Agricultural Sci. J. 48 : 3 (Suppl.) : 141-144 (2017) ว. วิทย. กษ. 48 : 3 (พิเศษ) : 141-144 (2560)

การระบุชนิดเชื้อราที่แยกจากอาการ starburst ของเมล็ดข้าวโพดหลังการเก็บเกี่ยว และการสร้างฟูโมนิซิน
Identification of Fungal Isolated from Starburst Symptom on Maize and Fumonisin Production

พิสุทธิ์ เขียวมณี[1,2] สรรเสริญ รังสุวรรณ[1,2] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2] รัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2] และรณภพ บรรเจิดเชิดชู[1]
Pisut Keawmanee[1,2],Sansern Rangsuwan[1,2],Chainarong Rattanakreetakul[1,2],Ratiya Pongpisutta[1,2]and Ronnapop Bunjoedchoedchu[1]

Abstract

Maize grain grading was an initial step for select good quality raw material for production line. In this study, the contaminated fungi were isolated from the starburst maize and the fumonisin contaminated maize. For morphological identification, macroconidium shape was slender, straight and almost needle-like. Microconidium shape was obovoid with a truncate, which was produced on monophialide in chain and false head. Number of conidia on chain were more than 20 conidia. All of isolates weren't presence chlamydospore. These morphological data refer to *F. verticillioides*. Six isolates of *F. verticillioides* were selected by location and were inoculated into grinding maize for 30 days. The result revealed that the *F. verticillioides* inoculation maize sample showed 14-21 ppm of fumonisin B_1 after detected with AgarQuant Total Fumonisin Assay. This study was confirmed that starburst symptom on maize was given close related to fumonisin production and the contamination can be eliminated by the screening out of the starburst symptom on maize grain.

Keyword: fumonisin, starburst symptom, *F. verticillioides*

บทคัดย่อ

ในการคัดแยกเมล็ดข้าวโพดหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม จะใช้การตรวจสอบลักษณะความผิดปกติของเมล็ดข้าวโพด จากการตรวจสอบเชื้อราจากเมล็ดข้าวโพดที่แสดงอาการ starburst เทียบกับตัวอย่างข้าวโพดบดที่ตรวจพบฟูโมนิซิน ทำการแยกเชื้อ และระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เชื้อรามีการสร้าง macroconidia รูปร่างเรียวยาว สปอร์ค่อนข้างแคบ สร้าง microconidia จำนวนมาก โดยพบเป็นกลุ่ม false head หรือเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่จำนวนมากกว่า 20 conidia พบการสร้าง monophialide ไม่พบการสร้าง polyphialide และ chlamydospore ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *F. verticillioides* ทำการคัดเลือกเชื้อรา *F. verticillioides* จากแหล่งตัวอย่างเป็นตัวแทน จำนวน 6 ไอโซเลท ปลูกเชื้อลงในข้าวโพดบดหยาบเป็นเวลา 30 วัน ตรวจสอบความสามารถในการสร้างฟูโมนิซินด้วย AgarQuant Total Fumonisin Assay พบว่าเชื้อรา *F. verticillioides* มีความสามารถในการสร้างฟูโมนิซินในระดับ 14 - 21 ppm และลักษณะอาการ starburst มีความสัมพันธ์กับการสร้างฟูโมนิซิน ดังนั้นการหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนฟูโมนิซินในข้าวโพดทำได้โดยการเลือกใช้ข้าวโพดที่ไม่แสดงอาการ starburst

คำสำคัญ: ฟูโมนิซิน อาการ starburst *F. verticillioides*

คำนำ

สารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxin) เมื่อปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารนับเป็นปัญหาสำคัญในเรื่องของสุขภาพ องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ ได้รายงานการพบสารพิษจากเชื้อรามากกว่า 100 ชนิด ซึ่งเกิดจากเชื้อราประมาณ 200 ชนิด และทำให้เกิดการปนเปื้อนสารพิษในอาหารถึง 100 ล้านตันต่อปี (โครงการสารานุกรมไทย, 2556) จากรายงานของกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ (2550) พบเชื้อราที่สร้างสารพิษ ได้แก่ กลุ่มเชื้อรา genus *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* โดยสารพิษจะก่อให้เกิดการผ่าเหล่าทางพันธุกรรม (Mutagenic Effects) ในระดับเซลล์ เป็นสาเหตุให้เกิดเซลล์มะเร็ง (Carcinogenic Effect) จากการสำรวจของ Biomin (2015) พบว่าประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีความเสี่ยงสูงในด้านของการปนเปื้อนจากสารพิษจากเชื้อรา โดยร้อยละ 83 ของตัวอย่างที่ทำการสำรวจพบการปนเปื้อนของฟูโมนิซิน สอดคล้องกับรายงานของประกรณ์ และคณะ (2558) ที่พบว่าการปนเปื้อนฟูโมนิซินในประเทศไทยมีระดับการปนเปื้อนที่

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[1] Department of plant pathology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom 73140
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education Commission, Bangkok 10400

เกินมาตรฐาน โดยฟูโมซินเป็นสารพิษที่ส่งผลรุนแรงต่อม้าทำให้เกิดโรค equine leukoencephalomalacia (ELEM) ทำให้ม้าเสียการทรงตัว เนื่องจากสมองถูกทำลาย หรือสุกรจะทำให้เกิดโรค porcine pulmonary edema (PPE) กินอาหารได้น้อยลง ตับถูกทำลาย (Starkl and Noehrer, 2015) สาเหตุหลักของการแพร่กระจายฟูโมนิซินนั้นมีสาเหตุจากเชื้อรา *F. verticillioides* ในวัตถุดิบเกษตร ซึ่งมีรายงานการพบอาการ starburst บนเมล็ดข้าวโพด อันเนื่องมาจากเชื้อราเจริญเข้าไปในชั้น pericarp และสร้างสารทุติยภูมิเพื่อที่จะย่อยผนังเซลล์ในชั้น pericarp ทำให้เห็นลักษณะเป็นขีดขาว (Duncan and Howard, 2010) การศึกษาในครั้งนี้เป็นการจำแนกเชื้อรา *Fusarium* sp. ในข้าวโพดที่แสดงอาการ starburst และข้าวโพดที่พบฟูโมนิซินโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และความสัมพันธ์กับการสร้างฟูโมนิซิน

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อรา *Fusarium* sp. จากตัวอย่างข้าวโพด

ทำการแยกเชื้อรา *Fusarium* sp. จากอย่างเมล็ดข้าวโพดที่แสดงอาการ starburst จากจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดลพบุรี และจังหวัดนครปฐม บนกระดาษเพาะเมล็ด (Blotter method) และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar plate method) โดยใช้อาหาร Malachite Green Agar (MGA) (Castella *et al*., 1997), PCNB Peptone Agar (PPA) (Nash and Snyder, 1962) และ Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับตัวอย่างข้าวโพดป่นที่พบสารพิษฟูโมนิซิน ได้รับความอนุเคราะห์จากงานชันสูตรโรคสัตว์ (กำแพงแสน) ศูนย์วิจัยและบริการทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้นำมาทำ serial dilution แล้วเกลี่ยให้ทั่วลงบนหน้าอาหาร PPA, MGA และ PDA ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง near UV และ cool white fluorescent เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตบนผิวหน้าอาหาร ให้ทำการย้ายเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นทำการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) ก่อนที่จะนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การระบุชนิดของเชื้อรา *Fusarium* sp. โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* sp. โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี สีของโคโลนี และลักษณะของโคโลนี บนอาหาร PDA ที่ระยะเวลา 3 และ 7 วัน และตรวจดูลักษณะของ microconidia, macroconidia และ chlamydospore บนอาหาร Carnation Leaf-piece Agar (CLA) ดัดแปลงมาจาก Fisher *et al*. (1982) ที่ระยะเวลา 7 วัน รวบรวมข้อมูลดังกล่าวเทียบกับข้อมูลของเชื้อรา *Fusarium* sp. โดยเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏใน The *Fusarium* Laboratory Manual ของ Leslie and Summerell (2006)

การตรวจสอบเชื้อราที่สร้างฟูโมนิซินโดยใช้เทคนิค Enzyme Link Immumosorbent Assay (ELISA)

นำเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่ต้องการทดสอบ เพิ่มปริมาณในข้าวโพดโดยดัดแปลงวิธีของ Dilkin *et al*. (2002) ทำการบ่มตัวอย่างในที่มืด 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วัน นำมาตรวจสอบปริมาณฟูโมนิซินโดยใช้ชุดตรวจสอบ AgarQuant Total Fumonisin Assay (Romer Labs, Singapore)

ผลการทดลอง

การระบุชนิดของเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากข้าวโพดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการแยกเชื้อรา *Fusarium* sp. จากตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการ starburst และข้าวโพดที่พบฟูโมนิซิน พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา *Fusarium* sp. และสามารถแยกเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้ 21 ไอโซเลท จากข้าวโพดที่แสดงอาการ starburst และจากข้าวโพดที่ตรวจพบฟูโมนิซิน 2 ไอโซเลท ลักษณะเชื้อทุกไอโซเลทบนอาหาร PDA ที่ระยะเวลา 3 วัน มีโคโลนีฟู สีโอรส เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 - 3.5 และที่ระยะเวลา 7 วัน บนอาหาร CLA พบการสร้าง macroconidia ในบางไอโซเลท มีรูปร่างเรียวยาว พบการสร้าง foot cell เป็นรูป foot shape สร้าง microconidia รูปร่างคล้ายไข่ และกระบอง ฐานตัด 1 เซลล์ไม่มีผนังกั้นจำนวนมาก โดยพบเป็นกลุ่ม false head หรือเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ จำนวนมากกว่า 20 conidia สร้างจาก monophialide ไม่พบการสร้าง polyphialide และ chlamydospore ซึ่งลักษณะข้อมูลทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากข้าวโพดแสดงอาการ starburst และข้าวโพดที่พบฟูโมนิซิน เป็นเชื้อรา *F. verticillioides* (Figure 1)

การตรวจสอบเชื้อราที่สร้างฟูโมนิซินโดยใช้เทคนิค Enzyme Link Immumosorbent Assay (ELISA)

จากการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่คัดแยกได้เพื่อการสร้างฟูโมนิซินโดยใช้เทคนิค ELISA พบว่า เชื้อรา *Fusarium* sp. ทุกไอโซเลท มีความสามารถในการสร้างฟูโมนิซิน โดยไอโซเลท 329 ซึ่งเป็นที่แยกมาจากข้าวโพดที่ตรวจพบฟูโมนิซิน มีความสามารถในการสร้างฟูโมนิซินมากที่สุดที่ 21.89 ppm ไอโซเลท 003, PJ09, NR09, NR10, 301 มีสามารถสร้างฟูโมนิซินได้ 19.76, 14.62, 15.91, 18.51 และ 20.43 ppm ตามลำดับ (Table 1)

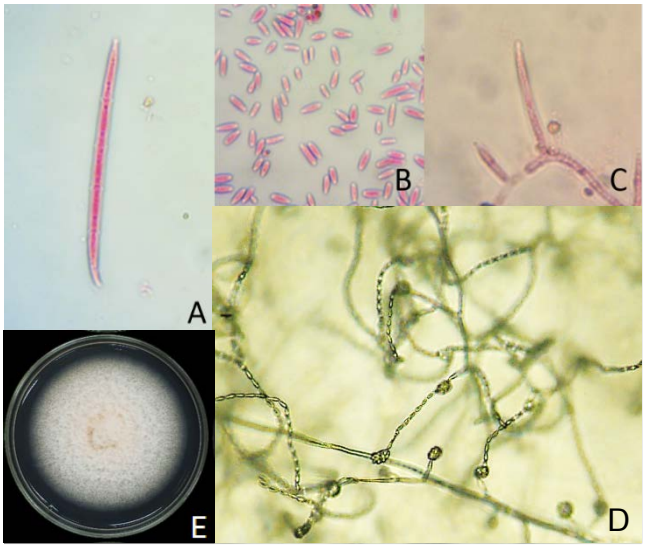

Figure 1 Morphological characteristic of *Fusarium verticillioides*. A : macrocomidia, B: microconidia, C: monophialide, D: microconidia with long chain on CLA incubated with alternating period of 12 h darkness/light at 25°C ± 2°C for 7 days, E: colony growing on PDA and incubated for 7 days

Table 1 Quantity of Fumonisin B1 detected by AgarQuant Total Fumonisin Assay

Location	Isolate	Fumonisin B1 quantity (ppm)
Nakhon Pathom	003	19.76
Lop Buri	PJ09	14.62
Nakhon Ratchasima	NR09	15.91
	NR10	18.51
Kamphaeng Saen Veterinary	301	20.43
Diagnosis Center	329	21.89

วิจารณ์ผล

จากการระบุชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากอาการ starburst และตัวอย่างที่พบการสร้างฟูโมนิซิน พบว่าเป็นเชื้อรา *F. verticillioides* ซึ่งเชื้อราดังกล่าวพบได้มาก และพบเป็นประจำในข้าวโพด (Leslie, 1996; Munkvold, 2003) สอดคล้องกับรายงานของ Dancan and Howard (2010) ที่ได้รายงานว่าเชื้อรา *F. verticillioides* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการ starburst ในข้าวโพด เชื้อราจะเข้าทำลายข้าวโพดผ่านทางส่วนของ stylar canal หลังจากนั้นเส้นใยของเชื้อรา *F. verticillioides* จะเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณในส่วน lumen ของ pericarp และสร้างสารทุติยภูมิเพื่อที่จะย่อยผนังเซลล์ในชั้น pericarp ทำให้เห็นลักษณะเป็นขีดขาว (white streak) ซึ่งเป็นที่มาของอาการ starburst Leslie and Summerell (2006) ; Visentin *et al.* (2009) รายงานว่าเชื้อรา *F. verticillioides* และ *F. proliferatum* มีความคล้ายคลึงกันทางสัณฐานวิทยาเป็นอย่างมาก มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยในส่วนของลักษณะ phialide ซึ่งเชื้อรา *F. verticillioides* สร้างเฉพาะ monophialide แตกต่างจากเชื้อรา *F. proliferatum* ซึ่งสร้างทั้ง monophialide และ polyphialide และจำนวนของ microconidia ใน chain ของ *F.*

proliferatum จะน้อยกว่า *F. verticillioides* Saa nchez-rangel *et al*. (2005) ; Ono *et al*. (2010) สามารถแยกเชื้อรา *F. verticillioides* จากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และเชื้อราดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างฟูโมนิซิน

สรุป

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* sp. จากข้าวโพดที่แสดงอาการ starburst และตัวอย่างที่พบการสร้างฟูโมนิซิน พบว่า การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ครบถ้วนสามารถใช้ตรวจสอบชนิดของเชื้อราได้โดยจะต้องมีการตรวจลักษณะของเชื้อรา ในด้านการเจริญเติบโตของโคโลนี สีของโคโลนี ลักษณะของโคโลนี รูปร่างของ microconidia, macroconidia และ chlamydospore และการสร้าง phialide โดยพบว่าเชื้อราดังกล่าวเป็นเชื้อรา *F. verticillioides* และยังพบว่าเชื้อราดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างฟูโมนิซิน ดังนั้นการหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนฟูโมนิซินในข้าวโพดที่จะนำไปใช้ในการแปรรูปทางอุตสาหกรรมทำได้โดยการเลือกใช้ข้าวโพดที่ไม่แสดงอาการ starburst

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาด้านโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และการได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กทม.

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์. 2550. สารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/qcontrol/images/stories/gfeed/ knowledge-toxin.pdf. (2 ตุลาคม 2558).

โครงการสารานุกรมไทย. 2556. สารานุกรมไทยสาหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่มที่ 14. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://kanchanapisek.or.thkp6/New/Sub/book/. (2 ตุลาคม 2558).

ประกรณ์ จาละ, อาสูตร สงวนเกียรติ, พิษณุ ตุลยกุลม, สุดธิดา เหล่าเปี่ยม และ ณัฐวุฒิ รัตนวนิชย์โรจน์. 2558. สถานการณ์สารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์ในประเทศไทย รายงานผลห้องปฏิบัติการระหว่างปี พ.ศ. 2553-2557. น. 609-615. ใน : รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์ ครั้งที่ 54 (สาขาสัตวแพทย์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Biomin. 2015. The global mycotoxin threat 2016. [Online]. Available Source: http://www.biomin.net/en/book.php?page =main&book=. (14 October 2015).

Castella, G., M.R. Bragulat, M.V. Rubiales and F.J. Cabanes. 1997. Malachite green agar, a new selective medium for *Fusarium* spp. Mycopathologia 137 (3): 173-178.

Dilkin, P., C.A. Mallmann, C.A.A. Almeida, E.B. Stefanon, F.Z. Fontana and E.L. Milbradt. 2002. Production of fumonisins by strains of *Fusarium monoliforme* according to temperature, moisture and growth period. Brazilian Journal of Microbiology 33: 111-118.

Duncan, K.E. and R.J. Howard. 2010. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. Molecular Plant-Microbe Interactions 23 (1): 6–16.

Fisher, N.L., L.W. Burgess, T.A. Toussoun and P.E. Nelson. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology 72: 151-153.

Leslie, J.F. 1996. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. 153-164. In Fumonisins in Food Plenum Press, New York.

Leslie, J.F. and B.A. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing.

Munkvold, G.P. 2003. Epidemiology of fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears. European Journal of Plant Pathology. 109: 705-713.

Nash, S. M. and W.C. Snyder. 1962. Quanlitative estimations by plate count of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 52: 567-572.

Ono, E.Y.S., M.H.P. Fungaro, S.H. Sofia, T. Miguel, Y. Sugiura and E.Y. Hirooka. 2010. *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn feed: characterization by fumonisin production and RAPD fingerprinting. Brazilian Archives of Biology and Technology 53: 953-960.

Saa nchez-rangel, D., A. Sanjuan and J. Plasencia. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. Agriculture and Food Chemistry 53: 8565-8571.

Starkl, V. and K. Noehrer. 2015. Fumonisin compendium. Biomin holding gmbh.

Visentin, I., G. Tamietti, D. Valentino, E. Portis, P. Karlovsky, A. Moretti and F. Cardinale. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. The British Mycological Society 113: 113-1145.