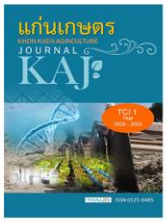
วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง *Tetragonula pagdeni* (Schwarz) ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวในส้มเขียวหวาน

Antifungal activity of stingless bee, *Tetragonula pagdeni* (Schwarz), propolis extracts against tangerine green mold rot

วชิราภรณ์ ฟูนัน[1]* และ กนกวรรณ นพคุณ[1]

Wachiraporn Phoonan[1]* and Kanokwan Noppakun[1]

[1] *สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพ 10220*
[1] *Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University, Bangkok 10220*

บทคัดย่อ: โรคเน่าราเขียวที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium* spp. ก่อปัญหาให้กับส้มเขียวหวานหลังการเก็บเกี่ยวเป็นอย่างมาก การใช้สารเคลือบผิวส้มที่มาจากธรรมชาติมีส่วนประกอบของสารที่ป้องกันการระเหยของน้ำ และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา จึงจำเป็นเพื่อลดสารตกค้างอันตรายต่อผู้บริโภค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพรอพอลิสที่ได้จากชันโรงในประเทศไทย ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวในส้มเขียวหวาน โดยพรอพอลิสถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล และนำไปทดสอบประสิทธิภาพแบบ *in vitro* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคเน่าราเขียวที่แยกได้จากผลส้ม ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2.5 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดพรอพอลิสเมทานอล (PME) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้มากที่สุด (ร้อยละ 65.80±8.35) ไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดจากพรอพอลิสชนิดอื่น ยกเว้น สารสกัดพรอพอลิสเอทานอล (PEE) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยที่ค่าเฉลี่ยรวมร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงสุดเป็นของสารสกัดพรอพอลิสอะซิโตน (PAE) รองลงมาคือ สารสกัดพรอพอลิสจากเมทานอล (PME) และเอทานอล (PEE) ตามลำดับ
คำสำคัญ: การยับยั้งการเจริญของเส้นใย; ชัน; เชื้อราหลังการเก็บเกี่ยว; ผลไม้

ABSTRACT: Green mold rot, caused by *Penicillium* spp., is an important problem of postharvest tangerines. Using natural coating agent containing with water diffusion preventing agent, and antifungal activity obtain is necessary to reduce harmful chemical residue to consumers. This study aimed to evaluate efficacy of the suitable organic solvents and concentrations of a Thai stingless bee propolis extracts against tangerine green mold rot. The propolis was extracted by three organic solvents and *in vitro* tested the mycelial growth inhibition of fungi causing green mold rot isolated from tangerines at concentrations of 1, 2.5 and 5% (w/v). The result showed that the highest mycelial growth inhibition by propolis methanol extract (PME) with 2.5% (w/v) concentration (65.80±8.35%) is not significantly different with other types of propolis, except for the 2.5% (w/v) of propolis ethanol extract (PEE). The total average of percentage inhibition revealed that the propolis acetone extract (PAE) gave the highest inhibition following by PME and PAE (propolis ethanol extract), respectively.
Keywords: mycelial inhibition; propolis; postharvest fungi; fruit

* Corresponding author: wachiraporn_da@hotmail.com

Received: date; May 8, 2020 Accepted: date; October 27, 2020 Published: date; June 5, 2021

บทนำ

ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata* Blanco.; Tangerine) จัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีรสชาติอร่อยทำให้เป็นที่นิยมกันเป็นอย่างมาก ส้มเขียวหวานที่ผลิตได้ใช้บริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ ทำให้มีรายได้เข้าประเทศปีละหลายล้านบาท แหล่งผลิตส้มเขียวหวานแพร่กระจายอยู่ทั่วประเทศ โดยพบว่าในปี พ.ศ. 2562 ภาคเหนือเป็นภูมิภาคที่มีเนื้อที่การปลูกมากที่สุดถึง 99,046 ไร่ ให้ผลผลิต 205,160 ตันต่อปี และผลผลิตรวมทั้งประเทศอยู่ที่ 213,609 ตันต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562) ส้มเขียวหวานจัดเป็นส้มเปลือกบางชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับส้มสายน้ำผึ้ง ลักษณะเปลือกที่บางของส้มเขียวหวานนี้ ทำให้หลังการเก็บเกี่ยวส้มมักจะเหี่ยว และง่ายต่อการเกิดบาดแผล ส่งผลให้เกิดโรคจากเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวได้ง่าย จึงทำให้อายุการวางจำหน่ายสั้น (ชนะตะวัน และคณะ, 2557) โรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญของส้มเขียวหวาน คือ โรคราเขียว หรือโรคราน้ำเงิน ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเข้าทำลายของเชื้อราในสกุล *Penicillium* โดยเชื้อนี้ทำให้ผลส้มเน่าเสีย และสปอร์ของเชื้อรายังแพร่กระจายไปยังส้มผลอื่น ๆ ในบรรจุภัณฑ์เดียวกันได้ง่าย ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยพบว่าความเสียหายที่เกิดกับผลไม้ทั่วโลกภายหลังการเก็บเกี่ยวมีมากถึง 25-50% (วิจิตรา, 2547; Moraes Bazioli et al., 2019) ซึ่งที่มาของการปนเปื้อนเชื้อราอาจมาจากในแปลงปลูก ผลส้มหลังการเก็บเกี่ยว ในโรงเก็บ ในขั้นตอนการขนส่ง หรือแม้กระทั่งในตลาด (สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2557) ดังนั้น หลังการเก็บเกี่ยวผลส้มจะต้องมีการล้างทำความสะอาด และมีการเคลือบผิวผลส้มก่อนที่จะเก็บเข้าห้องเย็นหรือนำมาวางขาย ซึ่งการเคลือบผิวผลส้ม มีข้อดีคือ ผลส้มจะมีความมันวาว น่าซื้อ และสามารถป้องกันการระเหยของน้ำออกจากผลส้ม ช่วยป้องกันไม่ให้ผลส้มเหี่ยวและเก็บไว้ได้นานขึ้น สารที่นิยมนำมาใช้เคลือบผิวผลส้มส่วนใหญ่เป็นไขมันที่คล้ายขี้ผึ้งหรือแวกซ์ (wax) เป็นสารโมเลกุลใหญ่ชนิดหนึ่ง ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (ชนะตะวัน และคณะ, 2557) ซึ่งมักมีการผสมสารเคมีป้องกันเชื้อราลงไปด้วย ตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งส่งผลให้มีสารเคมีตกค้าง และเป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค รวมถึงสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อราบางชนิดยังอาจถูกกีดกันจากการนำเข้าผลผลิตในบางประเทศด้วย (วิจิตรา, 2547) การค้นหาสารสกัดจากธรรมชาติจึงมีความจำเป็นเพื่อนำมาใช้ทดแทนสารเคมีที่เป็นอันตรายในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเน่าราเขียวในส้มเขียวหวาน

พรอพอลิส (propolis) หรือชันผึ้ง เป็นสารผสมที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวข้น โดยแมลงผสมเกสรในกลุ่มผึ้งและชันโรงจะเก็บยางไม้หรือของเหลวที่ไหลออกมาจากส่วนต่าง ๆ ของต้นพืชนานาชนิด ผสมรวมกับไขที่ถูกสร้างขึ้นมาจากตัวแมลงเอง สารผสมพรอพอลิสนี้ชันโรงจะนำมาสร้างทุกส่วนของรังเพื่อป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อจุลินทรีย์และแมลงศัตรูอื่น ๆ พรอพอลิสที่ได้จากชันโรงจึงมีปริมาณมากกว่าที่ได้จากผึ้ง (อัญชลี, 2556) ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของพรอพอลิสมากขึ้น มีรายงานว่าพรอพอลิสอุดมไปด้วยสารประกอบฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด (ศิริวรรณ, 2550; El- Fadaly and El-Badrawy, 2001; Koc et al., 2007; Hernández Zarate et al., 2018; Xu et al., 2019) จึงมีผลิตภัณฑ์ทางการค้าหลายชนิดนำพรอพอลิสมาเป็นส่วนผสม ทั้งในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เป็นส่วนผสมทางยาเพื่อรักษาโรคที่เกี่ยวกับช่องปากและผิวหนัง ซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

สำหรับการนำพรอพอลิสมาใช้ควบคุมโรคเน่าราเขียว พบว่ามีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่นำพรอพอลิสซึ่งได้จากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) มาใช้ในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* ที่เป็นสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวในผลไม้ทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* พบว่าสารสกัดพรอพอลิสด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *P. digitatum* (Soylu et al., 2008; Matny, 2015) แต่ยังไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคราเขียวของผลส้มที่ปลูกเชื้อได้ (Soylu et al., 2008) และยังมีผลจากงานวิจัยที่พบว่าสารสกัดพรอพอลิสช่วยชะลอการเจริญเติบโตของ *P. expansum* และลดความรุนแรงของโรคเน่าราสีน้ำเงิน (blue mold) ในลูกแพรได้เช่นเดียวกัน (Sánchez et al., 2016) Temiz et al. (2013) พบว่าผลการทดสอบสารสกัดพรอพอลิสด้วยเอทานอลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aurantiogriseum* และ *Aspergillus versicolor* ที่ความเข้มข้น 10% (v/v) สารสกัดพรอพอลิสสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้งสองชนิดได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ 5% และ 1% (v/v) และยังพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ให้ค่าการยับยั้งสูงจะมีปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงตามไปด้วย ซึ่ง Xu et al. (2019) ได้ทำการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพรอพอลิสจากสองแหล่งซึ่งให้ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. notatum* ได้ดีที่ค่า MIC 0.8 mg/mL พบว่า

สารสกัดพรอพอลิสจากประเทศจีนและสหรัฐอเมริกามีสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบร่วมเหมือนกัน คือ pinocembrin pinobanksin-3-O-acetate galanin chrysin pinobanksin และ pinobanksin-methyl ether ซึ่งผลการศึกษาของ Peng et al. (2012) รายงานว่าสารประกอบ pinocembrin ที่แยกได้จากพรอพอลิสสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. italicum* ได้ดี

จากคุณสมบัติของพรอพอลิสที่เป็นสารจากธรรมชาติ ประกอบไปด้วยสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลาย อีกทั้งยังมีส่วนผสมของไขผึ้ง เหมาะที่จะนำมาเป็นสารเคลือบผิวผลไม้ทางเลือกเพื่อทดแทนสารเคมีอันตรายที่ใช้อยู่เดิม และยังไม่มีงานวิจัยที่นำสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงมาใช้ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคเน่าราเขียวในส้ม ซึ่งจากธรรมชาติในการเก็บยางไม้ของผึ้งและชันโรงที่แตกต่างกัน น่าจะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของของพรอพอลิสจากต่างแหล่งที่มามีคุณสมบัติต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากพรอพอลิสของชันโรงชนิดขนเงิน (*Tetragonula pagdeni* Schwarz) และศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวในส้มเขียวหวานแบบ *in vitro* เพื่อพัฒนาเป็นสารเคลือบผิวผลไม้กันเชื้อราจากธรรมชาติต่อไป

วิธีการศึกษา

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวจากส้มเขียวหวาน

แยกเชื้อราบนผลส้มเขียวหวานที่ปรากฏอาการโรคเน่าราเขียว โดยการใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อเขี่ยสปอร์สีเขียวของเชื้อรามาใส่ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 2 มล. หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย ใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราก่อโรคเน่าราเขียวที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และทำการยืนยันการเป็นเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี Koch's postulation โดยนำผลส้มมาทำความสะอาดผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วทำบาดแผลที่ผลส้มเป็นจุดเล็ก ๆ ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อที่ลนไฟแล้ว จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่เลี้ยงไว้ในจานเพาะเชื้อหยดลงในรอยแผลของผลส้ม แล้วบ่มในกล่องชื้น มีฝาปิด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจสอบอาการของโรค หลังจากนั้นจึงนำเชื้อราที่พบว่าก่อโรคเน่าราเขียวในผลส้มนี้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การศึกษาสัณฐานวิทยา ลักษณะเส้นใย ลักษณะสปอร์ ของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวที่พบในส้มเขียวหวาน ใช้วิธีเพาะเลี้ยงบนแผ่นสไลด์ (slide culture) โดยใช้อาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยราเจริญมาที่กระจกปิดสไลด์ ให้นำมาย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue บันทึกลักษณะของเส้นใย ลักษณะของสปอร์ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจำแนกเชื้อราเบื้องต้นในระดับสกุล

การสกัดสารจากพรอพอลิส

นำพรอพอลิสที่เก็บเกี่ยวได้จากส่วนถ้วยเก็บน้ำหวานของชันโรงชนิดขนเงิน *T. pagdeni* จำนวน 30 รัง จากสวนผลไม้ 10 แห่งในตำบลรำพัน อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี มาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง และฉีกเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธีการแช่ (maceration) ในตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ที่มีขั้วปานกลางถึงสูง สำหรับการสกัดสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล (เกรดสำหรับงานวิเคราะห์) ในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะมืด หลังจากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง และเติมตัวทำละลายลงไปใหม่ เพื่อสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดและกรองทั้ง 3 ครั้งรวมกัน และนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศ (rotary evaporator) ทำการสกัดทั้งหมด 3 ซ้ำ จะได้สารสกัดหยาบพรอพอลิสของตัวทำละลายแต่ละชนิด นำไปชั่งน้ำหนักและเก็บไว้สำหรับทดสอบต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวด้วยสารสกัดหยาบพรอพอลิส

นำสารสกัดหยาบพรอพอลิสแต่ละชนิดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มาทำการเจือจางด้วยตัวทำละลายอะซิโตน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นร้อยละ 1, 2.5 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (คิดเป็น 10,000, 25,000 และ 50,000 ppm ตามลำดับ) ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค โดยวิธีเทคนิคอาหารเป็นพิษ (Poisoned food

technique) โดยผสมสารละลายของสารสกัดหยาบพรอพอลิสแต่ละความเข้มข้นลงในอาหาร PDA จากนั้นวางชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคที่มีระยะการเจริญเติบโตของเส้นใยครบ 3 วัน เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับสารสกัดหยาบพรอพอลิส โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืดเป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยวัดพื้นที่การเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งชุดทดลอง และชุดควบคุมโดยใช้การเทียบกับกระดาษกราฟ หลังจากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (% Inhibition) จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = ((a-b)/a)*100$$

โดยที่ a = พื้นที่การเจริญเติบโตเชื้อราของชุดควบคุม (ตารางมิลลิเมตร)

b = พื้นที่การเจริญเติบโตเชื้อราของชุดทดลอง (ตารางมิลลิเมตร)

วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ

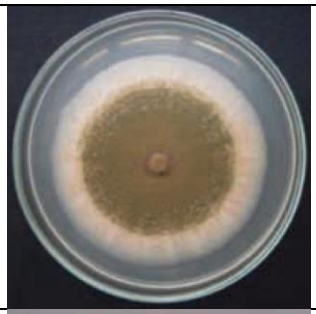
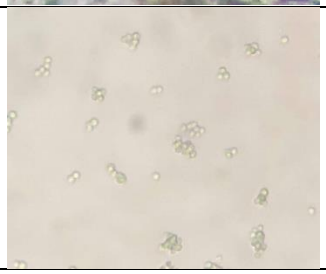
นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยโดยใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P <0.05)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. ผลการแยกเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวจากผลส้มเขียวหวาน

จากการแยกเชื้อราจากผลส้มเขียวหวานที่แสดงอาการของโรคเน่าราเขียวและนำมาพิสูจน์การเกิดโรคโดยวิธี Koch's postulation และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อราเขียวที่แยกได้จากผลส้มเขียวหวานในการศึกษานี้ คือ เชื้อรา *Penicillium* spp. โดยมีลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นสีเขียวเข้มถึงเขียวมะกอก เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าก้านชูสปอร์หรือโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) มีลักษณะเป็นแบบไฟอะโลฟอร์ (phialophore) หรือลักษณะคล้ายแปรงทาสี สปอร์หรือโคนิเดีย (conidia) เป็นแบบ ไฟอะโลสปอร์ (phialospore) มีลักษณะกลมรีต่อกันเป็นสายโซ่ยาว (**Table 1**) เมื่อนำไปยืนยันการก่อโรคโดยวิธี Koch's postulation พบว่าเชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการของโรคเช่นเดียวกับโรคเน่าราเขียวที่ปรากฏอยู่บนผลส้มก่อนหน้านี้ คือมีลักษณะเส้นใยสีขาวบริเวณกลางแผลมีรอยช้ำและปรากฏสปอร์สีเขียวจำนวนมาก ซึ่งลักษณะสัณฐานของเชื้อราเขียวที่แยกได้จากผลส้มเขียวหวานในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ เบญจมาภรณ์ (2548) และสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร (2557) ที่กล่าวว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่มเพนิซิลเลียมที่ก่อโรคเน่าราเขียวบนผลส้มที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA มีสปอร์สีเขียวเข้มถึงเขียวมะกอก กลุ่มของสปอร์ฟูและมีความสามารถในการฟุ้งกระจายสูง สปอร์มีลักษณะค่อนข้างกลมถึงรี เรียงต่อกัน อยู่บนก้านชูสปอร์ที่เป็นแบบ phialophore มีปลายก้านแตกแขนงไม่สม่ำเสมอ โดยจะทำให้ปรากฏอาการของโรคเน่าราเขียวบนผลส้ม เป็นรอยช้ำใสเป็นวงบนผิวส้ม และขยายขนาดขึ้นเรื่อย ๆ มีเส้นใยสีขาว และสร้างสปอร์สีเขียวฟูจำนวนมาก ซึ่งเชื้อรา *Penicillium* ที่เป็นสาเหตุโรคเน่าราเขียวในส้มมีหลายชนิด หากต้องการระบุชนิดของเชื้อราจะต้องมีการศึกษาทางสัณฐานเพิ่มเติมหรือทำการระบุชนิดโดยการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลต่อไป

Table 1 Comparison of morphology of fungi causing green mold rot on tangerine

Morphology of green mold	*Penicillium digitatum* (from references[1/])	*Penicillium* sp. (from this study)
1. Colony on PDA		
2. Conidiophore : phialophore		
3. Conidia : phialospore		

[1/] Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture (2014)

2. ปริมาณสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรงที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน

จากการนำชันหรือพรอพอลิสของชันโรงมาสกัดด้วยการแช่ในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล พบว่าได้สารสกัดหยาบพรอพอลิสแต่ละชนิดที่มีลักษณะข้นเหนียว สีน้ำตาลเข้มแกมเหลือง เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ได้กับน้ำหนักพรอพอลิสที่ใช้สกัดเริ่มต้น พบว่าสารสกัดพรอพอลิสทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณค่าร้อยละของผลผลิต (% yield) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยสารสกัดพรอพอลิสอะซิโตน (PAE) มีปริมาณมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 34.65 รองลงมา คือ สารสกัดพรอพอลิสเอทานอล (PEE) และสารสกัดพรอพอลิสเมทานอล (PME) ที่ร้อยละ 34.40 และ 31.81 ตามลำดับ (**Table 2**) ค่าร้อยละของผลผลิต (% yield) ของสารสกัดพรอพอลิสที่สกัดโดยการแช่ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดในงานวิจัยครั้งนี้ มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 31.81 - 34.65 ซึ่งอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับงานวิจัยของ วชิราภรณ์ (2562) ที่พบว่าการสกัดสารจากพรอพอลิสของชันโรงด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดนี้ร่วมกับวิธีการกวนและการเขย่าให้ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดอยู่ระหว่าง 30.59 – 37.09 แต่ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดด้วยอะซิโตนในงานวิจัยนี้สูงกว่าสารสกัดเอทานอลและเมทานอล ตามลำดับ แตกต่างจากงานวิจัยของ วชิราภรณ์ (2562) ที่มีค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดเมทานอลสูงกว่าเอทานอลและอะซิโตน ตามลำดับ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากความมีขั้วของตัวทำละลายและแหล่งที่มาของพรอพอลิสมีความแตกต่างกันในเรื่องสถานที่หรือช่วงเวลาเก็บเกี่ยว ทำให้ชันหรือพรอพอลิสของชันโรงมีสัดส่วนขององค์ประกอบสารที่มีขั้วต่ำและขั้วสูงแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่พรอพอลิสของชันโรงจะประกอบด้วยยางไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ชันโรงเก็บมาผสมรวมกับขี้ผึ้งหรือ wax ที่ชันโรงสร้างขึ้น เพื่อใช้ในการสร้างรัง ซึ่งยางไม้จะให้สารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (อัญชลี, 2556) และสามารถถูกสกัดออกมาได้ง่ายด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วค่อนข้างสูง ส่วนไขผึ้งเป็นสารที่สามารถถูกสกัดออกมาได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่า หากสัดส่วนของสารประกอบฟลาโวนอยด์และไขผึ้งในพรอพอลิสแต่ละแหล่งมีความแตกต่างกัน ก็อาจส่งผลให้ปริมาณสารที่ถูกสกัดออกมาได้ด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันมี

ปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าในระหว่างขั้นตอนการกรองสารสกัด สังเกตเห็นปริมาณของไขผึ้งแขวนลอยอยู่ในสารสกัดพรอพอลิส PAE มากกว่าสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดอื่น

Table 2 Yield of propolis crude extracts from three different solvent extractions

Propolis crude extracts	Organic solvent	% yield [1/]
1. Propolis acetone extract (PAE)	Acetone	34.65±1.32[a]
2. Propolis ethanol extract (PEE)	Ethanol	34.40±2.14[a]
3. Propolis methanol extract (PME)	Methanol	31.81±1.19[a]

[1/] Means within a column followed by the same letter do not differ significantly (P>0.05) with Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่มีต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราเขียว

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2.5 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคเน่าราเขียวในส้ม พบว่าชนิดของสารสกัดพรอพอลิสที่แตกต่างกันในความเข้มข้นที่ต่างกันให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราเขียวแตกต่างกัน โดยสารสกัดพรอพอลิส PME ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้สูงสุดที่ร้อยละ 65.80±8.35 ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับ PAE ส่วนสารสกัดพรอพอลิส PEE ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เป็นสารสกัดที่ให้ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราน้อยที่สุดที่ร้อยละ 42.10±3.08 (**Table 3**) สาเหตุที่สารสกัดพรอพอลิสเมทานอล (PME) และสารสกัดพรอพอลิสอะซิโตน (PAE) ที่ความเข้มข้นเดียวกันให้ประสิทธิภาพสูงสุดไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดพรอพอลิสในงานวิจัยนี้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วค่อนข้างสูงจึงทำให้สามารถสกัดสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์ออกมาได้ใกล้เคียงกัน (Dirar et al., 2019) ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ที่ศึกษาการใช้สารสกัดพรอพอลิสในการควบคุมเชื้อราในสกุล *Penicillium* ที่เป็นสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวในผลไม้หลายชนิด โดยเฉพาะผลไม้ตระกูลส้ม พบว่าสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถควบคุมการงอกของสปอร์เชื้อรา (Soylu et al., 2008; Yang et al., 2010; Xu et al., 2019) ยับยั้งการเจริญของเส้นใย (Soylu et al., 2008; Yang et al., 2010; Temiz et al., 2013) ได้ดี อันเป็นผลมาจากในสารสกัดพรอพอลิสประกอบไปด้วยยางไม้เป็นหลักมีสารประกอบประเภทฟีนอล (phenolic compound) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ค่อนข้างสูง รายงานก่อนหน้านี้พบว่าสารประกอบกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ดังรายงานของ El- Fadaly and El-Badrawy (2001) พบว่าสารสกัดพรอพอลิสมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และพบสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์เหล่านี้ คือ chrysin, galangin, pinocembrin และ pinobanksin เป็นองค์ประกอบในสารสกัดพรอพอลิสส่วนใหญ่ ซึ่ง Xu et al. (2019) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดพรอพอลิสที่ได้จากประเทศจีนและสหรัฐอเมริกา พบสารประกอบ pinocembrin, galangin, chrysin, pinobanksin เป็นองค์ประกอบในสารสกัดพรอพอลิสเช่นเดียวกัน โดยมีรายงานว่าสารประกอบ pinocembrin ที่แยกได้จากสารสกัดพรอพอลิสสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. italicum* ได้ ด้วยการไปขัดขวางการรักษาสมดุลของพลังงาน (energy homeostasis) และไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Peng et al., 2012) อย่างไรก็ตาม สารสกัดพรอพอลิสในรายงานทั้งหลายก่อนหน้านี้ เป็นสารสกัดพรอพอลิสที่ได้จากผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) เป็นส่วนใหญ่ มีรายงานน้อยมากเกี่ยวกับการใช้สารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงในการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยใหม่ที่นำสารสกัดจากพรอพอลิสของชันโรงไทยชนิด *T. pagdeni* มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวในส้มเขียวหวาน ยังต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการสกัดความเข้มข้น และวิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมเพิ่มเติม รวมถึงการทดสอบในพืช (*in vivo*) เพื่อให้มีประสิทธิภาพและสามารถนำไปใช้แทนสารเคลือบผลส้มป้องกันเชื้อราที่อาจเป็นอันตรายได้ต่อไป

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพโดยรวมของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 3 ชนิด คือ อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคเน่าราเขียวในส้ม พบว่าสารสกัดพรอพอลิส PAE ที่สกัดด้วย

ตัวทำละลายอะซิโตน ให้ค่าเฉลี่ยรวมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่าสารสกัดพรอพอลิส PME และ PEE ที่ร้อยละ 61.28, 58.05 และ 51.98 ตามลำดับไม่แตกต่างกัน (**Table 3** และ **Figure 1**) สอดคล้องกับการศึกษาของ Dirar et al. (2019) ได้ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัดสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) จากพืช พบว่าอะซิโตนเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ออกมาได้ปริมาณมากที่สุด ส่วนสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล และเมทานอล ให้ปริมาณสารประกอบประเภทฟีนอลมากกว่า ซึ่งทั้งสารประกอบฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลมีสารสำคัญหลายชนิดที่สามารถถูกสกัดออกมาได้ด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันและมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ดังรายงานก่อนหน้านี้ที่พบสารประกอบฟลาโวนอยด์ pinocembrin มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* ได้ (Peng et al., 2012) ส่วนสารประกอบในกลุ่มฟีนอลมักให้ฤทธิ์กว้างในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระ (Do et al., 2014; Dirar et al., 2019)

และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยรวมความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคเน่าราเขียวในส้ม (**Figure 2**) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสมีค่าสูงขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเขียวในส้มมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยค่าเฉลี่ยรวมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงสุดอยู่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้นร้อยละ 2.5 และร้อยละ 1 ที่ค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 60.18, 55.77 และ 55.35 ตามลำดับ (**Table 3** และ **Figure 2**) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Temiz et al. (2013) และ Matny et al. (2015) ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสต่อการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* และรายงานของ สุพรรณิการ์ และ รังสิยา (2563) ที่ทำการศึกษาผลของสารประกอบในกลุ่ม GRAS ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* เช่นเดียวกัน พบว่า หากเพิ่มความเข้มข้นของสารทดสอบมากขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจะยิ่งสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยเบื้องต้นนี้ยังไม่เห็นความแตกต่างอย่างเด่นชัดในเรื่องของความเข้มข้น เนื่องจากพรอพอลิสที่ได้จากส่วนถ้วยเก็บน้ำหวานอาจมีน้ำตาลปนอยู่ในสารสกัดพรอพอลิส ซึ่งสามารถถูกสกัดออกมาได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว และส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา จึงต้องมีการแยกองค์ประกอบของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราและทำการทดสอบเพิ่มเติม หรือเลือกใช้พรอพอลิสที่มาจากส่วนอื่นของรังชันโรงแทน

Table 3 Percentage inhibition (MEAN±SD) of propolis crude extracts on green mold mycelial growth

Propolis extracts	Percentage concentration (% w/v)[1/]			Average
	1	2.5	5	
PAE	63.79±11.86^{ab}	59.41±9.41^{ab}	60.62±13.95^{ab}	61.28^{a}
PEE	57.94±16.34^{ab}	42.10±3.08^{b}	55.90±13.97^{ab}	51.98^{a}
PME	44.33±14.93^{ab}	65.80±8.35^{a}	64.02±10.63^{ab}	58.05^{a}
Average	55.35^{a}	55.77^{a}	60.18^{a}	57.10

[1/] Means within a column followed by the same letter do not differ significantly (P>0.05) with Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

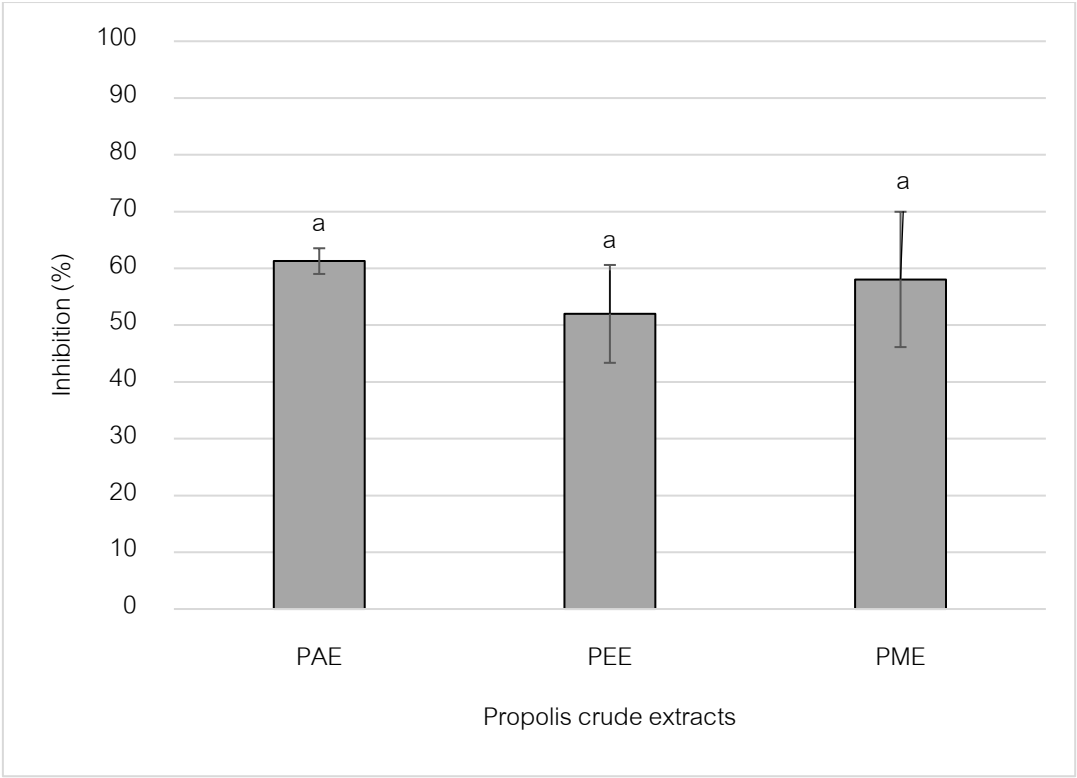


Figure 1 Percentage fungal inhibition of propolis crude extracts in different solvent extraction (PAE PEE and PME were propolis extracted with acetone, ethanol and methanol, respectively.), the same letter do not differ significantly (P > 0.05) with Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

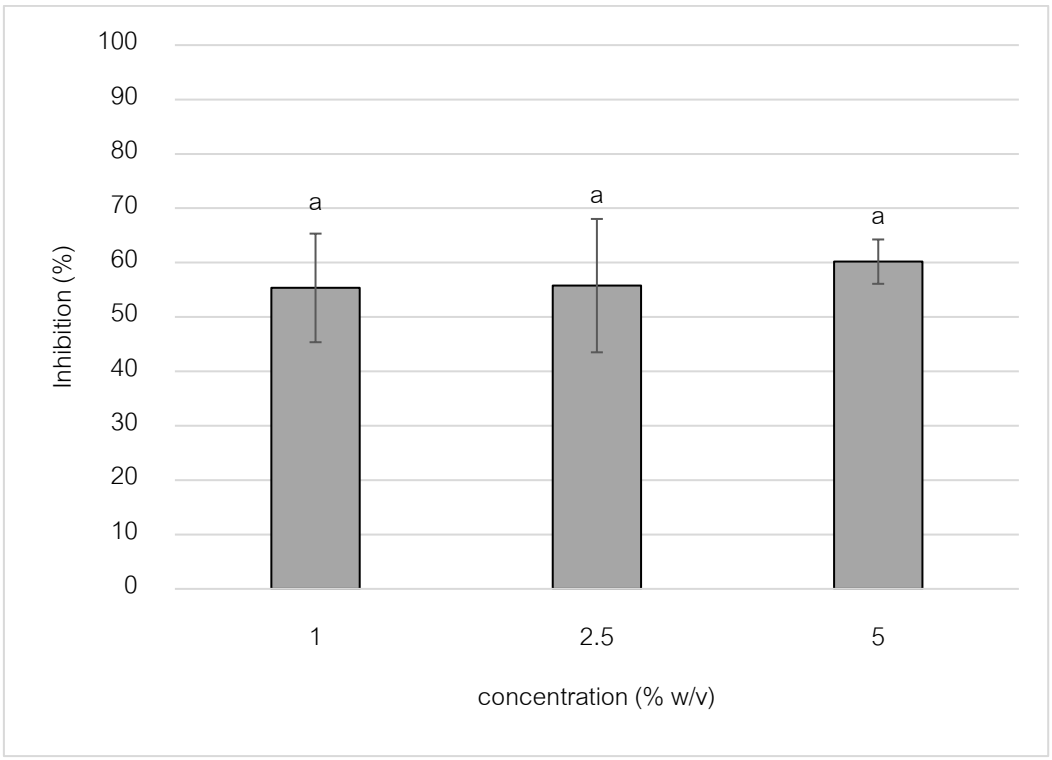


Figure 2 Percentage fungal inhibition of propolis crude extracts in various concentrations, the same letter do not differ significantly (P > 0.05) with Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

สรุป

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดหยาบพรอพอลิสอะซิโตน (PAE) สารสกัดหยาบพรอพอลิสเอทานอล (PEE) และสารสกัดหยาบพรอพอลิสเมทานอล (PME) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวในส้มเขียวหวานแบบ *in vitro* พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวในส้มเขียวหวานที่แยกได้จากการศึกษานี้เป็นเชื้อรา *Penicillium* spp. การสกัดสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากซันโรงด้วยตัวทำละลายอะซิโตนให้ค่าร้อยละผลผลิตมากที่สุด สารสกัดหยาบพรอพอลิสเมทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเน่าราเขียวในผลส้มเขียวหวานได้สูงที่สุด โดยสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนให้ค่าเฉลี่ยรวมของการยับยั้งสูงที่สุด ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มความเข้มข้นหรือจำนวนซ้ำเพื่อดูแนวโน้มและแยกองค์ประกอบเพื่อดูว่ามีสารสำคัญที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราชนิดนี้อยู่ในสารสกัดพรอพอลิสชนิดใด จึงจะสามารถทราบถึงตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด และค่ายับยั้งการเจริญของเชื้อรามีแนวโน้มแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิส

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ประจำปี 2560 ที่สนับสนุนทุนวิจัยบางส่วน และขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย ขำมี และ ดร.จักรพงษ์ หรั่งเจริญ ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารทางเคมีและการจำแนกเชื้อราก่อโรคพืช ตามลำดับ นอกจากนี้ ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครที่อำนวยความสะดวกเรื่องอุปกรณ์ เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ชนะตะวัน คริสเตนเซ่น, ทวิธาร จีนะสฤษดิ์, ลลิตตา จันทร์ทอง, สุชาดา พันธุ์สถิตย์วงศ์, และนพพล เล็กสวัสดิ์. 2557. สารเคลือบผิวผลไม้เศรษฐกิจไทย. แหล่งข้อมูล: http://www.agro.cmu.ac.th/absc/data/57/57-017. ค้นเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2563.

เบญจมาภรณ์ ศรีคำแหง. 2548. การควบคุมโรคเน่าราเขียวของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งหลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับสารเคลือบผิว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

วชิราภรณ์ ฟูนัน. 2562. วิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากพรอพอลิสของซันโรงที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว. (ออนไลน์). ใน: ประชุมวิชาการระดับชาติ “วลัยลักษณ์วิจัย” ครั้งที่ 11 วันที่ 27-28 มีนาคม 2562. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, นครศรีธรรมราช.

วิจิตรา ลีละศุภกุล. 2547. การควบคุมโรคผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนงบประมาณแผ่นดิน. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย. 2550. พรอพอลิส: ของขวัญจากธรรมชาติ. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 3: 286-295.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2562. ส้มเขียวหวาน: เนื้อที่ยืนต้น เนื้อที่ให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2562. http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/lime62.pdf. ค้นเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2563.

สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2557. โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว. จามจุรีโปรดักส์, กรุงเทพฯ.

สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง และรังสิยา แก้ววิเชียร. 2563. การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *Fusarium* sp. ที่คัดแยกได้จากพริกไทย (*Piper nigrum* L.) โดยใช้สารประกอบกลุ่ม GRAS. แก่นเกษตร. 48 (ฉบับพิเศษ 1): 1189-1196.

อัญชลี สวาสดิ์ธรรม. 2556. มหัศจรรย์ซันโรง. ทริปเพิ้ล กรุ๊ป, กรุงเทพฯ.

Dirar, A. I., D. H. M. Alsaadi, M. Wada, M. A. Mohamed, T. Watanabe, and H. P. Devkota. 2019. Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. South African Journal of Botany. 120: 261-267.

Do, Q. D., A. E. Angkawijaya, P. L. Tran-Nguyen, L. H. Huynh, F. E. Soetaredjo, S. Ismadji, and Y. Ju. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. Journal of Food and Drug Analysis. 22: 296-302.

El- Fadaly, H., and E. E. Y. El-Badrawy. 2001. Flavonoids of propolis and their antibacterial activities. Pakistan Journal of Biological Sciences. 4: 204-207.

Hernández Zarate, M. S., M. R. Abraham Juárez, A. Cerón García, C. Ozuna López, A. J. Gutiérrez Chávez, J. J. N. Segoviano Garfias, and F. Avila Ramos. 2018. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. Food Science and Technology. 38: 210-215.

Koc, A. N., S. Silici, F. Mutlu-Sariguzel, and O. Sagdic. 2007. Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. Food Technology and Biotechnology. 45: 57–61.

Matny, O. N. 2015. Efficacy evaluation of Iraqi propolis against gray mold of stored orange caused by *Penicillium digitatum*. Plant Pathology Journal. 14(3): 153-157.

Matny, O. N., S. H. S. Al-Warshan, and A. M. Ali. 2015. Antifungal evaluation of Iraqi propolis against *Penicillium expansum* and mycotoxin production in apple. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 4: 399-405.

Moraes Bazioli, J., J. R. Belinato, J. H. Costa, D. Y. Akiyama, J. G. de Moraes Pontes, K. C. Kupper, F. Augusto, J. E. de Carvalho, and T. P. Fill. 2019. Biological control of citrus postharvest phytopathogens. Toxins (Basel). 11(8): 460.

Peng, L., S. Yang, Y. J. Cheng, F. Chen, S. Pan, and G. Fan. 2012. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. Food Science and Biotechnology. 21: 1533–1539.

Sánchez, C., P. Duarte., P. Vasilenko., M. Santos., M. Loebler., A.S. Cruz., and M. Gonçalves. 2016. Potential application of Portuguese propolis to control blue mould disease in 'Rocha' pear. Acta Horticulturae. 1144: 359-364.

Soylu, E. M., A. E. Özdemir, E. Ertürk, N. Sahnler, and S. Soylu. 2008. Antifungal activity of propolis against postharvest disease agent *Penicillium digitatum*. Asian Journal of Chemistry. 20: 4823-4830.

Temiz, A., A. S. Mumcu, A. Ö. Tüylü, K. Sorkun, and B. Salih. 2013. Antifungal activity of propolis samples collected from different geographical regions of Turkey against two food-related mold, *Aspergillus versicolor* and *Penicillium aurantiogriseum*. GIDA-The Journal of Food. 38: 135-142.

Xu, X., R. Pu, Y. Li, Z. Wu, C. Li, X. Miao, and W. Yang. 2019. Chemical compositions of propolis from China and the United States and their antimicrobial activities against *Penicillium notatum*. Molecules. 24: 3576.

Yang, S., L. Peng, Y. Cheng, C. Feng, and P. Siyi. 2010. Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis. Food Science and Biotechnology. 19: 1303–1308.