

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารแนบหมายเลข 2

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5880038

ชื่อโครงการ: ชุมชีพแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับไรโปรสิตรายแรงสกุล วารัวร์และ ทอปปี
ลิแลปส์ในผึ้ง เลี้ยงไทยและการประยุกต์เพื่อควบคุมโดยชีววิธี

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: อ.ดร.เทิด ดิษยธนูวัฒน์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อีเมลล์ : Terd.dis@gmail.com, Terd.dis@cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

ไรทรอปปีเลแลปส์และไรวาร์ัวร์ถูกรายงานว่าเป็นไรโปรสิตภายนอกที่เป็นศัตรูกับผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ซึ่งสามารถพบไรทั้งสองชนิดบนตัวอ่อนผึ้งหรือผึ้งงาน เพื่อจะดูคัดเลือกผึ้ง โดยในการศึกษารังนี้ ได้ศึกษาชุมชีพของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับไรวาร์ัวร์และไรทรอปปีเลแลปส์ในภาคเหนือของประเทศไทยด้วยเทคนิค culture-dependent และ culture-independent ทำการเก็บตัวอย่างไรทั้งสองจากรังผึ้งพันธุ์ในจังหวัดเชียงใหม่และลำปาง แบ่งตัวอย่างไรออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากไรทั้งสองบนอาหาร NA และ TSA จากผลการศึกษาพบแบคทีเรียประมาณ 1,340 CFU/mite และ 1,140 CFU/mite ในไรวาร์ัวร์และไรทรอปปีเลแลปส์ ตามลำดับ แบคทีเรียส่วนใหญ่แสดงลักษณะกลมมน ขอบเรียบ สีครีม และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับ *Enterococcus* ในส่วนที่สอง หกตัวอย่างของไรแต่ละชนิด ประกอบไปด้วยไรจำนวน 30-50 ตัว ที่ถูกสกัดดีเอ็นเอและศึกษากลุ่มของแบคทีเรียด้วยเทคนิค pyrosequencing ผลการศึกษาพบทั้งหมด 81,717 ลำดับเบส โดยแบ่งเป็น 429 OTU97 ที่เกี่ยวข้องกับไรวาร์ัวร์ แบคทีเรียจำนวนมากสุดในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยเฉพาะในสกุล *Arsenophonus*, *Enterobacter*, และ *Proteus* ส่วนในทรอปปีเลแลปส์ พบสกุล *Enterococcus* มากสุด จากทั้งหมด 84,075 ลำดับเบส ที่แบ่งได้ 166 OTU97 ส่วนการศึกษาแหล่งที่อยู่ของกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Fluorescence in situ hybridization (FISH) ด้วยแบคทีเรียโพรบ (EUB338-Cy5 และ EUB784-Cy3) พบแบคทีเรียส่วนมากในส่วน caecum ของไรทั้งสองชนิด นอกจากนี้การศึกษาด้วย Enterobacteriaceae และ *Arsenophonus* โพรบ ก็พบแบคทีเรียในส่วน of caecum เช่นกัน เมื่อนำเชื้อ *Enterococcus* มายับยั้งโดยยาปฏิชีวนะพบว่า สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด ซึ่งอนุมานว่าจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของไรได้ แต่เมื่อทดสอบโดยชีววิธีแล้วพบว่าไม่มีผลทำให้ไรอายุสั้นลงแต่อย่างใด

คำหลัก: ไรวาร์ัวร์, ไรทอปปีลิแลปส์, ชุมชีพแบคทีเรีย, 454 pyrosequencing, FISH

Abstract

Project Code : TRG5880038

Project Title : Bacterial communities associated with harmful parasitic mite in genus *Varroa* and *Tropilaelaps* in Thai honey bee (*Apis mellifera*) and application for biological control

Investigator :

E-mail Address : Terd.dis@gmail.com, Terd.dis@cmu.ac.th

Project Period : 2 years

Abstract:

and *Varroa* have been reported for serious ectoparasitic mite in honey bee (*Apis mellifera*). In this study, we characterized bacterial communities associated with *Varroa* and *Tropilaelaps* in Northern Thailand, using both culture-dependent and culture-independent approaches. Adult female mites were collected from apiary in Chiang Mai and Lampang provinces. Mite samples were divided into two parts, in the first, bacteria associated with the mite were isolated from individual mites. On average, we observed approximately 1,340 and 1,140 CFU/mite in *Varroa* and *Tropilaelaps*, respectively. All cultured isolate bacterial exhibited convex, circular, entire and cream-colored colonies and Gram-positive cocci, and sequencing assigned them to the genus *Enterococcus*. In the second, six samples of genomic DNA of 30-50 mites were extracted and subjected to pyrosequencing of bacterial 16S rRNA amplicons. The resulting 81,717 sequences were grouped into 429 operational taxonomic units (OTU97) in *Varroa*. The most abundant bacteria in *Varroa* mites belonged to the family Enterobacteriaceae, specifically the genera *Arsenophonus*, *Enterobacter*, and *Proteus*, while family Enterococcaceae especially in the genus *Enterococcus* was obviously in *Tropilaelaps* mites. The presence of 84,075 sequences of *Tropilaelaps* were defined to 166 OTU97. To localize these bacteria in the mites by fluorescence in situ hybridization, two universal bacterial probes (EUB338-Cy5 and EUB784-Cy3) were applied to longitudinal section of both mites. Fluorescent signals were restricted to the mite's caecum. Moreover, taxon-specific Enterobacteriaceae and *Arsenophonus* probes confirmed their localization in *Varroa*'s caecum. For antibiotics assay, antibiotic name revealed the most inhibition with *Enterococcus* isolates. These antibiotic were sprayed on mites and revealed there was no effect with mite life span.

Keywords : *Varroa* mite, *Tropilaelaps* mite, bacterial communities, 454 pyrosequencing, FISH

บทคัดย่อภาษาไทย

รหัสโครงการ: TRG5880038

ชื่อโครงการ: ชุมชีพแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับไรโปรสตรัยแรงสกุล วารร์วและ ทอปปีลีแลปส์ในผึ้ง เลี้ยงไทยและการประยุกต์เพื่อควบคุมโดยชีววิธี

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: อ.ดร.เท็ด ดิษยธนูวัฒน์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อีเมลล์ : Terd.dis@gmail.com, Terd.dis@cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

ไรทอปปีลีแลปส์และไรวารร์วถูกรายงานว่าเป็นไรโปรสตรัยภายนอกที่เป็นศัตรูกับผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ซึ่งสามารถพบไรทั้งสองชนิดบนตัวอ่อนผึ้งหรือผึ้งงาน เพื่อจะดูเลือดผึ้ง โดยในการศึกษารังนี้ ได้ศึกษาชุมชีพของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับไรวารร์วและไรทอปปีลีแลปส์ในภาคเหนือของประเทศไทยด้วยเทคนิค culture-dependent และ culture-independent ทำการเก็บตัวอย่างไรทั้งสองจากรังผึ้งพันธุ์ในจังหวัดเชียงใหม่และลำปาง แบ่งตัวอย่างไรออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากไรทั้งสองบนอาหาร NA และ TSA จากผลการศึกษาพบแบคทีเรียประมาณ 1,340 CFU/mite และ 1,140 CFU/mite ในไรวารร์วและไรทอปปีลีแลปส์ ตามลำดับ แบคทีเรียส่วนใหญ่แสดงลักษณะกลมมน ขอบเรียบ สีครีม และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับ *Enterococcus* ในส่วนที่สอง หกตัวอย่างของไรแต่ละชนิด ประกอบไปด้วยไรจำนวน 30-50 ตัว ที่ถูกสกัดดีเอ็นเอและศึกษากลุ่มของแบคทีเรียด้วยเทคนิค pyrosequencing ผลการศึกษาพบทั้งหมด 81,717 ลำดับเบส โดยแบ่งเป็น 429 OTU97 ที่เกี่ยวข้องกับไรวารร์ว แบคทีเรียจำนวนมากที่สุดในวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะในสกุล *Arsenophonus*, *Enterobacter*, และ *Proteus* ส่วนในไรทอปปีลีแลปส์ พบสกุล *Enterococcus* มากที่สุด จากทั้งหมด 84,075 ลำดับเบส ที่แบ่งได้ 166 OTU97 ส่วนการศึกษาแหล่งที่อยู่ของกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธี Fluorescence in situ hybridization (FISH) ด้วยแบคทีเรียโพรบ (EUB338-Cy5 และ EUB784-Cy3) พบแบคทีเรียส่วนมากในส่วน caecum ของไรทั้งสองชนิด นอกจากนี้การศึกษากับ *Enterobacteriaceae* และ *Arsenophonus* โพรบ ก็พบแบคทีเรียในส่วนของ caecum เช่นกัน เมื่อนำเชื้อ *Enterococcus* มายับยั้งโดยยาปฏิชีวนะพบว่า สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด ซึ่งอนุมานว่าจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของไรได้ แต่เมื่อทดสอบโดยชีววิธีแล้วพบว่าไม่มีผลทำให้ไรอายุสั้นลงแต่อย่างใด

คำหลัก: ไรวารร์ว, ไรทอปปีลีแลปส์, ชุมชีพแบคทีเรีย, 454 pyrosequencing, FISH

Abstract

Project Code : TRG5880038

Project Title : Bacterial communities associated with harmful parasitic mite in genus *Varroa* and *Tropilaelaps* in Thai honey bee (*Apis mellifera*) and application for biological control

Investigator :

E-mail Address : Terd.dis@gmail.com, Terd.dis@cmu.ac.th

Project Period : 2 years

and *Varroa* have been reported for serious ectoparasitic mite in honey bee (*Apis mellifera*). In this study, we characterized bacterial communities associated with *Varroa* and *Tropilaelaps* in Northern Thailand, using both culture-dependent and culture-independent approaches. Adult female mites were collected from apiary in Chiang Mai and Lampang provinces. Mite samples were divided into two parts, in the first, bacteria associated with the mite were isolated from individual mites. On average, we observed approximately 1,340 and 1,140 CFU/mite in *Varroa* and *Tropilaelaps*, respectively. All cultured isolate bacterial exhibited convex, circular, entire and cream-colored colonies and Gram-positive cocci, and sequencing assigned them to the genus *Enterococcus*. In the second, six samples of genomic DNA of 30-50 mites were extracted and subjected to pyrosequencing of bacterial 16S rRNA amplicons. The resulting 81,717 sequences were grouped into 429 operational taxonomic units (OTU97) in *Varroa*. The most abundant bacteria in *Varroa* mites belonged to the family Enterobacteriaceae, specifically the genera *Arsenophonus*, *Enterobacter*, and *Proteus*, while family Enterococcaceae especially in the genus *Enterococcus* was obviously in *Tropilaelaps* mites. The presence of 84,075 sequences of *Tropilaelaps* were defined to 166 OTU97. To localize these bacteria in the mites by fluorescence in situ hybridization, two universal bacterial probes (EUB338-Cy5 and EUB784-Cy3) were applied to longitudinal section of both mites. Fluorescent signals were restricted to the mite's caecum. Moreover, taxon-specific Enterobacteriaceae and *Arsenophonus* probes confirmed their localization in *Varroa*'s caecum. For antibiotics assay, antibiotic name revealed the most inhibition with *Enterococcus* isolates. These antibiotic were sprayed on mites and revealed there was no effect with mite life span.

Keywords : *Varroa* mite, *Tropilaelaps* mite, bacterial communities, 454 pyrosequencing, FISH