บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 เชื้อรา *Ascosphaera apis*

เชื้อรา *Ascosphaera apis* พบครั้งแรกในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อราสาเหตุของโรคชอล์คบรูดในตัวอ่อนผึ้งพันธุ์ และตั้งชื่อให้ตามลักษณะอาการของโรค คือซากตัวหนอนที่ตายมีลักษณะคล้ายกับแท่งชอล์ค ภาณุวรรณ (2553) ได้กล่าวถึงที่มาของเชื้อราชนิดนี้ว่ายังไม่มีใครทราบว่าโรคนี้พบได้ในผึ้งพันธุ์อย่างเดียว หรืออาจพบเชื้อราชนิดนี้อยู่แล้วในธรรมชาติในแมลงต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตาม หลังจากที่ถูกค้นพบได้มีการจัดลำดับอนุกรมวิธานอยู่ในอนุอาณาจักร Ascomycota ในชั้น Plectomycetes อันดับ Ascosphaerales วงศ์ Ascosphaeraceae สกุล *Ascosphaera* ชนิด *Ascosphaera apis* เชื้อรานี้มีชื่อเดิมว่า *Pericystis apis* (Fennell, 1973) ซึ่ง Moeller and Williams (1976) ได้รายงานว่าแต่เดิมเชื้อ *Pericystis apis* ก่อให้เกิดโรคในระยะตัวหนอนของแมลงหลายชนิดเช่น ผึ้งกัดใบอัลฟัลฟา (*Megachile rotundata*, *M. pacifica*) และอาจก่อโรคชอล์คบรูดในผึ้งอัลคาไล (*Nomia melanderi*) ได้ แต่ยังไม่ทราบชัดเจนว่าการก่อโรคเกิดขึ้นเพราะเป็นสิ่งมีชีวิตตระกูลผึ้งเหมือนกัน หรือมีสายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจงที่ทำให้เกิดโรค และในรายงานฉบับเดียวกันได้รายงานเพิ่มเติมอีกว่า การบันทึกข้อมูลอย่างเป็นทางการครั้งแรกของโรคชอล์คบรูดในสหรัฐอเมริกามาจากรัฐยูทาห์ ซึ่งพบเกิดขึ้นในผึ้งป่า ในปี ค.ศ.1965 ต่อมาได้มีการค้นพบว่าเชื้อราดังกล่าวมีความแตกต่างจากเชื้อในสกุลเดียวกัน เช่น *Pericystis alvei* ซึ่งเป็นเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่พบในรังผึ้ง หลังจากการศึกษาวงชีวิตของเชื้อรา *A. apis* แล้ว จึงถูกจัดให้อยู่ในสกุลและวงศ์ใหม่ โดยมีเชื้ออ้างอิงเพื่อเปรียบเทียบสำหรับสกุลใหม่คือ เชื้อ *Ascosphaera apis* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อโรคสำคัญในผึ้งคือ โรคชอล์คบรูด (Chalkbrood) หรือ Ascosphaeriosis หรืออีกชื่อหนึ่งคือ Stonebrood (Moeller and Williams, 1976) แต่ในรายงานของ ภาณุวรรณ (2553) ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับโรค Stonebrood ไว้ว่า เป็นโรคที่มีลักษณะอาการคล้ายกับโรคชอล์คบรูดแต่ซากตัวอ่อนที่ตายจะมีสีน้ำตาลหรือสีเหลืองออกเขียว เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. fumigates* และ *A. niger*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.1 ชีววิทยาของเชื้อรา *Ascosphaera apis*

Aronstein and Murray (2010) ได้ศึกษาเชื้อราที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง พบว่าเชื้อรา *A. apis* สร้างเส้นใยที่มีสีขาว ซึ่งเส้นใยเจริญเติบโตออกไปทั้งในอากาศ บริเวณผิวหน้าอาหาร และยังเจริญเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย เส้นใยของเชื้อราจะเป็นเส้นใยแบบมีผนังกั้น ขนาด 2.5-8 ไมโครเมตร และมีการแตกกิ่งออกเป็นสองแขนงอย่างชัดเจน ถ้าเส้นใยถูกทำให้แตกออก ผนังกั้นจะให้ความแข็งแรงแก่เส้นใยและยังช่วยจำกัดการสูญเสียของเหลวภายในอีกด้วย ผนังกั้นแต่ละหน่วยมีรูที่ใช้ถ่ายเทของเหลวและองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์

เชื้อรา *A. apis* เป็นเชื้อราจำพวก Heterothallic คือ มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยเกิดขึ้นจากการสัมผัสกันของเส้นใยในส่วนที่เป็น haploid แล้วพัฒนาเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) (บาจรีย์, 2548) หรือสปอร์ซิสต์ (spore cyst) (Pureta *et al.,* 2011) หรือแอสโคมา (ascoma) (Aronstein and Murray, 2010) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47-140 ไมโครเมตร ภายในแอสโคมาบรรจุสปอร์บอล (spore ball) หรือแอสคัส (ascus) จำนวนมาก แอสคัส มีขนาด 7-18 ไมโครเมตร แอสคัสแต่ละหน่วย ประกอบไปด้วยเซลล์สืบพันธุ์หน่วยเล็ก ๆ เรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospore) มากมาย มีขนาดประมาณ 2.7-3.5 ไมโครเมตร (Geremew, 2006; Chorbinski and Krzysztof, 2003)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy (SEM)) ทำให้เห็นลักษณะของผนังของแอสโคมามีสองชั้น ผิวด้านนอกมีลักษณะเรียบ แอสคัสแต่ละหน่วยถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อบาง ๆ ที่มองเห็นไม่เด่นชัด แอสโคสปอร์มีผนังเซลล์หนา ลักษณะทรงรี (Liu, 1987; Chorbinski and Krzysztof, 2003)

การรายงานเกี่ยวกับช่วงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *A. apis* นั้น Aronstein and Murray (2010) ได้รายงานไว้ว่าไม่มีรายงานฉบับใดกล่าวถึงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *A. apis* ถึงแม้ว่าการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เป็นลักษณะการสืบพันธุ์แบบที่พบได้ทั่วไปในเชื้อราที่ถูกจัดให้อยู่ในไฟลัม Ascomycota แต่จากรายงานของ นวมาลย์ (2548) ได้มีการกล่าวถึงลักษณะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อรา *A. apis* ไว้ว่า เชื้อราชนิดนี้มีการสืบพันธุ์ที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์สองชนิด คือ สปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ คือแอสโคสปอร์ มีผนังหนา เป็นเซลล์อิสระ ที่แต่ละหน่วยจะมีผนังเซลล์และไซโตพลาสซึมหุ้มนิวเคลียสไว้ และถูกสร้างขึ้นภายในแอสคัส ส่วนเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สองได้จากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ อาจเปลี่ยนเป็นสปอร์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ตรงปลายเส้นใยที่เรียกว่า โคนิเดียม (conidium)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 การก่อโรคชอล์คบรูดในผึ้งพันธุ์

สปอร์ของเชื้อรา *A. apis* เข้าสู่รังผึ้งโดยติดมากับตัวผึ้งหลังจากออกไปหาอาหารและติดมากับวัสดุอุปกรณ์ที่ผู้เลี้ยงผึ้งใช้ร่วมกัน สปอร์เข้าสู่ร่างกายของตัวหนอนผึ้งพันธุ์ผ่านทางการกินเท่านั้น ในอดีตอาจมีการตั้งสมมุติฐานวิธีการที่สปอร์ของเชื้อราเข้าสู่ร่างกายของตัวหนอนผึ้งไว้สองช่องทาง คือจากการกินอาหาร และการสัมผัส แต่ในปัจจุบันมีการศึกษารายละเอียดของเชื้อราดังกล่าวมากขึ้น จึงมีข้อสรุปที่เป็นที่ยอมรับแล้วว่า การก่อโรคชอล์คบรูดในตัวหนอนผึ้งพันธุ์นั้นต้องอาศัยช่องทางการกินเท่านั้น เพราะสปอร์ไม่สามารถงอกเส้นใยบนผนังลำตัวของตัวหนอนผึ้งได้ (Aronstein and Murray, 2010)

ธีระยุทธ (2549) ได้อธิบายกระบวนการของการติดเชื้อโรคชอล์คบรูดในตัวอ่อนของผึ้งพันธุ์ว่าหลังจากที่ตัวอ่อนได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายผ่านทางการกินอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อรา *A. apis* แล้ว สปอร์ของเชื้อราเข้าไปอยู่ในส่วนระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง หลังจากที่ตัวหนอนผึ้งได้รับเชื้อเข้าไป ทำให้ตัวหนอนกินอาหารเร็วขึ้น ในส่วนของลำไส้ส่วนกลางมีเยื่อบุผนังชั้นในเรียกว่า peritrophic membrane ซึ่งมีสารไคติน (chitin) เป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่กรองสารอาหาร (ศานิต, 2550) ทำให้เชื้อราสร้างเอนไซม์บางชนิดที่มีส่วนช่วยให้เชื้อราผ่านชั้น peritrophic membrane และสร้างเส้นใยแทงทะลุผ่านเยื่อบุนี้ได้ หลังจากที่ตัวหนอนได้รับเชื้อ 48 ชั่วโมง จากนั้นเส้นใยเจริญต่อไปยังเยื่อบุผนังชั้นนอกของระบบทางเดินอาหาร (epithelium) จากการที่เส้นใยเจริญผ่านเซลล์ในส่วนนี้ ทำให้ปริมาณของเม็ดแกรนูลเพิ่มสูงขึ้น และเกิดการบวมของนิวเคลียสอย่างชัดเจน จากนั้นเส้นใยจะผ่าน basal membrane เพื่อเจริญเข้าไปในส่วนช่องว่างในลำตัว ใช้ระยะเวลาประมาณ 72 ชั่วโมงหลังจากที่ตัวหนอนได้รับเชื้อ และเจริญต่อไปที่ก้อนไขมัน เชื้อราทำการเปลี่ยนแปลงรูปทรงและส่วนประกอบใน trophocytes และเจริญผ่าน enocyte ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับ trophocytes ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นหลังจากตัวหนอนได้รับเชื้อแล้ว 96 ชั่วโมง และในวันที่ 5-6 หลังจากได้รับเชื้อแล้ว เส้นใยจะเจริญผ่านผนังลำตัวชั้นนอกออกมาครอบคลุมร่างกาย Gilliam *et al* (1978) ได้รายงานว่าหลังจากที่เส้นใยเจริญผ่านผนังลำตัวออกมา พบว่าเส้นใยที่แทงทะลุผิวหนังขึ้นมาจากส่วนท้ายของลำตัวก่อน แล้วจึงสร้างเส้นใยมากขึ้นจนปกคลุมตัวหนอน Aronstein and Murray (2010) ได้อธิบายเพิ่มเติมว่า ตัวหนอนผึ้งที่ถูกปกคลุมด้วยเส้นใยมีการยืดตัวออกไปในสภาพที่เหยียดตรง และตัวหนอนจะบวมจนคับหลอดรวง และตัวหนอนตายเนื่องจากเชื้อราดูดกินสารอาหารในร่างกาย ซากตัวหนอนผึ้งที่ถูกปกคลุมด้วยเส้นใยเชื้อราในช่วงแรกลำตัวยังอ่อนนิ่ม แต่หลังจากนั้นไม่นาน ตัวหนอนจะแห้ง แข็ง และตัวหดสั้นลง ทำให้ตัวหนอนมีลักษณะเป็นมัมมี่ เรียกตัวหนอนที่มีลักษณะเช่นนี้ว่า mummified larva ซึ่งสามารถพบตัวหนอนที่แห้งได้ตามพื้นรัง และบริเวณหน้ารัง เพราะผึ้งงานได้ขนออกมาทิ้ง ตัวหนอนมัมมี่บางตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาจมีสีเทาหรือสีดำ เกิดจากการสัมผัสกันของเส้นใย (mycelium) สองแบบ ทำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และสร้างแอสโคมาที่มีผนังหุ้มสีน้ำตาลเข้ม ทำให้มองเห็นซากตัวหนอนผึ้งมีสีดำ นอกจากนี้พวกที่ไม่สร้างแอสโคมาทำให้ตัวหนอนผึ้งตายเป็นแท่งชอล์คสีขาวซึ่งเป็นสีของเส้นใยเชื้อรา Aronstein and Murray (2010) ได้รายงานว่าในซากมัมมี่สีดำแต่ละซากมีแอสโคสปอร์ถึง 10^8-10^9 แอสโคสปอร์ ในบางรายงานได้อธิบายเกี่ยวกับสีของมัมมี่ต่างกันไว้ว่า ตัวหนอนที่เกิดโรคชอล์คบรูดแล้วเปลี่ยนรูปร่างเป็นแท่งชอล์คสีขาวนั้น เกิดจากการที่ตัวหนอนได้รับสปอร์ที่สร้างเส้นใยชนิดแกรมบวกหรือแกรมลบเพียงชนิดเดียว ส่วนตัวหนอนที่มีลักษณะคล้ายกันแต่เป็นสีเทาหรือดำนั้น เกิดจากการที่ตัวหนอนได้รับสปอร์ที่สร้างเส้นใยชนิดแกรมบวก และสปอร์ที่สร้างเส้นใยชนิดแกรมลบ การตายเนื่องจากการติดเชื้อพบทั้งในตัวหนอนในวัยก่อนและหลังการปิดฝาหลอดรวงเพื่อเตรียมตัวเข้าดักแด้ Weinstock (2006) ได้รายงานว่า สปอร์ของเชื้อเจริญเติบโตอยู่ภายในระบบทางเดินอาหารของตัวหนอน และสร้างเส้นใยในระหว่างที่ตัวหนอนอยู่ในวัยสุดท้าย ทำให้ตัวหนอนตายก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ Qin *et al*. (2006) ได้อธิบายเพิ่มเติมว่าหากตัวหนอนได้รับสปอร์เข้าสู่ร่างกายก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ พบดักแด้ที่แสดงอาการของโรคชอล์คบรูดเช่นเดียวกัน

ในบางกรณีที่เส้นใยของเชื้อราสัมผัสกับตัวอ่อนของผึ้ง เส้นใยสามารถแทงทะลุเข้าไปสู่ผนังลำตัวของตัวอ่อนผึ้งได้เช่นกัน (ภาณุวรรณ, 2553) และทำให้ตัวหนอนผึ้งตายจากการที่ตัวหนอนถูกเส้นใยสีขาวของเชื้อราปกคลุมลำตัว

สปอร์ของเชื้อ *A. apis* มีความคงทนต่อความร้อนสูงกว่าอุณหภูมิที่หลอมไขผึ้ง และทนต่อสารเคมีได้หลายชนิด อีกทั้งยังสามารถอยู่รอดได้ในดิน และอาจคงอยู่ได้นานถึง 15 ปี สปอร์เจริญในสภาพเกือบไร้ออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิภายในช่องทางเดินอาหารของตัวอ่อน สปอร์จะไม่ทำให้เกิดโรคจนกว่าจะมีการงอกของสปอร์และสร้างเส้นใยเจริญอยู่ภายในลำตัวของหนอน ตัวหนอนจะอ่อนแอต่อเชื้อที่สุดในช่วงอายุไม่เกินห้าวัน และพบตัวหนอนของผึ้งเพศผู้เป็นโรคมากกว่าตัวหนอนของผึ้งงาน

การชันสูตรโรคชอล์คบรูดทำได้โดยการนำซากตัวหนอนที่ตายเนื่องจากการติดเชื้อ มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากซาก แล้วเขี่ยเส้นใยของเชื้อราไปตรวจสอบ วิธีที่ทำได้ง่ายคือการตรวจสอบลักษณะของสปอร์และเส้นใยของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา โดยการนำเข็มเขี่ยปลายงอเขี่ยเส้นใยบริเวณที่มีสปอร์ไปวางบนสไลด์ที่มี lactophenol cotton blue จำนวนสองหยด แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมทั้งบันทึกภาพ ตลอดจนศึกษาลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนวิธีที่ใช้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. apis* ทำได้โดยการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อสำรวจลักษณะเฉพาะของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โครงสร้างสืบพันธุ์ของเชื้อราที่เรียกว่าแอสโคมา ซึ่งภายในจะบรรจุสปอร์บอลหลายหน่วย แต่ละหน่วยบรรจุแอสโคสปอร์จำนวนมาก

2.1.3 การแพร่ระบาดของโรคชอล์คบรูด

Aronstein and Murray (2010) ได้รายงานว่าโรคชอล์คบรูดจะพบมากในช่วงฤดูใบไม้ผลิ เนื่องจากการเติบโตของเชื้อราเจริญเติบโตได้ดีในที่ที่มีความอับชื้น แต่ยังมีปัจจัยอื่นที่มีความสัมพันธ์กับการระบาดของโรคชอล์คบรูดซึ่งได้แก่ สภาพแวดล้อมอื่น ๆ ปฏิกิริยาระหว่างปัจจัยที่มีชีวิต เช่น ความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราและผึ้ง ซึ่งจะมีผลต่อการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคได้ ปริมาณสปอร์ที่ปนเปื้อนภายในรังผึ้งจำนวนที่มากกว่าจะเพิ่มโอกาสการเกิดโรคและเพิ่มระดับความรุนแรงของโรคชอล์คบรูดในผึ้งแต่ละรังได้ ดังนั้น อัตราการเกิดโรคขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อราในแง่ของความสามารถในการสร้างสปอร์ในปริมาณมาก อัตราการงอกของสปอร์และประสิทธิภาพในการแพร่กระจายของสปอร์ นอกจากนี้ ในส่วนของผึ้งนั้น ปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคที่ต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของผึ้ง ความแข็งแรงของผึ้ง และความเครียดที่เกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค ทำให้หลายปีมานี้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์ผึ้ง ให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. apis* ผลการศึกษาเกี่ยวกับความต้านทานต่อเชื้อรา *A. apis* ของผึ้งพันธุ์ได้ถูกรายงานโดย Jensen *et al* (2009) ซึ่งได้ทำการวิจัยเพื่อเปรียบเทียบความต้านทานของผึ้งพันธุ์ 3 ชนิดย่อย คือ *Apis mellifera carnica, A. m. ligustica* และ *A. m. mellifera.* พบว่า ผึ้งพันธุ์ชนิดย่อย *A. m. ligustiga* มีความต้านทานมากกว่าอีกสองชนิดย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การแพร่กระจายของสปอร์เป็นไปได้โดยง่าย เนื่องจากสปอร์สามารถติดไปกับนางพญาผึ้งและปนเปื้อนไปกับผลิตภัณฑ์ผึ้ง ไม่ว่าจะเป็น น้ำผึ้ง เกสรผึ้ง พรอพอลิส ไขผึ้ง รวมทั้งอุปกรณ์ทุกอย่างที่ใช้ในการเลี้ยงผึ้ง รวมไปถึงผู้เลี้ยงผึ้งด้วย สปอร์ของเชื้อรา *A. apis* สามารถติดไปกับถุงมือ เสื้อผ้า รองเท้าได้อีกด้วย (Flores *et al.,* 2005)

Hornitzky (2001) รายงานว่าผึ้งตัวเต็มวัยเมื่อกัดฝาหลอดรวงออกมา และสัมผัสกับตัวหนอนที่ตายจากการติดเชื้อราหรือได้รับสปอร์ที่ปนเปื้อนอยู่ภายในรัง และทำให้สปอร์ติดอยู่บนตัวผึ้ง ซึ่งผึ้งแต่ละตัวสามารถนำสปอร์ติดตามตัวไปได้ถึง 10^4 – 10^7สปอร์ และเมื่อผึ้งออกหาอาหาร สปอร์เหล่านั้นจะตกหล่นไปตามเส้นทางการหาอาหารของผึ้งในไร่อัลฟัลฟา ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถก่อโรคในผึ้งที่ใช้ชีวิตแบบโดดเดี่ยวได้ (solitary bees) เช่น ผึ้งกัดใบ โดยการได้รับสปอร์ที่ปนเปื้อนบนดอกอัลฟัลฟา ซึ่งติดมากับผึ้งพันธุ์ในระหว่างที่เก็บเกสรจากต้นอัลฟัลฟา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Anderson *et al.* (1998) ได้รายงานว่าเชื้อ *Ascosphaera* spp. พบได้ในธรรมชาติ เป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงในกลุ่มของผึ้งทั้งผึ้งสังคมและผึ้งโดดเดี่ยว ใน Superfamily Apoidea เชื้อรา *A. apis* เป็นเชื้อราก่อโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจของผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* ส่วนเชื้อรา *A. aggregate* Skou เป็นศัตรูสำคัญของผึ้งกัดใบ (*M. rotundata*) ส่วนเชื้อรา *A. larvis, A. osmophila, A. proliperda* และ *A. subcuticulata* ต่างก็เป็นเชื้อที่ก่อโรคในผึ้งได้ทั้งสิ้น แต่ในหลายรายงานได้ให้ข้อมูลไว้ว่าเชื้อเหล่านี้มีความสำคัญเป็นเพียงผู้ย่อยสลายตามห่วงโซ่อาหารเท่านั้น

2.1.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. apis* ทำได้ง่าย เนื่องจากเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้ในอาหารหลายชนิด แต่อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ ได้แก่ Potato-Dextrose agar (PDA), Yeast-Glucose-Starch agar (YGPSA), Sabouraud Dextrose agar (SDA), Malt agar ที่มีปริมาณมอลท์ประมาณ 0.5-2 % และอาหารชนิด PDA ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ 0.4 % เป็นต้น เชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมองเห็นเป็นเส้นใยสีขาวที่หนาแน่น โดยมีส่วนที่ยื่นไปในอากาศ เส้นใยบริเวณผิว และเส้นใยใต้อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเส้นใยบริเวณผิวมีความกว้าง 4-8 ไมโครเมตร เส้นใยเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนแอสโคสปอร์จะงอกในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงคือ 30 องศาเซลเซียส และการงอกของสปอร์ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

2.1.5 การป้องกันกำจัด

ภาณุวรรณ และคณะ (2547) รายงานว่ายังไม่มีวิธีการใดที่สามารถป้องกันกำจัดโรคชอล์คบรูดได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดกับผึ้งต้องคำนึงถึงปัจจัยที่สำคัญได้แก่ ประสิทธิภาพของสารเคมีหรือวิธีการที่เลือกใช้ต้องให้ผลที่ดีและต้องไม่เป็นอันตรายต่อประชากรผึ้งภายในรัง และต้องไม่มีสารพิษตกค้างภายในรังผึ้งและไม่ส่งผลเสียใด ๆ ต่อผลิตภัณฑ์ผึ้ง ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงวิธีการหลากหลายเพื่อนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคชอล์คบรูดในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง Aronstein and Murray (2010) ได้กล่าวถึงวิธีการป้องกันกำจัดหลายวิธี ซึ่งได้แก่ การใช้พันธุ์ผึ้งต้านทานต่อโรคชอล์คบรูด ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทาน โดยพิจารณาจากพฤติกรรมการทำความสะอาดรังของผึ้งในแต่ละรัง ซึ่งพฤติกรรมดังกล่าวทำให้ผึ้งสามารถกำจัดตัวหนอนที่ตายจากการติดเชื้อให้ออกจากรัง ทำให้ลดอัตราการระบาดภายในรังได้ อีกวิธีการคือการจัดการรังเพื่อให้ผึ้งอยู่ในสภาพที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตและสร้างสภาพเป็นอุปสรรคต่อการระบาดของโรค เนื่องจากสปอร์ของเชื้อราสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในรังผึ้งได้หลายปี อีกทั้งยังปนเปื้อนอยู่กับผลิตภัณฑ์ภายในรังผึ้งด้วย การจัดการรังเพื่อลดการระบาดของโรคชอล์คบรูดมีหลายวิธี เช่น การ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้อาหารเสริมเพื่อเสริมให้ผึ้งแข็งแรง สามารถต้านทานต่อการเกิดโรคได้ดี การรักษาความสะอาด กำจัดเศษขยะที่มีสปอร์ปนเปื้อนอยู่ออกจากรังผึ้ง ใช้อุปกรณ์ที่ปลอดเชื้อ การเปลี่ยนรวงใหม่ทุกปี เพื่อกำจัดสปอร์ที่ตกค้างอยู่ในไขผึ้ง และหลอดรวงผึ้ง หลีกเลี่ยงการเคลื่อนย้ายผึ้งระหว่างรัง เพื่อป้องกันการแพร่กระจายโรคไปสู่รังอื่น การจัดการให้สภาพภายในรังผึ้งมีอากาศถ่ายเทได้ดี นอกจากนี้ หากพบว่ามีการระบาดอย่างรุนแรงควรทำลายรวงดังกล่าว และเปลี่ยนรวงใหม่ให้กับผึ้ง แต่การจัดการมีข้อจำกัดด้านแรงงานและอุปกรณ์ ซึ่งถือเป็นการสิ้นเปลืองแรงงานมาก หากนำไปใช้กับฟาร์มผึ้งขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุด้วยวิทยาการอื่น ๆ เช่น การใช้รังสีแกรมมา จาก Cobalt-60 กับอุปกรณ์และรวงรัง โดยใช้ในปริมาณ 10 kGray ซึ่งไม่พบผลเสียใด ๆ กับองค์ประกอบของไขผึ้ง แต่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในเชิงเคมีและกายภาพของน้ำผึ้ง ซึ่งได้แก่ การทำงานของเอนไซม์ในน้ำผึ้งลดลง สีของน้ำผึ้งเปลี่ยนไปจากเดิม และพบว่ามีน้ำผึ้งไหลออกมาจากหลอดรวงด้วย นอกจากนี้ ความร้อนยังสามารถกำจัดเชื้อสาเหตุในน้ำผึ้งได้ด้วย โดยการศึกษาพบว่าเมื่อให้ความร้อนกับน้ำผึ้งถึง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หรือ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้อ่างน้ำร้อน พบว่าสามารถฆ่าสปอร์ของเชื้อสาเหตุได้ อุณหภูมิที่สูงกว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้สีของน้ำผึ้งเปลี่ยนไป และทำให้เปลี่ยนสภาพเป็นคาราเมล อีกทั้งอุณหภูมิที่สูงขึ้น ยังเพิ่มระดับของ hydroxymethylfurfural (HMF) และลดการทำงานของเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในน้ำผึ้งด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีการพยายามหาทางเลือกอื่น เช่น การใช้คลื่นไมโครเวฟ การใช้ความร้อนจาก infrared การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงและการกรองแบบละเอียดสูงเพื่อรักษาคุณภาพของน้ำผึ้งเอาไว้ด้วย (Aronstein and Murray, 2010; Hornitzky, 2001)

Hornitzky (2001) ได้กล่าวถึงสารเคมีที่สามารถควบคุมโรคชอล์คบรูดว่า ได้มีการใช้สารเคมีหลายชนิดเป็นสารรมในรังผึ้ง เช่น Trichloroisocyanuric acid (TCA) ซึ่งปล่อยก๊าซคลอรีนออกมาเป็นสารรมได้ ไอของ Propionic acid ก็สามารถนำมาใช้เป็นสารรมได้ด้วย Ethyl oxide สามารถนำมารมรวงผึ้งเพื่อฆ่าสปอร์ที่อยู่ในรวงผึ้งได้ ส่วน Methyl bromide ได้ถูกนำมาใช้รมรังผึ้งและอุปกรณ์ แต่พบว่ามีสารตกค้างในเนื้อไม้และในไขผึ้ง นอกจากนี้ Alkyl amines ยังกระตุ้นให้ผึ้งงานกำจัดซากมัมมี่ และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนี้ยังได้รายงานรายชื่อและวิธีการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดในห้องปฏิบัติการอีกหลายชนิดเช่น Sorbic acid, Sodium propionate, Methyl parahydroxybenzoate เป็นต้น Liu *et al.* (1991) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้สาร 15-azasterol (A25822B) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคชอล์คบรูดพบว่า สารเคมีดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ได้อย่างสมบูรณ์และยังทำให้เกิดแวคิวโอลมากมายในเส้นใยอีกด้วย และในการศึกษาของ Liu (1988) เกี่ยวกับผลของสารเคมี Itraconazole ที่มีต่อเชื้อรา *A. apis* พบว่าสารเคมีดังกล่าว ทำให้โครงสร้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของแอสโคสปอร์เปลี่ยนไป โดยทำให้เกิดเกราะหนาหุ้มผนังของแอสโคมาที่เกิดจากปุ่มก้อนเล็ก ๆ มากมาย และทำให้ไม่มีรูพรุนที่ผนังของแอสโคมา ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อีกทั้งในสปอร์แก่ยังไม่พบว่ามีการสร้างสปอร์บอลด้วย ทิติยาและคณะ (2540) ได้รายงานว่ามีการนำเอาสารปฏิชีวนะมาใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคชอล์คบรูด โดยสารที่มีผลในการควบคุมเชื้อราได้ดีคือ Amphotericin B, Girseofulvin และ Mcycophenolic acid

2.1.6 การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ

ในปัจจุบันได้มีการตระหนักถึงโทษของสารเคมีที่ใช้ในการเกษตร และมีการตั้งข้อจำกัดมากมาย ทำให้มีการศึกษาค้นคว้าหาประโยชน์ที่มีในธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคและแมลง โดยการป้องกันกำจัดโรคชอล์คบรูดในออสเตรเลียมีความเชื่อว่าการวางกล้วยไว้ในรังผึ้งจะสามารถรักษาโรคชอล์คบรูดได้ (Hornitzky, 2001) แต่ในรายงานเดียวกันไม่ได้ให้รายละเอียดเกี่ยวกับผลของการปฏิบัติและสารที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อราดังกล่าว Aronstein and Murray (2010) ได้ให้ข้อมูลที่น่าสนใจเกี่ยวกับสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดในการทดสอบบนอาหารเทียม ซึ่งได้แก่ citral, geraniol และ citronellal ซึ่งนอกจากจะสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Penicillum, Aspergillus* และ *Bacillus* ได้อีกด้วย David and Ward (2003) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมโรคชอล์คบรูดด้วยผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ซึ่งในการทดลองได้คัดเลือกพืชหลายชนิดมาสกัดน้ำมันหอมระเหย โดยพบว่าสารสกัดจากธรรมชาติที่ให้ผลดีที่สุด โดยใช้ในความเข้มข้นต่ำสุดเพียง 250 ppm. ได้แก่ Nepalese lemon grass oil, Lemon scented eucalyptus, Lemon scented tea tree และ สัดส่วนเฉพาะของ New Zealand manuka oil และพบว่าส่วนใหญ่แล้วจะมีส่วนประกอบของ citral อยู่ด้วย ส่วนใน New Zealand manuka oil นั้นพบว่ามีสารออกฤทธิ์สำคัญคือ terpenoid ภาณุวรรณ และคณะ (2547) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากธรรมชาติในตัวทำละลายต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูด โดยผลการวิจัยพบว่าอบเชยที่สกัดด้วย hexane ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้อย่างสมบูรณ์ (ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์) ที่ความเข้มข้นเพียง 1.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอบเชยที่สกัดด้วย dichloromethane ให้ผลการทดลองที่สมบูรณ์เช่นกันที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และพลูที่สกัดด้วย ethylacetate สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการนำเอาพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A apis* ซึ่งในการทดลองของ สุรชัย (2549) พบว่าพืชสมุนไพรที่คัดเลือกมานั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพียงชนิดเดียวคือ อบเชย ในส่วนของ ทิติยา และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คณะ (2540) ได้นำเอาพืชในประเทศไทยมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ก่อโรคชอล์คบรูดเช่นกัน ซึ่งผลที่ได้พบว่าพืชทุกชนิดที่นำมาศึกษาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต ของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ได้ในปริมาณที่แตกต่างกันออกไป โดยพืชที่ให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุดคือ พลู รองลงมาคือ ทองพันชั่ง สาบเสือ เหงือกปลาหมอ กกธูป ประดู่ และรากของว่านกีบแรด ตามลำดับ โดยพืชทั้งหมดถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และ Bailac *et al.* (2006) ได้ใช้สารสกัดจากพืชมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. apis* เปรียบเทียบกับ Ketoconazol เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการทดลองคือ พืชในสกุล *Lippia* (ไม้เลื้อยคลุมดิน) ซึ่งได้แก่ *Lippia juneliana, L. integrifolia* และ *L. turbinata* สามารถ ยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Tessaria absinthioides* และ *Hetheroteca latifolia* สามารถยับยั้งการเจริญได้ 62.5 เปอร์เซ็นต์ และ *Aloysia gratissima* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา *A. apis* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved