Agricultural Sci. J. 52 : 2 (Suppl.) : 53-56 (2021) ว. วิทย. กษ. 52 : 2 (พิเศษ) : 53-56 (2564)

การตรวจสอบเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยไพรเมอร์ afl R

Detection of Aflatoxin Producing *Aspergillus flavus* with the Primer afl R

ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2] สรรเสริญ รังสุวรรณ[1] รัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2] และ พิสุทธิ์ เขียวมณี[1]

Chainarong Rattanakreetakul[1,2], Sansern Rangsuwan[1], Ratiya Pongpisutta[1,2] and Pisut Keawmanee[1]

Abstract

Aspergillus flavus is important to agricultural product quality. The fungal pathogen can be found during the post-harvest period. The fungi are causal of aflatoxin produce in grain, which was toxic to consumers. In nature, some *A. flavus* strains showed nonaflatoxin production. Therefore, the aflatoxin detection procedure is essential to evaluate the fungal contamination in the agricultural product. In our study, *A. flavus* were isolated from maize grain in Nakhon Pathom province. The fungi were divided into groups: group 1; fungi produce a high number of sclerotia with less conidial head (AF1). Group 2 is highly conidial head produce and fewer sclerotia (AF2). Both *A. flavus* groups showed an orange color under colony growth in Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA). The aflatoxin content was highly observed in the AF1 fungal group with a pink to reddish color beneath the fungal colony grown in Yeast extract sucrose (YES) medium after the 25% ammonium hydroxide vapor. PCR determination with afl R primers (aflatoxin gene) can amplify the DNA amplicon size 500 bp for *A. flavus*, at 700 bp for *A. niger,* and 1200 bp for *Fusarium* sp. It referred the afl R primers can used for a quality control process with the amplicon size at 500 bp on the detection of the toxigenic *A. flavus*. While the YES medium can differentiate the aflatoxin producing *A. flavus* to each colony. This method needed to consider the fungal genus, which has color beneath the fungal colony and can disturb the outlook of activity.

Keywords: Aflatoxin, PCR detection, Food safety

บทคัดย่อ

Aspergillus flavus เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญต่อคุณภาพผลผลิตทางการเกษตรที่พบในระยะหลังการเก็บเกี่ยว โดยเชื้อราสามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินสะสมในธัญพืชและมีอันตรายต่อผู้บริโภค ในธรรมชาติเชื้อรา *A. flavus* บางสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างสารพิษ ดังนั้นการตรวจสอบเชื้อราเพื่อยืนยันการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินจึงมีความจำเป็นสำหรับประเมินคุณภาพผลิตผลเกษตรและการปนเปื้อนก่อนการนำไปผลิตเป็นผลผลิตอาหารตามระบบอุตสาหกรรม จากการรวบรวมเชื้อรา *A. flavus* ที่แยกจากข้าวโพดอุตสาหกรรมในพื้นที่จังหวัดนครปฐม พบเชื้อรา *A. flavus* แบ่งออกเป็น กลุ่มที่ 1 เชื้อรา *A. flavus* มีการสร้างเม็ด sclerotium ปริมาณมาก สร้าง conidial head ปริมาณน้อย (AF1) และกลุ่มที่ 2 เชื้อรา *A. flavus* ที่มีการสร้าง conidial head ในปริมาณมาก ไม่พบการสร้างเม็ด sclerotium หรือพบในปริมาณที่น้อย (AF2) การยืนยันเชื้อรา *A. flavus* สามารถใช้อาหาร Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA) โดยพบเฉพาะเชื้อรา *A. flavus* ทั้งสองกลุ่มมีสีส้มใต้โคโลนี ในการตรวจสอบการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินสามารถเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Yeast extract sucrose agar (YES) และรมด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 25% บนฝาเพลท พบเชื้อรากลุ่ม AF1ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมีการเปลี่ยนแปลงสีใต้โคโลนีเป็นสีชมพู และเมื่อนำมายืนยันการตรวจสอบทางชีวโมเลกุลด้วยไพรเมอร์ afl R (aflatoxin gene) พบเชื้อรา *A. flavus* ให้แถบ DNA ขนาด 500 bp *A. niger* พบขนาด 700 bp และ *Fusarium* sp. พบขนาด 1200 bp ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การตรวจติดตามเชื้อรา *A. flavus* ในระบบการตรวจรับสินค้าเกษตรสามารถใช้ไพรเมอร์ afl R เข้าร่วมการตรวจ ในขณะที่การตรวจโดยอาหาร YES สามารถแยกโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ทั้งนี้ต้องพิจารณาการสร้างสีใต้โคโลนีของเชื้อราที่รบกวนการตรวจสอบ

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน การติดตามด้วยพีซีอาร์ อาหารปลอดภัย

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[1] Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Sean, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กทม. 10400

[2] Postharvest Technology Innovation Center, Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation, Bangkok 10400.

คำนำ

สารพิษอะฟลาทอกซินสร้างโดยเชื้อราหลายชนิด กลุ่มเชื้อราที่พบรายงานเป็นสาเหตุได้แก่ *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus nominus* สารพิษอะฟลาทอกซินมีคุณสมบัติทางชีวภาพต่อ คน สัตว์และพืช ซึ่งประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น จึงมีสภาวะอากาศและสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลิตผลทางการเกษตร ในปัจจุบันการตรวจสอบการปนเปื้อนเป็นไปได้จากการตรวจเชื้อราที่พบ หรือการตรวจสารพิษของอะฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นในผลผลิตเกษตร

การตรวจสอบเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินสามารถตรวจตรวจสอบได้หลายวิธี ตั้งแต่การตรวจสอบกลิ่นที่ผิดปกติบนข้าวโพด การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราด้วยอาหารเฉพาะชนิด coconut oil agar (พิสุทธิ์ และคณะ, 2558) การตรวจสอบสารพิษด้วยการรม 25% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งสามารถใช้ทดสอบเบื้องต้น หรือการตรวจสอบปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่ปะปนในผลผลิตโดยตรง แต่เนื่องจากในสภาพธรรมชาติ *A. flavus* มีสองสายพันธุ์ คือ L ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน กับสายพันธุ์ S ที่พบการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมาก และรวมถึงเชื้อราอื่นๆที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาสทอกซิน จึงมีความจำเป็นในการศึกษาวิธีการตรวจสอบกลุ่มเชื้อจำเพาะที่สร้างสารพิษ งานวิจัยนี้เป็นการทดสอบการใช้ไพรเมอร์เฉพาะ aflR เพื่อการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษจากเมล็ดข้าวโพด

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างเชื้อราทดสอบ การยืนยันกลุ่มเชื้อ *A. flavus* และการตรวจสอบการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

แยกเชื้อราจากฝักข้าวโพด โดยคัดเลือกเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างเม็ด sclerotium ปริมาณมาก สร้าง conidial head ปริมาณน้อย (AF1), *A. flavus* ที่มีการสร้าง conidial head ในปริมาณมาก ไม่พบการสร้างเม็ด sclerotium หรือพบในปริมาณที่น้อย (AF2) (สรรเสริญ และคณะ, 2561) เทียบกับเชื้อราต่างกลุ่มได้แก่ เชื้อรา *A. niger* และ *Fusarium* spp. เลี้ยงเส้นใยเชื้อราทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) (Corry *et al*., 1995) และ Yeast extract sucrose agar (YES) บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5-7 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อราเฉพาะ YES รมด้วย 25% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เพื่อตรวจสอบการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA ตรวจสอบการสร้างสีส้มใต้โคโลนีเพื่อการยืนยันเชื้อกลุ่ม *A. flavus*

2. การทดสอบความจำเพาะของ aflR Primer ต่อการจำแนกเชื้อราที่สร้างสารพิษ aflatoxin

สกัด DNA จากเส้นใยเชื้อราจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *A. flavus* (Af8 และ Af17) *A. niger* และ *Fusarium* sp. ด้วยชุดสกัด DNA Plant Genomic DNA Kit (Tiangen, China) นำสารพันธุกรรมของเชื้อรามาเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ชุด Taq DNA polymerase (Fermentas) และไพรเมอร์ aflR1 (5'- AGA ATA GCT TCG CAG GGT GGT -3') และ aflR2 (5'- AGT CTG GGA GGA ACG GAT CG -3') (Kim *et al*., 2011) โดยจัด PCR ให้ทำงานดังนี้ initial denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และdenature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่ 56.5 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1.2% ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 14 โวลต์ต่อเซนติเมตร และย้อมสีเจลเพื่อเทียบขนาด amplicon size ของแถบ DNA กับขนาด DNA มาตรฐาน

ผลการทดลอง

1. ลักษณะโคโลนี และการตอบสนองของเชื้อราบนอาหารเฉพาะ

ลักษณะของโคโลนีเชื้อราทดสอบจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus A. niger* และ *Fusarium* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA ที่ระยะเวลา 7 วัน พบกลุ่มเชื้อรา *A. flavus* (AF1, AF2) ด้านหลังโคโลนีเชื้อราเป็นสีส้มอ่อน ส่วนกลางโคโลนีสีส้มเข้มซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกลุ่ม *A. flavus* (Fig 1-A) สำหรับเชื้อรา *A. niger* และ *Fusarium* sp. ด้านใต้โคโลนีเป็นสีของเชื้อราไม่พบการเปลี่ยนเป็นสีส้มเหมือนกับเชื้อรากลุ่ม *A. flavus*

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ YES กลุ่มเชื้อรา *Aspergillus* sp. มีลักษณะสีโคโลนีเป็นสีเขียวเข้ม แต่เชื้อรา AF1 มีการสร้างกลุ่มเม็ด sclerotium ปริมาณมาก เชื้อรา *A. niger* มีการสร้างโคโลนีเป็นสีดำ และเชื้อรา *Fusarium* sp. ให้ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเป็นสีขาว ผลจากการรมด้วยสารละลาย 25% แอมโมเนียมไฮด์รอกไซด์เพื่อทดสอบการสร้างพิษอะฟลาทอกซิน พบการ

เปลี่ยนสีภายใต้โคโลนีโดยเชื้อรา *A. flavus* AF1 เกิดการเปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้มอมแดง (Fig 1-C) สำหรับ *A flavus* AF2 และ *A. niger* ไม่พบการเปลี่ยนของสีบริเวณภายใต้โคโลนี (Fig 1-B) และ *Fusarium* sp. พบว่าสีของโคโลนีเป็นสีอมชมพู (Table 1)

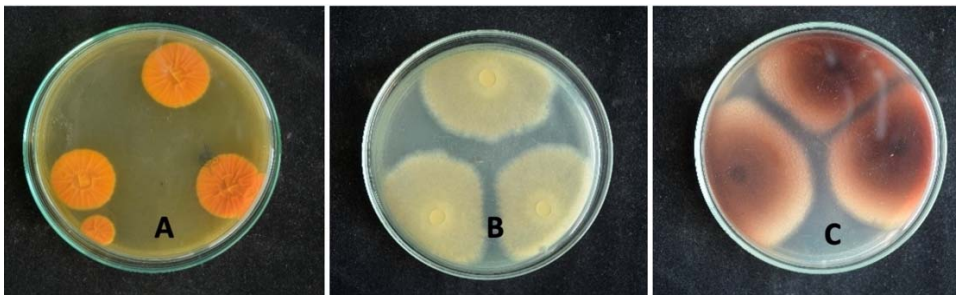

Figure 1 *Aspergillus flavus* reverse of colony character on A) orange color on AFPA medium, B) YES medium without color transform, C) pink color on YES medium after 25% ammonium hydroxide fumigation

Table 1 Fungal colony of atoxigenic and toxigenic *Aspergillus flavus* on AFPA and YES media

Media	Toxigenic *A. flavus* (AF1)	Atoxigenic *A. flavus* (AF2)	*A. niger*	*Fusarium* sp.
AFPA	Orange	Orange	Clear color	Clear color
YES	Pink color	Clear color	Clear color	Pink color

2. ผลตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ afl R ต่อเชื้อราทดสอบ

ผลการเพิ่มปริมาณผลผลิตสารพันธุกรรมที่จำเพาะโดย primer afl R กับเชื้อราทดสอบจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *A. flavus* (Af8, Af17) *A. niger* และ *Fusarium* spp. พบว่าเชื้อรากลุ่ม *A. flavus* (Af8, Af17) ทั้งสองชนิด สามารถเพิ่มปริมาณ PCR product size เท่ากับ 500 bp ในขณะที่เชื้อรา *A. niger* และ *Fusarium* sp. ที่เพิ่มปริมาณมี PCR product size ขนาดที่มากกว่า 500 bp

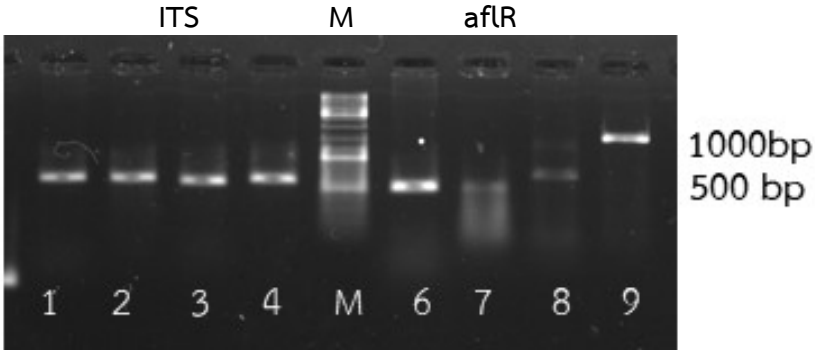

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product with ITS primers (left) and aflR (right) (Lane 1-4: ITS 1/4 primers); 1) AF1; 2) AF2; 3) *Fusarium* spp.; 4) *A. niger*; 5) Marker 1 kb DNA Ladder marker, (Lane 6-9: aflR primers); 6) AF1; 7) AF2; 8) *Fusarium* spp.; 9) *A. niger*

วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อรา *A. flavus* ทั้งสองกลุ่มเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA มีลักษณะสัณฐานวิทยาโคโลนีสีเขียวแกมเหลือง พบ conidial head จำนวนมาก และสำหรับกลุ่ม AF1 พบเม็ด sclerotium ขนาดเล็กต่างจาก AF2 ที่ไม่พบ (ชัยณรงค์ และคณะ, 2563) การพบสีใต้โคโลนี *A. flavus* เป็นสีส้มเมื่อเจริญบนอาหาร AFAP เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อรากลุ่ม *A. flavus* และ *A. parasiticus* เกิดเนื่องจากสาร iron ammonium citrate (Bothast and Fennell, 1974; Adhikari *et al*., 2021) โดยเชื้อราผลิต aspergillic acid และทำปฏิกิริยากับธาตุเหล็กในอาหาร ทั้งนี้การสร้างสีไม่เกี่ยวกับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ในขณะที่การรมด้วยสารละลาย 25% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เมื่อเชื้อราเจริญบนอาหาร YES พบการสร้างสารสีชมพูแดง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Alkhersan *et al*. (2016) ที่ให้เหตุผลการเปลี่ยนเป็นสีชมพูเนื่องจากการไอระเหยที่ไปทำปฏิกิริยากับ

สารเรืองแสง แต่สำหรับเชื้อราบางชนิดเช่น *Fusarium* sp. พบการสร้างสีแดงจากเส้นใยเชื้อราเอง สำหรับการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลด้วย aflR primer เพื่อตรวจสอบการสร้างสารพิษ มีรายงานวิจัยของ Kim *et al*. (2011); Bintvihok *et al*. (2016 และ Zhang *et al*. (2020) ที่ศึกษาไพรเมอร์เพื่อระบุการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ทั้งนี้ไพรเมอร์ afl R มีความเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซิน จึงนำยีนดังกล่าวมาติดตามเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไพรเมอร์ afl R มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มปริมาณ amplicon size ขนาด 500 bp ของเชื้อ AF1 และ AF2 ในขณะที่เชื้ออื่นๆสามารถพบขนาดแถบ DNA ที่แตกต่าง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำไพรเมอร์ afl R ไปใช้ประเมินคุณภาพของผลผลิตเกษตร โดยพิจารณาแถบ DNA ของเชื้ออื่นประกอบด้วย

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินจากเชื้อรา *A. flavus* สามารถใช้อาหาร YES เพื่อติดตามโคโลนี *A. flavus* ที่สร้างสารพิษโดยตรวจดูสีชมพูแดงใต้โคโลนี สำหรับการใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน สามารถใช้ afl R primer เพื่อตรวจสอบแถบ DNA ขนาด 500 bp.

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพมหานคร

เอกสารอ้างอิง

ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, สรรเสริญ รังสุวรรณ, รัติยา พงศ์พิสุทธา และพิสุทธิ์ เขียวมณี. 2563. ความแตกต่างของสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Aspergillus flavus* กลุ่มที่สร้างและไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน. วารสารแก่นเกษตร 48 (4): 693-702.

พิสุทธิ์ เขียวมณี, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และรณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2558. ประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลงเพื่อตรวจสอบเชื้อราที่สร้างสารพิษปนเปื้อนบนเมล็ดข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 46 (3 พิเศษ): 105-108.

สรรเสริญ รังสุวรรณ, พิสุทธิ์ เขียวมณี, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และรัติยา พงศ์พิสุทธา. 2561. ศักยภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อตรวจสอบเชื้อราปนเปื้อนในเมล็ดข้าวโพด. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 49 (4 พิเศษ): 159-162.

Adhikari, B.N., K.A. Callicott and P.J. Cotty. 2021. Conservation and loss of a putative iron utilization gene cluster among genotypes of *Aspergillus flavus*. Microorganisms 9 (1): 137.

Alkhersan, R.N., M.H. Khudor and B.A. Abbas. 2016. Rapid detection of aflatoxigenic producing strains of *Aspergillus flavus* from poultry FEEDS by UV light AND ammonia vapor. Basrah Journal of Veterinary Research 14 (4): 169-178.

Bintvihok. A., S. Treebonmuang, K. Srisakwattana, W. Nuanchun, K. Patthanachai and S. Usawang. 2016. A rapid and sensitive detection of aflatoxin-producing fungus using an optimized polymerase chain reaction (PCR). Toxicological Research 32: 81-87.

Bothast, R.J. and D.I. Fennell. 1974. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. Mycologia 66: 365-369.

Corry, J.E.L., G.D.W. Curtis and R.M. Baird. 1995. Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA). Culture Media for Food Microbiology 34: 254-256.

Kim, D.M., S.H. Chung and H.S. Chun. 2011. Multiplex PCR assay for the detection of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic fungi in meju, a Korean fermented soybean food starter. Food Microbiology 28: 1402e1408.

Zhang, W., X. Chang, Z. Wu, J. Dou, Y. Yin, C. Sun and W. Wu. 2020. Rapid isolation of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strains. World Mycotoxin Journal 13: 277-286.