| | | |
|---|---|---|
| **Thesis Title** | Influence of Calcium on *Aspergillus flavus* Infection in Peanut | |
| **Author** | Mr. Prachan Janpengphat | |
| **Degree** | Doctor of Philosophy (Agronomy) | |
| **Thesis Advisory Committee** | Prof. Dr. Chuckree Senthong | Advisor |
| | Assoc. Prof. Dr. Keith T. Ingram | Co-advisor |
| | Assoc. Prof. Dr. Sombat Srichuwong | Co-advisor |
| | Assoc. Prof. Suthat Julsrigival | Co-advisor |


## ABSTRACT


Infection of peanut (*Arachis hypogaea* L.) pod shell and seed by *Aspergillus flavus* and subsequent aflatoxin contamination is a serious worldwide problem. Considering the role of calcium (Ca) in cell wall development and have been shown to be associated with resistance to *A. flavus* infection. Three experiment were conducted during 2004-2007, to determine the influence of soil Ca and soil properties on *A. flavus* population and the response of Ca content in pod shell, seed coat and seed in relation to resistance of peanut genotypes to *A. flavus* infection and Ca supply.

In the first experiment (2004-2005) soil samples from different peanut growing regions of the North and Northeastern part of Thailand were collected to determine the influence of soil Ca and soil properties on *A. flavus* population. Result showed that no correlation of soil Ca content with *A. flavus* population in the soil that collected before peanut was planted but it had a significantly correlation in the soil that collected after peanut was harvested in the rainy season (2004). No correlation of


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

soil Ca content with *A. flavus* population in the soil that collected before peanut was planted and after harvested in the dry season (2005). It was also found that soil calcium content had a highly significant correlation with soil pH and cation exchange capacity (C.E.C) whereas soil moisture content had highly significant correlation with *A. flavus* population. In the rainy season, most of the soil samples had larger *A. flavus* population than soil that were collected from the region that growing peanut in the dry season.

In the second experiment, three peanut genotypes (419CC : drought and aflatoxin susceptible; 511CC: drought and aflatoxin resistance and Tainan 9: a commercial variety in Thailand) were selected to determine the influence of Ca content in pod shell, seed coat and seed in relation to resistance to *A. flavus* infection. Pots experiment was conducted in the greenhouse of the Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Thailand during May – September, 2006. Results showed that increase the concentration of Ca in the solution will increase the amount of Ca in pod shell, seed coat and seed whereas the incidence of pod shell and seed infection of all three peanut genotypes were declined. Genotype 511CC had the highest Ca content in pod shell (0.35 g/100g), seed coat (0.37 g/100g) and seed (0.40 g/100g) and had the lowest incidence of pod shell (8.1%) and seed (2.2%) infection as compared to genotype 419CC which had the lowest Ca content in pod shell (0.21 g/100g), seed coat (0.18 g/100g) and seed (0.20 g/100g) and had the highest incidence of pod shell (36.3%) and seed (13.3%) infection. No seed infection was found in genotype 511CC under a high concentration of Ca (2500 ppm). From this results could be suggested that Ca content in peanut pod shell, seed coat and seed can be applied as criterion in selection for resistance to *A. flavus* infection. It was found that genotype 511CC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

supported the lowest levels of *A. flavus* infection and suggested that this genotype might provide potential source of resistance that could be used to move aflatoxin resistance into commercial peanut hybrids.

In the third experiment, the same three peanut genotypes as in the experiment 2 were used to determine the influence of calcium level between pod zone and root zone on pod shell, seed coat and seed Ca content in relation to resistance to *A. flavus* infection. A split root and pod solution culture was conducted in the greenhouse of the Faculty of Agriculture, Chiang Mai University during May – September, 2007. Plant were grown in half-strength Hoagland's solution (root zone) containing 10, 250 and 2500 ppmCa and three treatments imposed in which the pod zone (sand culture) solution Ca was controlled at 10, 250 and 2500 ppmCa in half-strength Hoagland's solution. At flowering stage (35-40 days after planting), cracked corn inoculums and spore suspension of green fluorescing protein (GFP) *A. flavus* were incorporated and spayed into the sand culture system. The experiment was arranged in a 3x3x3 factorial in a completely randomized design with three replications. Results revealed that, the concentration of Ca in the pod shell, seed coat and seed increased markedly with increasing Ca concentration in root zone solution. Increasing the Ca concentration in the pod zone at each levels of Ca in the root zone did not significantly increased the concentration of Ca in pod shell, seed coat and seed of all three peanut genotypes. Calcium found in pod shell, seed coat and seed are mainly taken up from the root zone and increased with the increase of Ca concentration. Increasing the Ca concentration in the root and pod zone solution will increase the amount of Ca in pod shell, seed coat and seed whereas the incidence of pod shell and seed infection of all three peanut genotypes were declined. Genotype 511CC had the highest Ca content in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

pod shell (0.35g/100g), seed coat (0.37g/100g) and seed (0.40g/100g) and had the lowest incidence of pod shell (8.4%) and seed (1.9%) infection as compare to genotype 419CC which had the lowest Ca content in pod shell (0.20g/100g), seed coat (0.22g/100g) and seed (0.23g/100g) and had the highest incidence of pod shell (36.9%) and seed (12.9%) infection, whereas Tainan 9 had the Ca content in pod shell (0.23g/100g), seed coat (0.28g/100g) and seed (0.30g/100g) and had the moderately incidence of pod shell (13.6%) and seed (6.5%) infection. No seed infection was found in genotype 511CC under the high concentration of Ca (2500ppm) in the root zone at each level of Ca in the pod zone. The results of this study have shown that the relationship between Ca content in peanut pod shell, seed coat and seed as influenced by Ca on *A. flavus* infection varied with genotypes and Ca concentration between the root and pod zones. Results obtained from this study could be suggested that no need to apply Ca as gypsum to the peanut plant in a soil which already high in exchangeable Ca (2500ppm) in the root zone.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** อิทธิพลของแคลเซียมต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสง

**ผู้เขียน** นายปราณัญ จันทร์เป็งผัด

**ปริญญา** วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต ( พืชไร่ )

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** ศ. ดร. จักรี เส้นทอง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Assoc. Prof. Dr. Keith T. Ingram อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. สุทัศน์ จุลศรีไกวัล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## บทคัดย่อ

การเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในเปลือกฝักและเมล็ดของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) ตลอดจนการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาท็อกซินเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นทั่วทุกมุมโลกเมื่อพิจารณาถึงบทบาทของแคลเซียมต่อการพัฒนาของผนังเซลล์และมีความเกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสงจึงได้ทำการศึกษาประกอบด้วย 3 การทดลองระหว่างปี พ.ศ. 2547 – 2550 เพื่อประเมินอิทธิพลของแคลเซียมในดิน และคุณสมบัติของดินต่อจำนวนประชากรของเชื้อรา *A. flavus* และการตอบสนองของปริมาณแคลเซียมในเปลือกฝักเยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานของสายพันธุ์ถั่วลิสงต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และปริมาณของแคลเซียมที่ให้

การทดลองที่ 1: (พ.ศ. 2547-2548) ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ต่างๆ ที่ปลูกถั่วลิสงในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเพื่อประเมินอิทธิพลของแคลเซียมในดิน และคุณสมบัติของดินที่มีต่อจำนวนประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ผลการทดลองพบว่าไม่มีสหสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณของแคลเซียมในดินกับจำนวนประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ในดินที่เก็บก่อนการปลูกถั่วลิสง แต่มีสหสัมพันธ์กันในระดับสูงสำหรับดินที่เก็บตัวอย่างหลังจากการเก็บเกี่ยวถั่งลิสงในช่วงฤดูฝน(พ.ศ. 2547)และพบว่าไม่มีสหสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณของแคลเซียมในดินกับจำนวนประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ในดินที่เก็บก่อนการปลูกและหลัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเก็บเกี่ยวถั่งลิสงในช่วงฤดูแล้ง (พ.ศ. 2548) จากการศึกษานี้ยังพบว่าปริมาณของแคลเซียมในดินมีสหสัมพันธ์กันในระดับสูงกับค่าของความเป็นกรด-ด่าง(pH)ของดิน และ ค่า cation exchange capacity (C.E.C) ขณะที่ความชื้นในดินมีสหสัมพันธ์กันในระดับสูงกับจำนวนประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ตัวอย่างดินที่เก็บในช่วงฤดูฝนส่วนใหญ่พบว่ามีจำนวนประชากรของเชื้อรา *A. flavus* มากกว่าตัวอย่างดินที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง

การทดลองที่ 2: ได้คัดเลือกถั่วลิสง 3 สายพันธุ์ได้แก่ พันธุ์ 419CC: เป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาวะแห้งแล้งและอ่อนแอต่อการสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซิน 511CC: เป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสภาวะแห้งแล้ง และต้านทานต่อการสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซิน และ Tainan 9 เป็นพันธุ์ที่แนะนำให้ปลูกทั่วไปในประเทศไทย เพื่อใช้ในการประเมินอิทธิพลของแคลเซียมในเปลือกฝัก เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ได้ทำการทดลองในกระถางในสภาพเรือนทดลองของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม-กันยายนพ.ศ.2549 ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของแคลเซียมในสารละลายจะช่วยเพิ่มปริมาณของแคลเซียมที่สะสมในเปลือกฝัก เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดขณะที่เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในเปลือกฝัก และเมล็ดของถั่วลิสงจะลดลงทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ 511CC มีปริมาณของแคลเซียมที่สูงในเปลือกฝัก (0.35 กรัม/100กรัม) เยื่อหุ้มเมล็ด (0.37 กรัม/100กรัม) และเมล็ด (0.40 กรัม/100กรัม) และพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ที่น้อยในเปลือกฝัก (8.1%) และเมล็ด (2.2%) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ 419CC ซึ่งมีปริมาณของแคลเซียมที่น้อยในเปลือกฝัก (0.21 กรัม/100กรัม) เยื่อหุ้มเมล็ด (0.18 กรัม/100กรัม) และเมล็ด (0.20 กรัม/100กรัม) และพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ที่มากในเปลือกฝัก (36.3%) และเมล็ด (13.3%) ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดของสายพันธุ์ 511CC ที่ปลูกในสารละลายที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมในระดับสูง ( 2500 ppm ) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณของแคลเซียมที่สะสมในเปลือกฝัก เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดสามารถที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกหาสายพันธุ์ถั่วลิสงที่มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างเหมาะสมนอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ที่น้อยในสายพันธุ์ 511CC ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าถั่วลิสงสายพันธุ์นี้สามารถที่จะใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมของความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และสามารถที่จะถ่ายทอดพันธุ์กรรมนี้ไปสู่สายพันธุ์ลูกผสมที่สามารถต้านทานต่อการสร้างสารพิษอะฟลาท๊อกซินได้

การทดลองที่ 3: ถั่วลิสง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองที่ 2 ได้นำมาใช้เพื่อการประเมินอิทธิพลของระดับแคลเซียมที่แตกต่างกันระหว่างในชั้นของฝักกับชั้นรากต่อปริมาณของแคลเซียมในเปลือกฝัก เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

*flavus* ได้ทำการทดลองโดยแยกเลี้ยงส่วนของราก และฝักในกระบะที่วางทับซ้อนกันในเรือนทดลองของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม-กันยายน พ.ศ. 2550 ทำการปลูกถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ให้มีรากเจริญลงไปยังกระบะชั้นล่างที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมในสารละลาย half-strength Hoagland ที่ระดับ 10 ppm, 250 ppm และ 2500 ppm ตามลำดับ ในชั้นของฝักได้ควบคุมระดับแคลเซียมให้มีความเข้มข้นสารละลาย half-strength Hoagland เช่นเดียวกันกับชั้นของราก เมื่อถั่วลิสงเจริญถึงระยะออกดอก (35-40 วันหลังปลูก) ได้ทำการปลูกเชื้อรา *A. flavus* ที่เรืองแสง (green fluorescing protein, GFP) โดยการผสม cracked corn inoculums ลงไปในกระบะทรายซึ่งเป็นชั้นสำหรับการเจริญของฝัก และฉีดพ่น spore suspension ลงไปบนต้นถั่ว ได้วางแผนการทดลองแบบ 3×3×3 factorial ในสุ่มสมบูรณ์มี 3 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมที่สะสมในเปลือกฝัก เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมในสารละลายในชั้นของราก การเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมในชั้นของฝักในแต่ละระดับความเข้มข้นของแคลเซียมในชั้นรากไม่ทำให้มีการเพิ่มปริมาณของแคลเซียมที่สะสมในเปลือกฝัก เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดของถั่วลิสงทั้ง 3 สายพันธุ์แต่อย่างใด แคลเซียมที่พบในเปลือกฝัก เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดได้มาจากการดูดของรากเป็นส่วนใหญ่ การเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมในสารละลายทั้งในชั้นของราก และในชั้นของฝักจะช่วยเพิ่มปริมาณของแคลเซียมที่สะสมในเปลือกฝัก เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ด ซึ่งจะมีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในเปลือกฝัก และเมล็ดของถั่วลิสงทุกสายพันธุ์ที่ลดน้อยลงไป สายพันธุ์ 511CC มีปริมาณของแคลเซียมที่สูงในเปลือกฝัก (0.35 กรัม/100กรัม) เยื่อหุ้มเมล็ด (0.37 กรัม/100กรัม) และเมล็ด (0.40 กรัม/100กรัม) และพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ที่ต่ำในเปลือกฝัก (8.4%) และเมล็ด (1.9%) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ 419CC ซึ่งมีปริมาณของแคลเซียมที่น้อยในเปลือกฝัก (0.20 กรัม/100กรัม) เยื่อหุ้มเมล็ด (0.22 กรัม/100กรัม) และเมล็ด (0.23 กรัม/100กรัม) และพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ที่สูงมากในเปลือกฝัก (36.9%) และเมล็ด (12.9%) ขณะที่พันธุ์ Tainan 9 มีปริมาณของแคลเซียมที่สะสมในเปลือกฝัก (0.23 กรัม/100 กรัม) เยื่อหุ้มเมล็ด (0.28 กรัม/100กรัม) และเมล็ด (0.30 กรัม/100กรัม) และพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในระดับปานกลางที่เปลือกฝัก (13.6%) และเมล็ด (6.5%) การทดลองครั้งนี้ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดของสายพันธุ์ 511CC ที่ปลูกโดยมีความเข้มข้นของแคลเซียมในชั้นของรากในระดับสูง (2500 ppm) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแคลเซียมที่สะสมในเปลือกฝัก เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* นั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของถั่วลิสง และปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมในชั้นของราก และในชั้นของฝักที่แตกต่างกันผลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าไม่จำเป็นต้องให้แคลเซียมใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปของยิปซัมแก่ต้นถั่วลิสงถ้าหากดินมีปริมาณของ exchangeable Ca ในชั้นของรากในระดับที่สูง (2500 ppm) อยู่แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved