



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกการสร้างความต้านทานของสายพันธุ์ถั่วลิสงต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา
Aspergillus flavus และการเกิดสารอะฟลาท็อกซิน

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. จักรี เส้นทอง

นางสาวจันทร์จิรา พันตะศรี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สวัสดิ์ มีจ้อย

Assoc. Prof. Dr. Keith T Ingram

เสร็จสิ้นโครงการเมื่อ วันที่ 27 กันยายน 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกการสร้างความต้านทานของสายพันธุ์ถั่วลิสงต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา
Aspergillus flavus และการเกิดสารอะฟลาท็อกซิน

ผู้วิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. จักรี เส้นทอง¹

นางสาวจันทร์จิรา พันตะศรี¹

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สาวิตร์ มีจุ้ย²

Assoc. Prof. Dr. Keith T Ingram³

สังกัด

¹ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

²สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง จ. ลำปาง

³Crop and Soil Sciences, Griffin, GA, USA.

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยการสนับสนุนทุนวิจัยจาก ฝ่ายวิชาการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยได้ให้การสนับสนุนทุนงานวิจัยเป็นระยะเวลา 2 ปี

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปางเอื้ออำนวยสถานที่ในการทำงานวิจัย ตลอดจนอุปกรณ์ต่างๆ เจ้าหน้าที่ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่กรุณาช่วยเหลือในด้านแรงงาน และมหาวิทยาลัยจอร์เจียเอื้ออำนวยในด้านเทคโนโลยีงานวิจัย และขอขอบคุณคุณธีรศักดิ์ รุ่งเจริญ ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือทางด้านคอมพิวเตอร์โปรแกรม

สุดท้ายนี้ ทีมผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้คงเป็นประโยชน์ และเป็นแนวทางในการศึกษาแก่ผู้สนใจและเกี่ยวข้องกับงานวิจัยด้านนี้ หากมีข้อบกพร่องประการใด ผู้วิจัยยินดีน้อมรับแนะนำเพื่อแก้ไขให้เหมาะสมในโอกาสต่อไป และขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ทีมงานวิจัย

รหัสโครงการ สัญญาเลขที่ BGJ/30/2544

ชื่อโครงการ กลไกการสร้างความต้านทานของสายพันธุ์ถั่วลิสงต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และการเกิดสารอะฟลาท็อกซิน

ชื่อนักวิจัย ศ.ดร. จักรี เส้นทอง¹, นางสาวจันทร์จิรา พันตะศรี¹, ผศ.ดร. สาวิตร มีจ้อย²
Assoc. Prof. Dr. Keith T Ingram³

¹ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ²สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง อ.เมือง จ.ลำปาง, ³Crop and Soil Sciences, Griffin, GA, USA.

Email address : agicsnth@chiangmai.ac.th

puntase@hotmail.com

sawitm@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ 28 กันยายน 2544 - 27 กันยายน 2546

ในพันธุ์ถั่วลิสงที่ไม่ทนแล้งจะพบประชากรของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่รากและฝัก ในปริมาณที่มากกว่าพันธุ์ถั่วลิสงที่ทนแล้ง ทั้งนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับสารที่ปลดปล่อยจากรากและฝักของถั่วลิสง ซึ่งอาจจะเป็นอาหารสำหรับการเพิ่มประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ก็ได้ การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินถึงความสัมพันธ์ระหว่างสารที่ปลดปล่อยจากรากของถั่วลิสงในแต่ละพันธุ์กับการเพิ่มประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ในสภาวะที่ขาดน้ำและการต้านทานต่อสารอะฟลาท็อกซิน ได้ทำการทดลองที่โรงปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยจอร์เจีย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง ระหว่างเดือน กันยายน พ.ศ. 2544 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2546 โดยการปลูกถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 419CC, 511CC, Luhua 11 และพันธุ์ไทนาน 9 ในระบบ hydroponic ที่มีสารละลาย half Hoagland ได้ใช้สาร poly- ethyleneglycol เพื่อชักนำให้เกิดสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารที่ปลดปล่อยจากรากด้วยเครื่องมือ HPLC และใช้ WinRhizo program สำหรับการวิเคราะห์เกี่ยวกับระบบของราก ผลการทดลอง พบว่า ในสภาวะที่ขาดน้ำจะมีน้ำตาลซูโครส ปลดปล่อยออกมาจากรากในปริมาณที่มากกว่าน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโทส และจากผลการทดลองนี้เองได้สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า สารละลายที่ปลดปล่อยออกมาจากรากของถั่วลิสง โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส นั้นจะเป็นปัจจัยหลักทางนิเวศวิทยาที่จะมีผลต่อการเพิ่มประชากรของเชื้อรา *A. flavus* ในบริเวณของรากและฝักของถั่วลิสง ในสภาวะที่ขาดน้ำสายพันธุ์ถั่วลิสงที่ไม่ทนแล้ง (419CC) จะมีการปลดปล่อยน้ำตาลซูโครสออกมาในปริมาณที่มากกว่า 40% เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ทนแล้ง (511CC)

คำหลัก เชื้อรา *Aspergillus flavus*, สารที่ปลดปล่อยจากราก, สายพันธุ์ถั่วลิสง, ระบบ hydroponic, การขาดน้ำ

Project Code: BGJ/30/2544

Project Title: Mechanisms of Resistance to *Aspergillus flavus* Infection and Aflatoxin Contamination in Peanut Genotypes

Investigator: Prof. Dr. Chuckree Senthong¹, Ms. Janjira Puntase¹,

Assist. Prof. Dr. Sawit Meechoui², Assoc. Prof. Dr. Keith T Ingram³

¹Department of Agronomy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

²Lampang Agricultural Research and Training Center, Lampang, Thailand.

³Department of Crop and Soil Sciences, University of Georgia, Griffin, GA, U.S.A.

Email address : agicsnth@chiangmai.ac.th

puntase@hotmail.com

sawitm@hotmail.com

Project Period: September 28, 2001 – September 27, 2003

Aspergillus flavus population appeared to be greater on roots and pods of drought susceptible peanut genotypes than on roots and pods of drought resistant genotypes. Root exudates may provide growth substrate to promote *A. flavus* population increase. The objective of this research was to ascertain the relationship between root exudates, development of *A. flavus* population, water deficit and aflatoxin resistance. The experiments were conducted in the greenhouse of the Georgia Envirotron, the University of Georgia, at Chiang Mai University and at the Lampang Agricultural Research and Training Center in Thailand from September, 2001 to September, 2003. Four peanut genotypes; 419CC, 511CC, Luhua 11 and Tainan 9 were grown in a hydroponic system with half- Hoagland's solution. Poly- ethyleneglycol was used to impose as water deficit. Root exudates were measured by HPLC. Root system were analyzed for root length using a flatbed scanner and WinRhizo software. The effects of root exudates on *A. flavus* population growth was observed. Water deficit promoted in the greater exudation of sucrose more than glucose and fructose. These result support the hypothesis that the exudates especially sucrose in the geocarposphere are an important ecological factor affecting the colonization of peanut fruits by *Aspergillus flavus*. Under water deficit condition drought susceptible genotype (419CC) excreted more than 40% of sucrose when compared with the drought resistant genotypes (511CC)

Keywords: *Aspergillus flavus*, Root exudates, Peanut genotypes, Hydroponic system, Water deficit

บทนำ

การศึกษาเกี่ยวกับการเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในบริเวณรากและฝักของถั่วลิสงนั้น ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ามีกลไกของการเข้าทำลายได้อย่างไร และมีความสัมพันธ์กับการเกิดสารอะฟลาท็อกซินได้อย่างไร แต่เมื่อไม่นานมานี้ได้มีงานวิจัยซึ่งทำโดย Ingram *et al.* (1999) ได้ใช้ระบบ mini-rhizotron สำหรับการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บริเวณรากและฝักของถั่วลิสง โดยได้ทำการปลูกเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่มียีน green fluorescing protein (GFP) ที่ได้พัฒนาโดย J. Cary และยีน GFP ตัวนี้มีคุณสมบัติเรืองแสงสีเขียวสว่างภายใต้คลื่นแสง UV จึงทำให้เชื้อรา *A. flavus* ที่ใช้มีคุณสมบัติเรืองแสงสีเขียวด้วย ทำให้ง่ายแก่การสำรวจ และ Ingram *et al.* (1999) ได้สำรวจจำนวนประชากรของเชื้อรา GFP *A. flavus* โดยประเมินจากการเพิ่มปริมาณการเรืองแสงบริเวณผิวรากและฝักถั่วลิสงภายใต้สภาวะดินแห้งหรือขาดน้ำ พบว่า จำนวนของเชื้อรา *A. flavus* ปรากฏในบริเวณรากและฝักของถั่วลิสงสายพันธุ์ที่ไม่ทนแล้งจะมีปริมาณที่มากกว่าบริเวณรากและฝักของถั่วลิสงสายพันธุ์ที่ทนแล้ง

สารที่ปลดปล่อยจากราก และสารบางอย่างที่รั่วไหล อาจเป็นสารตั้งต้นส่งเสริมการเจริญของประชากรเชื้อรา *A. flavus* ปริมาณสารที่ปลดปล่อยออกมาดูเหมือนว่าจะแตกต่างกันในถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ และเพิ่มขึ้นในพืชที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดด้วย สมมุติฐานของการศึกษาในครั้งนี้ คือ สารที่ปลดปล่อยจากราก และสารที่รั่วไหลจากเซลล์รากพืช อาจเป็นตัวที่จะอธิบายถึงความแตกต่างของการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บริเวณผิวราก และความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมของถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อการเกิดสารพิษอะฟลาท็อกซิน ดังนั้น

การทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบสมมุติฐาน โดยการประเมินปริมาณของสารที่ปลดปล่อยหรือรั่วไหลจากรากของถั่วลิสงในแต่ละสายพันธุ์ ความสัมพันธ์ระหว่างสารที่ปลดปล่อยจากราก กับการต้านทานต่อสภาวะที่ขาดน้ำ และผลของสารที่ปลดปล่อยจากราก ต่อจำนวนเชื้อรา *A. flavus* ในดิน

วิธีการทดลอง

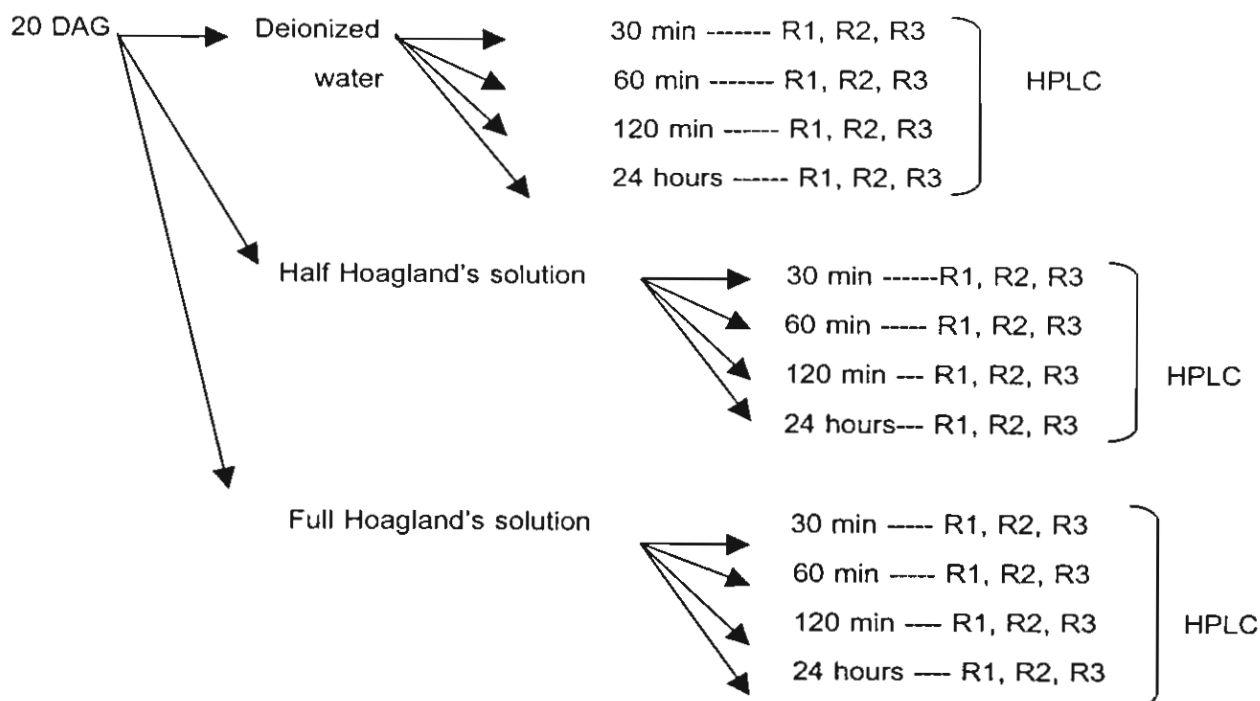
การทดลองในปี พ.ศ. 2544 ณ มหาวิทยาลัยจอร์เจีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ทำการปลูกถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 329CC, 419CC, 511CC และพันธุ์ Georgia Green ในถังปลูกขนาด 200 ลิตรด้วยทรายละเอียด ภายใต้สภาพโรงเรือน ทุกถังปลูกติดตั้งท่อ mini-rhizotron ที่ระดับ 5, 25, 50, 75 เซนติเมตร สำหรับสอดกล้อง mini-rhizotron (ภาพ 1) เพื่อการสำรวจการเจริญเติบโตของราก และฝักถั่วลิสง แบ่งกรรมวิธีการให้น้ำสารละลาย half Hoagland แก่ถั่วออกเป็น 2

กรรมวิธี คือ ให้น้ำที่จุดอิมตัว (ให้น้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง) และให้ขาดน้ำ 2 สัปดาห์สลับกับการให้น้ำตามปกติ 1 สัปดาห์ เมื่อถั่วอายุได้ 30-40 วันหลังปลูก ทำการปลูกเชื้อ GPF *A. flavus* ลงบนผิวทรายตรงตำแหน่งท่อ mini-rhizotron แล้วหลังจากนั้น ใช้กล้อง mini-rhizotron ส่องตรวจการเจริญของเชื้อรา GPF *A. flavus* บริเวณที่รากเจริญด้วยแสง UV ทำการเก็บรวบรวมภาพที่ได้ลงในคอมพิวเตอร์ แล้วนำภาพข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์การเรืองแสงสีเขียวด้วย QuaCos program โดยข้อมูลจะบันทึกปริมาณการเรืองแสงสีเขียวต่อภาพที่ได้ ในระยะเกิดฝักก็ทำการสำรวจบริเวณที่เกิดฝัก แล้วรวบรวมภาพข้อมูลวิเคราะห์เช่นเดียวกัน

การทดลองในปี 2545 - 2546

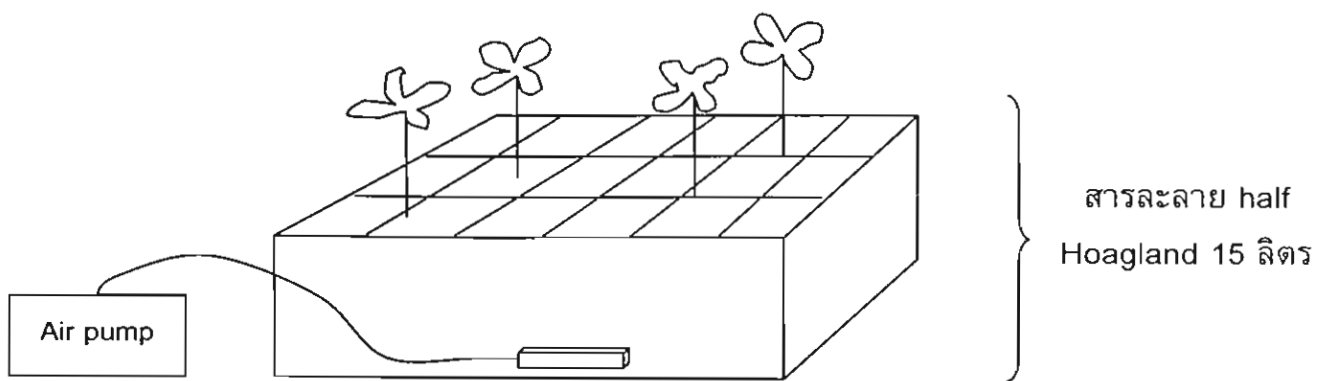
ได้แบ่งการทดลองเป็น 2 ช่วงการทดลอง คือ ช่วงแรกทำการประเมินอายุของต้นถั่วลิสงที่ควรเก็บ, ช่วงระยะเวลาการแช่ราก และชนิดของสารละลายที่ใช้แช่รากถั่วลิสง ตามลำดับ ช่วงที่ 2 นำผลจากช่วงการทดลองแรกมาใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลในถั่วลิสงสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

การทดลองที่ 1 ทำการปลูกถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 โดยเริ่มจากเพาะเมล็ดถั่วด้วยกระดาษเพาะ (Between paper) ประมาณ 3 วัน เมื่อรากถั่วเริ่มงอกยาว 2-3 เซนติเมตร ย้ายเมล็ดถั่วดังกล่าว ไปปลูกในระบบ hydroponic ด้วยสารละลาย half Hoagland เป็นระยะเวลา 2 เดือน เปลี่ยนน้ำสารละลายทุกๆ 7 วัน ในกรณีที่เกิดโรค แมลงเข้าทำลายต้นถั่ว ทำการฉีดพ่นสารเคมีตามความจำเป็น ได้แก่ อะซิไดน เมื่อต้นถั่วลิสงอายุได้ 20, 40 และ 60 วันหลังปลูก สุ่มเก็บตัวอย่างต้นถั่วลิสงจากแต่ละถังปลูก (2 ต้น ต่อ 1 ถังปลูก) ล้างรากถั่วด้วยน้ำธรรมดา แล้วนำต้นถั่วโดยเฉพาะส่วนของรากถั่วไปแช่ในบีกเกอร์ที่มีสารละลาย 3 ชนิด ได้แก่ Deionized water, half Hoagland's solution และ full Hoagland's solution ทำการแช่รากถั่วในสารละลายทั้ง 3 ชนิด เป็นระยะเวลา 30, 60, 120 นาที และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังไดอะแกรมข้างล่าง



และเมื่อถั่วลิสงอายุได้ 40 และ 60 วันหลังปลูกทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับที่ 20 วันหลังปลูก เมื่อครบกำหนดเวลาที่แช่รากถั่ว เก็บตัวอย่างสารแขวนลอยที่ได้จากการแช่รากถั่ว (root exudates) ไว้ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาดเล็ก แล้วนำไปแช่เก็บที่อุณหภูมิ -20°C หลังจากนั้นนำสารแขวนลอย root exudates ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล กลูโคส ซูโครส และ ฟรุคโทส ด้วยเครื่องมือ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ซึ่งมีสภาวะดังนี้ mobile phase: Acetronotile : H_2O (70:30); inject volume: $20\ \mu\text{l}$; flow rate: $1\ \text{ml/min}$; sensitivity: $1.0\text{:E-}07\ \text{RIU/mV}$; HPLC column: packed column, $5\ \mu\text{m}$, length $250\ \text{mm}$

การทดลองที่ 2 ได้นำผลการทดลองจากการทดลองที่ 1 มาใช้ โดยเริ่มต้นจากฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ด้วย clorox 10% เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง เพาะเมล็ดถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 419CC (อ่อนแอต่อสภาวะขาดน้ำและการเกิดสารอะฟลาท็อกซิน), 511CC (ต้านทานต่อสภาวะขาดน้ำและการเกิดสารอะฟลาท็อกซิน) และพันธุ์ Luhua 11 (ต้านทานต่อการเกิดสารอะฟลาท็อกซิน) , ไทนาน 9 (พันธุ์นิยมปลูกในประเทศไทย)* ด้วยกระดาษเพาะ (Between paper) จนเกิดรากประมาณ 3-5 วัน ย้ายเมล็ดถั่วลิสงทั้ง 4 สายพันธุ์ลงในถังปลูกระบบ hydroponic จำนวน 4 ต้นต่อถัง (1 ซ้ำ) ของแต่ละสายพันธุ์จำนวน 4 ซ้ำการทดลอง ในถังปลูกบรรจุสารละลาย half Hoagland's solution อยู่ประมาณ 15 ลิตรต่อถัง และแต่ละถังปลูกติดตั้งสายยางให้อากาศจากปั๊ม ดังรูป ระบบ hydroponic ทั้งหมดอยู่ในสภาพโรงเรือนกระจก



ทุก ๆ 7 วันเปลี่ยนสารละลาย half Hoagland พร้อมกับวัดค่า DOC ของน้ำ ด้วยเครื่องมือออกซิเจนอิเล็กโทรด เมื่อถั่วลิสงทั้ง 4 สายพันธุ์มีอายุได้ 30 วันหลังปลูก (ระยะออกดอก) แบ่งถั่วแต่ละสายพันธุ์ออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดแรก คือ ชุดควบคุมให้สารละลายตามปกติ ส่วนชุดที่ 2 ชักน้ำให้เกิดภาวะเครียด (ขาดน้ำในต้นพืช) โดยผสมสาร polyethylene-glycol 4000 (PEG) ลงในน้ำ

* ไม่สามารถปลูกทดสอบถั่วลิสงสายพันธุ์ 329CC และ พันธุ์ Georgia Green เหมือนกับการทดลองที่มหาวิทยาลัยจอร์เจียได้ เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงทั้ง 2 สายพันธุ์มีความงอกที่ต่ำ และเมล็ดพันธุ์ขาดแคลน ไม่สามารถนำมาปลูกทดสอบได้อีก

สารละลายในถังปลูกถั่วลิสง โดยใส่ในปริมาณ 50 กรัมต่อ 1 ลิตรของสารละลาย เป็นเวลานานประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดสถานะเครียดในต้นถั่วด้วยเครื่องมือ LCA4 (Advance portable photosynthesis and transpiration measurement system) และ pressure bomb (Model 3000 series plant water status console soil moisture equipment crop)

หลังจากทำการวัดสถานะเครียดของน้ำในต้นพืช เก็บตัวอย่างต้นถั่วลิสงทุกถังปลูก (4 ต้นต่อถัง) ล้างส่วนของรากถั่วด้วยน้ำธรรมดา (พยายามอย่าให้รากถั่วขาดหรือเสียหาย) นำส่วนรากถั่วลิสงแช่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำ Deionized ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงตามที่กำหนด เก็บตัวอย่างสารแขวนลอย (root exudates) จากแต่ละบีกเกอร์ใส่ขวดพลาสติก แช่เก็บที่อุณหภูมิ -20°C ส่วนต้นถั่วลิสงตัดแยกออกจากส่วนราก นำส่วนลำต้นและใบไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°C นาน 48 ชั่วโมง ส่วนรากถั่วนำมาย้อมสีด้วย methyl violet ใน 95% ethanol (2.5 กรัม methyl violet ใน 250 มิลลิลิตร 95% ethanol แล้วเจือจางใน 1 มิลลิลิตรต่อ น้ำ 100 มิลลิลิตร)

นำสารแขวนลอย root exudates ที่ได้จากถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ ไปเลี้ยงเชื้อรา GFP *A. flavus* ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร โดยนำทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 20 กรัม ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ หยดสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา GFP *A. flavus* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารแขวนลอย root exudates ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30°C) เป็นเวลานาน 5 วัน หลังจาก 5 วันทำการประเมินปริมาณการเจริญของเชื้อรา GFP *A. flavus* บนแต่ละจานเพาะเชื้อ โดยวิธี soil dilution technique (ปั้นผสมทราย 20 กรัม จากแต่ละจานเพาะเชื้อที่บ่มไว้ กับน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 200 มิลลิลิตร นาน 1 นาที แล้วทำการเจือจางสารผสมที่ปั้นจนถึงระดับความเข้มข้นที่ 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ดูดสารผสม 0.5 มิลลิลิตร (500 ไมโครลิตร) จากแต่ละความเข้มข้นหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ M3S1B ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ประกอบด้วย 5.0 g peptone, 1.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30.0 g NaCl, 20.0 g agar, 50.0 mg streptomycin sulfate, 50.0 g chlorotetracycline, 1.0 mg 2,6-dichloro-4-nitroaniline (added in 3 ml acetone), and 1 liter distilled water) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร ผลที่ได้บันทึกเป็นจำนวนโคโลนี (colonies forming unit) ต่อ กรัมดิน)

สารแขวนลอย root exudates อีกส่วนหนึ่งนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล กลูโคส ซูโครส และ ฟรุคโทส ที่ปลดปล่อยออกมาจากรากและหมักของถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ ด้วยเครื่องมือ HPLC ที่มีสภาวะดังนี้ mobile phase: Acetonitrile: H_2O (75:25); flow rate: 1.5 ml/min; inject volume: 25 μl ; sensitivity: 1.0×10^{-7} RIU/mV; HPLC column: packed column, 5 μm , length 250 mm

ส่วนรากแก้วลิสงที่ย้อมสีไว้ นำมาหาความยาวรากทั้งหมด พื้นที่ผิวราก ปริมาตรราก และ เส้นผ่านศูนย์กลางราก ด้วย WinRhizo program (V.4.0 B, RE'ERENT INSTRUMENT INC. 4040 Blain St., Quc'bee (Quc'bee) G2B 5CB CANADA, Tel: (418) 840- 1347; Fax: (418) 840-1350.)

นอกจากนี้ ทำการปลูกแก้วลิสง 4 สายพันธุ์เหมือนกับพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองช่วงที่ 2 ในถึงขนาดเล็กที่บรรจุทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 2 ต้นต่อถังปลูก จำนวน 4 ซ้ำการทดลอง และ กำหนดให้มีชุดควบคุม(ทรายไม่มีการปลูกแก้วลิสง)ในการเปรียบเทียบ ให้น้ำทุกถังปลูกด้วยสารละลาย half Hoagland เมื่อแก้วอายุได้ 30 วันหลังปลูก (ระยะออกดอก) เก็บตัวอย่างทรายบริเวณรากแก้ว มาเลี้ยงเชื้อรา GFP *A. flavus* ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยนำทราย 20 กรัม รวมกับสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา GFP *A. flavus* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน แล้วประเมินจำนวนเชื้อรา *A. flavus* ด้วยวิธี soil dilution technique บันทึกผลที่ได้เป็นจำนวนโคโลนีเชื้อราต่อกรัมทราย

ผลการทดลอง

ผลการทดลองในปี 2544 ที่ได้ทำการทดลองที่มหาวิทยาลัยจอร์เจีย โดยใช้กล่อง mini-rhizotron สำนวความหนาแน่นของประชากรเชื้อรา GFP *A. flavus* ด้วยแสง UV ที่เจริญอยู่ในบริเวณรากใต้ดิน แล้ววิเคราะห์การเรืองแสงสีเขียวของเชื้อรา ด้วย QuaCos program ผลปรากฏว่า บริเวณที่รากเจริญอยู่มีเชื้อราเจริญอยู่รอบๆ (ภาพ 2-3) ซึ่งถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC และ 511CC มีความหนาแน่นของเชื้อรามากกว่าสายพันธุ์ 329CC และ Georgia Green ตามลำดับ ถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC และ 511CC เป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาวะแห้งแล้ง และทนต่อสภาวะแห้งแล้ง ตามลำดับ แต่กลับพบว่า ในถั่ว 2 สายพันธุ์นี้มีการเจริญของเชื้อราที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตาราง 1) ส่วนในถั่วลิสงสายพันธุ์ 329CC พบว่ามีการเจริญของเชื้อราในกรรมวิธีที่ให้น้ำตามปกติมากกว่าในสภาวะขาดน้ำ ซึ่งให้ผลที่แตกต่างจากถั่วสายพันธุ์อื่น ที่มีการเจริญของเชื้อราในสภาวะแห้งแล้งมากกว่า นั่นอาจเป็นไปได้ว่าบริเวณรากของถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC และ 511CC มีสารบางอย่างที่ส่งเสริมให้เชื้อราเจริญได้ดี อีกทั้งในสภาวะแห้งแล้งทำให้เชื้อราเจริญมากยิ่งขึ้น ยกเว้นถั่วลิสงสายพันธุ์ 329CC ซึ่งอาจไม่มีสารที่กระตุ้นการเจริญของเชื้อราเหมือนถั่วสายพันธุ์อื่น

ตาราง 1 ความหนาแน่นของประชากรเชื้อรา GFP *A. flavus* บริเวณราก ประเมินโดย QuaCos program

สายพันธุ์ถั่วลิสง	ปริมาณเรืองแสงสีเขียวต่อภาพ		ค่าเฉลี่ย
	สภาวะแห้งแล้ง	สภาวะน้ำปกติ	
329CC	9,284.35	10,078.20	9,681.28 bc
419CC	17,419.75	9,913.60	13,666.68 a
511CC	11,799.30	10,436.05	11,117.68 ab
Georgia Green	10,624.07	4,768.93	7,696.50 c
ค่าเฉลี่ย	12,392.39 a	9,067.88 b	10,730.14

อักษร a b c แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

ตาราง 2 ความหนาแน่นของประชากรเชื้อรา GFP *A. flavus* บริเวณฝัก ประเมินโดย QuaCos program

สายพันธุ์ถั่วลิสง	ปริมาณเรืองแสงสีเขียวต่อภาพ		ค่าเฉลี่ย
	สภาวะแห้งแล้ง	สภาวะน้ำปกติ	
329CC	1,936.10	1,538.10	1,731.10 c
419CC	2,953.70	3,065.10	3,009.40 a
511CC	2,927.55	1,775.80	2,351.68 b
Georgia Green	2,666.93	2,212.07	2,437.00 ab
ค่าเฉลี่ย	2,617.01 a	2,143.48 b	2,380.24

อักษร a b c แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P=0.05

จากตาราง 2 ทำการสำรวจและวิเคราะห์ความหนาแน่นของเชื้อรา GFP *A. flavus* เช่นเดียวกับตาราง 1 ปรากฏว่า บริเวณที่ฝักเจริญมีเชื้อราเจริญอยู่รอบๆ ฝัก (ภาพ 4-5) ซึ่งถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC และพันธุ์ Georgia Green มีเชื้อราเจริญมากกว่าสายพันธุ์อื่น และในสภาวะแห้งแล้งทำให้เชื้อรามีความหนาแน่นมากกว่าในสภาวะให้น้ำปกติ ยกเว้นถั่วสายพันธุ์ 419CC กลับมีเชื้อราเจริญบริเวณฝักน้อยกว่าในสภาวะปกติ แต่ก็แตกต่างกันน้อยมาก (ไม่ถึง4%) และเมื่อเปรียบเทียบกับตาราง 1 พบว่า บริเวณที่รากเจริญมีความหนาแน่นของเชื้อราในปริมาณที่มากกว่า บริเวณที่เกิดฝักอย่างเห็นได้ชัด

จากตาราง 1 และ 2 ทำให้เกิดข้อสงสัยต่อไปอีกว่า ทำไมเชื้อราถึงมีการเจริญในบริเวณที่ราก และฝักเจริญ โดยเฉพาะบริเวณผิวราก ผิวฝักถั่ว และในถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ก็มีความหนาแน่นของเชื้อราที่แตกต่างกัน จึงเกิดข้อสมมุติฐานขึ้นมาว่า บริเวณดังกล่าวอาจมีสารจำพวกคาร์บอนที่เป็นแหล่งอาหารในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ก็ได้จึงได้ทำการศึกษาต่อไปอีก

ผลการทดลองในระหว่างปี 2545- 2546

การทดลองที่ 1

จากการวิเคราะห์สารแขวนลอย root exudates ที่ได้จากการแช่รากถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ด้วยเครื่องมือ HPLC ปรากฏว่า สารละลายที่ใช้แช่รากทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณน้ำตาล ที่ปลดปล่อยออกมาจากรากถั่วและฝักถั่วจริง (ดังตาราง 3) ซึ่งปริมาณน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโทส และซูโครสที่ปลดปล่อยออกมามีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P= 0.05) เมื่อถั่วอายุตั้งแต่

20 วันหลังปลูก จนกระทั่งถึง 60 วันหลังปลูก และช่วงระยะเวลาที่ทำการแช่รากแก้วตัวอย่างในสารละลายชนิดต่างๆ ตั้งแต่ 30 นาที ถึง 24 ชั่วโมง ก็ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ในสารละลาย 3 ชนิดที่แตกต่างกัน ผลปรากฏว่า รากแก้วที่แช่ในน้ำ Deionized มีปริมาณน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโทส และซูโครส ที่ปลดปล่อยออกมามากกว่าในสารละลาย full Hoagland และ half Hoagland ตามลำดับ (ดังตาราง 4)

ตาราง 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทส ซูโครส ต่อต้นของถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ที่เก็บตัวอย่างเมื่ออายุต่างกัน 3 ระยะ และแช่ในสารละลายต่างกัน 3 ชนิด เป็นระยะเวลาต่างกัน 4 ระยะเวลา

ชนิดน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อต้น)	วันหลังปลูก			ชนิดสารละลาย			ระยะเวลาแช่ราก			
	20	40	60	Deionized water	half Hoagland	full Hoagland	30 นาที	60 นาที	120 นาที	24 ชั่วโมง
กลูโคส	47.876	275.020	323.570	624.450	5.740	16.283	522.180	34.017	126.710	179.060
ฟรุคโทส	252.330	382.85	9252.8	9751.8	11.555	124.62	12504	74.265	269.75	336.21
ซูโครส	48.824	63.538	98.683	139.43	2.099	69.516	33.933	69.875	46.072	131.51

ตาราง 4 ผลทางสถิติของปริมาณน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโทส และซูโครส ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างที่อายุต่างกัน 3 ระยะ แช่ในสารละลาย 3 ชนิด และระยะเวลาแช่ราก 4 ระยะเวลา

กรรมวิธี	ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อต้น)		
	กลูโคส	ฟรุคโทส	ซูโครส
วันหลังจากปลูก	ns	ns	ns
ชนิดสารละลายที่ใช้แช่	*	ns	ns
เวลาที่ใช้แช่รากแก้ว	ns	ns	ns

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ P= 0.05

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ P= 0.05

จากการทดลองนี้ ถึงแม้ว่าผลทางสถิติให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ทำการวิเคราะห์เมื่อถั่วลิสงอายุได้ 60 วันหลังปลูก และแช่รากในน้ำ Deionized มีปริมาณน้ำตาลมากที่สุด อีกทั้งแช่รากที่ 24 ชั่วโมงก็มีปริมาณน้ำตาลมากเช่นกัน ดังนั้น จึงนำผลของการทดลองนี้ไปปรับใช้ในการทดลองช่วงที่ 2 โดยจะกำหนดวิธีการ คือ ทำการเก็บตัวอย่างต้นถั่วลิสงเมื่ออายุได้ 30 วันหลังปลูก** (flowering stage) ถือว่าเป็นช่วงที่ค่อนข้างวิกฤตสำหรับถั่วลิสง แล้วนำไปแช่ในน้ำ Deionized เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำสารแขวนลอย root exudates ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลต่อไป และจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่ารากถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ที่ใช้ทดสอบนี้มีปริมาณน้ำตาลฟรุคโทส มากกว่าน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ตามลำดับ

การทดลองที่ 2

เมื่อทำการปลูกทดสอบถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ โดยใช้ผลการทดลองจากช่วงที่ 1 มาปรับใช้เพื่อหาปริมาณน้ำตาลที่ปลดปล่อยจากรากถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ ผลที่ได้ดังนี้

ตาราง 5 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ปลดปล่อยจากรากถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ ในสภาวะปกติและสภาวะเครียด

สายพันธุ์ถั่ว กรรมวิธี	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อต้น)				ค่าเฉลี่ย
	419CC	511CC	Luhua 11	ไทนาน 9	
ไม่ใส่ PEG (ชุดควบคุม)	15.667	8.394	6.244	85.250	28.888
ใส่ PEG (สภาวะเครียด)	3.486	48.350	34.360	20.251	26.611
ค่าเฉลี่ย	9.577	28.372	20.302	52.750	27.750

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ถั่วลิสงทั้ง 4 สายพันธุ์ มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ตาราง 5) สามารถที่จะบ่งบอกได้ว่า ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสมากกว่าถั่วสายพันธุ์ 511CC, Luhua 11 และ 419CC ตามลำดับ และเมื่อชักนำให้เกิดสภาวะเครียดด้วยสาร PEG เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ทำให้ถั่วลิสงสายพันธุ์ 511CC และ Luhua 11 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ปลดปล่อยออกมาจากรากมากกว่าถั่วลิสงที่อยู่ในสภาวะปกติ แต่ถั่วสายพันธุ์ 419CC และไทนาน 9 กลับมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ปลดปล่อยออกมาในสภาวะเครียดน้อยกว่าสภาวะปกติ

** เหตุที่เก็บต้นถั่วที่อายุน้อยกว่า 60 วันหลังปลูก เนื่องจากต้องทำการวัดความยาวรากถั่วทั้งต้น ถ้าหากถั่วมีอายุมากเกินไปจะทำให้รากถั่วเจริญพันกันมากเกินไป และยากแก่การวัดด้วย WinRhizo program

ตาราง 6 ปริมาณน้ำตาลฟรุทโทสที่ปลดปล่อยจากรากถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ ในสภาวะปกติและ
สภาวะเครียด

สายพันธุ์ถั่ว กรรมวิธี	ปริมาณน้ำตาลฟรุทโทส (มิลลิกรัมต่อดัน)				ค่าเฉลี่ย
	419CC	511CC	Luhua 11	ไทนาน 9	
ไม่ใส่ PEG (ชุดควบคุม)	28.095	41.925	5.936	81.990	39.487
ใส่ PEG (สภาวะเครียด)	45.104	39.674	4.281	5.409	23.617
ค่าเฉลี่ย	36.600	40.799	5.109	43.700	31.552

ค่าเฉลี่ยน้ำตาลฟรุทโทสของถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งกรรมวิธีการชักนำให้เกิดสภาวะเครียดในต้นถั่วก็ไม่มีผลต่อการปลดปล่อยน้ำตาลจากราก ยกเว้นถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC ที่ปลดปล่อยน้ำตาลฟรุทโทสออกมามากเมื่อรากอยู่ในสภาวะเครียด และจากตาราง 6 พบว่าถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 มีการปลดปล่อยน้ำตาลฟรุทโทสออกมามากที่สุด และเมื่อเทียบกับตาราง 3 จะเห็นได้ยิ่งกว่า ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในช่วงการทดลองที่ 1 มีปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้ในปริมาณที่มากกว่า โดยเฉพาะน้ำตาลฟรุทโทส เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากขณะที่เก็บตัวอย่างรากถั่วในช่วงการทดลองที่ 1 รากเกิดความเสียหาย ขาด และเกิดรอยแผล

ตาราง 7 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ปลดปล่อยจากรากถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ ในสภาวะปกติและ
สภาวะเครียด

สายพันธุ์ถั่ว กรรมวิธี	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อดัน)				ค่าเฉลี่ย
	419CC	511CC	Luhua 11	ไทนาน 9	
ไม่ใส่ PEG (ชุดควบคุม)	12.653	0.000	27.154	26.262	16.517
ใส่ PEG (สภาวะเครียด)	73.375	42.906	36.592	43.128	48.750
ค่าเฉลี่ย	42.514	21.453	31.873	34.695	32.634

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสจากถั่วลิสง 4 สายพันธุ์มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อีกทั้งในสภาวะปรกติและสภาวะเครียดก็มีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน (ตาราง 7) และจากตารางก็เห็นได้ว่าถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC มีปริมาณน้ำตาลซูโครสมากกว่าถั่วสายพันธุ์อื่นๆ ในสภาวะเครียดที่ชักนำให้เกิดโดยสาร PEG 4000 ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลซูโครสจากรากของถั่วลิสงทั้ง 4 สายพันธุ์มากกว่าในสภาวะปกติ ซึ่งจะเห็นได้ชัด ในถั่วลิสงสายพันธุ์ 511CC ในสภาวะปกติไม่มีการปลดปล่อยน้ำตาลซูโครสออกมาเลย แต่เมื่อเกิดสภาวะเครียดกลับปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสออกมา นั้นแสดงให้เห็นว่าในสภาวะเครียดหรือพืชขาดน้ำของถั่วลิสงทำให้เกิดการปลดปล่อยหรือรั่วไหลของน้ำตาลซูโครสออกมามาก เนื่องจากเซลล์ของพืชเกิดความเสียหายในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้เกิดการรั่วไหลของน้ำตาลภายในเซลล์ออกมาภายนอกเซลล์

หลังจากที่นำสารแขวนลอย root exudates ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ แล้วนำสารแขวนลอยอีกส่วนหนึ่งไปเลี้ยงเชื้อรา GFP *A. flavus* ด้วยทรายในจานเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่เจริญต่อทราย 1 กรัม พบว่า เชื้อรา *A. flavus* มีการเจริญในจำนวนที่ค่อนข้างมาก แต่ก็ยังมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนสปอร์เชื้อราก่อนนำมาเลี้ยงด้วยสารแขวนลอย root exudates (เริ่มต้นที่ 6.05×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากว่า สปอร์ที่นับเริ่มต้นมีทั้งสปอร์ที่ตายและมีชีวิตปนกัน ซึ่งสปอร์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ และเมื่อนำไปเลี้ยงด้วยน้ำตาลจากสารแขวนลอย ก็พบว่า ไม่ได้ทำให้จำนวนของเชื้อราเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะสารแขวนลอยที่มีปริมาณน้ำตาลน้อยเกินไปหรือไม่เพียงพอที่เชื้อราจะใช้ในการเจริญ (ดังตาราง 8) และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ก็พบว่า สารแขวนลอย root exudates ของถั่วลิสงแต่ละพันธุ์ ทำให้เชื้อราเจริญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อมีการเจริญมากในสารแขวนลอยที่ได้จากถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC และพันธุ์ Luhua 11

ตาราง 8 การเจริญของเชื้อรา GFP *A. flavus* หลังจากเลี้ยงด้วยสารแขวนลอย root exudates ของถั่วลิสง 4 สายพันธุ์

สายพันธุ์ถั่ว กรรมวิธี	จำนวนเชื้อราที่เจริญ (โคโลนีx10 ⁴ ต่อทราย 1 กรัม)				ค่าเฉลี่ย
	419CC	511CC	Luhua 11	ไททาน 9	
ไม่ใส่ PEG (ชุดควบคุม)	11.667	9.333	13.000	9.000	10.750
ใส่ PEG (สภาวะเครียด)	13.667	13.000	16.667	9.000	13.083
ค่าเฉลี่ย	12.667 ab	11.167 bc	14.833 a	9.000 b	11.917

อักษร a b c แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P=0.05

ด้วยเหตุนี้ จึงนำทรายที่ได้จากการปลูกถั่วลิสงตามสภาพธรรมชาติจริงๆ มาเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ในจานเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง พบว่า ทรายที่ปลูกถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC, Luhua 11, ไทนาน 9 และ 511CC มีเชื้อราเจริญในจำนวน 12.5×10^4 , 10.0×10^4 , 9.5×10^4 , 9.25×10^4 โคโลนีต่อกรัมทรายตามลำดับ เมื่อเทียบกับทรายที่ไม่มีถั่วลิสงปลูก (ชุดควบคุม) มีจำนวนเชื้อรา 5.75×10^4 โคโลนีต่อกรัมทราย และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ ทรายที่ปลูกถั่วลิสงทั้ง 4 สายพันธุ์มีปริมาณเชื้อราเจริญได้ดีกว่าในทรายที่ไม่มีถั่วปลูก นั้นแสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *A. flavus* มีการเจริญได้ดีในทรายที่ปลูกถั่ว ซึ่งมีสารตั้งต้นสำหรับการเจริญ อาจได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส ที่ปลดปล่อยออกมาจากรากถั่วลิสง ตลอดจนสารอินทรีย์จำพวกเซลล์ผิวรากที่ตาย หลุดอยู่ในดิน

ความยาวรากถั่วลิสงทั้งหมดต่อต้น

นำรากที่ย้อมสีไว้มาวัดความยาวราก พื้นที่ผิวราก ปริมาตรราก และเส้นผ่าศูนย์กลางรากด้วย WinRhizo program ปรากฏว่า ผลวิเคราะห์ทางสถิติพื้นที่ผิวราก ปริมาตรราก และเส้นผ่าศูนย์กลางรากของถั่วลิสงทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สำหรับความยาวรากถั่วต่อต้นของถั่วลิสงทั้ง 4 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 มีความยาวรากมากกว่าถั่วลิสงสายพันธุ์ 511CC และ Luhua 11 ตามลำดับ ดังตาราง 9

ตาราง 9 ความยาวรากถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ ที่ทำการวัดด้วย WinRhizo program

สายพันธุ์ถั่ว กรรมวิธี	ความยาวรากถั่วลิสง (เซนติเมตรต่อต้น)				ค่าเฉลี่ย
	419CC	511CC	Luhua 11	ไทนาน 9	
ไม่ใส่ PEG (ชุดควบคุม)	6,507.2	5,270.7	5,532.7	7,306.6	6,154.3
ใส่ PEG (สภาวะเครียด)	6,573.2	5,291.6	4,100.6	7,606.9	5,893.1
ค่าเฉลี่ย	6,540.2 ab	5,281.1 bc	4,816.7 c	7,456.8 a	6,023.7

อักษร a b c ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

สรุปและวิจารณ์

จากการทดลองทั้งหมดสามารถบ่งบอกได้ชัดเจนยิ่งขึ้นว่า บริเวณที่รากและฝักของถั่วลิสงเจริญอยู่ใต้ดิน (rhizosphere and geocarposphere) มีเชื้อรา *Aspergillus flavus* เจริญอยู่จริง ซึ่งสำรวจด้วยกล้อง mini-rhizotron และ QuaCos program โดยได้ประเมินจำนวนประชากรของเชื้อรา *A. flavus* จากการเรืองแสงสีเขียวสว่างของเชื้อรา พบว่า ถั่วลิสงสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาวะแห้งแล้งมีจำนวนเชื้อราเจริญมากกว่าถั่วลิสงสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะแห้งแล้ง (Ingram *et al.*, 1999) และเมื่อทดสอบหาสารที่ปลดปล่อยออกมาจากรากถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์ในสภาพที่รากไม่เกิดความเสียหาย ก็พบว่ารากถั่วลิสงแต่ละสายพันธุ์มีการปลดปล่อยสารจำพวกน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทส และซูโครสออกมาจริง (ตาราง 3)

จากตารางแสดงปริมาณน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด และความยาวรากถั่วลิสงต่อต้น (ตาราง 9) พบว่า ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 และสายพันธุ์ 419CC ซึ่งมีความยาวรากต่อต้นมากที่สุด มีน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทส และซูโครสปลดปล่อยออกมามากกว่าถั่วลิสงสายพันธุ์ 511CC และพันธุ์ Luhua 11 นั้นแสดงให้เห็นว่า ถั่วลิสงสายพันธุ์ที่มีความยาวของรากมาก มีการปลดปล่อย/รั่วไหลของน้ำตาลออกจากเซลล์มาก โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด (พืชขาดน้ำ) ยังส่งผลให้รากพืชปลดปล่อยน้ำตาลซูโครสออกมามาก (ตาราง 7) แต่สภาวะเครียดบางครั้งก็ไม่มีผลต่อการปลดปล่อยน้ำตาลฟรุคโทสของถั่วลิสง (ตาราง 6) ยกเว้นถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC ที่มีปริมาณน้ำตาลฟรุคโทสปลดปล่อยออกมามาก ถึง 45.104 มิลลิกรัมต่อต้น แสดงให้เห็นชัดเจนว่า ถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC มีการปลดปล่อยน้ำตาลฟรุคโทสออกมามาก แม้ว่าจะอยู่ในสภาวะเครียดหรือไม่ก็ตาม แต่ก็ยังมีปริมาณน้ำตาลที่ปลดปล่อยออกมาน้อยกว่าถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 และนอกจากนี้สภาวะขาดน้ำยังส่งผลทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลซูโครสออกมาในถั่วลิสงทุกสายพันธุ์ โดยเฉพาะถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC ซึ่งเป็นถั่วพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาวะขาดน้ำ มีการปลดปล่อยน้ำตาลซูโครสออกมามากกว่าสายพันธุ์ 511CC ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำ เกือบ 50%

Hale and Griffin, (1975) ได้ทดสอบหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ปลดปล่อยออกจากฝักอ่อนถั่วลิสงที่ทำให้เกิดรอยแผลบริเวณผิวฝัก และไม่เกิดแผล พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ปลดปล่อยจากถั่วทั้ง 2 พันธุ์จะแตกต่างกัน โดยฝักถั่วที่เกิดแผลจะมีปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟรุคโทสปลดปล่อยมาก ซึ่งการที่ฝักถั่วเกิดแผลหรือเกิดความเสียหายเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการเข้าทำลายจากเชื้อรา *A. flavus* (Ashworth *et al.*, 1965; McDonald and Harkness, 1964; Schroeder and Ashworth, 1965) ทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของถั่วลิสงจากเชื้อรา *A. flavus* เมื่อใส่สารแขวนลอย root exudates มาเลี้ยงเชื้อรา GFP *A. flavus* พบว่า ถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC และพันธุ์ Luhua 11 มีเชื้อรา *A. flavus* เจริญได้ดี เหตุที่เชื้อรา *A. flavus* เจริญได้ดีกว่าถั่วสายพันธุ์อื่น อาจเนื่องมาจากได้รับแหล่งอาหารน้ำตาลซูโครส และฟรุคโทสที่ปลดปล่อยจากรากถั่วในปริมาณที่มากกว่าอีก 2 สายพันธุ์

ได้มีการรายงานเกี่ยวกับความเสียหายที่เกิดขึ้นบริเวณรากถั่วลิสงและทำให้มีสารปลดปล่อยออกมาจากราก โดยเฉพาะรากแขนงและรากฝอยจะเป็นรากชุดที่มีการปลดปล่อยสารออกมาในปริมาณมากที่สุด (Schroth and Snyder, 1961; McDougall, 1968; McDougall and Rovira, 1970) ในบริเวณที่รากเจริญจะเป็นแหล่งหลักของการปลดปล่อยสารจำพวกคาร์บอน โดยเฉพาะส่วนของเซลล์ผิวรากที่ตาย/หลุด ซึ่งเป็นตัวส่งเสริมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* เมื่อนำทรายที่ปลูกถั่วลิสงมาเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* จะพบว่า ในทรายที่ปลูกถั่วจะมีสารที่ปลดปล่อยจำพวกน้ำตาลและเซลล์ผิวรากที่ตาย/หลุดอยู่ในทราย ซึ่งจะเป็นแหล่งอาหารที่ส่งเสริมให้เชื้อรา *A. flavus* เจริญได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับทรายที่ไม่มีการปลูกถั่ว

การทดลองนี้สรุปได้ว่า ถั่วลิสงสายพันธุ์ 511CC ซึ่งเป็นถั่วสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำและต้านทานต่อสารอะฟลาท็อกซินจะมีการปลดปล่อยน้ำตาลซูโครสออกมาในปริมาณที่น้อย แต่ถั่วลิสงสายพันธุ์ 419CC ซึ่งอ่อนแอต่อสภาวะแห้งแล้งและไม่ต้านทานต่อสารอะฟลาท็อกซิน จะมีน้ำตาลซูโครสปลดปล่อยออกมาในปริมาณที่มาก แสดงว่า แหล่งอาหารน้ำตาลที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* คือ น้ำตาลซูโครส ในถั่วลิสงพันธุ์ Luhua 11 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนต่อสารอะฟลาท็อกซินก็มีการปลดปล่อยน้ำตาลซูโครสมากเช่นกัน ถึงแม้ว่าจะอยู่ในสภาวะปกติก็ตาม สำหรับถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทยแต่ยังไม่ได้ระบุชัดเจนว่าต้านทานต่อสารอะฟลาท็อกซินหรือไม่ จากการทดลองนี้สามารถบ่งบอกได้ว่าถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทส และซูโครสในปริมาณที่มาก ซึ่งจะเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- Ashworth L. J., Schroeder H. W. and Langley B. C. (1965) Aflatoxins: environmental factors governing occurrence in Spanish peanuts. *Science* 148, 1228- 1229.
- Hale, M. G., Griffin G. J. The effect of mechanical injury on exudation from immature and mature peanut fruits under axenic condition. *Soil Boil. Biochem.* 8, 225- 227.
- Ingram, K. T., G. F. Patena, and C. C. Holbrook. 1999. Drought and temperature effect on aflatoxin resistance peanut. Paper presented to 1999 Multicrop Aflatoxin elimination workshop. 20- 22 October, 1999, Atlanta, GA, USA.
- McDougall B. M. (1968) The exudation of ^{14}C -labelled substances from roots of wheat seedlings. *Trans. Ninth Inter. Cong. Soil Sci.*, Adelaide, pp. 647- 685.
- McDougall B. M. and Rovira A. D. (1970) Sites of exudation of ^{14}C -labelled compounds from wheat roots. *New Phytol.* 69. 999- 1003.
- McDonald D. and Harkness C. (1964) Growth of *A. flavus* and production of aflatoxin in ground nuts. Part IV. *Trop. Sci.* 6, 12- 27.
- Schroeder H. W. and Ashworth L. J., Jr (1965) Aflatoxin in Spanish peanuts in relation to pod and kernel condition. *Phytopathology* 55, 464- 465.
- Schroth M. N. and Snyder W. C. (1961) Effect of host exudates on chamydospore germination of the bean root rot fungus, *Fusarium solani f. phaseoli*. *Phytopathology* 51, 389- 393.