Ubon Rajathanee University

รายงานผลโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเพื่อการพัฒนาและ
สนับสนุนงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาความต้านทานต่อสารรมฟอสฟีน และการวิเคราะห์ความแตกต่างทาง พันธุกรรมในมอดข้าวเปลือก ในจังหวัดอุบลราชธานี

Studies of Phosphine Resistance and Polymorphic DNA Marker Analysis of *Rhyzoprtha dominica* in Ubon Ratchathani

โดย

ณิชารัตน์ สวาสดิพันธ์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณโรงสีเดชอุดม ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และให้ความอนุเคราะห์สารเคมีบางชนิด และกำลังที่สำคัญที่สุดในงานวิจัยชิ้นนี้คือ นางสาวจารุณี ฉันทวรลักษณ์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ซึ่งทำการทดลองบางส่วนในงานวิจัยชิ้นนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาสารนิพนธ์ และที่สำคัญที่สุดที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้เป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของงานวิจัยชิ้นอื่นๆอีกต่อไปคือ ทุนอุดหนุนจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ณิชารัตน์ สวาสดิพันธ์

พฤษภาคม 2547

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความต้านทานต่อสารรมฟอสฟีนของมอดข้าวเปลือก (*Rhyzopertha dominica*) พบว่ามอดข้าวเปลือกที่เก็บจาก จ.อุบลราชธานี เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อสารรมฟอสฟีนที่ระดับความเข้มข้น 0.04 mg/l การศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ Preheat ที่ 94 °C 1 นาที Denature ที่ 92 °C 1 นาที annealing ที่ 35 °C 1 นาที และ extension ที่ 72 °C 2 นาที และเมื่อเพิ่ม $MgCl_2$ จาก 4 mM เป็น 5 mM จะทำให้เห็นแถบของ DNA ได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น และในการทดสอบหา Random Primer พบว่า Primer ที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ให้กับมอดข้าวเปลือกได้คือ P3, RP6-14, RP16-74 แต่ Primer ที่ทำให้เห็นแถบของ DNA ได้ชัดเจนมากที่สุดคือ P3, RP6-13 จึงได้เลือก PCR product เหล่านี้มาแยกโดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีที่แยกแถบของ DNA ได้ชัดเจนมากกว่าการใช้ agarose gel อย่างไรก็ตาม มอดข้าวเปลือกที่เก็บจาก จ.เชียงใหม่ (Resistance) และ จ.สมุทรปราการ (Non Resistence) ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ทำให้ไม่สามารถนำแถบของ Polymorphic DNA marker มาเปรียบเทียบกันได้

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Abstract

Lesser grain borers (*Rhyzopertha dominica*) collected from a rice mill in Ubonratchthani were sensitive to phosphine at level 0.04 mg/l. The optimization condition of PCR was preheat at 94 °C 1 minute denature at 92 °C 1 minute annealing at 72 °C 2 minutes. The steps from denature to extension were repeated 35 rounds. The increasing concentration of $MgCl_2$ from 4 mM to 5 mM produced brighter PCR bands. Random primers that were able to amplify *Rhyzopertha* DNA were P3, RP6-14, RP16-74. But primer P3, RP6-13 produced bright and clear PCR bands. These PCR products were run on polyacrylamide gel and showed clearer bands than on agarose gel. However, lessor grain borers from Samutharaprakan and Chaing Mai were unable to amplify. Thus, we can not compare polymorphic DNA markers.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญเรื่อง

บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
วิธีการทดลอง	7
ผลการทดลอง	11
สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ	19
บรรณานุกรม	20
ภาคผนวก ก	22
ภาคผนวก ข	24
ประวัตินักวิจัย	29

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนการตายของ Rhyzopertha dominica ที่ได้รับการรมสารรมฟอสฟีนที่เวลา 20 ชั่วโมง 11

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนการตายของ Rhyzopertha dominica ที่ไม่ได้รับการรมสารรมฟอสฟีน (Control) ที่เวลา 20 ชั่วโมง (Control) 12

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ random primer 27

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	PCR product โดยใช้ condition ที่ 2 แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	14
ภาพที่ 2	PCR product โดยใช้ condition ที่ 3 แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	14
ภาพที่ 3	PCR product โดยใช้ condition ที่ 3 โดยเติม 50mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.5µl (5 mM final concentration) แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	15
ภาพที่ 4	PCR product โดยใช้ condition ที่ 2 โดยเติม 50mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.0µl (4mM final concentration) แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	15
ภาพที่ 5	PCR product เมื่อใช้ random primer RP6-RP13 แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	16
ภาพที่ 6	PCR product โดย Primer ที่ใช้คือ RP31-RP38	17
ภาพที่ 7	PCR product เมื่อนำมาแยกโดยใช้ polyacrylamide gel	18
ภาพที่ 8	การเตรียมสารรมฟอสฟีนจากก้อนฟอสฟีนให้มีความเข้มข้น 0.04 mg/l จาก 5% sulfuric acid	23
ภาพที่ 9	การรมสารฟอสฟีนของ Rhyzopertha dominica ใน desiccators ที่มี Stirrer หมุนวนอยู่ด้านล่าง	24
ภาพที่ 10	การฉีดสารรมฟอสฟีนที่มีความเข้มข้น 0.04 mg/l ปริมาตร 210µl ลงใน desiccators ที่มี มอดบรรจุอยู่ภายในขวด	24
ภาพที่ 11	ภาพแสดง Keypad ของเครื่อง Gel Scan 2000	28

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

คำอธิบายสัญลักษณ์

สัญลักษณ์	ความหมาย
°C	องศาเซลเซียส
µl	ไมโครลิตร
g	กรัม
l	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
µM	ไมโครโมลาร์
rpm	รอบต่อนาที

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทนำ

ข้าวเป็นอาหารหลัก และสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทยมาช้านาน ภายหลังการเก็บเกี่ยวข้าวอาจได้รับความเสียหายจากแมลงในระหว่างการเก็บรักษา เพื่อบริโภค เพื่อใช้ทำพันธุ์ หรือเพื่อรอการสีข้าว จากการทดสอบประเมินความเสียหายของข้าวเปลือกในยุ้งจากการเข้าทำลายของแมลงในเวลา 6 เดือน โดยเก็บตัวอย่างข้าวเปลือกทุก 2 เดือน พบว่าระยะหลังเก็บเกี่ยวใหม่ๆ เมล็ดเสียหายประมาณ 1.35-4.18 % สำหรับประเทศไทย หากข้าวเปลือกได้รับความเสียหาย 5% ต่อปี จากผลผลิต 19 ล้านตัน จะคิดเป็นน้ำหนักที่สูญเสียประมาณ 950,000 ตัน และถ้าราคาข้าวเปลือกเฉลี่ยตันละ 5,000 บาท จะคิดเป็นเงินสูญเสียถึง 4,750 ล้านบาท (ชูวิทย์ และคณะ, 1996) ปัจจุบันราคาประกันข้าว ราคาไม่ต่ำกว่า 6700 บาทต่อตัน ฉะนั้นมูลค่าที่สูญเสียอาจมากกว่านี้ นอกจากข้าวแล้วผลิตผลอื่นๆทางการเกษตรก็ได้รับความเสียหายมากเช่นกัน

แมลงศัตรูในโรงเก็บที่สำคัญ 3 ชนิด คือ มอดข้าวเปลือก (*Rhyzopertha dominica*) หรือมอดหัวป้อมหรือมอดหัวไม้ขีด มอดข้าวสาร หรือด้วงงวงข้าว (*Sitophilus oryzae*) และมอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) แมลงทั้ง 3 ชนิดนี้ มีการแพร่กระจายทั่วโลก แต่ระบาดรุนแรงในเขตอบอุ่นและเขตร้อน สามารถเข้าทำลายได้ทั้งข้าวเปลือก ข้าวสารและแป้ง แต่มีความชอบข้าวแต่ละชนิดมากน้อยต่างกัน การเข้าทำลายของแมลงเหล่านี้ก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ทั้งในแง่การเข้าทำลายผลผลิตโดยตรง และปัญหาในการจัดการ โดยตัวอ่อนของแมลงจะเข้าทำลายภายในเมล็ด กัดกินภายในจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยจึงเจาะออกมาภายนอก ตัวเต็มวัยแทะเล็มภายนอกเมล็ด และปล่อยสิ่งขับถ่าย ทำให้มีกลิ่นเหม็น นอกจากนี้ตัวเต็มวัยยังสามารถบินได้ไกล จึงระบาดไปยังโรงเก็บอื่นๆได้ง่าย มอดข้าวเปลือกจะเข้าทำลายเมล็ดข้าว กข. 13 กข. 7 ขาวดอกมะลิ และ กข. 1 จากมากไปน้อยตามลำดับ (กุสุมาและคณะ, 1985)

การควบคุมแมลงศัตรูในโรงเก็บนิยมใช้สารรม ในอดีตมีอยู่ถึง 60 ชนิด แต่ปัจจุบันสารรมเหล่านั้นต้องเลิกใช้ เนื่องจากความเป็นพิษ คงเหลืออยู่เพียง 2 ชนิด คือ ฟอสฟีน (PH_3) และ เมธิลโบรไมด์ (CH_3Br) ฟอสฟีนมีข้อดีคือ มีวิธีการใช้ที่ง่าย เสียค่าใช้จ่ายน้อย และที่สำคัญคือไม่มีสารตกค้าง และเนื่องจาก เมธิลโบรไมด์ มีผลต่อการทำลายโอโซนในชั้นบรรยากาศ ก่อให้เกิดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อม จึงได้รับความนิยมน้อยลง ตามข้อตกลงกับ NASA ในประเทศที่พัฒนาแล้ว จะต้องยุติการใช้เมธิลโบรไมด์ในปี ค.ศ. 2005 สำหรับประเทศกำลังพัฒนาจะต้องลดการใช้ลงเรื่อยๆ และยุติการใช้โดยสิ้นเชิงในปี ค.ศ. 2015 (United Nation Environment programme, 1996) ฉะนั้นฟอสฟีนจึงเป็นสารรมเพียงชนิดเดียวที่จะยังคงเหลือใช้ในอนาคต ขณะนี้บริษัทเอกชน CYTEC ประเทศคานาดา กำลังศึกษาและผลิตสารรมชนิดใหม่ คือ ECO_2Fume ซึ่งประกอบด้วยกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 98 %และฟอสฟีน 2 % แต่ก็ทำให้ต้นทุนการกำจัดแมลงเพิ่มสูงขึ้นมาก

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ประมาณ 5-10 เท่า และวิธีการใช้ยุ่งยากกว่า ต้องทำในไซโลที่ปิดสนิท นอกจากนี้สารรมชนิดนี้ยังไม่มีการนำมาใช้ในประเทศไทย United Nations Environment Programme (UNEP) and United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) ร่วมกับกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ทำโครงการการศึกษาการใช้ฟอสฟีน และกาซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้เมธิลโบรไมด์ในกรุงเทพ และจังหวัดใกล้เคียง ในปี ค.ศ. 1996-1997

อย่างไรก็ตาม มีรายงานเกี่ยวกับการดื้อต่อฟอสฟีนจากหลายประเทศ เริ่มต้นจากบังกลาเทศ (Tyler *et al.*, 1983) อินเดีย (Rajendran and Narasimhan, 1994) และออสเตรเลีย (Collins *et al.*, 2002) ในประเทศไทย มอดข้าวเปลือกเป็นปัญหาที่สำคัญที่เกิดการดื้อต่อสารรมที่ใช้ในการควบคุม แมลง Chotimanothum, 2000 รายงานการดื้อต่อสารรมฟอสฟีนของมอดข้าวเปลือกใน 13 จังหวัด ในเขตภาคกลาง มีเพียง 2 จังหวัดเท่านั้นที่ไม่การดื้อต่อสารรมฟอสฟีน ส่วนการดื้อสารรมฟอสฟีนในมอดข้าวสาร และมอดแป้ง ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย และยังไม่มีการศึกษาในภาคอื่นๆของประเทศไทย

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีสารอื่น หรือทางเลือกอื่นที่สามารถทดแทนการใช้สารรมฟอสฟีนได้ เพื่อให้ยังสามารถใช้สารรมฟอสฟีนได้ต่อไป โดยเฉพาะในระดับเพื่อการส่งออก จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ ต้องมีการควบคุมการใช้ให้ถูกต้อง มีการตรวจวัดระดับของการต้านทาน และคิดหาวิธีในการป้องกันการดื้อต่อสารรมฟอสฟีน ก่อนที่จะต้องยุติการใช้เมธิลโบรไมด์อย่างสิ้นเชิงในปี ค.ศ. 2015

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การตรวจเอกสาร

มอดข้าวเปลือก (Lesser Grain Borer)

ชื่ออื่น ๆ	มอดหัวป้อม มอดหัวไม้ขีด Australian Wheat Weevil
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Rhyzopertha dominica* (Fabricius)
ชื่อสามัญ	Lesser Grain Borer
วงศ์	Bostrychidae
อันดับ	Coleotera (สิริวัฒน์, 1982)

ลักษณะรูปร่างและชีวประวัติ

ตัวเต็มวัยรูปร่างเป็นทรงกระบอกสีน้ำตาลเข้มปนแดง มีความยาวประมาณ 2.5-3.0 มม. ส่วนหัวสั้นและงุ้มซ้อนอยู่ใต้ปล่องแรก ด้านหน้าอกแหลม และมีซี่กฟันเรียงตามขวางส่วนด้านหลังอกปล้องแรกมีส่วนที่แบนๆต้องมองดูด้านหน้าถึงจะเห็นส่วนหัวที่ชัดเจนเวลามองดูด้านบนจะดูเหมือนส่วนอกเป็นส่วนหัว ปีกคู่หน้ามีหลุมอยู่โดยเรียงเป็นแถวอย่างมีระเบียบตัวเมียวางไข่ได้คราวละ 300-500 ฟองเมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอน มีลักษณะสีขาวขุ่น จะเข้าดักแด้ภายในเมล็ด โดยระยะของตัวอ่อน 21-28 วัน ดักแด้ 6-8 วัน วงจรชีวิตใช้เวลา 1 เดือนขึ้นไป ตัวเต็มวัยอยู่ได้นาน 5 เดือนหรือมากกว่านี้

วงชีวิต

ไข่ ——➤ หนอน ·····➤ ดักแด้ ——➤ ตัวเต็มวัย

การแพร่กระจายและฤดูกาล

มอดข้าวเปลือกมีการแพร่กระจายไปทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่มีการปลูกข้าว มักระบาดในประเทศเขตอบอุ่นตลอดทั้งปี

พืชอาหาร

ข้าวเปลือก ข้าวสาร ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี พืชหัว (ชูวิทย์และคณะ, 2000)

มอดข้าวเปลือกเป็นแมลงที่เป็นศัตรูที่สำคัญของข้าวเปลือกชนิดหนึ่ง ทำลายเมล็ดข้าวเปลือกให้ได้รับความเสียหายทำให้ไม่สามารถสีเป็นข้าวสารได้ (สิริวัฒน์, 2526) มอดข้าวเปลือกจัดเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมี 6 ขา โดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะทำลายเมล็ดข้าวให้ได้รับความเสียหาย และมีกลิ่นเหม็นซึ่งมีลักษณะทำลายที่สำคัญดังนี้ คือ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ลักษณะการเข้าทำลายของมอดข้าวเปลือกต่อผลิตผลทางการเกษตร

หลังเก็บเกี่ยว (Post Harvest) เมล็ดพืชบางชนิดต้องกะเทาะเปลือก ขัดสี คัดแยก ทำความสะอาด ช่วงระยะปฏิบัติงานเหล่านี้โดยมากจะทำที่โรงเก็บหรือสถานที่เดียวกัน ซึ่งอาจมีแมลงอาศัยอยู่แล้วทำให้แมลงเข้าไปทำลายผลผลิตได้ นอกจากนี้ในการขนส่งจากที่หนึ่งไปยังที่หนึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน และหากขนส่งโดยวิธีใส่กระสอบป่าน หรือการขนส่งในปริมาณมากๆ โดยมิได้บรรจุภาชนะใดๆแมลงก็สามารถทำลายระยะเวลานี้ได้ (ชูวิทย์และคณะ, 2000)

แมลงจะอาศัยและกัดกินอยู่ภายในเมล็ด ตัวเต็มวัยของแมลงจะไข่อยู่ที่ผิวภายนอกเมล็ดหรือผลผลิตเมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอนก็จะเจาะเข้าไปภายในกัดกินเจริญเติบโตจนกระทั่งครบวงจรชีวิต ตัวเต็มวัยก็จะเจาะเมล็ดหรือผลิตผลออกมาทำให้เป็นรูและภายในเป็นโพรง (ชูวิทย์และคณะ, 2000)

ประเภทของความเสียหายที่เกิดขึ้น

ความเสียหายเกิดจากการทำลายของแมลงมีดังนี้

สูญเสียน้ำหนัก แมลงสามารถกินอาหารได้มากกว่าน้ำหนักตัวหลายเท่า เมื่อแพร่ระบาดมากก็ทำให้สูญเสียน้ำหนักมาก แมลงที่อาศัยและกัดกินอยู่ภายในเมล็ดจะออกมาจากเมล็ดจะออกมาจากเมล็ดเมื่อเป็นตัวเต็มวัย ถ้ามีแมลงมาทำลายมากอาจทำให้เมล็ดเหลือแต่เปลือก ซึ่งเป็นการสูญเสียน้ำหนักโดยทางตรง

สูญเสียคุณค่าทางอาหาร ส่วนประกอบของเมล็ดคือ endosperm ซึ่งประกอบด้วย แป้ง ไขมัน โปรตีน และ germ ซึ่งประกอบด้วยวิตามิน ธาตุอาหาร ได้แก่ Thiamine (B1) และ Riboflavin (B6) และพบว่าแมลงชอบทำลาย germ มากกว่าเนื่องจากในสภาพความชื้นต่ำ ส่วนที่เป็น endosperm จะแข็ง ในขณะที่ germ จะอ่อน

สูญเสียความงอก เนื่องจากแมลงชอบทำลายส่วนที่เป็น germ เป็นผลให้เมล็ดสูญเสียความงอก หรือถ้าเปอร์เซ็นต์ความงอกไม่ลดลง ก็จะมีผลต่อความแข็งแรงของต้นพืชอาจทำให้ตายหรือไม่ให้ผลผลิต

สูญเสียคุณภาพ ทำให้ความสม่ำเสมอของเมล็ดเสียไป การเข้าไปปะปนของแมลงและของเสียจากแมลงจะทำให้เกิดกลิ่นเหม็น คุณภาพของผลิตผลบางชนิด เช่นแป้งเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ซากแมลงที่ตายจะติดไปกับอาหาร ทำให้น่ารังเกียจในการนำไปบริโภค

สูญเสียเงิน เมื่อน้ำหนักของผลิตผลลดลงก็ทำให้สูญเสียรายได้ เนื่องจากน้ำหนักขาดหายไปและคุณภาพของผลิตผลลดลงก็ทำให้ราคาลดลงตามไปด้วย

สูญเสียชื่อเสียง ผลผลิตที่ถูกทำลายในด้านคุณภาพ ทำให้ผู้ซื้อและผู้บริโภคเสื่อมความเชื่อถือและไว้ใจในสินค้า และเมื่อขายสินค้าคุณภาพไม่ดีตามสัญญาของการซื้อขาย ทำให้ความเชื่อถือในด้านการค้าลดลง อาจจำหน่ายไม่ได้หรือลดน้อยลง และอาจกระทบกระเทือนถึงสินค้าชนิดอื่นๆ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การป้องกันโดยการใช้สารรมฟอสฟีน

สารรมฟอสฟีนที่นำมาใช้สำหรับการรมฆ่าแมลงศัตรูผลทางการเกษตรนั้น ได้ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1930 โดย Dr. Werner Freyberg โดยการบรรจุอยู่ในถุง ที่มี Aluminium Phosphine 57% และสารอื่น ๆ 43% หลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 มีการผลิตกาซฟอสฟีนในรูป tablets และ pellets และเมื่ออเมริกาได้เริ่มนำกาซฟอสฟีนมาใช้ในปี ค.ศ. 1958 เพื่อกำจัดแมลงศัตรูผลทางการเกษตร ภายใต้การรับรองจากองค์การอาหารและยาว่าปลอดภัยไม่มีสารพิษตกค้างทำให้กาซฟอสฟีนได้รับความนิยมใช้กันมากขึ้น โดยเฉพาะการรมใบยาสูบ สำหรับสารฟอสฟีนนั้นได้มาจากปฏิกิริยาของ Aluminium Phosphine หรือ Magenesium Phosphide กับไอน้ำในอากาศ ดังนี้

Phosphine + Water ⟶ Hydrogen Phosphine + Powdery Reaction Products

ปฏิกิริยาทางเคมี คือ

$AlP + 3H_2O \longrightarrow Al(OH)_3 + PH_3$

$Mg_3P_2 + 6H_2O \longrightarrow 3Mg(OH)_2 + PH_3$

อัตราการรม

ใช้อัตรา 2-3 เม็ด ต่อ เมล็ดพืช 1 ตัน หรือ 1-2 เม็ด ต่อเนื้อที่ 1 ลูกบาศก์เมตร ในเวลา 5-7 วัน

คุณสมบัติของสารฟอสฟีน

1. เป็นสารที่ไม่มีสี มีกลิ่นเล็กน้อย คล้ายกระเทียม
2. สูตรเคมี คือ PH_3
3. น้ำหนักโมเลกุล 34.1
4. หนักกว่าอากาศ 1.18 เท่า
5. จุดเดือด 87.4 ° C
6. ละลายน้ำได้ประมาณ 26% (by Vol. At 17 ° C)
7. กาซฟอสฟีนที่เข้มข้นมากจะระเบิดลุกเป็นไฟได้
8. ทำปฏิกิริยากับโลหะ เช่น ทองแดง และเงิน
9. เป็นพิษต่อแมลง และสัตว์เลือดอุ่นสูงมาก
10. ไม่มีพิษตกค้าง

เนื่องจากกาซฟอสฟีนที่มีความเข้มข้นมาก ๆ จะระเบิดลุกเป็นไปได้ การผลิตสารรมฟอสฟีนจึงได้มีการป้องกันมิให้ระเบิดลุกเป็นไฟเป็นอย่างดี แต่อย่างไรก็ตามในการใช้ ผู้ปฏิบัติจะต้องระมัดระวัง โดยเฉพาะการรมกองผลิตผลที่มีขนาดใหญ่ต้องใช้ปริมาณมาก จะต้องแบ่งใช้ปริมาณที่

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ถูกต้องเหมาะสม และควรเตรียมพร้อมในกรณีอาจเกิดการลุกเป็นไฟขึ้นความเข้มข้นกาซฟอสฟีนที่มีความปลอดภัย คือ 0.3 ppm (4 mg/l or 0.4 g/m^3)

อาการผู้ที่ได้รับสารพิษ

จะเกิดปฏิกิริยาทางระบบประสาท ทำให้เกิดอาการคลื่นเหียน วิงเวียน หน้ามืด ตาลาย ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร ปวดในท้อง ลิ้นแข็ง พูดไม่ชัด อาการดังกล่าวนี้จะไม่แสดงอาการทันที แต่จะปรากฏภายหลังในเวลา 30 นาที – 48 ชั่วโมง แล้วแต่ความต้านทานของแต่ละบุคคล (delay effects)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

วิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงมอดข้าวเปลือก (*Rhyzopertha dominica*)

1. เก็บตัวอย่างแมลงจากโรงสีในจังหวัดอุบลราชธานี
2. นำแมลงที่ได้มาจัดจำแนก และเลี้ยงในขวดปากกว้าง ใส่อาหารประมาณไม่เกิน 1/4 ของขวด ปิดด้วยกระดาษกรอง ปล่อยให้วางไข่ แล้วจึงร่อนแมลงตัวเต็มวัยออกด้วยตะแกรง ปล่อยให้ไข่เป็นดักแด้

การรมฟอสฟีน

1. คัดเลือกมอดที่จะใช้สำหรับรมฟอสฟีนโดยใช้มอดที่มีอายุอยู่ในช่วงเดียวกัน
2. การรมฟอสฟีนจะทดสอบที่ 1 ความเข้มข้นคือ 1 เท่า (0.04 mg/l) 50 ตัว โดยนำมอดทั้ง 50 ตัวใส่ในขวดแก้วขนาดเล็กปิดฝาขวดแก้วด้วยผ้าขาวบางเพื่อให้มีอากาศถ่ายเทเข้าออกได้สะดวก
3. เตรียม desiccator ที่จะใส่ขวดแก้วบรรจุมอด โดยวัดปริมาตร desiccator และวัดปริมาตรความจุของโถแก้ว เพื่อใช้ในการคำนวณการเตรียมความเข้มข้นสำหรับฟอสฟีน
4. การเตรียมฟอสฟีน
    4.1 เตรียม sulfuric acid 5% ปริมาตร 2500 ml ใส่ลงในโถแก้ว
    4.2 ใส่ก้อนฟอสฟีน 1/4 ก้อน ครอบทับก้อนฟอสฟีนด้วย Funnel glass
    4.3 ใช้แท่นตั้ง Burette ช่วยในการยึดเกาะขวดแก้วสำหรับดักกาซที่ระเหยขึ้นมาจากก้อนฟอสฟีน
5. ใช้ syring ดูดกาซฟอสฟีนจากขวดแก้ว ปริมาตร 210µl ใส่ใน desiccator
6. ใช้เครื่อง Stirrer สำหรับช่วยในการให้อากาศหมุนวนภายใน
7. ตั้งทิ้งไว้ 20 ชั่วโมงจึงเริ่มนับการตายของมอด

การสกัด DNA

1. นำมอดที่ผ่านการรมฟอสฟีนมาแล้ว ใส่ใน eppendorf เติม Liguid Nitrogen แล้วบดด้วย micropastle
2. นำมอดที่บดแล้วมาใส่ใน eppendorf เติมน้ำกลั่น Sterile 1000 µl
3. นำมา incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่ 13000 rpm 3 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง เหลือไว้แต่ pellet

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

4. นำส่วนที่เป็น pellet ซึ่งมีปริมาตรประมาณ 50µl มาเติม 5% Chelex 150 µl จะได้ปริมาตรรวมประมาณ 200µl
5. นำไป incubate ที่ 55 °C นาน 30 นาที จากนั้นนำมา เขย่าด้วย Vortex ด้วยความเร็วสูง 5-10 วินาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 8 นาที
6. Vortex ด้วยความเร็วสูง 5-10 วินาทีแล้วนำไป ปั่นที่ 12320 rpm 3 นาที เก็บส่วนที่เป็น supernatant (ส่วนใส)
7. นำส่วนที่เป็น supernatant มาทำซ้ำตามวิธีปฏิบัติในข้อ 4 คือ เติม 5% Chelex 150 µl จนถึงข้อ 6 จะได้เป็น supernatant ที่ต้องการ

<u>การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)</u>

1. ดูดสารละลายดังต่อไปนี้ ใส่ลงไปใน PCR tube

2	µl	Template DNA
2.5	µl	10x PCR buffer
2.5	µl	50 mM $MgCl_2$
1	µl	dNTPs
1	µl	*Taq* TB
1	µl	Primer
15	µl	DI water Sterile

โดย Template ที่ใช้คือ DNA ที่สกัดได้จาก *Rhyzopertha dominica* ที่ผ่านการรมฟอสฟีนมาแล้ว Primer ที่เลือกใช้คือ P3, RP8, RP9, RP10, RP11, RP12 และRP13

2. นำสารทั้งหมดที่ใส่ลงในหลอด PCR tube แล้วมาปั่นเพื่อให้สารเข้ากัน และเพื่อให้สารตกลงมาที่ก้นหลอด
3. เติม Mineral Oil Sterile 25 µl ลงใน PCR tube ทุกหลอด
4. นำไปใส่ในเครื่อง PCR โดยใส่ Mineral Oil บนหลุมสำหรับใส่ PCR tube แล้วตั้ง Program ดังนี้

Pre-heat	ที่	94 °C	1 นาที	
Denature	ที่	92 °C	1 นาที	35 รอบ
Annealing	ที่	35 °C	1 นาที	
Extention	ที่	72 °C	2 นาที	

5. เก็บตัวอย่าง PCR Reaction ที่อุณหภูมิ 4 °C

<u>หมายเหตุ</u> ในขณะที่ปฏิบัติควรแช่สารทุกชนิด และ PCR tube ในน้ำแข็งตลอดเวลา

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Agarose gel electrophoresis of DNA

1. ขั้นตอนการเตรียม Agarose gel

1.1 ชั่ง Agarose 0.5 g ในขวดรูปชมพู่ เติม 0.5x TBE buffer 50 µl

1.2 นำไปหลอมในเตาไมโครเวฟจนละลาย

1.3 ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 60 °C (ขนาดที่มือพอจับได้)

1.4 เท Agarose ลงใน gel box ที่สวมหวีไว้แล้ว รอจน gel แข็งตัวแล้วจึงดึงออก

2. ขั้นตอนการแยก DNA ด้วยเครื่อง Electrophoresis

1.1 วางแผ่น gel ลงในเครื่อง electrophoresis เท 0.5x TBE buffer จนท่วมแผ่น gel

1.2 ผสม Blue juice 4 µl กับ PCR Reaction 16 µl ผสมให้เข้ากันโดย Auto pipette แล้วจึงหยอดใส่หลุมในแผ่น gel

1.3 ปิดฝาเครื่อง ต่อขั้ว Anode ไว้ด้านบน และCathode ไว้ด้านล่าง เปิดเครื่องเพื่อจ่ายกระแสไฟฟ้า ปรับค่า Voltage ให้เท่ากับ 90 Volt

1.4 รอจนกระทั่งสีของ Blue Juice เคลื่อนที่ลงมาได้ เกือบสุด (ประมาณ ¾ ของแผ่น gel)

1.5 ปิดเครื่องแล้วนำแผ่น gel ไปย้อมในสารละลาย Ethidium bromide 0.5 mg/ml นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

1.6 นำแผ่น gel ไปดูแถบของ DNA ด้วยเครื่อง UV transilluminator บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation

Acrylamide gel of DNA

1. ขั้นตอนการเตรียม 4% denaturing Acrylamide gel

1.1 ล้างกระจกที่มีความยาว 18 ซม.ให้สะอาด เช็ดให้แห้ง และเช็ดกระจกอีกครั้ง Ethanol 75% เพื่อล้างคราบไขมันและคราบโปรตีนออกให้หมดควรทำซ้ำหลายๆครั้ง

1.2 ประกบแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกัน

1.3 ส่วนประกอบของ Acrylamide มีดังนี้

2	ml	30%Acrylamide
0.9	ml	10xTBE
90	µl	10%APS
9	µl	TEMED
12.1	ml	DI Water

1.4 ผสม Acrylamide ทั้งหมดเบาๆ หลังจากนั้นนำ กระบอกฉีดยามาดูดสารทั้งหมด

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

1.5 Degas ออกจาก Acrylamide โดยการดึงก้านกระบอกฉีดยาลง ในขณะที่ปลายนิ้วกดที่ปากกระบอก จะเกิดฟองกาซขึ้น ให้ทำด้วยความรวดเร็วเพื่อป้องกันการแข็งตัวของ Acrylamide

1.6 นำ Acrylamide ที่ผ่านการ Degas แล้วมาค่อยๆฉีดลงไปในแผ่นกระจกแล้วปิดคอบด้านบนด้วย Casting Comb รอจนกระทั้ง gel แข็งตัว

2. ขั้นตอนการแยก DNA ด้วยเครื่อง DNA Fragment Analysis

2.1 เมื่อ gel แข็งตัวแล้วถอด Casting Comb ออก และใส่ Combที่มีลักษณะเป็นหวีลงไปแทนที นำแผ่นกระจกใส่ลงในเครื่อง

2.2 เติม Ethidium bromide 8 µl และ0.6x TBE buffer 200 ml ใส่ลงในถาดด้านล่างของตัวเครื่อง

2.3 เติม 0.6x TBE buffer 120 ml ใสลงในถาดด้านบนของตัวเครื่อง

2.4 ทำการ Pre-Run เครื่อง DNA Fragment Analysis ที่ใส่ Acrylamide gel 30 นาที

2.5 ทำการ Flush หลุมใน gel ด้วย Auto pipette

2.6 Load 2x Loading Dye 1 µl และ PCR Reaction 1µl ผสมด้วย Autopipette

2.7 ดูด Sampleใส่ลงไปในหลุดบน gel ทั้ง 2 µl

2.8 Pulse Sample เป็นเวลา 22 วินาที และทำการ Flush ด้วย Autopipette อักครั้งเพื่อล้างส่วนเกินออกไป

2.9 ปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการ Run Sample 35° C ใช้เวลา 45 นาที ปรับค่า Voltage ให้เท่ากับ 1200 Volt

2.10 การ Run Sample สามารถทำได้โดยการสั่งการที่เครื่อง คอมพิวเตอร์เลือกเข้า Program Gel –Scan 2000 เริ่มต้นการ Run Sample (Acquire/Start) แถบของ DNA ที่แยกได้จะปรากฏขึ้นบนจอคอมพิวเตอร์

หมายเหตุ ควรตรวจสอบจนมั่นใจแล้วว่ากระจกไม่มีรอย หรือคราบใดๆติดอยู่ ในการฉีด Acrylamide ควรทำด้วยความระมัดระวังอย่าให้เบื้อนบนแผ่นกระจก ควรตรวจสอบว่า 0.6x TBE buffer ที่ใส่อยู่ด้านบนไม่รั่วซึมลงมาด้านล่าง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ผลการทดลอง

1. การศึกษา การรมฟอสฟีน ของมอดข้าวเปลือก (*Rhyzopertha dominica*)

จากการเก็บตัวอย่างมอดข้าวเปลือกในจังหวัดอุบลราชธานีแล้วนำมาทำการเลี้ยงให้เกิดตัวอ่อน จากนั้นจึงทำการคัดแยกตัวแก่ออกจากตัวตัวอ่อน ตัวอ่อนที่ได้รับการคัดแยกออกมาจะเจริญเป็นตัวโตเต็มวัยซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 2 เดือน นำตัวอย่างมอดข้าวเปลือกที่เลี้ยงได้มาทำการรมฟอสฟีนโดยใช้ตัวอย่างที่ใช้ในการรมดังต่อไปนี้คือตัวอย่างมอดข้าวเปลือกจากจังหวัดอุบลราชธานี 50 ตัว ตัวอย่างมอดข้าวเปลือกที่ได้จากจังหวัดสมุทรปราการซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อสารรมฟอสฟีน (Negative Control) 50 ตัว และตัวอย่างมอดข้าวเปลือกที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารรมฟอสฟีน (Positive Control) 50 ตัว โดยตัวอย่างมอดที่ได้จาก จังหวัดสุมทรปราการ และเชียงใหม่จะเป็นตัวที่ใช้ในการเปรียบเทียบการตายของมอดจากจังหวัดอุบลราชธานีว่าเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารรมฟอสฟีนหรือเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อสารรมฟอสฟีน

ซึ่งเมื่อรมสารรมฟอสฟีนที่ความเข้มข้น 1 เท่า (0.04 mg/l) คือ 210 µl ใส่ใน desiccator ที่บรรจุขวดบรรจุมอด และมีการให้อากาศหมุนวนภายในโดยใช้เครื่อง Stirrer ในเวลา 20 ชั่วโมงจะพบว่ามอดจากจ.อุบลราชธานีตาย 50 ตัว มอดจากจ.สมุทรปราการตาย 46 ตัว และมอดจาก จ.เชียงใหม่ ตาย 8 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนการตายของ *Rhyzopertha dominica* ที่ได้รับการรมสารรมฟอสฟีนที่เวลา 20 ชั่วโมง

ชนิดสายพันธุ์ *Rhyzopertha dominica*	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่รอด (ตัว)
จ.อุบลราชธานี	50	0
จ.สมุทรปราการ	46	4
จ.เชียงใหม่	8	42

นอกจากนี้แล้วยังได้มีการทำ Control อีกชุด โดยกำหนดสภาวะให้เหมือนกัน แต่ Control นี้จะไม่ได้มีการรมฟอสฟีน เพื่อเปรียบเทียบความแข็งแรง ความทนทานของสายพันธุ์ จ.อุบลราชธานี จ.สมุทรปราการ และ จ.เชียงใหม่ ในเวลา 20 ชั่วโมงจะพบว่ามอดส่วนใหญ่ไม่ตายยกเว้นมอดจากจ.อุบลราชธานีตาย 1 ตัว (ตารางที่ 2)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนการตายของ *Rhyzopertha dominica* ที่ไม่ได้รับการรมสารรมฟอสฟีน (Control) ที่เวลา 20 ชั่วโมง (Control)

ชนิดสายพันธุ์ *Rhyzopertha dominica*	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่รอด (ตัว)
จ.อุบลราชธานี	1	49
จ.สมุทรปราการ	0	50
จ.เชียงใหม่	0	50

เมื่อนำจำนวนการตายของมอดทั้ง 3 สายพันธุ์มาคิดเป็น % อัตราการตาย เนื่องจากสารรมฟอสฟีน จะได้ว่าสายพันธุ์ จ.อุบลราชธานี มีอัตราการตายคิดเป็น 100% สายพันธุ์จ.สมุทรปราการ มีอัตราการตายคิดเป็น 92% และสายพันธุ์ จ.เชียงใหม่มีอัตราการตายคิดเป็น 16%

และเมื่อครบ 14 วันที่อยู่ในระยะการวัดจำนวนการตายของมอดพบว่า ของ *Rhyzopertha dominica* จากสายพันธุ์ จ.อุบลราชธานี มีอัตราการตาย 50 ตัวเป็น 100% มอดจากจ.สมุทรปราการ มีอัตราการตาย 50 ตัว คิดเป็น 100% และ มอดจากจ.เชียงใหม่ มีอัตราการตายเป็น 8 ตัว รอด 42 ตัว คิดเป็น 16%

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

2. การศึกษา DNA Fingerprint ของมอดข้าวเปลือก (*Rhyzopertha dominica*)

เมื่อนำตัวอย่างมอดที่ได้รับการรมฟอสฟีนแล้วมาสกัด DNA โดยใช้ Chelex แล้วนำ DNA ที่ได้รับการสกัดมาแล้ว มาทำ PCR โดยใช้ Condition ที่ 1 คือ

Stsge I.	94° C	5	นาที	
Stsge II.	94° C	30	วินาที	30 รอบ
	57° C	1	นาที	
	56° C	1	นาที	
	55° C	1	นาที	
	54° C	1	นาที	
	53° C	1	นาที	
	72° C	5	นาที	

จาก Condition ที่ 1 จะพบว่าไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA เนื่องจากนำมาแยก DNA โดยวิธี Gel Electrophoresis ไม่พบแถบของ DNA จึงได้มีการใช้ Condition ที่ 2 คือ

Stage I.	94° C	5	นาที	
Stage II.	94° C	30	วินาที	35 รอบ
	35° C	1	นาที	
	72° C	1	นาที	
Stage III.	72° C	5	นาที	

จาก Condition ที่ 2 จะพบว่าสามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้แต่จำนวน DNA ที่เพิ่มได้นั้นเมื่อนำมาแยก DNA โดยวิธี Gel Electrophoresis จะพบว่าเห็นแถบของ DNA ไม่ชัดเจนจึงได้มีการใช้ Condition ที่ 3 คือ

Pre-heat	ที่	94° C	1	นาที	
Denature	ที่	92° C	1	นาที	35 รอบ
Annealing	ที่	35° C	1	นาที	
Extention	ที่	72° C	2	นาที	

จาก Condition ที่ 3 จะพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของ DNA ได้และเมื่อนำมาแยก DNA โดยวิธี Gel Electrophoresis ก็พบแถบของ DNA จำนวนมาก จึงเลือก Condition ที่ 3 มาใช้ในการทำ PCR ในครั้งต่อไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

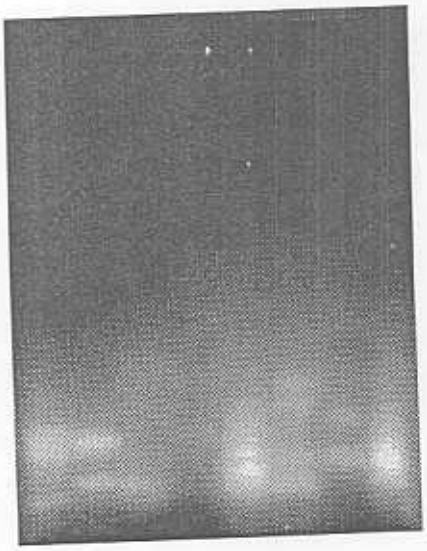
1 2 3

ภาพที่ 1 PCR product โดยใช้ condition ที่ 2 แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

แถวที่ 1 *Rhyzopertha dominica* ตัวอย่างที่ 1

แถวที่ 2 *Rhyzopertha dominica* ตัวอย่างที่ 2

แถวที่ 3 *Rhyzopertha dominica* ตัวอย่างที่ 3



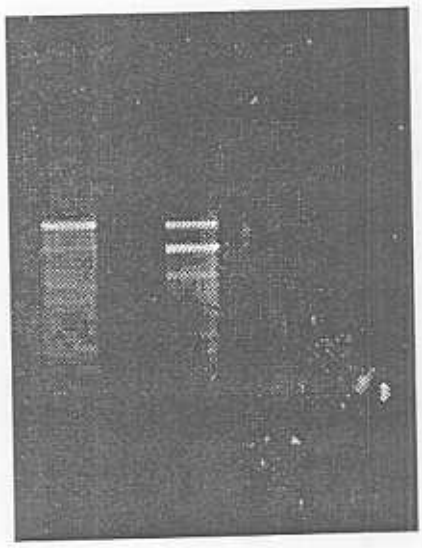
1 2 3 4 5 6 7

ภาพที่ 2 PCR product โดยใช้ condition ที่ 3 แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เมื่อได้ Condition ที่เหมาะสมแล้วได้มีการทำการเปรียบเทียบระหว่าง การทำ PCR โดยมีการเพิ่มปริมาตร $MgCl_2$ และไม่เพิ่มปริมาตร $MgCl_2$ ปริมาตร $MgCl_2$ ที่เพิ่มคือจาก 2.0 µl เป็น 2.5µl (เพิ่มขึ้น 0.5µl) ซึ่งจากการดูการแยก DNA โดยวิธี Gel Electrophoresis พบว่าเมื่อมีการเพิ่มปริมาตร $MgCl_2$ จะเห็นแถบของ $MgCl_2$ ได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นเนื่องจากแถบจะเพิ่มขนาดใหญ่มากยิ่งขึ้น



1 2

ภาพที่ 3 PCR product โดยใช้ condition ที่ 3 โดยเติม 50mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.5µl (5 mM final concentration) แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

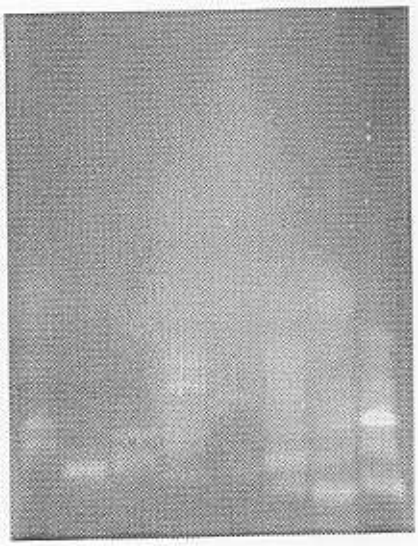
1 2 3 4 5 6

ภาพที่ 4 PCR product โดยใช้ condition ที่ 2 โดยเติม 50mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.0µl (4mM final concentration) แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เมื่อได้ Condition ที่เหมาะสมมากที่สุดคือ Condition ที่ 3 จึงนำมาทำ PCR โดยใช้ Primer ที่ต่างกันออกไปทั้งหมด 71 Primer พบว่าสามารถเพิ่มจำนวน DNA ของสายพันธุ์ จ. อุบลราชธานี ได้ทั้งหมด 67 Primer ไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ของสายพันธุ์ จ. อุบลราชธานี ได้ 4 Primer ซึ่งชนิดของ Primer ที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ คือ P3 ,RP6-RP14 และ RP16-RP 74 ส่วน Primer ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้คือ RP1-RP3 และ RP75

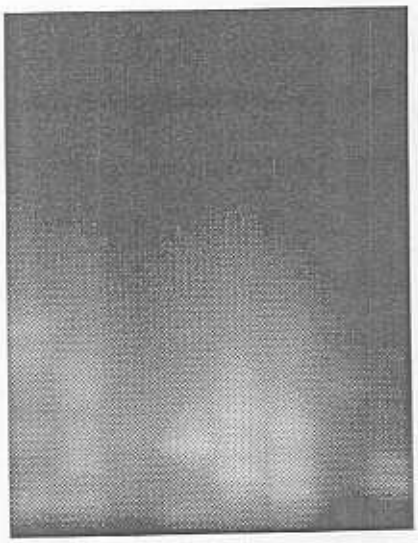


1 2 3 4 5 6 7

ภาพที่ 5 PCR product เมื่อใช้ random primer RP6-RP13 แยกโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis
แถวที่ 1 Primer RP6, แถวที่ 2 Primer RP7, แถวที่ 3 Primer RP8, แถวที่ 4 Primer RP9,
แถวที่ 5 Primer RP10, แถวที่ 6 Primer RP11, แถวที่ 7 Primer RP12, แถวที่ 8 Primer RP13

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



1 2 3 4 5 6 7

ภาพที่ 6 PCR product โดย Primer ที่ใช้คือ RP31-RP38

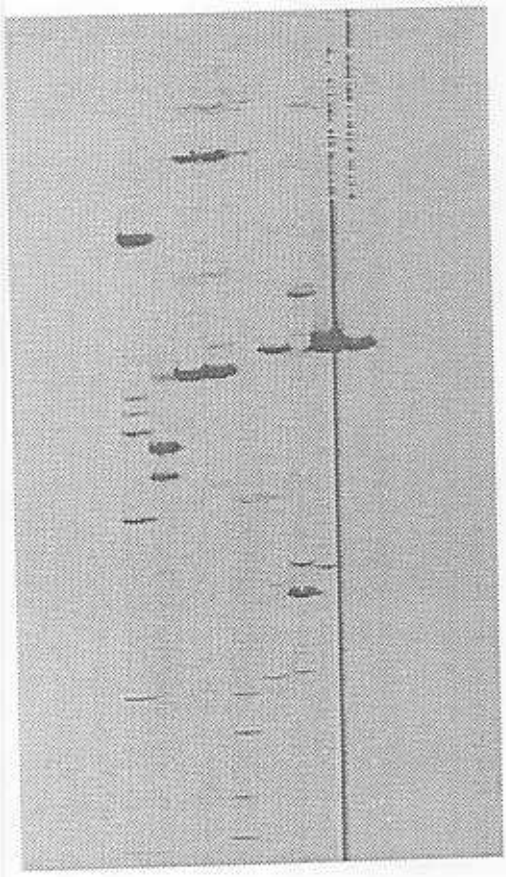
แถวที่ 1 Primer RP31, แถวที่ 2 Primer RP32, แถวที่ 3 Primer RP33, แถวที่ 4 Primer RP34, แถวที่ 5 Primer RP35, แถวที่ 6 Primer RP36, แถวที่ 7 Primer RP37, แถวที่ 8 Primer RP38

สำหรับสายพันธุ์ จ.สมุทรปราการ และ จ.เชียงใหม่ Primer ทั้ง 71 Primer ไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ เนื่องจากเมื่อนำมาแยก DNA โดยใช้วิธี Electrophoresis gel ไม่พบแถบของ DNA เกิดขึ้นแต่อย่างใด

หลังจากที่สามารถแยก DNA ด้วยด้วยวิธี Gel Electrophoresis แล้วจึงนำ PCR Product ที่เหลือมาทำ Gel Acrylamide ดังจะเห็นได้จากภาพที่ 4 และ 6 คือ ภาพที่ 4 เป็นภาพที่แยก DNA โดยใช้วิธี Gel Electrophoresis แต่ภาพที่ 7 เป็นภาพที่แยก DNA โดยใช้วิธี Gel Acrylamide เมื่อเปรียบเทียบภาพทั้ง 2 จะพบว่า การแยก DNA โดยใช้วิธี Acrylamide gel เป็นการแยก DNA ได้ดีกว่าและชัดเจนมากกว่าวิธี Gel Electrophoresis เนื่องจากแถบของ DNA จะแยกออกจากกันอย่างสิ้นเชิงโดยไม่อยู่ติดกันเหมือนแถบ DNA ของวิธี Gel Electrophoresis ที่ยังไม่แยกออกจากกันดีมากนักหรือถ้าหากแยกออกจากกันก็ยังสังเกตได้ยาก

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



1 2 3 4 5 6 7 8

ภาพที่ 7 PCR product เมื่อนำมาแยกโดยใช้ polyacrylamide gel

แถวที่ 1 Primer RP9, แถวที่ 2 Primer RP8, แถวที่ 3 Primer P3, แถวที่ 4 Primer P3,

แถวที่ 5 Primer RP10, แถวที่ 6 Primer RP11, แถวที่ 7 Primer RP12, แถวที่ 8 Primer RP13

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาการรมสารฟอสฟีนของมอดข้าวเปลือก จะพบว่ามอดข้าวเปลือกสายพันธุ์ จ.อุบลราชธานี และจ.สมุทรปราการ เป็นสายพันธุ์ที่เป็น Non resistance เนื่องจากเมื่อนำไปรมด้วยสารรมฟอสฟีนที่มีความเข้มข้น 1 เท่า (0.04 mg/l) ตามที่ FAO แนะนำ มอดจากสายพันธุ์ จ. อุบลราชธานี และจังหวัดสมุทรปราการไม่สามารถต้านทานต่อสารรมฟอสฟีนอยู่ได้ ซึ่งให้ผลคือตายทั้ง 50 ตัว คิดเป็น 100 %ส่วนสายพันธุ์ จ.เชียงใหม่ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารรมฟอสฟีน ที่ใช้เป็น Positive Control พบว่ามีการตายเพียง 8 ตัว คิดเป็น 16 % เนื่องจากมอดที่เก็บมาจากเชียงใหม่มีอายุค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับมอดจากอุบลราชธานี และเนื่องจากระยะเวลาจำกัดทำให้ไม่สามารถรอมอดที่จะเกิดใหม่ในอีกสองเดือน อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่ามอดจาก จ.อุบลราชธานีเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อสารรมฟอสฟีน จึงสามารถให้คำแนะนำเกษตรกรและผู้ประกอบการโรงสีให้ใช้ฟอสฟีนต่อไป

จากการศึกษา DNA Fingerprint ของมอดข้าวเปลือก (*Rhyzopertha dominica*) โดยขั้นตอนแรกคือการหา Annealing ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ซึ่งจะทำการทดสอบที่ 3 Condition ผลคือ ที่ Condition ที่ 3 จะสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ดีที่สุด เนื่องจากเมื่อนำมาแยก DNA โดยวิธี Gel Electrophoresis ก็พบแถบของ DNA จำนวนมาก ในขณะที่ Condition ที่ 1 ไม่พบแถบของ DNA เลย และที่ Condition ที่ 2 พบแถบของ DNA แต่ไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงเลือก Condition ที่ 3 ในการเพิ่มปริมาณ DNA การทดสอบการเพิ่มปริมาณ $MgCl_2$ พบว่าเมื่อมีการเพิ่มปริมาณ จาก 4 mM เป็น 5 mM จะให้แถบของ DNA ที่ชัดเจน และใหญ่ขึ้น จึงใช้สภาวะนี้ในการทดสอบการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ Primer ต่างๆ พบว่า Primer ที่นำมาทำการสอบสอบตั้งแต่ P3, RP6-RP14, RP16-RP64 สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ดีแต่ Primer ที่เห็นได้ชัดเจนมากที่สุดคือ P3, RP6-RP13 อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นในมอดจาก จ.สมุทรปราการ และ เชียงใหม่ ซึ่งอาจเนื่องจากดีเอ็นเอของมอดจาก จ.สมุทรปรการ และ เชียงใหม่ มีสารบางอย่างที่ขัดขวางการทำงานของเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase จึงต้องทดลองสกัดดีเอ็นเอจากมอดจากสมุทรปราการและมอดจากเชียงใหม่ จึงจะสามารถหา polymorphic DNA marker และเปรียบเทียบผลกับ Schipalius, et. al. 2001 and 2002 ได้

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บรรณานุกรม

Cano, R.J., Hendrik, N.P., Pieniazek, N.J., Acra, A., Poianr, G.O. (1993). Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million year old weevil. Nature 363: 536-538.

Chotimanothum, B. 2000. Studies on phosphine resistance and detoxificaiton enzyme activity of *Rhyzopertha dominica* Fabricius (Coleoptera: Bostrichidae) in Central Thailand. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.

Collins, P.J., Gaglish, G.J., Benston, M., Lamkin, T.M., Pavic, H. 2002. Genetics of resistance to phosphine in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). J. Econ. Entomol. In press.

FAO (Food and Agriculture Organization), 1975. Recommended methods for the detection and measurement of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some major pests species of stored cereals, with methyl bromide and phosphine- FAO method N0. 16 FAO Plant Protection Bulletin 23, 12-25.

Rajendran, S., Narasimhan, K. S. 1994. The current status of phosphine fumigations in India, pp 148-152 in Proceeding of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection, edited by E. highley, E.J.Wright, H.J. Banks and B.R. Champ. CAB intl., Canberra Australia.

Schipalius, D.I. , Cheng, Q., Reilly, P.E., Collins, P.J., Ebert, P.R. (2002). Genetic linkage analysis of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* identifies two loci that confer high-level resistance to the fumigant phosphine. Genetics 161: 773-782.

Schipalius, D.I., Waldron, J., Caroll, B.J., Collins P.J., Ebert, P. R. 2001. A DNA fingerprinting procedure for ultra-high throughput genetic analysis of insects. Insect Mol. Biol. 10: 579-585.

Singthom, P., Tauthong, P., ChanKaewmance, B. 2001. Effects of phosphine fumigation in milled rice under different gas-proof sheet conditons against three species of insect pests, 20th ASEAN/ 2nd APEC Seminar on Postharvest Technology, 31.

Tyler P.S., Tayler, R.W., Reeds, D.P. 1983. Insect resistant to phosphine fumigation in food warehouse in Bangladesh. Int. pest control 25: 10-13, 21.

United Nation Environment Programme, 1996. Eight Meeting of the Parties to the Montreal Protocol on Substance that Deplete the Ozone Layer, Vienna.

กุสุมา นวลวัฒน์. 2524. การเปรียบเทียบความชอบของแมลงโรงเก็บในข้าวพันธุ์ต่างๆ. สาขาแมลงศัตรู

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ผลิตผลทางการเกษตรในโรงเก็บ. สาขามาตรฐานและคุณภาพ

ชูวิทย์ ศุขปราการ, กุสุมา นวลวัฒน์, พินิจ นิลพานิชย์, บุษรา จันทร์แก้วมณี, ไชทิพย์ อุไรชื่น และรังสิมา เก่งพานิช. 2539. แมลงศัตรูผลิตผลเกษตรและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผลิตผลเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

สิริวัฒน์วงษ์สิริ. 2526. แมลงศัตรูพืชทางการเกษตรของประเทศไทย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและ Buffer

1.1 TBE Buffer (5x)

Tris base	54	g
Boric acid	27.5	g
0.5 mM EDTA (pH8)	20	ml

1.2 Ethidium Bromide (10 mg/ml)

ชั่ง Ethidium Bromide 1g เติม DI water ปริมาตร 80 ml คนจน Ethidium Bromide ละลายหมด ปรับปริมาตรด้วย DI water จนได้ 100 ml

1.3 5 % Chelex

100 mM Tris HCl (pH8.0)	10	ml
1mM EDTA	200	µl
$2.5x10^{-7}$ mg/l Rnase A	2.5	µl
Chelex	5	g
น้ำกลั่น Sterilize	90.08	ml

1.4 5 % Sulfuric acid (เตรียม 2500 ml)

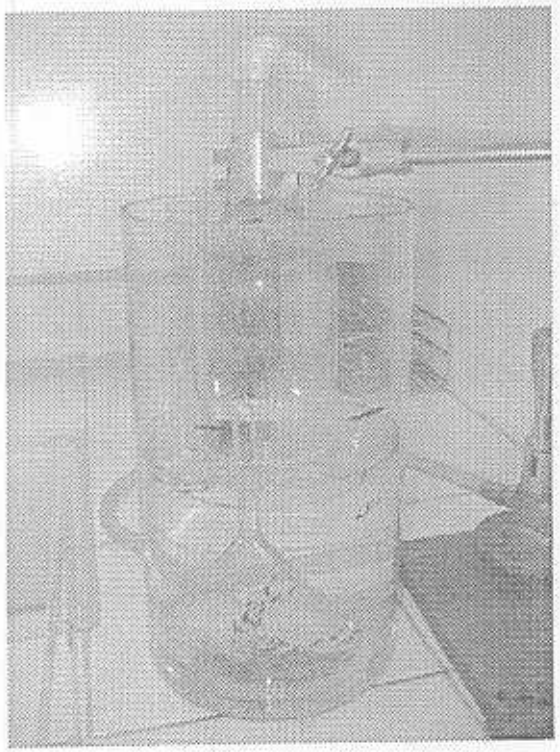
96 % Sulfuric acid	130.2	ml
น้ำกลั่น	2369.8	ml

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ภาคผนวก ข

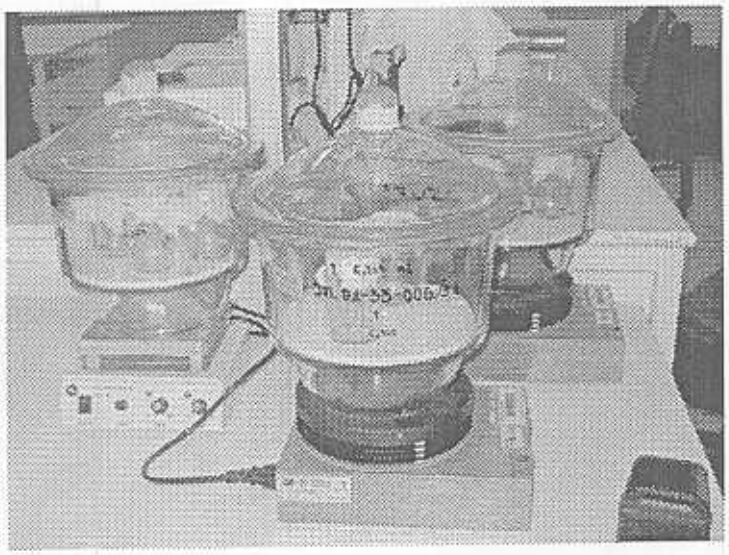
1. การเตรียมสารรมฟอสฟีน
    1. เตรียม sulfuric acid 5% ปริมาตร 2500 ml ใส่ลงในโถแก้ว
    2. ใส่ก้อนฟอสฟีน 1/4 ก้อน ครอบทับก้อนฟอสฟีนด้วย Funnel glass ใช้แท่นตั้ง Burette ช่วยในการยึดเกาะขวดแก้วสำหรับดักกาซที่ระเหยขึ้นมาจากก้อนฟอสฟีน
    3. ใช้ syring ดูดกาซฟอสฟีนที่ได้ใส่ลงใน desiccators ปริมาตร 210 µl



ภาพที่ 8 การเตรียมสารรมฟอสฟีนจากก้อนฟอสฟีนให้มีความเข้มข้น 0.04 mg/l จาก 5% sulfuric acid

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



ภาพที่ 9 การรมสารฟอสฟีนของ *Rhyzopertha dominica* ใน desiccators ที่มี Stirrer หมุนวนอยู่ด้านล่าง

ภาพที่ 10 การฉีดสารรมฟอสฟีนที่มีความเข้มข้น 0.04 mg/l ปริมาตร 210µl ลงใน desiccators ที่มีมอดบรรจุอยู่ภายในขวด

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การคำนวณปริมาตร phosphine

$$\text{จากสมการ } \frac{298*x_1(\text{mg/l})*v_1(\text{l})*22.414*1000*1000*100}{273*1000*33.9977(\text{GMW phosphine})*86} = D_1(\mu\text{l})$$

โดยกำหนดให้ x_1 (mg/l) = ความเข้มข้นของ86% phosphine gas ใน desiccator

v_1 (l) = ปริมาตร ของ desiccator

D_1 (µl) = ปริมาตร ของ86% phosphine gas ที่ 25ºC

$$\frac{298*0.04\ (\text{mg/l})*6.3(\text{l})*22.414*1000*1000*100}{273*1000*33.9977(\text{GMW phosphine})*86} = D_1(\mu\text{l})$$

$$210.87(\mu\text{l}) = D_1$$

การคำนวณความเข้มข้น phosphine

$$\text{จากสมการ } \frac{D1(\mu\text{l})*273*1000*33.9977*86}{298*\ v_1\ (\text{l})*22.414*1000*1000*100} = X_1(\mu\text{l})$$

โดยกำหนดให้ X_1 (mg/l) = ความเข้มข้นของ86% phosphine gas ใน desiccator

v_1 (l) = ปริมาตร ของ desiccator

D_1 (µl) = ปริมาตร ของ86% phosphine gas ที่ 25ºC

$$\frac{210.87\ (\mu\text{l})*273*1000*33.9977*86}{298*\ 6.3(\text{l})*22.414*1000*1000*100} = X_1(\mu\text{l})$$

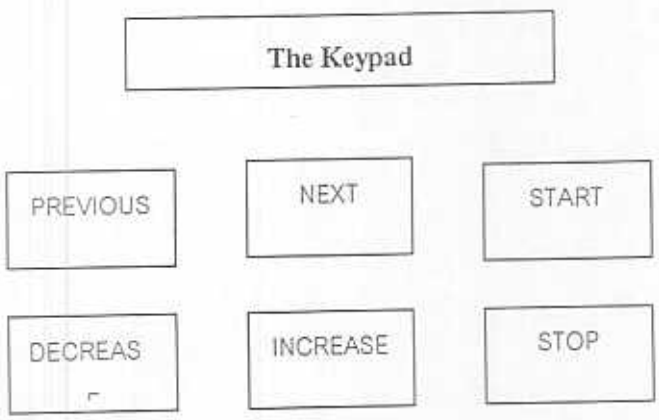
$$0.04\ (\mu\text{l}) = X_1$$

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

2. การใช้เครื่อง Gel Scan 2000 DNA Fragment Analysis

1. เมื่อเปิดเครื่อง Computer ให้กดปุ่ม Delete ทันที หน้าจอจะเข้าสู่หน้า menu ของ CMOS setup
2. เลือก Integrated Peripherals
   แก้ Onboard Serial Port B เป็น Disable (กด +)
   จากนั้นกด Esc จนกลับสู่หน้าจอ menu CMOS setup
3. เลือก PnP/PCI Configurations
   แก้ Resource Controlled By เป็น Manual
   แก้ IRQ-3 assigned to เป็น Legacy ISA
   จากนั้นกด Esc กลับสู่หน้าจอ menu CMOS setup
4. เลือก Save&Exit setup กด Enter จนเครื่อง Boot ใหม่
5. Pre-running กดปุ่ม INCREASE เพื่อเลือก Pre-running



ภาพที่ 11 ภาพแสดง Keypad ของเครื่อง Gel Scan 2000

6. Flush โดยใช้ Auto pipette เพื่อเป็นการไล่ฟองอากาศ
7. Load Sample ตามที่ต้องการ
8. Pulse กดปุ่ม DECREASE เพื่อเลือก Pulse
9. Flush โดยใช้ Auto pipette เพื่อเป็นการชะล้างส่วนเกินออกไป
10. กดปุ่ม START จากเครื่อง Computer เพื่อเริ่มการ Run gel

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

2. ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ random primer

NAME	SEQUENCE	SCALE	PURIF	MERS
RP1	TCGTGGCTGCC	0.05μM	DESALT	11
RP2	ATGAAGGGGTT	0.05μM	DESALT	11
RP3	TGCTGGCTCCC	0.05μM	DESALT	11
RP4	TGCTGGTTCCC	0.05μM	DESALT	11
RP5	TGCTGGTTACC	0.05μM	DESALT	11
RP6	TGCTGGTTTCC	0.05μM	DESALT	11
RP7	ATACAGGGGTT	0.05μM	DESALT	11
RP8	ATACAGGGATT	0.05μM	DESALT	11
RP9	ATCGTTACCG	0.05μM	DESALT	10
RP10	ATAGCAAGCG	0.05μM	DESALT	10
RP11	ATGCAGTAGC	0.05μM	DESALT	10
RP12	ATGCAGTAGCC	0.05μM	DESALT	11
RP13	TACGTCATCGC	0.05μM	DESALT	11
RP14	ATGCTAAGCG	0.05μM	DESALT	10
RP15	AGTCCTAAGCG	0.05μM	DESALT	11
RP16	TTCAGGATGG	0.05μM	DESALT	10
RP17	ATAGGATGGC	0.05μM	DESALT	10
RP18	GATCGTTACG	0.05μM	DESALT	10
RP19	GGTAGACGAGT	0.05μM	DESALT	11
RP20	CTGAGGAACTG	0.05μM	DESALT	11
RP21	TAGCACCTTCC	0.05μM	DESALT	11
RP22	CTTCGGATAGG	0.05μM	DESALT	11
RP23	TAGGCAAGTGG	0.05μM	DESALT	11
RP24	CCTTGATGACC	0.05μM	DESALT	11
RP25	TAGGAAGCATC	0.05μM	DESALT	11
RP26	TCCGACTCTAC	0.05μM	DESALT	11
RP27	CGTTATGGTGT	0.05μM	DESALT	11
RP28	GCTTGGATACC	0.05μM	DESALT	10
RP29	GATTCCAGAG	0.05μM	DESALT	10
RP30	CCAAGTTACC	0.05μM	DESALT	10
RP31	GGACAATAGG	0.05μM	DESALT	10
RP32	ATGCCTAACC	0.05μM	DESALT	10
RP33	CATTCGTAGG	0.05μM	DESALT	10
RP34	CAGTATGCGT	0.05μM	DESALT	10
RP35	GTATTGGCGA	0.05μM	DESALT	10

Ubon Rajathanee University

NAME	SEQUENCE	SCALE	PURIFICATION	MERS
RP36	AGGAATCGTG	0.05μM	DESALT	10
RP37	AGCTTAGGCT	0.05μM	DESALT	10
RP38	TACTGTGTCC	0.05μM	DESALT	10
RP39	GTCATTGGAG	0.05μM	DESALT	10
RP40	CCTCAACAGT	0.05μM	DESALT	10
RP41	AGGCTACTTG	0.05μM	DESALT	10
RP42	TTGTATGGCA	0.05μM	DESALT	10
RP43	ATGCTCTGGG	0.05μM	DESALT	10
RP44	ATTGTGACCC	0.05μM	DESALT	10
RP45	TTATTGGCGG	0.05μM	DESALT	10
RP46	ATCGTTGCCA	0.05μM	DESALT	10
RP47	GCAGTAATCC	0.05μM	DESALT	10
RP48	CACTTCCTGA	0.05μM	DESALT	10
RP49	TATCAGCAGG	0.05μM	DESALT	10
RP50	ACTATGCTGG	0.05μM	DESALT	10
RP51	TCAGAGGATG	0.05μM	DESALT	10
RP52	TTGATGTGCC	0.05μM	DESALT	10
RP53	ACTATGTCGTC	0.05μM	DESALT	11
RP54	CTGTATCGTC	0.05μM	DESALT	10
RP55	TAAGATGCCC	0.05μM	DESALT	10
RP56	CTATGATGACC	0.05μM	DESALT	11
RP57	TCTATGTCGG	0.05μM	DESALT	10
RP58	AGCATCAGTGG	0.05μM	DESALT	11
RP59	GTCATTGCTG	0.05μM	DESALT	10
RP60	TAGCAGGATG	0.05μM	DESALT	10
RP61	CAACTCTGGT	0.05μM	DESALT	10
RP62	ACTATGTGACC	0.05μM	DESALT	11
RP63	ACTATGTGAGG	0.05μM	DESALT	11
RP64	TACTTGATGCC	0.05μM	DESALT	11
RP65	CTTGTCAGTCC	0.05μM	DESALT	11
RP66	ATGTGGAAGG	0.05μM	DESALT	10
RP67	TGACTTGACC	0.05μM	DESALT	10
RP68	TAGATGTCACC	0.05μM	DESALT	11
RP69	AGTCCTATTG	0.05μM	DESALT	10
RP70	ATCGGAACTC	0.05μM	DESALT	10
RP71	GTTGCTGCTT	0.05μM	DESALT	10
RP72	TATGGAGCCTG	0.05μM	DESALT	11
RP73	GTCCATCAGTG	0.05μM	DESALT	11
RP74	CAACTCTGGT	0.05μM	DESALT	10
RP75	CTGTAGGAAC	0.05μM	DESALT	10
P3	AACGGGCAGC	0.05μM	-	10

Ubon Rajathanee University

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อและนามสกุล ภาษาไทย : ผศ. ดร. ณิชารัตน์ สวาสดิพันธ์

ภาษาอังกฤษ : Assistant Prof. Dr. Nicharat Swasdipan

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ

-

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 6

4. หน่วยงานที่สังกัด และที่อยู่ที่ติดต่อได้

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

อ.วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ 0-4528 8380 โทรสาร 0-4528 8380

nswasdipan@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

การศึกษาระดับอุดมศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยม)	2533	ม. เกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
Postgraduate Diploma in Biochemistry	2539	The University of Queensland, Australia
Doctor of Philosophy	2545	The University of Queensland, Australia

6. สาขาที่ชำนาญ

Insect molecular techniques

Polyclonal antibody production

Immunohistochemistry by transmission electron microscope

Bioinformatics

7. ประสบการณ์ในการทำงานวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Maleszka R., **Swasdipan N**, Ebert P., Stange G. 1997. A novel family of highly conserved small putative carrier proteins (SCPS) in insect. 13th congress of the European Chemoreception research Organization, Siena, Italy.
สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

Swasdipan N., Ebert P. 1999. Pheromone binding protein gene regulation is correlated with behavioural specialisation in the honeybee (*Apis Mellifera*). 29th Annual meeting, Society for Neuroscience. Miami, USA, pp 389.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ

Swasdipan N., Ebert P. 2001. Phylogeny and diversity of insect odorant binding proteins. International conference of Bioinformatics, Bangkok, Thailand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ

Swasdipan N., Pongwan P. 2002. Optimization and rapid purification of Taq DNA polymerase. 28th Congress on Science and Technology of Thailand. Bangkok, Thailand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ

Briand L., **Swasdipan N.**, Nespoulous C., Bezirard V., Blon F., Huet J.-C., Ebert P., Parnollet J.-C. 2002. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. European Journal of Biochemistry. 269(18): 4586-4596.
สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

Swasdipan N., Jaksupan N., Krongsap M. 2003. Scanning electron microscopic studies of the antennal sensila of lessor grain borer, *Rhyzoperhta dominica* (Coleoptera:Bostrichidae). The XXth EMST Annual Conference on Electron Microscopy. Bangkok, Thailand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ

Swasdipan N. 2003. Pheromone communication in honeybees. Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products, Chiang Mai, Thailand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Swasdipan N., Palasarn W., Pimmongkol A. 2003. Expression and immunohistochemical localization of a pheromone binding protein (ASP1) of *Apis mellifera*. 29th Congress on Science and Technology of Thailand. Khonkhan, Thailand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการ

Lathulee N., **Swasdipan** N., Pimmongkol A., Wongsena P., Boothramat D., Wisuwan S., Singhanuwat W., Sutthiphongpracha N. 2003. Human cytomegalovirus of cervical lesion : A first case experience and review literature. The 2nd meeting of Cytological society on CA cervix and CA breast in the era of National cancer prevention policy. Bangkok, Thailand
สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

Lathulee N., **Swasdipan** N., Pimmongkol A., Wongsena P., Chouwsrikul W., Phongthipphon A. 2003. Embryonal rhabdomyosarcoma of the nasal cavity. The 2nd meeting of Cytological society on CA cervix and CA breast in the era of National cancer prevention policy. Bangkok, Thailand
สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

7.2 งานวิจัยที่กำลังทำ

การศึกษาการผลิต การแปรรูป และคุณสมบัติของนมแพะ
แหล่งทุน สวทช
ผู้ร่วมวิจัย ส่วนร่วมในงานวิจัย 10%

การศึกษาความต้านทานต่อสารรมฟอสฟีน และการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในมอดข้าวเปลือกในจังหวัดอุบลราชธานี
แหล่งทุน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
หัวหน้าโครงการวิจัย ส่วนร่วมในงานวิจัย 100%

การศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของหนวด และตำแหน่งที่มี Pheromone binding protein ในผึ้ง 5 ชนิดของประเทศไทย
แหล่งทุน สกว
หัวหน้าโครงการวิจัย ส่วนร่วมในงานวิจัย 100%

Ubon Rajathanee University