

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างฟั้งพันธุ์

เก็บตัวอย่างฟั้งพันธุ์จากฟาร์มฟั้งทางภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 46 แห่ง โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดลำพูน ลำปาง เชียงราย พะเยา น่าน แพร่ และเชียงใหม่ จำนวน 9, 9, 5, 8, 6, 5 และ 4 แห่งตามลำดับ สำหรับจังหวัดแม่ฮ่องสอนนั้นไม่มีการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากไม่มีรายงานการเลี้ยงฟั้งพันธุ์ ณ จังหวัดนี้ โดยการเก็บตัวอย่างได้เก็บตัวอย่างบริเวณต่าง ๆ ของจังหวัดดังภาพ 2

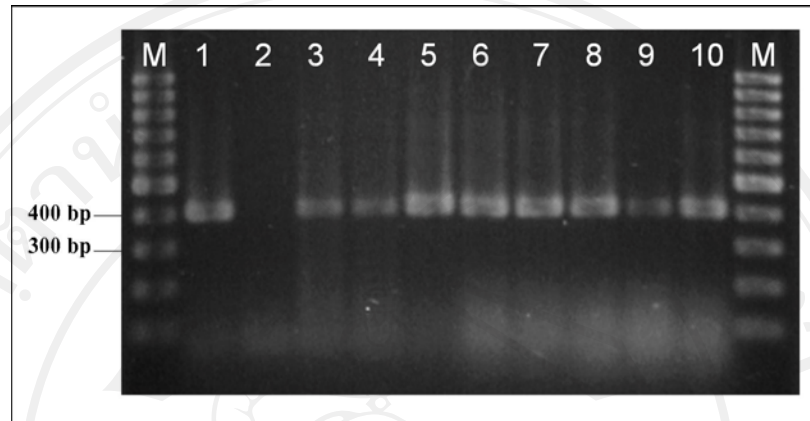


ภาพ 2 บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มฟั้งพันธุ์ทางภาคเหนือของประเทศไทย

2. การตรวจหาเชื้อไวรัสในฟั้งพันธุ์

จากการสกัด RNA จากฟั้งพันธุ์เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ และทำการตรวจสอบในระยการเจริญของฟั้ง 2 ระยะ คือระยะตัวอ่อน (brood) และตัวเต็มวัย (adult) โดยการสุ่มตัวอย่างฟั้งพันธุ์จากแต่ละแหล่ง แหล่งละ 10 ตัวมาบดแล้วทำ cDNA เพื่อใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR

นั้น หลังจากนั้นทำการแสดงผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยภาพ 3 แสดงผลที่ได้จากการตรวจหา DWV และได้ PCR product ขนาด 395 bp



ภาพ 3 ผลของการตรวจหาการติดเชื้อ Deformed wing virus

M : 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA), 1-5 : ผีงพันธุ์ตัวเต็มวัย, 6-10 : ผีงพันธุ์ตัวอ่อน ของฟาร์มในจังหวัดเชียงราย (CR) โดย Lane 2 คือผลที่เป็น negative ส่วนที่เหลือเป็นผล positive

ผลที่ได้จากการทดลองพบการติดเชื้อ Acute bee paralysis virus (ABPV), Deformed wing virus (DWV), Kashmir bee virus (KBV) และ Sacbrood virus (SBV) แต่ไม่พบเชื้อ Black Queen-cell virus (BQCV) และ Chronic bee paralysis virus (CBPV) ในทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ โดยเชื้อไวรัสที่พบการติดเชื้อมากที่สุดทั้งในผีงพันธุ์ตัวเต็มวัยและตัวอ่อนคือ DWV รองลงมาคือ ABPV, SBV และ KBV ตามลำดับ (ตาราง 3) และมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรวมในผีงพันธุ์ของตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการสำรวจคือ DWV 48 %, ABPV 33 %, SBV 8 % และ KBV 3 % ซึ่งสามารถแสดงผลของความถี่ของการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกันได้ดังตาราง 4

ตาราง 3 การตรวจหาเชื้อไวรัส ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV และ SBV ในตัวอย่างผึ้งพันธุ์
46 แหล่ง

แหล่ง	เวลาเก็บตัวอย่าง	ABPV		BQCV		CBPV		DWV		KBV		SBV	
		ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน
LPU 1	พ.ค. 49	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LPU 2	พ.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPU 3	พ.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LPU 4	พ.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LPU 5	พ.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LPU 6	พ.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LPU 7	พ.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LPU 8	พ.ค. 49	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LPU 9	พ.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LPA 1	มิ.ย. 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPA 2	มิ.ย. 49	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LPA 3	มิ.ย. 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPA 4	มิ.ย. 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPA 5	มิ.ย. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LPA 6	มิ.ย. 49	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
LPA 7	มิ.ย. 49	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
LPA 8	มิ.ย. 49	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
LPA 9	มิ.ย. 49	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
CR 1	ก.ค. 49	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
CR 2	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CR 3	ก.ค. 49	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
CR 4	ก.ค. 49	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
CR 5	ก.ค. 49	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-

ตาราง 3 (ต่อ)

แหล่ง	เวลา เก็บ ตัวอย่าง	ABPV		BQCV		CBPV		DWV		KBV		SBV	
		ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน
PY 1	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 2	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 3	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 4	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 5	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 6	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 7	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 8	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 1	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 2	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 3	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 4	ก.ค. 49	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
NAN 5	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 6	ก.ค. 49	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PH 1	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 2	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
PH 3	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PH 4	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PH 5	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM 1	มิ.ย. 50	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM 2	มิ.ย. 50	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CM 3	ส.ค. 50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM 4	ส.ค. 50	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

ตาราง 3 (ต่อ)

แหล่ง เก็บ ตัวอย่าง	เวลา	ABPV		BQCV		CBPV		DWV		KBV		SBV	
		ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน
จำนวน		9	21	0	0	0	0	15	29	1	2	2	5
(%) ของ		(20)	(46)					(33)	(63)	(2)	(4)	(4)	(11)
แหล่งที่พบไวรัส													
% รวมของการติดเชื้อ		33		0		0		48		3		8	

* อักษรย่อแทนชื่อจังหวัดที่เก็บตัวอย่างผิงพันธุ์

LPU : จังหวัดลำพูน

LPA : จังหวัดลำปาง

CR : จังหวัดเชียงราย

PY : จังหวัดพะเยา

NAN : จังหวัดน่าน

PH : จังหวัดแพร่

CM : จังหวัดเชียงใหม่

ตาราง 4 ความถี่ของการตรวจพบเชื้อไวรัสหลายชนิดร่วมกันในตัวอย่างเดียวกันของผิงพันธุ์

จำนวนไวรัส	ชนิดของไวรัส	จำนวนของตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์	จำนวนแหล่งที่พบ
0		8	17	1LPU, 3LPA, 1PY, 2PH, 1CM
1	ABPV	7	15	6PY, 1CM
	DWV	15	33	8LPU, 2LPA, 2NAN, 3PH
2	ABPV,DWV	8	17	1CR, 1PY, 4NAN, 2CM

ตาราง 4 (ต่อ)

จำนวน ไวรัส	ชนิดของไวรัส	จำนวนของ ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์	จำนวนแหล่งที่พบ
3	ABPV, DWV, KBV	1	2	1LPA
	ABPV, DWV, SBV	5	11	1LPA, 4CR
4	ABPV, DWV, KBV, SBV	2	4	2LPA

3. การตรวจหาเชื้อไวรัสในไรวาร์ว

จากการเก็บตัวอย่างไรวาร์วโดยการแช่ฟุ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยในแอลกอฮอล์ แล้วทำการแยกไรแต่ละชนิดเพื่อนับจำนวนและบันทึกผลจำนวนไรที่ตกลงมา รวมถึงบันทึกการเกิดโรคในฟาร์มว่ามี การติดโรคจากเชื้อชนิดอื่นหรือไม่ (ตาราง 5) พบว่ามีฟาร์มจำนวน 12 แหล่ง ที่สามารถทำการ ทดลองโดยการสกัด RNA ได้ ส่วนแหล่งอื่น ๆ พบจำนวนไรวาร์วน้อยกว่า 10 ตัว ดังนั้นจึงไม่ได้ ทำการตรวจสอบ และเมื่อได้นำไรวาร์วจากทั้ง 12 แหล่งนั้นมาทดลองตรวจหาเชื้อไวรัสในไรวาร์ ว์ตามวิธีของ Tangjingjai *et al.* (2003) แล้วทำการเพิ่มปริมาณ DNA และตรวจดูผลโดยการแสดง บน agarose gel แล้ว ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าในไรวาร์วมีการติดเชื้อ Deformed wing virus (DWV) เพียงชนิดเดียว โดยพบการติดเชื้อจำนวน 7 แหล่งคิดเป็น 58 % ของตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ

ตาราง 5 การพบไรของผึ้ง โรค EFB และขอล์คบุตร และการตรวจพบเชื้อไวรัส DWV ในไรวาร์ว

แหล่ง	ไร (%)		โรคอื่น ๆ		ไวรัสในไรวาร์ว
	วาร์ว	ทรอพิลแลปส์	EFB	ขอล์คบุตร	DWV
LPU 1	5.2	-	-	-	+
LPU 2	-	-	-	-	NA
LPU 3	-	0.8	-	-	NA
LPU 4	-	-	-	-	NA
LPU 5	-	-	-	-	NA
LPU 6	-	-	-	-	NA
LPU 7	-	-	-	-	NA
LPU 8	7.6	-	-	-	-

ตาราง 5 (ต่อ)

แหล่ง	ไร (%)		โรคอื่น ๆ		ไวรัสในไรวาร์ว
	วาร์ว	ทรอพิสแลปส์	EFB	ซอสต์คบรูด	DWV
LPU 9	-	-	-	-	NA
LPA 1	4.7	-	-	-	NA
LPA 2	5	1.5	-	-	-
LPA 3	4	-	-	-	-
LPA 4	5.5	0.5	-	-	+
LPA 5	8	0.4	-	-	+
LPA 6	11.5	1	-	-	+
LPA 7	8.4	1.2	-	-	-
LPA 8	11.6	2.4	-	-	+
LPA 9	8	-	-	+	-
CR 1	-	0.5	-	-	NA
CR 2	-	-	-	-	NA
CR 3	-	1.2	-	-	NA
CR 4	-	9.2	-	-	NA
CR 5	-	1.6	-	-	NA
PY 1	2	-	-	-	NA
PY 2	-	1.3	-	-	NA
PY 3	-	-	-	-	NA
PY 4	1	-	-	-	NA
PY 5	-	-	-	-	NA
PY 6	-	-	-	+	NA
PY 7	1	2	-	-	NA
PY 8	0.5	-	-	-	NA
NAN 1	4	15.6	-	-	+
NAN 2	1	-	-	-	NA
NAN 3	2	10	-	-	NA

ตาราง 5 (ต่อ)

แหล่ง	ไรว (%)		โรคอื่น ๆ		ไวรัสในไรวาร์ว
	วาร์ว	ทรอพิสแลปส์	EFB	ซอส์คบรูต	DWV
NAN 4	1	-	-	-	NA
NAN 5	10	37	+	-	+
NAN 6	2	11	-	-	NA
PH 1	0.4	0.4	+	-	NA
PH 2	-	0.7	-	-	NA
PH 3	3.3	8.7	-	-	NA
PH 4	-	11.5	+	-	NA
PH 5	-	-	-	-	NA
CM 1	3	14	-	-	NA
CM 2	1.5	6	-	-	NA
CM 3	-	0.8	-	-	NA
CM 4	-	20	-	-	NA
จำนวน (%)			3	2	7
ของแหล่งที่พบ			(6.5)	(4.3)	(58)

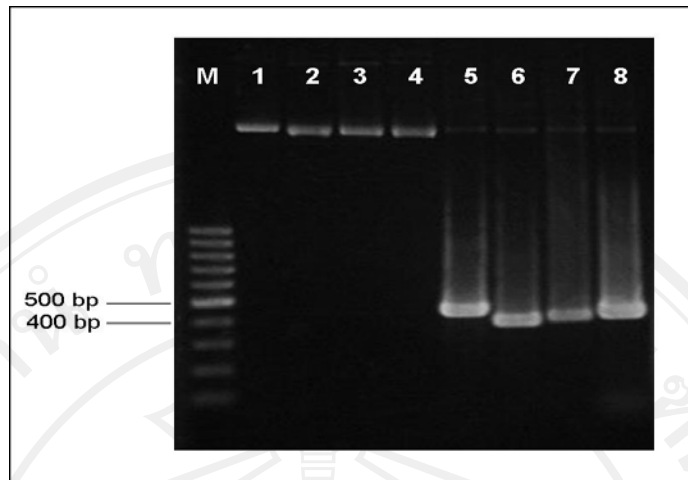
* - : negative

+ : positive

NA : sample not available

4. การเตรียม PCR product จากสิ่งปนื้อเพื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส

เมื่อเพิ่มปริมาณ DNA แล้วจึงทำการเตรียม DNA ให้บริสุทธิ์จากเจลโดยใช้ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit เตรียม PCR product สำหรับการเชื่อมต่อเข้ากับ pGEM-T Easy vectors จากนั้นทำการคัดเลือก clone ที่มี plasmid อยู่ภายใน จากการสังเกตความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มี ampicillin และตรวจสอบการเชื่อมต่อของ insert product ใน plasmid โดยวิธี Colony PCR ซึ่ง PCR product ของเชื้อไวรัส ABPV, DWV, KBV และ SBV นั้น มีขนาด 452, 395, 393 และ 426 bp ตามลำดับ (ภาพ 4) แล้วส่งผลตัวอย่าง RT-PCR product ที่ได้เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)



ภาพ 4 ผลการทำ Colony PCR จาก plasmid

M : 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA)

1-4 : plasmid ที่มี insert ของ PCR product เชื้อ ABPV, DWV, KBV และ SBV ตามลำดับ

5-8 : colony PCR จาก plasmid ที่มี insert ของ PCR product เชื้อ ABPV, DWV, KBV และ SBV ตามลำดับ

5. ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบส

การวิเคราะห์หาลำดับเบสจากตัวอย่างเชื้อไวรัส โดยการส่งวิเคราะห์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี และทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของ RT-PCR product กับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ที่มีรายงานและถูกเก็บไว้ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยวิธีการ BLAST search (ภาคผนวก ค) พบว่าลำดับเบสของตัวอย่างมีความเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูลดังตาราง 6

ตาราง 6 ค่าความเหมือนของลำดับเบสของเชื้อไวรัสจากการทดลองเปรียบเทียบกับข้อมูลใน NCBI

เชื้อไวรัส	Accession no. ของ ตัวอย่างที่เหมือนสูงสุด	บริเวณที่เหมือน	% ความเหมือน
Acute bee paralysis virus	EF219380	RNA polymerase gene	97
Deformed wing virus	AJ489744	gene for polyprotein	94
Kashmir bee virus	AF197908	RNA polymerase gene	96
Sacbrood virus	AF092924	polyprotein	91

และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ได้แก่ SPSS 14.0 for Windows Evaluation Version เพื่อเปรียบเทียบความถี่การตรวจพบการติดเชื้อไวรัสในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัย ผึ้งพันธุ์ตัวอ่อน และไรวาร์ว โดยการใช่วิธีของ Chi square ในตัวอย่างของเชื้อไวรัส Deformed wing virus จากการอ่านผลพบว่าในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยมีค่า $P = 1.000$ ในผึ้งพันธุ์ตัวอ่อนมีค่า $P = 0.248$ และไรวาร์วมีค่า $P = 0.564$ (ตาราง 7) สำหรับในตัวอย่างเชื้อไวรัส Acute bee paralysis virus, Kashmir bee virus และ Sacbrood virus ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบไม่พบการติดเชื้อในไรวาร์วจึงไม่สามารถเปรียบเทียบค่าทางสถิติได้

ตาราง 7 ผลการเปรียบเทียบความถี่ของการตรวจพบเชื้อไวรัส DWV ในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัย ผึ้งพันธุ์ตัวอ่อน และไรวาร์ว โดยวิธี Chi square

	Mite	Pupae	Adult
Chi square	.333	1.333	.000
Df	1	1	1
Asymp. Sig.	.564	.248	1.000