

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานโครงการวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

ประจำปีงบประมาณ 2554 (ปีที่ 2)

เรื่อง

อัตราการติดเชื้อและผลของพรอพอลิสต่อการติดเชื้อ *Nosema ceranae* ของทางเดิน
อาหารส่วนกลางและต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งในประเทศไทย

Infection Ratio and Effect of propolis on the infectivity of *Nosema ceranae* of Midgut
and Hypopharyngeal Glands of Honeybees in Thailand.

โดย

๑๙ ๐๑๔๓๔๗

๑๗ เม.ย. ๒๕๕๕

A๑ ๐๐ ๘๔๗/๓

เริ่มบริการ

301509

๒๘ พ.ค. ๒๕๕๕

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กันทิมา สุวรรณพงศ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

2554

อภิรักษ์นันทนาการ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้สำเร็จได้ด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุนเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2554 ปีที่ 2 จากโครงการวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากสภာวิจัยแห่งชาติที่กรุณาให้คำแนะนำการในเสนอโครงการวิจัย เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพาที่กรุณาให้ความสะดวกในการดำเนินการโครงการวิจัย ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้อ่าน หากมีข้อผิดพลาดประการใดคณะผู้วิจัยขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วยและยินดีรับข้อเสนอแนะด้วยความยินดี

กันทิมา สุวรรณพงศ์

หัวหน้าโครงการฯ

สิงหาคม 2554

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของ *Nosema ceranae* ที่มีต่อผึ้งหลังติดเชื้อและสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง *Trigona apicallis* ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดจันทบุรี ต่อการติดเชื้อโนซีมา ปริมาณเชื้อต่อตัว ร้อยละการติดเชื้อในเซลล์ อัตราการรอดชีวิต ปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ในผึ้งงานของผึ้งสองชนิดคือ ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) และผึ้งมี้ม (*Apis florea*) โดยให้สารสกัดพรอพอลิสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ร้อยละ 50 (50P) และ ร้อยละ 70 (70P) หลังจากป้อนเชื้อโนซีมาที่ละลายในสารละลายน้ำตาลซูโครสร้อยละ 50 (w/v) ด้วยเข็มชั้น (Dose) 40,000 สปอร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อตัว นำมาเลี้ยงในตู้ปมเชื้ออุณหภูมิ $33 \pm 2^{\circ} \text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 50 ± 5 พบว่าอัตราการติดเชื้อ ร้อยละการติดเชื้อภายในเซลล์ อัตราการตายของผึ้งทั้งสองชนิดในกลุ่มทดลองที่ป้อนเชื้อโนซีมาแต่ไม่ได้รับสารสกัดพรอพอลิส คือ กลุ่ม OP และกลุ่ม CE สูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม CO CP และกลุ่มที่ป้อนเชื้อแต่ได้รับสารสกัดพรอพอลิส คือ กลุ่ม 50P และ 70P แต่จากการศึกษาพบว่าระดับความเข้มข้นของพรอพอลิส ที่ร้อยละ 50 และ ร้อยละ 70 ให้ผลไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้จากการศึกษาปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งทั้งสองชนิดหลังจากป้อนเชื้อโนซีมาและให้สารสกัดพรอพอลิส พบว่าเชื้อโนซีมาส่งผลให้ปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์ในผึ้งทั้งสองชนิดลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ (กลุ่มควบคุม CO CP) และกลุ่มที่ป้อนเชื้อแต่ได้รับสารสกัดพรอพอลิส นอกจากนี้อัตราการติดเชื้อยังเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังได้รับเชื้อด้วย จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงชนิด *T. apicallis* ทำให้ลดอัตราการติดเชื้อ ร้อยละการติดเชื้อในเซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลางและลดอัตราการตายของผึ้งทั้งสองชนิด นอกจากนี้ทำให้ปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ป้อนเชื้อแต่ไม่ได้รับสารสกัดพรอพอลิส

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	๗
บทคัดย่อ.....	๘
สารบัญ.....	๙
สารบัญภาพ.....	๑-๗
สารบัญตาราง.....	๗
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และขั้นตอนการวิจัย.....	12
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	24
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการศึกษา.....	58
บรรณานุกรม.....	60
ภาคผนวก.....	71

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
4.1	แสดงอัตราการรอดชีวิตของมด (A. florea) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากมดโพรง (A. cerana) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายฟรอกทอลิสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 24
4.2	ค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ $\pm$ SD ของมด (A. florea) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากมดโพรง (A. cerana) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัวและให้สารละลายฟรอกทอลิสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 25
4.3	แสดงค่าเฉลี่ยการติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ $\pm$ SD ของมด (A. florea) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากมดโพรง (A. cerana) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายฟรอกทอลิสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 26
4.4	ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ต่อตัวของมด (A. florea) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากมดโพรง (A. cerana) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายฟรอกทอลิสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 27
4.5	แสดงร้อยละของเซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลางของมด (A. florea) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมา (วันที่ 14) ที่สกัดมาจากมดโพรง (A. cerana) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายฟรอกทอลิสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 34
4.6	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของมดงานของมดกลุ่มควบคุมวันที่ 14 หลังจากการทดลอง 400x 35
4.7	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของมดงานของมดกลุ่มควบคุมวันที่ 14 หลังจากการทดลอง 1,000x 35
4.8	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของมดงานของมดกลุ่ม CP ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง 400x..... 36
4.9	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของมดงานของมดกลุ่ม CP ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง 1000x..... 36
4.10	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของมดงานของมดกลุ่ม CE ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง 400x..... 37

4.11	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมี้มกลุ่ม CE ในวันที่ 14 หลังจาก การทดลอง 1000x.....	37
4.12	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมี้มกลุ่ม OP ในวันที่ 14 หลังจาก การทดลอง 400x.....	38
4.13	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมี้มกลุ่ม OP ในวันที่ 14 หลังจาก การทดลอง 400x.....	38
4.14	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมี้มกลุ่ม OP ในวันที่ 14 หลังจาก การทดลอง 1000x.....	39
4.15	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมี้มกลุ่ม OP ในวันที่ 14 หลังจาก การทดลอง 1000x.....	39
4.16	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมี้มกลุ่ม 50P ในวันที่ 14 หลังจาก การทดลอง 400x.....	40
4.17	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมี้มกลุ่ม 50P ในวันที่ 14 หลังจาก การทดลอง 1000x.....	40
4.18	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมี้มกลุ่ม 70P ในวันที่ 14 หลังจาก การทดลอง 400x.....	41
4.19	แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมี้มกลุ่ม 70P ในวันที่ 14 หลังจาก การทดลอง 400x.....	41
4.20	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อตัว) จากต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งมี้มใน วันที่ 14 หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรงด้วยความ เข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายฟรอฟอลิสที่ ระดับความ เข้มข้นต่างๆ.....	42
4.21	แสดงอัตราการรอดชีวิตผึ้งโพรง (<i>A. cerana</i>) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโน ซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (<i>A. cerana</i>) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ ต่อตัว และให้ สารละลายฟรอฟอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	43
4.22	แสดงค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ $\pm$ SD ของผึ้งโพรง (<i>A. cerana</i>) หลังจาก ทำการป้อน สปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (<i>A. cerana</i>) ด้วยความ เข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้ สารละลายฟรอฟอลิสที่ ระดับ ความเข้มข้นต่างๆ.....	44

- 4.23 แสดงค่าเฉลี่ยการติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ $\pm$ SD ของผึ้งโพรง (*A. cerana*) หลังจากทำการบ่อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพรอพอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 45
- 4.24 ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งโพรง (*A. cerana*) หลังจากทำการบ่อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพรอพอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 46
- 4.25 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อตัว) จากต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งโพรงในวันที่ 6 10 และ 14 หลังจากทำการบ่อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพรอพอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 54
- 5.1 แสดงอัตราการรอดชีวิตผึ้งมัมและผึ้งโพรง หลังจากทำการบ่อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว..... 59

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งมัมในกลุ่ม CO.....	28
4.2 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งมัมในกลุ่ม CP.....	29
4.3 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งมัมในกลุ่ม CE.....	30
4.4 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งมัมในกลุ่ม OP.....	31
4.5 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งมัมในกลุ่ม 50P.....	32
4.6 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งมัมในกลุ่ม 70P.....	33
4.7 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งโพรงในกลุ่ม CO.....	47
4.8 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งโพรงในกลุ่ม CP.....	48
4.9 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งโพรงในกลุ่ม CE.....	49
4.10 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งโพรงในกลุ่ม OP.....	50
4.11 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งโพรงในกลุ่ม 50P.....	51
4.12 ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งโพรงในกลุ่ม 70P.....	52
5.1 ผลของ <i>N. ceranae</i> ต่อผึ้งมัม <i>A.florea</i> วรรณะผึ้งงาน.....	58
5.2 ผลของ <i>N. ceranae</i> ต่อผึ้งโพรง <i>A.cerana</i> วรรณะผึ้งงาน.....	59

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Nosema apis และ *N. ceranae* เป็นปรสิตภายในเซลล์ที่ก่อความเสียหายอย่างรุนแรงในผึ้งงานระยะตัวเต็มวัยที่พบการระบาดอยู่ทั่วโลก โดยมีรายงานว่าก่อให้เกิดความเสียหายอย่างเห็นได้ชัดกับผึ้งที่มีการติดเชื้อ โดยทำให้ผึ้งต้องเสียชีวิตอย่างรุนแรง มีอายุสั้นลง ส่งผลต่อพฤติกรรมต่างๆ ภายในรังผึ้ง เช่น การหาอาหารลดลง การเลี้ยงดูตัวอ่อนลดลงเนื่องจากผลิตนมผึ้ง (royal jelly) ได้น้อยลง ตลอดจนการวางไข่ของนางพญา ซึ่งลดจำนวนหรือหยุดวางไข่ เป็นต้น ซึ่งลักษณะต่าง ๆ เหล่านี้เป็นสาเหตุทำให้จำนวนประชากรของผึ้งภายในรังลดลง ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ผึ้ง (bee products) ลดลง และที่สำคัญทำให้ประชากรของแมลงที่ทำหน้าที่ถ่ายละอองเกสร (pollinators) ลดจำนวนลงด้วย ผลพวงตามาคือพืชผลทางการเกษตรที่ต้องการผึ้งเป็นแมลงถ่ายละอองเกสรให้ผลผลิตต่ำลง นอกจากนี้ ยังไม่มีรายงานการศึกษาการระดับสากลถึงแพร่ระบาดของเชื้อสองชนิดนี้ ในผึ้งชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย ดังนั้น การศึกษาสำรวจการแพร่กระจาย การแยกชนิดสายพันธุ์และการติดเชื้อในผึ้งแต่ละชนิดที่มีในประเทศไทย จะเป็นข้อมูลที่สำคัญ ต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงผึ้ง การอนุรักษ์ผึ้งพันธุ์พื้นเมืองที่นับวันลดน้อยลงเนื่องจากปัญหาการใช้สารเคมีตลอดจน การนำไปประยุกต์ใช้เป็นข้อมูลโรคของแมลงกลุ่มอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงผึ้ง เช่น ผีเสื้อหนอนไหมที่เลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมและแมลงอื่น ๆ ที่มีรายงานการระบาดของเชื้อ *Nosema* นอกจากนี้โรคชนิดนี้ยังเป็นโรคที่นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกมีความตื่นตัวและให้ความสำคัญในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ *Nosema* มากเนื่องจาก เชื่อกันว่าเชื้อชนิดนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด CCD (colony collapse disorder) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่ประชากรของผึ้งหายไปจากรัง จำนวนมาก ทำให้ประชากรภายในรังลดลงอย่างกะทันหัน โดยไม่ทราบสาเหตุ ประกอบกับข้อมูลรายงานการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ผึ้ง (*Apis mellifera*) ระหว่างเชื้อ *Nosema apis* ซึ่งเดิมพบในผึ้งพันธุ์ สามารถเข้าไประบาดในผึ้งโพรง (*A. cerana*) และในทางกลับกัน *N. ceranae* ซึ่งเดิมพบเป็นเชื้อที่ระบาดในผึ้งโพรง สามารถเข้าไประบาดในเซลล์ของผึ้งพันธุ์ได้เช่นกันและก่อให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ และประชากรโดยรวมของผึ้งภายในรังมากกว่า *N. apis* อย่างชัดเจน ทำให้นักวิจัยผึ้งทั่วโลก รวมทั้งเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งมีความกังวล เกี่ยวกับการระบาดของเชื้อ *N. ceranae* ที่อาจทำให้ประชากรของผึ้งพันธุ์เสียหายจำนวนมากหรืออาจส่งผลให้ประชากรของผึ้งชนิดดังกล่าวในฟาร์มหายไปจนไม่สามารถนำไปใช้ในถ่ายละอองเกสรในสวนผลไม้หรือพืชที่ต้องการผึ้งชนิดนี้ถ่ายละอองเกสรได้ ประกอบกับผึ้งพันธุ์เป็นผึ้งที่ใช้เลี้ยงในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งทั่วโลก ดังนั้นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากเชื้อ *Nosema* จึงเป็นที่สนใจในศึกษากันมากทั่วโลก

นอกจากนี้มียางานเกี่ยวกับผึ้งที่ได้รับเชื้อ *Nosema* จะทำให้การเลี้ยงดูตัวอ่อนของผึ้งพยาบาลลดลงเนื่องจากผลิตนมผึ้งได้ลดลงทั้งนี้เนื่องจากสปอร์ของโนซีมา เข้าไปทำลายเซลล์ในหน่วยสร้างสารของต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) ที่มีหน้าที่หลักในการผลิตนมผึ้ง (royal jelly) ซึ่งเป็นอาหารหลักของตัวอ่อนของผึ้งงานอายุ 1-3 วัน และผึ้งนางพญาตลอดอายุขัย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาต่อม ไฮโปฟาริงค์ เมื่อมีการติดเชื้อชนิดนี้ว่ามีอัตราการติดเชื้อเป็นอย่างไร และส่งผลต่อการเจริญของต่อมอย่างไร มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ผลิตออกมาในส่วนผสมของนมผึ้งอย่างไร ดังนั้นถ้าหากการติดเชื้อของผึ้งงานกลุ่มพยาบาลแล้วส่งผลให้มีความเสียหายต่อตัวต่อม ตลอดจนทำให้ความสามารถในการผลิตนมผึ้งลดลงหรือด้อยคุณภาพลงจะส่งผลเสียหายต่อคุณภาพของอาหารของตัวอ่อนซึ่งมีผลต่อการเจริญและพัฒนาร่างกายของตัวอ่อนเพื่อพัฒนาต่อเพื่อเจริญไปเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย อาจทำให้ได้ผึ้งงานที่ไม่แข็งแรง ไม่มีคุณภาพ ส่งผลเสียหายต่อกิจกรรมการหาอาหาร ป้องกันรังหรือกิจกรรมอื่น ๆ ภายในรัง นอกจากนี้ที่สำคัญคืออาจส่งผลให้อาหารที่นำไปป้อนนางพญาคุณภาพต่ำ ทำให้นางพญาวางไข่ลดลง หรืออาจส่งผลต่อการผลิต queen pheromone ออกมาเพื่อควบคุมรัง กล่าวโดยรวมถ้าหากต่อมไฮโปฟาริงค์เสียหายจากการติดเชื้อ จะทำให้มีผลเสียหายรุนแรงเกิดขึ้นในรังผึ้งและทำให้อุตสาหกรรมการผลิตนมผึ้งเพื่อจำหน่ายมีความเสียหายได้เนื่องจากผึ้งพยาบาลไม่สามารถผลิตหรือผลิตได้น้อยหรือผลิตโปรตีนออกมาน้อยมีผลต่อคุณภาพของนมผึ้งด้วย ดังนั้นการศึกษาวิจัยการติดเชื้อและผลของเชื้อต่อต่อมชนิดนี้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก

การศึกษากการติดเชื้อโนซีมาที่ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของเชื้อ *N. ceranae* ในผึ้งชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย มีความสำคัญมากเช่นเดียวกัน เนื่องจากมียางานการติดเชื้อในทางเดินอาหารส่วนกลางในผึ้งพันธุ์ โดยผึ้งที่ได้รับเชื้อปริมาณมาก ๆ จะเกิดอาการท้องร่วงและตายในที่สุด มีกลิ่นเน่าเหม็น เนื่องจากเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะเข้าไปเจริญและแพร่พันธุ์ในทางเดินอาหารส่วนกลาง ทำให้เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลางเสียหาย ไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์ และย่อยอาหารได้ ผลทำให้อาหารที่ผึ้งกินเข้าไปไม่สามารถย่อยได้ โดยเฉพาะอาหารพวกโปรตีนที่ผึ้งได้จากการกินเกสรของดอกไม้ (pollen grains) นอกจากนี้พฤติกรรมหาอาหารของผึ้งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายและรับเชื้อ *Nosema* เนื่องจากผึ้งที่อาศัยอยู่ในบริเวณใกล้กันที่มีอาณาเขตในการหาอาหารทับซ้อนกัน ผึ้งมักมีการใช้แหล่งอาหารเหล่านี้ร่วมกัน ดังนั้นผึ้งงานหาอาหารที่มีเชื้อ *Nosema* มีโอกาสปล่อยเชื้อไว้ตามแหล่งอาหารต่าง ๆ ขณะหาอาหาร ทำให้สปอร์ของเชื้อสามารถแพร่ไปยังผึ้งจากรังอื่น ๆ หรือผึ้งชนิดอื่น ๆ ที่มาหาอาหารในดอกไม้ดอกเดียวกันหรือแหล่งอาหารอื่นที่ใช้ร่วมกันได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาอัตราการติดเชื้อโนซีมาของผึ้งชนิดที่มีในประเทศไทยทั้ง 5 ชนิดเมื่อให้เชื้อในระดับที่กำหนดระดับต่าง ๆ ว่ามีอัตราการติดเชื้อเท่าไร เริ่มติดเชื้อเมื่อไหร่ (โดยตรวจนับและศึกษาดำแหน่งของสปอร์ภายในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลาง) ระยะเวลาที่เมื่อผึ้งได้รับเชื้อจนกระทั่งผึ้งตาย และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอัตราการติดเชื้อ *N. ceranae* ในผึ้งแต่ละชนิดในประเทศไทยเมื่อทดสอบด้วยการให้พรอพอลิส

(propolis) แตกต่างกันหรือไม่ ทั้งนี้เพื่อศึกษาความสามารถในการระบาด ความรุนแรงของเชื้อชนิดนี้ เพื่อนำไปสู่การทำนายความเป็นไปได้ของการระบาดไปยังแมลงถ่ายละอองเกสรชนิดอื่น ๆ ที่หาอาหารในพืชชนิดเดียวกันกับผึ้ง รวมทั้งสัตว์กลุ่มอื่นที่มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อโดยวิธีการต่าง ๆ ตามกลไกทางธรรมชาติ หรืออื่นๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุม กำจัด หรือประยุกต์นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยด้านอื่นๆ ของเชื้อชนิดนี้ต่อไป

จะเห็นได้ว่าการระบาดของเชื้อ *Nosema* นี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายหลายด้าน เช่น ทางเศรษฐกิจ อย่างเห็นได้ชัดเนื่องจากเป็นสาเหตุหลักในการทำให้ประชากรผึ้งลดจำนวนลง และไม่มีคุณภาพ นอกจากนี้ยังส่งผลเสียหายต่อระบบนิเวศน์โดยรวม ทำให้การแพร่พันธุ์ของพืชบางกลุ่มลดลง เป็นต้น ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้เลี้ยงผึ้งและนักวิทยาศาสตร์ที่ทำงานวิจัยเกี่ยวกับผึ้ง และชีววิทยาของผึ้ง เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาและหาวิธีการป้องกันกำจัดที่เหมาะสมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาอัตราการติดเชื้อ *Nosema ceranae* ของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) ของผึ้งงานของผึ้ง 5 ชนิดในประเทศไทยคือ ผึ้งมัมเล็ก (*Apis andreniformis*) ผึ้งโพรง (*A. cerana*) ผึ้งหลวง (*A. dorsata*) ผึ้งมัม (*A. florea*) และผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ความเข้มข้นของสปอร์ระดับต่าง ๆ
- 1.2.2 ศึกษาผลของเชื้อ *N. ceranae* ต่ออัตราการตาย (mortality) ของผึ้ง และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลางและต่อมไฮโปฟาริงค์ ของผึ้ง 5 ชนิดในประเทศไทย
- 1.2.3 ศึกษาผลของพรอปอลิส (propolis) ต่ออัตราการตายของผึ้งที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* อัตราการติดเชื้อและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลางและต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้ง 5 ชนิดในประเทศไทย

บทที่ 2

บทสอบสวนเอกสารและงานที่เกี่ยวข้อง (Literature reviews)

2.1 เชื้อโนซีมา (Nosema)

Nosema จัดเป็น Microsporidia ซึ่งถือเป็นปรสิตภายในเซลล์กลุ่มใหญ่ที่แพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติและพบได้ทั่วโลก (Matheson, 1996) ซึ่งปัจจุบันมีมากกว่า 150 ชนิด (species) เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrates) รวมถึงแมลง (insects) อย่างน้อย 12 อันดับ (orders) มักจะพบบ่อยในแมลงที่อยู่ในอันดับ Lepidoptera และ Hymenoptera (Higes, 2007a) โดยก่อให้เกิดโรคที่มีชื่อว่า Nosema disease (Bailey and Ball, 1991; Fries, 1989) เชื้อชนิดนี้จะทำให้ระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของเจ้าบ้าน (hosts) เสียหาย ทำให้เกิดอาการท้องร่วงและ เชื้อมีความสามารถด้านทานต่อระบบภูมิคุ้มกันของตัวเจ้าบ้านที่เชื้อเข้าไปอาศัยอยู่ (de Graaf et al., 1994; Higes et al., 2006) สำหรับ *Nosema* ที่ก่อให้เกิดโรคในผึ้ง (honeybees) ที่รายงานมี 2 ชนิด คือ *N. apis* (Zander, 1909) และ *N. ceranae* (Fries et al., 1996) โดย *N. apis* เป็นปรสิตในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ซึ่งเป็นผึ้งพื้นเมืองของยุโรปปัจจุบันถูกนำมาเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมทั่วโลก ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Zander ในปี 1909 ในผึ้งพันธุ์ โดยเชื้อชนิดนี้จะติดเชื้อในเนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของผึ้งงานตัวเต็มวัยเป็นสาเหตุทำให้ระบบย่อยอาหารผิดปกติ อาหารไม่ย่อยและเกิดอาการท้องเสียทำให้ผึ้งมีอายุสั้นและส่งผลให้จำนวนประชากรภายในรังลดลงอย่างรวดเร็ว (Anderson and Giacón, 1992; Hassanein, 1953; Rinderer and Elliott, 1977; Higes et al., 2007a) ในอดีตพบโรคโนซีมาเฉพาะในยุโรปและเกิดจากเชื้อ *N. apis* เท่านั้น (Chen et al., 2008; Ellis and Munn, 2005) ต่อมาได้มีผู้ศึกษาพบว่าโรคโนซีมามีการระบาดทั้งในภูมิภาคเอเชียและยุโรป โดยพบ *Nosema* ในผึ้งโพรง (*A. cerana*) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *N. ceranae* ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Fries และคณะ ในปี 1996 (Fries et al., 1996; Higes et al., 2006) ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันหลายประการเช่น SSUrRNA sequences (โดยใช้เทคนิค PCR เพื่อแยกความแตกต่างของ 16S rRNA ของทั้งสองชนิด) (Fries et al., 1996; Higes et al., 2006; Huang et al., 2007; Williams et al., 2007) ขนาดของสปอร์ ซึ่งพบว่าสปอร์ของ *N. ceranae* สั้นกว่าสปอร์ของ *N. apis* (Williams et al., 2007) จำนวน polar filament coils ของ *N. ceranae* มีจำนวน 20-23 filaments ในขณะที่ *N. apis* มีจำนวน 30-44 filaments (Fries, 1989) โดยเชื้อชนิดนี้เข้าไปติดและทำความเสียหายบริเวณกระเพาะอาหาร (ventriculus) ของผึ้งโพรง ทำให้บริเวณดังกล่าวมีลักษณะสีขาวขุ่นและบวมโป่งออก (Fries et al., 1996) นอกจากนี้มีรายงานการแพร่กระจายของเชื้อ *N. ceranae* จากผึ้งโพรง (*A. cerana*) สูผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ที่อยู่ในเอเชีย ยุโรป อเมริกา

เหนือ อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ (Higes et al., 2006; Huang et al., 2007; Klee et al., 2007; Martin et al., 2007; Williams et al., 2008)

2.2 วงชีวิตของ *Nosema* (Life cycle of *Nosema*) และการแพร่เชื้อ (Spread)

การติดต่อของโรคหรือการติดเชื้อ เกิดได้โดยการป้อนอาหารโดยส่งต่อจากปากของผึ้งงานตัวหนึ่งสู่ผึ้งอีกตัวหนึ่งที่เรียกว่า trophallaxis (Webster, 1993) รวมทั้งการนำเอาส่วนของรวงรังที่มีสปอร์ของเชื้อปนอยู่เข้าปาก (ingestion of infected comb) หรือมาจากแหล่งน้ำที่ผึ้งนำเข้ามาใช้ในรัง (Bailey and Ball, 1991) เมื่อสปอร์ของเชื้อ *Nosema* เข้าสู่ร่างกายทางปาก สปอร์จะเริ่มพัฒนาภายใน 30 นาที ในกระเพาะอาหาร (ventriculus) และทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) โดยเฉพาะที่บริเวณเยื่อบุผิว (epithelium) ของ ventricular fold โดยการยื่น polar tube ที่เป็นตัวนำเอา sporoplasm ของเชื้อ เข้าไปในเซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลาง โดยเชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 6-10 วัน (Bailey and Ball, 1991) สปอร์ของโนซีมาสามารถเจาะผ่านทะเลาะหว่างเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียงทำให้เซลล์ปกติติดเชื้อได้ (Bailey and Ball, 1991; de Graaf et al., 1994; Goodman, 2007) เชื้อที่แพร่พันธุ์และเพิ่มจำนวนในร่างกายจะบวมและพังกตัวในร่างกายของผึ้งงานที่ยังมีชีวิตอยู่ นอกจากนี้สปอร์ของเชื้อยังอาจอยู่ที่ไขผึ้งที่เป็นส่วนประกอบของรัง ปนอยู่ในน้ำผึ้ง และส่วนอื่น ๆ ในรังผึ้ง (Canwell and Shimanuki, 1970) สปอร์ที่อยู่ที่เซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางจะถูกกำจัดออกจากทางเดินอาหาร โดยการขจัดเนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารปกติ พร้อมกับการขับน้ำย่อยออกอยู่แล้ว ทำให้สปอร์สามารถเข้าสู่เซลล์อื่น ๆ ของทางเดินอาหารได้และมีสปอร์บางส่วนผ่านต่อไปยังลำไส้ (intestine) และหลุดออกมาพร้อมกับอุจจาระ (feces) ของผึ้งสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกและสามารถเข้าสู่ผึ้งตัวต่อไปได้ใหม่ เมื่อผึ้งมาสัมผัสบริเวณที่มีอุจจาระที่มีสปอร์ปนต่อไป (Goodman, 2007; Malone et al., 1995; Matheson, 1993) พบการระบาดของโรคโนซีมาในฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วง มักมีการระบาดน้อยในฤดูร้อน (summer) ช่วงฤดูนี้ผึ้งจะมีสปอร์อยู่ภายในร่างกายเล็กน้อย ทำให้ไม่แสดงอาการของโรคและไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อประชากรภายในรังผึ้ง นอกจากนี้สปอร์บางส่วนยังติดอยู่ที่รวงรังและจะแพร่พันธุ์ใหม่อย่างรวดเร็วอีกครั้งเมื่อเริ่มเข้าสู่ฤดูใบไม้ร่วง (autumn) ซึ่งส่งผลให้สูญเสียประชากรผึ้งเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว (Goodman, 2007; Malone et al., 1995) และเสียหายหนักมากในฤดูหนาว (winter) และจะลดลงอีกครั้งเมื่ออุณหภูมิอุ่นขึ้นในช่วงหน้าร้อน

ปัจจุบันมีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อชนิดนี้ในผึ้ง พันธุ์ ผึ้งโพรง ผึ้งมัม ผึ้งหลวง โดยเฉพาะในผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงกันเป็นอุตสาหกรรมทั่วโลกและมีรายงานการได้รับความเสียหายอย่างมาก ในทั่วโลกเนื่องจากเป็นสาเหตุหลักในการทำให้ผึ้งตายทีละมาก ๆ ประชากรภายในรังลดลงอย่างกระชั้นชิด ส่งผลเสียหายหนักกับรังที่ได้รับเชื้อ และส่งผลต่อเนื่องต่อผู้เลี้ยง ตลอดจนพืชที่อาศัยผึ้งเป็นตัวช่วยถ่ายละอองเรณู

2.3 ผลของเชื้อโนซีมาต่อผึ้ง (Effect of *Nosema* on bees)

ไม่พบการติดเชื้อในผึ้งระยะตัวหนอน (larvae) แต่สามารถพบได้ในผึ้งตัวเต็มวัย (adult) บางครั้งผึ้งที่ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการเฉพาะของโรคแต่สามารถตรวจสอบได้โดยการตรวจดูทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งโดยจะพบสปอร์ของ *Nosema* ในกรณีที่ได้รับเชื้อปริมาณมาก ๆ ทำให้ ผึ้งที่ได้รับเชื้อเกิดอาการท้องร่วงและตายในที่สุดเนื่องจากเชื้อเข้าไปทำลายเซลล์ ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางเสียหาย ไม่สามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยเกสรที่กินเข้าไปได้ (de Graaf et al., 1994; Goodman, 2007; Malone et al., 1995; Matheson, 1993) ตัวอย่างในผึ้งหาอาหารของผึ้งพันธุ์ เมื่อได้รับเชื้อจำนวน 100,000 สปอร์ต่อตัว โดยบ้วนปนกับสารละลายน้ำตาลปริมาตร 1 ไมโครลิตร จะมีผลทำให้ทางเดินอาหารส่วนกลางผลิตโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) ได้น้อยลง (Malone and Gatehouse, 1997) และส่งผลให้ผึ้งมีอายุสั้นลง (Ritter, 2001) ส่งผลทำให้ลดจำนวนประชากรภายในรังอย่างรวดเร็ว (Hassanein, 1953; Rinderer and Sylvester, 1978; Malone et al., 1995) การติดเชื้อในผึ้งงานกลุ่มหาอาหาร (foragers) จะทำให้การเก็บเกสรดอกไม้และน้ำหวานลดลง ทำให้รังขาดแคลนอาหาร สุขภาพโดยรวมของประชากรภายในรังอ่อนแอและทำให้ผึ้งเกิดอาการท้องเสีย ตายในที่สุดประชากรภายในรังลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลผลิตภายในรัง (bee products) ลดลงรวมทั้งผลผลิตทางการเกษตร (crop production) เนื่องจากขาดแมลงถ่ายละอองเรณู (Anderson and Giacon, 1992; Fries et al., 19984; Goodwin et al., 1990) หากผึ้งพยาบาล (nurse bees) ได้รับเชื้อชนิดนี้ ส่งผลให้การเจริญของต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) ลดลง หรือหยุดชะงัก ซึ่งมีผลต่อการผลิตนมผึ้ง (royal jelly) ได้ไม่เต็มที่ ส่งผลทำให้ผึ้งพยาบาลสูญเสียความสามารถในการเลี้ยงดูตัวอ่อน (Clark, 1980) จากการศึกษาการใช้เชื้อ *Nosema apis* จำนวน 5,000 สปอร์ ต่อตัว แก่ผึ้งงานของผึ้งพันธุ์อายุ 1 วัน พบว่าต่อมไฮโปฟาริงค์ไม่เจริญและฝ่อไปในที่สุด (Wang and Moeller, 1971) ส่งผลต่อเนื่องถึงคุณภาพของประชากรผึ้งภายในรังเนื่องจากได้โปรตีนคุณภาพต่ำและไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต (Anderson and Giacon, 1992; Clark, 1980; Fries et al., 19984; Goodwin et al., 1994) จากการศึกษาการใช้เชื้อ *Nosema apis* จำนวน 5,000 สปอร์ ต่อตัว แก่ผึ้งงานของผึ้งพันธุ์อายุ 1 วัน พบว่าต่อมไฮโปฟาริงค์ไม่เจริญและฝ่อไปในที่สุด (Wang and Moeller, 1971) ส่งผลต่อเนื่องถึงคุณภาพของประชากรผึ้งภายในรัง และหากผึ้งนางพญา (queen) ติดเชื้อจะมีผลทำให้การวางไข่ลดลงและตายภายใน 2-3 สัปดาห์ (Goodman, 2007; Hassanein, 1953; Malone et al., 1995; Rinderer and Sylvester, 1978; Webster et al., 2004) ผลเสียหายโดยรวมทำให้ประชากรผึ้งลดน้อยลงและไม่มีคุณภาพ ผลคือให้ผลิตภัณฑ์ผึ้งชนิดต่าง ๆ ลดลงอย่างมาก หรืออาจตายยกรัง นอกจากนี้ทำให้ระบบนิเวศน์ขาดแคลน แมลงถ่ายละอองเกสรที่สำคัญ โดยเฉพาะในพืชเศรษฐกิจทั้งหลาย ส่งผลให้การติดผลลดลง ตลอดจนทำให้ความหลากหลายของชนิดพืชลดลงไปด้วย โดยเฉพาะถ้าหากมีการระบาดต่อเนื่องและยาวนาน (Wang and Moeller, 1969, 1971)

2.4 ต่อมไฮโปฟาริงค์ (Hypopharyngeal glands)

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

ต่อมไฮโปฟาริงค์ในผึ้งที่อายุน้อยจะยังไม่เจริญดีและจะเจริญเต็มที่เมื่อผึ้งเข้าสู่ระยะผึ้งพยาบาล (nurse bees) และยังคงเจริญดีในระยะผึ้งงานระยะหาอาหารซึ่งเป็นกลุ่มผึ้งที่มีอายุมากกว่าผึ้งพยาบาล ต่อมนี้อาจเปลี่ยนไปทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) และกลูโคซิเดส (glucosidase) แทนซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตน้ำผึ้ง (honey) จากน้ำหวาน (nectar) จากดอกไม้ และต่อมนี้อาจจะเริ่มเสื่อมสลายเมื่อผึ้งเข้าสู่ระยะผึ้งทหาร (guardian bees) (Brouwers, 1982; Huang and Otis, 1989; Otani et al., 1985; Simpson, 1968; Suwannapong et al., 2007; 2010a) และเนื่องจากผึ้งเป็นแมลงสังคมแท้ชั้นสูง (highly eusocial insect) ที่แบ่งหน้าที่การทำงานออกเป็นวรรณะต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ วรรณะผึ้งงาน (workers) ผึ้งนางพญา (queen) และผึ้งตัวผู้ (drones) ในขณะเดียวกันในกลุ่มของวรรณะผึ้งงานยังแบ่งหน้าที่การทำงานออกเป็นกลุ่มย่อยอีกได้แก่ ผึ้งทำความสะอาดรัง (house cleansing bees) มีอายุตั้งแต่โผล่ออกมาจากเซลล์ของดักแด้ถึง 3 วัน ผึ้งพยาบาลมีอายุในช่วง 3-16 วัน มีหน้าที่ผลิตนมผึ้งเพื่อเลี้ยงดูตัวอ่อนและนางพญา ผึ้งงานกลุ่มหาอาหารมีอายุ 16-28 วัน มีหน้าที่หาอาหาร เช่นการเก็บเกสรจากดอกไม้เพื่อผลิตน้ำผึ้ง และกลุ่มผึ้งป้องกันรัง เป็นผึ้งที่มีอายุมากที่สุด (Seeley, 1985)

ทอกซิน (toxin) หรือสารพิษจากเชื้อ *Nosema* สามารถทำลายโครงสร้างของเซลล์หน่วยสร้างสาร (secretory cells) ของต่อมไฮโปฟาริงค์ ส่งผลให้ผึ้งพยาบาลผึ้งพันธุ์สามารถผลิตนมผึ้งได้ลดลง (Hassanein, 1952; Wand and Muller, 1969; 1979; 1971) หากผึ้งที่มีอายุน้อยได้รับเชื้อจะทำให้ต่อมดังกล่าวไม่เจริญและไม่สามารถผลิตนมผึ้งได้ (Wand and Muller, 1969).

จากเหตุผลข้างต้นทำให้คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางจุลกายวิภาค อัลตราสตรัคเจอร์และอัตราร้อยละการติดเชื้อ ปริมาณโปรตีนของต่อมนี้ ระหว่างผึ้งได้รับเชื้อของ *N. ceranae* ความเข้มข้นที่กำหนดระดับต่าง ๆ กับผึ้งปกติ ในผึ้งทั้ง 5 ชนิดที่มีในประเทศไทย

2.5 ทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้ง (Honeybee midgut)

ผึ้งประกอบด้วยท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut) โดย **ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut)** เริ่มจากช่องปาก (cibarium) ถัดลงไปเป็นส่วนที่แคบเข้าและมีกล้ามเนื้อหนาเรียกบริเวณนี้ว่า คอหอย (pharynx) ซึ่งถัดจากคอหอยไปเป็นท่อทางยาวแคบเรียกหลอดอาหาร (esophagus) ซึ่งเริ่มจากส่วนอกยาวไปจนถึงส่วนหน้าของช่องท้องเชื่อมติดต่อกับกระเพาะเก็บน้ำผึ้ง (honey ที่มีการพัฒนาขยายใหญ่ พบในผึ้งงานเท่านั้น กระเพาะเก็บน้ำผึ้งยังทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำหวานจากดอกไม้ให้เป็นน้ำผึ้ง ได้ด้วยการปล่อยเอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) จากต่อมน้ำลาย มาเพื่อย่อย ซูโครส (sucrose) ให้ได้เป็นกลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) ขณะที่ผึ้งบินกลับรัง (สิริวัฒน์, 2532; Snodgrass, 1935) ทางเดินอาหารส่วนนี้เป็นทางผ่านของเชื้อ *Nosema* เพื่อลำเลียงเชื้อส่งต่อไปที่ทางเดินอาหารส่วนถัดไป ยังไม่มีรายงานการแพร่กระจายหรือความเสียหายของทางเดินอาหารส่วนนี้จากโรค *Nosema* **ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut)** เริ่มต้นจากส่วนโปรเวนทริคูลัส (proventriculus) ซึ่งเชื่อมต่อจากกระเพาะเก็บน้ำผึ้งเป็นท่อสั้น และแคบ ท่อนี้ยื่นเข้าไปในกระเพาะเก็บน้ำหวานมีลิ้นเปิดปิด ประกอบด้วยเนื้อเยื่อรูปสามเหลี่ยม 4 อัน ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้มน้ำผึ้งในกระเพาะเก็บน้ำหวานไหลไปรวมกับอาหารในทางเดินอาหารส่วนกลางหรือเวนทริคูลัส (ventriculus) และเชื่อว่าทำหน้าที่ในการแยกเกสรดอกไม้ออกจากน้ำหวานที่ผ่านมาจากกระเพาะเก็บน้ำผึ้ง ท่อเวนทริคูลัสเป็นท่อกลมยาวขนาดใหญ่ขดเป็นรูปตัวยู (U-shape) มีขนาดยาวที่สุดของทางเดินอาหาร ภายในเวนทริคูลัสเคลือบด้วยเยื่อเมือก (gelatinous mass) ซึ่งเอนไซม์ถูกสร้างขึ้นมาจากเซลล์บุผิว (epithelial cells) และจะหลั่งออกมาจากเยื่อเมือกเมื่อมีอาหารอยู่ในเวนทริคูลัส โดยเฉพาะอาหารประเภทโปรตีน ที่สำคัญคือ พวงละอองเรณู (pollen grains) และทำหน้าที่ดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้วทั้งหมดเข้าสู่เซลล์ (สิริวัฒน์, 2532; Snodgrass, 1935) ผึ้งที่ได้รับเชื้อ *Nosema* จะทำให้เซลล์ของเยื่อบุผิวบริเวณนี้เสียหาย ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ไม่สามารถย่อยพวงเรณูที่ผึ้งกินเข้าไปได้ ผลคือพบเกสรผึ้งหรือเรณูจำนวนมากในผึ้งที่ติดเชื้อ เมื่อติดเชื้อจำนวนมากจะทำให้ผึ้งท้องเสียและตายในที่สุดเนื่องจากเซลล์บริเวณนี้ถูกทำลายเสียหายหนัก (Anderson and Giacon, 1992; Hassanein, 1953; Rinderer and Elliott, 1977; Higes et al., 2007a) **ทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut)** เริ่มต้นจากลำไส้เล็ก (intestine) ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับเวนทริคูลัส บริเวณที่เชื่อมต่อกันนี้จะมีท่อขับถ่าย มัลพีเจียลทิวบูล (Malpighian tubules) เป็นท่อเล็กๆ ยาวจำนวนมาก ทำหน้าที่ขับถ่ายดูดซึมของเสีย เช่น กรดยูริก (uric acid) และเกลือต่างๆ จากเลือดไปยังลำไส้ใหญ่ถัดจากลำไส้เล็กเป็นไส้ตรง (rectum) ทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหารและน้ำที่ย่อย ขับกากอาหารออกสู่ภายนอก ร่างกายทางทวารหนัก (anus) (สิริวัฒน์, 2532; Snodgrass, 1935) พบว่าผึ้งที่ได้รับเชื้อ *N. apis* ทางเดินอาหารส่วนนี้จะประกอบด้วยเกสร (pollen grains) ที่ไม่ถูกย่อยกระจายอยู่เต็มทางเดินอาหารส่วนท้ายนี้ ทำให้บวม ไปงอกและมีสีน้ำตาลเข้ม (de Graaf et al., 1994; Higes et al., 2006)

2.6 ผึ้งในประเทศไทย (Honeybees of Thailand)

ผึ้งเป็นแมลงสังคมแท้ชั้นสูง (highly eusocial insects) จัดอยู่ในอันดับไฮมีโนพเทอร่า (Order Hymenoptera) สกุลเอปิส (Genus *Apis*) ในประเทศไทยพบจำนวน 5 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ผึ้งพื้นเมืองของประเทศไทย (native species) ได้แก่ (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) ผึ้งมัม (*A. florea* Fabricius, 1787) ผึ้งมัมดำ (*A. andreniformis* Smith, 1858) และผึ้งโพรง (*A. cerana* Fabricius, 1793) และผึ้งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (introduced species) คือ ผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* Linnaeus, 1758) (Suwannapong, 2000; Wongsiri et al., 1990; 1996) ผึ้งแต่ละรังประกอบด้วย 3 วรรณะ คือ ผึ้งนางพญา (queen) ผึ้งตัวผู้ (drones) และผึ้งงาน (workers) โดยแต่ละวรรณะมีหน้าที่ภายในรังแตกต่างกัน โดยผึ้งนางพญามีหน้าที่วางไข่ เพียงตัวเดียวภายในรัง โดยผลิตสารเฟอโรโมนที่เรียกว่า queen pheromone โดยปล่อยออกมาเพื่อควบคุมพฤติกรรมของผึ้งวรรณะอื่น ๆ ให้ทำงานและกิจกรรมต่าง ๆ ที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต ส่วนวรรณะผึ้งงาน ซึ่งมีจำนวนสมาชิกหลายพันหรือหลายหมื่นตัว ขึ้นอยู่กับชนิดของผึ้ง ในวรรณะนี้ประกอบด้วยผึ้งงานที่ทำหน้าที่แตกต่างกันหลายกลุ่มได้แก่ ผึ้งงานกลุ่มหาอาหาร (foraging bees) ทำหน้าที่หาน้ำหวานและเกสรเพื่อมาใช้และเก็บสะสมภายในรัง ผึ้งงานกลุ่มป้องกันรัง (guardian bees) ทำหน้าที่ป้องกันรังเมื่อมีศัตรูมารบกวน ผึ้งพยาบาล (nurse bees) ทำหน้าที่ผลิตนมผึ้งเพื่อมาเลี้ยงตัวอ่อน ที่มีอายุ 1-3 วัน และนางพญาตลอดอายุขัย ผึ้งงานกลุ่มทำความสะอาดรัง (house cleansing bees) เป็นต้น ส่วนวรรณะผึ้งตัวผู้มีประมาณ 200-300 ตัวต่อรัง มีหน้าที่เพียงอย่างเดียวคือผสมพันธุ์กับผึ้งนางพญา เมื่อรังไม่ต้องการจะถูกจำกัดทิ้งออกนอกรัง (Ruttner, 1988; Otis, 1991) ซึ่งกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในรังผึ้งจะใช้สารที่เรียกว่าเฟอโรโมน ในการสื่อสารระหว่างวรรณะ หรือแม้กระทั่งในวรรณะเดียวกัน ในกรณีที่ผึ้งมีการติดเชื้อหรือมีพยาธิสภาพ ในร่างกายทำให้สูญเสียการทำงานภายในรังและส่งผลโดยรวมต่อสมาชิกทุกตัวภายในรัง เนื่องจากผึ้งใช้เฟอโรโมนในการสื่อสารกันกับสมาชิกทุกตัวภายในรัง ดังนั้นเมื่อผึ้งชนิดต่าง ๆ ทั้ง 5 ชนิดที่มีในประเทศไทย ซึ่งมีลักษณะชีววิทยาบางประการ ที่แตกต่างกันเช่น สันฐานวิทยา การสร้างรัง พฤติกรรมต่าง ๆ การใช้เฟอโรโมนการสร้างพรอพอลิส ถิ่นอาศัย เมื่อผึ้งชนิดต่าง ๆ ได้รับเชื้อ *Nosema* ที่ระดับต่าง ๆ ที่กำหนด น่าจะส่งผลต่อการทำกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายอาจถึงขั้นร้ายแรง ที่น่าจะมีควมแตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาในระดับลึกต่อไป ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนการวิจัยเพื่อนำข้อมูลของความแตกต่างจากความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตมาใช้ประโยชน์ให้สูงสุด ไม่ว่าจะเป็นเรื่ององค์ความรู้ เกษตรกรรมและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.7 พรอพอลิส (Propolis)

พรอพอลิส เป็นผลิตภัณฑ์ผึ้งที่ได้จากยางไม้ (resins) ประกอบด้วย ยางไม้ (50-70%), ไขผึ้ง (30-50%), เกสรผึ้ง (10%) และน้ำมันหอมระเหย (5-10%) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารต่าง ๆ

มากกว่า 180 ชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและถิ่นที่อยู่อาศัย ตลอดจนฤดูกาลที่ผึ้งไปเก็บมา ผึ้งที่พบการสร้างพรอพอลิสได้แก่ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ผึ้งมัมเล็ก (*A. andreniformis*) ผึ้งมัม (*A. florea*) ผึ้งหลวง (*A. dorsata*) ส่วนผึ้งโพรงไม่พบการสร้างพรอพอลิส จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าผึ้งโพรงน่าจะมีวิธีการหรือผลิตภัณฑ์ผสมอยู่ในไขผึ้งหรือผลิตภัณฑ์อื่นที่สามารถทำให้สามารถกำจัดเชื้อโรคหรือพวกแบคทีเรียที่เซลล์ของรวงรังแก้ตัวอ่อนได้ ดังนั้นการศึกษาอัตราการติดเชื้อ *Nosema* ของผึ้งโพรง นำข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง โดยเฉพาะการทดสอบการยับยั้งด้วย พรอพอลิส ในผึ้งชนิดนี้น่าจะให้ผลที่แตกต่างจากผึ้งชนิดอื่นในประเทศไทย รวมทั้งน่าจะให้ผลแตกต่างจากผึ้งต่างประเทศด้วยเช่นกัน พรอพอลิสประกอบด้วย phenolic compounds ที่สำคัญหลายชนิด เช่น quercetin , caffeic acid และ ferulic acid ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เอสเทอร์ (ester) กรดฟีโนอิก (phenolic acid) เทอร์ปีน (terpenes) กรดเบนโซอิก (benzoic acid) กรดซินนามิก (cinnamic acid) กรดคาฟิอิก (caffeic acid) กรดซินนาปิก (sinapic acid) กรดไอโซเฟอรูลิก (isoferulic acid) และคริสซิน (chrysin) (Usami et al., 2004) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอื่นๆ เช่น แมกนีเซียม ทองแดง แคลเซียม ธาตุเหล็ก สังกะสี และ วิตามินต่าง ๆ เช่น วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง วิตามินบีหก วิตามินซี และวิตามินอี เป็นต้น (Castaldo and Capasso, 2002) พรอพอลิสมีสีน้ำตาลจนเกือบดำ หรือบางพื้นที่มีสีเขียวหรือขาว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยางไม้ และฤดูกาล ดังนั้นชนิดของสาร สัดส่วนของสารที่เป็นองค์ประกอบของพรอพอลิส จะแตกต่างกันในผึ้งแต่ละชนิดด้วยเช่นกัน (Bankova, Castro and Marcucci, 2000) ผึ้งใช้พรอพอลิส ในการอุดรอยต่อ (sealing) ต่าง ๆ และยึดรวงรัง บางทีจึงถูกเรียกว่า "กาวผึ้ง" (bee glue) ใช้ในการซ่อมแซมรังหรือใช้อุดหน้าทางเข้ารัง เพื่อลดขนาดรูเปิดเข้ารังให้พอดีเพื่อสะดวกในการดูแล และป้องกันรังผึ้งจากศัตรูไม่ให้เข้ามาในรัง ตลอดจนรักษาความสะอาด และป้องกันการระบาดของเชื้อโรคภายในรังด้วย ใช้หุ้มซากของศัตรูที่มีขนาดใหญ่และตายอยู่ในรังไม่สามารถจะนำออกไปทิ้งนอกรังได้เพื่อไม่ให้เชื้อโรคเจริญและแพร่เข้ามาในรังได้ นอกจากนี้ยังใช้เคลือบรวงรังเพื่อให้แต่ละเซลล์ที่นางพญาจะวางไข่มีสภาพสะอาดปลอดจากเชื้อและปกป้องรังจากศัตรูไม่ให้เข้ามาในรัง (Russo, Longo & Vanella, 2008) สารสกัดจากพรอพอลิส สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ได้มากกว่า 15 ชนิด จากการใช้พรอพอลิสทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการสามารถยับยั้งได้ดีเมื่อเทียบกับ คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) เซฟาติน (cefradine) และ โพลีมิกซิน บี (polymyxin B) (Castaldo and Capasso, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของพรอพอลิสซึ่งสารประกอบในการต้านอนุมูลอิสระของ โดยเฉพาะสารในกลุ่ม flavonoids ที่พบในพรอพอลิสนั้นช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของวิตามินชนิดต่าง ๆ รวมถึงกรดไขมันที่จำเป็นบางชนิดอีกด้วย (Sroka, 2006) สารสกัดจากพรอพอลิสมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยสารที่มีบทบาทสำคัญในพรอพอลิสที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ มะเร็งคือ quercetin, caffeic acid, cleerodane diterpendoid โดย cleerodane และ diterpendoid มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

มากที่สุด สารอพิจินิน (apigenin) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีอยู่ในน้ำผึ้ง และพรอพอลิส สามารถยับยั้งเชื้องอกได้ (Munoz et al., 2007; Saforcin, 2007; Yaghoubi et al., 2007)

งานวิจัยในครั้งนี้สนใจนำเอาพรอพอลิสของผึ้งในประเทศไทยมาเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Nosema* ในผึ้ง 5 ชนิดของประเทศไทย เนื่องจากในพรอพอลิสมีสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราได้หลายชนิด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าพรอพอลิสของผึ้งในประเทศไทยบางชนิดอาจสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Nosema* ในผึ้งบางชนิดได้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

Materials and Methods

3.1 อุปกรณ์ (Instruments)

- Camera (Nikon, Japan)
- Freezer (Krungthai, Thailand)
- Incubator (Thermotek, Thailand)
- Incubator (WET binder, US)
- LKB Ultramicrotome Ultratome V (LKB, Sweeden)
- Light Microscope (Nikon, Japan)
- Microcentrifuge
- Microsyrinx 1 μ l (Varain, USA)
- Microsyrinx 10 μ l (Hewlett-packard, USA)
- Stereo Microscope (Nikon, Japan)
- Transmission Electron Microscope TEM (Phillip, Netherlands)
- Stereomicroscope (Nikon, Japan)
- Spectrophotometer (Shimadzu, Australia)
- Rotary microtome (Leica, Germany)
- Manetic sterer and magnetic bars (Heidolph, Germany)
- Microtome blades (Feather, Japan)
- Warmplate (Fisher, USA)

3.2 วัสดุ (Inventory supplies)

- Beakers 5, 25, 80, 125, 500 and 1,000 ml (Pyrex, Germany)
- Cuvets (VWR international)
- Capsules; Embedding, Size 00, 8 mm I.D (EMS, USA)
- Copper Grid 200 mesh (EMS, USA)
- Bee cages (80 x130x135 mm³)
- Dissecting Scissors CV scissors, 4" (EMS, USA)

- Embedding Capsule Holder (EMS, USA)
- Eppendorf 1 ml
- Filter paper Whatmann No. 4 (Whatmann International Ltd., England)
- Forcep No. 4 INOX (Dumont & Fils, Switzerland)
- Glass Knife Boats (EMS, USA)
- Glass Knife Strips Size 6.4 mm × 25 mm × 400 mm (EMS, USA)
- Micropipette 10, 200 and 1,000 p (Gilson, France)
- Mixer Vortex Genies 2 (EMS, USA)
- Parafilm M and Dispenser (EMS, USA)
- Pasteur Pipettes
- Petri Dish (Pyrex, Germany)
- Pipette Tips 10, 200 and 1,000 µl (Axygen-Hayward, USA)
- Sectioning set (Chiron Stainless, Germany)
- Specimen Forceps 4.5" (EMS, USA)
- Staining jars
- Test tube 12 × 75 mm²

3.3 สารเคมี (Chemicals)

3.3.1 สารเคมีสำหรับศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Chemicals for transmission Electron Microscopy)

- Absolute Ethyl Alcohol (Merk, Germany)
- Dodecenyl Succinic Anhydride (Sigma Chemical Company, USA)
- DMP 30 (2, 4, 6 Tridimethyl Amionmethyl Phenol) (EMS, USA)
- Epon 812 (EMS, USA)
- Glutaraldehyde (Sigma Chemical Company, USA)
- Hydrochloric Acid (Merk, Germany)
- Lead Citrate (Sigma Chemical Company, USA)
- Methyl Nadic Anhydride (EMS, USA)
- Osmium Tetroxide, Crystalline, Highest Purity, 99.95% (EMS, USA)
- Paraformaldehyde, EM Grade, Purified (EMS, USA)

- Phosphotungstic acid (Fluka, Switzerland)
- Propylene Oxide, EM grade (EMS, USA)
- Sodiumborate (Fluka, Switzerland)
- Sodium Cacodylate (Sigma Chemical Company, USA)
- Sodium Hydroxide (Fluka, Switzerland)
- Methylene Blue (Fluka, Switzerland)
- Uranyl Acetate (Fluka, Switzerland)

3.3.2 สารเคมีสำหรับศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบให้แสง

(Chemicals for Light Electron Microscopy)

- Activated charcoal
- Absoluted Ethyl Alcohol (J.T Baker, Malaysia)
- Basic Fuchsin (Labchem, Australia)
- Distilled water
- Formaldehyde Solution (Univar, Australis)
- Glacial Acetic Acid (Analar, England)
- Hydrochloric Acid (J.K Baker, USA)
- Light Green (Fluka, Switzerland)
- Picric Acid (Labchem, Australia)
- Periodic Acid (Merck Chemical,)
- Permunt (Fisher Chemical, USA)
- Sodium Bisulfite
- Toluidine blue
- Xylene (Panreac, England)

3.3.3 สารเคมีสำหรับวัดค่าโปรตีนวิธีแบรดฟอร์ด (Chemicals for Bradford Protein Assay)

- BSA (Bovine Serum Albumin; Sigma Chemical Company, USA)
- Coomassie Blue 250 G (C.1# 42655) (Sigma Chemical Company, USA)
- Distilled water
- Glycerine jelly (Ajax, Australia)

- Methanol (Sigma Chemical Company, USA)
- Phosphoric acid (Merck KGaA, Germany)
- Sodium Hydroxide (NSW 2147, Australia)

3.4 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Specimens)

- ผึ้งมิม (*Apis florea*) วรรณะผึ้งงาน (workers)
- ผึ้งโพรง (*A. cerana*) วรรณะผึ้งงาน (workers)
- *Nosema ceranae*

3.5 สถานที่ศึกษา (Study site)

3.5.1 บริเวณที่ศึกษาการกระจายตัว (การแพร่ระบาดของเชื้อ)

3.5.1.1 ภาคเหนือ

3.5.1.2 ภาคตะวันออก

3.5.1.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

3.5.2 บริเวณที่เก็บตัวอย่างเชื้อเพื่อศึกษาอัตราการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้เก็บรวบรวมจากฟาร์มเลี้ยงผึ้งในจังหวัด สมุทรสงคราม

3.5.3 ศึกษาอัตราการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาทดลองเกี่ยวกับการติดเชื้อโนซีมาในผึ้งทั้งสองชนิด ทำการศึกษาทดลอง ณ ห้องทดลองของภาควิชาชีววิทยา ห้อง BS3108 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย

3.6 วิธีการศึกษาทดลอง (Methodology)

3.6.1 ขั้นตอนการศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ *Nosema ceranae* และการเพิ่มจำนวนเชื้อในห้องปฏิบัติการ

1. สุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งงานระยะตัวเต็มวัย ของผึ้งทั้ง 2 ชนิด ในประเทศไทย คือ ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) และ ผึ้งมิม (*A. florea*) จากภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและภาคตะวันออก
2. โดยสุ่มเก็บผึ้งจำนวน 50 ตัว/รัง/ชนิด/บริเวณ

3. นำผิ้วตัวอย่างใส่ลงในสารละลายกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 50 (W/W) ที่บรรจุอยู่ในขวดที่มีฝาปิดสนิท เพื่อนำกลับไปที่ตรวจนับหาเชื้อและนับจำนวนสปอร์ในห้องปฏิบัติการ (โดยใช้ Haemocytometer)
4. นำตัวอย่างผิ้วมาตัดเอาทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) ออก โดยใช้ปากคีบปลายแหลมขนาดเล็ก
5. นำทางเดินอาหารส่วนกลางใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml./ทางเดินอาหาร ของ ผี 20 ตัว ที่ภายในบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร
6. บดด้วย homogenizer ขนาดเล็ก
7. นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 6,000 g เป็นเวลา 5 นาที
8. ใช้ pasture pipette ดูดเอาส่วนที่เป็นตะกอนสีขาวออกมาแล้วใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อีกอันหนึ่งที่ภายในบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร
9. นำเอา microcentrifuge tube ในข้อ 8 ไป vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนับเซลล์ด้วยเครื่อง Hemocytometer (ในกรณีที่พบสปอร์ของโนซีมา)
10. บันทึกจำนวนสปอร์ต่อ 1 ไมโครลิตร
11. ทำเช่นเดียวกันในผีทุกชนิด และทุกบริเวณศึกษา จนได้จำนวนสปอร์เพียงพอต่อความต้องการ
12. นำสปอร์ที่ได้ไปป้อนให้กับผีงานของผีพันธุ์อายุ 1 วัน โดยใช้ 5,000 สปอร์ต่อผี 1 ตัว แล้วเลี้ยงใน incubator ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % นำผีที่ตายในแต่ละวันมาตรวจนับ โนซีมาเพื่อเก็บไว้สำหรับการทดลองต่อไป

3.6.2 การทดลองให้ติดเชื้อ (Experimental Infection)

3.6.2.1 การเตรียมสปอร์ (Spore preparation)

1. สปอร์ของโนซีมาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เตรียมจากรังของผึ้งโพรงในจังหวัดสมุทรสงคราม ที่พบว่าการติดเชื้อโนซีมาอย่างรุนแรง
2. นำผีที่ติดเชื้อมาผ่าแยกเดินอาหารส่วนกลางออก นำทางเดินอาหารส่วนกลางที่ได้ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 200 μ l จากนั้นทำการบดทางเดินอาหารส่วนกลางให้ละเอียด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 6,000 g เป็นเวลา 10 นาที
3. แยกเอาส่วนของเหลวที่อยู่ด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนที่มีลักษณะสีขาวขุ่นที่อยู่บริเวณด้านล่างสุดของตะกอนซึ่งเป็นส่วนของสปอร์โนซีมา จากนั้นนำเอาสปอร์ที่ได้มาใส่ในสารละลายซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 50 และทำการนับภายใต้กล้องโดยใช้ hemocytometer เพื่อเตรียมระดับความเข้มข้นของสปอร์ ระดับต่างๆ คือ 5,000 10,000 และ 20,000 สปอร์ต่อไมโครลิตร

3.6.2.2 ศึกษาอัตราการติดเชื้อขั้นต้นโดยให้ปริมาณสปอร์คือ 5,000 8,000 และ 10,000 สปอร์ต่อตัว

1. นำคอนมดึ่งที่มีตัวอ่อนในระยะดักแด้จากรังที่แข็งแรงและตรวจดูแล้วว่าไม่มีการติดเชื้อโนซีมา จากฟาร์มเลี้ยงมดึ่งในจังหวัดสมุทรสงครามมาชนิดละ 3 รัง (มดึ่งโพง 3 รัง และมดึ่งมีมอีก 3 รัง) ทำการศึกษาขั้นตอนต่อไปเหมือนกันในมดึ่งทั้งสองชนิด
2. นำคอนมดึ่งที่ได้มาบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ $34\pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 50-55% เพื่อให้มดึ่งฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย
3. นำมดึ่งที่ออกมาใหม่จากข้อ 2 ย้ายใส่ในกรงที่เตรียมไว้อย่างระมัดระวัง โดยแบ่งใส่กรงละ 50 ตัว จากนั้นนำกลับไปใส่ในตู้บ่ม ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 วัน โดยไม่ให้อาหาร
4. แบ่งมดึ่งจากข้อ 3 ออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำ (กรง) นำมดึ่งแต่ละตัวจากแต่ละกลุ่มป้อนด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมาละลายอยู่ด้วย โดยป้อนด้วยปริมาตร 2 μl ต่อตัว โดยในกลุ่มที่ 1 ให้เป็นกลุ่มควบคุมป้อนด้วยสารละลายซูโครสที่ไม่มีสปอร์ของโนซีมา กลุ่มที่ 2 ป้อนด้วยความเข้มข้น 5,000 สปอร์ต่อตัว กลุ่มที่ 3 ป้อนด้วยความเข้มข้น 8,000 และกลุ่มที่ 4 ป้อนด้วยความเข้มข้น 10,000 สปอร์ต่อตัว
5. หลังจากที่ได้ป้อนเชื้อเสร็จแล้วนำขวดที่บรรจุน้ำ และสารละลายซูโครส 50% มาติดกับแต่ละกรงเพื่อเป็นแหล่งน้ำและพลังงานให้กับมดึ่ง เปลี่ยนขวดน้ำและน้ำตาลทุกๆ 5 วัน
6. จากนั้นเตรียมอาหารให้มดึ่งโดยนำเกสรอบแห้ง 60g มาผสมกับสารละลายซูโครส 50% ปริมาตร 17 ml (w/v) คนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นแบ่งใส่จานและนำไปให้กับมดึ่งแต่ละกรง
7. ตรวจสอบอัตราการตายของมดึ่งในแต่ละวัน ทำการบันทึกจำนวนมดึ่งที่ตายในแต่ละวันต่อแต่ละกรง ศึกษาอัตราการตาย (mortality) อัตราการติดเชื้อ (infection ratio) และปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ในมดึ่งทั้งสองชนิด

3.6.2.3 การทำให้มดึ่งติดเชื้อโดยให้ปริมาณสปอร์คือ 10,000 20,000 และ 40,000 สปอร์ต่อตัว

1. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2.1 โดยเปลี่ยนปริมาณเป็น 10,000 20,000 และ 40,000 สปอร์ต่อตัว
2. ศึกษาอัตราการตาย อัตราการติดเชื้อ ร้อยละของเซลล์ที่ติดเชื้อมีกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อของทางเดินอาหารส่วนกลางของมดึ่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) จำนวนสปอร์ที่ติดในทางเดินอาหารส่วนกลางของมดึ่งต่อตัว และปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ในมดึ่งทั้งสองชนิด

3.6.2.3.1 ศึกษาอัตราการติดเชื้อต่อมิ่งหนึ่งตัว (Infectivity)

1. ผ่าแยกเอาทางเดินอาหารส่วนกลางจากมิ่งที่ตายในแต่ละวันจากแต่ละกรงมาใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 100 μ l
2. บดให้ละเอียด แล้วนำของเหลวที่ได้ไปนับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยใช้ hemocytometer
3. บันทึกผลที่นับได้เป็นจำนวนสปอร์ต่อตัว ทำจนกระทั่งทดลองเสร็จสิ้นหรือจนกว่ามิ่งในแต่ละกรงจะตายหมด

3.6.2.3.2 ศึกษาอัตราการรอดชีวิต (Survival analysis)

1. ตรวจสอบอัตราการตายของมิ่งในแต่ละกรงเป็นระยะเวลา 30 วัน บันทึกจำนวนมิ่งที่ตายในแต่ละวันต่อกรง นำมิ่งที่ตายออกมาเก็บแช่ในตู้เย็นเพื่อทำการศึกษในขั้นต่อไป
2. หลังจากทำการตรวจสอบอัตราการตายของมิ่งและบันทึกผลครบ 30 วันแล้ว นำผลที่ได้มาเขียนเป็นกราฟโดยใช้วิธี Kaplan-Meier survival curves

3.6.2.3.3 ศึกษาร้อยละของเซลล์ที่ติดเชื้อมีไม่ติดเชื้อภายในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลางของมิ่ง (Infection ratio between infected cells and non-infected cells)

1. นำมิ่งที่ยังมีชีวิตจากแต่ละกรงๆ 3 ตัว ทุกวันที่ 6 10 และวันที่ 14 หลังจากทำการป้อนเชื้อไปแล้วออกมาศึกษาร้อยของเซลล์ที่ติดเชื้อมีไม่ติดเชื้อ
2. ผ่าแยกทางเดินอาหารส่วนกลางออก นำเนื้อเยื่อบางส่วนไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบว่ามิ่งที่นำมาศึกษาติดเชื้อจริงหรือไม่ หลังจากตรวจสอบแล้วถ้าพบว่าติดเชื้อมำเนื้อเยื่อที่ได้มาเตรียมในขั้นต่อไปโดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

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

1. นำทางเดินอาหารส่วนกลางของมิ่ง แช่ใน Bouin's fluid solution 24 ชั่วโมง
2. จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาล้างในสารละลายแอลกอฮอล์ 70% สามรอบหรือจนกว่าตัวอย่างใส
3. นำเนื้อเยื่อแช่ในแอลกอฮอล์ 70-95% ขึ้นละ 6 ชั่วโมง
4. แช่ในแอลกอฮอล์ 100% 1 ชั่วโมง
5. แช่ใน xylene 1 ชั่วโมง
6. แช่ใน ส่วนผสมระหว่าง xylene: melt paraplast อัตราส่วน 2: 1, 1: 1 และ 1: 2 ขึ้นละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 58 °C
7. หลังจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างมาฝังในพาราพลาสเทล
8. ตัดตัวอย่างโดยใช้เครื่อง rotary microtome ความหนา 6 μ m

9. ย้อมด้วยสี Periodic Acid Schiff's reagent (PAS) นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
10. ศึกษาอัตราการติดเชื้อระหว่าง เซลล์ที่ติดเชื้อมีกับไม่ติดเชื้อและบันทึกผลและถ่ายรูป

ขั้นตอนสำหรับการเตรียมการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Protocol for studying by Transmission electron microscopy (TEM))

1. นำฝั้จากแต่ละกลุ่มการทดลองหลังจากบ๊องเชื้อไปแล้ว 14 วัน มาผ่าแยกระบบทางเดินอาหารส่วนกลางออก
2. ล้างเนื้อเยื่อในบัฟเฟอร์ให้สะอาด แล้วแช่ในน้ำยารักษาสภาพ Karnowsky fixative ทันที ที่อุณหภูมิ 4 °C แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. ล้างด้วย 0.27 M fixing buffer pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
4. แช่ ชิ้นตัวอย่างใน 2% osmium tetroxide ที่ละลายใน 0.27 M fixing buffer pH 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. จุ่ม ตัวอย่างในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 30% 50% 70% 90% จนถึง 100% ขึ้นละ 10 นาที
6. แช่ชิ้นตัวอย่างในสารละลาย propylene oxide นาน 1 ชั่วโมง
7. แช่ชิ้นตัวอย่างในสารละลาย propylene oxide (ที่มี uranyl acetate และ phosphotungstic acid ละลายอยู่) นาน 12 ชั่วโมง
8. แช่ชิ้นตัวอย่างในส่วนผสมระหว่าง propylene oxide และ embedding media สัดส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 ตามลำดับขึ้นละ 1 ชั่วโมง
9. ฝังลงใน พลาสติกผสม Epon 812-aradite 502 ใน capsules.
10. นำเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ใน capsules ใส่ในตูบ่ม ที่อุณหภูมิ 35 °C 24 ชั่วโมง 45 °C 48 ชั่วโมง และ 65 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
11. ตัด Semi-thin ให้มีความหนาประมาณ 1µm โดยใช้ KB ultramicrotome และย้อมด้วยสี 1% toluidine blue ใน sodium borate solution.
12. ตัด Ultra-thin sections ให้มีความหนา 90 nm
11. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ลอยในน้ำกลั่นด้วย 200 mesh grids ย้อมสีตัวอย่างด้วย uranyl acetate และเพิ่มความชัดด้วย lead citrate.
12. จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Jeol 200SX (Tokyo, Japan)

3.6.2.3.4 ศึกษาปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์ (Hypopharyngeal gland protein contents: Bradford assay)

1. นำผึ้งที่ยังมีชีวิตอยู่จากแต่ละกรงๆ ละ 3 ตัว ในวันที่ 6 10 และวันที่ 14 หลังจากการ ป้อนเชื้อแล้ว แปะแท่งในตู้เย็นจนกว่าจะทำการวัดปริมาณโปรตีน
2. จากนั้นนำผึ้งที่แช่ไว้มาผ่าแยกเอาต่อมไฮโปฟาริงค์
3. นำต่อมไฮโปฟาริงค์จากผึ้งแต่ละตัวใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tubes ที่มีสารละลาย phosphate buffer pH.7.8 ปริมาตร 50 μ l บรรจุอยู่
4. บดให้ละเอียดแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 1,000 g เป็นเวลา 2 นาที
5. ดูดเอา Supernatant เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งแต่ละตัว โดยใช้วิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976).
6. เตรียมกราฟมาตรฐานจาก bovine serum albumin (BSA) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนในช่วงคลื่น 595 nm โดยใช้เครื่อง Shimadzu uv-visible spectrophotometer (UV-1610).
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยเปรียบจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยให้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี one way ANOVA

3.6.2.4 ผลของพรอพอลิสที่มีต่ออัตราการตาย อัตราการติดเชื้อ ร้อยละการติดเชื้อภายในเซลล์ปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ (Effect of propolis on honeybee mortality, infectivity and protein contents of hypopharyngeal glands)

3.6.2.4.1 การสกัดพรอพอลิส (Propolis extraction)

1. พรอพอลิสที่นำมาศึกษาครั้งนี้ เป็นพรอพอลิสที่ได้จากชันโรงชนิด *Trigona apicalis* ซึ่งได้มาจากฟาร์มเลี้ยงผึ้งในจังหวัด จันทบุรี นำพรอพอลิสที่ได้มาอบให้แห้งในตู้อบโดยอบที่อุณหภูมิ 80°C จนกว่าจะแห้ง จากนั้นนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 70% (w/v) โดยชั่งพรอพอลิส 60 มาละลายใน 100 ml ของ 70% เอทานอล นำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยพาราฟินให้สนิท จากนั้นนำไปแช่ยาโดยใช้เครื่องแช่เป็นเวลา 2 วัน โดยสารสกัดที่ได้จะคิดเป็นความเข้มข้นของพรอพอลิสเป็น 200%

2. นำสารสกัดที่ได้มาเตรียมให้ได้ความเข้มข้นสามระดับคือ 10% 20% และ 50% โดยนำสารสกัดที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น

3.6.2.4.2 ศึกษาการติดเชื้อ (Experimental infection)

1. แบ่งผึ้งที่แข็งแรงและไม่มีเชื้อในซีมาออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้ คือ

กลุ่มที่ 1: ป้อนด้วย 50% (w/v) สารละลายชูโครสที่ละลายในน้ำกลั่น และให้ pollen mix (โดยผสม 60 g เกสรกับ 17 ml สารละลายชูโครส 50% (w/v)) โดยให้กลุ่มนี้เป็นกลุ่ม positive control

กลุ่มที่ 2: กลุ่มควบคุมที่เป็น Negative control โดยป้อนผึ้งด้วย 50% (w/v) 50% (w/v) สารละลายชูโครสที่ละลายในน้ำกลั่น และมีสปอร์ของโนซีมาผสมอยู่ด้วย โดยป้อนด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 40,000 สปอร์ต่อผึ้งหนึ่งตัว และให้ pollen mix ที่ผสม 60 g ของเกสรกับ 17 ml ของสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายในเอทานอล 17.5% (v/v)

กลุ่มที่ 3: ป้อนด้วยสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายในน้ำกลั่นและมีสปอร์ของโนซีมา 40,000 สปอร์ต่อผึ้งหนึ่งตัว จากนั้นให้ pollen mix ที่ผสม 60 g ของเกสรกับ 17 ml ของสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายใน 10% propolis (v/v)

กลุ่มที่ 4: ป้อนด้วยสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายในน้ำกลั่นและมีสปอร์ของโนซีมา 40,000 สปอร์ต่อผึ้งหนึ่งตัว จากนั้นให้ pollen mix ที่ผสม 60 g ของเกสรกับ 17 ml ของสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายใน 20% propolis (v/v)

กลุ่มที่ 5: ป้อนด้วยสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายในน้ำกลั่นและมีสปอร์ของโนซีมา 40,000 สปอร์ต่อผึ้งหนึ่งตัว จากนั้นให้ pollen mix ที่ผสม 60 g ของเกสรกับ 17 ml ของสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายใน 50% propolis (v/v)

2. ทำการศึกษาทดลองตามข้อที่ 3.6.1.2

3. ตรวจสอบอัตราการตายของผึ้งในแต่ละวัน ทำการบันทึกจำนวนผึ้งที่ตายในแต่ละวันต่อแต่ละกรง

4. ศึกษาอัตราการตาย อัตราการติดเชื้อ ร้อยละของเซลล์ที่ติดเชื้อมีไม่ติดเชื้อและปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ตามขั้นตอนที่กล่าวไว้ขั้นตอน

5. ทำเช่นเดียวกันในผึ้งทั้ง 2 ชนิด คือผึ้ง *A. Florea* และ *A. cerana*

3.7 ผลของพรอพอลิสจากจังหวัดจันทบุรีที่มีต่ออัตราการตาย อัตราการติดเชื้อ ร้อยละการติดเชื้อภายในเซลล์ ปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งมัมและผึ้งโพรง

สารละลายพรอพอลิสที่ใช้ในการทดลองจะใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายและปรับความเข้มข้นโดยใช้น้ำให้ได้ 50% และ 70% โดยเก็บพรอพอลิสจากผึ้งพันธุ์ (*Apis. mellifera* Linneaus, 1758) และชันโรง (*Trigona. apicalis* Smith, 1875) จากจังหวัดจันทบุรี หลังจากนั้นทำการทดลองดังนี้

3.7.1. นำคอนผึ้งที่ไม่มีการติดเชื้อประกอบด้วยดักแด้ที่กำลังจะออกมาเป็นตัวเต็มวัย ใส่ในกรงผึ้งแล้วนำมาใส่ใน incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % เพื่อให้ผึ้งฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย โดยใช้เวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง

3.7.2 นำผึ้งตัวเต็มวัยที่ฟักออกมา (ซึ่งถือว่าเป็นผึ้งงานอายุ 1 วัน) จาก incubator แบ่งเป็นกลุ่ม 6 กลุ่ม โดยทำการทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำดังนี้

กลุ่มที่ 1 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำกลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร ให้เป็นกลุ่มควบคุม (CO)

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำกลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในสารละลายฟลอพอลิส 70%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร ให้เป็น Negative control (CP)

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ประกอบด้วยสปอร์ของโนซี มาปริมาณ 80,000 สปอร์/ตัว และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำ กลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาล ละลายในเอทานอล) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร ให้เป็น Positive control (CE)

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ประกอบด้วยสปอร์ของโนซี มาปริมาณ 80,000 สปอร์/ตัว และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำ กลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาล ละลายในน้ำ) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร (OP)

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ประกอบด้วยสปอร์ของโนซี มาปริมาณ 80,000 สปอร์/ตัว และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำ กลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาล ละลายในสารละลายฟลอพอลิส 50%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร (50P)

กลุ่มที่ 6 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ประกอบด้วยสปอร์ของโนซี มาปริมาณ 80,000 สปอร์/ตัว และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำ กลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาล ละลายในสารละลายฟลอพอลิส 50%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร (70P)

3.7.3. นำผึ้งแต่ละกลุ่มในข้อ 3.7.2 ใส่ในกรงเลี้ยงขนาดเล็ก (bee cage) ขนาด 80x135x130 mm³ (ผาด้านหน้ามีแผ่นเลื่อนเพื่อสะดวกต่อการนำเอาผึ้งออก ผังด้านหลังในกรง บรรจุ queen pheromone ที่ยึดติดกับกระดาษแข็งยึดไว้แน่นกับกรง) โดยแยกใส่กรงละ 50 ตัว/ treatment นำกรงผึ้งทั้งหมด ใส่ใน incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 50%

3.7.4 ศึกษาอัตราการตาย (bee mortality) โดยตรวจนับอัตราการตายของผึ้งแต่ละกลุ่ม ทุกวัน จนกระทั่งครบ 30 วัน อัตราการติดเชื้อ (infection rate) โดยการตรวจหาเชื้อและนับจำนวน สปอร์ของผึ้งแต่ละตัวโดยใช้ Hemocytometer และศึกษาร้อยละของการติดเชื้อของเซลล์ที่ติดเชื้อ

(infected cells) กับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ (non infected cells) ของเซลล์เยื่อทางเดินอาหารส่วนกลาง ตลอดจนศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ของต่อมไฮโปฟาลิงค์ (hypopharyngeal glands) และเยื่อผิวของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของผึ้งในกลุ่มต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) รวมทั้งศึกษาผลของเชื้อต่อการผลิตปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาลิงค์

๑๑๕.๗๙๙

ค ๓๘๙ ๑๓

3 0 1 5 0 9

บทที่ 4

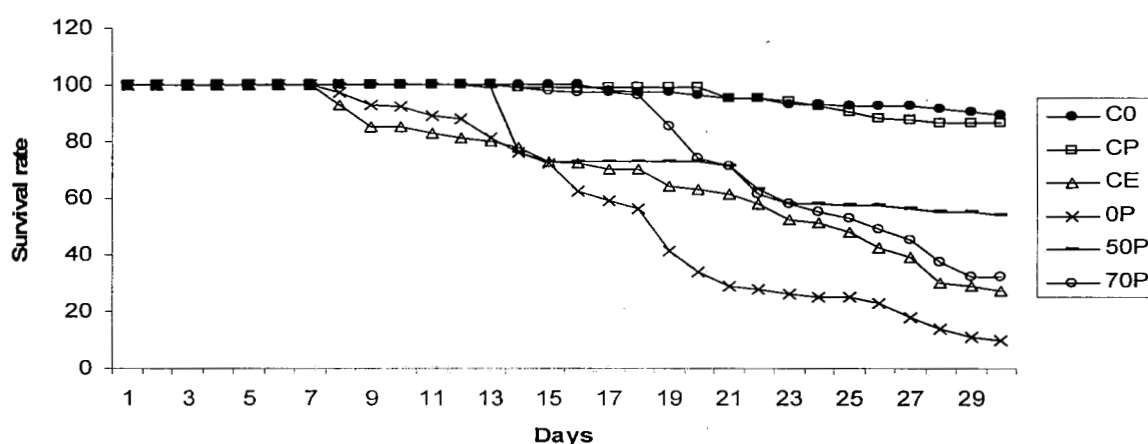
ผลการศึกษา

Results

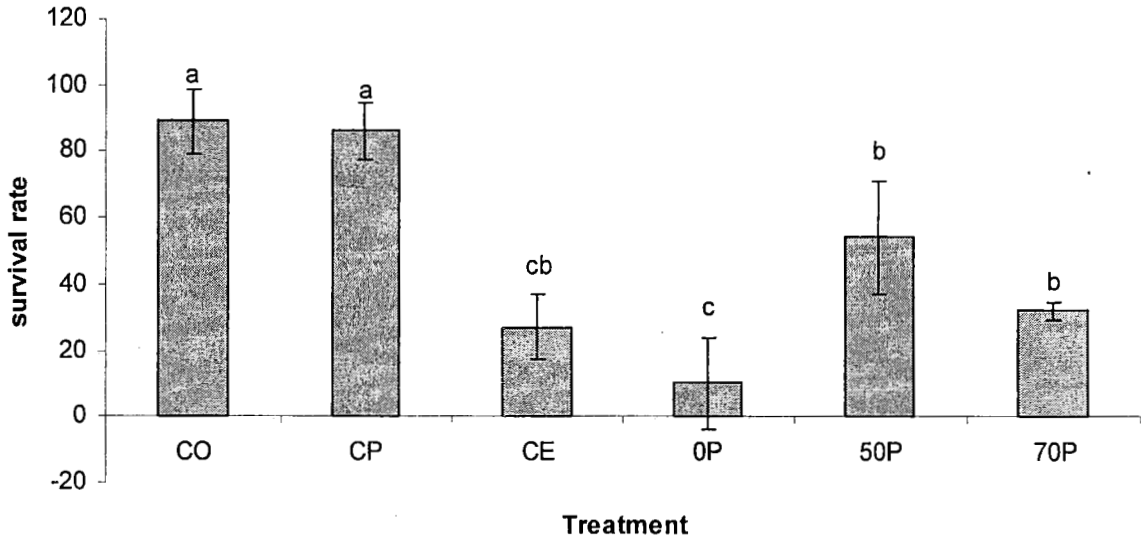
4.1 ผลของพรอปอลิสที่มีต่ออัตราการรอดชีวิต การติดเชื้อ ร้อยละการติดเชื้อภายในเซลล์ และค่าโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงซ์ของผึ้งมัม (Effect of propolis on honeybee survival rate, infectivity, infection rate, infection ratio and protein content of hypopharyngeal glands of *Apis florea*)

4.1.1 อัตราการรอดชีวิตของผึ้งมัม (Survival rate of *A. florea*)

การรอดชีวิตของผึ้งมัม คือ $89\% \pm 9.89$ $86\% \pm 8.48$ $27\% \pm 9.89$ $10\% \pm 14.14$ $54\% \pm 16.97$ และ $32\% \pm 2.8$ ในกลุ่ม CO CP CE OP 50P และ 70P ตามลำดับ กลุ่มที่ให้พรอปอลิส 50P มีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่ม OP และ CE ส่วน 70P มีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่ม OP แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม CE กลุ่มที่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุดคือ OP อย่างไรก็ตามกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคือ CO ซึ่งไม่แตกต่างกับกลุ่ม CP ($F_5=16.60$, $P<0.0019$) ดังรูปที่ 4.1 และ รูปที่ 4.2



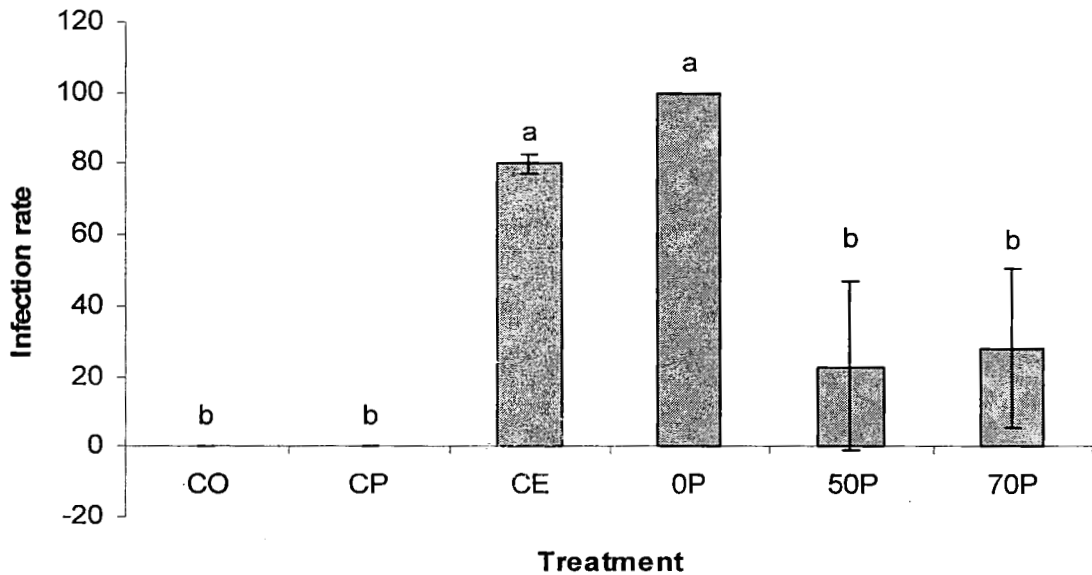
รูปที่ 4.1 แสดงอัตราการรอดชีวิตผึ้งมัม (*A. florea*) หลังจากทำการบ่มสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพรอปอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพรอปอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพรอปอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP เป็นระยะเวลา 30 วัน (ANOVA- Duncan's multiple range test, ($F_5=16.60$, $P<0.0019$))



รูปที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ $\pm$ SD ของผึ้งมัม (*A. florea*) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพรอพอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพรอพอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพรอพอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP เป็นระยะเวลา 30 วัน (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5 = 16.60$, $P < 0.0019$)

4.1.2 อัตราการติดเชื้อของผึ้งมัม (Infection rate of *A. florea*)

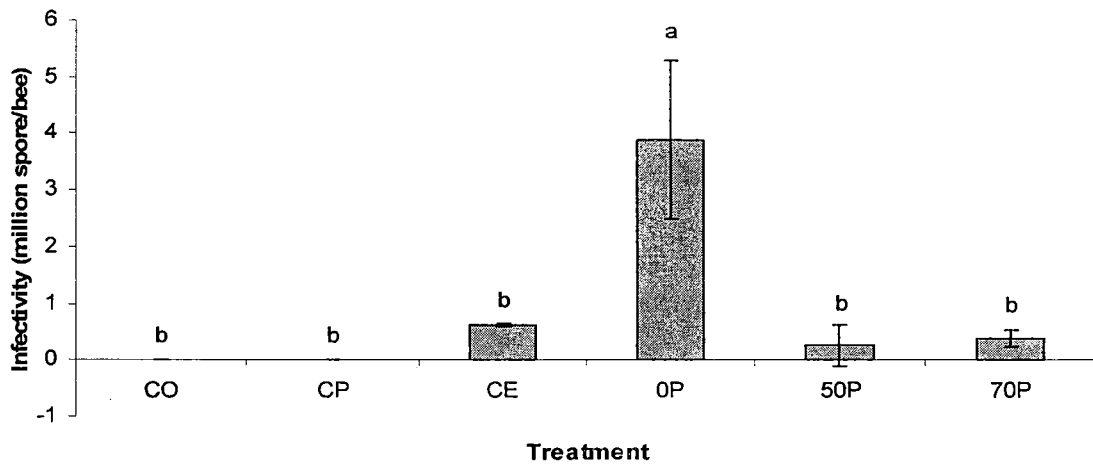
ผึ้งในกลุ่ม CO และ CP ไม่พบติดเชื้อการติดเชื้อตลอดการศึกษาและในกลุ่มทดลองทั้งหมดพบการติดเชื้อโนซีมา อัตราการติดเชื้อในกลุ่ม OP CE 50P และ 70P คือ 100% 80% $\pm$ 2.82 23% $\pm$ 24.04 และ 28% $\pm$ 22.63 ตามลำดับ เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า กลุ่ม OP และ CE ไม่มีความแตกต่างกันแต่แตกต่างกับกลุ่ม CO CP 50P และ 70P อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_5 = 19.28$, $P < 0.0012$) อย่างไรก็ตามอัตราการติดเชื้อสูงที่สุดพบในกลุ่ม OP ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยการติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ $\pm$ SD ของผึ้งมิม (*A. florea*) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายฟรอฟอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายฟรอฟอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายฟรอฟอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5 = 19.28$, $P < 0.0012$)

4.1.3 ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์/ตัวของผึ้งมิม (Infectivity of *A. florea*)

ผึ้งในกลุ่มควบคุมไม่พบการติดเชื้อตลอดการศึกษา (CO และ CP) ผึ้งในกลุ่มที่ให้เชื้อสามารถตรวจพบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบค่าเฉลี่ย $0.631 \times 10^6 \pm 0.028$ (ช่วงค่าเฉลี่ยของการติดเชื้อ $0.002 \times 10^6 - 2.535 \times 10^6$ สปอร์/ตัว) $3.896 \times 10^6 \pm 1.403$ (ช่วงค่าเฉลี่ยของการติดเชื้อ $0.013 \times 10^6 - 10.695 \times 10^6$ สปอร์/ตัว) $0.265 \times 10^6 \pm 0.363$ (ช่วงค่าเฉลี่ยของการติดเชื้อ $0.002 \times 10^6 - 2.490 \times 10^6$ สปอร์/ตัว) และ $0.394 \times 10^6 \pm 0.163$ (ช่วงค่าเฉลี่ยของการติดเชื้อ $0.003 \times 10^6 - 1.35 \times 10^6$ สปอร์/ตัว) ผึ้งในกลุ่ม CE OP 50 และ 70P ตามลำดับ กลุ่มที่พบการติดเชื้อต่อตัวสูงที่สุดคือ OP ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_5 = 12.76$, $P < 0.0038$) ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งมัม (*A. florea*) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพรวพอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพรวพอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพรวพอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5=12.76$, $P<0.0038$)

ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งมัม ในกลุ่ม CO CP CE OP 50P และ 70P

ตารางที่ 4.1 กลุ่ม CO คือ ผึ้งมัมที่ป้อนสารละลายยาชูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายยาชูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม	จำนวนสปอร์ต่อตัว ($\times 10^6$ สปอร์/ตัว)									
	1	2	3	4	5	6	2	8	9	10
COI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	22	23	24	25	16	17	28	29	30
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
COI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

ตารางที่ 4.2 กลุ่ม CP คือ ผึ้งมิมที่ป้อนสารละลายชูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (ละลายในพรอพอลิส 70%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม	จำนวนสปอร์ต่อตัว ($\times 10^6$ สปอร์/ตัว)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

ตารางที่ 4.3 กลุ่ม CE คือ ผงมิมที่ป้อนสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) มีสปอร์ Nosema 80,000 สปอร์ และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม 60 กรัม ผสมกับสารละลายซูโครส 50% (ละลายใน ethanol) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม	จำนวนสปอร์ต่อตัว ($\times 10^6$ สปอร์/ตัว)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CEI	0.049	0.040	0.011	0.008	0.012	1.105	0.925	0.012	0.011	0.130
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0.007	0	0.031	0	0	0.265	0.182	2.210	0.275	0.220
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	1.000	4.260	0.725	0.160	0.300	0.004	3.520	1.845	0.735	0.010
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0.020	0.010	2.535	0.300	0.240	1.854	0.960	0.021	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0.200	0.110	0.012	0.050	0.265	0	0.350	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CEI	1.315	0	0.006	0.009	4.070	0.056	0.010	0.035	0	0.087
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0.395	0.005	0.365	0.300	0.130	0.890	0.980	1.400	0.890	0.760
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0	2.405	0	0	0	0	0.890	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0.997	0.030	1.110	0.200	0	0.900	1.230	1.300	0.880	0.020
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0.007	0.008	0.005	0.075	1.100	0.930	0.004	0.160	0.540	0.037

ตารางที่ 4.4 กลุ่ม OP คือ ผึ้งมีมที่ป้องกันสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) มีสปอร์ Nosema 80,000 สปอร์ และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

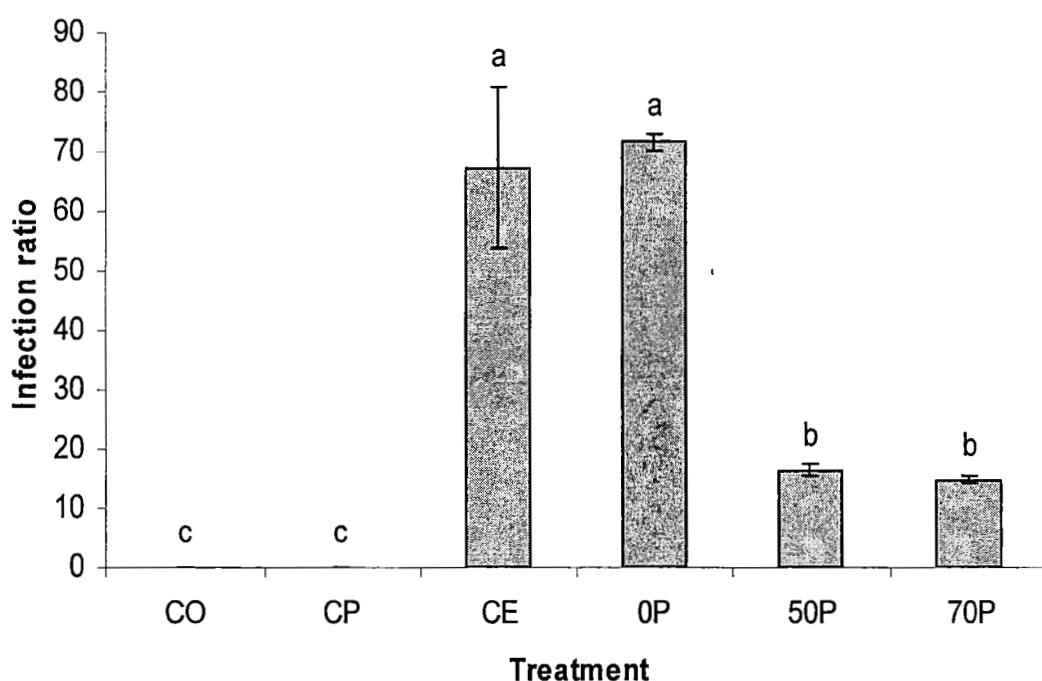
กลุ่ม	จำนวนสปอร์ต่อตัว ($\times 10^6$ สปอร์/ตัว)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OP1	0.034	0.030	0.615	0.370	1.610	0.350	0.965	0.845	8.100	2.245
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	3.165	3.975	0.610	3.895	1.855	0.855	2.860	0.715	2.050	7.990
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	2.445	0.910	0.535	0.230	3.110	5.830	2.015	2.155	3.985	2.270
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	3.535	3.835	2.550	5.565	5.085	4.310	3.520	1.780	1.155	8.095
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OP2	5.810	0.030	2.265	2.615	0.013	2.456	8.225	9.707	1.580	6.400
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0.053	0.056	1.820	0.010	2.570	4.425	7.500	2.200	0.485	5.690
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2.130	2.190	8.800	5.470	2.870	0.395	5.265	7.200	5.865	4.585
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	3.805	2.145	0.820	6.900	2.155	4.690	4.825	13.500	9.385	5.815
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	7.495	3.980	6.630	5.170	5.585	4.440	20.400	8.610	4.485	17.700
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0.090	10.695	4.595	3.070	1.570	0.985	1.140	9.985	1.725	1.810

ตารางที่ 4.5 กลุ่ม 50P คือ สิ่งมีชีวิตที่ป้อนสารละลายยาซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) มีสปอร์ Nosema 80,000 สปอร์ และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม 60 กรัม ผสมกับสารละลายยาซูโครส 50% (ละลายในพรอพอลิส 50%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม	จำนวนสปอร์ต่อตัว (×10 ⁶ สปอร์/ตัว)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
50P1	0.008	0.007	0.005	0	0.003	0.002	0.003	0	1.285	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0	0	1.760	0	0	0.002	0.012	2.490	0	0
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	3.600	0	0	0.015	0.004	0	0.009	0	0.009	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0.005	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0	0	0.002	0	0	0	0.003	0	1.185	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
50P2	0	0	0	0	0	0.013	0	0	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0.008	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0	0	0	0	0.003	0	0	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

4.1.4 ร้อยละของเซลล์ที่ติดเชื้อและเซลล์ไม่ติดเชื้อ (Infection ratio) วันที่ 14 หลังจากให้เชื้อของ ผึ้งมัม (Infection ratio of *A. florea*)

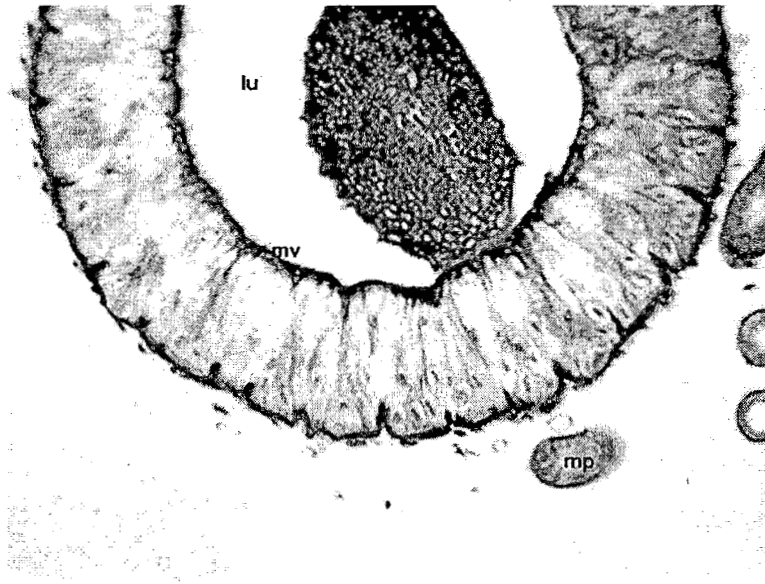
กลุ่ม CO และ CP ไม่พบการติดเชื้อภายในเซลล์ และพบการติดเชื้อภายในเซลล์ ในกลุ่ม CE OP 50P และ 70P คือ $67.23\% \pm 13.68$ $71.53\% \pm 1.6$ $16.40\% \pm 0.98$ และ $14.73\% \pm 0.62$ ตามลำดับ กลุ่ม OP ติดเชื้อภายในเซลล์สูงที่สุดและไม่แตกต่างกันกับกลุ่ม CE ทั้ง OP และ CE แตกต่างกับกลุ่ม 50P และ 70P อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_5=66.69$, $P<0.0001$) อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ติดเชื้อระหว่าง 50P และ 70P ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.5 แสดงร้อยละของเซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งมัม (*A. florea*) หลังจากทำการบ่อนสปอร์ของเชื้อโนซีมา (วันที่ 14) ที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพอร์พอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพอร์พอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพอร์พอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5=66.69$, $P<0.000$)

ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscopic study) ฝั่มมีมในกล่มควบคม (CO)

ไม่พบการติดเชื้อโนซีมาในฝั่มกล่มควบคม เซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลางของฝั่มมีรูปร่างเป็นแท่งทรงกระบอก (columnar) และบริเวณส่วนยอดของเซลล์มี microvilli อยู่หนาแน่น ส่วนรูปร่างของนิวเคลียสเป็นรูปไข่อยู่บริเวณฐานของเซลล์ จะสังเกตเห็นทางเดินอาหารส่วนกลางมีลักษณะโค้งงอขึ้นลง (folding)



รูปที่ 4.6 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของฝั่มงานของฝั่มมีมกล่มควบคมในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 400x) (lu, lumen; mv, microvilli; mp, malpighian tubule)



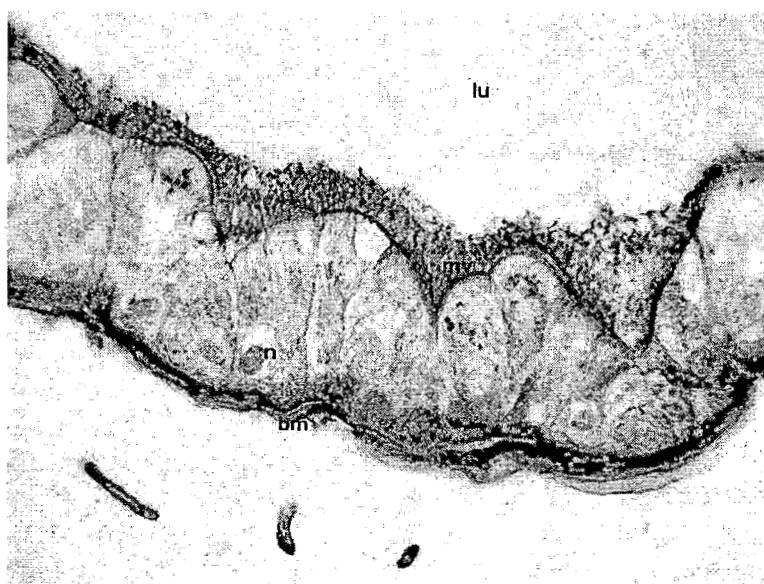
รูปที่ 4.7 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของฝั่มงานของฝั่มมีมกล่มควบคมในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 1000x) (lu, lumen; mv, microvilli; bm, basement membrane; n, nucleus)

ผึ้งมัมในกลุ่มควบคุม (CP)

ไม่พบการติดเชื้อในผึ้งมัมในกลุ่ม CP เซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งมีรูปร่างเป็นแท่งทรงกระบอก (columnar) และบริเวณส่วนยอดของเซลล์มี microvilli อยู่หนาแน่น ลักษณะเหมือนกับกลุ่ม CO ส่วนรูปร่างของนิวเคลียสเป็นรูปไข่อยู่บริเวณฐานของเซลล์



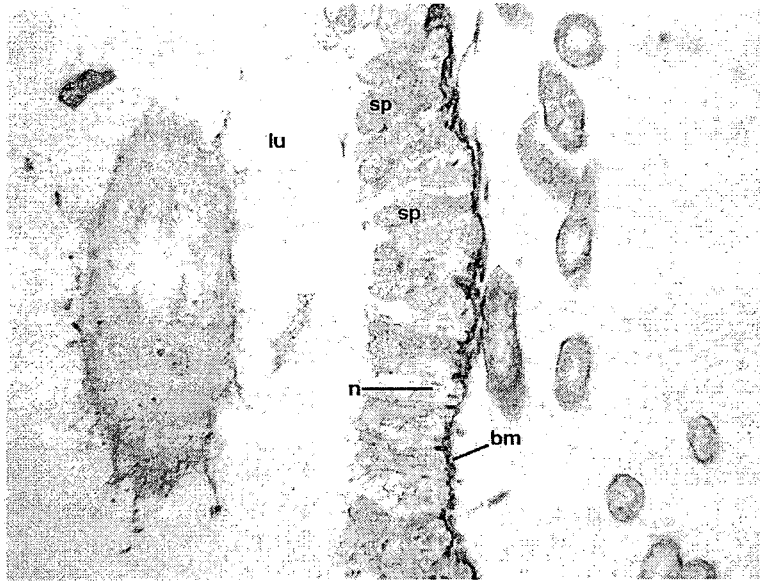
รูปที่ 4.8 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมัมกลุ่ม CP ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 400x) (lu, lumen; n, nucleus)



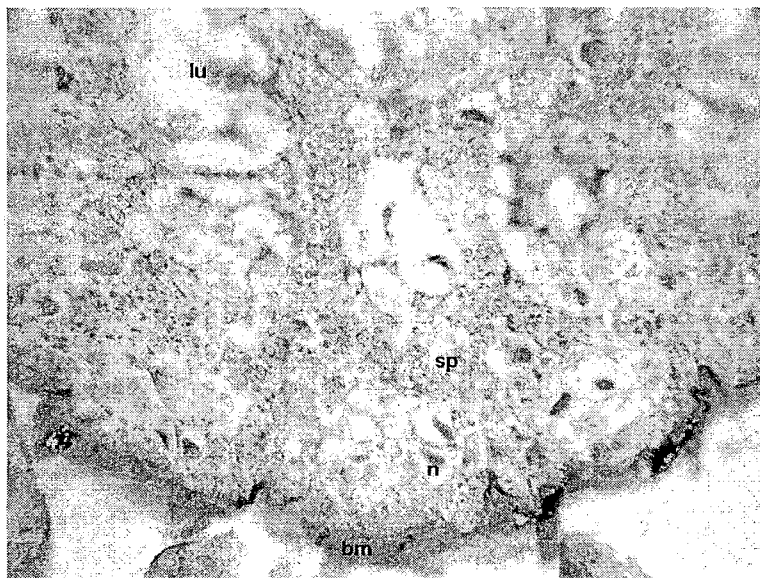
รูปที่ 4.9 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมัมกลุ่ม CP ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 1000x) (lu, lumen; mv, microvilli; bm, basement membrane; n, nucleus)

ผนังม้ามในกลุ่ม (CE)

โครงสร้างของเซลล์ได้รับความเสียหายจากการติดเชื้อสามารถพบสปอร์โนซีมาได้ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลางของผนังและที่บริเวณปลายอิสระของเซลล์เสียหาย บริเวณส่วนยอดของเซลล์เยื่อบุผิวที่ติดเชื้อได้รับความเสียหาย และไซโตพลาสซึมขยายใหญ่ขึ้น



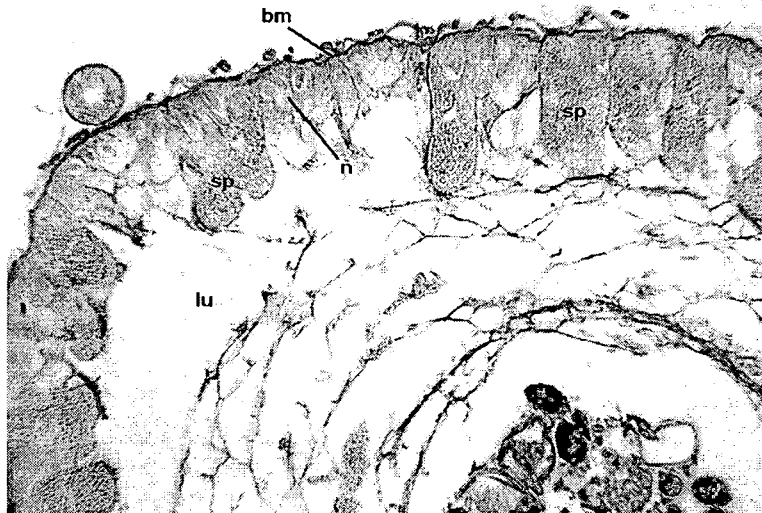
รูปที่ 4.10 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผนังงานของผนังม้ามกลุ่ม CE ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 400x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)



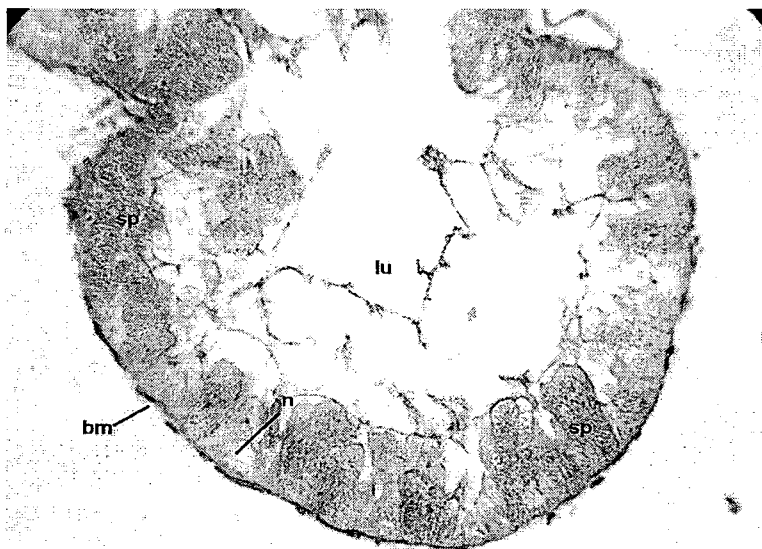
รูปที่ 4.11 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผนังงานของผนังม้ามกลุ่ม CE ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 1000x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)

ผึ้งมัมในกลุ่ม (OP)

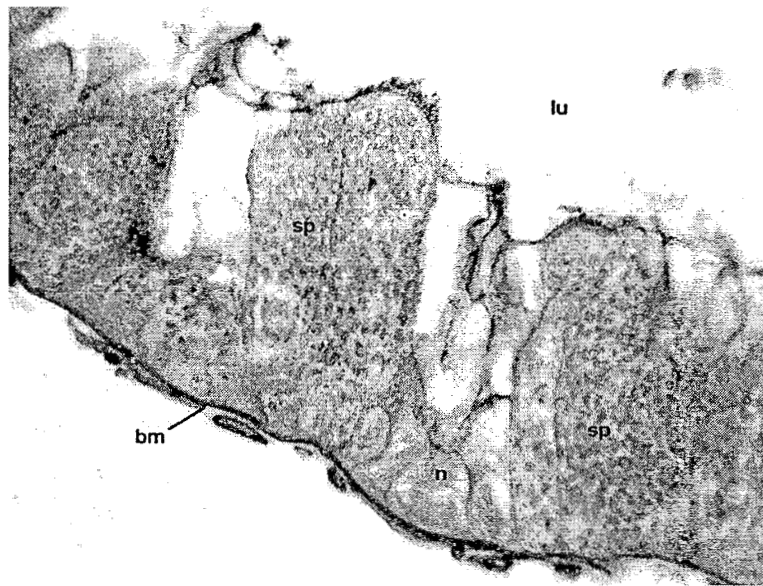
สามารถพบสปอร์ในชีมาได้ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้ง สังเกตเห็นสปอร์ที่เจริญเต็มที่แล้ว (mature spores) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทางเดินอาหารของผึ้งที่ติดเชื้อมาก่อน นอกจากนี้ยังพบว่า microvilli ที่บริเวณปลายอิสระของเซลล์เสียหาย บริเวณส่วนยอดของเซลล์เยื่อบุผิวที่ติดเชื้อได้รับความเสียหาย และไซโตพลาสซึมขยายใหญ่ขึ้นซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับกลุ่ม CE อย่างไรก็ตามเซลล์ทางเดินอาหารบางเซลล์ไม่ติดเชื้อโดยสามารถพบได้ใกล้กับกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อ



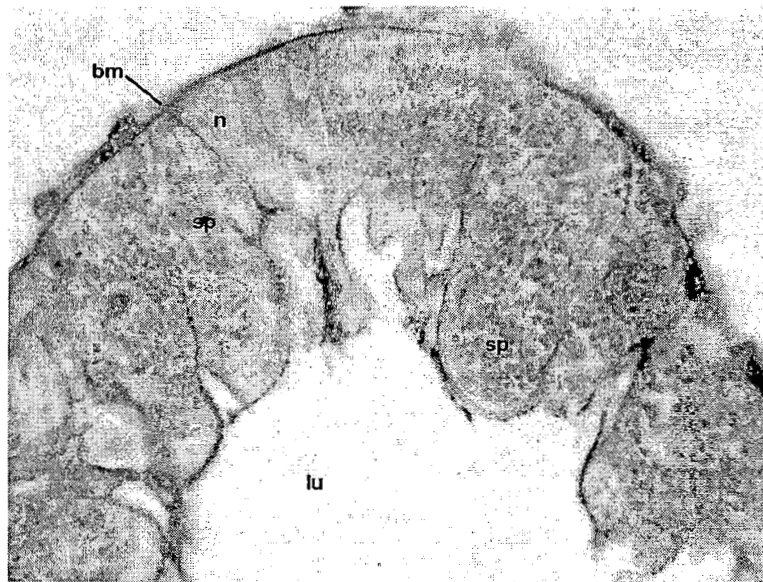
รูปที่ 4.12 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมัมกลุ่ม OP ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 400x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)



รูปที่ 4.13 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมัมกลุ่ม OP ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 400x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)



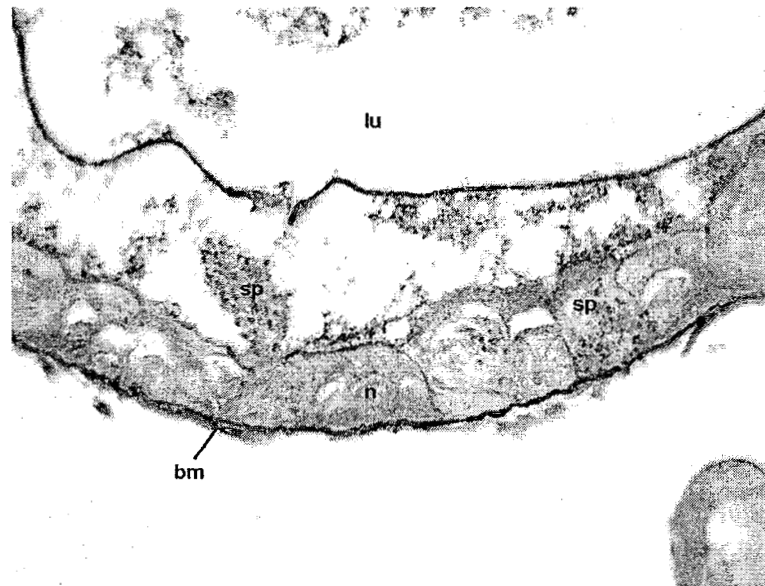
รูปที่ 4.14 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของแมลงวันของแมลงมีกลุ่ม OP ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 1000x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)



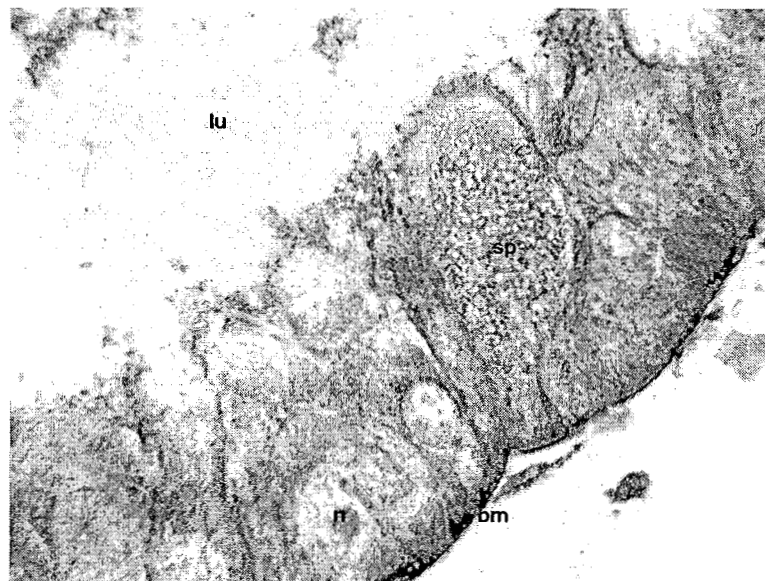
รูปที่ 4.15 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของแมลงวันของแมลงมีกลุ่ม OP ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 1000x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)

ผึ้งมีมในกลุ่ม (50P)

สามารถพบสปอร์โนซีมาได้ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งบางเซลล์ โครงสร้างของเซลล์ได้รับความเสียหายไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OP



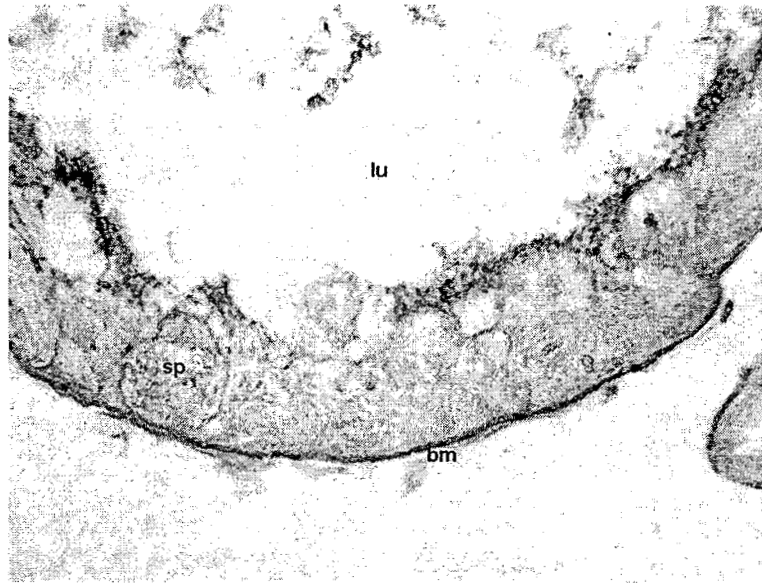
รูปที่ 4.16 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมีมกลุ่ม 50P ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 400x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)



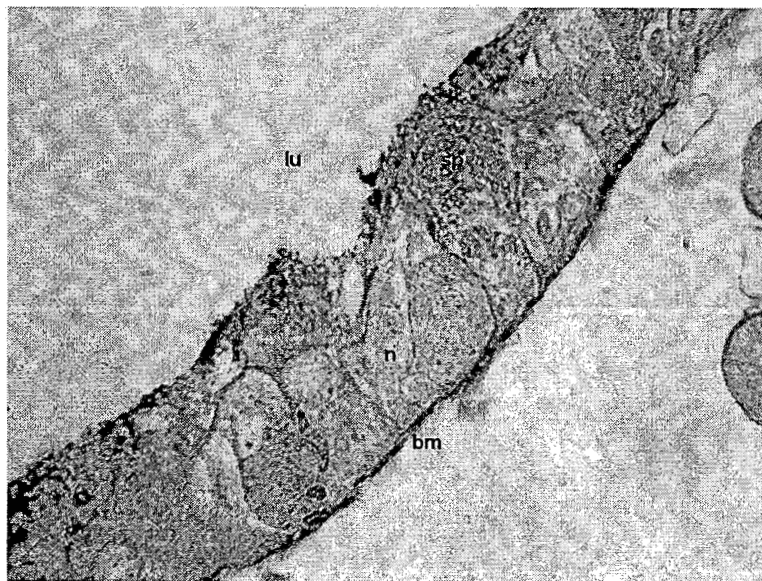
รูปที่ 4.17 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งงานของผึ้งมีมกลุ่ม 50P ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 1000x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)

ฝั่มมีมในกลุ่ม (70P)

พบสปอร์โนซีมาในไซโตพลาสซึมของเซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลางของฝั่มบางเซลล์เช่นเดียวกับกลุ่ม 50P



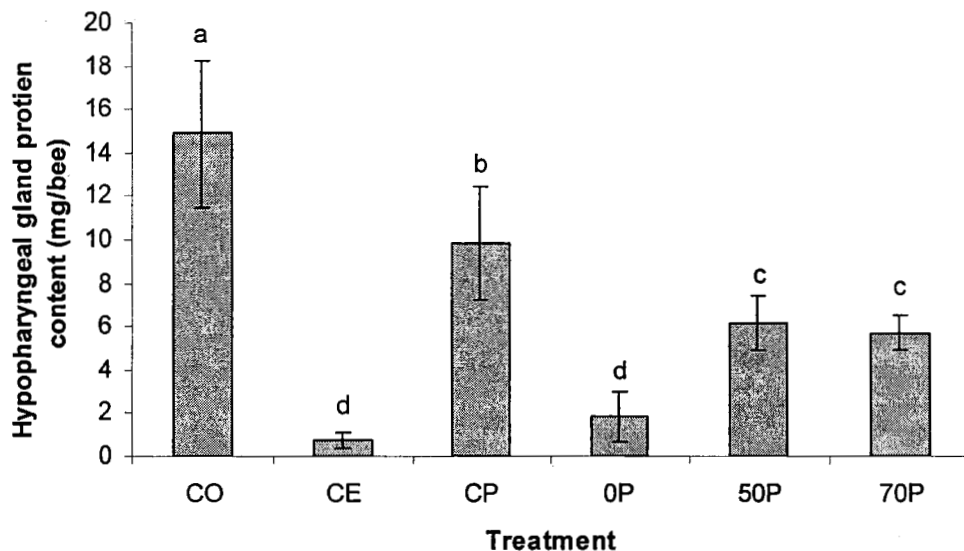
รูปที่ 4.18 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของฝั่มงานของฝั่มมีมกลุ่ม 70P ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 400x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)



รูปที่ 4.19 แสดงทางเดินอาหารส่วนกลางของฝั่มงานของฝั่มมีมกลุ่ม 70P ในวันที่ 14 หลังจากการทดลอง (PAS, 400x) (lu, lumen; sp, spores; bm, basement membrane; n, nucleus)

4.1.5 โปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงซ์ของผึ้งมิม (Protein contents of hypopharyngeal glands of *A. florea*)

ค่าเฉลี่ยของโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงซ์ของผึ้งมิมในวันที่ 14 หลังจากผึ้งติดเชื้อ คือ 14.86 ± 3.35 มิลลิกรัม/ตัว 0.77 ± 0.36 มิลลิกรัม/ตัว 9.88 ± 2.61 มิลลิกรัม/ตัว 1.81 ± 1.16 มิลลิกรัม/ตัว 6.15 ± 1.27 มิลลิกรัม/ตัว และ 5.68 ± 0.76 มิลลิกรัม/ตัว ในกลุ่ม CO CP CE OP 50P และ 70P ตามลำดับ กลุ่ม CO มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด กลุ่ม 50P และ 70P มีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกันและทั้งสองกลุ่มยังมีปริมาณโปรตีนมากกว่ากลุ่ม CE และ OP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_5 = 21.25$, $P < 0.0001$)

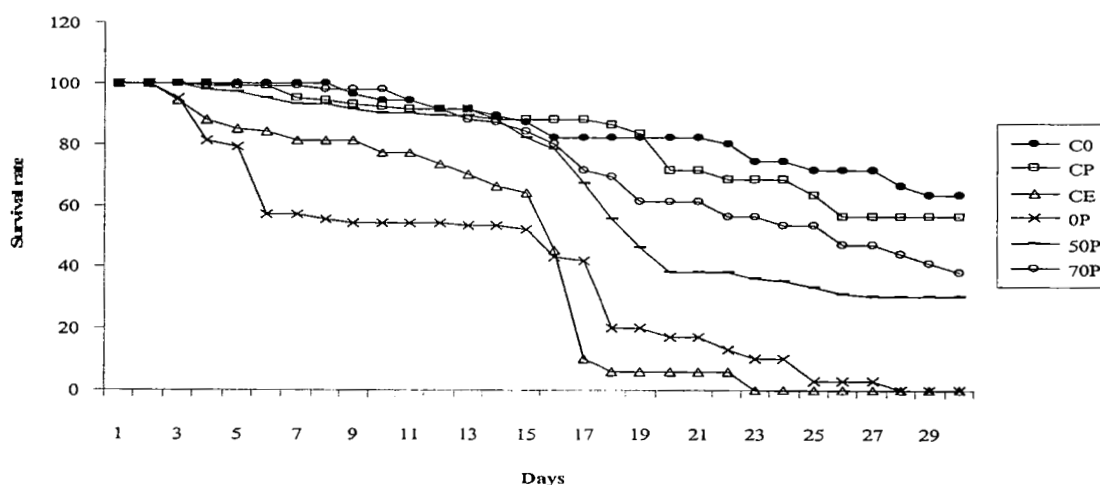


รูปที่ 4.20 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อตัว) จากต่อมไฮโปฟาริงซ์ของผึ้งมิมในวันที่ 14 หลังจากทำการบ่อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพวอพอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพวอพอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพวอพอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5 = 21.25$, $P < 0.0001$)

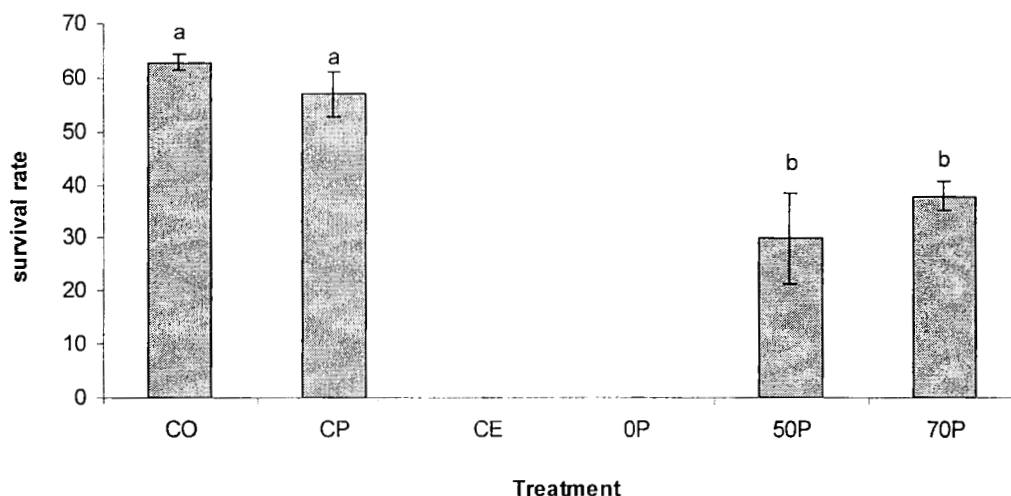
4.2 ผลของพรอพอลิสที่มีต่ออัตราการรอดชีวิต การติดเชื้อ ร้อยละการติดเชื้อภายในเซลล์ และค่าโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงซ์ของผึ้งโพรง (Effect of propolis on honeybee survival rate, infectivity, infection rate, infection ratio and protein content of hypopharyngeal glands of *Apis cerana*)

4.2.1 อัตราการรอดชีวิตของผึ้งโพรง (Survival rate of *A. cerana*)

ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตหลังจากการป้อนเชื้อโนซีมาเป็นระยะเวลา 30 วัน จากการทดลองพบว่าผึ้งในกลุ่มที่ได้รับเชื้อโนซีมาจะเริ่มพบการตายเร็วกว่ากลุ่มควบคุม โดยเริ่มพบการตายของผึ้งในวันที่ 3 หลังจากการป้อนเชื้อแล้วในขณะที่กลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (CO และ CP) เริ่มพบการตายของผึ้งในวันที่ 7 และ 9 นอกจากนี้ยังพบว่าผึ้งในกลุ่มทดลอง CE และ OP ตายหมดทุกตัวในวันที่ 24 และ 28 ของการทดลอง ทั้งสองกลุ่มมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 0% ในขณะที่กลุ่ม 50P และ 70P มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม CO และ CP โดยมีอัตราการรอดชีวิตดังนี้คือ $30 \pm 8.48\%$ และ $38 \pm 2.42\%$ ตามลำดับ แต่เมื่อนำอัตราการรอดชีวิตของกลุ่ม 50P และ 70P เทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (CO และ CP) พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า ซึ่งอัตราการรอดชีวิต $63 \pm 1.41\%$ และ $57 \pm 4.24\%$ และเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_5=88.11$, $P<0.0001$) ดังรูปที่ 4.21 และ รูปที่ 4.22



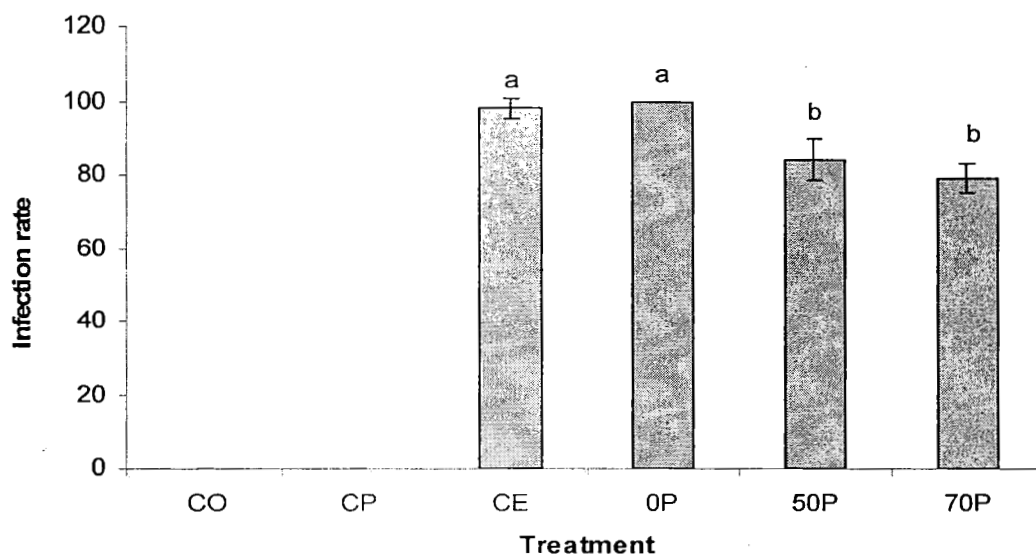
รูปที่ 4.21 แสดงอัตราการรอดชีวิตผึ้งโพรง (*A. cerana*) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพรอพอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพรอพอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพรอพอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP เป็นระยะเวลา 30 วัน (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5=88.11$, $P<0.0001$)



รูปที่ 4.22 แสดงค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ $\pm$ SD ของผึ้งโพรง (*A. cerana*) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้ สารละลายพอร์พอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพอร์พอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพอร์พอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP เป็นระยะเวลา 30 วัน (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5=88.11$, $P<0.0001$)

4.2.2 อัตราการติดเชื้อของผึ้งโพรง (Infection rate of *A. cerana*)

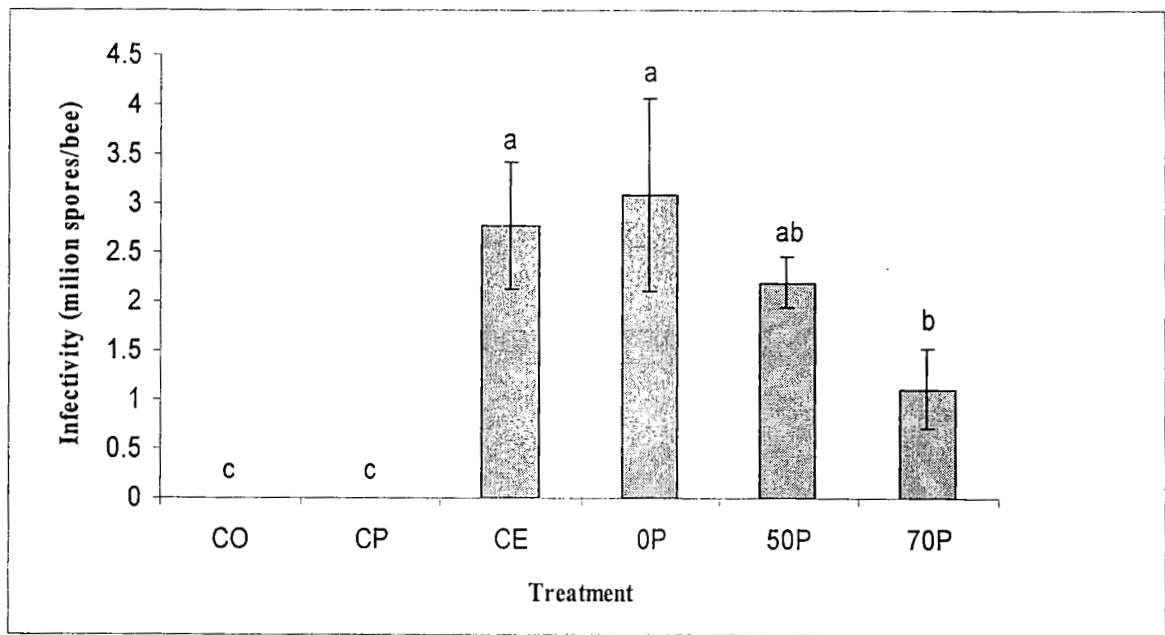
จากการศึกษาอัตราการติดเชื้อพบว่าตลอดระยะการศึกษาผึ้งในกลุ่ม CO และ CP ไม่พบการติดเชื้อ ในขณะที่ยวกันผึ้งในกลุ่มทดลองที่เหลือทั้งหมด คือกลุ่ม CE OP 50P และ 70P พบการติดเชื้อโนซีมา ทุกกลุ่มโดยมี อัตราการติดเชื้อตามลำดับดังนี้ คือ $98 \pm 2.82\%$ 100% $84 \pm 5.65\%$ และ $79 \pm 4.24\%$ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าในกลุ่ม OP มีอัตราการติดเชื้อสูงสุด แต่เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการติดเชื้อของผึ้งในกลุ่ม OP และ CE ไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบทั้งสองกลุ่มนี้กับผึ้งในกลุ่ม 50P และ 70P ที่ได้รับสารสกัดพอร์พอลิสหลังการติดเชื้อพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_5=462.66$, $P<0.0001$) ดังรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 แสดงค่าเฉลี่ยการติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ $\pm$ SD ของผึ้งโพรง (*A. cerana*) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพรอพอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพรอพอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพรอพอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5=462.66$, $P<0.0001$)

4.2.3 ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์/ตัวของผึ้งโพรง (Infectivity of *A. cerana*)

จากการศึกษาปริมาณการติดเชื้อหรือจำนวนสปอร์เฉลี่ยต่อตัวบริเวณทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งโพรง (*A. cerana*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าผึ้งในกลุ่มควบคุมคือ กลุ่ม CO และ CP ไม่พบการติดเชื้อตลอดการศึกษา ส่วนผึ้งในกลุ่มที่ให้เชื้อกลุ่มต่างๆ สามารถตรวจพบจำนวนสปอร์เฉลี่ยต่อตัวได้ตามลำดับดังนี้ คือกลุ่ม CE พบค่าเฉลี่ย $2.77 \times 10^6 \pm 0.64$ (ช่วงค่าเฉลี่ยของการติดเชื้อ $0 - 20.325 \times 10^6$ สปอร์/ตัว) กลุ่ม OP มีค่าเฉลี่ยการติดเชื้ออยู่ที่ $3.08 \times 10^6 \pm 0.98$ (ช่วงค่าเฉลี่ยของการติดเชื้อ $0.032 \times 10^6 - 47.70 \times 10^6$ สปอร์/ตัว) กลุ่ม 50P มีค่าเฉลี่ย $2.19 \times 10^6 \pm 0.26$ (ช่วงค่าเฉลี่ยของการติดเชื้อ $0 - 9.88 \times 10^6$ สปอร์/ตัว) และกลุ่ม 70P มีค่าเฉลี่ย $1.1086 \times 10^6 \pm 0.405$ (ช่วงค่าเฉลี่ยของการติดเชื้อ $0 - 10.175 \times 10^6$ สปอร์/ตัว) ซึ่งพบว่าเป็นกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยการติดเชื้อน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกับกลุ่ม 50P แต่มีความแตกต่างกับกลุ่ม CE และกลุ่ม OP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_5=13.82$, $P<0.0030$) ส่วนกลุ่มที่พบการติดเชื้อต่อตัวสูงที่สุดคือ OP ดังรูปที่



รูปที่ 4.24 ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งโพรง (*A. cerana*) หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมา ที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว และให้สารละลายพอร์พอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพอร์พอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพอร์พอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5=13.82$, $P<0.0030$)

ตารางแสดงจำนวนสปอร์ต่อตัวของผึ้งโพรง ในกลุ่ม CO CP CE OP 50P และ 70P

ตารางที่ 4.7 กลุ่ม CO คือ ผึ้งโพรงที่ป้อนสารละลายชูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม	จำนวนสปอร์ต่อตัว ($\times 10^6$ สปอร์/ตัว)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CO1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CO1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

ตารางที่ 4.8 กลุ่ม CP คือ ผึ้งโพรงที่ป้อนสารละลายชูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (ละลายในพรอพอลิส 70%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

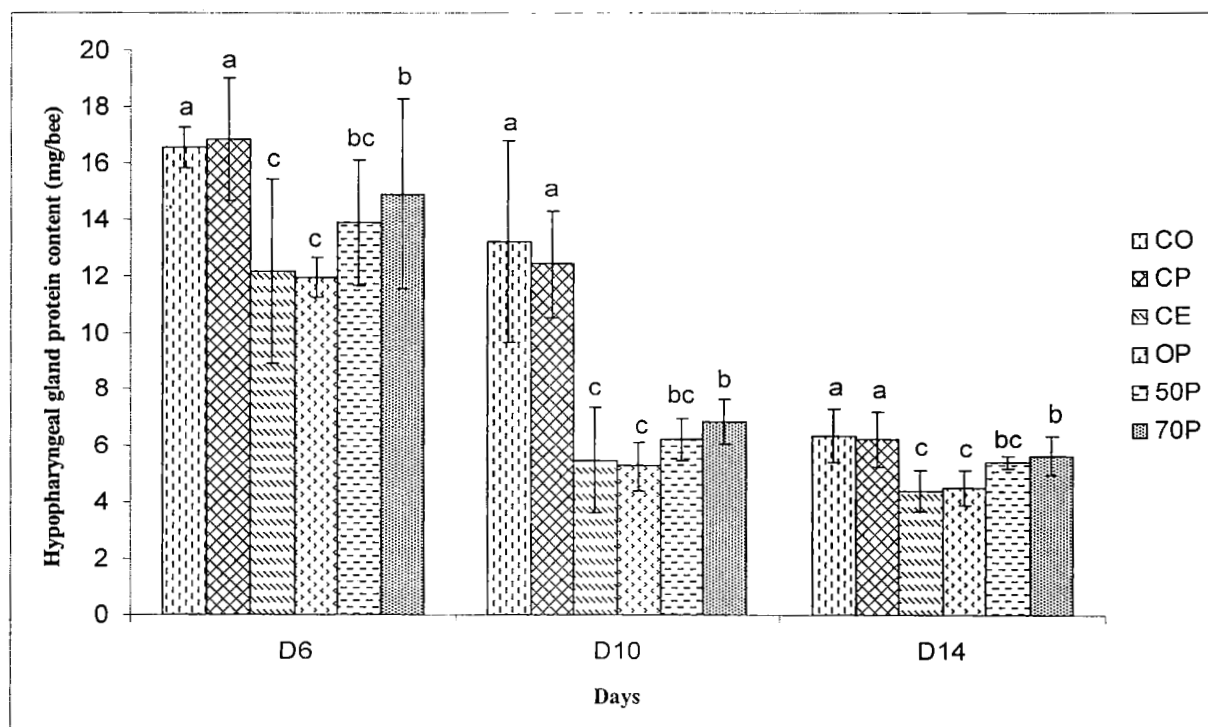
กลุ่ม	จำนวนสปอร์ต่อตัว ($\times 10^6$ สปอร์/ตัว)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

ตารางที่ 4.10 กลุ่ม OP คือ ผังโพรงที่ป้อนสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) มีสปอร์ Nosema 80,000 สปอร์ และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม	จำนวนสปอร์ต่อตัว ($\times 10^6$ สปอร์/ตัว)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OP1	0.035	0.045	0.048	0.008	0.0014	0.154	0.34	0.360	0.074	3.50
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	0.240	0.375	0.170	0.0420	0.060	0.375	0.125	7.715	6.385	3.615
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	7.350	9.315	0.110	0.958	0.158	0.201	8.720	0.280	4.330	10.835
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	8.665	1.740	11.940	9.165	47.700	0.68	0.085	4.355	0.0763	0.053
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OP2	2.400	0.920	5.190	6.305	6.365	4.540	5.150	3.600	1.855	2.3850
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0.036	0.028	0.500	0.475	0.315	0.380	0.265	9.500	0.240	0.500
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	6.015	4.027	0.200	3.85	0.025	5.195	10.66	7.665	2.950	7.925
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	0.223	0.437	5.270	1.135	3.250	1.375	20.360	5.060	0.032	1.930
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	1.400	1.070	3.315	4.445	2.395	0.680	2.995	0.054	0.078	0.121
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	0.220	0.0720	0.350	0.065	0.525	0.578	0.0250	0.338	0.128	0.876

4.2.4 โปรตีนจากต่อมไฮโปฟาลิงค์ของผึ้งโพรง (Protein contents of hypopharyngeal glands of *A. cerana*)

การศึกษาปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาลิงค์ของผึ้งโพรงในวันที่ 6 10 และ 14 หลังจากผึ้งติดเชื้อ พบว่าปริมาณโปรตีนของทุกกลุ่มการทดลองมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 6 และลดลงเมื่อจำนวนวันเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณโปรตีนรวมของทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณสูงกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับวันที่ 10 และ 14 ($F_2=117.54$, $P<0.0001$) และเมื่อแยกวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่พบในแต่ละกลุ่มการทดลองพบว่าในกลุ่มควบคุม CO และ CP มีปริมาณโปรตีนสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่ทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันโดยปริมาณโปรตีนเฉลี่ยของต่อมไฮโปฟาลิงค์ของ CO มีดังนี้ คือวันที่ 6 มีค่าเฉลี่ย 16.54 ± 0.72 มิลลิกรัม/ตัว วันที่ 10 มีค่าเฉลี่ย 13.21 ± 3.55 มิลลิกรัม/ตัว และวันที่ 14 มีค่าเฉลี่ย 6.34 ± 0.94 มิลลิกรัม/ตัว กลุ่ม CP มีค่าเฉลี่ยในวันที่ 6 16.84 ± 2.117 มิลลิกรัม/ตัว วันที่ 10 มีค่าเฉลี่ย 12.41 ± 1.87 มิลลิกรัม/ตัว และวันที่ 14 มีค่าเฉลี่ย 6.23 ± 0.98 มิลลิกรัม/ตัว ส่วนในกลุ่มผึ้งที่ได้รับสารพรอพอลิสคือกลุ่ม 50P และ 70P มีปริมาณโปรตีนรองลงมาจากกลุ่มควบคุมและสูงกว่ากลุ่ม CE และ OP โดยแต่ละกลุ่มมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ยดังนี้คือ กลุ่ม 50P มีค่าเฉลี่ยในวันที่ 6 13.89 ± 2.23 มิลลิกรัม/ตัว วันที่ 10 มีค่าเฉลี่ย 6.23 ± 0.75 มิลลิกรัม/ตัว และวันที่ 14 มีค่าเฉลี่ย 5.44 ± 0.24 มิลลิกรัม/ตัว กลุ่ม 70P มีค่าเฉลี่ยในวันที่ 6 14.9 ± 3.38 มิลลิกรัม/ตัว วันที่ 10 มีค่าเฉลี่ย 6.88 ± 0.79 มิลลิกรัม/ตัว และวันที่ 14 มีค่าเฉลี่ย 5.64 ± 0.69 มิลลิกรัม/ตัว กลุ่ม CE มีค่าเฉลี่ยในวันที่ 6 12.15 ± 3.26 มิลลิกรัม/ตัว วันที่ 10 มีค่าเฉลี่ย 5.47 ± 1.89 มิลลิกรัม/ตัว และวันที่ 14 มีค่าเฉลี่ย 4.4 ± 0.75 มิลลิกรัม/ตัว และกลุ่มสุดท้ายกลุ่ม OP มีค่าเฉลี่ยในวันที่ 6 11.94 ± 0.68 มิลลิกรัม/ตัว วันที่ 10 มีค่าเฉลี่ย 5.28 ± 0.87 มิลลิกรัม/ตัว และวันที่ 14 มีค่าเฉลี่ย 4.51 ± 0.24 มิลลิกรัม/ตัว ($F_5=12.64$, $P<0.0001$) ดังแสดงในรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อดัง) จากต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งโพรงในวันที่ 6 10 และ 14 หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อดัง และให้สารละลายพรอพอลิสที่ ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้น 0% (OP) ความเข้มข้น 50% (50P) และความเข้มข้น 70% (70P) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารละลายพรอพอลิส 2 กลุ่ม คือ control (CO) and control ethanol (CE) และกลุ่มที่ให้สารละลายพรอพอลิสแต่ไม่ให้เชื้อคือกลุ่ม CP (ANOVA- Duncan's multiple range test, $F_5=12.64$, $P<0.0001$)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา
Conclusions and Discussion

5.1 ผลของโนซีมาที่มีต่อผึ้งมัม (Effect of *Nosema* on dwarf honeybees, *Apis florea*)

เชื้อ *N. ceranae* ที่แยกออกมาจากผึ้งงานของผึ้งโพรงและผึ้งมัม ที่ติดเชื้อมานาน หลังจาก นั้นทำให้ติดเชื้อในผึ้งมัมในจำนวนสปอร์ต่างกันโดยความรุนแรงขึ้นอยู่กับจำนวนสปอร์ที่ได้รับ ส่งผลต่อ การผลิตโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ ทำให้ผลิตโปรตีนลดลง นอกจากนี้ยังทำให้เพิ่มอัตราการตาย การ ติดเชื้อ ร้อยละของเซลล์ติดเชื้อ โดยทำให้โครงสร้างภายในเซลล์เสียหายอย่างหนัก ออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ได้รับความเสียหาย และถูกทำลาย และเมื่อให้พรอพอลิสที่สกัดจากชันโรงพบว่าการติดเชื้อและความ รุนแรงของการติดเชื้อลดลง โดยที่ความเข้มข้นของพรอพอลิสมากทำให้อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น การ ผลิตโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์เพิ่มขึ้น ดังตาราง 5.1

ตารางที่ 5.1 ผลของ *N. ceranae* ต่อผึ้งมัม *A.florea* วรณะผึ้งงาน

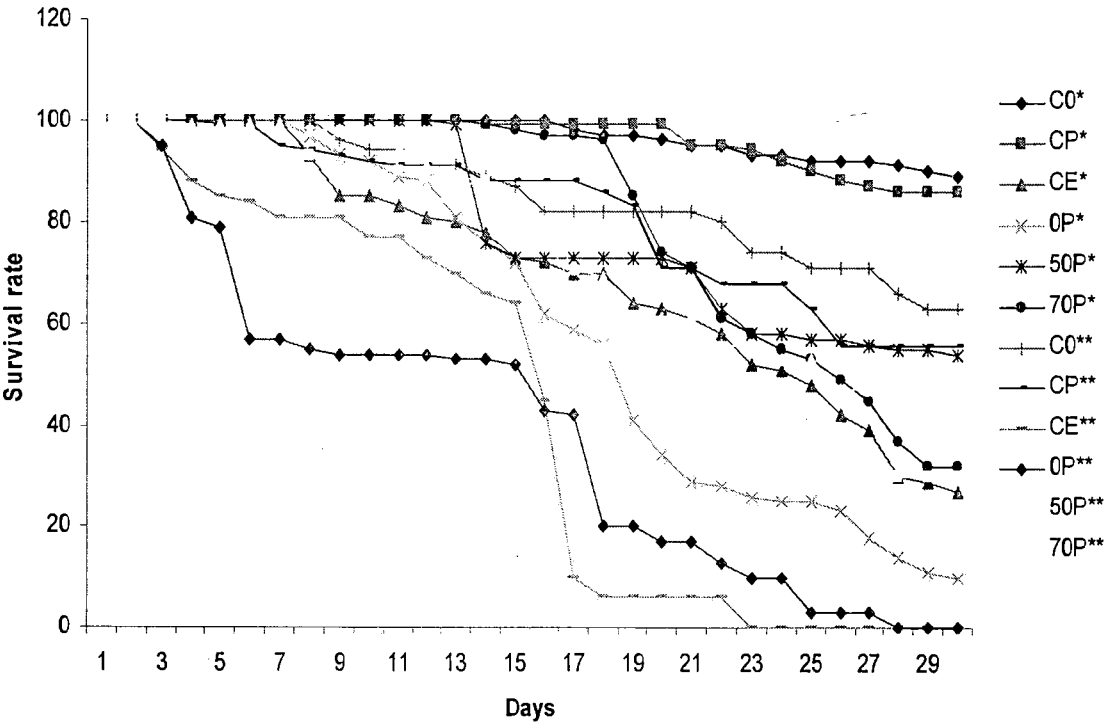
กลุ่ม ทดลอง*	ผลของ <i>N. ceranae</i> ที่มีต่อผึ้งงานของผึ้งมัม			
	อัตราการติดเชื้อ ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (%)	ติดเชื้อต่อตัว ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (million)	ร้อยละการติดเชื้อในเซลล์วันที่ 14 หลังการติดเชื้อ ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (%)	โปรตีนที่วัดได้จากต่อม HPGs (mg/bee) วันที่ 14 หลังการติดเชื้อ
CO	0	0	0	14.86 $\pm$ 3.35
CP	0	0	0	0.77 $\pm$ 0.36
CE	80 $\pm$ 2.82	0.631 $\pm$ 0.028	67.23 $\pm$ 13.68	9.88 $\pm$ 2.61
OP	100	3.896 $\pm$ 1.403	71.53 $\pm$ 1.6	1.81 $\pm$ 1.16
50P	23 $\pm$ 24.04	0.265 $\pm$ 0.363	16.40 $\pm$ 0.98	6.15 $\pm$ 1.27
70P	28 $\pm$ 22.63	0.394 $\pm$ 0.163	14.73 $\pm$ 0.62	5.68 $\pm$ 0.76

5.2 ผลของโนซีมาที่มีต่อผึ้งโพรง (Effect of *Nosema* on Asiatic honeybees, *Apis cerana*)

N. ceranae ที่แยกออกมาจากผึ้งงานของผึ้งมัมที่ติดเชื้อมานาน ส่งผลต่อการผลิตโปรตีนที่ ได้จากต่อมไฮโปฟาริงค์ของ ผึ้ง *A. cerana* เช่นเดียวกับผลกระทบต่อผึ้งมัม *A. florea* และยังพบว่า อัตราการตาย การติดเชื้อ ร้อยละของเซลล์ที่ติดเชื้อ มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับผึ้ง *A. florea* ด้วย เช่นกัน ดังตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 ผลของ *N. ceranae* ต่อผึ้งโพรง *A.cerana* วรณะผึ้งงาน

กลุ่มทดลอง	ผลของ <i>N. ceranae</i> ที่มีต่อผึ้งงานของผึ้งโพรง				
	อัตราการติดเชื้อ ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (%)	ติดเชื้อต่อตัว ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (million)	โปรตีนที่วัดได้จากต่อม HPGs (mg/bee) หลังการติดเชื้อ		
			วันที่ 6	วันที่ 10	วันที่ 14
CO	0	0	16.54 $\pm$ 0.72	13.21 $\pm$ 3.55	6.34 $\pm$ 0.94
CP	0	0	16.84 $\pm$ 2.117	12.41 $\pm$ 1.87	6.23 $\pm$ 0.98
CE	98 $\pm$ 2.82	2.77 $\pm$ 0.64	12.15 $\pm$ 3.26	5.47 $\pm$ 1.89	4.4 $\pm$ 0.75
0P	100	3.08 $\pm$ 0.98	11.94 $\pm$ 0.68	5.28 $\pm$ 0.87	4.51 $\pm$ 0.24
50P	84 $\pm$ 5.65	2.19 $\pm$ 0.26	13.89 $\pm$ 2.23	6.23 $\pm$ 0.75	5.44 $\pm$ 0.24
70P	79 $\pm$ 4.24	1.1086 $\pm$ 0.405	14.9 $\pm$ 3.38	6.88 $\pm$ 0.79	5.64 $\pm$ 0.69



รูปที่ 5.1 แสดงอัตราการรอดชีวิตผึ้งมิมและผึ้งโพรง หลังจากทำการป้อนสปอร์ของเชื้อโนซีมาที่สกัดมาจากผึ้งโพรง (*A. cerana*) ด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 80,000 สปอร์ต่อตัว

อักษรย่อ:

* คือ ผึ้งมัม

** คือ ผึ้งโพรง

กลุ่ม CO คือ ผึ้งที่ป้องกันสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม CP คือ ผึ้งที่ป้องกันสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายซูโครส 50% (ละลายในฟลอปอลิส 70%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม CE คือ ผึ้งที่ป้องกันสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) มีสปอร์ Nosema 80,000 สปอร์ และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายซูโครส 50% (ละลายใน ethanol) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม OP คือ ผึ้งที่ป้องกันสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) มีสปอร์ Nosema 80,000 สปอร์ และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม 50P คือ ผึ้งที่ป้องกันสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) มีสปอร์ Nosema 80,000 สปอร์ และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายซูโครส 50% (ละลายในฟลอปอลิส 50%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

กลุ่ม 70P คือ ผึ้งที่ป้องกันสารละลายซูโครส 50% (ละลายในน้ำกลั่น) มีสปอร์ Nosema 80,000 สปอร์ และให้อาหารคือ pollen mix เตรียม pollen 60 กรัม ผสมกับสารละลายซูโครส 50% (ละลายในฟลอปอลิส 70%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อเมื่อผึ้งทั้งสองชนิดนี้ได้รับเชื้อในปริมาณเท่ากันพบว่า ผึ้งมัมมีอัตราการติดเชื้อต่อตัวสูงกว่าผึ้งโพรง นอกจากนี้ทำให้การผลิตโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ลดลงในผึ้งทั้งสองชนิดสารสกัดจากฟลอปอลิสจากชันโรง (stingless bee, *T. Apicallis*) จังหวัดจันทบุรีสามารถยับยั้งหรือลดการติดเชื้อได้ในผึ้งทั้งสองชนิด แต่สามารถยับยั้งเชื้อโนซีมาในผึ้งมัมได้ดีกว่าในผึ้งโพรงและจากรูปที่ 5.1 ในกลุ่มที่ให้ฟลอปอลิสมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าในกลุ่มที่ไม่ให้ฟลอปอลิสทั้งในผึ้งโพรงและผึ้งมัม

เอกสารอ้างอิง (References)

- Anderson, D. L. and Giacon, H. 1992. Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *Journal of Economic Entomology* 85(1): 47-51
- Bailey, L. 1955. The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). *Parasitology* 45: 86-94
- Bailey, L. 1955. The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honeybee. *Annals of Applied Biology* 43: 379-389.
- Bailey, L. and Ball, B. V. 1991. *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London.
- Balerrama, N. , Nunze, J. , Giurfa, M. , Torreaba, J. , Alboznos, G. M. and Almeida, O. L. 1996. A deterrent response in honeybee (*Apis mellifera*) foragers: dependence on disturbance and season. *Journal of Insect Physiology* 42: 463-470.
- Bankova , V., De Castro, S. L. & Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3-15.
- Blum, M. S. , Fales, H. , Tucker, K. W. and Collins, A. M. F. 1978. Chemistry of sting apparatus of worker honeybee. *Journal of Apicultural Research* 17: 218-221.
- Boch, R. and Shearer, D. A. 1962. Identification of geraniol as the active compound in the Nasonoff pheromone of the honeybee. *Nature* 194: 704- 706.
- Boch, R. and Shearer, D. A. 1971. Chemical releaser of alarm behavior in the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 17: 2277-2285.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brand, J. M. and Mpuru, S. P. 1993. Dufour's gland and poison gland chemistry of the myrmicine ant, *Messor capensis* (Mayr.). *Journal of Chemical Ecology* 19(7): 1315-1321.
- Brouwers, E. V. M. 1982. Measurement of hypopharyngeal glands activity in the honeybee. *Journal of Apicultural research* 21(4): 193-198.
- Butler, C. G. 1940. The age of the bees in a swarm. *Bee World* 21: 9-10.
- Buyts, B. 1972. *Nosema* in brood. *South African Bee Journal* 44: 2-4.
- Cantwell, G. E. 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal* 110: 222-223.

- Cantwell, G. E. and Shimanuki, H. 1970. The use of heat to control *Nosema* and increase production for the commercial beekeeper. *American Bee Journal* 110: 263-265.
- Castaldo, S. and Capasso, F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* ,73 (1), S1–S6.
- Chauzat, M. P., Higes, M., Hernander, R. M., Meana, A., Cougoule, N. and Faucon, J. P. 2007. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* 46(2), 127-128
- Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B. and Pettis, J.S. .2008. *Nosema ceranae* is a long- present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 186-188.
- Chen, Y., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M. and Pettis, J. S. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 101, 204–209.
- Chioveanu, G., Ionescu, D. and Mardare, A. 2004. Control of nosemosis- the treatment with "Protofil". *Apiacta* 39, 31-81.
- Clark, T. B. 1980. A second misrosporidian in the honeybee. *Journal of Invertebrate Pathology*. 35: 290-294.
- Czekonska, K. 2000. The influence of *Nosema apis* on young honeybee queens and transmission of the disease from queens to workers. *Apidologie* 31: 701-706.
- Czekonska, K. 2007. Influence of carbon dioxide on *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 95: 84-86.
- De Graaf, D.C., Masschelein, G., Vandergeynst, F., De Brabander, H.F. and Jacobs F.J. 1993. In vitro germination of *Nosema apis* (Microsporidia:Nosematidae) spores and its effect on their $\alpha\alpha$ -trehalose/D-glucose ratio. *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 220–225.
- De Graaf, D. C., Raes, H., Sabbe, G., De Rycke, P.H. and Jacobs F.J. 1994. Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 74–81.
- Doull, K. 1961. *Nosema* disease. *The Australasian Beekeeper* 62: 228-235.
- Ellis, J. D., Munn, P. A. 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86:88–101.

Engels, W., Rosenkranz, p. , Adler, A., Taghizadeh, T , Lubke, G. and Francke, W. 1997.

Mandibular gland volatile and their ontogenetic pattern in queen honeybees, *Apis mellifera carnica*. *Journal of Insect Physiology* 43: 307-313.

Farrar, C. L. (1947) Nosema losses in package bees as related to queen supersedure and honey yields, *Journal of Economic Entomology* 40: 333-338.

Fries, I., Ekbohm, G. and Villumstead, E. 1983. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *Journal of Apicultural Research* 23(2): 102-105

Fries, I. 1989. Comb replacement and *Nosema* disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee colonies. *Apidologie* 19: 343-354.

Fries, I., Feng, F., Dasilva, A., Slemenda, S.B. and Pieniazek, N.J. 1996. *Nosema ceranae* (microspora, Nosematidae) morphological and molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal Protistology* 32, 356-365.

Fries, I. (1997) Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie* 19: 319-328

Fries, I., Martin, R., Meana, A., Garcia-Palencia, P. and Higes, M. 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal Apicultural Research* 45: 230-233

Furi, P. , Wille, H. , Gerig, L. and Luscher, M. 1982. Change in weight of pharyngeal glands and haemolymph titres of juvenile hormone, proteins and vitellogenin in worker honeybees. *Journal of Insect Physiology* 14: 39-59.

Gatehouse, H. S. and Malone, L. A. 1998. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora) : DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 92-105

Gary, N. E. 1992. Activities and behavior of honey bee, *The Hive and The Honey Bee*. Dadant & Sons, Michigan; pp. 269-361.

Goodwin, M. , Ten Houten, A. , Perry, J. and Blackmann, R. 1990. Cost benefit analysis of using fumagillin to treat *Nosema*. N. Z. *Beekeeper* 208: 11-12.

Goodman, G. 2007. *Nosema* disease in honey bee. Agriculture notes;<http://www.dpi.vic.gov.au>.

Graham, J. M. (1992) *The Hive and the Honey Bee*. Dadant & Sons, Michigan; 1324 pp.

- Gray, F.H., Cali, A. and Briggs, J. D. 1969. Intracellular stages in the life cycle of the Microsporidian *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 14: 391–394
- Hartwig, A. and Przelecka, A. 1971. Nucleic acids in the intestine of *Apis mellifera* infected with *Nosema apis* and treated with fumagillin DCH; cytochemical and autoradiographic studies. *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 331–336
- Hassanein, M. H. (1951) The influence of *Nosema apis* on the larval honeybee. *Annual Applied Biology* 38: 844–846
- Hassanein, M. H. 1953. The influence of infection with *Nosema apis* on the activities and longevity of the worker honeybee. *Annal Applied Biology* 40:418–423
- Higes, M., Martin, R. and Meana, A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92(2): 93–95
- Higes, M., Palencia, P. G., Hernandez, R. M. and Meana, A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honey bee with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 211–217
- Higes, M., Hernandez, R. M., Bailon, E. G., Palencia, P. G. and Meana, A. 2007. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 76–78
- Hornitzky, M. 2005. *Nosema* Disease in Honeybees. <http://www.rirdc.gov.au/reports/HBE/05-055.pdf>
- Huang, W. F., Jiang, J.H. and Wang, C.H. 2005. *Nosema ceranae* infection in *Apis mellifera*. 38th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology. Anchorage, Alaska.
- Huang, W. F., Bocquet, M., Lee, K. C., Sung, I. H., Jiang, J. H., Chen, Y.W. and Wang, C. H. 2007. The comparison of rDNA spacer region of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 9–13
- Huang, Z. Y. and Otis, G. W. 1989. Factor determining hypopharyngeal glands activity of worker honeybees. *Journal of Insect physiology* 14: 39–59.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Camp, J., Katz, H. , Gardiol, G. and Mendoza, Y. 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 101, 150–153.

- Kang, Y.B., Kim, D.S. and Jang, D. H. 1976. Experimental studies on the pathogenicity and development al stages of *Nosema apis*. *Korean Journal of Veterinary Research* 16: 180-184
- Karmo, E. and Morgenthaler, O. 1939. The development of *Nosema apis* at various temperatures. *Bee World* 20: 57-58
- Katznelson, H. and Jamieson, C. A. 1952. Control of *Nosema* disease of honey bees with fumagillin. *Science* 115: 70-71
- Kerr, W. E., Blum, M. S. Pisani, J. F. and Stort, A. C. (1974) Correlation between amounts of 2-heptanone and isopentyl acetate in honeybees and their aggressive behaviour. *Journal of Apicultural Research* 13: 173-176.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I. and Paxton, R. J. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal Invertebrate Pathology* 96: 1-10.
- Knecht, D. and Kaatz, H. H. 1990. Pattern of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie* 21: 457-468.
- Koeniger, N. ; Weiss, J. and Maschwitz, U. 1979. Alarm pheromones of the sting in the genus *Apis*. *Journal of Insect Physiology* 25: 467-476.
- Kubo, T. , Sasaki, M. , Nakamura, J. , Sasagawa, H. , Ohashi, K. , Takeushi, H. and Natori, S. 1996. Change in the expression of hypopharyngeal gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *Journal of Biochemistry* 119(2): 291-295.
- Klee, J., Tay, W. T. and Paxton, R. 2006. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in bumble bees (*Bombus* spp.;Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 98-104.
- Liu, T. P. (1973) Effects of Fumidil B on the spore of *Nosema apis* and on lipids of the host cell as revealed by freeze-etching. *Journal of Invertebrate Pathology* 22: 364-368.
- Li, J., Feng, M., Zhang, Z. and Pan, Y. 2008. Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 39: 199-214.

- Malone, L. A., Giacon, H. A. and Newton, M. R. 1995. Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. *Apidologie* 26: 495–502.
- Malone, L. A. and Gatehouse, H. S. 1998. Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*Apis mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 169–174.
- Malone, L. A. and Stefanovic, D. 1999. Comparison of the response of two races of honeybees to infection with *Nosema apis*. *Apidologie* 30, 375–382.
- Malone, L. A., Gatehouse, H. S. and Tregidga, E. L. 2001. Effects of time, temperature and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae) a parasite of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 258–268.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez S. A., Garrido-Bailón, E. and Higes, M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6331–6338
- Matheson, A. 1993. World bee health report. *Bee World* 74: 176–212.
- Matheson, A. 1996. World bee health update. *Bee World* 77: 45–51.
- Mattila, H. R. and Otis, G. W. 2006. Effects of pollen availability and *Nosema* infection during the spring on division of labour and survival of worker honey bees. *Environmental Entomology* 35(3): 708–717.
- Moritz, B. and Crailsheim, K. 1987. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 33(12): 923–931.
- Moffet, J. O., Lockett, J. J. and Hitchcock, J. D. 1969. Compounds tested for control of *Nosema* in honey bees. *Journal Economic Entomology* 62: 886–889
- Otani, H., Oyama, M. and Tokita, F. 1985. Polyacrylamide gel electrophoretic and immunochemical properties of proteins in royal jelly. *Japanese Journal Dairy Food Science* 34: 21–25
- Otis, G. W. 1991. A Review of Diversity of Species Within *Apis*, *Diversity in the Genus Apis*. : Westview press, Boulder; pp. 29–49.
- Olsen, P.E., Rice, W.A. and Liu, T.P. 1986. In vitro germination of *Nosema apis* spores under conditions favorable for the generation and maintenance of sporoplasms. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 65–73.

- Park, O. W. 1949. Activities of honeybees, *The Hive and Honeybee*. Dadant & Sons, Hamilton; pp. 79-152.
- Paxton, R. J., Klee, J., Korpela, S. and Fries, I. 2007. *Nosema ceranae* has infection *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558-565
- Plettner, E., Slessor, K. N., Winston, M. L., Robinson, G. E. and Page, R. E. 1993. Mandibular gland component and ovarian development as measures of caste differentiation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 39: 235-240.
- Reith, J. P., Winston, W. T. and Levin, M. D. 1986. Repellent honeybees from insecticides-treated flowers with 2-heptanone. *Journal of Apicultural Research* 25: 78-84.
- Rijk, P. D., Gatehouse, H. S. and Wachter, R. D. 1998. The secondary structure of *Nosema apis* large subunit ribosomal RNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1442: 326-328.
- Rinderer, T. E. and Elliott, K. D. 1977. Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*: influence of diet. *Journal of Economic Entomology* 70: 431-433.
- Rinderer, T. E. and Sylvester, H. A. (1978) Variation in response to *Nosema apis*, longevity, and hoarding behavior in a free-mating population of the honey bee. *Annals of the Entomological Society of America* 71: 372-374.
- Rogers, R. E. L., Bishop, B. and MacKenzie, K. 2003. Detection of *Nosema* spores: preparation and examination of honey bee samples. *Hivelights* 16: 10-11
- Ruttner, F. 1988. *The Genus Apis, Biogeography & Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag, Berlin; pp. 3-11.
- Saforcin, J. M. 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 1-14.
- Sagili, R. R., Pankiw, T. and Zhu-Salzman, K. 2005. Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 51: 953-957
- Seeley, T. D. (1985) *Honeybee Ecology*. Westview, New Jersey; 165 pp.
- Seely, T. D. 1985. Labour Specialization by Workers. *Honeybee Ecology*. Princeton, New Jersey; pp. 31-35.
- Simpson, J., Inge, B. M. and Wilding, N. 1968. Invertase in hypopharyngeal glands of the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 7(1): 29-36.

- Singh, Y. (1975) *Nosema* in Indian honey bee (*Apis cerana indica*). *American Bee Journal* 115: 59
- Slamovits, C. H., Williams, B. A. P. and Keeling, P. J. 2004. Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonosporea locustae* n. comb. Based on molecular and ultrastructural data. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51(2): 207-213.
- Sokot, R., Molska, D. and Siuda, M. 2007. The influence of the invasion of *Nosema apis* on the number of pollen seeds in bee's intestines. *Polish Journal of Natural Sciences* 22(1): 150-156.
- Stoscheck, C. M. 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69.
- Suwannaong, G. 2000. *Ultrastructure and Pheromones of the Mandibular Glands of Honeybee Foragers in Thailand*. Ph.D Thesis, Chulalongkorn university. 177 pp
- Suwannapong, G. and Wongsiri, S. 2005. Pheromonal Activities of the Mandibular Gland Pheromones on Foraging Activity of Dwarf Honeybees. *Apimondia 39th Apimondia International Apicultural Congress*, Dublin, Ireland. pp. 89-90.
- Suwannapong, G., Seanbualuang, P. and Wongsiri, S. 2007. A histochemical study of the hypopharyngeal glands of the dwarf honey bees *Apis andreniformis* and *Apis florea*. *Journal of Apicultural Research* 46(4): 260-264.
- Stoscheck, C. M. 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69
- Szabo, T. I. and Heikel, D. T. (1987) Effect of dry fumagillin feeding on spring *Nosema* spore counts in overwintered colonies. *American Bee Journal* 127: 210-211.
- Tengeo, J., Hefetz, A., Bertsch, A., Schmitt, U., Luebke, G. and Francke, W. 1991. Species specificity and complexity of Dufour's gland secretion of bumble bees. *Comparative Biochemical Physiology* 99(3): 641-646.
- Thibout, E., Feary, S. and Auger, J. 1994. Natural and role of sexual pheromones emitted by male of *Acrolepipsis assectella* (Lep.). *Journal Chemical Ecology* 20(7): 1571-1582.
- Tomoda, G., Matsuyama, J. and Matsuka, M. 1977. Studies on protein in royal jelly 2 fractionation of water-soluble protein by DEAE-cellulose chromatography, gel filtration and disc electrophoresis. *Journal of Apicultural Research* 16(3): 125-130.
- Vivarès, C. P. and Méténier, G. 2001. The microsporidian Encephalitozoon. *Bioessays* 23: 194-201.

- Witherell, P. C. 1979. Others products of the hive. *In* Dadant and Sons (eds) *The Hive and the Honeybee*. Dadant and Sons; Hamilton, Illinois; pp. 531-558.
- Woyciechowski, M. and Czekonska, K. 1999. The effect of temperature on *Nosema apis* Zander (Microsporida, Nosematidae) infection in honey bees (*Apis mellifera*). *Parasite* 6: 185–187.
- Yaghoubi, S. M. J., Ghorbani, G. R., Rahmani, H. R. and Nikkhah, A. 2007. Growth, weaning performance and blood indicators of humoral immunity in Holstein calves fed supplemental flavonoids. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92 (4): 456 – 462.
- Yoshida T. 1999. Bees and beekeeping in Asia. *Farming Japan* 33: 10-17.
- Zander, E. 1909. Tierische parasiten als Krankheitserreger bei der biene. *Leipziger Bienenzeitung* 24: 147-150, 164-166.