

## สารบัญ

|                                         | หน้า |
|-----------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                         | ก    |
| บทคัดย่อภาษาไทย                         | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ                      | ฉ    |
| สารบัญ                                  | ช    |
| สารบัญตาราง                             | ณ    |
| สารบัญภาพ                               | ญ    |
| บทที่ 1 บทนำ                            | 1    |
| บทที่ 2 ตรวจเอกสาร                      | 3    |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ               | 35   |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง | 43   |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง                  | 76   |
| เอกสารอ้างอิง                           | 79   |
| ภาคผนวก                                 |      |
| ภาคผนวก ก                               | 89   |
| ภาคผนวก ข                               | 90   |
| ภาคผนวก ค                               | 95   |
| ภาคผนวก ง                               | 96   |
| ภาคผนวก จ                               | 99   |
| ภาคผนวก ฉ                               | 102  |
| ภาคผนวก ช                               | 136  |
| ประวัติผู้เขียน                         | 140  |

## สารบัญตาราง

|             |                                                                                                                                                                                      | หน้า |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 1  | สรุปความแตกต่างของโรคโนซิมา <i>N. ceranae</i> กับ <i>N. apis</i> ที่เข้าก่อโรคในผึ้ง                                                                                                 | 13   |
| ตารางที่ 2  | จำนวนตัวอย่างผึ้งที่ได้จากการสำรวจลานเลี้ยงผึ้งพันธุ์จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557                                      | 36   |
| ตารางที่ 3  | ไพรเมอร์ 218 MITOC มีความจำเพาะเจาะจงกับ <i>N. ceranae</i> และไพรเมอร์ 321 APIS มีความจำเพาะเจาะจงกับ <i>N. apis</i> ถูกออกแบบมาจาก GenBank                                          | 40   |
| ตารางที่ 4  | ส่วนผสมของปฏิกิริยา Multiplex PCR ต่อ 1 ตัวอย่าง ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ                                                                                                           | 41   |
| ตารางที่ 5  | ผลการตรวจสอบสปอร์ของโรคโนซิมาในผึ้งพันธุ์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ คอมพาวนด์                                                                                                            | 49   |
| ตารางที่ 6  | ปริมาณสปอร์เฉลี่ยของโนซิมา ที่ก่อ โรคในผึ้งพันธุ์ ที่ตรวจพบจากลานเลี้ยง ผึ้งตัวอย่างในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่ ระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 | 50   |
| ตารางที่ 7  | ข้อมูลด้านอนุกรมวิธานวิทยาจังหวัดเชียงใหม่ก่อนดำเนินการเก็บตัวอย่าง ถึงวันที่ เก็บตัวอย่าง กับปริมาณสปอร์โนซิมาที่ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ คอมพาวนด์                            | 57   |
| ตารางที่ 8  | จำนวนตัวอย่างพิสูจน์ดีเอ็นเอของโรคโนซิมาในผึ้งพันธุ์ในพื้นที่ภาคเหนือ ตอนบน 3 จังหวัด ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557                                       | 68   |
| ตารางที่ 9  | ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างผึ้ง โดยการใช้สวิงโอบ                                                                                                                           | 69   |
| ตารางที่ 10 | ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ตรวจพบสปอร์ของโรคโนซิมาในผึ้ง พันธุ์ที่ตายหน้ารัง                                                                                                  | 69   |
| ตารางที่ 11 | แสดงจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบการปรากฏดีเอ็นเอของโรคโนซิมาในแต่ละ เดือนของจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่                                                                                 | 73   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

|             |                                                                                                                                                | หน้า |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 12 | แสดงการปรากฏดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ตรวจพบสปอร์โรคโนซิมาในฝั่่งพันธุ์<br>ที่ตายหน้าร้างในแต่ละเดือนของจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่             | 74   |
| ตารางที่ 13 | การวัดขนาดสปอร์ของโรคโนซิมา หน่วยเป็นไมโครเมตร                                                                                                 | 89   |
| ตารางที่ 14 | ปริมาณสปอร์ที่ตรวจพบของลานเลียงฝั่่งจังหวัดเชียงใหม่                                                                                           | 96   |
| ตารางที่ 15 | ปริมาณสปอร์ที่ตรวจพบของลานเลียงฝั่่งจังหวัดลำพูน                                                                                               | 97   |
| ตารางที่ 16 | ปริมาณสปอร์ที่ตรวจพบของลานเลียงฝั่่งจังหวัดแพร่                                                                                                | 98   |
| ตารางที่ 17 | ข้อมูลด้านอุณหภูมิที่วัดได้ ขณะเก็บตัวอย่างฝั่่ง ณ ลานเลียงฝั่่ง 3 จังหวัด<br>ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557         | 99   |
| ตารางที่ 18 | ข้อมูลด้านความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้ ขณะเก็บตัวอย่างฝั่่ง ณ ลานเลียงฝั่่ง 3<br>จังหวัด ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 | 100  |
| ตารางที่ 19 | รายงานข้อมูลอุตุณิยวิทยา ศูนย์อุตุณิยวิทยาภาคเหนือ จ. เชียงใหม่                                                                                | 102  |
| ตารางที่ 20 | รายงานข้อมูลอุตุณิยวิทยา ศูนย์อุตุณิยวิทยาภาคเหนือ จ. ลำพูน                                                                                    | 115  |
| ตารางที่ 21 | รายงานข้อมูลอุตุณิยวิทยา ศูนย์อุตุณิยวิทยาภาคเหนือ จ. แพร่                                                                                     | 127  |
| ตารางที่ 22 | ปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างฝั่่งเก็บจากการใช้สวิงโอบ                                                                                                | 136  |
| ตารางที่ 23 | ปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างฝั่่งที่ตายหน้าร้าง                                                                                                      | 138  |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## สารบัญภาพ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 1 ผู้ค้นพบโรคโนซิมาสาเหตุการตายของผึ้ง                                                                                                                                                                                                                                              | 6    |
| ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของโรคโนซิมา ในเซลล์ลำไส้ส่วนกลางของผึ้ง                                                                                                                                                                                                                                 | 7    |
| ภาพที่ 3 ภาพแสดงโครงสร้างภายในของสปอร์โนซิมา ชนิด <i>N. ceranae</i> โดยแสดงส่วนประกอบตามสัญลักษณ์ ได้แก่ EN = endospore, EX = exospore, PM = plasma membrane, N = nucleus และ PFs = 20-22 isofilar coils of the polar filament                                                             | 9    |
| ภาพที่ 4 การย้อมสี Giemsa-stain, Stained blue-white ของสปอร์โนซิมาอาศัยในเซลล์ลำไส้ผึ้ง ส่วน Stained red คือ นิวเคลียสของเซลล์ลำไส้ผึ้ง                                                                                                                                                    | 10   |
| ภาพที่ 5 ความเสียหายที่ส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยาของรังไข่ของผึ้งแม่รังที่ถูกทำลายด้วย <i>N. apis</i> เมื่อเปรียบเทียบกับรังไข่ผึ้งแม่รังที่ไม่ได้รับเชื้อ                                                                                                                                     | 12   |
| ภาพที่ 6 ความรุนแรงของโรคโนซิมาที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ                                                                                                                                                                                                                                       | 16   |
| ภาพที่ 7 แสดงการงอก filament ของสปอร์โนซิมา 2 สองชนิด โดยเชื้อ <i>N. apis</i> สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะที่ <i>N. ceranae</i> ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากไม่เกิดการงอกของ polar filament ซึ่งมีหน้าที่ในการขนถ่าย sporoplasms | 18   |
| ภาพที่ 8 การเปรียบเทียบลักษณะลำไส้ที่ถูกโรคโนซิมาเข้าทำลาย กับลำไส้ปกติ                                                                                                                                                                                                                    | 19   |
| ภาพที่ 9 ผลิตภัณฑ์สารปฏิชีวนะ ใช้รักษาโรคโนซิมาในผึ้ง                                                                                                                                                                                                                                      | 24   |
| ภาพที่ 10 รูปร่างของสปอร์โนซิมาทั้งชนิด <i>N. ceranae</i> และ ชนิด <i>N. apis</i> แต่การจำแนกรูปร่างต้องอาศัยความชำนาญในการวิเคราะห์                                                                                                                                                       | 26   |
| ภาพที่ 11 แสดงตัวอย่างลานตั้งรังผึ้ง (ทิศทางการตั้งรังผึ้งขึ้นอยู่กับลักษณะทางภูมิประเทศของแต่ละพื้นที่) ในการเก็บตัวอย่างผึ้งจำนวน 3 รัง ของแต่ละลานเลี้ยงผึ้ง                                                                                                                            | 35   |
| ภาพที่ 12 แสดงการเก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์บริเวณหน้ารังผึ้ง                                                                                                                                                                                                                                   | 36   |
| ภาพที่ 13 เครื่องมือนับจำนวน Hemacytometer เพื่อใช้นับจำนวนสปอร์โนซิมา                                                                                                                                                                                                                     | 37   |
| ภาพที่ 14 ผลผลิตดีเอ็นเอที่สกัดได้ เป็นตะกอนดีเอ็นเอพร้อมใส่ TE Buffer                                                                                                                                                                                                                     | 39   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 15 เครื่องวัดค่าปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop spectrophotometer micro volume sample retention system)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 40   |
| ภาพที่ 16 เครื่อง Thermal Cycler Programmable Thermal Controller PTC-200TM Thermo cycler                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 43   |
| ภาพที่ 17 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส และถ่ายภาพด้วย Gel documentation                                                                                                                                                                                                                                                                          | 42   |
| ภาพที่ 18 ลักษณะการตายของผึ้งบริเวณหน้ารังที่มีสาเหตุมาจากเชื้อสาเหตุของโรคโนซิมา ซึ่งพบขณะสำรวจ และเก็บตัวอย่างผึ้งงาน                                                                                                                                                                                                                                                     | 44   |
| ภาพที่ 19 ลำไส้ของผึ้งพันธุ์ที่ตายหน้ารัง ที่ดึงออกจากส่วนท้อง พบว่ามีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 44   |
| ภาพที่ 20 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของผึ้งที่พบอยู่บริเวณหน้ารัง โดยได้จากการสำรวจในลานเลี้ยงผึ้งของจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่ ตั้งแต่ช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557                                                                                                                                                                                 | 45   |
| ภาพที่ 21 การตายของผึ้งด้วยสาเหตุอื่น ๆ ที่ได้จากการสำรวจ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 47   |
| ภาพที่ 22 แสดงลักษณะสปอร์โนซิมา ที่ได้จากการบดเนื้อเยื่อลำไส้ของผึ้ง และสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวนด์ที่กำลังขยาย 40X                                                                                                                                                                                                                                      | 48   |
| ภาพที่ 23 ข้อมูลจำนวนปริมาณสปอร์โนซิมา กับการวัดผลอุณหภูมิเฉลี่ย และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย ที่วัดได้ ขณะสำรวจ และเก็บตัวอย่างผึ้งในพื้นที่ 3 จังหวัดภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556 และเดือนมกราคม ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557                                                                                                       | 52   |
| ภาพที่ 24 ตำแหน่งดีเอ็นเอของโรคโนซิมา เป็นตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากผึ้งพันธุ์ที่บินเข้าออกบริเวณหน้ารัง โดยถูกสรด้นซ้ายแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอ marker ขนาด 200 คู่เบส และถูกสรด้นขวาล่าง แสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอขนาด 218 คู่เบส ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของโนซิมาชนิด <i>N. ceranae</i> ขณะถูกสรด้นขวาล่างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอขนาด 321 คู่เบส เป็นดีเอ็นเอของโนซิมาชนิด <i>N. apis</i> | 75   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

|                                                                                                                                                                                                                                                                   | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 25 ตำแหน่งดีเอ็นเอของโรคโนซีมา เป็นตัวอย่างเก็บได้จากการตายของผึ้งพันธุ์บริเวณหน้ารัง โดยลูกศรด้านซ้ายแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอ marker ขนาด 200 คู่เบส และลูกศรด้านขวา แสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอ ขนาด 218 คู่เบส ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของโนซีมาชนิด <i>N. ceranae</i> | 75   |



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved