

ประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงอกร่อง

Efficacy of propolis extract against *Colletotrichum* sp. causing anthracnose diseases of mango fruit cv. Aok Rong

พิกุล นุชนวลรัตน์^{1*} และ นภาพร จิตต์ศรัทธา¹

Phikun Nuchnuanrat^{1*} and Napaporn Jitsatta¹

บทคัดย่อ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงในเขตอำเภอแหลมสิงห์ อำเภอมะขาม และอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงอกร่อง พบว่า สารสกัดพรอพอลิสความเข้มข้น 1, 2, 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เทียบกับสารโปรคลอราซความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) สารสกัดพรอพอลิสจากอำเภอแหลมสิงห์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดพรอพอลิสจากอำเภอท่าใหม่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราโปรคลอราซความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุดเท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารสกัดพรอพอลิสจากอำเภอมะขามความเข้มข้น 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 87.11 และ 71.24 เปอร์เซ็นต์ และมีผลยับยั้งการงอกของสปอร์เท่ากับ 93.96 และ 84.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสรุปสารสกัดพรอพอลิสที่เก็บรวบรวมจากทั้ง 3 อำเภอในจังหวัดจันทบุรี มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงองค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติในการต้านเชื้อราของพรอพอลิส

คำสำคัญ: โรคแอนแทรคโนส มะม่วง พรอพอลิส

Abstract

The efficacy of stingless bee propolis extract obtained from Laem Sing, Makham, and Tha Mai district in Chanthaburi province, was studied to inhibit the growth of *Colletotrichum* sp. causing anthracnose disease of mango cv. Aok Rong on the culture medium. The study showed that the propolis extract at concentrations of 1, 2, 3% (w/v) compared to prochloraz 0.05% (v/v) significantly ($p < 0.01$) inhibited the mycelium growth and spore germination of the tested fungi. The effective treatments were propolis from Laem Sing District at 3%, propolis from Tha Mai district at 2%, and prochloraz at 0.05%, showing 100.00% inhibition of mycelium growth and spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides*, followed by propolis from Makham at 3 and 2% inhibited mycelium growth by 87.11 and 71.24%

¹ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

¹ Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Rambhai Barni University

* Corresponding author. E-mail: phikun.n@rbru.ac.th

while inhibiting the spore germination by 93.96 and 84.66%, respectively. In conclusion, propolis extract obtained from three districts in Chanthaburi province shows antifungal activities to inhibit the growth of *Colletotrichum* sp. causing anthracnose disease in mango. The chemical composition and antifungal properties of propolis extracts should be included in future studies.

Keywords: anthracnose disease, mango, propolis

บทนำ

โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญของมะม่วง มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. ในระยะหลังการเก็บเกี่ยวทำให้ผลมะม่วงมีอาการแผลจุดสีดำเล็ก ๆ และจะขยายลุกลามมาติดกันเมื่อผลสุกมากขึ้น แผลมีสีน้ำตาลดำค่อนข้างกลม บริเวณแผลมีลักษณะยุบตัวลง ทำให้ผลมะม่วงเน่าเสีย มีคุณภาพต่ำ และอายุการเก็บรักษาสั้นลง (Jenny, Sultana, Islam, Khandaker, & Bhuiyan, 2019) การควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมีจากการสังเคราะห์ เช่น คาร์เบนดาซิม (carbendazim) หรือ โพรคลอราซ (prochloraz) นอกจากมีอันตรายต่อเกษตรกร ยังอาจมีปริมาณสารพิษตกค้างในผลผลิต ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค การศึกษาความต้านทานของเชื้อราต่อสารเคมี พบมีรายงานความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงต่อสารเคมีคาร์เบนดาซิมทั้งในประเทศ และต่างประเทศ (Chaichana & Nalumpang, 2007; Kumar, Reddy, Reddy, & Devi, 2007; Nalumpang et al., 2010; Kongtragoul, Nalumpang, Miyamoto, Izumi, & Akimitsu, 2011; Nuchnuanrat, & Jisatta, 2021) ซึ่งทำให้ในสวนมะม่วงที่เชื้อราเกิดความต้านทานต่อสารเคมี อาจใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมในการควบคุมโรคไม่ได้ผล จากประเด็นปัญหาจากการใช้สารเคมีเรื่องการปนเปื้อนทั้งมลภาวะ

สารพิษในสิ่งแวดล้อม และการสูญเสียทรัพยากรชีวภาพที่ถูกคุกคาม ทำให้เกิดกระแสการบริโภค อุปโภค ผลผลิตที่มาจากสารอินทรีย์ในธรรมชาติ เนื่องจากคำนึงถึงความปลอดภัย ความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงกระแสการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์ด้านอาหาร ยา สมุนไพร อย่างยั่งยืน ซึ่งอาจนำไปสู่การคิดค้นผลิตภัณฑ์ที่สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจกับชุมชนได้ (Waramit, & Charoensuk, 2016)

ปัจจุบันมีการส่งเสริมการเลี้ยงผึ้งและชันโรงในสวนผลไม้เพื่อช่วยผสมเกสร การเลี้ยงผึ้งและชันโรงยังให้ผลผลิตยางผึ้ง หรือพรอพอลิส (propolis) การแปรรูปผลิตภัณฑ์ผึ้ง และชันโรงจึงเป็นการเสริมรายได้ต่อครัวเรือน จากการตรวจเอกสารพบมีรายงานผลการศึกษาศาสตร์กัตพรอพอลิสในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวพืชในพืชหลายชนิด โดยนักวิจัยมีความสนใจใช้สารสกัดพรอพอลิสเป็นสารเคลือบผิวเพื่อควบคุมโรคและยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวให้ยาวนานขึ้น เช่น การศึกษาการเคลือบผิวผลสตรอเบอรี่ด้วยสารสกัดพรอพอลิสเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Omar, Sidique, & Ahmad, 2020) การเคลือบผิวกล้วยด้วยสารสกัดพรอพอลิสเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Mohamad

Areff, Mohamed Sidique, Lani, & Ahmad, 2022) นอกจากนี้ยังพบรายงานวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพของพืชรพพอลิสร่วมกับสารเคลือบผิวชนิดอื่น ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อลดการเกิดโรค ลดความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนส และรักษาคุณภาพของผลผลิต เช่น สารสกัดพืชรพพอลิสร่วมกับกัมอะราบิก (gum arabic) ในการเคลือบผิวมะละกอ (Ali, Cheong, & Zahid, 2014) สารสกัดพืชรพพอลิสร่วมกับน้ำมันหอมระเหยอบเชยและกัมอะราบิกในการเคลือบผิวพริก (Ali, Chow, Zahid, & Ong, 2014) สารสกัดพืชรพพอลิสร่วมกับไคโตซาน (chitosan) ในการเคลือบผิวผลอะโวคาโด (Marino, Pinsetta Junior, Magalhães, & Mattiuz, 2018)

พืชรพพอลิสจากแหล่งต่าง ๆ ที่มีสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ พืชพรรณแตกต่างกัน หรือมีชนิดพันธุ์ที่ต่างกัน จะมีองค์ประกอบทางเคมี และความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน (Bankova, Boudourova, Popov, Sforcin, & Funari, 1998; Inson, & Malaipan, 2006) สารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในพืชรพพอลิเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กรดอะโรมาติก (aromatic acids) และเอสเทอร์ (ester) ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพืชรพพอลิสจากประเทศโคลัมเบียที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคมะละกอละมั่ง และ *Botryodiplodia theobromae* สาเหตุโรคในอะโวคาโด พบสารสำคัญ 3 ชนิด คือ สาร labdane-type diterpenes: isocupressic acid (1), (+)-agathadiol (2) และ epi-13-torulosol (3) เป็นองค์ประกอบหลัก (Meneses, Diego, Durango, Carlos, & García, 2009) สารสกัดพืชรพพอลิสจากประเทศ

บราซิลที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum musae* สาเหตุโรคข้าวหิวเฒ่าของกล้วย พบสารสำคัญคือ Medicarpin (3S)-vestitol และ (3S)-neovestitol เป็นองค์ประกอบหลัก (Dudoit, Mertz, Chillet, Cardinault, & Brat, 2021)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชรพพอลิสที่เป็นผลผลิตจากการเลี้ยงชันโรงในพื้นที่อำเภอมะขาม อำเภอแหลมสิงห์ และอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง เนื่องจากพืชรพพอลิเป็นสารจากธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมี หากสามารถนำพืชรพพอลิสมาใช้ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีได้ นอกจากจะเป็นการผลิตสินค้าเกษตรปลอดภัยให้ได้มาตรฐานตามระบบ GAP และระบบเกษตรอินทรีย์ จะยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากการเลี้ยงชันโรงของเกษตรกรในจังหวัดจันทบุรีในอนาคต

วิธีการศึกษา

1. การสกัดสารสกัดหยาบจากพืชรพพอลิส

การสกัดสารสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน (maceration) โดยนำพืชรพพอลิสจากชันโรงที่เก็บรวบรวมจากสวนผลไม้ในอำเภอมะขาม อำเภอแหลมสิงห์ และอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี น้ำหนัก 200 กรัม ระหว่างเดือนกันยายนถึงตุลาคม 2564 นำมาฉีกเป็นชิ้นเล็กแล้วใส่ในขวดแก้วสี่ขาปากกว้าง เดิมเอทิลแอลกอฮอล์ (ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วนพืชรพพอลิสต่อตัวทำละลาย 1:4 โดยปริมาตรต่อปริมาตร, w/v) ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน โดยคนสารทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง จากนั้นกรองเศษที่ไม่ละลาย

ออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองอีกครั้งด้วยกระดาษ Whatman No.1 นำส่วนแอลกอฮอล์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกสารสกัดและตะกอนออกจากกัน จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบ (crude extracted) ซึ่งมีลักษณะของเหลวหนืดข้น ซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดหยาบจากพรอพอลิสไว้ในขวดสีชา ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (ดัดแปลงจาก Ali, Cheong, & Zahid, 2014; Ecem-Bayram, & Gercek, 2019)

2. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์

ทำการแยกเชื้อราที่เป็นโรคแอนแทรกโนสจากตัวอย่างผลมะม่วงอร่องที่เก็บจากบ้านเสม็ดงาม ตำบลหนองบัว จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิค tissue transplanting (Dhingra, & Sinclair, 1995) โดยการตัดชิ้นส่วนของผิวบริเวณขอบแผลให้ติดบริเวณที่ไม่เป็นโรคขนาดประมาณ 0.50×0.50 เซนติเมตร ใส่เชื้อผิวโดยแช่ในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite เวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับฆ่าเชื้อ นำไปวางบนอาหาร WA (water agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 3 วัน จากนั้นตัดปลายเส้นใยที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพืชวางลงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และทำการ sub-culture จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยศึกษาโคโลนีเชื้อราบนอาหาร PDA และตรวจโครงสร้างพื้นฐานของเชื้อรารายได้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (compound microscope) ทำการพิสูจน์การเกิดโรคตามวิธีของ Koch's postulation (Agrios, 1997)

โดยการปลูกเชื้อบนผลมะม่วงที่ไม่มีบาดแผล และอาการของโรค เพื่อพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรค แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค single spore เมื่อได้เชื้อราบริสุทธิ์ให้เข็มเย็บตัดปลายเส้นใยเชื้อราเก็บลงอาหาร PDA ในหลอดทดลอง (PDA slant) เก็บรักษาในตู้เย็น เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษาผลของสารสกัดพรอพอลิสที่มีต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

ทำการทดสอบผลของสารสกัดพรอพอลิสที่มีต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง ด้วยวิธี poisoned food technique (Dhingra, & Sinclair, 1995) โดยผสมสารสกัดหยาบพรอพอลิสในอาหาร PDA ให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เทประมาณ 15 มิลลิลิตร ในส่วนของชุดควบคุมจะเป็นอาหาร PDA ที่ไม่มีการผสมสารใด ๆ และอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราโพรคอลลาราช ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ หลังจากผิวหน้าอาหารผสมสารทดสอบแห้งสนิท นำชิ้นรุ่นที่ได้จากการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะผ่านบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบที่อายุ 7 วัน วางบนผิวหน้าอาหารที่ผสมสารสกัดพรอพอลิส จากนั้นบ่มเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD, completely randomized design) ทำการทดลอง 8 ซ้ำ ตรวจวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) ทุกวัน จนกระทั่งเชื้อราชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(A - B) / A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนชุดควบคุม

B คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนชุดทดสอบ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ตาราง ANOVA (analysis of variance) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's new multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4. การศึกษาผลของสารสกัดพรอพอลิสที่มีต่อการออกของสปอร์เชื้อรา

ทำการทดสอบผลของสารสกัดพรอพอลิสที่มีต่อการยับยั้งการออกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง โดยดัดแปลงวิธีการของ Rodrigues et al. (2019) ทำการผสมสารสกัดพรอพอลิสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหาร WA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เทประมาณ 15 มิลลิลิตร ในส่วนของชุดควบคุมจะเป็นอาหาร WA ที่ไม่มีการผสมสารใด ๆ และอาหาร WA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราโพรคลอราซความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ หลังจากผิวหน้าอาหารผสมสารทดสอบแห้งสนิท ทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราโดยการทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปเตรียมสารละลายสปอร์โดยเทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงบนอาหาร PDA

จากนั้นใช้แท่งแก้วกลีบบริเวณผิวหน้าอาหารเพื่อให้สปอร์กระจาย แล้วกรองเส้นใยออกด้วยผ้าขาวบาง ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ให้มีความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้อุปกรณ์ตรวจนับสปอร์ (hemacytometer) ทำการทดสอบสารสกัดจากพรอพอลิสที่มีต่อการออกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง โดยหยดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นเกลี่ยด้วยแท่งแก้ว (spread plate technique) ให้สปอร์กระจายทั่วผิวอาหารอย่างสม่ำเสมอ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจลักษณะการออกของสปอร์เชื้อรา โดยตัดชิ้นวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 2×2 เซนติเมตร นำมาวางบนแผ่นสไลด์ โดยให้ด้านที่มีเชื้อราหงายขึ้น หยด lactophenol เพื่อย้อมให้สปอร์มองเห็นได้ชัดเจนขึ้น และบันทึกจำนวนสปอร์ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยถือว่าสปอร์ที่งอก คือ สปอร์ที่มี germ tube ยาวเกินกว่าครึ่งหนึ่งของขนาดสปอร์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการออกของสปอร์โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(A - B) / A] \times 100$$

เมื่อ A คือ จำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกเมื่อไม่ได้ผสมสารทดสอบ (ชุดควบคุม)

B คือ จำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกเมื่อได้ผสมสารทดสอบ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ตาราง ANOVA (analysis of variance) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's new multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ผลการศึกษา

1. ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากพรอพอลิส

ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากพรอพอลิสพบว่า สารสกัดหยาบจากพรอพอลิสจากอำเภอลำปาง อำเภอน่าน และอำเภอมะขาม มีน้ำหนักเท่ากับ 45.39, 57.44 และ 69.64 กรัม ตามลำดับ สารสกัดหยาบมีสีน้ำตาลแดง ลักษณะข้นเหนียว

2. ผลการแยกเชื้อราบริสุทธิ์

เมื่อทำการแยกเชื้อราบริสุทธิ์ แล้วทำการศึกษาโคโลนีเชื้อราบนอาหาร PDA พบว่าโคโลนีมีลักษณะกลมขอบเรียบสีขาวปนเทา เส้นใยฟูเนื้อผิวอาหารเล็กน้อย บางไฮฟาเล็ดมีการเจริญแบบวงแหวนเป็นชั้น ๆ เชื้อรามีการสร้างกลุ่มเมือกของสปอร์ (spore mass) สีส้มเป็นจุดเล็ก ๆ บริเวณกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดัง (Figure 1a) โคโลนีของเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน ด้านหลังจานอาหาร PDA พบโคโลนีมีสีขาวปนเทา มีลักษณะการเจริญเป็นวงซ้อนกัน ดัง (Figure 1b) เมื่อทำการเขี่ยเชื้อตรงบริเวณกลุ่มของสปอร์มาตรวจดูโครงสร้างเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ พบว่าสปอร์มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ใสไม่มีสี รูปร่างยาวรีถึงทรงกระบอกปลายมน ดัง (Figure 1c) เส้นใยมีผนังกันตามขวาง (septate hypha) ใสไม่มีสี ดัง (Figure 1d) เมื่อนำไปปลูกเชื้อพิสูจน์โรคบนผลมะม่วงพบแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส ลักษณะเป็นผลยุบตัว สีดำ

มีลักษณะกลม ผลการแยกเชื้อราบริสุทธิ์สามารถแยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนส

3. ผลของสารสกัดพรอพอลิสที่มีต่อการเจริญของเส้นใย

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราแต่ละทรีตเมนต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดัง (Table 1)

Table 1 Efficacy of propolis extract on mycelia growth of *Colletotrichum* sp. causing mango anthracnose.

treatments		% mycelial growth inhibition ^{1/}
T1	control (water)	0.00±0.00 i ^{2/}
T2	Lam Sing 1%	6.70±0.83 h
T3	Lam Sing 2%	58.76±1.37 d
T4	Lam Sing 3%	100.00±0.00 a
T5	Makham 1%	21.24±1.09 g
T6	Makham 2%	71.24±1.37 c
T7	Makham 3%	87.11±0.57 b
T8	Tha Mai 1%	43.03±0.78 f
T9	Tha Mai 2%	100.00±0.00 a
T10	Tha Mai 3%	53.71±0.57 e
T11	prochloraz 0.05%	100.00±0.00 a
C.V. %		1.36%
F- test		**

note: ** Significant difference at $P<0.01$

^{1/} Mean of eight replications ± SD

^{2/} Different letters in each column are significantly different ($P<0.01$) based on Duncan's multiple range test (DMRT).

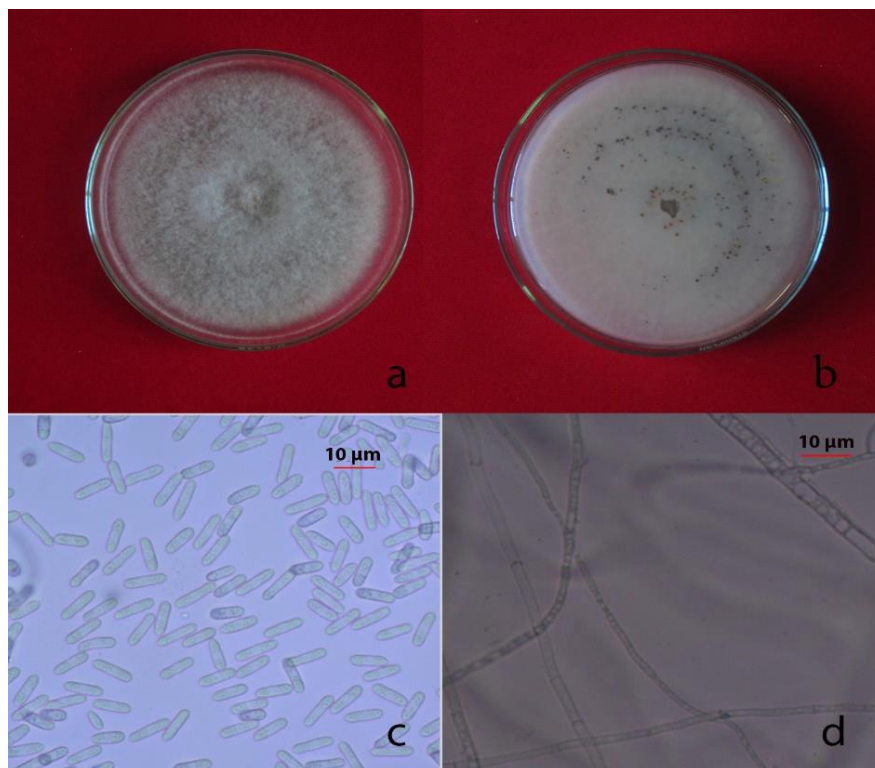


Figure 1 Morphology characteristics of *Colletotrichum* sp. isolated from mango anthracnose (a, b) colony on PDA medium at 25 °C for 7 days ((a) upper surface, (b) lower surface), (c) conidia, (d) hyphae. Microscopic image of conidia and hyphae at 400x. Scale bar = 10 μ m.

ผลการทดลองพบว่าอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดพริกพอลิสดจากอำเภอสว่างไสงมีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พริกพอลิสดจากอำเภอน้ำใหม่ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราไพโรคลอราซความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รองลงมาคืออาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดพริกพอลิสดจากอำเภอมะขามความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พริกพอลิสดจาก

อำเภอมะขามความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พริกพอลิสดจากอำเภอสว่างไสงความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พริกพอลิสดจากอำเภอน้ำใหม่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พริกพอลิสดจากอำเภอน้ำใหม่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พริกพอลิสดจากอำเภอมะขามความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และพริกพอลิสดจากอำเภอสว่างไสงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 87.11, 71.24, 58.76, 53.71, 43.03, 21.24 และ 6.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดัง (Figure 2)

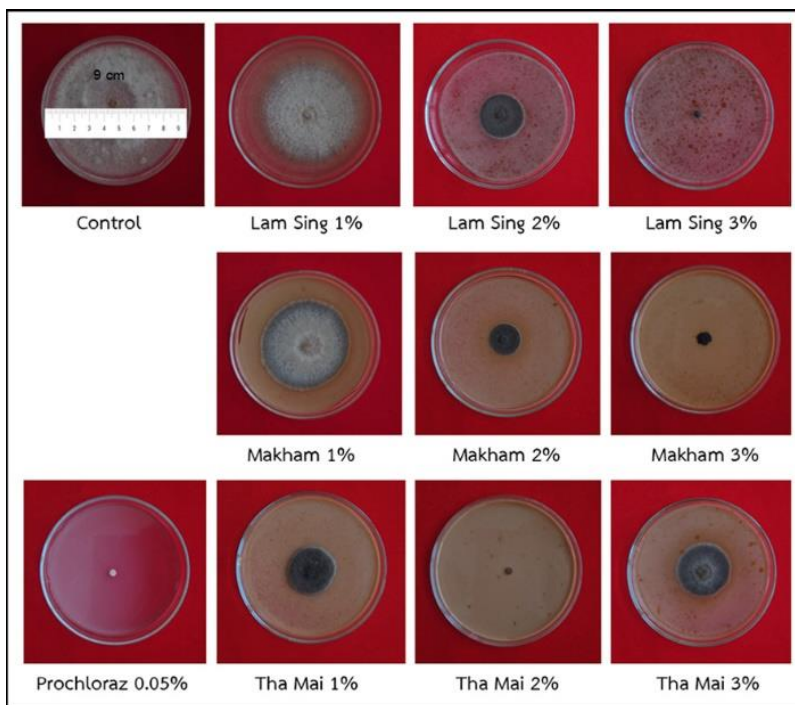


Figure 2 Colony morphology of *Colletotrichum* sp. causing mango anthracnose on potato dextrose agar amended with propolis crude extract (1-3%), after incubation for 7 days at room temperature.

4. ผลของสารสกัดพรอพอลิสที่มีต่อการงอกของสปอร์

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดยับยั้งพรอพอลิสตสดที่มีต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp. ภายหลังจากทดลองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ดัง (Table 2) พรอพอลิสจากอำเภอมะขามความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พรอพอลิสจากอำเภอลำปางความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราไพโรคลอราซความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดี

ที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รองลงมาคือพรอพอลิสจากอำเภอมะขามความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พรอพอลิสจากอำเภอลำปางความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พรอพอลิสจากอำเภอลำปางความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พรอพอลิสจากอำเภอลำปางความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พรอพอลิสจากอำเภอลำปางความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พรอพอลิสจากอำเภอลำปางความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และพรอพอลิสจากอำเภอมะขามความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 93.96, 84.66, 66.26, 62.86, 58.46, 55.12 และ 40.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Table 2 Efficacy of propolis extract on the spore germination of *Colletotrichum* sp. causing mango anthracnose.

	treatments	% spore germination inhibition ^{1/}
T1	control (water)	0.00±0.00 i
T2	Lamsing 1%	55.12±0.66 g
T3	Lamsing 2%	62.86±0.60 e
T4	Lamsing 3%	100.00±0.00 a
T5	Makham 1%	40.26±0.91 h
T6	Makham 2%	84.66±0.97 c
T7	Makham 3%	93.96±0.60 b
T8	Tha Mai 1%	58.46±1.67 f
T9	Tha Mai 2%	100.00±0.00 a
T10	Tha Mai 3%	66.26±0.60 d
T11	prochloraz 0.05%	100.00±0.00 a
	C.V. %	1.07%
	F- test	**

Note: ** Significant difference at $P<0.01$

^{1/} Mean of five replications $\pm$ SD

^{2/} Different letters in each column are significantly different ($P<0.01$) based on Duncan's multiple range test (DMRT).

อภิปรายผล

สารสกัดพรอพอลิสจากอำเภอลำปางและอำเภอลำปาง จังหวัดลำปาง ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงได้แตกต่างกัน เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะมีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อราได้สูงขึ้นในทิศทางเดียวกัน ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ

Ezazi, & Davari (2018) ที่รายงานผลการศึกษาศาสตร์สกัดพรอพอลิสที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยว 4 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus* สาเหตุโรคเน่าเหลืองของพิสตาชิโอ (pistachio yellow rot), *Botrytis cinerea*, *Aspergillus tubingensis* และ *Cladosporium cladosporioides* สาเหตุโรคผลเน่าขององุ่นในประเทศอิหร่าน โดยทำการทดลองบนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดพรอพอลิสที่ระดับความเข้มข้น 50, 100, 250, 500 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดพรอพอลิสมีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราแต่ละชนิดแตกต่างกัน และเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะมีผลยับยั้งเชื้อราได้สูงขึ้นเช่นเดียวกันรายงานของ Mohamad Aref, Mohamed Sidique, Lani, & Ahmad (2022) ที่รายงานผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสในการเคลือบผิวกล้วยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยได้สูงขึ้น

สาเหตุที่สารสกัดพรอพอลิสจากอำเภอลำปางและอำเภอลำปาง มีผลยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ต่างกัน สืบเนื่องจากความหลากหลายของชนิดพันธุ์ และชนิดพืชที่ขึ้นโรงเก็บเรซินและยาง ในแต่ละอำเภอก็มีความแตกต่างกัน ทำให้ในพรอพอลิสมีองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราแตกต่างกัน สอดคล้องกับ Hossain et al. (2022) ที่กล่าวว่าในพรอพอลิสอุดมไปด้วยองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อนมาก ซึ่งพรอพอลิสจากแต่ละแหล่งอาจแตกต่างกันไปเนื่องจากหลายปัจจัย เช่น แหล่งของพืชพรรณ ฤดูกาลเก็บเกี่ยว สภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ ชนิดของผึ้ง และชนิดโรง เช่นเดียวกัน

กับรายงานการศึกษาของ Costantin et al. (2022) ที่ประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของพรอพอลิสที่ได้จากชันโรง 3 สปีชีส์ เปรียบเทียบกับพรอพอลิสที่ได้จากผึ้ง ต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่าสารสกัดพรอพอลิสจากผึ้งจะมีความเข้มข้นของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าในสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง

สาเหตุที่สารสกัดพรอพอลิสจากอำเภอดำเนินความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อราในการทดลองน้อยกว่าความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ อาจมีสาเหตุมาจากส่วนประกอบของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากอำเภอดำเนินอาจมีน้ำตาลปนอยู่มาก จึงส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา สอดคล้องกับ Phoonan, & Noppakun (2021) ที่กล่าวว่าพรอพอลิสที่ได้จากส่วนถ้วยเก็บน้ำหวานอาจมีน้ำตาลปนอยู่ในสารสกัดพรอพอลิส ซึ่งสามารถถูกสกัดออกมาได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว และส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา จึงควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงวิธีการแยกองค์ประกอบของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา และทำการทดสอบเพิ่มเติม หรือเลือกใช้พรอพอลิสที่มาจากส่วนอื่นของรังชันโรงแทน

การที่สารสกัดพรอพอลิสมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในการทดลองได้ อาจเกิดจากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ กรดอะมิโน และเอสเทอร์ในยางจากต้นไม้ที่ชันโรงเก็บรวบรวมมาทำรัง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยมีผลทำลายโครงสร้างเส้นใยของเชื้อรา รบกวนขบวนการหายใจ และการเผาผลาญพลังงาน สอดคล้องกับรายงานของ Xu et al. (2019) ที่รายงานผลการศึกษาคู่ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสจากประเทศจีน และสหรัฐอเมริกาที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ พบว่ามีสารสำคัญหลายชนิด

เช่น pinocembrin, pinobanksin-3-O-acetate, galanin, chrysin, pinobanksin และ pinobanksin-methyl ether โดยสาร pinocembrin ในสารสกัดพรอพอลิส มีผลทำลายโครงสร้างเส้นใยเชื้อรา *Penicillium notatum* ลดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจเชื้อรา รบกวนสมดุลพลังงาน จึงมีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

สรุป

สารสกัดพรอพอลิสจากอำเภอดำเนินความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดพรอพอลิสจากอำเภอดำเนินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราไพโรคลอราซความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงได้ดีที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการทดลองนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ผู้ที่สนใจการนำพรอพอลิสไปใช้ในการควบคุมโรคพืช จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงองค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติในการต้านเชื้อราของพรอพอลิส

คำขอบคุณ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ปีงบประมาณ 2564 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ที่ได้อนุมัติทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Agrios, G. N. (1997). *Plant pathology* (4th ed.). London: Academic Press.

- Ali, A., Cheong, C. K., & Zahid, N. (2014). Composite effect of propolis and gum arabic to control postharvest anthracnose and maintain quality of papaya during storage. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(6), 1117-1122.
- Ali, A., Chow, W. L., Zahid, N., & Ong, M. K. (2014). Efficacy of propolis and cinnamon oil coating in controlling post-harvest anthracnose and quality of chilli (*Capsicum annuum* L.) during cold storage. *Food and Bioprocess Technology*, 7(9), 2742-2748.
- Bankova, V., Boudourova, K. B., Popov, S., Sforcin, M., & Funari, S. R. C. (1998). Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, 29, 361-367.
- Chaichana, S., & Nalumpang, S. (2007). Detection of fungicide carbendazim resistance in *Colletotrichum* spp. causing anthracnose disease from mango fruits. *Agricultural Science Journal*, 38(5), 205-208. (in Thai)
- Costantin, C. R., Oliveira, H. G. de, Roese, L. S. M., Pancera, M. R., Silvestre, W. P., Siqueira, G. R., Ferreira, N. R., & Sartori, V. C. (2022). Evaluation of the antifungal activity of propolis extracts from stingless bees on phytopathogenic fungi. *Research, Society and Development*, 11(16), e445111638445.
- Dhingra, O. B., & Sinclair, J. B. (1995). *Basic plant pathology methods* (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Dudoit, A., Cardinault, N., Mertz, C., Chillet, M., & Brat, P. (2021). Antifungal activities of propolis and its main components with an emphasis against phytopathogenic fungi. *Journal of Apicultural Science*, 65(1), 5-24.
- Ecem-Bayram, N., & Gercek, Y. (2019). Appropriate maceration duration for the extraction of propolis. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(1), 188-192.
- Ezazi, R., & Davari, M. (2018). Antifungal activity of ethanolic extract of propolis (EEP) against some postharvest fungi. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 7(1), 103-107.
- Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., Yeskaliyeva, B., Jain, D., Smeriglio, A., Trombetta, D., Kiani, R., Kobarfard, F., Mojmami, N., Saffarian, P., Ayatollahi, S. A., Sarkar, C., Islam, M. T., Keriman, D., Uçar, A., Martorell, M., Sureda, A., Pintus, G., Butnariu, M., Sharifi-Rad, J., & Cho, W.C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Medicine*, 17(1), 100.
- Inson, C., & Malaipan, S. (2006). *Diversity of stingless bees (Apidae: Trigona spp. and Hypotrigona spp.) and their resin and gum collecting behavior from nature in golden jubilee Thong Pha Phum project, Thong Pha Phum district, Kanchanaburi province* (research report). Bangkok: Biodiversity Research and Training Program. (in Thai)
- Jenny, F., Sultana, N., Islam, M., Khandaker, M. M., & Bhuiyan, M. A. B. (2019). A review on anthracnose of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bangladesh Journal Plant Pathology*, 35(1&2), 65-74.
- Kongtragoul, P., Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Izumi, Y., & Akimitsu, K. (2011). Mutation at codon 198 of tub2 gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose in Thailand. *Journal of Plant Protection Research*, 1(5), 378-384.

- Kumar, A. S., Reddy, N. P. E., Reddy, K. H., & Devi, M. C. (2007). Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathology Bulletin*, 16, 157-160.
- Marino, A. K., Pinsetta Junior, J. S., Magalhães, K. M., & Mattiuz, B. (2018). Chitosan-propolis combination inhibits anthracnose in 'Hass' avocados. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(8), 681-687.
- Meneses, E. A., Diego, L., Durango, D. L., Carlos, M., & García, C. M. (2009). Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. *Quimica Nova*, 32(8), 2011-2017.
- Mohamad Areff, A. A., Mohamed Sidique, S. N., Lani, M. N., & Ahmad, F. T. (2022). Effect of different concentrations of propolis extract coating on postharvest quality of banana artificially inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. *Malaysian Applied Biology*, 51(1), 149-156.
- Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Miyake, C., Izumi, Y., Akitmitsu, K., & Kongtragoul, P. (2010). Point mutations in the beta-tubulingene conferred carbendazim-resistant phenotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* causing nam dok mai mango anthracnose. *Journal of Agricultural Technology*, 6(2), 365-378.
- Nuchnuanrat, P., & Napaporn, J. (2021). Evaluation of fungicide carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease of mango cv. Aokrong in Chanthaburi province. *RMUTSB Academic Journal*, 9(2), 164-173.
- Omar, N. A., Sidique, S. N. M., & Ahmad, F. T. (2020). Antifungal properties of water extract propolis coating against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease on strawberry (*Fragaria anannassa*). *Malaysian Applied Biology*, 49(4), 253-260.
- Phoonan, W., & Noppakun, K. (2021). Antifungal activity of stingless bee, *Tetragonula pagdeni* (Schwarz), propolis extracts against tangerine green mold rot. *Khon Kaen Ariculture Journal*, 49(3), 691-700. (in Thai)
- Rodrigues, M. L. M., Mizobutsi, E. H., Lima Prates, P. J., Leite Duarte, P. V., Ferreira Ribeiro, R. C., Silva Pinheiro, J. M. da, Mizobutsi, G. P., Fernandes, M. B., & Silva, L. S. (2019). Phosphite-based products in the *in vitro* *Colletotrichum musae* control. *Journal of Experimental Agriculture International*, 33(4), 1-9.
- Waramit, W., & Charoensuk, K. (2016). Effective on Pak-wan tree (*Sauropus androgynus*) extraction to bacterial inhibition of *Salmonella pullorum* in native chicken. *RMUTSB Academic Journal*, 4(2), 120-128.
- Xu, X., Pu, R., Li, Y., Wu, Z., Li, C., Miao, X., & Yang, W. (2019). Chemical compositions of propolis from China and the United States and their antimicrobial activities against *Penicillium notatum*. *Molecules*, 24(19), 3576.