รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2556

.....

1. **ชุดโครงการวิจัย :** การลดการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลังเก็บเกี่ยว

2. **โครงการวิจัย** : การจัดการโรคและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวโดยไม่ใช้สารเคมี

   กิจกรรมที่ 2 : การจัดการโรคหลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลเกษตร

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การควบคุมการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) :Controlling for Aflatoxin Contamination in Seed and Agriculture Products using *Aspergillus flavus* Non-Toxigenic strains

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : อัจฉราพร ศรีจุดานุ

   ผู้ร่วมงาน : อมรา ชินภูติ สุพี วนศิรากุล มัทนา วานิชย์

   หน่วยงาน : สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

แยกเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* จากตัวอย่างดินและผลิตผลเกษตร ในพื้นที่ 22 จังหวัดของประเทศไทย โดยใช้วิธี Soil dilution plate technique และ Agar plate method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Glycerol (DG 18) และจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถแยกได้รา *Aspergillus flavus* 602 สายพันธุ์ (83.7%) *A. tamarii* 97 สายพันธุ์ (13.5%) *A. nomius* 20 สายพันธุ์ (2.8%) เมื่อนำรา *A. flavus* มาตรวจสอบการสร้างสารพิษเบื้องต้นบนอาหาร Coconut agar ในที่มืด 5 วัน ถ้ารามีการสร้างสารแอฟลาทอกซินจะมีการเรืองแสงสีฟ้าน้ำเงินภายใต้แสง UV ที่ช่วงคลื่น 365 nm พบว่ามีรา *A. flavus* ที่ไม่มีการเรืองแสง 123 สายพันธุ์ แล้วนำรามาทดสอบการสร้างพิษในอาหารเหลว YES medium เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง พบว่าเชื้อรา *A. flavus* จำนวน 31 สายพันธุ์เท่านั้นที่ไม่สร้างสารพิษ ได้นำรากลุ่มนี้มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ โดยวิธี Competition plate method บนอาหาร Potato dextrose agar เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตเร็วและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39) คัดเลือกได้จำนวน 8

สายพันธุ์ (37, 374, 377, 400, 401, 538, 561 และ 588) จากนั้นนำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ โดยวิธี Dual culture method ในอาหารเหลว YES medium เป็นเวลา 14 วัน พบปริมาณสารพิษ AFB_1 ลดลงจากชุดควบคุม 99.2, 96.7, 99.1, 100, 100, 100, 99.1 และ 99.1% ตามลำดับ จากนั้นได้นำราทั้ง 8 สายพันธุ์ ไปตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอและจำแนกชนิดราด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล โดยในปฏิกิริยา PCR ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน internal transcribed spacer region (ITS) ทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่าเป็นรา *A. flavus* เพียง 4 สายพันธุ์ (37, 374, 400, 561), *A. tamarii* 3 สายพันธุ์ (377, 538, 588) และ *A. nomius* 1 สายพันธุ์ (401) ในจำนวนนี้ พบว่ารา *A. flavus* สายพันธุ์ที่ตรวจไม่พบยีนการสร้างสารพิษ Aflatoxin gene (*pks*A, *afl*R และ *nor*A) มีจำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 561 และเมื่อนำราสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 400 และ 561 มาทดสอบประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ในเมล็ดข้าวโพดพบว่า สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในข้าวโพดได้ถึง 97.43 และ 83.92% ผลของการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *A. flavus* (561) ที่ไม่สร้างสารพิษ เป็นราสายพันธุ์ใหม่ที่พบในประเทศไทย และมีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์กับราที่สร้างสารพิษ ทำให้สารแอฟลาทอกซินลดลงถึง 97.43 % และสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นในเชิงพาณิชย์ได้

6. คำนำ

ปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรายังคงเป็นปัญหาทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ เนื่องจากสารพิษจากเชื้อราจะปนเปื้อนและเป็นปัญหาของผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับสุขอนามัยของผู้บริโภคโดยตรง ดังนั้นวิธีการที่จะนำมาใช้ในการควบคุมจึงควรเป็นวิธีการที่ปลอดภัยกับผู้บริโภคด้วย การควบคุมโดยชีววิธีจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ และเป็นการลดการใช้สารเคมีที่มีอันตรายด้วย

เชื้อราสกุล *Aspergillus* มีมากถึง 185 ชนิด และมีบทบาทที่สำคัญมากเพราะเชื้อราสามารถนำมาทำประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมได้ เช่น *Aspergillus oryzae* และ *A. sojae* และมีกลุ่มที่เป็นโทษสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อชีวิตมนุษย์ได้เช่นกัน และที่เป็นสาเหตุก่อพิษต่อมนุษย์ ได้แก่ *A. niger*, *A. flavus*, *A. carbonarius* และ *A. fumigatus* (เลขา และคณะ, 2550) ตามธรรมชาติเชื้อราจะมีการแข่งขันกันเพื่อความอยู่รอดและสมดุลของธรรมชาติ ตามธรรมชาติเชื้อราจะมีการแข่งขันกันเพื่อความอยู่รอดและสมดุลของธรรมชาติ เชื้อราที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชเรียกว่า เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist)โดยเชื้อนี้จะมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้ 4 ลักษณะ คือ การแข่งขัน (competition) การทำลายชีวิต (antibiosis) การเป็นปรสิต (parasitism) และการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) การป้องกันกำจัดเชื้อราโดยชีววิธี (biological control) โดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ จิระเดช และคณะ (2535)ได้คัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* spp.) สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด พัฒนาในรูปแบบชีวภัณฑ์ และส่งเสริมให้กับเกษตรกรนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่าง

แพร่หลาย ที่ผ่านมามีการใช้สารเคมีในการเกษตรมากมาย ทำให้เชื้อรา และจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีประโยชน์มากมายถูกทำลาย ทำให้ปัญหาการเกิดโรคและสารพิษจากเชื้อราปนเปื้อนในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวยังคงเป็นปัญหาที่ต้องแก้ไข เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเกษตรกร การศึกษาครั้งนี้จึงวิจัยและพัฒนาเอาวิธีการควบคุมแบบชีววิธีมาใช้ในการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร

7. วิธีการดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่างผลิตผลเกษตร และการคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus flavus*

เก็บเมล็ด ถั่วลิสง ข้าวโพด และเมล็ดธัญพืช จากแหล่งต่าง ๆ มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ มาเจือจางในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ หรือ 0.85% normal saline สเปรดลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการแยกเชื้อรา *Aspergillus flavus* ให้บริสุทธิ์และเลี้ยงบน อาหาร Malt Extract Agar (MEA) และ Czapek's Dox Agar (CZA) ในหลอดทดลอง เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จึงย้ายเชื้อรามาเลี้ยงในอาหาร Malt Extract Broth (MEB) ในขวดลูกชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อราปริมาตร 250 มิลลิลิตรเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เก็บเส้นใยเชื้อราบริสุทธิ์

2. การคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (Toxigenic strains) และสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ (Non-Toxigenic strains) โดยเทคนิคอณูพันธุศาสตร์

2.1 การสกัด ดี เอ็น เอ (DNA extraction) นำเส้นใยเชื้อราบริสุทธิ์ มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ และล้างด้วยเกลือโซเดียม 0.85% สองครั้งเพื่อกำจัดโพลีแซคคาไรด์ วางเส้นใยบนกระดาษกรองเพื่อนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าเส้นใยจะแห้งกรอบเป็นสีขาว ชั่งน้ำหนักเส้นใย 1 กรัม แล้วเก็บเส้นใยแต่ละ strainsไว้ที่ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำไปสกัด DNA ด้วยชุดน้ำยา DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, USA)

2.2 การจัดลำดับยีน และการวิเคราะห์ ทำการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) กับไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะและตรวจปริมาณ ดี เอ็น เอ ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ใช้ 1.5% อะกาโรสเจล ใน 1XTAE บัฟเฟอร์ ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 35 นาที ย้อมอะกาโรสเจล ด้วย 0.5% เอทิเดียมโบรไมด์ 10 นาที ตรวจแถบ ดีเอ็นเอ ใต้แสงยูวี และถ่ายภาพด้วย ultraviolet transilluminator การทดสอบจะมียีนต้นแบบของ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษเป็นตัวเปรียบเทียบ

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน

3.1 การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ โดยวิธี Competition plate method นำเชื้อราสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงบน อาหาร PDA อายุประมาณ 4-5 วันหลังจากนั้นใช้

Cork Borer ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรามาวางในจานทดสอบที่มีชิ้นเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษอยู่ด้วย บ่มจานทดสอบไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จึงทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี*Aspergillus flavus* เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินโดยวิธี Dual Culture method นำเชื้อราที่คัดเลือกไปเลี้ยงในอาหารเหลว YES medium พร้อมกับเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างสารพิษเป็นเวลา 14 วัน นำสารสกัดที่อยู่ในอาหารเหลวมาทดสอบปริมาณสารแอฟลาทอกซิน โดยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับชุดควบคุม วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำต่อสายพันธุ์

4. การผลิตชีวภัณฑ์จากเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่คัดเลือกว่าประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน โดยใช้สูตรต่าง ๆ ในการผลิตประมาณ 5 สูตร แล้วนำไปทดสอบใช้ในแปลงปลูกถั่วลิสง

เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2553 สิ้นสุดการทดลอง กันยายน 2556
สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างดินและผลิตผลเกษตร และการคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus flavus*

แยกเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* section *Flavi* ได้ทั้งหมด 719 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดินและผลิตผลเกษตร 22 จังหวัดของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2556 นำมาทดสอบชนิดเชื้อรา *A. flavus* โดยสังเกตลักษณะสีของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Czapek's Dox agar (CZA) และ *Aspergillus flavus* and *parasiticus* Agar (AFPA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีของ Raper and Funnell (1965) และ Pitt *et al*. (1983) การศึกษานี้พบว่า สามารถแยกได้เชื้อรา *A. flavus* 602 สายพันธุ์ (83.7%) *A. tamarii* 97 สายพันธุ์ (13.5%) *A. nomius* 20 สายพันธุ์ (2.8%) และไม่พบ*A. parasiticus* (Table 1) เมื่อนำตัวแทนของรา section *Flavi* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus* 374, *A. tamarii* 382 และ *A. nomius* 401 โดยมี *A. oryzae* TISTR 3019 เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ นำมาจัดจำแนกชนิดเชื้อรา section *Flavi* ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบมีดังนี้ เชื้อรา *A. flavus* และ *A. nomius* มีลักษณะรูปร่างที่คล้ายกันสร้าง conidial head บนอาหาร CZA เป็นสีเหลืองปนเขียวเมื่ออายุน้อย แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจกลายเป็นสีน้ำตาลเวสซิเคิล รูปร่าง globose หรือ pyriform สเตอริกมาส่วนใหญ่จะเป็นแบบสองชั้น (biseriate) หรือชั้นเดียว (uniseriate) สร้างสเคลอโรเทียมเม็ดใหญ่สีขาว โคโลนีที่เจริญบนอาหาร AFPA เมื่อพลิกดูที่ด้านใต้เพลทมีสีส้ม และเชื้อรา *A. tamarii* สร้าง conidial head บนอาหาร CZA สีน้ำตาล สีส้ม หรือสีเขียว เวสซิเคิล รูปร่าง globose หรือ pyriform สเตอริกมาเรียงตัวแบบ uniseriate หรือ biseriate ไม่สร้าง

สเคลอโรเทียม หรือบางสายพันธุ์สร้างได้ปริมาณน้อย และลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร AFPA เมื่อพลิกด้านใต้เพลทมีสีน้ำตาลส้ม สีน้ำตาลดำ และ *A. oryzae* TIST3019 มีสีของ conidial head สีขาวครีม สีเทาเมื่ออายุน้อย เมื่อแก่มีสีเหลือง สีน้ำตาลมะกอก ลักษณะผิวของโคโลนีฟูคล้ายปุยสำลี (fluffy or cottony) ไม่สร้างสเคลอโรเทียม สร้างเวสซิเคิล รูปร่าง pyriform การจัดเรียงตัวสเตอริกมาแบบ uniseriate เจริญเติบโตบนอาหาร AFPA ช้า และโคโลนีด้านใต้เพลทมีสีขาว (Figure 1)

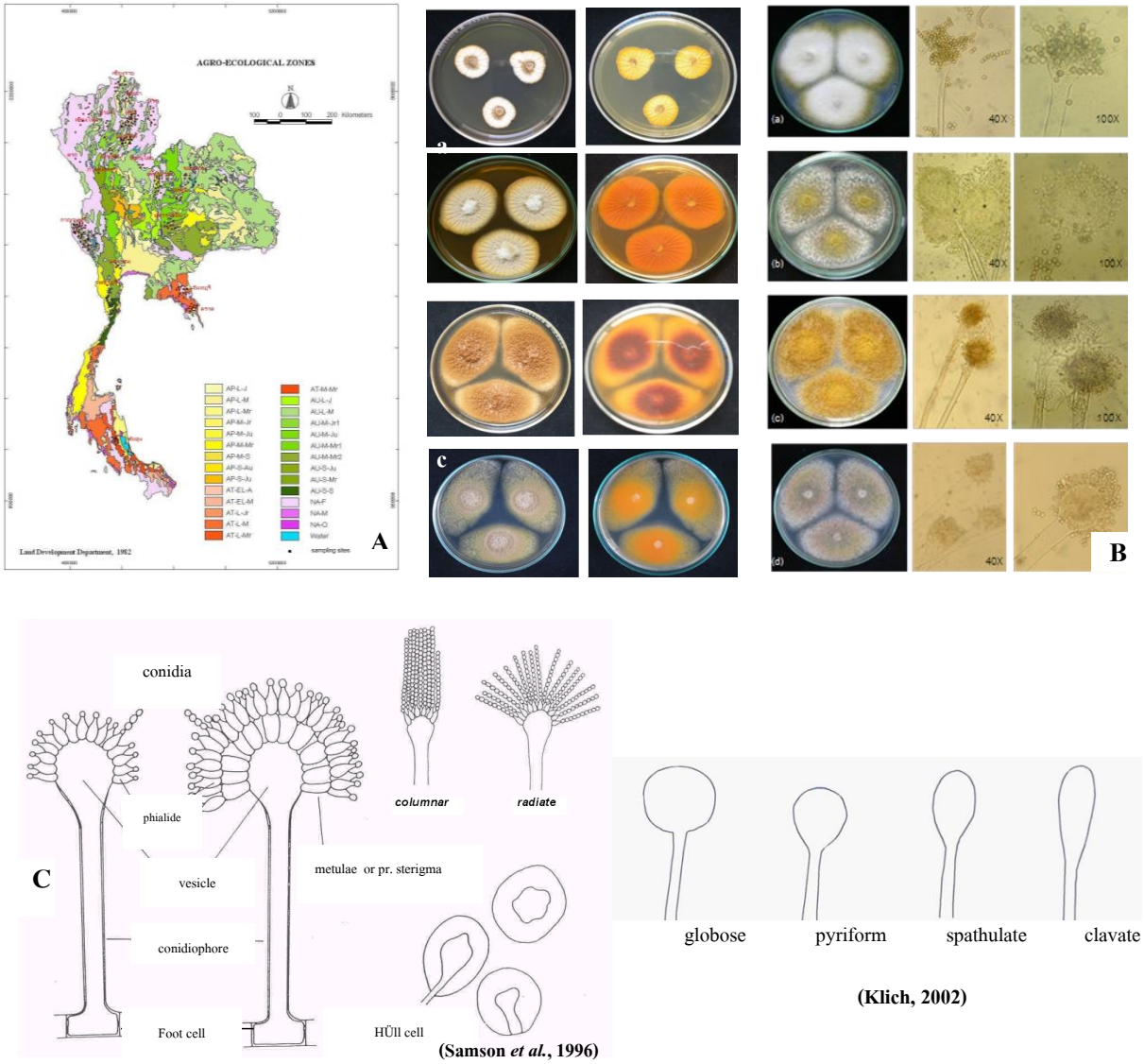


Figure 1 **A.** Map of Thailand showing locations in many agro-ecological zones where soil samples were collected to determine distribution of *Aspergillus* section *Flavi* strains and other fungal species (indicated by black cercle) total 21 provinces

B. Macroscopic features of *Aspergillus* section *Flavi* on Czapek's Dox Agar (7d at 30°C) and sporing structures of *Aspergillus* section *Flavi* in Thailand Agricultural siols (a) *A. oryzae* TISTR 3019 (b) *A. flavus*374 (c) *A. tamarii*382 (d) *A. nomius*401

C. Morphological structure and some common vesicle shapes of *Aspergillus* section *Flavi*

2. การคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (Toxigenic strains) และสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ (Non-Toxigenic strains) โดยเทคนิคอณูพันธุศาสตร์

2.1 การสกัด ดี เอ็น เอ (DNA extraction) สกัดดีเอ็นเอรวมของเชื้อรา section *Flavi* โดยใช้ชุดน้ำยาสกัด DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) และทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอของเชื้อราด้วย internal control โดยใช้ไพรเมอร์ CS3 และ LR3 ซึ่งเป็นไปเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง ITS2-LSU บนโครโมโซม สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส จำนวน 26 สายพันธุ์ และได้ส่งราเพื่อนำไปวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus* ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ประเทศไทยทั้ง 26 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบคุณภาพดีเอ็นด้วยการวัดค่านาโนดรอป OD 260/280 โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พบว่า ได้คุณภาพดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ universal primer ITS1, ITS4 และ ITS5 (White *et al*., 1990) ได้

2.2 การจัดลำดับยีน และการวิเคราะห์ นำตัวแทนของรา section *Flavi* จำนวน 26 สายพันธุ์มาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยเทคนิคอณูพันธุศาสตร์ ส่งวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS4-5 บน 18S rDNA แล้วนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดย Blastn เพื่อตรวจหาความคล้ายคลึงลำดับเบสของยีน 18S rRNA สามารถจำแนกชนิดสายพันธุ์เชื้อรา section *Flavi* ที่พบจากดินและผลิตผลเกษตรในประเทศไทย ผลการเปรียบเทียบพบ 19 สายพันธุ์ (01, 36, 37, 38, 39, 40, 43, 45, 46, 47, 185, 193, 227, 231, 374, 386, 561, 400 และ A39) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดอย่างมากกับเชื้อราในแฟมิลี่ *Ascomycetes* ที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยลำดับเบส 18S rDNA คล้ายกับ *A. flavus* strain ATCC 9643 และ strain ATCC 20043 (Accession No. HQ026738 และ AY939782) ในระดับ 99-100% similarity และสายพันธุ์ 386 มีสัมพันธ์ใกล้ชิดอย่างมากกับเชื้อรา *A. flavus* isolate ucb041 (Accession No. EF409807) ที่พบในประเทศบราซิล ในระดับ 99% similarity สายพันธุ์ 368, 377 และ 588 มีสัมพันธ์ใกล้ชิดอย่างมากกับเชื้อรา *A. tamarii* isolate SRRC1088 (Accession No. AY373870) ที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา ในระดับ 99-100% similarity สายพันธุ์ 401 มีสัมพันธ์ใกล้ชิดอย่างมากกับเชื้อรา *A. nomius* isolate SRRC1088 (Accession No. KF312154) ที่พบในประเทศมาเลเซีย ในระดับ 99% similarity และสายพันธุ์ 386 มีสัมพันธ์ใกล้ชิดอย่างมากกับเชื้อรา *A. tamarii* isolate KUFS12 (Accession No. JQ257030) ที่พบในประเทศอินเดีย ในระดับ 99% similarity (Table 2)

เมื่อจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* และ *A. flavus* ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมลำดับเบสของยีน 18S rRNA เปรียบเทียบโดยใช้ ClustalW version 2.1 (DDBJ, 2012) แสดงภาพโดย Tree view สามารถแบ่งกลุ่มสายวิวัฒนาการย่อยของเชื้อรา *A. flavus* เป็น Clade A, B, D และ E และ section *Flavi* อื่นๆ จัดอยู่ใน Clade C นอกจากนี้ยังพบว่า สายพันธุ์ 561 จัดอยู่นอกกลุ่มสายวิวัฒนาการย่อย (Clade) (Figure 4)

จะเห็นได้ว่าเชื้อรา section *Flavi* ที่มาจากคนละสถานที่กัน มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางสายบรรพบุรุษ สอดคล้องกับ Peterson (2008) ได้เปรียบเทียบเชื้อรา section *Flavi* โดยใช้ยีน ITS rDNA เช่นกัน และจัดเป็นกลุ่มที่เป็นวงศ์วานวิวัฒนาการเดี่ยว (monophyletic group)

Figure 2 Deletion patterns in aflatoxin gene clusters of Thailand *Aspergillus* section *Flavi* isolates

	Isolates	Stains					1141 bp	416 bp	none	663 bp	none	766 bp	435 bp	none	529 bp	759 bp	785 bp	423 bp	536 bp	567 bp	491 bp	554 bp	593 bp	none	629 bp	393 bp	603 bp	592 bp	586 bp	none	none	659 bp	none	none
			C1	*C2*	*C3*	*norB-cypA*	*aflT*	*pksA*	*nor1*	*hexA*	*hexB*	*aflR*	*aflJ*	*adhA*	*estA*	*norA*	*Ver1*	*verA*	*avnA*	*verB*	*avfA*	*omtB*	*omtA*	*ordA*	*vbs*	*cypX*	*moxY*	*ordB*	*hypA*	*nadA*	*hexA*	*glcA*	*sugR*	*C4*
TISTR	3019	AF-	●	○	●	●	○	○	○	○	●	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	●	○	○	○	○
PHPRDO	401	AF-	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	●	●	○	●	○	○	●	○
PHPRDO	538	AF-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○
PHPRDO	588	AF-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
PHPRDO	561	AF-	●	○	○	●	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PHPRDO	37	AF-	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●
PHPRDO	400	AF-	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PHPRDO	374	AF-	●	○	●	●	●	●	○	○	○	●	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PHPRDO	36	AF-	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●
PHPRDO	01	AF-	○	○	○	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PHPRDO	40	AF+	●	○	○	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PHPRDO	46	AF+	●	○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	A39	AF+	●	○	●	●	●	●	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●

Solid circles = positive PCR product; open circles = no PCR products; Primer for 32 aflatoxin genes cluster from Chang *et al*., 2005

การวิเคราะห์โดยเทคนิคชีวโมเลกุลโดยปฏิกิริยา PCR โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตำแหน่งยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอฟลาทอกซิน 32 ยีน (32 genes in aflatoxin biosynthetic pathway) (Yu *et al*. 2004; Chang *et al*., 2005) ซึ่งมี 2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารแอฟลาทอกซิน คือ ยีน *afl*R และ *afl*J (Chang *et al*., 2000) ในจำนวนนี้พบว่า เชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ตรวจไม่พบยีนการสร้างสารพิษ Aflatoxin gene (*pks*A, *afl*R, *afl*J และ *nor*A) มีจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 561, 538 และ 588 (Figure 2)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน

3.1 การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ โดยวิธี Competition plate method พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตเร็วและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39) คัดเลือกได้จำนวน 8 สายพันธุ์ (37, 374, 377, 400, 401, 538, 561 และ 588) พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 46.5, 46.9, 47.9, 44.1, 47.5, 45.6, 44.0 และ 45.5% ตามลำดับ (Table 3)

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน โดยวิธี Dual Culture method เมื่อนำรา *A. flavus* มาตรวจสอบการสร้างสารพิษเบื้องต้นบนอาหาร Coconut agar ในที่มืด 5 วัน ถ้ารามีการสร้างสารแอฟลาทอกซินจะมีการเรืองแสงสีฟ้าน้ำเงินภายใต้แสง UV ที่ช่วงคลื่น 365 nm (Figure 3) พบว่า มีรา *A. flavus* ที่ไม่มีการเรืองแสง 123 สายพันธุ์ (20.43%) แล้วทดสอบการสร้างพิษบนอาหาร YES media โดยนำตัวแทนของรา *A. flavus* จำนวน 71 สายพันธุ์ มาตรวจสอบการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน AFB_1 ด้วยวิธี ELISA (อมรา และประวัติ, 2543) เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง พบว่า เชื้อรา *A. flavus* ชนิดผลิตสารพิษ AFB_1 ได้ปริมาณสูง ระดับ 13,800-158,200 ng/ml พบ 53 สายพันธุ์ (74.64%) ปริมาณ AFB_1 ปานกลาง ถึง ต่ำในระดับ 0- 1,000 ng/ml พบ18 สายพันธุ์ (25.35%) สำหรับเชื้อรา *A. tamarii* เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารพิษ AFB_1เพียง 5 สายพันธุ์ พบว่า ทั้ง 5 สายพันธุ์ ผลิตสารพิษได้ระดับ 10-6,980 ng/ml เปรียบเทียบสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39) มีปริมาณสารพิษ AFB_1เท่ากับ 7,960 พีพีบี (Table 2) การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ โดยวิธี Dual culture method ในอาหารเหลว YES medium เป็นเวลา 14 วัน พบปริมาณสารพิษ AFB_1 ลดลงจากชุดควบคุม 99.2, 96.7, 99.1, 100, 100, 100, 99.1 และ 99.1% ตามลำดับ (Table 4) จากนั้นนำราตัวแทนราสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 400 และ 561 มาทดสอบประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ในเมล็ดข้าวโพดพบว่า สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในข้าวโพดได้ถึง 97.43 และ 83.92% (Table 5)

4. การผลิตชีวภัณฑ์จากเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในโครงการนี้ได้สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่คัดเลือกว่าประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซิน จำนวน 3 สายพันธุ์ แผนที่จะดำเนินการในปีถัดไป คือ การผลิตชีวภัณฑ์จากเชื้อราโดยใช้สูตรต่าง ๆ ในการผลิตประมาณ 5 สูตร และสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นในเชิงพาณิชย์ได้

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สำรวจการแพร่กระจายของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซินจากดิน ซึ่งดำเนินการตามภาคต่างๆ ทั่วประเทศ 21 จังหวัด ระหว่าง เดือน ธันวาคม 2552- กันยายน 2555 การทดลองนี้สามารถแยกเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซินในดินของประเทศไทย ได้ 3 ชนิด คือ *A. flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* และไม่พบ *A. parasiticus* และสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อรา section *Flavi* ตามความสามารถในการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ (Non-toxigenic strains) พบ 31 สายพันธุ์ (39.74 %) และสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (Toxigenic strains) พบ 47 สายพันธุ์ (60.25 %) (Table 2) โดยพบ *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน เป็นเชื้อราที่กระจายตัวมากที่สุดในดิน ชี้ให้เห็นว่าประเทศไทย มีความเสี่ยงต่อการตรวจพบการสร้างสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรสูง

สามารถแยกราที่ไม่สร้างสารพิษที่มีประสิทธิภาพดี จากดินประเทศไทยได้ 2 สายพันธุ์ ดังนี้ 400 และ 561 เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ในเมล็ดข้าวโพดพบว่า สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในข้าวโพดได้ถึง 97.43 และ 83.92 % ตามลำดับ ผลของการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *A. flavus* (561) ที่ไม่สร้างสารพิษ เป็นราสายพันธุ์ใหม่ที่พบในประเทศไทย และมีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์กับราที่สร้างสารพิษ ทำให้สารแอฟลาทอกซินลดลงถึง 99.73 % สามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นในเชิงพาณิชย์ได้

10. การนำไปใช้ประโยชน์

นำเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ (Non-Toxigenic strains) มาใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ชนิดที่สร้างสารพิษ โดยการแยกชนิดด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction ในผลิตผลทางการเกษตรโดยเฉพาะถั่วลิสง นำไปปรับใช้กับแปลงปลูกถั่วลิสง เพื่อลดการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร ตั้งแต่ในแปลงปลูกก่อนการเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นการป้องกันกำจัด โดยไม่ใช้สารเคมี

11. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

นำผลการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์ นำไปทดสอบใช้ในแปลงปลูกถั่วลิสงของเกษตรกร เพื่อควบคุมผลิตผลเกษตรโดยเฉพาะในข้าวโพดและถั่วลิสง

12. คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยกรมวิชาการเกษตรประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-56 ขอบคุณ ดร.อมรา ชินภูติ ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ เชื้อรา *A. flavus* A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ และฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์ ให้ความอนุเคราะห์ เชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ TISTR 3019

13. เอกสารอ้างอิง

เลขา มาโนช, อรอุมา เจียมจิตต์, ธิดา เดชฮวบ, จิตรา เกาะแก้ว, อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์, ผจงจิต ภูจิญญาณ์ และยุพดี เผ่าพันธุ์. 2550. ความหลากหลายของราบนวัสดุต่าง ๆ และราที่มีความสำคัญต่อสุขภาพ. *ใน*: *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์* ครั้งที่ 45. 746 หน้า.

อมรา ชินภูติ และประวัติ ตันบุญเอก. 2543. การวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร โดยวิธี ELISA และวิธีการลดปริมาณสารพิษ. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1-8.

จิระเดช แจ่มสว่าง จินตนา ชนะ วรรณวิไล เกษนรา เฉลิมลาภ จิระประสิทธ์ สุพรรณี ชีววิริยกุล ธีรยุทธ ตู้จินตา ศรปราชญ์ ชไนศวรรยางกุล วุฒิชัย ญาณอรรถ กัทลีวัลย์ สุขช่วย และสมนึก กายาผาด. 2535. การควบคุมโรคต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์โดยวิธีคลุกเมล็ด ด้วยผงมวลชีวภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและปลูกพืชทดลอง. 6(2) : 3 – 8.

Chang P.K., B.W. Horn and J.W. Dorner. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. Fungal Genetics and Biology 42: 914-923.

Cotty P.J. and J.E. Mellon. 2006. Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. Mycotoxin Res. 22: 110-117.

DNA data bank of Japan (DDBJ). 2012. Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW. Available from: http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/. [cited 2012 Feb 13].

Klich, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht, Netherlands.

Peterson, S.W. 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia. 100(2): 205-226.

Pitt, J. I., A. D. Hocking and D. R. Glenn. 1983. An improved medium for detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. J. Appl. Bacteriol. 54: 109–114.

White, T.J., T. Bruns, Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315-322.

Yu, J., K.C. Ehrlich, J.W. Cary, D. Bhatnagar, T.E. Cleveland, G.A. Payne, J.E. Linz, C.P. Woloshuk and J.W. Bennett. 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Contamination of crops. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1253 - 1262.

14. ภาคผนวก

Table 1 *Aspergillus* section *Flavi* strains collected from Thailand in different regions between 2009-2011

Strain No.	Province	Substrate and time	Identify as	Reference strain [e]	% Similarity	ITS[b] sizes (nt)	AFPA	CCA	AFB_1 production (ug/ml)	Strain
TISTR3019 [c]	Bangkok	Soy sauce, 2010	*A. parasiticus*	NRRL3386	100%	572	White	-	0	Non-toxigenic
PHPRDO 01 [d]	Bangkok	Soybean, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	99%	536	Orange	-	0	Non-toxigenic
PHPRDO 36	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	100%	541	Orange	-	0	Non-toxigenic
PHPRDO 37	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	100%	541	White	-	70	Non-toxigenic
PHPRDO 47	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	100%	503	Orange	-	400	Non-toxigenic
PHPRDO 193	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	99%	688	Orange	-	170	Non-toxigenic
PHPRDO 227	Chaing mai	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	99%	506	White	-	600	Non-toxigenic
PHPRDO 185	Sukhothai	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	99%	710	Orange	-	630	Non-toxigenic
PHPRDO 231	Chaing mai	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	99%	577	White	-	690	Non-toxigenic
PHPRDO 374	Kanchanaburi	Sugarcane field, 2011	*A. flavus*	ATCC9643	99%	549	Orange	-	30	Non-toxigenic
PHPRDO 561	Chanthaburi	Corn field, 2011	*A. flavus*	ATCC9643	99%	566	Orange	-	70	Non-toxigenic
PHPRDO 400	Lampang	Corn field, 2011	*A. flavus*	ATCC9643	99%	565	White	-	0	Non-toxigenic
PHPRDO 377	Kanchanaburi	Corn field, 2011	*A. tamarii*	SRRC1088	100%	576	Brown	-	10	Non-toxigenic
PHPRDO 538	Chunthaburi	Corn field, 2011	*A. tamarii*	CBS575.65	99%	540	Brown	-	70	Non-toxigenic
PHPRDO 588	Chunthaburi	Corn field, 2011	*A. tamarii*	SRRC1088	99%	544	Brown	-	70	Non-toxigenic
PHPRDO 401	Lampang	Corn field, 2011	*A. nomius*	Peterson *et al.* (2001)	99%	534	Orange	-	0	Non-toxigenic
PHPRDO 38	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	100%	492	Orange	+	35,600	Toxigenic
PHPRDO 39	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	100%	724	Orange	+	27,400	Toxigenic
PHPRDO 40	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	100%	504	Orange	+	46,000	Toxigenic
PHPRDO 43	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	100%	505	Orange	+	39,600	Toxigenic
PHPRDO 45	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	100%	493	Orange	+	55,600	Toxigenic
PHPRDO 46	Phetchabun	Corn field, 2009	*A. flavus*	ATCC9643	100%	500	Orange	+	16,400	Toxigenic
PHPRDO 382	Kanchanaburi	Corn field, 2011	*A. flavus*	ATCC9644	99%	570	Orange	+	11,100	Toxigenic
PHPRDO 386	Kanchanaburi	Corn field, 2011	*A. flavus*	ATCC9643	99%	579	Orange	+	29,990	Toxigenic
PHPRDO 368	Kanchanaburi	Sugarcane field, 2011	*A. tamarii*	SRRC1088	100%	582	Brown	+	6,980	Toxigenic
[a] A39	Bangkok	Dry Bael fruit	*A. flavus*	ATCC9643	100%	542	Orange	+	7,960	Toxigenic

Abbreviation:

[a] A39 toxigenic strain of *Aspergillus flavus* received from Dr. Amara Chinaphuti

[b] The internal transcribed spacer (ITS) region.

[c] The Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Thailand.

[d] The Post-harvest and Processing Research and Development Office Collection (PHPRDO), Thailand

[e] The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the ITS sequences of *Ascomycetes* reported in this study are: the American Type Culture Collection (ATCC), USA, the Northern Regional Research Center (NRRL), USA, the Southern Regional Research Center (SRRC), USA and the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, Netherlands.

Table 2 Incidence of *Aspergillus* section *Flavi* strains and aflatoxin B_1 production collected from Thailand in different regions between 2010-2013

Thailand	Genus&Species			Sample (no.)	AFB_1 range	Total aflatoxin B_1 levels (ng/ml)			
Region	*A. flavus*	*A. tamarii*	*A. nomius*	(Test)	(ng/ml)	<20	21-99	100-1,000	>1,000
Central	330	25	5	17	0-55,600	1	-	6	10
West	6	10	0 [a]	42	0-158,200	6	3	6	27
North	176	31	15	9	0-97,100	1	-	3	5
East	11	21	0	10	10-120,600	1	-	-	5
North East	64	6	0	- [b]	-	-	-	-	-
South	15	4	0	-	-	-	-	-	-
All	83.7%	13.5%	2.8%	78	0-158,200	9(11.5%)	7(8.9%)	15(19.2%)	47(60.2%)

[a] 0 = Not found; [b] - = Not detected

Table 3 Percent inhibition of *A. flavus* A39 toxigenic strain by Thailand *Aspergillus* section *Flavi* non-toxigenic strains on Potato dextrose agar (7d) at 30°C, average from 3 replicates.

Strains	Inhibition [a] (%)		
	3 day	5 day	7 day
A. flavus PHPRDO 37	5.4	8.8	46.5
A. flavus PHPRDO 374	4.4	5.4	46.9
A. flavus PHPRDO 400	6.8	10.5	47.9
A. flavus PHPRDO 561	0	0	44.1
A. nomius PHPRDO 401	6.0	7.8	47.5
A. tamarii PHPRDO 377	4.1	6.5	45.6
A. tamarii PHPRDO 538	4.3	5.5	44.0
A. tamarii PHPRDO 588	5.1	7.7	45.5
Mean	4.5	6.5	46.0

Table 4 Atoxigenic Performance in Mixtures YES Media (14d) inoculation studies, average from 2 replicates.

Strains	AFB_1 (ng/ml)		Reduction (%)
	Alone	Mixture	
A. flavus PHPRDO 37	70	60	99.2
A. flavus PHPRDO 374	30	260	96.7
A. flavus PHPRDO 400	0	0	100
A. flavus PHPRDO 561	70	70	99.1
A. nomius PHPRDO 401	0	0	100
A. tamarii PHPRDO 377	20	70	99.1
A. tamarii PHPRDO 538	0	0	100
A. tamarii PHPRDO 588	70	70	99.1
A. flavus A39 (control)	7,960	-	

Table 5 Mean aflatoxin concentrations in corn from two dates and two biocontrol treatments in 2013

Treatment	Aflatoxin B_1 content of kernels (ug/kg)			
	7 days after inoculation	Reduction (%)	14 days after inoculation	Reduction (%)
Toxigenic A39	120.3c [a]	--	246.7c [b]	--
Atoxigenic No. 400[c]	16.5a	83.92	112.8ab	34.53
Atoxigenic No. 561 [d]	7.9a	97.43	97.9a	43.69
Combined No. 400 and A39[e]	86.2b	29.90	218.0c	11.93
Combined No. 561 and A39 [e]	63.0b	50.24	190.7bc	23.29
Control (Distilled water)	69.9b	--	169.0abc	--
Before inoculation	6.27	--	6.27	--
C.V. (%)	42.6		37.1	

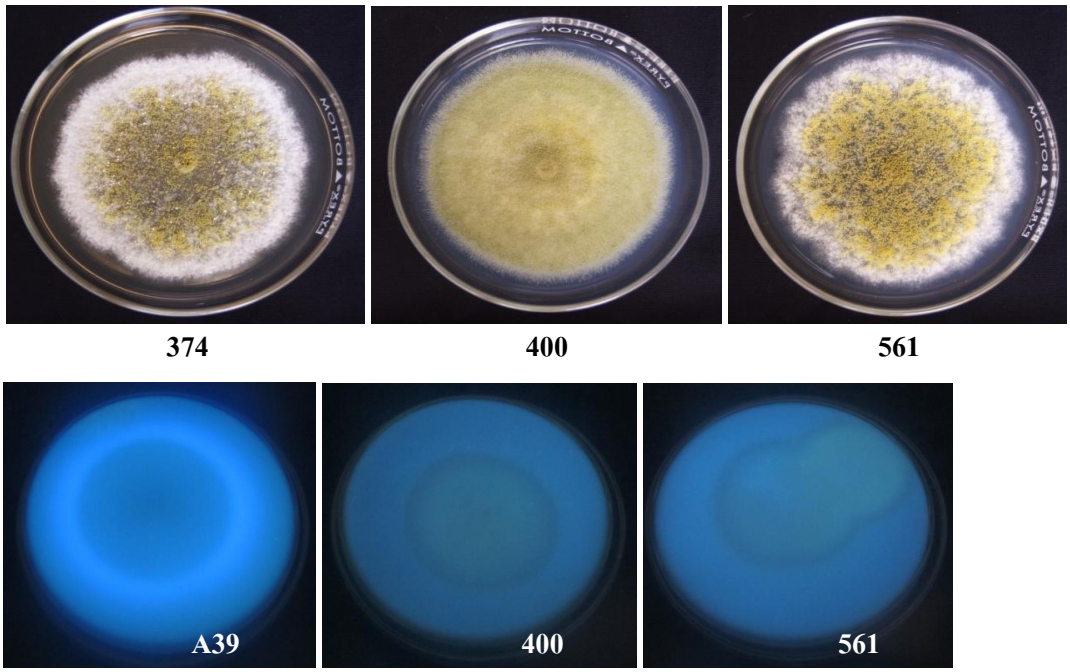
[a] Means that are followed by the same letter in a column are not significantly (P _ 0.01) different.

[b] Means that are followed by the same letter in a column are not significantly (P _ 0.05) different.

[c] No. 400 applied as a spore suspension 10^8 cfu application mixture grain inoculation.

[d] No. 561 applied as a spore suspension 10^8 cfu application mixture grain inoculation.

[e] A39 applied as a spore suspension 10^7 cfu application mixture grain inoculation.



Coconut agar Under UV365 nm

Figure 3 Macroscopic features of *Aspergillus* Non-toxic strain on two differences media (Czapek's Dox and Coconut agar)

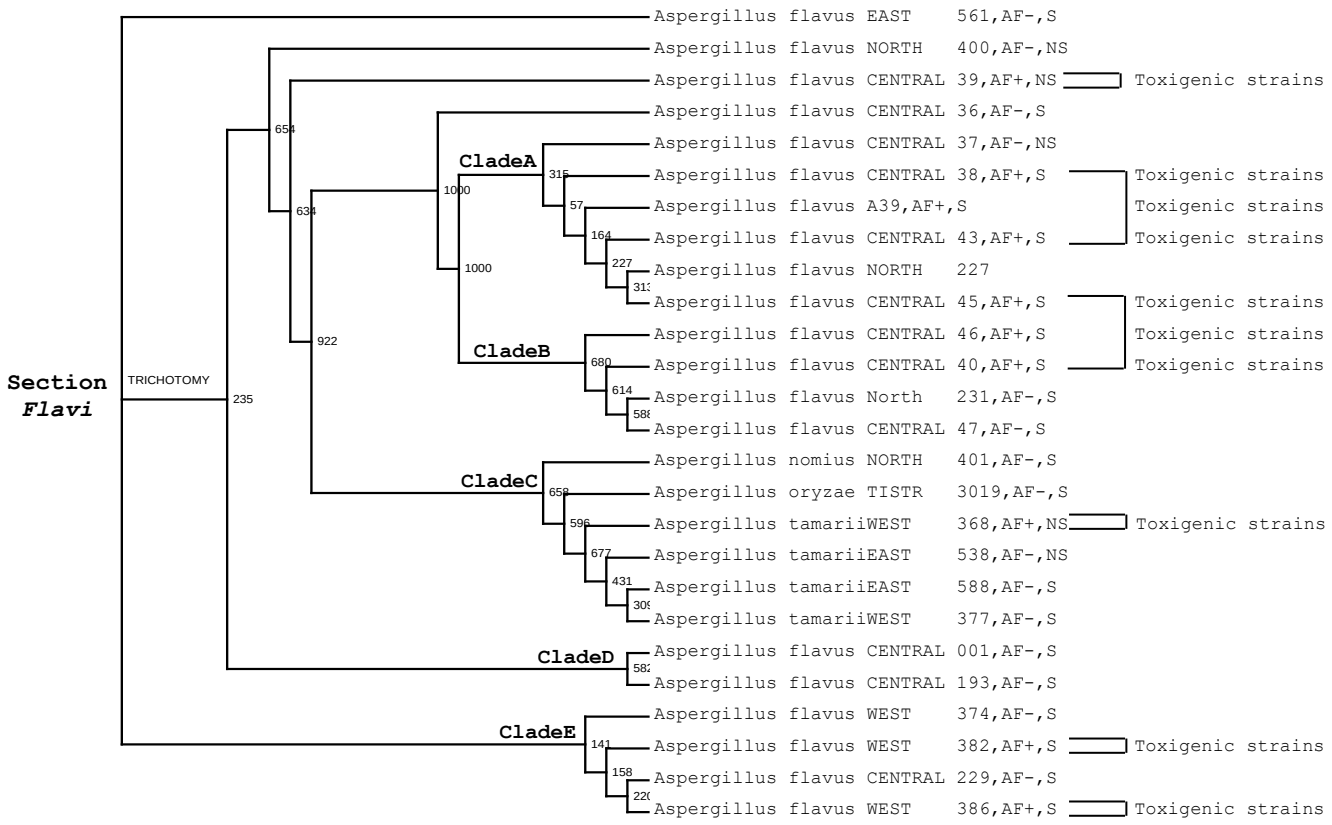


Figure 4 Phylogenetic relationships of *Aspergillus* section *Flavi* based on the ITS rRNA gene sequence. Toxic and non-toxic are denoted (AF+) and (AF-), produced and non-produced sclerotium are denoted (S) and (NS), respectively