การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีตรวจหาสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง

Feasibility of Using Near-Infrared Spectroscopy to Detect Spores of Anthracnose-Pathogenic Fungi in 'Namdokmai Sithong' Mango Fruit

แคทรียา สนธิยา[1] อรอุมา เรืองวงษ์[2] ปาริชาติ เทียนจุมพล[3,4] พลกฤษณ์ มณีวระ[3,4] และพิมพ์ใจ สีหะนาม[1,3,4]*

Katthareeya Sonthiya[1] Onuma Ruangwong[2] Parichat Theanjumpol[3,4] Phonkrit Maniwara[3,4] and Pimjai Seehanam[1,3,4]*

[1]ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

[1]Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Mueang, Chiang Mai 50200

[2]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

[2]Department of Entomology and Plant pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Mueang, Chiang Mai 50200

[3]ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว กองส่งเสริมและประสานเพื่อประโยชน์ทางวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สำนักงานปลัดกระทรวงกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

[3]Postharvest Technology Innovation Center, Science, Research and Innovation Promotion and Utilization Division, Office of the Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation, Ratchathewi, Bangkok 10400

[4]ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

[4]Postharvest Technology Research Center, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Mueang, Chiang Mai 50200

* Corresponding author: pimjai193@gmail.com

(Received: 29 October 2024; Revised: 3 December 2024; Accepted: 24 December 2024)

Abstract

This research aimed to detect spores of anthracnose-pathogenic fungi in 'Namdokmai Sithong' mango fruit using near-infrared spectroscopy (NIRS). A spore suspension of the fungus *Colletotrichum* spp. (10^5 spores/mL) was tested for fungal infestation on the mango fruits. Twenty microliters of spore suspension were inoculated on the mango fruit peel. The sample was incubated in a moist chamber (100% relative humidity) at 28ºC. The results indicated that after 72 and 96 hours, the 'Namdokmai Sithong' mango fruit showed symptoms of anthracnose disease. The NIR spectra of *Colletotrichum* spp. spore suspensions were measured directly onto a fiberglass paper at a concentration of 10^5 spores per milliliter. The NIR6500 spectrometer was used to measure NIR spectra data in reflectance mode over a wavelength of 400 and 2500 nm. The spectral data were analyzed using Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS) regression. The results indicated that NIRS could be used to detect spores of anthracnose-pathogenic fungi in 'Namdokmai Sithong' mango fruit. Moreover, the wavelengths at 1340 - 1344, 1725, 2300 - 2380, and 2400 - 2460 nm were identified as key spectral ranges for detecting spore suspensions. Therefore, using NIRS, it could be possible to detect spores of anthracnose pathogenic fungi in 'Namdokmai Sithong' mango fruit.

Keywords: Non-destructive detection, mango, spore suspension

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองโดยใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โดยเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อราบนผิวของผลมะม่วง ทำการปลูกสปอร์แขวนลอย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บนผิวของผลมะม่วง จากนั้นบรรจุผลมะม่วงในกล่องที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 72 และ 96 ชั่วโมง ผลมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองแสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส นอกจากนี้วัดสเปกตรัม NIR ของสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยหยดสปอร์แขวนลอย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรองชนิดใยแก้ว จากนั้นวัดสเปกตรัม NIR แบบการสะท้อนกลับด้วยเครื่อง NIRS6500 ที่ช่วงความยาวคลื่น 400 - 2500 นาโนเมตร แล้ววิเคราะห์สเปกตรัมด้วยวิธี Principal Component Analysis และ Partial Least Squares regression พบว่า NIRS สามารถตรวจหาสปอร์แขวนลอยของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสได้ อีกทั้งยังพบว่าความยาวคลื่นที่ 1340 - 1344 1725 2300 - 2380 และ 2400 - 2460 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นที่สำคัญในการตรวจหาสปอร์แขวนลอย ดังนั้น การใช้ NIRS จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ตรวจหาสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง

คำสำคัญ: การตรวจสอบโดยไม่ทำลาย มะม่วง สปอร์แขวนลอย

คำนำ

โรคแอนแทรกโนสเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของมะม่วง โดยเฉพาะการปลูกในสภาพอากาศร้อนชื้นในประเทศไทย โรคแอนแทรกโนสสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดฤดูการผลิต (polycyclic disease) เนื่องจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุก่อโรค สามารถสร้างส่วนขยายพันธุ์ขึ้นมาใหม่ จึงส่งผลให้สามารถเข้าทำลายผลิตผลได้ตลอดทั้งปี และเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโต การควบคุมโรคทำได้ยาก นอกเหนือจากการเข้าทำลายผลมะม่วงยังสามารถพบอาการของโรคแอนแทรกโนสได้บริเวณใบ กิ่ง ก้านใบ ลำต้น และดอก โดยส่งผลให้แสดงอาการใบไหม้ (leaf blight) ช่อดอกดำ (blossom blight) ช่อดอกไหม้ (panicle blight) ผลแห้งตาย (mummification) และกิ่งแห้งตาย (die back) ซึ่งเป็นแหล่งสะสมและพักตัว (quiescent infection) ของเชื้อราเพื่อรอเข้าทำลายผลมะม่วงที่กำลังพัฒนา ระยะผลอ่อนจะแสดงอาการจุดแผลขนาดเล็กสีน้ำตาลเข้ม แผลสามารถขยายตัวมาติดกันทำให้เกิดเป็นแผลกว้าง และแผลสามารถเข้าทำลายเนื้อผลทำให้เนื้อผลมีลักษณะช้ำ เละ และยุบตัวลง (Jenny *et al.*, 2019; Nelson, 2008) หรือเชื้อพัฒนาขึ้นมาใหม่เมื่อมะม่วงใกล้สุกหรือภายหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้มะม่วงเกิดการเน่าเสีย (blemished fruit) โรคแอนแทรกโนสจึงถูกจัดเป็นโรคในระยะหลังการเก็บเกี่ยว (postharvest disease) (Chantrasri *et al.*, 2008)

เชื้อราสกุล *Colletotrichum* เป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคแอนแทรกโนส ซึ่งมีพืชอาศัยหลายชนิด ทั้งนี้การสืบพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มี 2 แบบ คือ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage) และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage) กรณีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เชื้อราจะสร้าง Perithecia และเจริญต่อไปเป็น Ascospore ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เชื้อราจะสร้าง Acervuli และเจริญต่อไปเป็น Conidia โดยทั่วไปเชื้อราที่เข้าทำลายผลมะม่วงจะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ในฤดูฝนเป็นช่วงที่มะม่วงถูกเข้าทำลายง่ายที่สุด เนื่องจากต้นมะม่วงมีความสมบูรณ์ในทุกส่วน และ Acervuli สามารถแพร่กระจายได้ง่าย (Bagshaw, 1989) โดยปกติแล้ว

Conidia มีรูปร่างคล้ายไข่หรือรูปขอบขนานโค้งเล็กน้อย เมื่อ Conidia สัมผัสกับผิวของผลมะม่วงจะยึดติดกับผิวของผลมะม่วงและเกิดเป็นรอยแผลเป็นขนาดเล็ก จากนั้น Conidia สร้าง germ tube และ subcuticular hypha สร้าง Appressorium เพื่อช่วยยึด Conidia กับผิวของผลมะม่วงบริเวณชั้น cuticle แล้วแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) (Jeffries *et al*., 1990)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy; NIRS) เป็นเทคโนโลยีที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการประเมินคุณภาพโดยไม่ทำลายผลิตผล โดยอาศัยหลักการสั่น (vibration) ของพันธะภายในโมเลกุลของอินทรีย์สารในผลิตผล ร่วมกับคลื่นแสงเนียร์อินฟราเรด (Near InfraRed; NIR) ช่วงความยาวคลื่น 800 - 2500 นาโนเมตร เมื่อเกิดการสั่นของพันธะตรงกับความถี่ของคลื่นแสง NIR จะเกิดการดูดกลืนแสง (absorption) ซึ่งการดูดกลืนแสงสามารถนำไปประมวลผลในการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพต่อไป (Osborne *et al*., 1993; Thanapase *et al*., 2012) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ NIRS ในการตรวจสอบคุณภาพมะม่วง ได้แก่ Rungpichayapichet *et al*. (2016) รายงานว่า NIRS สามารถทำนายคุณภาพทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมีของมะม่วงได้ เช่น ความแน่นเนื้อ (firmness) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ และดัชนีความสุก (ripening index; RPI) ซึ่งพบว่า ค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.82 0.90 0.74 และ 0.80 ตามลำดับ และค่า SEP เท่ากับ 4.22 นิวตัน 1.20 และ 0.38 เปอร์เซ็นต์ และ 0.80 ตามลำดับ นอกจากนี้ Theanjumpol *et al*. (2013) ได้ใช้ NIRS ในการตรวจสอบส่วนประกอบทางเคมีที่มีผลต่อคุณภาพของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองและพันธุ์ Keitt ซึ่งได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส กรดซิตริก กรดมาลิก แป้ง และเซลลูโลส และพบว่าค่า R^2 SEC SEP และ Bias ของมะม่วงทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน โดยที่ R^2 มีค่าเท่ากับ 0.99 ค่า SEC และ SEP ต่ำกว่า 0.50 และค่า Bias มีค่าใกล้เคียง 0 ทั้งนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ NIRS ในการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อราในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองอีกด้วย ซึ่ง Wongsheree *et al*. (2010) และ Chaiareekitwat (2012) ศึกษาการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนผลมะม่วงด้วยวิธีการที่ทำให้เกิดบาดแผล แล้วตรวจสอบอาการของโรคด้วย NIRS โดยการวัดแบบ Reflectance mode ที่ช่วงความยาวคลื่น 900 - 2500 นาโนเมตร และ Interactance mode ที่ช่วงความยาวคลื่น 780 - 1100 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่า สามารถตรวจสอบอาการของโรคแอนแทรกโนสในผลมะม่วงได้ที่ระดับความแม่นยำ 89.0 และ 90.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Seehanam *et al*. (2024) รายงานการใช้ NIRS ด้วยการวัดแบบ Interactance mode ที่ช่วงความยาวคลื่น 800 - 2500 นาโนเมตร ตรวจสอบอาการของโรคแอนแทรกโนสในผลมะม่วง โดยการปลูกเชื้อราด้วยวิธีการไม่ทำให้เกิดบาดแผล พบว่า การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) และ Artificial Neural Network (ANN) สามารถตรวจสอบอาการของโรคแอนแทรกโนสได้ที่ระดับความแม่นยำ 89.0 และ 98.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การใช้ NIRS โดยการวัดแบบ Reflectance และ Interactance mode สามารถตรวจสอบอาการของโรคแอนแทรกโนสในผลมะม่วงได้ กรณีตัวอย่างสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสนั้น ผิวของตัวอย่างอาจทำให้เกิดการแพร่กระจายของแสง จึงจำเป็นต้องวัดสเปกตรัมด้วย Reflectance mode เนื่องจากตัวรับสัญญาณ (detector) สามารถวัดการสะท้อนกลับของแสงที่ออกมาจากผิวของตัวอย่างได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี NIRS ด้วยการวัดแบบ Reflectance mode ในการตรวจหาสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนส

นำผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสบรรจุลงในกล่องพลาสติกปิดสนิทเพื่อรักษาความชื้นแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ย 34.7±0.8 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 68.5±0.7 เปอร์เซ็นต์) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุก่อโรคแอนแทรกโนส จนกระทั่งเชื้อราสร้าง spore mass (Figure 1A และ 1B) โดย spore mass มีลักษณะเป็นกระจุกก้อนสีส้มถึงสีส้มอมชมพู ดังภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscopes) (Figure 1C) และ Conidia ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีลักษณะเป็นเซลล์เดียว ใสและไม่มีสี ผนังบาง รูปไข่หรือทรงรี ตรงหรืออาจจะโค้งงอ ดังภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา (compound microscope) (Figure 1D) จากนั้นทำการปลูกเชื้อราลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) (No. GM096-500G Granulated, Himedia™, India) และบ่มเชื้อไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (MIR-553, Sanyo, Japan) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 65.4±0.3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการให้แสงฟลูออเรสเซนต์ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นใยและกระตุ้นการสร้าง Conidia เมื่อเชื้อราก่อโรคเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วใช้เข็มเขี่ยเส้นใยเพื่อให้ Conidia หลุดออกจากเส้นใยจากนั้นกรองเส้นใยออกจากสปอร์แขวนลอยด้วยผ้าขาวบาง เพื่อให้ได้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

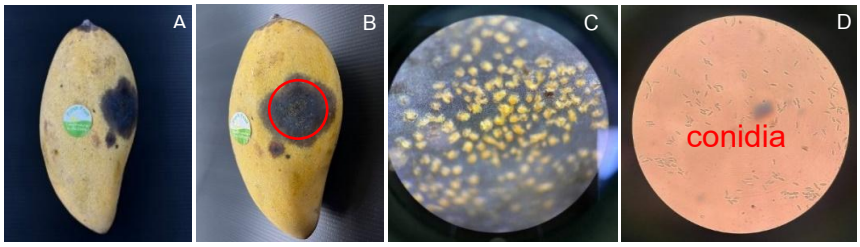

Figure 1 Anthracnose disease on A) 'Namdokmai Sithong' mango fruit B) spore mass C) spore mass unit of *Colletotrichum* spp. under a stereo microscope and D) conidia of *Colletotrichum* spp. under a compound microscope

การทดลองที่ 1 การทดสอบการเข้าทำลายของสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

เก็บเกี่ยวผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองในระยะผลแก่ทางการค้า จากสวนของเกษตรกรในอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 30 ผล มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผึ่งให้ผลแห้งที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ย 36.2±0.3 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 63.7±2.5 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหยดสารละลายสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนผิวผลมะม่วงโดยไม่ทำให้เกิดบาดแผล ซึ่งหยดสารละลายสปอร์แขวนลอยจำนวน 3 จุด ได้แก่ บริเวณใกล้ขั้วผล กลางผล และส่วนปลายผล โดยปลูกสปอร์แขวนลอยทั้ง 2 ด้านของผลมะม่วง จากนั้นบรรจุผลมะม่วงในกล่องพลาสติกที่มีความชื้น 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (MIR-553, Japan) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 64.1±0.6

เปอร์เซ็นต์ เพื่อกระตุ้นการเข้าทำลายของเชื้อรา และติดตามการเข้าทำลายของเชื้อราทุก 24 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2 การตรวจหาสปอร์แขวนลอยของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสโดยใช้ NIRS

หยดสปอร์แขวนลอยของ *Colletotrichum* spp. ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรองชนิดใยแก้ว (glass microfiber filter papers) (Whatman™ Grade GF/C, 1.2 μm, 37 mm diameter circles, China) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25.0± 0.4 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 66.9± 1.1 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้น้ำส่วนเกินระเหยออกไป จากนั้นวัดสเปกตรัมด้วยการวัดแบบ reflectance mode ด้วยเครื่อง NIRSystem 6500 (Foss NIRSystems, USA) โดยบันทึกสเปกตรัมระยะห่างทุก ๆ 2 ความยาวคลื่นต่อเนื่องกัน ในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 400 - 2500 นาโนเมตร ทั้งนี้บันทึกสเปกตรัมจำนวน 32 สแกนต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วเฉลี่ยเป็นหนึ่งเส้นสเปกตรัม จากนั้นนำสเปกตรัมดั้งเดิม (original spectra) ที่ได้มาแปลงข้อมูล (data pre-processing) โดยวิธีทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธี 1) Standard Normal Variate (SNV) 2) Multiplicative Scatter Correction (MSC) 3) first derivative 4) second derivative 5) mean centering 6) standard deviation scale และ 7) mean centering ร่วมกับ standard deviation scale ซึ่งการปรับแต่งสเปกตรัมเป็นการปรับแต่งเพื่อให้สเปกตรัมเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ข้อมูลอย่างมีประสิทธิภาพ แล้วทำการวิเคราะห์สเปกตรัมด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA) และวิธี Partial Least Squares (PLS) regression โดยโปรแกรม The Unscrambler version 9.7 software (CAMO Software AS, Norway) การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี PCA เป็นการวิเคราะห์สเปกตรัมโดยอาศัยความเหมือนและแตกต่างของข้อมูล สำหรับการวิเคราะห์สเปกตรัมด้วยวิธี PLS regression เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยนำตัวแปรหลายตัวที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA มาสร้าง variation เป็นวิธีการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้อัตโนมัติและรวดเร็ว

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การทดสอบการเข้าทำลายของสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ผิวของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง

หลังจากปลูกสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนผิวผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองโดยไม่ทำให้เกิดบาดแผล พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง ผิวของผลมะม่วงยังไม่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส (Figure 2A และ 2B) เนื่องจากในช่วง 24 - 48 ชั่วโมงแรก การเข้าทำลายของเชื้อรากลุ่ม *Colletotrichum* จะทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของไซโทพลาซึม ทั้งนี้เส้นใยของเชื้อราสามารถเจริญเติบโตภายในผนังเซลล์ได้ จากนั้นเส้นใยจะเจริญไปยังส่วนต่าง ๆ อย่างรวดเร็ว (Jeffries *et al*., 1990) เมื่อสังเกตจากภายนอกจะยังไม่สามารถสังเกตเห็นอาการของโรคแอนแทรกโนสที่ผิวของผลมะม่วง อย่างไรก็ตาม หลังจากการปลูกสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ผิวของผลมะม่วงแสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส (Figure 2C และ 2D) โดยผิวของผลมะม่วงแสดงอาการเป็นจุดสีดำบริเวณของ Lenticel เนื่องจากระหว่างการก่อตัวของ Appressorium จะเกิดการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น เมลานิน (Kaverinathan *et al*., 2017; Kubo *et al*., 1985) จึงสามารถสังเกตเห็นอาการของโรคแอนแทรกโนสได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับ Jeffries *et al*. (1990) ที่รายงานว่า หลังจากการปลูกเชื้อรากลุ่ม *Colletotrichum* ลงบนผิวมะม่วงเป็นระยะเวลา 3 - 4 วัน สามารถสังเกตเห็นอาการของโรคแอนแทรกโนสได้ และเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ผิวของผลมะม่วงจะเกิดการยุบตัวลง

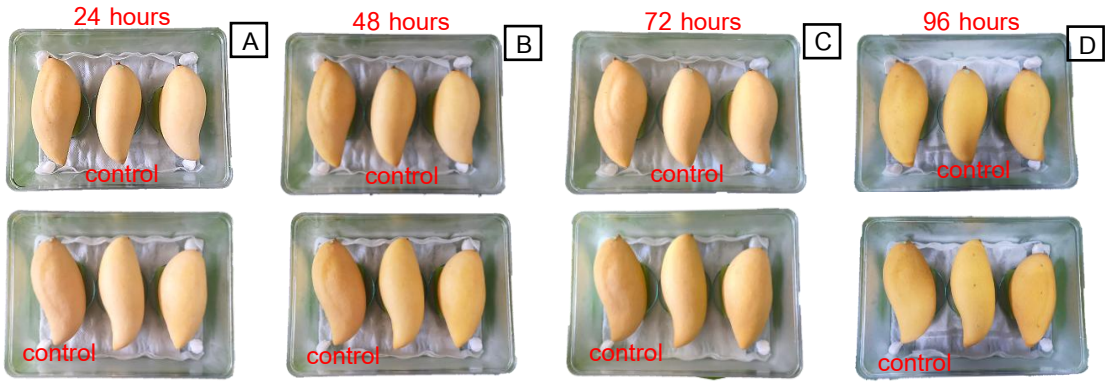

Figure 2 'Namdokmai Sithong' mango fruit inoculated with *Colletotrichum* spp. after A) 24 hours B) 48 hours C) 72 hours and D) 96 hours

การทดลองที่ 2 การตรวจหาสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ก่อโรคแอนแทรกโนสโดยใช้ NIRS

2.1 ลักษณะสเปกตรัม NIR

จากการตรวจหาสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ก่อโรคแอนแทรกโนสโดยใช้ NIRS ในช่วงความยาวคลื่น ระหว่าง 400 - 2500 นาโนเมตร จะได้สเปกตรัมดั้งเดิม (original spectra) จากนั้นแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยวิธี SNV MSC first derivative second derivative mean centering standard deviation scale และ mean centering ร่วมกับ standard deviation scale ผลการทดลองพบว่า สเปกตรัมดั้งเดิม และสเปกตรัมที่ผ่านการแปลงข้อมูล ด้วยวิธี SNV MSC และ mean centering มีพีก (peak) ชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1450 และ 1940 นาโนเมตร (Figure 3A 3B 3C และ 3F ตามลำดับ) อีกทั้งสเปกตรัม ที่แปลงข้อมูลด้วยวิธี first derivative พบพีกชัดเจน ที่ความยาวคลื่น 1380 และ 1880 นาโนเมตร (Figure 3D) ทั้งนี้ที่ความยาวคลื่น 1380 1450 1880 และ 1940 นาโนเมตร คือ ค่าการดูดกลืนพลังงานของคลื่นแสงที่ สัมพันธ์กับพันธะ O-H ในโมเลกุลของน้ำ (Osborne *et al*., 1993; Toth *et al*., 1976; Williams and Norris, 2001) สอดคล้องกับสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งประกอบด้วย น้ำกลั่น และ Conidia ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

นอกจากนี้ สเปกตรัมดั้งเดิมและสเปกตรัมที่ ผ่านการแปลงข้อมูลด้วยวิธี SNV และ MSC พบพีกที่ ชัดเจนของ Tween 80 ที่ความยาวคลื่น 1215 1450 1765 1940 2050 และ 2310 นาโนเมตร (Figure 3A 3B และ 3C ตามลำดับ) อีกทั้งสเปกตรัมที่ผ่านการ แปลงข้อมูลด้วยวิธี first derivative พบพีกที่ชัดเจนของ Tween 80 ที่ความยาวคลื่น 1700 และ 2276 นาโนเมตร (Figure 3D) และสเปกตรัมที่ผ่านการแปลงข้อมูลด้วย วิธี Mean centering Standard deviation scale และ mean centering ร่วมกับ standard deviation scale พบพีกที่ชัดเจนของ Tween 80 ที่ความยาวคลื่น 1215 1765 และ 2310 นาโนเมตร (Figure 3F 3G และ 3H ตามลำดับ) โดยความยาวคลื่นที่ 1215 1700 1765 และ 2310 นาโนเมตร คือ Overtone ของพันธะ C-H ความยาวคลื่นที่ 1450 และ 1940 นาโนเมตร คือ Overtone ของพันธะ O-H ความยาวคลื่นที่ 2050 นาโน เมตร คือ การยืดของพันธะ N-H สำหรับความยาวคลื่น ที่ 2276 นาโนเมตร คือ การยืดของพันธะ O-H และ พันธะ C-C (Osborne *et al*., 1993) สัมพันธ์กับสูตร

ทางเคมีของ Tween 80 คือ $C_{64}H_{124}O_{26}$ ซึ่ง Tween 80 มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และเป็นตัวเชื่อมประสาน (emulsifier) ทำให้น้ำกับน้ำมันละลายเข้ากันได้อีกทั้งยังมีคุณสมบัติเป็นสารช่วยให้คงตัว (stabilizer) และเป็นสารช่วยละลาย (solubilizer) (Yu *et al*., 2018)

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis; PCA)

ผลการวิเคราะห์ PCA ของสเปกตรัมดั้งเดิม สเปกตรัมที่ผ่านการแปลงข้อมูลด้วยวิธี SNV MSC first derivative second derivative mean centering standard deviation scale และ mean centering ร่วมกับ standard deviation scale พบว่า PC1 และ PC2 สามารถแสดงความแปรปรวนของข้อมูลสเปกตรัมได้เท่ากับ 83 และ 17 เปอร์เซ็นต์ 90 และ 9 เปอร์เซ็นต์ 93 และ 7 เปอร์เซ็นต์ 73 และ 26 เปอร์เซ็นต์ 61 และ 10 เปอร์เซ็นต์ 83 และ 17 เปอร์เซ็นต์ 78 และ 21 เปอร์เซ็นต์ 78 และ 21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 4A - 4H ตามลำดับ) ทั้งนี้จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสเปกตรัมของ Tween 80 มีความแตกต่างจากสเปกตรัมของน้ำและสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม สเปกตรัมของน้ำและสเปกตรัมของสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีค่าใกล้เคียงกัน จึงเกิดการซ้อนทับกัน (overlap) ของข้อมูล เนื่องจากสปอร์แขวนลอยมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้น จึงต้องนำวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิค Partial Least Squares (PLS) regression เพื่อหาสัมประสิทธิ์การถดถอยที่บ่งบอกถึงลักษณะสำคัญของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

2.3 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficients)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมด้วย Partial Least Squares (PLS) regression พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของสเปกตรัมดั้งเดิม และสเปกตรัมที่แปลงข้อมูลด้วยวิธี SNV MSC และ mean centering พบความยาวคลื่นที่สำคัญ ได้แก่ 1450 1940 และ 2400 - 2460 นาโนเมตร (Figure 5) โดยที่ความยาวคลื่น 1450 และ 1940 นาโนเมตร สัมพันธ์กับพันธะของน้ำ (Osborne *et al*., 1993) ซึ่งน้ำเป็นองค์ประกอบหลักของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และที่ความยาวคลื่น 2400 - 2460 นาโนเมตร คือ การสั่นแบบ combination ของพันธะ C-H (Ribeiro *et al*., 2011) เกี่ยวข้องกับโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์ของเชื้อรา โดยเชื้อรากลุ่ม *Colletotrichum* spp. จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ซึ่งเชื้อราในไฟลัมนี้จะมี Polysaccharide เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์มากถึง 80 - 90 เปอร์เซ็นต์ (Gautam, 2014) สำหรับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของสเปกตรัมที่ผ่านการแปลงข้อมูลด้วยวิธี first derivative พบความยาวคลื่นที่สำคัญ ได้แก่ 1340 - 1344 1725 1880 และ 2300 - 2380 นาโนเมตร (Figure 5D) เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของสเปกตรัมที่แปลงข้อมูลด้วยวิธี second derivative พบความยาวคลื่นที่สำคัญ ได้แก่ 1340 - 1344 1725 1880 2140 และ 2276 นาโนเมตร (Figure 5E) ซึ่งที่ความยาวคลื่น 1340 - 1344 1725 และ 2300 - 2380 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนที่ระดับ first overtone และการสั่นสะเทือนแบบ combination ของพันธะ C-H (Osborne *et al*., 1993; Ribeiro *et al*., 2011) เกี่ยวข้องกับโครงสร้างผนังเซลล์ของ Conidia (Rinaudo,

2006) ความยาวคลื่นที่ 1880 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H โดยเกิดการสั่นสะเทือนแบบ combination และ first overtone (Fernández-Espinosa, 2016) ซึ่งเกี่ยวข้องกับโมเลกุลของน้ำ สอดคล้องกับสปอร์แขวนลอยที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบมากที่สุด สำหรับความยาวคลื่นที่ 2140 นาโนเมตร คือ การยืดของพันธะ C-H และ C=C (Osborne *et al*., 1993) กรณีของความยาวคลื่น 2276 นาโนเมตร เกี่ยวข้องกับการยืดและสั่นสะเทือนของพันธะ O-H และ C-C (Osborne *et al*., 1993) ซึ่งที่ความยาวคลื่น 2140 และ 2276 นาโนเมตร เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบหลักของ Tween 80 ได้แก่ Oleic acid และ Sorbitol (Yu *et al*., 2018)

อย่างไรก็ตาม สัมประสิทธิ์การถดถอยของสเปกตรัมที่แปลงข้อมูลด้วยวิธี standard deviation scale และ mean centering ร่วมกับ standard deviation scale พบความยาวคลื่นที่สำคัญ ได้แก่ 970 และ 1152 นาโนเมตร (Figure 5G และ 5H) โดยความยาวคลื่น 970 นาโนเมตร คือ second overtone ของพันธะ O-H (Osborne *et al*., 1993) สัมพันธ์กับปริมาณน้ำที่เป็นส่วนประกอบของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และที่ความยาวคลื่น 1152 นาโนเมตร คือ second overtone ของพันธะ C-H (Osborne *et al*., 1993) ทั้งนี้การสั่นสะเทือนของพันธะ C-H ที่ความยาวคลื่น 1152 นาโนเมตร สัมพันธ์กับโครงสร้างของผนังเซลล์เชื้อราและ Conidia (Gautam, 2014; Rinaudo, 2006) จากการพิจารณาสัมประสิทธิ์การถดถอยของสเปกตรัมดั้งเดิมและสเปกตรัมที่แปลงข้อมูลด้วยวิธีต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าการใช้ Tween 80 ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ดังนั้น การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไม่ควรใช้น้ำร่วมกับ Tween 80

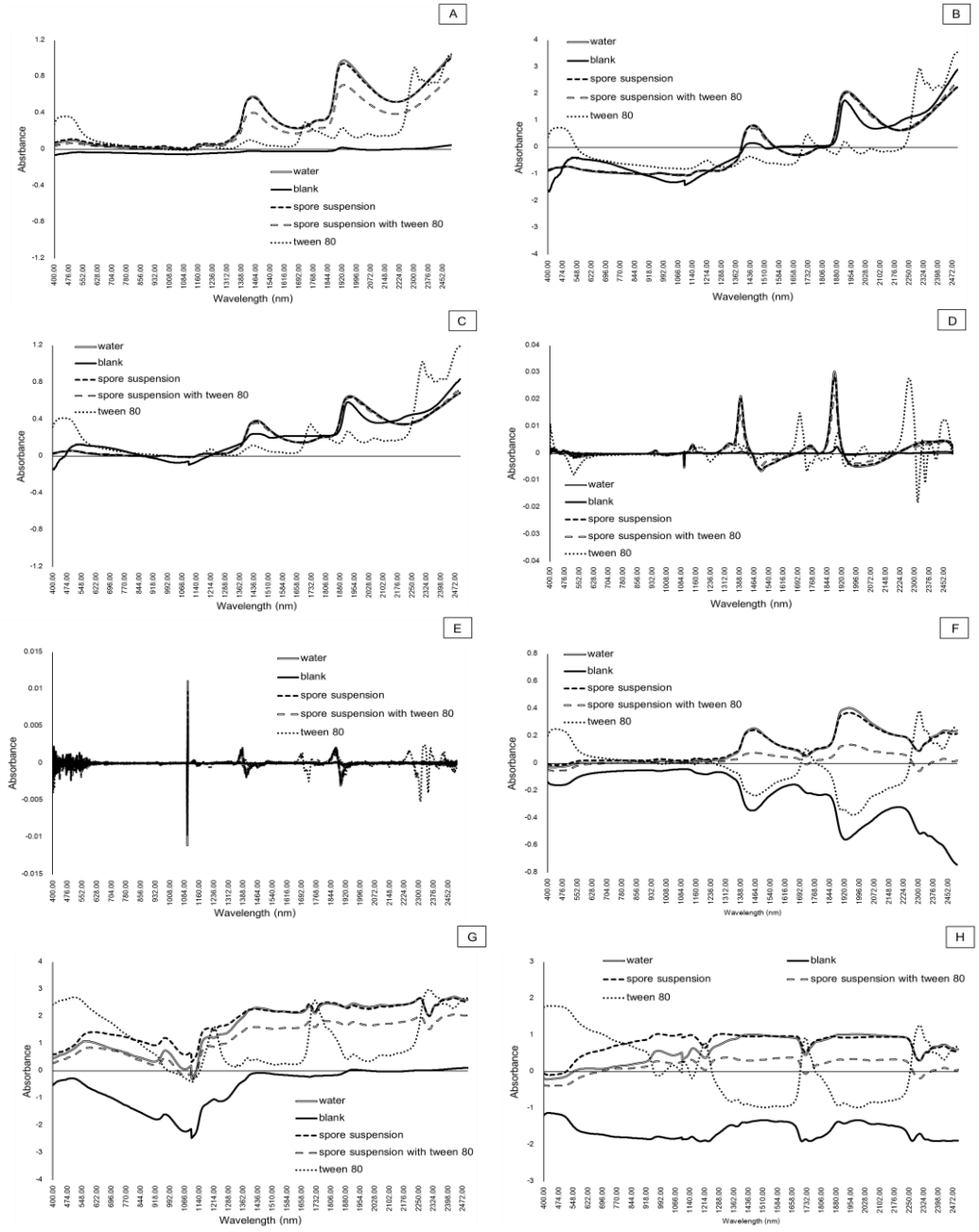

Figure 3 Average spectra of water, blank or glass microfiber filters, spore suspension, spore suspension with Tween 80, and Tween 80: A) original spectra B) standard normal variate spectra C) multiplicative scatter correction spectra D) first derivative spectra E) second derivative spectra F) mean centering G) standard deviation scale and H) mean centering with standard deviation spectra

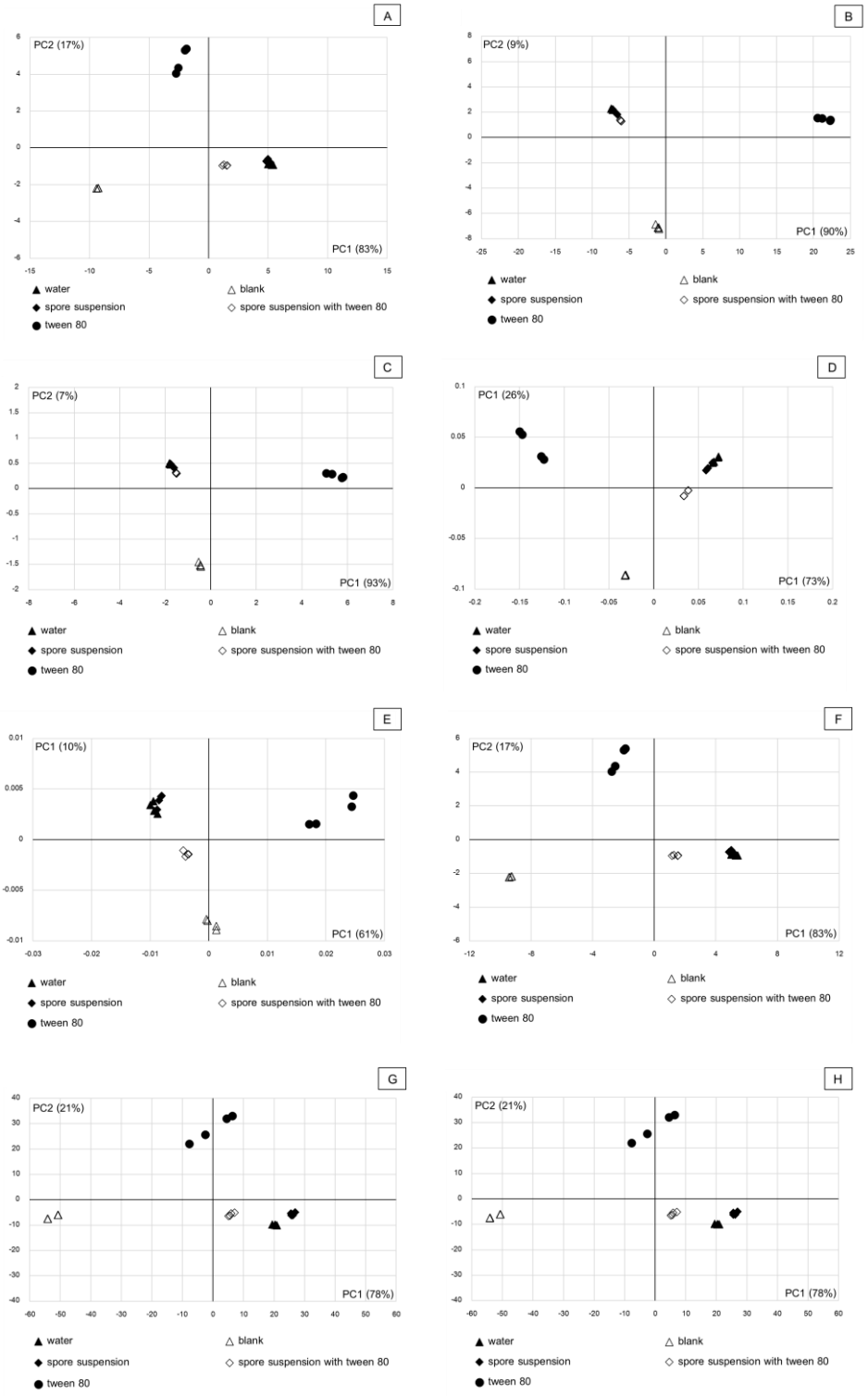

Figure 4 PCA score plots of water, blank or glass microfiber filters, spore suspension, spore suspension with Tween 80, and Tween 80: A) original spectra, B) standard normal variate spectra C) multiplicative scatter correction spectra D) first derivative spectra E) second derivative spectra F) mean centering G) standard deviation scale and H) mean centering with standard deviation spectra

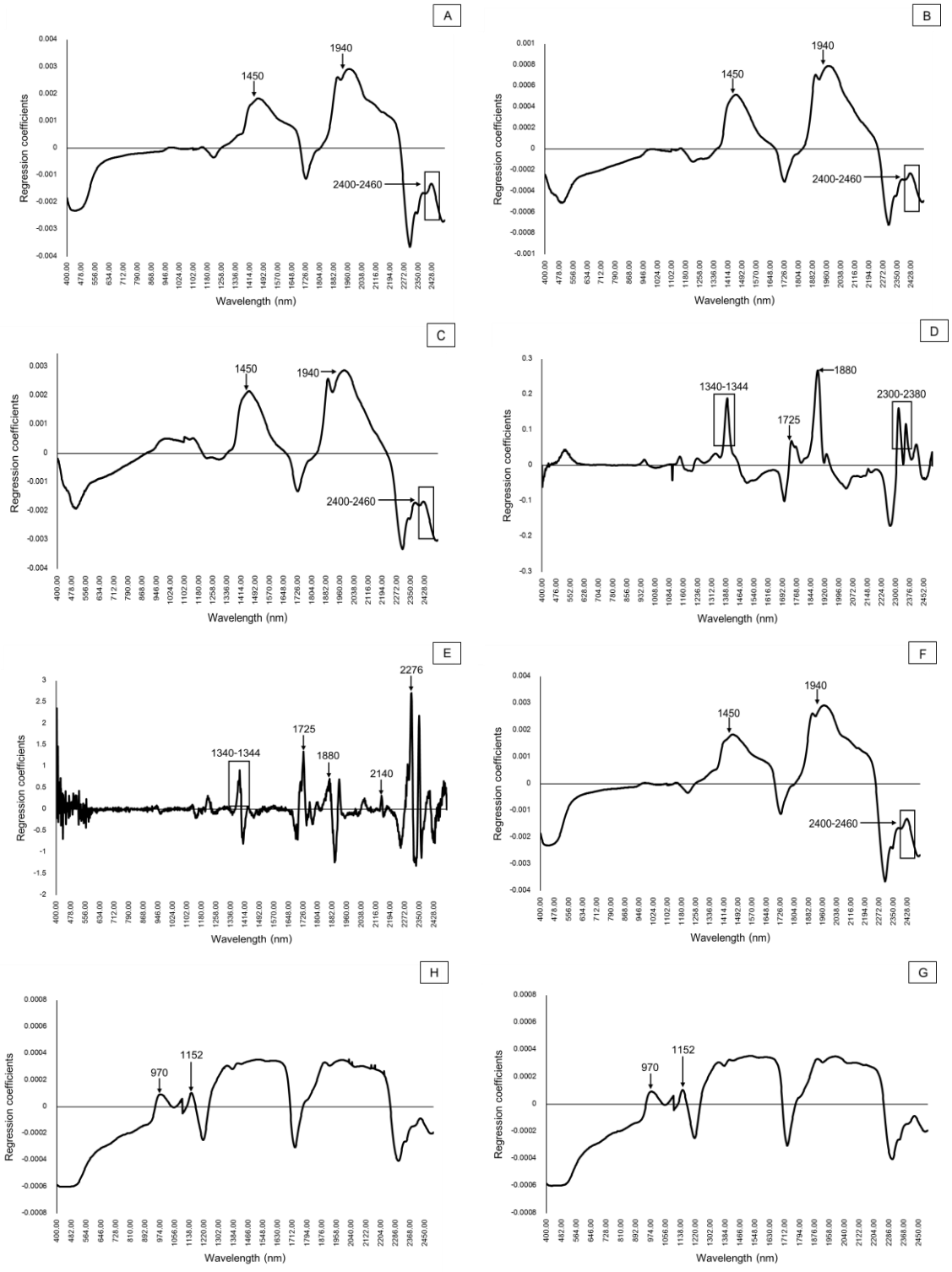

Figure 5 Regression coefficients plot for PLS model using: A) original spectra B) standard normal variate spectra C) multiplicative scatter correction spectra D) first derivative spectra E) second derivative spectra F) mean centering G) standard deviation scale and H) mean centering with standard deviation spectra

สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบการเข้าทำลายของสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนผิวของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองที่ไม่ทำให้เกิดบาดแผล พบว่า หลังจากการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผิวของผลมะม่วงแสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส สำหรับการตรวจหาสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ร่วมกับเทคนิค Partial Least Squares (PLS) regression พบความยาวคลื่นที่สามารถบ่งบอกถึงลักษณะของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้แก่ 1340 - 1344 1725 2300 - 2380 และ 2400-2460 นาโนเมตร ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีตรวจหาสปอร์ของ *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุการเกิดโรคแอนแทรกโนสในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว กองส่งเสริมและประสานเพื่อประโยชน์ทางวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สำนักงานปลัดกระทรวงกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และสาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Bagshaw, J. 1989. Mango pests and disorders. Queensland Department of Primary Industries, Queensland.

Chaiareekitwat, S. 2012. Application of NIR spectroscopy and hyperspectral imaging for classification of anthracnose on mango. Master's Thesis in Food Technology, Silpakorn University. [in Thai]

Chantrasri, P., V. Sardsud, U. Sardsud and R. Pornprasit. 2008. System management of anthracnose disease control in “Nam Doc Mai” mango for exportation. In Final Report. Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai. [in Thai]

Fernández-Espinosa, A. J. 2016. Combining PLS regression with portable NIR spectroscopy to on-line monitor quality parameters in intact olives for determining optimal harvesting time. Talanta 148: 216-228.

Gautam, A. K. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides*: biology, pathogenicity and management in India. Journal of Plant Physiology and Pathology 2(2), Available: https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000125.

Jeffries, P., J. Dodd, M. J. Jeger and R. A. Plumbey. 1990. The biology and control of *Colletotrichum gloeosporioides* species on tropical fruit crops. Plant Pathology 39(3): 343-366.

Jenny, F., N. Sultana, M. M. Islam, M. M. Khandaker and M. A. B. Bhuiyan. 2019. A review on anthracnose of mango caused *Colletotrichum gloeosporioide*s. Bangladesh Journal of Plant Pathology 35(1&2): 65-74.

Kaverinathan, K., M. Scindiya, P. Malathi, R. Viswanathan and A. R. Sundar. 2017. Role of melanin in *Colletotrichum falcatum* pathogenesis causing sugarcane red rot. Sugar Tech 19(6): 584-591.

Kubo, Y., K. Suzuki, I. Furusawa and M. Yamamoto. 1985. Melanin biosynthesis as a prerequisite for penetration by appressoria of *Colletotrichum lagenarium*: site of inhibition by melanin-inhibiting fungicides and their action on appressoria. Pesticide Biochemistry and Physiology 23(1): 47-55.

Nelson, S. C. 2008. Mango anthracnose (*Colletrotrichum gloeosporioides*). Plant Disease, PD-48. College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR), University of Hawaii, Honolulu.

Osborne, B. G., T. Fearn and P. H. Hindle. 1993. Practical NIR spectrometer with applications in food and beverage Analysis. 2nd Edition Longman Scientific and Technical, Harlow.

Ribeiro, J. S., M. M. C. Ferreira and T. J. G. Salva. 2011. Chemometric models for the quantitative descriptive sensory analysis of arabica coffee beverages using near infrared spectroscopy. Talanta 83 (5): 1352-1358.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. Progress in Polymer Science 31(7): 603-632.

Rungpichayapichet, P., B. Mahayothee, M. Nagle, P. Khuwijitjaru and J. Müller. 2016. Robust NIRS models for non-destructive prediction of postharvest fruit ripeness and quality in mango. Postharvest Biology and Technology 111: 31-40.

Seehanam, P., K. Sonthiya, P. Maniwara, P. Theanjumpol, O. Ruangwong, K. Nakano, S. Ohashi, S. Kramchote and P. Suwor. 2024. Ability of near infrared spectroscopy to detect anthracnose disease early in mango after harvest. Horticulture, Environment and Biotechnology 65: 581-591.

Thanapase, W., S. Kasemsumran, S. Pathaveerat, A. Terdwongworakul, P. Ritthiruangdej, T. Suwonsichon and R. Rittiron. 2012. Near-infrared technology and applications in industries. Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Bangkok. [in Thai]

Theanjumpol, P., G. Self, R. Rittiron, T. Pankasemsuk and V. Sardsud. 2013. Selecting variables for near infrared spectroscopy (NIRS) valuation of mango fruit quality. Journal of Agricultural Science 5(7): 146-159.

Toth, L. M., J. T. Bell, D. W. Fuller, S. R. Buxton, H. A. Friedman and M. R. Billings. 1976. Chemistry of the KALC process. The CO_2-I_2-CH_3I-H_2O System. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee.

Williams, P. and K. Norris. 2001. Near- infrared technology in the agriculture and food industries. 2nd Edition American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.

Wongsheree, T., R. Rittiron, P. Jitareerat, C. Wongs-Aree and T. Phiasai. 2010. Near infrared spectroscopic analysis for latent infection of *Colletrotrichum gloeosporioides*, a causal agent of anthracnose disease in mature-green mango fruit. Proceedings of GMSTEC 2010: International Conference for a Sustainable Greater Mekong Subregion, Bangkok, Thailand. pp. 341-343.

Yu, J., S. Citrowske, N. Carlson and J. Strange. 2018. Analysis of tween 80 by high-performance liquid chromatography with diode array detection. Technical Document. Agilent Technologies, Inc., St. Paul, Minnesota.