



รายงานการวิจัย  
ประจำปีงบประมาณ 2561

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี  
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

(ภาษาไทย) ความหลากหลายของแบคทีเรีย *Melissococcus plutonius* ที่ก่อโรคตัว  
อ่อนเน่ายุโรป (European foulbrood disease) ในผึ้ง

(ภาษาอังกฤษ) Diversity of *Melissococcus plutonius* bacteria causing  
European foulbrood disease in bees

คณะผู้วิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่แล้วเสร็จ

พุทธศักราช 2561

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2561 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี รวมทั้ง หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ และศูนย์เครือข่ายการเรียนรู้เพื่อภูมิภาค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา และหน่วยยานพาหนะและซ่อมบำรุง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

## บทคัดย่อ

*Melissococcus plutonius* เป็นแบคทีเรียก่อโรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียนในตัวอ่อนของผึ้ง เมื่อเร็ว ๆ นี้ พบว่าสามารถจัดจำแนกโฮเซเลตของ *M. plutonius* ออกได้เป็น 2 ชนิด คือ typical *M. plutonius* และ atypical *M. plutonius* โดยทั้ง 2 โฮเซเลตมีลักษณะที่ต่างกันอย่างเห็นได้ชัดทั้งทางด้าน phenotype และพันธุกรรม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 โฮเซเลตควรมีกลไกในการก่อโรคที่ต่างกันและส่งผลกระทบต่ออาการเลี้ยงผึ้งที่แตกต่างกัน ในประเทศไทย โรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียนส่งผลกระทบเป็นอย่างมากต่อฟาร์มผึ้งทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการกระจายตัวของ *M. plutonius* โดยเริ่มเก็บตัวอย่างผึ้งโพรง (*Apis cerana*), ผึ้งมิม (*A. florea*) และผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) จากการใช้เทคนิคต่าง ๆ ทางจุลชีววิทยาและ PCR พบว่ามีการปนเปื้อนของ *M. plutonius* ในผึ้งตัวเต็มวัยโดยที่ผึ้งไม่ได้แสดงอาการของโรคเลย ต่อจากนั้นจึงได้ทำการตรวจสอบ sequence types (STs) แต่ละโฮเซเลตที่ได้ด้วยการทำ multilocus sequence typing (MLST)

**คำสำคัญ:** โรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียน การตรวจวินิจฉัยโรค ผึ้ง, multilocus sequence typing, เชื้อก่อโรค

### Abstract

*Melissococcus plutonius* is a widespread bacterial pathogen causing European foulbrood (EFB) disease of honeybee larvae. Recently, *M. plutonius* isolates were separated into two types, typical and atypical *M. plutonius*, which have different phenotypic and genetic characterization. These could be implied that typical and atypical *M. plutonius* could have differences in pathogenic mechanisms and various effects on apiculture. In Thailand, EFB can cause extensive losses in both amateur and commercial apiaries. In this study, the native Asian honeybees (*Apis cerana*, *A. florea* and *A. mellifera*) were randomly collected in Thailand. With rapid and feasible technique, we were identified *M. plutonius* from adult bees without clinical symptoms by PCR assays and determined sequence types (STs) of each isolated *M. plutonius* using the multilocus sequence typing (MLST).

**Keywords:** European foulbrood disease, diagnosis, honeybee, multilocus sequence typing, pathogen

## สารบัญ

	หน้า
หน้าปกรายงาน	1
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญรูป	7
บทนำ	8
วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
ขอบเขตการวิจัย	9
วิธีดำเนินการวิจัย	9
ผลและอภิปรายผลการศึกษา	12
สรุปผลการศึกษา	16
ข้อเสนอแนะ	16
เอกสารอ้างอิง	17
ประวัติคณะวิจัย	19

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลของลำดับเบสของยีน *argE*, *gbpB* และ *purr*

หน้า  
16

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1	12
รูปที่ 2	13
รูปที่ 3	14
รูปที่ 4	15

## บทนำ

โรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียนจัดเป็นโรคหนึ่งที่สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งเป็นอย่างมาก เกิดจากแบคทีเรีย *Melissococcus plutonius* โดยมีผลกระทบโดยตรงต่อตัวอ่อนของผึ้ง, *M. plutonius* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะกลม (coccus) ไม่สร้างสปอร์ เติบโตในที่ที่มีออกซิเจนต่ำ หรือไม่มีออกซิเจนเลย (Budge et al., 2014; Forsgren, 2010; Mckee et al., 2003) คาร์บอนไดออกไซด์ และโพแทสเซียมฟอสเฟตจัดเป็นสารประกอบที่สำคัญต่อการเติบโตของ *M. plutonius* (Forsgren et al., 2013) ตัวอ่อนผึ้งได้รับหรือติดแบคทีเรียชนิดนี้จากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของ *M. plutonius*, โดยแบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้ดีในทางเดินอาหารส่วนกลางของตัวอ่อนผึ้ง ๆ ที่ติดเชื้อ โดยทั่วไปจะตายเมื่อมีอายุ 4-5 วันก่อนที่เซลล์จะปิด ตัวอ่อนผึ้งที่ตายมีลักษณะบิดงอ คล้ายเกลียว มีสีเปลี่ยนจากขาวเป็นเหลือง แล้วกลายเป็นสีน้ำตาล ในที่สุดก็จะเน่าสลายอยู่ที่กันเซลล์ ส่งกลิ่นเหม็น (Forsgren, 2010)

ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า *M. plutonius* เป็น homogeneous species, แต่ต่อมามีรายงานว่า *M. plutonius* สามารถถูกแบ่งออกเป็น typical isolate และ atypical isolate โดยมีลักษณะที่แตกต่างทาง phenotype และพันธุกรรม ลักษณะแตกต่างที่เด่นชัด คือ atypical isolate ไม่ต้องการโพแทสเซียมฟอสเฟตในการเติบโต (Arai et al., 2012) มีการทดลองก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่า atypical isolate สามารถเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมฟอสเฟตในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนและในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโพแทสเซียมในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (Takamatsu et al., 2013) ยิ่งไปกว่านี้ยังพบว่า typical isolate จะสูญเสียความรุนแรงในการก่อโรคลงเรื่อย ๆ เมื่อ subculture ไปเรื่อย ๆ ในขณะที่ atypical isolate สามารถรักษาความสามารถในการก่อโรคได้เหมือนเดิม ถึงแม้ว่าจะมีการ subculture ไปเรื่อย ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า typical isolate และ atypical isolate มีกลไกในการก่อโรคที่ต่างกัน (Haynes et al., 2013)

ปัจจุบันได้ประสบผลสำเร็จในการพัฒนา Multi-locus Sequence Typing (MLST) จนสามารถนำมาใช้แยก sequence types (STs) ของ *M. plutonius* isolate ได้เป็นอย่างดี ยีนที่นิยมเลือกนำมาศึกษาในงาน MLST คือ ยีน acetylornithine deacetylase (*argE*), galactokinase (*galK*), secreted antigen (*gbpB*) และ purine operon repressor (*purP*) โดยเทคนิคนี้ก็ยังคงอาศัยพื้นฐานของการทำ PCR และการหาลำดับเบสอยู่ (Takamatsu et al., 2014) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษา MLST เพิ่มเติมใน *M. plutonius* isolate ที่แยกได้จากผึ้งในประเทศไทย

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อสนองพระราชดำริ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)
2. เพื่อตรวจสอบ strain ของ *M. plutonius* ทั้งที่เป็น native strain และ atypical strain ที่พบในผึ้ง
- 3 เพื่อตรวจสอบลักษณะที่เฉพาะทาง phenotype และ genotype ของ native *M. plutonius* strain



## ขอบเขตการวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างผึ้งทุกสปีชีส์ นำมาสกัด DNA แล้วทำการ Screen หาตัวอย่างผึ้งที่มีเชื้อ *M. plutonius* โดยใช้ Real-time PCR หลังจากนั้นทำการคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อ *M. plutonius* จากตัวอย่างผึ้งที่มีเชื้อ ทำการจัด Type ของ *M. plutonius* ที่แยกได้โดย Duplex PCR ท้ายสุดทำการตรวจสอบลักษณะที่เฉพาะของ *M. plutonius*

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บผึ้งทั้งหมด 73 รังจาก 11 ฟาร์มผึ้งที่อยู่ตามบริเวณต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย โดยเลือกเก็บแบบสุ่ม ในแต่ละรังทำการเก็บผึ้งจำนวน 30 ตัว โดยเก็บในน้ำแข็งแห้งระหว่างอยู่ในภาคนาม แล้วย้ายมาเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ในห้องปฏิบัติการ

### การเพาะเชื้อและการสกัด DNA

ในแต่ละรัง เลือกใช้ผึ้ง 5 ตัวมาทำให้ปลอดเชื้อด้านนอกตัวโดยใช้ 70% (v/v) ethanol แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำการผ่าส่วนท้อง ย้ายเอาทางเดินอาหารของผึ้งออกมา แล้วทำการบด homogenized ด้วย 500 ml phosphate buffered saline (PBS) หลังจากนั้นทำการแบ่ง lysate ที่ได้ ออกเป็น 2 ส่วน (ส่วนที่ I และ II)

ส่วนที่ I: นำ lysate มา centrifuged ที่ 13,000 rpm, อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นทำการเก็บส่วน pellet มาทำการสกัด DNA โดยใช้ QIAamp DNA mini kit (cat. # 51304, Qiagen) ค่าความเข้มข้นของ DNA จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และหาความบริสุทธิ์ของ DNA โดยพิจารณาจากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้โดยใช้ 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis, เก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$

### การตรวจคัดกรอง *M. plutonius* เบื้องต้นโดย real-time PCR

เพื่อค้นหาผึ้งที่มีการปนเปื้อนของ *M. plutonius* จึงทำการตรวจหา DNA ของแบคทีเรีย โดยเน้นที่ยีน *sodA* ของ *M. plutonius*, อ้างอิงจากงานของ Roetschi et al. (2008) จึงทำการ amplifications โดยใช้ QIAGEN QuantiTect SYBR Green PCR kit (cat. # 204141, Qiagen) และ real-time PCR (LightCycler® 2.0 Instrument, Roche), ใน reaction mixture ที่มีปริมาตรสุดท้าย 20  $\mu\text{l}$  ประกอบด้วย 10  $\mu\text{l}$  ของ reaction buffer (2X), 0.1  $\mu\text{M}$  ของ probe (5' FAM-CTTGGTTGGTCGTTGACMBHQ1 3'), 0.3  $\mu\text{M}$  ของแต่ละ primer (forward primer หรือ Mp-sodA-F 5' CAGCTAGTCGTTTGGTTCC 3' และ reverse primer หรือ Mp-sodA-R 5' TTGGCTGTAGATAGAATTGACAAT 3') และ 10 ng DNA, โดยมี PCR thermocycling ดังนี้  $50^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 นาที และ  $95^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย 40 รอบของ  $95^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 วินาที, และ  $60^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 นาที โดยมี DNA มาตรฐานของ typical *M. plutonius* และ atypical *M. plutonius* จาก Dr. Daisuke Takamatsu มาใช้เป็นตัวควบคุม และใช้ปฏิกิริยาที่ไม่มี DNA เลย เป็น negative control

ส่วนที่ II: นำ lysate ปริมาณเล็กน้อยจากฝั้งที่ถูกคัดกรอง *M. plutonius* เบื้องต้น โดย qPCR แล้ว ให้ผลเป็นบวก มาทำการ streaked ลงบน KSBHI agar plate (10 g/l agar, 5 g/l soluble starch, 20.4 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> และ 37 g/l Brain Heart Infusion) โดยมี 3 µg/ml nalidixic acid แล้วทำการบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน ในภาวะไร้ออกซิเจน หลังจากนั้น 3 วัน จะสังเกตเห็นโคโลนีของแบคทีเรีย, โคโลนีของ *M. plutonius* จะมีสีขาว ผิวเรียบ กลม ทั้งนี้ atypical strains จะเติบโตได้เร็วกว่าและฟอร์มโคโลนีที่มีขนาดใหญ่กว่า typical strains, โคโลนีที่คาดว่าเป็่น *M. plutonius* จะถูก subcultured ลงบน KSBHI agar แล้วทำการบ่มต่อไปที่ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน ในภาวะไร้ออกซิเจน ทำการย้อมสี Gram เพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำการแยกแบคทีเรียเป้าหมายลงเลี้ยงใน KSBHI media แล้วทำการบ่มต่อไปที่ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน ในภาวะไร้ออกซิเจน หลังจากนั้น ทำการสกัด genomic DNA ของแบคทีเรียโดยใช้ QIAamp DNA mini kit (cat. # 51304, Qiagen) คำนวณความเข้มข้นของ DNA จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และหาความบริสุทธิ์ของ DNA โดยพิจารณาจากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้โดยใช้ 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis, เก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ไว้ที่ -20 °C

#### *M. plutonius* - specific PCR

ทำการเพิ่มปริมาณของ DNA ที่สกัดได้จาก *M. plutonius* ที่แยกได้ โดยใช้ PCR โดยเน้นที่ยีน 16S rRNA, ทำการออกแบบ primers (forward primer หรือ Mp-16S-F, 5' GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC 3' และ reverse primer หรือ Mp-16S-R, 5' TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG 3') โดยอ้างอิงจาก Govan et al. (1998), ใน reaction mixture ที่มีปริมาตรสุดท้าย 25 µl ประกอบด้วย 12.5 µl ของ Emerald Amp GT PCR master mix (2X, cat. # RR310A, Takara), 0.2 µM ของแต่ละ primer และ 10 ng DNA โดยมี PCR conditions ดังนี้: 1 รอบของ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที; 30 รอบของ 93 °C เป็นเวลา 1 นาที, 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และรอบสุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วย 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis, ย้อมสี gel ด้วย GelRed nucleic acid gel stain, แล้วสังเกตผลโดยใช้ UV-transillumination, ผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังมีขนาด 832 bp

#### Duplex PCR amplification

ทำ strain typing ของ *M. plutonius* ที่แยกได้โดย duplex PCR โดยอ้างอิงวิธีการของ Arai et al. (2014) และ Djordjevic et al. (1998), ทำ duplex PCR assays โดยใช้ QIAgen multiplex PCR kit (catalog # 206143, Qiagen), ใน reaction mixture ที่มีปริมาตรสุดท้าย 25 µl ประกอบด้วย 12.5 µl ของ multiplex PCR master mix (2X), 0.2 µM ของแต่ละ primer ที่เฉพาะเจาะจงต่อ typical *M. plutonius* (forward primer หรือ Mp-T-F, 5' TGGTAGCTTAGGCGGAAAAC 3'; reverse primer หรือ Mp-T-R, 5' TGGAGCGATTAGAGTCGTTAGA 3') และ primer ที่เฉพาะเจาะจงต่อ atypical *M. plutonius* (forward primer หรือ Mp-A-F, 5' GAGAACGATTTCGGTACAAGC 3'; reverse primer หรือ Mp-A-R, 5' CCTTTTCTTCACATTCTGGACAT 3'), และ 10 ng DNA, มี thermal cycler ที่ใช้สำหรับ PCR amplifications ดังนี้: 94°C เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 57°C เป็นเวลา 90 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที, และรอบสุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบ

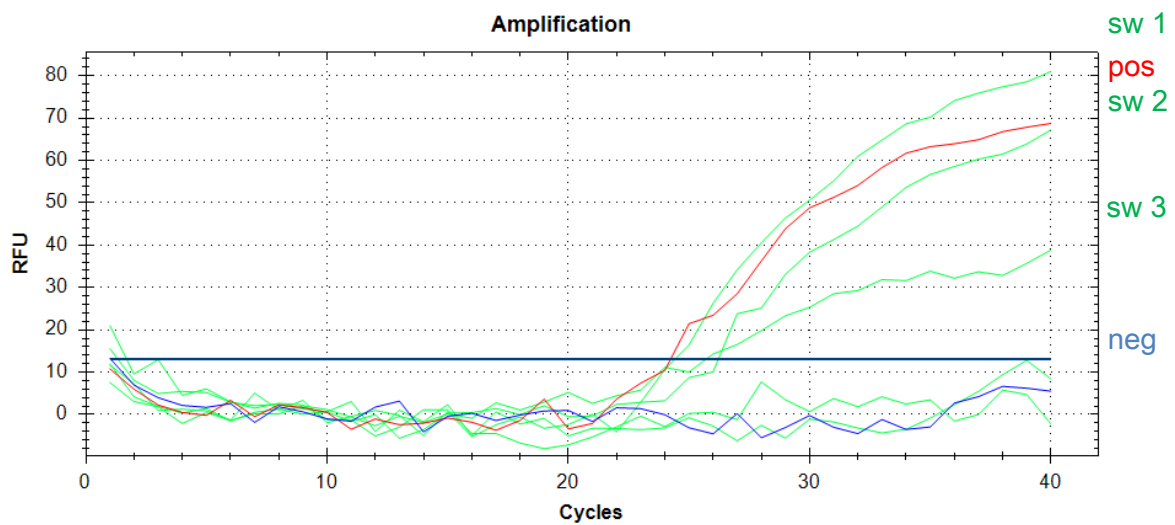
ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วย 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis, ย้อมสี gel ด้วย GelRed nucleic acid gel stain, แล้วสังเกตผลโดยใช้ UV-transillumination

genotyping *M. plutonius* ที่แยกได้โดย MLST analysis

เพื่อเป็นการตรวจสอบ allelic numbers และ sequence types (STs) ของ *M. plutonius* isolates, จึงทำ MLST analysis ด้วยการหาลำดับเบสของยีน 4 ยีน (*argE*, *galK*, *gbpB* และ *purR*) โดยอ้างอิงจาก Haynes et al. (2013), ทำการจำแนก allelic numbers และ STs ของแต่ละไอโซเลตโดยทำการเปรียบเทียบผลกับ 34 STs ที่มีบันทึกไว้อยู่แล้วใน *M. plutonius* MLST database (<http://pubmlst.org/mplutonius/>)

## ผลและอภิปรายผลการศึกษา

จากการตรวจคัดกรอง *M. plutonius* เบื้องต้นจากผึ้งตัวเต็มวัยที่เก็บมาจากบริเวณต่าง ๆ จำนวน 73 รัง เป็นผึ้งโพรงจำนวน 48 รัง ผึ้งมี้ม 10 รัง และผึ้งพันธุ์ 15 รัง ซึ่งเป็นผึ้งที่ไม่ได้แสดงอาการของโรคตัวอ่อนนำยูโรเปียนเลย โดยใช้ qPCR พบผลที่เป็นบวกจากการ amplification ของยีน *SodA* กับ 1 ตัวอย่างจากกรุงเทพฯ, 18 ตัวอย่างจากเชียงใหม่, 35 ตัวอย่างจากชุมพร, 5 ตัวอย่างจากพิจิตร และ 14 ตัวอย่างจากสมุทรสงคราม ผล qPCR ที่เป็นบวกแสดงดังในรูปที่ 1 แสดงเฉพาะผลของ *M. plutonius* ที่แยกได้จากผึ้งโพรง 3 รัง ที่เก็บจากอำเภอสวี จังหวัดชุมพร



รูปที่ 1 แสดง qPCR amplification (เป้าหมายที่ยีน *SodA*) โดยใช้ DNA ของผึ้งโพรงรังที่ 1, 2, และ 3 จากอำเภอสวี จังหวัดชุมพร (code: sw1, sw2, และ sw3, ตามลำดับ) ในขณะที่ pos แสดง positive reaction และ neg แสดง negative reaction

PCR amplification (เป้าหมายที่ยีน 16S rRNA ของ *M. plutonius*)

จากผลบวกในรูปที่ 1 จึงทำการทดลองต่อโดยมุ่งเป้าหมายมายีน 16S rRNA ของ *M. plutonius* ถ้าผลการทดลองเป็นบวก จะได้ขนาดของ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ 832 bp แสดงดังในรูปที่ 2

M 1 2 3 4



Lane

M: DNA marker X (0.07-12.2 kb)

1: DAT561 positive control for atypical *M. plutonius*

2: DAT606 positive control for typical *M. plutonius*

3: d-H<sub>2</sub>O (negative control)

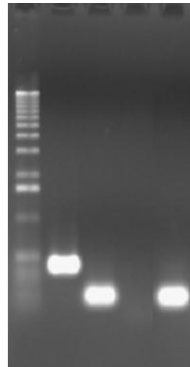
4: sw1 sample

รูปที่ 2 แสดงผลของ PCR amplification ของยีน 16S rRNA ของ *M. plutonius*, หลังการทำ 1% agarose gel electrophoresis, 100 V เป็นเวลา 40 นาที สังเกตเห็นผลบวกจาก *M. plutonius* ที่แยกได้จากตัวอย่าง sw1

duplex PCR amplification (เพื่อจัดจำแนก typical *M. plutonius* และ atypical *M. plutonius*)

จากผลบวกในรูปที่ 2 จึงทำการทดลองต่อโดยมุ่งเป้าหมายมาที่จัดจำแนก typical *M. plutonius* และ atypical *M. plutonius* ถ้าผลการทดลองเป็นบวกของ typical *M. plutonius* จะได้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ 187 bp แสดงดังในรูปที่ 3

M 1 2 3 4



Lane

M: DNA marker X (0.07-12.2 kb)

1: DAT561 positive control for atypical *M. plutonius*

2: DAT606 positive control for typical *M. plutonius*

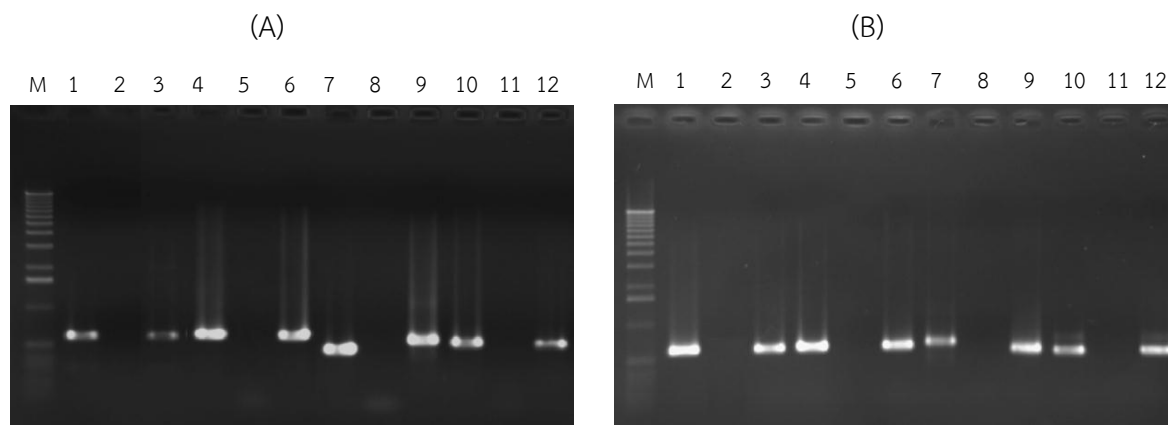
3: d-H<sub>2</sub>O (negative control)

4: sw1

รูปที่ 3 แสดงผลของ duplex PCR amplification ของ DNA ของ *M. plutonius*, หลังการทำ 1% agarose gel electrophoresis, 100 V เป็นเวลา 40 นาที สังเกตเห็นผลบวกจาก typical *M. plutonius* ที่แยกได้จากตัวอย่าง sw1

## MLST analysis

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 4 ยีน (*argE*, *galK*, *gbpB* และ *purR*) หลังจากที่ทำกร repeat typing ของ *M. plutonius* strain เพื่อยืนยันผล ผลการทดลองที่ได้จากการทำ 2 ซ้ำเหมือนกันดังแสดงในรูปที่ 4 (A และ B)



## Lane

M: DNA marker X (0.07-12.2 kb)

1: DAT606 (positive control for typical *M. plutonius*) with primer *galK*

2: d-H<sub>2</sub>O (negative control)

3: sw1 with primer *galK*

4: DAT606 (positive control for typical *M. plutonius*) with primer *argE*

5: d-H<sub>2</sub>O (negative control)

6: sw1 with primer *argE*

7: DAT606 (positive control for typical *M. plutonius*) with primer *gbpB*

8: d-H<sub>2</sub>O (negative control)

9: sw1 with primer *gbpB*

10: DAT606 (positive control for typical *M. plutonius*) with primer *purR*

11: d-H<sub>2</sub>O (negative control)

12: sw1 with primer *purR*

**รูปที่ 4** แสดง MLST analysis ของ positive DNA ของ *M. plutonius*, หลังการทำ 1% agarose gel electrophoresis, 100 V เป็นเวลา 40 นาที สังเกตเห็นผลบวกจาก typical *M. plutonius* ที่แยกได้จากตัวอย่าง sw1

เมื่อนำลำดับเบสของยีน 4 ยีน (*argE*, *galK*, *gbpB* และ *purR*) มาวิเคราะห์เพิ่มเติม พบรายละเอียดดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลของลำดับเบสของยีน *argE*, *gbpB* และ *purR*

Allele	Length (bp)	Start position	End position
<i>argE</i> : 1	503	523	1,025
<i>gbpB</i> : 1	458	1,040	1,497
<i>purR</i> : 4	383	1,498	1,880

ในขณะนี้ได้ส่งลำดับเบสไปยัง MLST database (<http://pubmlst.org/mplutonium/>) เรียบร้อยแล้ว อยู่ในช่วงตรวจสอบลำดับเบส เพื่อขอ ST number ของแต่ละไอโซเลตอย่างเป็นทางการต่อไป ที่น่าสนใจคือพบ novel allele ของยีน *galK*

### สรุปผลการศึกษา

จากการสำรวจผิ้ว 3 species จำนวน 73 รังในประเทศไทย พบการปนเปื้อนของ *M. plutonium* แบบที่เป็น typical strain และที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือผลจาก MLST analysis ที่แสดงให้เห็นว่า typical *M. plutonium* ที่พบมี novel allele ของยีน *galK*

### ข้อเสนอแนะ

ทำการวินิจฉัยหาการปนเปื้อนของ *M. plutonium* ในผิ้วเพิ่มเติม



## เอกสารอ้างอิง

- Arai R., Tominaga K., Wu M., Okura M., Ito K., Okamura N., Onishi H., Osaki M., Sugimura Y., Takamatsu D. 2012. Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. PLoSOne. 7, 1-10.
- Arai R., Akiyama T.M., Okumura K., Morinaka Y., Wu M., Sugimura Y., Yoshiyama M., Okura M., Kirikae T., Takamatsu D. 2014. Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. Journal of Veterinary Medical Science. 76, 491-498.
- Budge G.E., Shirley M.D.F., Jones B., Quill E., Tomkies V., Feil E.J., Brown M.A., Haynes E.G. 2014. Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. The ISME Journal. 8, 1588–1597.
- Djordjevic S.P., Noone K., Smith L., Hornitzky M. 1998. Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. Journal of Apicultural Research. 37, 165-174.
- Forsgren E. 2010. European foulbrood in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology. 103, S5-S9.
- Forsgren E., Budge G.E., Charrière J.D., Hornitzky M.A.Z. 2013. Standard methods for European foulbrood research. Journal of Apicultural Research. 52, 1–14.
- Govan V.A., Brozel V., Allsopp M.H., Davison S. 1998. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. Applied and Environmental Microbiology. 64, 1983-1985.
- Haynes E, Helgason T, Young JPW, Thwaites R, Budge GE. (2013). A typing scheme for the honeybee pathogen *Melissococcus plutonius* allows detection of disease transmission events and a study of the distribution of variants. Environmental Microbiology Reports. 5, 525–529.
- Mckee B.A., Djordjevic S.P., Goodman R.D., Hornitzky M.A. 2003. The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. Apidologie. 34, 19-27.
- Roetschi A., Berthoud H., Kuhn R., Imdorf A. 2008. Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. Apidologie. 39, 362-371.
- Takamatsu D., Arai R., Miyoshi-Akiyama T., Okumura K., Okura M., Kirikae T., Kojima A., Osaki M. 2013. Identification of mutations involved in the requirement of potassium for growth of typical *Melissococcus plutonius* strains. Applied and Environmental Microbiology. 79, 3882-3886.
- Takamatsu D., Morinishi K., Arai R., Sakamoto A., Okura M., Osaki M. 2014. Typing of

*Melissococcus plutonius* isolated from European and Japanese honeybees suggests spread of sequence types across borders and between different *Apis* species. *Veterinary Microbiology*. 171, 221-226.

## ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Chanpen Chanchao
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1403 00209 37 5
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

โทรศัพท์ 085 913 0412 โทรสาร 02 218 5380

E-mail: chanpen.c@chula.ac.th และ cchanchao@hotmail.com

### 5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ประเทศ
2535	ปริญญาตรี	วท.บ.	ชีววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2539	ปริญญาโท	M.S.	ชีววิทยา	Virginia Tech	USA
2542	ปริญญาเอก	Ph.D.	ชีววิทยา	Virginia Tech	USA

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการชีววิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล

### 7. ผลงานวิจัย

#### 7.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (ย้อนหลัง 5 ปี: 2013-2018)

Pramoj Na Ayutthaya, P., **Chanchao, C.** and Chunsriviro, S. 2018. Insight into the substrate specificity change caused by the Y227H mutation of  $\alpha$ -glucosidase III from the European honeybee (*Apis mellifera*) through molecular dynamics simulations. PLoS ONE 13(6): e0198484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198484>

(ISI, IF2017 = 2.806, Q1)

**Chanchao, C.**, Stoić, M., Yoshiyama, M. and Kimura, K. 2018. Review on apiary management and antimicrobial compounds as alternative prevention or treatment for honeybee diseases. OnLine Journal of Biological Science 18(1): 46-61. (**Scopus**)

Kustiawan, P.M., Okuyoshi, H., Kuse, Y., Izawa, H., Saito, Y., Tsuruma, K., **Chanchao, C.**, Hara, H. and Shimazawa, M. 2017. Protective effects of Indonesian propolis against light-induced retinal damage. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research* 9(2): 163-170. (**Scopus, Q3**)

Kustiawan, P.M., Lirdprapamongkol, K., Palaga, T., Puthong, S., Phuwapraisirisan, P., Svasti, J. and **Chanchao, C.** 2017. Molecular mechanism of cardol, isolated from *Trigona incisa* stingless bee propolis, induced apoptosis in the SW620 human

- colorectal cancer cell line. *BMC Pharmacology and Toxicology* 18: 32. doi: 10.1186/s40360-017-0139-4 (ISI, IF2015 = 2.030, Q1 Medicine, medicine (miscellaneous))
- Kilaso, M., Remnant, E., Chapman, N., Oldroyd, B.P., and **Chanchao, C.** (2017) DNA methylation of Kr-h1 is involved in regulating ovary activation in worker honey bees (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux* 64(1): 87-94. (ISI, IF2016 = 1.267)
- Kilaso, M., Chapman, N., Remnant, E., Oldroyd, B.P., and **Chanchao, C.** (2017) No evidence that DNA methylation is associated with the regulation of fertility in the adult honey bee (*Apis mellifera*) worker ovary. *Austral Entomology* 56(1), pp. 115-121. (ISI, IF2016 = 1.114)
- Kilaso, M., Tipgomut, C., Sanguankiattichai, N., Teerapakpinyo, C., and **Chanchao, C.** (2016) Expression and DNA methylation of *phospholipase A<sub>2</sub>* in Thai native honeybees (Hymenoptera: Apidae). *Russian Journal of Developmental Biology* 47(4): 190-201. (ISI, IF2014 = 0.305)
- Nugitrangson, P., Puthong, S., Iempridee, T., Pimtong, W., Pornpakakul, S., and **Chanchao, C.** (2016) *In vitro* and *in vivo* characterization of the anticancer activity of Thai stingless bee (*Tetragonula laeviceps*) cerumen. *Experimental Biology and Medicine* 241(2): 166-176. doi: 10.1177/1535370215600102 (ISI, IF2014 = 2.165)
- Nonthapa, P. and **Chanchao, C.** (2015) Pathogen detection and gut bacteria identification in *Apis cerana indica* in Thailand. *African Journal of Biotechnology* 14(49): 3235-3247. doi: 10.5897/AJB2015.14955
- Buahorm, S., Puthong, S., Palaga, T., Lirdprapamongkol, K., Phuwapraisirisan, P., Svasti, J., and **Chanchao, C.** (2015) Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 23: 5. doi: 10.1186/s40199-015-0138-1 (ISI, IF2014 = 1.638)
- Tree-udom, T., Thamyongkit, P., Wiratkasem, N., **Chanchao, C.**, Palaga, T., Insin, N., Pienpinijtham, P., Rengpipat, S., and Wanichwecharungruang, S. (2015) Harmonization of upconverting nanocrystals and photosensitizer for antimicrobial application. *Royal Society of Chemistry Advances* 5: 102416–102423. (ISI, IF2013 = 3.580)
- Kustiawan, P.M., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., Palaga, T., Arung, E.T., and **Chanchao, C.** (2015) Propolis from the stingless bee *Trigona incisa* from East Kalimantan, Indonesia induces *in vitro* cytotoxicity and apoptosis in cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16(15): 6581-6589. (ISI, IF2012 = 1.271)
- Kustiawan, P.M., Puthong, S., Arung, E.T., and **Chanchao, C.** (2014) *In vitro* cytotoxicity

- of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(7): 549-556. (ISI, no IF)
- Premratanachai, P. and **Chanchao, C.** (2014) Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(5): 337-344. (ISI, no IF)
- Kijpornyongpan, T., Sereemasapun, A., and **Chanchao, C.** (2014) Dose-dependent cytotoxic effect of menthol on human malignant melanoma A-375 cells: correlation with TRPM8 transcript expression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(4): 1551-1556. (ISI, IF2012 = 1.271)
- Boonsai, P., Phuwapraisirisan, P., and **Chanchao, C.** (2014) Antibacterial activity of a cardanol from Thai *Apis mellifera* propolis. *International Journal of Medical Sciences* 11(4): 327-336. doi: 10.7150/ijms.7373 (ISI, IF2013 = 2.065)
- Kaewmuangmoon, J. and **Chanchao, C.** (2013) Over-expression and characterization of recombinant alpha – glucosidase I from *Apis cerana indica* in *E. coli*. *Journal of Apiculture* 28: 97-111.
- Kaewmuangmoon, J., Kilaso, M., Leartsakulpanich, U., Kimura, K., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2013) Expression of a secretory  $\alpha$ -glucosidase II from *Apis cerana indica* in *Pichia pastoris* and its characterization. *BMC Biotechnology* 13: 16. doi: 10.1186/1472-6750-13-16. (ISI, IF2012 = 2.35)
- 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. doi: 10.1111/j.1752-4598.2012.00193.x. (ISI2009, IF = 2.828)
- ขอรับรองว่าข้อความที่ให้ไว้เป็นความจริงทุกประการ

(ลงชื่อ) 

(ศาสตราจารย์ ดร. จันทรเพ็ญ จันทรเจ้า)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 20 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2561