



รายงานผลการดำเนินงาน

ปีงบประมาณ 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี  
สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

ความหลากหลายของแบคทีเรีย *Melissococcus plutonius*  
ที่ก่อโรคตัวอ่อนเน่ายุโรป (European foulbrood disease) ในผึ้ง

ผู้รับผิดชอบโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
ปีงบประมาณ 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ชื่อเรื่อง

(ภาษาไทย) ความหลากหลายของแบคทีเรีย *Melissococcus plutonius*  
ที่ก่อโรคตัวอ่อนเน่ายุโรป (European foulbrood disease) ในผึ้ง

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

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**กิตติกรรมประกาศ**

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2560 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุน ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทคัดย่อไทย

*Melissococcus plutonius* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคตัวอ่อนเน่ายุโรป (European foulbrood หรือ EFB) ซึ่งพบว่ามีอาการระบาดอย่างมากในตัวอ่อนของผึ้ง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 types คือ typical และ atypical, โดยพบว่าทั้ง 2 types นั้น มีความแตกต่างอย่างเด่นชัดทางด้าน phenotype และพันธุกรรม โดย atypical type มีความรุนแรงมากกว่า typical type, อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 types นี้ก็ทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมากต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงผึ้ง ในโครงการวิจัยนี้ จึงเลือกทำการศึกษาในผึ้งเศรษฐกิจของประเทศไทย คือ ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) และผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ซึ่งเก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ โดยเลือกเก็บผึ้งที่ยังไม่ได้แสดงอาการของโรคใด ๆ ทั้งสิ้น ทำการวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค conventional PCR และ duplex PCR ซึ่งทำได้อย่างรวดเร็ว ผลการทดลองพบว่าจากการเลือกใช้ยีน 16S rRNA ของ *M. plutonius* แสดงให้เห็นว่ามี 2 ตัวอย่างที่ให้ผลเชิงบวก กล่าวคือ ได้ขนาดของ PCR products ที่จำเพาะ โดยมีขนาด 832 bp, เพื่อทำการแยก typical และ atypical *M. plutonius*, จึงเลือกใช้ duplex PCR, ผลการทดลองพบ typical *M. Plutonius* เนื่องจากได้ PCR products ที่มีความจำเพาะ ซึ่งมีขนาด 187 bp, ต่อมาทำการแยก type ของ *M. plutonius*, ผลพบว่าได้ PCR products ที่มีความจำเพาะทั้งต่อ typical type และ atypical type ของ *M. Plutonius*, ซึ่งจะมีขนาดเท่ากับ 187 bp และ 424 bp, ตามลำดับ โดยสรุป สามารถกล่าวได้ว่า พบ *M. plutonius* ทั้ง typical type และ atypical type ในผึ้งของประเทศไทย

**บทคัดย่อภาษาอังกฤษ**

*Melissococcus plutonius* is a widespread bacterial pathogen causing European foulbrood (EFB) disease of honeybee larvae. It could be classified into two strains which are typical and atypical. Both strains have different phenotypic and genetic characterization. Atypical strain is more virulent than typical strain. However, both strains of *M. plutonius* can cause extensive losses in both amateur and commercial apiaries. In this study, the native Asian honeybees (*Apis cerana* and *A. mellifera*) were randomly collected from Chiang mai province. With rapid and feasible technique, the isolated *M. plutonius* was identified and typed from adult bees without clinical symptoms by conventional PCR and duplex PCR. The results of PCR assays targeting the 16S rRNA gene of *M. plutonius* showed that 2 samples were positive, which resulted in specific-PCR products (832 bp). In order to distinguish typical and atypical *M. plutonius* rapidly, duplex PCR assays were used to identify each isolated *M. plutonius* type. As the results, typical *M. plutonius*-specific PCR products were detected (187 bp). Next, specific PCR products of both typical and atypical *M. plutonius* were obtained (187 bp and 424 bp, respectively). In conclusion, the current study demonstrates that both typical and atypical *M. plutonius* could be found in the honeybees in Thailand.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
หน้าปกรายงาน	1
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญรูป	6
สารบัญตาราง	7
บทนำ	8
วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
วิธีดำเนินการวิจัย และแผนการปฏิบัติงาน	8
สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล	12
ผลการดำเนินงาน	13
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	29
เอกสารอ้างอิง	30

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงสภาพของฟาร์มหรือสถานที่ที่ออกเก็บผึ้ง	10
รูปที่ 2 แสดงผลของ agarose gel electrophoresis ของ DNA ที่สกัดได้จากผึ้งพันธุ์	14
รูปที่ 3 แสดงผลของ agarose gel electrophoresis ของ DNA ที่สกัดได้จากผึ้งโพรง	16
รูปที่ 4 แสดงผลของ RT qPCR ของผึ้งพันธุ์จาก 5 รัง ที่เก็บจากอำเภอเชียงดาว ฟาร์มที่ 1	18
รูปที่ 5 แสดงผลของ RT qPCR ของผึ้งพันธุ์จาก 5 รัง ที่เก็บจากอำเภอเชียงดาว ฟาร์มที่ 2	19
รูปที่ 6 แสดงผลของ RT qPCR ของผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรงที่เก็บจากอำเภอหนองหอย	20
รูปที่ 7 แสดงการยืนยันผลของการ amplification ของ RT qPCR product	21
รูปที่ 8 แสดงลักษณะทางสัณฐานของ <i>M. plutonius</i> ที่แยกได้	22
รูปที่ 9 แสดงผลของการสกัด DNA และ colony PCR ของผึ้งพันธุ์จากฟาร์มที่ 1 อำเภอเชียงดาว	23
รูปที่ 10 แสดงผลของการสกัด DNA และ colony PCR ของผึ้งพันธุ์จากฟาร์มที่ 2 อำเภอเชียงดาว	24
รูปที่ 11 แสดงผลของการสกัด DNA และ colony PCR ของผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรงจากอำเภอหนองหอย	25
รูปที่ 12 แสดงผลของการสกัด DNA และ colony PCR ของผึ้งพันธุ์จากอำเภอจอมทอง	26
รูปที่ 13 แสดง agarose gel electrophoresis ของ DNA ที่สกัดได้จาก positive colony	27
รูปที่ 14 แสดงผลการทำ PCR และ duplex PCR เพื่อแยกชนิดของ <i>M. plutonius</i>	28

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดเกี่ยวกับผ้าที่เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่และพิจิตร	9
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ DNA (ng/ $\mu$ l) จากผ้าพันธุที่เก็บมา	11
ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ DNA (ng/ $\mu$ l) จากผ้าที่เก็บมา	15
ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ออกแบบ	17
ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของ DNA (ng/ $\mu$ l) จาก positive colony	27



## 1) บทนำ

อุปสรรคสำคัญที่ประสบในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง คือปัญหาการระบาดของโรคติดต่อในผึ้ง โดยเฉพาะโรคตัวอ่อนเน่ายุโรป (European foulbrood) ที่พบการแพร่ระบาดทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทย (Bailey, 1956) เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งจะสามารถระบุชนิดของโรคได้ จากการสังเกตลักษณะอาการของโรค ซึ่งกว่าที่ผึ้งจะแสดงอาการของโรคก็มักจะพบว่าเกิดการระบาดที่รุนแรงและแผ่กระจายไปมากแล้ว ส่งผลให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะ (Oxytetracycline hydrochloride, OTC) ในปริมาณมาก จนเกิดการตกค้างและปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ผึ้ง โดยเฉพาะในน้ำผึ้ง ซึ่งไม่สามารถส่งออกขายต่างประเทศได้ หรือถ้าผึ้งมีอาการเป็นโรคขั้นรุนแรง เกษตรกรต้องเผารังผึ้งทิ้ง ทำให้เกิดความสูญเสียต่อผลผลิตและส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของผู้ประกอบธุรกิจเลี้ยงผึ้งเป็นอย่างมาก โรคตัวอ่อนเน่ายุโรปเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Melissococcus plutonius* ในทางเดินอาหารของผึ้ง ส่วนใหญ่มักจะพบการติดเชื้อในตัวอ่อนผึ้งก่อนที่จะมีการปิดฝาหลอดรวงผึ้ง และตัวอ่อนที่ติดเชื้อจะตายที่อายุประมาณ 4 ถึง 5 วัน โดยที่เชื้อยังคงมีชีวิตอยู่ในหลอดรวงผึ้งและสามารถก่อโรคได้อีกเป็นเวลาหลายปี (Forsgren, 2010) ในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากได้รายงานถึงความสำเร็จในการใช้เทคนิคต่างๆ ในการวินิจฉัยโรคตัวอ่อนเน่ายุโรป ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาและจำแนก *M.plutonius* ภายใต้อณูพันธุศาสตร์ การวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay, PCR, Hemi-nested PCR, quantitative Real-time PCR, Duplex PCR ในผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera*, *Apis cerana* และ *Apis laboriosa* เป็นต้น (Pinnock and Featherstone, 1984; Govan et al., 1998) ซึ่งในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทำการศึกษาระบาดวิทยาและตรวจวินิจฉัย *M.plutonius* ที่พบในผึ้งโพรง *A. cerana* จากฟาร์มผึ้งของประเทศไทย ด้วยเทคนิค Real-time PCR และ Duplex PCR เพื่อจำแนก และสามารถระบุให้ชี้ชัดได้ว่า *M.plutonius* ที่พบเป็นสายพันธุ์ที่มีอยู่ในท้องถิ่น หรือมาจากต่างถิ่น ได้อย่างรวดเร็วก่อนที่จะแสดงอาการของโรคเพื่อหาวิธีการป้องกันและรักษาโรคได้อย่างถูกต้องและทันท่วงที ก่อนที่การระบาดของโรคจะรุนแรงจนไม่สามารถรักษาได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบธุรกิจเลี้ยงผึ้งในประเทศไทย และต้องงานวิจัยเพื่อพัฒนาด้านโรคตัวอ่อนเน่ายุโรปต่อไปในอนาคต

## 2) วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 2.1 เพื่อตรวจสอบ Strain ของ *M. plutonius* ทั้งที่เป็น Native strain (Typical strain) และ Atypical strain ที่พบในผึ้ง
- 2.2 เพื่อตรวจสอบลักษณะที่เฉพาะทาง Phenotype และ Genotype ของ Native *M. plutonius* strain

## 3) วิธีดำเนินการวิจัย และแผนการปฏิบัติงาน

### 3.1 เก็บตัวอย่างผึ้ง

ทำการเก็บตัวอย่างผึ้งโพรง *A. cerana*, ผึ้งพันธุ์ *A. mellifera* และผึ้งมี้ม *A. florea* จากฟาร์มเลี้ยงผึ้ง และจากที่กำลังหาอาหารบนดอกไม้ในจังหวัดเชียงใหม่ (รายละเอียดดังในตารางที่ 1 และรูปที่ 1) โดยสุ่มเก็บฟาร์มละ 5 รัง ซึ่งจะเก็บรักษาผึ้งในน้ำแข็งแห้งระหว่างการเดินทาง ก่อนจะนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดเกี่ยวกับผึ้งที่เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่และพิจิตร

<b>Location</b>	<b>Code name</b>	<b>1<sup>st</sup> collection</b>	<b>2<sup>nd</sup> collection</b>
Chiang mai province Chiang dao district Farm no.1	Am.cm.cd1	<i>A. mellifera</i> 5 hives	-
Chiang mai province Chiang dao district Farm no.2	Am.cm.cd2	<i>A. mellifera</i> 5 hives	-
Chiang mai province Nong hoi sub-district	Am.cm.nh Ac.cm.nh	<i>A. mellifera</i> 5 hives <i>A. cerana</i> 1 hive	-
Chiang mai province Chom thong district	Ac.cm.et	<i>A. cerana</i> 2 hives	-
Phichit province	Af.pc	<i>A. florea</i> 5 hives	-

### 3.2 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างผึ้ง

#### 3.2.1 บดตัวอย่างผึ้งสำหรับการตรวจหาเชื้อและการแยกเชื้อ *M. plutonius*

ทำการล้างตัวอย่างผึ้งด้วย 70% เอทานอล เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วยท้องของผึ้ง มาบดผึ้งให้ละเอียดด้วยแท่งบด (pestle) ในสารละลาย Phosphate Buffer Saline หรือ PBS (500  $\mu$ L) โดยใช้ตัวอย่างผึ้งจำนวน 5 ตัวต่อ 1 ตัวอย่าง เก็บรักษาสารละลายที่บดได้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  โดยแบ่งสารละลายออกเป็นสองส่วน สำหรับทำการตรวจหาเชื้อ *M. plutonius* ด้วยเทคนิค real-time PCR และสำหรับทำการแยกเชื้อ *M. plutonius* โดยเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

#### 3.2.2 เตรียม template DNA สำหรับทำ real-time PCR

นำสารละลายที่แบ่งไว้สำหรับทำ real-time PCR จากข้อ 3.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใส มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAgen DNA mini kit) ตามคู่มือ คำนวณหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัด โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้ววิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดด้วย agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยดีเอ็นเอ gel red ส่องภายใต้แสง U.V. เพื่อวิเคราะห์ผลซึ่งคาดว่าจะผลิตได้จะมีขนาด 23 kb

### 3.3 ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *M. plutonius* ด้วยเทคนิค real-time PCR

#### 3.3.1 ตรวจหาแบคทีเรีย *M. Plutonius* (Roetschi และคณะ, 2008)

การทำตรวจหา *M. plutonius* ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้คู่ primer ที่มีความจำเพาะต่อ *sodA* gene ของ *M. plutonius* ซึ่งมี forward primer คือ 5'- CAG CTA GTC GGT TTG GTT CC -3' และ reverse primer คือ 5'- TTG GCT GTA GAT AGA ATT GAC AAT -3' ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แล้วตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยดีเอ็นเอ gel red ส่องภายใต้แสง U.V. เพื่อวิเคราะห์ผลซึ่งคาดว่าจะผลิตได้จะมีขนาด 79 bp

#### 3.3.2 จำแนกชนิดระหว่าง typical และ atypical *M. Plutonius*

ทำการจำแนกชนิดของ *M. plutonius* ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAgen Quantitect SYBR Green PCR kit ซึ่งใช้ primer 2 ชนิดดังนี้ ในส่วนของการจำแนก Typical *M. plutonius* ใช้คู่ primer ที่มีความจำเพาะต่อ  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter และ *napA* gene ซึ่งมี forward primer คือ 5'- GTT CTT AGG TGG TAG CTT AGG C -3' และ reverse primer คือ 5'- GGC CAT TTC CCC TCT AGA GAT C -3' ส่วนการจำแนก Atypical *M. plutonius* ใช้คู่ primer ที่มีความจำเพาะต่อ Fur family transcriptional regulator gene ซึ่งมี forward primer คือ 5'- CCA TCC AAC GGC AGA TGA AAT C -3' และ reverse primer คือ 5'- CAA ACC GAC TGG ATG TAT CTC C -3' ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แล้วตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ agarose gel electrophoresis และย้อมดีเอ็นเอด้วย gel red ส่องภายใต้แสง U.V. เพื่อวิเคราะห์ผลซึ่งคาดว่าจะผลิตได้จะมีขนาด 73 bp และ 146 bp ตามลำดับ

### 3.4 แยกเชื้อแบคทีเรีย *M. plutonius* โดยสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Arai และคณะ, 2012)

นำสารละลายที่แบ่งไว้สำหรับทำการแยกเชื้อจากข้อ 3.1 ไป spread ลงบนอาหาร KSBHI agar (Brain Heart Infusion 37 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20.4 g/L, soluble starch 10 g/L, agar 15 g/L และเติม nalidixic acid 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Hornitzky และ Smith, 1998) ลงในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อลดปริมาณของเชื้อชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *M. plutonius* เติบโต) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 3-4 วัน ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใน anaerobic jar สังเกตและจดบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการ subculture และบ่มภายใต้สภาวะเดิม แล้วนำมาย้อมสีแกรม เพื่อดูการติดสีของผนังเซลล์ เพื่อจำแนกว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบ โดยใช้คริสตัลไวโอเลต และซาฟรานินโอ

### 3.5 จำแนกและระบุชนิดของ *M. plutonius* ด้วยเทคนิค PCR และ duplex PCR

เขียนเชื้อ *M. plutonius* ที่แยกได้ออกมาจาก plate ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (1mL) นำไปปั่นที่ 12,000-15,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม IntraGene matrix (100  $\mu\text{L}$ ) ลงไปในตะกอนเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที นำไป vortex ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 8 นาที แล้ว vortex ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที นำไปปั่นที่ 12,000-15,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใสออกมา วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

#### 3.5.1 จำแนก *M. plutonius* ด้วยเทคนิค PCR (Govan และคณะ, 1998)

ในการจำแนก *M. plutonius* ด้วยเทคนิค PCR ใช้คู่ primer ที่มีความจำเพาะต่อ 16S rRNA gene ของ *M. plutonius* ซึ่งมี forward primer คือ 5'- GAA GAG GAG TTA AAA GGC GC -3' และ reverse primer คือ 5'- TTA TCT CTA AGG CGT TCA AAG G -3' ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แล้วตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ agarose gel electrophoresis และย้อมดีเอ็นเอด้วย gel red ส่องภายใต้แสง U.V. เพื่อวิเคราะห์ผลซึ่งคาดว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาด 832 bp

#### 3.5.2 ระบุชนิดของ *M. plutonius* ด้วยเทคนิค duplex PCR (Arai และคณะ, 2012)

ทำการระบุชนิดของ *M. plutonius* ด้วยเทคนิค duplex PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAgen multiplex PCR kit ซึ่งใช้ primer 2 ชนิดดังนี้ ในส่วนของ Typical *M. plutonius* ใช้คู่ primer ที่มีความจำเพาะต่อ  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter และ *napA* gene ซึ่งมี forward primer คือ 5'- TGG TAG CTT AGG CGG AAA AC -3' และ reverse primer คือ 5'- TGG AGC GAT TAG AGT CGT TAG A -3' ส่วน Atypical *M. plutonius* ใช้คู่ primer ที่มีความจำเพาะต่อ Fur family transcriptional regulator gene ซึ่งมี forward primer คือ 5'- GAG AAC GAT TCG GTA CA GC -3' และ reverse primer คือ 5'- CCT TTT CTT CAC ATT CTG GAC AT -3' ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แล้วตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ agarose gel electrophoresis และย้อมดีเอ็นเอด้วย gel red ส่องภายใต้แสง U.V. เพื่อวิเคราะห์ผลซึ่งคาดว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาด 187 bp และ 424 bp ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAquick PCR Purification kit เพื่อส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อระบุสายพันธุ์ของ *M. plutonius*

### 3.6 วิเคราะห์และสรุปผล

#### 4) สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

พื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่

## 5) ผลการดำเนินงาน

## 5.1 ผลของการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างผึ้ง

นำผึ้งที่เก็บมาได้มาสกัด genomic DNA ตามวิธีที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง หลังทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm แล้ว สามารถคำนวณค่าความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ดังในตารางที่ 2 ซึ่งแสดง DNA ที่สกัดได้จากผึ้งทั้ง 2 ฟาร์มใน อำเภอเชียงดาว

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ DNA (ng/μl) จากผึ้งพันธุ์ที่เก็บมา

ฟาร์มที่ 1, อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ (รังหมายเลข 1-5)

Sample	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	DNA (ng/μl)
Am.cm.nh-1	0.819	0.431	1.900	819
Am.cm.nh-2	0.894	0.493	1.813	894
Am.cm.nh-3	0.237	0.122	1.943	237
Am.cm.nh-4	0.720	0.378	1.905	720
Am.cm.nh-5	0.702	0.399	1.759	702
Ac.cm.nh-1	0.154	0.101	1.525	51.3

ฟาร์มที่ 2, อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ (รังหมายเลข 1-5)

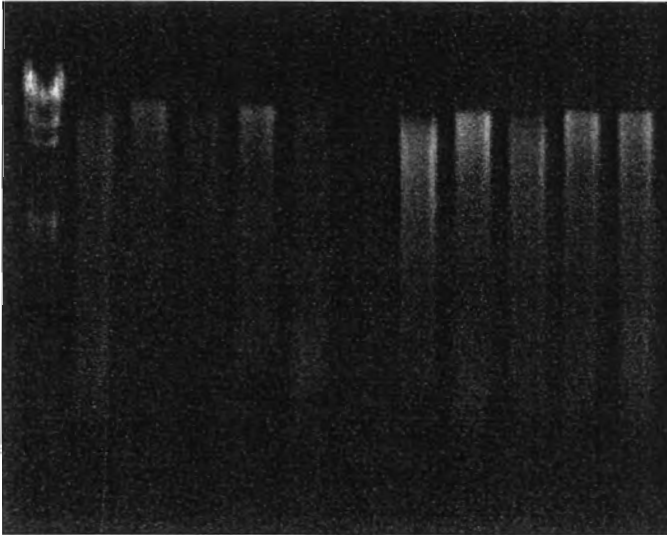
Sample	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	DNA (ng/μl)
Am.cm.cd1-1	0.967	0.504	1.919	483.5
Am.cm.cd1-2	0.577	0.304	1.898	72.1
Am.cm.cd1-3	0.759	0.403	1.883	94.9
Am.cm.cd1-4	0.990	0.510	1.941	123.8
Am.cm.cd1-5	0.247	0.140	1.764	247

หลังจากนั้นนำ DNA ของผึ้งพันธุ์ที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยการ run ด้วย agarose gel electrophoresis, ผลการทดลองที่ได้ แสดงดังในรูปที่ 2 ซึ่งแสดงถึงคุณภาพที่ดีของ DNA

### Gel electrophoresis

0.8% agarose gel in TBE, 100 volt for 30 min

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



M = Lambda HindIII DNA Marker

1 = DNA of Am.cm.cd1-1

2 = DNA of Am.cm.cd1-2

3 = DNA of Am.cm.cd1-3

4 = DNA of Am.cm.cd1-4

5 = DNA of Am.cm.cd1-5

6 = -

7 = DNA of Am.cm.cd2-1

8 = DNA of Am.cm.cd2-2

9 = DNA of Am.cm.cd2-3

10 = DNA of Am.cm.cd2-4

11 = DNA of Am.cm.cd2-5

รูปที่ 2 แสดงผลของ agarose gel electrophoresis ของ DNA ที่สกัดได้จากผึ้งพันธุ์

ทำการทดลองสกัด DNA เพิ่มเติมจากฝั้งโพรง หลังทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm, สามารถคำนวณความเข้มข้นของ DNA (ng/ $\mu$ l) ได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ DNA (ng/ $\mu$ l) จากฝั้งที่เก็บมา

ฝั้งโพรงรังที่ 1 และ 2, อำเภोजอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

Sample	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	DNA (ng/ $\mu$ l)
Ac.cm.ct-1	0.886	0.497	1.783	443
Ac.cm.ct-2	0.568	0.332	1.711	284

หลังจากนั้นนำ DNA ของผึ้งดพรงที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยการ run ด้วย agarose gel electrophoresis, ผลการทดลองที่ได้ แสดงดังในรูปที่ 3 ซึ่งแสดงถึงคุณภาพที่ดีของ DNA

### Gel electrophoresis

0.8% agarose gel in TBE, 100 volt for 30 min

M 1 2 3 4 5 6 7 8



M = Lambda HindIII DNA Marker

1 = DNA of Am.cm.nh-1

2 = DNA of Am.cm.nh-2

3 = DNA of Am.cm.nh-3

4 = DNA of Am.cm.nh-4

5 = DNA of Am.cm.nh-5

6 = DNA of Ac.cm.nh-1

7 = DNA of Ac.cm.ct-1

8 = DNA of Ac.cm.ct-2

รูปที่ 3 แสดงผลของ agarose gel electrophoresis ของ DNA ที่สกัดได้จากผึ้งโพรง



## 5.2 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *M. plutonius* ด้วยเทคนิค real-time PCR

ต่อมาทำการออกแบบ primers เพื่อการทำ quantitative real time PCR (RT qPCR), ผลการออกแบบ primers แสดงดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ออกแบบ

ยีน	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>SodA</i>	CAGCTAGTCGGTTTGGTTCC	TTGGCTGTAGATAGAATTGAC AAT
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter แบบ ที่ 1	GTTCTTAGGTGGTAGCTTAGGC	GGCCATTTCCCCTCTAGAGATC
Fur family transcriptional regulator แบบที่ 1	CCATCCAACGGCAGATGAAATC	CAAACCGACTGGATGTATCTCC
16S rRNA	GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC	TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter แบบ ที่ 2	TGGTAGCTTAGGCGGAAAAC	TGGAGCGATTAGAGTCGTTAGA
Fur family transcriptional regulator แบบที่ 2	GAGAACGATTCGGTACAGC	CCTTTTCTTCACATTCTGGACAT

สามารถหาส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ได้ซึ่งประกอบด้วย 25 µl ของ 2x Qiagen multiplex PCR master mix, 1 µl ของ 10 µM forward primer, 1 µl ของ 10 µM reverse primer, 1 µl ของ DNA template (~200 ng), และ 22 µl ของ Distilled H<sub>2</sub>O เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 µl ทำการ Amplify โดยใช้ Thermal Cycler Dice Realtime System (Takara)

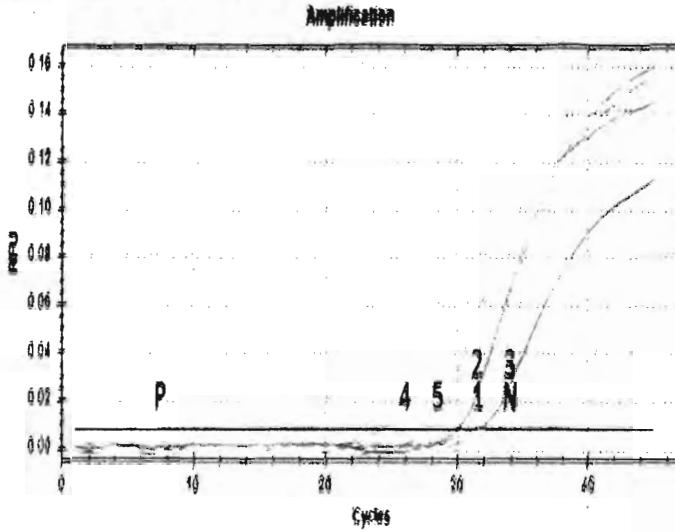
สำหรับ Primers ของยีน Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter แบบที่ 1 และยีน Fur family transcriptional regulator แบบที่ 1 ได้ภาวะการทำงานที่เหมาะสมดังนี้ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที; 35 รอบของ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที, 53 °C เป็นเวลา 30 วินาทีและ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาทีแล้วตามด้วย 1 รอบของ Dissociation cycle ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที; 60 °C เป็นเวลา 60 วินาที; และ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที ตามลำดับ

ผลของการทำ RT qPCR แสดงดังในรูปที่ 4, 5 และ 6

Chiang mai province Chiang dao district Farm no.1 (hive no.1-5)

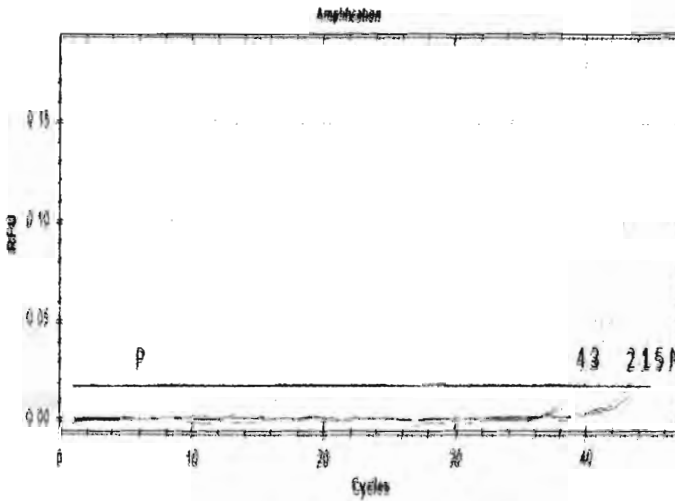
**Am.cm.cd1**

- Positive control = P
- Negative control = N
- Am.cm.cd1-1 = 1
- Am.cm.cd1-2 = 2
- Am.cm.cd1-3 = 3
- Am.cm.cd1-4 = 4
- Am.cm.cd1-5 = 5



**Typical**

- Quantitation cycle (Cq)
- Positive control = 2.04
- Negative control = 31.20
- Am.cm.cd1-1 = 29.93
- Am.cm.cd1-2 = 29.64
- Am.cm.cd1-3 = 31.20
- Am.cm.cd1-4 = 24.47
- Am.cm.cd1-5 = 27.38

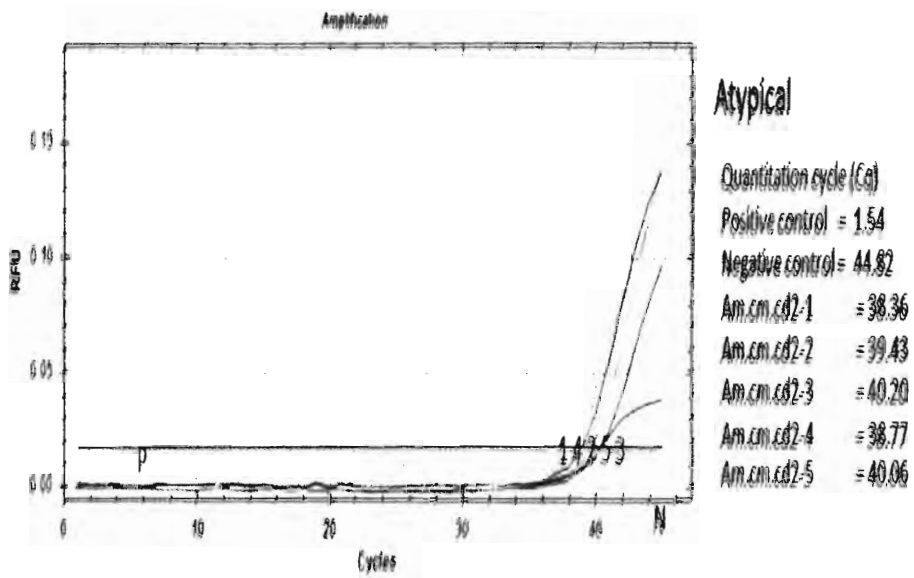
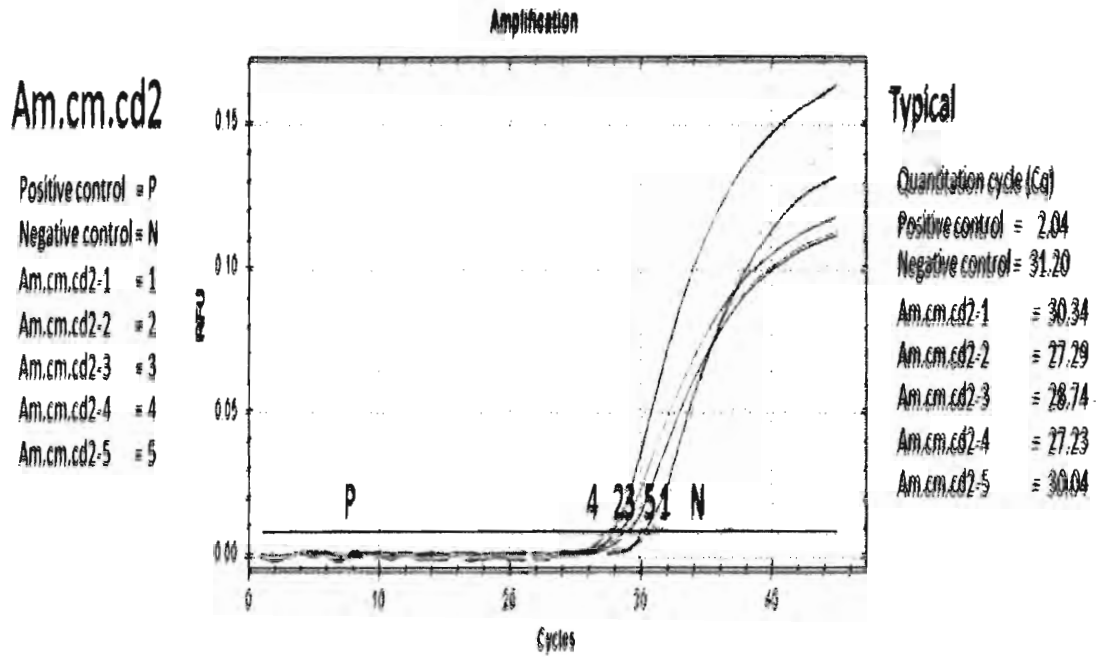


**Atypical**

- Quantitation cycle (Cq)
- Positive control = 1.58
- Negative control = 44.83
- Am.cm.cd1-1 = 43.16
- Am.cm.cd1-2 = 43.07
- Am.cm.cd1-3 = 39.58
- Am.cm.cd1-4 = 39.10
- Am.cm.cd1-5 = 43.83

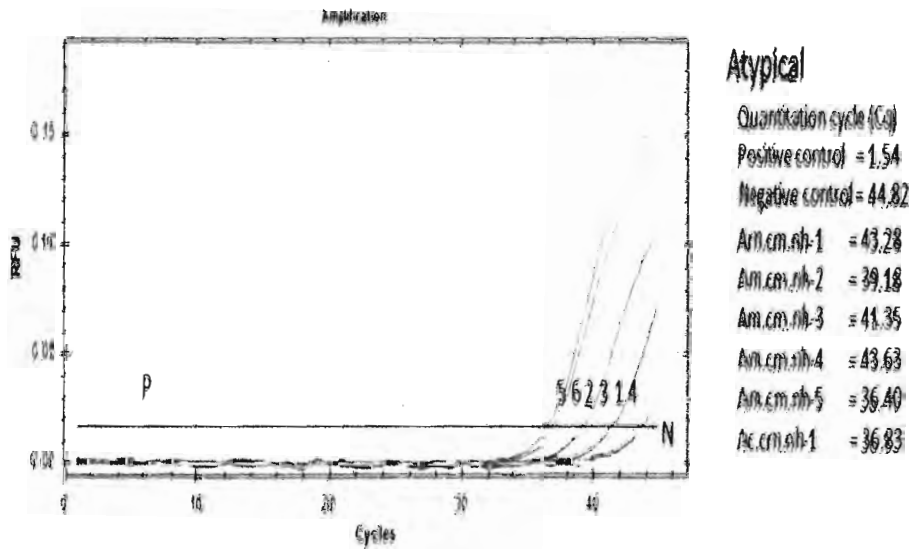
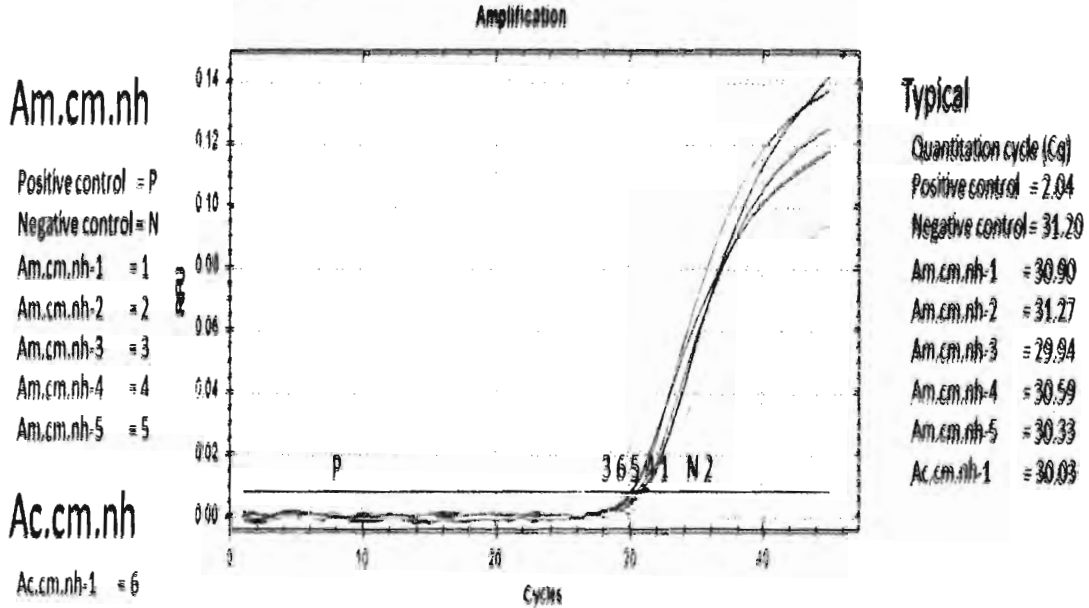
รูปที่ 4 แสดงผลของ RT qPCR ของผึ้งพันธุ์จาก 5 รัง ที่เก็บจากอำเภอเชียงดาว ฟาร์มที่ 1

Chiang mai province Chiang dao district Farm no.2 (hive no. 1-5)



รูปที่ 5 แสดงผลของ RT qPCR ของผึ้งพันธุ์จาก 5 รัง ที่เก็บจากอำเภอยางตลาด ฟาร์มที่ 2

Chiang mai province Nong hoi sub-district (hive no. 1-5 of *A. mellifera* and hive no. 1 of *A. cerana*)



รูปที่ 6 แสดงผลของ RT qPCR ของผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรงที่เก็บจากอำเภอนงหอย

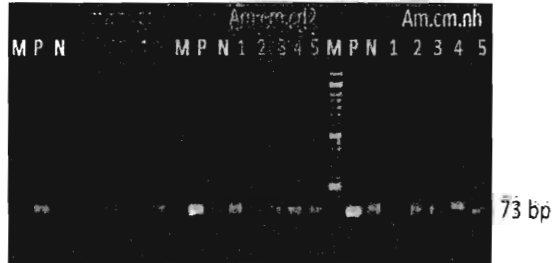
เพื่อเป็นการยืนยันผลของการเกิด amplification ของ RT qPCR, จึงนำ RT qPCR product มาทำการ run agarose gel electrophoresis อีกครั้ง ผลการทดลองยืนยันการเกิด amplification ซึ่งแสดงดังในรูปที่ 7

### The results of real time PCR

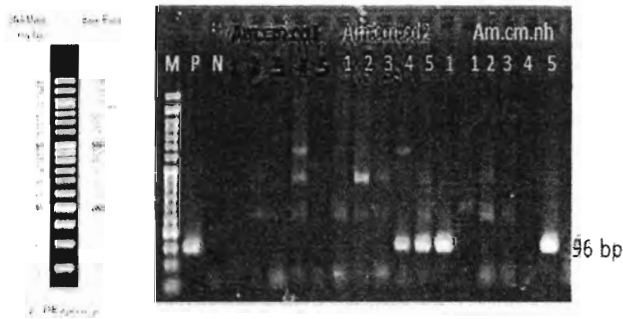
#### Gel electrophoresis

2% agarose gel in TBE, 100 volt for 40 min

#### Detect typical *M. plutonius*



#### Detect atypical *M. plutonius*

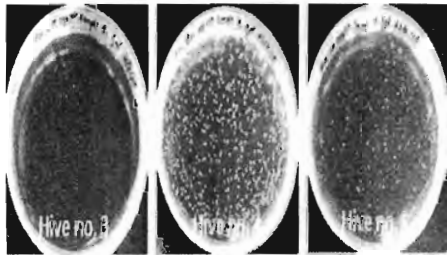
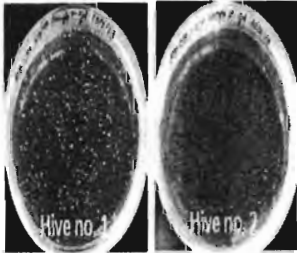


รูปที่ 7 แสดงการยืนยันผลของการ amplification ของ RT qPCR product

### 5.3 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *M. plutonius* โดยสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

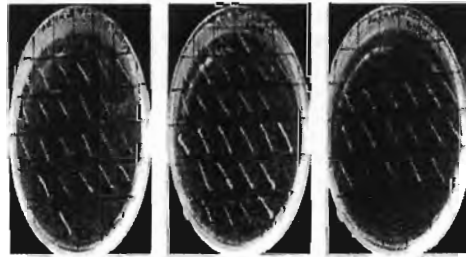
จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ด้วย KSBHI agar (Brain Heart Infusion 37 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20.4 g/L, soluble starch 10 g/L, agar 15 g/L และเติม nalidixic acid), สามารถแยก *M. plutonius* ได้ ดังแสดงในรูปที่ 8

Spread the lysate of bee samples on KSBHI agar plates.  
Incubate at 37 °C for 3-4 days under anaerobic conditions.

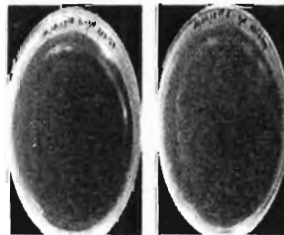


Chiang mai province Nong hoi sub-district  
(*A. mellifera* 5 hives)

Pick a single colony (5-15 colonies for each hive)  
and streak on new KSBHI agar plate.  
Incubate at 37 °C for 3-4 days under anaerobic conditions.



(*A. cerana* 1 hive)



Chiang mai province Chom thong district  
(*A. cerana* 2 hives)



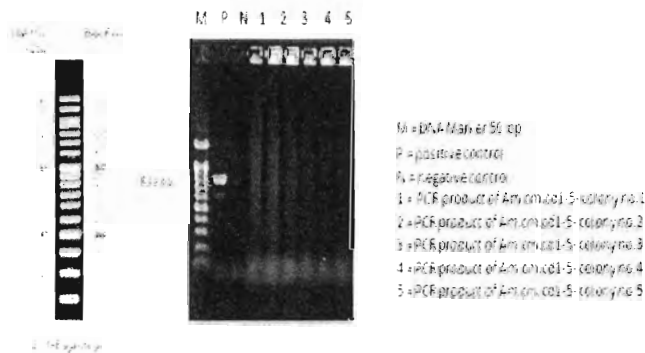
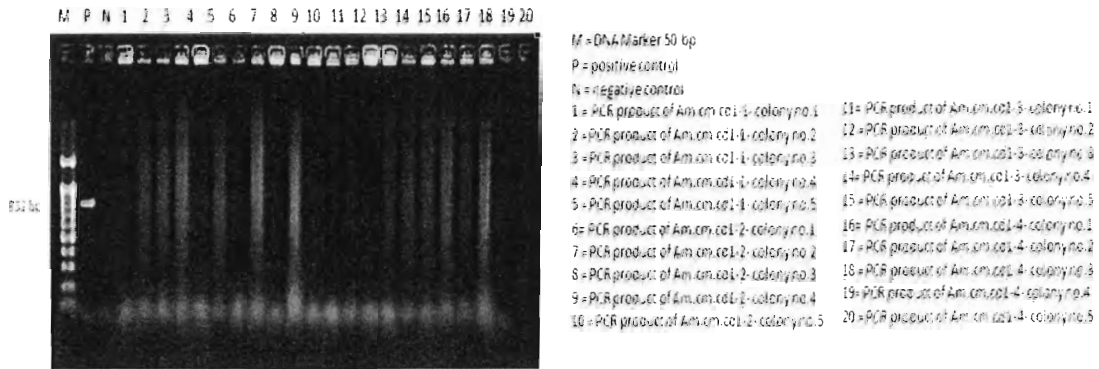
รูปที่ 8 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. plutonius* ที่แยกได้

นำโคลนที่คาดว่าจะจะเป็น *M. plutonius* จากการพิจารณาลักษณะทางสัณฐานนั้น มาทำการพิสูจน์ต่อโดยทำ colony PCR, ผลแสดงดังในรูปที่ 9-12, ในแต่ละรูปนั้น รูปย่อยบนแสดง DNA ที่สกัดได้จากโคลนที่สนใจ ส่วนรูปย่อยล่างแสดงผลของ colony PCR

Chiang mai province Chiang dao district Farm no.1 (hive no. 1-5)

**Gel electrophoresis**

0.8% agarose gel in TBE, 100 volt for 30 min

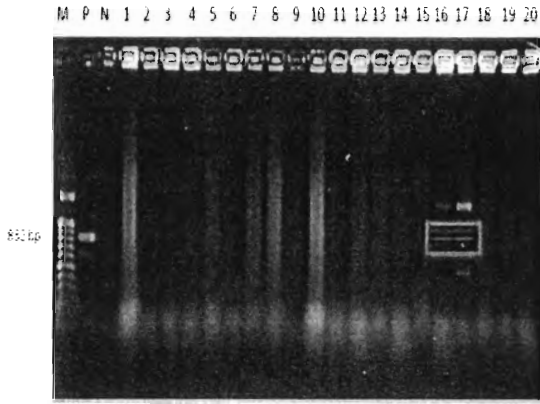


รูปที่ 9 แสดงผลของการสกัด DNA และ colony PCR ของผึ้งพันธุ์จากฟาร์มที่ 1 อำเภอเชียงดาว

Chiang mai province Chiang dao district Farm no.2 (hive no. 1-5)

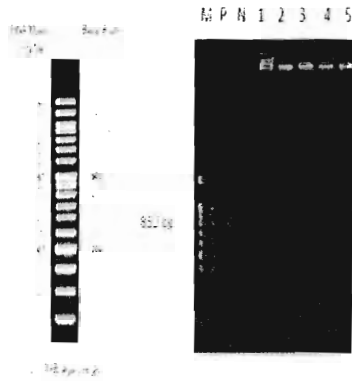
**Gel electrophoresis**

0.8% agarose gel in TBE, 100 volt for 30 min



- M = DNA Marker 50 bp
- P = positive control
- N = negative control
- 1 = PCR product of Am.cm.cd2-1- colony no.1
- 2 = PCR product of Am.cm.cd2-1- colony no.2
- 3 = PCR product of Am.cm.cd2-1- colony no.3
- 4 = PCR product of Am.cm.cd2-1- colony no.4
- 5 = PCR product of Am.cm.cd2-1- colony no.5
- 6 = PCR product of Am.cm.cd2-2- colony no.1
- 7 = PCR product of Am.cm.cd2-2- colony no.2
- 8 = PCR product of Am.cm.cd2-2- colony no.3
- 9 = PCR product of Am.cm.cd2-2- colony no.4
- 10 = PCR product of Am.cm.cd2-2- colony no.5
- 11 = PCR product of Am.cm.cd2-3- colony no.1
- 12 = PCR product of Am.cm.cd2-3- colony no.2
- 13 = PCR product of Am.cm.cd2-3- colony no.3
- 14 = PCR product of Am.cm.cd2-3- colony no.4
- 15 = PCR product of Am.cm.cd2-3- colony no.5
- 16 = PCR product of Am.cm.cd2-4- colony no.1
- 17 = PCR product of Am.cm.cd2-4- colony no.2
- 18 = PCR product of Am.cm.cd2-4- colony no.3
- 19 = PCR product of Am.cm.cd2-4- colony no.4
- 20 = PCR product of Am.cm.cd2-4- colony no.5

DNA samples (Am.cm.cd2-4 colony no.1 and 2)  
were not the isolated *M. plutonius*  
(have non specific PCR product of other bacterial species)



- M = DNA Marker 50 bp
- P = positive control
- N = negative control
- 1 = PCR product of Am.cm.cd2-5- colony no.1
- 2 = PCR product of Am.cm.cd2-5- colony no.2
- 3 = PCR product of Am.cm.cd2-5- colony no.3
- 4 = PCR product of Am.cm.cd2-5- colony no.4
- 5 = PCR product of Am.cm.cd2-5- colony no.5

รูปที่ 10 แสดงผลของการสกัด DNA และ colony PCR ของผึ้งพันธุ์จากฟาร์มที่ 2 อำเภอเชียงดาว

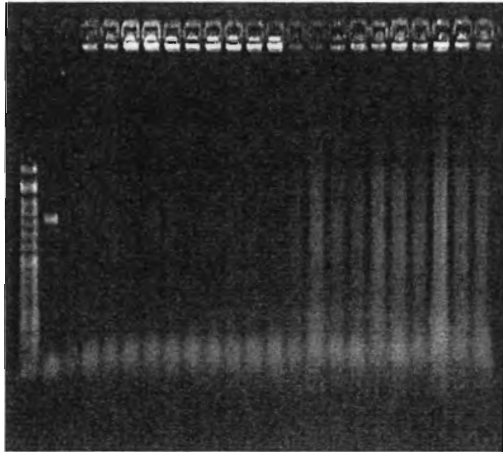


Chiang mai province Nong hoi sub-district  
(hive no. 1-5 of *A. mellifera* and hive no. 1 of *A. cerana*)

**Gel electrophoresis**

0.8% agarose gel in TBE, 100 volt for 30 min

M P N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



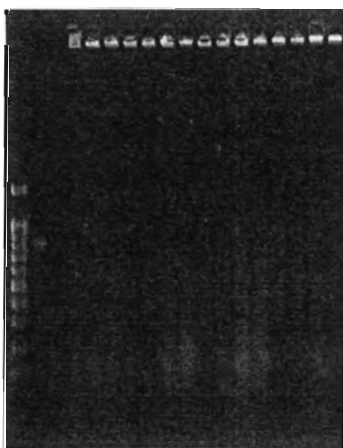
M = DNA Marker 50 bp

P = positive control

N = negative control

- 1 = PCR product of Am.cm.nh-1- colony no.1
- 2 = PCR product of Am.cm.nh-1- colony no.2
- 3 = PCR product of Am.cm.nh-1- colony no.3
- 4 = PCR product of Am.cm.nh-1- colony no.4
- 5 = PCR product of Am.cm.nh-1- colony no.5
- 6 = PCR product of Am.cm.nh-2- colony no.1
- 7 = PCR product of Am.cm.nh-2- colony no.2
- 8 = PCR product of Am.cm.nh-2- colony no.3
- 9 = PCR product of Am.cm.nh-2- colony no.4
- 10 = PCR product of Am.cm.nh-2- colony no.5
- 11 = PCR product of Am.cm.nh-3- colony no.1
- 12 = PCR product of Am.cm.nh-3- colony no.2
- 13 = PCR product of Am.cm.nh-3- colony no.3
- 14 = PCR product of Am.cm.nh-3- colony no.4
- 15 = PCR product of Am.cm.nh-3- colony no.5
- 16 = PCR product of Am.cm.nh-4- colony no.1
- 17 = PCR product of Am.cm.nh-4- colony no.2
- 18 = PCR product of Am.cm.nh-4- colony no.3
- 19 = PCR product of Am.cm.nh-4- colony no.4
- 20 = PCR product of Am.cm.nh-4- colony no.5

M P N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



M = DNA Marker 50 bp

P = positive control

N = negative control

- 1 = PCR product of Am.cm.nh-5- colony no.1
- 2 = PCR product of Am.cm.nh-5- colony no.2
- 3 = PCR product of Am.cm.nh-5- colony no.3
- 4 = PCR product of Am.cm.nh-5- colony no.4
- 5 = PCR product of Am.cm.nh-5- colony no.5
- 6 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.1
- 7 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.2
- 8 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.3
- 9 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.4
- 10 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.5
- 11 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.6
- 12 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.7
- 13 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.8
- 14 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.9
- 15 = PCR product of Ac.cm.nh-1- colony no.10

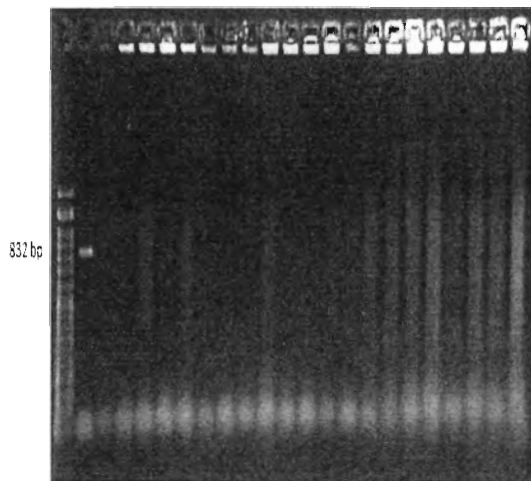
รูปที่ 11 แสดงผลของการสกัด DNA และ colony PCR ของผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรงจากอำเภอนองหอย

Chiang mai province Chom thong district (hive no. 1-2)

### Gel electrophoresis

0.8% agarose gel in TBE, 100 volt for 30 min

M P N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



M = DNA Marker 50 bp

P = positive control

N = negative control

1 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.1

2 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.2

3 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.3

4 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.4

5 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.5

6 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.6

7 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.7

8 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.8

9 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.9

10 = PCR product of Am.cm.ct-1- colony no.10

11 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.1

12 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.2

13 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.3

14 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.4

15 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.5

16 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.6

17 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.7

18 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.8

19 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.9

20 = PCR product of Am.cm.ct-2- colony no.10

รูปที่ 12 แสดงผลของการสกัด DNA และ colony PCR ของผึ้งพันธุ์จากอำเภोजอมทอง

#### 5.4 การจำแนกและระบุชนิดของ *M. plutonius* ด้วยเทคนิค PCR และ duplex PCR

positive colony ของ *M. plutonius* ที่ได้จากการสังเกตด้วยลักษณะทางสัณฐานและ colony PCR, จะถูกนำมาแยกชนิดของเชื้ออีกด้วยการทำ PCR และ duplex PCR, จึงเริ่มต้นโดยการสกัด DNA จาก positive colony, ความเข้มข้นของ DNA (ng/μl) ที่สกัดได้แสดงดังในตารางที่ 5, ส่วนคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้แสดงโดยการทำ agarose gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 13

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของ DNA (ng/μl) จาก positive colony

Sample	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	DNA (ng/μl)
Am.cm.cd2-4 no.1	0.105	0.062	1.694	52.5
Am.cm.cd2-4 no.2	0.053	0.029	1.828	26.5

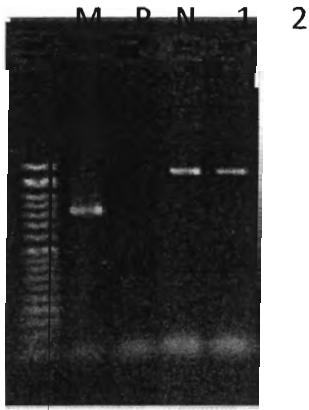
M 1 2



M = Lambda HindIII DNA Marker  
 1 = DNA of Am.cm.cd2-4 colony no.1  
 2 = DNA of Am.cm.cd2-4 colony no.2

รูปที่ 13 แสดง agarose gel electrophoresis ของ DNA ที่สกัดได้จาก positive colony

เมื่อทำการ amplification ด้วย PCR และ duplex PCR เพื่อแยก type ของ positive colony ของ *M. plutonius*, ผลการ amplification แสดงดังในรูปที่ 14



Gel electrophoresis : 1.5% TBE agarose gel

M = DNA Marker 50 bp

P= positive control

N = Negative control

1 = DNA of Am.cm.cd2-4 colony no.1

2 = DNA of Am.cm.cd2-4 colony no.2

DNA samples (Am.cm.cd2-4 colony no.1 and 2)  
 were not the isolated *M. plutonius*  
 (have non specific PCR product of other bacterial species)  
 resolution: re-isolation

รูปที่ 14 แสดงผลการทำ PCR และ duplex PCR เพื่อแยกชนิดของ *M. plutonius*

## 6) สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ในโครงการนี้ สามารถจำแนกและระบุสายพันธุ์ของ *M. plutonius* ที่พบในมดที่เก็บในจังหวัดเชียงใหม่ ได้ ด้วยเทคนิค real-time PCR และ duplex PCR จึงสามารถตรวจพบการติดเชื้อของ *M. plutonius* ในมดได้อย่างรวดเร็ว และสามารถระบุสายพันธุ์ของ *M. plutonius* ให้แน่ชัดได้ว่า *M. plutonius* ที่ระบาดอยู่ในมดเป็นสายพันธุ์ที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่นหรือมาจากต่างถิ่น เนื่องจาก *M. plutonius* ที่มาจากต่างถิ่นมีโอกาสที่จะติดต่อยาปฏิชีวนะที่เกษตรกรเลี้ยงมดใช้รักษาโรคเพื่อยับยั้ง *M. plutonius* สายพันธุ์ที่มีอยู่ในถิ่นนั้นเป็นประจำ ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงมดต้องหายาปฏิชีวนะชนิดอื่นหรือหาวิธีรักษาโรคใหม่ ถือเป็นปัญหาที่ค่อนข้างแก้ไขยาก และยิ่งก่อให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์ท้องถิ่น จึงหวังว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบการเลี้ยงมดในประเทศไทยเพื่อพัฒนาวิธีการป้องกันและรักษาโรคได้อย่างถูกต้องและทันทั่วถึง ก่อนที่การระบาดของโรคจะรุนแรงจนไม่สามารถรักษาได้

ปัญหาของการติดโรคในมดนับว่าเป็นปัญหาของหลาย ๆ ประเทศที่มีอุตสาหกรรมการเลี้ยงมด ซึ่งพบว่าการพัฒนาเทคนิคเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคก่อนที่มดจะแสดงอาการเป็นสิ่งที่สำคัญมาก ยกตัวอย่าง เช่น

Djordjevic และคณะ (1998) พัฒนาเทคนิค hemi-nested PCR สำหรับตรวจสอบ *M. plutonius* ในตัวอ่อนมดที่ติดโรค EFB, ทำการออกแบบ primer 3 อัน คือ MP1, MP2 และ MP3 โดยจะใช้ primer เข้าจับ DNA ครึ่งละ 1 คู่ คือ MP1 และ MP2 เข้าจับในส่วนของยีน *16S rDNA* ในลำดับเบสที่ 893-1377 จะได้ผลิตภัณฑ์หลังจากการทำ PCR ขนาด 486 bp และคู่ของ primer MP1 และ MP3 เข้าจับในส่วนของยีน *16S rDNA* ในลำดับเบสที่ 1168-1144 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการทำ hemi-nested PCR จะมีขนาด 276 bp, จัดเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง สามารถตรวจสอบได้เพียงแค่มีย *M. plutonius* 1-10 cells/mL เท่านั้น ต่อมา McKee และคณะ (2003) ได้นำเทคนิค hemi-nested PCR นี้มาใช้ตรวจสอบ *M. plutonius* ในตัวอ่อนมด มดโตเต็มวัย น้ำมดและเกสรมด เพื่อทดสอบความไวและความจำเพาะของเทคนิค ผลพบว่าเทคนิคนี้ยังวิเคราะห์ได้เพียงการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

ในปี ค.ศ. 2008 Roetschi และคณะ จึงทำการพัฒนาเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ *M. plutonius* ได้ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ โดยออกแบบ primer ที่สามารถเข้าจับบนตำแหน่งของยีน *sod A* ของ *M. plutonius* และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่ง primer ดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงต่อ *M. plutonius* สูงมาก ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Tomkies และคณะ ประสบความสำเร็จในการสร้างชุดตรวจสอบ *M. plutonius* สำเร็จรูป โดยใช้เนื้อเยื่อของมดที่ติดโรคมাত্রตรวจสอบ

ในปี ค.ศ. 2012 Arai และคณะ จำแนกความหลากหลายของสายพันธุ์ *M. plutonius* จากตัวอ่อนมดในประเทศญี่ปุ่น ด้วยเทคนิค pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) พบว่า *M. plutonius* จำแนกออกได้เป็นสายพันธุ์ที่มีอยู่ในท้องถิ่น (typical *M. plutonius*) และสายพันธุ์ที่มาจากต่างถิ่น (atypical *M. plutonius* หรือเรียกว่า *M. plutonius*-like organism) ทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทาง phenotype และ genotype คือ typical *M. plutonius* จัดเป็น fastidious organism ต้องการโพแทสเซียมฟอสเฟตในปริมาณสูงสำหรับการเจริญเติบโต แต่ atypical *M. plutonius* ไม่จัดเป็น fastidious organism เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้โพแทสเซียมฟอสเฟตในการเจริญเติบโต สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมฟอสเฟตภายใต้ภาวะที่ไร้ออกซิเจน และสามารถเจริญเติบโตในภาวะที่มีออกซิเจนได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโพแทสเซียม ในขณะที่ typical *M. plutonius* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เลยในภาวะที่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าใน atypical *M. plutonius* นั้น เอนไซม์  $\beta$ -glucosidase มีแอกทิวิตีที่ดี มีความสามารถในการย่อยสลาย esculin และสามารถผลิตกรดได้จาก L-arabinose, D-cellobiose และ salicin จากการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบความรุนแรงในการก่อโรค EFB, พบว่า atypical *M. plutonius* คงรักษาความสามารถในการก่อโรค EFB ไว้ได้ แต่ typical *M. plutonius* จะสูญเสียความสามารถในการก่อ

โรคไปอย่างรวดเร็ว จึงแสดงให้เห็นว่า atypical *M. plutonius* ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค EFB ได้รุนแรงกว่า typical *M. plutonius*

ในปีต่อมา Arai และคณะ (2013) พัฒนาเทคนิค duplex PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ระหว่าง typical และ atypical *M. plutonius* เนื่องจากทั้งสองสายพันธุ์มีกลไกการก่อโรคที่แตกต่างกัน จึงเป็นสิ่งจำเป็นในจำแนกสายพันธุ์ของ *M. plutonius* ที่ตรวจพบจากตัวอ่อนผึ้งในท้องถิ่นนั้น ๆ ในประเทศญี่ปุ่น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการควบคุมโรค EFB ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น โดยการออกแบบ primer 3 คู่ คือ คู่แรกที่มีความจำเพาะต่อยีน  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter และคู่ที่สองที่มีความจำเพาะต่อยีน *nap A* ของ typical *M. plutonius* และคู่ที่สามที่มีความจำเพาะต่อยีน fur family transcriptional regulator ของ atypical *M. plutonius* ซึ่ง primer ดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูง สามารถจำแนก typical และ atypical *M. plutonius* ออกจากกันได้อย่างชัดเจน เทคนิค duplex PCR จึงเป็นวิธีการตรวจสอบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของ *M. plutonius* ได้อย่างง่ายและรวดเร็ว

## 7) เอกสารอ้างอิง

- Arai R., Tominaga K., Wu M., Okura M., Ito K., Okamura N., Onishi H., Osaki M., Sugimura Y., Takamatsu D. 2012. Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. Plos One 7: 1-10.
- Arai R., Akiyama T.M., Okumura K., Morinaka Y., Wu M., Sugimura Y., Yoshiyama M., Okura M., Kirikae T., Takamatsu D. 2014. Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. Journal of Veterinary Medical Science 76: 491-498.
- Bailey L. 1956. Aetiology of European foulbrood; a disease of larval honeybee. Nature. 178, 1130.
- Djordjevic S.P., Noone K., Smith L., Hornitzky M. 1998. Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. Journal of Apicultural Research. 37, 165-174.
- Govan V.A., Brozel V., Allsopp M.H., Davison S., 1998. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1983-1985.
- Pinnock D.E., Featherstone N.E. 1984. Detection and quantification of *Melissococcus pluton* infection in honeybee colonies by means of enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Apicultural Research. 23, 168-170.
- Roetschi A., Berthoud H., Kuhn R., and, Imdorf A. 2008. Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. Apidologie 39: 362-371.

## ประวัติผู้วิจัย

## ชื่อหัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) นางสาวจันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Chanpen Chanchao

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 02 218 5380 และ 085 913 0412

ที่อยู่ปัจจุบัน 14/1 หมู่ที่ 8 ต. นครหลวง อ. นครหลวง จ. พระนครศรีอยุธยา

โทรศัพท์ 035 360 372

## ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ตรี	ชีววิทยา	2535
Virginia Tech	โท	ชีววิทยา	2539
Virginia Tech	เอก	ชีววิทยา	2542

## ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ ช่วงปี 2012-2017

Kustiawan, P.M., Okuyoshi, H., Kuse, Y., Izawa, H., Saito, Y., Tsuruma, K., **Chanchao, C.**,

Hara, H. and Shimazawa, M. 2017. Protective effects of Indonesian propolis against light-induced retinal damage. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research* 9(2): 163-170. (Scopus, Q3)

Kustiawan, P.M., Lirdprapamongkol, K., Palaga, T., Puthong, S., Phuwapraisirisan, P., Svasti, J. and **Chanchao, C.** 2017. Molecular mechanism of cardol, isolated from *Trigona incisa* stingless bee propolis, induced apoptosis in the SW620 human colorectal cancer cell line. *BMC Pharmacology and Toxicology* 18: 32. doi: 10.1186/s40360-017-0139-4 (ISI, IF2015 = 2.030, Q1 Medicine, medicine (miscellaneous))

Kilaso, M., Remnant, E., Chapman, N., Oldroyd, B.P., and **Chanchao, C.** (2017) DNA methylation of Kr-h1 is involved in regulating ovary activation in worker honey bees (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux* 64(1): 87-94. (ISI, IF2016 = 1.267)

Kilaso, M., Chapman, N., Remnant, E., Oldroyd, B.P., and **Chanchao, C.** (2017) No evidence that DNA methylation is associated with the regulation of fertility in the adult honey bee (*Apis mellifera*) worker ovary. *Austral Entomology* 56(1), pp. 115-121. (ISI, IF2016 = 1.114)

Kilaso, M., Tipgomut, C., Sanguankiattichai, N., Teerapakpinyo, C., and **Chanchao, C.** (2016) Expression and DNA methylation of *phospholipase A<sub>2</sub>* in Thai native honeybees (Hymenoptera: Apidae). *Russian Journal of Developmental Biology* 47(4): 190-201. (ISI, IF2014 = 0.305)

- Nugitrangson, P., Puthong, S., Iempridee, T., Pimtong, W., Pornpakakul, S., and **Chanchao, C.** (2016) *In vitro* and *in vivo* characterization of the anticancer activity of Thai stingless bee (*Tetragonula laeviceps*) cerumen. *Experimental Biology and Medicine* 241(2): 166-176. doi: 10.1177/1535370215600102 (ISI, IF2014 = 2.165)
- Nonthapa, P. and **Chanchao, C.** (2015) Pathogen detection and gut bacteria identification in *Apis cerana indica* in Thailand. *African Journal of Biotechnology* 14(49): 3235-3247. doi: 10.5897/AJB2015.14955
- Buahorm, S., Puthong, S., Palaga, T., Lirdprapamongkol, K., Phuwapraisirisan, P., Svasti, J., and **Chanchao, C.** (2015) Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 23: 5. doi: 10.1186/s40199-015-0138-1 (ISI, IF2014 = 1.638)
- Tree-udom, T., Thamyongkit, P., Wiratkasem, N., **Chanchao, C.**, Palaga, T., Insin, N., Pienpinijtham, P., Rengpipat, S., and Wanichwecharungruang, S. (2015) Harmonization of upconverting nanocrystals and photosensitizer for antimicrobial application. *Royal Society of Chemistry Advances* 5: 102416–102423. (ISI, IF2013 = 3.580)
- Kustiawan, P.M., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., Palaga, T., Arung, E.T., and **Chanchao, C.** (2015) Propolis from the stingless bee *Trigona incisa* from East Kalimantan, Indonesia induces *in vitro* cytotoxicity and apoptosis in cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16(15): 6581-6589. (ISI, IF2012 = 1.271)
- Kustiawan, P.M., Puthong, S., Arung, E.T., and **Chanchao, C.** (2014) *In vitro* cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(7): 549-556. (ISI, no IF)
- Premratanachai, P. and **Chanchao, C.** (2014) Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(5): 337-344. (ISI, no IF)
- Kijpornyongpan, T., Sereemasapun, A., and **Chanchao, C.** (2014) Dose-dependent cytotoxic effect of menthol on human malignant melanoma A-375 cells: correlation with TRPM8 transcript expression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(4): 1551-1556. (ISI, IF2012 = 1.271)
- Boonsai, P., Phuwapraisirisan, P., and **Chanchao, C.** (2014) Antibacterial activity of a cardanol from Thai *Apis mellifera* propolis. *International Journal of Medical Sciences* 11(4): 327-336. doi: 10.7150/ijms.7373 (ISI, IF2013 = 2.065)
- Kaewmuangmoon, J. and **Chanchao, C.** (2013) Over-expression and characterization of recombinant alpha – glucosidase I from *Apis cerana indica* in *E. coli*. *Journal of Apiculture* 28: 97-111.
- Kaewmuangmoon, J., Kilaso, M., Leartsakulpanich, U., Kimura, K., Kimura, A., and



- Chanchao, C.** (2013) Expression of a secretory  $\alpha$ -glucosidase II from *Apis cerana indica* in *Pichia pastoris* and its characterization. *BMC Biotechnology* 13: 16. doi: 10.1186/1472-6750-13-16. (ISI, IF2012 = 2.35)
- Rattanawanee, A., **Chanchao, C.**, Lim, J., Wongsiri, S., and Oldroyd, B.P. (2013) Genetic structure of a giant honey bee (*Apis dorsata*) population in northern Thailand: implications for conservation. *Insect Conservation and Diversity* 6: 38-44. doi: 10.1111/j.1752-4598.2012.00193.x. (ISI2009, IF = 2.828)
- Kaewmuangmoon, J., Yoshiyama, M., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2012) Characterization of some enzymatic properties of recombinant  $\alpha$ -glucosidase III from the Thai honeybee, *Apis cerana indica* Fabricus. *African Journal of Biotechnology* 11: 16220-16232. (abstract in CAB direct)
- Chantarudee, A., Phuwapraisirisan, P., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2012) Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 45. doi: 10.1186/1472-6882-12-45. (ISI, IF2012 = 2.24)
- Teerasripreecha, D., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2012) *In vitro* antiproliferative / cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 27. doi: 10.1186/1472-6882-11-37. (ISI, IF2012 = 2.24)
- Rattanawanee, A., **Chanchao, C.**, and Wongsiri, S. (2012) Geometric morphometric analysis of giant honeybee (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) populations in Thailand. *Journal of Asia Pacific Entomology* 15: 611-618. doi: 10.1016/j.aspen.2012.07.001. (ISI, IF2015 = 0.824)
- Rattanawanee, A., **Chanchao, C.**, Wongsiri, S., and Oldroyd, B.P. (2012) No evidence that habitat disturbance affects mating frequency in the giant honey bee *Apis dorsata*. *Apidologie* 43(6): 761-770. doi: 10.1007/s13592-012-0150-0. (ISI2009, IF = 1.493)
- Kaewmuangmoon, J., Nonthapa, P., Rattanawanee, A., Winayanuwattikun, P., and **Chanchao, C.** (2012) Preliminary screening for various bioactivities in honey and propolis extracts from Thai bees. *European Journal of Medicinal Plants* 2(2): 74-92.

## โครงการวิจัยอื่นๆที่กำลังดำเนินการ

ลำดับที่	ผู้วิจัยหลัก	หัวข้อเรื่อง	แหล่งทุน	ปีที่ได้	ปีที่คาดว่าจะสำเร็จ
1	จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า	การวิเคราะห์ทางโปรตีนโอมิกของเซลล์มะเร็ง BT-474 และ SKOV-3 ที่ถูกชักนำให้เกิดการตายโดย apigenin และ $\alpha$ -mangostin	เงินรายได้ของมหาวิทยาลัย ประเภททุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษก สมโภช ปีงบประมาณ 2560 (ครั้งที่ 9)	2560	2562
2	จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า	ความหลากหลายของแบคทีเรีย <i>Melissococcus plutonius</i> ที่ก่อโรคตัวอ่อนเน่ายุโรป (European foulbrood disease) ในผึ้ง	โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนสุตาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระ ราชดำริ โดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2560	2561

งานประจำในช่วงเวลาที่จะทำการวิจัยโดยประมาณ

งานสอน (15 ชั่วโมง/สัปดาห์) และงานบริการวิชาการ (2 ชั่วโมง/สัปดาห์)

แหล่งทุนอื่นที่ผู้วิจัยได้ส่งข้อเสนอโครงการวิจัยนี้ไปขอรับการสนับสนุน

ไม่มี  มี (โปรดระบุ).....

ขอรับรองว่าข้อความที่ให้ไว้เป็นความจริงทุกประการ

(ลงชื่อ)

จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

(นางสาวจันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 31 เดือนมกราคม พ.ศ. 2561