



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่ายุโรปของไรปรสิตภายนอก
ของผึ้งหลวง (*Apis dorsata*)

An evaluation of ectoparasitic mites as the vectors for European
foulbrood (EFB) disease in giant honeybees *Apis dorsata*

ชื่อนิสิต น.ส.กนกวรรณ ตั้งสิริพัฒนาพันธุ์ เลขประจำตัว 6032002223

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่าอยู่โรเปียนของไรปรสิตภายนอกของผึ้งหลวง
(*Apis dorsata*)

An evaluation of ectoparasitic mites as the vectors for European foulbrood
(EFB) disease in giant honeybees *Apis dorsata*

นางสาวกนกวรรณ ตั้งสิริพัฒนาพันธุ์

อาจารย์ที่ปรึกษา

ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนน่ายูโรเปียนของไรปรสิต ภายนอกของผึ้งหลวง (<i>Apis dorsata</i>)
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวกนกวรรณ ตั้งสิริพัฒนาพันธุ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ศาสตราจารย์ ดร. จันทรเพ็ญ จันทรเจ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐพจน์ วาฤทธิ
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

ผึ้งจัดเป็นแมลงสังคมที่มีความสำคัญต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก ทั้งนี้พบว่ามีโรคในผึ้งเป็นจำนวนมาก ในโครงการนี้เลือกศึกษาผึ้งหลวง (*A. dorsata*) เนื่องจากเป็นผึ้งที่แข็งแรง จึงสนใจว่าจะมีโรคมามากน้อยเพียงไร แต่เปลี่ยนมาสนใจโรค American foulbrood disease (AFB) แทนโรค European FB (EFB) เนื่องจากเป็นโรคที่ร้ายแรงมาก เกิดจากแบคทีเรีย *Paenibacillus larvae* ที่สร้างสปอร์ได้และมีการแพร่ระบาดในผึ้งหลายชนิดทั่วโลก และเลือกศึกษาไรปรสิตภายนอกเนื่องจากมีรายงานจำนวนมากรายงานว่าสามารถเป็นพาหะนำโรคของผึ้งได้ จึงทำการเก็บตัวอย่างผึ้งหลวงจำนวน 3 รังจากจังหวัดสมุทรสงคราม ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564 แล้วทำการสำรวจไรปรสิตภายนอกที่เกาะผึ้งหลวงในระยะต่าง ๆ พร้อมทั้งสังเกตบริเวณที่ตัวผึ้งที่ไรปรสิตภายนอกเกาะอยู่ด้วย stereo microscope และ compound microscope, ผลพบว่าจากผึ้งหลวงตัวเต็มวัย 150 ตัว (50 ตัว/รัง) ไม่พบว่ามีไรปรสิตภายนอกเลย แต่พบไรขนาดเล็กซึ่งพบที่บริเวณปล้องอกของผึ้งตัวเต็มวัย โดยเฉพาะบริเวณขาคู่ที่ 3 จากลักษณะทางสัณฐานโดย scanning electron microscope พบว่าไรที่พบเป็น phoretic mite, ส่วนร้อยละของผึ้งตัวเต็มวัยที่มีไรเกาะ (prevalence) จากรังที่ 1, รังที่ 2 และรังที่ 3 เท่ากับ 32%, 20% และ 30% ตามลำดับ แต่ไม่พบไรใด ๆ ในผึ้งระยะไข่ ตัวอ่อน และดักแด้เลย ต่อมาจึงทำค้นหาความเป็นพาหะนำโรค AFB ของ phoretic mites ด้วยวิธี multiplex PCR, จึงนำ phoretic mites พร้อมขาผึ้งที่มีไรเกาะไปสกัด DNA ด้วย DNA extraction mini kit (cat. # 51304, QIAgen), เตรียมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรสุดท้าย 25 μ L ที่ประกอบด้วย 12.5 μ L Emerald Amp GT PCR master mix (cat. # RR310Q, Takara), 5 μ L DNA (100 ng), 1 μ L ของแต่ละ primer (10 μ M) และ d-H₂O, มีภาวะการทำงานที่เริ่มต้นด้วย 94 °C เป็นเวลา 1 min ตามด้วย 35 รอบของ 94 °C เป็นเวลา 1 min, 45 °C เป็นเวลา 1 min และ 64 °C เป็นเวลา 2 min, และสุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 7 min สังเกต PCR products ด้วย 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis, ทั้งนี้จาก primers 2 คู่ที่เลือกใช้, primer คู่แรก มีความจำเพาะกับ *16S rRNA* ของ *P. larvae* คาดหวัง PCR product ขนาด 700 bp และ primer คู่ที่ 2 ที่เป็นชุดควบคุม มีความจำเพาะกับ *cytochrome b* ของผึ้งในสกุล *Apis* คาดหวัง PCR product ขนาด 500 bp, ผลพบว่าใน phoretic mites มี PCR products ของ *P. larvae*, จึงทำการยืนยันผลด้วยการนำ PCR products ที่ได้ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นผลจากการศึกษานี้อาจถูกนำไปใช้ในแนวทางการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง phoretic mites, แบคทีเรียและผึ้งรวมทั้งแนวทางการควบคุมโรคดังกล่าวในอนาคต

คำสำคัญ: ผึ้งหลวง, โรคของผึ้ง, multiplex PCR, *Paenibacillus larvae*, phoretic mite

Research Title : An evaluation of ectoparasitic mites as the vectors for European foulbrood (EFB) disease in giant honeybees *Apis dorsata*

Student name : Miss Kanokwon Tangsiripattanapun

Advisor : Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.

Co-Advisor : Assistant Professor Natapot Warrit, Ph.D.

Department of : Biology

Abstract

Honeybees, as eusocial insects, are important for human. However, many bee diseases have been found. In this work, due to its strength, *A. dorsata* was used to determine whether it was affected by diseases or not. It was focused on American foulbrood disease (AFB), instead of European FB because AFB was very severe. It was caused by *Paenibacillus larvae*, spore producing bacteria. Thus, it could be widely spread. Furthermore, ectoparasitic mites were investigated because, in many articles, it has been reported that they could be vectors. Three hives of *A. dorsata* were collected in Samut Songkram province in February, 2021. Under stereo and compound microscopes, it was found that, among 150 adults (50 bees/hive), there were no ectoparasitic mites at all. In contrast, a lot of tiny mites were found at the bee's abdomen, especially legs of pair # 3. Considering morphology by scanning electron microscope, phoretic mites were revealed. Prevalence of adults with phoretic mites from hive # 1, 2 and 3 was 32%, 20% and 30%, respectively. No mites were observed from eggs, larvae and pupae of *A. dorsata* at all. Later, AFB carrying mites were investigated by multiplex PCR. DNA was extracted from phoretic mites and bee's legs by DNA extraction mini kit (cat. # 51304, QIAgen). A reaction mixture contained 12.5 μ L of Emerald Amp GT PCR master mix (cat. # RR310Q, Takara), 5 μ L of DNA (100 ng), 1 μ L of each primer (10 μ M) and d-H₂O to make final volume of 25 μ L. The condition of PCR was initiated at 94 °C for 1 min. It was followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 45 °C for 1 min and 64 °C for 2 min. At last, it was at 72 °C for 7 min. PCR products were observed by 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis. Considering 2 pairs of primers, the first pair of primers were specific to *16S rRNA* of *P. larvae*, with the expected size of PCR product at 700 bp while the latter pair of primers, as control, were specific to *cytochrome b* of *Apis* spp., with the expected size of PCR product at 500 bp. It showed that chosen phoretic mites might contain *P. larvae*. The PCR products were next sent for nucleotide sequencing. Hence, this obtained data may be used to study the interaction among phoretic mites, bacteria and honeybee leading to how to control the bee disease in the future.

Keywords: *Apis dorsata*, bee disease, multiplex PCR, *Paenibacillus larvae*, phoretic mite

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากความช่วยเหลือจากผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ศาสตราจารย์ ดร.จันทรเพ็ญ จันทรเจ้า อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนการติดต่อเจ้าหน้าที่เก็บตัวอย่างผึ้งหลวงตัวเต็มวัยและรังผึ้งหลวง ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ให้ความรู้ กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ทั้งเรื่องการทำงานวิจัยและการใช้ชีวิตเป็นนิสิตในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จนกระทั่งโครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และให้ความรู้เกี่ยวกับไรที่พบในผึ้งหลวงในโครงการนี้ จนกระทั่งโครงการนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยดี จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.มารุต เพ็ญอวรณ์ ที่ให้คำแนะนำและความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับไรที่พบในผึ้งหลวงในโครงการนี้ จนกระทั่งโครงการนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยดี จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณพีไตรรัตน์ ยิ่งสุนทรวัฒนา (พี่ยุ่น) ที่เอื้อเฟื้อยกยืม Compound microscope และ Stereo microscope สำหรับใช้ในตลอดระยะเวลาในโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพีพรรณทิวา คงคาร์ตัน (พี่แพรว) ที่คอยให้คำปรึกษาในการใช้อุปกรณ์รวมถึงช่วยเตรียมสารเคมี จนไปถึงเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการทำโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวอาภาศิริ นพรัตน์ ที่เอื้อเฟื้อภาพถ่ายดอกสาละลังกาสำหรับประกอบกับเนื้อหาในโครงการวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทรเพ็ญ จันทรเจ้า, อาจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา, อาจารย์ ดร.มารุต เพ็ญอวรณ์ และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
ABSTRACT	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1. ผีเสื้อหลวง	3
2.2. โรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน	4
2.3. การศึกษาไรในผีเสื้อหลวง	5
2.4. การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน	5
2.5. พื้นที่ศึกษา.....	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	7
3.1. สัตว์ทดลอง.....	7
3.2. การเก็บตัวอย่างผีเสื้อหลวงตัวเต็มวัยและรังผีเสื้อหลวง	7
3.3. การศึกษาไรในผีเสื้อหลวง	8
3.3.1. การศึกษาไรในผีเสื้อตัวเต็มวัยและรังผีเสื้อหลวง	8
3.3.2. การระบุชนิดของไร	8
3.4. การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันของไรในผีเสื้อหลวง.....	9
3.4.1. การสกัดดีเอ็นเอของขาผีเสื้อที่มีไรเกาะอยู่.....	9
3.4.2. การตรวจหาเชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน.....	10
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	11
4.1. การศึกษาไรในผีเสื้อหลวง	11
4.1.1. การศึกษาไรในผีเสื้อหลวงตัวเต็มวัย.....	11
4.1.2. การศึกษาไรในรังผีเสื้อหลวง.....	15
4.2. การระบุชนิดของไร.....	15

4.3. การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน	16
4.3.1. ค่าความเข้มข้นและค่า A_{260}/A_{280} ของดีเอ็นเอสายคู่	16
4.3.2. การตรวจหาเชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน	17
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	21
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	23
6.1. สรุปผลการศึกษา	23
6.2. ข้อเสนอแนะ	23
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์	23
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต	23
เอกสารอ้างอิง	24

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3-1 Primers สำหรับตรวจหาโรคตัวอ่อนเนออเมริกัน.....	10
ตารางที่ 4-1 ชนิดต้นไม้ที่ผึ้งหลวงทำรัง จากพื้นที่จังหวัดสมุทรสงคราม ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564.....	11
ตารางที่ 4-2 ร้อยละของผึ้งตัวเต็มวัยที่พบไร (Prevalence) ในแต่ละรังและจำนวนไรที่พบในผึ้ง ตัวเต็มวัยในแต่ละรัง.....	11
ตารางที่ 4-3 ตำแหน่งของผึ้งที่พบไรในผึ้งตัวเต็มวัยรังที่ 1.....	12
ตารางที่ 4-4 ตำแหน่งของผึ้งที่พบไรในผึ้งตัวเต็มวัยรังที่ 2.....	13
ตารางที่ 4-5 ตำแหน่งของผึ้งที่พบไรในผึ้งตัวเต็มวัยรังที่ 3.....	14
ตารางที่ 4-6 ร้อยละของเซลล์ในรังผึ้งที่พบไร (Prevalence) ในแต่ละรังและจำนวนไรที่พบใน เซลล์ในแต่ละรัง.....	15
ตารางที่ 4-7 ค่าความเข้มข้นและค่า A_{260}/A_{280} ของดีเอ็นเอสายคู่ของขาผึ้งที่มีไรเกาะอยู่.....	16

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 ผึ้งหลวง (<i>Apis dorsata</i>)	3
ภาพที่ 2-2 ส่วนต่าง ๆ ของรังผึ้ง.....	3
ภาพที่ 2-3 Ropy stage ของตัวอ่อนผึ้งที่ติดเชื้อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน	4
ภาพที่ 3-1 รังผึ้งหลวงหลังจากไล่ผึ้งหลวงออกด้วยควันจากคบกิ่งไม้แล้ว.....	7
ภาพที่ 3-2 ขาผึ้งหลวงตัวเต็มวัยคู่ที่ 3 ที่มีไรเกาะอยู่เมื่อส่องใต้กล้อง Stereo microscopes....	8
ภาพที่ 3-3 กล้อง Scanning electron microscope ที่สถาบันเครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....	9
ภาพที่ 3-4 ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่า A_{260}/A_{280}	9
ภาพที่ 4-1 ไรที่เกาะบนขาคู่ที่ 3 ของผึ้งงานของผึ้งหลวงตัวเต็มวัย	15
ภาพที่ 4-2 ไรจากภาพที่ 4-1 ที่เกาะบนขาคู่ที่ 3 ของผึ้งงานของผึ้งหลวงตัวเต็มวัย.....	16
ภาพที่ 4-3 Agarose gel electrophoresis ครั้งแรก.....	17
ภาพที่ 4-4 Agarose gel electrophoresis ครั้งที่ 2	18
ภาพที่ 4-5 Agarose gel electrophoresis ครั้งที่ 3	19
ภาพที่ 4-6 Agarose gel electrophoresis ครั้งที่ 4	19
ภาพที่ 5-1 ดอกสาละลังกา หรือ Cannonball tree ที่มีผึ้งสกุล <i>APIS</i> กำลังเก็บเกสรที่เป็นแหล่ง อาหารของผึ้งสกุลนี้	21
ภาพที่ 5-2 Phoretic mite ที่ถ่ายได้จาก Compound microscope ซึ่งสามารถเห็น Attachment organ ที่ด้าน Ventral ชัดเจน	22

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ผึ้ง (Honeybees) เป็นแมลงที่มีระบบสังคมแท้ (Eusocial insect) (ปิยมาศ และสุริรัตน์, 2555) ที่มีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์ ทั้งในด้านเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญ เช่น น้ำผึ้ง และเกสร ที่ใช้ในอาหารและยา รวมทั้งเป็นแมลงที่ช่วยถ่ายเรณูให้แก่พืชผลต่าง ๆ ทั้งพืชสวนและพืชไร่ ทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น (สิริวัฒน์, 2555) แต่ในขณะเดียวกันโรคของผึ้งที่พบนั้นสามารถสร้างความเสียหายแก่ประชากรผึ้งและเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งได้ ในโครงการนี้ ผู้วิจัยได้เลือกผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) มาศึกษา เพราะว่าผึ้งชนิดนี้เป็นผึ้งที่พบการแพร่กระจายในประเทศไทย เป็นผึ้งที่มีความแข็งแรงและคนไทยนิยมบริโภคน้ำผึ้งที่ได้จากผึ้งชนิดนี้อีกด้วย

เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรค COVID-19 และตัวอย่างโรคที่พบในผึ้งหลวงเป็น phoretic mite ซึ่งไม่ใช่โรปรสติด ทางผู้วิจัยจึงเปลี่ยนโรคที่ใช้ในการประเมินความเป็นพาหะนำโรค จากเดิมเป็นโรคตัวอ่อนเน่ายุโรป (European foulbrood disease หรือ EFB) เปลี่ยนเป็นโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน (American foulbrood disease หรือ AFB) ซึ่งโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันเป็นโรคในตัวอ่อนผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ที่มีความร้ายแรงและแพร่ระบาดไปทั่วโลก เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus larvae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ที่สามารถทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่น ความร้อนและความแห้ง เป็นต้น (Hansen and Brødsgaard, 1999) โดยผึ้งพันธุ์ได้นำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกในช่วงปีพ.ศ.2483 ถึงปีพ.ศ.2493 (Suppasat et al., 2007) นอกจากนี้ Chen และคณะ (2000) พบว่า *P. larvae* สามารถก่อโรคดังกล่าวในตัวอ่อนผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ได้

ในส่วนของโรคที่พบว่าสามารถเป็นพาหะนำโรคของผึ้งได้ คือ โรปรสติดภายนอก (Ectoparasitic mite) ชื่อว่า *Varroa destructor* ซึ่งเป็นโรคที่พบได้ใน *A. mellifera* โดยพบว่าไรชนิดนี้สามารถเป็นพาหะนำโรคของผึ้งที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้ เช่น โรคปีกผิดรูป (Deformed wing virus หรือ DWV), โรคอัมพาตเฉียบพลันในผึ้ง (Acute Bee Paralysis Virus หรือ ABPV) เป็นต้น (Chantawannakul et al., 2006)

แต่อย่างไรก็ดี ยังไม่มีการศึกษาเป็นที่แน่ชัดว่าโรคที่พบในผึ้งสามารถเป็นพาหะนำโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้หรือไม่และโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันสามารถพบได้ใน *A. dorsata* หรือไม่ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยในครั้งนี้ โดยในการศึกษานี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยในส่วนแรกจะศึกษาเกี่ยวกับการสำรวจไรศัตรูผึ้งในการเบียน *A. dorsata* ในระยะต่าง ๆ โดยจะมีการสำรวจรังของ *A. dorsata* และมีการสุ่มพื้นที่ในรังเพื่อทำการศึกษา เพื่อดูว่ามีการพบไรศัตรูผึ้งชนิดไหนบ้างและเจอไรศัตรูผึ้งใน

ผึ้งระยะโตมากที่สุด รวมทั้งสังเกตบริเวณของตัวผึ้งที่ไรศัตรูผึ้งมักเกาะอยู่ และในส่วนที่สองจะเป็น การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันของไรศัตรูผึ้งต่อ *A. dorsata* ด้วยวิธีการทาง อณูชีววิทยา (molecular analysis) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวต่อการตรวจพบเชื้อก่อโรคข้างต้น และมีความแม่นยำ เพื่อประเมินว่าไรศัตรูผึ้งที่พบนั้นสามารถเป็นพาหะนำโรคที่กล่าวไว้ข้างต้นหรือไม่

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อสำรวจไรศัตรูผึ้งในการเบียน *A. dorsata* ในระยะต่าง ๆ และการสังเกตบริเวณที่ตัวผึ้ง ที่ไรศัตรูผึ้งมักเกาะอยู่ รวมทั้งระบุชนิดของไรศัตรูผึ้งที่พบ
- เพื่อประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่ายุโรปเบียนของไรศัตรูผึ้งต่อ *A. dorsata* ด้วย วิธีการทางอณูชีววิทยา

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

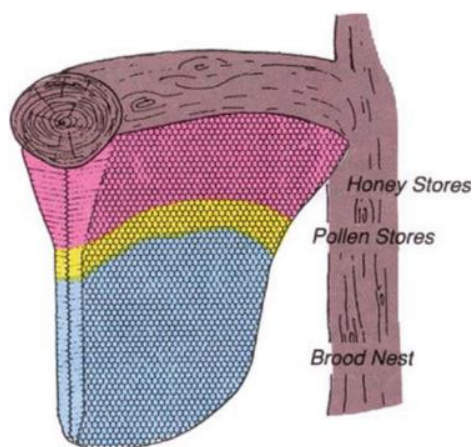
2.1. ผึ้งหลวง

ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) เป็นผึ้งที่มีการกระจายในหลายประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย (Niem and Trung, 1999) เป็นผึ้งที่มีขนาดของผึ้งและรังใหญ่ที่สุด (ความยาวลำตัวเท่ากับ 17-20 มิลลิเมตรและความยาวปีกคู่หน้าเท่ากับ 12-15 มิลลิเมตร) และผึ้งหลวงกลุ่มเดียวสามารถอพยพได้ระหว่าง 100-200 กิโลเมตรทุกปี (Gupta, 2014)



ภาพที่ 2-1 ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) (ภาพจาก indiabiodiversity.org)

ผึ้งหลวงทำรังอยู่ในที่โล่งแจ้ง ลักษณะรวงทั่วไปแผ่นรวงรังมีแผ่นเดียว จะโค้งรีเป็นรูปครึ่งวงกลมจะติดอยู่ที่กิ่งไม้ หน้าผา โขดหิน หรือมุดตึกที่อยู่สูง ๆ (Rattanawanee et al., 2013) โดยภายในรังผึ้งจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนหลัก ๆ ดังภาพ 2-1 โดยส่วนแรกที่เป็นที่เก็บน้ำผึ้งจะอยู่ที่มุมด้านบนของแผ่นรวงรังตรงบริเวณที่ยึดเกาะกับวัตถุ ถัดลงมาเป็นที่เก็บเกสรและสุดท้ายที่อยู่ล่างสุดจะเป็นส่วนที่เก็บตัวอ่อน (Petersen and Reddy, 2016)



ภาพที่ 2-2 ส่วนต่าง ๆ ของรังผึ้ง (ภาพจาก Petersen and Reddy, 2016)

วงจรชีวิตของ *A. dorsata* นั้นประกอบไปด้วย 4 ระยะตามลำดับ ได้แก่ ไข่ (egg), ตัวอ่อน (larva), ดักแด้ (pupa) และตัวเต็มวัย (adult) โดยเริ่มแรกผึ้งเพศเมียที่เป็นนางพญา (queen) วางไข่ที่ฐานของหลอดรวง (cell) โดยวางไข่ 1 ฟองต่อ 1 หลอดรวง และไข่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์กับน้ำเชื้อของผึ้งเพศผู้ (drone) จะกลายเป็นผึ้งเพศผู้ ส่วนไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์กับน้ำเชื้อของผึ้งตัวผู้จะกลายเป็นผึ้งเพศเมีย หลังจากนั้นจะฟักออกมาเป็นตัวอ่อนที่เป็นหนอนขนาดเล็ก มีสีขาว โดยถ้าตัวอ่อนที่จะเจริญเป็นผึ้งงาน (worker) จะได้รับนมผึ้ง (royal jelly) เป็นอาหารใน 3 วันแรก หลังจากนั้นจะได้น้ำผึ้งและเกสรเป็นอาหาร ส่วนตัวอ่อนที่จะเจริญเป็นผึ้งนางพญา จะได้รับนมผึ้งตลอดเวลา หลังจากนั้นเมื่อผึ้งงานปิดช่องหลอดรวงและตัวอ่อนมีการพัฒนาไปเป็นระยะดักแด้ และเมื่อมีการพัฒนาจนใกล้ระยะตัวเต็มวัย ผึ้งจะเคี้ยวช่องที่ปิดไว้ออกมาเป็นผึ้งระยะตัวเต็มวัย (Ramachandra et al., 2012)

2.2. โรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน

โรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน (American Foulbrood disease) เป็นโรคในตัวอ่อนผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ที่ร้ายแรงและแพร่ระบาดไปทั่วโลก พบการแพร่ระบาดได้ตลอดทั้งปี ไม่ขึ้นกับฤดูกาล มีแบคทีเรียก่อโรคคือ *Paenibacillus larvae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่น ความร้อนและความแห้ง เป็นต้น (Hansen and Brødsgaard, 1999) จากการทดลองของ Haseman (1961) พบว่าสปอร์ที่ค้างอยู่ในรังผึ้งเป็นเวลา 35 ปียังคงความสามารถในการก่อโรค ลักษณะอาการที่สังเกตได้คือ ตัวอ่อนผึ้งจะเปลี่ยนสีหลังจาก 10-15 วันหลังจากฟักตัว (Park, 1953) ฝาที่ปิดรวงที่มีตัวอ่อนผึ้งที่ตายจะเป็นรอยบุ๋ม สีคล้ำถึงดำ เมื่อนำไม้จิ้มลงไปแล้ว ตัวออกมาจะติดเป็นสายยืดออกมาเรียกว่า “Ropy stage” (ภาพที่ 2-2) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของตัวอ่อนผึ้งที่เป็นโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน (ภาณุวรรณ, 2555)



ภาพที่ 2-3 Ropy stage ของตัวอ่อนผึ้งที่ติดเชื้อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน

(ภาพจาก beeaware.org.au)

ความไวต่อโรคจะขึ้นอยู่กับอายุของตัวอ่อน ถ้าอายุมากขึ้นความไวต่อการติดเชื้อจะลดลง จากการทดลองพบว่า ตัวอ่อนผึ้ง *A. mellifera* ที่มีอายุน้อยกว่า 24 ชั่วโมง สปอร์ของแบคทีเรียเพียง 10 สปอร์ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ ในขณะที่ตัวอ่อนผึ้งที่มีอายุ 48 ชั่วโมง จะต้องกินสปอร์แบคทีเรียหลายล้านสปอร์ (Bamrick and Rothenbuhler, 1961; Woodrow and Holst, 1942) สาเหตุเนื่องจากตัวอ่อนของผึ้งมีอายุมากขึ้น ผนังทางเดินอาหาร peritrophic membrane จะหนาขึ้น (Davidson, 1973) ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถผ่านทะลุเข้าไปสู่เซลล์ของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut cell) ได้โดยง่าย นอกจากนี้ Chen และคณะ (2000) พบว่า *P. larvae* สามารถก่อโรครดักกล่าวในตัวอ่อนผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ได้และพบว่าเมื่อตัวอ่อนผึ้งโพรงอายุมากขึ้น ความไวต่อการติดเชื้อจะลดลงเช่นกัน โดยตัวอ่อนที่มีอายุ 1 วันมีความไวต่อการติดเชื้อมากที่สุด รองลงมาเป็นตัวอ่อนที่มีอายุ 2 วัน สุดท้ายตัวอ่อนอายุ 3 วันมีความไวต่อการติดเชื้อน้อยที่สุดถึงแม้ว่าจะให้อาหารที่มีสปอร์ของเชื้อปริมาณมาก (4.5×10^4 สปอร์/1 ตัวอ่อน)

2.3. การศึกษาไรในผึ้งหลวง

การศึกษาไรในผึ้งหลวงนั้น Koeniger และคณะ (2002) ได้พบไรศัตรูผึ้งของ *A. dorsata* ทั้งหมด 5 ชนิด จากเศษซาก (debris) ของรังผึ้งหลวง 5 รังในพื้นที่เดียวกันในรัฐซาบะห์ (Sabah) บนเกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย คือ *Tropilaelaps clareae*, *T. koenigerum*, *Varroa rindereri*, *V. jacobsoni* และ *Euvarroa wongsirii* โดยใช้วิธีส่องตัวอย่างตัวอ่อนและเซลล์ที่เปิดแล้วด้วย dissecting microscope และในส่วนของ Suppasat และ Wongsiri (2018) ก็มีการพบไร *T. koenigerum* ในตัวอย่าง *A. dorsata* ระยะตัวอ่อนในประเทศไทยโดยใช้วิธีขึ้นกรอบ (mount) ตัวอย่างไรด้วย Hoyer's medium ลงในสไลด์และส่องใต้กล้องจุลทรรศน์และนำตัวอย่างไรมาศึกษาด้วยวิธี Molecular analysis อีกด้วย นอกจากนี้ Koeniger และคณะ (1983) ได้ศึกษาไรในผึ้ง *A. cerana*, *A. dorsata* และ *A. florea* ในระยะตัวเต็มวัย, ตัวอ่อนและในเซลล์ที่มีตัวอ่อนอยู่ในพื้นที่ Anuradhapura ประเทศศรีลังกาด้วยกล้องจุลทรรศน์เช่นกัน และพบไรทั้งหมด 4 ชนิด คือ *V. jacobsoni*, *Euvarroa sinhai*, *Neocypholaelaps indica* และ *Suidasia medanensis*

2.4. การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน

การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันจะเป็นการตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรีย *P. larvae* ในตัวอย่างตัวอ่อนผึ้งที่ติดเชื้อและในตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยวิธีหลัก ๆ ในการตรวจหาเชื้อก่อโรครดักกล่าวจะใช้วิธีการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ตัวอย่างเช่น Piccini และคณะ (2002) ที่เริ่มใช้วิธีการทำ PCR ในตัวอย่างตัวอ่อนผึ้งที่ติดเชื้อและในตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ *16S rRNA* ของ *P. larvae* ต่อมา D'Alessandro และคณะ (2006) ได้ใช้วิธีการทำ PCR จากตัวอย่างน้ำผึ้งและตัวอ่อนที่ติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว โดยสกัดดีเอ็นเอออกจากสปอร์ของแบคทีเรียโดยใช้วิธี spore-decoating และการใช้เทคนิคการทำลายสปอร์ด้วยความเย็น นอกจากนี้

Moharrami และคณะ (2011) ได้ใช้วิธีการทำ PCR ควบคู่กับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. larvae* จากตัวอย่างน้ำผึ้งและตัวอ่อนที่ติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว โดยทั้ง 3 การทดลองได้ผลคือพบเชื้อ *P. larvae* ทั้งในตัวอ่อนที่ติดเชื้อ และในน้ำผึ้งทั้งหมด

2.5. พื้นที่ศึกษา

สำหรับพื้นที่ศึกษาในโครงการนี้ จะเป็นพื้นที่ในจังหวัดสมุทรสงคราม โดยมีการเก็บตัวอย่างในวันที่ 9 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

3.1. สัตว์ทดลอง

ผึ้งหลวง *Apis dorsata* (Fabricus, 1793) ที่ใช้ศึกษาจับมาจากพื้นที่จังหวัดสมุทรสงคราม โดยเก็บตัวอย่างผึ้งตัวเต็มวัย และรังผึ้งหลวง เป็นจำนวน 3 รัง

3.2. การเก็บตัวอย่างผึ้งหลวงตัวเต็มวัยและรังผึ้งหลวง

ตัวอย่างผึ้งตัวเต็มวัยและรังผึ้งจะถูกเก็บไว้ในถุงซิปล็อค ขนาด 20 x 25 นิ้ว ซึ่งการเก็บตัวอย่างผึ้งหลวงตัวเต็มวัยและรังผึ้งหลวงจะใช้วิธีจุดไฟที่กิ่งไม้ให้มอดไหม้แล้วจ่อไปที่รังผึ้งหลวงให้ผึ้งบินออกจากรัง โดยตัวอย่างผึ้งตัวเต็มวัยจะถูกครอบลงในถุงซิปล็อคและทำการปิดปากถุงอย่างรวดเร็วขณะที่ตัวผึ้งมีชีวิตอยู่ เพื่อไม่ให้ตัวอย่างผึ้งออกมา ส่วนตัวอย่างรังผึ้งจะถูกตัดออกมาทั้งรัง และเก็บใส่ในถุงซิปล็อคเช่นกัน โดยจะต้องบันทึกลำดับรังที่บริเวณถุงซิปล็อคแต่ละถุงกำกับไว้และบันทึกข้อมูลต้นไม้ที่ผึ้งทำรังในแต่ละรังอีกด้วย หลังจากที่ได้เดินทางกลับถึงจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว ตัวอย่างผึ้งตัวเต็มวัยและรังผึ้งจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ทันที



ภาพที่ 3-1 รังผึ้งหลวงหลังจากไล่ผึ้งหลวงออกด้วยควันจากคบกิ่งไม้แล้ว (ลูกศรสีแดง)

3.3. การศึกษาไรในผึ้งหลวง

3.3.1. การศึกษาไรในผึ้งตัวเต็มวัยและรังผึ้งหลวง

นำตัวอย่างผึ้งตัวเต็มวัยมาสุ่มตรวจหาไร โดยจะหยิบสุ่มรังละ 50 ตัว มาส่องหาไรด้วย stereo microscopes และ compound microscopes เก็บข้อมูลเบื้องต้นว่าพบไรหรือไม่ ถ้าพบ จะบันทึกวาระผึ้งที่พบ, บริเวณที่พบ และทำการเก็บขาผึ้งที่มีไรใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีเอธานอลความเข้มข้น 70% โดยบันทึกเลขรังและลำดับผึ้งที่พบไว้ด้วยเพื่อมาทำการระบุชนิดของไรศัตรูผึ้ง (ดัดแปลงจาก Suppasat and Wongsiri, 2018) และนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอแบบ pool sample ในส่วนของรังผึ้งหลวงจะทำการเลือกสุ่มตรวจทั้งหมด 50 เซลล์ โดยบันทึกแต่ละเซลล์ว่าเซลล์นี้เป็นเซลล์ผึ้งระยะไข่, ตัวอ่อน หรือดักแด้ โดยจะดึงไข่, ตัวอ่อน และ ดักแด้ผึ้งออกโดยใช้ห่วงเย็บเชื้อ (Inoculation loop) 2 อันเย็บออกมาตรวจหาไรด้วย stereo microscopes และเก็บข้อมูลว่าพบไรหรือไม่ ถ้าพบ จะต้องบันทึกบริเวณที่พบไรและเก็บตัวอย่างไร ด้วยวิธีเดียวกันกับกรณีของผึ้งตัวเต็มวัย



ภาพที่ 3-2 ขาผึ้งหลวงตัวเต็มวัยคู่ที่ 3 ที่มีไรเกาะอยู่ (บริเวณวงกลมสีแดง) เมื่อส่องใต้กล้อง stereo microscopes

3.3.2. การระบุชนิดของไร

การระบุชนิดของไรศัตรูผึ้งจะทำการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาจาก compound microscope และ scanning electron microscope เพื่อจำแนกชนิดของไรศัตรูผึ้ง โดยการส่งตัวอย่างไปสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาจาก scanning electron microscope นั้นจะทำการนำตัวอย่างไรออกจากเอธานอลความเข้มข้น 70% รอให้แห้งแล้วทำการดึงน้ำออกโดยใส่ในเอธานอลความเข้มข้น 95% เป็นเวลา 1 นาทีแล้วนำออกจากเอธานอลความเข้มข้น 95% แล้วใส่ใน

microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่สะอาดแล้วส่งตัวอย่างโรที่สถาบันเครื่องมือวิจัย
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

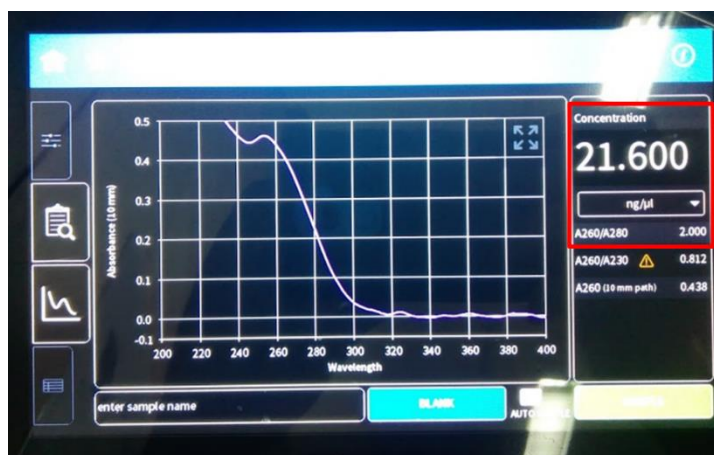


ภาพที่ 3-3 กล้อง scanning electron microscope ที่สถาบันเครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4. การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเมาเมริกกันของไรในฝั้งหลวง

3.4.1. การสกัดดีเอ็นเอของขาฝั้งที่มีไรเกาะอยู่

การสกัดดีเอ็นเอของขาฝั้งที่มีไรเกาะอยู่จะทำการสกัดแบบ pool sample โดยขั้นตอนแรก
จะนำขาฝั้งที่มีไรออกจากเอธานอลความเข้มข้น 70% จากนั้นมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรที่
สะอาดและสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA extraction mini kit (cat. # 51304, QIAgen) จากนั้นนำดีเอ็นเอ
ที่สกัดได้มาวัดความเข้มข้นและค่า A_{260}/A_{280} ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่วัดความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสายคู่
ด้วย IMPLEN NanoPhotometer® NP80 จากนั้นบันทึกค่าที่ได้ในผลการทดลอง ซึ่งค่า A_{260}/A_{280}
ที่บ่งบอกว่าดีเอ็นเอสายคู่บริสุทธิ์จะมีค่าอยู่ที่ 1.85 – 1.88 แต่ไม่ควรเกิน 2.1 (Koetsier and
Cantor, 2019)



ภาพที่ 3-4 ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่า A_{260}/A_{280} (กรอบสี่เหลี่ยมสีแดง)

3.4.2. การตรวจหาเชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *P. larvae* จะใช้วิธีการตรวจด้วยวิธี Multiplex Polymerase Chain Reaction (Multiplex PCR) โดยใช้ Primer สองคู่ โดย primer คู่แรกที่เป็นชุดควบคุมมีความจำเพาะกับ *cytochrome b* ของผึ้งในสกุล *Apis* คาดหวัง PCR product ขนาด 500 bp และ primer คู่ที่ 2 มีความจำเพาะกับ *16S rRNA* ของ *P. larvae* คาดหวัง PCR product ขนาด 700 bp โดยลำดับ sequence จะแสดงในตารางที่ 3-1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย Emerald Amp GT PCR master mix (cat. # RR310Q, Takara) 12.5 μ L, ดีเอ็นเอ 5 μ L (100 ng) (ยกเว้น negative control ที่ไม่ต้องใส่ดีเอ็นเอ), primer แต่ละชนิด (ความเข้มข้นของ primer แต่ละชนิดเท่ากับ 10 μ M) ชนิดละ 1 μ L และ d-H₂O เพื่อให้ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 μ L โดยภาวะการทำงานของปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นด้วย Denaturation step เริ่มต้นที่ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation step ที่ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที, Annealing step ที่ 45 °C เป็นเวลา 1 นาที, และ Extension step ที่ 64 °C เป็นเวลา 2 นาที, และ Extension step สุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที โดยเมื่อทำปฏิกิริยา PCR เสร็จแล้วจะตรวจหาผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้ 0.8% w/v agarose gel electrophoresis และส่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจหา nucleotide sequencing ต่อไป

ตารางที่ 3-1 Primers สำหรับตรวจหาโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน

	Primer name	Sequence (5'→3')	Type of Primer	Product size (bp)
Control	Cytb-F2	5'– TGATA AAAGA AATAT TTTGA – 3'	Forward	500
	Cytb-R2	5'– TGAAA CAAAT ATATA AATTG – 3'	Reverse	
AFB Detector	PL5-F1	5'– TCAGT TATAG GCCAG AAAGC –3'	Forward	700
	PL4-R1	5'– CGAGC GGACC TTGTG TTTCC –3'	Reverse	

บทที่ 4 ผลการศึกษา

จากการสำรวจต้นไม้ที่ผึ้งหลวงทำรังในพื้นที่จังหวัดสมุทรสงครามทั้งหมด 3 รัง ในช่วงเดือน
กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564 พบว่าผึ้งหลวงทำรังบนต้นไม้ต่างชนิดกัน ดังรายละเอียดในตาราง 4-1
ตารางที่ 4-1 ชนิดต้นไม้ที่ผึ้งหลวงทำรัง จากพื้นที่จังหวัดสมุทรสงคราม ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.
2564

Hive	Thai name	Scientific name
1	ต้นทองกลาง	<i>Erythrina variegata</i>
2	ต้นกระถินป่า	<i>Acacia</i> spp.
3	ต้นลำพู	<i>Sonneratia caseolaris</i>

4.1. การศึกษาไรในผึ้งหลวง

4.1.1. การศึกษาไรในผึ้งหลวงตัวเต็มวัย

จากการศึกษาไรที่พบในผึ้งหลวงตัวเต็มวัยทั้ง 3 รังพบว่า พบไรในผึ้งหลวงทั้งหมด 3 รัง ส่วน
ร้อยละของผึ้งตัวเต็มวัยที่มีไรเกาะ (prevalence) จากรังที่ 1, รังที่ 2 และรังที่ 3 เท่ากับ 32%, 20%
และ 30% ตามลำดับมีจำนวนไรที่พบในผึ้งตัวเต็มวัยในแต่ละรังดังที่แสดงในตาราง 4-2

ตารางที่ 4-2 ร้อยละของผึ้งตัวเต็มวัยที่พบไร (Prevalence) ในแต่ละรังและจำนวนไรที่พบในผึ้งตัว
เต็มวัยในแต่ละรัง

Hive	Total adult bee	Adults with mites	Prevalence (%)	Total mites found in adult bee
1	50	16	32	74
2	50	10	20	13
3	50	15	30	27

นอกจากนี้เป็นที่สังเกตว่าบริเวณที่พบไรในผึ้งหลวงทั้ง 3 รังส่วนใหญ่ จะพบในบริเวณขาคู่ที่
3 ซึ่งอยู่ในปล้องอก ดังที่แสดงในตารางที่ 4-3, ตารางที่ 4-4 และ ตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-3 ตำแหน่งของผึ้งที่พบไรในผึ้งตัวเต็มวัยรังที่ 1

ลำดับผึ้งตัวเต็มวัยที่พบไร	วรรณะ	ไรตัวที่	บริเวณที่พบ
1	ผึ้งงาน	1	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		2-3	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
2	ผึ้งงาน	5-8	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		9-14	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
3	ผึ้งงาน	15	ส่วนท้อง (ด้าน dorsal)
		16-21	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		22-23	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
4	ผึ้งงาน	24-27	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
5	ผึ้งงาน	28	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
6	ผึ้งงาน	29-33	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		34-37	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		38	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 2)
7	ผึ้งงาน	39-40	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
8	ผึ้งงาน	41-42	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
9	ผึ้งงาน	43-44	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
10	ผึ้งงาน	45-46	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
11	ผึ้งงาน	47-49	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		50-51	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
12	ผึ้งงาน	52-53	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
13	ผึ้งงาน	54-57	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		58-60	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
14	ผึ้งงาน	61-62	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		63-64	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
15	ผึ้งงาน	65-66	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		67-68	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
16	ผึ้งงาน	69-71	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)
		72-74	ส่วนนอก (ขาคู่ที่ 3)

ตารางที่ 4-4 ตำแหน่งของผึ่งที่พบไว้ในผึ่งตัวเต็มวัยรังที่ 2

ลำดับผึ่งตัว เต็มวัยที่พบไร	วรรณะ	ไรตัวที่	บริเวณที่พบ
1	ผึ่งงาน	1	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
2	ผึ่งงาน	2	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
3	ผึ่งงาน	3	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
4	ผึ่งงาน	4-5	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
5	ผึ่งงาน	6	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
6	ผึ่งงาน	7	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
7	ผึ่งงาน	8-9	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
		10	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
8	ผึ่งงาน	11	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
9	ผึ่งงาน	12	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)
10	ผึ่งงาน	13	ส่วนนอก (ขาคู่อี 3)

ตารางที่ 4-5 ตำแหน่งของผึ่งที่พบไว้ในผึ่งตัวเต็มวัยรังที่ 3

ลำดับผึ่งตัวเต็มวัยที่พบไร	วรรณะ	ไรตัวที่	บริเวณที่พบ
1	ผึ่งงาน	1	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
2	ผึ่งงาน	2	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
3	ผึ่งงาน	3	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
4	ผึ่งงาน	4-5	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
		6	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
5	ผึ่งงาน	7-8	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
6	ผึ่งงาน	9-11	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
7	ผึ่งงาน	12	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
		13-15	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
8	ผึ่งงาน	16	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
9	ผึ่งงาน	17	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
10	ผึ่งงาน	18	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
11	ผึ่งงาน	19-21	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
12	ผึ่งงาน	22-23	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
		24	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
13	ผึ่งงาน	25	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
14	ผึ่งงาน	26	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)
15	ผึ่งงาน	27	ส่วนนอก (ขาตู้ที่ 3)

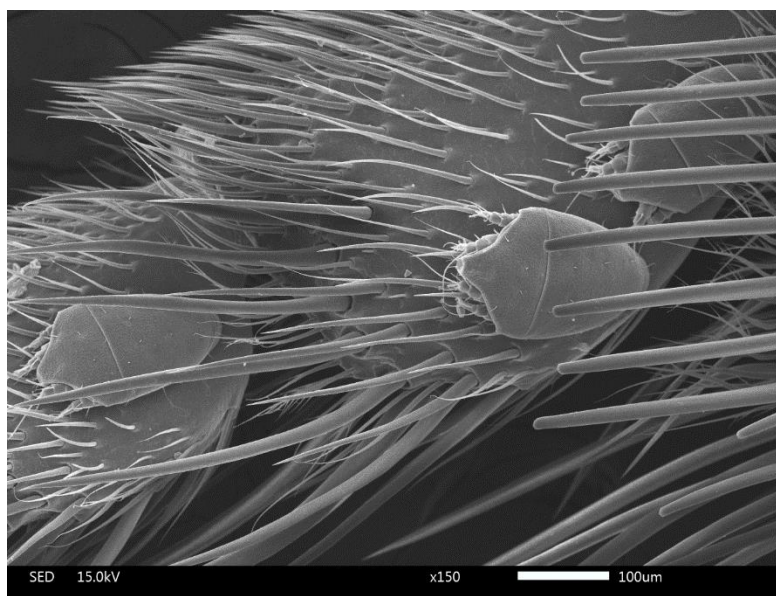
4.1.2. การศึกษาไรในรังผึ้งหลวง

เนื่องจากระยะเวลาในการดำเนินโครงการมีจำกัด จึงมีการศึกษาไรที่พบในรังผึ้งหลวงรังที่ 1 และ 2 เพียงบางส่วนเท่านั้น โดยพบว่าไม่พบไรในรังผึ้งหลวงเลย ดังแสดงในตารางที่ 4-6 ตารางที่ 4-6 ร้อยละของเซลล์ในรังผึ้งที่พบไร (Prevalence) ในแต่ละรังและจำนวนไรที่พบในเซลล์ในแต่ละรัง

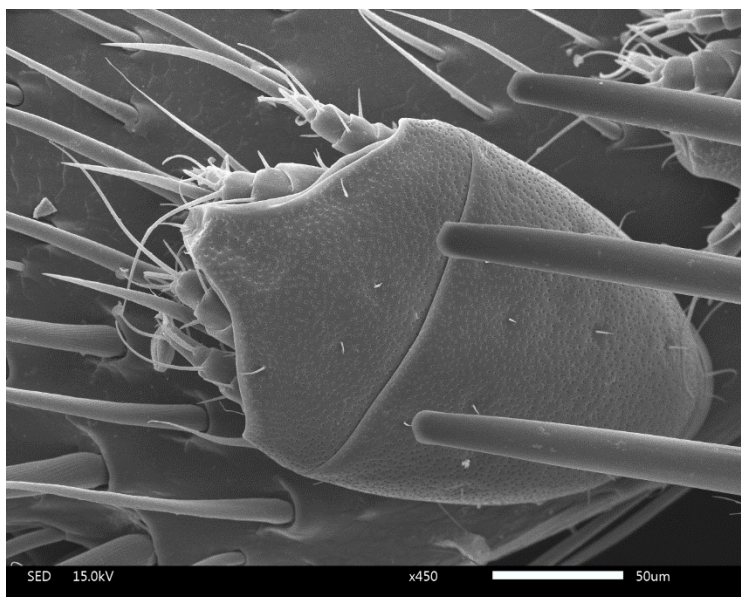
Hive	Number of each stage in cells				Cells with mites	Prevalence (%)
	Egg	Larva	Pupa	total		
1	5	25	20	50	0	0
2	-	6	5	11	0	0
3	-	-	-	0	-	-

4.2. การระบุชนิดของไร

จากการสังเกตด้วยกล้อง stereo microscope ไม่พบไรศัตรูผึ้ง แต่พบไรขนาดเล็กจำนวนมากที่บริเวณขาตู้ที่ 3 และเมื่อนำตัวอย่างขาผึ้งที่มีไรมาสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้อง scanning electron microscope ดังภาพที่ 4-1 และภาพที่ 4-2 และได้ขอคำปรึกษาในการระบุประเภทไรจาก ผศ.ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ และ อ.ดร.มารุต เพ็ญอวรณ์ ต่างให้คำตอบตรงกันว่า ไรที่พบที่ขาตู้ที่ 3 ของผึ้งงานของผึ้งหลวงตัวเต็มวัยเป็นไรชนิด Phoretic mite ซึ่งไม่ใช่ไรปรสิต



ภาพที่ 4-1 ไรที่เกาะบนขาตู้ที่ 3 ของผึ้งงานของผึ้งหลวงตัวเต็มวัย



ภาพที่ 4-2 ไรจากภาพที่ 4-1 ที่เกาะบนขาคนที่ 3 ของฝัองงานของฝัองหลวงตัวเต็มวัย

4.3.การประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน

4.3.1. ค่าความเข้มข้นและค่า A_{260}/A_{280} ของดีเอ็นเอสายคู่

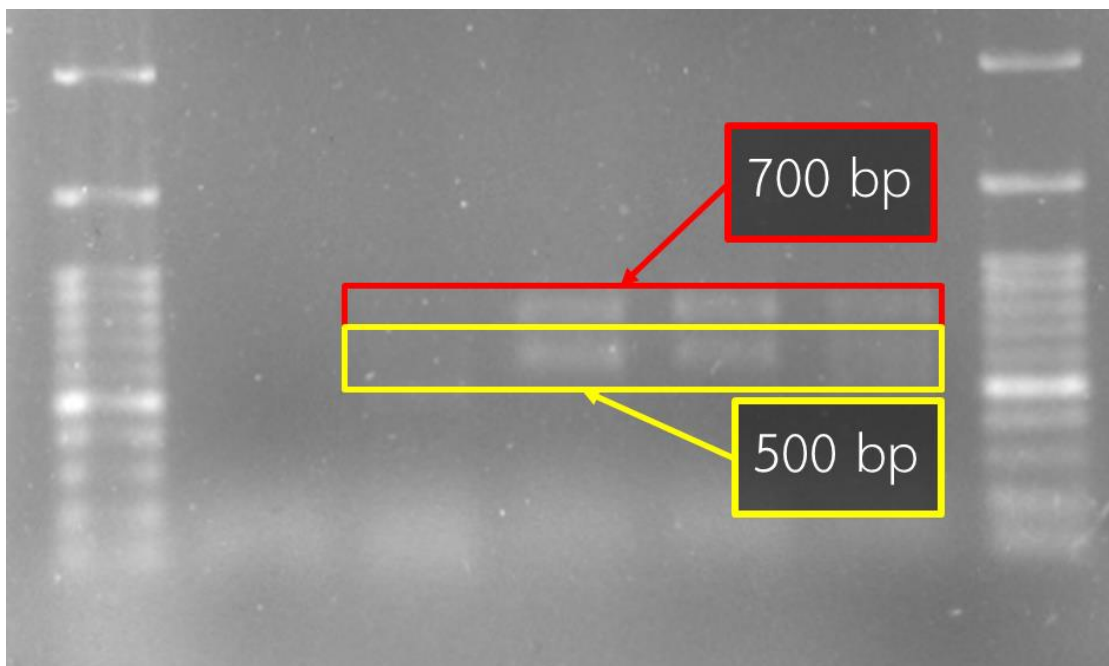
หลังจากที่สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างขาฝัองที่มีไรโดยสกัดเป็น pool sample และตรวจหาค่าความเข้มข้นและค่า A_{260}/A_{280} ของดีเอ็นเอสายคู่ดังตารางที่ 4-7 พบว่าค่า A_{260}/A_{280} ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 1.83 – 1.89 และมีค่าไม่เกิน 2.1 ซึ่งสามารถบอกได้ว่า ดีเอ็นเอสายคู่ที่สกัดได้มีความสะอาดมากพอที่จะนำมาทำปฏิกิริยา PCR

ตารางที่ 4-7 ค่าความเข้มข้นและค่า A_{260}/A_{280} ของดีเอ็นเอสายคู่ของขาฝัองที่มีไรเกาะอยู่

สกัดรอบที่	ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/ μ l)	ค่า A_{260}/A_{280}
1	รังที่ 1 ฝัองตัวที่ 4	1.4500	1.611
	รังที่ 1 ฝัองตัวที่ 6	13.6000	2.015
	รังที่ 2	8.4000	2.049
	รังที่ 3 ฝัองตัวที่ 9 – 15	6.0500	1.833
2	รังที่ 1 ฝัองตัวที่ 1,3 และ 5	21.6000	2.000
	รังที่ 1 ฝัองที่ 7 – 16	37.4000	1.861
	รังที่ 2	18.2000	1.857
	รังที่ 3 ตัวที่ 1 – 8	37.5000	1.889

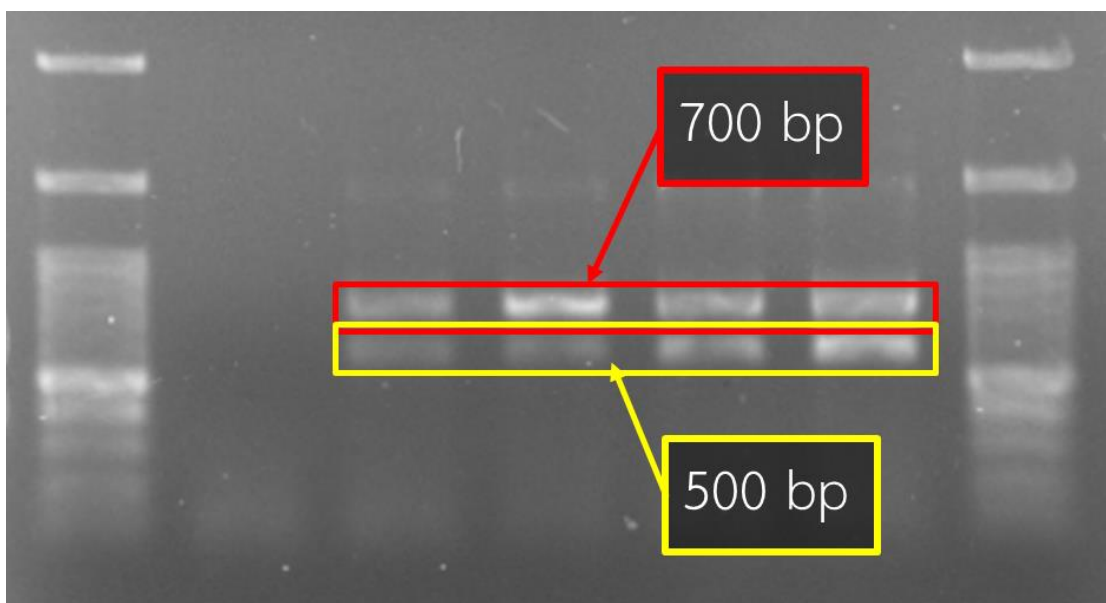
4.3.2. การตรวจหาเชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน

หลังจากสกัดดีเอ็นเอของขาผึ้งที่มีไรแล้ว จึงทำ Agarose gel electrophoresis โดยการรันเจลครั้งแรกซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอจากรังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 4, รังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 6, รังที่ 2 และ รังที่ 3 ผึ้งตัวที่ 9 – 15 โดยพบว่า ไม่พบแถบ PCR product ของดีเอ็นเอจากรังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 4 ดังภาพที่ 4-3 ทางผู้วิจัยจึงตัดสินใจรันเจลจากดีเอ็นเอชุดนี้ใหม่



ภาพที่ 4-3 Agarose gel electrophoresis ครั้งแรก โดยแถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder; แถวที่ 2 คือ negative control; แถวที่ 3 คือ รังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 4; แถวที่ 4 คือ รังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 6; แถวที่ 5 คือ รังที่ 2; แถวที่ 6 คือ รังที่ 3 ผึ้งตัวที่ 9-15; แถวที่ 7 คือ 100 bp DNA ladder ขนาดของ PCR product ถูกแสดงด้วยลูกศร

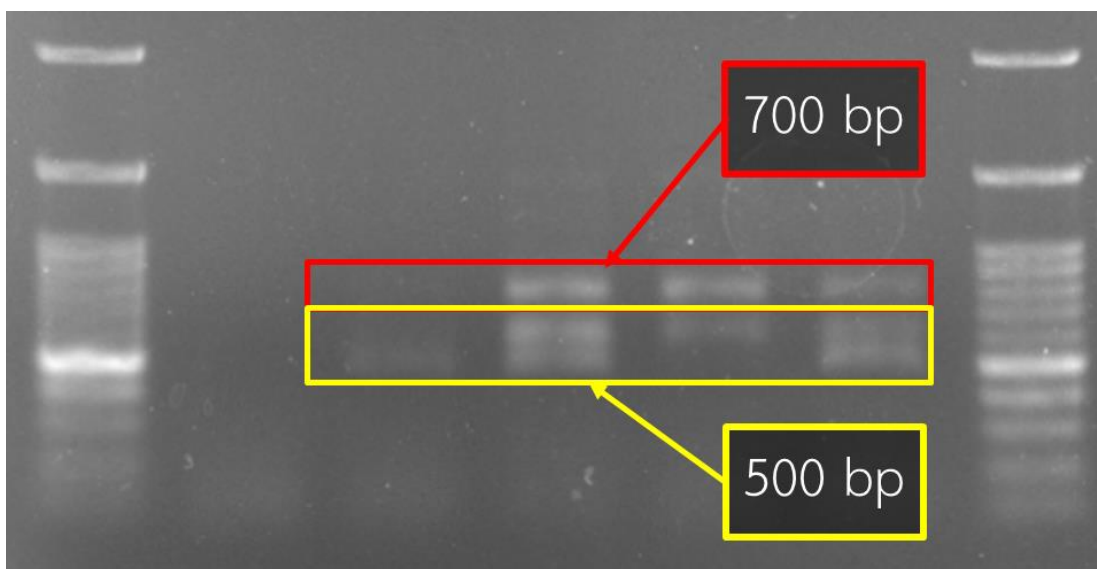
หลังจากทำ Agarose gel electrophoresis โดยการรันเจลครั้งที่สองโดยใช้ pool sample เดียวกับกับภาพที่ 4-3 โดยพบว่า พบแถบ PCR product ที่ 500 bp ของ primer ชุดควบคุม และ พบ PCR product ที่ 700 bp ของ primer ชุดตรวจหาเชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันในทุกตัวอย่าง ดังภาพที่ 4-4 ซึ่งสามารถบอกได้ว่าในตัวอย่างไรที่พบนั้น อาจมีเชื้อ *P. larvae* ที่ก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันอยู่



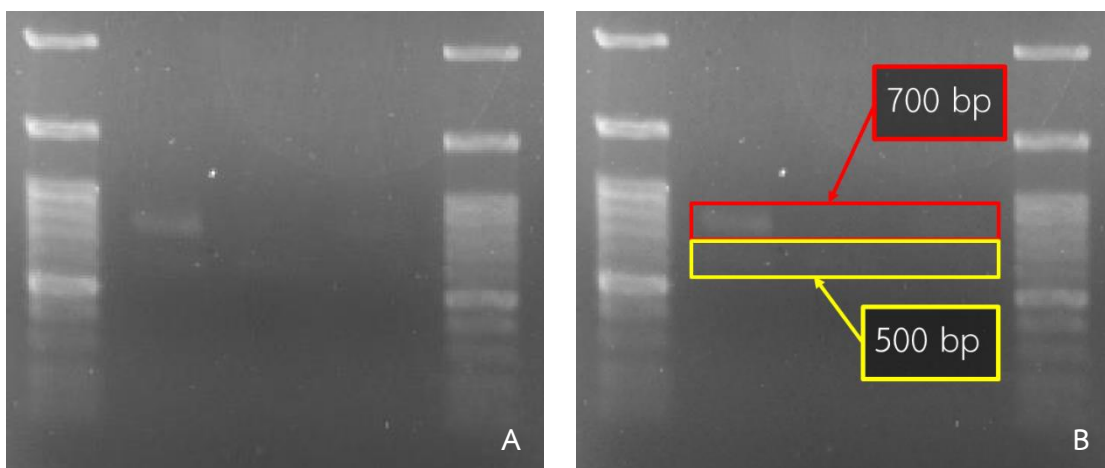
ภาพที่ 4-4 Agarose gel electrophoresis ครั้งที่ 2 (Pool sample ที่ใช้ เป็น Pool sample เดียวกันกับภาพที่ 4-3) โดยแถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder; แถวที่ 2 คือ negative control; แถวที่ 3 คือ รังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 4; แถวที่ 4 คือ รังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 6; แถวที่ 5 คือ รังที่ 2; แถวที่ 6 คือรังที่ 3 ผึ้งตัวที่ 9-15; แถวที่ 7 คือ 100 bp DNA ladder ขนาดของ PCR product ถูกแสดงด้วยลูกศร

หลังจากนั้นจึงทำ Agarose gel electrophoresis โดยการรันเจลครั้งที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอจากรังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 1,3 และ 5, รังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 7 – 16, รังที่ 2 และ รังที่ 3 ผึ้งตัวที่ 1 – 8 โดยพบว่า มี PCR product ที่ 500 bp ของ primer ชุดควบคุมในทุกตัวอย่าง และมีเพียงตัวอย่าง ดีเอ็นเอจากรังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 1,3 และ 5 เท่านั้นที่ไม่พบ PCR product ที่ 700 bp ของ primer ชุด ตรวจสอบเชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน นั่นหมายถึงมีเพียงตัวอย่างจากรังที่ 1 ผึ้งตัวที่ 1,3 และ 5 เท่านั้น ที่ไม่มี *P. larvae* ส่วนตัวอย่างอื่น อาจมีเชื้อ *P. larvae* นั่นเอง

ต่อมา ทางผู้วิจัยได้แยก PCR product ของ primer ชุดควบคุมในทุกตัวอย่าง และของ primer ชุดตรวจหาเชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันออกจาก 0.8% w/v Agarose gel ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit เพื่อส่งตัวอย่าง PCR product ไปหา Nucleotide sequence โดยหลังจาก สกัด PCR product ของ primer ทั้งสองชนิดออกจากเจลแล้ว ได้มีการทำ Agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่า PCR product ที่สกัดออกจากเจลมีความบริสุทธิ์มากพอที่จะ ส่งไปหา Nucleotide sequence หรือไม่ จากภาพที่ 4-6 พบว่ามีเพียงแถวที่ 3 และแถวที่ 4 ที่ สามารถส่งไปหา Nucleotide sequence ได้ ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณของ PCR product ที่สกัดออก จากเจลได้น้อย เนื่องจากแถวที่ 2 มี PCR product ที่ 500 bp ปนอยู่ใน PCR product ที่ 700 bp จึงไม่สามารถส่งไปหา Nucleotide sequence ได้



ภาพที่ 4-5 Agarose gel electrophoresis ครั้งที่ 3 (Pool sample ที่ใช้ เป็น Pool sample ที่ต่างจากภาพที่ 4-2 และภาพที่ 4-3) โดยแถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder; แถวที่ 2 คือ negative control; แถวที่ 3 คือ รังที่ 1 ผึ่งตัวที่ 1,3 และ 5; แถวที่ 4 คือ รังที่ 1 ผึ่งตัวที่ 7 – 16; แถวที่ 5 คือ รังที่ 2; แถวที่ 6 คือรังที่ 3 ผึ่งตัวที่ 1-8; แถวที่ 7 คือ 100 bp DNA ladder ขนาดของ PCR product ถูกแสดงด้วยลูกศร



ภาพที่ 4-6 Agarose gel electrophoresis ครั้งที่ 4 เพื่อส่งตัวอย่างไปหา Nucleotide sequencing โดยแถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder; แถวที่ 2 คือ 700 bp product จากภาพที่ 4-3; แถวที่ 3 คือ 500 bp product จากภาพที่ 4-3; แถวที่ 4 คือ 700 bp product จากภาพที่ 4-4; แถวที่ 5 คือ 100 bp DNA ladder (A) ขนาดของ PCR product ถูกแสดงด้วยลูกศร (B)

บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

จากการทดลองในส่วนการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *P. larvae* ด้วยวิธี Multiplex PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะกับ *16S rRNA* เพราะว่ายีนนี้มีการเปลี่ยนแปลงลำดับ sequence ที่น้อยมากในการวิวัฒนาการของแบคทีเรีย และสามารถพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด (Govan et al., 1999) ส่วนสาเหตุที่ใช้ Primer ที่เป็นชุดควบคุมที่จำเพาะกับ *cytochrome b* ของผึ้งในสกุล *Apis* เพราะว่าทางผู้วิจัยไม่มี positive control ในที่นี้คือตัวอย่างตัวอ่อนและเซลล์ในรังผึ้งที่มีเชื้อแบคทีเรีย *P. larvae* นอกจากนี้เมื่อตัวอ่อนของผึ้งมีอายุมากขึ้น ผนังทางเดินอาหาร peritrophic membrane จะหนาขึ้น (Davidson, 1973) ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถผ่านทะลุเข้าไปสู่เซลล์ของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut cell) ได้โดยง่าย จึงมีความเป็นไปได้ที่พบแบคทีเรียก่อโรคได้น้อยมากในผึ้งตัวเต็มวัย

จากการใช้ Multiplex PCR เพื่อหาเชื้อแบคทีเรีย *P. larvae* ในผึ้งหลวง พบว่าตัวอย่างไร Phoretic mite ในตัวอย่างผึ้งหลวงอาจมีแบคทีเรีย *P. larvae* ได้ โดยมีความเป็นไปได้ว่า Phoretic mite อาจมีการเปลี่ยนชนิดของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (host) จากผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ไปยังผึ้งหลวง (*A. dorsata*) ผ่านดอกไม้ดอกเดียวกัน โดยตัวอย่างของดอกไม้ที่เป็นแหล่งอาหารของผึ้งสกุล *Apis* มากกว่า 1 สปีชีส์ คือดอกสาละลังกา หรือ Cannonball tree (*Couroupita guianensis* Aubl.) ดังภาพที่ 5-1 โดย Ormond และคณะ (1981) พบว่าบางครั้งผึ้งพันธุ์อาจทำหน้าที่เป็นแมลงผสมเกสร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีผึ้งจำนวนมากมาที่ดอกไม้ชนิดนี้ดอกเดียวกันในเวลาพร้อม ๆ กัน นอกจากนี้ Pyramarn และ Wongsiri (1986) ได้ศึกษาว่าดอกไม้ชนิดนี้เป็นไม้ประดับที่เป็นแหล่งอาหารของผึ้งสกุล *Apis* เช่นกัน



ภาพที่ 5-1 ดอกสาละลังกา หรือ Cannonball tree ที่มีผึ้งสกุล *Apis* กำลังเก็บเกสรที่เป็นแหล่งอาหารของผึ้งสกุลนี้ (ถ่ายภาพโดย อาภาศิริ นพรัตน์)

ในส่วนของไรที่พบที่ขาคู่ที่สามของตัวอย่างฝัองงานตัวเต็มวัยของฝัองหลวง พบว่าเป็น phoretic mite จากข้อมูลจาก อ.ดร.มารุต เพื่องอาวรณ์ ทำให้ทราบว่าไร phoretic mite ที่พบในตัวอย่างฝัองหลวงนั้นเป็นไรในกลุ่ม Astigmata mite ในระยะ Deutonymph เนื่องจากพบ attachment organ ซึ่งเป็นอวัยวะพิเศษที่ช่วยให้ไรเกาะกับสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านเพื่อแพร่พันธุ์ในสถานที่อื่นได้ดังภาพที่ 5-2 นอกจากนี้ Warrit และ Lekprayoon (2011) ได้ศึกษาว่าไรในกลุ่ม Astigmata mite จะกินอินทรีย์วัตถุที่กำลังย่อยสลาย และกินเศษซากที่ติดเชื้อราในรังฝัอง, ซากฝัองที่ตายแล้วรวมทั้งกินเกสรเป็นอาหาร (kleptophages) เป็นบางครั้งอีกด้วย



ภาพที่ 5-2 Phoretic mite ที่ถ่ายได้จาก Compound microscope ซึ่งสามารถเห็น Attachment organ (วงกลมสีแดง) ที่ด้าน Ventral ชัดเจน

แต่อย่างไรก็ดี ก็ยังสรุปไม่ได้แน่ชัดว่า ไรที่พบนั้น สามารถเป็นพาหะนำแบคทีเรียก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันได้จริง ๆ เนื่องจากยังไม่ได้ผลของ Nucleotide sequence อันเนื่องมาจากระยะเวลาดำเนินโครงการที่จำกัด ซึ่งจะสามารถยืนยันได้แน่ชัดว่าไรที่พบนั้น สามารถเป็นพาหะนำแบคทีเรียก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันได้หรือไม่

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาไรในฝั้งหลวงตัวเต็มวัยและในรังฝั้งหลวง พบว่าพบไรขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก บริเวณขาคู่ที่ 3 ในตัวอย่างฝั้งงานตัวเต็มวัยของฝั้งหลวง ส่วนร้อยละของฝั้งตัวเต็มวัยที่มีไรเกาะ (prevalence) จากรังที่ 1, รังที่ 2 และรังที่ 3 เท่ากับ 32%, 20% และ 30% ตามลำดับ แต่กลับไม่พบไรในระยะไข่, ตัวอ่อน และดักแด้ และเมื่อสังเกตลักษณะทางสั้ณฐานวิทยาด้วยกล้อง Compound microscope และ Scanning electron microscope พบว่าไรที่พบเป็น Phoretic mite

จากการประเมินความเป็นพาหะนำโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา พบว่าในตัวอย่าง Phoretic mite จากฝั้งหลวงทั้ง 3 รังอาจพบแบคทีเรีย *P. larvae* ซึ่งยังไม่ได้ผลของ Nucleotide sequencing อันเนื่องมาจากระยะเวลาดำเนินโครงการที่จำกัด จึงไม่สามารถยืนยันได้แน่ชัดว่า Phoretic mite สามารถเป็นพาหะของแบคทีเรีย *P. larvae* ที่ก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกันได้หรือไม่

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

จากข้อมูลที่ได้ในโครงการนี้สามารถนำไปศึกษาต่อในเรื่องปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย, ไร Phoretic mite และฝั้งหลวง ซึ่งจะนำไปสู่การควบคุมโรคในฝั้งต่อไป

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

ในโครงการนี้ยังศึกษาในส่วนของการศึกษาไรในฝั้งระยะไข่, ตัวอ่อน และดักแด้ยังไม่ครบถ้วน และไม่มีการศึกษาข้อมูลที่ได้จาก Nucleotide sequencing จึงต้องการให้มีการศึกษาในสองเรื่องนี้อธิบายข้างต้นในอนาคตด้วย

เอกสารอ้างอิง

- ปิยมาศ นานอก และ สุรรัตน์ เตียววณิชย์. 2555. บทที่ 3 ชีวิตและสังคมของผึ้ง. ใน สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และ สุรรัตน์ เตียววณิชย์, ชีววิทยาของผึ้ง, หน้า 37-53. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ภาณุวรรณ จันทวรรณกร. 2555. บทที่ 10 โรคของผึ้ง. ใน สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และ สุรรัตน์ เตียววณิชย์, ชีววิทยาของผึ้ง, หน้า 37-53. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2555. บทที่ 1 บทนำ. ใน สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และ สุรรัตน์ เตียววณิชย์, ชีววิทยาของผึ้ง, หน้า 1-14. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Bamrick, J.F. and Rothenbuhler, W.C. 1961. Resistance to American foulbrood in honey bees IV. The relationship between larval age at inoculation and mortality in a resistant and in a susceptible line. Journal of Insect Pathology. 3(4), 381-390.
- Chantawannakul, P., Ward, L., Boonham, N. and Brown, M. (2006). A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in Varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. Journal of invertebrate pathology. 91: 69-73.
- Chen, Y. W., Wang, C. H., An, J., and Kai-Kuang, H. (2000). Susceptibility of the Asian honey bee, *Apis cerana*, to American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae*. Journal of Apicultural Research. 39: 169-175.
- D'Alessandro, B., Antunez, K., Piccini, C. and Zunino, P. 2007. DNA extraction and PCR detection of *Paenibacillus larvae* spores from naturally contaminated honey and bees using spore-decoating and freeze-thawing techniques. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 593-597.
- Davidson, E. W. 1973. Ultrastructure of American foulbrood disease pathogenesis in larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology. 21: 53-61.
- Govan, V.A., Allsopp, M.H. and Davison, S. 1999. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. Applied and Environmental Microbiology. 65: 2243-2245.

- Gupta, R.K. 2014. Taxonomy and distribution of different honeybee species. In: Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security, pp. 63-103. Springer: Dordrecht.
- Hansen, H. and Brødsgaard, C.J. 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. Bee world. 80: 5-23.
- Haseman, L. 1961. How long can spores of American foulbrood live?. American Bee Journal. 101: 298–299.
- Koeniger, N., Koeniger, G. and Delfinado-Baker, M. (1983). Observations on mites of the Asian honeybee species (*Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*). Apidologie. 14: 197-204.
- Koeniger, G., Koeniger, N., Anderson, D.L., Lekprayoon, C. and Tingek, S. 2002. Mites from debris and sealed brood cells of *Apis dorsata* colonies in Sabah (Borneo) Malaysia, including a new haplotype of *Varroa jacobsoni*. Apidologie. 33: 15-24.
- Koetsier, G., & Cantor, E. 2019. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. New England Biolabs Inc. Available from: https://www.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?rev=a26a5aefff694df3aff399856b360536&hash=AFC97A276589191BA435B6CF40DD40AE#:~:text=In%20buffered%20solutions%2C%20pure%20dsDNA,a%20ratio%20of%20around%202.1.&text=The%20A260%2FA230%20is%20a,that%20absorb%20at%20230%20nm[28 February 2021]
- Moharrami, M., Modirrousta, H. and Moeinfar, N. 2011. Detection of *Paenibacillus* larvae larvae spores in honey and diseased larvae samples by culture and PCR. Archives of Razi Institute. 66: 101-107.
- Niem, N.V. and Trung, L.Q. 1999. Morphological comparison of three Asian native honey bees (*Apis cerana*, *A. dorsata*, *A. florea*) in northern Vietnam and Thailand. Biotropia. 14: 10-16.

- Ormond, W.T., Pinheiro, M.C.B. and De Castells, A.R.C. 1981. A contribution to the floral biology and reproductive system of *Couroupita guianensis* Aubl. (Lecythidaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden. 68: 514-523.
- Petersen S. and Shankar Reddy M. 2016. Requirements for Sustainable Management of *Apis dorsata* Fab. with Rafter Method. In: Chakravarthy A., Sridhara S. (Eds) Arthropod Diversity and Conservation in the Tropics and Sub-tropics. pp. 383-396. Singapore: Springer.
- Piccini, C., D'alessandro, B., Antunez, K. and Zunino, P. 2002. Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies larvae spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18: 761-765.
- Pyramarn, K. and Wongsiri, S. 1986. Bee flora for four species of *Apis* in Thailand. Journal Science Research Chulalongkorn University. 11: 95-103.
- Ramachandra, T.V., Subash Chandran, M.D., Joshi, N.V. and Balachandran, C. 2012. Beekeeping: Sustainable Livelihood Option in Uttara Kannada, Central Western Ghats. Environmental Information System [ENVIS] Technical Report. 1-149.
- Rattanawanee, A., Chanchao, C., Lim, J., Wongsiri, S. and Oldroyd, B.P. 2013. Genetic structure of a giant honey bee (*Apis dorsata*) population in northern Thailand: implications for conservation. Insect Conservation and Diversity. 6: 38-44.
- Suppasat, T. and Wongsiri, S. 2018. Morphometric and Genetic Variation of Tropilaelaps Mites Infesting *Apis dorsata* and *A. mellifera* in Thailand. Journal of Apiculture. 33: 227-237.
- Suppasat, T., Smith, D. R., Deowanish, S. and Wongsiri, S. 2007. Matrilineal origins of *Apis mellifera* in Thailand. Apidologie. 38: 323-334.
- Warrit, N., & Lekprayoon, C. 2011. Asian honeybee mites. In: Honeybees of Asia. pp. 347-368. Springer: Berlin, Heidelberg.
- Woodrow, A. W. and Holst, E. C. 1942. The mechanism of colony resistance to American foulbrood. Journal of Economic Entomology. 35: 327-330.