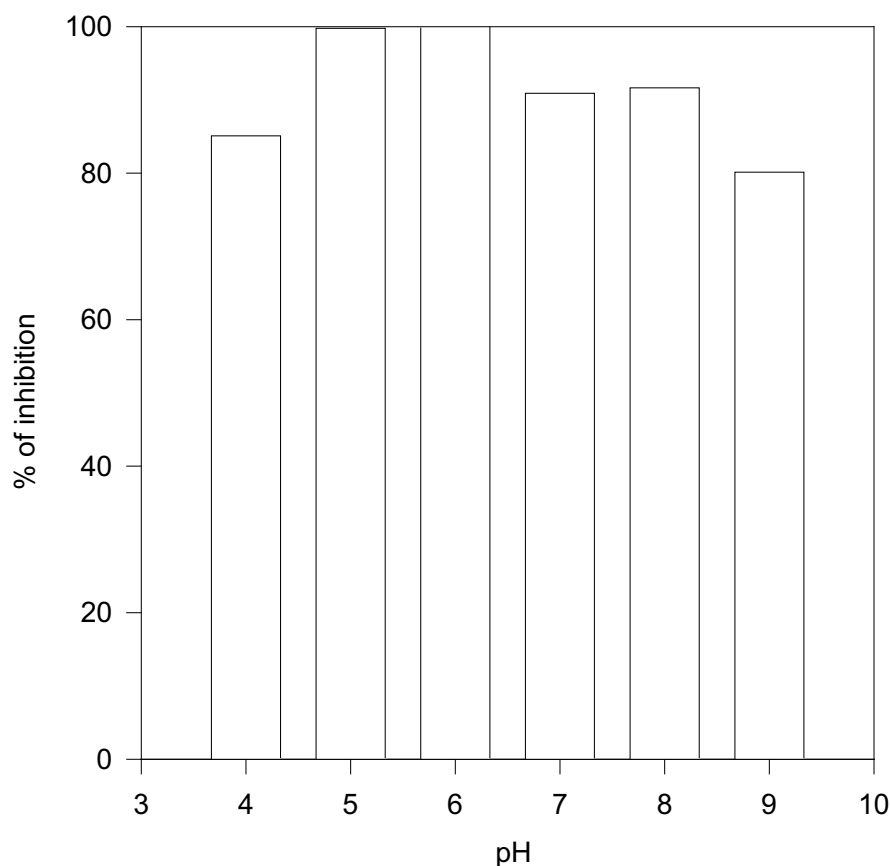




ภาพที่ 2.7 กราฟแสดงความเสถียรของสารสกัดจากออบเชยในสภาวะความเป็นกรดเป็นด่างต่างๆ (pH 4-9)

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจในฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งใน 5 จังหวัดทางภาคเหนือ คืออำเภอเมือง อำเภอแมริม อำเภอหางดง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอพานจังหวัดเชียงราย อำเภอจุนจังหวัดพะเยา อำเภอบ้านหลวงจังหวัดน่าน อ.สูงเม่น จ.แพร่ พบเชื้อรา 46 ตัวอย่าง เป็นโรคซอส์คิบรูตจากจังหวัดเชียงใหม่ 4 แหล่ง และจากอำเภอจุน จังหวัดพะเยา อีก 1 แหล่ง โดยไม่พบเชื้อราในผึ้งโพรงที่ทำการสำรวจ สาเหตุของการไม่พบโรคซอส์คิบรูตในผึ้งโพรงในหลายจังหวัดทางภาคเหนือเพราะว่าในปัจจุบันการเลี้ยงผึ้งโพรงไม่เป็นที่นิยมเลี้ยงจึงไม่มีแหล่งในการสำรวจที่พบโรคซอส์คิบรูต

โรคซอส์คิบรูตเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดเชียงใหม่และระบาดลงมาถึงจังหวัดพิษณุโลก² หลังจากนั้นมีการสำรวจของ ทิพย์ดีและคณะ¹ สำรวจโรคซอส์คิบรูตตามแหล่งเลี้ยงผึ้งทางเหนือและทางใต้ตั้งแต่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร เกาะสมุย และจังหวัดภูเก็ต

ช่วงการระบาดจะขึ้นอยู่กับสภาพภูมิประเทศ ตำแหน่งและ ภูมิอากาศ เกษตรกรเลี้ยงผึ้งทาง ชักโลกเหนือพบโรคชอล์คบรูด ในช่วงเดือนเมษายนถึงตุลาคมและจะมีมากที่สุดในช่วง พฤษภาคม-มิถุนายน ในประเทศสวีเดนเจอแลนด์พบสูงสุดในช่วงเดือนมิถุนายน¹⁸ ประเทศฝรั่งเศส และประเทศสหรัฐอเมริกา พบโรคชอล์คบรูดสูงสุดในเดือนกรกฎาคม^{10, 19, 26} อย่างไรก็ตามมีการ ตั้งสมมติฐานว่าโรคชอล์คบรูดจะระบาดมากในช่วงฤดูร้อน เนื่องจากปริมาณของผึ้งงานมีน้อยลง ทำงานหนักในการเก็บน้ำหวานจากดอกไม้ต่าง ๆ ในช่วงที่ดอกไม้บาน เป็นผลให้ผึ้งงานนั้นโทรม

การระบาดอย่างรุนแรงของโรคชอล์คบรูดของประเทศไทยในตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530มีสาเหตุ มาจาก ไม่เคยมีการระบาดของโรคนี้มาก่อน ทำให้ขาดความรอบคอบในการตรวจสอบโรคนี้ในรัง ผึ้งที่นำเข้ามาในประเทศ เชื้อโรคจึงติดมากับรังและแพร่กระจายไปอย่างรวดเร็ว อีกทั้งการ สนับสนุนการเลี้ยงผึ้งของหน่วยงานภาครัฐเช่น ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตรไม่ได้ทำ การตรวจและศึกษาโรคของผึ้งด้วยการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ¹

นอกจากนี้การสะสมเชื้อโรคในรังผึ้งมีอย่างต่อเนื่องเพราะในเขตร้อนชื้นผึ้งแม่รังจะวางไข่ตลอดปี ทำให้โรคติดต่อจากตัวอ่อนวัยหนึ่งไปอีกรายหนึ่งและจากรังหนึ่งได้ตลอดเวลา สภาพ ความชื้นในแหล่งเลี้ยงผึ้ง เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรค โดยอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการเจริญของโรคชอล์คบรูดอยู่ที่ 30-35 องศาเซลเซียส²⁷ ในที่มีความชื้นที่สูง (ประมาณ 87%) จะมีเปอร์เซ็นต์ของการเป็นโรคสูงขึ้น 7.75% เมื่อเทียบกับความชื้นสัมพัทธ์ที่ต่ำกว่า (ประมาณ 68%) จะมีอัตราการเป็นโรคเพียงแค่ 0.95% ตัวอย่างเช่น การเลี้ยงผึ้งในเขตหนาวเช่นรัฐไวโอมิง (Wyoming) ของอเมริกาการเกิดโรคจะมีน้อยกว่าเพราะปริมาณความชื้นในอากาศมีน้อย¹¹

การขยายกิจการการเลี้ยงผึ้ง ทำให้มีการเคลื่อนย้ายรังผึ้งไปในที่ต่าง ๆ บ่อย ๆ โรคจึง แพร่ระบาดได้กว้างขวางออกไปเรื่อย ๆ Gilliam *et al.*¹² พบว่ามีการแพร่กระจายของโรคชอล์คบรูด จากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ไปสู่ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ในประเทศเกาหลีใต้มีสาเหตุสำคัญมาจากการเคลื่อนย้ายการเลี้ยงผึ้งและการนำผึ้งพันธุ์จากต่างประเทศเข้ามาเลี้ยงในประเทศ ทำให้ผึ้งโพรง พื้นเมืองติดโรคไปด้วย ในประเทศไทยมีผู้เลี้ยงผึ้งรายใหญ่มากอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ มีการโยกย้ายการเลี้ยงผึ้งไปตามฤดูกาลบานของดอกไม้ชนิดต่าง ๆ ในหลายท้องที่ เช่น ดอกกล้วยไม้ทางภาคเหนือ ดอกนุ่นทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือแม้กระทั่งยางพาราทางภาคใต้² การขายผึ้งและ อุปกรณ์ผึ้งที่ไม่ได้ผ่านการตรวจสอบเชื้อโรคอาจจะนำไปสู่การแพร่กระจายของโรคได้เช่นกัน เนื่องจากสปอร์ของโรคชอล์คบรูดนั้นสามารถอยู่ได้นานถึง 15 ปี²¹ ดังนั้นหากขาดวิธีการควบคุม กำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพ ไม่มีการศึกษาวิจัยอย่างจริงจัง และขาดการประชาสัมพันธ์ให้ผู้เลี้ยงผึ้งมี ความรู้เบื้องต้นในการป้องกันการติดโรคและตระหนักถึงความเสี่ยงอันตรายอันเกิดขึ้นจากโรคนี้จะทำให้ การระบาดรุนแรงขึ้น

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืช 10 ชนิด คือ กระเทียม (*Allium sativum* Linn.) กานพลู (*Eugenia caryophyllum* Bullock & Harrison) พลุ (*Piper betle* Linn.) ขมิ้นชัน (*Curcuma*

longa Linn.) โป้ยักษ์ (*Illicium verum* Hook) อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Kurz.) สะเดา (*Azadirachta siamensis*) ว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.) หนอนตายอยาก (*Stemona tuberosa* Lour.) พบว่าอบเชยให้การยับยั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ในตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตต ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 1.5% (w/v), 2.0% (w/v) และ 10.0% (w/v) ตามลำดับ พบว่าตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารจากอบเชย ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Ascosphaera apis* ได้ดีที่สุดคือเฮกเซนมีลักษณะความเป็นขี้ดดำ คือตัวทำละลายของผลึกที่ดีที่สุดที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Ascosphaera apis* คือเอทิลอะซิเตตใช้ความเข้มข้น 3.5% (w/v) ในส่วนของพืชอื่น ๆ นั้นต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงคือ 7.5% (w/v) ได้แก่ พลูในเฮกเซน, ไคคลอโรมีเทนและแอลกอฮอล์ 95% กานพลูในเฮกเซน นอกจากนี้พืชสมุนไพรหรือเครื่องเทศบางชนิดต้องใช้ความเข้มข้น 10% จึงจะมีผลในการยับยั้งอย่างสมบูรณ์คือโป้ยักษ์ในไคคลอโรมีเทน พืชหลายชนิดต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 10% จึงจะมีผลในการยับยั้งอย่างสมบูรณ์

จากการทดลองพบว่า อบเชย (*Cinnamomum cassia*) เป็นสารสกัดสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคราซอสค์บรูดได้ดี *Cinnamomum cassia* เป็นหนึ่งในเครื่องเทศที่เก่าแก่ที่สุดในโลกใช้ในอาหาร เครื่องดื่ม อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ซึ่งน้ำมันของอบเชยยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของราได้⁷ ตลอดจนยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์⁹ เช่น *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. และ *Enterobacter* spp. สารประกอบหลักที่สามารถต้านแบคทีเรียและราได้คือ cinnamic aldehyde²⁰

ความเสถียรของสารต่อการแปรเปลี่ยนของอุณหภูมิช่วง 30-37 องศาเซลเซียสและความเป็นกรดเป็นด่างเป็นปัจจัยสำคัญในการใช้สารนี้ในการกำจัดโรคพืชในภาคสนาม จากผลการทดลองสารสกัดจากอบเชยน่าจะเป็นสารที่สามารถใช้ในภาคสนามได้ อย่างไรก็ตามจะต้องมีการทดลองภาคสนามว่าสารสกัดนี้ไม่เป็นอันตรายหรือมีผลกระทบต่อพืชและกิจกรรมของพืช และดลองวิธีการแปรรูปสารสกัดที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งได้ง่ายและราคาถูก

เอกสารอ้างอิง

- 1) ทิพย์วดี อรรถธรรม, สุดาวรรณ เขยชมศรี, พิชัย คงพิทักษ์ (2533) โรคชอล์กบรูคของผึ้งและการป้องกันกำจัด. รายงานผลการวิจัย ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 2) สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ (2532) ชีววิทยาของผึ้ง บริษัท ต้นอ้อ จำกัด หน้า 1-176.
- 3) Bailey, L., and Ball, B.V. (1991) Honey bee pathology. Academic press, London, 53-63
- 4) Bailey, L. (1967) The effects of temperature on the pathogenicity of the fungus *Ascosphaera apis*, for larvae of the honey bee, *Apis mellifera*, In proceeding of international colloquium on insect pathology and microbial control (P.A. van der Laan, Ed. Pp. 162-167. North-Hollan, Amsterdam.
- 5) Betts, A.D. (1932) Fungus diseases of bees. *Bee world*, 40:156.
- 6) Bissett, J. (1988) Contribution towards a monograph of the genus *Ascosphara*. *Canadian Journal of Botany*, 66: 2541-2560.
- 7) Bullerman, C.U., Lieu, F.Y., Seier, S. (1977) Inhibition of growth and alfatoxin production by cinnamon and cloves oils, cinnamic aldehyde and eugenols. *Journal of Food Science*, 42:1107-1109.
- 8) Calderone, N.W., Shimanuki, H., Allen-Wardell, G. (1994) An *in vitro* evaluation of botanical compounds for the control of the honeybee pathogens *Bacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the secondary invader *B. alvei*. *Journal of essential oils research*, 6: 279-287.
- 9) Chao, S.C, Yong, D.G., and Oberreg, C.J. (2000) Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12 (5): 639-649.
- 10) De Jong, D (1977) A study of chalkbrood disease of honey bees in US. Cornell University, Ithaca, USA. M. Sc. Thesis.
- 11) Gilliam, M. (1990) Chalkbrood disease of honey bees, *Apis mellifera*, caused by the fungus, *Ascosphaera apis*: Review of past and current research. Fifth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control: 398-402.
- 12) Gilliam, M., Lorenz, B.J., and Prest, D.B. (1993) *Ascosphaera apis* from *Apis cerana* from South Korea. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61(1):111.
- 13) Gilliam, M (1997) Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155(1):1-10.

- 14) Gochnauer, T.A., Boch, R., Margetts, V.J. (1979) Inhibition of *Ascosphaera apis* by citral and geraniol. *Journal of Invertebrate Pathology*, 34:57-61.
- 15) Heath, L.A.F. (1985) Occurrence and distribution of chalkbrood disease of honey bees. *Bee world*, 66: 9-15.
- 16) Hornitzky, M. (2001) Literature review of chalkbrood: a fungal disease of honey bees RIRDC publication No 01/150 NSW Agriculture.
- 17) Kajikawa, K. and Nakene, T. (1986) Preventative measures for chalkbrood: selection of the most effective drugs and its application to diseased colonies. *Honey Bee Science*, 7: 69-74.
- 18) Maurizio, A. (1934) Über die Kenntnis der Pilzflora im Bienenstock. I. Die Pericystisinfektion der Bienenlarven. *Ber. Schweiz.bot. Ges.* 44:133-156.
- 19) Menapace, D.M. (1976) Chalkbrood infection and detection in colonies of honey bees, *Apis mellifera*. *American Bee Journal*, 118(3): 158-159.
- 20) Park, I., Lee, H., Lee, S., Park, J., Ahn, Y. (2000) Insecticidal and fumigant activities of *Cinnamon cassia* bark-derived material against *Mechoris ursulus* (Coleoptera: Attelabidae). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48:2528-2531.
- 21) Sammataro, D., and Avitabile, A. (1998) *The Beekeeper's Handbook*. 3rd ed, Cornell University Press, London.
- 22) Seal, D. W. A. (1957) Chalkbrood disease of bees. *New Zealand Journal of Agriculture*, 6:52.
- 23) Serrano, F. J. M., Puerta, P. F., Ruiz, B.M., Alvarez, P.F., Jiménez, J.A., Garcia, T.F. (1995) The effect of trichloroisocyanuric acid on the germination of *Ascosphora apis*. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 12(2) 49051.
- 24) Spiltoir, C.F. and Olive L.S. (1955) A reclassification of the genus *Pericystis* Betts. *Mycologia*, 47: 238-244.
- 25) Taber, S. Saskett, R., and Millis, J. (1975) A possible control of chalkbrood disease. *American Bee Journal*, 155:20.
- 26) Toumanoff, C. (1951) Les maladies des abeilles. *Rev. fr. Apic.* Numero special no. 68.
- 27) Winston, E. (1970) Ethylene oxide treatment methods for the small beekeeper. *American bee Journal*, 110:10-11.

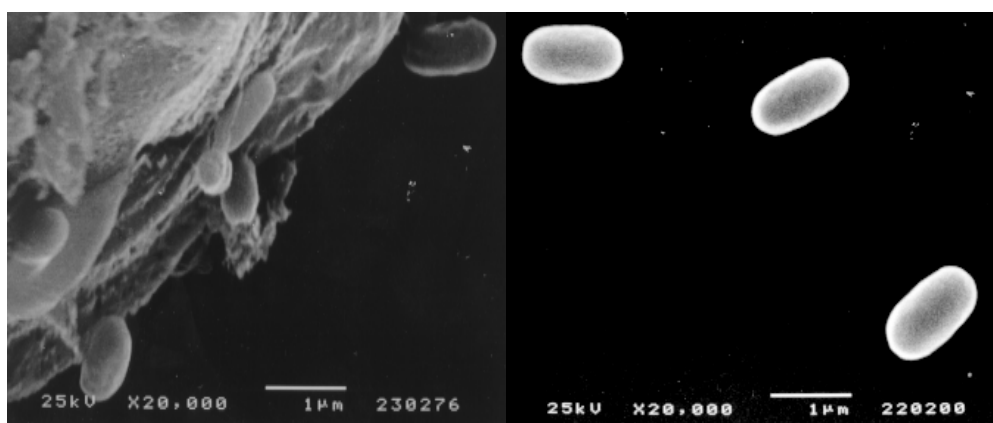
บทที่ 3 โรคเชื้อแบคทีเรียในตัอ่อนผึ้ง *

เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคตัวอ่อนเน่าในผึ้งที่เป็นที่รู้จักคือ โรคอเมริกันฟาวบรูค (American foulbrood) และ โรคยุโรปเฟียนฟาวบรูค (European foulbrood)

โรคอเมริกันฟาวบรูค (American foulbrood)

ตัวอ่อนที่เป็นโรคนี้นี้จะมีกลิ่นเน่ารุนแรงและตัวอ่อนที่เน่าตายจะมีลักษณะยางเหนียวที่เรียกว่า ropy stage หลังจากนั้นจะแห้งติดที่พื้นล่างของหลอดรวง สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* สปอร์ของเชื้อก่อโรค (ภาพที่ 3.1) จะงอกในส่วนทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้งและจะทะลุผ่าน peritrophic membrane และในที่สุดเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต เซลล์แบคทีเรียจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและในที่สุดตัวอ่อนของผึ้งจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน⁶

การเพาะเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการสามารถเพาะลงบนอาหารหลายชนิดเช่น J agar Sheep blood agar⁹ ในการเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการจะมีเชื้อในجنัส *Bacillus* และ *Paenibacillus* หลายชนิดที่จะเจริญเนื่องจากอาศัยในแหล่งเดียวกัน ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ 16 S rRNA gene⁸ เพื่อตรวจตัวอ่อนเน่าเป็นการยืนยันการติดเชื้อก่อโรคอเมริกันฟาวบรูคร่วมกับเทคนิคการเลี้ยงเชื้อและบ่งชนิดเชื้อทางจุลชีววิทยา



ภาพที่ 3.1 สปอร์ของเชื้อ *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* จากแหล่งต่างๆ (ซ้าย: ตัวอ่อนเน่า AFB; ขวา: บนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ)⁶

* งานบางส่วนในบทนี้ได้เสนอ Oral presentation ในงานประชุม International Congress of Entomology 2004, Brisbane, Australia และ poster presentation ในงานประชุม Apimondia 2003, Ljubljana, Slovenia

โรคยุโรปียนฟาวบรูค (European foulbrood)

ตัวอ่อนจะตายเมื่ออายุได้ประมาณ 4-5 วัน จะเกิดขึ้นในช่วงก่อนฤดูร้อนเมื่อโคลอนิของผึ้งมีการขยายตัวเร็ว ตัวอ่อนผึ้งจะตาย ลักษณะตัวจะเป็นฟาม เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และย่อยสลายให้กลิ่นเน่าเปรี้ยวรุนแรงในบางกรณี ถ้านำตัวอ่อนมาดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อผ่าช่องทางเดินอาหารส่วนกลางจะเห็นแบคทีเรียเจริญเป็นสีขาวขุ่น

โรคนี้เกิดจากเชื้อ *Melissococcus plutonius* ซึ่งเป็น แบคทีเรียติดสีกรัมบวก ลักษณะคล้ายลูกปัด จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ต่อกันเป็นสายหรือ เป็นกลุ่ม การค้นพบในระยะแรกตั้งชื่อเป็น *Bacillus pluton*¹¹ และ *Streptococcus pluton*² แต่เมื่อพบว่ามีความ G+C ประมาณ 29%³ ซึ่งทำให้แตกต่างกับแบคทีเรียในจีนัส *Streptococcus* นอกจากนี้ยังไม่สร้างสปอร์เหมือนแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus*

แบคทีเรียจะปนเปื้อนไปกับอาหาร แบคทีเรียก่อโรคนี้นี้ต้องการออกซิเจนในระดับต่ำหรือ สภาวะไร้ออกซิเจน และต้องการก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียจะเจริญในอาหารในทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้ง ถ้าตัวอ่อนมีการถ่ายของเสีย จุลินทรีย์จะติดอยู่ที่ฐานเซลล์และสามารถก่อเชื้อได้อีกเป็นระยะเวลาหลายปี ผึ้งงานอาจจะช่วยกำจัดเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ ซึ่งอาจทำให้เกิดการแพร่จากเซลล์สู่เซลล์ ตัวอ่อนของผึ้งจะเป็นโรคได้ทุกระยะการเติบโตในช่วงฟาลอดตรงยังไม่ปิด ตัวอ่อนที่มีอายุมากกว่าจะสามารถต้านโรคได้ดีกว่าตัวอ่อนที่มีอายุน้อย อาจเป็นเพราะว่าเกิดจากสภาพอาหารน้อยลง ในช่วงที่มีการผลิตน้ำหวานมากๆ การเลี้ยงตัวอ่อนจะเพิ่มมากขึ้นอย่างกะทันหัน ทำให้ตัวอ่อนได้รับอาหารไม่สมบูรณ์ ผึ้งงานจะเก็บน้ำหวานเป็นส่วนมากทำให้ไม่สามารถตรวจตรารังได้เต็มที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคขึ้น ในรังที่อ่อนแอจะติดโรคได้ง่าย

การระบาดของโรคพบได้โดยทั่วไปในบริเวณที่มีการเลี้ยงผึ้งทั่วโลก โดยที่สายพันธุ์ที่พบจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ยกเว้น สายพันธุ์ในประเทศบราซิลและ สายพันธุ์ที่พบในผึ้งชนิดอื่น เช่น *A. laboriosa*¹ ซึ่งจะมีความแตกต่างมากกว่ากลุ่มสายพันธุ์อื่น

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อสำรวจโรคในผึ้งที่เกิดจากโรคแบคทีเรียในผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรงในไทย
2. เพื่อบ่งชี้ชนิดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในผึ้งที่พบ
3. เพื่อคัดเลือกสารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค
4. เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง
5. ทดสอบความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง

วิธีการทดลอง

1. การสำรวจแบคทีเรียจากฝัังโพรงและฝัังพันธุ์ในตัวอ่อนที่เป็นโรค

1.1 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอ่อนฝัังพันธุ์และฝัังโพรงที่เป็นโรคที่เกิดจากแบคทีเรียจากลักษณะการเกิดโรค โดยเก็บตัวอ่อนที่เป็นโรคจากแหล่งเลี้ยงฝััง

1.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บได้จากตัวอ่อนมาทำการแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ บนอาหาร Brain Heart Infusion ในกรณีที่เป็นโรคอเมริกันฟาวบรูค และ EFB medium^{4, 7} ในกรณีที่เป็นโรคยูโรเปียนฟาวบรูค แล้วเก็บเชื้อไว้เป็น stock ในอาหารเยือก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2. บ่งชนิดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคตามฐานฐานวิทยาและชีวเคมีตามคีย์ใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology^{2,4,6} โดยเปรียบเทียบสายพันธุ์เชื้อ reference strains ที่ทำให้เกิดโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน ตัวอ่อนเน่ายูโรเปียน จาก Culture Collection เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน จะทดสอบหาความแตกต่างของสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบ zymogram ด้วยวิธี native gel electrophoresis⁶

3. การคัดเลือกสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

คัดเลือกสมุนไพรและเครื่องเทศ และเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศและนำไปศึกษาการออกฤทธิ์การต้านเชื้อโดยวิธี agar disc diffusion technique และ ทำการทดสอบผลของสารสกัดธรรมชาติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกมาได้ในข้อ 2

4. ประเมินผลวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibition Concentration, MIC) โดยใช้วิธี paper disc diffusion

5. การทดสอบความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการเลี้ยงฝััง

ศึกษาความเสถียรของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และรังสีอัลตราไวโอเลต

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากฝิ่งและตัวอ่อนฝิ่งที่เป็นโรคแบคทีเรียและลักษณะฐานวิทยา

จากการสำรวจฝิ่งและตัวอ่อนฝิ่งที่เป็นโรคและเก็บตัวอย่างฝิ่งและตัวอ่อนฝิ่งที่แสดงอาการพบว่าได้เชื้อแบคทีเรียกรัมบวก แท่ง และกลุ่มที่สร้างสปอร์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจนดังตารางที่ 3.1 และ 3.2

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียทรงกลมกรัมบวกและแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

ไอโซเลท	การติดสีกรัม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รหัส	แหล่งที่เก็บ
A1	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E3-3	หางดง
A2	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E3-1	หางดง
A3	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-1	สารภี
A4	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-1 10 ⁰	สารภี
A5	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-8	สารภี
A6	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 4-4	แม่ริม
A7	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 6-8	แม่ริม
A8	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 4-4 10 ⁰	แม่ริม
A9	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 6-8	HL
A10	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-5	สารภี
A11	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 5-2	เกษตรศาสตร์ มช.
A12	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 5-1	เกษตรศาสตร์ มช.
A13	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 4-1	แม่ริม
A14	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 1-6	HL
A15	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 1-2	HL
A16	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 1-2	HL
A17	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-2	สารภี
A18	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	EF1-3	HL
A19	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	EF1-3 10 ¹	HL
A20	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	EF1-3 10 ⁵	HL
A21	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-2	สารภี
A24	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	EF1-3	HL
A26	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-2 10 ²	สารภี
A27	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-2 10 ²	สารภี
A30	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-2 10 ²	สารภี
A33	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	PN 2	อ.พาน จ.เชียงราย
A34	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	PN 3	อ.พาน จ.เชียงราย
A35	+	Coccus เชลต์่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	E 2-2	สารภี

ไอโซเลท	การติดสีกรัม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รหัส	แหล่งที่เก็บ
A106	+	Coccus เชลต่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	SM 13 10 ⁶	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A107	+	Coccus เชลต่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	SM 10	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A108	+	Coccus เชลต่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	SM 10 10 ²	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A109	+	Coccus เชลต่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	SM 10 10 ³	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A110	+	Coccus เชลต่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด	SM 10 10 ⁶	อ.สูงเม่น จ.แพร่

- A = bacteria growth in anaerobic condition ; P = bacteria growth in aerobic condition

ตารางที่ 3.2 แบบที่เรียรูปร่างและแหล่งตัวอย่างที่เก็บ

ไอโซเลท	การติดสีกรัม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รหัส	แหล่งที่เก็บ
P3	+	Rod มี endospore	E 2-5	อ.สารภี จ.เชียงใหม่
P4	+	Rod มี endospore	E 1-6	HLจ.เชียงใหม่
P7	+	Rod มี endospore	E 1-6 10 ²	HLจ.เชียงใหม่
P8	+	Rod มี endospore	E 5-2	เกษตรศาสตร์ มช.
P11	+	Rod มี endospore	E 2-1	อ.สารภี จ.เชียงใหม่
P20	+	Rod มี endospore	E 1-2	HLจ.เชียงใหม่
P21	+	Rod มี endospore	E 2-1	อ.สารภี จ.เชียงใหม่
P26	+	Rod มี endospore	EF 1-4	HLจ.เชียงใหม่
P27	+	Rod มี endospore	EF 1-4 10 ¹	HLจ.เชียงใหม่
P32	+	Rod มี endospore	EF 1-4	HLจ.เชียงใหม่
P36	+	Rod มี endospore	EF 1-4	HLจ.เชียงใหม่
P37	+	Rod มี endospore	EF 1-4	HLจ.เชียงใหม่
P39	+	Rod มี endospore	PN 1	อ.พาน จ.เชียงราย
P40	+	Rod มี endospore	EF 1-5 10 ¹	HLจ.เชียงใหม่
P41	+	Rod มี endospore	EF 1-1	HLจ.เชียงใหม่
P44	+	Rod มี endospore	EF 1-4 10 ²	HLจ.เชียงใหม่
P46	+	Rod มี endospore	PN 1	อ.พาน จ.เชียงราย
P47	+	Rod มี endospore	PN 1 10 ¹	อ.พาน จ.เชียงราย
P48	+	Rod มี endospore	PN 3	อ.พาน จ.เชียงราย
P49	+	Rod มี endospore	PN 3 10 ³	อ.พาน จ.เชียงราย
P52	+	Rod มี endospore	EF 1-5	HLจ.เชียงใหม่
P52	+	Rod มี endospore	EF 1-5	HLจ.เชียงใหม่

ไอโซเลท	การติดสีกรัม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รหัส	แหล่งที่เก็บ
P54	+	Rod มี endospore	EF 1-510 ³	HL จ.เชียงใหม่
A22	+	Rod มี endospore	EF 2-3	อ.สารภี จ.เชียงใหม่
A23	+	Rod มี endospore	EF 2-2	อ.สารภี จ.เชียงใหม่
A25	+	Rod มี endospore	EF 2-2 10 ²	อ.สารภี จ.เชียงใหม่
A28	+	Rod มี endospore	PN 1	อ.พาน จ.เชียงราย
A29	+	Rod มี endospore	PN 1 10 ³	อ.พาน จ.เชียงราย
A31	+	Rod มี endospore	PN 3	อ.พาน จ.เชียงราย
A32	+	Rod มี endospore	PN 1 10 ¹	อ.พาน จ.เชียงราย
A38	+	Rod มี endospore	E 1 10 ⁰	HL จ.เชียงใหม่
A39	+	Rod มี endospore	EF 1-1 10 ¹	HL จ.เชียงใหม่
A44	+	Rod มี endospore	EF 1-4	HL จ.เชียงใหม่
A45	+	Rod มี endospore	EF 1-5	HL จ.เชียงใหม่
A47	+	Rod มี endospore	J 3	อ.จุน จ.พะเยา
A48	+	Rod มี endospore	J 2	อ.จุน จ.พะเยา
A52	+	Rod มี endospore	J 5	อ.จุน จ.พะเยา
A57	+	Rod มี endospore	J 2 10 ¹	อ.จุน จ.พะเยา
A58	+	Rod มี endospore	J 1	อ.จุน จ.พะเยา
A59	+	Rod มี endospore	J 6	อ.จุน จ.พะเยา
A60	+	Rod มี endospore	J 7	อ.จุน จ.พะเยา
A61	+	Rod มี endospore	J 5	อ.จุน จ.พะเยา
A62	+	Rod มี endospore	J 4	อ.จุน จ.พะเยา
A63	+	Rod มี endospore	J 3	อ.จุน จ.พะเยา
A77	+	Rod มี endospore	SM 4	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A88	+	Rod มี endospore	SM 8	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A89	+	Rod มี endospore	SM 8 10 ²	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A100	+	Rod มี endospore	SM 12	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A101	+	Rod มี endospore	SM 12 10 ¹	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A26	+	Rod มี endospore	E 2-2	อ.สารภี จ.เชียงใหม่
A20	+	Rod มี endospore	EF 1-3	HL จ.เชียงใหม่
A6	+	Rod มี endospore	E 3-3	อ.หางดง จ.เชียงใหม่
A41	+	Rod มี endospore	E	อ.หางดง จ.เชียงใหม่
A36	-	Rod, no endospore forming	E 2-2	อ.สารภี จ.เชียงใหม่
A40	+	Rod, mucus no endospore forming	E 2-2	อ.สารภี จ.เชียงใหม่
A41	+	Rod, mucus no endospore forming	E	อ.หางดง จ.เชียงใหม่

ไอโซเลท	การติดสีกรัม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รหัส	แหล่งที่เก็บ
A46	+	Rod, no endospore forming	PN 3	อ.พาน จ.เชียงราย
A48	-	Rod, no endospore forming	J 2	อ.จุน จ.พะเยา
A49	+	Rod, mucus no endospore forming	J 2	อ.จุน จ.พะเยา
A50	+	Rod, no endospore forming	J 6	อ.จุน จ.พะเยา
A51	+	Rod, no endospore forming	J 5	อ.จุน จ.พะเยา
A55	+	Short rod, no endospore forming	J 1	อ.จุน จ.พะเยา
A56	+	Rod, mucus no endospore forming	J 1	อ.จุน จ.พะเยา
A57	+	Rod, mucus no endospore forming	J 2	อ.จุน จ.พะเยา
A59	+	Rod, no endospore forming	J 6	อ.จุน จ.พะเยา
A61	+	Rod, no endospore forming	J 5	อ.จุน จ.พะเยา
A62	+	Rod, no endospore forming	J 4	อ.จุน จ.พะเยา
A63	+	Rod, no endospore forming	J 3	อ.จุน จ.พะเยา
A82	+	Short rod, no endospore forming	J 2	อ.จุน จ.พะเยา
A87	+	Rod, no endospore forming	SM 8	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A88	+	Rod, no endospore forming	SM 8 10^2	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A89	+	Rod, no endospore forming	SM 8 10^1	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A96	+	Short rod, no endospore forming	SM 11 10^1	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A97	+	Rod, no endospore forming	SM 11 10^3	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A98	+	Rod, no endospore forming	SM 12	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A99	+	Short rod, no endospore forming	SM 12 10^1	อ.สูงเม่น จ.แพร่
A101	+	Short rod, no endospore forming	SM 12	อ.สูงเม่น จ.แพร่

- A = bacteria growth in anaerobic condition
- P = bacteria growth in aerobic condition

2. การบ่งชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี

เชื้อแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนและเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่ามีแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท(A17, A20, A37, A70, A72, A76) เป็นเชื้อก่อโรคมะเร็งโรเปียนฟาวบรูค (*Melissococcus plutonius*) เชื้อที่สร้างสปอร์ที่พบมีเชื้อ *B. stearothermophilus* (29%), *B. macerans* (3.9%), *B. laterosporus* (13.7%), *B. circulans* (9.8%), *B. firmis* (9.8%), *B. coagulans* (17%)และ *B. licheniformis* (17%) ไม่พบเชื้อก่อโรคมะเร็งโรเปียนฟาวบรูคที่อยู่ในจีนัส *Paenibacillus* (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ตามกีย์ Norris *et al.*¹⁰

ไอโซเลท	Catalase test	VP test	50°C	65°C	7% NaCl	การย่อยแป้ง	การสร้างกรดจากกลูโคส	การเจริญในสภาพที่ไร้ออกซิเจน	ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	
P3	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	
P4	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B.stearothermophilus</i>	
P7	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B.stearothermophilus</i>	
P8	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B.stearothermophilus</i>	
P11	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B.stearothermophilus</i>	
P20	+	-	ND	-	ND	+	+	ND	<i>B. macerans</i>	
P21	+	-	ND	-	ND	+	+	ND	<i>B. macerans</i>	
P26	+	-	ND	-	ND	-	ND	+	<i>B. laterosporus</i>	
P27	+	-	ND	-	ND	-	ND	+	<i>B. laterosporus</i>	
P32	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B.stearothermophilus</i>	
P36	+	-	ND	-	ND	+	-	10 um org -	PH in VP +	<i>B. circulans</i>
P37	+	-	ND	-	ND	+	-	10 um org -	PH in VP +	<i>B. circulans</i>
P39	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B.stearothermophilus</i>	
P40	+	-	ND	-	ND	-	ND	+	<i>B. laterosporus</i>	
P41	+	-	ND	-	ND	-	ND	+	<i>B. laterosporus</i>	
P44	+	-	ND	-	ND	+	-	10 um org -	PH in VP +	<i>B. circulans</i>

ไอโซ เลข	Catal ase test	VP test	50°C	65°C	7% NaCl	การย่อย แป้ง	การสร้าง กรดจาก กลูโคส	การ เจริญใน สภาพที่ ไร้ ออกซิเจ น	ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	
P46	+	-	ND	-	ND	-	ND	+	<i>B. laterosporus</i>	
P47	+	-	ND	-	ND	+	ND	10 um org -	PH in VP -	<i>B. firmis</i>
P48	+	-	ND	-	ND	+	ND	10 um org -	PH in VP -	<i>B. firmis</i>
P49	+	-	ND	-	ND	+	ND	10 um org -	PH in VP -	<i>B. firmis</i>
P52	+	-	ND	-	ND	+	ND	10 um org -	PH in VP -	<i>B. firmis</i>
P52	+	-	ND	-	ND	+	ND	10 um org -	PH in VP -	<i>B. firmis</i>
P54	+	-	ND	-	ND	+	-	10 um org -	PH in VP +	<i>B. circulans</i>
A22	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	<i>B. coagulans</i>	
A23	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	<i>B. coagulans</i>	
A25	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B. stearothermophilus</i>	
A28	+	-	ND	-	ND	+	-	10 um org -	PH in VP +	<i>B. circulans</i>
A29	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B. stearothermophilus</i>	
A31	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B. stearothermophilus</i>	
A32	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	<i>B. coagulans</i>	
A38	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>	
A39	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B. stearothermophilus</i>	
A44	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>	

ไอโซ เลข	Catal ase test	VP test	50°C	65°C	7% NaCl	การย่อย แป้ง	การสร้าง กรดจาก กลูโคส	การ เจริญใน สภาพที่ ไร้ ออกซิเจ น	ชนิดเชื้อแบคทีเรีย
A45	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>
A47	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	<i>B. coagulans</i>
A48	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	<i>B. coagulans</i>
A52	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>
A57	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	<i>B. coagulans</i>
A58	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	<i>B. coagulans</i>
A59	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	<i>B. coagulans</i>
A60	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	<i>B. coagulans</i>
A61	+	-	ND	-	ND	-	ND	+	<i>B. laterosporus</i>
A62	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B. stearothermophilus</i>
A63	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B. stearothermophilus</i>
A77	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>
A88	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>
A89	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>
A100	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>
A101	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>
A27	+	-	ND	-	ND	-	ND	+	<i>B. laterosporus</i>
A41	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	<i>B. lichenformis</i>
P34	+	-	ND	+	ND	ND	ND	ND	<i>B. stearothermophilus</i>

* ND = No Data

- A = bacteria growth in anaerobic condition
- P = bacteria growth in aerobic condition

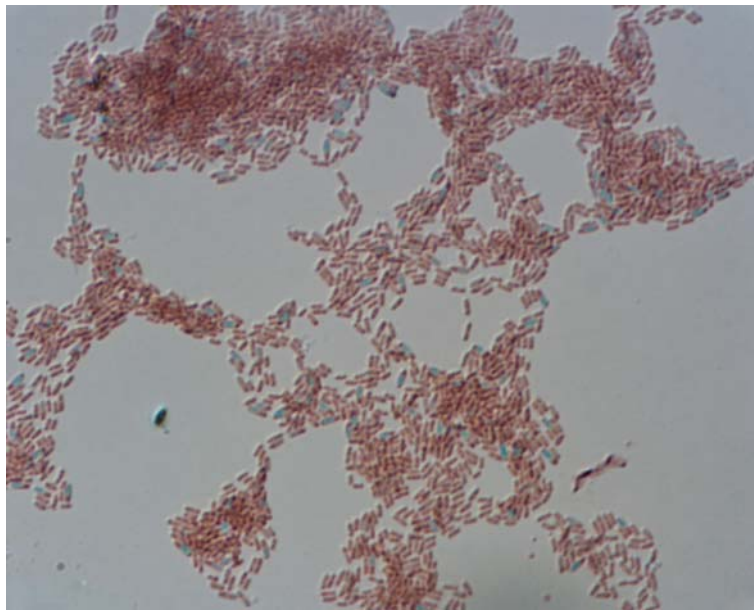
จากการศึกษาทางด้านชีวเคมีและปฏิกิริยา serological tests พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคยูโรเปียนฟาวบรูคที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่ (A17,20) และแพร่ (A72,A76) พบความแตกต่างในการทดสอบในตารางที่ 3.4 เปรียบเทียบกับเชื้อ type strain จากประเทศออสเตรเลีย ดังนั้นในการบ่งชนิดเชื้อก่อโรคยูโรเปียนฟาวบรูคด้วยวิธีทางชีวเคมีจะได้ผลไม่แน่นอน ในการทดลองได้ใช้ primer ที่เสนอโดย Govan *et al.*⁸ ไม่พบ amplified DNA fragment ที่ 812 bp

ตารางที่ 3.4 ผลการทดสอบทางด้านชีวเคมีและ serological test ของเชื้อก่อโรคยูโรเปียนฟาวรูดที่แยกได้กับเชื้ออ้างอิงจาก Regional Laboratory (Elizabeth Macarthur Agricultural Institute (NSW Agriculture), Australia) (Aus 1 จาก South Australia; Aus2,Aus3 จาก New South Wales)

การทดสอบ	A17	A20	A70	A72	A76	Aus1	Aus2	Aus3
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferment								
-Glucose	+	+	+	+	+	-	-	-
-Maltose	+	+	+	+	+	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
H y d r o g e n sulfide	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-
MR test	+	+	+	+	+	-	+	-
VP test	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on NA	-	-	-	-	-	-	+	-
Growth								
-10 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
-45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
-pH 9.6	-	-	-	-	-	-	-	-
-6.5 % NaCl	-	-	-	-	-	-	+	-
Antiserum_Aus1	-	-	-	-	-	+	+	+
Antiserum_Aus2	-	-	-	-	-	-	+	-
Antiserum_Aus3	-	-	-	-	-	+	+	+



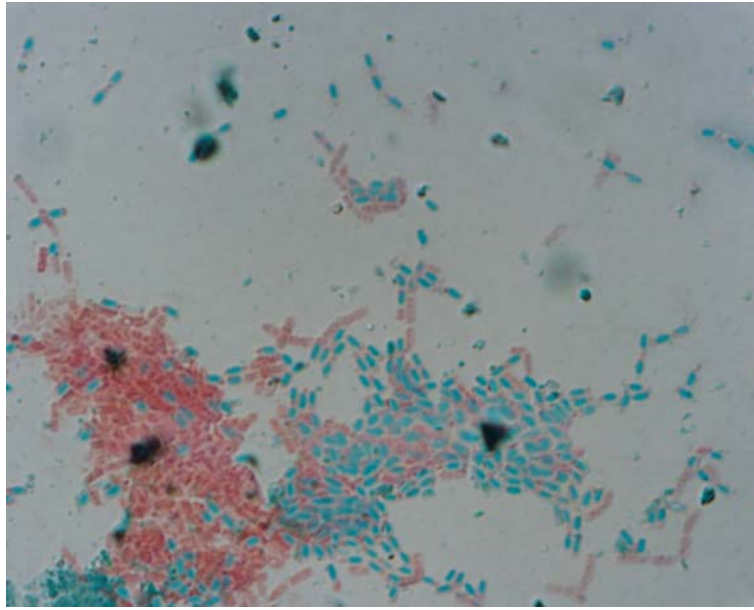
ภาพ 3.2 แบคทีเรียก่อโรคซูโรเปียนฟาวบรูค (บน: Thai isolate A76, กลาง: Australian Isolate (AUS1), ล่าง: Australian Isolate (AUS2))



ภาพ 3.3 *Bacillus circulans* ที่แยกได้จากตัวอ่อนผึ้ง



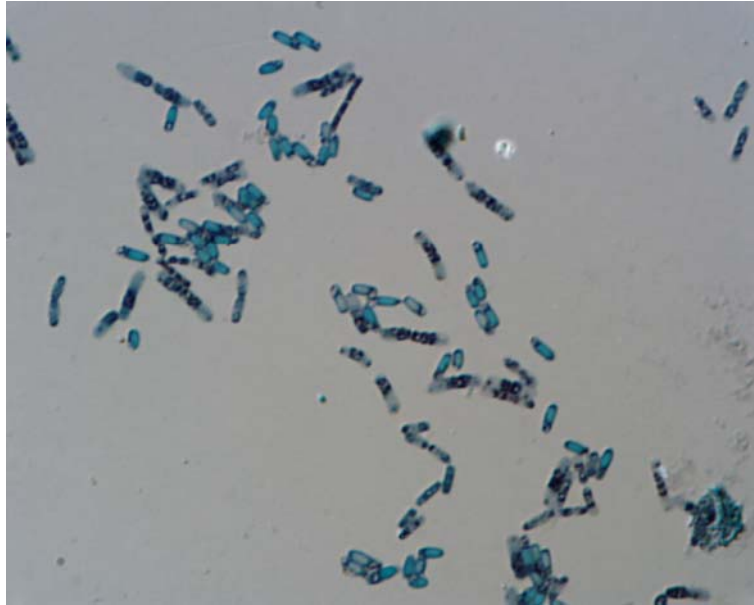
ภาพ 3.4 *Bacillus coagulans* ที่แยกได้จากตัวอ่อนผึ้ง



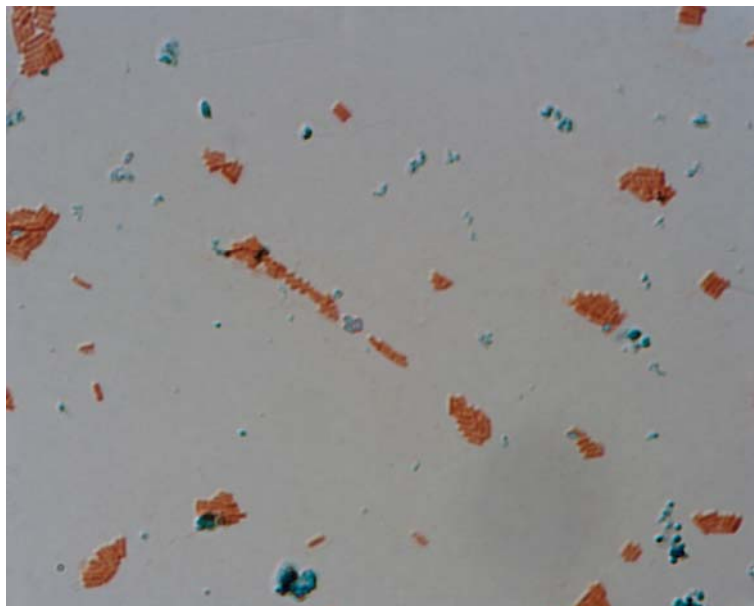
ภาพ 3.5 *Bacillus firmis* ที่แยกได้จากตัวอ่อนผึ้ง



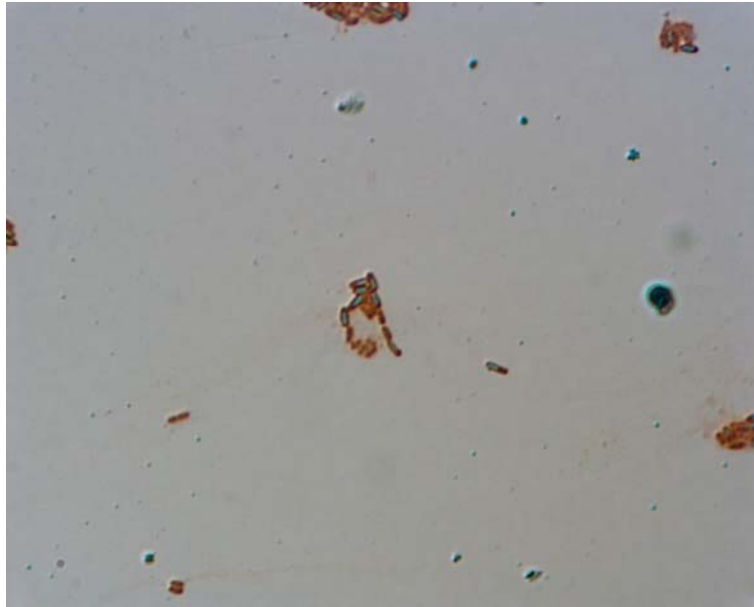
ภาพ 3.6 *Bacillus laterosporus* ที่แยกได้จากตัวอ่อนผึ้ง



ภาพ 3.7 *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อ



ภาพ 3.8 *Bacillus macerans* ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อ



ภาพ 3.9 *Bacillus stearothermophilus* ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อ

3. การทดสอบสารสมุนไพรต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคยูโรเปียนฟาวบรูค

จากผลการทดสอบในข้อ 2 ตามคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ในการทดสอบสารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงได้เลือกสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทางชีวเคมีขึ้นต้นเป็นเชื้อทดสอบสาร สารสกัดจากชะเอม อบเชย กานพลู และพลู สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีดังตารางที่ 3.5-3.9 แต่พบว่าสารสกัดไคคลอโรมีเรนจากชะเอมและอบเชยสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 5 สายพันธุ์

ตารางที่ 3.5 ผลการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *M. plutonius* (Aus1)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ความสามารถในการยับยั้ง*						
		Hex.	Dic.	Eth.	But.	Alc.	Met.	Wat.
<i>Allium sativum</i>	กระเทียม	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eugenia caryophyllum</i>	กานพลู	-	-	-	++	-	+++	-
<i>Piper betel</i>	พลู	-	-	-	-	++++	++++	-
<i>Curcuma longa</i>	ขมิ้นชัน	-	-	-	-	-	-	-
<i>Illicium verum</i>	โป๊ยกั๊ก	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum cassia</i>	อบเชย	+	++	-	-	-	-	-
<i>Rhinacanthus nasutus</i>	ทองพันชั่ง	-	-	-	-	-	-	-
<i>Azadirachta siamensis</i>	สะเดา	-	-	+	-	-	-	-
<i>Acorus calamus</i>	ว่านน้ำ	+	-	-	-	-	-	-
<i>Stemona tuberosa</i>	หนอนตายอยาก	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	ชะเอม	-	++	-	-	-	-	-
<i>Piper sarmentosum</i>	ชะพลู	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycin	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+

* (-) Zone of inhibition 0-0.5 cm ; (+) Zone of inhibition 0.5-1.0 cm; (++) Zone of inhibition 1.0-1.5 cm; (+++) Zone of inhibition 1.5-2.0 cm; (+++++) Zone of inhibition > 2.0 cm

ND: No data

ตารางที่ 3.6 ผลการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *M. plutonius* (Aus2)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ความสามารถในการยับยั้ง*						
		Hex.	Dic.	Eth.	But.	Alc.	Met.	Wat.
<i>Allium sativum</i>	กระเทียม	-	-	-	-	-	-	+
<i>Eugenia caryophyllum</i>	กานพลู	+	-	-	+	-	-	-
<i>Piper betel</i>	พลู	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curcuma longa</i>	ขมิ้นชัน	-	-	-	-	-	-	-
<i>Illicium verum</i>	โป๊ยกั๊ก	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum cassia</i>	อบเชย	+	++	-	-	-	-	-
<i>Rhinacanthus nasutus</i>	ทองพันชั่ง	-	-	-	-	-	-	-
<i>Azadirachta siamensis</i>	สะเดา	-	-	-	-	-	+	-
<i>Acorus calamus</i>	ว่านน้ำ	++	+++	-	-	-	-	-
<i>Stemona tuberosa</i>	หนอนตายอยาก	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	ชะเอม	++	++	-	-	-	-	-
<i>Piper sarmentosum</i>	ชะพลู	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycin	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+

* (-) Zone of inhibition 0-0.5 cm ; (+) Zone of inhibition 0.5-1.0 cm; (++) Zone of inhibition 1.0-1.5 cm; (+++) Zone of inhibition 1.5-2.0 cm; (++++) Zone of inhibition > 2.0 cm

ND: No data

ตารางที่ 3.7 ผลการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *M. plutonius* (Aus3)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ความสามารถในการยับยั้ง*						
		Hex.	Dic.	Eth.	But.	Alc.	Met.	Wat.
<i>Allium sativum</i>	กระเทียม	+	-	-	-	-	-	-
<i>Eugenia caryophyllum</i>	กานพลู	-	-	-	-	-	-	-
<i>Piper betel</i>	พลู	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curcuma longa</i>	ขมิ้นชัน	-	-	-	-	-	-	-
<i>Illicium verum</i>	โป๊ยกั๊ก	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum cassia</i>	อบเชย	+	++	+	-	-	-	-
<i>Rhinacanthus nasutus</i>	ทองพันชั่ง	-	-	-	-	+	-	-
<i>Azadirachta siamensis</i>	สะเดา	-	-	-	-	+	-	-
<i>Acorus calamus</i>	ว่านน้ำ	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stemona tuberosa</i>	หนอนตายอยาก	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	ชะเอม	+++	++	-	-	-	-	-
<i>Piper sarmentosum</i>	ชะพลู	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycin	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+

* (-) Zone of inhibition 0-0.5 cm; (+) Zone of inhibition 0.5-1.0 cm; (++) Zone of inhibition 1.0-1.5 cm; (+++) Zone of inhibition 1.5-2.0 cm; (+++++) Zone of inhibition > 2.0 cm

ND: No data

ตารางที่ 3.8 ผลการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *M. plutonius* (A72)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ความสามารถในการยับยั้ง*						
		Hex.	Dic.	Eth.	But.	Alc.	Met.	Wat.
<i>Allium sativum</i>	กระเทียม	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eugenia caryophyllum</i>	กานพลู	-	-	-	-	-	++	+
<i>Piper betel</i>	พลู	-	-	-	-	-	+	-
<i>Curcuma longa</i>	ขมิ้นชัน	-	-	-	-	-	-	-
<i>Illicium verum</i>	โป๊ยกั๊ก	-	+++	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum cassia</i>	อบเชย	+++	++	-	+++	-	-	-
<i>Rhinacanthus nasutus</i>	ทองพันชั่ง	-	-	-	-	-	-	-
<i>Azadirachta siamensis</i>	สะเดา	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acorus calamus</i>	ว่านน้ำ	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stemona tuberosa</i>	หนอนตายอยาก	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	ชะเอม	+++	+++	-	-	-	-	-
<i>Piper sarmentosum</i>	ชะพลู	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycin	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+

* (-) Zone of inhibition 0-0.5 cm ; (+) Zone of inhibition 0.5-1.0 cm; (++) Zone of inhibition 1.0-1.5 cm; (+++) Zone of inhibition 1.5-2.0 cm; (+++++) Zone of inhibition > 2.0 cm

ND: No data

ตารางที่ 3.9 ผลการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *M. plutonius* (A76)

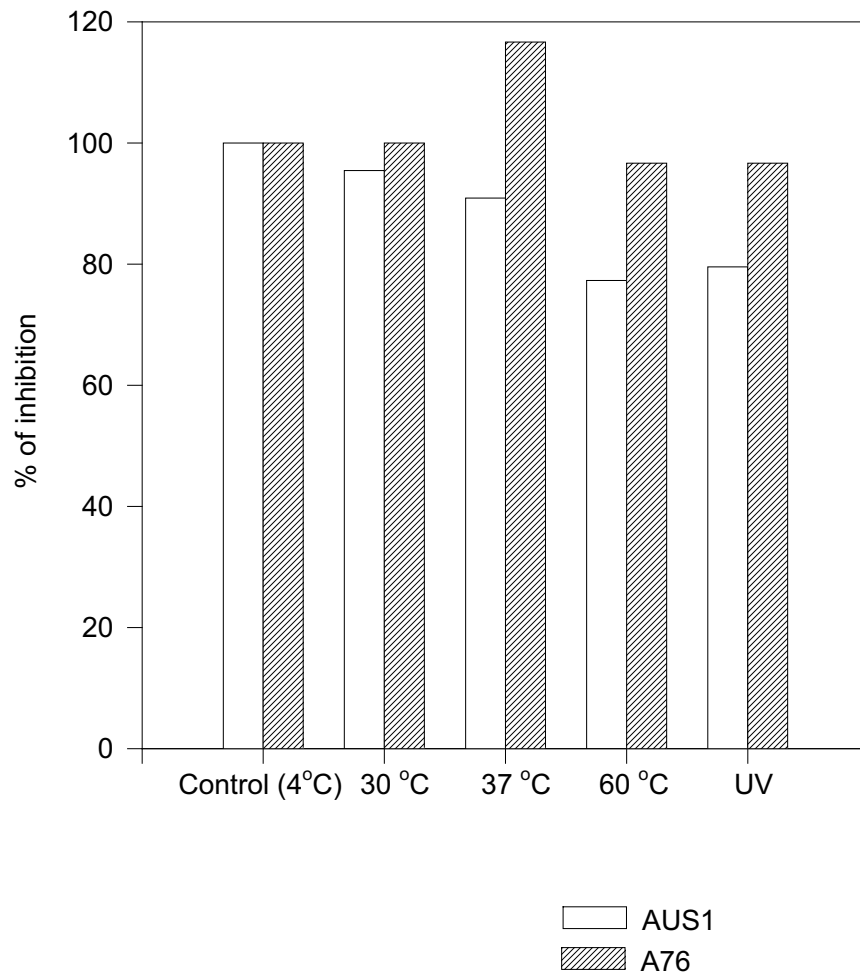
ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ความสามารถในการยับยั้ง*						
		Hex.	Dic.	Eth.	But.	Alc.	Met.	Wat.
<i>Allium sativum</i>	กระเทียม	-	-	-	-	-	+	-
<i>Eugenia caryophyllum</i>	กานพลู	-	-	-	-	+	+	-
<i>Piper betel</i>	พลู	-	-	-	-	-	++	++
<i>Curcuma longa</i>	ขมิ้นชัน	-	-	-	-	-	-	-
<i>Illicium verum</i>	โป๊ยกั๊ก	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum cassia</i>	อบเชย	+	++	-	-	-	-	-
<i>Rhinacanthus nasutus</i>	ทองพันชั่ง	-	-	-	-	-	-	-
<i>Azadirachta siamensis</i>	สะเดา	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acorus calamus</i>	ว่านน้ำ	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stemona tuberosa</i>	หนอนตายอยาก	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	ชะเอม	+++	++	-	-	-	-	-
<i>Piper sarmentosum</i>	ชะพลู	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycin	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+

* (-) Zone of inhibition 0-0.5 cm ; (+) Zone of inhibition 0.5-1.0 cm; (++) Zone of inhibition 1.0-1.5 cm; (+++) Zone of inhibition 1.5-2.0 cm; (++++) Zone of inhibition > 2.0 cm

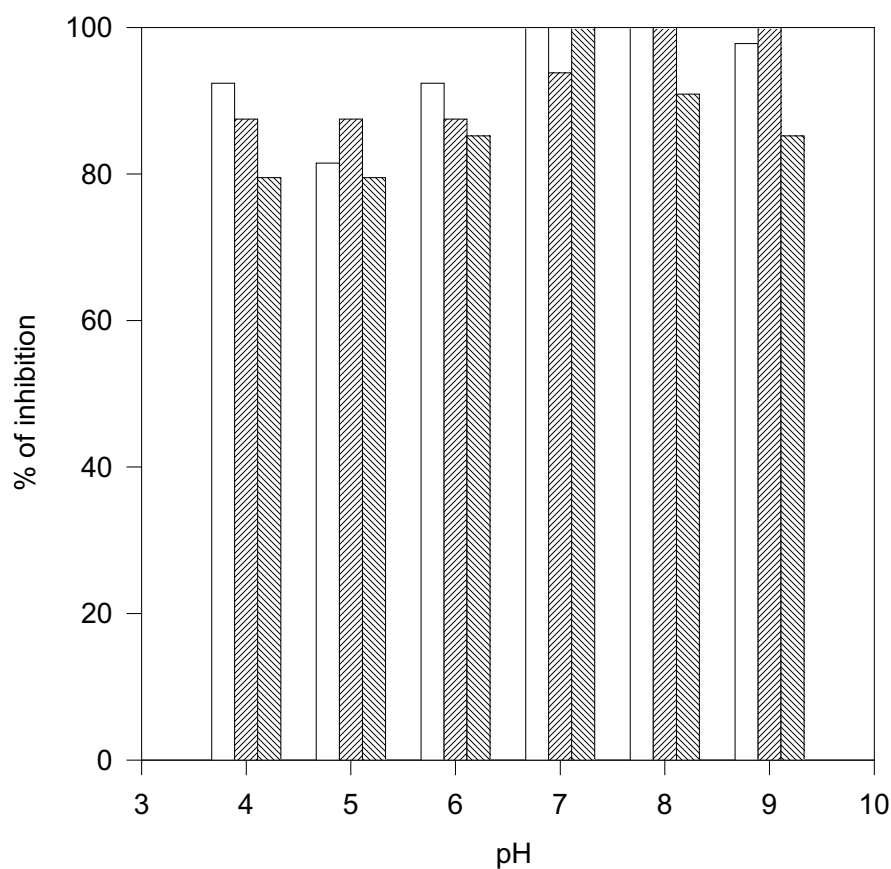
ND: No data

4. ประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารสกัดจากชะเอม

ชะเอมที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมี Percent recovery เท่ากับ 9.43 % มีค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 37,000 ppm และเมื่อทดสอบความเสถียรของสารสกัด ณ อุณหภูมิต่างๆ และ แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) พบว่าสารสกัดจากชะเอมจะลดความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *M. plutonius* AUS1 ที่อุณหภูมิสูงขึ้นและจะไวต่อแสง UV หลังจากบ่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพ 3.10) การออกฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากชะเอมจะลดลงถึง 20 % หลังจากบ่มไว้ในค่า pH เท่ากับ 4 (ภาพ 3.11)



ภาพที่ 3.10 กราฟแสดงความเสถียรของสารสกัดจากชะเอมด้วยไดคลอโรมีเทน หลังจากบ่มในอุณหภูมิต่างๆ และแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.11 กราฟแสดงความเสถียรของสารสกัดจากชะเอมด้วยไดคลอโรมีเทน หลังจากบ่มใน pH ต่างๆ เป็น เวลา 24 ชั่วโมง (Aus1,Aus2 และ Aus3 ตามลำดับ)

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ชะเอมเป็นพืชที่มีการศึกษาทางด้านเคมีและการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์มากในปัจจุบัน สารที่มักพบในการยับยั้งเป็นพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid)¹² เช่น การยับยั้งเชื้อ *Candida albicans*¹³ ชะเอมและอบเชยเป็นสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคยูโรเปียนฟาวบรูค นอกจากนี้ อบเชยยังสามารถยับยั้งราก่อโรคซอสต์บรูคได้ (ในบทที่ 2) ดังนั้นการใช้สารสกัดธรรมชาติแบบผสม (cocktail) เพื่อป้องกันและยับยั้งเชื้อในภาคสนาม การแยกบริสุทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- 1) Allen M.F., Ball, B.V., and Underwood, B.A. (1990) An isolate of *Melissococcus pluton* from *Apis laboriosa*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55: 439-440.
- 2) Bailey, L. (1957) The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* (*Bacillus pluton*) and further observations on Bacterium Eurydice White. *Journal of General Microbiology*, 17:39-48.
- 3) Bailey, L. and Collins, M.D. (1982). Taxonomic studies on *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb.nov. *Journal of Applied Bacteriology*, 53: 215-217.
- 4) Bailey, L. Ball, B.V. (1991) Honey bee pathology. 2nd ed. Academic Press.
- 5) Breadbear, N. (1988) World distribution of major honebee diseases and pests. *Bee world*, 69:15-39.
- 6) Chantawannakul P. and Dancer B.N. (2001) American foulbrood in honey bee. *Bee World*. 82(4):168-180.
- 7) Dancer B.N. and Chantawannakul P. (1997) The protease of American foulbrood. *Journal of invertebrate pathology*, 70(2):79.
- 8) Govan, V.A., Brozel, V., Allsopp M.H., and Davidson, S. (1998) A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honey bee larvae. *Applied and Environment microbiology*, 64(5), 1983-1985.
- 9) Hornitzky, M.A.Z., and Karlovskis, S. (1989) A system for the diagnosis of the major bacterial brood disease of honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 28(2):118-120.
- 10) Norris, J.R., Berkerley, R.C.W., Logan, N.A., O Donnell, A.G. (1981) The prokaryotes handbook on habitats isolation and identification of bacteria (Eds. Tarr, P.M., Stolp, H., Truper, G.H., Balows, A., and Schlegel, G.H.) Vol II, Springer-Verlag Heidelberg. New York.
- 11) White,G.F. (1912) The cause of European foulbrood. Circular, US Bureau of Entomology, No. 157.
- 12) Fukai, T., Sheng, C, Horikoshi, T. and Nomura, T. (1996) Isoprenylated flavonoids from underground parts of *Glycyrrhiza glabra*, *Phytochemistry*, 43(5): 119-1124.
- 13) Motsei, M.L., Lindsey, K.L., Staden, J., Jager, A. K. (2003) Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86: 235-241.

บทที่ 4 ชีวสารสนเทศของจีโนมผึ้ง (honey bee genome)*

ในการศึกษาโรคในผึ้งที่เกิดจากจุลินทรีย์ ได้มีการวิจัยในระยะหลังเพื่อหาสายพันธุ์ผึ้งที่สามารถต้านโรคหรือมี Disease resistant gene (*dr* gene) แทนการใช้สารเคมีต่างๆ และวิธีการป้องกันโดยใช้มาตรการทำลายรังที่ติดเชื้อ

ในปัจจุบันมีการศึกษา genome ของ มนุษย์ แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) ไล่เดือน (*Caenorhaditis elegans*) และพืชดอก (*Arabidopsis thaliana*) ในเดือนกรกฎาคม 2546 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ได้สำเร็จ ความสนใจในผึ้งนั้นเนื่องจากนักวิจัยมีความสนใจในด้านพฤติกรรมการเรียนรู้และตอบสนอง (recognition and response) ความจำ (memory) การแพร่กระจายของโรค (disease transmission) ชิ้นส่วน DNA ทั้งหมดมีกว่า 1.1 ล้านชิ้นประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 135 ล้านตัว การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รวดเร็วทำให้มีการศึกษาเปรียบเทียบโปรตีโอม (proteome) ของสปีชีส์ต่างๆ เช่น *D. melanogaster*, *C. elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, และ *A. thaliana* ³

ในการศึกษานี้ถือได้ว่าเป็นครั้งแรกของการศึกษาจีโนมผึ้งโดยชีวสารสนเทศ (bioinformatics) โดยการวิเคราะห์ความถี่ของ ORFs ในจีโนมผึ้ง การศึกษานี้อาจนำไปสู่ลำดับยีนหรือชิ้นส่วนที่อาจจะบ่งถึงยีนที่ต้านโรคในผึ้งและความเข้าใจเกี่ยวกับพฤติกรรมอื่นๆ ในอนาคต

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก [tp://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast/?organism=Amellifera](http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast/?organism=Amellifera) (Honeybee Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine) วิเคราะห์ชิ้นส่วน DNA โดยให้มีความยาวเบสที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโนมากกว่า 16 ตัว และนำมาวิเคราะห์ด้วย Pearl Algorithms (จำนวน ORFs ทั้งหมดเท่ากับ 5,677,000) หลังจากนั้นนำมาจัดเป็นกลุ่มตามจำนวนความถี่ของกรดอะมิโนและขนาดของ ORFs

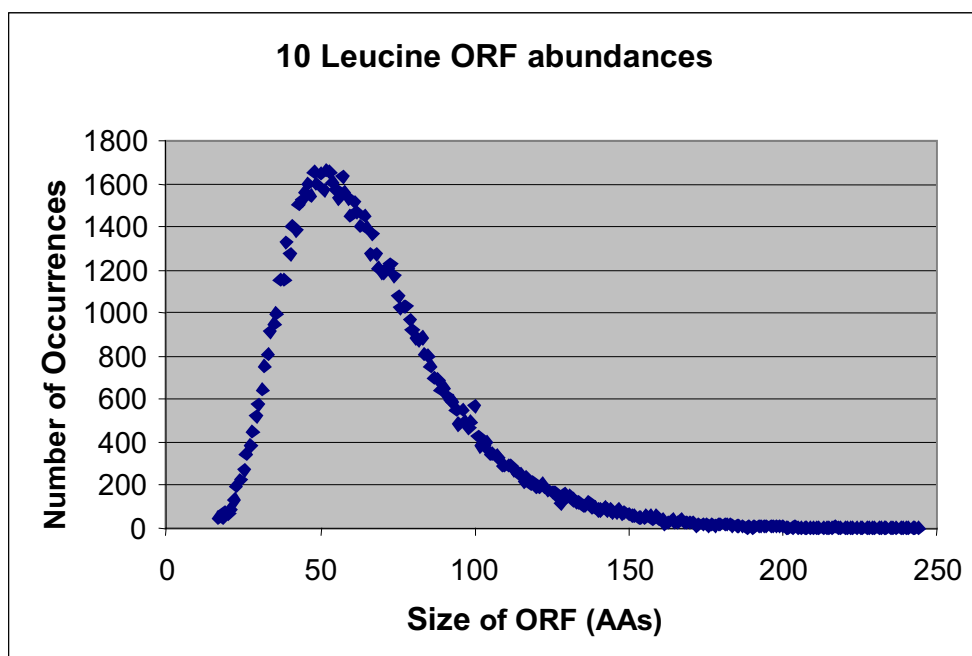
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่พบทั้งหมดในจีโนมผึ้งพบกรดอะมิโน leucine ในสัดส่วนที่มากที่สุด (11.14 %) คล้ายกับที่พบในมนุษย์ (19%) ในขณะที่ สิ่งมีชีวิตอื่นๆ มีประมาณ 3.5-5.2 %³ การมีปริมาณ leucine มากอาจบ่งถึงโครงสร้างของโปรตีนหากมีการแสดงออกของยีน จากการ

* ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Apicultural Research

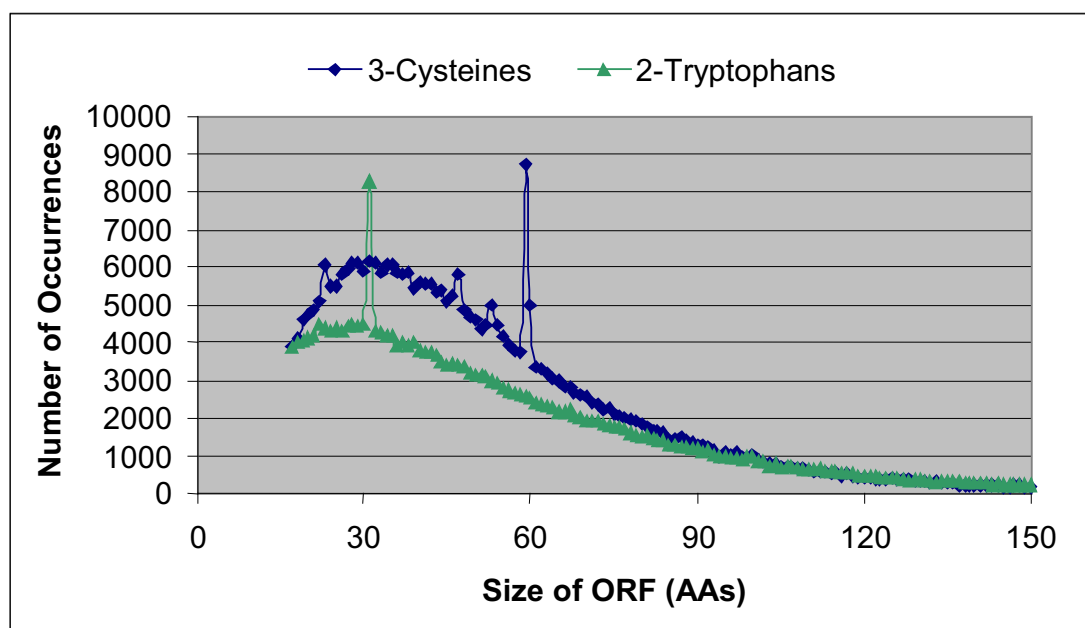
วิเคราะห์ขนาดของ ORF และความถี่ของกรดอะมิโนในสาย พบว่าขนาด ORFs ในช่วง 16-250 มี leucine 10 ตัว (รูปที่ 4.1) เป็นการกระจายแบบ Poisson (Poisson distribution)

โปรตีนที่มี leucine อยู่จำนวนมาก (Leucine-rich repeat, LRRs) พบในโปรตีนมากกว่า 60 ชนิดและทำหน้าที่ในการเชื่อมกับโปรตีนชนิดอื่น (protein-protein interaction)^{4,5} อาทิ photoreceptor cell specific adhesion molecule ในแมลงหวี่⁶ นอกจากนี้ในการศึกษา crystallography พบว่า การมีโครงสร้างโปรตีนที่มี leucine คั่นกลางทุกๆ 6 ตัวในสายโปรตีนทำให้เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า Leucine zipper motif ทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนอื่นๆ ณ ตำแหน่ง side chain ของ leucine และพบว่าเป็นโครงสร้างของการด้านโรคของ *A. thaliana* ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค¹



ภาพที่ 4.1 Open reading frames ที่มี Leucine 10 ตัว

อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนตัวอื่นๆ พบว่ามีกรดอะมิโนบางตัวที่มีความถี่มากกว่าที่ทำนายไว้ตาม Poisson distribution เช่น ORFs ที่มีขนาดกรดอะมิโนทั้งหมด 31 และ 59 ตัวมี Tryptophan และ cysteine จำนวน 2 และ 3 ตัวมีความถี่การพบมากกว่าการคาดจากการคำนวณการกระจายความถี่แบบ Poisson (รูปที่ 4.2, 4.3 ; ตัวอย่าง ORFs (ตารางที่ 4-1))

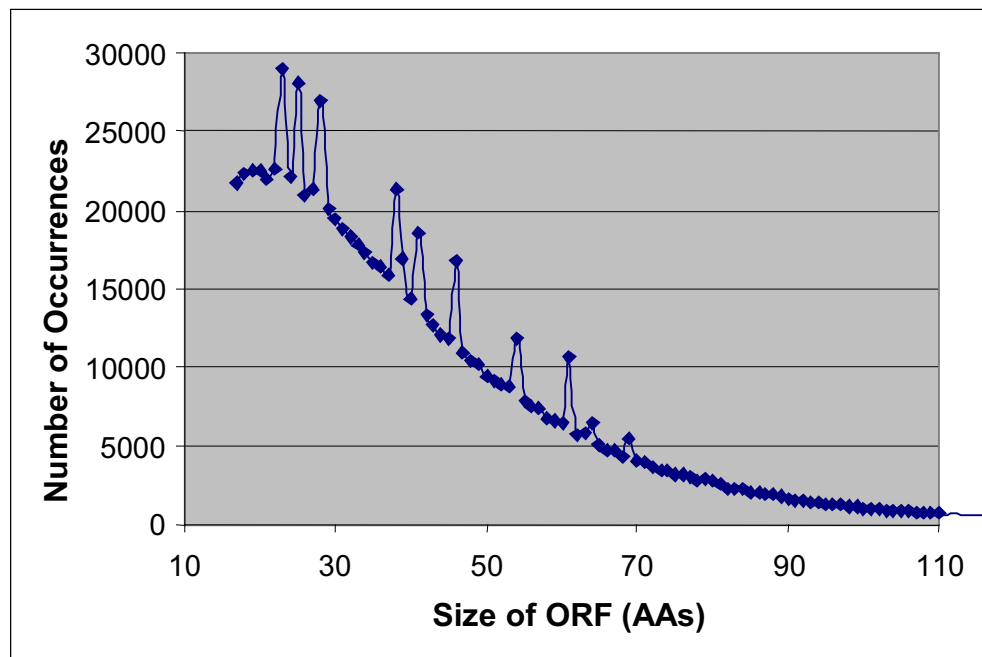


ภาพที่ 4.2 ความถี่ของ Open reading frames ที่มีกรดอะมิโน cysteine 3 ตัว และ tryptophan 2 ตัว

ตารางที่ 4.1 ORFs ขนาด 59 และ 31 ที่มีกรดอะมิโน cysteine 3 ตัว และ tryptophan 2 ตัว

ORF Size	AA	AA Number	Number of Sequences	Amino Acid Sequence
59 ¹	C	3	5079	SAVSGKSDALTTL PASHARRSDNAVDRFPP TRRSANSTHCGPKRVSAATFCCRSLLSSS
59 ²	C	3	157	CSGKAERAPLLPLLETVYVEGLCQCRTDIR LRPSSVRAVPRSRPQPPTAPTELIRRSLV
31	W	2	4027	YAVVSSNMTLTWYTPHFMACLRIPLLWRSR

Open reading frame ที่ได้จากการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.2 ไม่มีความเหมือนกับโปรตีนในฐานข้อมูล Genebank



ภาพที่ 4.3 ความถี่ของ Open reading frames ที่มีกรดอะมิโน cysteine 2 ตัว

การศึกษาชิ้นส่วน DNA ขนาดใหญ่ที่พบในฐานข้อมูลของจีโนมพืชมีความเหมือนกับ Cloning vector (ตารางที่ 4. 3) ซึ่งอาจเกิดจากข้อมูลที่มีการปนเปื้อนของ cloning vector ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมพืช

ตารางที่ 4.3 ORF ขนาด > 150 ที่พบในจีโนมผึ้งและผลการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Blast result)

Length of ORF (in amino acids)	Abundance	BLASTn result
261	22	gi 37654163 gb AC146851.1 Human Herpesvirus 5 Towne-BAC isolate, complete sequence Score = 151 bits (76), E = 2e-33
335	16	gi 8308067 gb AF261968.1 AF261968 <i>Anourosorex squamipes</i> clone AS10 microsatellite sequence Score = 335 bits (169), E = 1e-88
364	14	gi 37496514 emb AJ509853.1 SVE509853 Cloning vector pUvBBAC Score = 579 bits (292), E = e-162
360	14	gi 8308066 gb AF261967.1 AF261967 <i>Anourosorex squamipes</i> clone AS9 microsatellite sequence Score = 470 bits (237), E = e-129
424	13	gi 14794633 gb AF327720.1 Cloning vector pCM132, complete sequence Score = 779 bits (393), E = 0.0
375	13	gi 38155841 gb AY437644.1 Expression vector pcGlobin 2-GST, complete sequence Score = 680 bits (343), E = 0.0
375	13	gi 14794633 gb AF327720.1 Cloning vector pCM132, complete sequence Score = 589 bits (297), E = e-165
400	13	gi 3132862 gb U90555.1 SVU90555 Shuttle vector pJIR1457, complete sequence Score = 761 bits (384), E = 0.0
385	13	gi 14794633 gb AF327720.1 Cloning vector pCM132, complete sequence Score = 644 bits (325), E = 0.0
412	13	gi 3132862 gb U90555.1 SVU90555 Shuttle vector pJIR1457, complete sequence Score = 533 bits (269), E = e-148
267	12	gi 3132862 gb U90555.1 SVU90555 Shuttle vector pJIR1457, complete sequence Score = 963 bits (486), E = 0.0

สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ความถี่และขนาดของ Open reading frames จากข้อมูลใน database ของจีโนมผึ้ง (honey bee genome: *Apis mellifera*) เพื่อหา ORFs ใหม่ที่อาจเป็นข้อมูลกำหนดพฤติกรรมต่างๆ ของผึ้ง การมีกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งในปริมาณที่มากในสายโพลีเปปไทด์อาจบ่งให้ทราบความสำคัญของปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้กับพฤติกรรมต่างๆ ของผึ้ง ซึ่งในที่นี้หากมีการศึกษาผึ้งชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะผึ้งพื้นเมืองของไทยในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสามารถในการต้านโรค อาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ข้อมูลในการจัดการป้องกันและควบคุมโรคเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งของไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- 1) Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, Staskawicz, B.J.(1994) RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, 265: 1856-1860.
- 2) *C. elegans* sequencing consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282:2012-2018.
- 3) Karlin, S., Brocchieri, L., Bergman, A., Mrazek, J., Gentles, A.J. (2002) Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 :333–338.
- 4) Kobe, B., Deisenhofer, J. (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif of particular interest . *Trends Biochem Sci.*, 19: 415–421.
- 5) Kobe, B., Deisenhofer, J (1995) Proteins with leucine-rich repeats. *Current Opinion in Structural Biology* , 5(3): 409-416.
- 6) Krantz, D.E., Zipursky, S.L. (1990) *Drosophila* chaoptin, a member of the leucine-rich repeat family, is a photoreceptor cell-specific adhesion molecule. *EMBO J.* , 9:1969–1977.
- 7) Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Mcknight, T.S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240:1759-1764.
- 8) Vogt, R.G., Callahan, F.E., Rogers, M.E., Dickens, J.C. (1999) Odorant Binding Protein Diversity and Distribution among the Insect Orders, as indicated by LAP, and OBP-related Protein of the True Bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chemical Senses*, 24: 481-495.

ภาคผนวก

Full paper *

1. **Chantawannakul, P.**, Puchanichanthranon, T and Wongsiri, S. 2004 Distribution and controlling of *Ascoshaera apis*, a pathogen causing Chalkbrood disease in honey bee larvae in northern Thailand. *Acta Horticulture (in press)*
2. **Chantawannakul, P.**, Peterson, S., and Wongsiri, S. 2004. Conservation of honey bee species in South East Asia: *Mellifera* or Native bees. *Biodiversity*, 5 (2): 25-28.
3. Munshaw S., Cutler R.W., Wongsiri S. and **Chantawannakul P.** 2004. A genomic wide analysis: Insight to diverse small high copy number ORFs. *Journal of apicultural research (accepted)*
4. **Chantawannakul, P.** and Wongsiri 2004 Microbial diseases in honey bee larvae in Northern Thailand. *American Bee Journal (in preparation)*.
5. ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล 2546. ฝูงและจุลินทรีย์: อดีตถึงปัจจุบัน วารสารวิทยาศาสตร์ 57(6): 329-336

Conference abstract

1. Puchanichanthranon, T, **Chantawannakul, P** and Wongsiri, S. 2002 Distribution and controlling of *Ascoshaera apis*, a pathogen causing Chalkbrood disease in honey bee larvae in northern Thailand. The 3rd Asia-Pacific Mycological conference on biodiversity and biotechnology (4-8 November, 2002, Yunnan University, China)
2. **Chantawannakul, P.** Puchanichanthranon, T, and Wongsiri, S. 2003 Inhibitory effect of some medicinal plant extracts on the growth of *Ascoshaera apis*. The 3rd World Congress on

Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP) (3-7 February, 2003, Chiang Mai, Thailand)

3. **Chantawannakul, P.**, Chaiharn, M., Nandakwang, P., and Wongsiri, S. 2003. Microbial diseases of honey bee larvae in Thailand. XXXVIIIth *Apimondia International Apicultural Congress*. Ljubljana, Slovenia (August 24-29, 2003)

4. Chaiharn, M., **Chantawannakul, P.**, Kanekumchorn, W., and Wongsiri, S. 2003. Antimicrobial substances from Thai royal jelly and propolis. XXXVIIIth *Apimondia International Apicultural Congress*. Ljubljana, Slovenia (August 24-29, 2003)

5. **Chantawannakul, P.**, Chaiharn, M., Puchanichantranon, T., and S. Wongsiri, 2004. *In vitro* antimicrobial effects of herbal extracts on pathogens causing Chalkbrood and European foulbrood diseases in honey bee (*Apis mellifera*). XII International Congress of Entomology, Brisbane, Australia (August 15-21, 2004)