

<b>Thesis Title</b>	Effects of Temperature, CO <sub>2</sub> , and Water Deficit on Peanut Growth and <i>Aspergillus flavus</i> Infection	
<b>Author</b>	Miss Jarunee Pilumwong	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Agronomy)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Prof. Dr. Chuckree Senthong	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Keith T. Ingram	Member
	Assoc. Prof. Dr. Sombat Srichuwong	Member

### ABSTRACT

The interactions effects of temperature, CO<sub>2</sub> and water deficit on peanut growth and *Aspergillus flavus* infection was studied at the Georgia Envirotron, the University of Georgia, Griffin Campus, and at the Lampang Agricultural Research and Training Center and at Chiang Mai University during 2002-2005.

Experiment 1, was conducted in the controlled environment growth chambers of the Georgia Envirotron, the University of Georgia, Griffin Campus, during August to December 2002, to determine the growth and development responses of peanut shoots and roots grown under different combinations of CO<sub>2</sub> and temperature and to evaluate these combined effects on *A. flavus* infection. The study comprised a long-term experiment, in which plants were grown in growth chambers for 112 days and a short-term experiment, in which growing plants in rhizotrons for 17 days. In the long-term experiment, peanut cultivar Tainan 9 was grown in 20-L containers fitted with minirhizotron observation tubes at 5 cm soil depth and placed in controlled environment chambers under three levels of CO<sub>2</sub> concentration (400, 600, and 800

$\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) and two levels of air temperature (25/15°C and 35/25°C day/night temperature). Plants were inoculated with green fluorescent protein (GFP) *A. flavus* inoculum at 23, 53 and 73 days after planting (DAP). In the short-term experiment; two seedlings of Tainan 9 peanut genotype were grown in acrylic rhizotrons with a 6-mm thick soil layer. Root growth was observed at 3- to 4-day intervals. At 25/15°C, plants grown at 600 and 800  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  CO<sub>2</sub> had main stems that were 24 and 44 % longer than those grown at 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  while at 35/25°C the main stem length did not differ among CO<sub>2</sub> levels. Area and dry weight of leaflet were greater in 25/15°C than 35/25°C which resulted in 60% greater in total leaf area at harvest. Specific leaf area at low temperature was 22% less than at high temperature. At high temperature, above ground biomass was 56%, 24%, and 16% higher than at low temperature as CO<sub>2</sub> increased from 400 to 800  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . Pod dry weight increased with increasing CO<sub>2</sub> at 25/15°C but there was no different among CO<sub>2</sub> levels at 35/25°C. In the 25/15°C, pod dry weight was 50% higher than in the 35/25°C. As temperature increased from 25/15°C to 35/25°C, pod dry weight was reduced by 40-54% with increasing CO<sub>2</sub> levels. High temperature produced more root length in the containers whereas low temperature did in the rhizotrons. Percent of peg infection by *A. flavus* and the soil *A. flavus* population were greater at 25/15°C than 35/25°C. Both tended to increase with increasing CO<sub>2</sub> levels. This research clearly shown that there was no interaction of elevated CO<sub>2</sub> with higher temperature on the reproductive growth, despite a tendency for beneficial temperature by CO<sub>2</sub> interaction on vegetative growth and total shoot dry weight. At all levels of CO<sub>2</sub> concentration, higher temperatures resulted in significant pod weight loss.

Experiment 2, was conducted in the green house at the Georgia Envirotron, the University of Georgia, during 2002 and in the opened field at the farm of the Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, during 2004. The objectives of this investigation were i) to evaluate the effects of different levels of water deficit on shoots and roots growth of peanut genotypes, ii) to determine the responses of peanut genotypes to *A. flavus* infection under different levels of water deficit, and iii) to determine the biochemical responses of peanut pods to *A. flavus* infection under drought condition.

In the green house experiment, three peanut genotypes (511CC, 419CC, and Tainan 9) were grown in 214-L containers with minirhizotron tubes installed at 5, 25, 50, and 75 cm depths. Plants were inoculated by cracked corn inoculum at 35 DAP. The four irrigation treatments were applied water at each 3- to 4-day intervals as the control (T1), 7-day intervals (T2), 14-day intervals (T3), and 21-day intervals (T4). Soil moisture tension and temperature were monitored at 5, 25, and 75 cm depths during growing period. Of all shoot traits observed, water deficit (T3 and T4) significant reduced leaflets number, main stem length, leaf area, specific leaf area and shoot dry weights in all genotypes. The root length of plants receiving T1 and T2 treatments was greater root length in the two upper soil layer (5 and 25 cm) than T3 and T4 treatments. In the T3 and T4 treatments, the root length was longer in the deeper soil depths (50 and 75 cm) than in T1 and T2 treatments. Root length decreased with increasing soil depth for plants receiving adequate water and tended to increase with increasing soil depth for plant that suffering from water deficit. Water deficit severely reduced pod dry weight plant<sup>-1</sup>, especially in genotype 511CC, for which the reduction was greater than 60% in the T3 treatment and 80% in the T4

treatment. Pod weight reduction ranged from 32 to 57% in 419CC and from 28 to 53% in Tainan 9. Incidence of pod shell colonization and soil *A. flavus* population was highest in T4 treatment, while seed infection was greatest in T2 treatment. Genotype 511CC appeared to have greater colonization in both pod shell and seed than the other two genotypes, even though it was found to have the lowest *A. flavus* in the soil.

In the opened field experiment, the same three peanut genotypes were grown in 200-L containers, filled with sandy loam soil and inoculated with *A. flavus* at 36 DAP. Water deficit was imposed by withholding irrigation water from 50 to 100 DAP. The *A. flavus* colonization at harvest was significantly increased by 53% in pod shell and 46% in seed when plants were exposed to drought. The highest incidence of pod shell infection was found in genotype 419CC. Contents of CT and Ca in seed coat were higher than in pod shell under drought. Among genotypes tested, 511CC had the highest concentration of CT in seed coat and the lowest incidence of *A. flavus* colonization. Drought significantly reduced Ca and Fe in pod shell and crude fat in cotyledon but tended to increase Zn in seed coat and crude protein in cotyledon. Moreover, there was a negative correlation between Mg and Mn contents in seed coat with pod shell and seed infection.

Experiment 3, was conducted in the green house of the Lampang Agricultural Research and Training Center during 2003. Three peanut genotypes (511CC, 419CC, and Tainan 9) were grown in a hydroponic system to determine flower and aerial peg infection by *A. flavus*. Peanut flowers were marked with colored thread and inoculated with 0.5 ml of GFP *A. flavus* spore suspension. By 24 and 48 hr after inoculation, inoculated flowers were separated into stigma, style, hypanthium and ovary for

observation of fungal invasion and colonization. At 10 days after inoculation, pegs were evaluated for the incidence of fungal colonization. Observation with an UV-illuminated microscope showed conidia of GFP *A. flavus* germinated within 24 hr and extensively colonized stigma and style, especially near the pollen grains. By 48 hr after inoculation, fungal hyphae grew down the style, eventually reaching the top of the ovary conidiophores and conidia had formed over the peanut flowers. However, the visible fungal colonization in the ovules was sparse. The highest incidence of peg infection was found in Tainan 9. This experiment provides compelling evidence that seed infection by *A. flavus* may occur directly through floral infection. Initial infections may take place from, i) *A. flavus* spore attached to pollen grain, ii) spore germinated on the stigma surface and penetrated through the stigma follow the pollen tube, and iii) spore germinated on hypanthium and penetrated transversely through the style and ovary wall.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ผลของอุณหภูมิ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการขาดน้ำ ต่อการเจริญเติบโตของถั่วลิสงและการเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

ผู้เขียน

นางสาวจารุณี ภิฑุมวงศ์

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (พืชไร่)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. จักรี เต้ินทอง

ประธานกรรมการ

Assoc. Prof. Dr. Keith T. Ingram กรรมการ

รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์

กรรมการ

บทคัดย่อ

ผลของ อุณหภูมิ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการขาดน้ำ ต่อการเจริญเติบโตของถั่วลิสงและการเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้ทำการทดลองในสภาพเรือนทดลองของมหาวิทยาลัยจอร์เจีย วิทยาเขตกริฟฟิน สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2548

การทดลองที่ 1 ทดลองในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม ณ มหาวิทยาลัยจอร์เจีย วิทยาเขตกริฟฟิน ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2545 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการตอบสนองทางด้านการเจริญเติบโตและการพัฒนาการทางลำต้นและใบ และรากของถั่วลิสงที่ปลูกภายใต้ระดับความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พร้อมทั้งประเมินผลของสภาพดังกล่าวต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* โดยการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย ได้แก่ การทดลองระยะสั้นเป็นระยะเวลา 17 วัน และการทดลองระยะยาวเป็นระยะเวลา 112 วัน สำหรับการทดลองระยะยาวนั้น ได้ปลูกถั่วลิสงพันธุ์ไททานิก 9 ในกระบะพลาสติกขนาด 20 ลิตร ซึ่งติดตั้ง minirhizotron observation tube ที่ระดับ 5 ซม. จากระดับผิวดิน การทดลองทำในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมภายใต้ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 3 ระดับ (400, 600 และ 800  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) และอุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 2 ระดับ (25/15°C และ 35/25°C) ทำการปลูกเชื้อรา *A. flavus* ที่มี green fluorescence protein (GFP) ที่ 23, 53 และ 73 วันหลังปลูก สำหรับการทดลองระยะสั้น ได้ปลูกถั่วลิสงพันธุ์ไททานิก 9 ใน rhizotron ที่มีความหนาของดิน 6 มล.

แล้ววางไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมข้างต้น และวัดการเจริญเติบโตของรากถั่วลิสง ทุก 3 ถึง 4 วัน ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 25/15°C ถั่วลิสงที่ได้รับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 600 และ 800  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  มีความยาวลำต้นมากกว่าที่ 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  คิดเป็น 24 เปอร์เซ็นต์ และ 44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่อุณหภูมิ 35/25°C ความยาวลำต้นไม่แตกต่างกันระหว่างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในแต่ละระดับ พื้นที่ใบและน้ำหนักแห้งของใบย่อยที่อุณหภูมิ 25/15°C จะมีมากกว่าที่อุณหภูมิ 35/25°C ซึ่งจะให้มีพื้นที่ใบต่อต้นในขณะเก็บเกี่ยวมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ แต่จะมีค่าของ specific leaf area ต่ำกว่าที่อุณหภูมิสูงประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเก็บเกี่ยวพบว่าถั่วลิสงที่ปลูกภายใต้ อุณหภูมิ 35/25°C จะมีน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินมากกว่าที่อุณหภูมิ 25/15°C ในทุกระดับของ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมีค่าเฉลี่ยสูงกว่า 56, 24 และ 16 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นของก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ 400, 600 และ 800  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  ตามลำดับ น้ำหนักแห้งของฝักที่อุณหภูมิ 25/15°C จะสูงกว่าที่อุณหภูมิ 35/25°C ถึง 50 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มสูงขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ที่อุณหภูมิ 35/25°C น้ำหนักแห้งของฝักไม่เพิ่มสูงขึ้นตามการเพิ่มขึ้น ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แต่อย่างใด ถ้าหากมีอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้ให้น้ำหนักแห้งของฝัก ลดลงไปตั้งแต่ 40 ถึง 54 เปอร์เซ็นต์ ตามระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มสูงขึ้น สำหรับ ความยาวรากของถั่วลิสงที่ปลูกในกระบะที่อุณหภูมิ 35/25°C จะมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 25/15°C เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองใน rhizotron พบว่าที่อุณหภูมิต่ำจะมีความยาวของรากมากกว่าที่ อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และ จำนวนของ ประชากรเชื้อราในดินที่อุณหภูมิ 25/15°C จะสูงกว่าที่อุณหภูมิ 35/25°C และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตาม ระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปฏิสัมพันธ์ร่วม ระหว่างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และอุณหภูมิ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วลิสงในระยะ สืบพันธุ์ ถึงแม้ว่าจะมีแนวโน้มที่จะมีผลต่อการเจริญทางลำต้นและใบก็ตาม ในทุกระดับของก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าหากมีอุณหภูมิที่สูงด้วยแล้ว จะมีผลทำให้น้ำหนักแห้งของฝักถั่วลิสงลดลง อย่างมีนัยสำคัญ

การทดลองที่ 2 ดำเนินการในเรือนทดลอง ของมหาวิทยาลัยจอร์เจีย วิทยาเขต กริฟฟิน ระหว่างปี พ.ศ. 2545 และที่แปลงทดลองของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2547 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ประเมินผลของการขาดน้ำระดับต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโต ทางลำต้น ใบ และรากของถั่วลิสง 2) ตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสงที่ขาด น้ำในแต่ละระดับ และ 3) ศึกษาการตอบสนองของสารชีวเคมีในฝักถั่วลิสงเมื่อมีการเข้าทำลายของ เชื้อรา *A. flavus* ภายใต้สภาวะที่แห้งแล้ง

การทดลองในเรื่องทดลองได้ทำการปลูกถั่วลิสง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 511CC, 419CC และ ไทนาน 9 ในถังปลูกขนาด 214 ลิตร ที่ติดตั้ง minirhizotron observation tube ที่ระดับ 5, 25, 50 และ 75 ซม. จากระดับผิวดิน ได้ทำการปลูกเชื้อ *A. flavus* ที่เจริญอยู่ในเมล็ดข้าวโพด (cracked corn inoculum) ที่ 35 วันหลังปลูก สำหรับการให้น้ำมี 4 กรรมวิธี ได้แก่ การให้น้ำทุก 3 ถึง 4 วัน (T1), 7 วัน (T2), 14 วัน (T3) และ 21 วัน (T4) และได้บันทึกข้อมูลความชื้นและอุณหภูมิดินที่ระดับ 5, 25 และ 75 ซม. ตลอดระยะเวลาปลูก ผลการทดลองพบว่า การให้น้ำทุก 14 วัน และ 21 วัน มีผลทำให้จำนวนใบ ความยาวลำต้น พื้นที่ใบ specific leaf area และน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ถั่วลิสงที่ได้รับน้ำทุก 3 ถึง 4 วัน และ 7 วัน มีความยาวของรากมากขึ้นในดินระดับ 5 ถึง 25 ซม. ขณะที่ถั่วลิสงที่ได้รับน้ำทุก 14 วัน และ 21 วัน มีความยาวของรากมากในดินระดับลึก 50 ถึง 75 ซม. ในถั่วลิสงที่ได้รับน้ำอย่างเพียงพอจะมีความยาวของรากลดลง ในระดับความลึกของดินที่เพิ่มสูงขึ้น แต่มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นตามระดับความลึกของดินเมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดน้ำ สภาวะของการขาดน้ำมีผลทำให้น้ำหนักแห้งฝักลดลง โดยเฉพาะถั่วลิสงสายพันธุ์ 511CC จะลดลงมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์เมื่อได้รับน้ำทุก 14 วัน และจะลดลง มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อได้รับน้ำทุก 21 วัน สำหรับสายพันธุ์ 419CC และ พันธุ์ ไทนาน 9 จะมีน้ำหนักแห้งของฝักลดลงไป 35 ถึง 57 เปอร์เซ็นต์ และ 25 ถึง 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าในถั่วลิสงที่ได้รับน้ำทุก 21 วัน จะมีเปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อรา *A. flavus* ที่เปลือกฝัก และมีจำนวนเชื้อราดังกล่าวในดินสูงที่สุด ขณะที่การติดเชื้อราของเมล็ดจะมีอยู่สูงในถั่วลิสงที่มีการให้น้ำทุกกระยะ 7 วัน ในสายพันธุ์ 511CC จะมีการติดเชื้อราที่เปลือกฝักและเมล็ดในปริมาณที่สูงกว่าอีกสองสายพันธุ์

สำหรับการทดลองในแปลง ได้ทำการปลูกถั่วลิสงทั้ง 3 สายพันธุ์ในกระบะซีเมนต์ขนาด 200 ลิตร และปลูกเชื้อรา *A. flavus* ที่ 36 วันหลังปลูก และชักน้ำให้เกิดการขาดน้ำในช่วงระยะเวลา 50 ถึง 100 วันหลังปลูก ผลการทดลองพบว่าถ้าหากถั่วลิสงขาดน้ำจะทำให้มีการติดเชื้อรา *A. flavus* ที่เปลือกฝัก 53 เปอร์เซ็นต์ และที่เมล็ดมีสูงถึง 46 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในส่วนของเปลือกฝักจะพบมากที่สุดสายพันธุ์ 419CC ในสภาพที่แห้งแล้งจะมีปริมาณของสารแทนนินและแคลเซียมในเปลือกหุ้มเมล็ดสูงกว่าในส่วนของเปลือกฝัก สายพันธุ์ 511CC จะมีปริมาณของสารแทนนินในส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดมากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อรา *A. flavus* ต่ำที่สุด นอกจากนี้สภาพที่แห้งแล้งจะมีผลทำให้ปริมาณแคลเซียมและเหล็กในเปลือกฝัก และไขมันในใบเลี้ยงลดลง ในขณะที่ปริมาณของสังกะสีในเปลือกหุ้มเมล็ดและโปรตีนในใบเลี้ยงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ปริมาณของแมกนีเซียมและแมงกานีสในเปลือกฝักและเปลือกหุ้มเมล็ดมีความสัมพันธ์ในทางลบกับเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus*



การทดลองที่ 3 ดำเนินการในเรือนทดลองของสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง ในปี พ.ศ. 2546 โดยปลูกถั่วลิสง 3 สายพันธุ์ (511CC, 419CC และ ไทนาน 9) ในสารละลาย เพื่อตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในดอกและเข็มของถั่วลิสง ได้ทำเครื่องหมายบนดอกของถั่วลิสงก่อนทำการปลูกเชื้อด้วยสารละลายแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* จำนวน 0.5 มล. เก็บตัวอย่างของดอกไปแยกส่วนออกเป็น stigma, style, hypanthium และ ovary หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 24 ชม. และ 48 ชม. เพื่อตรวจสอบเส้นใยของเชื้อราดังกล่าวภายใต้กล้อง UV-microscope เก็บตัวอย่างเข็มของถั่วลิสงที่พัฒนามาจากดอกที่ได้รับการปลูกเชื้อมาแล้ว 10 วันมาตรวจสอบการติดเชื้อโดยวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่า สปอร์ ของเชื้อรา GFP *A. flavus* งามภายใน 24 ชม. และแผ่ขยายเส้นใยไปยังส่วนของ stigma และ style อย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลา 48 ชม. หลังการปลูกเชื้อ เส้นใยของเชื้อราจะเจริญลงไปตามความยาวของ style จนกระทั่งถึงส่วนล่างสุดของ style ที่ต่อกับรังไข่ และพบว่าเชื้อราสามารถสร้าง conidiophore และ conidia ขึ้นปกคลุมเนื้อเยื่อของดอกได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในส่วนของ ovule ที่ชัดเจน ในสายพันธุ์ไทนาน 9 จะมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเข็มที่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อมากที่สุด การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดของถั่วลิสง อาจจะพัฒนามาจากการติดเชื้อตั้งแต่ระยะที่ต้นถั่วเริ่มออกดอก และการติดเชื้อเริ่มแรกอาจจะมาจาก 1) สปอร์ของเชื้อราติดไปกับละอองเรณู 2) สปอร์ของเชื้อราตกบน stigma และงอกเส้นใยเจริญผ่านเข้าไปตามท่อนำละอองเรณู และ 3) สปอร์ของเชื้อรางอกบน hypanthium และแทงเส้นใยผ่าน style เข้าสู่ผนังของ ovary โดยตรง