณะการเคลื่อนที่ที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเกิดการเคลื่อนที่ชนิด Brownian's movement ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่ที่ไม่ได้เกิดจากการเคลื่อนที่ของ cell เอง แต่เกิดจากปัจจัยภายนอกมากกระทำ เช่น การไหลของหยดน้ำเป็นต้น การเคลื่อนที่แบบนี้ สามารถตรวจดูได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.4 Catalase Test

เมื่อสังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของแบคทีเรียแต่ละชนิดได้ผลดังนี้

แบคทีเรียชนิด C : เกิดฟองก๊าซขึ้นให้ผล positive test

แบคทีเรียชนิด D : เกิดฟองก๊าซขึ้นให้ผล positive test

แบคทีเรียชนิด E : ไม่เกิดฟองก๊าซขึ้นให้ผล negative test

1.5 ทดสอบการเจริญใน NA ที่มียาปฏิชีวนะ

หลังจากทิ้งเชื้อแบคทีเรียที่เรียก spread ใน NA และ NA + 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อใดๆเลย ทั้ง 2 ซ้ำของการทดลอง

2. ผลการศึกษาเนื้อเยื่อตัวอ่อนของผึ้ง

2.1 เนื้อเยื่อตัวอ่อนปกติของผึ้งหลวง

การศึกษาเนื้อเยื่อตัวอ่อนปกติระบบต่างๆ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร ระบบแลกเปลี่ยนก๊าซ ระบบขับถ่ายของเสีย ระบบหมุนเวียนเลือด และระบบประสาท โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง ได้ผลดังต่อไปนี้

1. ระบบทางเดินอาหาร

ทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้งมีลักษณะเป็นท่อยาวตลอดลำตัวจากช่องปากไปจนถึงทวารหนัก แบ่งออกได้ เป็น 3 ส่วนได้แก่ ทางเดินอาหารส่วนต้น (fore gut หรือ stomodeum) ประกอบด้วย คอหอย (pharynx) หลอดอาหาร (oesophagus) ถุงพักอาหาร (crop) และกิ้น (proventriculus) (รูปที่ 1) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut หรือ mesenteron) ได้แก่ กระเพาะ (ventriculus or stomach) ทางเดินอาหารส่วนท้าย (hind gut หรือ proctodeum) ซึ่งประกอบด้วยลำไส้เล็ก (small intestine) ลำไส้ใหญ่ (large intestine) ซึ่งมี 2 ส่วนย่อยได้แก่ colon และ rectum (รูปที่ 8)

ทางเดินอาหารส่วนต้นเจริญมาจากเนื้อเยื่อ ectoderm ในระยะที่เป็นเอ็มบริโอ จากการศึกษาพบว่า ผนังของท่อชั้นในสุดบุด้วยเนื้อเยื่อชั้น cuticular intima ของ epidermis ชั้นที่อยู่ถัดมาเป็นชั้นเนื้อเยื่อบุผิว (epithelium) ซึ่งมีเซลล์บุผิวเรียงตัวหนึ่งชั้นอยู่บนเยื่อรองรับ (basement membrane) ในบริเวณคอหอยและหลอดอาหาร เซลล์บุผิวมีรูปร่างแบนบาง (รูปที่ 2) ส่วนในบริเวณถุงพักอาหารและกิ้นมีเซลล์บุผิวทรงสี่เหลี่ยมมีความสูงกว่าในช่วงต้น และท่อทางเดินอาหารมีช่องภายใน (lumen) ขยายใหญ่ ชั้นของผนังที่อยู่ต่อจากชั้นเยื่อบุผิวเป็นชั้นกล้ามเนื้อ (muscular layer) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อลายที่จัดเรียงตัวเป็นชั้นย่อยดังนี้ กล้ามเนื้อตามแนวยาวอยู่ชั้นใน (inner longitudinal muscle) และกล้ามเนื้อวงกลมล้อมรอบที่ออกอยู่ชั้นนอก (outer circular muscle) ผนังชั้นนอกสุดของทางเดินอาหารส่วนต้น มีลักษณะเป็นชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่หุ้มรอบนอกสุด (รูปที่ 2) นอกจากนี้โครงสร้างของกิ้น (proventriculus) มีลักษณะเปลี่ยนแปลงเฉพาะคือมีการหวัดตัวของผนังยื่นเข้าไปยังบริเวณ lumen ภายในถุงพักอาหารมีรูปร่างคล้ายลิ้น เนื้อเยื่อบริเวณลิ้นประกอบด้วยชั้นกล้ามเนื้อที่มีเนื้อเยื่อบุผิวคลุมอยู่นอกสุด (รูปที่ 3-4)

ทางเดินอาหารส่วนกลาง ซึ่งได้แก่ กระเพาะ (ventriculus) มีโครงสร้างของเนื้อเยื่อของผนังกระเพาะ ประกอบด้วย ชั้นเนื้อเยื่อบุผิวซึ่งเป็นเซลล์ทรงสูง (columnar cell) และมีไมโครวิลไล (microvilli) อยู่ที่ผิวด้านอิสระมีลักษณะเป็นเส้นขนที่เรียงตัวเป็นแนวเรียก striated border (รูปที่ 5) ใน

กระเพาะของตัวอ่อนมีแผ่นเยื่อที่เรียกว่า เยื่อเพอริโทรฟิค (peritrophic membrane) ที่มีลักษณะเป็นแผ่นตาข่ายของเส้นใยไคตินและโปรตีน เส้นใยนี้จะสานกันเป็นตาข่ายมีลักษณะเป็นปลอกคลุมเหนือเซลล์บุผิวรอบ lumen ในกระเพาะ (รูปที่ 6) ผนังชั้นกลางของกระเพาะเป็นชั้นกล้ามเนื้อวงกลม ชั้นนอกสุดเป็นชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่หุ้มล้อมรอบกระเพาะ (รูปที่ 7)

ทางเดินอาหารส่วนท้าย ประกอบด้วยลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ส่วน colon และ rectum ที่เปิดออกสู่ทวารหนัก (anus) โครงสร้างของผนังทางเดินอาหารส่วนท้ายมีลักษณะดังนี้ ชั้นในสุดเป็นชั้น cuticular intima ซึ่งเคลือบอยู่บนผิวเซลล์ของ epithelium ชั้นต่อมาเป็นชั้น epithelium มีเซลล์รูปลูกเต๋าในบริเวณลำไส้เล็กและ colon (รูปที่ 9) ในบริเวณ rectum มีเซลล์รูปแท่งทงสูง ชั้นถัดจากเยื่อบุผิวเป็นชั้นของกล้ามเนื้อวงกลม และชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่รอบนอก ผนังของ rectum มีลักษณะพิเศษเนื่องจากมีลอนสันนูนตามแนวยาวของท่อ ที่เกิดจากการนูนหนาของชั้น epithelium ยื่นเข้าไปในช่องว่างตรงกลางท่อ จำนวน 5-6 ลอนสันนูน เรียกแต่ละลอนว่า rectal pad บริเวณนี้มีเซลล์บุผิวเรียงตัวซ้อนกัน 2-3 ชั้น ชั้นนอกสุดของ colon และ rectum เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหุ้มล้อมรอบท่อ (รูปที่ 10-11) ที่บริเวณลำไส้เล็กจะมีท่อมัลปิเกียน (malpighian tubule) เจริญยื่นออกมาในบริเวณช่องท้องมีลักษณะเป็นท่อปลายตันจำนวน 5-6 ท่อ แทรกไปมาในบริเวณช่องว่างลำตัวในส่วนนอกและส่วนท้อง

ต่อมที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนมี ได้แก่ ต่อมสร้างเส้นใย (silk gland) หรือ ต่อมน้ำลาย (salivary gland) (รูปที่ 12-13) มีลักษณะ เป็นท่อยาวตรงขนาดเล็ก ๆ จำนวน 2 ท่อ อยู่ด้านล่างของลำตัว เซลล์บุท่อที่มีลักษณะเป็นเซลล์รูปลูกเต๋า ภายใน lumen ของท่อมีเส้นใย ต่อมสร้างเส้นใยนี้มีทางเปิดออกสู่ภายนอกบริเวณใกล้ ๆ ปาก

2. ระบบขับถ่ายของเสีย

ตัวอ่อนของผึ้ง มีระบบขับถ่ายของเสียประกอบด้วยท่อมัลปิเกียน (malpighian tubule) จำนวน 5-6 ท่อ มีลักษณะเป็นท่อยาวขดไปมามีปลายด้านหนึ่งตันและปลายอีกด้านหนึ่งเชื่อมทะลุบริเวณลำไส้เล็กที่ต่อกับกระเพาะ (รูปที่ 14-15) ท่อมัลปิเกียนแทรกตัวอยู่ในบริเวณส่วนท้อง ส่วนนอกและบริเวณของช่องว่างภายในลำตัวที่มีของเหลว (hemolymph) แทรกอยู่ (รูปที่ 16,18) โครงสร้างของผนังท่อมัลปิเกียนประกอบด้วย epithelial cell ซึ่งเป็นเซลล์รูปเหลี่ยมที่ค่อนข้างเตี้ยเรียงตัว 1 ชั้น บน basement membrane ที่ผิวของเซลล์บุผิวมีชั้น cuticular intima เคลือบไว้ภายใน lumen ตลอดความยาวของท่อ ที่ผิวด้านบนของเซลล์บุท่อมมีเส้นขน cilia และภายใน lumen มีผลึกขนาดเล็ก ๆ ของ urates, calcium oxalate และผลึกหินปูน (รูปที่ 17)

3. ระบบแลกเปลี่ยนก๊าซ

ระบบแลกเปลี่ยนก๊าซของตัวอ่อนผึ้งหรือระบบหายใจมีลักษณะเป็นระบบท่อลม (tracheal system) ที่ประกอบด้วย ช่องเปิดท่อลม (spiracle) ท่อลมขนาดใหญ่ (trachea) ท่อลมฝอย (tracheole) และถุงลม (tracheal sac or air sac) ซึ่งมีโครงสร้างของเนื้อเยื่อดังนี้

ช่องเปิดท่อลม (spiracle) เป็นบริเวณส่วนต้นของท่อลมใหญ่ (trachea) มีลักษณะเป็นแอ่งหว้าหรือห้องซึ่งต่อเนื่องกับช่อง lumen ภายในท่อลมที่เปิดออกสู่ภายนอกในบริเวณชั้น epidermis ของผิวหนังด้านข้างของแต่ละปล้อง (รูปที่ 19-20) ในตัวอ่อนของผึ้งมี spiracle ทั้งสิ้น 10 คู่ พบที่ส่วนนอก 2 คู่ และพบที่ปล้องของส่วนท้อง 8 คู่ โครงสร้างของ spiracle ประกอบด้วย ห้องหรือช่องหว้าที่เรียกว่า atrium ภายในบุด้วยเนื้อเยื่อ epidermis ชั้น cuticle intima ที่คลุมอยู่เหนือชั้น epithelium ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์รูปทรงสูงเรียงตัวชั้นเดียวบนเยื่อรองรับและมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหุ้มล้อมรอบ (รูปที่ 21-23)

ท่อลม (trachea) เกิดจากการหว้าตัวเข้าข้างในลำตัวของเนื้อเยื่อ epidermis ท่อลมประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นต่าง ๆ ได้แก่ ชั้น cuticle ที่เชื่อมต่อเนื่องกับชั้น cuticle ของ epidermis ผิวภายนอก ชั้น intima cuticle มีความหนาไม่สม่ำเสมอและมีลักษณะหน้าตัวเป็นเกลียววงแหวนพันวนรอบช่อง lumen ภายในท่อลม เรียกว่า taenidae (รูปที่ 24-25) ซึ่งจะสิ้นสุดที่ท่อลมฝอย ได้ชั้น cuticle ลงไปจะเป็นชั้น epithelium มีเซลล์รูปทรงสูงหรือลูกเต๋าอยู่ในท่อขนาดกลางและเล็กตามลำดับท่อลมขนาดใหญ่ที่เชื่อมต่อมาจากช่อง spiracle จะแตกแขนงย่อยลงไปหลาย ๆ ระดับ และแทรกกระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ ภายในช่องอก ช่องท้อง และส่วนหัว บริเวณส่วนปลายของ trachea จะมีขนาดเล็กมากเรียกว่าท่อลมฝอย (tracheole) ระบบท่อลมประกอบด้วยท่อหลัก (main duct) จำนวน 2 สายอยู่ด้านข้างลำตัวตามแนวของช่อง spiracle จากท่อหลักจะมีท่อย่อยแตกแขนงลงไปในแต่ละปล้อง (รูปที่ 24-26)

ท่อลมฝอย (tracheole) เป็นท่อลมขนาดเล็กแตกแขนงย่อยมาจาก trachea ผนังท่อส่วนนี้บางมาก มีโครงสร้างประกอบด้วยเซลล์รูปท่อเท่านั้น เป็นเซลล์รูปร่างแบนบางและไม่มีชั้น intima cuticle เคลือบอยู่ภายในท่อลม tracheole ส่วนมากท่อลมฝอยจะอยู่ชิดแนบกับเซลล์ tracheoblast (รูปที่ 27-28) ท่อลมฝอยพบแทรกไปตามบริเวณ เนื้อเยื่อของผนังทางเดินอาหาร, กล้ามเนื้อ, หัวใจ, ปมประสาท, สมอง, ท่อมัลปิเกียน และช่องว่างภายในตัว

ถุงลม (tracheal sac or air sac) เป็นบริเวณส่วนปลายของท่อลมบางแห่งที่ขยายตัวออกเป็นถุงขนาดใหญ่เพื่อเก็บอากาศ พบในช่องอกและช่องท้อง ปกติจะแฟบแบน แต่เห็นเป็นถุงพองได้ชัดเมื่อมีอากาศเก็บอยู่ (รูปที่ 29-30)

4. ระบบไหลเวียนเลือด

ผึ้งมีระบบไหลเวียนเลือดอยู่ในช่องว่างบริเวณด้านบนของตัว (dorsal sinus) ซึ่งมีเยื่อชั้นแยกจากอวัยวะอื่นภายในตัวด้วย แผ่นกั้นรอบหัวใจที่เรียกว่า dorsal diaphragm หรือ pericardial septum ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อลาย และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ภายใน dorsal sinus มี dorsal vessel ซึ่งมีเม็ดเลือดและของเหลว (hemolymph) อยู่ใน (รูปที่ 31) แผ่น dorsal diaphragm หรือ pericardial septum จะหดตัวเป็นจังหวะทำให้เม็ดเลือดและของเหลวภายใน dorsal vessel เคลื่อนไปในทิศทางจากด้านหลังของตัวไปยังส่วนหัว

โครงสร้างของ dorsal sinus แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน ส่วนต้นของท่อเรียกว่า aorta ส่วนปลายท่อเรียกว่า heart (รูปที่ 32-34)

หัวใจของผึ้งเริ่มต้นจากส่วนท้ายสุดของ dorsal vessel บริเวณปล้องท้องที่ 9 เป็นแนวยาวไปยังปล้องท้องที่ 1 ต่อจากนั้นเลือดจะไหลเข้าไปยัง aorta ซึ่งอยู่ในส่วนอกและหัวแล้วเปิดออกสู่ช่องว่างในบริเวณหัวและอก (รูปที่ 35-37)

เลือดจะเข้าสู่ dorsal vessel บริเวณหัวใจโดยช่อง (ostia) ที่อยู่ด้านข้างของ dorsal vessel ซึ่งจะพบในช่องท้องตั้งแต่ปล้องที่ 2-11 รวมทั้งหมด 7 คู่ ช่อง ostia จะมีลิ้นกั้นให้เลือดไหลเข้าหัวใจในทิศทางเดียวเท่านั้น (รูปที่ 38-40)

เยื่อ pericardial septum มีโครงสร้างประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อและ pericardial cell มีรูปร่างรีไข่ มักมี 2 นิวเคลียสผนังกันจะถูกคลุมด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่ด้านนอกสุด (รูปที่ 39)

เม็ดเลือดและของเหลวจะอยู่ล้อมรอบเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ของตัวอ่อนผึ้ง ในส่วนหัว, อก, ท้อง และเคลื่อนเข้าไปในรูเปิดของช่อง ventral sinus ซึ่งมีลักษณะเป็นช่องยาวทอดตลอดแนวของตัวด้านล่าง และมีเยื่อชั้นเรียก ventral diaphragm ซึ่งมีลักษณะเป็น septum ประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อและเส้นใยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่กั้นแยก sinus จากช่องว่างภายในลำตัว การหดตัวของแผ่น ventral diaphragm ทำให้ของเหลว (hemolymph) เคลื่อนที่จากส่วนอกไปส่วนท้ายของลำตัวและไปในทิศทางด้านข้างในบริเวณ ที่มีปมประสาททอดติดตามแนวยาวตลอดลำตัวเช่นกัน (รูปที่ 34)

เนื้อเยื่อเลือดของผึ้งประกอบด้วยเม็ดเลือด (haematocyte) และ ของเหลว (hemolymph) อยู่ในกระแสโลหิตซึ่งจะพบได้ทั้งในบริเวณ dorsal vessel ช่องว่างที่แทรกกระหว่างเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในตัว และที่ ventral sinus ใต้ ventral diaphragm

haematocytes ของผึ้งแบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ เมื่อศึกษารูปร่างลักษณะดังนี้

ชนิดที่หนึ่ง Prohaematocyte มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดเล็ก รูปกลม มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ บางเซลล์อยู่ในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์ (รูปที่ 41-42)

ชนิดที่สอง Plasmotocyte เป็นเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมและมี pseudopodium ภายใน cytoplasm มี vacuole และ phagosome เม็ดเลือดชนิดนี้มีจำนวนมากค่อนข้างมาก (รูปที่ 43-44,46)

ชนิดที่สาม Granular haematocyte เป็นเซลล์รูปรีไซใน cytoplasm มีกรานูลย้อมติดสีแดง (acidophilic granule) (รูปที่ 45-46)

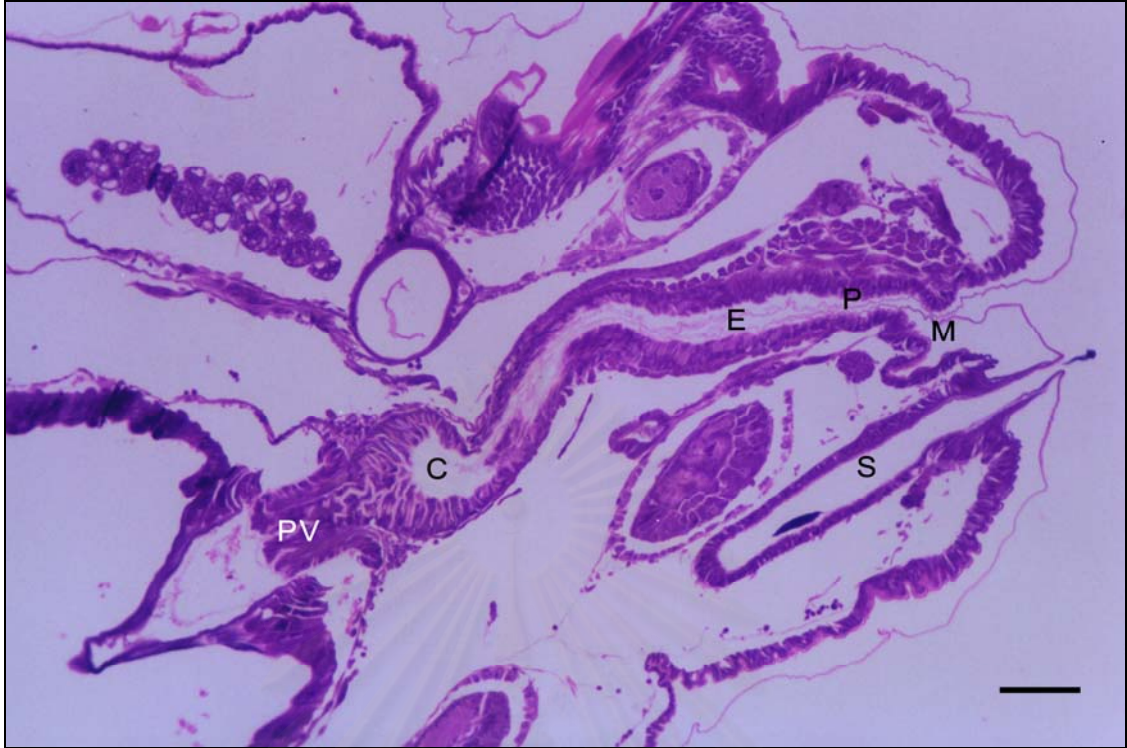
ชนิดที่สี่ Adipohaematocyte (Spheroidocyte) เซลล์รูปกลม, รีไซ่ ภายใน cytoplasm มีเม็ดหยดไขมันจำนวนมาก (รูปที่ 47-48)

5. ระบบประสาท

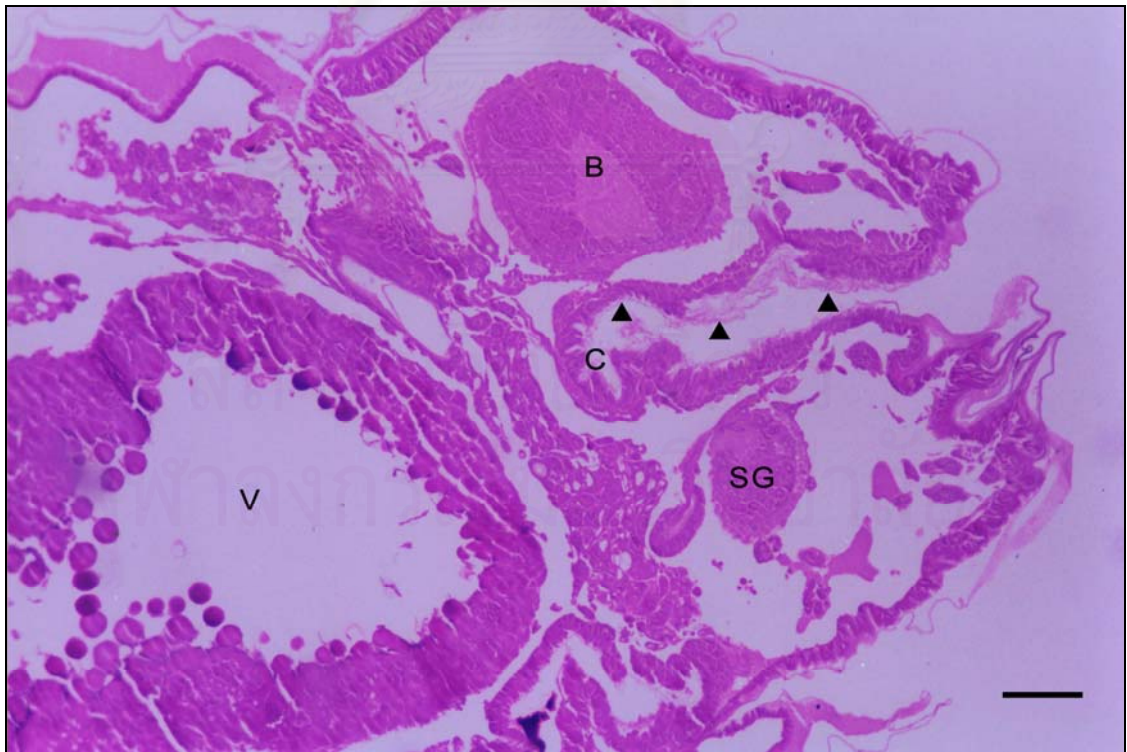
ระบบประสาทตัวอ่อนฝัง ประกอบด้วยเนื้อเยื่อของสมอง ปมประสาท และ ventral nerve cord สมองของตัวอ่อนฝังประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่เรียงตัวเป็นชั้น ๆ อยู่ริมขอบนอกเรียก outer cellular layer ซึ่งมี neuron และ glia cell เรียงตัวกระจายแทรกกัน ส่วนบริเวณตรงกลางของสมองจะเรียกชั้นนี้ว่า internal fibrillar tissue ซึ่งจะมี nerve fiber พวก axon และ dendrite ที่มี myelin sheath หุ้มไว้เป็นส่วนมาก ปนกับ non-myelinated fiber (รูปที่ 49-53)

ปมประสาทแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามบริเวณที่พบได้แก่

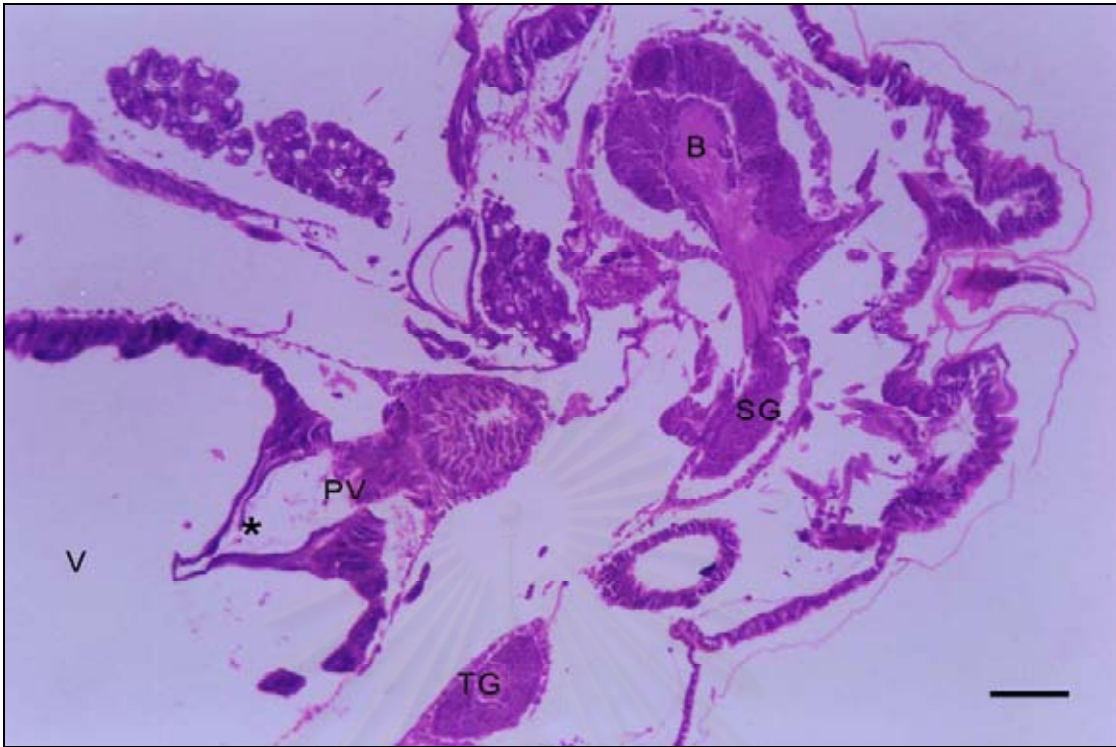
1. Suboesophageal ganglion เป็นปมประสาทที่อยู่ใต้หลอดอาหารซึ่งเชื่อมระหว่างสมองและโอบล้อมทางเดินอาหารลงมาเป็นปมใต้หลอดอาหาร ภายในปมประสาทมีตัวเซลล์ประสาท (neuron) และ glia cell อยู่รอบ ๆ ส่วนบริเวณตรงกลางของเนื้อเยื่อสมองมีเส้นใยประสาท (รูปที่ 49-50)
2. Thoracic ganglion มี 2 ปม พบบริเวณส่วนอกได้แก่ first ventral ganglion (อยู่ที่ prothorax และ second ventral ganglion (บริเวณขาคู่ที่ 2) จะมีเส้นใยประสาทเชื่อมต่อกับ suboesophageal ganglion บริเวณปมประสาทประกอบด้วย neuron, glia cell และเส้นประสาท (รูปที่ 54-57)
3. Abdominal ganglion เป็นปมประสาทในส่วนท้องมีทั้งหมด 10 ปม ซึ่งจะเชื่อมต่อกันเป็นสายของ ventral nerve cord แนบตัวด้านล่างภายในบริเวณ ventral sinus ใต้ ventral diaphragm ปมท้ายสุดมีขนาดใหญ่อยู่ใต้บริเวณลำไส้ใหญ่ส่วน rectum เป็นปมขนาดใหญ่ (รูปที่ 58-62)



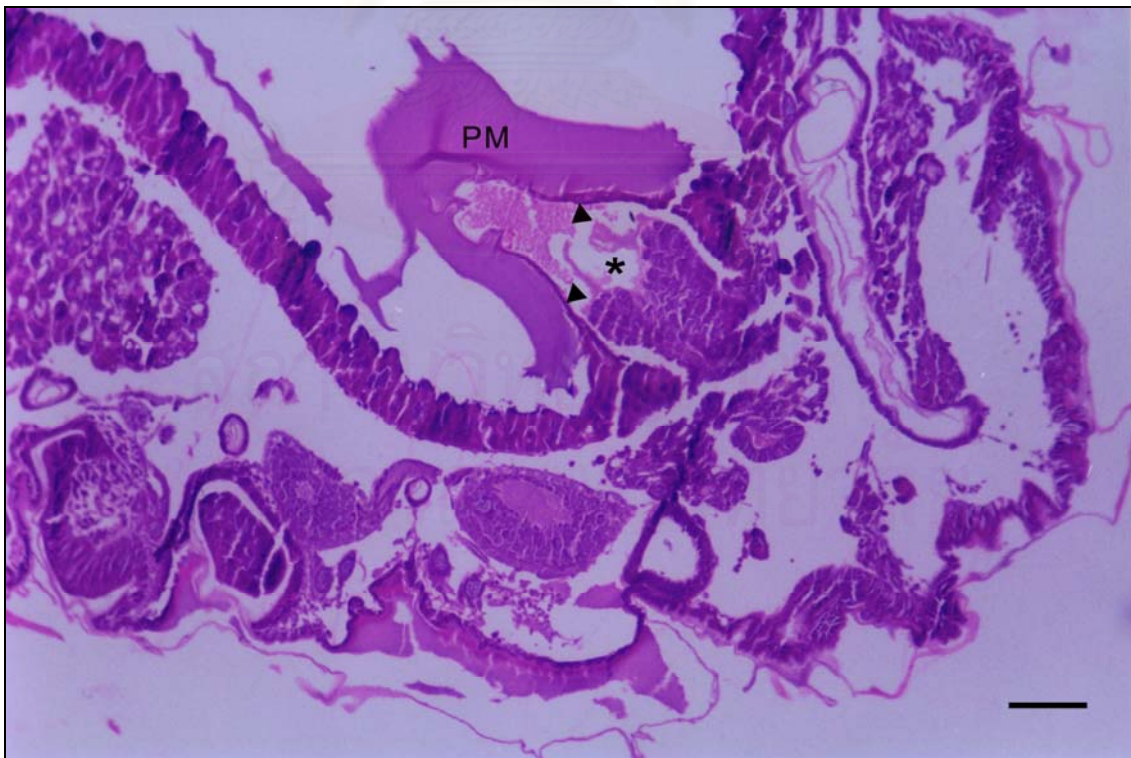
รูปที่ 1 แสดงระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้งหลวงอายุ 3 วัน ที่บริเวณทางเดินอาหารส่วนต้น fore gut ซึ่งประกอบด้วย mouth (M), pharynx (P), esophagus (E), crop (C), proventriculus (PV), salivary duct or silk duct (S) ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



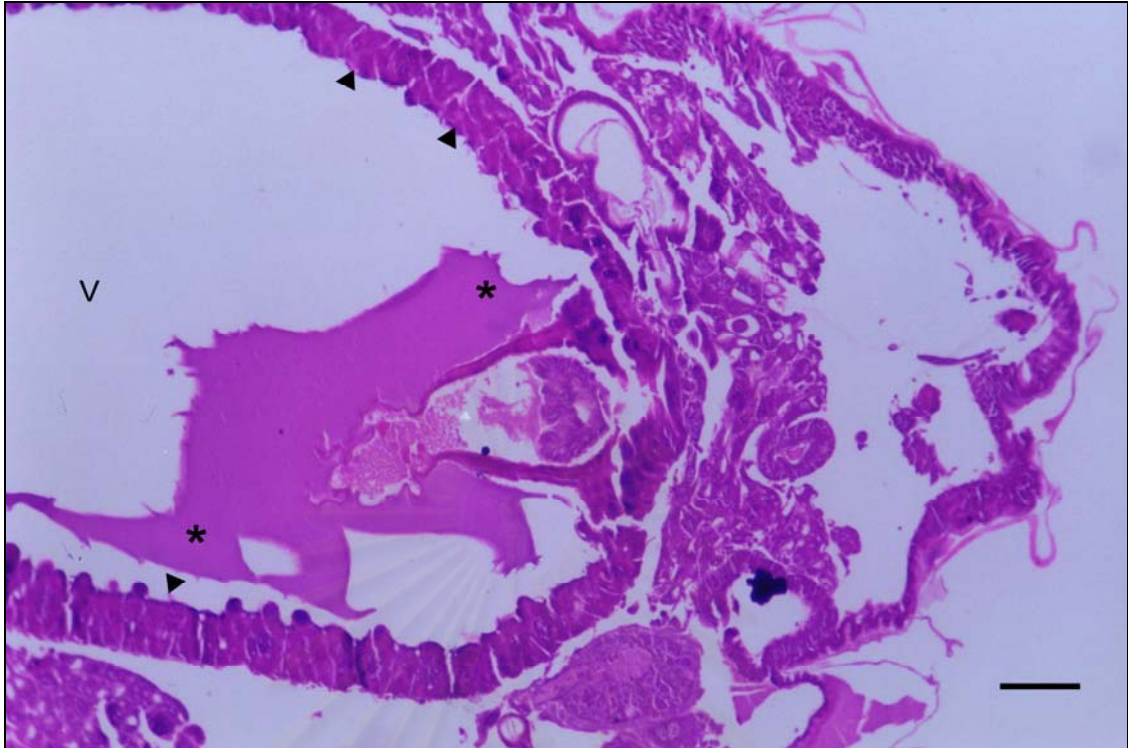
รูปที่ 2 แสดงถุงพักอาหาร crop (C) ซึ่งมีชั้น cuticular intima (▶) อยู่เหนือเยื่อบุผิวชนิด columnar epithelium และมีโครงสร้างของเซลล์บุผิวเรียงตัวเป็นชั้นขนานตามยาว 5-6 ชั้น (Brain = B, Suboesophageal ganglion = SG, Ventriculus = V) ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 3 แสดงรอยต่อบริเวณ proventriculus (PV) กับกระเพาะ ventriculus (V) ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นลื่น ยื่นลงไปในช่วงว่างของกระเพาะ (*) (Brain = B, Suboesophageal ganglion = SG, Thoracic ganglion = TG, Ventriculus = V) ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



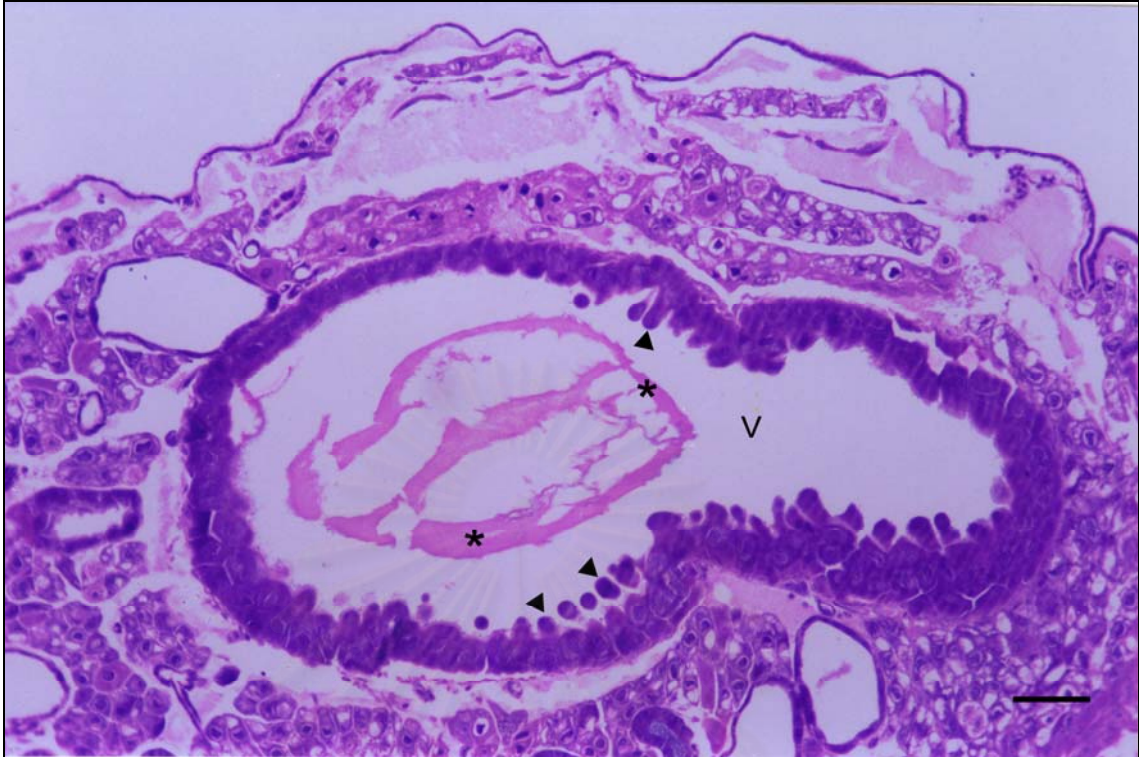
รูปที่ 4 แสดงรอยต่อของ proventriculus กับกระเพาะบริเวณ proventricular valves (*) ที่ยื่นลงไปในช่วงว่างของกระเพาะและมีเนื้อเยื่อบุผิวกระเพาะยื่นลงไปตามแนวของดัด (>) ในบริเวณเยื่อ peritrophic membrane (PM) ภายใน lumen ของกระเพาะ ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 5 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางบริเวณ ventriculus (V) หรือกระเพาะที่มีเยื่อบุผิวชนิด simple columnar epithelium (▶) และเยื่อ peritrophic membrane (*) บูดอยู่ในช่องว่างกระเพาะ

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

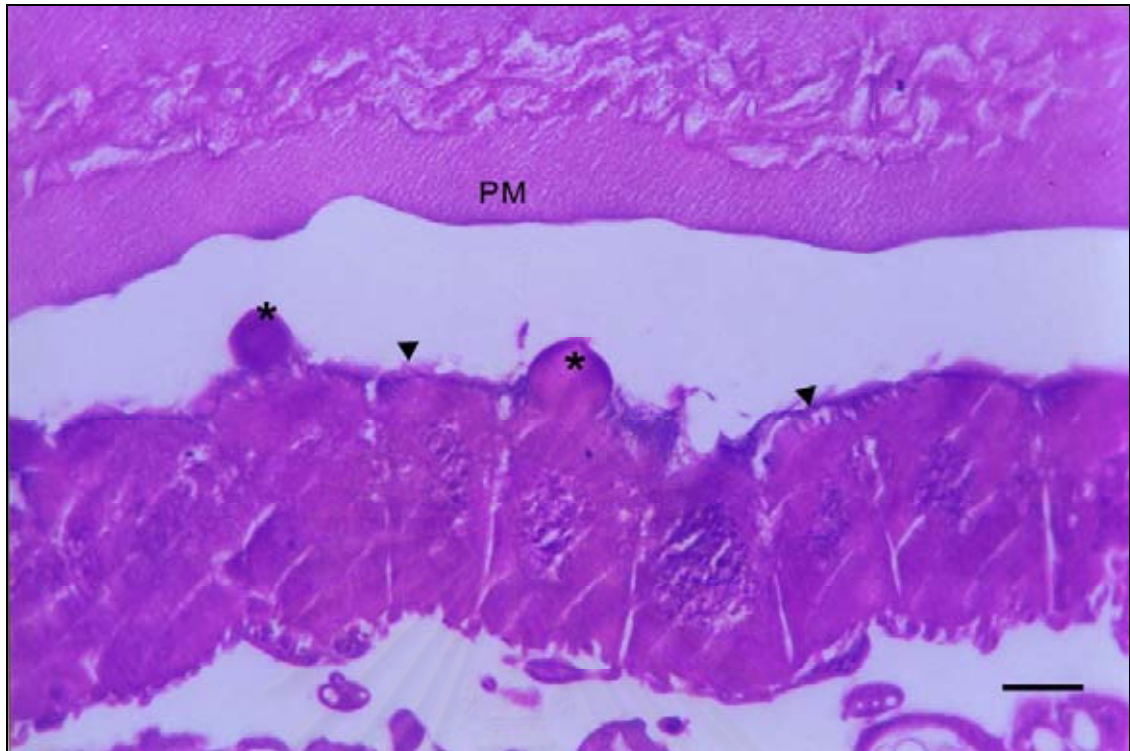
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของ ventriculus (V) ในบริเวณส่วนท้องของตัวอ่อนซึ่งประกอบด้วย simple columnar epithelium ที่มี microvilli เรียงตัวเป็น striated brush border และมี proliferating membrane (▶) ของผิวเซลล์เยื่อบุกระเพาะ ภายใน lumen มีเยื่อ peritrophic membrane (*)

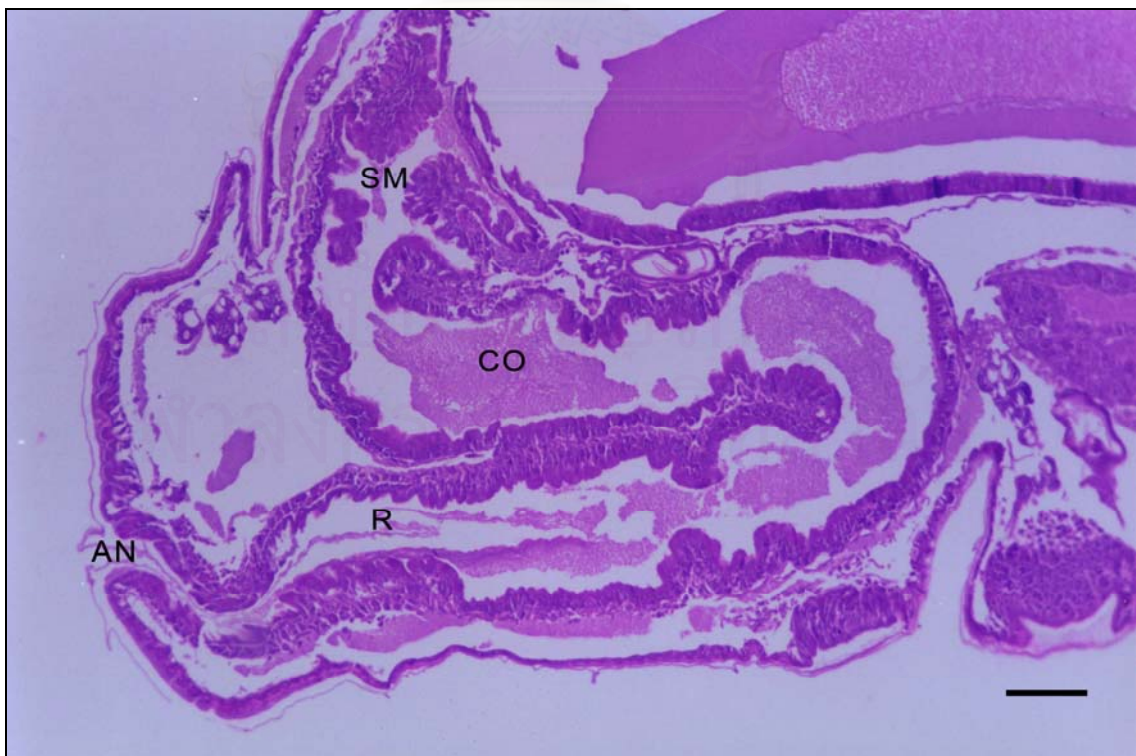
ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



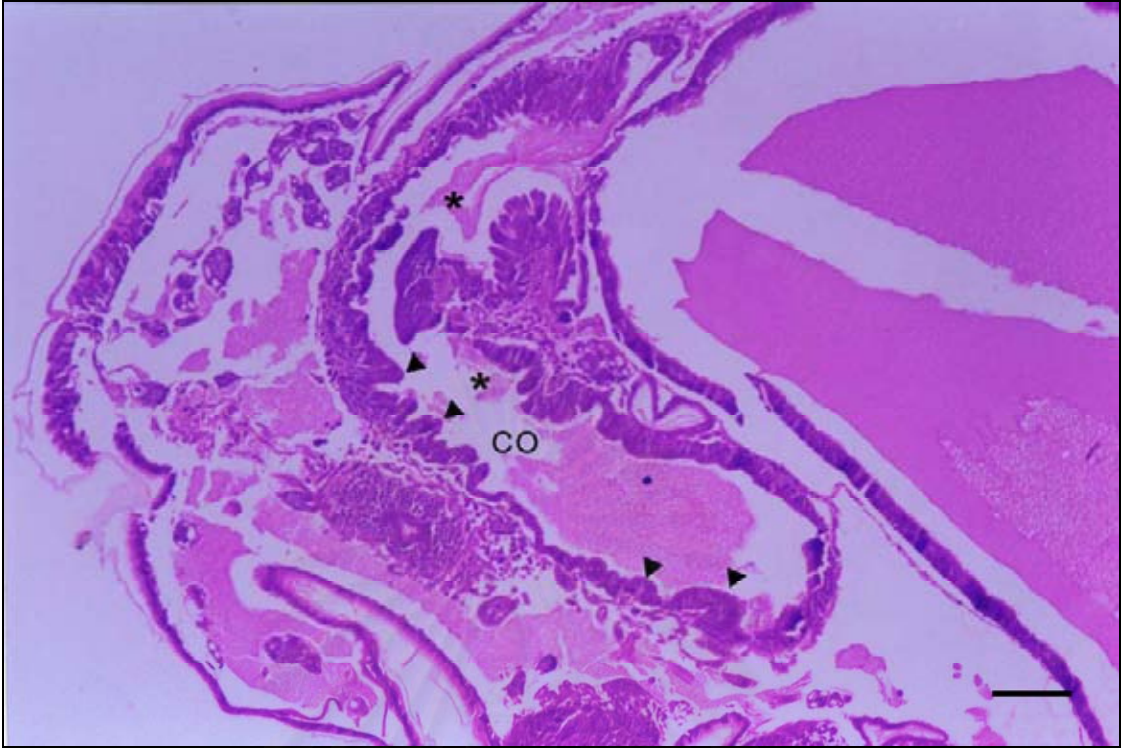
รูปที่ 7 ภาพขยายเยื่อบุผิวกระเพาะตัวอ่อนผึ้ง แสดงลักษณะของ simple columnar epithelium ซึ่งมี Columnar cell และมี microvilli บนด้านอิสระ (▶) และบางเซลล์มี proliferating membrane (*) ภายใน lumen มีเยื่อ peritrophic membrane (PM) ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยสานกันเป็นร่างแห

ย้อม H+E; Bar = 25 μ m



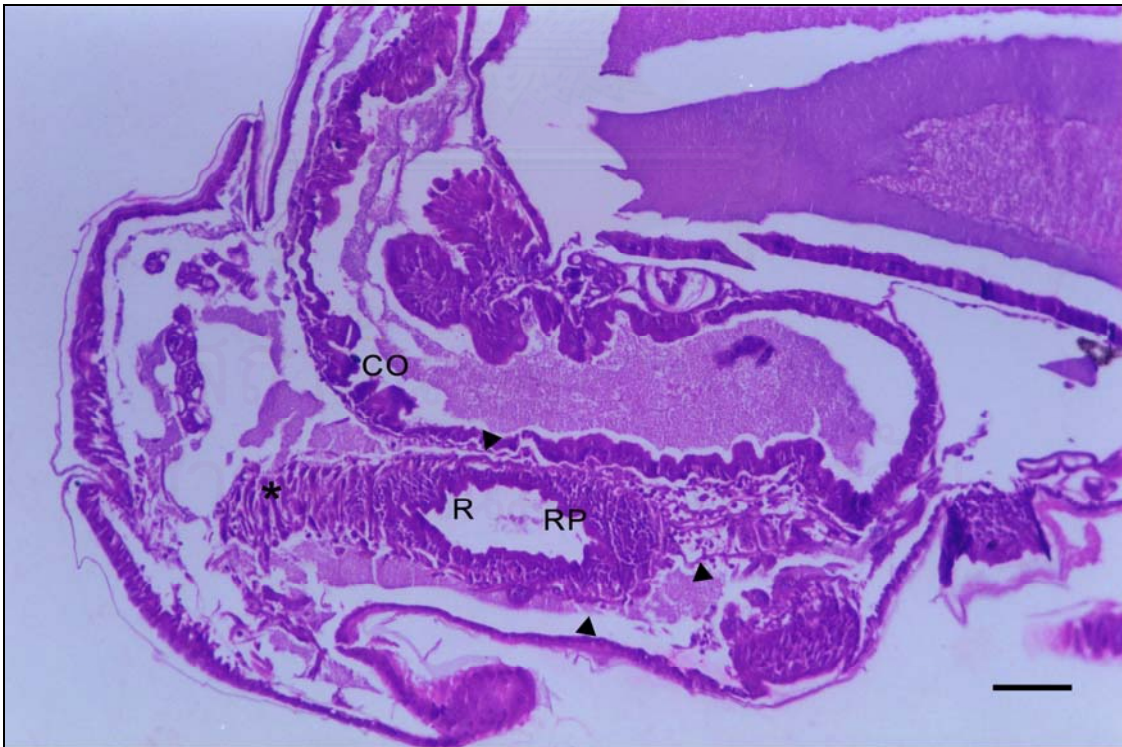
รูปที่ 8 แสดงทางเดินอาหารส่วนท้ายซึ่งประกอบด้วย small intestine (SM) ลำไส้ใหญ่ส่วน colon (CO) กับ rectum (R) และทวารหนัก anus (AN)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



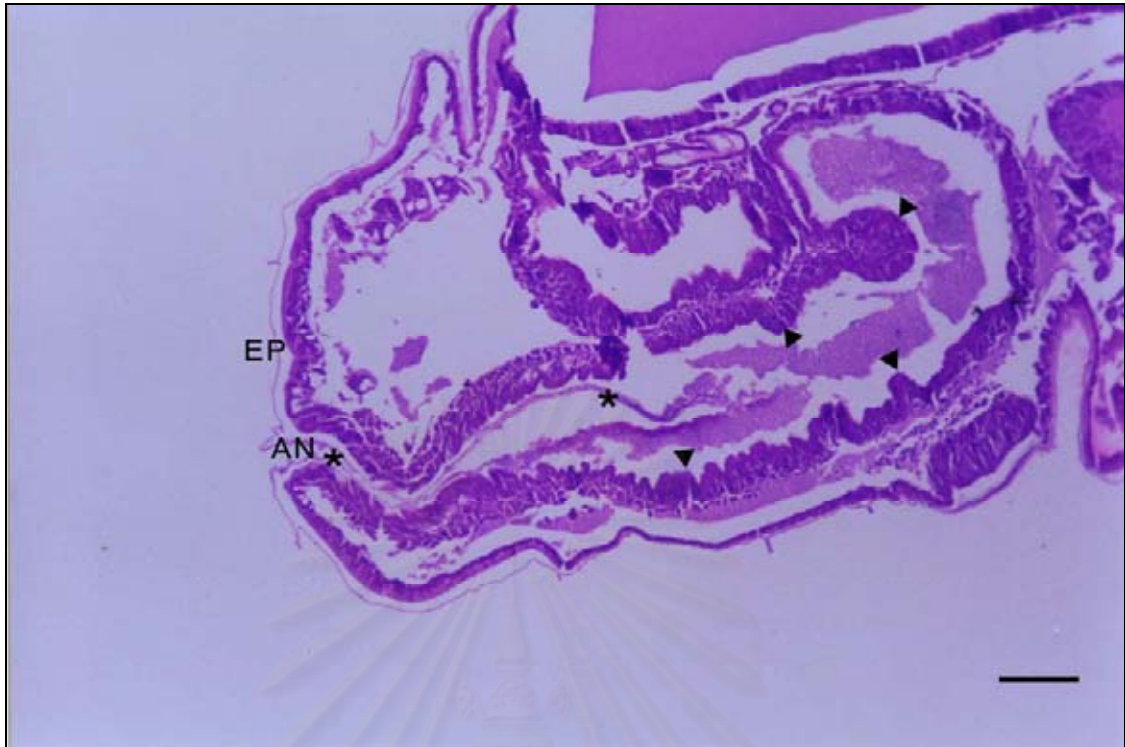
รูปที่ 9 แสดงลำไส้ใหญ่ส่วน colon (CO) ซึ่งมีเนื้อเยื่อบุผิวชนิด columnar epithelium เรียงตัวเป็นลอนสั้น(fold)ตามแนวยาวของท่อ (▶) และมีเยื่อ cuticular intima คลุ่มเนื้อเซลล์เยื่อบุผิว (*)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

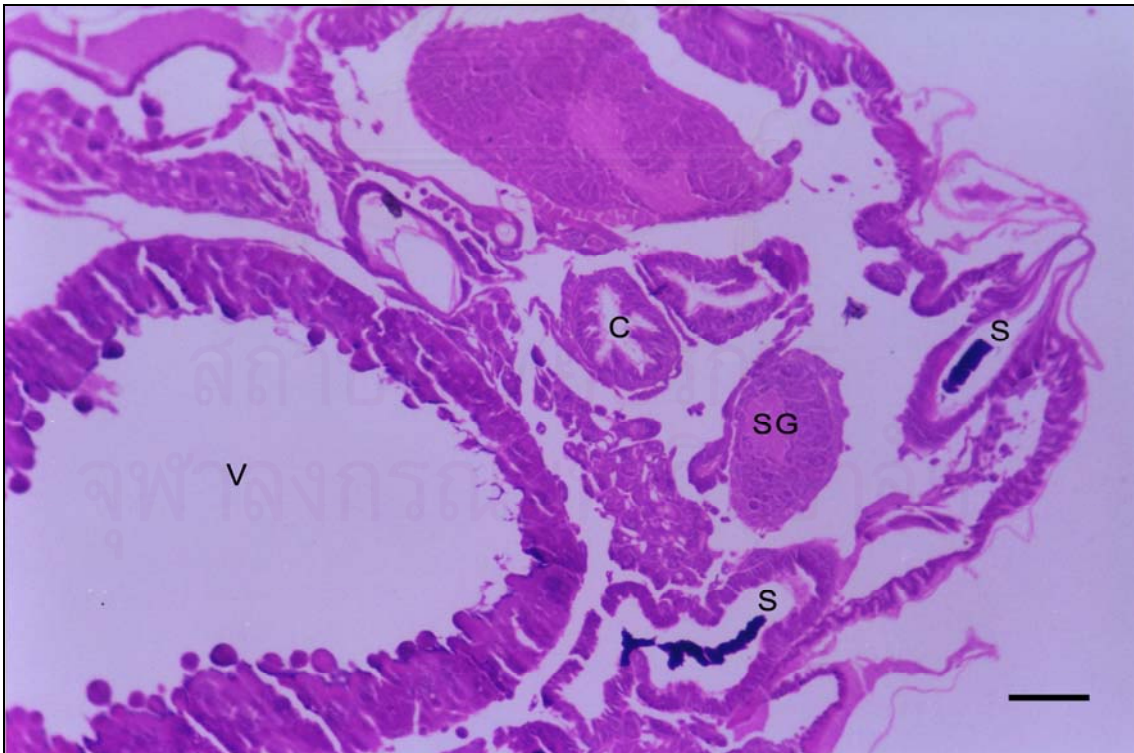


รูปที่ 10 แสดงลำไส้ใหญ่ส่วน colon (CO) และ rectum (R) ซึ่งมีเนื้อเยื่อบุผิว columnar epithelium เป็นลอนนูนเรียก rectal pad (RP) และชั้นนอกมีโครงสร้างเป็นเซลล์กล้ามเนื้อที่เรียงตัวเป็น circular muscle (*) และ longitudinal muscle (▶)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

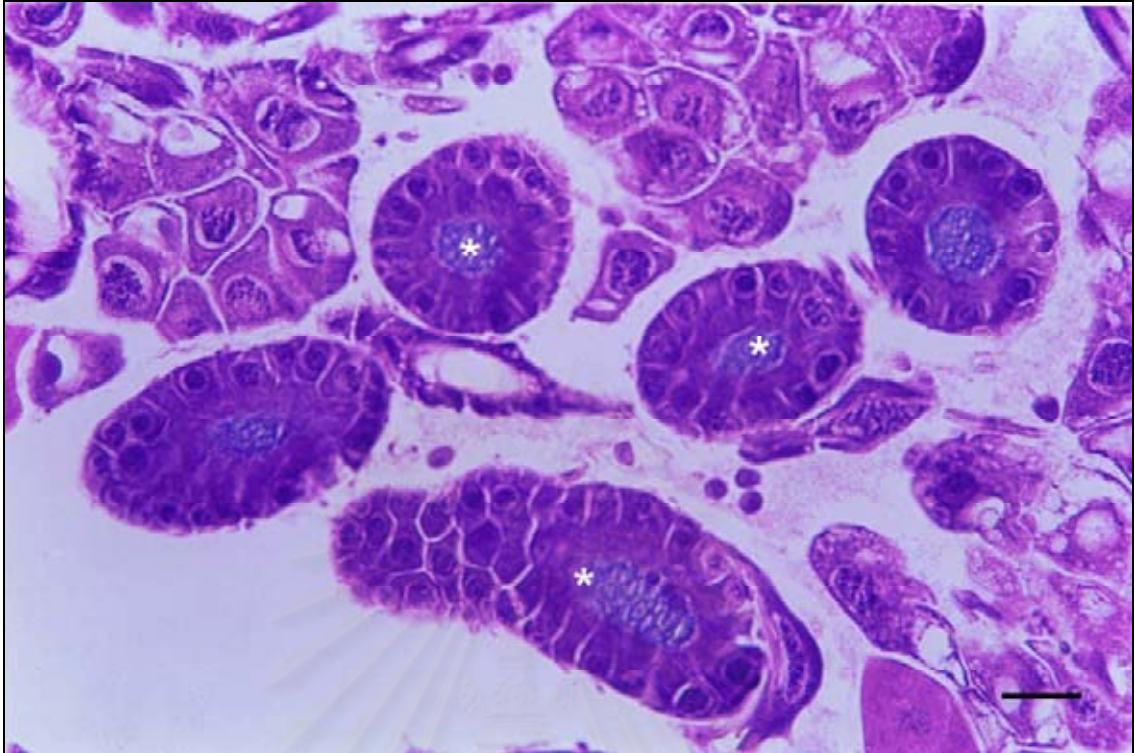


รูปที่ 11 แสดงบริเวณทวารหนัก (AN) และลำไส้ใหญ่ส่วน rectum ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยชั้น cuticular intima (*) ที่เชื่อมติดต่อกับชั้น cuticle ด้านนอกของ epidermis (EP) ภายในบริเวณ rectum มีชั้น epithelium นูนเป็น rectal pad (▶) ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

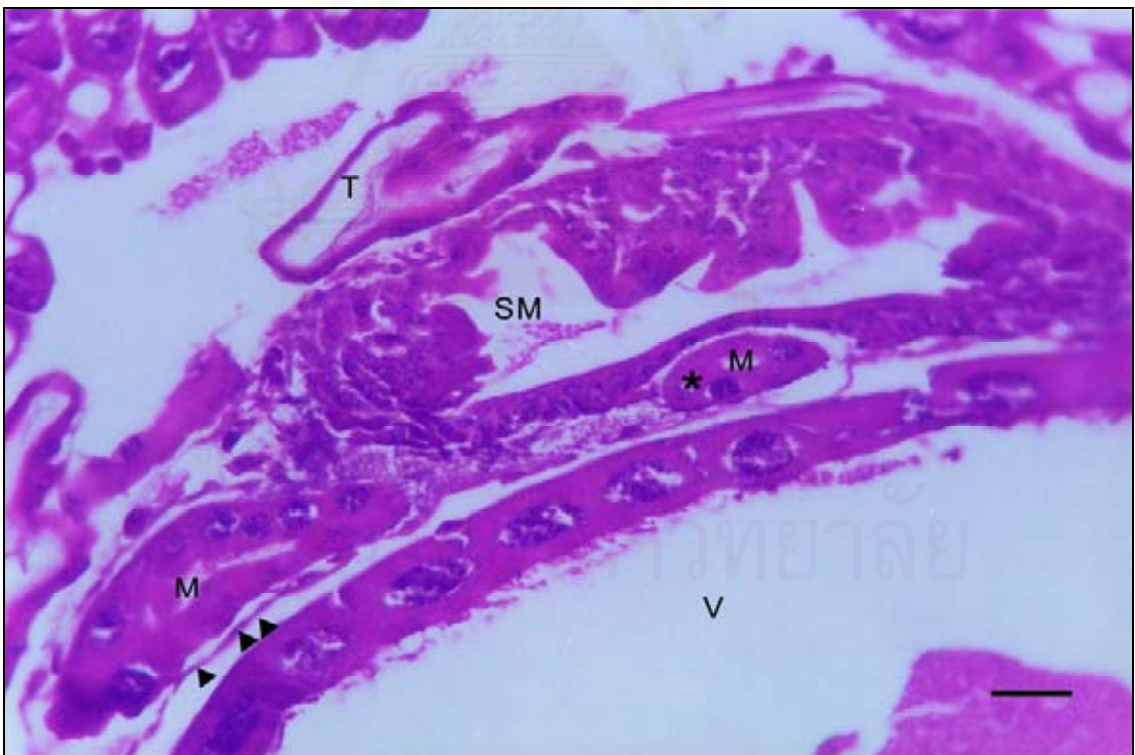


รูปที่ 12 แสดงต่อมสร้างเส้นใย silk gland (S) บริเวณใต้ปากและลำตัวซึ่งทอดยาวด้านล่างใต้ทางเดินอาหารส่วนต้น และกระเพาะ (Crop = C, Suboesophageal ganglion = SG, Ventriculus = V)

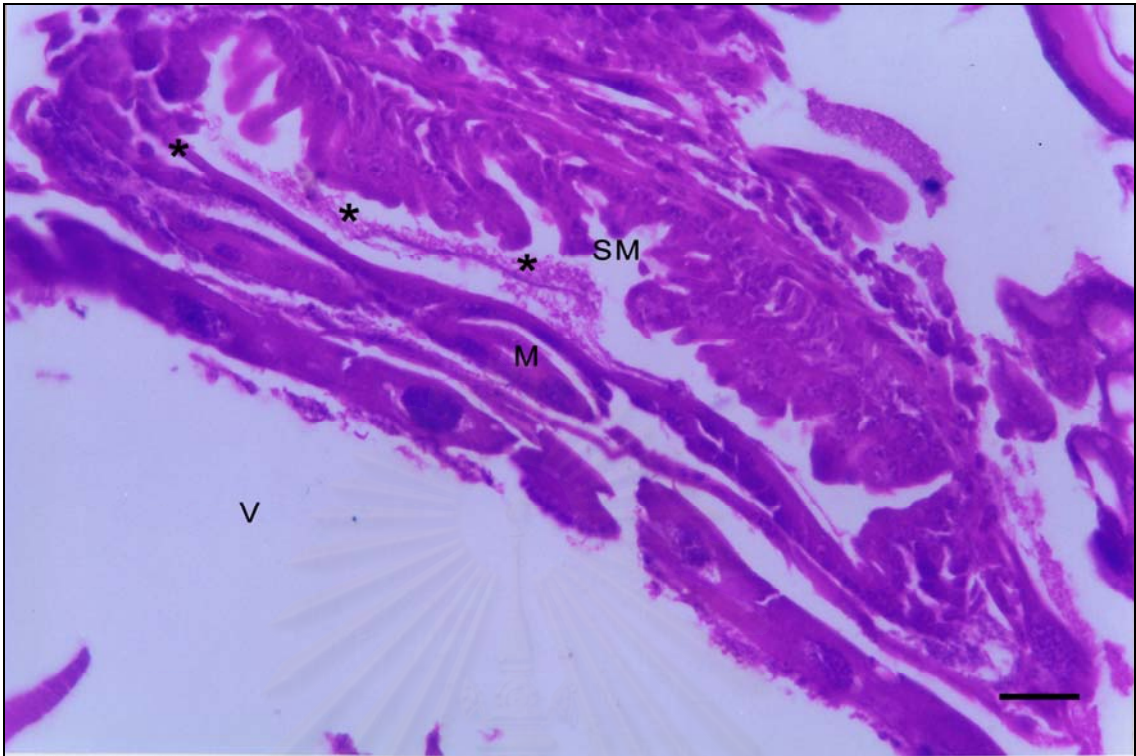
ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



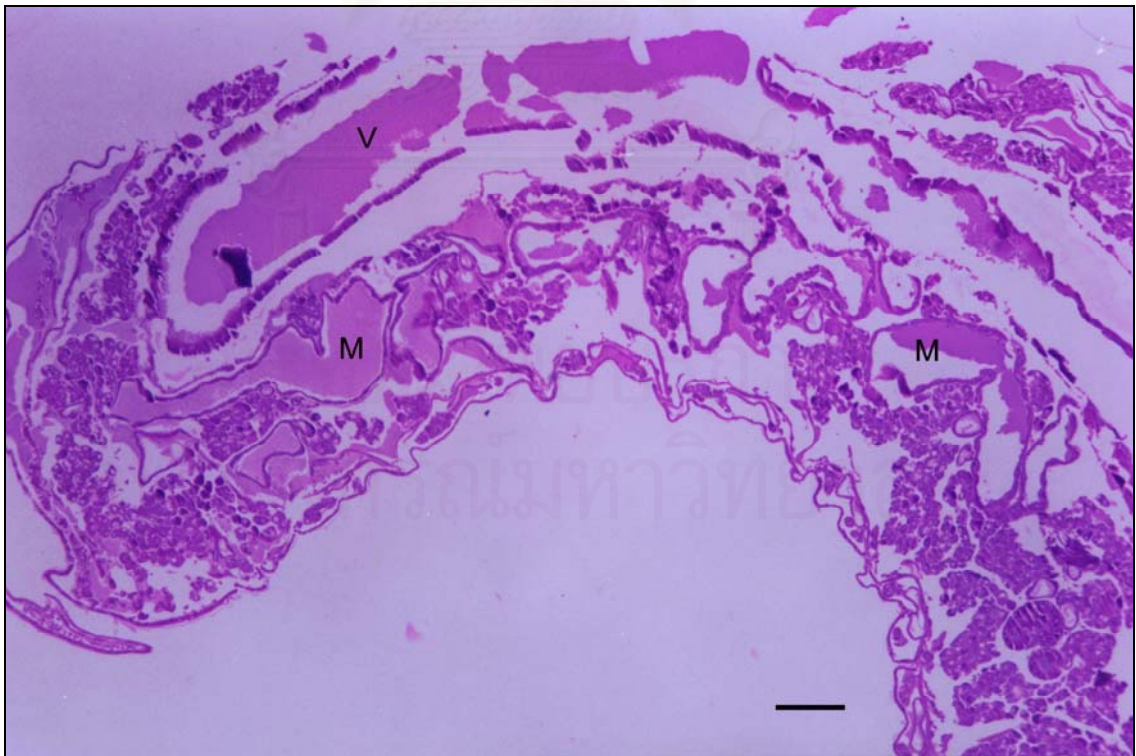
รูปที่ 13 แสดงรายละเอียดต่อมสร้างเส้นใยตัดตามขวาง มีโครงสร้างเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple cuboidal epithelium ภายใน lumen มีเส้นใย (*) ย้อม H+E; Bar = 25 μ m



รูปที่ 14 แสดงภาพขยายบริเวณ ลำไส้เล็ก (SM) ที่มี malpighian tubule (M) ท่อขับถ่ายของเสียเชื่อมติดต่อกับ โครงสร้างของท่อขับถ่ายของเสีย ประกอบด้วย simple cuboidal epithelium (*) ที่ล้อมรอบด้วย connective tissue (▶) (Ventriculus = V, Trachea = T) ย้อม H+E; Bar = 25 μ m

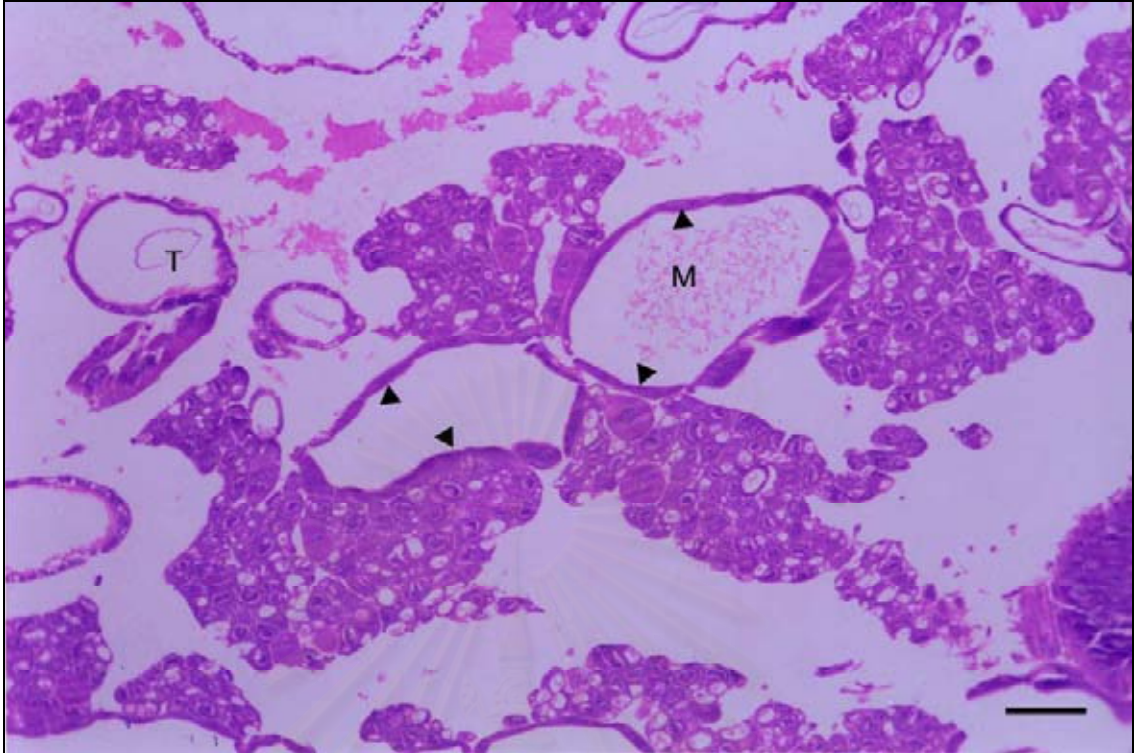


รูปที่ 15 แสดงภาพขยาย malpighian tubule (M) ที่แทรกระหว่างรอยต่อของกระเพาะ (V) กับลำไส้เล็ก (SM) ซึ่งมีเยื่อ cuticular intima (*) อยู่ภายใน lumen ของลำไส้เล็ก ย้อม H+E; Bar = 25 μ m



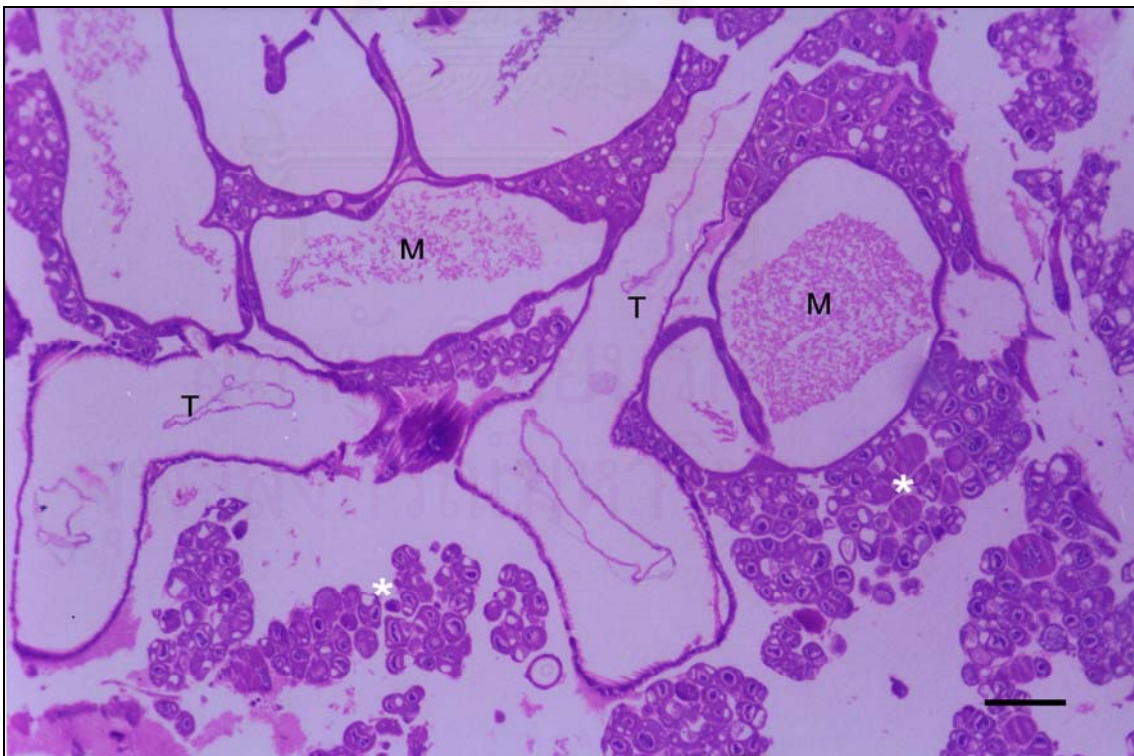
รูปที่ 16 แสดงตำแหน่งท่อขับถ่ายของเสีย malpighian tubule (M) ที่กระจายอยู่ภายในช่องว่างของลำตัวด้านล่างในบริเวณใต้ทางเดินอาหารภายในช่องท้องตัวอ่อนผึ้ง (Ventriculus = V)

ย้อม H+E; Bar = 250 μ m



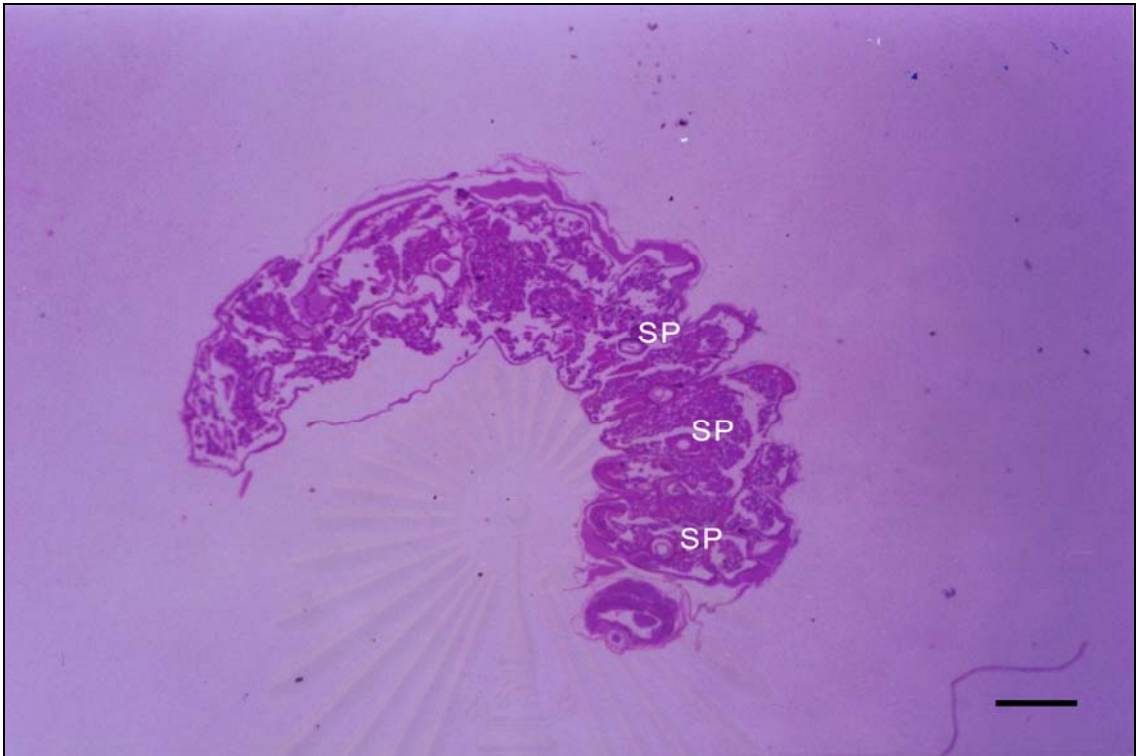
รูปที่ 17 แสดงภาพท่อ malpighian tubule (M) ตามแนวขวาง โครงสร้างผนังท่อประกอบด้วยเซลล์รูปแบนบาง (▶) ภายใน lumen มีผลึกสารย้อมติดสีชมพู (Trachea = T)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



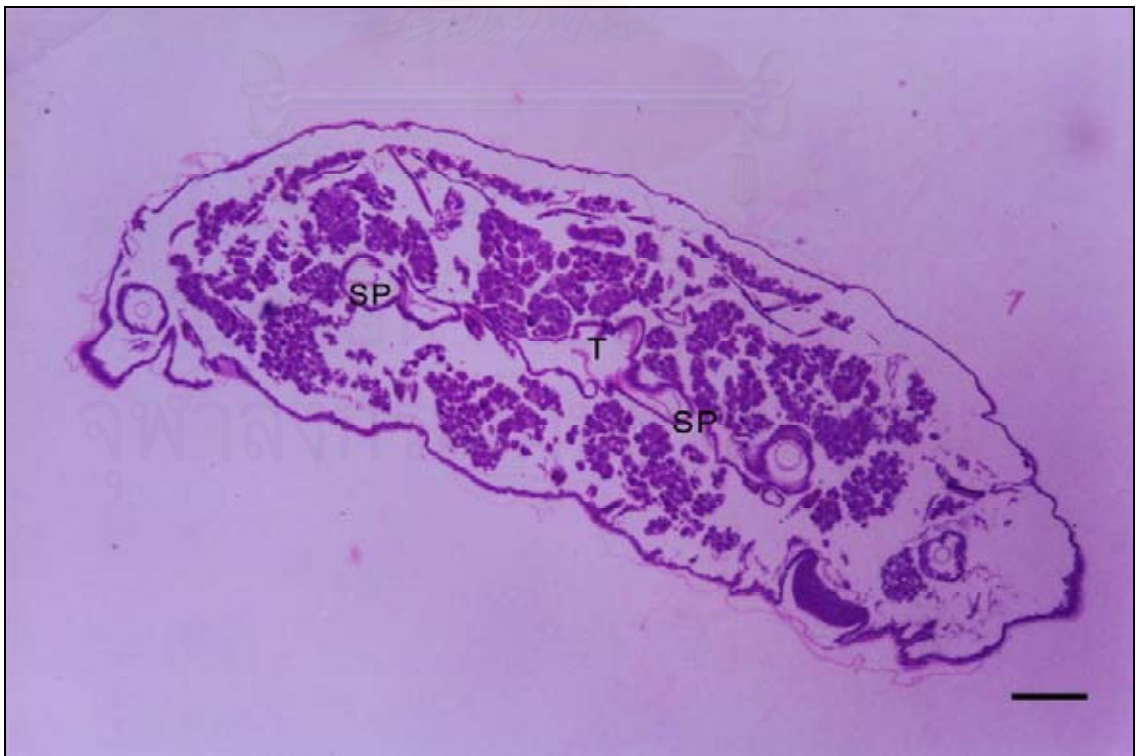
รูปที่ 18 แสดงท่อขับถ่ายของเสีย malpighian tubule (M) ที่แทรกระหว่าง haematocyte และ haemolymph (*) ในบริเวณใกล้ท่อลม trachea (T)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



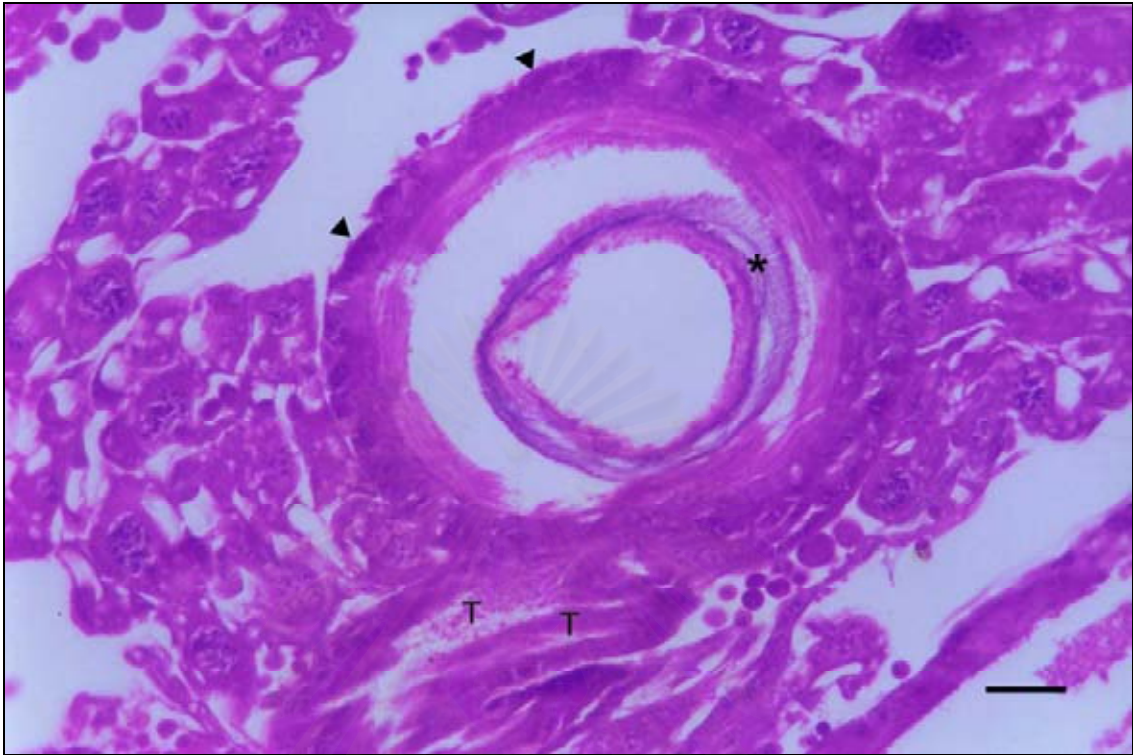
รูปที่ 19 แสดงระบบแลกเปลี่ยนก๊าซหรือระบบหายใจตลอดความยาวของตัวอ่อนในบริเวณส่วนหัวและส่วนอก ซึ่งประกอบด้วยช่องเปิดที่อลม spiracle (SP) ที่บริเวณส่วนหัว ส่วนอก และ ส่วนท้อง

ย้อม H+E ; Bar = 500 μ m



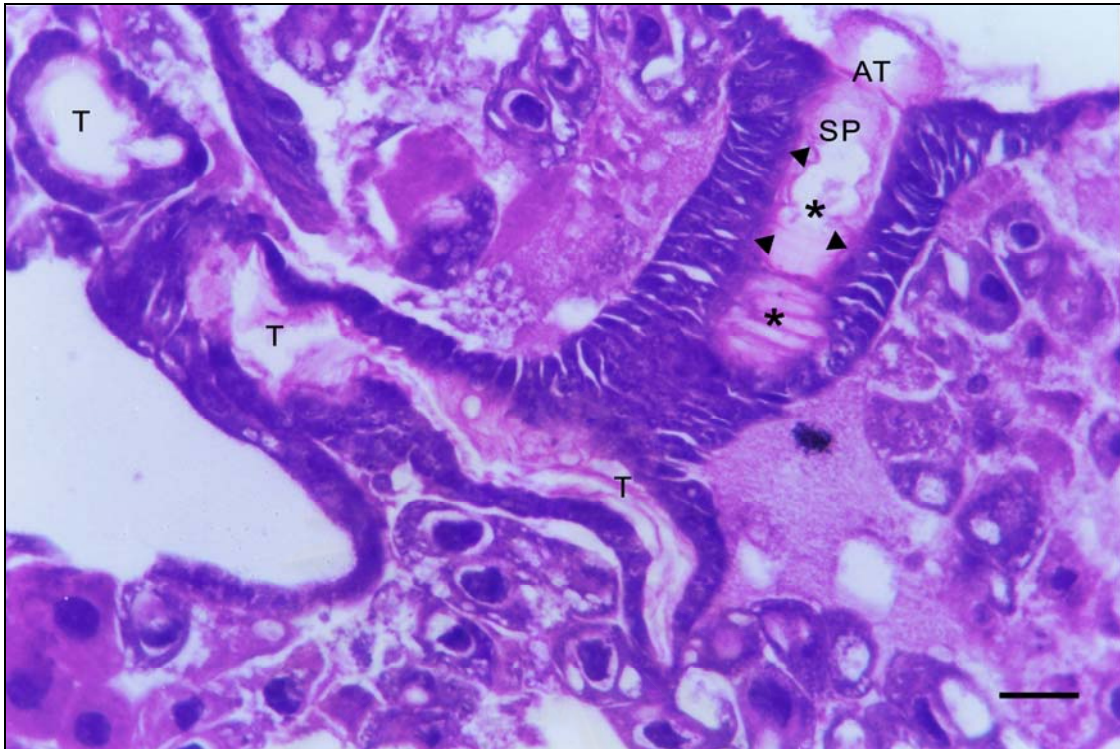
รูปที่ 20 แสดงช่อง spiracle (SP) ที่มีท่อลม trachea (T) เชื่อมต่อระหว่างช่อง spiracle ในแนวด้านข้างของลำตัวเป็นสายหลักตลอดแนวส่วนท้อง

ย้อม H+E; Bar = 250 μ m



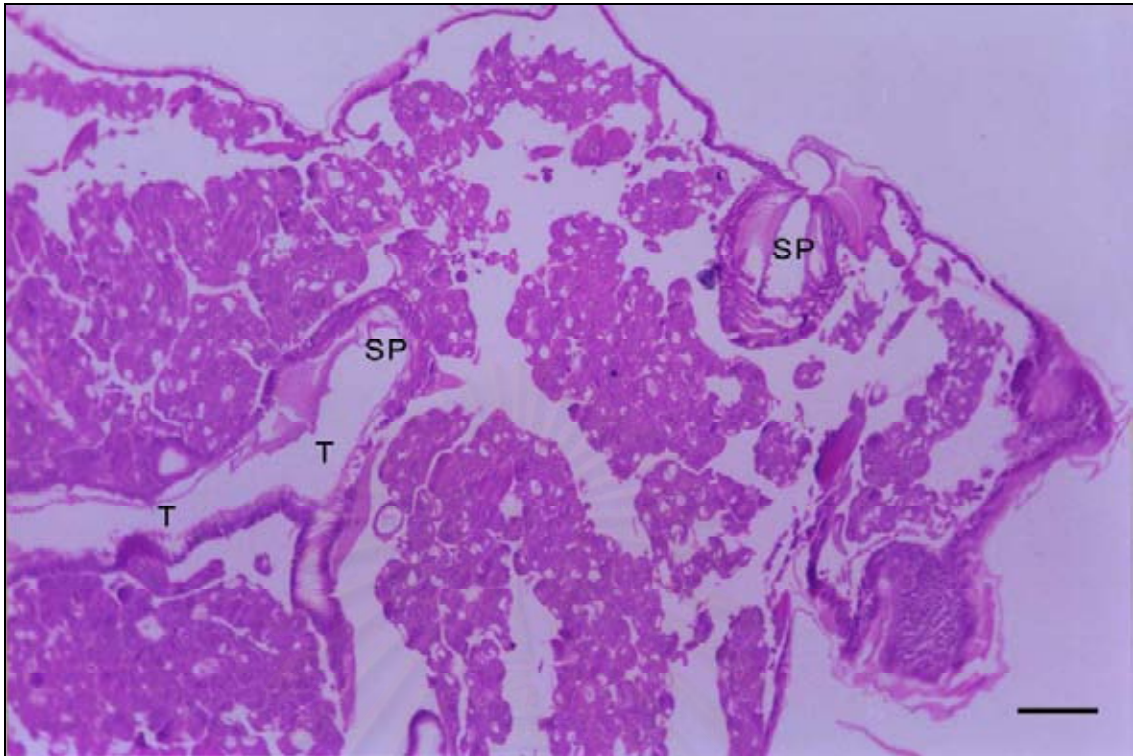
รูปที่ 21 แสดงภาพขยายช่อง spiracle ตามแนวขวางซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยเนื้อเยื่อผิวหนังชนิด simple cuboidal epithelium (▶) และเยื่อ cuticular intima ของชั้น epidermis ที่มีความหนาไม่สม่ำเสมอและเป็นสันนูนเป็นเกลียวพันรอบ lumen ของ spiracle (*) ช่อง spiracle จะเชื่อมต่อกับท่อลม trachea (T) ย้อม H+E; Bar = 25 μ m

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

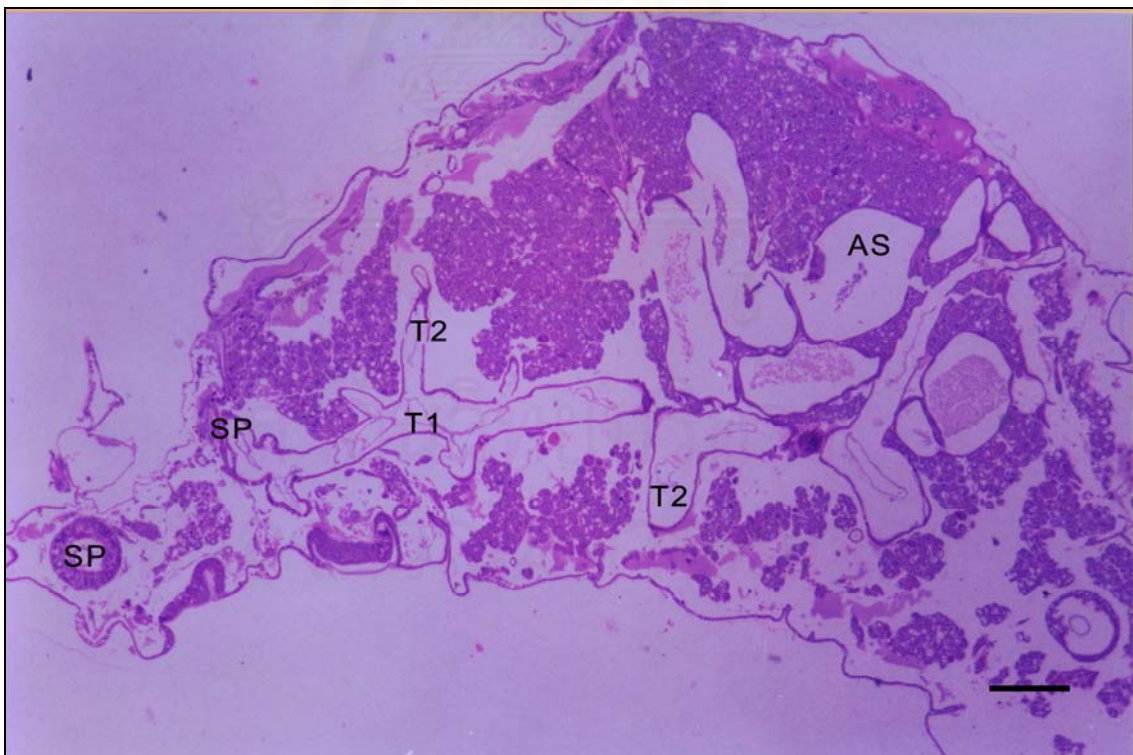


รูปที่ 22 ภาพแสดงช่อง spiracle (SP) และท่อลม trachea (T) ที่ด้านข้างของลำตัว บริเวณปากช่องมีลักษณะเป็นแอ่งเรียก atrium (AT) ภายในช่อง spiracle ประกอบด้วยชั้น simple columnar epithelium (▶) และภายในมีเยื่อ cuticular intima เคลือบผิวซึ่งมีความหนาเป็นเกลียวรอบช่อง lumen (*) ที่ด้านล่างของช่อง spiracle จะติดต่อกับท่อลม (T) ที่แตกแขนงย่อยออกไปยังเนื้อเยื่ออื่น

ย้อม H+E; Bar = 25 μ m

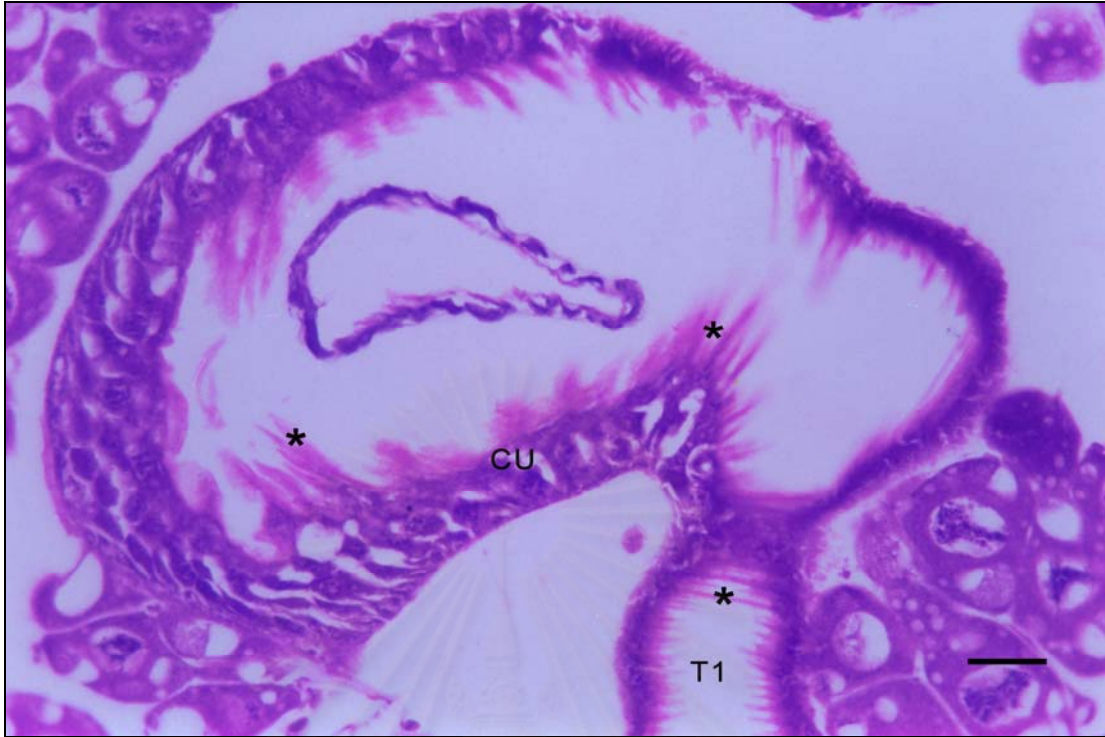


รูปที่ 23 แสดงช่องเปิด spiracle (SP) บริเวณหัว และระบบท่อลม tracheal system (T) ที่เชื่อมต่อกับ spiracle และแตกแขนงเป็นท่อลมย่อยแทรกกระหว่างเนื้อเยื่อเลือด ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 24 แสดงระบบท่อลม ในบริเวณส่วนหัว, ส่วนอก และส่วนท้องซึ่งประกอบด้วยท่อลมใหญ่ที่ต่อเชื่อมกับ spiracle (SP) ท่อลมรองลงมา (T₁) เชื่อมระหว่าง spiracle อยู่แนวกลางลำตัว และท่อลมย่อย (T₂) ที่แตกแขนงออกไปทางด้านบนและด้านล่างของตัว และ airsac (AS)

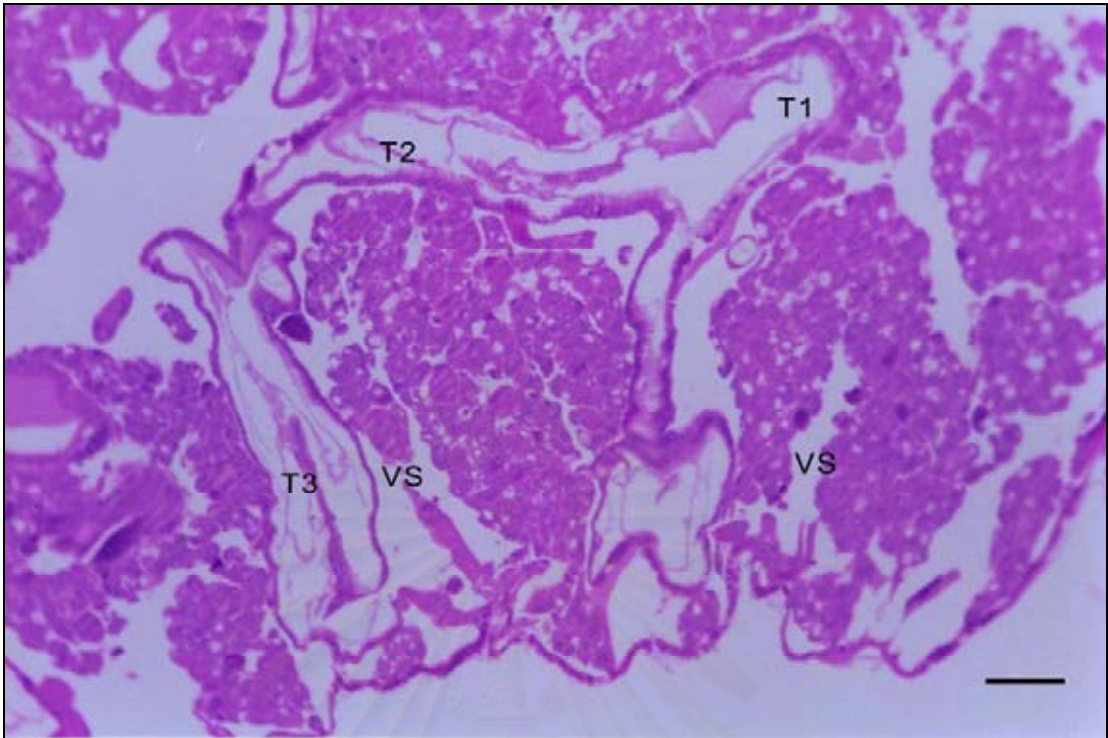
ย้อม H+E; Bar = 250 μ m



รูปที่ 25 แสดงโครงสร้างท่อลม ที่ประกอบด้วย simple cuboidal epithelium (CU) เยื่อชั้น cuticular intima ที่มีสาร cutin เคลือบหนาเป็นเกลียววงแหวน เรียก taenidae (*) ท่อลมใหญ่จะแตกแขนงเล็กลงไปเป็นท่อลมย่อย (T1) และภายในท่อที่มีชั้น cuticular intima และ taenidae

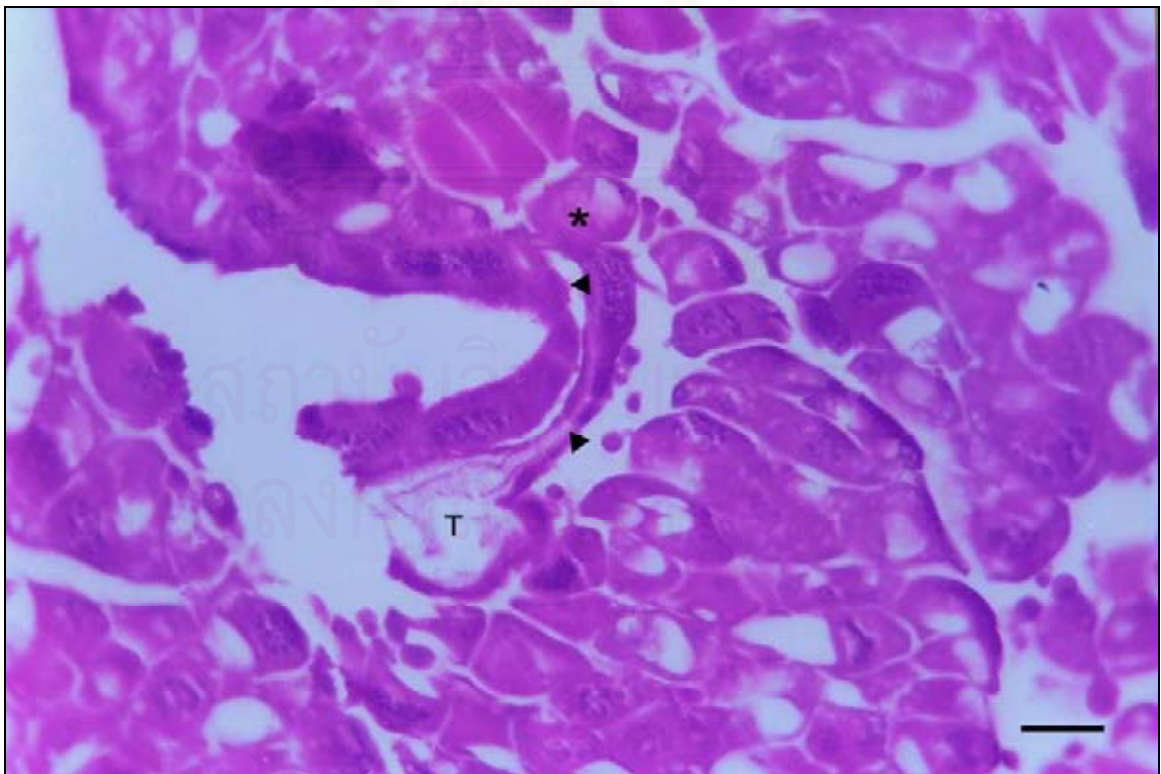
ย้อม H+E; Bar = 25 μ m

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



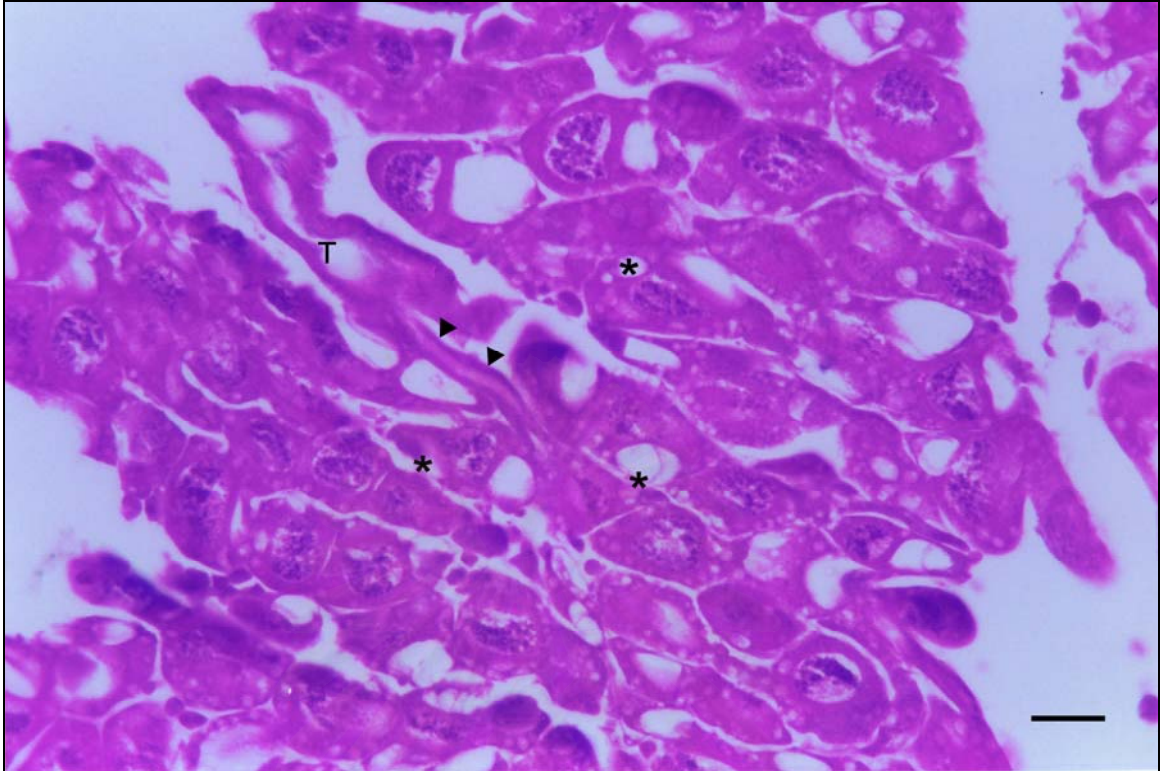
รูปที่ 26 แสดงการแตกสาขาของท่อลมตามลำดับจากท่อลมขนาดใหญ่ (T1) ลงมาเป็นท่อลมรองลงมา (T2) และ (T3) เพื่อแทรกเข้าไปยังบริเวณ ventral sinus (VS) ด้านล่างของส่วนท้อง

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

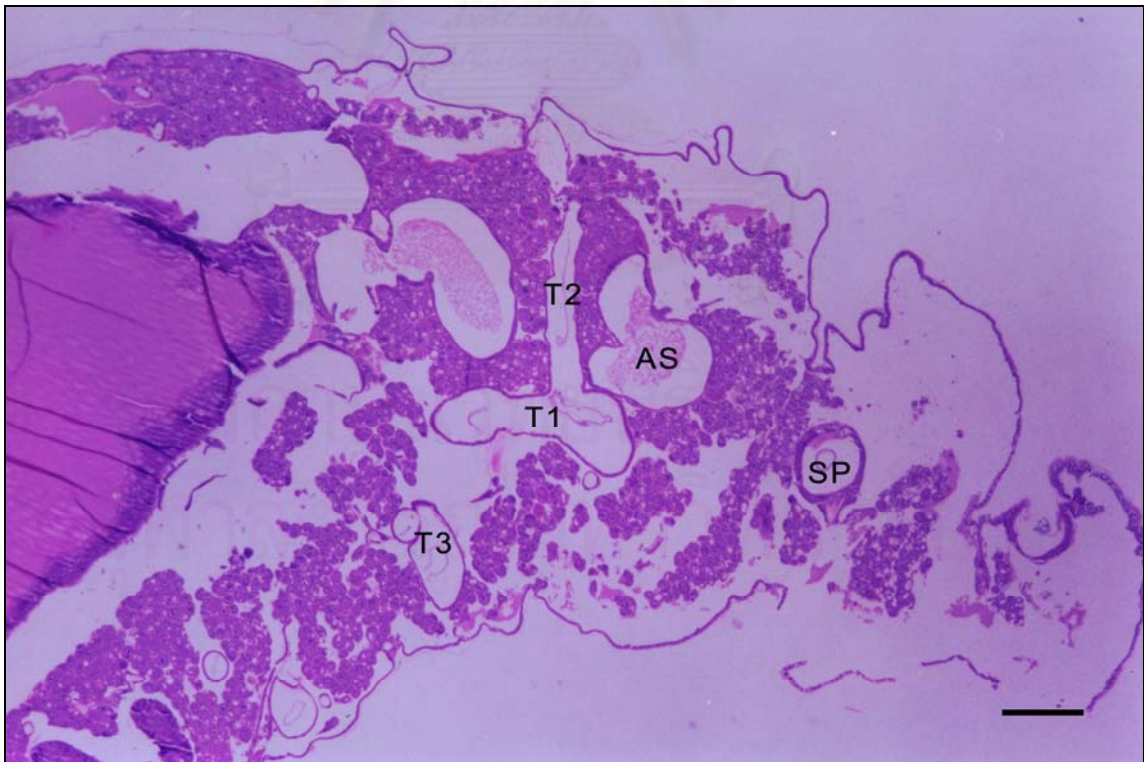


รูปที่ 27 แสดงการแตกสาขาย่อยของท่อลม trachea (T) ลงไปเป็นท่อลมฝอย trachole (►) และเซลล์ tracheoblast (*)

ย้อม H+E ; Bar = 25 μ m

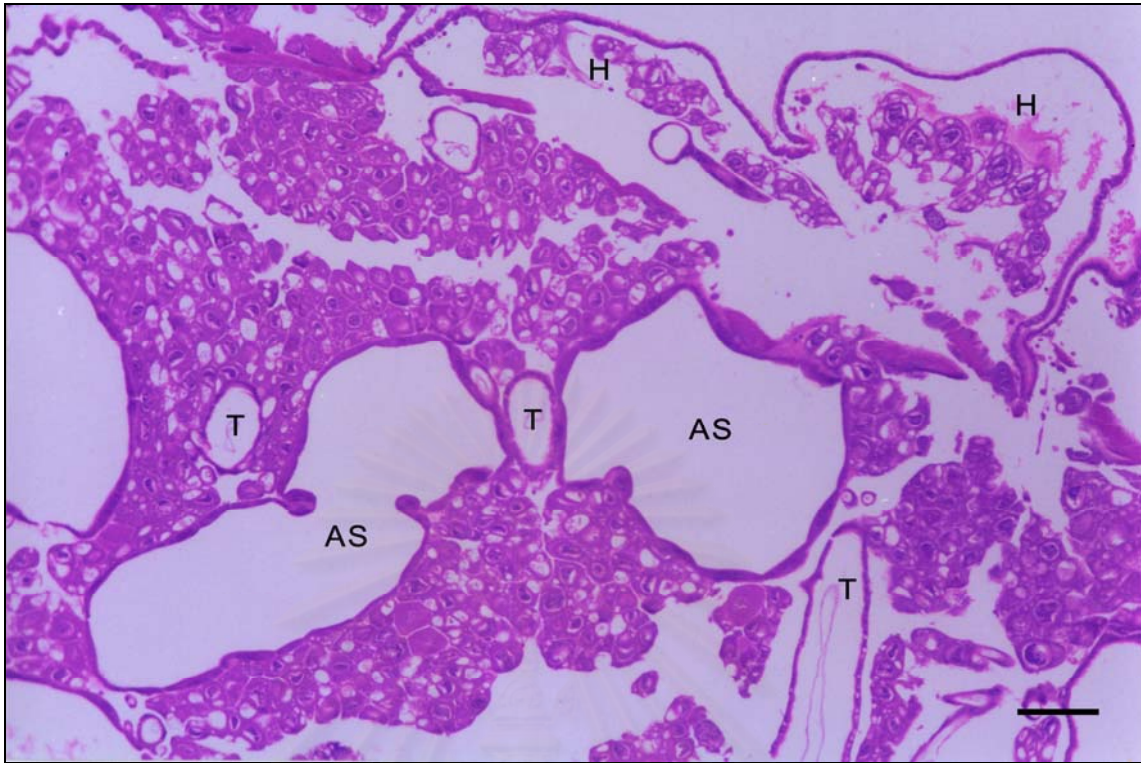


รูปที่ 28 แสดงรอยต่อเชื่อมระหว่างท่อลม trachea (T) กับ ท่อลมฝอย tracheole (►) ในบริเวณกลุ่มเซลล์เม็ดเลือด (*)
 ย้อม H+E; Bar = 25 μ m

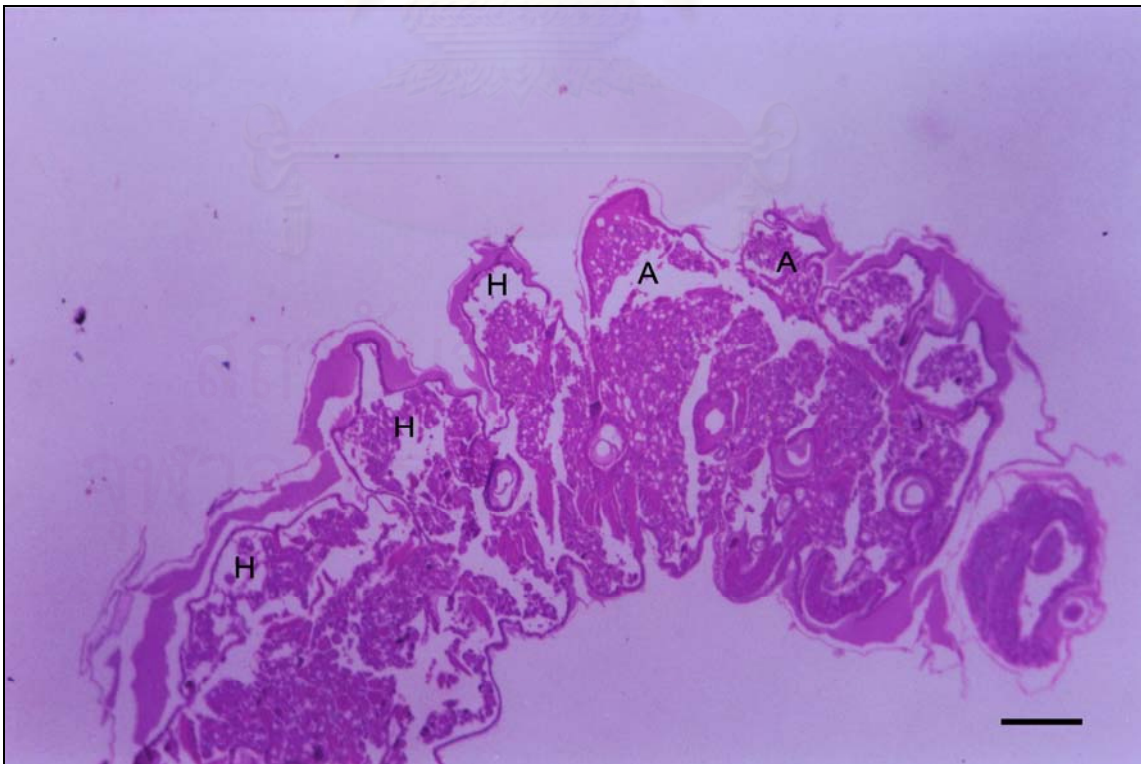


รูปที่ 29 แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของระบบแลกเปลี่ยนก๊าซหรือ ระบบหายใจซึ่งประกอบด้วยช่อง spiracle (SP) ท่อลมใหญ่ (T1) ท่อลมย่อย (T2, T3) และถุงลม air sac (AS)

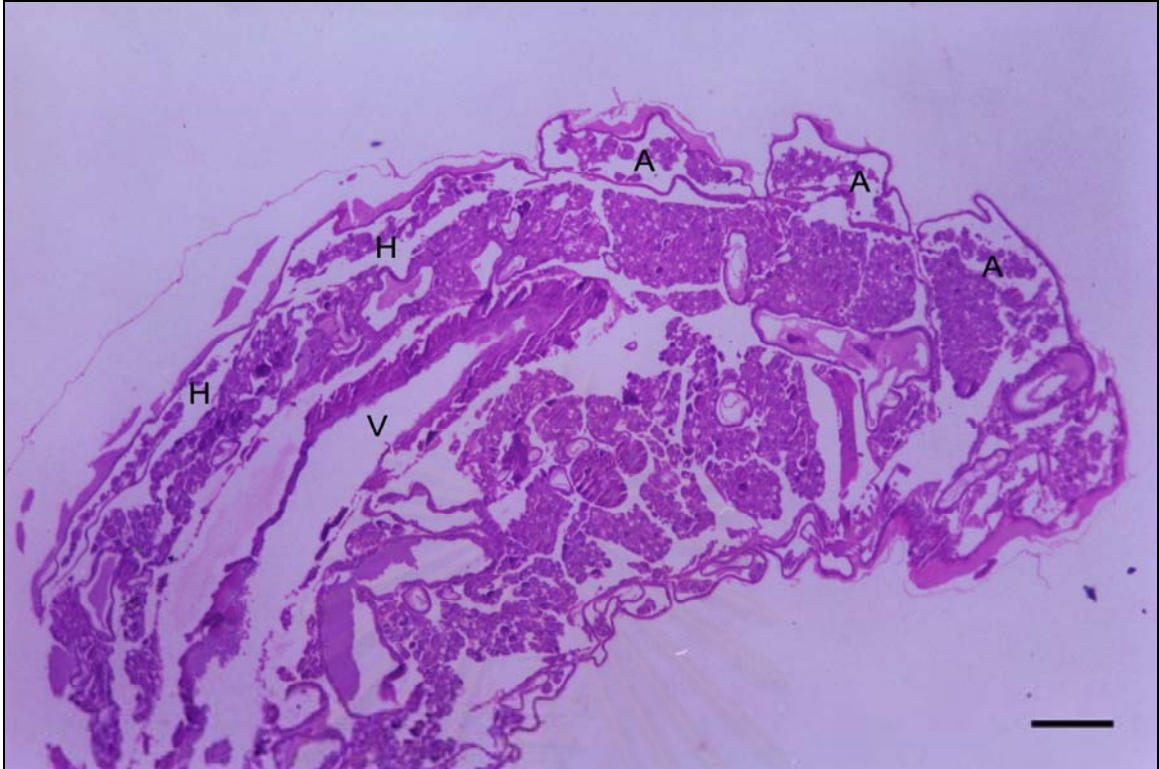
ย้อม H+E; Bar = 250 μ m



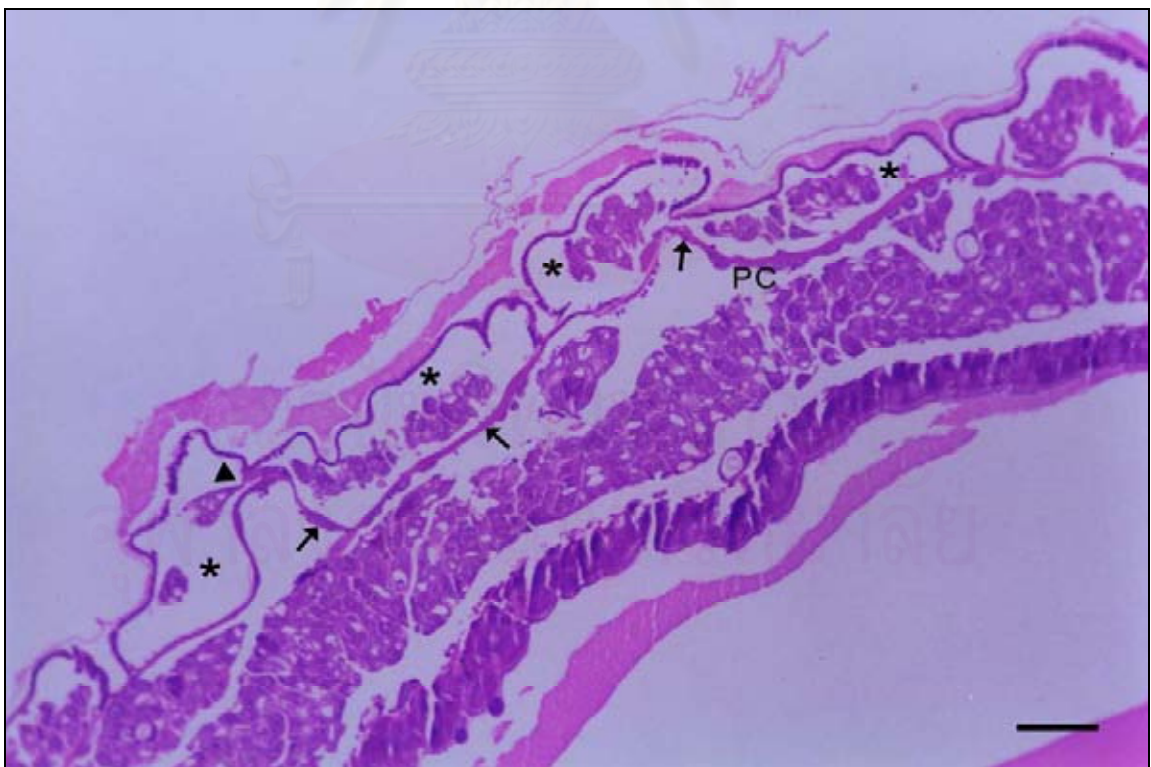
รูปที่ 30 แสดงภาพขยายของถุงลม air sac (AS) บริเวณใกล้กับท่อลม (T) ขนาดต่างๆ ถุงลมมีโครงสร้างประกอบด้วย simple squamous cell ภายในท่อไม่มีชั้น cuticular intima ซึ่งต่างจากท่อลม (Heart = H) ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



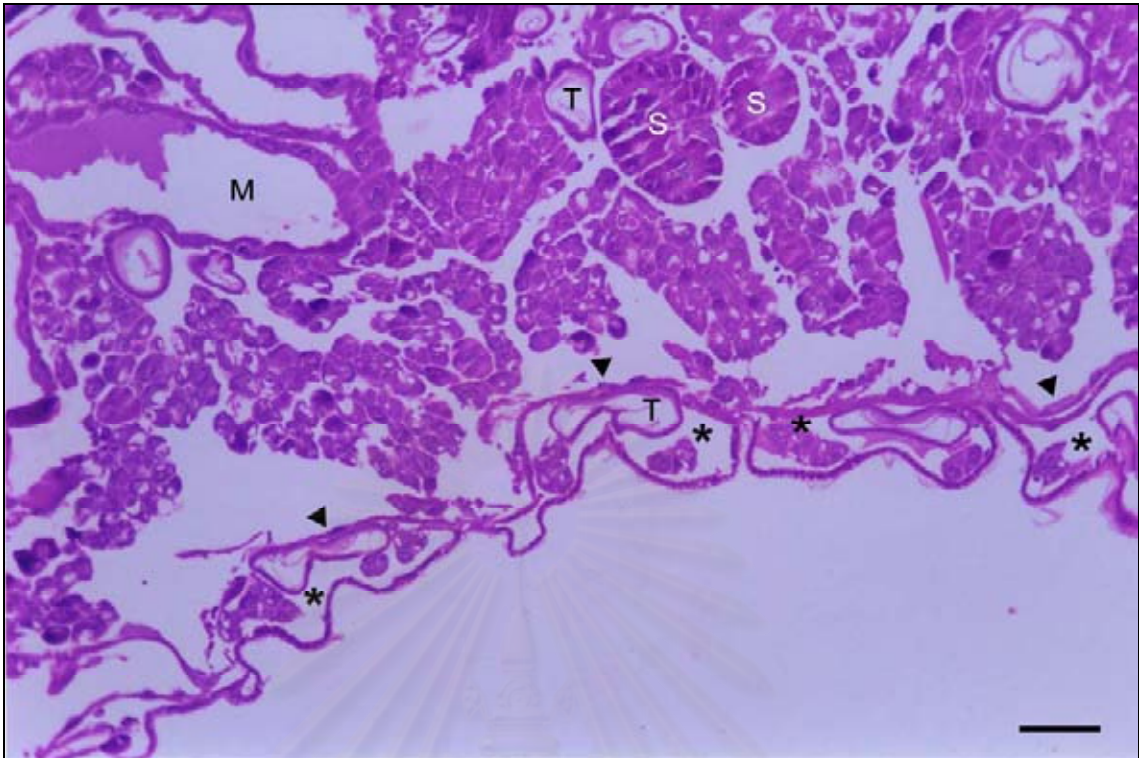
รูปที่ 31 แสดง dorsal sinus ในช่วงที่เรียกว่า aorta (A) ซึ่งอยู่ในบริเวณส่วนหัวและอก และ dorsal vessel หรือ heart (H) ในบริเวณส่วนท้อง ช่อง dorsal sinus อยู่ด้านบนมีความยาวตลอดตัวเริ่มจากส่วน หัว, อก และส่วนท้อง ย้อม H+E; Bar = 250 μ m



รูปที่ 32 แสดง aorta (A) บริเวณส่วนหัว, อก และ dorsal vessel หรือหัวใจ (H) ที่อยู่เหนือบริเวณ midgut หรือ ventriculus (V) ภายในช่อง dorsal sinus ย้อม H+E; Bar = 250 μ m

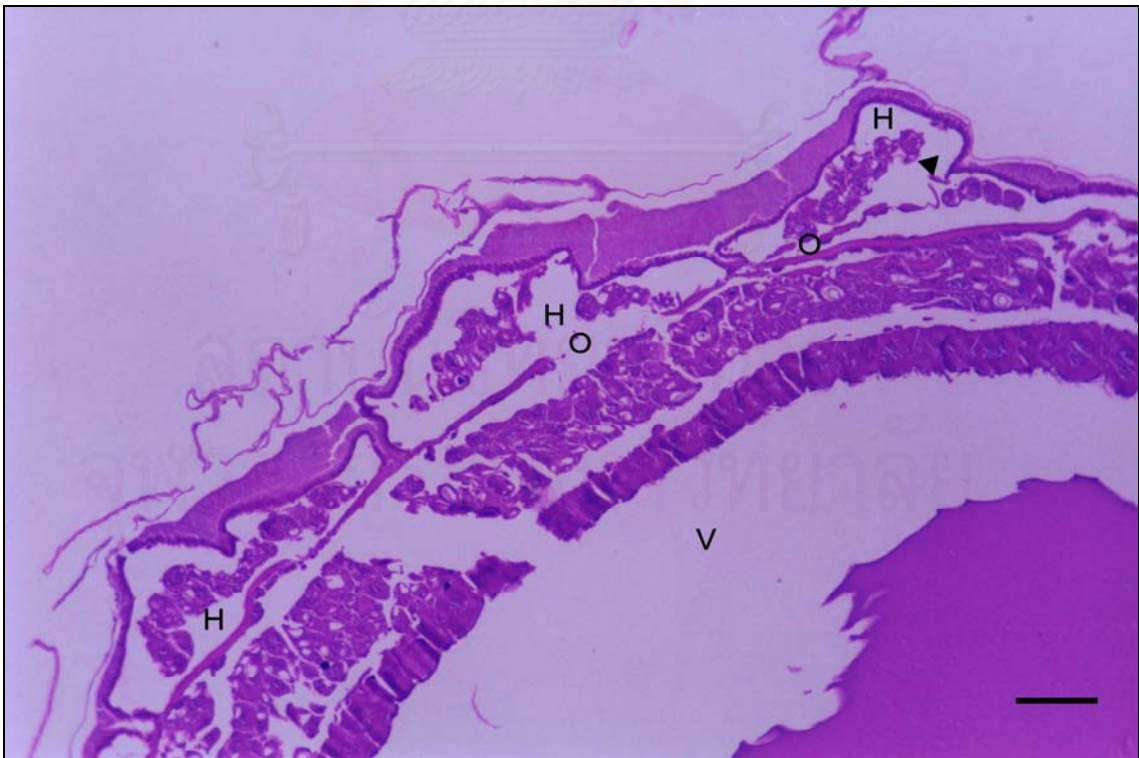


รูปที่ 33 แสดง dorsal sinus (*) ในบริเวณที่เป็น dorsal vessel หรือหัวใจซึ่งมีเยื่อที่ pericardial septum (→) ประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อและ pericardial cell (PC) ระหว่างห้องหัวใจมี valve (▴) ควบคุมการไหลของเลือด ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



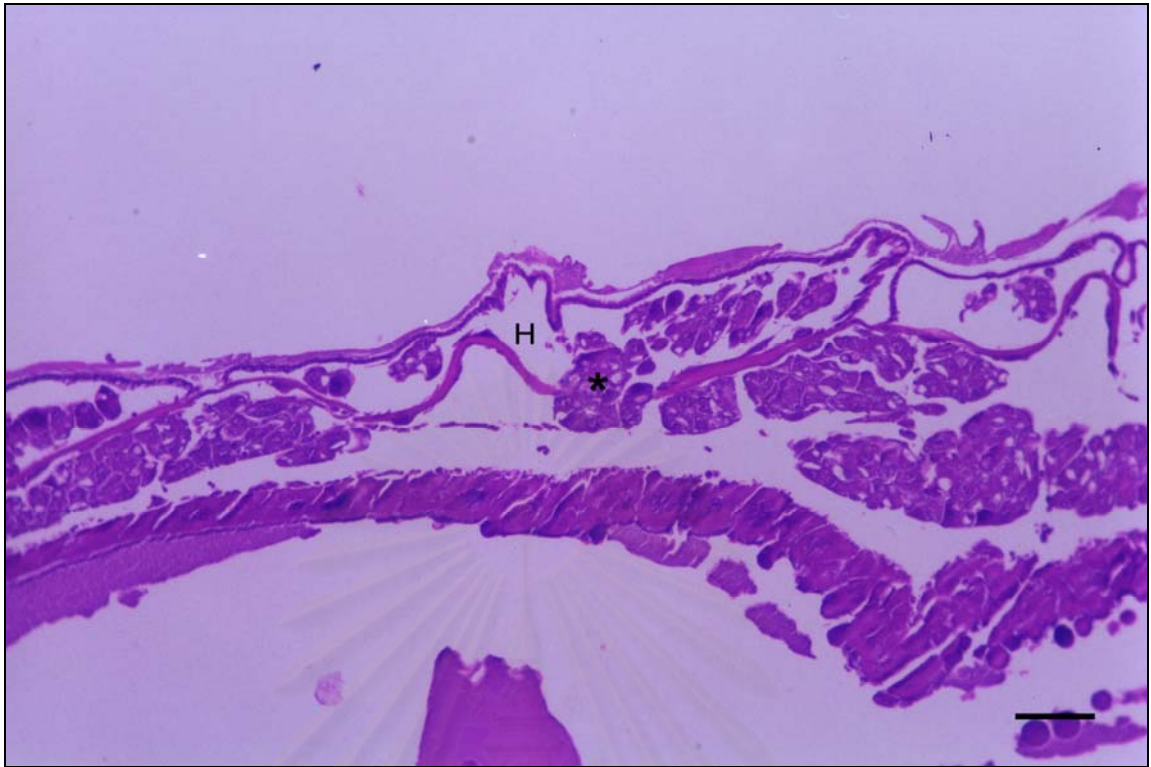
รูปที่ 34 แสดง ventral sinus หรือ perineural sinus (*) และ ventral diaphragm (▶) อยู่ด้านล่าง บริเวณส่วนท้องของตัวอ่อน (Malpighian tubule = M, Silk gland = S, Taenidia = T)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

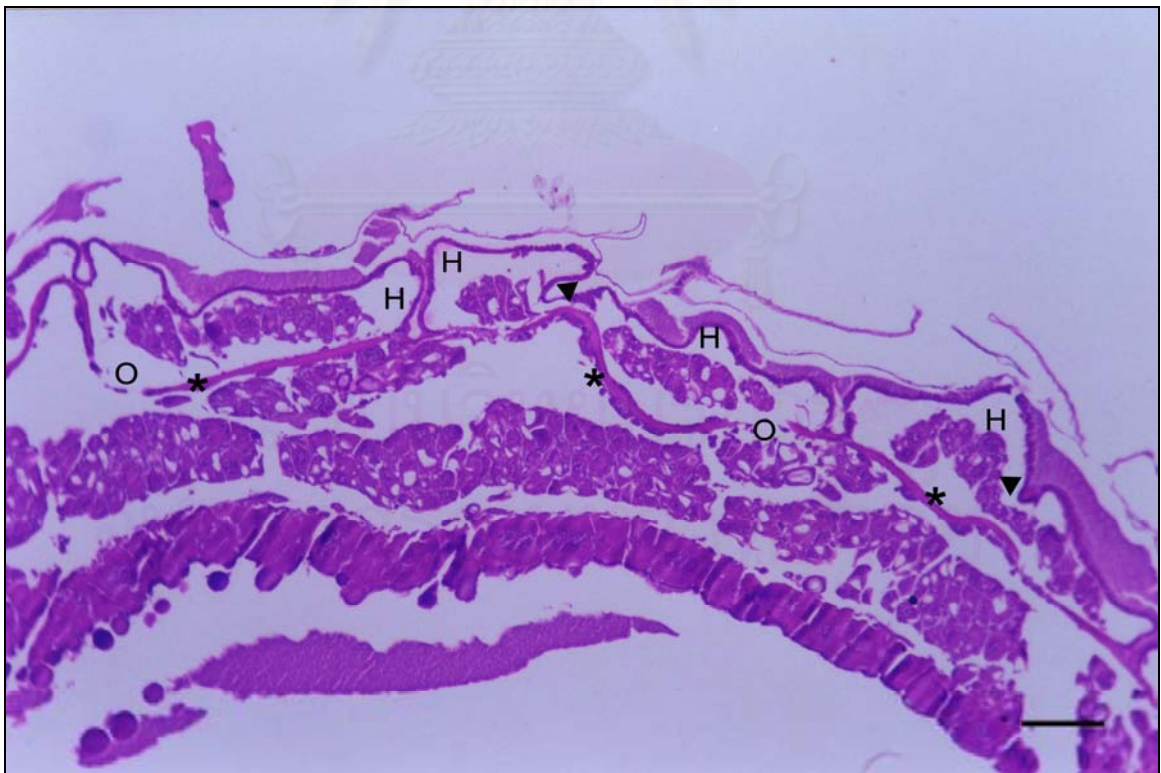


รูปที่ 35 แสดงหัวใจ heart (H) 3 ห้องเหนือบริเวณ midgut หรือ ventriculus (V) ระหว่างหัวใจ 2 ห้องมี valve (▶) ควบคุมทิศทางการไหลของเลือด และมีรูเปิด ostia (O) อยู่ด้านข้าง

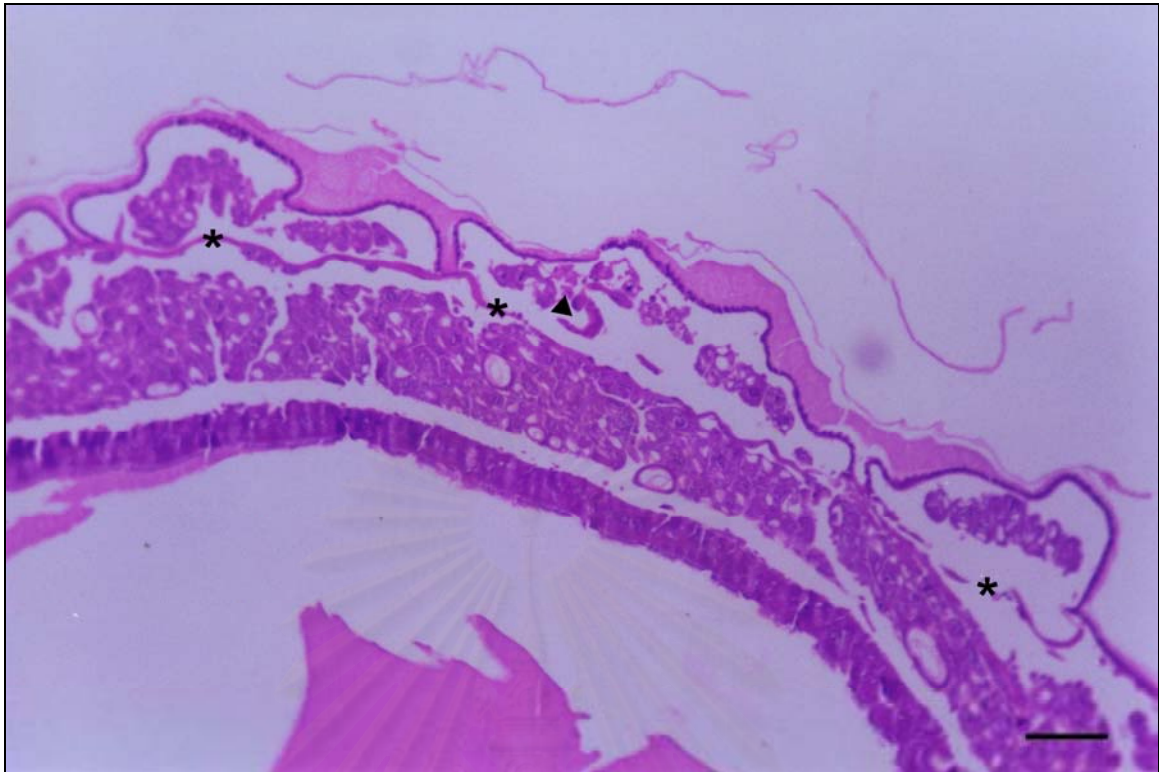
ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 36 แสดงช่อง ostia ของหัวใจที่มีกลุ่ม haematocyte (*) อยู่ภายในช่อง บริเวณ pericardial septum ในส่วนท้องเหนือ mid gut ของตัวอ่อนผึ้ง ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

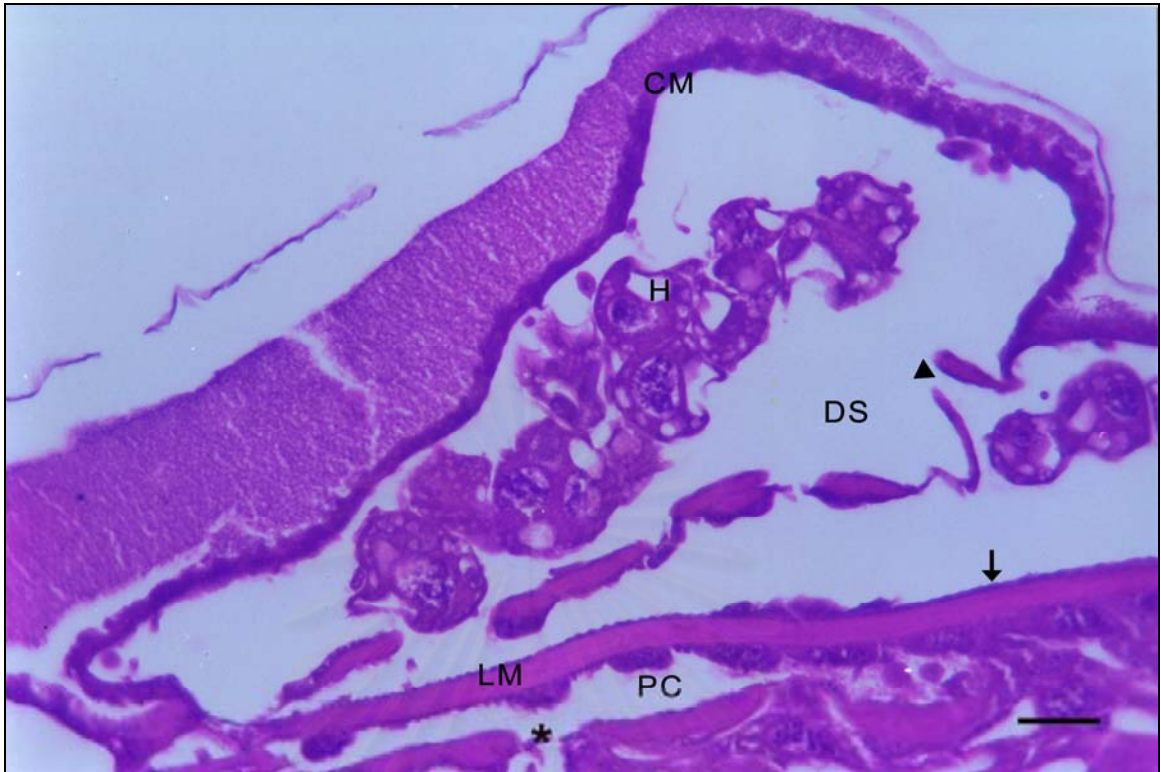


รูปที่ 37 แสดงหัวใจ (H) ทั้ง 4 ห้อง เหนือบริเวณ mid gut ซึ่งมี valve ระหว่างห้อง (▶) และรู ostia ที่ pericardial septum (*) ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 38 แสดงหัวใจ 3 ห้อง ที่มี ostia (▶) และ pericardial septum (*) กั้นระหว่างช่องว่างภายในห้องกับช่อง dorsal vessel ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

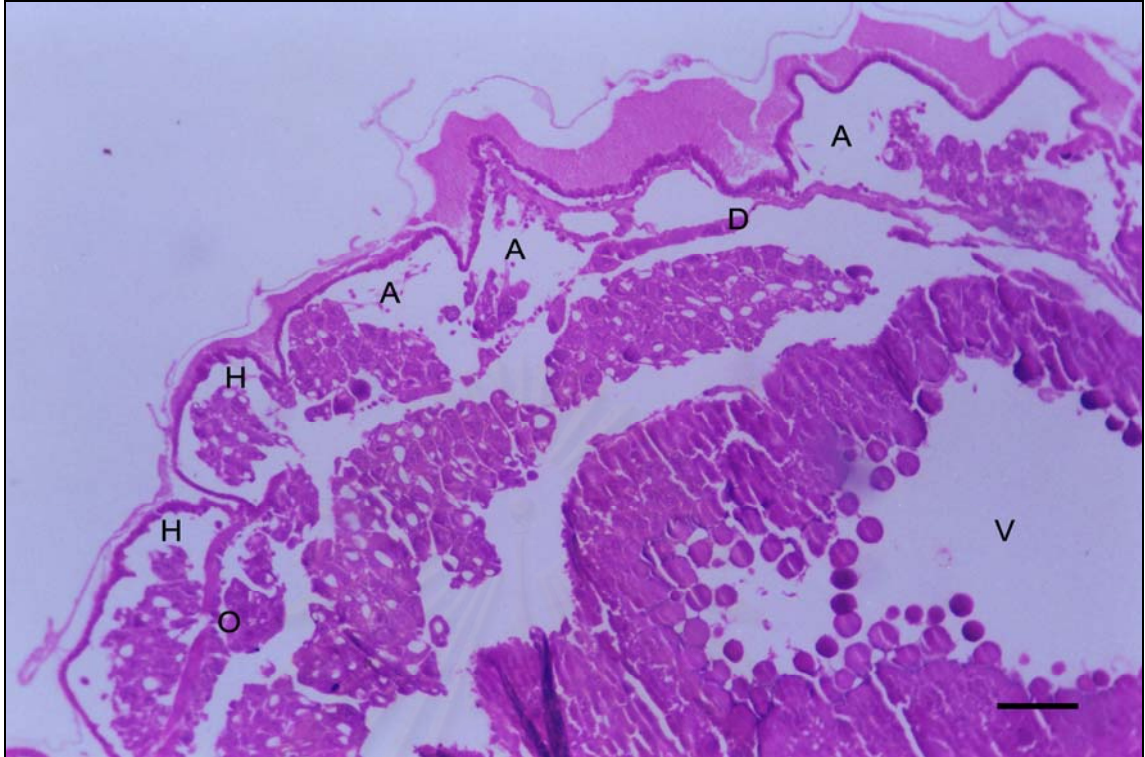
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



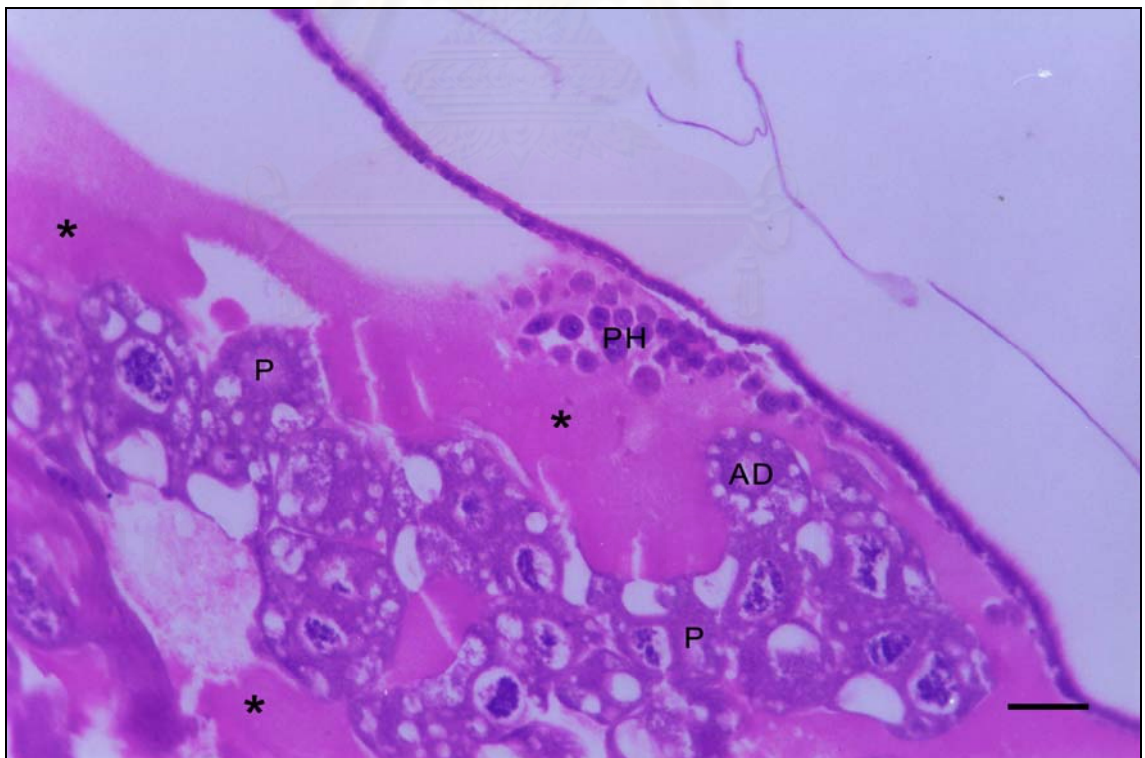
รูปที่ 39 แสดงโครงสร้าง dorsal vessel หรือหัวใจตัวอ่อนฝังประกอบด้วย pericardial septum (→) กั้นระหว่าง dorsal sinus (DS) กับช่องว่างภายในลำตัวส่วนนอกและท้อง (*) ผนังของหัวใจประกอบด้วย กล้ามเนื้อชนิด longitudinal muscle (LM) และ semicircular muscle (CM), pericardial cell (PC) ระหว่างห้องหัวใจมีลิ้น (▶) กั้นให้ haematocyte (H) เคลื่อนผ่านในทิศทางเดียว

ย้อม H+E; Bar = 25 μ m

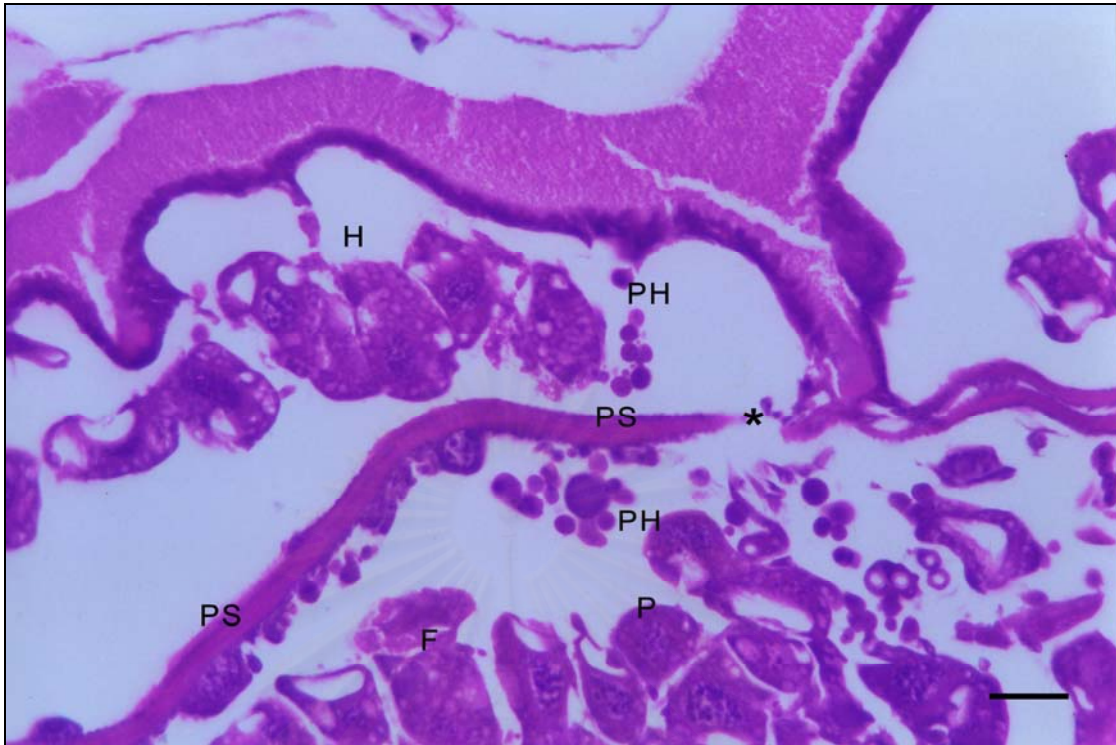
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



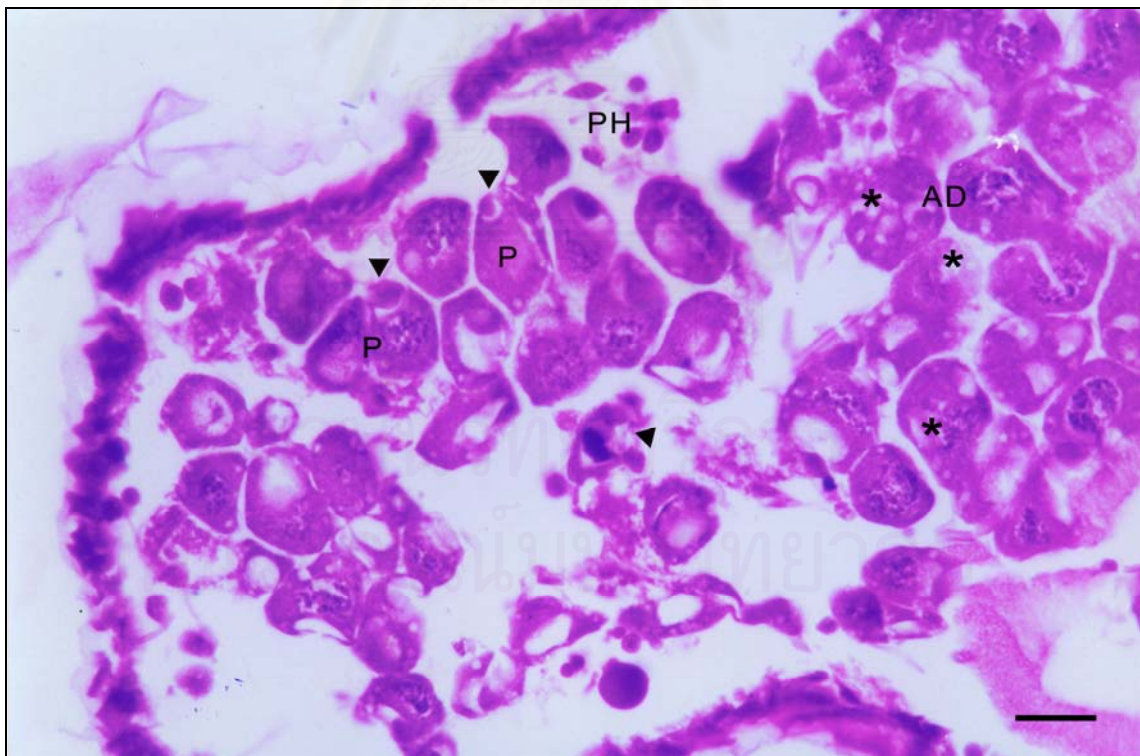
รูปที่ 40 แสดง dorsal vessel ส่วนต้นซึ่งเป็น aorta (A) 3 ห้อง บริเวณส่วนหน้าของ heart (H) ในช่องอก ตัวอ่อนฝัง (Ventriculus = V, Dorsal diaphragm = D, Ostia = O) ย้อม H+E; Bar=100 μm



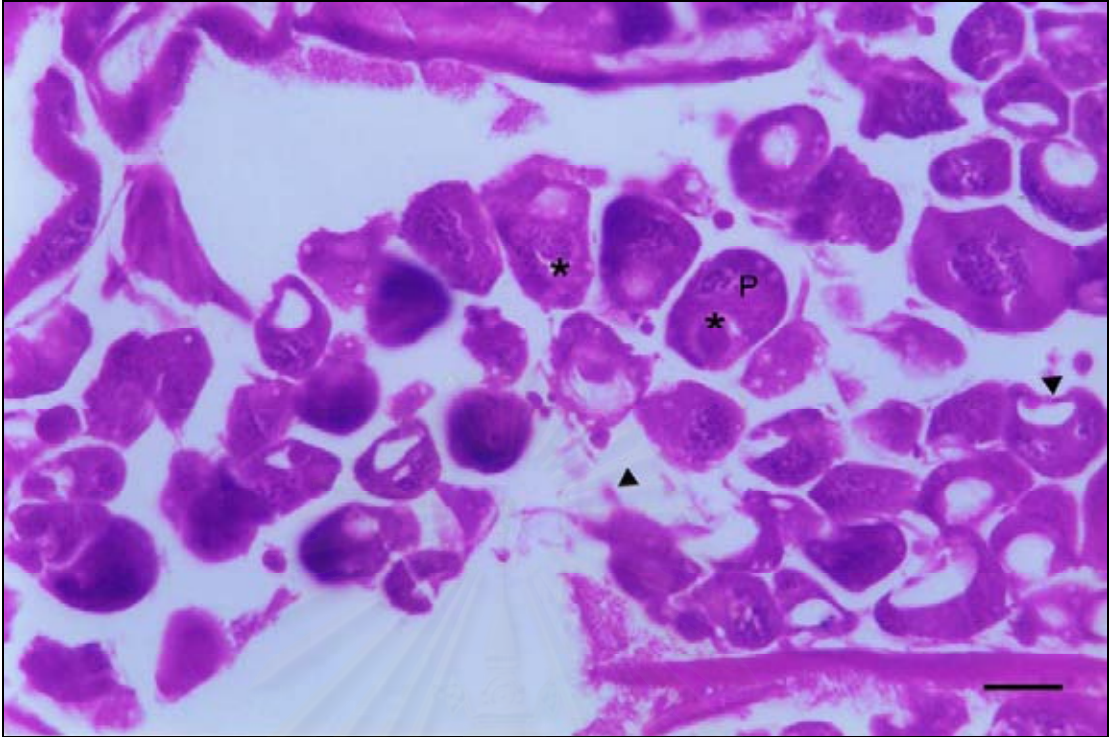
รูปที่ 41 แสดงเนื้อเยื่อในระบบไหลเวียนเลือดของตัวอ่อนฝังซึ่งประกอบด้วยน้ำเลือด haemolymph (*) และเม็ดเลือดชนิดที่อยู่ในระยะวัยอ่อน prohaematocyte (PH) มีลักษณะเป็นเซลล์รูปกลมขนาดเล็กมีนิวเคลียสย้อมติดสีเข้มขนาดเกือบเต็มเซลล์และเม็ดเลือดระยะเจริญเต็มที่ ได้แก่ adipohaematocyte (AD), plasmacyte (P) ย้อม H+E; Bar = 25 μm



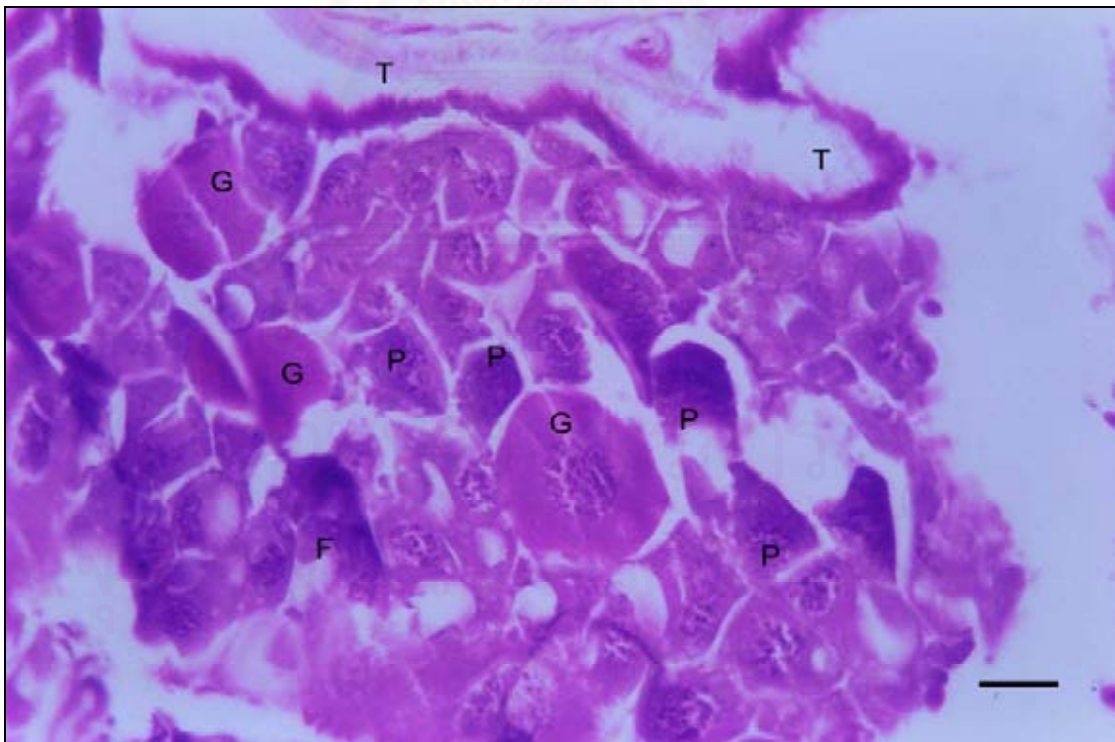
รูปที่ 42 แสดงเม็ดเลือดชนิด prohaematocyte (PH) ในบริเวณหัวใจ (H) และช่องว่างในบริเวณลำตัวใต้ pericardial septum (PS) ซึ่งมีรูเปิด ostia (*) (Plasmatocyte = P) ย้อม H+E; Bar = 25 μ m



รูปที่ 43 แสดงเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ prohaematocyte (PH) plasmatocyte (P) มีรูปร่างหลายเหลี่ยมและมี pseudopodium (▶) ภายใน cytoplasm ย้อมติดสีม่วงเข้มมี phagosome และ vacuole, adipohaematocyte (AD) เซลล์รูปกลมหรือรูปรีภายใน cytoplasm มี fat droplets (*) จำนวนมาก ย้อม H+E; Bar = 25 μ m



รูปที่ 44 แสดงรูปร่างลักษณะของ plasmotocyte (P) ที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม มี pseudopodium (▶) phagosome (*) ใน cytoplasm ที่ย้อมติดสีม่วงเข้ม ย้อม H+E ; Bar = 25 μ m



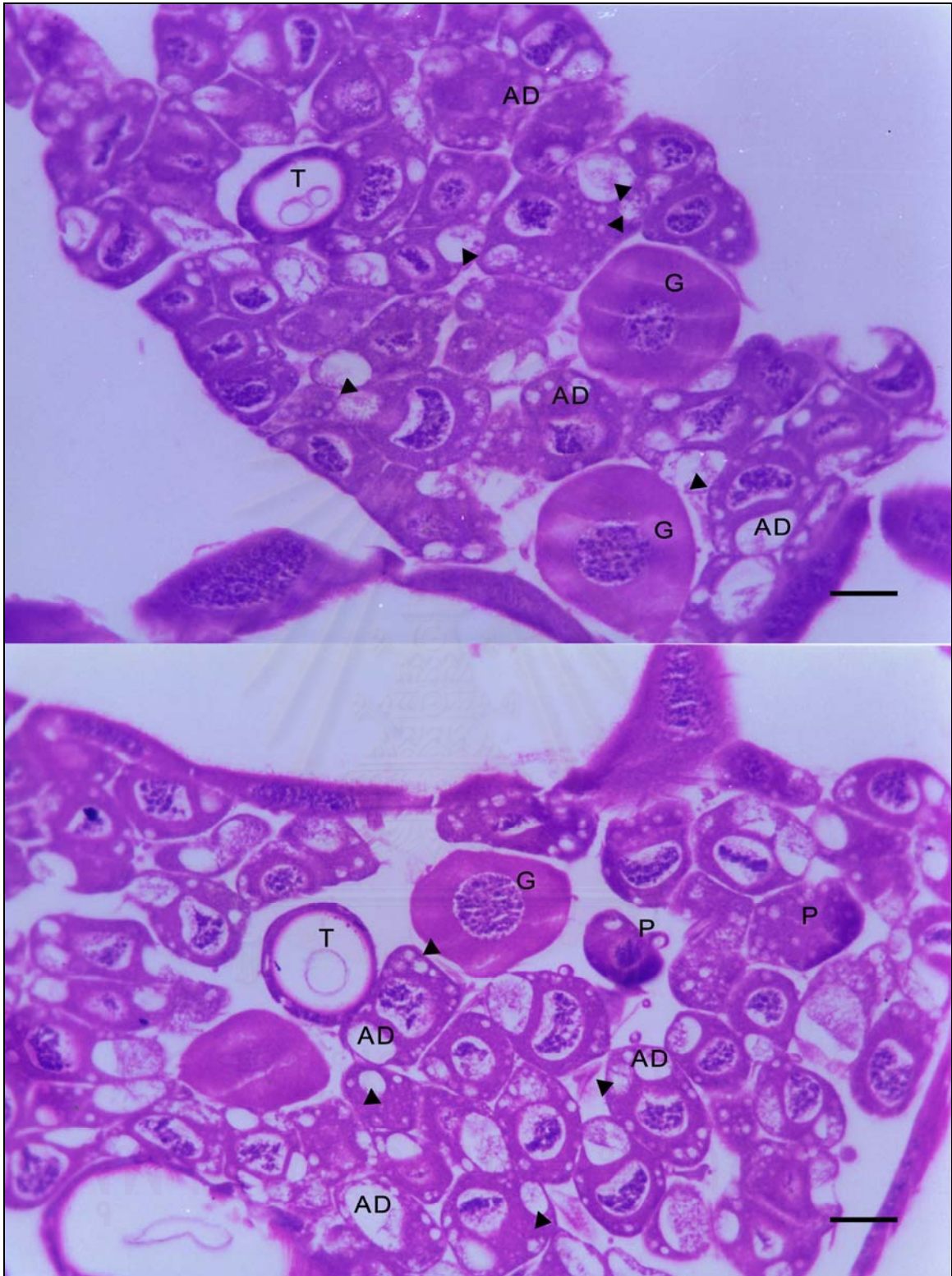
รูปที่ 45 แสดงรูปร่างลักษณะของ granulocyte (G) เปรียบเทียบกับ plasmotocyte (P) granulocyte เป็นเซลล์รูปกลมรีขนาดใหญ่ภายใน cytoplasm มี acidophilic granule ย้อมติดสีแดง มีนิวเคลียสใหญ่ อยู่กลางเซลล์ ส่วน plasmotocyte เป็นเซลล์รูปหลายเหลี่ยมมีขนาดเล็กกว่าและมี basophilic cytoplasm ที่ติดสีม่วงเข้ม (Trachea = T) ย้อม H+E ; Bar = 25 μ m



รูปที่ 46 แสดงเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในบริเวณช่องว่างภายในลำตัวไถ่ๆ ท่อลม trachea (T) และท่อขับถ่ายของเสีย malpighian tubule (M) ได้แก่ plasmotocyte (P), granulocyte (G), adipohaematocyte (AD), prohaematocyte (PH) และน้ำเลือด haemolymph (*)

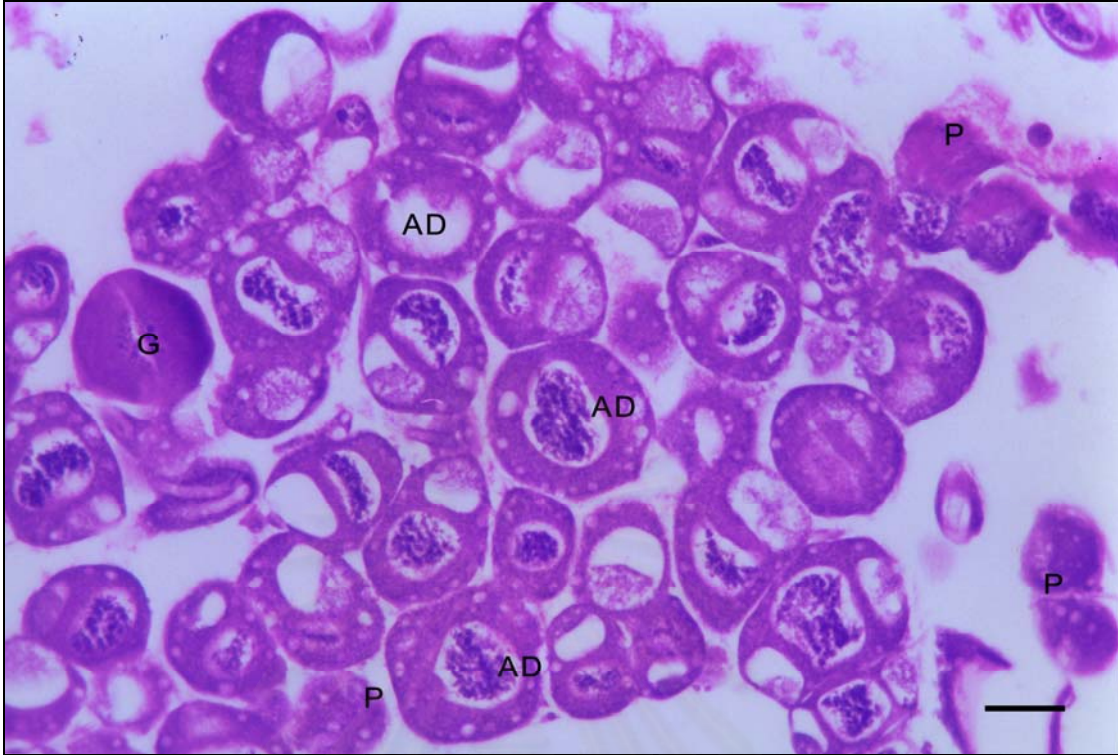
ย้อม H+E; Bar = 25 μ m

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

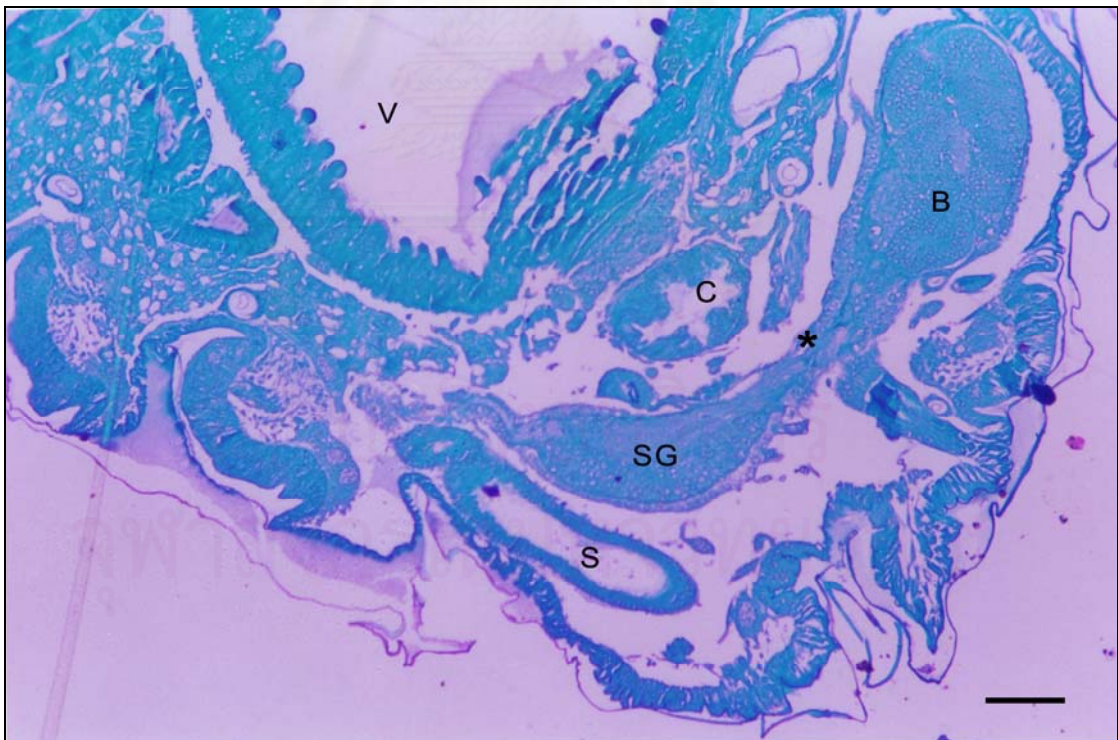


รูปที่ 47 A-B แสดงลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือด adipohaematocyte (AD) หรือ spheroidocyte ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์รูปกลมมีนิวเคลียสใหญ่อยู่กลางเซลล์ ภายใน cytoplasm มี lipid droplets หรือ fat vacuole (▶) จำนวนมากและเม็ดเลือดชนิด granulocyte (G) ซึ่งมีรูปกลมหรือรีมี nucleus อยู่กลางเซลล์และมี acidophilic granule ย้อมติดสีแดงอยู่ภายใน cytoplasm (Trachea = T)

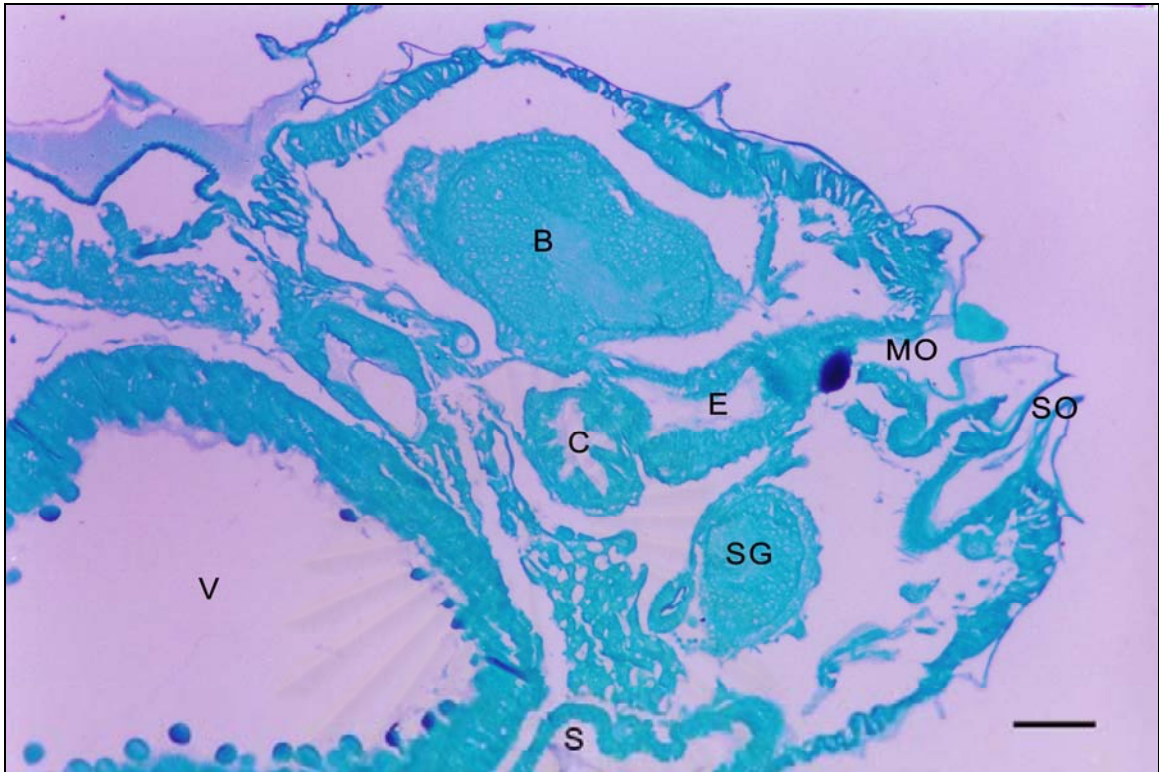
ย้อม H+E; Bar = 25 μ m



รูปที่ 48 แสดงเม็ดเลือดชนิด adipohaematocyte (AD) เปรียบเทียบกับ plasmacyte (P) และ granulocyte (G) ย้อม H+E; Bar = 25 μ m



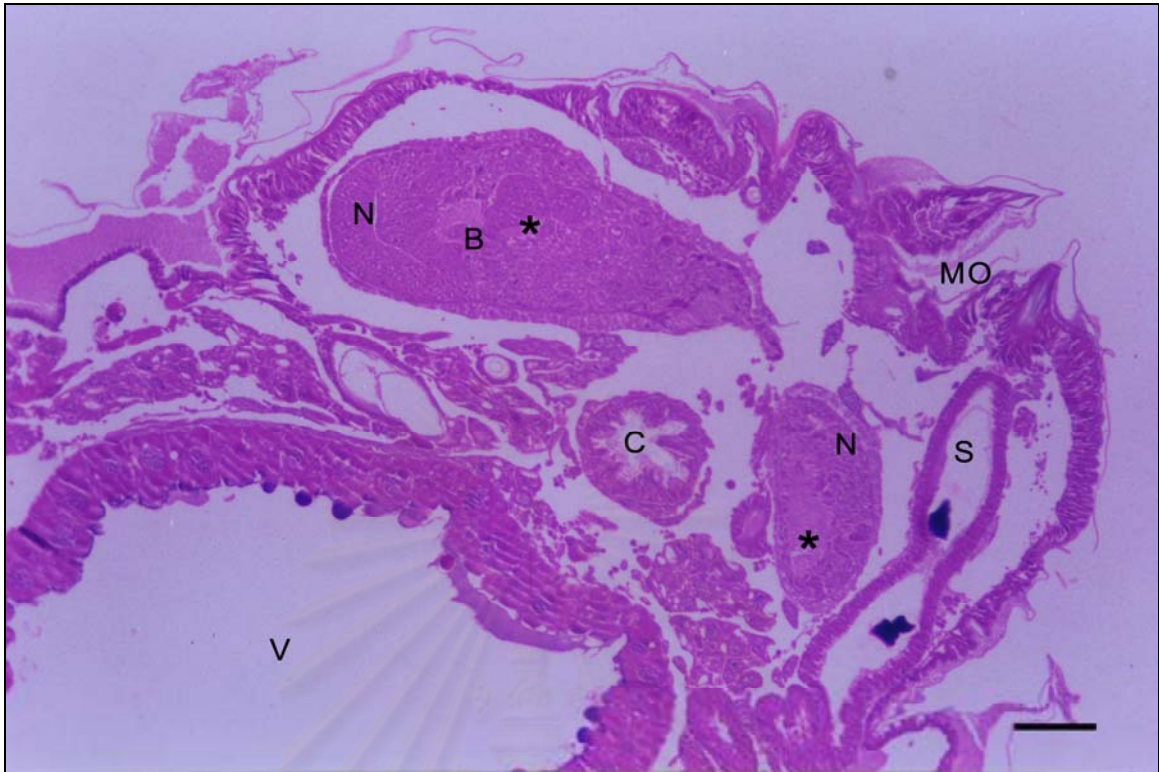
รูปที่ 49 แสดงระบบประสาทของตัวอ่อนฝังหลวงอายุ 3 วัน ที่บริเวณส่วนหัวซึ่งประกอบด้วย สมอง brain (B) และปมประสาทใต้หลอดอาหาร suboesophageal ganglion (SG) และเส้นใยประสาท (*) ซึ่งเชื่อมโยงระหว่าง brain กับ suboesophageal ganglion (Crop = C, Ventriculus = V, Silk duct = S) ย้อม KB Loxoblue ; Bar = 100 μ m



รูปที่ 50 แสดง brain (B) ตัวอ่อนฝังที่อยู่เหนือทางเดินอาหารส่วนต้นบริเวณหลอดอาหาร esophagus (E) และ crop (C) และมีปมประสาทปมที่หนึ่ง ซึ่งคือ subesophageal ganglion (SG) ซึ่งอยู่ใต้หลอดอาหาร (Mouth = MO, Silk duct opening = SO, Silk duct = S, Ventriculus = V)

ย้อม KB Loxobluce ; Bar = 100 μ m

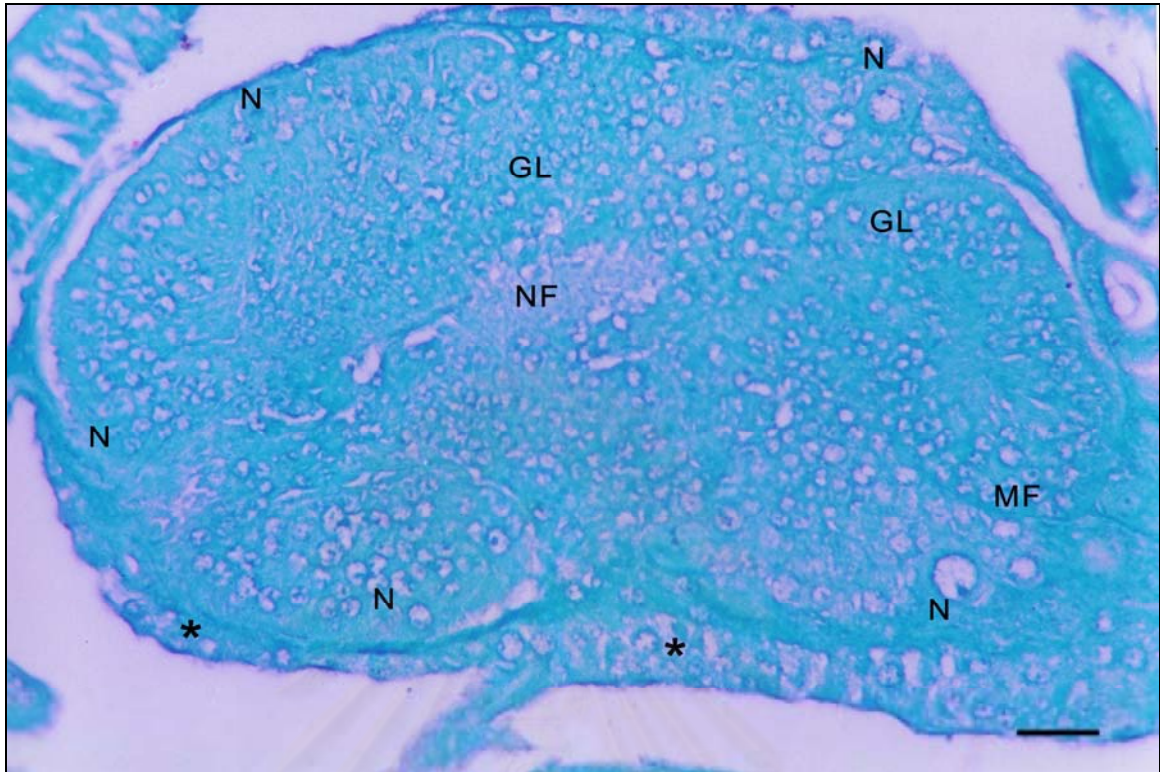
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 51 แสดง brain (B) และ suboesophageal ganglion ซึ่งมีเซลล์ประสาท neuron (N) อยู่ที่ขอบรอบนอก และเส้นใยประสาทอยู่ตรงกลาง (*) ของเนื้อเยื่อสมองและปมประสาท (Crop = C, Silk duct = S, Ventriculus = V, Mouth = MO)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

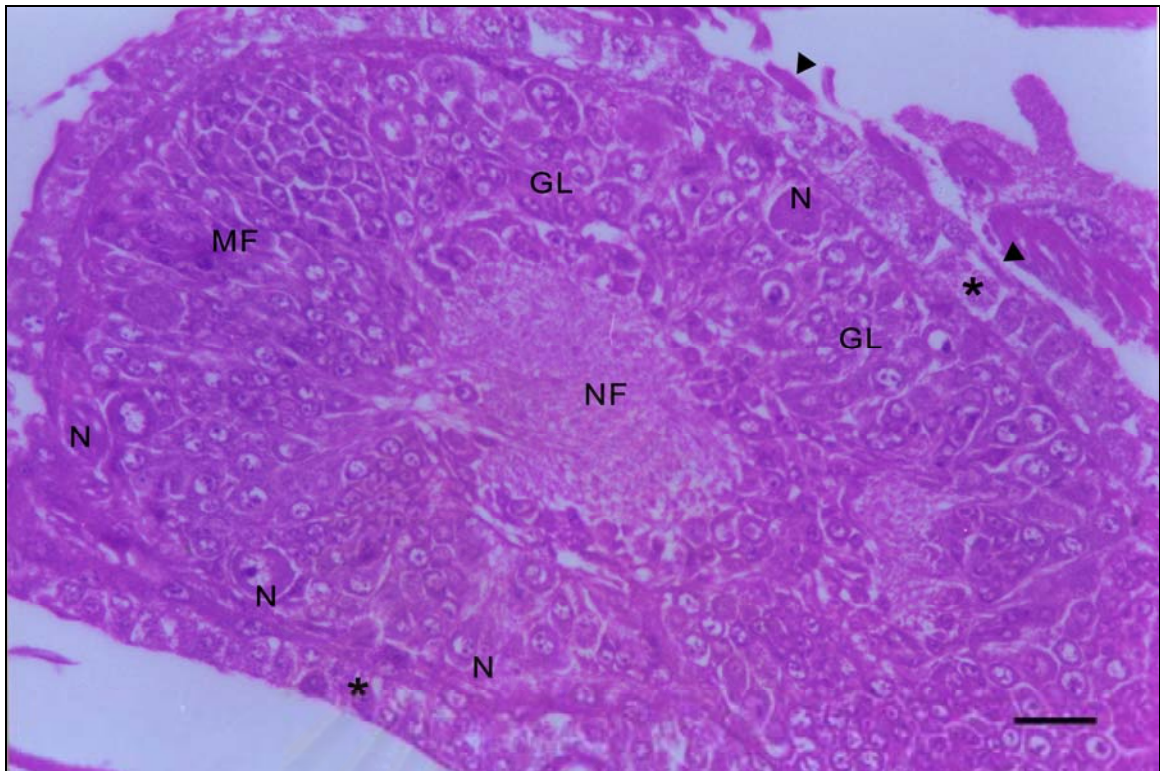
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 52 ภาพขยายสมองตัวอ่อนฝั่งหลวง แสดงลักษณะโครงสร้างที่ประกอบด้วย เซลล์ประสาท neuron (N) มีรูปร่างหลายเหลี่ยมภายในมีนิวเคลียสขนาดใหญ่และมีนิวคลีโอลัส 1 อัน และมีลักษณะเป็น multipolar neuron ที่เรียงตัวอยู่ขอบนอกใกล้กับ capsule (*) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหุ้มล้อมรอบสมอง เซลล์อีกชนิดได้แก่ glia cell (GL) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม แทรกระหว่าง neuron ตรงกลางเนื้อสมองเป็นกลุ่มของเส้นใยประสาทชนิด myelinated fiber (MF) และ non - myelinated fiber (NF)

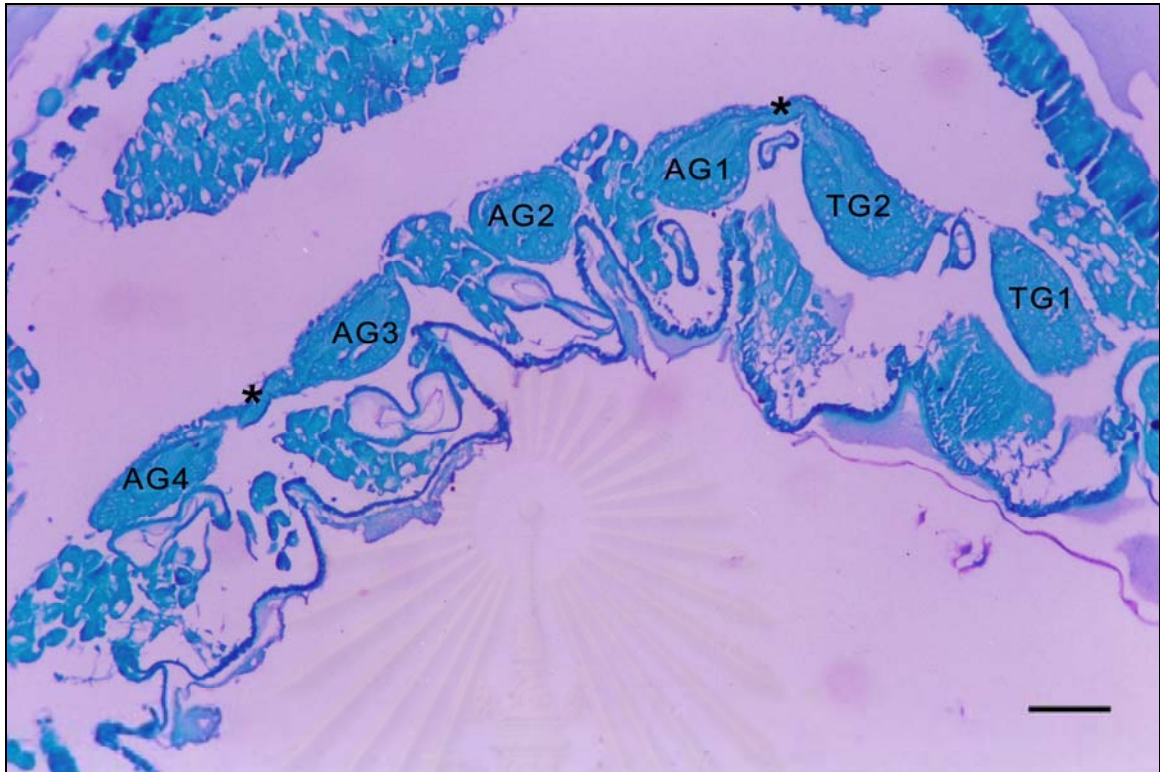
ย้อม KB Loxoblue; Bar = 25 μ m

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 53 ภาพขยายสมอง แสดงโครงสร้างที่ประกอบด้วย multipolar neuron (N), glial cell (GL), myelinated fiber (MF), non - myelinated fiber (NF) และ capsule หุ้มสมองซึ่งมีชั้นของ cuboidal cell (*) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหุ้มรอบนอก (▶) ย้อม H+E; Bar = 25 μ m

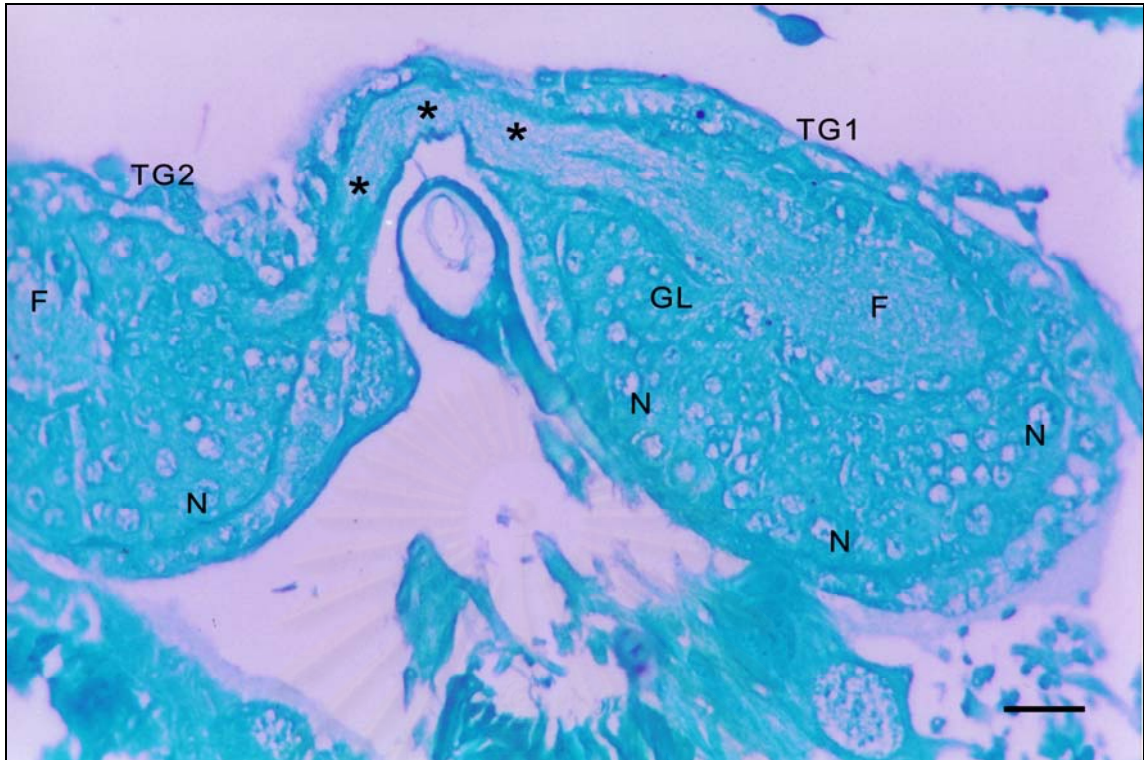
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



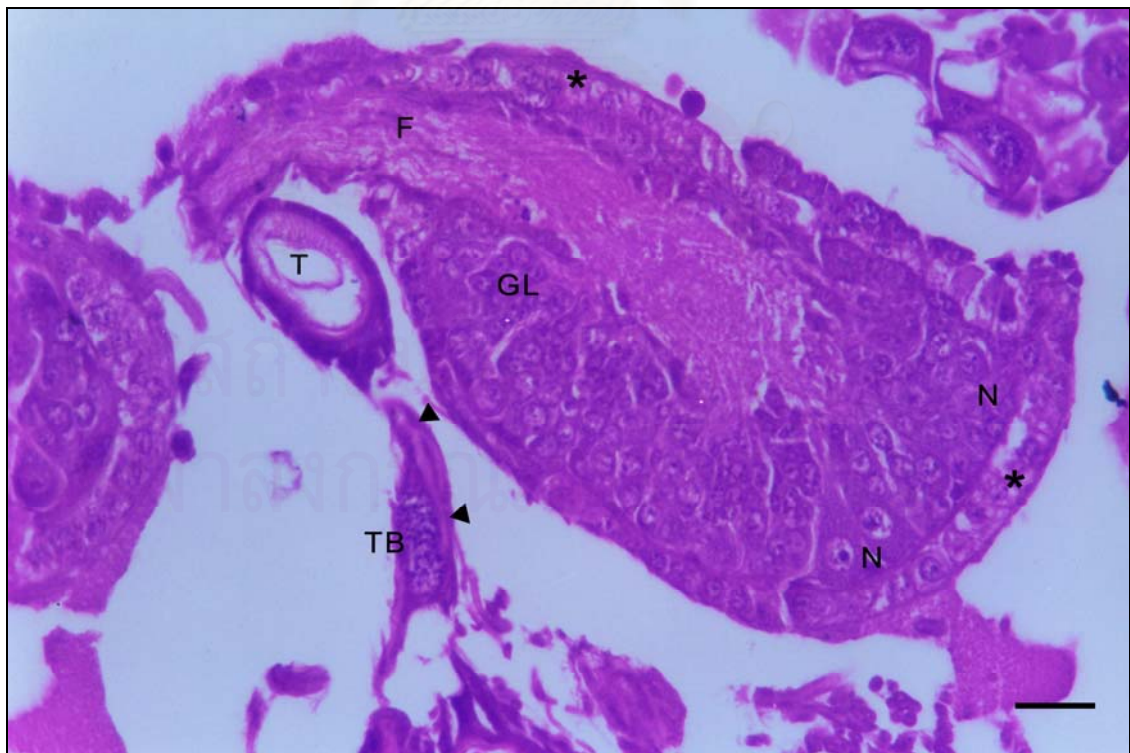
รูปที่ 54 แสดงปมประสาทบริเวณส่วนอก thoracic ganglion ปมที่ 1 และ 2 (TG1, TG2) และปมประสาทบริเวณส่วนท้อง abdominal ganglion ปมที่ 1-4 (AG1-4) ที่มี nerve fiber (*) เชื่อมโยงติดต่อกันเป็น nerve cord อยู่เหนือ ventral sinus และได้ทางเดินอาหาร

ย้อม KB Loxoblu; Bar = 100 μ m

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 55 ภาพขยายปมประสาทส่วนอก thoracic ganglion ปมที่ 1 และปมที่ 2 (TG1, TG2) ซึ่งมีเส้นใยประสาทเชื่อมต่อกัน (*) โครงสร้างภายในปมประสาทประกอบด้วย neuron (N), glia cell (GL) และ nerve fiber (F) ย้อม KB Loxobluce ; Bar = 25 μ m

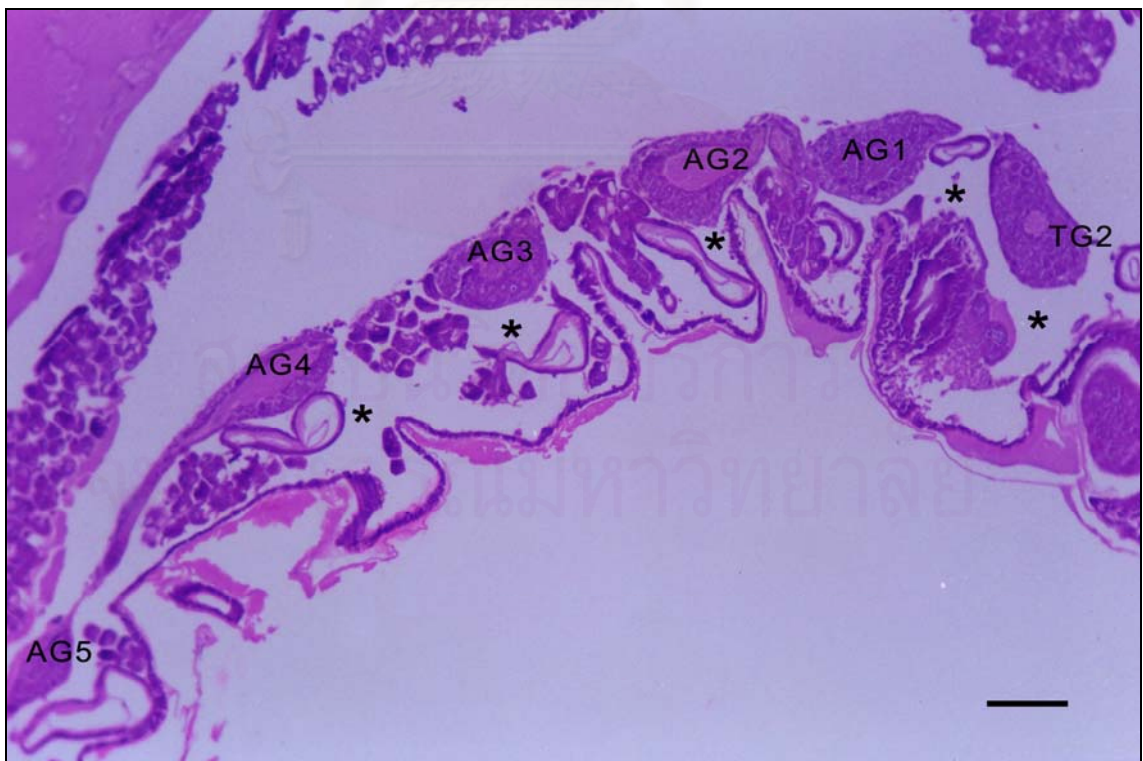


รูปที่ 56 ภาพขยายปมประสาทส่วนอกปมที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย neuron (N) ชนิด multipolar neuron, glia cell (GL), เส้นใยประสาท (F) และเยื่อหุ้ม capsule (*) และมี trachea (T), tracheoblast (TB) และ tracheole (►) ในบริเวณใกล้ปมประสาท ย้อม H+E; Bar = 25 μ m



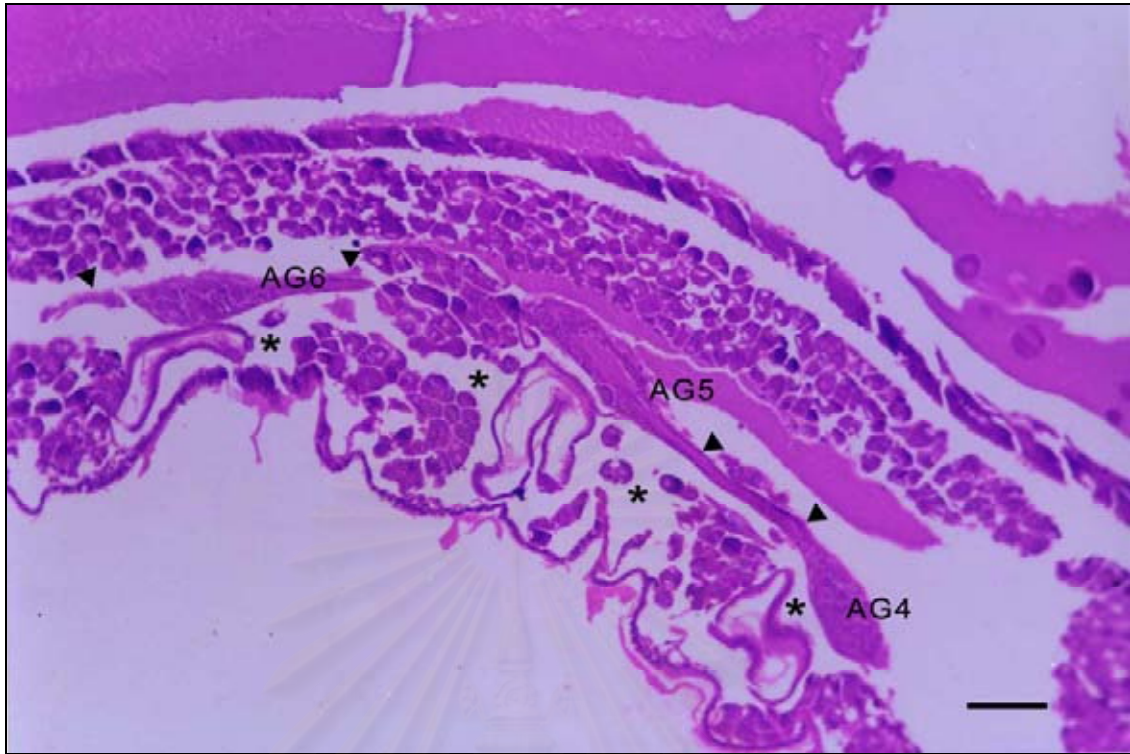
รูปที่ 57 แสดงภาพขยายปมประสาทส่วนอก thoracic ganglion ปมที่ 2 (TG₂) ซึ่งมี neuron(N), glia cell (GL) และ nerve fiber (F) อยู่ภายในเยื่อหุ้ม (Trachea =T)

ย้อม KB Loxoblue; Bar = 25 μ m



รูปที่ 58 แสดง ventral nerve cord บริเวณปมประสาทส่วนอกปมที่ 2 (TG₂) และปมประสาทส่วนท้อง abdominal ganglion ปมที่ 1-5 (AG1-5) ที่ทอดตัวอยู่เหนือ ventral sinus (*)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



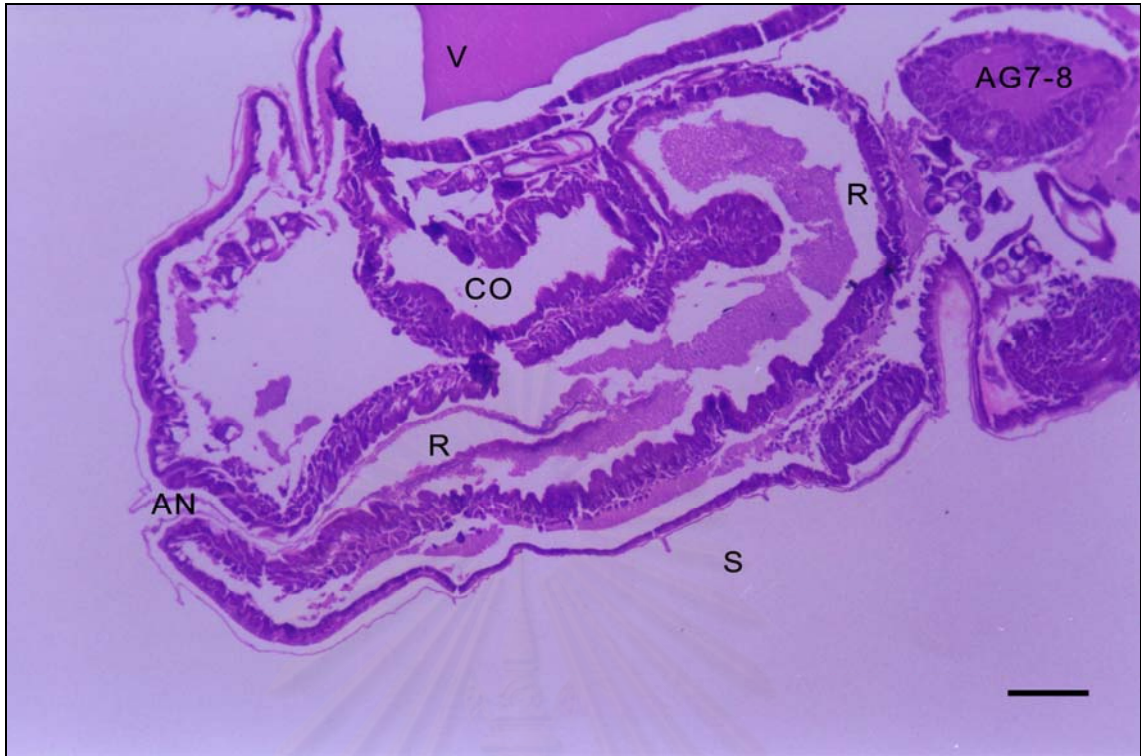
รูปที่ 59 แสดง ventral nerve cord บริเวณส่วนท้อง ซึ่งมี abdominal ganglion ปมที่ 4, 5, 6 (AG4, AG5, AG6) เชื่อมต่อกันด้วยเส้นใยประสาท (▶) เหนือ ventral sinus (*)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

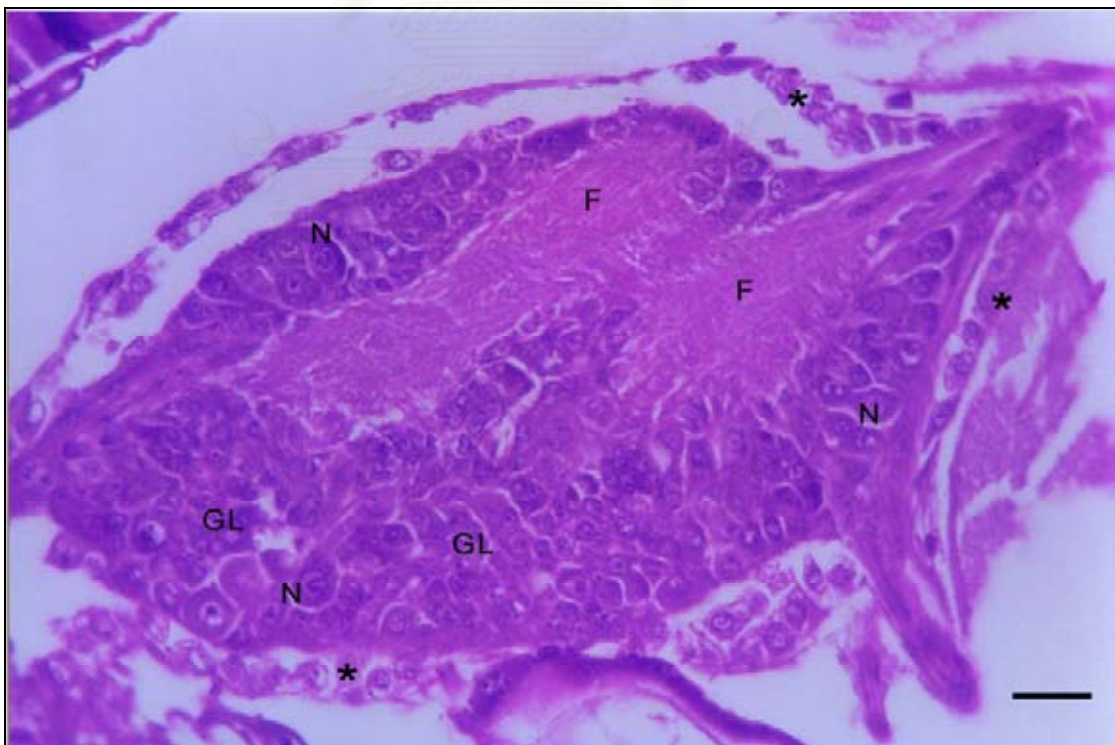


รูปที่ 60 แสดง ventral nerve cord ในบริเวณส่วนท้องใต้ทางเดินอาหารส่วน ventriculus (V) และไส้ rectum (R) ของ hind gut ซึ่งมี abdominal ganglion ปมที่ 6, ปมที่ 7 และ 8 ซึ่งเชื่อมติดต่อกันเป็นปมขนาดใหญ่ (AG6, AG7-8)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



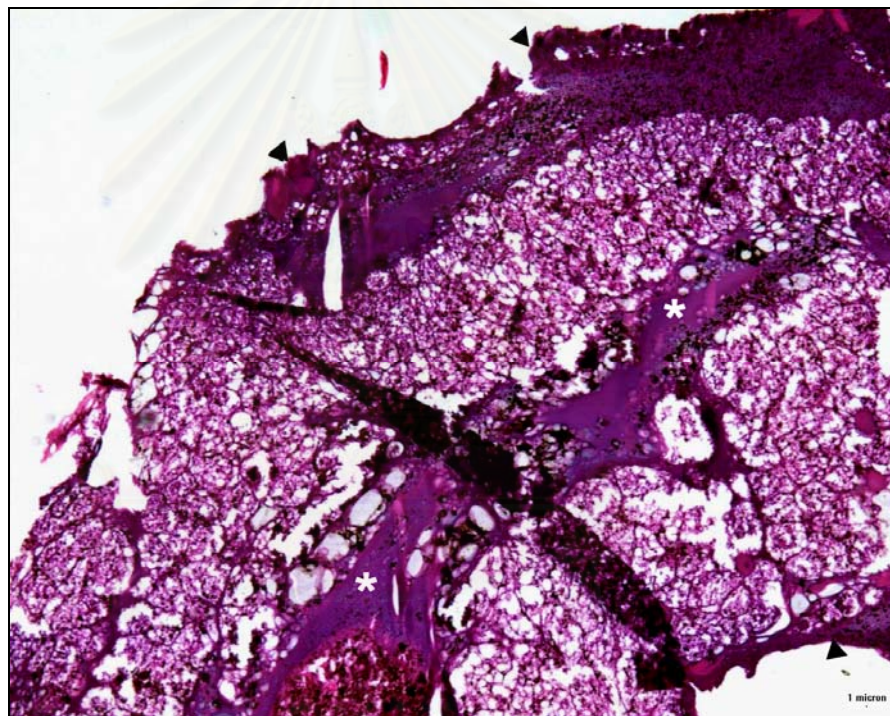
รูปที่ 61 แสดงปมประสาทส่วนท้อง abdominal ganglion ปมที่ 7, 8 (AG7-8) ซึ่งเชื่อมติดกันเป็นปมใหญ่อยู่ท้ายสุดของ ventral nerve cord ใกล้ทางเดินอาหาร rectum (R) และ ventriculus (V) (Colon = CO, Anus = AN) ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 62 ภาพขยายของ abdominal ganglion ปมที่ 7 และ 8 ซึ่งเชื่อมติดกันเป็นปมขนาดใหญ่ มีโครงสร้างประกอบด้วย neuron (N), glia cell (GL) และ nerve fiber (F) อยู่ภายในเยื่อหุ้ม capsule (*) ย้อม H+E ; Bar = 25 μ m

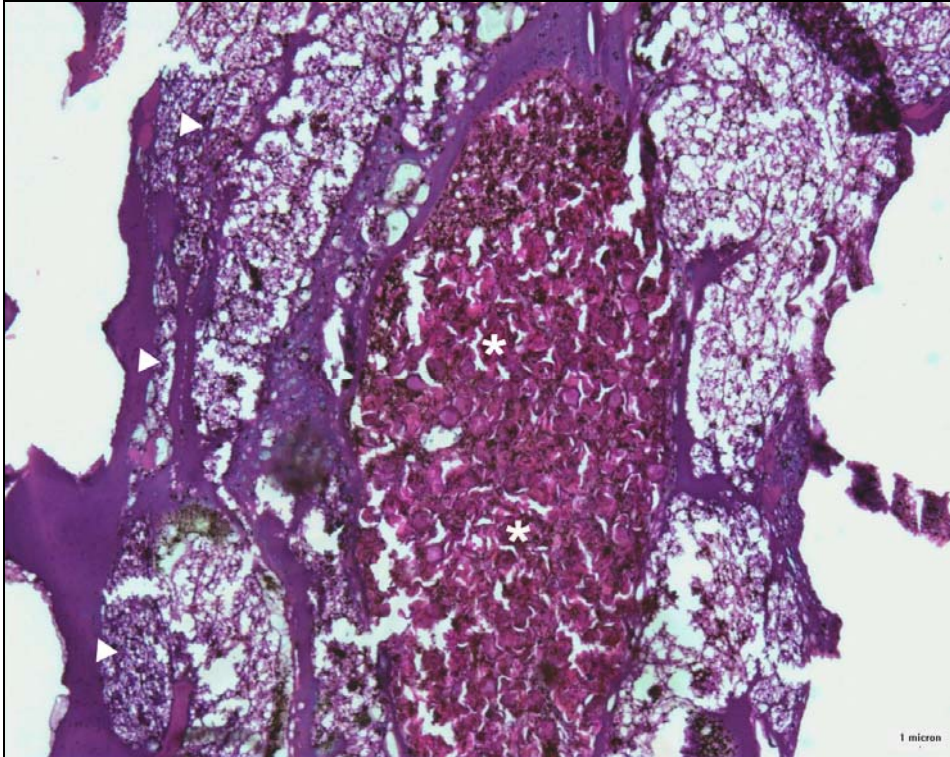
2.2 เนื้อเยื่อของตัวอ่อนผึ้งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียน

ตัวอ่อนผึ้งโพรงที่นำมาศึกษาพบว่าเป็นโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียน ซึ่งได้ผลดังนี้ ตัวอ่อนผึ้งโพรงมีลักษณะที่เน่าสลาย เนื้อเยื่อของระบบทางเดินอาหารถูกทำลาย บริเวณถุงพักอาหารและกระเพาะอาหาร มีเซลล์เยื่อเมือกถูกทำลายและเนื้อเยื่อชั้นต่างๆสลายตัว สภาพบริเวณหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ถูกทำลายมีกลุ่มเซลล์ที่ตาย รวมทั้งต่อมและท่อของต่อมเปลี่ยนแปลงสภาพ (รูปที่ 63-73) ส่วนเนื้อเยื่อระบบขับถ่ายของเสีย ระบบไหลเวียนเลือด ระบบประสาท นั้นเซลล์ตายและเนื้อเยื่อถูกทำลาย (รูปที่67-69) ส่วนระบบแลกเปลี่ยนก๊าซ ยังมีท่อลมบางส่วนที่ยังหลงเหลือให้เห็นบ้าง ส่วนใหญ่ถูกทำลาย (รูปที่63-64)

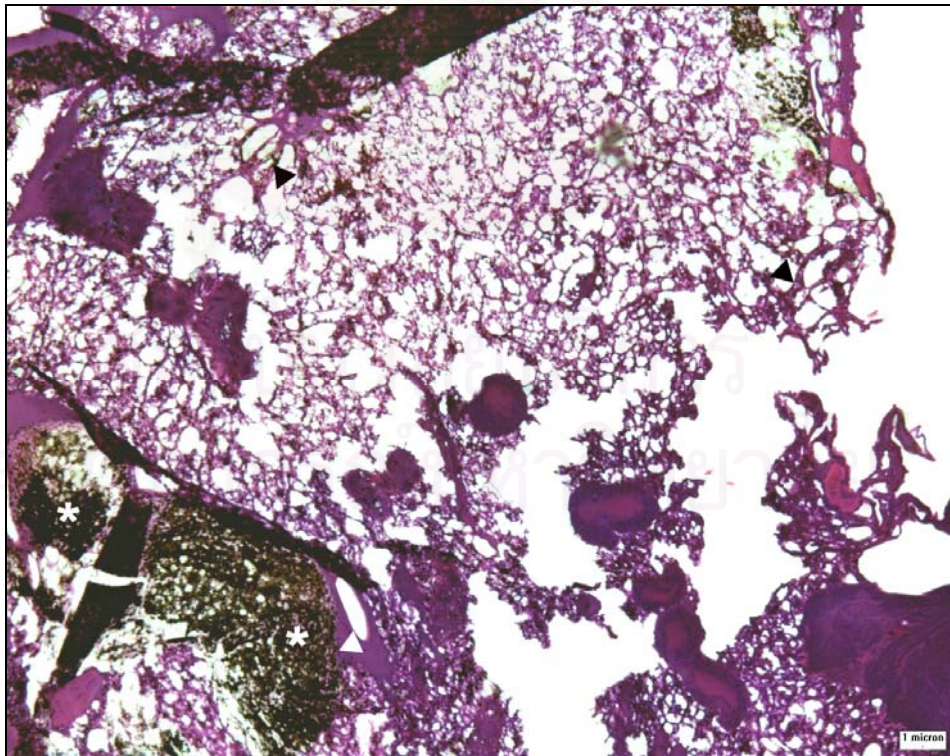


รูปที่ 63 แสดงตัวอ่อนผึ้งโพรง *Apis cerana* ที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียนบริเวณหัวและลำตัว มีชั้น cuticle ย่อมติดดีซิมพูเข้มของสปีไอซิน (▶) เซลล์ต่างๆ และเนื้อเยื่อของระบบทางเดินอาหารถูกทำลาย (*) มีบางส่วนของท่อลมยังคงเหลืออยู่ (T)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

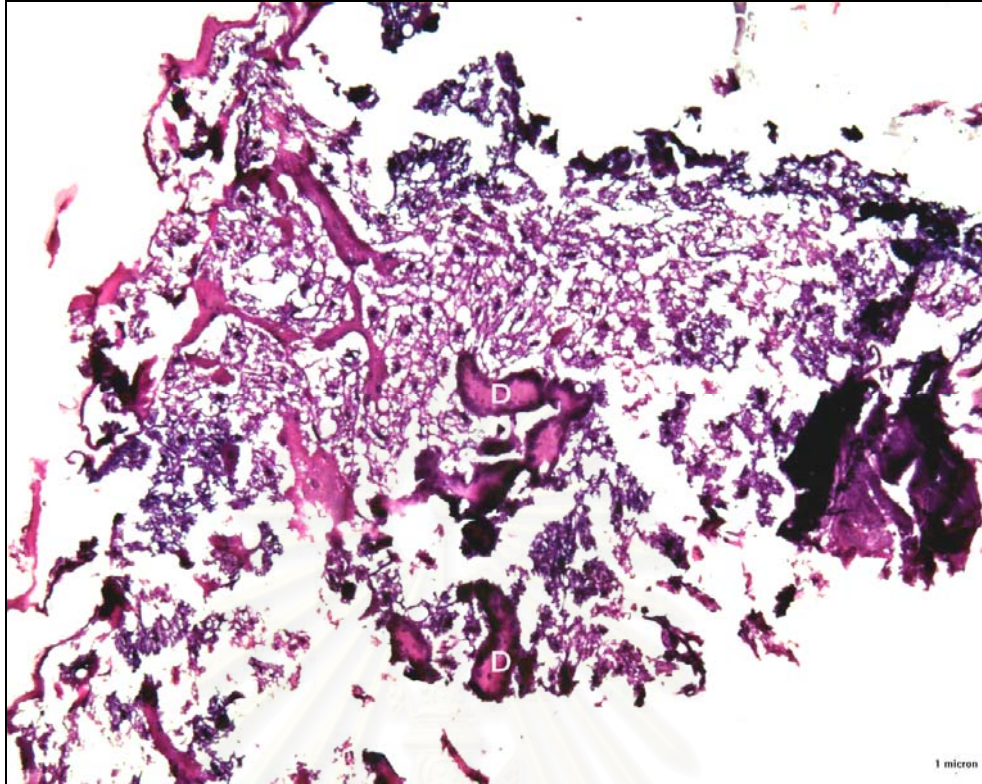


รูปที่ 64 แสดงตัวอ่อนที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียนบริเวณส่วน ventriculus ยังคงมีเกสรดอกไม้ไม่อยู่ ภายใน (*) หัวใจและท่อลมไม่เห็นขอบเขตชัดเจน (▶) ชั้นคิวตินของชั้นผิวนอกติดสีชมพูเข้ม ส่วนเซลล์และเนื้อเยื่อของระบบทางเดินอาหาร ระบบขับถ่ายถูกทำลาย ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



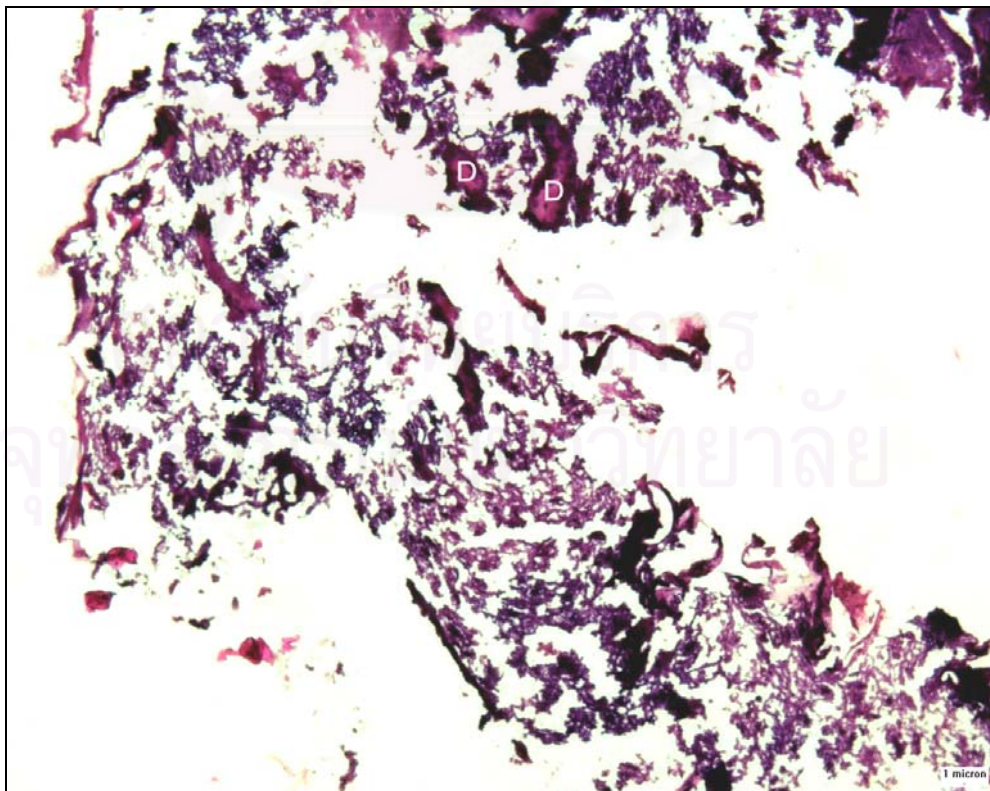
รูปที่ 65 ตัวอ่อนฝังโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียน แสดงบริเวณของท่อของต่อมใกล้กับถุงเก็บเกสรดอกไม้ (*) ถูกทำลายเหลือเป็นบริเวณจางๆ ซึ่งตัวเซลล์สลายไปแต่พบท่อลมแทรกอยู่ (▶)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 66 ตัวอ่อนฝังโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียน แสดงบริเวณส่วนกลางของลำตัว ซึ่งมีท่อของต่อมน้ำลาย (D) อยู่ใกล้กับท่อลมที่แตกแขนง พบว่าเซลล์ได้รับความเสียหายและสลายตัวไปรวมทั้งเนื้อเยื่อระบบต่างๆ ถูกทำลาย

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 67 ตัวอ่อนฝังโพรงที่เป็นโรค เซลล์ส่วนใหญ่เสียหายและตาย มีร่องรอยของท่อของต่อมปรากฏให้เห็น (D) เนื้อเยื่อระบบต่างๆ สลายตัว

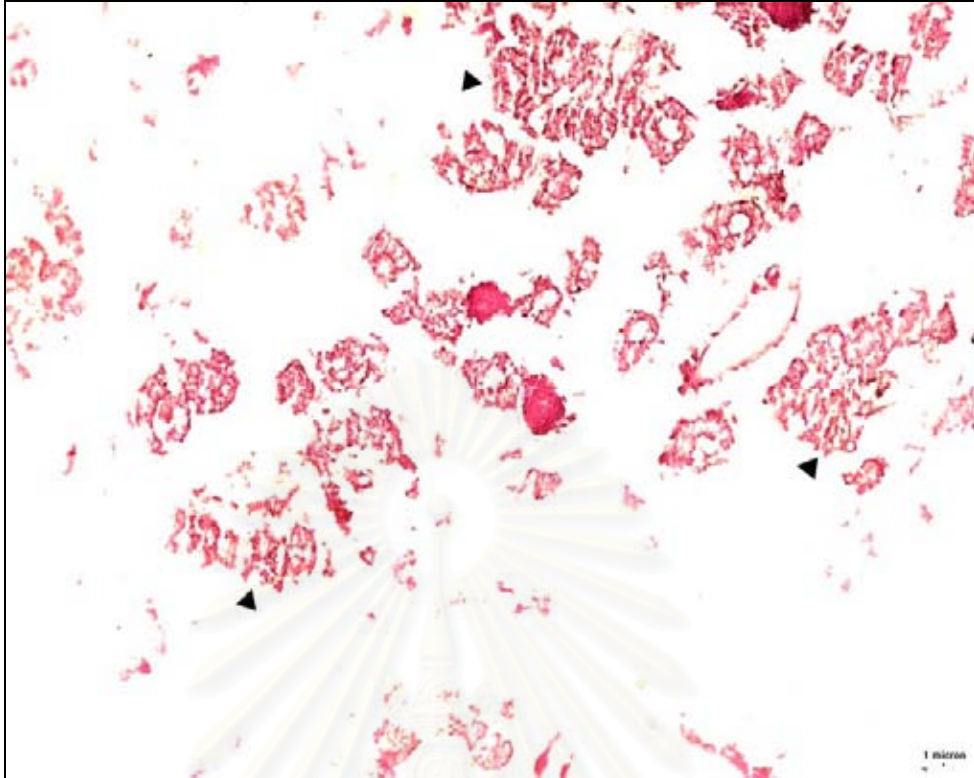
ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 68 แสดงกลุ่มเซลล์ที่ตายเป็นส่วนใหญ่ และยังคงปรากฏกลุ่มเซลล์ haemocyte ที่ได้รับความเสียหาย (*) และยังคงเหลือ haemocyte บางชนิด (H) ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

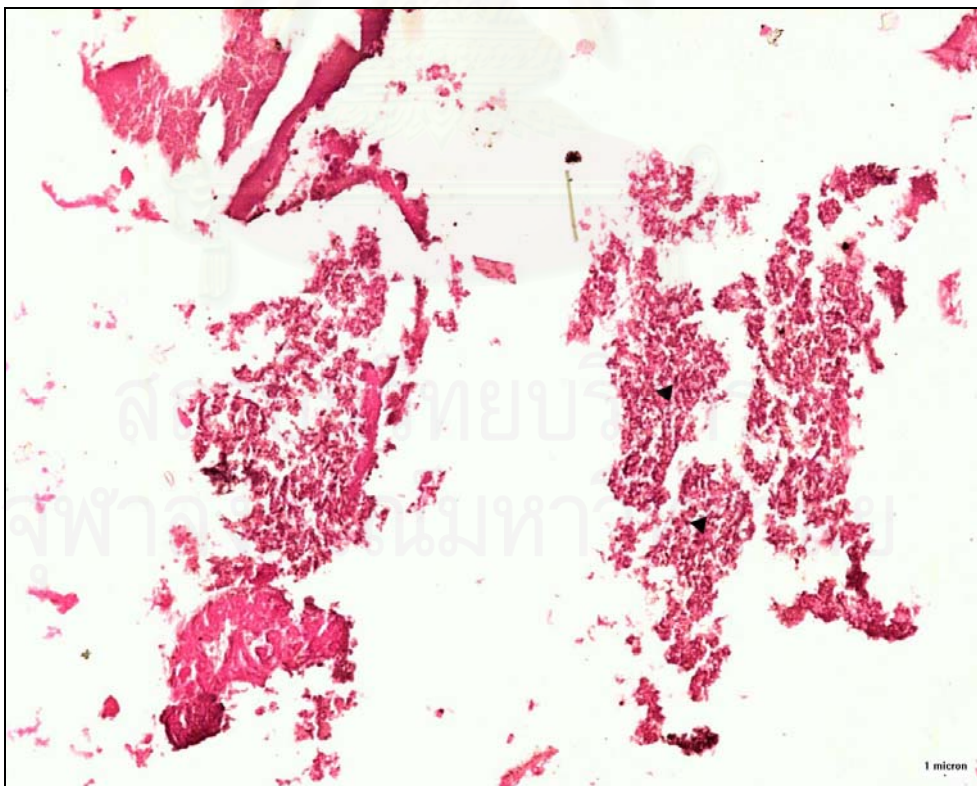


รูปที่ 69 แสดงกลุ่มเซลล์ที่ถูกทำลาย กระจายทั่วๆ ไป บริเวณชั้นผิวของตัวอ่อนถูกทำลายจนไม่เห็นขอบเขตของลำตัว ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



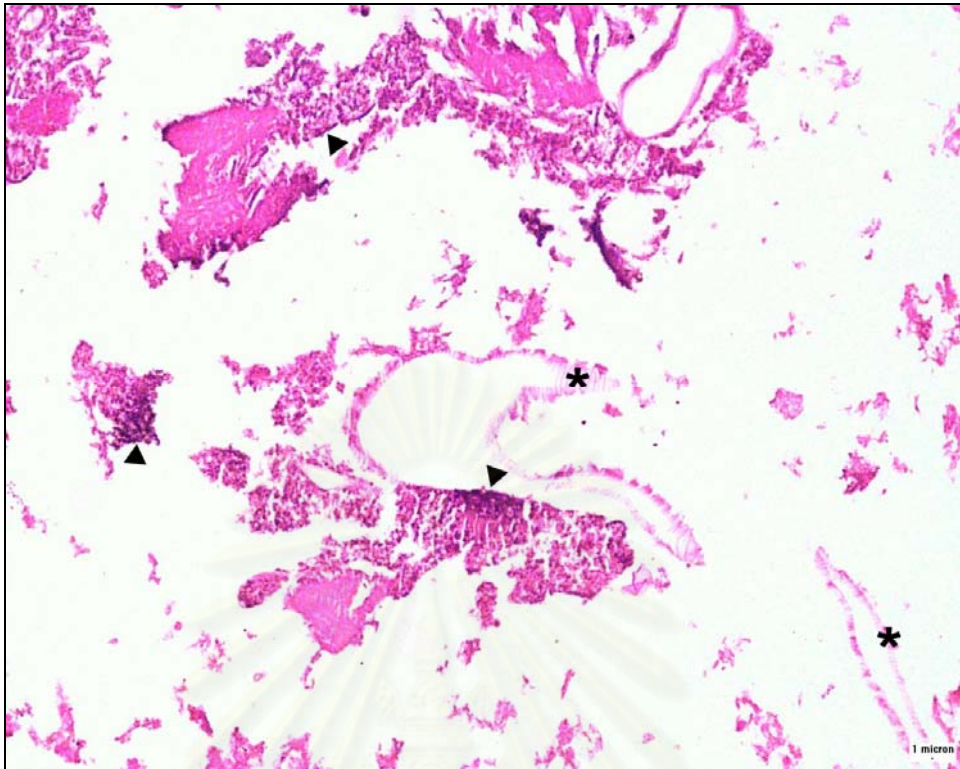
รูปที่ 70 แสดงกลุ่มเซลล์ของตัวอ่อนฝั่งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเนื้องาญโรเบียน ที่ได้รับความเสียหาย กระจายเป็นกลุ่มๆ ทั่วไป (▶)

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



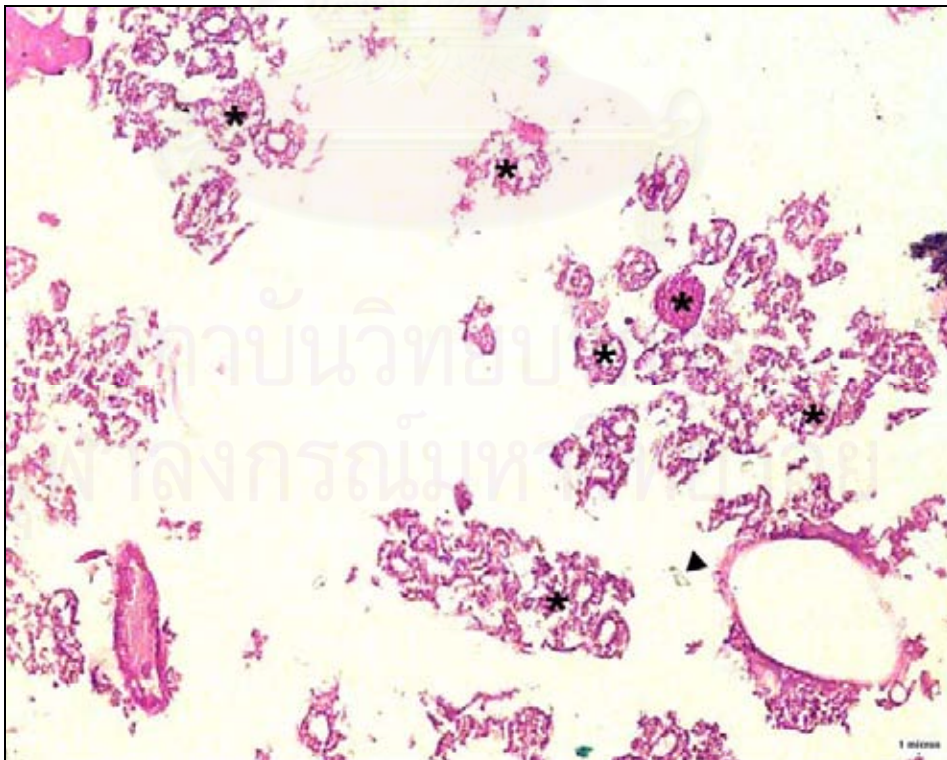
รูปที่ 71 แสดงกลุ่มของเซลล์ที่ตาย ซึ่งเห็นนิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงินเข้มที่บออยู่เป็นกลุ่มๆ (▶) กระจาย ทั่วไป ส่วนเนื้อเยื่อระบบต่างๆ ถูกทำลาย

ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 72 แสดงเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายเสียหาย ย้อมติดสีชมพูเข้มของสีย้อมไอซันและนิวเคลียส ย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม (►) บริเวณทางเดินอาหารมีเยื่อบุผิวถูกทำลายเห็นเป็นรอยจางๆ (*)

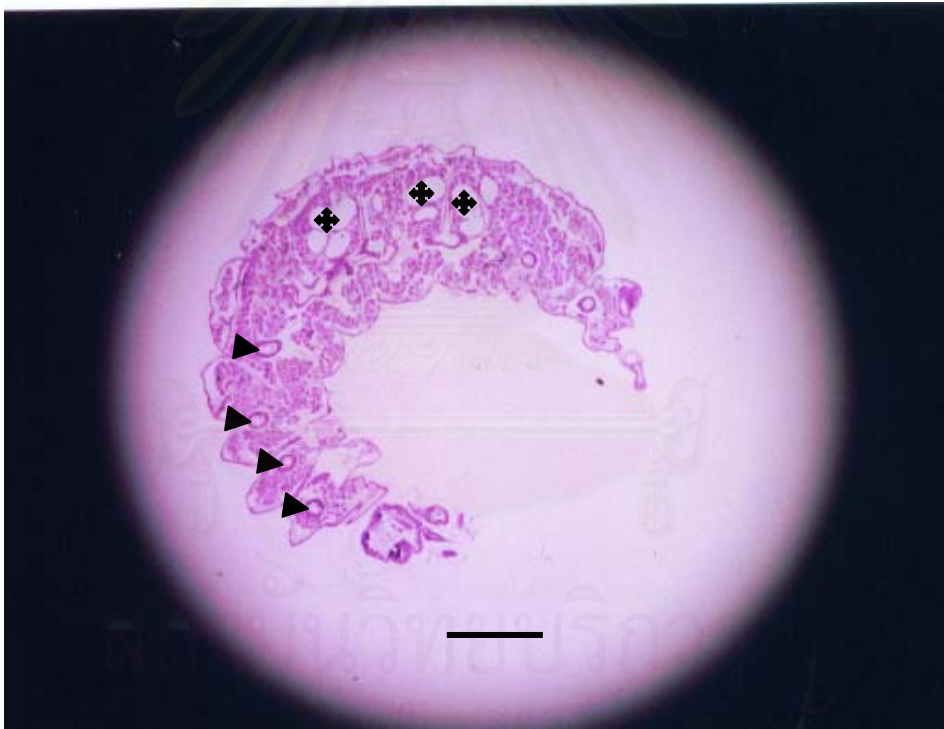
ย้อม H+E; Bar = 100 μ m



รูปที่ 73 แสดงบริเวณท่อลมขนาดใหญ่ ของตัวอ่อนผึ้งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียน ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ของท่อลม (►) และกลุ่มเซลล์ของต่อมในบริเวณใกล้ท่อลม (*) ย้อม H+E; Bar = 100 μ m

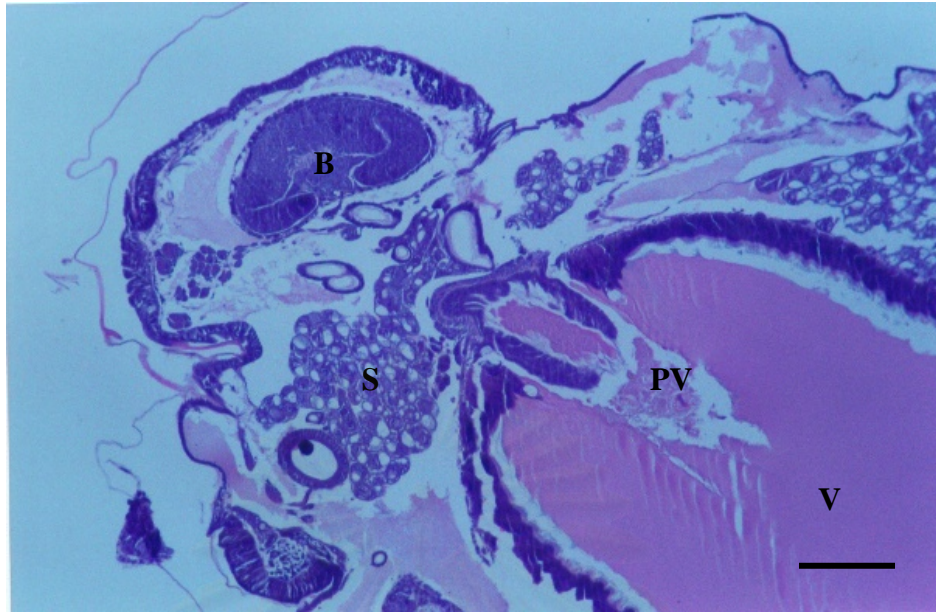
2.3 เนื้อเยื่อตัวอ่อนปกติของผึ้งโพรง

การศึกษาเนื้อเยื่อตัวอ่อนปกติโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าประกอบด้วยระบบต่างๆ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร (รูปที่ 74) ระบบขับถ่ายของเสีย ระบบไหลเวียนเลือด และระบบประสาทที่มีโครงสร้างของเนื้อเยื่อต่าง ๆ และเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่เหมือนกับของตัวอ่อนผึ้งหลวง ระบบทางเดินอาหารแบ่งเป็น 3 ส่วน ทางเดินอาหารส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนท้าย มีอวัยวะต่าง ๆ เช่น กิ่น (proventriculus) กระเพาะอาหาร (ventriculus) ลำไส้เล็ก (รูปที่ 75) ระบบขับถ่ายของเสียประกอบด้วยท่อมัลปิเกียนบริเวณลำไส้เล็กที่ต่อกับกระเพาะ ระบบไหลเวียนเลือดประกอบด้วย aorta ในบริเวณส่วนหัวและส่วนอก หัวใจ (heart) จะอยู่บริเวณส่วนท้องปล้องที่ 1-9 และมีช่องลม (ostia) (รูปที่ 76) เนื้อเยื่อเลือดประกอบด้วยเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ prohaematocyte plasmatocyte granular haematocyte และ spheroidocyte (รูปที่ 77) ระบบประสาทประกอบด้วยเนื้อเยื่อสมอง ปมประสาท และ ventral nerve cord



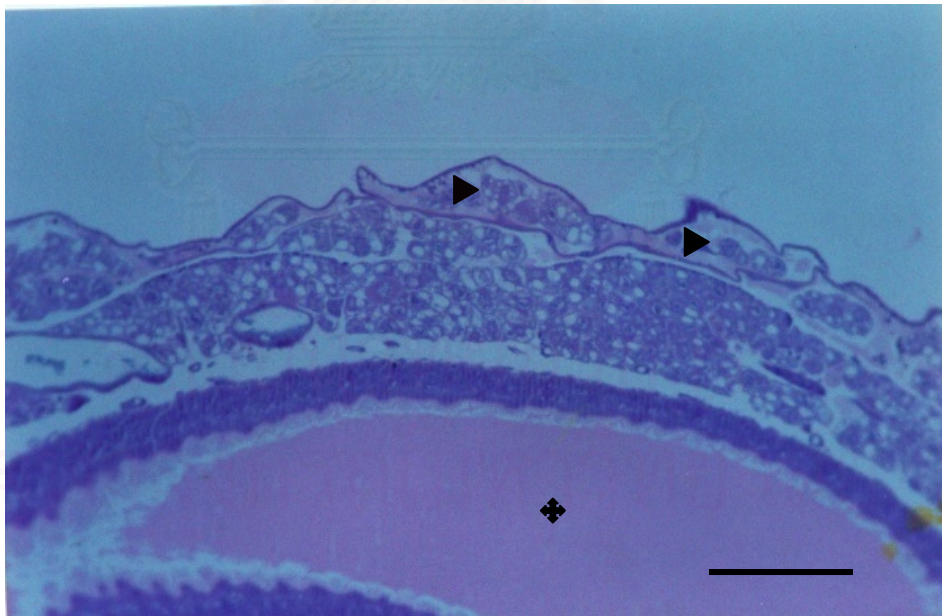
รูปที่ 74 แสดงเนื้อเยื่อตัวอ่อนปกติผึ้งโพรง *Apis cerana* อายุ 3 วัน ประกอบด้วย ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ซึ่งมีช่องเปิดท่อลม spiracle (▶) และถุงลม air sac (◆)

ย้อม H+E; Bar = 500 μ m



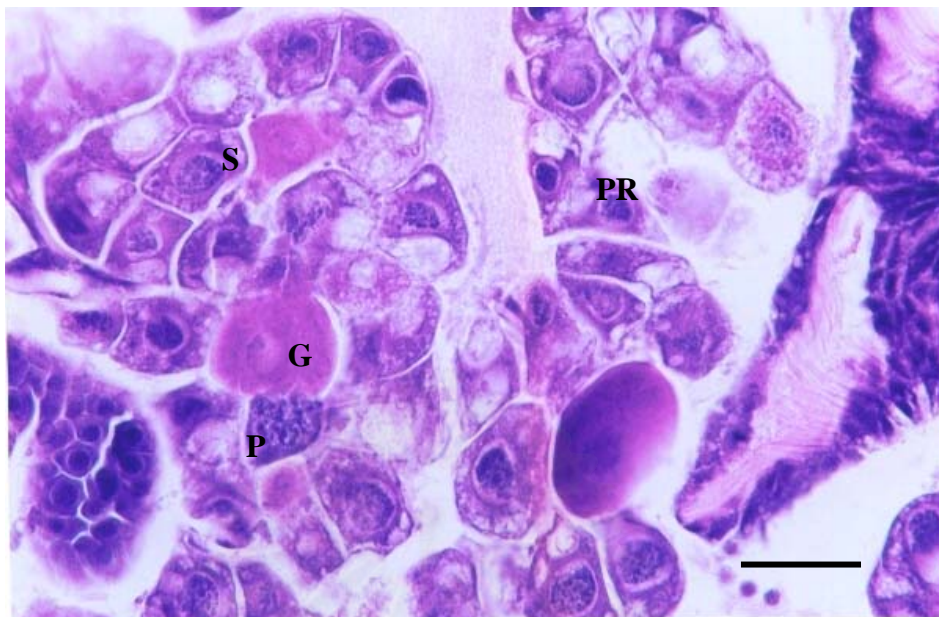
รูปที่ 75 แสดงทางเดินอาหารส่วนต้น และส่วนกลางของตัวอ่อนปกติผึ้งโพรง *Apis cerana* บริเวณส่วนต้น พบกับ proventriculus (PV) บริเวณส่วนกลางมีกระเพาะ ventriculus (V) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ทรงสูง (columnar cell) (B=brain, S=silk gland)

ย้อม H+E; Bar = 200 μ m



รูปที่ 76 แสดงรูปหัวใจ (►) ที่อยู่เหนือทางเดินอาหารส่วนกลาง (✦) ของตัวอ่อนปกติผึ้งโพรง *Apis cerana*

ย้อม H+E; Bar = 300 μ m



รูปที่ 77 แสดงลักษณะของเซลล์เม็ดเลือด haematocyte ชนิด granular haematocyte (G) prohaematocyte (PR) plasmatocyte (P) spheroidocyte (S)

ย้อม H+E; Bar = 50 μ m

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. จากข้อมูลในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (NA) เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ (isolates) จากการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนของผึ้งโพรงที่ตายด้วยลักษณะที่เกิดโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียน มีอย่างน้อย 3 ชนิด โดยทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะต่างๆ ที่สำคัญคือ เป็น gram-positive rod ทั้ง 3 ชนิด เป็นแบคทีเรียที่ให้ผลในการทดสอบ Catalase test ที่ให้ผล positive test 2 ชนิด และให้ผล negative test 1 ชนิด แต่เมื่อทำการทดสอบการเคลื่อนที่ของโคโลนี พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีการเคลื่อนที่แบบ Brownian's movement ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ใช่แบคทีเรียชนิด *Paenibacillus alvei* เนื่องจากหากเป็นแบคทีเรียชนิด *P. alvei* จะต้องมีการเคลื่อนที่ที่เกิดจากตัวของเชื้อแบคทีเรียเอง ไม่ใช่จากการที่มีปัจจัยภายนอกมากระทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ cell ซึ่ง แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ให้ผลการเคลื่อนที่ที่ต่างจาก *P. alvei* และทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดอาจไม่ใช่แบคทีเรียชนิด *P. alvei* เนื่องจากการเคลื่อนที่ได้ของโคโลนี ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของ *P. alvei* ไม่เกิดขึ้นในแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด

แม้ไม่สามารถ identify ชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับ species แต่การทดลองนี้สามารถชี้ให้เห็นถึงข้อมูลพื้นฐานทางด้านจุลชีววิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ยกตัวอย่างเช่น ชนิดของแกรม ผลจากการทดสอบ Catalase test และผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของโคโลนี เป็นต้น ทั้งนี้ การศึกษาเพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนจนสามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดใดยัง

ต้องการข้อมูลเพิ่มเติมขึ้นจากการทำการทดลองไว้ โดยจะต้องเพิ่มการทดลองทางจุลชีววิทยาอีกในหลายๆ การทดลอง เพื่อที่จะนำผลจากการทดลองเหล่านั้นมาใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จนถึงระดับ species ต่อไป

แบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิดเป็น แบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถระงับการเจริญได้ด้วยยาปฏิชีวนะ Ampicillin ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการรักษาและป้องกันการระบาดของโรคตัวอ่อนเน่า ยูโรเปียนได้

2. เนื้อเยื่อของตัวอ่อนผึ้งหลวงและผึ้งโพรง ประกอบด้วยเนื้อเยื่อระบบต่าง ๆ ที่มีลักษณะโครงสร้างและเซลล์ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งประกอบด้วยระบบต่าง ๆ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหารที่เป็นท่อยาวตลอดจากปากไปถึงทวารหนัก บริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง และส่วนท้าย มีโครงสร้างเนื้อเยื่อที่คล้ายคลึงกันเพราะตัวอ่อนผึ้งได้รับน้ำผึ้งที่เป็นอาหาร ซึ่งไม่ต้องทำการย่อยและไม่มีการกากอาหาร ซึ่งลักษณะทางเดินอาหารแบบนี้จะพบได้เช่นเดียวกันในพวกแมลงในอันดับ Heteroptera ที่ดูดน้ำเลี้ยงของพืชเป็นอาหาร (Goodchild, 1963) ทางเดินอาหาร ประกอบด้วยอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ คอหอย หลอดอาหาร ฤงักอาหาร กั้น กระเพาะ ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก ซึ่งในตัวอ่อนผึ้งทั้ง 2 ชนิดนี้ที่บริเวณกั้นมีลักษณะพิเศษที่ดัดแปลงเป็น valve ยื่นเข้าไปในช่องของทางเดินอาหารส่วนกลาง และเมื่อเป็นตัวเต็มวัยมีลักษณะที่เป็น spine แต่ในแมลงพวก periplanata จะพบ valve อยู่ที่ทางเดินอาหารส่วนต้น (Snodgrass 1935, 1956) ที่บริเวณทางเดินอาหารส่วนกลางของตัวอ่อนผึ้งทั้ง 2 ชนิดนี้มีแผ่นเยื่อ peritrophic membrane ที่มีลักษณะสานถ่างกันเป็นร่างแห ซึ่งเกิดจากการแยกตัวของผิวเยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลาง ซึ่งแผ่นคลุมภายในช่องกระเพาะ แผ่นเยื่อนี้จะพบได้เช่นเดียวกันในแมลงพวก Orthoptera Odonata และ Coleoptera (Chapman, 1972) แต่สำหรับพวกแมลง Diptera นั้นแผ่นเยื่อนี้เจริญมาจากบริเวณ stomoderm (Wigglessworth, 1965) ระบบขับถ่ายของเสีย ประกอบด้วยท่อมัลปิเกียนเปิดเข้าสู่ท่อที่เป็นรอยต่อระหว่างกระเพาะกับลำไส้เล็ก ส่วนระบบไหลเวียนเลือดของผึ้งหลวงผึ้งโพรงมีช่องว่างด้านบนของลำตัว (dorsal sinus) ทำหน้าที่เป็น aorta และหัวใจ และมีช่องเปิดให้เลือดไหลเข้าสู่หัวใจเรียกว่า ostia จำนวน 7 คู่ ส่วนด้านล่างของลำตัวมีช่องว่าง (ventral sinus) รับเลือดจากอวัยวะในส่วนหัว ออก และท่อ เข้ามายังส่วนท้าย เพื่อไปยัง dorsal sinus แล้วกลับเข้าหัวใจ ซึ่งจะเหมือนกับผึ้งชนิดอื่น ๆ (Freudenstein, 1928) แต่จะแตกต่างจากหัวใจของ Aeschna nymph ที่มี ostia เพียง 2 คู่ ในแต่ละห้องหัวใจ และต่างจากพวก dictyoptera ที่มีมากถึง 12 คู่ทั้งหมด (Chaman, 1972) จากการจำแนกชนิดของเม็ดเลือด haematocyte โดย Jones (1962, 1964) พบว่าตัวอ่อนผึ้งโพรงมีเม็ดเลือด 5 ชนิด ซึ่งพบได้เช่นเดียวกับในตัวอ่อนผึ้งโพรงและผึ้งหลวงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ แต่จะแตกต่างไปจากแมลงพวก Lepidoptera และ Diptera ซึ่งจะพบ 2 ชนิด ได้แก่ spheroidocyte และ acidohaematocyte ส่วนระบบแลกเปลี่ยนก๊าซของตัวอ่อนผึ้งหลวงและผึ้งโพรงนั้นมีช่องเปิดท่อลม (spiracle) บริเวณส่วนอก 2 คู่ และส่วนท้อง 8 คู่ ซึ่งต่างจากพวก Diptera ซึ่งมีจำนวน 11 คู่ พบที่

บริเวณระหว่างหัวกับ prothorax 1 คู่ ส่วนอก 4 คู่ ส่วนท้อง 6 คู่ (Chapman, 1972) ระบบประสาทของตัวอ่อนมีทั้ง 2 ชนิด ประกอบด้วย สมอ ปมประสาท รวมทั้งสิ้น 13 ปม เช่นเดียวกัน

3. เนื้อเยื่อตัวอ่อนมีทั้งโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียพบว่าเนื้อเยื่อและเซลล์ต่างๆ ได้รับความเสียหายเกิดพยาธิสภาพ ระบบทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ถูกทำลายเสียหาย เยื่อบุทางเดินอาหารและเนื้อเยื่อชั้นต่าง ๆ สลายตัว ต่อมสร้างเส้นใยถูกทำลาย เหลือเพียงบางส่วนของกระเพาะในตัวอ่อนบางตัวเท่านั้น ระบบแลกเปลี่ยนก๊าซถูกทำลาย เห็นช่องของท่อลมบ้างบริเวณหัวใจ ช่อง dorsal sinus และ ventral sinus ถูกทำลายไปยังคงเห็น haematocyte บางบริเวณเท่านั้น ส่วนระบบประสาทของตัวอ่อนมีโพรงที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียเน่นั้น สมอและปมประสาทถูกทำลายไปเซลล์ของสมอและปมประสาทสลายตัว สรุปได้ว่าตัวอ่อนของผึ้งโพรงที่เป็นโรคนี้อาจมีการสูญเสียเซลล์และเนื้อเยื่อของระบบต่างๆ ทุกระบบ รวมทั้งระบบปกคลุมร่างกายด้วยเช่นกัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Areekul, S. 1992. Effects of agricultural development in Thailand to Asian honey bees. In Wongsiri, S. (ed.). International Conference on The Honey Bees and Bee Mites. Feb. 9-14, p.26, Thailand: Chulalongkorn University.
- Aquilanti L, Silvestri G, Zannini E, Osimani A, Santarelli S & Clementi F. Phenotypic, genotypic, and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *J Appl Microbiol* 2007; 103(4): 948-960.
- Bailey, L. Honeybee Pathology. Academic press, London. 1958
- Bergey DH. Bergey's manual of determinative bacteriology (eighth edition), Buchanan RE & Gibbons NE (Eds), The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland. 1,246 p, 1974.
- Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., and others. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore: WAVERLY PRESS, 1975.
- Cai J & Collins MD. Evidence for a close phylogenetic relationship between *Melissococcus pluton*, the causative agent of European foulbrood disease, and the genus *Enterococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44(2): 365-367.
- Chapman, R.F. 1972. The insects: structure and function. London: The English Language Book Society and The English Universities.
- Christopher K. Mathews., K. E. van Hold., and Kevin G. Ahern. Biochemistry third edition. Addison – Wesley Publishing Company.
- Crane, E. 1990. Bee and beekeeping science, practice and world resource. New York: Cornell University.
- Djordjevic SP, Forbes WA, Smith LA & Hornitzky MA. Genetic and biochemical diversity among isolates of *Paenibacillus alvei* cultured from Australian honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(3): 1098-1106.
- Djordjevic SP, Smith LA, Forbes WA & Hornitzky MA. Geographically diverse Australian Isolates of *Melissococcus pluton* exhibit minimal genotypic diversity by restriction endonuclease analysis. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 173(2): 311-318.
- Freudenstein, K. 1928. Heart and circulatory: honey bee. *Z. Wiss. Zool.* 132: 404-475.

- Goodchid, A.J.P. 1963. Studies on the functional anatomy of the intestines of Heteroptera. Proc. Zool. Soc. Lond. 141: 851-910.
- Jones, J.C. 1962. Current concepts concerning insect haematocytes. Am. Zoologist. 2: 209-246.
- Jones, J.C. 1964. The circulatory system of insects. In Rockstein, M.(Ed.). The physiology of insecta. Vol. 3. New York: Academic Press.
- Kaban G & Kaya M. Identification of lactic acid bacteria and gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk). J Food Sci 2008; 73(8): M385-M388.
- Morse, R. *Apis dorsata* in the Philippines. Monogr. Philipp. Associa. Entomol. 1969. 1: 1-96.
- Shimanuki H & Knox DA. Bee health and international trade. Rev Sci Tech 1997; 6(1):172-6.
- Snodgrass, R. E. 1935. Anatomy of the honey bee. London: Constable.
- Snodgrass, R. E. 1956. Anatomy of the honey bee. London: Constable.
- Steven P. Djordjevic., Wendy A. Forbes., Lisa A. Smith., and Michael A. Hornitzky. Genetic and Biochemical Diversity among Isolates of *Paenibacillus alvei* Cultured from Australian Honeybee (*Apis mellifera*) colonies. Applied and Environment Microbiology. Mar. 2000. p. 1098-1106.
- Thapa, R. and Wongsiri. S. Colony migrations of *Apis dorsata* in the northern part of Thailand. 4th Asian Apicultural Assosiation Conference. Nepal. 1998
- Wigglesworth, V.B. 1965. The Principles of insect physiology. London: Methuen.
- Williams DL. A veterinary approach to the European honey bee (*Apis mellifera*). Vet J 2000; 160(1): 61-73.
- Wongsiri, S. 1989. Biology of honey bees. 2 nd. Bangkok: Ton-or.
- Wongsiri S, Chanchao C, Deowanish S, Aemprapa S, Chaiyawong T, Peterson S & Leepitakrat S. Honeybee diversity and beekeeping in Thailand. Bee World 2000; 81: 20-29.