

Thesis Title	Effects of Root and Pod Exudates on Drought and Aflatoxin Resistance of Peanut Genotypes	
Author	Miss Janjira Puntase	
Degree	Doctor of Philosophy (Agronomy)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Chuckree Senthong	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Keith T. Ingram	Member
	Assoc. Prof. Dr. Dumnern Karladee	Member
	Assoc. Prof. Dr. Sombat Srichuwong	Member

ABSTRACT

The relationship between root and pod exudates from peanut (*Arachis hypogaea* L.), development of *Aspergillus flavus* Link ex. Fires population, water deficit and aflatoxin resistance was ascertained and studied at the Georgia Envirotron at the University of Georgia, Griffin Campus, the Lampang Agricultural Research and Training Centre and at Chiang Mai University during 2000-2004.

Aflatoxin contamination occurs when peanuts are colonized by aflatoxigenic strains of *A. flavus* and pods develop under drought. Aflatoxin-resistant peanut genotypes have either resistance to *A. flavus* infection, or prevention of aflatoxin production, or both. In these studies, resistance to *A. flavus* infection was used to indicate aflatoxin resistance, because without infection of *A. flavus*, there can be no aflatoxin contamination. Peanut grown under drought is often contaminated with aflatoxin, one possible avenue to avoid aflatoxin contamination would be to use

drought-resistant genotypes. Drought resistance is an umbrella term that refers to a plant's ability to produce yield well under water-limited conditions. Components of drought resistance include drought tolerance, drought avoidance, drought recovery and drought escape. Drought-avoiding genotypes are able to maintain internal plant water status for normal metabolic functioning with limited water supply, either through conservation or enhanced water collection such as a deep root system. The hypotheses of these research work are the genotypes that produce less root and pod exudates, sloughed cells or leakage of cell contents under drought conditions provide less substrate for *A. flavus* growth, and that smaller *A. flavus* populations are less likely to infect these low-exuding genotypes. Thus, less root and less pod exudation would be most aflatoxin resistant in peanut genotypes.

In Experiment 1, three sub experiments (soil and hydroponic culture) were conducted in green houses of the Georgia Envirotron, University of Georgia, the Lampang Agricultural Research and Training Centre and Chiang Mai University with the objectives to observe *A. flavus* populations on roots and pods in response to water deficit and to evaluate the effects of root exudate on *A. flavus* in the pod zone of peanut genotypes. First, four peanut genotypes were grown in sandy soil under green house conditions with two irrigation treatments. Four peanut genotypes were 329CC, classified as aflatoxin resistant in plant breeding traits; 419CC, which is drought susceptible and aflatoxin susceptible; 511CC, which is drought resistant and aflatoxin resistant; and Georgia Green, which is a commercial variety from USA. A minirhizotron system was used to observe green fluorescent protein (GFP) *A. flavus* populations on surfaces of roots, pegs and pods at 5 cm soil depth. Water deficit increased *A. flavus* population density on the root by 37% and pod zones by 22%.

Genotype 419CC had the greatest *A. flavus* population densities on root and pod surfaces under soil culture. For peanut grown in a hydroponic system using PEG to impose water deficit, root exudate solution of 419CC had the greatest colonization of *A. flavus* in the sand culture. This genotype apparently exuded the most of substrate from roots for *A. flavus* growth.

In Experiment 2, three sub experiments were conducted at Georgia Envirotron, the University of Georgia, Griffin Campus and the Chiang Mai University with the objective to develop a method to maximize *Aspergillus flavus* infection of peanut flowers, pegs and ovaries. A suspension of *A. flavus* spores was sprayed over the top of half of the plants at 10 and 20 days after flowering, the other half of plants in a growth chamber received no spray. Four cuvettes were attached to the sides of the containers, each cuvette had a different inoculation method. The four cuvette treatments were: 1) spore suspension was mixed into soil before filling cuvette; 2) cracked corn inoculum was mixed into soil before filling cuvette; 3) uninoculated soil was placed in cuvette and cracked corn inoculum was applied to the soil surface; and 4) cuvette soil was not inoculated. Maximum infection by GFP *A. flavus* was found by spraying a spore suspension over shoots and flowers of peanut with cracked corn inoculum applied to the soil surface. Peanut flower surfaces were infected by *A. flavus* at moderate to high frequency, from 50 to 100%. Observations with a UV microscope showed fluorescing GFP *A. flavus* on the surface of peanut flowers and a fluorescing network of hyphae on the embryo inside of peanut pegs in about 2% of embryos observed. These experiments show that peanut infection by GFP *A. flavus* can occur during flowering, probably before peg formation. It appears that *A. flavus* hyphae follow the germinating pollen tube through the style to infect embryos.

In Experiment 3, the objective was to observe differences among peanut genotypes with respect to *A. flavus* infection and crop growth and development under water deficit. Four peanut genotypes were grown in 214-L containers with sandy soil. Soil moisture and temperature at 5, 25 and 75 cm depth were monitored with a CR10X data logger. All containers were inoculated with green fluorescent protein (GFP) *A. flavus* strains cultured on cracked corn medium. Irrigation treatments were well-watered (saturated twice weekly) and four 3-week water deficit cycles (two weeks without irrigation followed by saturation twice during the third week). After harvest, pods of each genotype were surface sterilized then cultured on Petri dishes with M3S1B medium. Because water deficit did not affect mainstem elongation, individual leaf area or soil moisture extraction of genotype 329CC, this genotype was considered highly drought resistant. On the other hand, water deficit caused 44% pod weight loss for this genotype. Based on its low pod weight loss under water deficit (36%) and high soil moisture extraction, genotype 511CC was classified as drought resistant. Furthermore, 511CC had the lowest *A. flavus* infection on the pods, shell and seeds so this genotype is also classified as *A. flavus* resistant. Contrary to expectations, *A. flavus* infection of seeds was greater in well-watered than in stressed plants, except for Georgia Green, which also had the highest levels of seed infection. Infection levels of pod (exterior) and shell (interior) were not related to seed infection. Although drought resistance may confer *A. flavus* resistance, as it did in 329CC, its inability to maintain pod yield under water deficit would make these characters unsuited for germplasm assessment efforts. The plant trait that appeared to be the most important for drought resistance of genotype 511CC was the ability to extract

soil moisture from deeper soil layers, which allowed the plants to maintain high tissue moisture content and resulted in a lower intensity of *A. flavus* infection.

Results also show that *A. flavus* populations cultured with root exudate solutions did not apparently reflect differences in drought or aflatoxin resistance, which suggests that the amount of root exudates is probably not a trait related to aflatoxin resistance. To inoculate peanut in screening for aflatoxin resistance, plant breeders should spray a spore suspension over the top of plants at 10 and 20 days after flowering and apply cracked corn inoculum to the soil surface. Moreover, the plant trait which conferred the greatest drought and aflatoxin resistance was the ability to extract soil moisture from deeper soil layers which allowed the plants to maintain high tissue moisture content and resulted in low pod weight loss and low intensity of *A. flavus* infection on the seeds.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ผลของสารที่ปลดปล่อยจากรากและฝักของ
สายพันธุ์ถั่วลิสงต่อการทนแล้งและต้านทานต่อ
สารอะฟลาท็อกซิน

ผู้เขียน

นางสาวจันทร์จิรา พันตะศรี

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (พืชไร่)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ. ดร. จักรี เส้นทอง

ประธานกรรมการ

Assoc. Prof. Dr. Keith T. Ingram กรรมการ

รศ. ดร. ดำเนิน กาละดี กรรมการ

รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ความสัมพันธ์ระหว่างสารที่ปลดปล่อยจากรากและฝักถั่วลิสง, การเจริญและการพัฒนาของจำนวนประชากรเชื้อรา *Aspergillus flavus*, สภาพของการขาดน้ำ, และการต้านทานต่อสารพิษอะฟลาท็อกซิน ได้ทำการศึกษาค้นคว้า ณ มหาวิทยาลัยจอร์เจีย วิทยาเขต Griffin, สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างปี 2543-2547

การปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินในถั่วลิสงเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษโดยเฉพาะเมื่อฝักถั่วลิสงพัฒนาภายใต้สภาวะแห้งแล้ง ถั่วลิสงสายพันธุ์ที่จัดว่าต้านทานต่อสารพิษอะฟลาท็อกซิน จะสามารถต้านทานต่อการติดเชื้อจากเชื้อรา *A. flavus* หรือการป้องกันการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน หรือทั้งสองกรณี ในการทดลองนี้จะใช้คำว่า การต้านทานต่อการติดเชื้อรา *A. flavus* แทนการต้านทานต่อสารพิษอะฟลาท็อกซิน เนื่องจากว่าถ้าหากไม่มีการติดเชื้อรา *A. flavus* ย่อมไม่เกิดการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินแต่อย่างใด และการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ดีเมื่อถั่วลิสงปลูกภายใต้สภาวะแห้งแล้ง ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่จะสามารถหลีกเลี่ยงต่อการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินได้ก็โดยการใช้พันธุ์ถั่ว

ลิสงที่ต้านทานต่อสภาวะแห้งแล้งมาปลูก การต้านทานต่อสภาวะแห้งแล้ง หมายถึง ความสามารถของพืชที่จะให้ผลผลิตในระดับที่ดีภายใต้สภาวะที่มีน้ำจำกัด องค์ประกอบของการต้านทานต่อสภาวะแห้งแล้งนั้นจะรวมไปถึงการทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งที่ยาวนาน, การหลีกเลี่ยงต่อสภาวะแห้งแล้ง, การฟื้นตัวกลับคืนหลังสภาวะแห้งแล้ง และการหลีกเลี่ยงจากสภาวะการขาดน้ำ ถั่วลิสงสายพันธุ์ที่หลีกเลี่ยงต่อสภาวะแห้งแล้งได้นั้น จะมีความสามารถที่จะรักษาสมดุลของน้ำภายในต้นได้ดี เพื่อใช้ในขบวนการต่างๆ และมีระบบรากที่หยั่งลึกตลอดจนมีปริมาณของรากมากเพื่อการดูดน้ำมาใช้ในการเจริญเติบโตได้เป็นปกติ สำหรับสมมุติฐานของการทดลองนี้ คือ ถั่วลิสงสายพันธุ์ที่มีการปลดปล่อยสารจากรากและฝัก, มีเซลล์ที่ถูกสตัดทิ้ง หรือมีปริมาณสารที่รั่วไหลจากเซลล์ในปริมาณที่น้อยภายใต้สภาวะแห้งแล้งนั้น จะมีสารอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อราอยู่น้อยด้วย และถ้าหากพบว่ามีจำนวนประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ที่น้อย จะทำให้ถั่วลิสงมีการติดเชื้อจากเชื้อรา *A. flavus* น้อยลงไปด้วย ดังนั้น ถั่วลิสงสายพันธุ์ที่มีสารปลดปล่อยจากรากและฝักในปริมาณที่น้อย จึงเป็นสายพันธุ์ที่น่าจะมีความต้านทานต่อสารพิษอะฟลาท็อกซินด้วย

การทดลองที่ 1 ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย (ปลูกพืชในดินและปลูกในสารละลาย) ได้ทำการทดลองภายใต้สภาพโรงเรือน ณ มหาวิทยาลัยจอร์เจีย, สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีวัตถุประสงค์การทดลอง เพื่อสำรวจประชากรเชื้อรา *A. flavus* บนส่วนของรากและฝักถั่วลิสงที่ตอบสนองต่อสภาวะของการขาดน้ำ และประเมินผลของสารที่ปลดปล่อยจากรากต่อความหนาแน่นของเชื้อรา *A. flavus* บริเวณที่ฝักเจริญของถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ ทำการปลูกถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ในดินทราย และจัดให้มีการให้น้ำ 2 กรรมวิธี ใช้ถั่วลิสงทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 329CC เป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษอะฟลาท็อกซิน ซึ่งลักษณะดังกล่าวจำแนกโดยนักปรับปรุงพันธุ์, สายพันธุ์ 419CC จัดเป็นสายพันธุ์อ่อนแอต่อสภาวะแห้งแล้งและอ่อนแอต่อการเกิดสารพิษอะฟลาท็อกซิน, สายพันธุ์ 511CC เป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสภาวะแห้งแล้งและการเกิดสารพิษอะฟลาท็อกซิน และพันธุ์ Georgia Green เป็นชื่อพันธุ์ทางการค้าของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ใช้ระบบกล้อง minirhizotron เป็นเครื่องมือสำรวจการเรืองแสงสีเขียวของประชากรเชื้อรา *A. flavus* บนบริเวณฝักราก, เข็ม, และฝักที่ระดับ 5 ซม.จากระดับผิวดิน ผลการทดลอง พบว่า ในสภาวะของการขาดน้ำจะมีความหนาแน่นของจำนวนประชากรเชื้อรา *A. flavus* ในบริเวณรากถึงร้อยละ 37 และในบริเวณฝักเพียงร้อยละ 22 จากการปลูกถั่วลิสงในดินพบว่าถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC มีความหนาแน่นของประชากรเชื้อรา *A. flavus* ในบริเวณรากและฝักมากที่สุด ส่วนการปลูกถั่วลิสงในสารละลาย แล้วชักนำให้เกิดสภาวะขาดน้ำด้วยสารโพลีเอทิลีนไกลคอล แล้วนำสารที่ปลดปล่อยจากรากของถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC ไปเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* พบว่ามีการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* มากที่สุด แสดงให้เห็นว่า ถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC

จะปลดปล่อยสารอาหารจากรากสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ในปริมาณที่มากกว่า ถั่วลิสงอีก 3 สายพันธุ์

การทดลองที่ 2 ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย ได้ทำการทดลอง ณ มหาวิทยาลัยจอร์เจีย และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วัตถุประสงค์การทดลอง เพื่อพัฒนาวิธีการปลูกเชื้อรา *A. flavus* ให้เกิดการติดเชื้อสูงสุดบนดอก, เข็ม และรังไข่ของถั่วลิสง ทำการฟ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ลงบนส่วนลำต้นของถั่วลิสงที่ระยะ 10 และ 20 วันหลังจากออกดอก ได้ปลูกถั่วลิสงในถังปลูกที่ติดตั้งด้วย cuvette ขนาดเล็กทั้ง 4 ด้าน กำหนดให้ cuvette ทั้ง 4 อันประกอบด้วย 4 กรัม วิธีการปลูกเชื้อ ได้แก่ 1) สารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ผสมกับดินทรายก่อนบรรจุลงใน cuvette 2) ผสมดินทรายกับเมล็ดข้าวโพดบดที่มีเชื้อราเจริญ (cracked corn) ก่อนบรรจุลงใน cuvette 3) เมล็ดข้าวโพดบดปลูกเชื้อลงบนผิวดินใน cuvette 4) ไม่มีการปลูกเชื้อ ผลการทดลองพบว่า วิธีการฟ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* บนส่วนลำต้นเหนือดิน, บนดอก ร่วมกับการปลูกเชื้อด้วยเมล็ดข้าวโพดบดลงบนผิวดิน จะมีการติดเชื้อจากเชื้อรา *A. flavus* สูงสุด การติดเชื้อจากเชื้อรา *A. flavus* บนผิวดอกถั่วลิสงจะมีสูงถึงร้อยละ 50 ถึงร้อยละ 100 จากการสำรวจด้วยกล้อง UV microscope พบว่า มีการเรืองแสงสีเขียวของเชื้อรา *A. flavus* บนผิวของดอกถั่วลิสง และพบร่างแหของเส้นใยเชื้อราในส่วนเอ็มบริโอของเข็มประมาณร้อยละ 2 การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อของถั่วลิสงจากเชื้อรา *A. flavus* สามารถเกิดขึ้นได้ในช่วงระยะของการออกดอก หรืออาจเกิดก่อนระยะการสร้างเข็ม เส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* จะเจริญไปตามท่อลำเลียงเรณู ผ่านก้านเกสรตัวเมีย แล้วเข้าทำลายรังไข่ในที่สุด

การทดลองที่ 3 เพื่อศึกษาถึงผลกระทบและความแตกต่างของการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาภายใต้สภาวะของการขาดน้ำ ได้ปลูกถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ในถังขนาด 214 ลิตรด้วยดินทราย การตรวจวัดความชื้นและอุณหภูมิดินที่ระดับ 5, 25 และ 75 ซม.จากระดับผิวดิน ได้ใช้เครื่องมือ CR10X data logger ทำการปลูกเชื้อรา GFP *A. flavus* ด้วยเมล็ดข้าวโพดบดลงบนผิวดินของถังปลูกทั้งหมด การให้น้ำแบ่งออกเป็น 2 กรรมวิธี คือ การให้น้ำตามปกติ (สัปดาห์ละ 2 ครั้ง) และการขาดน้ำ (หยุดให้น้ำติดต่อกันนาน 2 สัปดาห์ และในสัปดาห์ที่ 3 ให้น้ำตามปกติ) หลังจากเก็บเกี่ยวนำฝักถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ M3S1B ผลการทดลอง พบว่า สภาวะของการขาดน้ำไม่มีผลกระทบต่อการยึดตัวของลำต้นหลัก พื้นที่ใบ และการควบแน่นจากดินของถั่วลิสงสายพันธุ์ 329CC แต่อย่างไรก็ตาม แสดงว่าสายพันธุ์ 329CC เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดี แต่สภาวะของการขาดน้ำยังเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำหนักของฝักลดลงถึงร้อยละ 44 สำหรับสายพันธุ์ 511CC มีการสูญเสียน้ำหนักของฝักที่น้อยในสภาวะของการขาดน้ำ และมีการติดของเชื้อรา *A.*

flavus ในปริมาณที่ต่ำในส่วนของฝัก, เปลือก และเมล็ด ดังนั้น สายพันธุ์ 511CC จึงเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อการติดเชื้อรา *A. flavus* สำหรับการติดเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดของถั่วลิสงจะพบมากในถั่วลิสงที่ปลูกในสภาวะของการให้น้ำตามปกติ ซึ่งตรงกันข้ามกับความคาดหมายของการทดลองนี้ ยกเว้นพันธุ์ Georgia Green ซึ่งมีการติดเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดมากที่สุดในสภาวะของการขาดน้ำ ปริมาณการติดเชื้อราในส่วนของฝัก (ด้านนอก) และเปลือกฝัก (ด้านใน) พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในส่วนของเมล็ด ถึงแม้ว่าการทนต่อสภาวะแห้งแล้งของสายพันธุ์ 329CC จะมีความสัมพันธ์ต่อการต้านทานสารพิษอะฟลาท็อกซิน แต่สายพันธุ์ 329CC ไม่สามารถที่จะรักษาระดับผลผลิตของฝักภายใต้สภาวะของการขาดน้ำได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ลักษณะดังกล่าวไม่เหมาะสมสำหรับใช้เพื่อการคัดเลือกให้เป็นแหล่งของพันธุกรรม ส่วนลักษณะที่ปรากฏในสายพันธุ์ 511CC ถือว่ามีความสำคัญต่อการทนแล้ง ก็คือ สายพันธุ์นี้มีรากที่ลึก ซึ่งสามารถดูดน้ำจากดินในระดับที่ลึกได้ดี และยังสามารถเก็บรักษาความชื้นในต้นได้สูง จึงมีผลทำให้การติดเชื้อจากเชื้อรา *A. flavus* ลดต่ำลงไป

จากผลการทดลองที่ได้นำเชื้อรา *A. flavus* มาเพาะเลี้ยงด้วยสารที่ปลดปล่อยจากรากถั่วลิสง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องของการต้านทานต่อสภาวะแห้งแล้งและต้านทานต่อสารพิษอะฟลาท็อกซินแต่อย่างใด ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าปริมาณของสารที่ปลดปล่อยจากรากของถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์นั้น ไม่ใช่ลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับการต้านทานต่อสารพิษอะฟลาท็อกซินสำหรับวิธีการปลูกเชื้อในถั่วลิสงเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารพิษอะฟลาท็อกซินนั้น นักปรับปรุงพันธุ์ควรพิจารณาแนวตอนยสเปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ลงบนต้นถั่ว ที่ระยะ 10 และ 20 วันหลังจากการออกดอก ไปพร้อมกันกับการปลูกเชื้อรา *A. flavus* ด้วยเมล็ดข้าวโพดบด ลงบนผิวดิน ซึ่งทำให้ถั่วลิสงมีการติดเชื้อราสูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะของพืชที่มีความสัมพันธ์กับการทนแล้งและต้านทานต่อสารอะฟลาท็อกซินได้ดีนั้น เพราะมีระบบรากที่ยังลึกลงดินและสามารถที่จะดูดน้ำที่อยู่ลึกลงไปมาใช้เพื่อที่ต้นพืชจะสามารถปรับตัวให้อยู่รอดได้ และรักษาระดับความชื้นของเนื้อเยื่อที่สูง ซึ่งจะมีผลทำให้มีการสูญเสียของน้ำหนักฝักที่ลดต่ำลงไป ตลอดจนมีการติดเชื้อรา *A. flavus* ที่เมล็ดลดน้อยลงไปด้วย