



วารสาร

ISSN 0125 - 2364

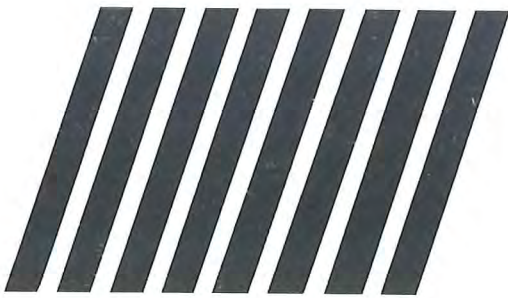
วิทยาศาสตร์พบ.

THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

ปีที่ 28 ฉบับที่ 2 เม.ย. - มิ.ย. 43

GMI





วารสาร

ISSN 0125-2364

วิทยาศาสตร์ปูช.

THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่วิทยาการใน สาขาวิชาต่าง ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานด้านการวิจัย และการศึกษา ค้นคว้าของอาจารย์และนักศึกษา
3. เพื่อเป็นสื่อกลางการแลกเปลี่ยนความรู้ และแนวความคิดทางวิชาการระหว่างอาจารย์ นักศึกษาและผู้สนใจ ทั้งภายในและภายนอกสถาบัน

กำหนดออก

ปีละ 4 ฉบับ

- ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม
ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน
ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน
ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม

ค่าบำรุง ปีละ 75 บาท ข่ายปลีก เล่มละ 20 บาท

การบอกรับเป็นสมาชิก

แจ้งความจำนงค์เป็นจดหมาย หรือกรอกใบสมัครเป็นสมาชิก พร้อมส่งค่าบำรุงเป็นธนาคัต หรือเช็ค ไปรษณีย์ในนามของนางบุญคุ้ม เหลือล้ำ ฝ่ายจัดการ ส่งจ่าย ป.ท.มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
รองคณบดีฝ่ายวิชาการ

บรรณาธิการ

ศักดิ์สิทธิ์

จันทร์ไทย

บรรณาธิการผู้ช่วย

อัจฉรา

ศิริมั่งคะลา

กองบรรณาธิการ

เฉลิม

เรืองวิริยะชัย

บำรุง

สมสวัสดิ์

วิทยา

อมรกิจบำรุง

สุพร

นุชดำรงค์

ประนอม

จันทร์ไธทย

นฤมล

แสงประดับ

สุวรรณา

เนียมสนิท

เพ็ญประภา

เพชรบุรณิน

สุพจน์

ไวทย์ทางกูร

วิจารณ์

สดศิริ

วิชุดา

ไชยติวามงคล

พูนชัย

ศิริแสงตระกูล

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิลิน

ดิณนเรศรฐ์

ทรงเวทย์

เบ้าชัย

ฝ่ายเหรียญกษาปณ์

บุญคุ้ม

เหลื่อล้ำ

ฝ่ายจัดการและ เลขานุการ

ทัศนีย์

จิตตะกวี

สมศักดิ์

อุ๋นจันทร์

สุคนธ์

กลินพกา

**บทความและงานวิจัย
ได้รับการกลั่นกรอง
จากผู้ทรงคุณวุฒิ**

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ



0125-2364
ISSN 0125-2364
วิทยาจารย์
THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University,
Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen
University.

Objectives

1. To promote and propagate knowledge in all fields of science.
2. To publish results from research and studies by academic staff and students.
3. To be a medium for the exchange of knowledge and ideas among staff, students and those interested from both inside and outside the institute.

Publishing terms

four issues per annual volume
Issue no. 1 January - March
Issue no. 2 April - June
Issue no. 3 July - September
Issue no. 4 October - December

Subscription rate

75 baht per annum. Single issue price 20 Baht.

Membership

Membership request can be made by letter or by completing the membership form, with the fee paid in the form of a postal order or postal cheque sent to Mrs. Boonkoom Lualon, Managing Committee, Khon Kaen University Post Office, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

Advisory Committee

Dean, Faculty of Science
Associate Dean for Academic affairs

Editor

Saksit Chanthai

Associate Editor

Atchara Sirimungkala

Editorial Board

Chalerm Ruangviriyachai
Bamrung Somswadi
Vittaya Amornkitbamrung
Suporn Nuchadomrong
Pranom Chantaranothai
Narumon Sangpradub
Suwanna Niamsanit
Penprapa Phetcharaburanin
Supot Waitayangkoon
Wijarn Sodsiri
Wichuda Chaisiwamongkol
Pusadee Seresangtakul

Artist

Kilen Tinnoraset
Songwate Bousechai

Treasurer

Boonkoom Lualon

Managing Staff and Secretary

Tassanee Jittakhawee
Somsak Unjantee
Sukhon Klinpaka

**The articles and research
publications have been reviewed
by qualified readers**

The views and opinions expressed in this journal are those of the authors, and do not necessarily reflect the views and opinions of the editorial board.

บรรณาธิการ *แดง*

เรียน ท่านสมาชิกวารสาร ฯ และท่านผู้อ่านที่รัก

วารสารวิทยาศาสตร์ มข. ปีที่ 28 ฉบับที่ 2 ประจำเดือนเมษายน-มิถุนายน 2543 ขอเสนอบทความวิชาการเกี่ยวกับ GMOs ที่กำลังได้รับความสนใจขณะนี้ แม้ว่าจะมีข้อมูลอื่นๆ ทั้งแง่บวกและผลกระทบในแง่ลบแตกต่างกันบ้างก็ตาม มนุษย์เราย่อมเชื่อวิวัฒนาการทางธรรมชาติมากกว่าอยู่ดี และผลงานวิจัยเด่นๆ ในฉบับหลายเรื่อง ทั้งด้านคณิตศาสตร์บริสุทธิ์ สถิติ เคมี ชีววิทยา หรือแม้แต่เรื่อง Wildlife Conservation ของมาเลเซียก็ตาม เราหวังว่าเนื้อหาในฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อสาธารณชนเช่นเคย ในฉบับหน้า ท่านสมาชิกจะได้พบกับวารสารวิทยาศาสตร์ มข. โฉมใหม่ โดยที่มบรรณาธิการชุดใหม่ ซึ่งจะนำผลงานวิชาการ วิจัย และสิ่งใหม่ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ออกสู่สายตาในเร็วๆ นี้

สวัสดีครับ
บรรณาธิการ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วารสาร

วิทยาศาสตร์ชุมชน

THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

ปีที่ 28 ฉบับที่ 2

บรรณาธิการแถลง

บทความ

- เส้นทางสู่เทคโนโลยีการผลิตจีเอ็มโอ
พรณี รัตนแสง..... 67

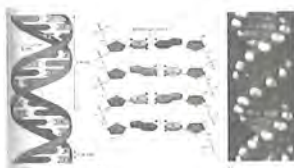
งานวิจัย

- A Characterization of Graphs of Diameter Three
ประครอง คำมั่น
เที่ยง ภูมิสะอาด..... 78

- ประสิทธิภาพของแบบทดสอบค่าเฉลี่ยประชากรปกติ
หนึ่งประชากร เมื่อบางหน่วยตัวอย่างมีค่าสูงมาก
อโนทัย ศรีวานิช
ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์..... 84

- การดูดซับเมธิลีนบลูด้วยถ่านกัมมันต์ เกลือ
ถ่านเกลือบ และถ่านเกลือบเผา
รัตนา มหาชัย..... 97

- การศึกษาสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกและ
ผกากรอง เพื่อใช้เป็นสารฆ่าหอยเชอรี่
พินิจ หวังสมนึก
ตรัย วงษ์ศิริ..... 107



มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วารสาร

วิทยาศาสตร์ชุมชน.

THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

ปีที่ 28 ฉบับที่ 2



- Genetic Engineering in Rice (*Oryza sativa* L.)
with an Insecticidal Gene from *Bacillus*
thuringiensis (Bt) for the Increasing Resistance
against its Insect Pests

Jagkrit Parakarn..... 117

- Effect of Selective Logging on the Barking
Deer (*Muntiacus Muntjak*)

Moutasim Gamar Eldin

Mohamed Daud

Mohamed Zakaria

Mohamed Zohadie..... 142

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เส้นทางสู่เทคโนโลยีการผลิตจีเอ็มโอ

พรรณิรัตน์ รัตนแสง*

ในปัจจุบันประชากรมนุษย์ทั่วโลกมีอยู่ประมาณ 6 พันล้านคน และมีแนวโน้มจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกๆ ปี ขณะที่ทรัพยากรมีอยู่อย่างจำกัดและนับวันจะลดจำนวนลงหรืออาจจะหมด หรือสูญพันธุ์ไปจากโลก ทำให้จำนวนมนุษย์และทรัพยากรไม่สมดุลกัน เกิดการขาดแคลนและเป็นปัญหาต่างๆ ตามมา เช่น ปัญหาที่อยู่อาศัย สิ่งแวดล้อม หรือแม้กระทั่งการขาดแคลนอาหาร อาหารถือว่าเป็นหนึ่งในปัจจัยสี่ที่มนุษย์จะขาดเสียไม่ได้ ทำให้มนุษย์บางกลุ่มบางประเทศมองเห็นทางที่จะทำเงินมหาศาลจากธุรกิจเหล่านี้ พยายามที่จะคิดค้นหาวิธีการใหม่ๆ ในการที่จะเพิ่มผลผลิตทางอาหารให้เพียงพอกับความต้องการของมนุษย์ ผู้อ่านคงปฏิเสธไม่ได้ว่าไม่เคยได้ยินคำว่า จีเอ็มโอ (Genetically Modified Organisms-GMOs) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีชีวภาพที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร โดยประเทศที่ใช้เทคนิคนี้ในอุตสาหกรรมอาหารยกเหตุผลถึงความจำเป็นในการใช้จีเอ็มโอ คือ เพื่อช่วยให้เกษตรกรเพิ่มผลผลิตและเพื่อลดปัญหาสิ่งแวดล้อมถูกทำลายเพราะเทคโนโลยีจีเอ็มโอจะทำให้พืชหรือสัตว์มีคุณสมบัติตามต้องการได้ เช่น ทนทานต่อเชื้อโรค ต่อสภาพแวดล้อม ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้ยาฆ่าแมลง เป็นต้น

โดยปกติถ้าเรานำพืชหรือสัตว์สองสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีมาผสมพันธุ์กัน เราจะได้ลูกผสมที่มียีนต่างๆ จากทั้งพ่อและแม่เข้าไปรวมกันอยู่ทั้งยีนที่เราต้องการและไม่ต้องการ การคัดเลือกยีนที่ดีโดยธรรมชาติ นั้นต้องใช้เวลาค่อนข้างนานกว่าจะได้เฉพาะยีนที่เราต้องการจริงๆ ดังนั้น การทำจีเอ็มโอ จึงเป็นวิธีการที่คิดค้นขึ้นเพื่อคัดเลือกเฉพาะยีนที่ควบคุมเฉพาะลักษณะที่เราต้องการมาสร้างพืชหรือสัตว์ชนิดใหม่ ซึ่งใช้เวลาสั้นกว่าวิธีตามธรรมชาติ ก็จะได้ผลิตผลเป็นพืชหรือสัตว์ที่มีคุณลักษณะตามต้องการขึ้น

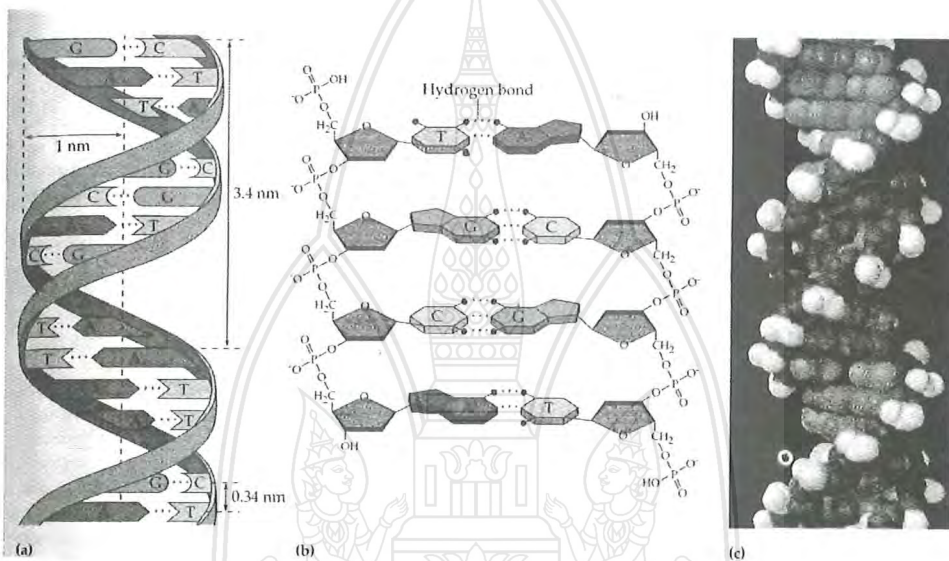
สารพันธุกรรมและยีนคืออะไร

ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) พบมากในนิวเคลียส รวมอยู่กับโปรตีนชื่อ ฮิสโตน (histone) เกิดเป็นนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) ขดแน่นอยู่ในโครโมโซม พบเล็กน้อยในไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ของพืชสีเขียว ดีเอ็นเอ มีโครงสร้างเป็นเกลียวคู่ (double helix) ของโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) สองสายที่เรียงตัวแบบสวนทางกัน (anti-parallel) เวียนขวา แต่ละนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยน้ำตาล 5 คาร์บอน (deoxy-ribose) กลุ่มฟอสเฟต และเบส เบสพิวรีน (Adenine (A), Guanine (G) หรือพิริมิดีน (Thymine (T), Cytosine (C) (รูปที่ 1) จากการค้นพบโครงสร้างของดีเอ็นเอ โดย Watson และ Crick เมื่อปี ค.ศ. 1953 ทำให้ทราบถึงการทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมของดีเอ็นเอ ข้อความทางพันธุกรรมที่อยู่ในดีเอ็นเอ จะถูกถ่ายทอดในแต่ละช่วงของ ดีเอ็นเอ ซึ่งเรียกว่า ยีน (gene) ยีนเป็นส่วนหนึ่งของ ดีเอ็นเอ ที่เก็บข้อความทางพันธุกรรมอยู่ในรูปของรหัส (code) รหัสนี้ก็คือเบสพิวรีน หรือพิริมิดีน

* อาจารย์ ระดับ 6 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เรียงตามลำดับที่เฉพาะในแต่ละช่วงของ ดีเอ็นเอ โดย ดีเอ็นเอ โมเลกุลหนึ่งจะมีหลายยีน แต่ละยีนจะควบคุมลักษณะทางกรรมพันธุ์ของพ่อแม่สืบทอดไปยังลูกหลานต่อไป พบว่าในสายดีเอ็นเอจำนวนเบส A จะเท่ากับเบส T และเบส G จะเท่ากับเบส C เสมอ

อาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid, RNA) เป็นตัวกลางนำรหัสพันธุกรรมจาก ดีเอ็นเอ ไปใช้ในการสร้างโปรตีน เอนไซม์ต่างๆ หรือทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมในไวรัสบางชนิด RNA พบในไรโบโซม ซึ่งเป็นโรงงานสร้างโปรตีน พบอยู่ในส่วนของนิวเคลียสโดยอยู่ในนิวคลีโอไล์ซึ่งเป็นที่สร้าง RNA รหัสพันธุกรรมบนสาย RNA จะเป็นเบส A, C, G และ U (Uracil) เนื่องจาก RNA ที่พบเป็นสายเดี่ยว ดังนั้น จำนวนเบส A และ U หรือเบส G และ C ไม่จำเป็นต้องเท่ากัน



รูปที่ 1 โครงสร้างเกลียวคู่ (double helix) ของดีเอ็นเอ

- แถบยาว (ribbons) แสดงโมเลกุลน้ำตาลและฟอสเฟตที่เป็นแกนหลัก(sugar-phosphate backbones) ของดีเอ็นเอ สองสายเวียนขวา ยึดติดกันด้วยพันธะ hydrogen (เส้นไขปลาน) ระหว่างเบสคู่สมภายในสาย
- โครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอ
- การรวมกันของเบสคู่สมเห็นชัดเจนในรูปจำลองจากคอมพิวเตอร์
(ที่มา : Campbell, Reece and Mitchell, 1999)

ปริมาณดีเอ็นเอและจำนวนยีนในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีขนาดและจำนวนต่างกัน อย่างไรก็ตาม ในสิ่งมีชีวิตหนึ่งหรือในคนๆ หนึ่งเซลล์ร่างกายจะมีปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์เท่ากัน และเป็นดีเอ็นเอชนิดเดียวกัน คือมีข้อมูลทางพันธุกรรมหรือลำดับของนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน ยกเว้นในเซลล์สืบพันธุ์ เช่น ในตัวสุจิหรือในไข่จะมีปริมาณ ดีเอ็นเอ เพียงครึ่งเดียวของเซลล์ร่างกาย ภายหลังที่มีการปฏิสนธิแล้วจึงมีปริมาณเท่ากับเซลล์ร่างกายดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอและจำนวนยีนจึงเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดพันธุ์

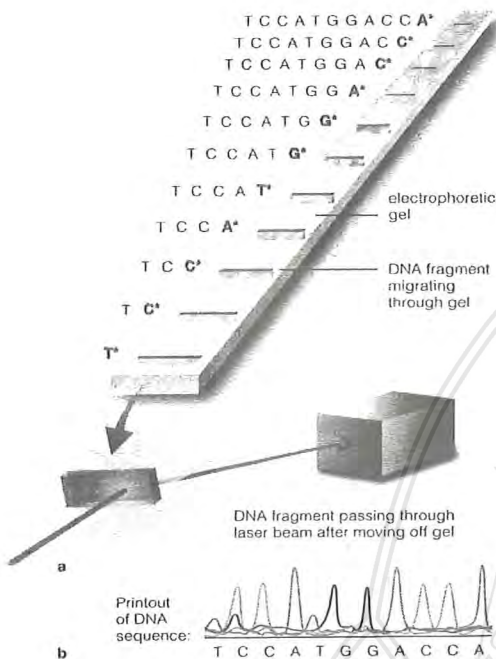
ซึ่งเรียกกันทางวิชาการว่า จีโนม (genome) จีโนมในสิ่งมีชีวิตประกอบไปด้วยยีนหลายพันยีน เช่น *E. coli* มีประมาณ 4,000 ยีน *Saccharomyces cerevisiae* 6,000 ยีน แมลงหวี่ 20,000 ยีน พืชชั้นสูง 30,000-50,000 ยีน หนูเม้าส์มี 80,000 ยีน และมนุษย์มีมากกว่า 100,000 ยีน เป็นต้น

การแสดงออกของยีน

ต้องไม่ลืมว่ายีนคือ ดีเอ็นเอ ส่วนหนึ่งที่มีขนาดความยาวแตกต่างกัน ยีนเรียงรายตามลำดับอย่างเป็นระเบียบและค่อนข้างมั่นคงในสายดีเอ็นเอ ยีนแต่ละตัวมีหน้าที่แตกต่างกันไป ยีนที่สร้างโปรตีนจะทำงานเมื่อได้รับคำสั่งจากยีนอีกตัวหนึ่งหรือหลายตัว สิ่งมีชีวิตทุกอย่างในโลกต่างเจริญเติบโตมาจากเซลล์ๆ เดียวทั้งนั้น เป็นเรื่องแปลกว่าทำไมจากเซลล์เริ่มต้นเซลล์เดียวจึงสามารถเจริญเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน เช่น เป็นพืช สัตว์ มนุษย์ เป็นต้น คำตอบในเรื่องนี้ก็คือ แต่ละเซลล์มีมวลยีนที่ต่างกันและทำหน้าที่ต่างกัน ยีนมีหน้าที่การทำงานต่างกันออกไปในแต่ละเวลา และแต่ละสภาวะแวดล้อมทั้งภายในและภายนอกเซลล์นั้นๆ ยีนทุกตัวจึงมีช่วงทำงาน (turn-on) และช่วงพักตัว (turn-off) ดังนั้น ในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันจะมีการแสดงออกของยีนในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโตแตกต่างกัน

การหาลำดับของนิวคลีโอไทด์บนสาย ดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

ในปี ค.ศ. 1995 นักวิจัยสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1.8 ล้านนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย (*Haemophilus influenzae*) ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจมนุษย์ได้สำเร็จ หลังจากนั้นก็ประสบความสำเร็จในสัตว์ชนิดอื่นๆ ส่วนในมนุษย์คาดว่าจะสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีทั้งหมด 3.2 พันล้านนิวคลีโอไทด์ ได้สำเร็จก่อนปี ค.ศ. 2002 สาเหตุที่ทำให้นักวิจัยเชื่อเช่นนั้นเป็นเพราะว่าในปัจจุบันมนุษย์ประดิษฐ์เครื่องมือที่ทันสมัยมากขึ้น จึงทำให้การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นไปได้ง่ายและรวดเร็วขึ้นกว่าแต่ก่อน เช่น เครื่อง automated DNA sequencer ซึ่งเป็นเครื่องมือใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวต่างๆ กันโดยอาศัยเทคนิค gel electrophoresis โดยชั้นที่สั้นที่สุดจะถูกแยกออกมาจากกลุ่มได้เร็วที่สุดในขณะที่เส้นยาวที่สุดก็就会被แยกออกมาช้าที่สุด แล้วจะรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างไร ? รู้ได้โดยการใช้นิวคลีโอไทด์ชนิดพิเศษที่สามารถเรืองแสงให้สีแตกต่างกันออกไปเมื่อผ่านลำแสงเลเซอร์ไป ในปฏิบัติการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยนิวคลีโอไทด์ชนิดพิเศษนี้เมื่อถูกนำไปสร้างสายดีเอ็นเอปฏิบัติการสังเคราะห์จะหยุดลง แต่ถ้าเป็นนิวคลีโอไทด์มาตรฐานถูกนำไปสร้างสายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการสังเคราะห์ก็จะดำเนินการต่อไป โดยนิวคลีโอไทด์ชนิดพิเศษนี้จะเกาะอยู่ด้าน 3' ของดีเอ็นเอสายใหม่เสมอ เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ชนิดพิเศษสามารถเรืองแสงให้ สีที่แตกต่างกันเมื่อผ่านลำแสงเลเซอร์ จึงทำให้นักวิจัยสามารถทราบลำดับของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในดีเอ็นเอ ได้ รูปที่ 2 แสดงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer แต่ละ peak แสดงการ ตรวจพบสีที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ชนิดพิเศษแต่ละตัวในชั้นของดีเอ็นเอ



รูปที่ 2 Automated DNA sequencing

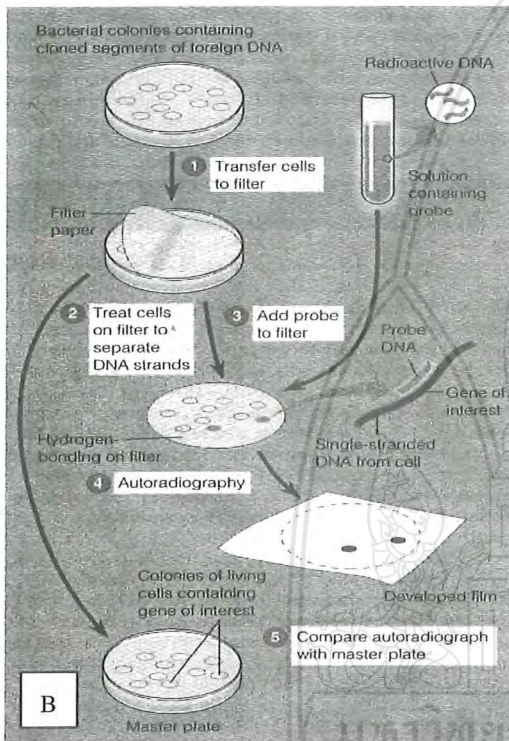
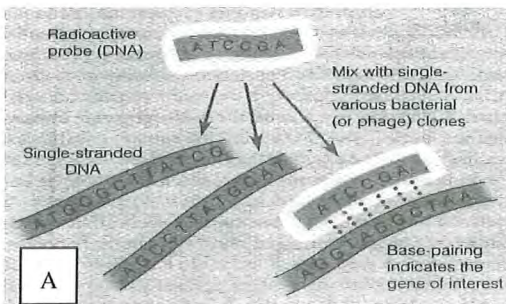
- ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ จากจีโนมของอวัยวะที่สนใจ ถูกติดฉลากที่ตรงปลายสายด้วยนิวคลีโอไทด์ชนิดพิเศษ (modified nucleotide) ที่สามารถเรืองแสงให้สีที่จำเพาะเมื่อผ่านลำแสงเลเซอร์
- การ print out ของการหาลำดับดีเอ็นเอ ในตัวอย่าง peak แต่ละ peak บ่งชี้การดูดกลืนสีที่จำเพาะของนิวคลีโอไทด์ที่ถูกติดฉลาก (ที่มา : Starr, 2000)

เราจะแยกยีนที่สนใจได้อย่างไร (Isolating gene of interest)

เมื่อเราทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ และทราบตำแหน่งยีนแล้ว ก็มาถึงขั้นที่เราจะแยกยีนที่สนใจออกมาได้อย่างไร อย่างแรกต้องทำห้องสมุดยีน (gene library) ซึ่งประกอบด้วย cloned DNA fragments จากจีโนมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ และมียีนที่สนใจอยู่ในนั้นด้วย จากนั้นก็มี probe ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลาก (labeled) ด้วยสารกัมมันตรังสีซึ่งถูกออกแบบมาให้มีเบสคู่สม (base-pair) กันกับยีนที่สนใจ ในทางปฏิบัตินิยมออกแบบให้มีจำนวน 6 นิวคลีโอไทด์ขึ้นไป ขั้นตอนการหา ยีนที่สนใจอธิบายไว้ในรูปที่ 3

พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering)

เป็นวิธีการที่นำเอายีนที่ต้องการเฉพาะจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งใส่เข้าไปในโมเลกุลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งโดยตรง ยิ่งกว่านั้นการถ่ายยีนดังกล่าวสามารถทำได้กับสิ่งมีชีวิตแตกต่างกันโดยสิ้นเชิง เช่น การนำยีนของแบคทีเรียเข้าสู่พืช การนำยีนมนุษย์เข้าสู่แบคทีเรีย เป็นต้น โมเลกุล ดีเอ็นเอ ที่ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ จากสิ่งมีชีวิตมากกว่าสองชนิดเรียกว่า ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA)



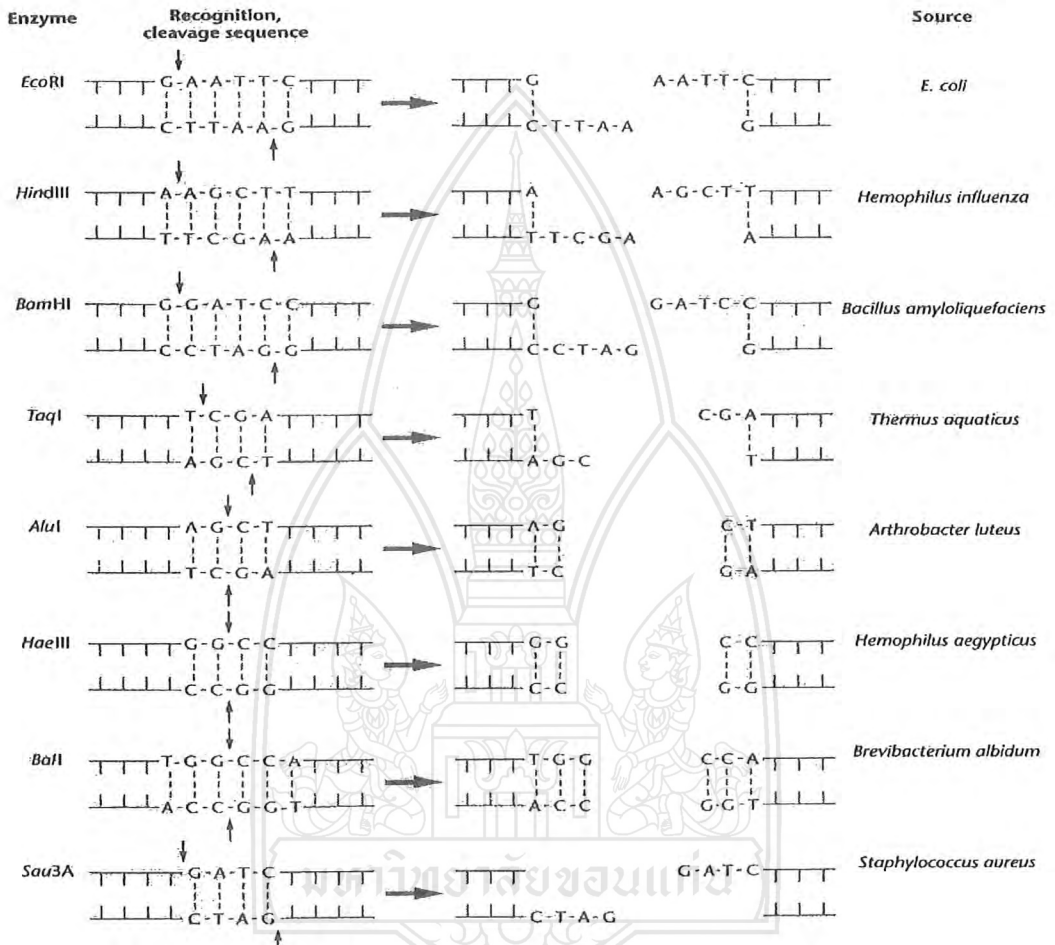
รูปที่ 3 A. แสดงการใช้ DNA probe ในการติดตามยีน

B. การใช้ DNA probe เพื่อหาดำแหน่งของ bacterial โคโลนีที่มียีนที่สนใจ

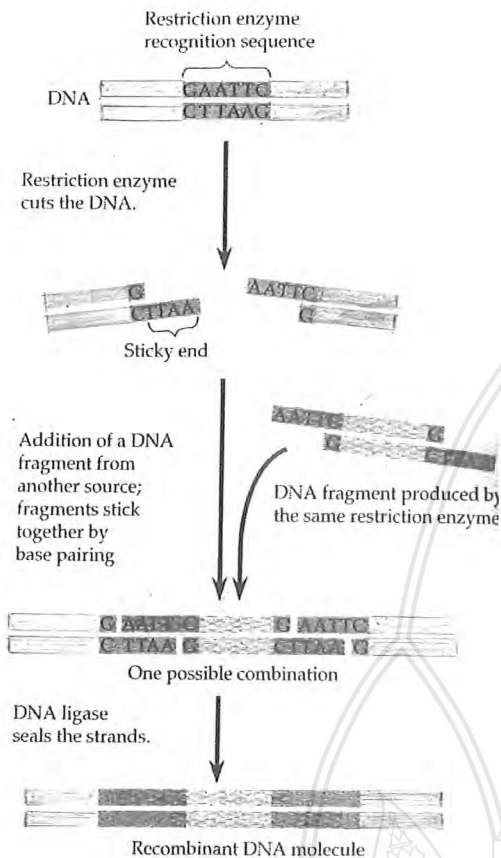
1. วางกระดาษกรอง (filter paper) บนจานเลี้ยงที่มีโคโลนีของแบคทีเรีย โคโลนีจะติดกระดาษมองเห็นเป็นดวง
2. นำกระดาษกรองไปแช่ในน้ำยาเพื่อเปิดเซลล์และแยกดีเอ็นเอที่ติดกระดาษออกเป็นสายเดี่ยว
3. ใส่ probe ให้เข้าไปจับกับเบสคู่สมบนดีเอ็นเอสายเดี่ยว บนกระดาษกรอง
4. นำกระดาษกรองมาถ่ายภาพ และจะเห็นบริเวณที่แผ่รังสี (radio-active area) บนฟิล์ม (autoradiography)
5. นำภาพถ่ายฟิล์มไปเปรียบเทียบกับโคโลนีในจานเลี้ยงเพื่อตรวจดูว่าโคโลนีใดน่าจะมียีนที่ต้องการ

(ที่มา : Campbell, Mitchell and Reece, 2000)

ความสำเร็จของพันธุวิศวกรรมนั้นเกิดขึ้นจากการค้นพบเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า restriction enzyme (รูปที่ 4) เอนไซม์เฉพาะนี้สามารถจดจำลำดับเบสได้ 4-8 นิวคลีโอไทด์ มีความสามารถในการตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งเฉพาะ ดีเอ็นเอสายคู่ที่ถูกตัดมีเบสเหมือนกัน เพียงแต่มีลำดับในทิศทางสวนกัน เอนไซม์เฉพาะจะตัด ดีเอ็นเอ ตรงตำแหน่งเบสที่เฉพาะ ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า “sticky end” คือสาย ดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันนั้นจะมีลักษณะเป็นคู่สมหรือสามารถเข้าคู่กันได้ เราสามารถนำ ดีเอ็นเอ โมเลกุลอื่นที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เดียวกันนี้มาตัดต่อเข้าด้วยกันได้ทำให้เกิด ดีเอ็นเอ ลูกผสม และเชื่อมต่อกันใหม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ DNA ligase (รูปที่ 5) เมื่อแบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน ทำให้ได้ยีนที่สนใจเพิ่มจำนวนขึ้นตามไปด้วย



รูปที่ 4 Restriction enzymes บางตัวกับตำแหน่งที่ตัดจำเพาะในสายดีเอ็นเอ พร้อมรูปแบบการแยกตัวหลังถูกตัดและแหล่งที่มาของเอนไซม์ (ที่มา : Klug and Cummings, 1999)



รูปที่ 5 การใช้ restriction enzyme และ DNA ligase เพื่อสร้าง recombinant DNA restriction enzyme ในตัวอย่างคือ EcoRI ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดคู่เบสที่ตำแหน่งจำเพาะ (ประมาณ 6 เบส) และตัด sugar-phosphate backbone ในตำแหน่งเดียวกันได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ สายสั้นๆ พร้อมกับส่วนที่เรียกว่า sticky ends ใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกันตัดพลาสมิดของแบคทีเรียได้พลาสมิดของแบคทีเรียที่มี sticky ends ซึ่งมีเบสคู่สมกันกับดีเอ็นเอจากแหล่งที่สนใจ นำดีเอ็นเอ พลาสมิดของแบคทีเรีย และ DNA ligase มาผสมกันทำให้ได้ recombinant DNA โดย DNA ligase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้ดีเอ็นเอจากทั้งสองแหล่งยึดติดกันด้วยพันธะ covalent (ที่มา : Campbell, Reece and Mitchell, 1999)

เทคนิคในการนำยีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิต

เทคนิคในการนำยีนเข้าพืช

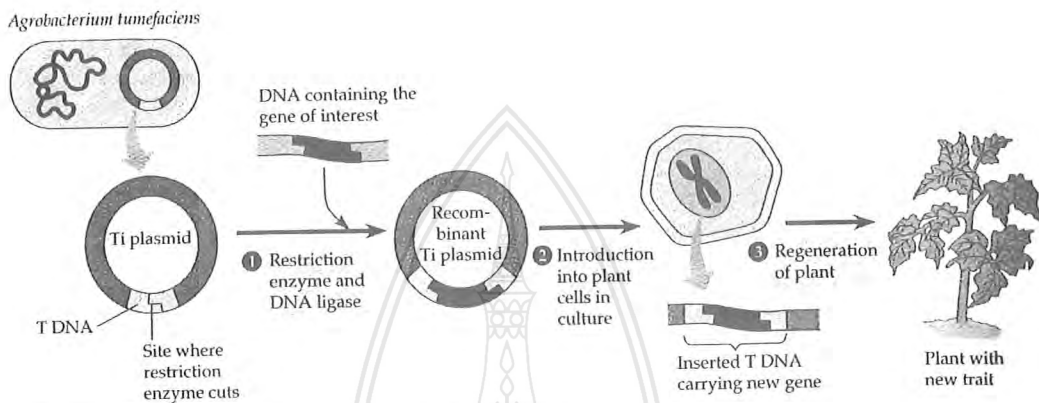
1. ใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรครากเน่าในพืชใบเลี้ยงคู่ แบคทีเรียจะเข้าสู่ต้นพืชบริเวณที่เป็นรอยแผลและจะชักนำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อที่ผิวของต้นพืชโดยการถ่ายยีนที่มีอยู่เรียกว่า T-region หรือ T-DNA ยีนที่อยู่บน T-DNA ที่สนับสนุนให้เกิดเป็นก้อนเซลล์ของพืชนี้สามารถแยกออกมาและตัดต่อเพื่อเอา ดีเอ็นเอ จากแหล่งอื่นๆ ที่สนใจเช่น *Bacillus Thuringiensis* gene (BT gene) ที่สามารถสร้างสารพิษ (toxin) เข้าสู่ T-DNA นี้ได้แล้วนำเข้าสู่เซลล์ของ *Agrobacterium* ต่อไป แต่มีข้อจำกัดใช้ได้กับพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้น (รูปที่ 6)

2. Electroporation โดยใช้กระแสไฟฟ้าระดับสูงกับสารละลายที่ประกอบด้วยโปรโตพลาสต์และดีเอ็นเอที่ต้องการ การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าทำให้ plasma membrane ของเซลล์พืชเป็นช่องเปิด ดีเอ็นเอที่อยู่ในสารละลายสามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้

3. Particle bombardment เป็นวิธีการใช้กระแสไฟฟ้าแรงสูง นำเอาดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าสู่เซลล์ โดยให้ยึดติดกับผิวของ microprojectile และยิงเข้าเซลล์เปรียบเสมือนเป็นลูกกระสุน วิธีการนี้เป็นวิธีการนำสารพันธุกรรมที่ต้องการเข้าสู่เซลล์พืชที่สะดวกและมีประสิทธิภาพ

เทคนิคในการนำยีนเข้าสัตว์

1. การฉีด ดีเอ็นเอ หรือยีนเข้าไปโดยตรง โดยฉีดยีนที่ต้องการเข้าไปโดยตรงในโปรนิวเคลียส (pronucleus) ของไซโกต ยีนที่ฉีดเข้าไปสามารถที่จะรวมกับสายยีนสายเดิมได้ (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 การใช้ Ti plasmid เป็น vector เพื่อทำพันธุวิศวกรรมในพืช

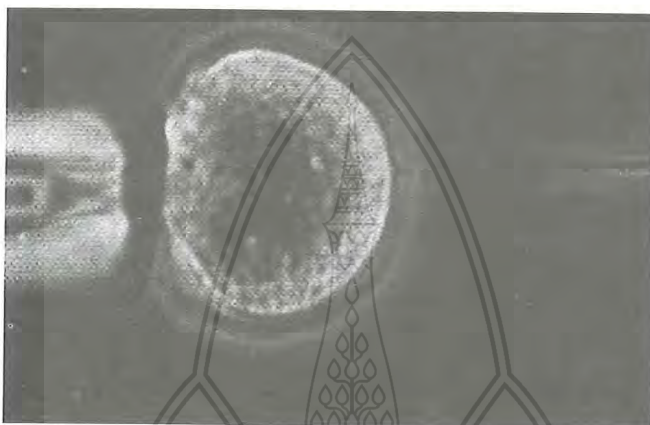
1. Ti plasmid ถูกแยกจากแบคทีเรียชนิด *Agrobacterium tumefaciens* และชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอที่มียีนสนใจถูกใส่เข้าไปในส่วน T region โดยใช้เทคนิค recombinant DNA
2. เมื่อ recombinant plasmid ถูกใส่เข้าไปในเซลล์พืช T DNA จะรวมเข้ากับ chromosomal DNA เซลล์พืชแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้ได้ T DNA และ ยีนที่สนใจเพิ่มจำนวนตามไปด้วย (ที่มา: Campbell, Reece and Mitchell, 1999)

2. การทำให้เอมบริโอติดเชื้อไวรัสทำได้โดยนำเอมบริโอที่ได้เอาผนังหุ้มออกแล้วมาเลี้ยงบนเซลล์ไฟโบบลาส (fibroblast cell line) ที่ทำให้ติดเชื้อโดยไวรัสชนิดรีโทรไวรัส (retro virus) RNA ของไวรัสสามารถที่จะแทรกเข้าไปในสาย ดีเอ็นเอ ของเซลล์ไฟโบบลาสได้เมื่อแทรกเข้าไปแล้ว RNA ของรีโทรไวรัสสามารถที่จะแทรกออกมานอก ดีเอ็นเอ ของไฟโบบลาสได้เหมือนเดิม และพบว่าการแทรกกลับออกมาของรีโทรไวรัสบางครั้งจะนำยีนหรือ ดีเอ็นเอ ของไฟโบบลาสออกมาด้วย และเมื่อ RNA ของรีโทรไวรัสดังกล่าวติดเชื้อเข้าไปในเซลล์ของเอมบริโออีกครั้ง ก็จะนำยีนหรือ ดีเอ็นเอ ของเซลล์ไฟโบบลาสดังกล่าวแทรกเข้าไปในสาย ดีเอ็นเอ ของเอมบริโอ

3. การฉีดเซลล์เข้าไปในเอมบริโอระยะบลาสโตซิส ทำได้โดยการนำเอาเซลล์ที่มีการพัฒนา (differentiate) จากอินเนอร์เซลล์แมส ฉีดเข้าไปบริเวณช่องว่างของเอมบริโอระยะบลาสโตซิส เซลล์ดังกล่าวสามารถที่จะเข้าไปรวมกับเซลล์ของเอมบริโอเดิมได้

ความสำเร็จในจีเอ็มโอทำให้มีการปลูกพืชตัดแต่งยีนอย่างกว้างขวางในสหรัฐ เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง ฝ้าย มันฝรั่ง ส่วนเทคโนโลยีชีวภาพจีเอ็มโอที่นำมาใช้ในด้านสัตว์ยังไม่แพร่หลายมากนัก เพราะสัตว์มีข้อแตกต่างจากพืชตรงที่สัตว์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองจากกลุ่มเซลล์ร่างกายได้ ทำให้การผลิตจีเอ็มโอในสัตว์ค่อนข้างจะยุ่งยาก เพราะต้องทำในระดับสุจิ ไข่ ไซโกต หรือเอมบริโอ ไม่ก็อยู่ในรูปของ

วักซิน หรือฮอร์โมน (growth hormone) ที่เตรียมได้จากแบคทีเรียหรือเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อฉีดให้แก่สัตว์หรือมนุษย์ จะเห็นว่านอกจากเป็นวิธีการค่อนข้างยุ่งยากแล้วยังสิ้นเปลืองอีกด้วย ส่วนประโยชน์ที่จะได้รับจากเทคนิคนี้ เช่น การผลิตเนื้อ ผลิตนม การผลิตขนให้มากขึ้น ทำให้สัตว์นั้นสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรค หรือเพื่อการรักษาโรคบางชนิด เป็นต้น สัตว์ที่ทำจีเอ็มโอแล้วได้แก่ โค สุกร แกะ และปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด เช่น rainbow trout และ salmon เป็นต้น



รูปที่ 7 การฉีดดีเอ็นเอ (cloned DNA) โดยใช้ปิเปตขนาดเล็กฉีดยีนที่ต้องการเข้าไปในนิวเคลียสของเอมบริโอระยะไซโกต จากนั้นนำไซโกตไปย้ายฝากในสัตว์ตัวรับ
(ที่มา : Klug and Cummings, 1999)

สถานภาพ จีเอ็มโอ ของไทยในปัจจุบัน

1. การนำเข้าเพื่อเพาะปลูกเชิงพาณิชย์ ปัจจุบันกรมวิชาการเกษตรยังไม่อนุญาตให้นำเข้าพันธุ์จีเอ็มโอ เพื่อการเพาะปลูกเชิงพาณิชย์ แต่อนุญาตให้นำเข้าเพื่อทดลองได้ พืช จีเอ็มโอ ที่นำมาทดลองปลูก เช่น ฝ้าย มะเขือเทศ พริก มะละกอ ถั่วฝักยาวต้านทานโรคไวรัส เป็นต้น
2. การนำเข้าเพื่อเป็นวัตถุดิบ กระทรวงพาณิชย์เป็นผู้อนุญาตให้นำเข้าเมล็ดพืชเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบ เช่น ถั่วเหลือง และกากถั่วเหลือง ข้าวโพด เพื่อใช้ในการแปรรูปอาหารสัตว์ โรงงานผลิตน้ำมัน ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์อื่นๆ โดยนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาผู้ผลิตพืช จีเอ็มโอ มากที่สุด
3. การนำเข้าอาหารสำเร็จรูป ไทยนอกจากจะนำเข้าวัตถุดิบแล้ว เรายังนำเข้า ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์เพื่อการบริโภคโดยตรง นอกจากนี้ยังมีพวกขนมขบเคี้ยวต่างๆ ที่ทำมาจากแป้งข้าวโพด ผลิตภัณฑ์นม เนย ต่างๆ ที่เราพบเห็นโดยทั่วไปตามร้านค้า

ผลกระทบจากการนำ จีเอ็มโอ และเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องมาใช้ในไทย

1. ความปลอดภัยทางชีวภาพ การนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก จีเอ็มโอ ออกมาใช้หรือจำหน่ายสู่ท้องตลาดมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยโดยเฉพาะต่อคนระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อม เนื่องจาก จีเอ็มโอ เป็นสิ่งใหม่เพิ่งออกสู่ตลาดได้ไม่นาน ดังนั้น การออกแบบหรือทบทวนที่มาและผล

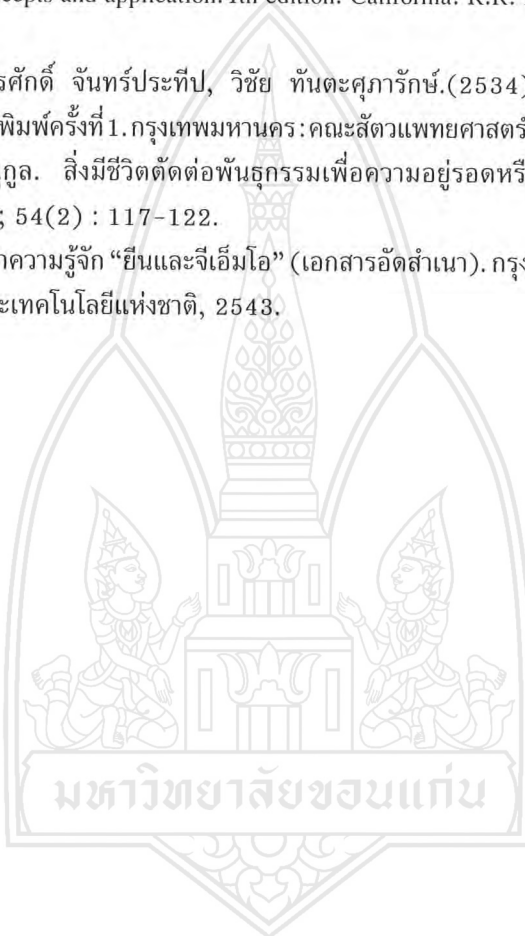
กระทบของ จีเอ็มโอ ต่อสิ่งต่างๆ จำต้องมีการดำเนินการอย่างรัดกุม เพื่อตรวจสอบว่า จีเอ็มโอ นั้นไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงในเชิงลบ เช่น สารพันธุกรรมที่ใช้ตกแต่งในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งอาจแพร่กระจายและถ่ายทอดไปสู่สิ่งมีชีวิตอื่นได้เมื่อปล่อยเข้าสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจเป็นอันตราย ได้แก่ สารพันธุกรรมที่สร้างความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ สารพันธุกรรมที่สร้างความต้านทานต่อยาปราบศัตรูพืช สารพันธุกรรมที่เป็นพิษต่อแมลงศัตรูพืช เป็นต้น ปัจจุบันสินค้าที่นำเข้าไทยไม่ได้แจ้งข้อมูลว่ามี จีเอ็มโอ และไทยยังไม่มีระบบการตรวจสอบมาตรฐานและคุณภาพของสินค้านำเข้าอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น ประเทศไทยควรมีมาตรการตรวจสอบสินค้าอย่างจริงจังและเป็นระบบ ควรให้ข้อมูลเกี่ยวกับ จีเอ็มโอ และให้ทางเลือกแก่ประชาชนเพื่อจะตัดสินใจที่จะใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ เช่น ติดฉลากผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ว่าเป็นจีเอ็มโอ หรือไม่ให้ชัดเจน เพื่อให้ผู้บริโภคมีสิทธิเลือก

2. การกีดกันทางการค้า ผลจากการนำเข้าทำให้ผู้ส่งออกไทยเริ่มมีปัญหาจากการส่งออกสินค้าไปยังกลุ่มประเทศฮับที่ต่อต้านอาหาร จีเอ็มโอ มีรายการสินค้าส่งออกของไทยเริ่มถูกตักกลับและกักกันไม่ให้นำเข้าเพราะไม่มีการติดฉลากแสดงและการตรวจพบ จีเอ็มโอ ที่เป็นข่าวกันครึกโครม เช่น ปลาหมึกแปงั่วเหลือง ปลากระป๋อง บะหมี่สำเร็จรูป ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น สำหรับเหตุผลที่ยูเอชบียกขึ้นมาต่อต้านสินค้า จีเอ็มโอ คือเห็นว่าสินค้า จีเอ็มโอ เป็นสินค้าอันตรายต่อร่างกาย เพราะยังไม่มีข้อพิสูจน์ที่มั่นใจได้ว่า จีเอ็มโอ ไม่มีอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้น ผู้ส่งออกสินค้าเข้าฮับต้องติดฉลากระบุ จีเอ็มโอ ซึ่งได้สร้างความเดือดร้อนให้กับประเทศกำลังพัฒนา เพราะหมายถึงจะทำให้การส่งออกได้ยากขึ้น ต้องหาสถาบันหรือองค์กรที่จะมาตรวจรับรองสินค้าแน่นอนว่าจะทำให้ต้นทุนสูงขึ้นแต่อย่างไรก็ตามเมื่อผู้ส่งออกมีผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะมี จีเอ็มโอ ควรจะยอมรับและทำตามข้อตกลงนานาชาติหรือทำตามข้อตกลงของประเทศนั้น ๆ ไมอย่างนั้นก็คงต้องถูกกีดกันต่อไป อีกทางหนึ่งไทยน่าจะถือโอกาสนี้ไปรื้อบทสนทนาของไทยว่ามาจากธรรมชาติปลอดภัยจาก จีเอ็มโอ เสียเลยซึ่งจะกลายเป็นจุดแข็งเสียอีก เพราะปัจจุบันดูเหมือนว่ามนุษย์จะหันเข้าหาอะไรที่เป็นธรรมชาติมากขึ้นทุกวัน

3. ศักยภาพและความพร้อมด้านเทคโนโลยี ขณะนี้ไทยมีนักวิจัยทางด้านนี้น้อยแค่นั้นยังไม่แน่ชัด แต่ยังไม่มียุทธศาสตร์การผลิตพืช จีเอ็มโอ ออกมาใช้ นอกจากใช้ในการศึกษาและทดลอง อีกทั้งยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับผลกระทบของ จีเอ็มโอ ต่อสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งแวดล้อม ทำให้มองไม่ออกว่าทิศทางของเทคโนโลยีทางนี้ในบ้านเราจะไปในทิศทางไหน ประเทศไทยเป็นประเทศที่ถือได้ว่ามีการส่งออกสินค้าทางเกษตรมากไม่แพ้ประเทศอื่นๆ ดังนั้น รัฐบาลควรจะออกมาชี้แจงให้ชัดเจนว่าประเทศไทยจะดำเนินนโยบายไปในทิศทางใด ควรมีมาตรการตรวจสอบสินค้านำเข้าให้รัดกุมยิ่งขึ้นหรือไม่ และถ้ามี จีเอ็มโอปนเปื้อนควรนำเข้าสินค้านั้นหรือไม่ หรือควรจะให้งบประมาณสนับสนุนการวิจัยเกี่ยวผลกระทบของจีเอ็มโอต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ หรือสิ่งแวดล้อมให้เป็นรูปธรรมมากกว่านี้ ถ้าศึกษาวิจัยแล้วพบว่าเทคโนโลยีนี้มีผลเสียก็ไม่ควรนำเข้ามาใช้ในทางปฏิบัติ นอกจากการศึกษาวิจัยเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาความรู้ในบางสาขาวิชา เช่น ทางการแพทย์ เพราะประเทศของเราเองยังไม่มีมีความจำเป็นมากนักในการที่จะนำเทคโนโลยีนี้เข้ามาเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เห็นได้จากผลิตผลทางการเกษตรของเกษตรกรไทยล้นตลาดเกือบทุกปี ถ้าวิจัยแล้วพบว่ามีความเสี่ยงมากกว่าผลเสีย รัฐควรจะหามาตรการที่รัดกุมเพื่อให้การใช้เทคโนโลยีนี้เป็นไปอย่างถูกต้องปลอดภัยและคุ้มค่า แน่แน่นอนว่ารัฐต้องใช้เงินทุนมหาศาลในการซื้อเครื่องมือทางด้านนี้เข้ามาใช้ รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการพัฒนาบุคลากรผู้เชี่ยวชาญที่จะใช้เทคโนโลยีนี้ ซึ่งคิดว่าเป็นการลงทุนที่คุ้มค่า

เอกสารอ้างอิง

1. Campbell N, Mitchell L, Reece J. Biology: Concepts & Connections. 3rd edition. California : An imprint of Addison Wesley Longman, Inc.; 2000.
2. Campbell N, Reece J, Mitchell L. Biology. 5th edition. California : An imprint of Addison Wesley Longman, Inc.; 1999.
3. Klug W, Cummings M. Essentials of Genetics. 3rd edition. New Jersey : Prentice Hall; 1999.
4. Starr C. Biology: concepts and application. 4th edition. California: R.R. Donnelley & Sons, Inc.; 2000.
5. มงคล เตชะกำพุ, พีรศักดิ์ จันทร์ประทีป, วิชัย ทันตะสุภารักษ์. (2534). เทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
6. วรวิณี จุฬาลักษณ์นกุล. สิ่งมีชีวิตติดต่อพันธุกรรมเพื่อความอยู่รอดหรือหายนะของมวลมนุษย์. ว. วิทยาศาสตร์ 2543; 54(2) : 117-122.
7. สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. ทำความรู้จัก “ยีนและจีเอ็มโอ” (เอกสารอัดสำเนา). กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2543.



A Characterization of Graphs of Diameter Three

ประครอง คำมัน* เทียง ภูมิสะอาด**

บทคัดย่อ

ให้ G เป็น simple graph ถ้า distance ระหว่างจุดที่ยาวที่สุดของกราฟ G เท่ากับ 3 แล้วจะกล่าวว่า $\text{diam}(G) = 3$ ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการหาลักษณะของกราฟ G ซึ่งทำให้ $\text{diam}(G) = 3$

1. บทนำ

จากงานวิจัยของ Gary S. Bloom, John W. Kennedy and Louis V. Quintas [2] ทำให้ได้ทฤษฎีบทที่แสดงถึงเงื่อนไขที่เพียงพอและจำเป็นสำหรับกราฟ G ซึ่งจะทำให้ $\text{diam}(G) = 2$ และทฤษฎีบทที่แสดงถึงเงื่อนไขที่เพียงพอสำหรับกราฟ G ซึ่งจะทำให้ $\text{diam}(G) = 2$ ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาลักษณะของกราฟ และได้ผลสรุปที่สำคัญคือ ได้ทฤษฎีบทที่แสดงถึงเงื่อนไขที่เพียงพอและจำเป็นสำหรับกราฟ G ซึ่งจะทำให้ $\text{diam}(G) = 3$ และทฤษฎีบทที่แสดงถึงเงื่อนไขที่เพียงพอสำหรับกราฟ G ซึ่งจะทำให้ $\text{diam}(G) = 3$

2. ความรู้พื้นฐาน

ในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเรื่องที่จะนำไปใช้ในการพิสูจน์ทฤษฎีบทที่เป็นผลลัพธ์สำคัญในหัวข้อต่อไป โดยสัญลักษณ์ต่างๆ ที่จะใช้เหมือนกับในหนังสือทฤษฎีกราฟเบื้องต้น ของ นิติยา ชิงชัย [1]

นิยาม 2.1 กราฟ (graph) คือ คู่อันดับ $(V(G), E(G))$ โดยที่ $V(G)$ เป็นเซตจำกัดที่ไม่เป็นเซตว่างของสมาชิกที่เรียกว่าจุด (vertex) และ $E(G)$ เป็นแฟ้มมีจำกัดของคู่อันดับของสมาชิกใน $V(G)$ ซึ่งเรียก สมาชิกของ $E(G)$ ว่าเส้น (edge)

โดยทั่วไปแล้วจะเขียนแทนกราฟ G ใด ๆ ด้วยแผนภาพ ซึ่งประกอบด้วยจุดและเส้น โดยที่จุดของแผนภาพคือสมาชิกของ $V(G)$ และเส้นของแผนภาพคือสมาชิกของ $E(G)$ และเส้น $e = \{u, v\}$ ใดๆ ใน $E(G)$ จะเป็นเส้นที่เชื่อมระหว่างจุด u และจุด v เขียนแทนด้วย uv

นิยาม 2.2 ลูป (loop) คือเส้นที่อยู่ในรูป vv

นิยาม 2.3 มัลติเพิลเอจ (multiple edge) คือ เส้นที่มีมากกว่าหนึ่งเส้นซึ่งเชื่อมจุดคู่เดียวกัน

* นักศึกษาภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** รองศาสตราจารย์ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

- นิยาม 2.4 ซิมเปิลกราฟ (simple graph) คือกราฟที่ไม่มีมัลติเพลดจ์และไม่มีลูป
- นิยาม 2.5 จะเรียกจุด u และ v ของกราฟว่าเป็น จุดประชิด (adjacent vertices) ถ้ามีเส้นเชื่อมระหว่างจุด u และจุด v
- นิยาม 2.6 ให้ u และ v เป็นจุดในกราฟ G จะกล่าวว่า v เป็น neighbor ของ u ถ้า u เป็นจุดที่ประชิดกับ v และให้ $N(u)$ แทนเซตของจุดที่เป็น neighbor ของ u
- นิยาม 2.7 ถ้าจุด u และจุด v ของกราฟมีเส้น uv เชื่อมแล้วจะเรียก u หรือ v ว่าเป็นจุดที่ อินซิเดนท์ (incident) กับเส้น uv
- นิยาม 2.8 จะเรียกจำนวนเส้นของกราฟที่อินซิเดนท์กับจุด v ว่า ดีกรี (degree) ของจุด v และเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ $d(v)$
- นิยาม 2.9 จะเรียกกราฟที่มีจุด 1 จุดว่า ทริวีเอลกราฟ (trivial graph) นอกนั้นจะเรียกว่า นอนทริ-วีเอลกราฟ (nontrivial graph)
- นิยาม 2.10 ถ้า G เป็นกราฟที่มี $E(G)$ เป็นเซตว่างแล้วจะเรียก G ว่าเป็น กราฟว่าง (empty graph)
- นิยาม 2.11 จะเรียกซิมเปิลกราฟว่า คอมพลีทกราฟ (complete graph) ถ้าทุกคู่ของจุดในกราฟนี้มีเส้นเชื่อมระหว่างจุด และใช้สัญลักษณ์ K_p แทนคอมพลีทกราฟที่มี p จุด
- นิยาม 2.12 ถ้า G เป็นซิมเปิลกราฟแล้ว คอมพลีเมนต์ (complement) ของกราฟ G คือ ซิมเปิลกราฟ $\bar{G}$ ซึ่งมีเซตของจุดเป็น $V(G)$ และจุด 2 จุดใดๆ จะเป็นจุดที่ประชิดกันใน $\bar{G}$ ก็ต่อเมื่อจุด 2 จุดนั้น ไม่ประชิดกันใน G
- นิยาม 2.13 จะเรียกกราฟ H ว่าเป็น สับกราฟ (subgraph) ของกราฟ G ถ้าทุกจุดของ H เป็นจุดของ G และทุกเส้นของ H เป็นเส้นของ G
จะเรียกสับกราฟ H ว่า span G ถ้า $V(H) = V(G)$
- นิยาม 2.14 star centered at x คือ เซตของเส้นทั้งหมดใน G ที่มี x เป็นจุดปลาย
- นิยาม 2.15 ถ้า v เป็นจุดของ G แล้ว $G-v$ จะหมายถึงสับกราฟของ G ซึ่งได้จากการลบจุด v และเส้นที่อินซิเดนท์กับจุด v ออกไปจาก G

ในรูปทั่วไป ถ้า S เป็นเซตใดๆ ของจุดใน G แล้ว $G - S$ จะหมายถึงสับกราฟของ G ที่ได้จากการลบจุดใน S และเส้นที่อินซิเดนท์กับจุดใน S ออกจาก G

- นิยาม 2.16 ยูเนียน (union) ของกราฟ G_1 และ G_2 (เขียนแทนด้วย $G_1 \cup G_2$) คือ กราฟ G ที่มี $V(G) = V(G_1) \cup V(G_2)$ และ $E(G) = E(G_1) \cup E(G_2)$

- นิยาม 2.17 ให้ u และ v เป็นจุดของกราฟ G $u - v$ วอล์ค ($u - v$ walk) ใน G คือลำดับจำกัดของจุดและเส้นที่ปรากฏในลักษณะสลับที่กันโดยเริ่มต้นด้วยจุด u และสิ้นสุดด้วยจุด v และทุก ๆ เส้น จะอินซิเดนซ์กับจุดที่อยู่หน้าและหลังเส้นนั้น
- นิยาม 2.18 $u - v$ พาท ($u - v$ path) ในกราฟ G คือ $u - v$ วอล์คที่มีจุดต่างกัน
- นิยาม 2.19 จะเรียกจำนวนเส้นใน $u - v$ พาท ว่า ความยาวของ $u - v$ พาท
- นิยาม 2.20 จะเรียก $u - v$ พาทที่มี $u = v$ ว่า พาทปิด นอกนั้นเป็นพาทเปิด
- นิยาม 2.21 จะเรียกพาทปิดซึ่งประกอบด้วยเส้นอย่างน้อย 1 เส้นว่า เซอร์คิต (*circuit*)
- นิยาม 2.22 ระยะทาง (distance) ระหว่างจุด u และ v ของกราฟ G (แทนด้วยสัญลักษณ์ $d(u,v)$) คือความยาวของพาทที่สั้นที่สุดที่เชื่อมระหว่าง u และ v ถ้าระหว่าง u กับ v ไม่มีพาทเชื่อมแล้ว $d(u,v) = \infty$
- นิยาม 2.23 จะเรียก u และ v ในกราฟ G ว่าเป็น คอนเนคเตด (*connected*) ก็ต่อเมื่อ $u = v$ หรือถ้า $u \neq v$ แล้วจะมี $u - v$ พาทใน G
- นิยาม 2.24 จะเรียก G ว่า คอนเนคเตดกราฟ (*connected graph*) ถ้าสองจุดใด ๆ ใน G เป็นคอนเนคเตด ส่วนกราฟที่ไม่เป็น คอนเนคเตดกราฟ จะเรียกว่า ดิสคอนเนคเตดกราฟ
- หมายเหตุ กราฟที่มี 1 จุดจะเป็นคอนเนคเตดกราฟ
- นิยาม 2.25 diameter ของกราฟ G แทนด้วย $\text{diam}(G)$ คือ distance ระหว่างจุดที่ยาวที่สุดใน G และ $\text{diam}(G) = \infty$ เมื่อ G เป็นดิสคอนเนคเตดกราฟ
- นิยาม 2.26 ทรี (*tree*) คือ กราฟที่ไม่มีเซอร์คิตและเป็นคอนเนคเตดกราฟ
- นิยาม 2.27 ให้ uv เป็นเส้นในกราฟ G $\text{double-star on } uv$ คือ maximal tree ใน G ซึ่งเป็นยูเนียนของ $\text{star-centered at } u$ กับ $\text{star-centered at } v$ โดยที่แต่ละ star จะต้องบรรจุเส้น uv
- นิยาม 2.28 ให้ G เป็นคอนเนคเตดกราฟใดๆ เลือก เซอร์คิตใดๆ ใน G แล้วเอาเส้นออกไปหนึ่งเส้นโดยที่ยังคงทำให้ G เป็นคอนเนคเตดกราฟ และถ้าทำต่อไปเรื่อย ๆ กับเซอร์คิตที่เหลือใน G จนกระทั่งกราฟที่เหลือไม่มีเซอร์คิตเลย กราฟที่เหลือนี้จะเป็นทรีที่ $\text{span } G$
- นิยาม 2.29 ให้ uv, uw และ vw เป็นเส้นในกราฟ G $\text{triple-star on } uvw$ คือ ยูเนียนของ $\text{star centered at } u$ กับ $\text{star centered at } v$ กับ $\text{star centered at } w$

3. ผลลัพธ์ที่สำคัญ

ในหัวข้อนี้จะเป็นการพิสูจน์ทฤษฎีบทที่เป็นผลลัพธ์สำคัญในการศึกษาคราวนี้ โดยในทฤษฎีบทแรกจะเป็นการกล่าวถึงเงื่อนไขที่จำเป็นและเพียงพอที่จะทำให้กราฟ G ใดๆ มี $\text{diam}(G) = 3$ ในส่วนที่สองจะเป็นทฤษฎีบทที่กล่าวถึงคุณสมบัติเพียงพอของกราฟที่จะทำให้กราฟ G ใดๆ มี $\text{diam}(G) = 3$

ทฤษฎีบทที่ 3.1

ให้ G เป็นซิมเปิลคอนเนคเตดกราฟ กราฟ G จะมี $\text{diam}(G) = 3$ ก็ต่อเมื่อ

1. $\bar{G}$ ไม่เป็นกราฟว่าง
2. มี double-star ที่ สแปน $\bar{G}$
3. $d(x,y) \leq 3$ สำหรับทุก $x,y \in V(G)$

พิสูจน์ $(\rightarrow)$

1) (จะแสดงว่า $\bar{G}$ ไม่เป็นกราฟว่าง) สมมติว่า G เป็นกราฟว่าง

จะได้ว่า $G = K_p$ และเนื่องจาก $\text{diam}(K_p)$ เท่ากับ 0 หรือ 1

ดังนั้น $\text{diam}(G)$ เท่ากับ 0 หรือ 1 นั่นคือ $\text{diam}(G) \neq 3$

ซึ่งขัดแย้งกับที่กำหนดให้ว่า $\text{diam}(G) = 3$ เพราะฉะนั้น $\bar{G}$ ไม่เป็นกราฟว่าง

2) (จะแสดงว่ามี double-star ที่ สแปน G) สมมติว่าไม่มี double-star ที่ สแปน G

จะได้ว่าทุกเส้น uv ใน $\bar{G}$ จะมีจุด x ที่ไม่เป็น neighbor ของทั้ง u และ v

ดังนั้น x จะเป็น neighbor ของทั้ง u และ v ใน G

จึงได้ว่าใน G $d(u,v) = 2$ และถ้า uv ไม่เป็นเส้นใน $\bar{G}$

จะได้ว่าใน G $d(u,v) = 1$ ดังนั้น $\text{diam}(G)$ เท่ากับ 1 หรือ 2

นั่นคือ $\text{diam}(G) \neq 3$ ซึ่งขัดแย้งกับที่กำหนดให้ว่า $\text{diam}(G) = 3$

เพราะฉะนั้นมี double-star ที่ สแปน $\bar{G}$

3) (จะแสดงว่า $d(x,y) \leq 3$ สำหรับทุก $x,y \in V(G)$) เนื่องจาก $\text{diam}(G) = 3$

จะได้ว่า $d(x,y) \leq 3$ สำหรับ $x,y \in V(G)$

(จะแสดงว่า $\text{diam}(G) = 3$) ให้ double-star on edge uv span $\bar{G}$

$(\leftarrow)$ จะได้ว่า ทุกจุด x ใน $\bar{G}$ จะมี xu หรือ xv เป็นเส้นใน G ดังนั้น ในกราฟ G

$d(u,v) \geq 3$ แต่จาก 3) จะได้ว่า $d(u,v) \leq 3$ เพราะฉะนั้น $d(u,v) = 3$

และจาก 3) ที่ว่า $d(x,y) \leq 3$ สำหรับทุก $x,y \in V(G)$ จึงได้ว่า $\text{diam}(G) = 3$ ■

จากทฤษฎีบทข้างต้นจะเห็นว่ากราฟ G จะมี $\text{diam}(G) = 3$ ถ้าคุณสมบัติของกราฟ G ทั้ง 3 ข้อ เป็นจริง แต่การพิจารณาคุณสมบัติของกราฟตามข้อ 3 ทำได้ยาก ดังนั้น ต่อไปนี้จะแสดงทฤษฎีบทที่ทำให้พิจารณาคุณสมบัติของกราฟ G ที่ $\text{diam}(G) = 3$ ได้ง่ายขึ้น

ทฤษฎีบทที่ 3.2

ให้ G เป็นซิมเปิลคอนเนคเตดกราฟ

กราฟ G จะมี $\text{diam}(G) = 3$ ถ้า $G \neq K_p$, มี double-star on edge uv ที่ สแปน $\bar{G}$

และข้อใดข้อหนึ่งต่อไปนี้ เป็นจริง

- 1) มี double-star ที่ สแปน G
- 2) มี star centered ที่ สแปน $G - u$ หรือ $G - v$
- 3) มี triple-star on xyz สแปน G เมื่อ $x,y,z \in V(G)$

พิสูจน์

1) (จะแสดงว่า $d(x,y) \leq 3$ สำหรับทุก $x,y \in V(G)$)

ให้ double-star on edge wz สแปน G ดังนั้น

สำหรับสองจุด $x, y \in V(G)$ จะได้ว่า $x, y \in N(w) \cup N(z)$ เพราะฉะนั้น $d(x, y) \leq 3$ โดยทฤษฎีบทที่ 3.1 จะได้ว่า $\text{diam}(G) = 3$

2) (จะแสดงว่า $d(x, y) \leq 3$ สำหรับทุก $x, y \in V(G)$)

2.1 ให้ star centered at w สเป้น $G - u$ ดังนั้น

สำหรับทุก $z \in V(G) - \{w, u\}$ จะได้ว่า $z \in N(w)$ เพราะฉะนั้น $d(w, z) = 1$ เนื่องจาก G เป็นคอนเนคเตดกราฟ จะได้ว่ามี $p \in N(w)$ ซึ่ง $up \in E(G)$ เพราะฉะนั้น $d(u, z) \leq 3$ ให้สองจุด s, t ใดๆ ใน $V(G) - \{w, u\}$ จะได้ว่า $s \in N(w)$ และ $t \in N(w)$ เพราะฉะนั้น $d(s, t) \leq 2$ และเนื่องจากมี double-star on edge uv ที่สเป้น G จะได้ว่า $u \notin N(w)$ เพราะฉะนั้น $d(u, w) = 2$ ดังนั้น สำหรับสองจุด $x, y \in V(G)$ จะได้ว่า $d(x, y) \leq 3$ โดยทฤษฎีบทที่ 3.1 จึงได้ว่า $\text{diam}(G) = 3$

2.2 พิสูจน์ทำนองเดียวกับข้อ 2.1

3) (จะแสดงว่า $d(s, t) \leq 3$ สำหรับทุก $s, t \in V(G)$) ให้ triple-star on xyz สเป้น G ดังนั้น สำหรับสองจุด $s, t \in V(G)$ จะได้ว่า $s, t \in N(x) \cup N(y) \cup N(z)$ เพราะฉะนั้น $d(s, t) \leq 3$ โดยทฤษฎีบทที่ 3.1 จึงได้ว่า $\text{diam}(G) = 3$

ทฤษฎีบทที่ 3.3

ให้ G เป็นซิมเปิลคอนเนคเตดกราฟ

กราฟ G จะมี $\text{diam}(G) = 3$ ถ้า $G \neq K_p$, มี double-star on edge uv ที่ สเป้น $\bar{G}$, มี $x \in N(u) - N(v)$ และ $y \in N(v) - N(u)$ ใน G ซึ่ง $xy \in E(G)$ และข้อใดข้อหนึ่งต่อไปนี้เป็นจริง

a) มี star centered สเป้น $G - \{u, v\}$

b) มี $z \in N(u) \cap N(v)$ ใน $\bar{G}$ ซึ่ง star centered at z สเป้น

$G - \{u, v, x, y\}$ และ u, v, x, y เชื่อมกับจุดใน $N(z)$ อย่างน้อยหนึ่งจุด

พิสูจน์ a)

(จะแสดงว่า $d(s, t) \leq 3$ สำหรับทุก $s, t \in V(G)$) ให้ star centered at w

สเป้น $G - \{u, v\}$ ดังนั้นสำหรับทุก $z \in V(G) - \{u, v, w\}$ จะได้ว่า $z \in N(w)$

เพราะฉะนั้น $d(z, w) = 1$ เนื่องจาก G เป็นคอนเนคเตดกราฟ จะได้ว่ามี

$p, q \in N(w)$ ซึ่ง $up, vq \in E(G)$ เพราะฉะนั้น $d(u, z) \leq 3$ และ $d(v, z) \leq 3$

ให้ s, t เป็นสองจุดใดๆ ใน $V(G) - \{u, v, w\}$ จะได้ว่า $s \in N(w)$ และ $t \in N(w)$

เพราะฉะนั้น $d(s, t) \leq 2$ เนื่องจาก $ux, xy, yv, xw, yw \in E(G)$ ดังนั้น สำหรับ

สอง s, t ใน $\{u, v, w\}$ จะได้ว่า $d(s, t) \leq 3$ เพราะฉะนั้น สำหรับสองจุด $s, t \in V(G)$

จะได้ว่า $d(s, t) \leq 3$ และโดยทฤษฎีบทที่ 3.1 จึงได้ว่า $\text{diam}(G) = 3$

b) (จะแสดงว่า $d(s, t) \leq 3$ สำหรับทุก $s, t \in V(G)$) ให้ $z \in N(u) \cap N(v)$ ใน $\bar{G}$

และ star centered at z สเป้น $G - \{u, v, x, y\}$ ดังนั้น สำหรับทุก $w \in V(G) - \{u, v, x, y, z\}$

จะได้ว่า $w \in N(z)$ เพราะฉะนั้น $d(w, z) = 1$ เนื่องจาก u, v, x, y เชื่อมกับจุดใน $N(z)$ อย่างน้อยหนึ่งจุด ดังนั้น สำหรับ $s \in \{u, v, x, y\}$ จะได้ว่า $d(s, w) \leq$

3 ให้ s, t เป็นสองจุดใดๆ ใน $V(G) - \{u, v, x, y, z\}$ จะได้ว่า $s \in N(z)$ และ $t \in N(z)$ เพราะฉะนั้น $d(s, t) \leq 2$ เนื่องจาก $ux, xy, yv \in E(G)$ ดังนั้น สำหรับ $s, t \in \{u, v, x, y, z\}$ จะได้ว่า $d(s, t) \leq 3$ เมื่อ $s \neq t$ เพราะฉะนั้น สำหรับสองจุด $s, t \in V(G)$ จะได้ว่า $d(s, t) \leq 3$ และโดยทฤษฎีบทที่ 3.1 จึงได้ว่า $\text{daim}(G) = 3$

ทฤษฎีบทที่ 3.4

ให้ G เป็นซิมเพลคอนเนคเตดกราฟ

กราฟ G จะมี $\text{diam}(G) = 3$ ถ้า $G \neq K_p$, มี double-star on edge uv สเป้น $\bar{G}$ และ

1. ถ้า $w \in V(G)$ แล้ว $wu \in E(G)$ หรือ $wv \in E(G)$
2. สำหรับทุก $x \in N(u)$ ใน G จะมี $y \in N(v)$ ใน G ซึ่ง $xy \in E(G)$ และสำหรับทุก $s \in N(v)$ ใน G จะมี $t \in N(u)$ ใน G ซึ่ง $st \in E(G)$

พิสูจน์ (จะแสดงว่า $d(p, q) \leq 3$ สำหรับทุก $p, q \in V(G)$)

เนื่องจากมี double-star on edge uv สเป้น $\bar{G}$ ดังนั้น สำหรับทุก $x \in V(G) - \{u, v\}$ จะได้ว่า $x \in N(u) - N(v)$ หรือ $x \in N(v) - N(u)$ อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น

ให้ $p \in N(u) - N(v)$ และ $q \in N(v) - N(u)$

จะได้ว่า $d(p, u) = d(q, v) = 1$

ให้ p, q เป็นสองจุดใดๆ ใน $N(u)$ จะได้ว่า $d(p, q) \leq 2$

ให้ p, q เป็นสองจุดใดๆ ใน $N(v)$ จะได้ว่า $d(p, q) \leq 2$

ให้ $p \in N(u)$ และ $q \in N(v)$ เนื่องจาก ข้อ 2. จะได้ว่า $d(p, q) \leq 3$ และ

$d(u, q) = d(v, p) = 2$ และเนื่องจาก $d(q, v) = 1$ จะได้ว่า $d(u, v) = 3$

เพราะฉะนั้น สำหรับสองจุด $p, q \in V(G)$ จะได้ว่า $d(p, q) \leq 3$ และโดย

ทฤษฎีบทที่ 3.1 จึงได้ว่า $\text{daim}(G) = 3$

4. สรุปและข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยของ Gary S. Bloom, John W. Kennedy and Louis V. Quintas ทำให้เกิดแนวคิดในการศึกษาครั้งนี้ ในการศึกษาต่อไปอาจเป็นการศึกษาถึงคุณสมบัติของกราฟ G ที่ $\text{diam}(G) = 4$ หรือกราฟ G ที่ $\text{diam}(G) = n$ เมื่อ n เป็นจำนวนเต็มบวกใดๆ

เอกสารอ้างอิง

- [1] นิตยา ชิงชัย , ทฤษฎีกราฟเบื้องต้น , มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- [2] A Characterization of Graph of Diameter two, Gary S. Bloom, John W. Kennedy and Louis V. Quintas, The American Mathematical Monthly, Vol.95, No.1, January 1988. P. 37-38

ประสิทธิภาพของแบบทดสอบค่าเฉลี่ยประชากรปกติ หนึ่งประชากร เมื่อบางหน่วยตัวอย่างมีค่าสูงมาก

ดร. อนันท์ ตริวานิช* และ ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์*

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบบทดสอบสำหรับทดสอบค่าเฉลี่ยของประชากรปกติหนึ่งประชากร เมื่อมีค่าสังเกตบางหน่วยมีค่าสูงมาก (T- test, Wilcoxon signed - rank test, Sign - test และ 2β trimmed T test) โดยพิจารณาจากความถี่สัมพัทธ์ของผลการทดสอบ ซึ่งสรุปว่าปฏิเสธสมมติฐานหลักที่คำนวณได้จากข้อมูลซึ่งจำลองขึ้นบนเครื่องคอมพิวเตอร์ด้วยเทคนิคมอนติคาร์โล (empirical rejection rate) ทั้งนี้ในแต่ละสถานการณ์ที่ศึกษากระทำซ้ำ ๆ 20,000 ครั้ง ผลการวิจัยสรุปได้ว่า ทุกแบบทดสอบได้รับผลกระทบเนื่องจากการมีค่าสูงมากในตัวอย่างโดย Wilcoxon signed - rank test ได้รับผลกระทบมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ Sign Test, T Test และ 2β trimmed T test ตามลำดับ แบบทดสอบที่ควรใช้เมื่อไม่พบค่าสูงมากคือ T Test เมื่อขนาดตัวอย่างมากกว่า 10 และ Wilcoxon signed - rank test เมื่อขนาดตัวอย่างน้อยกว่า 10 สำหรับกรณีที่พบค่าสูงมาก หากพบอยู่ในช่วง 1-10 % และตัวอย่างมีขนาดน้อย ควรใช้ T test ส่วนสถานการณ์อื่นๆ ควรใช้ 2β trimmed T test โดย β จะมีค่าขึ้นอยู่กับขนาดตัวอย่าง ระดับสัดส่วนของค่าสูงมากที่พบ และระดับนัยสำคัญ เช่น ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อใช้ตัวอย่างขนาด 10 และพบค่าสูงมากในช่วง 11-20 % ควรใช้ 2β trimmed T test โดย $\beta = 0.10$ แต่ถ้าพบค่าสูงมากอยู่ในช่วง 21-30 % ควรใช้ 2β trimmed T test โดย $\beta = 0.20$ เป็นต้น

มทววิทย ABSTRACT มทววิทย

The objective of this research is to investigate and compare the property of the tests for a normal mean population when containing some very large unit (i.e. T test, Wilcoxon signed - rank test, Sign Test and 2β Trimmed T test), using the empirical rejection rate. The data were obtained through simulation with repeating 20, 000 times for each predicament of the experiment. And a computer program was designed to calculate the empirical rejection rate. The results of the study can be summarized as follows.

When the sample does not contain very large units, the optimal test for testing normal mean population is T- test for $n > 10$ and Wilcoxon signed - rank test, for $n \leq 10$. In case of containing

* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

some very large units, if the proportion of very large units is about 1-10 % and the sample size is small, T test is still optimal. For another situations, the optimal test is 2β Trimmed T test. The value of β , which made 2β Trimmed T test to be optimal, depends on size of sample (n), proportion of very large units and level of significance. For example, at level of significance is 0.05, $n = 10$ and the proportion of very large units is about 11-20 %, the optimal test is 2β Trimmed T test when $\beta = 0.10$, but 2β Trimmed T test when $\beta = 0.20$ is the optimal test for the proportion of very large units is about 21-30 %.

1. บทนำ

ในการทดสอบสมมติฐานค่าเฉลี่ยของหนึ่งประชากรโดย T test นั้น มีข้อสมมติ (assumption) ว่าประชากรต้องมีการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) แต่หากข้อมูลไม่เป็นตามข้อสมมติดังกล่าว ผลการทดสอบจะคลาดเคลื่อนจากที่เป็นจริง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหานี้ จึงใช้ Sign test และ Wilcoxon signed - rank test แทน โดยแบบทดสอบทั้งสองเป็นแบบทดสอบไม่ใช้พารามิเตอร์ (nonparametric test)

อย่างไรก็ตาม กรณีที่ประชากรซึ่งมีการแจกแจงแบบปกติหรือใกล้เคียงแต่มีค่าสังเกตบางค่าสูงมาก โดยมีค่ามากกว่า ค่าเฉลี่ย + 2 (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ตัวอย่างที่เลือกมาได้อาจมีหน่วยที่มีค่าสูงมากรวมอยู่ด้วย ซึ่งค่าสูงมากนี้ส่งผลกระทบต่อการประมาณค่าพารามิเตอร์ที่สนใจ ดังจะเห็นได้จากการประมาณค่าเฉลี่ยประชากรจากตัวอย่างสุ่มอย่างง่ายชนิดไม่ใส่คืน (simple random sampling without replacement) ด้วยค่าเฉลี่ยตัวอย่าง ถ้านำค่าสังเกตที่เป็นค่าสูงมากมาคำนวณด้วย ค่าเฉลี่ยตัวอย่างที่ได้นั้นจะมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยประชากรมาก แต่ถ้าตัดค่าสังเกตดังกล่าวทิ้ง ค่าเฉลี่ยตัวอย่างที่คำนวณได้ก็จะน้อยกว่าค่าเฉลี่ยประชากรมาก เช่นกัน ปัญหานี้อาจแก้ไขได้โดยตัดค่าสังเกตที่เป็นค่าสูงมากทิ้ง ถ้าการกระทำดังกล่าวไม่กระทบกระเทือนต่อผลการวิจัยมากนัก แต่บางกรณีไม่สามารถตัดค่าสังเกตที่เป็นค่าสูงมากเหล่านี้ทิ้งได้ เพราะจะทำให้การประมาณค่าเฉลี่ยประชากรคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงมาก เช่น ในปี พ.ศ. 2529 อโนทัย ได้เสนอตัวประมาณ $\hat{Y}_k = 1, 2, 3$ ซึ่งพัฒนาจากการปรับหรือเปลี่ยนแปลงน้ำหนักในตัวประมาณความถดถอยสำหรับประมาณยอดรวมประชากร โดยไม่ตัดค่าสังเกตที่สูงมากทิ้ง ค่าประมาณที่ได้จะมีค่าใกล้เคียงกับยอดรวมประชากรมากกว่าค่าเฉลี่ยตัวอย่างคูณกับขนาดประชากร ตลอดจนใกล้เคียงกว่าค่าประมาณของตัวประมาณค่าที่เสนอโดย ไมเคิลและคาตาบา (2524)

การเกิดเหตุการณ์ดังกล่าวอาจนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนของการทดสอบและการแปลผลในการทดสอบสมมติฐานค่าเฉลี่ยประชากรด้วย T test เนื่องจาก T test ขึ้นอยู่กับค่าเฉลี่ยตัวอย่างด้วย แต่ยังไม่มีรายงานถึงผลกระทบในเรื่องนี้ รวมทั้ง Sign test และ Wilcoxon signed - rank test ซึ่งเป็นแบบทดสอบที่ใช้ทดสอบตำแหน่งประชากรของแบบไม่ใช้พารามิเตอร์ ก็ไม่มีการกล่าวถึงเช่นกัน

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยเห็นว่าควรทำการศึกษาและตรวจสอบถึงประสิทธิภาพของแบบทดสอบค่าเฉลี่ยประชากรว่ามีลักษณะอย่างไร เมื่อมีหน่วยตัวอย่างบางหน่วยมีค่าสูงมากรวมอยู่ด้วย เพื่อค้นหาแบบทดสอบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเหตุการณ์ดังกล่าว

2. การทดสอบสมมติฐานค่าเฉลี่ยประชากรปกติหนึ่งประชากร

ให้ $X_1, X_2, \dots, X_n$ เป็นตัวอย่างสุ่มขนาด n จากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติที่มีค่าเฉลี่ย μ และความแปรปรวน σ^2 จากคุณสมบัติของการแจกแจงแบบปกติจะได้ $M = \mu$ เมื่อ M คือ มัธยฐานของประชากร และสมมติฐานในการทดสอบอยู่ในลักษณะ

$$H_0 : \mu \leq \mu_0 \text{ เทียบกับ } H_1 : \mu > \mu_0$$

โดยแบบทดสอบ T test, Wilcoxon signed - rank test, Sign test และ 2 β trimmed T test สำหรับทดสอบสมมติฐานดังกล่าวอยู่ในรูปดังต่อไปนี้

• แบบทดสอบ T

จะปฏิเสธสมมติฐานหลัก H_0 ที่ระดับนัยสำคัญ α ถ้า

$$T = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}} \geq t_{\alpha, (n-1)} \text{ หรือ } P(T_{(n-1)} \geq \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}) \leq \alpha$$

$$\text{เมื่อ } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \text{ และ } s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

• แบบทดสอบ Sign

จะปฏิเสธสมมติฐานหลัก H_0 ที่ระดับนัยสำคัญ α ถ้า

$$s^+ \geq s^+_{\alpha} \text{ หรือ } P(S^+ \geq s^+ | n, 0.5) \leq \alpha$$

เมื่อ $s^+ =$ จำนวน X_i ที่มีค่ามากกว่า μ_0 และมีการแจกแจงแบบ Binomial $(n, 0.5)$

$$s^+_{\alpha} \text{ เป็นค่าคงที่ที่ทำให้ } \sum_{s=s^+_{\alpha}}^n \binom{n}{s} (0.5)^n \leq \alpha$$

• แบบทดสอบ Wilcoxon signed - rank

จะปฏิเสธสมมติฐานหลัก H_0 ที่ระดับนัยสำคัญ α ถ้า

$$T^+ \geq t^+_{\alpha} \text{ หรือ } P(T^+ \geq t^+) = P(T^- \leq t^-) \leq \alpha$$

เมื่อ $T^+ =$ ผลบวกของลำดับที่ (rank) ของค่า $|D_i|$ สำหรับ D_i ที่มีค่ามากกว่า 0

$$D_i = X_i - \mu_0 ; i = 1, 2, \dots, n$$

$$T^- = \frac{n}{2} (n+1) - T^+$$

และ t_{α}^{-} เป็นค่าคงที่ที่ทำให้ $P(T^+ \geq t_{\alpha}^+) = P(T^- \geq t_{\alpha}^-) = \sum_{r=0}^{t_{\alpha}^-} \frac{\mu(r^-)}{2^n} \leq \alpha$ โดย $\mu(r^-)$ คือ จำนวนวิธีที่จะเกิดค่า r^- และ 2^n คือ จำนวนวิธีที่จะเกิดเครื่องหมายบวกหรือลบที่เป็นไปได้ทั้งหมด หรือค่า t_{α}^+ อ่านได้จากตารางค่าวิกฤติสำหรับแบบทดสอบ Wilcoxon signed - rank

• แบบทดสอบ 2β Trimmed T

เริ่มด้วยการนำข้อมูลมาเรียงลำดับจากน้อยไปมากแล้วตัดค่าทางด้านน้อยสุดและมากที่สุดออกด้านละ $[n\beta]$ เมื่อ $[n\beta]$ คือ ค่าจำนวนเต็มของ $n\beta$; $0 \leq \beta \leq 1$ และสถิติทดสอบ 2β Trimmed T - test จะอยู่ในรูป

$$T_{n,2\beta} = \frac{(1-2\beta)\sqrt{n}(\bar{x}_{n,2\beta} - \mu_0)}{S_{w2\beta}} \quad \text{ซึ่งมีการแจกแจงแบบ } t \text{ ที่มีองศาอิสระเท่ากับ } n - [2n\beta] - 1$$

ทั้งนี้เราจะปฏิเสธสมมติฐานหลัก H_0 ที่ระดับนัยสำคัญ α ถ้า

$$T_{n,2\beta} \geq t_{\alpha, (n - [2n\beta] - 1)} \quad \text{หรือ} \quad P(T_{(n - [2n\beta] - 1)} \geq t_{n,2\beta}) \leq \alpha$$

เมื่อ $\bar{x}_{n,2\beta} = \frac{1}{n - 2m} \sum_{i=m+1}^{n-m} x_{(i)}$ โดย $m = [n\beta]$ และ $x_{(i)}$ คือสถิติอันดับที่ i

$$s_{w2\beta} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

โดย $y = \begin{cases} x_{(m+1)} & i \leq m \\ x_{(i)} & m < i \leq n-m \\ x_{(n-m)} & n-m < i \end{cases}$

และ $\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$

3. ตัวอย่างการนำไปใช้

บริษัทผลิตเครื่องดื่ม น้ำอัดลมชนิดหนึ่งได้กำหนดปริมาณสุทธินของน้ำอัดลมขนาด 290 ช.ม.³ ไว้ว่า “ปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมต้องไม่เกินกว่า 300 ช.ม.³. เพราะหากเกินจะมีผลต่อแรงดันในขวดทำให้ขวดเกิดระเบิดได้” เพื่อตรวจสอบปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมว่าอยู่ภายใต้การควบคุมหรือไม่ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ฝ่ายควบคุมการผลิตจึงสุ่มน้ำอัดลมขนาด 290 ช.ม.³ มาตรวจสอบ จำนวน 10 ขวด แล้ววัดปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมได้ดังนี้ (หน่วย : ช.ม.³)

290 316 347 272 329 464 332 356 352 311

ทั้งนี้สมมติว่า ปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมมีการแจกแจงแบบปกติ

วิธีทำ

ให้ μ เป็นค่าเฉลี่ยปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลม (หน่วย : ซม.³) และจากตัวอย่างขนาด 10 พบว่ามีปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมอยู่ 1 ค่าคือ 464 ที่เป็นค่าสูงมากโดยมีค่ามากกว่า $\bar{x} + 2s$ โดยคิดเป็น 10 % ของขนาดตัวอย่างและสมมติฐานที่ใช้ในการทดสอบคือ

$$H_0 : \mu \leq 300 \text{ (ปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมอยู่ภายใต้การควบคุม)}$$

$$H_1 : \mu > 300 \text{ (ปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมไม่อยู่ภายใต้การควบคุม)}$$

• Sign Test

ให้ $S^+ =$ จำนวนน้ำอัดลมที่มีปริมาตรสุทธิมากกว่า 300 ซม.³

จากข้อมูลได้ $s^+ = 8$ เนื่องจาก $S^+ \sim B(10, 0.5)$ $\therefore p\text{-value} = P(S^+ \geq 8) = 0.0547 > 0.05$ หรือเนื่องจาก $P(S^+ \geq 9) = 0.0107 < 0.05$ ได้ค่าวิกฤติ $s_{0.05}^+ = 9$ ดังนั้น ไม่สามารถปฏิเสธสมมติฐานหลักที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

นั่นคืออาศัย Sign Test สรุปว่า ปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมอยู่ภายใต้การควบคุม ($p > 0.05$) //

• Wilcoxon signed - rank test

คำนวณหาสถิติทดสอบได้ดังนี้

X_i	290	316	347	272	329	464	332	356	352	311
$D_i = X_i - 300$	-10	16	47	-28	29	164	32	56	52	11
$r(D_i)$	1	3	7	4	5	10	6	9	8	2

จากข้อมูลได้ $T^+ = 3 + 7 + 5 + 10 + 6 + 9 + 8 + 2 = 50$ และ $T^- = 1 + 4 = 5$ $\therefore p\text{-value} = P(T^+ \geq 50) = P(T^- \leq 5) = 0.0098 < 0.01$ หรือจากตารางค่าวิกฤติ t_{α} พบว่า เมื่อ $n = 10$ และ $\alpha = 0.05$ ได้ $t_{0.05} = 10$ ดังนั้น ปฏิเสธสมมติฐานหลักที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

นั่นคือ อาศัย Wilcoxon signed - rank test สรุปว่า ปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมไม่อยู่ภายใต้การควบคุม ($p < 0.01$) //

• T Test

จากตัวอย่างได้ $\bar{x} = 336.9$ และ $s = 52.13$ เมื่อ $n = 10$ ดังนั้น

$$T = \frac{336.90 - 300}{52.13 \sqrt{10}} = 2.2384$$

และ $p\text{-value} = P(T \geq 2.2384) = 0.0260$ หรือ $t_{0.05, (9)} = 1.833$ ดังนั้น ปฏิเสธสมมติฐานหลักที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

นั่นคือ อาศัย T Test สรุปว่า ปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมไม่อยู่ภายใต้การควบคุม ($p < 0.05$) //

• 2 β Trimmed T - test

เริ่มด้วยการนำข้อมูลมาเรียงลำดับจากน้อยไปหามาก แล้วตัดค่าทางด้านน้อยสุดและมากที่สุดออกด้านละ $m = [n\beta]$ เมื่อ $[n\beta]$ คือ จำนวนเต็มของ $n\beta$ สำหรับตัวอย่างข้างต้นสมมติให้ $\beta = 0.10$ นั่นคือ จากตัวอย่างนี้จะตัดข้อมูลออกด้านละ 1 ค่าแล้วคำนวณค่าสถิติทดสอบ 2 β Trimmed T - test ได้ดังนี้ ก่อนอื่นนำข้อมูลมาเรียงลำดับจากน้อยไปหามากได้ดังนี้

272 290 311 316 329 332 347 352 356

$$\text{และได้ว่า } m=1, \bar{x}_{n,2\beta} = \frac{1}{n-2m} \sum_{i=m+1}^{n-m} X_{(i)} = \frac{1}{10-2} \sum_{i=2}^9 X_{(i)} = 329.125$$

$$s_{w2\beta} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - 327.90)^2} = 25.48$$

ดังนั้นได้

$$T_{n,2\beta} = \frac{(1-2\beta)\sqrt{n}(\bar{x}_{n,2\beta} - \mu_0)}{s_{w2\beta}} = \frac{(1-2 \times 0.10)\sqrt{10}(329.125 - 300)}{25.48} = 2.8917$$

โดยมีองศาอิสระ = $n - [2n\beta] - 1 = 10 - 2 - 1 = 7$ และ $p\text{-value} = P(T_{(7)} > 2.8917) = 0.0116$ หรือจากตารางการแจกแจงแบบ t พบว่าที่ $\alpha = 0.05$ และ d.f. = 7 ได้ $t_{0.05, (7)} = 1.895$ ดังนั้น ปฏิเสธสมมติฐานหลักที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

นั่นคือ อาศัย 2 β Trimmed T - test (เมื่อ $\beta = 0.10$) สรุปว่า ปริมาตรสุทธิของน้ำอัดลมไม่อยู่ภายใต้การควบคุม ($p < 0.05$) //

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4. ผลการศึกษา

ผลการศึกษาจากข้อมูลที่จำลองขึ้น (simulation) โดยเครื่องคอมพิวเตอร์ระบบปฏิบัติการ DEC ด้วยเทคนิคมอนติคาโล โดยให้ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติที่มีความแปรปรวนของประชากร (σ^2) เท่ากับ 1 และค่าเฉลี่ย $\mu = 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5$, หรือ 2.0 ใช้ตัวอย่างขนาด 7, 10, 15, 20 และ 30 และแต่ละตัวอย่างประกอบด้วยหน่วยที่มีค่าสูงมากอยู่ในช่วงร้อยละ 0, 1-10, 11-20, และ 21-30 ตามลำดับ ทั้งนี้แต่ละสถานการณ์ที่ศึกษากระทำซ้ำๆ 20,000 ครั้ง ปรากฏผลดังนี้

• คุณสมบัติของตัวแบบทดสอบ

กรณีที่สมมติฐานหลักเป็นจริง จะพิจารณาคุณสมบัติของแบบทดสอบในเทอมความแกร่ง (robustness) ซึ่งจากการพิจารณาตามเกณฑ์ของ Chochran พบว่า กรณีที่มีค่าสูงมาก T-test, Wilcoxon signed

- rank test และ sign - test เท่านั้นที่มีความแกร่ง สำหรับ 2β trimmed T test จะไม่มีโอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักเลย นั่นคือ ไม่มีโอกาสเกิดความคลาดเคลื่อนประเภทที่ 1 ส่วนกรณีมีค่าสูงมากในตัวอย่างในช่วงร้อยละ 1-10 พบว่า T test เป็นเพียงแบบทดสอบเดียวที่มีความแกร่ง ส่วนเมื่อสัดส่วนของค่าสูงมากพบอยู่ในช่วงอื่น 2β trimmed T test ก็เป็นเพียงแบบทดสอบเดียวที่มีแนวโน้มว่าจะมีความแกร่ง สำหรับคุณสมบัติของแบบทดสอบทั้งสี่ในกรณีที่สมมติฐานหลักไม่เป็นจริง ปรากฏดังนี้

ความถี่สัมพัทธ์ของการปฏิเสธ H_0 ที่ได้จากการทดลองด้วยการใช้ T-test, Sign Test และ Wilcoxon signed-rank test จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ไม่ว่าจะเป็นกรณีที่กำหนดให้ขนาดตัวอย่างและระดับสัดส่วนของหน่วยตัวอย่างที่มีค่าสูงมากคงที่ แต่ให้ค่า μ เปลี่ยนแปลงในลักษณะเพิ่มขึ้น หรือกรณีที่กำหนดให้ค่าเฉลี่ยที่แท้จริงของประชากรและระดับสัดส่วนของค่าสูงมากคงที่ที่ระดับหนึ่ง แต่ใช้ตัวอย่างขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ หรือกรณีที่กำหนดให้ขนาดตัวอย่างและค่าเฉลี่ยของประชากรคงที่ แต่เพิ่มระดับสัดส่วนของหน่วยตัวอย่างที่มีค่าสูงมากจาก 0 % เป็น 1-10 %, 11-20%, 25-50%

คุณสมบัติของ T - test, Sign Test และ Wilcoxon signed - rank test ในกรณีที่พบค่าสูงมากเทียบกับกรณีไม่พบค่าสูงมาก โดยพิจารณาจากอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าอัตราส่วนระหว่างความถี่สัมพัทธ์ของการปฏิเสธ H_0 เมื่อพบค่าสูงมากในตัวอย่างเทียบกับความถี่สัมพัทธ์ของการปฏิเสธ H_0 เมื่อไม่พบค่าสูงมากของแต่ละตัวแบบทดสอบ ซึ่งเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ RE_1 ผลปรากฏว่า ทุกระดับนัยสำคัญที่พิจารณาเมื่อกำหนดให้ขนาดตัวอย่างและระดับสัดส่วนของหน่วยตัวอย่างที่เป็นค่าสูงมากคงที่แล้ว อัตราการเปลี่ยนแปลงของ RE_1 จะมีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อ μ มีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนเมื่อกำหนดให้ค่าเฉลี่ยที่แท้จริงของประชากรอยู่ในช่วงค่าน้อยๆ และระดับสัดส่วนของหน่วยตัวอย่างที่เป็นค่าสูงมากคงที่ RE_1 ก็จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อใช้ตัวอย่างขนาดใหญ่ขึ้น แต่ไม่เกิน 15 เพราะหากตัวอย่างมีขนาดมากกว่า 15 RE_1 จะลดลงเรื่อยๆ เช่นเดียวกัน ถ้ากำหนดให้ขนาดตัวอย่างและค่าเฉลี่ยของประชากรคงที่ แล้วเพิ่มระดับสัดส่วนของหน่วยตัวอย่างที่เป็นค่าสูงมากจาก 1-10 % เป็น 11-20%, 25-50 % ผลพบว่า ค่า RE_1 จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทั้งนี้อัตราการเปลี่ยนแปลงนี้จะลดลงถ้าตัวอย่างมีขนาด 30 และค่าเฉลี่ยของประชากร (μ) มีค่ามากขึ้น

ส่วนคุณสมบัติของ 2β trimmed T test พบว่า สำหรับขนาดตัวอย่างและระดับสัดส่วนของหน่วยตัวอย่างที่เป็นค่าสูงมาก ณ ค่าหนึ่งๆ ความถี่สัมพัทธ์ของการปฏิเสธ H_0 ที่ได้จากการทดลองเมื่อใช้แบบทดสอบนี้ จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อค่า μ เพิ่มขึ้น หรือ ณ ค่าเฉลี่ยที่แท้จริงของประชากรมากกว่า 0.5 หากกำหนดระดับสัดส่วนของหน่วยตัวอย่างที่เป็นค่าสูงมากคงที่ที่ระดับหนึ่งซึ่งมากกว่า 10% ความถี่สัมพัทธ์ของการปฏิเสธ H_0 ก็จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หากใช้ขนาดตัวอย่างใหญ่ขึ้น สำหรับสถานะการณ์เมื่อ $\mu < 0.5$ หรือระดับอื่นๆ ของสัดส่วนค่าสูงมากที่พบในตัวอย่าง คุณสมบัติของ 2β trimmed T test ไม่ชัดเจน ในทำนองเดียวกัน หากกำหนดให้ขนาดตัวอย่างและค่าเฉลี่ยของประชากรคงที่แล้วเพิ่มระดับสัดส่วนของหน่วยตัวอย่างที่เป็นค่าสูงมากจาก 1-10 % เป็น 11-20%, 25-50 % ผลพบว่า ความถี่สัมพัทธ์ของการปฏิเสธ H_0 จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อสัดส่วนของค่าสูงมากเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มถึง ณ ระดับหนึ่ง ความถี่สัมพัทธ์ของการปฏิเสธ H_0 จะมีค่าลดลง

นอกจากนี้ คุณสมบัติของ 2β trimmed T test ในกรณีที่พบค่าสูงมากในตัวอย่างเทียบกับกรณีที่ ไม่พบค่าสูงมาก ปรากฏในลักษณะที่ว่า เมื่อกำหนดให้ขนาดตัวอย่างและระดับของสัดส่วนค่าสังเกตที่มีค่า

ส่วนรายละเอียดอื่นๆ ดังในตารางที่ 1 ถึงตารางที่ 3

ร้อยละของค่าสูงมาก ที่พบในตัวอย่าง		μ^*							
		0	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0	1.5	2.0
0 %	S	0.05	0.09	0.19	0.35	0.55	0.80	0.98	1.00
	W	0.04	0.08	0.18	0.36	0.60	0.87	0.99	1.00
	T	0.05	0.06	0.14	0.29	0.51	0.81	0.99	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.001	0.002	0.01	0.06	0.17	0.48	0.89	0.93
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.001	0.002	0.02	0.06	0.16	0.42	0.66	0.70
1-10 %	S	0.09	0.13	0.26	0.43	0.62	0.84	0.98	1.00
	W	0.08	0.13	0.28	0.49	0.70	0.92	0.99	1.00
	T	0.06	0.07	0.17	0.35	0.56	0.84	0.99	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.004	0.01	0.05	0.14	0.32	0.63	0.81	0.92
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.004	0.01	0.04	0.12	0.26	0.48	0.57	0.77
11-20 %	S	0.14	0.20	0.35	0.52	0.70	0.88	0.99	1.00
	W	0.14	0.21	0.40	0.62	0.81	0.95	1.00	1.00
	T	0.08	0.13	0.27	0.48	0.69	0.90	0.99	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.03	0.05	0.14	0.22	0.41	0.52	0.65	0.94
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.02	0.04	0.10	0.21	0.33	0.43	0.54	0.87
21-30 %	S	0.22	0.29	0.46	0.63	0.78	0.92	0.99	1.00
	W	0.26	0.36	0.57	0.76	0.89	0.98	1.00	1.00
	T	0.18	0.25	0.45	0.66	0.83	0.96	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.08	0.13	0.22	0.31	0.35	0.42	0.79	0.99
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.06	0.08	0.15	0.21	0.24	0.30	0.69	0.96

• ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างแบบทดสอบ

ในการวิจัยครั้งนี้ การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบบทดสอบทั้งสี่จะแยกพิจารณาเป็น 2 กรณี คือ

1. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่าง T Test กับแบบทดสอบอื่นๆ
2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างแบบทดสอบที่มีความแข็งแกร่งกับแบบทดสอบอื่นๆ ซึ่งผลการศึกษทั้งสองกรณีปรากฏดังนี้

1. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่าง T test กับแบบทดสอบอื่นๆ

พบว่า ในกรณีที่พบค่าสูงมากในตัวอย่างที่ระดับขนาดตัวอย่างน้อย กล่าวคือ ประมาณ 7-10 พบว่า Sign - test และ Wilcoxon signed - rank test มีโอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักสูงกว่า T- test ทั้งนี้ ขนาดความแตกต่างนี้จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อ μ เพิ่มขึ้นในช่วงระหว่าง 0.1 - 0.50 แต่ถ้าค่า μ เพิ่มขึ้นในช่วงระหว่าง 0.50 - 2.0 ขนาดความแตกต่างนี้จะมีค่าลดลงเรื่อยๆ จนถึงระดับที่โอกาสจะปฏิเสธสมมติฐานหลักไม่ต่างไปจาก T- test และหากตัวอย่างมีขนาดใหญ่ คือ ประมาณ 15 ขึ้นไป พบว่า Sign - test และ Wilcoxon signed - rank test มีโอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักน้อยกว่า T- test และจะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับที่โอกาสไม่ต่างจาก T- test เมื่อ μ มีค่าเพิ่มขึ้น โดย Wilcoxon signed - rank test มีโอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักใกล้เคียงกับ T- test มากกว่า Sign - test

ส่วนประสิทธิภาพของ 2β trimmed T test เมื่อเทียบกับ T- test พบว่า 2β trimmed T test มีโอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักน้อยกว่า T test นอกจากนี้ เมื่อกำหนดให้ขนาดตัวอย่างคงที่ หาก μ มีค่าเพิ่มขึ้น โอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักเมื่อใช้ 2β trimmed T test จะเพิ่มขึ้นตามแต่ยังมีโอกาสน้อยกว่า T test และหากขนาดตัวอย่างที่ใช้เพิ่มขึ้น โอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักเมื่อใช้ 2β trimmed T test จะน้อยกว่า T test ลงเรื่อยๆ เมื่อ μ มีค่าอยู่ระหว่าง $0 < \mu < 1.0$

สำหรับกรณีเมื่อพบค่าสูงมากในตัวอย่าง พบว่าที่ระดับขนาดตัวอย่างน้อย กล่าวคือ ประมาณ 7-10 พบว่า Sign - test และ Wilcoxon signed - rank test มีโอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักสูงกว่า T- test โดยความแตกต่างนี้จะมีค่าลดลงเรื่อยๆ ถึงระดับไม่แตกต่างกัน เมื่อ μ มีค่าเพิ่มขึ้น แต่ที่ระดับขนาดตัวอย่างประมาณ 15 ขึ้นไป Sign - test และ Wilcoxon signed - rank test มีโอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักน้อยกว่า T- test และจะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับที่ไม่ต่างจาก T- test เมื่อ μ มีค่าเพิ่มขึ้น และเมื่อค่าเฉลี่ยของประชากรมีค่ามากและระดับขนาดตัวอย่างประมาณ 15 ขึ้นไป พบว่า ทั้ง Sign - test และ Wilcoxon signed - rank test มีโอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักมากกว่า T- test ขึ้นเรื่อยๆ เมื่อพบค่าสูงมากมากขึ้น แต่ที่ขนาดตัวอย่างน้อย ลักษณะของผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างแบบทดสอบทั้งสามไม่ชัดเจน

ส่วนผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ 2β trimmed T test เมื่อเทียบกับ T- test พบว่า 2β trimmed T test มีโอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักน้อยกว่าใช้ T test เสมอ และอยู่ในลักษณะดังนี้

1. เมื่อกำหนดให้ค่า n , β และระดับสัดส่วนค่าสูงมากที่พบในตัวอย่างคงที่ ถ้า μ มีค่าเพิ่มขึ้น อัตราส่วนของการปฏิเสธสมมติฐานหลักเมื่อใช้ 2β trimmed T test เทียบกับเมื่อใช้ T- test จะเพิ่มขึ้นด้วย

4. เมื่อกำหนด ค่า n , μ และระดับสัดส่วนค่าสูงมากที่พบในตัวอย่างคงที่ ถ้า β มีค่าเพิ่มขึ้น อัตราส่วนของการปฏิเสธสมมติฐานหลักเมื่อใช้ 2β trimmed T test เทียบกับเมื่อใช้ T- test จะมีค่าลดลง

ตารางที่ 2 ความดีสัมพัทธ์ของการปฏิเสธสมมติฐานหลักที่ได้จากการทดลองเมื่อใช้แบบทดสอบ T, S, W และ $T_{n, \beta}$ จำแนกตามร้อยละของค่าสูงมากที่พบในตัวอย่าง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และขนาดตัวอย่างเท่ากับ 20 (กำหนดให้ $H_0: \mu = 0$ เมื่อแท้จริงแล้วค่าเฉลี่ยของประชากรเท่ากับ (μ^*))

ร้อยละของค่าสูงมาก ที่พบในตัวอย่าง		μ^*							
		0	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0	1.5	2.0
0 %	S	0.06	0.11	0.30	0.57	0.81	0.97	1.00	1.00
	W	0.05	0.11	0.35	0.67	0.90	0.99	1.00	1.00
	T	0.05	0.13	0.37	0.70	0.92	1.00	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.00	0.00	0.001	0.02	0.10	0.51	0.99	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.00	0.00	0.001	0.02	0.11	0.50	0.98	1.00
1-10 %	S	0.12	0.20	0.43	0.69	0.88	0.98	1.00	1.00
	W	0.14	0.25	0.55	0.83	0.96	1.00	1.00	1.00
	T	0.09	0.29	0.62	0.88	0.98	1.00	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.00	0.001	0.01	0.09	0.31	0.78	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.00	0.001	0.01	0.08	0.28	0.74	0.99	1.00
11-20 %	S	0.23	0.34	0.58	0.80	0.93	0.99	1.00	1.00
	W	0.33	0.48	0.77	0.94	0.99	1.00	1.00	1.00
	T	0.26	0.61	0.87	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.01	0.02	0.12	0.38	0.71	0.97	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.01	0.02	0.09	0.29	0.60	0.92	0.98	1.00
21-30 %	S	0.40	0.48	0.77	0.94	0.99	1.00	1.00	1.00
	W	0.62	0.76	0.93	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00
	T	0.57	0.88	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.10	0.20	0.52	0.81	0.96	0.99	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.07	0.15	0.39	0.69	0.85	0.88	0.95	1.00

2. ผลการเปรียบเทียบระหว่างแบบทดสอบที่มีความแข็งแกร่งกับแบบทดสอบอื่นๆ

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบบทดสอบในกรณีนี้ พบว่า เมื่อ T test เป็นแบบทดสอบที่มีความแข็งแกร่ง ผลการเปรียบเทียบยังคงเหมือนกับกรณีแรก แต่หากแบบทดสอบที่มีความแข็งแกร่งไม่ใช่ T test แต่เป็น 2β trimmed T test พบว่า ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพจะเปลี่ยนไป ตัวอย่างเช่น ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 , $n = 10$ และสัดส่วนของค่าสูงมากพบอยู่ในช่วง 11-20 % แบบทดสอบที่มีความแข็งแกร่งคือ 2β trimmed T test (เมื่อ $\beta = 0.10$) โดย T test, Wilcoxon signed - rank test หรือ Sign Test มีโอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักสูงกว่า 2β trimmed T test (แสดงว่า โอกาสปฏิเสธสมมติฐานหลักมีค่าเกินความเป็นจริง หรือการมีค่าสูงมากในตัวอย่างส่งผลกระทบต่อโอกาสของการปฏิเสธสมมติฐานหลักทำให้มีโอกาสเกิดขึ้นมากกว่าความเป็นจริง) ทั้งนี้เรียงลำดับแบบทดสอบที่ได้รับผลกระทบจากมากที่สุดไปน้อยสุดได้ดังนี้ Wilcoxon signed - rank test, Sign Test , T Test และ 2β trimmed T test ตามลำดับ และโอกาสในการปฏิเสธสมมติฐานหลักที่เกินความเป็นจริงจะลดลงหาก μ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งเมื่อ $\mu = 2.0$ โอกาสในการปฏิเสธสมมติฐานหลักเมื่อใช้แบบทดสอบทั้งสี่ไม่แตกต่างกัน ในทางตรงกันข้าม โอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักยิ่งจะเกินความเป็นจริงมากขึ้นถ้าใช้ตัวอย่างขนาดใหญ่ขึ้น ส่วน 2β trimmed T test (เมื่อ $\beta = 0.20$) มีโอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักน้อยกว่า 2β trimmed T test (เมื่อ $\beta = 0.10$) แสดงว่า 2β trimmed T test (เมื่อ $\beta = 0.20$) มีโอกาสที่จะตัดสินใจปฏิเสธสมมติฐานน้อยกว่าความเป็นจริงมากกว่า 2β trimmed T test (เมื่อ $\beta = 0.10$) โดยอาจเป็นผลจากการตัดค่าสังเกตออกมากเกินไป

5. สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยที่กล่าวมาแล้วแสดงว่า การมีค่าสูงมากในตัวอย่างจะส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบสมมติฐานค่าเฉลี่ยเมื่อใช้แบบทดสอบทั้งสี่ โดยแบบทดสอบที่ได้รับผลกระทบมากที่สุดคือ Wilcoxon signed - rank test รองลงมา ได้แก่ คือ Sign Test, T Test และ 2β trimmed T test ตามลำดับ ทั้งนี้ผลกระทบจะรุนแรงยิ่งขึ้นหากสัดส่วนของค่าสูงมากเพิ่มขึ้น ดังนั้น ผู้วิจัยใคร่สรุปข้อเสนอแนะการใช้แบบทดสอบสำหรับทดสอบค่าเฉลี่ยของประชากรปกติ 1 ประชากรดังนี้ กรณีที่ไม่พบค่าสูงมาก ถ้าใช้ขนาดตัวอย่างน้อย กว่าหรือเท่ากับ 10 ควรใช้ Wilcoxon signed - rank test แต่ถ้าใช้ขนาดตัวอย่างมากกว่า 10 ควรใช้ T Test สำหรับกรณีที่พบค่าสูงมาก หากพบอยู่ในช่วง 1-10 % และใช้ขนาดตัวอย่างน้อยควรใช้ T test ส่วนสถานการณ์อื่นๆ ควรใช้ 2β trimmed T test ทั้งนี้ β จะมีค่าเป็นเท่าไรนั้นอยู่กับขนาดตัวอย่างและระดับสัดส่วนของค่าสูงมากที่พบ รวมทั้งระดับนัยสำคัญ ตัวอย่างเช่น ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อใช้ขนาดตัวอย่างเท่ากับ 10 และพบค่าสูงมากในช่วง 11-20 % ควรใช้ 2β trimmed T test โดย $\beta = 0.10$ แต่ถ้า พบค่าสูงมากอยู่ในช่วง 21-30 % ควรใช้ 2β trimmed T test โดย $\beta = 0.20$ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สถานการณ์นี้ยังไม่มียกข้อยติ เนื่องจากมีการวิจัยศึกษาปรับปรุงตัวสถิติอยู่เรื่อยๆ เพื่อให้ได้แบบทดสอบที่ให้ผลสรุปคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด

ตารางที่ 3 ความถี่สัมพัทธ์ของการปฏิเสธสมมติฐานหลักที่ได้จากการทดลองเมื่อใช้แบบทดสอบ T, S, W และ $T_{n,2\beta}$ จำแนกตามร้อยละของค่าสูงมากที่พบในตัวอย่าง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และขนาดตัวอย่างเท่ากับ 30 (กำหนดให้ $H_0 : \mu = 0$ เมื่อแท้จริงแล้วค่าเฉลี่ยของประชากรเท่ากับ (μ^*))

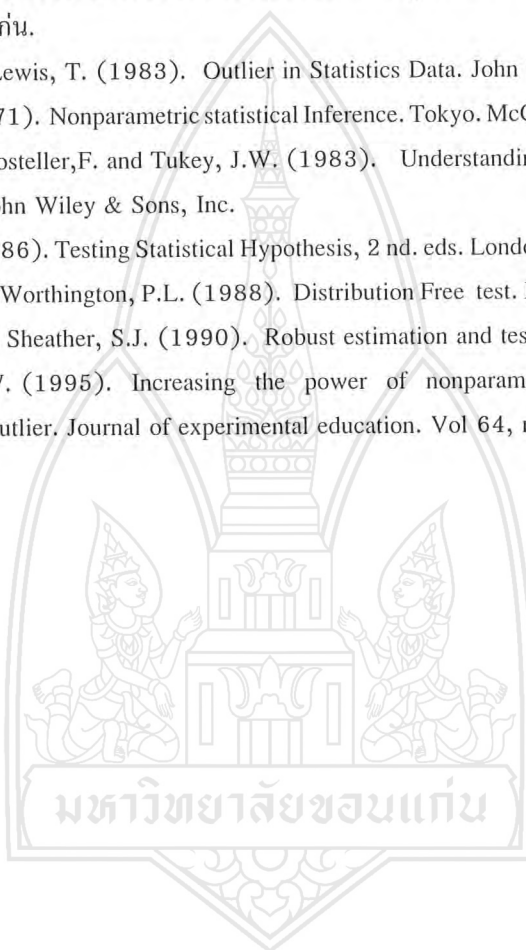
ร้อยละของค่าสูงมาก ที่พบในตัวอย่าง		μ^*							
		0	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0	1.5	2.0
0 %	S	0.05	0.11	0.36	0.69	0.92	1.00	1.00	1.00
	W	0.05	0.13	0.46	0.83	0.98	1.00	1.00	1.00
	T	0.05	0.15	0.49	0.85	0.98	1.00	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.00	0.00	0.00	0.003	0.06	0.51	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.00	0.00	0.00	0.01	0.06	0.50	0.99	1.00
1-10 %	S	0.13	0.13	0.53	0.81	0.96	1.00	1.00	1.00
	W	0.18	0.18	0.73	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00
	T	0.13	0.24	0.82	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.000	0.000	0.003	0.05	0.27	0.83	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.000	0.000	0.003	0.04	0.24	0.79	1.00	1.00
11-20 %	S	0.27	0.27	0.71	0.91	0.98	1.00	1.00	1.00
	W	0.47	0.47	0.70	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00
	T	0.41	0.64	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.001	0.005	0.08	0.36	0.74	0.99	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.001	0.005	0.05	0.26	0.62	0.96	1.00	1.00
21-30 %	S	0.49	0.49	0.86	0.97	0.99	1.00	1.00	1.00
	W	0.83	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	T	0.84	0.94	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.10)$	0.06	0.16	0.52	0.86	0.98	1.00	1.00	1.00
	$T_{n,2\beta} (\beta = 0.20)$	0.04	0.10	0.39	0.75	0.95	1.00	1.00	1.00

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. อโนทัย ตริวานิช (2529). การประมาณค่ารวมประชากรจากตัวอย่างอย่างง่ายที่มีบางหน่วยมีค่าสูงมาก โดยใช้ตัวประมาณความถดถอย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาสถิติ. บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. อโนทัย ตริวานิช และชัชวาลย์ เรืองประพันธ์ (2543). การศึกษาประสิทธิภาพของแบบทดสอบค่าเฉลี่ยประชากรปกติหนึ่งประชากร เมื่อบางหน่วยตัวอย่างมีค่าสูงมาก. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
3. Barnett, V. and Lewis, T. (1983). Outlier in Statistics Data. John Wiley & Sons.
4. Gibbon, J.D. (1971). Nonparametric statistical Inference. Tokyo. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd.
5. Hoaglin, D.C. Mosteller, F. and Tukey, J.W. (1983). Understanding Robust and Exploratory Data Analysis. John Wiley & Sons, Inc.
6. Lehman, E.L. (1986). Testing Statistical Hypothesis, 2 nd. eds. London: John Wiley & Sons, Inc.
7. Neava, H.R. and Worthington, P.L. (1988). Distribution Free test. London. Urwin Hyman Ltd.
8. Staudte, R.G. and Sheather, S.J. (1990). Robust estimation and testing. John Wiley, Inc.
9. Zimmerman, D.W. (1995). Increasing the power of nonparametric tests by detecting and downweighting outlier. Journal of experimental education. Vol 64, n1 p 71-78.



การดูดซับเมธิลีนบลูด้วยถ่านกัมมันต์ เกาลิน

ถ่านแกลบ และถ่านแกลบเผา

Adsorption of methylene blue by activated charcoal

kaolin rice husk ash and backed rice husk ash

รศ.รัตนา มหาชัย*

บทคัดย่อ

การศึกษาพฤติกรรมการดูดซับสารละลายเมธิลีนบลูบนวัสดุดูดซับถ่านกัมมันต์ เกาลิน ถ่านแกลบ และถ่านแกลบเผา ภาวะการทดลองที่ศึกษาได้แก่ เวลาที่ถึงสมดุลแบบแช่ มีค่า 240 5 120 และ 240 นาที อุณหภูมิห้อง (30°C) ตัวทำละลายน้ำ ผลการศึกษาจากสเปกตรัมรีแฟล็กแตนซ์ และไออาร์และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ได้ข้อสรุปว่า การดูดซับบนวัสดุถ่านกัมมันต์ ถ่านแกลบ และถ่านแกลบเผา เป็นแบบกายภาพให้ไอโซเทอร์มชนิดแลงเมียร์แบบ ชั้นสาม ชั้นเดียว และชั้นเดียว ตามลำดับ และบนวัสดุเกาลินเป็นแบบเคมี ให้ไอโซเทอร์มชนิดแลงเมียร์แบบชั้นเดียว ปริมาณการดูดซับมีค่าเรียงลำดับได้ดังนี้ 0.43, 0.05, 0.01 และ 0.15 กรัมต่อกรัมวัสดุ หาพื้นที่ผิวจำเพาะของวัสดุต่างๆ มีค่า 272.03, 29.56, 149.16 และ 219.15 ตารางเมตรต่อกรัม ตามลำดับ

Abstract

The study of adsorption behavior methylene blue have been used to examine as adsorbent activated charcoal, kaolin, rice husk ash and backed rice husk ash. Initially, adsorption conditions were studied for each adsorption pair in order to fine appropriate conditions, for example, time required for equilibrium 240, 5, 120 and 240 minutes, temperature 30°C and in aqueous solution for batch method. The reflectance spectra, IR spectra and electron microscope photograph were used for analysis the structure of each adsorbate pair. The overall results indicated that : adsorption of methylene blue on activated charcoal, rice husk ash and backed rice husk ash were physical adsorption with Langmuir adsorption isotherm type III, I and I respectively. But it showed the chemical adsorption with Langmuir adsorption isotherm type I on kaolin. The quality of adsorption were 0.43, 0.05, 0.01 and 0.15 g/g. The specific surface area of those adsorbents were analyzed and found that 272.03, 29.56, 146.16 and 219.15 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ respectively.

* ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1. บทนำ

1.1 หลักการและทฤษฎีการดูดซับ

การดูดซับ (Adsorption) คือ กระบวนการที่เกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส พื้นที่ผิวของสารอาจเป็นระหว่างของแข็งกับของเหลว สารที่พื้นผิวเกิดการดูดซับขึ้นเรียกว่า ตัวดูดซับ (Adsorbent) ส่วนสารที่ถูกดูดซับเรียกว่า ตัวถูกดูดซับ (Adsorbate) พฤติกรรมของการดูดซับระหว่างตัวดูดซับกับตัวถูกดูดซับที่พบมาก ได้แก่ การดูดซับกายภาพ (Physical Adsorption) และการดูดซับเคมี (Chemical Adsorption)

แอตซอร์พชันไอโซเทอร์ม (Adsorption Isotherm) คือ กราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่ถูกดูดซับกับความเข้มข้นของสาร ณ จุดสมดุลที่อุณหภูมิหนึ่ง ไกลส์และคณะ ได้จำแนกรูปร่างไอโซเทอร์ม 4 ชนิด ได้แก่ ชนิดแอล (Langmuir) ชนิดเอช (High Affinity) ชนิดซี (Constant Partition) และชนิดเอส (Strong Solute - Solute Attraction) ในแต่ละชนิดยังมีกลุ่มย่อย 1 2 3 4 แบบจำลองของแลงเมียร์ (Langmuir Model) ศึกษาการดูดซับโมเลกุลของกาซลงบนตัวดูดซับของแข็งเป็นการดูดซับแบบชั้นเดียวเขียนสมการเส้นตรง

$$\frac{1}{M} = \frac{1}{M_{\max}} - \frac{1}{B M_{\max} C} \quad \dots\dots\dots(1)$$

แบบจำลองบูเรเนาว์ เอมเมตต์และเลทเลอร์ (BET Model) ได้ปรับปรุงแบบจำลองของแลงเมียร์ให้ครอบคลุมพฤติกรรมดูดซับแบบหลายชั้น สมการเส้นตรง

$$\frac{C}{M (C_s - C)} = \frac{1}{B M_{\max}} + \frac{B - 1}{B M_{\max}} \frac{C}{C_s} \quad \dots\dots\dots(2)$$

ในการคำนวณหาพื้นที่ผิวจำเพาะของวัสดุดูดซับ ทำโดยนำข้อมูลจากแอตซอร์พชันไอโซเทอร์มมาพลอตกราฟระหว่าง $\frac{1}{M}$ กับ $\frac{1}{C_s}$ (แบบแลงเมียร์) หรือ $\frac{C}{M (C_s - C)}$ กับ $\frac{C}{C_s}$ (แบบ BET) จะได้ความชันแล้วหา $M_{\max}$ ได้นำมาคำนวณในสูตร $S = M_{\max} N_s/n$

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไกลน์ และคณะ⁽¹⁾ ได้ศึกษาไอโซเทอร์มของวัสดุดูดซับอะลิมินากราฟต์และซิลิกากับสีฟาราโนโตรฟีนอล ริชาร์ดและโปป⁽²⁾ ได้ศึกษาไอโซเทอร์มระหว่างเมธิลีนบลูบนวัสดุซิลิกาเอ็กซ์บรินาและมาตัสติส⁽³⁾ ได้ศึกษาการดูดซับเมธิลีนบลู คริสตัลไวโอเลต บนวัสดุดูดซับไพเรกซ์ และผงแทนทาลัมออกไซด์ ไกลส์และซิลวา⁽⁴⁾ ได้ทำการหาพื้นที่ผิวจำเพาะของถ่านกระดูก ซิลิกา อะลูมินา และถ่านกัมมันต์ด้วยสารละลายสีต่างๆ วานเดอฮัลและลิวติมา⁽⁵⁾ ได้ทำการหาพื้นที่ผิวจำเพาะของวัสดุดูดซับซิลเวอร์ไอโอไดต์ เฮมาไทต์ และซิลิกา ด้วยกาซและสารละลายสี ไกลส์และซิลวา⁽⁶⁾ ได้ศึกษาการดูดซับสีแคดไอออนและแอนไอออนด้วยวัสดุอะลูมินา ซิลิกา ถ่าน กระดูก ปรีดา พิมพ์ขาวขำ⁽⁷⁾ ได้ใช้การดูดซับสีเมธิลีนบลูในการหาพื้นที่ผิวของคอลลอยด์ในดิน รัตนา มหาชัย และคณะ⁽⁸⁾ ได้ศึกษาหาวัสดุธรรมชาติเพื่อหาวัสดุกรองน้ำกร่อยและสนิมเหล็กเจือปน รัตนา มหาชัย⁽⁹⁾ ศึกษาวัสดุธรรมชาติเพื่อดูดซับโลหะหนักที่มีพิษในน้ำเสีย

2. วิธีการทดลองและผลการทดลอง

2.1 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของวัสดุดูดซับและตัวถูกดูดซับ

2.1.1 วัสดุดูดซับ วัสดุดูดซับที่ศึกษามี 4 ชนิด ได้แก่

ชื่อ	สูตร	เกรด	บริษัท	หมายเหตุ
ถ่านกัมมันต์	-	AR	Fluka	0.20 พีช
เกาลิน	$\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	เมธากรูปเทรตติ้ง	-
ถ่านแกลบ	-	-	-	เก็บจากโรงสีข้าว
ถ่านแกลบเผา	-	-	-	เก็บจากโรงสีข้าวแล้วนำมาเผา 1000°C

2.1.2 ตัวถูกดูดซับ

ชื่อ	สูตร	เกรด	บริษัท	หมายเหตุ
เมธิลีนบลู	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NSCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	AR	Merck	เป็นสารมาตรฐานหาพื้นที่ผิวของรูพรุนขนาดกลาง

ได้ศึกษาสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของตัวถูกดูดซับเมธิลีนบลู ดังนี้

1) การหาความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืน พบว่า สารละลายเมธิลีนบลู ดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นสูงสุดที่ 662 นาโนเมตร

2) การสร้างกราฟมาตรฐาน นำสารละลายมาตรฐานเมธิลีนบลูที่มีความเข้มข้นต่างๆ วัดค่าแอมซอร์ปแทนซ์ (A) ที่ความยาวคลื่น 662 นาโนเมตร พบว่า กราฟมาตรฐานพลอตระหว่าง A กับ C กราฟเป็นเส้นตรงช่วง 0.2-4.0 ppm

3) การศึกษาผลของพีเอชสารละลายต่อความยาวคลื่นการดูดกลืน เนื่องจากว่าเมื่อนำสารละลายเมธิลีนบลูแช่ในวัสดุต่างๆ พบว่า พีเอช สารละลายอาจเปลี่ยน ดังนั้น จึงทำการศึกษาโดยการเปลี่ยนค่าพีเอชสารละลายที่ 4.00, 6.64, 7.00 และ 10.00 แล้ววัดค่าความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืน พบว่า ค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนเท่าเดิมคือ 662 นาโนเมตร

2.2 การศึกษาการดูดซับเมธิลีนบลูด้วยวัสดุดูดซับ

เมื่อนำสารละลายเมธิลีนบลูมาแช่ในวัสดุดูดซับต่างๆ ได้มีการตรวจสอบพี-เอชหลังแช่ และความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนผลการทดลองดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าพีเอช สารละลายหลังแช่ และ $\lambda_{\max}$

วัสดุดูดซับ	พีเอชหลังแช่	$\lambda_{\max}$ (nm)
ถ่านกัมมันต์	7.15	662
เกาลิน	6.88	662
ถ่านแกลบ	7.09	662
ถ่านแกลบเผา	7.11	662

* พีเอช สารละลายเมธิลีนบลูก่อนแช่มีค่า 6.44

ในการศึกษาการดูดซับต้องหาภาวะการทดลองที่เหมาะสมดังนี้

2.2.1 การหาช่วงความเข้มข้นกับน้ำหนักของวัสดุ

วิธีการทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักวัสดุแต่ละชนิดหนัก 0.0500 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่
2. ปิเปตสารละลายเมธิลีนบลู เข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 20 cm³ ลงในวัสดุดูดซับข้อ 1
3. เขย่าสารละลายแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สังเกตของสีเมธิลีนบลูที่หายไป ผลการทดลองความเข้มข้นที่เหมาะสมดังนี้ 700, 50, 100 และ 500 ppm ในวัสดุถ่านกัมมันต์เกาลิน ถ่านแกลบ และถ่านแกลบเผา

2.2.2 การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสม ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.2.1 แต่เปลี่ยนแปลงเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 1-480 นาที ผลการทดลองพบว่า เวลาที่เหมาะสม 5, 120 และ 240 นาที สำหรับถ่านกัมมันต์ เกาลิน ถ่านแกลบ และถ่านแกลบเผา

2.2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิ ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.2.1 โดยใช้เวลาตามข้อ 2.2.2 แล้วทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังนี้ 26 30 35 และ 40 °C ผลการทดลองพบว่า ปริมาณการดูดซับเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามอุณหภูมิ แสดงว่าขบวนการดูดซับที่เป็นแบบดูดความร้อนเกือบทุกวัสดุ

2.2.4 การศึกษาผลของตัวทำละลาย ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.2.1 และใช้ข้อมูลที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.2 และ 2.2.3 เปลี่ยนตัวทำละลายจากน้ำเป็นเอทานอล ผลการทดลองพบว่า ความยาวคลื่นของการดูดกลืนคลื่นแสงของสีเมธิลีนบลูในตัวทำละลายเอทานอลมีค่า 654 นาโนเมตร และปริมาณการดูดซับลดลงประมาณ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายน้ำในทุกวัสดุ

2.3 การศึกษาเพื่อสร้างไอโซเทอร์มของเมธิลีนบลูในวัสดุต่างๆ

จากการศึกษาเพื่อหาภาวะการทดลองที่เหมาะสมเพื่อนำมาศึกษาการสร้างไอโซเทอร์ม ข้อมูลที่ใช้ดังนี้

วัสดุดูดซับ	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	อุณหภูมิ °C	ตัวทำละลาย	$\lambda_{\max}$ (nm)
ถ่านกัมมันต์	0.0500	240	30	น้ำ	662
เกลลิน	0.0500	5	30	น้ำ	662
ถ่านแกลบ	0.0500	120	30	น้ำ	662
ถ่านแกลบเผา	0.0500	240	30	น้ำ	662

วิธีการทดลอง

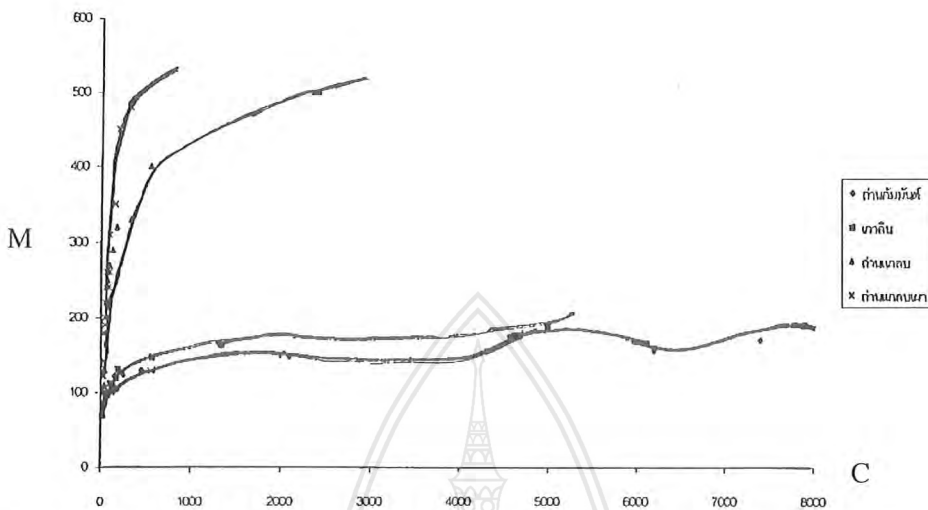
ทำเหมือนข้อ 2.2.1 และใช้ภาวะการทดลองดังตารางข้างต้นเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายเมธิลีนบลู 500-2000, 40-400, 20-400 และ 310-2000 ppm ปริมาตร 20 cm³ ลงในวัสดุดูดซับถ่านกัมมันต์ เกลลิน ถ่านแกลบ และถ่านแกลบเผา ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลประกอบการสร้างไอโซเทอร์มของเมธิลีนบลูในวัสดุดูดซับแต่ละชนิด

C = ความเข้มข้นที่สมดุลเป็นโมลาร์ M = จำนวนโมลที่ถูกดูดซับต่อกรัมวัสดุ

ถ่านกัมมันต์		เกลลิน		ถ่านแกลบ		ถ่านแกลบเผา	
C	M	C	M	C	M	C	M
13.39	5.84	2	5.27	4.01	1.98	315.9	2.05
16.06	6.36	7.36	6.13	18.07	2.48	518.7	2.2
22.76	6.44	17.4	6.8	32.12	2.99	637.2	2.8
47.52	6.77	50.87	7.6	56.22	3.1	912.9	3.19
220.21	7.69	58.23	8.38	75.63	3.4	914.3	3.83
392.23	8.07	99.06	8.91	95.71	3.66	1119.1	4.09
630.52	8.19	121.15	10.4	117.8	3.85	1452.4	3.82
692.1	9.01	141.9	10.3	131.19	4.39	1657.2	4.08
710.84	10	180.72	10.9	154.61	4.52	1850	4.38
999.33	9.91	216.19	11.7	184.73	5.46	2007	4.82
1220.21	10.11	242.97	11.7	214.85	7.46	2174	5.22
1438.42	9.78	297.85	12.2	267.06	8.59	2390	5.42
1497.32	9.97	397.59	13.5	292.5	9.71	2668	7.53
1566.27	10.87	445.78	14.2	246.05	9.71	3066	7.01
1750.34	11.21	568.94	14.7	423.02	9.85	3305	8.19

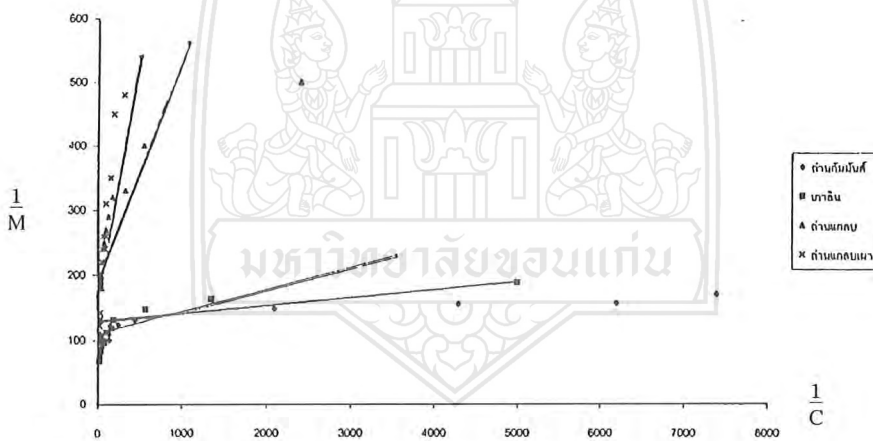
นำข้อมูลที่ได้มาพลอตกราฟระหว่างจำนวนโมลที่ถูกดูดซับต่อกรัมวัสดุกับความเข้มข้นเป็นโมลาร์ที่สมดุล ดังรูป 1 (ก) ในถ่านกัมมันต์ (ข) เกลลิน (ค) ถ่านแกลบ และ (ง) ถ่านแกลบเผา



รูปที่ 1 แสดงแอตซอร์พชันไอโซเทอร์มของสีเมธิลีนบลูบนวัสดุ (ก) กำนังมันต์ (ข) บาลิน (ค) กำนกลบ และ (ง) กำนกลบนา

2.4 การหาพื้นที่ผิวจำเพาะด้วยสีเมธิลีนบลูของวัสดุดูดซับ

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไอโซเทอร์มมาพลอตกราฟระหว่าง $\frac{1}{M}$ กับ $\frac{1}{C}$ โดย M เป็นจำนวนโมลของตัวถูกดูดซับต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนัก และ C เป็นความเข้มข้นสารละลายที่สมดุลเป็นโมลาร์ ดังรูป 2



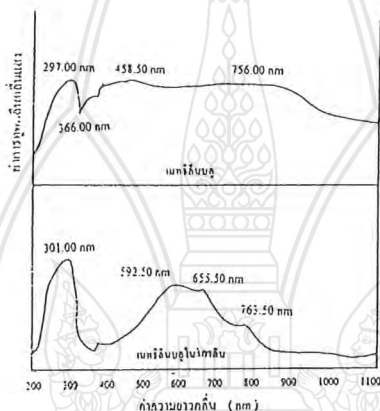
รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{M}$ กับ $\frac{1}{C}$ ของสีเมธิลีนบลู (ก) กำนังมันต์ (ข) บาลิน (ค) กำนกลบ และ (ง) กำนกลบนา

จากรูปได้ค่า $\frac{1}{M_{\max}}$ ในวัสดุต่างๆ เรียงลำดับดังนี้ 1062.3, 9775.8, 1937.1 และ 1318.6 mole/g และหาค่า $M_{\max}$ ได้ 9.41×10^{-4} , 1.02×10^{-4} , 5.16×10^{-4} และ 7.58×10^{-4} ตามลำดับ และแทนค่าลงในสูตร คำนวณค่าพื้นที่ผิวจำเพาะของวัสดุต่างๆ ดังนี้

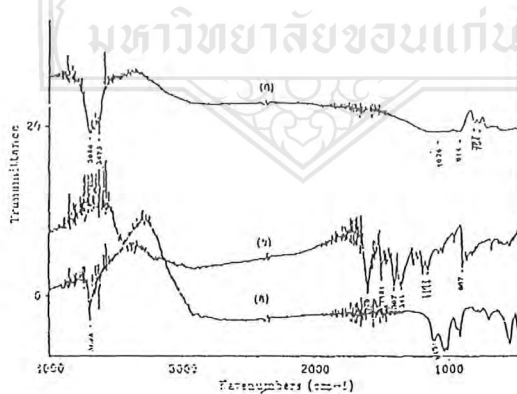
วัสดุดูดซับ	พื้นที่ผิวจำเพาะ m^2/g
ถ่านกัมมันต์	272.03
เกาลิน	29.56
ถ่านแกลบ	149.16
ถ่านแกลบเผา	219.15

2.5 การศึกษาพฤติกรรมการดูดซับของสีเมธิลีนบลูของวัสดุดูดซับ

ศึกษาพฤติกรรมการดูดซับของสีเมธิลีนบลูด้วยเทคนิคอิเล็กตรอนไมโครสโคป แพลคแทนซ์ โตรสโกปี และอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี เปรียบเทียบระหว่างวัสดุ เมธิลีนบลู และเมธิลีนบลูบนวัสดุต่าง ๆ ผลแสดงดังรูป 3 และ 4



รูปที่ 3 แสดงรีแฟลกแตนซ์สเปกตรัมของเกาลินเมธิลีนบลู และเมธิลีนบลูบนเกาลิน



รูปที่ 4 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ (ก) เกาลิน (ข) เมธิลีนบลู และ (ค) เมธิลีนบลูบนเกาลิน

เมื่อบันทึกสเปกตรัมอินฟราเรดสเปกตรัมของเมธิลีนบลูบนวัสดุผ่านกัมมันต์ ถ่านแกลบและถ่านแกลบเผา ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงอาจเนื่องจากวัสดุดูดซับมีสีดำนองแสงหมด ผลการทดลองรูปที่ 3 รีแฟลคแตนซ์สเปกตรัมเมธิลีนบลูบนกาลิน ความยาวคลื่นเมธิลีนบลูเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมการที่ 458.50 และ 756.00 nm เปลี่ยนเป็น 592.50 และ 763.50 nm และมีพีคเพิ่มอีก 1 พีคที่ 655.50 nm ความยาวคลื่นเลื่อนไปที่ยาวขึ้น และรูปที่ 4 สรุปได้ดังนี้

ความถี่ (cm-1)	(พันธะ)		
1076	Si - O - Si	ยืดหด	วัสดุกาลิน
797	Si - H	โค้งงอ	"
914	O - H	"	"
1182	C - C		เมธิลีนบลู
1396	C - N		"
1491	C $\equiv$ C		"
1599	C $\equiv$ N		"
889	C - H	โค้งงอ	"
1182	C - C	ยืดหด	เมธิลีนในกาลิน พีคเพิ่ม

3. สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

ตามวัตถุประสงค์ของงานคือศึกษาไอโซเทอร์มของเมธิลีนบลูในวัสดุดูดซับถ่านกัมมันต์ กาลิน ถ่านแกลบ ถ่านแกลบเผา และหาปริมาณไอโซเทอร์ม พร้อมหาพื้นที่ผิวจำเพาะของวัสดุดูดซับต่าง ๆ

จากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของตัวดูดซับเมธิลีนบลูมีค่าพีเอช 6.44 ความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนคลื่นแสง 662 nm พบว่า เมื่อแช่ลงในวัสดุบางชนิดพีเอชสารละลายเปลี่ยนไปแต่ความยาวคลื่นไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อนำเมธิลีนบลูมาศึกษาการดูดซับในวัสดุต่าง ๆ ภาวะการทดลองของการดูดซับที่เหมาะสม ได้แก่ น้ำหนักวัสดุ ความเข้มข้น เวลาที่ถึงสมดุล อุณหภูมิ และตัวทำละลาย จากน้ำเป็นเอทานอลดังตาราง

วัสดุดูดซับ	ความเข้มข้น ppm	น้ำหนักวัสดุ g	เวลา นาที	อุณหภูมิ °C	ตัวทำละลาย	พีเอช
ถ่านกัมมันต์	500-2000	0.0500	240	30	น้ำ	7.15
กาลิน	40-400	0.0500	5	30	น้ำ	6.88
ถ่านแกลบ	20-400	0.0500	120	30	น้ำ	7.09
ถ่านแกลบเผา	300-2000	0.0500	240	30	น้ำ	7.11

การศึกษาไอโซเทอร์มและพฤติกรรมการดูดซับ

1. การดูดซับของเมธิลีนบลูบนถ่านกัมมันต์ให้ไอโซเทอร์มชนิดแอล (Langmuir Isotherm) มีการดูดซับแบบ 3 ชั้น ในชั้นที่ 1 สารละลายจะอิ่มตัวที่เข้มข้น $630.52 \times 10^{-6} \text{ M}$ หรือถูกดูดซับ 0.36 กรัมต่อกรัมวัสดุ ชั้นที่ 2 ที่ $1000.52 \times 10^{-6} \text{ M}$ หรือ 0.38 กรัมต่อกรัมวัสดุ ชั้นที่ 3 ที่ $1438.42 \times 10^{-6} \text{ M}$ หรือ 0.43 กรัมต่อกรัมวัสดุ ผลการศึกษาจากอินฟราเรดและรีฟเลคแตนซ์สเปกตรัม พบว่า ถ่านกัมมันต์ก่อนและหลังการดูดซับเปรียบเทียบกัน พบว่า ไม่มีพีคเมธิลีนบลูที่ผิวด้านนอกถ่านกัมมันต์ เนื่องจากการดูดซับเป็นแบบกายภาพเป็นแรงดึงดูดอ่อนๆ ระหว่างถ่านกัมมันต์กับเมธิลีนบลู เมื่อปั่นเหวี่ยงในขณะทำการทดลองอาจหลุดออกจากผิว ซึ่งสอดคล้องกับภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นว่าถ่านกัมมันต์มีโครงสร้างเป็นรูพรุนแบบท่อกลวงมีรูพรุนพื้นที่ผิวภายนอกสูงมาก จึงดูดซับได้ดีที่สุดและดูดซับได้หลายชั้น เมื่อทำการหาพื้นที่ผิวจำเพาะของรูพรุนขนาดกลาง (ด้วยเมธิลีนบลู) มีค่า $272.03 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ใกล้เคียงกับที่โกลด์และคณหาไว้มีค่า $289.0 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$

2. การดูดซับเมธิลีนบลูบนเกลินให้ไอโซเทอร์มชนิดแอลแบบชั้นเดียวอิ่มตัวที่สารละลายเข้มข้น $379.59 \times 10^{-6} \text{ M}$ หรือ 0.05 กรัมต่อกรัมวัสดุ ซึ่งการดูดซับมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับพื้นที่ผิวจำเพาะที่หาได้มีค่า $29.56 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงโครงสร้างเกลินเป็นชั้นๆ แผ่นบางๆ ของซิลิกา และอะลูมินามีประจุลบหรือไฮดรอกซิล ทำให้เมื่อเกิดการดูดซับกับสีเมธิลีนบลูเป็นแบบเคมี โดยอาจเกิดขบวนการแลกเปลี่ยนไอออนหรือสร้างพันธะไฮออนิกอ่อนๆ จึงพบการเปลี่ยนแปลงที่ได้พีคที่เกิดขึ้นที่ 592.5 และ 655.5 นา และบางพีคของเมธิลีนบลูหายไปและการจากการทดลอง พบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง

3. การดูดซับเมธิลีนบลูบนถ่านแกลบ และถ่านแกลบเผาให้ไอโซเทอร์มชนิดแอลแบบชั้นเดียวเหมือนกัน แต่สารละลายที่จุดอิ่มตัวเข้มข้นต่างกันมีค่า $117.80 \times 10^{-6} \text{ M}$ และ $1452.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ หรือ 0.01 กรัม และ 0.15 กรัมต่อกรัมวัสดุ บัววัสดุถ่านแกลบและถ่านแกลบเผา ตามลำดับ และจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสอดคล้องกัน กล่าวคือ ถ่านแกลบมีความเป็นรูพรุนน้อยกว่าถ่านแกลบเผา อาจเนื่องจากถ่านแกลบมีความเป็นรูพรุนน้อยกว่าถ่านแกลบเผาอาจเนื่องจากถ่านแกลบเป็นวัสดุที่เก็บจากวัสดุเหลือใช้จากโรงสีข้าวมีการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ ส่วนถ่านแกลบเผาได้นำมาเผาที่อุณหภูมิ 1000°C ทำให้มีการเผาไหม้สมบูรณ์มากขึ้น จึงมีความเป็นรูพรุนสูง สอดคล้องกับค่าการหาพื้นที่ผิวจำเพาะของถ่านแกลบและถ่านแกลบเผา มีค่า 149.16 และ $219.15 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$

4. คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนหมวดเงินอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2541

เอกสารอ้างอิง

1. Giles, H. Chaeles, Smjth, David, D'silva, P., Anthony, and Waston, A., Jan. A General Treatment and Classificaton of The Solute Adsorption Isotherm. Jouranal of Colloid and Interface Science 1974; 47(7) : 755-777.
2. Richards, D., Mark, and Pope, G., Chris. Adsorption of Methylene Blue from Aqueous Solution by Amorphous Aluminosilicate Gels and Zeolite X. Journal Chemical Society Faraday Transactions 1996 ; 92(2) : 317-323.
3. Brina, Rossella, and Battisti, De, Achille, Determination of the Specific Surface Area of Solids by Means of Adsorption Data. Journal of Chemical Education 1987 ; 64 (2) : 175-176.
4. Giles, C.H., and D'silva, A.P. Molecular Sieve Effects of Powers Towards Dyes Measurement of Porosity by Dye Adsorption. Transactions Faraday society 1969 ; 65 : 1943 - 1951.
5. Van Den Hul, H.J., and Lyklema, J. Deterination of Specific Surface Areas of Dispersed Materials Comparison of the Negative Adsorpton Method with some other Mehods, American Chemical Society 1968 ; 90(12) : 3010 - 3015.
6. Giles, C. H., and D'silya, A.P. Electro-Kinetic and Diffusion Measurements of Association of Dyes in Solution and Adsorbed at Solid Surfaces. Transaction Farady Society 1969 ; 65 : 2516 - 1528.
7. ปรีดา พิมพ์ขาวขำ. เซรามิกส์. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.
8. รัตนา มหาชัย และคณะ. การศึกษาหัตถ์เครื่องน้ำกรวยและสนิมเหล็กเจือปน. 2534. เสนอประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
9. รัตนา มหาชัย. การศึกษาวัสดุธรรมชาติเพื่อดูดซับโลหะหนักที่มีพิษ ในน้ำเสีย. 2538. วารสารวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

การศึกษาสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกและพกากรอง
เพื่อใช้เป็นสารฆ่าหอยเชอรี่
Study on crude extract of *Brassaia actinophylla*
and *Lantana camara* as plant molluscicide
for *Pomacea canaliculata*

พินิจ หวังสมนึก* ดรัย วงษ์ศิริ**

บทคัดย่อ

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึก (*Brassaia actinophylla*) ด้วยน้ำต่อการทำลายหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) พบว่า ความเข้มข้น 140 และ 170 มก./ล. สามารถฆ่าหอยได้ร้อยละ 50 (LC_{50}) และ 90 (LC_{90}) ในเวลา 24 ชั่วโมง และความเข้มข้น 121 และ 138 มก./ล. สามารถฆ่าหอยได้ร้อยละ 50 และ 90 ในเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนผลของสารสกัดใบพกากรอง (*Lantana camara*) ด้วยแอลกอฮอล์ ค่า LC_{50} และ LC_{90} ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 295 และ 599 มก./ล. และที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 53 มก./ล. และ 93 มก./ล. ตามลำดับ จากการทดสอบในแปลงสาธิตพบว่า สารสกัดใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำ ค่า LC_{50} และ LC_{90} ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 356.21 และ 719.16 มก./ล. และที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 94.21 และ 160.68 มก./ล. ส่วนสกัดจากใบพกากรองด้วยแอลกอฮอล์มีค่า LC_{50} และ LC_{90} ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 351.80 และ 675.51 มก./ล. และที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 72.83 และ 134.70 มก./ล. และการศึกษาพิษตกค้างของสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่า สารสกัดใบหนวดปลาหมึกและพกากรองจะสลายตัวหมดภายใน 20 วัน และ 15 วัน ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Abstract

The toxicity of the molluscicidal plants *Brassaia actinophylla* and *Lantana camara* was evaluated against golden apple snail (*Pomacea canaliculata*). In laboratory, the 24 hr. LC_{50} and LC_{90} values of crude water extract of *Brassaia actinophylla* were 140 and 170 mg./l. whereas the 48 hr. LC_{50} and LC_{90} were 121 and 138 mg./l. The 24 hr. LC_{50} and LC_{90} values of ethanol crude extract of *Lantana camara* were 295 and 599 mg./l. whereas the 48 hr LC_{50} and LC_{90} were 53 and 93 mg./l respectively. In simulated field test, the 24 hr. LC_{50} and LC_{90} values of crude water extract of *Brassaia actinophylla* were

* ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

356.21 and 719.16 mg./l. whereas the 48 hr. LC_{50} and LC_{90} were 94.21 and 160.68 mg./l. The 24 hr. LC_{50} and LC_{90} values of ethanol crude extract of *Lantana camara* were 351.80 and 675.51 mg./l. whereas the 48 hr LC_{50} and LC_{90} were 72.83 and 134.70 mg./l. respectively. Crude extract of both species were rapidly degraded by sunlight. Toxicity of *Brassia actinophylla* and *Lantana camara* were detoxicated to 50% in 7 and 6 days and were completely detoxicated in 20 and 15 days respectively

Key words : *Brassia actinophylla*, *Lantana camara*, plant molluscicide, *Pomacea canaliculata*

บทนำ

หอยโข่งอเมริกาใต้หรือหอยเชอรี่ (golden apple snail : *Pomacea canaliculata*) เป็นหอยที่นำเข้ามาในประเทศไทย ในช่วงแรกนิยมเลี้ยงเพื่อความสวยงาม บริโภคและส่งออก ต่อมาเมื่อเนื้อของหอยไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค เกษตรกรผู้เลี้ยงจึงละทิ้งจนเกิดการแพร่พันธุ์สู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (สันทนา ดวงสวัสดิ์, 2531) ปัจจุบันหอยเชอรี่กลายเป็นศัตรูนาข้าวที่สำคัญชนิดหนึ่ง จากรายงานล่าสุดในปี 2540 พบการระบาดกว่า 60 จังหวัดทั่วประเทศ (ชมพูนุชและทักษิณ) หอยเชอรี่จัดว่าเป็นศัตรูที่สำคัญของนาข้าว เนื่องจากกัดกินต้นข้าวโดยเฉพาะในช่วงระยะหลังปักดำทำให้เกิดความเสียหายแก่นาข้าวเป็นอย่างมาก หอยเชอรี่ที่ระบาดในประเทศไทยมีอยู่อย่างน้อย 3 สายพันธุ์ได้แก่ *P. canaliculata*, *P. insularis* และ *Pomacea* sp. (Kaewjam and Upatham, 1990)

สารเคมีสังเคราะห์ที่เกษตรกรใช้ในการกำจัดหอยเชอรี่ ได้แก่ นิโคลซามิด (ไบลูสไซด์) เมทล-ดีไฮด์ คอปเปอร์ซัลเฟต ฯลฯ สารเคมีเหล่านี้นอกจากจะเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และสิ่งมีชีวิตใกล้เคียงแล้วยังมีผลตกค้างในธรรมชาติเป็นเวลานานอีกด้วย (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2540) ดังนั้น การนำสารสกัดจากพืชที่มีคุณสมบัติในการฆ่าหอยมาใช้ในการกำจัดหอยเชอรี่จะเป็นประโยชน์ใช้ทดแทนสารเคมีเหล่านี้ ลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร ลดการสั่งซื้อสารเคมีจากต่างประเทศ Simonds et al. (1999)

กล่าวถึงแนวโน้มการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในปี 2000 ว่าสารฆ่าแมลงส่วนมากจะเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ Wangsomnuk et al. (2000) ได้ทดสอบคุณสมบัติของพืชจำนวน 55 ชนิด จาก 24 วงศ์ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าหอย พบว่าสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึก (*Brassia actinophylla*) และผักการอง (*Lantana camara*) มีประสิทธิภาพสูงสุดและให้ผลดี ตามลำดับ ในการทำลายหอย *Biomphalaria glabrata* ซึ่งเป็นที่ให้อาศัย (host) ของพยาธิใบไม้ในเลือดของคน

จึงได้ศึกษาถึงศักยภาพของสารสกัดใบหนวดปลาหมึกและผักการองในการกำจัดหอยเชอรี่ และใช้ผักการองซึ่งเป็นไม้ล้มลุก ปลูกง่ายทดแทนหนวดปลาหมึกซึ่งเป็นไม้ยืนต้น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมวัสดุการทดลอง

1.1 การเตรียมน้ำเพื่อใช้ในการทดลอง

น้ำที่ใช้ในการเลี้ยงหอยเชอรี่และ การเตรียมสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองใช้น้ำที่ปราศจากคลอรีน โดยพ่นอากาศลงในถังน้ำประปาเป็นเวลาอย่างน้อย 5 วัน หรือใส่ถังทิ้งอย่างน้อย 10 วัน เพื่อให้หมดคลอรีนแล้วจึงนำมาใช้ได้

1.2 สัตว์ทดลอง

นำหอยเชอรี่ตัวเต็มวัย ขนาด 2.5-3.5 ซม. ที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ มาเลี้ยง

ในบ่อพักเป็นเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ เพื่อให้หอยเคยชินกับบ่อพัก ให้เศษผักที่มีใบอ่อนนุ่ม และล้างสะอาดเป็นอาหาร เช่น ผักกาดขาว ผักกะหล่ำปลี เป็นต้น แล้วจึงนำหอยมาทำการทดลองเพื่อหาค่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

โดยใช้วิธีการทดสอบในน้ำนิ่ง (static bioassay)

1.3 การเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อใช้เป็นยาฆ่าหอย

นำใบแก่ของต้นหนวดปลาหมึก และผลกากรองที่มีสภาพสมบูรณ์มาล้างให้สะอาด แล้วนำมาตากผึ่งลมหรืออบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส จนใบพืชทั้ง 2 ชนิดแห้งสนิทแล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า นำผงป่นที่ได้มาร่อนผ่านตะแกรงลวดมาตรฐานขนาด 80 เมช (mesh) แล้วนำมาทำการสกัดด้วยการแช่ในน้ำสำหรับใบหนวดปลาหมึก หรือ 70% แอลกอฮอล์สำหรับใบผลกากรอง เป็นเวลา 8-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางตาม ความเข้มข้นตามต้องการ (จากการลองทดสอบสารสกัดจากใบผลกากรองด้วยน้ำ พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นสูงจึงสามารถฆ่าหอยเชอรี่ได้)

2. การทดสอบในห้องปฏิบัติการ

2.1 การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารสกัดจากใบพืช

2.1.1 การทดสอบหาค่าความเป็นพิษเบื้องต้น (Preliminary screening)

การทดสอบเพื่อหาระดับความเข้มข้นนี้ได้ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Upatham et al. (1998) และวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลก (W.H.O., 1971) ทำการทดลองโดยแบ่งระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด เป็น 6 ระดับ คือ 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 มก./ล. ในปริมาตร 3 ล. ใส่ลงในโหลแก้ว ความจุ 5 ล. คนให้ทั่ว จากนั้นจึงนำหอยเชอรี่ซึ่งผ่านการอดอาหารมาแล้ว 24

ชั่วโมง ใส่ลงในโหลแก้วที่ทำการทดลองโหลละ 7 ตัว ขณะทำการทดลองให้งดอาหารและงดการเติมอากาศลงในน้ำ หลังจากครบตามระยะเวลาที่ 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วจึงทำการบันทึกอัตราการตายสะสมของแต่ละความเข้มข้น หลังจากนั้นให้นำหอยทั้งหมดที่ยังไม่ตายใส่ลงในโหลแก้วที่บรรจุน้ำสะอาดทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (recovery period) แล้วบันทึกอัตราการตายซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำค่าข้อมูลการตายของหอยที่ได้ทั้งหมดไปใช้ในการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองขั้นละเอียดต่อไป

2.1.2 การทดสอบหาค่าความเป็นพิษอย่างละเอียด (Definitive screening)

นำค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด ในระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ไม่ทำให้หอยตายเลย (sublethal concentration) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้หอยตายหมด (lethal concentration) มาทำการกระจายความเข้มข้นให้มีความละเอียดยิ่งขึ้น แล้วจึงทำการทดลอง เช่นเดียวกับการทดสอบในช่วงแรก โดยในแต่ละความเข้มข้นมี 3 ชุดการทดลอง นำผลอัตราการตายที่ได้มาทำการคำนวณหาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชที่ทำให้หอยเชอรี่ตาย ร้อยละ 50 (LC_{50}) และ 90 (LC_{90}) ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Probit analysis ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (Raymond, 1987) ขณะทำการทดลองได้สังเกตพฤติกรรมต่างๆ ของหอยเมื่อได้รับสารพิษ

2.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารนิโคตินาไมด์ต่อหอยเชอรี่

ทำการทดสอบวิธีเดียวกันกับสารสกัดจากพืชเพื่อนำผลการทดลองที่ได้มาเป็นค่าเปรียบเทียบกับสารเคมีที่สกัดจากพืช

2.3 การทดสอบความตกค้างของสารพิษในธรรมชาติ

นำสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิดในระดับความเข้มข้นที่ฆ่าหอยให้ตายหมดในเวลา 24 ชั่วโมง มาตากแดดที่ระยะเวลา 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 และ 30 วัน จากนั้นจึงนำสารทั้งสองชนิดมาทดสอบหาอัตราการตายโดยวิธีดังกล่าวแล้วข้างต้น แล้วบันทึกผลจากอัตราการตายของหอยที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

3. การทดสอบในแปลงสาธิต

3.1 การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบมีขั้นตอนคล้ายกับในห้องปฏิบัติการ แต่ทำการทดสอบเพียงขั้นตอนเดียว โดยใช้ค่า LC_{50} ที่ได้จากห้องปฏิบัติการเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ทดสอบในแปลงสาธิต การทดสอบทำในกระถางปลูกข้าวเส้นผ่าศูนย์กลาง 70 เซนติเมตร ซึ่งปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 2 สัปดาห์ กระถางละ 20 ต้น มีน้ำท่วมขังสูงเหนือพื้นดิน ทำการทดสอบระดับละ 3 ชั่วโมง โดยใช้หอยทดสอบซ้ำละ 7 ตัว

3.1.1 สารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำ

ผลจากการทดสอบหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ที่ 24 ชั่วโมง ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ มีค่าเท่ากับ 140 มก./ล. และ 170 มก./ล. และที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 121 มก./ล. และ 138 มก./ล. ดังนั้น จึงได้กำหนดช่วงความเข้มข้นเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 100, 150, 200, 250, 300 มก./ล. ตามลำดับ

3.1.2 ทดสอบหาค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากใบผกากรองด้วยแอลกอฮอล์

ผลจากการทดสอบหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่ได้จากห้องปฏิบัติการมีค่าเท่ากับ 295 มก./ล. และ 599 มก./ล. และที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 53 มก./ล. และ 93 มก./

ล. ดังนั้น จึงได้กำหนดช่วงความเข้มข้นเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 50, 100, 200, 400, 800 มก./ล. ตามลำดับ

ผลการทดลอง

ในห้องปฏิบัติการ

1. ค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน

1.1 สารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำ

ระดับความเข้มข้นของสารฯ ที่ทำให้หอยเชอรี่ตาย ร้อยละ 50 (LC_{50}) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 140 มก./ล. และ 121 มก./ล. และระดับความเข้มข้นที่ทำให้หอยตาย ร้อยละ 90 (LC_{90}) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 170 มก./ล. และ 138 มก./ล. (ภาพที่ 1)

1.2 สารสกัดจากใบผกากรองด้วยแอลกอฮอล์

ระดับความเข้มข้นของสารฯ ที่ทำให้หอยเชอรี่ตาย ร้อยละ 50 (LC_{50}) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 295 มก./ล. และ 53 มก./ล. ระดับความเข้มข้นที่ทำให้หอยตาย ร้อยละ 90 (LC_{90}) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 599 มก./ล. และ 93 มก./ล. (ภาพที่ 1)

1.3 สารนิโคตินาไมด์

ระดับความเข้มข้นสารฯ ที่ทำให้หอยเชอรี่ ร้อยละ 50 (LC_{50}) ในช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.40 มก./ล. และ 0.23 มก./ล. ระดับความเข้มข้นที่ทำให้หอยตาย ร้อยละ 90 (LC_{90}) ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.73 มก./ล. และ 0.51 มก./ล.

2. พิษตกค้างของสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึก และผกากรอง

การศึกษาถึงความเป็นพิษตกค้างของสารสกัดจากพืช ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้หอยตายหมดภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้ถูกแสงแดดที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ มีผลทำให้ประสิทธิภาพ

ภาพในการทำลายหอยเชอร์รี่สดลงดังนี้

2.1 การลดลงของประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำ

พบว่าเมื่อทิ้งให้สารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 200 มก./ล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้หอยตายหมดภายใน 24 ชั่วโมง มาตากแดดนาน 1 วัน แล้วยังไม่มีผลต่อการอยู่รอดของหอย คือยังคงตายทั้งหมด เมื่อทิ้งไว้ 7, 14 และ 20 วัน ประสิทธิภาพในการทำลายหอยเชอร์รี่จะลดลงร้อยละ 50, 90 จนสลายตัวหมด ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

2.2 การลดลงของประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบผกากรองด้วยแอลกอฮอล์

พบว่า เมื่อทิ้งให้สารสกัดจากใบผกากรองด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 750 มก./ล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีผลทำให้หอยตายหมดภายใน 24 ชั่วโมง มาตากแดดนาน 1 วันแล้วยังไม่มีผลต่อการอยู่รอดของหอย คือยังคงตายทั้งหมด เมื่อทิ้งไว้ 6, 12 และ 15 วัน ประสิทธิภาพในการทำลายหอยเชอร์รี่จะลดลงร้อยละ 50, 90 และจนสลายตัวหมดตามลำดับ (ภาพที่ 2)

3. พฤติกรรมบางประการของหอยเชอร์รี่ เมื่อได้รับสารพิษ

พฤติกรรมบางประการของหอยเชอร์รี่ เมื่อถูกสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึก ผกากรองและ

นิโคตินาไมด์ จะแสดงพฤติกรรมคล้ายๆ กัน คือในช่วงแรกหอยจะเปิดฝาปิดเปลือกแล้วยื่นส่วนเท้าออกมา หลังจากนั้นจะคลานขึ้นสู่ผิวน้ำ เมื่อเวลาผ่านไปหอยจะปิดฝาปิดเปลือกจนแน่นสนิท พร้อมทั้งขับสารเมือกออกมา และตาย

ในแปลงสาธิต

1. ค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน

1.1 สารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำ

ด้วยน้ำ

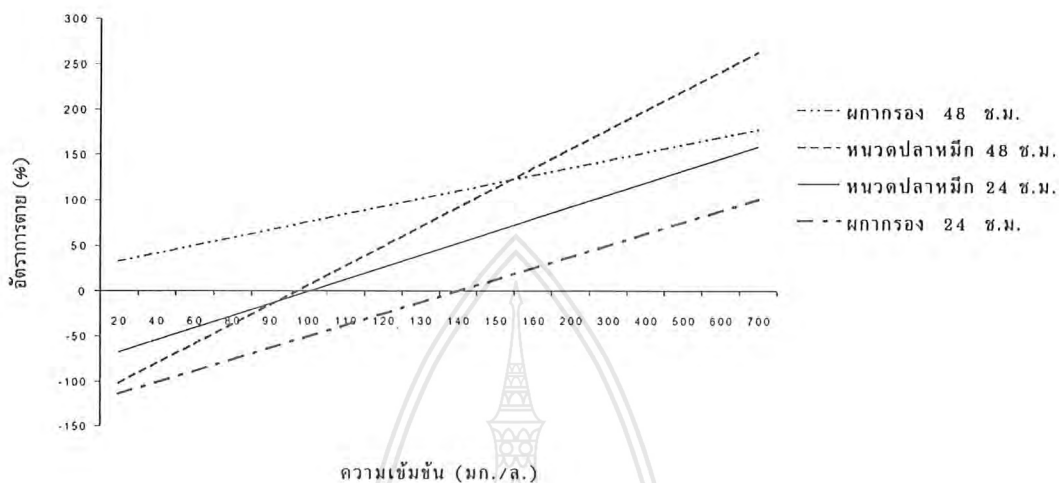
ระดับความเข้มข้นที่ทำให้หอยตาย ร้อยละ 50 (LC_{50}) ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 356.21 มก./ล. และ 94.21 มก./ล. ระดับความเข้มข้นที่ทำให้หอยตายร้อยละ 90 (LC_{90}) ในทั้ง 2 ช่วงเวลามีค่าเท่ากับ 719.16 มก./ล. และ 168.68 มก./ล. (ภาพที่ 3)

1.2 สารสกัดจากใบผกากรองด้วยแอลกอฮอล์

แอลกอฮอล์

ระดับความเข้มข้นที่ทำให้หอยตาย ร้อยละ 50 (LC_{50}) ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 351.80 มก./ล. และ 72.83 มก./ล. ระดับความเข้มข้นที่ทำให้หอยตายร้อยละ 90 (LC_{90}) ในทั้ง 2 ช่วงเวลามีค่าเท่ากับ 675.51 มก./ล. และ 134.70 มก./ล. (ภาพที่ 3)

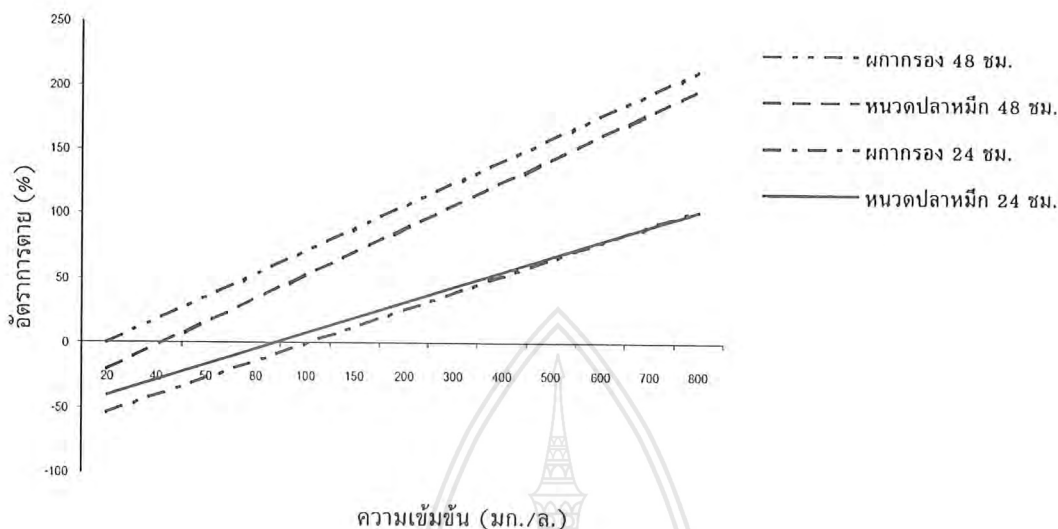
สลายจนเกิน



ภาพที่ 1 เปอร์เซนต์การตายของหอยเชอรี่ ที่ได้รับสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำและสารสกัดจากใบผกากรองด้วยแอลกอฮอล์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 เปอร์เซนต์การตายของหอยเชอรี่ที่ได้รับสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำ และสารสกัดจากใบผกากรองด้วยแอลกอฮอล์หลังจากสัมผัสกับแสงแดดที่ระยะเวลาต่างๆ



ภาพที่ 3 เปอร์เซนต์การตายของหอยเชอร์รี่ในแปลงสาธิต หลังจากได้รับสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึก ด้วยน้ำและสารสกัดจากใบผกากรองด้วยแอลกอฮอล์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาถึงความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารนิโคตินต่อการทำลายหอยเชอร์รี่ ได้ค่า LC_{50} และ LC_{90} ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 0.4 มก./ล., 0.23 มก./ล., 0.73 มก./ล. และ 0.51 มก./ล. ตามลำดับ ส่วน Malek (1971) ได้รายงานผลการทดสอบสารนิโคตินต่อการทำลายหอย *Biomphalaria glabrata* ซึ่งเป็นพาหะของพยาธิ *Schistosoma mansoni* ว่ามีค่า LC_{50} ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.09 มก./ล. ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดสอบของ MonKiedge et al. (1991) ได้ค่า LC_{50} ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.06 มก./ล. ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นหอยคนละชนิด และหอยเชอร์รี่มีขนาดใหญ่กว่า *Biomphalaria* หลายเท่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และสถานที่ซึ่งแตกต่างกัน ความแตกต่างของค่า LC_{50} และ LC_{90} ที่ได้จากการทดสอบสารเคมีชนิดเดียวกันแต่หอยต่างชนิดและขนาดกันนี้ ยังพบใน

การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกต่อการทำลายหอยเชอร์รี่ได้ค่า LC_{50} ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 140 และ 121 มก./ล. ตามลำดับ ขณะที่ Upatham et.al. (1998) ทดสอบสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกต่อหอยคัน *Indoplanorbis exustus* ได้ค่า LC_{50} ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 23 มก./ล. ระยะเวลาการเป็นพิษตกค้างของสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึก ใบผกากรอง และสารนิโคตินพบว่าแสงแดดมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายหอยเชอร์รี่ลดลง โดยอัตราการตายของหอยลดลงและสลายหมดเมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน (ภาพที่ 2) ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับการทดลองของ ลีลา และรังสิไชย (2539) ที่รายงานว่าสารนิโคตินความเข้มข้น 8 มก./ล. กำจัดหอยเจดีย์ในนาุ้งได้หมดภายใน 48 ชั่วโมง และเมื่อทิ้งน้ำในบ่อกุ้งนาน 5 วัน แล้วปล่อยน้ำลงสู่ชายทะเล ไม่มีผลกระทบกับสิ่งมีชีวิตข้างเคียง เช่น หอยแครง และปูทะเล

Committee on plant and animal pests (1969) กล่าวถึงการสลายตัวของสาร DDT. มาลาไอออน และพาราไอออนในน้ำโดยแสงแดดอย่างช้าๆ ส่วนสารสกัดจากพืชซึ่งเป็นสารอินทรีย์นั้นร้อยละ 90 ถูกสลายโดยแสงแดด และอีก 10% นั้นถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ต่างๆ ในดิน Duncan and Sturrock (1983) ได้รายงานค่า LC_{50} และค่า LC_{90} สามารถเปลี่ยนแปลงได้หากได้รับผลกระทบจากแสงแดด รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) อุณหภูมิที่เปลี่ยนไป Rabek (1994) ได้ทำการทดลองเรื่องการสลายตัวของสาร Polymer ซึ่งจะสลายตัวเมื่อถูกแสงแดด และรังสีอัลตราไวโอเลต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความถี่ของคลื่นแสง ช่วงเวลาที่ถูกแสง และปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ อากาศ และสิ่งแวดล้อมต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และ Crosby and Li (1969) ซึ่งได้ศึกษาผลของแสงต่อการสลายตัวของสารกำจัดวัชพืช (Herbicide) บางชนิดในฤดูร้อน พบว่า เมื่อถูกแสงอาทิตย์ 1 วัน สามารถลดประสิทธิภาพของสารพิษได้ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ และยังมียังยอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น อากาศ ความร้อน และองค์ประกอบของสารละลาย

ผลการทดสอบในแปลงสาธิตได้ระดับค่า LC_{50} และ LC_{90} ใกล้เคียงกับผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการแต่มีค่าสูงกว่าเล็กน้อย (ภาพที่ 3) ซึ่งน่าจะเกิดจากสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด ในแปลงสาธิต ถูกสลายโดยรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงอาทิตย์และการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในน้ำและดิน

จากการศึกษาสารพิษทั้ง 3 ชนิดต่อพฤติกรรมของหอยเชอรี่เมื่อได้รับสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกและผงการองนั้น คล้ายกับการทดลองของ Wangsomnuk et.al. (1997) กล่าวคือ หอยคัน *Indoplanorbis exustus* ที่ได้รับสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกและสารนิโคตินาไมด์ จะขับสารเมือกออกมาภายในลำไส้ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างสารเมือกที่บริเวณผิวหนังเดินอาหาร และ

คล้ายกับรายงานของ Ritchie (1969) ซึ่งกล่าวถึงพฤติกรรมของหอย *Biomphalaria glabrata* ที่ได้รับสารนิโคตินาไมด์จะคลานหนีออกจากแหล่งน้ำนั้น หรือหดตัวกลับเข้าไปในเปลือก และมีการสร้างเมือกเพิ่มมากขึ้น

จากการทดลองสรุปได้ว่าใบหนวดปลาหมึก มีคุณสมบัติในการฆ่าหอยได้ดีกว่าใบผงการองมาก เนื่องจากสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำสามารถฆ่าหอยเชอรี่ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบผงการองด้วยแอลกอฮอล์ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้การใช้แอลกอฮอล์สกัดสารเคมีจากใบผงการองยังมีความยุ่งยากสำหรับเกษตรกรหากมีการนำไปใช้ และจากการทดลองใช้สารสกัดจากใบผงการองด้วยน้ำพบว่าต้องใช้ความเข้มข้นสูงมากกว่า 2000 มก./ล. จึงจะสามารถฆ่าหอยเชอรี่ได้ 100% ซึ่งต่างจากรายงานของ Wangsomnuk et.al. (2000) ที่ระบุว่า LC_{50} และค่า LC_{90} ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกและผงการองด้วยน้ำ มีค่าเท่ากับ 21 กับ 30 และ 46 กับ 66 มก./ล. ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันมาก เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความเป็นพิษของใบหนวดปลาหมึกและผงการองกับการทดลองของนักวิจัยอื่น พบว่า สารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำมีคุณสมบัติดีกว่าพืชชนิดอื่นๆ เช่น Rejesus and Punzalan (1996) ได้รายงานถึงผลของสารสกัดจากใบต้น *Vitex negundo* L. ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกันกับผงการองด้วยน้ำมัน (oil) พบว่า มีความสามารถทำลายหอยเชอรี่ได้ได้ถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 200 มก./ล. ภายในเวลา 48 ชั่วโมง สารสกัดจาก *Phytolacca dodecandra* หรือ endod และสารสกัดจากเมล็ดของสะเดา *Azadirachta indica* ที่มีผลในการกำจัดหอยเชอรี่ (*Pomacea* spp.) ในประเทศฟิลิปปินส์ ว่า สารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหอยเชอรี่ได้หมดด้วยความเข้มข้นไม่เกิน 200 มก./ล. ซึ่งสารสกัดจาก

พืชเหล่านี้ส่วนมากต้องใช้สารเคมีเป็นตัวทำลาย ซึ่งต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายและยุ่งยากสำหรับเกษตรกรที่จะนำไปใช้ เพราะต้องหาความเข้มข้นของตัวทำลายที่เหมาะสม

สารสกัดจากใบหนวดปลาหมึกด้วยน้ำก็มีอันตรายต่อน้ำอื่นๆ เช่น ปลา เหมือนกับสารเคมีสังเคราะห์อื่นๆ (Upatham, 1998) แต่ถ้ามีการใช้อย่างระมัดระวังและเหมาะสมก็น่าจะเกิดประโยชน์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมมีค่า LC_{50} และค่า LC_{90} ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพราะใช้พืชปริมาณน้อย อย่างไรก็ตามที่ได้ทำการศึกษาวิจัยว่าที่ระดับความเข้มข้นเท่าไรจึงจะเป็นพืชต่อสัตว์เลือดอุ่น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป สำหรับนักวิจัยรุ่นใหม่ ผู้วิจัยหวังว่าผลงานวิจัยคงจะมีประโยชน์แก่วงการเกษตรกรรมในประเทศบ้าง ขอขอบคุณ คุณ อนุศาสตร์ ภูสินแก่น ที่ได้ช่วยเหลือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ในการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุท จรรยาเพศ และ ทักษิณ อาชาวาคม. 2542. หอยเชอร์รี่. ใน เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา “หอยเชอร์รี่”. 1-1 - 1-15. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร และสมาคมกัญและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร.

ลิลลา เรืองแป้น และ รังสิไชย ทับแก้ว. 2539. การทดลองใช้สารโบลูสไซด์ (r) กำจัดหอยเจดีย์. วารสารการประมง, 49 น.6 (พ.ย.-

ธ.ค.) : 163-170.

สันทนา ดวงสวัสดิ์. 2531. หอยเป่าอื้อน้ำจืด. หนังสือพิมพ์กสิกร. 60 (พ.ค.-มิ.ย.) : 204-207.

Committee on plant and animal pests. 1969. Insect-pest management and control. Principles of plant and animal pests control. Vol.3 : 360 - 402.

Crosby, D.G., and Li, M.Y. 1969. Herbicide Photo-decomposition. In **Degradation of Herbicide**, 321-336. P.C. Kearny and D.D. Kaufman, ed. Newyork : Marcel Dekker, Inc.

Duncan, J., and Sturrock, R.F. 1983. Laboratory evaluation of Potential plants molluscicides. In **Plant molluscicide.**, 251-266 .Kenneth E.Mott, ed.. Newyork : John Wiley and sons Ltd. .

Kaewjam, R.S., and Upathum, E.S. 1990. Shell morphology, reproductive anatomy and genetic pattern of three species of apple snails of the genus Pomacea. In Thailand. **Journal of medical and applied Malacology.** 90 (2) : 45-57.

Malek, E. A., and Cheng, T.C. 1974. **Medical Malacology.** Academic Press, Inc., Newyork.

Monkiedje, A. , Anderson, A.C. , and Englande , A.J. , 1991 . Acute toxicity of *Phytolacca dodecandra* (Endod-s) and Niclosamide to snails , *Schistosoma mansoni* cercaria, tilapia fish, and soil micro organism. **Enviromental toxicology and water quality.** vol 6 (4) : 405-413.

- Rabek, J.F. 1994. **Polymer degradation : mechanism and experimental methods.** Royal institute of medicine , Sweden.
- Raymond, M. 1985. Presentation on program analysis log. Probit pour microordinateur. **Ser. Ent. Med. Parasitology.** Vol.22 (2) : 117 - 121.
- Rejesus, B.M., and Punzalan, E.G. 1996. Toxicity of Philippines plants on golden apple snails *Pomacea* spp.. In **Biopesticides : toxicity, safety, development and proper use : Proceeding 1st International Symposium on Biopesticide.** 27-37. Jittawadee Rodcharoen and Siriwat Wongsiri., ed. Naresuan University Press.
- Ritchie, L.S. 1969. Molluscicide status of their evaluation formulation and methods of application. **WHO./PD/MOL.** 69.1.
- Simonds, M.S.J. , H.C. Evans, H.C. , and Blaney, W.M. 1999. Pesticide for the year 2000 : Mycochemicals and Botanicals. In **Pest management and the environment in 2000.** 127 - 164. Abdul Aziz S.A. Kadir and Henry S. Barlow, ed.. Malaysia : Agriculture institute.
- Upatham, E.S. , Wangsomnuk, P. , Kruatrachue, m. , Chitramvong, Y.P. , and Reutrakul, V. 1998. Acute toxicity of a plant molluscicide, *Brassia actinophylla* on *Indoplanorbis exustus* and non-target organism. **Molluscan Research.** 19 (2):1-14
- Wangsomnuk, P., Upatham, E.S., Kruatrachue, M. , Chitramuoug, Y. , and Sretarugsa, P. 1997. Histological alterations in the Reproductive Nervous and Digestive system of *Indoplanorbis exustus* intoxicated with Molluscicide. **The Science Society of Thailand.** 23: 281-296.
- Wangsomnuk, P., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., and Reutrakul, V. 2000. Screening of some plant extracts for molluscicidal activity. **Journal of medical and applied malacology,** 10: 29- 35.
- W.H.O. [World Health Organization] 1971. Annex 1: Definitive laboratory screening-standard methods. Meeting of Directors of Collaboration Laboratories on Molluscicide Testing and Evaluation. **WHO/SCHISTO/71.6,** pp. 26-29.

Genetic Engineering in Rice (*Oryza sativa* L.) with an Insecticidal Gene from *Bacillus thuringiensis* (Bt) for the Increasing Resistance against its Insect Pests

Jagkrit Parakarn*

Introduction:

Rice (genus *Oryza*, $2n = 24$) is one of the staple food crops of the world. The world rice production runs second to only the world wheat production (Poehlman and Sleper, 1995). Rice feeds nearly 3 billion people worldwide, predominantly in the developing countries (Datta, 1999). Most of the world rice production areas are situated in China, India, Indonesia, Vietnam, Myanmar, Thailand, Japan, Bracil, and The Philippines, respectively (Table 1). For Thailand, it is one of the world champion country of rice exporters (IRRI, 1997). For rice as a source of human nutrition, two species of rice are important: *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima*. The *O. sativa* or cultivated rice is originated in the humid tropics of South and Southeast Asia, while the *O. glaberrima* or red rice is originated in Niger basin several million years ago and still mainly grown in the middle Niger delta. Among the *O. sativa*, three eco-geographical types of rice are grown: (1) Indica rice in the tropical area (e.g., India, Thailand, Myanmar, Loa, The Philippines, and Vietnam), (2) Japonica rice in the temperate regions and tropical uplands (e.g., China, Japan, and Korea), and (3) Javanica rice in the islands of Malaysia

and Indonesia.

In the past 25 years, rice production has been increased from 257 million tons in 1966 to 520 million tons in 1990 (Datta, 1999), mostly due to the modern rice breeding, increased cropping lands and improved agricultural technology (Puonti-Kaerlas, et al., 1999). However, in the year 2020 it is estimated that 70% more rice must be produced but on less land, fewer minerals and fewer agricultural workers (Hossain and Fischer, 1995; Datta, 1999), in order to meet with the increased population which is growing at a rate of 85 million people a year (Puonti-Kaerlas, et al., 1999). With this growth rate, rice production must be increased at least 13 million tons in each year (IRRI, 1993). Rice production can be increased by two ways: improving rice yield or decreasing loss of rice due to unfavorable environmental conditions such as adverse climate, adverse soil, weeds, insect pests, and pathological diseases (Puonti-Kaerlas, et al., 1999). The conventional or traditional plant breeding may not be able to achieve certain desired traits, but the same problems could be accomplished by recent biotechnology called rice genetic engineering.

* Biology Department, Faculty of Science, Mahasarakham University

Table 1. World rice production in 1994 and milled rice trade in 1993 (IRRI, 1997).

Country	Production (10 ³ tons)	Area (10 ³ ha.)	Yield (tons / ha.)	Import (10 ³ tons)	Export (10 ³ tons)
Thailand	18,447	8,482	2.2	0	4,989
USA	8,972	1,336	6.7	203	2,680
Vietnam	22,500	6,500	3.5	1	1,765
China	178,251	30,373	5.9	100	1,507
Pakistan	5,269	2,107	2.5	< 1 ton	1,032
India	118,400	42,034	2.8	108	628
Italy	1,324	238	5.6	51	574
Uruguay	680	134	5.1	< 1 ton	505
Australia	1,017	122	8.3	31	482
Indonesia	46,245	10,646	4.3	24	351
Myanmar	19,057	6,477	2.9	0	209
Spain	390	63	6.2	144	190
Egypt	4,582	579	7.9	< 1 ton	144
Guyana	340	95	3.6	0	124
France	124	27	4.6	266	81
Surinam	225	60	3.8	0	50
Bracil	10,582	4,4446	2.4	650	12
Columbia	1,679	408	4.1	62	4
Rep. Korea	7,056	1,160	6.1	1	1
Sri Lanka	2,582	825	3.1	181	1
Japan	14,976	2,212	6.8	108	< 1 ton
Philippines	10,150	3,350	3.0	202	< 1 ton
Loa	1,653	639	2.6	4	0
Cambodia	1,800	1,700	1.1	84	0

Sources : CIAT, Trends in CIAT Commodities, 1992; Country National Statistical Office; FAO, FAOSTAT, 1995; IRRI, RICESTAT, 1995; ISNAR, Agricultural Research Policy: International Perspective, 1989; World Bank, 1994; World Bank Development Report, 1996.

So far, rice genetic engineering has been attempted since the early 1990s by many researchers worldwide. The main targets and goals of rice genetic engineering may be summarized as illustrated in Table 2 (Potrykus, et al., 1995; Datta, 1998; Puonti-Kaerlas, et al., 1999; Datta, 1999): (1) resistance to fungal disease, (2) resistance to rice tungro bacilliform virus, (3) resistance to stemborers, (4) provitamin A biosynthesis in rice endosperm, (5) iron content increase in rice endosperm, (6) water deficit and salinity tolerance, and (7) submergence tolerance.

The biological nitrogen fixation (BNF) rice has also been dreamed of many scientists, but it would take at least 10 or more years to become true (Reddy, 1999). See Parakarn (1998) for introductory BNF rice and Ladha and Reddy (1999) for recent advance of the BNF Rice Frontier Project and Working Group, also Ladha, et al. (1997) for the past few years of their work. In this paper, only the transgenic rice with increasing resistance to insect pests (especially stemborers) would be mainly focused.

Table 2. Targets and goals of transgenic rice (*Oryza sativa*) (Potrykus, et al., 1995; Datta, 1998; Puonti-Kaerlas, et al., 1999; Datta, 1999).

Target & Goal	Brief Descriptions	References
1. Resistance to fungal diseases	Rice blast (<i>Pyricularia oryzae</i>) and sheath blight (<i>Rhizoctonia solani</i>) are the most devastating fungal rice diseases worldwide. Multiple host response mechanisms include plant defensive enzymes (e.g. chitinases, β -1,3-glucanases, etc.) are involved in fungal-disease resistance.	Lin, et al., 1995; Datta, et al., 1999; Chareonpornwattana, et al., 1999
2. Resistance to rice tungro bacilliform virus	The most devastating virus disease in Southeast Asia is rice tungro disease (RTD), caused by a combined interaction of rice tungro bacilliform virus (RTBV) and rice tungro spherical virus (RTSV). The genes for viral coat protein, mutated viral replicase, and antisense RNA against the leader sequence of the RTBV pregenomic RNA have been tried.	Kloti, et al., 1995; Kloti, et al., 1999
3. Resistance to rice insect pests (stemborers)	Lepidopterous stemborers are chronic pests in many rice growing regions. In Asia, these include striped stem borer (<i>Chilo suppressalis</i>) and yellow stem borer (<i>Scirpophaga incertulas</i>). The crystal δ -endotoxin genes from soil bacterium <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) have been transferred to rice for resistance to these insect pests. Bt toxins are highly specific to Lepidopterans, Dipterans, Coleopterans, and Nematodes. The toxins are not toxic to beneficial insects, birds, and mammals.	Fujimoto, et al, 1993; Wunn, et al., 1996; Nayak, et al., 1997; Datta, et al., 1998; Alam, et al., 1999 (See Table 4.)

Table 2. Targets and goals of transgenic rice (*Oryza sativa*) (Potrykus, et al., 1995; Datta, 1998; Puonti-Kaerlas, et al., 1999; Datta, 1999) (Cont).

Target & Goal	Brief Descriptions	References
4. Provitamin A biosynthesis in rice endosperm	Rice endosperm contains neither β -carotene (provitamin A) nor its C40 carotenoid precursors. Four key enzymes, phytoene synthase, phytoene desaturase, δ -carotene desaturase and cyclopene cyclase, are necessary for β -carotene biosynthesis. The phytoene synthase gene from daffodil (<i>Narcissus pseudonarcissus</i>) has been transferred to rice.	Burkhardt, et al, 1997
5. Iron content increase in rice endosperm	More than one billion people suffer from iron deficiency anemia. Soybean iron storage protein ferritin gene has been transferred to rice to improve iron content in rice endosperm.	Yoshihara, et al, 1997
6. Water deficit and salinity tolerance	Expression of a late embryogenesis abundant protein gene (<i>HVA1</i>) from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice.	Xu, et al., 1996
7. Submergence tolerance	Submergence tolerance depends on anaerobic fermentation from pyruvate to ethanol via acetaldehyde. Alcohol dehydrogenase (<i>ADH</i>) and pyruvate decarboxylase (<i>PDC</i>) genes have been transferred into rice.	Quimio, et al., 1997

Transgenic rice with *Bt* genes for resistance against insect pests:

Insect pests have been enemies of crop farming, since humans began cultivation. The worldwide expenditure on insecticides are millions of dollars, but the crop losses are still incurred in millions of dollars as well (Figure 1). From Figure 1 (data for 1994), the amount of US\$ 1,190 millions were spent on insecticides, and rice losses (US\$ 45,000 millions) due to insect pests were the most enormous and mainly concerned herein. For alternative pest management apart from the chemical insecticides, nature still gives us the choice for biological controls (natural existing control on natural existence), in this case, by

Bt-spray and/or *Bt*-plants, which carry the gene products called *Bt* δ -endotoxins from a soil bacterium, *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) is a gram-positive, soil bacterium which produces endogenous crystalline inclusions upon sporulation (Maagd, et al., 1999; Mandaokar, et al., 1999). It is these crystalline inclusions that make *Bt* distinguished from other related *Bacillus* species, because these parasporal crystals are toxic against lepidopterous, coleopterous, and dipterous insects (Hofte and Whiteley, 1989). This insecticidal activity of *Bt* crystal proteins was discovered by E. Berliner (1915). Since then, the research on *Bt* has begun and run into the applications of the later known as

the *Bt*-spray and lately the *Bt*-plants. However, the *Bt* insecticidal crystal proteins are highly specific and thus safe for other beneficial insects, birds, and mammals (including humans). The *Bt*-spray has been used for a few decades, whereas *Bt*-plants have just set their applications recently in the 1990s. Some of the *Bt*-plants containing synthetic *Bt* genes are showed on Table 3. At present, the commercially released *Bt*-plants (Maagd, et al., 1999) include *Bt*-potato (NewLeaf™), *Bt*-cotton (Bollgard™), and *Bt*-maize (YieldGard™, Knockout™, Btguard™, and Bt-Xtra™). For *Bt*-rice (Table 4), many *Bt*-rice researches have been achieved both in Japonica and Indica rice in the 1990s. The *Bt*-rice is expected to be officially released in a few more years.

Advantages of *Bt*-plants (especially *Bt*-rice) include (Mandaokar, et al., 1999):

1. The durability of plant protection is season-long and independent of weather conditions.

Bt-Plant can constitutively express the *Bt* toxin if choose to use constitutive promoters. The expression can be tissue-specific, for example, in green tissues or in grain endosperm, depending on the choice of the specific promoters in use of controlling the *Bt* gene expression.

2. The *Bt*-plants are effective on controlling of burrowing insects that are difficult to reach with sprays (chemical sprays and/or *Bt*-sprays). The control affects in all steps of the insect development.

3. The *Bt*-toxins are highly specific to certain insect groups (Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera), and this narrow-ranged toxicity is safe for other non-targeted organisms.

4. The cultivation of *Bt*-plants would lead to the reduction of chemical insecticides. This reduction would make it environmentally safe and economically beneficial.

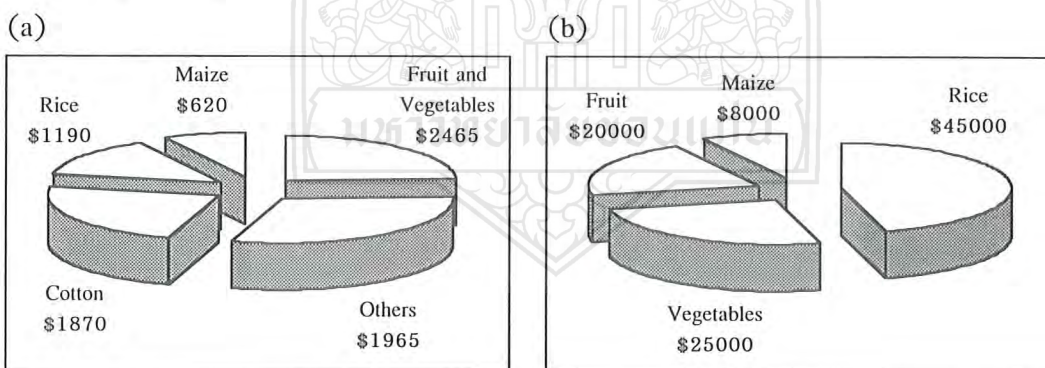


Figure 1. (a) Worldwide expenditure on insecticides (in millions of US\$) for different crop categories. (b) Worldwide crop losses caused by insect pests, in spite of the use of chemical insecticides (in millions of US \$). The percentages of the loss volume for each crop are 12% for maize, 6% for fruit, 9% for vegetable, and 27% for rice. These data are for the year 1994, and data for cotton are not showed. (Maagd, et al., 1999; Krattiger, et al., 1997).

Table 3. Transgenic (*Bt*) plants with synthetic *Bt* genes (Mandaokar, et al., 1999).

<i>Bt</i> -plants	<i>Bt</i> -Gene	%G+C content	<i>Bt</i> -protein content (% soluble protein)	Target insect	Reference
Cotton	<i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i>	49	0.1	<i>Heliothis zea</i> <i>Pectinophora gossypiella</i>	Perlak, et al., 1990
Tobacco	<i>cry1Ab</i>	49	0.03	<i>Heliothis virescens</i>	Perlak, et al., 1991
Tomato	<i>cry1Ab</i>	49	0.3	<i>Heliothis zea</i>	Perlak, et al., 1991
Potato	<i>cry3A</i>	49	0.3	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Perlak, et al., 1993
Maize	<i>cry1Ab</i>	65	0.17	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Koziel, et al., 1993
Rice	<i>cry1Ab</i>	59	0.05	<i>Chilo suppressalis</i>	Fujimoto, et al., 1993
(Japonica)					
Rice	<i>cry1Ac</i>	45	0.025	<i>Scirpophaga incertulas</i>	Wunn, et al., 1996; Nayak, et al., 1997
(Indica)					
Canola	<i>cry1Ac</i>	--	0.4	<i>Plutella xylostella</i>	Stewart, et al., 1996
Alfalfa	<i>cry1C</i>	45	0.2	<i>Spodoptera litoralis</i>	Strizhov, et al., 1996
Eggplant	<i>cry1Ab</i>	59	0.03	<i>Leucinodes orbonalis</i>	Kumar, et al., 1998

Table 4. Transgenic (*Bt*) rice with synthetic *Bt* genes in the 1990s.

Rice Cultivar	<i>Bt</i> -Gene	Promoter	Transformation Method	Reference
Japonica	<i>cry1Ab</i>	CaMV 35S	Protoplast	Fujimoto, et al., 1993
Indica	<i>cry1Ab</i>	CaMV 35 S	Biolic	Wunn, et al., 1996
Japonica & Indica	<i>cry1Ab</i>	CaMV 35S	Protoplast & Biolic	Alam, et al., 1996
Japonica	<i>cry1Ab</i>	CaMV 35S & Rice actin-1	Biolic	Wu, et al., 1997
Indica	<i>cry1Ac</i>	Maize ubiquitin	Biolic	Nayak, et al., 1997
Indica	<i>cry2A</i>	CaMV 35S	Biolic	Maqbool, et al., 1998
Indica & Japonica	<i>cry1Ab</i>	CaMV 35S, Rice actin-1, Maize pith, Maize PEPc	Biolic	Datta, 1998
Indica	<i>cry1Ab</i>	CaMV 35S	Biolic	Alam, et al., 1998
Indica	<i>Bt hybrid toxin</i> (<i>cry1Ab</i> & <i>cry1Ac</i>)	CaMV 35S & Rice actin-1	Biolic	Tu, et al., 1998
Indica	<i>cry1Ab</i>	CaMV 35S	Biolic	Alam, et al., 1999

Materials:

Bt genes encoding for *Bt* insecticidal crystal proteins (ICPs) can be summarized into 17 families as illustrated in Table 5 (Mandaokar, et al., 1999). Most of the ICPs are about 130 kDa in molecular weight and are processed in the insect midgut to become active (truncated) forms toxins of about 65–75 kDa, comprising of the N-terminus only. The ICPs exert toxicity by binding to midgut epithelial cells and ultimately cause

osmotic lysis through pore formation in the cell membrane (Gill, et al., 1992; Knowles and Dow, 1993). Toxin specificity is determined by the toxin–receptor interaction, although solubility of the crystal and protease activation also play a role (Maagd, et al., 1999). The toxicity is found in the following insect families: Lepidoptera (caterpillars), Diptera (flies and mosquitoes) and Coleoptera (beetles). Some nematodes are affected from *Bt* toxin as well.

Table 5. *Bt* insecticidal crystal (Cry) proteins (Mandaokar, et al., 1999).

ICPs	Toxic Specificity	ICPs	Toxic Specificity
Cry1A (a,b,c,d,e)	L	Cry6A	--
Cry1Ba	L, C	Cry7A (a,b)	C
Cry1C (a,b)	L, D	Cry8Aa	C
Cry1D (a,b)	L	Cry8Ab	C
Cry1E (a,b)	L	Cry8Ca	C
Cry1Fa	L	Cry9Aa	L
Cry1Ga	L	Cry9Ba	L
Cry1Ha	L	Cry9Ca	L
Cry1I (a,b)	L, C	Cry10Aa	D
Cry1Ja	L	Cry11Aa	D
Cry2A (a,b,c)	L, D	Cry12Aa	N
Cry3A	C	Cry13Aa	N
Cry3B (a,b)	C	Cry14Aa	C
Cry4Aa	D	Cry15Aa	--
Cry4Ab	D	Cry16Aa	--
Cry5A (a,b)	N	Cry17Aa	--

Note on symbols : L = Lepidoptera; D = Diptera; C = Coleoptera; N = Nematodes

Synthetic Bt genes are needed for expression in plants, since the whole (130 kDa) *Bt* gene would result in a low level of transgene expression. Besides, the native *Bt* genes have

some undesirable characteristics different from plant genes, for example, low %G+C content (Murray, et al., 1991), some secondary structures, plant terminating signals, inappropriate spicing or

cleavage sites, poor codon usage, polyadenylation in region of high %A+T content, etc (Mandaokar, et al., 1999). Thus, a synthetic Bt gene is created based on the following suggestions (Mandaokar, et al., 1999):

1. Some interfering sequences, e.g., plant polyadenylation signals (AATAAA, AATGAA, AATATT, GATAAA, and AATAAG), must be deleted or modified.

2. If the “polymerase II termination sequence CAN7-9AGTNNA” is present, this sequence must be modified, because it is the 3' end of the coding region of the U2 snRNA genes of *Arabidopsis thaliana*.

3. The CUUCGG hairpins must be modified, since they interfere with mRNA processing in plant post-transcriptional modification.

4. The plant consensus splice sites 5' = AAG:GTAAGT and 3' = TTTT(Pu) TTT(Pu) T(Pu)T (Pu)TGACAG:C (where Pu is purine) must be eliminated.

5. %A+T content must be reduced, and thus the %G+C content must be increased to approximately 50%G+C content, as normal plant genes usually have.

6. The synthetic Bt genes must be designed in such a way that its frequency of codon usage approaches the frequency of the preferred codon usage of the host plant cells. The preferred codon usage is the preference given to one codon among the choice of many degenerate codons for an amino acid. The following equations may be calculated.

$$\text{Codon usage freq.} = \frac{\text{Number of times of the specific codon being used in translating a gene into an amino acid sequence}}{\text{Total number of the degenerate codons in a gene sequence encoding for one specific amino acid}}$$

Once the codon usage frequency is obtained, the overall (%) average deviation (%AD) must be determined. The %AD must not exceed 25%, and the 10 %AveDev is desired for

optimal synthetic Bt genes, because the lower %AD means that the deviation of the codon usage frequency of the synthetic Bt gene is less deviated from the codon usage preference of the host plants.

$$\%AD = \sum_{n=1}^Z \left(\frac{|X_n - Y_n|}{X_n} \right) \times 100$$

%D or overall (%) average deviation (in context) is the sum of all % deviation of each codon usage from codon (n = 1) to codon (n = Z), all divided by the total number of codon (Z), where X_n is a frequency of the usage for codon (n) in the host plant, and Y_n is a frequency of the usage for codon (n) in the synthetic gene. Codon (n) is just any codon that specifies an amino acid on the gene sequence. For the deviation, it is the absolute difference between X_n and Y_n, and the % deviation is the multiple of 100.

Plasmid vector is the next material required for rice transformation. The synthetic *Bt* gene must be placed in control of a strong promoter of choices for a high level of Bt toxin production in rice. Various **promoters** used in rice transformation are demonstrated in **Table 6**. Constitutive promoters such CaMV 35S, rice Actin-1, maize ubiquitin, maize Emu, and maize Adh1 have been

successfully tried. Other specific-purpose promoters have already been tested. See **Table 6** for references. The most frequently used promoter is CaMV 35S promoter, which is strong, constitutive, and expressing in all tissue independently of developmental or environmental signals (Datta, 1999).

Table 6. Promoters used in rice transformation (Datta, 1999).

Promoter	Source	Pattern of Expression	Reference
35S	CaMV	Constitutive	Terada and Shimamoto, 1990; Datta, 1990; Battraw and Hall, 1991; Mitsuohara, et al., 1996
Actin-1	Rice	Constitutive	McElroy, et al., 1990; Zhang, et al., 1991; Wu, et al., 1997
Ubiquitin	Maize	Constitutive	Toki, et al., 1992; Cornejo, et al., 1993
Emu	Maize	Constitutive	Chamberlain, et al., 1994
Adh1	Maize	Constitutive	Kyozuka, et al., 1991
PEPc	Maize	Green tissue	Matsuoka, et al., 1994; Datta, et al., 1996
Pith	Maize	Pith tissue	Datta, et al., 1998
LHCP	Rice	Leaves, stems, floral organs	Tada, et al., 1991
Rbc-S	Rice	Mesophyll	Kyozuka, et al., 1993
Osg 6B	Rice	Tapetum	Yokoi, et al., 1997
Pin2	Potato	Wound inducible	Duan, et al., 1996
NOD	Legume	Selective expression	Reddy, 1998
Histone H3	Wheat	Meristematic tissue	Terada, et al., 1993
rolC	R1 plasmid	Vascular and embryonic	Mutsuki, et al., 1989
RTBV	RTBV	Phloem tissue	Yin and Beachy, 1995

Other than the *Bt* gene and the promoter, a **selective marker** is also crucial for selection of the transformants in a distinguishing medium containing a selective agent. The selective markers and selective agents for rice transformation have been summarized in **Table 7** by Datta (1999). S.K. Datta suggests that the antibiotic **hygromycin** is an excellent selectable agent for both Japonica rice (Shimamoto, et al., 1989) and Indica rice (Datta, et al., 1990), when the **hph** gene is driven by CaMV 35S promoter. For antibiotic kanamycin and geneticin (G418), the effectiveness for rice transformant selection is comparatively lower than hygromycin (Datta, 1999). In other rice transformation experiment, a herbicide **phosphinothricin (PPT)** is also found effective for selection of the transformants after transformed rice with a bar or pat selectable marker gene (Cao, et al., 1992; Datta, et al., 1992; Rathore, et al., 1993; Christou, et al., 1991). For mechanism of resistance, the selectable marker gene will encode an enzyme, e.g., antibiotic phosphotransferase (APH), or phosphinothricin N-acetyl phosphotransferase (PAT) that will phosphorylate or acetylate the selective agent, e.g., the antibiotics (hygromycin, kanamycin, geneticin) by APH, or the herbicide phosphinothricin by PAT, respectively (**Table 7**). The methotrexate can be used as a selective agent (Hauptmann, et al., 1988; Meijir, et al., 1991) but not so popular. Above all, the effective concentration of the selective agent and the timing of selection pressure are critical for the success of selecting the transformants and need to be optimized for each rice cultivar (Datta, 1999).

Variety of **rice tissue culture media** (Datta, 1999) have been used for rice transformation experiments, for example, MS medium (Murashige and Skoog, 1962), N6 medium (Chu, et al., 1975), AA medium (Muller and Graffe, 1978), R2 medium (Ohira, et al., 1973, Fujimura, 1985). For review of rice tissue culture media, see Vasil (1987). S.K. Datta (1999) suggests that in the past Indica rice was more difficult to transform than Japonica rice, but at present transformation of both Japonica and Indica rice could be achieved (Datta, et al., 1996a and 1996b).

Methods:

Rice explant and rice tissue culture preparation (Datta, et al., 1997 and 1999) are needed for the rice transformation experiments. The somatic tissues or organs such as mature seeds, scutellar tissue, immature inflorescence, and immature embryo may be used as explants. The immature embryos come from rice seeds of the spikelets collected 10–12 days after anthesis. The explants must be sterilized first with 70% ethyl alcohol and then in 45% chlorox. After the explants have been prepared, the callus could be induced by callus induction medium, usually MS medium with 2 mg/mL of 2, 4-D. Every 3–4 weeks after callus induction, embryonic calli must be selected and subcultured in the same medium. The embryonic calli are whitish to light yellow in color, compact, and relatively dry, whereas the no-embryonic calli are yellow, watery, loose, and friable.

Table 7. Selective agents used in rice transformation (Datta, 1999).

Selective agents	Concentration (mg/L)	Effect of selective agent on rice	Resistant gene	Resistant enzyme	Resistant mechanism against selective agent	Reference
1. Antibiotics						
Hygromycin	25.0 ^a 50.0 ^b 75.0 ^c	Protein synthesis	<i>hph</i> (<i>aph IV</i>)	APH(4')	Phosphorylation of hygromycin	Shimamoto, et al., 1989 Datta, et al., 1990
Kanamycin	100.0	Protein synthesis (NPT II)	<i>aphA2</i>	APH(3') II	Phosphorylation of kanamycin	Zhang, et al., 1988 Battraw and Hall, 1990
Geneticin (G418)	25.0	Protein synthesis	<i>aphA2</i>	APH(3') II (NPT II)	Phosphorylation of gentamycin	Peterhans, et al., 1990
2. Herbicides						
Basta TM Phosphothricin (PPT)	5-25	Amino acid synthesis	<i>bar</i> , <i>pat</i>	PAT	Acetylation of PPT	Christou, et al., 1991 Cao, et al., 1992 Datta, et al., 1992 Rathore, et al., 1993
3. Methotrexate		Nucleotide synthesis	<i>dhfr</i>	DHFR	Inhibit enzyme DHFR	Hauptmann, et al, 1988 Meijir, et al., 1991;

Note : (a) protoplast method, (b) Biolistic method, (c) *Agrobacterium* method

Rice transformation techniques (Datta, et al., 1997 and 1999) that are currently and popularly used include mainly of (Figure 2): (1) protoplast-mediated method, (2) *Agrobacterium*-mediated method, and (3) Biolistics-mediated method.

Protoplast-mediated gene transfer (Datta, et al., 1997 and 1999) requires the ability to isolate and culture protoplasts in large numbers and the ability to regenerate plants from protoplast-derived calli. Protoplast may be prepared from embryonic cell suspension (ECS), which is initiated from calli produced from explants mature seeds, immature embryos, anthers, and developing microspores, or embryonic calli (Vasil, 1987). The ECS establishment depends on genotype of rice, and Japonica rice seems to manipulate easier than Indica rice. The ECS can be established by placing the embryonic calli in a cell suspension medium, e.g., AA or R-2 medium. Then, the protoplasts can be isolated by an enzyme solution containing cellulase and pectolyase. The isolated protoplasts will be induced to take up the DNA by the mediation of polyethylene glycol (PEG). After gene transfer using PEG mediation, the transformed protoplasts will be cultured in P1 medium with selective agent (i.e., hygromycin) for two weeks. The transformants are subcultured in P2 medium for two weeks, before the rice plants are regenerated by a P3 regeneration medium. The whole process of protoplast-mediated transformation (Figure 2) would take at least 2-3 months.

***Agrobacterium*-mediated gene transfer** (Datta, et al., 1997 and 1999) has recently

showed capability of rice transformation (Raineri, et al., 1990; Chan, et al., 1992; Hiei, et al., 1994, Dong, et al., 1996; Datta, et al., 1996b). The *Agrobacterium* virulent strains must contain an extra chromosomal Ti-plasmid with an intact vir region, which is involved in tumorigenicity of the infected plants. On the Ti-plasmid, there is also a T-DNA or T-region containing onc genes for production of phytohormones that leads to plant tumor formation. The T-region or transfer-region is flanked by left and right 24-bp direct repeats, which are essential for signal recognition during the transfer and T-DNA integration into the plant genome. The T-region of the Ti-plasmid usually contains the transgene of interest (*Bt* gene), a promoter (CaMV 35S), and a selectable marker gene (*hpt* and/or GUS). Rice embryonic calli will be infected with *Agrobacterium* containing the constructed Ti-plasmid in liquid N6-AS infiltration medium with acetosyringone. Then, the embryonic calli are sterilized with containing cefotaxime to remove *Agrobacterium*. If GUS activity would be tested, place some calli in GUS staining solution, and the rest of the calli are selected for transformants by N6-CH selection medium containing cefotaxime and hygromycin. The transformant embryonic calli are regenerated into rice plants in a regeneration medium, usually MS medium with kinetin and NAA. The whole process of *Agrobacterium*-mediated gene transformation (Figure 2) would take at least 1-2 months.

Biolistics-mediated gene transfer (Datta, et al., 1997 and 1999) can help reduce the time and labors used to maintain the rice tissue culture. The longer time of rice calli exposed to the *in vitro*

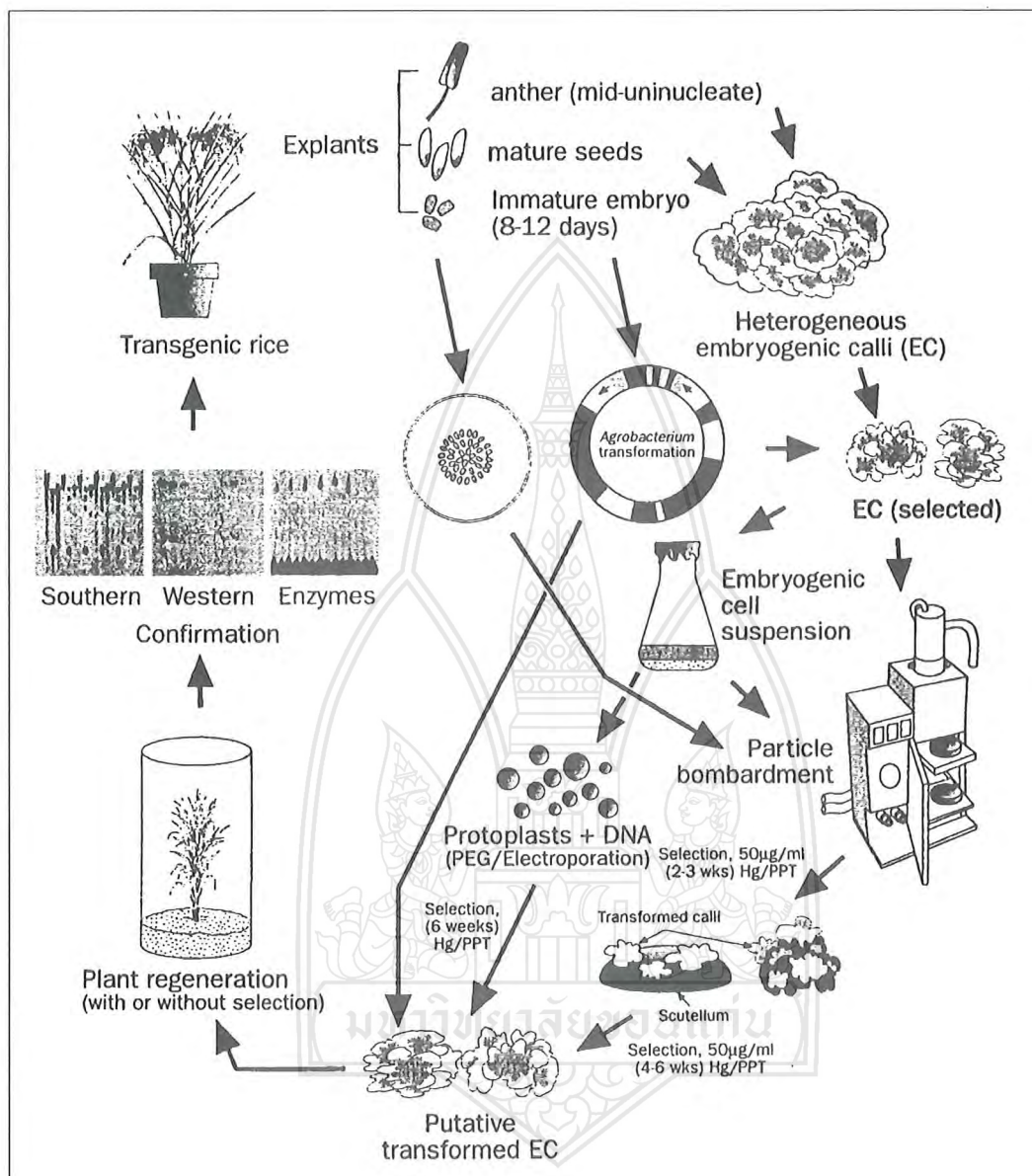


Figure 2. A schematic diagram shows how to produce transgenic rice: rice explant selection, rice tissue culture, rice transformation methods (e.g., protoplast-mediated, *Agrobacterium*-mediated, and Biolistics-mediated methods), transformant selection, rice plant regeneration, molecular analyses, bioassay, and field test (Datta, et al., 1997).

conditions causes the loss of plant regeneration ability. Thus, the Biolistic transformation is currently used widely in many laboratories around the world. Christou, et al. (1991) have showed that rice immature embryos and embryonic calli from immature embryo or mature seeds can be explants for Biolistic transformation. The gold particles are used as microcarriers to carry the transgene (DNA) into rice explants via particle bombardment. After the bombardment, the explants are placed into MS2D medium containing 2 mg/mL of 2, 4-D and a selective agent (hygromycin). The selection is repeated 3 times at a 2-week interval. Then, the rice plants are regenerated by a regeneration medium, usually MS medium with kinetin and NAA. The whole process of Biolistics-mediated gene transformation (Figure 2) would take at least 1-2 months.

Molecular Analyses of Data :

Isolation of genomic DNA from transgenic rice plants can be obtained from leaf tissues, which typically yields 40-60 µg per gram tissue (Datta, et al., 1997). For reference of plant DNA minipreparation, see Dellaporta, et al. (1983). After the DNA extraction, the concentration of the extracted DNA is determined by agarose gel electrophoresis and/or by spectrophotometry. The DNA from each plant is digested with specific restriction enzymes. Then, the digested DNA is run in 1% agarose gel electrophoresis. The DNAs in the gel are blot-transferred onto a nylon membrane. The *Bt* gene from the transgenic rice is detected by a radioactively labeled probe and autoradiography. This procedure is collectively

known as **Southern blotting and hybridization** (Southern, 1975). The expected size of the *Bt* gene is about 1.8 kb (Figure 3).

The similar blotting and hybridization technique may be done with the mRNA, and this is called **Northern blotting and hybridization**. The isolated RNA from leaf tissues of the transgenic rice is run on the 1% agarose gel electrophoresis and blot-transferred onto a nylon membrane. Then, the mRNA of the *Bt* gene is detected by a radioactively labeled probe and autoradiograph. For general protocol, see Ausubel, et al. (1998). After the *Bt* gene is confirmed to be integrated into the genomic DNA of the transgenic plants by Southern analysis and the *Bt* mRNA is detected by the Northern analysis, the next molecular evidence to be proved is the **Western blotting of *Bt* toxic protein**. Similarly, the protein bands from polyacrylamide gel electrophoresis are blot-transferred onto a nitrocellulose membrane. Then, the *Bt* toxic protein band is detected with antibodies or protein staining. The expected size of the *Bt* toxic protein is about 65 kDa (Figure 4).

Insecticidal Test and Bioassay :

Bt-rice could gain resistance to insects in the families Lepidoptera, Diptera and Coleoptera, e.g., yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*), striped stem borer (*Chilo suppressalis*), leafroller species (either *Marasmia patnalis* or *Cnaphalocrocis medinalis*) (Datta, et al., 1999). For more information about rice insect pests, look at Shepard, et al. (1995), and Pathak and Khan (1994). The following would describe briefly about bioassay for testing of the insecticidal activity of *Bt* toxin.

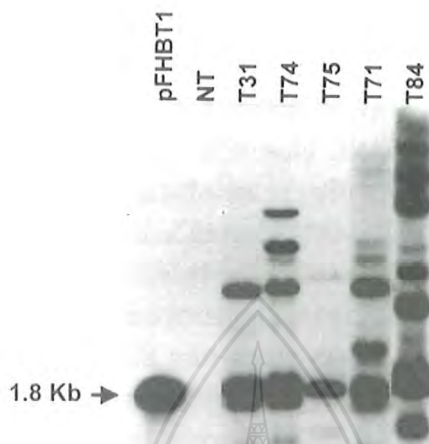


Figure 3. Molecular analysis of the genomic DNA from *Bt* rice by Southern blotting and hybridization (Tu, et al., 1998). PFHBT1 is a positive control or a plasmid containing a *Bt* gene and cut with *HindIII* and *SstI* restriction enzymes. NT is a negative control or non-transformed IR72 rice plant. T31, T74, T75, T71, and T84 are transgenic (*Bt*) rice plants. From the figure, the expected band of 1.8 Kb of the *Bt* gene is detected in all of the transgenic rice plants.



Figure 4. Molecular analysis of the protein extracts from *Bt* rice by Western blotting and analysis with 10% (w/v) SDS-PAGE (Tu, et al., 1998). 50 μ g of total soluble protein is loaded per lane. *CryIA(b)* is a positive control or purified *Bt* toxin. NT is a negative control or protein extracts from non-transformed IR72 rice plant. All the T9 are protein extracts from transgenic (*Bt*) rice plants. From the figure, the expected band of 60 KDa of the *Bt* toxic protein is detected in all of the transgenic rice plants.

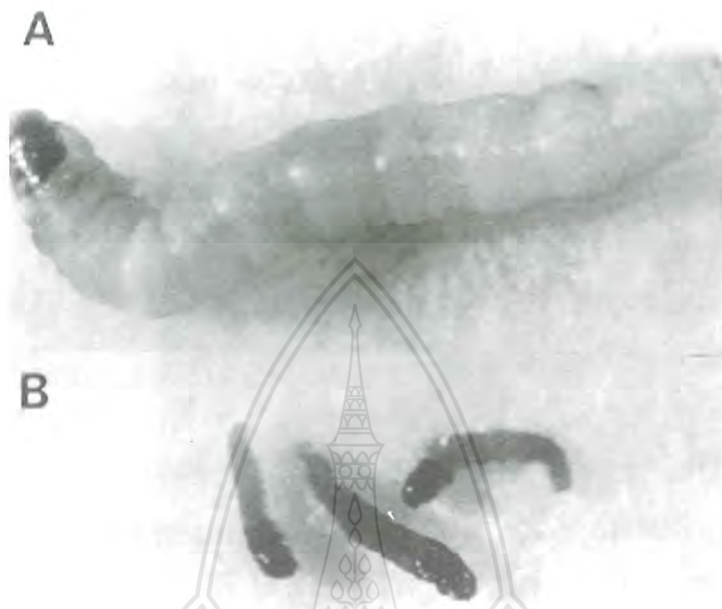


Figure 5. Yellow Stem Borer (YSB) larva (Tu, et al., 1998). (A) Live YSB larva after feeding for 4 days on a stem from a non-transformed IR72 rice plant. (B) Dead YSB larvae after 4-day feeding on a stem from a transgenic (*Bt*) rice.

For bioassay of stem borers, first collect female moths and allow them to lay eggs. The eggs would take about 8 days to hatch at 25 °C and usually at time between 0600 and 1200h (Datta, et al., 1999). The larvae will die in a few hours unless they are placed on plants. The plants are grown in sterilized soil and are properly fertilized and kept healthy. Both non-transformed and transgenic rice plants are arranged in a randomized complete block design with four replications. The larvae are fed for 4 days on a petri dish with two 7-cm stem pieces cut from rice tillers. The numbers of dead and alive larvae are recorded after 4 days of feeding on a negative control and on *Bt* rice.

Discussion:

According to Cohen, et al. (1999), the most toxic *Bt* genes on yellow stem borers (*Scirpophaga incertulas*) are *cry1A(b)*, *cry1B*, *cry2A*, *cry1A(a)*, *cry1E*, *cry1D*, and *cry1C*, sequentially in the order of decreased toxicity. *Bt*-rice with *cry1a(b)* gene and others (Table 5) do not show high and consistent toxin level enough to provide the high dose required for resistant to insect pests. The constitutive promoters seem to give the higher and more consistent level of *Bt* toxic proteins than the tissue-specific promoters do (Table 6). To date, the current suggestion for *Bt* high dose for rice is about 1% of the total soluble proteins in rice, otherwise the low dose of *Bt* toxin will lead to *Bt*-resistant insect pests.

Currently, there have been reports and concerns of the *Bt*-resistant insects due to the increased selection pressure by implementing the *Bt*-spray and/or *Bt*-plants in nature (Tabashnik, et al., 1990; Whalon, and McGaughey, 1993; Tabashnik, 1994). Tabashnik, et al. (1997) discover that one gene in the insect (diamondback moth) can confer resistance to *Bt* toxin. The evolution of the *Bt*-resistant insects is inevitable and will finally arrive unless other measures are conducted.

By the way, *Bt* resistance management strategies have been suggested to slow down the progress of the insect *Bt*-resistant evolution as follows (McGaughey and Whalon, 1992; Alstad and Andow, 1995; McGaughey, et al., 1998; Mandaokar, et al., 1999):

1. Rotation of *Bt* toxin, chemical insecticides, and biological controls. The integrated pest management (IPM) should remain kept practiced.

2. Mixture of different toxins, e.g., *Bt* toxin, chitinase, etc. Having two biochemically unrelated toxins in *Bt*-rice, each at high dose, can significantly decrease the rate of resistance development.

3. Refuges for reduction of selection pressure on *Bt*-resistant insects. The recommended ratio of *Bt* plants to refuge plants (non-*Bt*-plants) is 80% *Bt* plants to 20% non-*Bt*-plants (Cohen, et al., 1999).

4. Ultra high dose of *Bt* toxins. McBride, et al. (1995) found that the *Bt* toxin level may be extraordinarily increased by introducing the *Bt* gene into the chloroplasts of tobacco.

5. Control of gene expression. Spatial, temporal, inducible, constitutive, tissue-specific, stage-specific (vegetative or reproductive), and wound-specific promoters (Table 6) are now available for control of the desired gene expression.

There are many public concerns regarding to the biosafety of *Bt* rice. Even though *Bt* toxic proteins are known to be specific for only in insect, but the concerns remain in the dose effect of eating *Bt* rice three times a day (Datta, 1999). The *Bt* toxin may not lead to toxic effects directly, but an allergy to *Bt* toxic proteins may be developed in some people. However, food allergy is relatively rare, but we shall never overlook. The alternative solution could be done by using tissue-specific promoters (Table 6) to express *Bt* toxin in only green tissues (e.g., PEPc promoter) or in pith tissues (e.g., pith promoter). Thus far, neither the PEPc nor pith promoter would provide a consistently high dose of toxin when used alone, but they may work well in combination (Cohen, et al., 1999). More scientific research on *Bt*-rice as daily food should be more emphasized soon before released.

Conclusion:

In conclusion, "*Bt*-rice" is a rice plant produced by means of genetic engineering and into which an insecticidal gene (*cry*) from a soil bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) has been incorporated. The genetic engineering is a very powerful tool to help improve rice variety. It takes only two years to develop a new rice variety by genetic engineering, while it requires 8-10 years in producing a new variety by conventional breeding

(Datta, 1999). So far, *Bt*-plants such as maize, potato, and cotton, have already been released and grown worldwide by farmers in several countries. The *Bt*-rice will soon be available to farmers in the next few years. The *Bt*-rice will bring new hope and strategy to deal with insect pests that cause rice yield losses. The most important caterpillar pests are the yellow stem borers (*Scirpophaga incertulas*) in the tropical Asia and the striped stem borers (*Chilo suppressalis*) in temperate areas (Cohen, et al., 1999). These insect pest problems would be dramatically decreased providing that the *Bt*-resistant management and other integrated pest controls are kept practiced. The introduction of *Bt* gene into rice genome would also widen the rice genetic biodiversity and enrich the rice genomic constitution. In the long run, *Bt*-rice cultivation is expected to bring more benefits than hazards to humans and environments.

Acknowledgment :

My sincere thanks are to give to the International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines, for a scholarship award for training on transgenic rice research from November 1 to December 1, 1999, under a supervision of Dr.S.K. Datta at Plant Breeding, Genetics, and Biochemistry (PBGB) Division. My appreciation is extended toward all the PBGB staff at IRRI for training and to Shiela at the IRRI library for providing me with the photocopy service of the scientific journals. I also appreciate the discussion with Dr.P.M. Reddy at Soil and Water Division, IRRI, about the Biological Nitrogen Fixation (BNF) in rice.

References

- Alam, M.F., Datta, K., Vaquez, A.R., et al. 1996. Transformation of new plant type lines through biolistic and protoplast methods. *Rice Genetics Newsletter*. 13: 139-141.
- Alam, M.F., Datta, K., Vasquez, A.R., et al. 1996. Production of fertile transgenic new plant type rice using protoplast and biolistic systems. In Proceedings of the Third Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology: Issues and Choices. 10-15 November 1996. Hua Hin, Prachuapkhirikhan, Thailand. p.257-260.
- Alam, M.F., Datta, K., Abrigo, E., et al. 1998. Production of transgenic deep-water indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* gene with enhanced resistance to yellow stem borer. *Plant Science*. 135(1): 25-30.
- Alam, M.F., Datta, K., Abrigo, E., et al. 1999. Transgenic insect-resistant maintainer line (IR68899B) for improvement of hybrid rice. *Plant Cell Reports*. 18: 572-575.
- Alstad, D.N., and Andow, D.A. 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*. 268: 1894-1896.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., et al. 1998. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.

- Battraw, M.J., and Hall, T.C. 1990. Histochemical analysis of CaMV promoter β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol. Biol.* 15: 527-538.
- Berliner, E. 1995. Über die Schlafsucht der mehlmotenraupe. *Z. Angew. Entomol.* 2: 29-56.
- Burkhardt, P., Beyer, P., Wunn, J., et al. 1997. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudo-narcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant Journal.* 11(5): 1071-1078.
- Cao, J., Duan, X., McElroy, D., and Wu, R. 1992. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Reports.* 11: 586-591.
- Chamberlain, D.A., Bretell, R.S., Last, D.I., et al. 1994. The use of the Emu promoter with antibiotic and herbicide resistance genes for the selection of transgenic wheat callus and rice plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 95-112.
- Chan, M.T., Lee, T.M., and Chang, H.H. 1992. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiol.* 33(5): 577-583.
- Chareonpornwattana, S., Thara, K.V., Wang, L., et al. 1999. Inheritance, expression, and silencing of chitinase transgene in rice. *Theor. Appl. Genet.* 98: 371-378.
- Christou, P., Ford, T.F., and Kofron, M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa*) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology.* 9: 957-962.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, S.S., et al. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18: 659-668.
- Cohen, M., Bentur, J.S., Dirie, A., et al. 1999. Wall Posters. Entomology and Plant Pathology Division, International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines.
- Cornejo, M.J., Luth, D., Blankenship, K.M., et al. 1993. Activity of maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol. Biol.* 23: 567-581.
- Datta, K., Oliva, N., Torrizo, L., et al. 1996a. Genetic transformation of indica and japonica rice by *Agrobacterium tumefaciens*. *Rice Genet. Newslet.* 13: 136-139.
- Datta, K., Torrizo, L., Oliva, N., et al. 1996b. Production of transgenic rice by protoplast, biolistic and *Agrobacterium* system. Proc. 5th Internat. Symp. Rice Mol. Nbiol. Yi Hsiem Pub. Co., Taipei, Taiwan. p.159-167.
- Datta, K., Vasquez, A., Tu, J., et al. 1998. Constitutive and tissue-specific differen-

- tial expression of the *cryIA(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor. Appl. Genet.* 97(1/2): 20-30.
- Datta, K., Velazhahan, R., Oliva, N., et al. 1999. Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1138-1145.
- Datta, S.K., Peterhans, A., Datta, K., and Potrykus, I. 1990. Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology.* 8: 736-740.
- Datta, S.K., Datta, K., Soltanifar, N., et al. 1992. Herbicide-resistant indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG mediated transformation of protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 20: 619-629.
- Datta, S.K., Torrizo, L.B., Tu, J., Oliva, N., and Datta, K. 1997. Production and molecular Evaluation of transgenic rice plants. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines. 42 pages.
- Datta, Swapan K. 1999. Transgenic Cereals: *Oryza sativa* (rice). In Molecular of Cereal Crops, edited by I.K. Vasil. Kluwer Academic Publishers. U.K. p.149-187.
- Datta, S.K., Datta, K., Tu, J., et al. 1999. A Workshop on Transgenic Rice: Production and Development with Special Reference to Sheath Blight and Stem Borer Resistance. 11-29 October 1999. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines. 113 pages.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4): 19-21.
- Dong, J.J., Teng, W.M., Buchholz, W.G., and Hall, T.C. 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation of an elite cultivar of Texas rice. In Rice Genetics III, edited by G.S. Khush. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium. International Rice Research Institute (IRRI), Los Banos, The Philippines. p.143-151.
- Duan, X., Li, X., Xue, Q., et al. 1996. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology.* 14: 494-498.
- Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto, M., et al. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified β -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology.* 11: 1151-1155.
- Fujimura, T., Sakurai, M., Akagi, H., et al. 1985. Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Cult. Lett.* 2: 74-75.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., and Pietrantonio, P.V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Hauptmann, R.M., Vasil, V., Ozias-Akins, et al. 1988. Evaluation of selectable markers

- for obtaining stable transformants in the gramineae. *Plant Physiol.* 86: 602-606.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. *Plant Journal.* 6: 271-282.
- Hofte, H., and Whiteley, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbial Rev.* 53: 242-255.
- Hossain, M., and Fischer, K. 1995. Rice research for food security and sustainable agricultural development in Asia: achievements and future challenges. *Geo. Journal.* 35: 286-298.
- IRRI. 1993. IRRI Rice Almanac. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines.
- IRRI. 1997. Brochure in IRRI Rice Facts. International Rice Research Institute (IRRI). Manila, The Philippines.
- Kloti, A., Futterer, J., Terada, R., et al. 1995. Toward genetically engineered resistance to tungro virus. In Rice Genetics III, edited by G.S. Khush. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines.
- Kloti, A., Henrich, C., Bieri, S., et al. 1999. Upstream and downstream sequence elements determine the specificity of the rice tungro bacilliform virus promoter and influence RNA production after transcription initiation. *Plant Mol. Biol.* 40(2): 249-266.
- Knowles, B.H., and Dow, J.A.T. 1993. The crystal β -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*-models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays.* 15: 469-476.
- Kozziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., et al. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology.* 11: 194-200.
- Krattiger, A. 1997. Insect Resistance in Crops: a Case Study of Bacillus thuringiensis (Bt) and its Transfer to Developing Countries, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications Briefs No.2, ISAAA, Ithaca, New York, USA.
- Kyozuka, J., Fujimoto, H., Izawata, T., et al. 1991. Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize *Adh1* promoter in transgenic rice plants and their progeny. *Mol. Gen. Genet.* 228: 40-48.
- Kyozuka, J., McElroy, D., Hayakawa, T., et al. 1993. Light regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* fusion genes in transgenic rice. *Plant Physiol.* 102: 991-1000.
- Kumar, P.A., Mandaokar, A.D., Sreenivasu, K.A., et al. 1998. Insect resistant transgenic brinjal plants. *Mol. Breed.* 4: 33-37.
- Ladha, J.K., de Bruijn, F.J., and Malik, K.A. 1997. Opportunities for Biological

- Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Ladha, J.K., and Reddy, P.M. 1999. Nitrogen Fixation in Rice. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines. (in press).
- Lin, W., Anuratha, C.S., Datta, K., et al. 1995. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technology*. 13: 686-691.
- Maagd, R.A., Bosch, D., and Stiekema, W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science*. 4(1): 9-13.
- Mandaokar, A.D., Anand Kumar, P., Malik, V.S., and Sharma, R.P. 1999. Bt-transgenic crop plants: progress and prospects. In Applied Plant Biotechnology, edited by V.L. Chopra, V.S. Malik, and S.R. Bhat. Science Publishers, Inc. New Hampshire, USA. P.285-300.
- Maqbool, S.B., Husnain, T., Riazuddin, S., et al. 1998. Effective control of yellow stem borer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M7 using the novel β -endotoxin cry2A *Bacillus thuringiensis* gene. *Molecular Breeding*. 4: 501-507.
- Matsuki, R., Onodera, H., Yamauchi, T., and Uchimiya, H. 1989. Tissue specific expression of The rolC promoter of the R1 plasmid in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 220: 12-16.
- Matsuoka, M., Kyoizuka, J., Shimamoto, K., and Kano-Murakami, Y. 1994. The promoter of two carboxylase in a C4 plant (maize) direct cell-specific, light-regulated expression in a C3 plant (rice). *Plant Journal*. 6: 311-319.
- McBride, K.E., Svab, Z., Schaaf, D.J., et al. 1995. Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology*. 13: 362-365.
- McElroy, D., Zhang, W., and Wu, R. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*. 2: 163-171.
- McGaughey, W.H., and Whalon, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*. 258: 1451-1455.
- McGaughey, W.H., Gould, F., and Gelernter, W. 1998. Bt resistance management. *Nature Biotechnology*. 16: 144-146.
- Meijer, E.G.M., Schilperoort, R.A., Rueb, S., et al. 1991. Transgenic rice cell lines and plant expression of transferred chimeric genes. *Plant Mol. Biol.* 16: 807-820.
- Mitsuhashi, I., Ugaki, M., Hirochika, H., et al. 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37: 49-59.
- Muller, A.J., and Graffe, R. 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana Tabacum* lacking nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* 161: 67-76.

- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murray, E.E., Rocheleau, T., Eberle, M., et al. 1991. Analysis of unstable RNA transcripts of insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants and electroporated protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 16: 1035-1050.
- Nayak, P., Basu, D., Das, S., et al. 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing CryI δ endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 94: 2111-2116.
- Ohira, K., Ojima, K., and Fujiwara, A. 1973. Studies on the nutrition of rice cell culture: a simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 14: 1113-1121.
- Parakarn, Jagkrit. 1998. Biological Nitrogen Fixing (BNF) Rice for the Future Agricultural Improvement. *Journal of Mahasarakham University.* 17(1):136-145. Also, on-line access via Internet at <http://www.msu.ac.th/bio-dept/BNF-Rice.htm>
- Pathak, M.D., and Khan, Z.R. 1994. Insect Pests of Rice. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines.
- Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., et al. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology.* 8: 939-943.
- Perlak, F.J., Stone, T.B., Muskopf, Y.M., et al. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* 22: 313-321.
- Peterhans, A., Datta, S.K., Datta, K., et al. 1990. Recognition efficiency of Dicotyledoneae-specific promoter and RNA processing signals in rice. *Mol. Gen. Genet.* 22: 361-368.
- Poehlman, J.M., and Sleper, D.A. 1995. Breeding Rice. In Breeding Field Crops, 4th Edition. Iowa State University Press. Iowa, U.S.A.
- Quimio, C., Torrizo, L., Abrigo, E., et al. 1997. Transgenic rice for submergence tolerance. *Philippines J. Crop Sci. Supp.* 1. 22: 1.
- Raineri, D.M., Bottinno, P., Gordon, M.R., and Nester, E.W. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/Technology.* 8: 33-38.
- Rathore, K.S., Chowdhury, V.K., and Hodges, T.K. 1993. Use of *bar* as selectable marker gene for the production of herbicide resistant rice plants from protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 21: 871-884.
- Reddy, P.M., Ladha, J.K., Ramos, M.C., et al. 1998. Rhizobial lipochitooligosaccharide nodulation factors activate expression of the legume early nodulin gene *ENOD12* in rice. *The Plant Journal.* 14: 693-702.

- Reddy, P.M. 1999. Personal communication. Soil and Water Division, International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines.
- Shepard, B.M., Barrion, A.T., and Litsinger, J.A. 1995. *Rice-Feeding Insects of Tropical Asia*. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines.
- Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T., and Fujimoto, H. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from protoplast. *Nature*. 338: 274-276.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gelelectrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stewart, C.N., Adang, M.J., All, J.N., et al. 1996. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. *Plant Physiol.* 112: 115-120.
- Strizhov, N., Keller, M., Mathur, J., et al. 1996. A synthetic *cryC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, confers Spodoptera resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 15012-15017.
- Tabashnik, B.E. Cushing, N.L., Finson, N., et al. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback moth (Lepidoptera: plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 47-79.
- Tada, Y., Sakamoto, M., Matsuoka, M., and Fujimura, T. 1991. Expression of a monocot LHCP promoter in transgenic rice. *The EMBO Journal*. 10(7): 1803-1808.
- Terada, R., and Shimamoto, K. 1990. Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 220: 389-392.
- Tarada, R., Nakayama, T., Iwabuchi, M., and Shimamoto, K. 1993. A wheat histone H3 promoter confers cell division dependent and independent expression of the *gusA* gene in transgenic rice plants. *The Plant Journal*. 3(2): 241-252.
- Toki, S., Takamatsu, S., Nojiri, C., et al. 1992. Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. *Plant Physiol.* 100: 1503-1507.
- Tu, J., Datta, K., Alam, M.F., et al. 1998. Expression and function of a hybrid *Bt* toxin gene in transgenic rice conferring resistance to insect pest. *Plant Biotechnology*. 15(4): 195-203.
- Vasil, I.J. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and crop plants. *J. Plant Physiol.* 128: 193-218.
- Yoshihara, T., Naoki, S., Goto, F., et al. 1997. Accumulation of iron in rice seed by transferring the soybean iron storage protein ferritin gene. Abstract 303, 5th Internat. Congr. Plant Mol. Bio. Singapore.

- Whalon, M.E., and McGaughey, W.H. 1993. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. In *Advanced Engineered Pesticides*, edited by L. Kim. Marcel-Dekker. New York, USA. P.215-231.
- Wu, C., Fan, Y., Zhang, C., et al. 1997. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified cryIA(b) gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Reports*. 17: 129-132.
- Wunn, J., Kloti, A., Burkhardt, P.K., et al. 1996. Transgenic Indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic cryIA(b) gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/Tech-nology*. 14: 171-176.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., et al. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene (HVA1) from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*. 110: 249-257.
- Yin, Y., and Beachy, R. 1995. The regulatory regions of the rice tungro bacilli form virus promoter and interacting nuclear factor in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Journal*. 7: 969-980.
- Yokoi, S., Tsuchiya, T., Toriyama, K., and Hinata, K. 1997. Tapetum-specific expression of the Osg6B promoter β -glucuronidase gene in transgenic rice. *Plant Cell Reports*. 16: 363-367.
- Zhang, W., McElroy, D., and Wu, R. 1991. Analysis of rice Act 5' region activity in transgenic plants. *Plant Cell*. 3: 1155-1165.
- Zhang, H.M., Yang, H., Rech, E.L., et al. 1988. Transgenic rice plants produced by electroporation mediated plasmid uptake into protoplast. *Plant Cell Reports*. 7: 379-384.

Effect of Selective Logging on the Barking Deer (*Muntiacus Muntjak*)

Moutasim Gamar Eldin, Mohamed Daud¹,

Mohamed Zakaria², Mohamed Zohadie³

ABSTRACT

In South East Asia, selective logging has been one of the main causes of disturbance to the rain forest. The extent to which the barking deer population could be maintained in selectively logged forest is of prime importance. A study was conducted at Sungai Lalang Forest Reserve, Semenyih, Selangor from February to October 1998. The aim was to determine the relative abundance of barking deer (*Muntiacus Muntjak*) in primary and logged forest. Three compartments were selected within the forest reserve: Compartment 18 (five-year-old logged), 33 (ten-year-old logged) and 24 VJR (primary forest). Track Identification Method was used to survey the deer along four transects at each compartment. Statistical test ANOVA was used to compare the relative abundance of barking deer at the primary and logged forest with the aid of a computer package SAS (Duncan's Multiple Range Test). The test indicated that the relative abundance of barking deer was significantly higher at the VJR ($314.01 / \text{km}^2$ $p = 0.0007$) than the average at the logged compartments ($60.04 / \text{km}^2$ and $181.61 / \text{km}^2$). It was also found that the relative abundance of barking deer was significant higher at the 10-years-old logged forest C33 than that of the 5-year-old logged forest.

Key Words : Selective logging, Compartment, Abundance

1. Introduction

The principal cause of wildlife habitat disturbance in South East Asia has been selective logging (Collins et al., 1991). Although the practice of selective logging is designed to remove

valuable timber trees of certain species, its effects on the forest are far from selective (Johns, 1986). To be a genuinely sustainable method of forest management, selective logging needs to provide a sustainable yield of timber and conserve

1. Assoc. Prof., Director of Technology and Head of Expert System for EIA, Faculty of Engineering, Universiti Putra Malaysia (UPM), 43400 Serdang, Selangor, Malaysia.

2. Head of Wildlife Department, Faculty of Forestry, UPM.

3. Prof., Faculty of Engineering, UPM.

biodiversity (Willott et al., 2000). The impacts of selective logging have been studied for some of the fauna. Zakaria and Nordin (1998) and Nordin and Zakaria (1997) who assessed the effect of logging on birds found differences in species composition between the primary and logged forest. The effect of logging on mammals worldwide is widely studied. Most of the studies were associated with other effects such as fire, drought, and poaching (Woods, 1988).

There is less information on the response of deer species to selective logging in the tropical rain forest of South East Asia. However the Department of Wildlife and National Parks, Malaysia (DWNP) reports made some general scanning on the effect of logging on deer species and described logging as having a negative impact on deer species. This study compared the relative abundance of barking deer in primary and selectively logged forest in the Malaysian State of Selangor.

2. Study Area

Three study sites were selected in Sungai Lalang Forest Reserve, Selangor for this study (Figure 1). These are Virgin Jungle Reserve (Sub-comp. 24), five-year-old logged forest (Comp. 18) and ten-year-old logged forest (Comp. 33): The primary forest was an 82 ha compartment surrounded by logged forest while the five and ten year-old logged forest have an area of 260 ha and 387 ha respectively. These study sites are a mix between lowland and hill dipterocarp forest with an elevation between 50m to 850m, and are valued for commercial timber extraction.

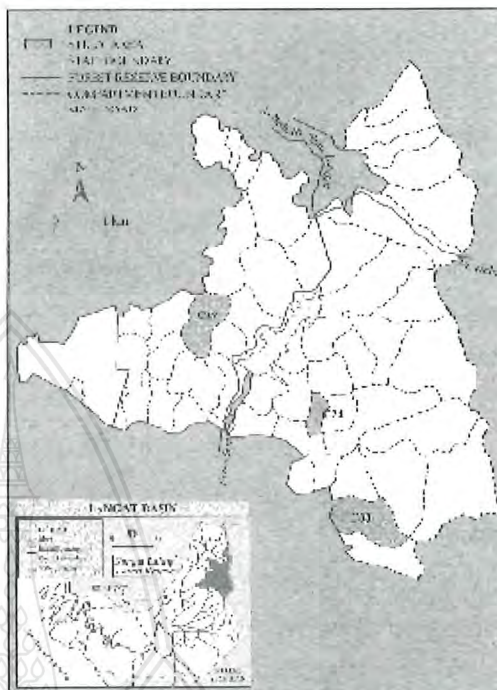


Figure 1. Study Sites at Sungai Lalang Forest Reserve

3. Methods

The transect method as described by Eberhardy (1987) was used to estimate the relative abundance. Surveys were normally conducted along twelve freshly cut trails (transects), four in each compartment. Transect length ranges between 1.00 to 2.00km. These transects were approximately of the same length so that sampling effort in each site was the same, thus, reducing a possible margin for difference between sites. Despite the constraint imposed by the small size of the VJR, it was possible to lay transect of 1.00 km. The transects were marked out using a measured rope and numbered red ribbons attached to trees at intervals of 0.02 km. The existing logging roads, compartment boundaries and forest trails were never used for sampling.

3.1 Surveys

Survey walks for track identification began as soon as sunshine and weather conditions permitted (frequently it was necessary to wait for moisture to clear and light is sufficient) to be able to identify tracks of barking deer. Most surveys began between 7:30 and 8:30 a.m. and all were completed before 2:00 p.m. The walking speed along transects was an average of 0.5 km/h. Data were recorded in a precisely designed data sheet.

3.2 Track Identification and Animal Counting

Surveys for tracks in each transect were conducted in one way direction. The search covered 5 meters perpendicular to the transect center at each side (left and right hand). The search also covered areas beyond the 5-meters boundary whenever possible. Each track (footprint) seen was first identified according to its shape. Secondly, the length, width, and depth of the track were measured using a measuring tape. Other tracks of the animal around the footprint (urine smell and eaten shoot) were recorded and used together with the footprints to identify the animal. Animal direction of movement (along transect upwards or cross left to right) was described. Glass plate technique was used to take the footprint outlines as described by Panwar (1979) to discriminate individuals of the same species at each walk. The technique included the carefully placing of a glass plate above the footprint and taking the footprint outlines using a marker pen. The drawing of the footprint was transferred to a paper. According to Riney (1982) this technique was tested for tiger and elephant and is promising for other ungulates.

Similar size footprints found in the same walk, with the same or similar footprint outlines are considered the footprints of only one animal and recorded only once in the data sheet. After recording all the needed information, the tracks were completely brushed to prevent double counting in the next walk.

3.3 Vegetation Cover

Tree height and crown cover were measured at three plots randomly selected at each transect. All plots have the same size of 5x5m. The plot center was marked with a yellow ribbon written in black ink showing the plot number and size and the borders were marked with red ribbons. Light spot method was used to measure tree crown cover. Tree height at each plot was measured and the average tree height for the plot was estimated. The horizontal distance from the observer to the tree was measured using a measuring rope. The angle between the horizontal line (observer height) and the treetop (crown) was measured and added to the observer height. The tree height was calculated using the formula: $X = d \sin \theta + h$

4. Results

Results of the survey carried out in primary forest C 24-VJR and logged compartments (C 18 and C 33) showed progressively decreasing average number of footprints of the barking deer from the VJR to the old logged forest C 33 to the recently logged forest C 18. There was apparent difference in the relative abundance of barking deer expressed as the number of footprints observed ($314.01/\text{km}^2$) at the primary forest ($p = 0.0007$).

Statistical test was used to compare the relative densities of barking deer at the primary and logged forest. The computer package SAS version 6.12 (Duncan's Multiple Range Test) was used to show the significance in the densities of barking deer at the primary and logged forest (Table 1). The test indicated that the relative density of the barking deer is significantly higher at the VJR ($314.01/\text{km}^2$) ($p = 0.0007$) than the average at the logged compartments ($60.04/\text{km}^2$) and ($181.61/\text{km}^2$). It was also found that the relative abundance of the barking deer was significantly higher at the 10-year-old logged forest C33 than that of the 5-years-old logged forest C18 (181.61 and $60.04/\text{km}^2$) respectively. The apparent difference in the relative abundance was indicated by the use of different letters (A, C and B) of Duncan range for the three compartments respectively.

Table 1. Relative Abundance of Barking Deer

Compartment	Number of Footprints / km^2	P	Duncan Range
C24	314.01	0.0007***	A
C18	60.04		C
C33	181.61		B

$NS = P > 0.05$, $*0.05 \geq P \geq 0.01$, $**0.01 \geq P \geq 0.001$, $***P \geq 0.001$

Results of measurements of tree heights and canopy covers in the logged and primary forests showed similar trend of significantly high values ($P=0.0001$). The virgin forest showed the highest values followed by the 10-year-old logged

forest and lastly, the 5-year-old logged forest. The VJR showed the highest average tree height (28.833m) and average canopy cover ($760420 \text{ m}^2/\text{Km}^2$). The logged compartment C33 showed the second highest tree height (12.924 m) and the second broadest canopy cover ($529170 \text{ m}^2/\text{Km}^2$) followed by C18 (Table 2).

Table 2. Average Tree Height and Canopy Covers

Compartment	Tree Height (m)	P	Canopy Cover (m^2/Km^2)	P
C24	28.833	0.0001***	760420	0.0001***
C33	12.924		529170	
C18	10.508		429170	

$NS = P > 0.05$, $*0.05 \geq P \geq 0.01$, $**P \geq 0.01$

5. Discussion

Logging is a common form of human disturbance that is often described as having a negative impact on tropical wildlife (Myers, 1984 and Fragoso, 1985). Primary forests are of vital importance in supporting a full range of rain forest species, but logged forests are able to support many animals, including some that cannot survive in small, isolated primary forest reserve (Johns, 1985).

The results show that logging has a negative effect on the relative densities of barking deer population. The declining of average relative densities of the animal starting at their highest following the sequence VJR followed by the ten-year-old logged forest and the five-year-old logged forest suggested that logging was one of the

factors affecting the abundance of barking deer at the logged compartments.

The significantly higher average relative density of barking deer at the virgin forest compared to the logged forest may suggest the availability of favorable conditions at the VJR. The favorable conditions may include the position of the VJR as a virgin forest surrounded by the logged portion of the compartment 24. This position was expected to provide the benefits of the virgin and the logged forests. The results suggested that barking deer use both habitats alternatively on a daily basis. This is the reason why the deer species had a high congregation around the VJR. The logged forest portion of the C 24 and the surrounding compartments provided the preferred food, as regeneration was rapid in the logged forest providing new shoot for the deer species. According to Johns (1985), "regeneration is rapid, however, stem density increases rapidly in recently logged forest as colonizing trees become established".

The primary forest was expected to provide shelter, nesting sites and breeding sites. Johns (1986; 1995) pointed out the importance of unlogged patches as breeding or feeding sites in addition to maintaining sedentary populations of vulnerable species. Results have shown that the representation of trees in terms of canopy cover and height changed significantly following logging. The VJR have shown significantly high tree canopy cover and height. The vegetation cover followed the same trend of higher values at the virgin forest than that in the logged forest, though no significant correlation was found between the number of footprints and vegetation cover.

In summary, the results suggested that the primary forest is of vital importance in supporting barking deer population. Accordingly, the presence of big patches of primary forest with significantly high canopy cover percentage within the logged area should be necessary to support some species as barking deer.

6. Conclusion

The study examined the effect of selective logging on barking deer (*Muntiacus Muntja*) in Sungai Lalang Forest Reserve, Malaysia. Foot prints and other animal tracks were identified and the relative abundance was determined in the primary and logged forest. The primary forest was found to have the highest relative abundance of barking deer expressed as the number of footprints per square kilometer.

The relatively high abundance of barking deer at the primary forest suggested the necessity of keeping a relatively large area of virgin forest within the logged forest. Alternatively keeping big patches of undisturbed forest within the logged forest may serve the same purpose.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the support received from the Ministry of Science, Technology and Environment Malaysia through the (IRPA) in completing this project. Also we are grateful to the Department of Wildlife and National Parks (DWNP) and staff in using their library and in giving useful suggestions and knowledge on wildlife.

References

- Collins, N. M., J. A. Sayer, and T. C. Whitmore. (Eds). (1991). *The Conservation Atlas of Tropical Forests/Asia and the Pacific*. Macmillan, London.
- Eberhardy, L. L. (1987). Transect Method for Population Studies. *J. Wildlife Manage.* 42(1): 1-29.
- Fragoso, J. M. (1985). The Effect of Selective Logging on Baird's Tapir. *Conservation Policy and Management*. 295-305.
- Myers, N. (1984). *The Primary Source: Tropical Forests and our Future*. Norton. New York. pp 399.
- Johns, A. D. (1985). Selective Logging and Wildlife Conservation in Tropical Rain-forest: Problems and Recommendations. *Biological Conservation*. 31(1985) 355-375.
- Johns, A. G (1995). Bird Population Persistence in Sabahan Logging Concession. *Biological Conservation*. 75,3-10.
- Johns, A. D. (1986). Effect of "Selective" Timber Extraction on Rain Forest Structure and Composition and Some Consequences for Frugivores and Folivores. *Biotropica* 20(1): 31-37.
- Nordin, M. and Zakaria, M. (1997). Some Effects of Logging in Mixed Lowland Dipterocarp Forests on Birds. In Ong Beng Gaik (Ed.)-*State of the Malaysian Environment*. Consumers Association of Penang Press, Malaysia. pp 161-166.
- Riney, T. (1982). *Study and Management of Large Mammals*. John Willey and Sons. USA.
- Panwar, H. S. (1979). A note on Tiger Census Technique. *Tiger Paper*. 6(2): 16-18.
- Varman, K. S and Sukumar. R. (1995). The Line Transect Tethod for Estimating Densities of Large Mammals in Tropical Deciduous Forest: An Evaluation of Models and Field Experiments. *J. Bioscience*. 20(2): 273-287.
- Woods, P. (1988). Effects of Logging, Drought, and Fire on Structure and Composition of Tropical Forests in Sabah, Malaysia. *BIOTROPICA*. 21(4): 290-298.
- Willott, S. J. Lim, D. C. Compton, S. G. And Sutton, S. L. (2000). Effects of Selective Logging on the Butterflies of a Bornean Rainforest. *Conservation Biology*. 14(4): 1055-1065.
- Zakaria, M. and Nordin, M. (1998). Comparison of Frugivory by Birds in Primary and Logged Lowland Dipterocarp Forests in Sabah, Malaysia. *Tropical Biodiversity*. 5(1): 1-9.

ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสาร วิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน
2. บทความปริทัศน์ ได้แก่งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูทางด้านวิชาการระดับต่าง ๆ
3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการย่อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและการเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ปกติ มีช่วงห่างระยะบรรทัดตามมาตรฐาน พิมพ์ลงในกระดาษขาว A4 (โรเดียวสั้น) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด หรือต้นฉบับพิมพ์ 1 ชุด และ Diskette ของบทความนั้น
2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะต้องสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตัวเอง 1 ฉบับ
3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้
4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ ไม่ยาวเกินไป และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น
5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน
6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วนหรือภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษตลอดทั้งการเขียนตัวสะกดการันต์ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน
7. ในกรณีของบทความวิจัย ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์
8. เชิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแก่ใจความเฉพาะตอนในบทความ ข้อความที่จำเป็นจะต้องมีเชิงอรรถให้ใช้เครื่องหมายดอกจัน (*) กำกับท้าย
9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว - ดำ ขนาดโปสการ์ด ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม
10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

อภิสิทธิ์ในการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 2 เล่ม และสำเนาพิมพ์อีก 15 ชุด

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหานี้ ให้ใช้ระบบหมายเลขเรียงตามลำดับที่อ้างอิง การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างอิงไว้แล้วในเนื้อหาเท่านั้น

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง จึงไม่ต้องมีหมายเลขกำกับในรายงาน แต่สรุปรวมเป็นรายชื่อเอกสารในส่วนของบรรณานุกรมโดยคำนึงถึงลำดับตัวอักษร (order system)

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.). ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์ หรือสำนักงานพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

2. เอกสารราชการ

ชื่อหน่วยราชการ. (เลขปี พ.ศ. หรือ ค.ศ.). ชื่อเรื่อง. ชื่อหนังสือ. เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์.

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่) : เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่) : เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

หมายเหตุ

- กรณีที่เป็นเอกสารอ้างอิงจากแหล่งอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนดข้างต้น เช่น จุลสาร, หนังสือพิมพ์ ฯลฯ ให้ยึดหลักการเขียนตามแบบข้างต้นโดยอนุโลม
- กรณีที่ผู้เขียน 2 หรือ 3 คน ให้เขียนตามแบบของผู้เขียนคนแรก แต่ให้เดิมคำว่า “และ” หรือ “and” หน้าชื่อสุดท้ายในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
- กรณีที่ผู้เขียนมากกว่า 3 คนขึ้นไป ให้ใส่เฉพาะผู้แต่งชื่อแรกและใส่คำว่า “และคณะ” หรือ “et. al.” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
- ถ้าเอกสารที่ถูกอ้างอิงอยู่ในระหว่างตีพิมพ์ให้ออกรายละเอียดมากที่สุดและใช้คำว่า “ระหว่างตีพิมพ์” หรือ “in press” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ โดยวงเล็บต่อท้ายเอกสารอ้างอิงนั้น

