

การใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเพื่อการประเมินการเกิด อะฟลาทอกซินในข้าวโพดไทยที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์ ตอนที่ 1 การวิเคราะห์อะฟลาทอกซินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์

อนงค์ บิณฑวิหค,^{1*} ศุภวิน วัชรมูล,² วิสุทธิ นวลชื่น,³ สุพิชญา ตรีบุญเมือง,³ กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ,³
กรณิศ พัฒนชัย,¹ และสังวร อยู่สว่าง³

¹ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ² ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ประเทศไทยพบเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างอะฟลาทอกซินและมักพบปนเปื้อนในเมล็ดข้าวโพดที่นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อศึกษาวิธีการประเมินผลการเกิดอะฟลาทอกซินในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์ ด้วยวิธี ELISA และ PCR-RFLP จากการสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวโพดจำนวน 200 ตัวอย่างจากแหล่งปลูกในไร่และโรงเก็บของพ่อค้าท้องถิ่น 5 จังหวัดคือ ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ นำมาตรวจวิเคราะห์หาสารพิษปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปวิธีอีไลซ่า และนำตัวอย่างข้าวโพดที่ตรวจพบและไม่พบอะฟลาทอกซิน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มไม่พบอะฟลาทอกซิน กลุ่มตรวจพบอะฟลาทอกซิน มากกว่าและน้อยกว่า 20 ppb ตามลำดับ นำตัวอย่างข้าวโพดมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะฟลาทอกซิน พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีมากพอที่จะทำพีซีอาร์ทั้ง 3 กลุ่ม นำผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วย 2% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตัดด้วยเอนไซม์ *HincII* และ *PvuII* จากผลการศึกษาพบว่า ข้าวโพดจากแหล่งปลูกในไร่ จำนวนตัวอย่างที่พบอะฟลาทอกซินปี 1 ร้อยละ 40-100 มากกว่าข้าวโพดจากโรงเก็บพ่อค้าท้องถิ่น ร้อยละ 25-50 แต่มีปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ที่พบในข้าวโพดจากโรงเก็บพ่อค้าท้องถิ่น (12-172 ppb) สูงกว่าข้าวโพดจากแหล่งปลูกในไร่ (2-6 ppb) ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนอะฟลาทอกซินได้ทั้ง 3 กลุ่ม

Keywords: อะฟลาทอกซิน ข้าวโพด เทคนิคพีซีอาร์

* Corresponding author:

รศ สพ.ญ. ดร. อนงค์ บิณฑวิหค

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

E-mail: anong_vet@yahoo.com

บทนำ

อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) เกิดจากเชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ฟลาวัส (*Aspergillus flavus*) และแอสเพอร์จิลลัส พาราซิติกัส (*Aspergillus parasiticus*) สำหรับประเทศไทยมักพบ *A. flavus* ปนเปื้อนในเมล็ดข้าวโพดที่นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งเชื้อราเจริญได้ดี เมื่อความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูงกว่าร้อยละ 85 และโดยธรรมชาติสามารถเกิดอะฟลาทอกซินขึ้นในพืชผลได้ตั้งแต่ในไร่ ยุ้งฉางเกษตรกร โรงเก็บของพ่อค้าและไซโลท้องถิ่น และเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ หลังจากการสีและการเก็บในโรงเก็บสินค้า^{1,2}

วิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินในวัตถุดิบทางการเกษตร ใช้วิธีทางเคมี เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งต้องใช้สารเคมีอันตรายจำนวนมาก ใช้เวลาตรวจนานหลายวัน และต้องมีความชำนาญสูงในการตรวจสอบ ส่วนการใช้วิธีทางอิมมูโน เช่น Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ต้องใช้สารเคมีก่อมะเร็งในกระบวนการตรวจสอบ³⁻⁶ สำหรับการตรวจหาเชื้อรา *A. flavus* ด้วยวิธีจุลชีววิทยา ใช้เวลาตรวจนานหลายวัน มักพบเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราอื่นๆ ปนเปื้อนร่วมด้วย เชื้อราแต่ละสายพันธุ์ แต่ละ isolates มีคุณสมบัติแตกต่างกัน การสร้างและลักษณะของ sclerotia ไม่สัมพันธ์กับการสร้างอะฟลาทอกซิน¹ โดยวิธีเหล่านี้ไม่สามารถตรวจหาพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อราจำเพาะ ซึ่งเป็นต้นเหตุสำคัญของการสร้างอะฟลาทอกซินได้

การศึกษาวิจัยด้านการปนเปื้อนเชื้อราในอาหารด้วยเทคนิคทางด้านอนุพันธุศาสตร์ มีแตกต่างกันหลายวิธี ทั้งการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนและการจำแนกสายพันธุ์ อาทิ การศึกษาวิจัย ชนิด

ของ *aflR* gene ที่แตกต่างกันของสายพันธุ์ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP^{7,8} โดยการศึกษาาระดับของเชื้อราที่เกิดขึ้น และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราที่เป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพของวัตถุดิบและสามารถบ่งบอกถึงความรุนแรงของการเกิดอะฟลาทอกซินได้^{9,10}

จากการตรวจหา หรือจำแนกเชื้อราในอาหารแบบดั้งเดิม มีการศึกษาทั้งทางด้านจุลชีววิทยาและใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในห้องปฏิบัติการที่จำเพาะ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการตรวจหาเพื่อความสะดวก รวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เพื่อให้สามารถประเมินคุณภาพของการปนเปื้อนในอาหารได้ ซึ่งเทคนิคทางด้านพีซีอาร์นี้เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีความไว และมีความจำเพาะต่อการจำแนกเชื้อราที่สร้างและไม่สร้างอะฟลาทอกซิน^{11,12} โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Aspergillus* ได้มีการศึกษาในต่างประเทศถึงการจำแนกขึ้นส่วนของดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน ที่มีความแตกต่างของสายพันธุ์^{12,13} การศึกษาดีเอ็นเอของเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซินในประเทศไทยนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา และวิเคราะห์หาเชื้อราที่ก่อให้เกิดอะฟลาทอกซิน และมีการปนเปื้อนในพืชวัตถุดิบอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ด้านอื่นๆ ได้ต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบอะฟลาทอกซินในข้าวโพดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ สำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบข้าวโพดที่เกิดการปนเปื้อนด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งสามารถใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่จะเพิ่มประสิทธิผล ความแม่นยำในการตรวจสอบและประเมินผลการเกิดอะฟลาทอกซินในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวโพดรวม 200 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างแบบหลายขั้นตอน จากแหล่งเพาะปลูกในไร่ และโรงเก็บข้าวโพดของพ่อค้าในท้องถิ่นของ 5 จังหวัดในประเทศไทย คือลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ จังหวัดละ 40 ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธี ELISA

ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพด 200 ตัวอย่าง โดยสกัดตัวอย่างและวัดหาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป DOA-Aflatoxin ELISA Test kit ซึ่งใช้หลักการ direct competitive ELISA ได้ค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่างระดับ ng/g หรือ ng/ml (ppb)

การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวโพดบด

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่เก็บมาบดให้ละเอียดปริมาณ 10 - 25 mg นำไปสกัดดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Plant Genomic DNA Mini Kit "Geneaid" และทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 2% gel electrophoresis แล้วเก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้งาน

PCR amplification

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างที่ทำการตรวจ สอบว่าพบการปนเปื้อน หรือไม่พบการปนเปื้อนด้วยวิธี ELISA มาทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยขั้นตอนพีซีอาร์ (PCR) ทำการปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์เพื่อให้ได้ product สำหรับนำมาศึกษาถึงลักษณะผลที่เกิดขึ้นด้วยการ

นำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไปได้ โดยจะนำตัวอย่าง 2 ng มาเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA โดยใช้ความเข้มข้นของ primers (forward และ reverse) 10 uM, dNTPs 0.2 mM, 1.5 mM MgCl₂ และ Taq DNA polymerase จำนวน 1 unit และ PCR condition คือ pre-denaturation 94°C นาน 5 นาที, denaturation 94°C นาน 18 วินาที, vary annealing 50° - 60°C นาน 1 นาที 15 วินาที, และ extension 72°C นาน 1 นาที 24 วินาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วย 72°C นาน 10 นาที primers ที่ใช้ในการตรวจสอบ¹⁴ คือ *aflR* -1, 5'- AAC CGC ATC CAC AAT CTC AT -3', *aflR* -2, 5'- AGT GCA GTT CGC TCA GAA CA -3'.

การตรวจสอบผล

หลังจากทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะในขั้นตอนพีซีอาร์แล้ว ทำการตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการนำดีเอ็นเอที่ได้ปริมาตร 10 ul มาแยกขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2% ในบัฟเฟอร์ 1xTBE (45 mM Tris, 45 mM Boric acid, 1 mM EDTA) ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ความต่างศักย์ -ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เปรียบ- เทียบด้วยขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp) ย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งมีความเข้มข้น 10 mg/ml เป็นเวลานานประมาณ 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลาประมาณ 30 นาที และบันทึกผลด้วย UV transilluminator

ผลการวิจัยและอภิปราย

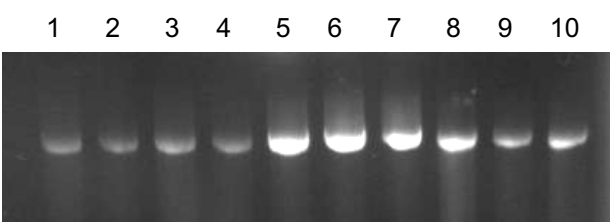
ผลการตรวจอะฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดรวม 200 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างแบบ

หลายขั้นตอนจากแหล่งปลูกในไร่ และโรงเก็บพ่อดำ ท้องถิ่นของ 5 จังหวัด คือ ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ จังหวัดละ 40 ตัวอย่าง โดยสกัดตัวอย่างและวัดหาปริมาณอะฟลาทอกซิน ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปวิธีอีไลซ่า พบว่าตัวอย่างข้าวโพดจากไร่ในจังหวัดลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ ตรวจพบอะฟลาทอกซินร้อยละ 100, 65, 40, 80 และ 100 ตามลำดับ ในปริมาณ 2 – 6 ppb ส่วนตัวอย่างข้าวโพดจากโรงเก็บพ่อดำท้องถิ่น ตรวจพบอะฟลาทอกซินร้อยละ 45, 25, 30, 40 และ 50 ตามลำดับ ในปริมาณ 12 - 172 ppb เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวโพดไทยซึ่งตรวจด้วยวิธี HPLC พบการปนเปื้อนสูงเช่นกัน คือ ร้อยละ 83.3 ของตัวอย่างที่ตรวจ (~ 72 ng/g)¹⁵

ผลการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพดบด

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดพบว่ามีปริมาณอยู่ระหว่าง 20-60 นาโนกรัม และเมื่อตรวจสอบด้วย gel electrophoresis ได้ผลดังรูปที่ 1

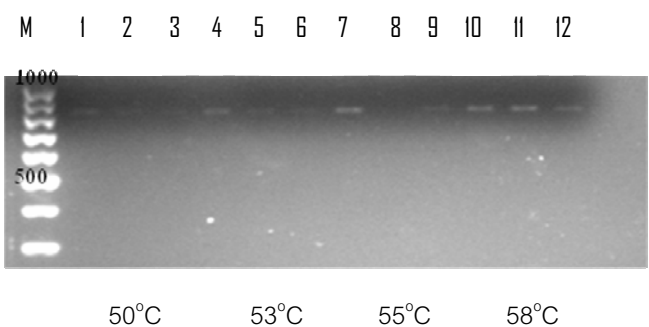


รูปที่ 1 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเมล็ดข้าวโพดบด 0.1 กรัม โดยเลน 1 - 4 เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพดที่พบอะฟลาทอกซินปนเปื้อนมาก (12-172 ppb), เลน 5 - 7 เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพดที่พบสารอะฟลาทอกซินปนเปื้อนน้อย (2-6 ppb) และเลน 8 - 10 เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพดที่ตรวจไม่พบอะฟลาทอกซิน

ผลการศึกษาการปรับสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์

หลังจากทำการสกัดดีเอ็นเอ และนำมาทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มตำแหน่งที่จำเพาะต่อสารอะฟลาทอกซิน พบว่าในการศึกษาครั้งแรกๆ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงมากเกินไป และใช้ความเข้มข้นของ primer น้อยเกินไป (10 pM) เมื่อทำการปรับสภาวะความเข้มข้นของส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์ใหม่ โดยทำการเจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอใหม่ เป็น 1:5 - 1:15 จากเดิม และปรับใช้ primer ที่ 10 uM ในปฏิกิริยาโดยทำการศึกษาความแตกต่างที่อุณหภูมิ annealing ตั้งแต่ 50°C- 60°C ผลที่ได้พบว่า ได้ PCR product จากการทำพีซีอาร์ที่สภาวะเหมาะสม (รูปที่ 2) และได้ความเข้มข้นที่อุณหภูมิ 58°C จากตัวอย่างที่เจือจางทั้ง 1:5 -1:15 ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ คือ primers (forward และ reverse) 10 uM, template 1 ul, dNTP 4 ul, 10x pcr buffer 2.5 ul, *Taq* polymerase 0.5 ul ในปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ul.

การศึกษาวិธีการประเมินผลการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อให้ทราบถึงที่



รูปที่ 2 PCR products (800 bp) ที่ได้หลังการปรับสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิต่างๆ

มาของผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ก่อนทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อบ่งบอกถึงลักษณะผลที่ได้ว่า แตกต่างกันหรือไม่ในเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ซึ่งจะพบว่าการศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์นี้ มีความสำคัญทุกขั้นตอน ตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอ การทำพีซีอาร์ จนกระทั่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งต้องมีการปรับสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมทุกขั้นตอน จากการศึกษาพบว่า การสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพด ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากพอ สำหรับนำไปศึกษาขั้นตอนพีซีอาร์ และเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มชิ้นส่วนจำเพาะในขั้นตอนพีซีอาร์ พบว่าต้องมีการปรับสภาวะที่เหมาะสมหลายครั้ง เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เหมาะสม เพื่อนำไปศึกษาด้วยการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป อย่างไรก็ตามในการศึกษารั้งนี้ยังต้องมีการปรับความเหมาะสมในการตัดเอนไซม์เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งจะเป็นผลที่จะนำไปวิเคราะห์ถึงความแตกต่างของลักษณะเฉพาะของตัวอย่างข้าวโพดที่พบ และไม่พบสารปนเปื้อนในโอกาสต่อไป

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นของการศึกษาขั้นตอนเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ซึ่งเป็นการศึกษาถึงผลของการตัดเอนไซม์ สำหรับการบ่งบอกลักษณะเฉพาะตัวของผลการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน เพื่อประยุกต์ใช้ในการประเมินผลการปน-เปื้อนอะฟลาทอกซินซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ในอนาคต และเพื่อให้สามารถใช้เป็นแนวทางเลือกหนึ่ง สำหรับการตรวจสอบสารปนเปื้อนในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์ใน ทางปศุสัตว์ของประเทศไทยได้

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และองค์การความร่วมมือระหว่างประเทศ แห่งประเทศญี่ปุ่น (JICA). การป้องกันสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าวโพดของประเทศไทย โดยโครงการศูนย์วิจัยการปรับปรุงคุณภาพข้าวโพด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์พันธ์พิบูลย์; 2535.
2. อนงค์ บิณฑิโศ. สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาทอกซิน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2546.
3. Bintvihok A, Hayashi M. Development of ELISA for aflatoxin B1 detection: preliminary experiment of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of aflatoxin B1 in cattle and buffalo sera in Thailand. Recent Advances in Toxicology Research 1991; 3: 233-41.
4. Bintvihok A, Pramoonsoosin T, Hayashi M, *et al.* Production of aflatoxin B1 antibody for ELISA detection in Thailand. Proceedings of 11th Annual Livestock Conference at Chiang Mai Orchid Hotel, Chiang Mai, Thailand, September 16-19, 1992: 275-85.
5. Bintvihok A, Sugano K, Intraraksa R, *et al.* Comparative determination of aflatoxin B1 in animal feed by using Densitometer, HPLC and ELISA. Proceedings of 11th Annual Livestock Conference at Chiang Mai Orchid Hotel, Chiang Mai, Thailand, September 16-19, 1992: 263-74.

6. Sugano K, Bintvihok A, Thanacharoenwatch P, *et al.* Simple and rapid cleanup method for determination of aflatoxin B1 in mixed feed by sep-pak florisil cartridge. *Proc Jpn Assoc Mycotoxicol* 1993; 37: 43-5.
7. Ehrlich KC, Montalbano BG, Cotty PJ. Sequence comparison of *aflR* from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genet Biol* 2003; 38: 63-74.
8. Somashekar D, Rati ER, Chandrashekar A. PCR-restriction fragment length analysis of *aflR* gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *Int J Fd Microbiol* 2004; 93: 101-7.
9. Manuel P, Silvia R, Amparo L. A simple DNA extraction method suitable for PCR detection of genetically modified maize. *J Sci Fd Agri* 2007; 87: 2728-31.
10. Shapira R, Paster N, Eyal O, *et al.* Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 3270-3.
11. Chen RS, Tsay JG, Huang YF, *et al.* Polymerase chain reaction mediated characterization of molds belonging to the *Aspergillus flavus* group and detection of *A. parasiticus* in peanut kernels by multiplex polymerase chain reaction. *J Food Prot* 2002; 65: 840-4.
12. Farber P, Geisen R, Holzapfel WH. Detection of aflatoxigenic fungi in figs by a PCR reaction. *Int J Food Microbiol* 1997; 36: 215-20.
13. Criseo G, Bagnara A, Bisignano G. Differentiation of aflatoxin production and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33: 291-5.
14. Rozen E, Skaletsky HJ. Primer 3. Available at http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html, 1997.
15. Yoshizawa T, Yamashita A, Chokethaworn N. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. *Food Addit Contam* 1996; 13: 163-8.