Thesis Title Inheritance of *Aspergillus flavus* Resistance in Groundnut

Author Miss Sarita Yoopum

Degree Doctor of Philosophy (Agronomy)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Dumnern Karladee Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Sombat Srichuwong Member

Assoc. Prof. Dr. Sansanee Jamjod Member

Abstract

The fungus *Aspergillus flavus* strain commonly infects groundnut and produce a potent class of hepatocarcinogenic has been known as aflatoxins. Although the infection does not as pathogenic as to affect crop productivity, the toxins are harmful to the animals and human in daily consumption causing liver cancer and many other diseases. Food safe for aflatoxins in commercial groundnut has relied mainly on the post-harvested processing. However, since the crop can be contaminated during the pre-harvested stage, the host plant resistance is therefore considered as the most effective method in reducing the accumulation of the toxin in grains. As a result, a resistant germ-plasm and a suitable criteria of selection for the genotypes resistant to the production of that toxicity is needed. In this thesis, experiment objective aim to exploring additional sources of resistance to *A. flavus* infection in order to examining the basis for genotypic variations for the inheritance of the genes for resistance. The novel screening method, aniline blue fluorescence and hematoxylin staining (AFHS) technique for fluorescence staining of *A. flavus* in association with groundnut tissue

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

was also developed. The localization of the fungal fragments fluorescence was detected at the cellular level by staining the infected groundnut tissues with aniline blue fluorescence and hematoxylin, respectively, in thin sections by rotary microtrome. Ultra structure of fungal fragments was examined under ultraviolet microscope. The technique provided effective documentation of plant-fungal interaction, produced a high of resolution and contrast between hyphae and host-plant tissues. The plant tissues were fixed as dark areas in contrast with the fluorescent area of the fungus infection. The higher fluorescent area of the fungus observed in susceptibility Tainan9 than the resistance J_{11} varieties using Guacos Quantitative Color System Version 2.5.2 program.

To determine the appropriate conditions for assessing pre-harvest and post-harvest resistant genotypes to *A. flavus* infection, it was found that the appropriate procedures, optimum surface sterilization by 3 % sodium hypochlorite for 5 min was the optimum for groundnut pegs and 3 min for seed with intact seedcoat. Optimum time after inoculation for assessment under suitable conditions for *A. flavus* invasion, 100 % relative humidity and 30 °C was after 7 days of inoculation in both peg and seed screening methods and AFHS technique. Under appropriate conditions, high temperature and humidity, *A. flavus* invaded the susceptible cultivar faster, a short time to infection and high rate of infection, than the resistant cultivar.

Genotypic variation of groundnut resistance to infection by *A. flavus* at pre-harvest and post-harvest were evaluated in 47 groundnut genotypes. At pre-harvest, groundnuts pegs resisted to infection by *A. flavus* differently among genotypes in both peg screening method, AFHS technique and also at post-harvest period using seed screening method. The resistant genotypes expressed the low percent infection in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

both pre-harvest and post-harvest screening method, J_{11}, ICGX990093, ICGX990094 and the high percent infection indicated the susceptible genotypes, KK4 and ICGV19066. These five genotypes could be used as potential sources in breeding program or evaluate the inheritance of resistance to *A. flavus* infection. Furthermore, after analyzed chemicals in groundnut peg and seedcoat found that the calcium concentration in aerial pegs and soil peg were negative correlated to percent-infected pegs of groundnut. Moreover, calcium and condensed tannins concentrations in groundnut seedcoat were also negative correlated to percent-infected seeds of groundnut. Form the results could be suggested that calcium and tannins concentration in groundnut structure might inhibit fungal growth or infection.

Inheritance of the resistance estimated as combining ability, was investigated in groundnut populations in the half-diallel crossing with 5 parental lines selected previously in pre-harvesting, peg screening method and AFHS technique. The general combining ability (GCA) mean squares showed significant for all traits, and varied among the parents. But the significant SCA mean squares could be obtained only in AFHS technique. The results indicated the effect of additive gene action for such the character. The greater positive GCA values with high percent-infected peg of KK4 (70.0 %) was basically causing the percent infection inherited to its F_1 progeny, J_{11} × KK4 (42.2 %), ICGX990093 × KK4 (46.4 %), ICGX990094 × KK4 (62.4 %) and ICGV91066 × KK4 (43.3 %). In contrast, the greater negative GCA with low percent-infected peg of J_{11} (7.4 %) was also inherited showing resistance in its progeny, J_{11} × ICGV91066 (8.4 %) and J_{11} × ICGX990094 (21.8 %). However, the highly significant of GCA as well as SCA in percent-infected peg area

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

fluorescence indicated the importance of both the additive and the non-additive gene effects. Considering the estimation of the SCA effects, it can be inferred that the combinations J_{11} × KK4, ICGV91066 × ICGX990093 and KK4 × ICGX990094 performed the outstanding hybrids for resistance to *A. flavus* infection. Therefore, combinations with low percent-infected area fluorescence, with the significant SCA estimates, involving at least one of the parents with high negative GCA, could be suitable for increasing accumulation of favorable resistant alleles, a situation of the great interest to breeders. In conclusion, propose is made that the inheritance of groundnut resistant genotypes to infection by *A. flavus* could be improved through hybridization and selection using the high negative GCA with less percent infection.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ลักษณะพันธุกรรมของความต้านทานต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสง	
ผู้เขียน	นางสาวสริตา อยู่พุ่ม	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (พืชไร่)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ดำเนิน กาละดี	ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. สมบัติ ศรีชุวงศ์	กรรมการ
	รศ. ดร. ศันสนีย์ จำจด	กรรมการ

บทคัดย่อ

ถั่วลิสงมีเชื้อรา *Aspergillus flavus* เข้าทำลายและสร้างสารพิษ aflatoxins ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง แม้ว่าการเข้าทำลายของเชื้อราจะไม่ส่งผลเสียต่อผลผลิตของพืชแต่สารพิษที่เกิดขึ้นทำให้อาหารไม่เหมาะสมต่อการบริโภคเพราะสารพิษจะส่งเสริมการเกิดมะเร็งในตับและโรคอื่นๆทั้งในสัตว์และคน วิธีการลดสารพิษ aflatoxins โดยใช้พันธุ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* เป็นวิธีที่ดีมีประสิทธิภาพ แต่พันธุ์ต้านทานยังมีน้อย ดังนั้นจึงควรค้นหาลักษณะต้านทานที่เหมาะสมในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้มากขึ้น โดยวิทยานิพนธ์นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาแหล่งพันธุกรรมความต้านทานให้เพิ่มขึ้น และศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานจากลักษณะที่แสดงปฏิริยาร่วมระหว่างถั่วลิสงกับเชื้อรา *A. flavus* เป็นหลัก

วิธีการใหม่สำหรับคัดเลือกถั่วลิสงพันธุ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ได้ใช้การย้อมสี aniline blue และ hematoxylin (AFHS) เพื่อตรวจหาการเรืองแสงของเชื้อรา *A. flavus* ในเนื้อเยื่อถั่วลิสง โดยตรวจหาตำแหน่งของเชื้อราในระดับเซลล์ของชิ้นส่วนถั่วลิสงที่ตัดบางด้วยเครื่อง rotary microtrome แล้วย้อมสี aniline blue และ hematoxylin ตามลำดับ หลังจากนั้นตรวจการเรืองแสงของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์และแสงอุตราไวโอเลต ซึ่งวิธีการนี้สามารถตรวจปฏิกิริยาร่วมของพืชกับเชื้อโรคได้เป็นอย่างดี และให้ความแตกต่างของเชื้อรากับพืชอย่างชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยเนื้อเยื่อของพืชจะมืดทำให้เห็นการเรืองแสงของเชื้อราอย่างชัดเจน และพบว่าพื้นที่ของเนื้อเยื่อที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายแล้วเรืองแสงในพันธุ์อ่อนแอ ไทนาน9 เกิดขึ้นมากกว่าในพันธุ์ต้านทาน J_{11} หลังตรวจวัดด้วยโปรแกรม Guacos Quantitative Color System Version 2.5.2

สภาพที่เหมาะสมในการประเมินระดับความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ทั้งในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวพบว่า วิธีการล้างฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 3 % โซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่เหมาะสมคือ 3 นาทีในเข็มของถั่วลิสง และ เมล็ดถั่วลิสง เหมาะสมที่ 5 นาที สำหรับเวลาทีเหมาะสมในการประเมิน คือ 7 วันหลังการปลูกเชื้อรา *A . flavus* ภายใต้สภาพที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ความชื้นสัมพัทธ์ 100 % และอุณหภูมิ 30° ซ โดยเหมาะสมในการประเมินด้วยวิธี peg screening, seed screening methods และ AFHS technique นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาพอุณหภูมิและความชื้นสูงดังกล่าวทำให้การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในพันธุ์อ่อนแอเกิดขึ้นได้เร็วกว่าในพันธุ์ต้านทาน โดยใช้เวลาเข้าทำลายที่สั้นกว่าและอัตราการเข้าทำลายที่สูงกว่า

ความแปรปรวนของลักษณะความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสงในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ได้ศึกษาในถั่วลิสงจำนวน 47 สายพันธุ์ พบว่าในระยะก่อนการเก็บเกี่ยว ระดับความต้านทานของเข็มถั่วลิสงแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ ทั้งวิธีการประเมินด้วย peg screening method และ AFHS technique และในระยะหลังการเก็บเกี่ยว seed screening method โดยสายพันธุ์ต้านทานมีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายต่ำทั้งในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ J_{11}, ICGX990093 และ ICGX990094 และพันธุ์อ่อนแอมีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* สูง ได้แก่ พันธุ์ KK4 และ ICGV91066 ซึ่งถั่วลิสง 5 สายพันธุ์นี้เป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดีที่จะใช้ ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ หรือ ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ต่อไป นอกจากนี้จากการวิเคราะห์สารประกอบทางเคมีในเข็มและเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วลิสงพบว่า ปริมาณแคลเซียมในเข็ม ทั้งเข็มที่อยู่เหนือดินและเข็มที่อยู่ในดินนั้นผันแปรสวนทางกับเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อราที่เข็มด้วยวิธี peg screening และปริมาณแคลเซียมและแทนนินในเปลือกหุ้มเมล็ดมีความสัมพันธ์ทางลบกับแปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมล็ด ดังนั้นปริมาณสารประกอบเคมีหรือธาตุอาหารในเนื้อเยื่อถั่วลิสง โดยเฉพาะปริมาณแคลเซียม และแทนนินมีผลในการยังยั้งหรือต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ได้

การทดลองนี้ได้ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมของความต้านทานต่อเชื้อรา *A. flavus* โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการรวมตัวทางพันธุกรรมในถั่วลิสงสายพันธุ์พ่อแม่จำนวน 5 สายพันธุ์ซึ่งได้มาจากการคัดเลือกก่อนหน้านี้มาผสมพันธุ์กันแบบ half-diallel และประเมินลักษณะต้านทานด้วยวิธี peg screening และ AFHS technique พบว่าความสามารถในการรวมตัวทั่วไป (GCA) ของสายพันธุ์พ่อแม่นั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 2 วิธีการประเมิน และสำหรับความสามารถในการรวมตัวเฉพาะ (SCA) นั้นไม่แตกต่างกันเมื่อประเมินด้วย peg screening method ซึ่งแสดงว่าลักษณะพันธุกรรมแบบบวกสะสม (additive gene effects) เป็นสาเหตุหลักให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของความต้านทานต่อเชื้อรา *A. flavus* เมื่อประเมินด้วย peg screening method ด้วยเหตุนี้เมื่อเกิด GCA ในทางบวกสูงๆ ร่วมกับเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อราที่เข็มสูงๆ ของถั่วลิสงสายพันธุ์ KK4 (70.0 %) จึงส่งผลให้รุ่นลูกมีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายสูงตามไปด้วย เช่น J_{11} × KK4 (42.2 %), ICGX990093 × KK4 (46.4 %), ICGX990094 × KK4 (62.4 %) และ ICGV91066 × KK4 (43.3 %) ในขณะที่เมื่อเกิด GCA ในทางลบมากๆ ร่วมกับเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายที่ต่ำของพ่อแม่ J_{11} (7.4 %) สามารถถ่ายทอดลักษณะต้านทานไปสู่รุ่นลูกได้ เช่น J_{11} × ICGV91066 (8.4 %) และ J_{11} × ICGX990094 (21.8 %) ส่วนลักษณะต้านทานที่ประเมินด้วย AFHS technique นั้นจะถูกควบคุมด้วย additive และ non-additive gene effects และเมื่อพิจารณาค่า SCA พบว่า ลูกผสมระหว่าง J_{11} × KK4, ICGV91066 × ICGX990093 และ KK4 × ICGX990094 สามารถแสดงความต้านทานได้ดีเมื่อใช้ AFHS technique ในการประเมิน ดังนั้นลูกผสมที่มีเปอร์เซ็นต์ พื้นที่เรืองแสงของการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ประกอบกับค่า SCA ที่ดีและมาจากพ่อหรือแม่ที่มี GCAในทางลบมากๆ จะช่วยเพิ่มลักษณะพันธุกรรมต้านทานที่เป็นประโยชน์สำหรับนักปรับปรุงพันธุ์จะนำไปใช้ต่อไป ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า การถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมของความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสง สามารถทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้โดยใช้ลูกผสมและการคัดเลือกจากพ่อแม่พันธุ์ที่มีความสามารถในการรวมตัวของลักษณะพันธุกรรมนั้นๆ ได้ดี มีค่า GCA ในทางลบสูงๆ และมีระดับการเข้าทำลายของเชื้อราต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved