ผลของสารสกัดหยาบจากพืชและสารปฏิชีวนะบางชนิดต่อการเจริญของเส้นใยรา *Ascosphaera apis* สาเหตุของโรคชอล์คบรูดในผึ้งพันธุ์

The Effect of Some Crude Plant Extracts Antimycotics Growth of the Hyphae of *Ascosphaera apis*, the Agent Causing Chalkbrood Disease in *Apis millifera*

ทิติยา จิตติหรรษา[1] ปารวี กู้มณีรัตน์[1] วริยาพร ปานเกษม[1]
เอกพันธ์ บางยี่ขัน[1] ฐิติรัตน พรประยุทธ[1]
Titiya Chittihunsa[1] Parawee Kumanerutana[1] Variyaporn Pankaseam[1]
Eakaphun Bangyeekhun[1] Titirutt Pornprayuth[1]

ABSTRACT

Studies on the effect of the crude extracts with 95 percent ethyl alcohol from the dried ground young leaves of *Piper betle*, *Pterocarpus indicus*, *Lagerstroemia florilrinda*, *Arachis hypogaea*, *Tomarindus indica*, *Sesbania roseberghii*, *Acacia famesiana*, *Clitoria ternatea*, *Typha angustifolia*, *Acanthus ilicifolius Rhinacanthus nasutus*, *Eupatorium odoratum*, and from the root of *Angiopteris evecta* to the growth of the hyphae of *Ascosphaera apis*, the agent causing chalkbrood disease in *Apis milliferra* found that the crude extracts at the concentrations of 1, 3, 4, 5 and 7 μg/filter paper disc of 0.6 cm in diamter could significantly ($p < 0.01$) retard the growth of fungal hyphae much better than the control groups. Generally, the crude extracts at the higher concentrations could retard the growth of hyphae much better than those at the lower concentrations. The most interesting crude extract was from *P. betle* following with *A. ilicifolius*, *E. odoratum*, *R. nasutus*, *T. angustifilia*, *P. indicus*, and *A. evecta*. The effect of crude extracts from *P. betle* and *A. ilicifolius* retarded the growth of fungal hyphae approximately 10 days *E. odoratum*, *L. florilrinda*, *S. roseberghii*, *P. indicus*, *A. famesiana* and *R. nasutus* could retard the growth of hyphae for approximately 1 week. Amphotericin B, Griseofulvin and Mycophenolic acid could significantly ($p < 0.01$) retarded the growth of hyphae better than the control groups. Similarly, at the higher concentrations of the antimycotics could retard the growth of fungal hyphae better and longer than those of the lower concentrations.

key words : Crude plant extract, antimycotics, *Ascosphaera apis*, chalkbrood disease, *Apis milliferra*

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากผงแห้งป่นละเอียดจากส่วนใบอ่อนของ พลู ประดู่ ตะแบก ถั่วลิสง มะขาม โสน กระถิน อัญชัน กกธูป เหงือกปลาหมอ สาบเสือ ทองพันชั่ง และรากของว่านกีบแรดด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% ต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา

(1) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จ.นครปฐม 73000
Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakornpathom, 73000 Thailand

Ascosphaera apis สาเหตุของโรคซอล์คบรูดในผึ้งพันธุ์ พบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1, 3, 4, 5 และ 7 ไมโครกรัมต่อกระดาษกรองทรงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร มีผลชะลอการเจริญของเส้นใยมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่างจากชุดควบคุม ($p < 0.01$) โดยทั่วไป สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นสูงจะสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่ำ สารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชะลอการเจริญของเส้นใยรา คือ พลู รองลงมาคือ ทองพันชั่ง สาบเสือ เหงือกปลาหมอ กกธูป ประดู่ และกีบแรด ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากพลูและทองพันชั่งมีระยะเวลาในการชะลอการเจริญของเส้นใยราได้นาน 10 วัน รองลงมาคือ สาบเสือ และพวกที่มีผลนาน 7 วัน ได้แก่ ตะแบก โสน ประดู่ กระถิน และเหงือกปลาหมอ สำหรับผลของสารปฏิชีวนะพบว่า Amphotericin B, Griseofulvin และ Mycophenolic acid มีผลชะลอการเจริญของเส้นใยราได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุม ($p < 0.01$) สารปฏิชีวนะที่มีความเข้มเข้นสูงสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราได้ดีและนานกว่าสารที่มีความเข้มข้นต่ำ

คำหลัก : สารสกัดหยาบจากพืช, สารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา, เชื้อรา *Ascosphaera apis*, โรคซอล์คบรูด, ผึ้งพันธุ์

บทนำ

เนื่องจากปัจจุบัน สมุนไพรกำลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศ ซึ่งแม้แต่ชาวต่างประเทศก็สนใจและให้การสนุบสนุนงานวิจัยด้านนี้อย่างกว้างขวาง เช่น ให้ทุนสนับสนุนหรือร่วมมือทำวิจัยกับประเทศไทย ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น จึงได้เปรียบในความหลากหลายในเรื่องของพืชพรรณต่างๆ มาก สมุนไพรหลายชนิดได้รับการศึกษาและสามารถพัฒนานำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายวิธี หลายชนิดสามารถผลิตออกจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ การศึกษาเพื่อใช้พืชสมุนไพรยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตตลอดจนทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์บางชนิด เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในสถาบันหลายแห่ง ดังนั้นคนไทยควรให้ความสนใจรีบเร่งทำการศึกษาเพื่อพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติเหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด และเพื่อเป็นการสงวนหรือป้องกันการลักลอบนำทรัพยากรธรรมชาติดังกล่าวออกจากประเทศ โดยความรู้เท่าไม่ถึงการณ์ของคุณค่าของพืชสมุนไพรในประเทศของเราด้วย

การเลี้ยงผึ้งเป็นอาชีพหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นอกจากจะให้ผลผลิตทางตรงที่เป็นที่ต้องการต่อผู้บริโภคนานับประการ เช่น น้ำผึ้ง (honey) นมผึ้ง (royal jelly) เกสร (bee pollen) ไขผึ้ง (wax) การเลี้ยงผึ้งยังให้ผลทางอ้อม เช่น ช่วยผสมเกสรทำให้พืชสามารถให้ผลผลิตมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะพืชที่ต้องการผสมพันธุ์แบบข้ามต้น (cross pollination)

ในธรรมชาติโรคของผึ้งมีมากมายหลายชนิด โรคที่สำคัญที่พบว่ามีการระบาดทั่วไปในผึ้งพันธุ์ คือโรคซอล์คบรูด (chalkbrood) ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Ascosphaera apis* (Nelson and Gochnauer 1981) ในประเทศไทยมีข้อสังเกตว่าแนวโน้มของการพบโรคนี้เพิ่มมากขึ้นทุกปี และสามารถพบได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย จึงได้รับความสนใจในการทำการศึกษาวิจัยเพื่อการควบคุม สำหรับในประเทศไทย โรคนี้ค้นพบครั้งแรกที่จังหวัดเชียงใหม่ในปี 2530 จนกระทั่งในปี 2533 มีอัตราการค้นพบโรคนี้สูงขึ้นถึง 50% จากรังผึ้งที่ทำการสำรวจในภาคเหนือ (Rath 1992) การศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้ในประเทศไทยนับว่ายังมีน้อยมาก การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงประสิทธิภาพตลอดจนระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพืชบางชนิด ได้แก่ พลู (*Piper betle*) ประดู่ (*Pterocarpus indicus*) ตะแบก (*Lagerstroemia floribuinda*) ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) มะขาม (*Tamarindus indica*) โสน (*Sesbania roseberghii*) กระถินเทศ (*Acacia famesiana*) อัญชัน (*Clitoria termatea*) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) เหงือกปลาหมอ (*Acanthus ilicifolius*) ว่านกีบแรด (*Angiopteris evecta*) สาบเสือ

(*Eupatorium odoratum*) กกธูป (*Typha angustifolia*) จากการตรวจเอกสารไม่พบข้อมูลเกี่ยวกับการใช้สารสกัดหยาบจากพืชควบคุมโรคราชนิดนี้โดยเฉพาะในประเทศไทย หลักการที่ใช้คัดเลือกพืชใช้หลายอย่าง เช่น เลือกพืชที่มีรายงานว่า สามารถชะลอการเจริญของเชื้อราบางชนิด เช่น พลู และทองพันชั่ง (Achararit et al. 1983 ; Evans et al. 1984) สาบเสือ (Ahmad and Nabi 1967) เหงือกปลาหมอ (Bhakuni et al. 1992) กระถิน และถั่วลิสงในวงศ์ Leguminacae (Griffin 1994) ว่านกีบแรด (Dhawan et al. 1977) มะขาม ตะแบกและประดู่ซึ่งมีดอกเป็นแหล่งอาหารของผึ้ง (อุบลวรรณ 2538) พืชดังกล่าว นอกจากหลายชนิดจะเป็นพืชสมุนไพร ปลูกหรือหาได้ง่าย เช่น อัญชัน (Srivasave et al. 1977) บางชนิดก็เป็นวัชพืช เช่น สาบเสือ และกกธูป จึงเป็นการนำพืชดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในอีกแนวทางหนึ่ง สำหรับการเลือกปฏิชีวนะสาร จะเลือกจากสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันและมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ เช่น Amphotericin B มีผลไปรวมกับสเทรอล (sterol) ที่ผนังเซลล์และยังมีผลทำให้สภาพซึมสาร (permeability) ของเซลล์เมมเบรนเปลี่ยนแปลง ทำให้เซลล์สูญเสียสภาพสมดุล สารชนิดนี้มีค่าความเป็นพิษต่อหนูโดยการฉีดเข้าร่องใต้ท้อง LC_{50} = 280 มก./กก. พวก Griseofulvin มีผลชะลอการเจริญของเส้นใยราบางชนิด ทำให้เส้นใยหดตัว บางครั้งจึงเรียกสารนี้ว่า curling factor สารชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อหนูด้วยการฉีดเข้าร่องท้อง LC_{50} = 250 มก./กก. และ Mycophenolic acid มีผลยับยั้งการทำงานของ enzyme inosine monophosphate dehydrogenase ใน guanosine monophosphatic pathway และมีความเป็นพิษต่อหนูโดยการกิน LC_{50} = 40 มก./กก. หรือโดยฉีดเข้าเส้นเลือด LC_{50} = 10 มก./กก. (Grahame-Smith and Aronson 1984, Glassby, 1976)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาลักษณะรูปร่างของเส้นใยและสปอร์ของ *A. apis*

ศึกษาลักษณะรูปร่างของเส้นใยและสปอร์ของ *A.apis* ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างภายใน 12 วันโดยเก็บตัวอ่อนผึ้งพันธุ์ *Apis millifera* ที่ตายและมีลักษณะคล้ายถูกห่อหุ้มด้วยเส้นใยของเชื้อราที่มีลักษณะคล้ายฝุ่นซอล์ค (mumified larvae) บางครั้งอาจพบสปอร์ซึ่งมีสีเทาถึงน้ำตาลหรือดำ (Fig. 1) จากแหล่งเลี้ยงผึ้ง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (โดยความอนุเคราะห์จาก ดร.ชุติกานต์ กิจประเสริฐ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร) นำตัวอ่อนผึ้งดังกล่าวแช่ทิ้งไว้ในน้ำปลอดเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 30 นาทีในตู้ปลอดเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยปลอดเชื้อค่อยๆ แยกเส้นใยและสปอร์ออกจากตัวผึ้ง ใช้ห่วงลวด (loop) ขีด (streak) เส้นใยและสปอร์บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Saborouad Dextrose Agar (SDA) ที่มี pH 7 ปิดฝาครอบจานเลี้ยงเชื้อและพันด้วยแผ่น parafilm บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่าจนได้ ascocarp เดี่ยวๆ แยก ascocarp เดี่ยวๆ มาเพาะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี SDA ประมาณ 15 มล. ต่อจาน เฝ้าสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ ascocarp ทุกวันและบันทึกภาพเมื่อพบลักษณะพิเศษที่น่าสนใจด้วยการนำเส้นใยและสปอร์ที่งอกบางส่วนมาเขี่ยให้กระจายบนสไลด์แล้วย้อมด้วย lactophenol cotton blue ในระหว่างเวลาที่เฝ้าศึกษาการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเชื้อรา ได้ทำการศึกษาลักษณะของโคโลนี เส้นใยและสปอร์ เปรียบเทียบกับลักษณะต่างๆ ดังกล่าวกับเชื้อรา *A. apis* จนแน่ใจว่าเป็น *A. apis* (Bailey and Ball 1991)

2. การสกัดสารจากพืช

สกัดสารจากพืชจากผงแห้งป่นละเอียดของส่วนใบอ่อน (เนื่องจากเป็นส่วนที่หาได้ง่ายตลอดปี) ของพลู ประดู่ ตะแบก ถั่วลิสง มะขาม โสน อัญชัน กกธูป ทองพันชั่ง เหงือกปลาหมอ สาบเสือ กระถิน และจากส่วนรากของกีบแรด ชนิดละ 200 กรัม แช่ทิ้งไว้ใน 95% เอทธิลแอลกอฮอล์ 800 มล. ผสมให้เข้ากันแช่ทิ้งไว้ 8-10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ฝาครอบภาชนะบรรจุผงของสารสกัดหยาบในสารละลายแอลกอฮอล์

เพื่อป้องกันแอลกอฮอล์ระเหย กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) ไปทำการระเหยแห้งใน waterbath ที่อุณหภูมิ 60°ซ ชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้จนกว่าจะได้น้ำหนักแห้งที่คงที่ เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดมิดชิดที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้งาน

3. การหาสารทำละลายและความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชที่ใช้ในการทดลอง

ทดลองละลายสารที่สกัดได้จากพืชโดยใช้สารสกัดหยาบ 1 มก. ละลายในสารทำละลาย 5 มล. โดยอาศัยหลักเบื้องต้นของการคัดเลือกคุณสมบัติของสารทำละลาย คือ เป็นสารที่สามารถละลายสารสกัดหยาบจากพืชได้มากที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำสุด และต้องไม่เป็นสารที่จะมีผลชะลอการเจริญของเส้นใยหรือยับยั้งการสร้างสปอร์หรือมีผลเสียอย่างใดอย่างหนึ่งต่อเชื้อรา เช่น การทำให้เชื้อรามีการเปลี่ยนรูปร่างลักษณะไปจากปกติ ฯลฯ ทำการทดลองหยดสารทำละลายปลอดเชื้อที่ต้องการทดสอบ (ด้วยการกรองผ่าน 0.45 Millipore paper) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ทรงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 ซม. รอให้ paper disc แห้งจึงใช้ปากคีบคีบ paper disc เคลือบสารทำละลายนั้นวางลงบนจานอาหาร SDA ที่มีเส้นใยเพาะไว้ตรงกลางจานอาหารนาน 3 วันแล้ว วาง paper disc ให้ห่างจากปลายสุดของเส้นใย (นับจากจุดศูนย์กลางของจานอาหาร ใน Fig. 2) 0.4 ซม. โดยใช้ปากคีบกดแผ่น paper disc ให้จมเสมอกับพื้นผิวอาหาร เพื่อให้สารที่เคลือบบน disc สามารถแพร่กระจายไปในอาหารที่อยู่ข้างเคียงได้ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในสารแต่ละชนิดและในแต่ละความเข้มข้นของสารทำละลาย เลือกสารทำละลายที่มีความเข้มข้นสูงสุดและไม่มี clear zone เกิดขึ้นโดยเทียบกับชุดควบคุม (paper disc ที่ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารทำละลาย

หมายเหตุ ก่อนทำการเพาะเลี้ยง *A. apis* ได้ทำการทดลองเบื้องต้น (preliminary test) โดยเลี้ยงเชื้อราบนสารอาหาร PDA และ SDA ที่ pH 4-9 เพื่อหาสารอาหารและ pH ที่เหมาะสมที่สุด

ผลจากการทดลองเบื้องต้นที่ใช้สารทำละลายพวกเบนซิน อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม เอธานอล และน้ำ พบว่า 95% เอธานอลเป็นสารทำละลายได้ดีพอสมควรสำหรับสารสกัดหยาบจากพืชที่เลือกไว้ดังกล่าวข้างต้น หลังจากทำการทดสอบเบื้องต้น ได้เลือกสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1, 3, 4, 5 และ 7 ไมโครกรัมต่อ paper disc (หยดสาร 10 ไมโครลิตรต่อ paper disc)

4. การเตรียมสารปฏิชีวนะ

หลังจากทำการทดสอบเบื้องต้นแล้ว จึงเตรียม Amphotericin B (ละลายในน้ำ) ความเข้มข้น $5x10^{-4}$, $74x10^{-4}$, $111x10^{-4}$, $167x10^{-4}$ และ $250x10^{-4}$ ไมโครกรัมต่อ paper disc เตรียม Griseofulvin (ละลายใน dimethylformamide, DMF) ความเข้มข้น $10x10^{-2}$, $20x10^{-2}$, $30x10^{-2}$, $40x10^{-2}$ และ$50x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อ paper disc และเตรียม Mycophenolic acid (ละลายใน 100% methanol) ความเข้มข้น $5x10^{-2}$, $7.5x10^{-2}$, $10x10^{-2}$, $12.5x10^{-2}$ และ $25x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อ paper disc ตามลำดับ

5. การเตรียม inoculum ของเชื้อราและการเลี้ยงเชื้อราบนจานอาหารทดสอบ

ย้ายเชื้อราจากหลอดที่เป็น stock ของ *A. apis* ลงบนจานอาหาร SDA ที่มีอาหารประมาณ 15 มล. ต่อจาน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ตัดขอบโคโลนีของราแล้วย้ายชิ้นวุ้นเชื้อไปปลูกลงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร SDA pH7 บ่มให้ราสร้างโคโลนี 3 วัน ใช้ปากคีบคีบ paper disc ที่เคลือบสารที่จะทดสอบ วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการตามที่กล่าวในข้อ 3 และใช้สารทำละลาย 95% เอทธิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ paper disc เป็นชุดควบคุม (Fig. 2) นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อบันทึกข้อมูลที่ต้องการ ทำการทดลอง 14 ซ้ำ สำหรับสารแต่ละชนิดและที่แต่ละความเข้มข้น

6. การตรวจและบันทึกผลการทดลอง

6.1 วัดค่า clear zone (ซม.) หรือการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยวัดจากปลายเส้นใยจนถึงจุดศูนย์กลางของ paper discs ภายใต้กล้อง stereoscope กำลังขยาย

15 เท่าทุกๆ วัน จนกระทั่งเส้นใยแตะขอบ paper disc ของชุดควบคุม นำค่าเฉลี่ยของ clear zone (จากการทดลอง 14 ซ้ำ) ไปทดสอบหาความแตกต่างทางสถิติ ทำการบันทึก clear zone ที่เกิดจากสารทดลองแต่ละสารและที่แต่ละความเข้มข้นต่อไปจนปลายเส้นใยแตะขอบ paper discs ที่เคลือบสารทดสอบนั้น

6.2 วัดค่าระยะเวลาของสารที่ยังออกฤทธิ์บน paper discs โดยเริ่มวัดจากระยะที่เส้นใยเจริญขึ้นไปครอบคลุมพื้นผิวของ paper discs โดยเทียบเป็นหน่วยเปอร์เซ็นต์ของพื้นผิวของ paper discs ทั้งหมด บันทึกผลทุกวันจนเส้นใยเจริญครอบคลุมเต็มพื้นผิว (100 %) ของ paper discs

7. การทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบความเข้มข้นต่างๆ จากสารในกลุ่มเดียวกัน และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารสกัดหยาบต่างชนิดกันที่ความเข้มข้นเดียวกันที่มีผลชะลอการเจริญของเส้นใย ตลอดจนระยะเวลาที่สารยังออกฤทธิ์อยู่บน paper discs โดยใช้โปรแกรม SPSS WINDOWS (ANOVA ANALYSIS) และใช้ LSD เป็นตัวเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในกรณีที่ค่าจาก F test แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Norusis 1993)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาลักษณะรูปร่างของเส้นใยและสปอร์ของ *A. apis*

ผลจากการศึกษาพบเส้นใยที่งอกออกมาจาก ascocarp มีลักษณะฟู สีขาวและมี septum เมื่อย้อมด้วย lactophenol cotton blue ผนังเส้นใยจะมีลักษณะค่อนข้างใส (Fig. 3) เส้นใยอาจสร้าง ascocarps รูปทรงกลมที่อาจมีขนาดต่างๆ กัน (Fig. 4) เมื่อมีอายุได้ 9 วัน ในระยะแรก ascocarps มักมีสีเทาและค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มจนดำ ภายในแต่ละ ascocarp จะมีการสร้าง spore balls และภายใน spore ball จะมี ascospores จำนวนมาก (Fig. 5) ซึ่งเป็นลักษณะที่สอดคล้องกับการพบของ Bailey and Ball (1991)

2. เปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบต่อการเจริญของเส้นใยบนอาหาร

จาก Table 1 พบว่า โดยทั่วไปสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีผลชะลอการเจริญของเชื้อราได้มากกว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่ำ สารสกัดหยาบจากพืชทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้ ตั้งแต่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/paper disc เป็นต้นไปมีผลชะลอการเจริญของเชื้อราแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) สารสกัดหยาบจากพลูให้ผลดีที่สุด สารสกัดหยาบจากพืชที่มีประสิทธิภาพรองลงมา คือ ทองพันชั่งสาบเสือ เหงือกปลาหมอ กกธูป ประดู่ และตะแบกตามลำดับ แม้ว่าพลูจะมีประสิทธิภาพสูงสุด แต่เนื่องจากสารสกัดหยาบมักประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่มีกลิ่นค่อนข้างแรง จึงอาจมีผลขับไล่ผึ้งเมื่อนำไปใช้งาน นอกจากจะต้องทำการแยกส่วนประกอบต่างๆ ด้วยตัวทำละลายต่างๆ และแยกด้วย chromatography แล้วพบว่าสารออกฤทธิ์ไม่มีผลในการไล่ผึ้ง สารสกัดหยาบจากพืชที่สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราอาจเกิดจากการที่สารสกัดหยาบประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงสามารถที่จะแพร่ออกจาก paper discs สู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ข้างๆ ได้ดี แต่หากใช้การทดสอบโดยวิธีการอื่นๆ หรือใช้ความเข้มข้นของ agar ที่แตกต่างไปจากการทดลองนี้ ผลที่ได้ก็อาจแตกต่างไปจากนี้ พืชที่พบว่ามีประสิทธิภาพดีจากการทดลองนี้มักเป็นพืชที่พบหรือปลูกได้ง่าย พืชบางชนิดยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ได้ด้วย พืชดังกล่าวควรที่จะนำไปแยกส่วนสกัดและศึกษาหาสารออกฤทธิ์ที่แท้จริง เพื่อการพิจารณานำไปใช้งานอย่างเหมาะสมต่อไป กลุ่มของพืชที่มีผลชะลอการเจริญของเชื้อราได้น้อย ก็ไม่ได้หมายความว่าจะเป็นพืชที่ไม่น่าสนใจ เพราะสารออกฤทธิ์อาจสกัดได้ดีด้วยสารทำละลายชนิดอื่นที่เหมาะสมกว่า จึงยังควรที่จะลองทำการศึกษาในสภาวะที่แตกต่างจากการทดลองนี้ เช่น การเปลี่ยนตัวทำละลาย ฯลฯ

สำหรับการศึกษานำสารสกัดจากพืชมาใช้ควบคุมเชื้อราชนิดต่างๆ ได้มีการศึกษากันมานาน โดยเฉพาะการศึกษากับเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในคน

Table 1. Comparisons the different concentration means (clear zone in centimeters) from the same crude plant extracts and the different crude plant extracts at the same concentration on the inhibition of the growth of hyphae of *A. apis* three days after laying the impregnated paper discs with tested substances and control on to the petri dishes.

Concentration of crude plant extracts (µg/paper disc)	Types of crude plant extracts												
	P. betle	*P. indicus*	*L. floribunda*	*A. hypogaea*	*T. indica*	*S. roseberghii*	*A. famesiana*	*C. ternatea*	*T. angustifolia*	*A. ilicifolius*	*E. odoratum*	*A. evecta*	*R. nsutus*
Control	I[1] a[2] 0.31±0.01	I a 0.31±0.01	I a 0.32±0.01	I a 0.33±0.01	I a 0.31±0.01	I a 0.31±0.01	I a 0.32±0.01	I a 0.31±0.01	I a 0.33±0.02	I a 0.33±0.02	I a 0.32±0.02	I a 0.34±0.02	I a 0.34±0.02
1	II c 0.41±0.01	II c 0.41±0.01	II bc 0.40±0.01	II a 0.34±0.01	II a 0.33±0.01	II ab 0.36±0.01	II a 0.35±0.01	II a 0.34±0.01	II a 0.35±0.01	II b 0.38±0.02	II bc 0.40±0.03	I a 0.35±0.02	II c 0.41±0.02
3	III c 0.54±0.03	III c 0.43±0.01	III b 0.40±0.01	II a 0.35±0.01	II a 0.35±0.02	II ab 0.37±0.01	II,III ab 0.37±0.01	II a 0.36±0.01	II b 0.40±0.02	II,III b 0.41±0.02	II,III bc 0.42±0.03	I,II a 0.36±0.02	III c 0.44±0.02
4	IV d 0.66±0.03	IV c 0.45±0.01	II b 0.40±0.02	II a 0.35±0.01	III a 0.35±0.02	II ab 0.37±0.01	II,III ab 0.37±0.03	III a 0.36±0.02	II b 0.41±0.01	III c 0.44±0.02	III c 0.45±0.03	II a 0.38±0.02	IV d 0.47±0.02
5	IV c 0.75±0.03	IV c 0.45±0.01	III b 0.42±0.01	II a 0.35±0.02	IV a 0.36±0.02	II ab 0.38±0.03	III ab 0.38±0.01	III a 0.36±0.02	III bc 0.44±0.02	IV c 0.46±0.03	IV c 0.49±0.03	II,III b 0.41±0.01	IV d 0.49±0.02
7	V f 0.87±0.01	IV b 0.45±0.01	III b 0.43±0.01	II a 0.35±0.01	IV a 0.36±0.01	II ab 0.38±0.02	III ab 0.38±0.02	III a 0.36±0.01	III bc 0.46±0.02	V c 0.49±0.02	V d 0.51±0.02	III b 0.44±0.01	V e 0.54±0.02

Note :

1) Means in columns followed by different Roman figures, at the upper left haded-side of the cell, were significantly different ($p < 0.01$) by the different concentrations from the same of crude plant extract (ANOVA ANALYSIS and LSD was used for means comparisons)
2) Means in rows followed by different letter, at the upper right handed-side of the cell, were significantly different ($p < 0.01$) by the different crude plant extracts at the same concentration (ANOVA ANLYSIS and LSD was used for means comparisons)
3) Means of the clear zone within 3-day experiment were used during to some hyphae in the control petri dishes reached to some paper discs.
4) Means were the average of 14 replications.

สารสกัดจากพืชต่างชนิดกันมักมีผลต่อเชื้อราแตกต่างชนิดกันด้วย โดยเฉพาะเชื้อราที่อยู่ในตระกูลหรือวงศ์ต่างกัน Griffin (1994), Kller (1992) ได้กล่าวถึงผลของการศึกษาโดยใช้สารสกัดจากพืชเพื่อควบคุมเชื้อราบางชนิดไว้บ้างพอสมควร แต่การศึกษาใช้สารสกัดจากพืชเพื่อควบคุมเชื้อ *A. apis* ไม่สามารถตรวจพบจากการค้นเอกสารจากทั้งในและนอกประเทศเลย ส่วนใหญ่จะเป็นการใช้สารกำจัดเชื้อรา (fungicide) เช่น thia-bendazole (Parker 1985), N-N dimethyl dodecana-mine (Herbert et al. 1987) การใช้ Captan (Youssef and Momanus 1985) การใช้ Botran และ DPX 965-75% (Youssef and Brindley 1989) หรือใช้สารพ่นฟุ้ง (fumigant) เช่น para-formaldehyde หรือ methylbromide (Mayer et al. 1991)

3. เปรียบเทียบผลของฤทธิ์ตกค้างจากสารสกัดหยาบต่อการเจริญของเส้นใยบน paper disc

เนื่องจากสารทดสอบเป็นสารสกัดหยาบซึ่งอาจประกอบด้วยสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และเล็กปะปนกันหลายชนิด สารออกฤทธิ์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่อาจจะไม่สามารถแพร่ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ข้างๆ จึงยังคงตกค้างอยู่บน paper discs นอกจากนั้นการทราบระยะเวลาของการออกฤทธิ์ของสารบน paper discs มีผลช่วยในการพิจารณาเลือกสารสกัดหยาบไปใช้งานด้วย สารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ได้ในระยะเวลานานจะสามารถควบคุมเส้นใยราได้นานและเหมาะแก่การนำไปใช้งานมากกว่าสารที่มีฤทธิ์ตกค้างสั้น การทำ thin layer chromatography อย่างง่ายจะสามารถคาดประมาณจำนวนชนิดของสารที่ประกอบกันในสารสกัดหยาบได้อย่างคร่าวๆ และการสกัดเอาสารโดยวิธี column chromatography ไปทดลองดูความสามารถในการแพร่กระจายสู่อาหารเลี้ยงเชื้อรอบข้างก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะทำให้ได้ข้อมูลที่น่าสนใจเพิ่มขึ้น

จาก Table 2 พบว่า โดยทั่วไปสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นสูงจะมีสารตกค้างหรือมีผลในการชะลอการเจริญของเส้นใยราบน paper discs ได้มากกว่าสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า ยกเว้นสารสกัดหยาบจากถั่วลิสงและมะขามที่ไม่แสดงผลว่ามีสารหรือฤทธิ์ตกค้างบน paper discs ในทุกๆ ความเข้มข้นที่ใช้หลังจากชุบเคลือบสารบน discs แล้ว 3 วัน สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ตกค้างได้นานที่สุด ที่ความเข้มข้น 7 ไมโคร-กรัมต่อ paper disc คือ พลู และทองพันชั่ง (8 วัน) รองลงมาคือ สาบเสือ (7 วัน) ตะแบก (6 วัน) สำหรับสารสกัดหยาบตัวอื่นๆ มีผลหรือฤทธิ์ตกค้างได้นานประมาณ 3-4 วัน ดังนั้นเมื่อรวมระยะเวลาตั้งแต่เคลือบสารลงบน paper discs จนถึงเวลาที่เส้นใยขึ้นคลุมพื้นที่ผิวของ discs ทั้งหมดของพืชทดสอบทุกชนิดจะไม่เกิน 2 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ใกล้เคียงกับการใช้สารเคมีบางชนิด ที่ยังนิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เช่น การใช้ trichlorinated isocyanuric acid ที่ความเข้มข้น 17-18 ppm ซึ่งจะสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้นาน 7 วัน (Tawara 1986) หรือการใช้ thiabendazole (ประมาณ 0.93 ก./มล.) ในรูปของสารแขวนลอยในน้ำจะต้องใช้ถึง 3 ครั้งต่อสัปดาห์ (Parker 1985) การแยกสารสกัดออกฤทธิ์ที่มีความบริสุทธิ์ อาจจะสามารถช่วยขจัดสารปนเปื้อนอื่นๆ ที่มีผลยับยั้งการทำงานของสารออกฤทธิ์ (สารพวก antagonists) การเติมสารบางชนิด หรือผลิตในรูปแบบที่สามารถยืดระยะเวลาของการออกฤทธิ์ของสารเช่น การผลิตในรูปแคบซูลเพื่อปล่อยสารออกมาครั้งละน้อยๆ (slow release) จะช่วยยืดระยะเวลาการออกฤทธิ์ของสารได้นานขึ้น แต่กระบวนการดังกล่าวจะทำให้เพิ่มค่าใช้จ่ายและเพิ่มความซับซ้อนในการใช้งานมากขึ้นด้วย

4. ผลของสารปฏิชีวนะ

จาก Table 3, 4 และ 5 แสดงว่า สารปฏิชีวนะทั้ง 3 ชนิดมีผลชะลอการเจริญของเส้นใยต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะมีผลชะลอการเจริญของเส้น 7 ใยและมีฤทธิ์ตกค้างบน paper discs ได้นานกว่าสารที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ของสารปฏิชีวนะทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบและที่ทุกๆ ความเข้มข้นด้วย จึงสอดคล้องกับงานวิจัย

Table 2. Comparisons the residual effect by the different concentration means (percentage of the surface area of paper discs covered by the hyphae) from the same crude plant extracts and the different curde plant extracts at the same concentration on the inhibition of the growth of hyphae of *A. apis* .

Concentration of crude plant (μg/paper disc)	Types of crude plant extracts												
	P. betle	*P. indicus*	*L. floribunda*	*A. hypogaea*	*T. indica*	*S. roseberghii*	*A. famesiana*	*C. ternatea*	*T. angustifolia*	*A. ilicifolius*	*E. odoratum*	*A. evecta*	*R. nsutus*
Control	IV a 99.00±0.00 (3.77±0.53)^{y}	II a 96.00±0.02 (3.69±0.28)^{y}	III a 96.50±0.66 (3.31±0.21)^{y}	I a 95.01±0.01 (4.03±0.11)^{y}	I a 95.17±0.04 (3.02±0.27)^{y}	III a 96.01±0.05 (3.02±0.42)^{y}	III b 100.00±0.00 (3.16±0.35)^{y}	II b 100.00±0.00 (3.50±0.57)^{y}	IV a 94.26±0.12 (4.02±0.71)^{y}	IV a 95.16±0.11 (3.01±0.69)^{y}	IV b 99.40±0.2 (3.18±0.57)^{y}	III a 97.11±0.5 (3.33±0.48)^{y}	V a 95.54±0.7 (3.81±0.46)^{y}
1	IV a 51.17±1.81 (6.51±0.63)^{y}	I c 81.08±5.39 (4.18±0.52)^{z}	II c 80.10±1.33 (4.24±0.42)^{y}	I d 100.00±0.00 (3.61±0.56)^{y}	I d 100.00±0.00 (3.45±0.46)^{y}	II a 57.28±4.00 (4.73±0.48)^{y}	II a 59.2±1.58 (4.61±0.51)^{y}	II d 100.00±0.00 (3.12±0.44)^{y}	III b 70.41±4.66 (3.19±0.69)^{y}	III ab 66.43±3.80 (3.33±0.68)^{y}	III ab 65.60±2.87 (3.34±0.79)^{y}	II b 71.43±2.61 (3.52±0.92)^{y}	IV a 65.57±1.54 (4.57±0.84)^{y}
3	III a 31.78±3.38 (6.39±0.72)^{y}	I e 79.57±2.52 (4.52±0.59)^{y}	I a 30.35±2.00 (5.13±0.64)^{z}	I f 100.00±0.00 (3.37±0.71)^{y}	I d 100.00±0.00 (3.28±0.37)^{y}	II c 54.04±1.89 (4.69±0.51)^{y}	II c 57.53±1.73 (4.48±0.62)^{y}	II f 100.00±0.00 (3.62±0.54)^{z}	II c 58.10±2.80 (2.88±0.70)^{y}	II b 49.43±4.8 (3.45±0.63)^{z}	II b 47.57±2.84 (4.61±0.86)^{y}	II d 67.92±3.07 (3.52±0.96)^{y}	III b 46.30±3.53 (5.24±0.99)^{z}
4	II a 29.3±3.33 (6.43±0.65)^{y}	I e 78.32±1.92 (4.02±0.86)^{y}	I a 34.89±1.49 (5.36±0.91)^{z}	I f 100.00±0.00 (2.81±0.84)^{y}	I f 100.00±0.00 (3.11±0.81)^{y}	I a 34.46±2.28 (6.44±0.59)^{y}	I a 38.00±2.53 (5.67±0.79)^{z}	I c 56.10±3.77 (3.96±0.71)^{z}	I,II c 52.24±2.85 (3.12±0.98)^{y}	II b 48.76±5.82 (3.73±0.86)^{z}	II b 47.72±2.01 (4.86±1.08)^{y}	II d 65.84±3.17 (3.27±1.03)^{z}	II a 38.41±3.84 (6.31±1.04)^{y}
5	I a 5.65±0.79 (7.18±0.92)^{y}	I e 79.42±1.84 (4.83±1.09)^{z}	I b 32.18±2.17 (5.34±0.91)^{y}	I f 100.00±0.00 (3.26±0.81)^{y}	I f 100.00±0.00 (3.05±0.93)^{y}	I b 32.67±2.07 (5.95±0.93)^{y}	I b 36.14±2.07 (4.87±1.24)^{y}	I cd 53.95±4.23 (4.35±1.03)^{z}	I c 47.52±3.17 (3.12±1.25)^{y}	II c 48.33±3.83 (4.45±1.63)^{z}	II c 43.52±3.2 (6.30±1.03)^{z}	I d 60.64±4.63 (3.28±1.11)^{y}	I,II b 35.29±2.10 (7.07±1.06)^{y}
7	I a 4.11±1.06 (8.12±1.67)^{y}	I e 77.79±3.97 (4.66±1.70)^{z}	I b 31.72±1.78 (5.96±1.01)^{y}	I e 100.00±0.00 (3.10±0.92)^{y}	I e 100.00±0.00 (3.16±0.98)^{y}	I b 31.39±1.61 (6.25±1.31)^{z}	I b 36.17±2.13 (5.04±1.45)^{z}	I c 55.50±1.88 (4.53±1.17)^{z}	I b 45.09±3.51 (4.46±1.55)^{z}	I ab 39.75±4.41 (6.97±2.02)^{y}	I a 35.95±2.15 (6.98±3.02)^{y}	I c 57.71±3.25 (3.21±1.54)^{y}	I a 32.61±2.55 (8.06±1.45)^{y}

Note :

1. Means in columns followed by different Roman figues, at the upper left handed-side of the cell, were significantly different (P<0.01) by the different concentrations from the same of crude plant extract (ANOVA ANALYSIS and LSD was used for means comparisons)
2. Means in rows followed by different letter, at the upper right handed-side of the cell, were significantly different (P<0.01) by the different crude plant extracts at the same concentration (ANOVA ANLYSIS and LSD was used for means comparisons)
3. Means of the percentage of surface area of paper discs by hyphae within 3-day experiment were used during to some hyphae in the control petri dishes reached to some paper discs.
4. Each mean value based on the average of 14 replicaitons.
5. Means in parentheses followed by different Thai letters were sigificantly (P<0.01) by the time duration (days) the hyphae fully covered the surface area of the paper discs.

Table 3. Comparison the effect of Amphotericin B by the different concentration means (clear zone in centimeters), the residual effect means (percentage of surface area of paper discs covered by hyphae) and the time duration means (days) the hyphae fully covered the suface area of paper discs.

Result	Control group	Concentration of Amphotericin B (μg x 10^{-4}/paper disc)				
		5	74	111	167	250
Clear zone (cm) within 3 days	0.34±0.02[a]	0.36±0.02[b]	0.38±0.02[c]	0.41±0.01[d]	0.45±0.02[e]	0.47±0.03[f]
Percentage of surface area of papar dises covered by hyphae within 2 days	85.12±5.23[d]	75.56±4.20[c]	70.35±3.56[c]	67.50±4.23[b]	62.17±5.16[a]	59.35±5.42[a]
Time duration (days) the hyphae fully covered of surface area of paper discs	3.5±0.49[a]	4.23±2.41[ab]	5.06±2.48[b]	6.17±2.39[b]	7.25±2.53[b]	8.11±3.01[b]

Note :
1. Means followed by different letters in each row were signigicantly different ($p < 0.01$) (ANOVA ANALYSIS and LSD was used for means comparisons).
2. Means of the clear zone within 3-day experiment were used during to some hyphae in the control petri dishes reached to some paper discs.
3. Means of the percentage of suface area of paper discs within 3-day experiment were used during to some hyphae in the control petri dishes fully covered some paper discs.
4. Data were the mean ± SE of 14 replications.

Table 4. Comparison the effect of Griesofluvin by the different concentration means (clear zone in centimeters), the residual effect means (percentage of surface area of paper discs covered by hyphae) and the time duration means (days) the hyphae fully covered the suface area of paper discs.

Result	Control group	Concentration of Griesofluvin (μg x 10^{-4}/paper disc)				
		10	20	30	40	50
Clear zone (cm) within 3 days	0.34±0.02[a]	0.37±0.02[b]	0.41±0.02[c]	0.43±0.02[d]	0.46±0.02[e]	0.50±0.02[f]
Percentage of surface area of papar dises covered by hyphae within 2 days	79.22±4.58[e]	74.47±6.54[d]	70.99±5.48[c]	65.47±5.23[b]	61.09±7.56[b]	55.11±3.57[a]
Time duration (days) the hyphae fully covered of surface area of paper discs	3.10±0.27[a]	3.26±1.04[a]	2.88±1.69[a]	3.11±1.53[a]	4.28±1.86[ab]	5.10±2.94[b]

ของ Nelson (1981) ที่รายงานว่า Amphotericin B และ Griseofulvin ที่ความเข้มข้นสูง สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราชนิดนี้ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่า เป็นต้น สารปฏิชีวนะ antimycotic ทั้ง 3 ชนิดเป็นสารที่หาซื้อได้ง่ายแต่ราคาค่อนข้างสูง แต่ก็มีรายงานการใช้สารเหล่านี้ในการควบคุมโรคซอล์ค-บรูดในบางบริณที่โรคนี้ระบาดอย่างรุนแรง แต่การใช้สารเหล่านี้ก็ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังมาก เนื่องจากกลไกการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของสารเหล่านี้ อาจมีผลต่อตัวผึ้งและต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมายอื่นๆ ด้วย เช่น Amphotericin B มีผลรวมกับ sterol ที่ผนังเซลล์ของเส้นใย จึงอาจมีผลรบกวนการสร้างหรือใช้ sterol ของผึ้งที่อาจเกี่ยวข้องกับการใช้ในการสร้างสารฮอร์โมนส์หรือเฟอโรโมนส์ เป็นต้น

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

1. ผลการทดลองนี้เป็นเพียงข้อมูลพื้นฐานที่

Table 5. Comparison the effect of Mycophenolic acid by the different concentration means (clear zone in centimeters), the residual effect means (percentage of surface area of paper discs covered by hyphae) and the time duration means (days) the hyphae fully covered the suface area of paper discs.

Result	Control group	Concentration of Griesofluvin (μg x 10^{-4}/paper disc)				
		5	7.5	10	12.5	25
Clear zone (cm) within 3 days	0.34±0.02[a]	0.36±0.02[b]	0.38±0.02[c]	0.43±0.02[d]	0.40±0.02[e]	0.49±0.02[f]
Percentage of surface area of papar dises covered by hyphae within 2 days	83.94±6.47[e]	79.89±4.58[d]	74.66±5.57[c]	70.65±4.89[b]	67.87±5.47[a]	65.14±6.54[a]
Time duration (days) the hyphae fully covered of surface area of paper discs	3.51±0.41[a]	3.19±1.03[a]	4.28±1.45[a]	5.47±1.53[ab]	5.81±1.16[ab]	6.69±1.25[b]

Note from Table 3-5:
1. Means followed by different letters in the same row were signigicantly different at $p < 0.01$ by LSD.
2. Means of the clear zone within 3-day experiment were used during to some hyphae in the control petri dishes reached to some paper discs.
3. Means of the percentage of suface area of paper discs within 3-day experiment were used during to some hyphae in the control petri dishes fully covered some paper discs.
4. Data were the mean ± SE of 14 replications.

ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมอีกมากมายในหลายๆ ด้าน สารสกัดหยาบจากพืช (โดยการสกัดด้วย 95 % ethanol) ที่ให้ผลน่าสนใจได้แก่ พลู ทองพันชั่ง สาบเสือ และตะแบก อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติประการหนึ่งของสารสกัดหยาบจากพืชที่มักพบทั่วไป คือ การให้ผลไม่แน่นอน (not repeatable results) เนื่องจากความแตกต่างของส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาใช้ทดสอบ สภาพแวดล้อมที่ปลูกพืช อายุของพืช ฤดูกาล ปฏิกิริยาตอบโต้ของพืชแต่ละต้นหรือแต่ละส่วนของพืชต่อสิ่งเร้าจากภายนอกหรือภายในต้น ในการใช้สารใดๆ ยังต้องคำนึงถึงผลที่จะมีต่อตัวผึ้งทั้งในด้านต่อพฤติกรรมเช่น การหนีรัง การเลี้ยงดูตัวอ่อนหรือการร่วมประสานการทำงานกับผึ้งตัวอื่นๆ ภายในรัง ฯลฯ นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงผลตกค้างในผลิตภัณฑ์ของผึ้งเช่น ในน้ำผึ้ง นมผึ้ง ฯลฯ ที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ตลอดจนผลเสียหายต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมายอื่นๆ อีกด้วย การศึกษาผลของสารต่อปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวแล้วจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

2. เนื่องจากสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โรคนี้เกิดการแพร่ระบาด คือ การที่ผึ้งงานไปได้รับเชื้อรามาจากพืชที่เป็นแหล่งอาหาร ดังนั้น หากสามารถคัดเลือกปลูกพืชที่เป็นแหล่งอาหารของผึ้งและมีสารสามารถยับยั้งหรือชะลอการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ได้ จะสามารถช่วยลดการแพร่ระบาดของเชื้อราชนิดนี้ได้เป็นอย่างมาก และการจัดสภาพแวดล้อมบริเวณเลี้ยงผึ้งให้เหมาะสม เช่น มีแหล่งน้ำที่สะอาดและสมบูรณ์ การหมั่นแยกรังผึ้งเมื่อผึ้งมีประชากรหนาแน่น การหมั่นตรวจดูและและรักษาความสะอาดของรังผึ้ง ฯลฯ ปัจจัยดังกล่าวจะช่วยให้ผึ้งมีสุขภาพดีและติดโรคซอล์คบรูดได้น้อยลง

3. ในการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชด้วยวิธีการนี้ ยังมีปัจจัยหลายประการที่ต้องแก้ไข เช่น ปัญหาจากการละลายของสารที่ไม่สมบูรณ์ ปัญหาการแพร่กระจายของสารโมเลกุลขนาดใหญ่ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ฯลฯ การดัดแปลงปรับปรุงวิธีการทดลองจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป นอกจากนั้น ในด้านของการใช้งาน การใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจะเป็นวิธีการที่สะดวกที่สุด การศึกษาโดยใช้น้ำเป็นสารทำละลายก็เป็นข้อมูลที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปอีกเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

อุบลวรรณ บุญฉ่ำ. 2538. ความแตกต่างของชีพพิสัยของผึ้ง 4 ชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกันในป่าดิบแล้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาบัณฑิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร. pp. 47-48, 111-113.

Achararit, C.,W.Panyayong and E. Ruchatakomut.1983. Inhibitory action of some Thai herbians. Undergraduate special project report. Mahidol University, Bangkok, Thailand. 13 pp.

Ahmad, M. and N.M. Nabi. 1967. Chemical investigations on the leaves of *Eupatorium odoratum*. Sci. Res. 4: 154-157.

Bailey, L. and B.V. Ball. 1991. Honey Bee Ptahogen 2nd ed. Academic Press Limited. San Diego CA. 193 pp.

Bhakuni, D.S., N.B. Dhawan, S.H. Garg, K.A. Goel, N.B. Mehrotra and C.R. Srimal. 1992. Bioactivity of marine organism (part 6-screeing of some marine flora from Indian coasts) Indian J. Exp. Biol. 30(6): 152-157.

Dhawan, B.N., K.G. Patnaik, P.R. Singh and S.T. Tandon. 1977. Screening of Indian plants for biological activity. Indian J. Exp. Biol. 15: 208-219.

Evans, P.H., S.W. Browers and S.E. Fonk. 1984. Identification of fungicidal and nematocidal components in the leaves of *Piper betle* (Piperaceae). J. Agri. Food Chem. 32(6) : 1254-1256.

Glassby, J.S. 1976. Encyclopedea of Antibiotics. John Wiley & Sons, Ltd. Press. London. pp. 31, 185-186, 246. Griffin, D.H. 1994. Fungicides *In* "Fungal Physiology" (H.D. Griffin, Ed). Wiley-Liss. New York. pp.399-425.

Grahame-Smith, G.D. and J.K. Aronson. 1984. Oxford Textbook of Clinical Pharmacology and Drug Therapy. English Language Book Society/Oxford University Press. pp. 74, 635, 284, 684.

Herbert. E.W., Jr., J.D. Chitwood and H. Shimanuki. 1987. Chalkbrood Research at Beltville. Amer. Bee J. 127(8): 488-491.

Koller, W. 1992. Target research in the discovery and development of antifungal inhibitors. *In* "Target Sites of Fungicide Action" (W. Koller, Ed). CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 255-310.

Mayer, D.R., Lunden J.D., Goerzen D.W. and B. Simko. 1991. Fumigating alfalfa leafcutting bee [*Megachile rotundata* (Fabr.)] nesting materials for control of chalkbrood disease. Bee Sci. 1(3): 162-165.

Nelson, L.D. and T. A. Gochnauer. 1981. Field and laboratory studies on the chalkbrood disease of honey bees. Amer. Bee J. 122(1): 29-33.

Norusis, J.M. 1993. SPSS for Windows. Base System User"s Guide Release 6.0. SPSS Inc. Chicago, Illinoids. 828 pp.

Parker, D.F. 1985. The effective fungicide treatment for controlling chalkbrood disease (Ascomycetes : Ascosphaeraceae) of the alfalfa leafcutting bee (Hymenoptea : Megachilidae) in the field. J. of Econ. Ent. 78(1): 35-40.

16Rath, W. 1992. Chalkbrood (*Ascophaera* sp.). A major problem for beekeeping with *A. mellifera* in Thailand and a potential threat for the enemic bees. "Proceedins in International Conference on The Asian 34 Honey Bees and Bee Mites. Bee Biology Research Unit, Department of Biology. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 9-14 Febuary, 1992.

Srivasave B.K. and S.C. Pand. 1977. Anthocyanins from the leaves *Clitoria ternata*. 32: 138.

Tawara, T. 1986. Neutralization of chlalkbrood disease in honeybees. Proceedings of The xxxth. International Congress of Apiculture. Nagoya. Japan. pp. 274-278. Youssef, N.N. and W.R. Momanus. 1985. Captan a promising fungicide for management of chalkbrood diseases in the alfalfa leafcutting bee. J. of Econ. Entomol. 78(2):428-431.

Youssef, N.N. and W.A. Brindley. 1989. Effectiveness of Botran and OPX 965 as growth inhibitors of *Ascosphaera aggregata* (Ascosphaeraceae) in the alfalfa leafcutting bee (Hymenoptera: Megachilidae). J. of Econ. Entomol. 82(5) : 1335-1338