วารสารเกษตร
JOURNAL OF AGRICULTURE
วารสารวิชาการของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีที่ 35 ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม 2562

การเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญา *Tetragonula laeviceps* (Smith) Species Complex ในสภาพกึ่งธรรมชาติ
ทักษพร สมมิตร จิราพร กุลสาริน ไสว บูรณพานิชพันธุ์ สมนึก บุญเกิด กนกวรรณ คำยอดใจ และ กฤษณะ เรืองฤทธิ์.....343

การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Cordyceps tenuipes* (Peck) เพื่อการผลิตเห็ดถั่งเฉ้าหิมะบนดักแด้ไหม
ฐิติณิชา ไชยชนะ จิราพร กุลสาริน ปิยะวรรณ สุทธิประพันธ์ ไสว บูรณพานิชพันธุ์ และ ธัญญา ทะพิงค์แก.....355

ผลของการใช้แมลงกินได้เป็นส่วนผสมในอาหาร SDB (Sabouraud Dextrose Broth) และวัสดุเพาะต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง *Cordyceps militaris* (L.) Link
โสภิณ คำแสนศรี จิราพร กุลสาริน ไสว บูรณพานิชพันธุ์ ธัญญา ทะพิงค์แก และ สิริญา คัมภิโร.....365

การผลิตมันเทศปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ชฎาพร ไชยลังกา ศิริมาศ ชัยชม เสาวลักษณ์ พิมขันท์ และ เกวลิน คุณาศักดากุล.....375

การผลิตดองดึง (*Gloriosa rothschildiana* O' Brien) ปลอดไวรัส CMV โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
พรสวรรค์ อุ่นศิลป์ ศิรินทร์ยา มีสวัสดิ์ และ เกวลิน คุณาศักดากุล.....385

การถ่ายทอดลักษณะแคระในเฟินกูดดอยใบมัน
สุรวิช วรรณไกรโรจน์ มล. จารุพันธ์ ทองแถม และ อนุพันธ์ สุรินรังษี.....395

ความสามารถในการยืดปล้องและการแสดงออกของยีน *SK2* ในข้าวป่าสามัญภายใต้สภาพน้ำลึก
ปฐมาภรณ์ มาสุด ศันสนีย์ จำจด และ ต่อนภา ผุสดี.....401

การประเมินประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกสำหรับการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกอ้อย
อภิรัฐ บัณฑิต.....413

การสะสมธาตุสังกะสีในข้าวไร่และข้าวนาสวนภายใต้การปลูกแบบไม่ขังน้ำและน้ำขัง
วรินธร วินสินจ้อย สิทธิชัย ลอดแก้ว และ ชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย.....425

การประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียและชีวภัณฑ์ในการลดความเป็นพิษของอาร์เซนิกในดิน
กนกขวัญ ปัญญาสิทธิ์ ยุพา จอมแก้ว และ อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง.....435

การประเมินการกร่อนดินและการสูญเสียธาตุอาหารภายใต้มาตรการอนุรักษ์ดินและน้ำในพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น
ธวัชชัย อินทร์บุญช่วย บุณฑริก ฉิมชาติ จุฑารัตน์ มนูญโย และ ศิริสุดา บุตรเพชร.....447

การคัดกรองและการประเมินประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียเพื่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว
อนุสรา พิศน้อย และ อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง.....461

คุณสมบัติทางกายภาพเคมีและการกักเก็บคาร์บอนและธาตุอาหารในดินที่เกิดจากหินภูเขาไฟและหินทรายในป่าเต็งรังที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่
จักรพงษ์ ไชยวงศ์ สุนทร คำยอง นิวัติ อนงค์รักษ์ ประสิทธิ์ วังภคพัฒนวงศ์ และ สุภาพ ปารมี.....475

ผลของการเสริมรำข้าวขาวต่อการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนและการย่อยได้ของโภชนะในโคเนื้อ
บุญฑริกา ปลั่งสูงเนิน เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ และ ณรกมล เลาห์รอดพันธ์.....487

ผลของอุณหภูมิสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต การย่อยได้ ลักษณะซากและองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อกระต่ายขุน
อรรถวิทย์ โกวิทวที พิพัฒน์พงษ์ จันทร์แดง การุณ ทองประจุแก้ว และ ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช.....495

ISSN 0857-0841
TCI กลุ่มที่ 1

คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ

เรื่องที่ตีพิมพ์

1. เป็นบทความวิจัย บทความปริทัศน์ หรือบทความวิชาการ ทางด้านเกษตรศาสตร์และสาขาที่เกี่ยวข้อง

2. ต้องไม่เคยได้รับตีพิมพ์มาก่อน (ต้นฉบับ หรือส่วนหนึ่งส่วนใดของต้นฉบับ) และต้นฉบับต้องไม่ได้อยู่ระหว่างกระบวนการพิจารณาลงตีพิมพ์ในวารสารหรือสิ่งตีพิมพ์อื่นใด

การเตรียมต้นฉบับ

1. **ภาษา** เป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ

2. **การพิมพ์**

1) พิมพ์หน้าเดียวบนกระดาษขนาด A4 พิมพ์แนวตั้ง (portrait orientation) ด้วยโปรแกรมไมโครซอฟต์ เวิร์ด (Microsoft Word for Windows) ตัวอักษรใช้ Cordia New โดยทั่วไปใช้ระยะบรรทัดปกติคือ 1 เท่า หรือ Single ความยาวต้นฉบับไม่เกิน 10 หน้า

2) ชื่อเรื่องให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 18 points พิมพ์ตัวหนา (bold) และจัดกึ่งกลางหน้า กระดาษ สำหรับชื่อเรื่องภาษาอังกฤษ กำหนดให้อักษรตัวแรกของคำให้พิมพ์ด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter)

3) ชื่อผู้เขียนให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 15 points พิมพ์ตัวหนา และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ

4) ที่อยู่และที่อยู่อีเมลของผู้เขียนให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 12 points พิมพ์ตัวเอียงธรรมดา (normal italic) และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ

5) บทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 points พิมพ์ตัวธรรมดา (normal) ยกเว้นเฉพาะคำ บทคัดย่อ และ Abstract ให้พิมพ์ตัวหนาและจัดชิดซ้าย

6) เนื้อหาให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 points พิมพ์ตัวธรรมดา (normal)

7) หัวข้อหลัก ได้แก่ คำนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผลการทดลองและวิจารณ์ สรุป เอกสารอ้างอิง ให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 16 points พิมพ์ตัวหนา และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ

8) หัวข้อย่อย ให้พิมพ์ตัวหนาและจัดชิดซ้าย

9) คำอธิบายตารางและภาพให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 points พิมพ์ตัวหนา โดยคำอธิบายตารางให้พิมพ์เหนือตารางและจัดชิดซ้าย ส่วนคำอธิบายภาพให้พิมพ์ใต้ภาพและจัดกึ่งกลางหน้า และคำอธิบายตารางและภาพถ้ามีมากกว่าหนึ่งบรรทัดให้เริ่มต้นพิมพ์บรรทัดถัดมาตรงกับข้อความของบรรทัดแรก

10) หากมีชื่อวิทยาศาสตร์ปรากฏในบทความ ให้เขียนตามหลักเกณฑ์การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ ในครั้งแรกที่ปรากฏชื่อนี้ให้สะกดเต็ม เช่น *Meloidogyne incognita* และหลังจากนั้นถ้ามีการระบุชื่อนี้อีกให้ย่อชื่อสกุล โดยเขียนเป็น *M. incognita*

11) คำว่า *et al.* และ *P* (*P*-value) ให้พิมพ์เอน

ข้อแนะนำการใช้ภาษา

1) ใช้คำศัพท์ตามพจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตยสถาน และประกาศของราชบัณฑิตยสภา

2) การเขียนชื่อเฉพาะหรือคำแปลจากภาษาต่างประเทศ ควรพิมพ์ภาษาเดิมของชื่อนั้น ๆ ไว้ในวงเล็บในครั้งแรกที่ปรากฏในบทความ โดยพิมพ์เป็นอักษรตัวพิมพ์เล็กทั้งหมด ยกเว้นชื่อเฉพาะให้พิมพ์เฉพาะอักษรตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่

3) ไม่ควรใช้ภาษาต่างประเทศถ้ามีภาษาไทยใช้อยู่แล้ว

4) รักษาความสม่ำเสมอในการใช้คำ คำศัพท์ และตัวย่อ โดยตลอดทั้งบทความ

การเรียงลำดับหัวข้อ ให้เรียงตามลำดับดังนี้

1. **ชื่อเรื่อง (Title)** ควรสั้น ชัดเจน และต้องสื่อเป้าหมายหลักของการศึกษาวิจัย มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ต้นฉบับที่เป็นภาษาไทยให้พิมพ์ชื่อเรื่องที่เป็นภาษาไทยก่อนแล้วตามด้วยชื่อเรื่องภาษาอังกฤษในบรรทัดถัดมา หากต้นฉบับเป็นภาษาอังกฤษ ให้พิมพ์ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษก่อนแล้วตามด้วยภาษาไทย

2. **ชื่อผู้เขียน** ให้ใช้ชื่อเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ หากผู้เขียนมีหลายคนและมีที่อยู่หรือสังกัดแตกต่างกัน ให้ใช้เลขตัวยก (superscript) ที่ต่างกัน กำกับไว้ท้ายนามสกุลของผู้เขียนที่มีที่อยู่ต่างกันนั้น หากมีผู้เขียนคนเดียว หรือหลายคนที่มีที่อยู่เดียวกัน ไม่ต้องใช้เลขตัวยกกำกับท้ายนามสกุลของผู้เขียน นอกจากนี้ ให้ใส่เครื่องหมายดอกจัน (*) กำกับไว้ที่ท้ายนามสกุลของผู้เขียนที่ให้ติดต่อ (corresponding author) ด้วย

3. **ที่อยู่ หรือสังกัด** ให้ระบุเฉพาะที่อยู่หรือสังกัดของผู้เขียนเท่านั้น มีทั้งที่เป็นภาษาไทยและภาษาอังกฤษ หากที่อยู่มีหลายแห่ง ให้พิมพ์ภาษาไทยของที่อยู่แห่งแรกก่อนแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ จากนั้นพิมพ์ภาษาไทยของที่อยู่แห่งที่สองแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ สลับกันในลักษณะนี้เรื่อยไปหากมีมากกว่าสองแห่ง ในกรณีผู้เขียนเป็นนักศึกษา ให้ระบุที่อยู่ตามที่อยู่หรือสังกัดของอาจารย์ที่ปรึกษาเท่านั้น นอกจากนี้ บรรทัดถัดจากที่อยู่ ให้พิมพ์ที่อยู่อีเมล (email address) ของผู้เขียนที่ให้ติดต่อ (corresponding author) ด้วย

4. **บทคัดย่อ (Abstract)** ควรเป็นเนื้อหาที่สั้น ชัดเจนและเข้าใจง่าย โดยรวมเหตุผลในการศึกษาวิจัย อุปกรณ์ วิธีการ ตลอดจนผลการศึกษาและสรุปด้วย ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ควรเกิน 250 คำ และให้ระบุคำสำคัญ (keywords) ไว้ท้ายบทคัดย่อแต่ละภาษาด้วย คำสำคัญไม่ควรเกิน 5 คำ ต้นฉบับที่เป็นภาษาไทยให้พิมพ์บทคัดย่อภาษาอังกฤษก่อนบทคัดย่อภาษาไทย หากต้นฉบับเป็นภาษาอังกฤษ ให้พิมพ์บทภาษาไทยก่อนบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

5. **เนื้อหา (Text)** ประกอบด้วย

5.1 **คำนำ (Introduction)** แสดงความเป็นมาและเหตุผลที่นำไปสู่การศึกษาวิจัย อาจรวมการตรวจเอกสาร (review of literature) และวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยไว้ด้วย

5.2 **อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)** ให้บอกรายละเอียดของวัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ ในการทดลอง ตลอดจนวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ และแบบจำลองการศึกษาวิจัยที่ชัดเจนและสมบูรณ์

5.3 **ผลการทดลองและวิจารณ์ หรือ ผลการศึกษาและวิจารณ์ (Results and Discussion)** ให้บรรยายผลการศึกษาวิจัย พร้อมเสนอข้อมูลในรูปแบบตารางหรือภาพประกอบได้ โดยตารางหรือภาพรวมทั้งคำอธิบายให้จัดทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด ถ้ามีตารางหรือภาพในบทความให้อ้างตารางหรือภาพนั้นในเนื้อหาด้วย สำหรับการวิจารณ์ ควรเชื่อมโยงกับผลการศึกษาว่าสอดคล้องกับสมมุติฐาน หรือแตกต่างไปจากผลงานวิจัยที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหรือไม่อย่างไรและด้วยเหตุใด โดยมีพื้นฐานการอ้างอิงที่เชื่อถือได้

5.4 **สรุป (Conclusion)** เป็นการสรุปผลที่ได้รับจากการศึกษาวิจัย อาจมีข้อเสนอแนะหรือระบุอุปสรรคและแผนงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไป

5.5 **กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)** อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ให้ทุนวิจัย หรือผู้ที่ช่วยเหลือในงานวิจัย แต่ไม่ได้เป็นผู้ร่วมงานวิจัย

5.6 **เอกสารอ้างอิง (References)** ให้เรียงเอกสารตามตัวอักษร

หลักการอ้างอิงและการเขียนเอกสารอ้างอิง

เนื่องจากวารสารเกษตรกำลังปรับเข้าสู่ฐานข้อมูล ACI (ASEAN Citation Index) ข้อกำหนดประการหนึ่งก็คือ เอกสารอ้างอิง (reference) ต้องจัดทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด ถ้าเป็นภาษาอื่น เช่น ภาษาไทย ต้องแปลเป็นภาษาอังกฤษ แล้ววงเล็บท้ายข้อความว่า in Thai เป็นต้น หลักการอ้างอิงและการเขียนเอกสารอ้างอิง มีดังนี้

1. **การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง** ไม่ควรอ้างอิงถึงเรื่องที่ไม่เกี่ยวข้อง ระบบที่ใช้อ้างอิงคือ ระบบชื่อและปี (Name-and-year System) ให้ใช้ชื่อสกุลและปี ค.ศ. เช่น Kubo (2003).....หรือ.....(Kubo, 2003) ถ้าผู้เขียนมี 2 คน ให้ใช้เป็น Muthita and Kuanprasert (2004) .....หรือ.....(Muthita and Kuanprasert, 2004) หากมีมากกว่า 3 คน ให้ใช้เป็น Bukhari *et al.* (2011).....หรือ.....(Bukhari *et al.*, 2015) สำหรับในบัญชีเอกสารอ้างอิง ให้ระบุชื่อผู้เขียนทุกคน ห้ามใช้คำว่า และคณะ หรือ *et al.*

(ดูคำแนะนำการเขียนเอกสารอ้างอิง การส่งต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ และการพิจารณาบทความได้ที่ปกหลังด้านใน)

วารสารเกษตร
JOURNAL OF AGRICULTURE

ผู้จัดพิมพ์	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Publisher	Faculty of Agriculture, Chiang Mai University
กำหนดการพิมพ์	วารสารราย 4 เดือน (3 ฉบับ/ปี) คือ ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม	Publication	Tri-annually Issue 1 January-April Issue 2 May-August Issue 3 September-December
วัตถุประสงค์	เพื่อเผยแพร่วิทยาการด้านการเกษตร และสาขาที่เกี่ยวข้อง	Objective	To disseminate academic knowledge in agriculture and related fields
ที่ปรึกษา	คณบดีคณะเกษตรศาสตร์ รองคณบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ ศ. เชี่ยวชาญพิเศษ ดร. สัญชัย จตุรสิทธา	Consultants	Dean, Faculty of Agriculture; Associate Dean for Research and Academic Services Sanchai Jaturasitha, Dr.sc.agr., Prof.
บรรณาธิการ	ศ.ดร. ดนัย บุณยเกียรติ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Editor	Danai Boonyakiat, Ph.D., Prof. Chiang Mai University
รองบรรณาธิการ	รศ.ดร. ไสว บูรณพานิชพันธุ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Vice Editor	Sawai Buranapanichpan, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
กองบรรณาธิการ ฝ่ายวิชาการ	รศ.ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Editorial Board (Academic)	Kaewalin Kunasakdakul, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
	รศ.ดร. สุนทร คำยอง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Soontorn Khamyong, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
	รศ.ดร. รุจ ศิริสัญลักษณ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Ruth Sirisunyaluck, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
	รศ.ดร. ชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Chanakan Prom-u-thai, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. สุรินทร์ นิลสำราญจิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Surin Nilsamranchit, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Yaowaluk Chanbang, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. ฉันทลักษณ์ ติยายน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Chantalak Tiyayon, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. จิรวรรณ กิจชัยเจริญ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Jirawan Kitchaicharoen, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Saowaluck Yammuen-art, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
	ผศ.ดร. ชูชาติ สันธทรัพย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Choochad Santasup, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University

	ผศ.ดร. สรณะ สมโน		Sarana Sommano, Ph.D., Assist. Prof.
	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		Chiang Mai University
	ศ.ดร. จรัญ จันทลักขณา		Charan Chantalakhana, Ph.D., Prof.
	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์		Kasetsart University
	ศ. ญาณวิทย์ ดร. เมธา วรรณพัฒน์		Metha Wanapat, Ph.D., Prof.
	มหาวิทยาลัยขอนแก่น		Khon Kaen University
	ศ.ดร. อังศุมาลย์ จันทราปัตย์		Angsumarn Chandrapatya, Ph.D., Prof.
	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์		Kasetsart University
	ศ.ดร. สุชีลา เตชะวงค์เสถียร		Suchila Techawongstien, D.agr., Prof.
	มหาวิทยาลัยขอนแก่น		Khon Kaen University
	ศ.ดร. ธวัชชัย ศุภดิษฐ์		Tawadchai Suppadit, Ph.D., Prof.
	สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์		National Institute of Development Administration
	รศ.ดร. เสวียน เปรมประสิทธิ์		Savent Pampasit, Ph.D., Assoc. Prof.
	มหาวิทยาลัยนเรศวร		Naresuan University
	รศ.ดร. วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ		Weerathep Pongprasert, Ph.D., Assoc. Prof.
	มหาวิทยาลัยนเรศวร		Naresuan University
	รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล		Petcharat Thummabenjapone, Ph.D., Assoc Prof.
	มหาวิทยาลัยขอนแก่น		Khon Kaen University
	รศ. บำเพ็ญ เขียวหวาน		Bumpen Keowan, M.S., Assoc. Prof.
	มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมธิราช		Sukhothai Thammathirat Open University
	รศ.ดร. เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน		Kriangsak Mengumphan, Ph.D., Assoc. Prof.
	มหาวิทยาลัยแม่โจ้		Maejo University
	ผศ.ดร. ปฏิภาณ สุทธิกุลบุตร		Pathipan Sutigoolabud, Ph.D., Assist. Prof.
	มหาวิทยาลัยแม่โจ้		Maejo University
	ผศ.ดร. เพ็ญพร เจนการกิจ		Penporn Janekarnkij, Ph.D., Assist. Prof.
	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์		Kasetsart University
	ผศ.ดร. ไชยวรรณ วัฒนจันทร์		Chaiyawan Wattanachant, Ph.D., Assist. Prof.
	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์		Prince of Songkla University
	ผศ.ดร. เสาวคนธ์ วัฒนจันทร์		Saowakon Wattanachant, Ph.D., Assist. Prof.
	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์		Prince of Songkla University
กองบรรณาธิการ	นางลาลิตยา นุ่มมีศรี	Editorial Board	Lalitaya Nummisri
ฝ่ายการจัดการ	นางสาวอรณิชาณ์ ปารมี	(Management)	Onnicha Paramee
	นายมานพ เปี้ยพรรณ์		Manop Pearpun

บทบรรณาธิการ

สวัสดีครับ วารสารเกษตรฉบับนี้เป็นปีที่ 35 ฉบับที่ 3 ประจาเดือนกันยายน-ธันวาคม 2562 ซึ่ง ประกอบด้วยบทความทางวิชาการจากงานวิจัยในสาขาต่าง ๆ รวม 15 เรื่อง โดยเป็นบทความทางวิชาการในสาขากีฏวิทยา จำนวน 3 เรื่อง โรคพืช จำนวน 2 เรื่อง พืชไร่ จำนวน 3 เรื่อง ปฐพีศาสตร์ จำนวน 4 เรื่อง และสัตวศาสตร์ จำนวน 2 เรื่อง วารสารเกษตรเป็นวารสารในกลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่มีค่า Thai-Journal Impact Factors ของศูนย์ดัชนีอ้างอิงวารสารไทย ประจาปี 2561 เท่ากับ 0.701

เพื่อให้วารสารสามารถพัฒนาคุณภาพให้ดีขึ้น สะดวก และรวดเร็วในการจัดพิมพ์วารสารเกษตร กองบรรณาธิการขอความร่วมมือจากผู้ส่งบทความทางวิชาการมาเพื่อตีพิมพ์ปฏิบัติตามคำแนะนำสำหรับผู้เขียนโดยเคร่งครัด

ท่านผู้อ่านที่ต้องการให้ข้อเสนอแนะเพื่อการพัฒนาวารสารเกษตรต่อไปสามารถให้ข้อเสนอแนะโดยตรงต่อกองบรรณาธิการทาง E-mail: agjournal22@gmail.com ซึ่งกองบรรณาธิการยินดีน้อมรับข้อเสนอแนะของท่าน

ศาสตราจารย์ ดร. ดนัย บุณยเกียรติ

บรรณาธิการวารสารเกษตร

การเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญา *Tetragonula laeviceps* (Smith) Species Complex ในสภาพกึ่งธรรมชาติ

In Vitro Rearing of Stingless Bee Queen *Tetragonula laeviceps* (Smith) Species Complex

ทักษพร สมมิตร[1] จิราพร กุลสาริน[1*] ไสว บูรณพานิชพันธุ์[1] สมนึก บุญเกิด[2] กนกวรรณ คำยอดใจ[1] และ กฤษณะ เรืองฤทธิ์[3]

Thaksaporn Sommitr[1], Jiraporn Kulsarin[1*], Sawai Buranapanichpan[1], Somnuk Boongird[2], Kanokwan Khamyotchai[1] and Krissana Ruangrit[3]

[1]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ 10240

[2]Department of Agricultural Technology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

[3]คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี จ. เพชรบุรี 76120

[3]Faculty of Animal Sciences and Agricultural Technology, Silpakorn University, Phetchaburi Information Technology Campus, Phetchaburi 76120, Thailand

**Corresponding author: Email: j.tayuti@gmail.com*

(Received: 18 December 2018; Accepted: 31 January 2019)

Abstract: The keeping of stingless bee, *Tetragonula laeviceps* (Smith) species complex colonies in human made hives is the most common in stingless bee beekeeping industry in Thailand. Nevertheless, to multiply the stingless bee colony for large scale farming, the queen rearing technique is needed to be developed. The present study examines the efficacy of *in vitro* queen–rearing techniques in terms of life cycle, survival rate and rearing technique for newly emerged adult queen. Experiments were carried out under growth chamber conditions at 28 ± 1°C and ambient 70-75% relative humidity. The quantity of larval food intake in each treatment was measured with graduated capillary. The results revealed that the optimal volume of larval food was 64 µl to be reared as queens. The larval survival rate, pupal survival rate, and queen survival rate were 34.28, 39.10 and 62.63% respectively. It also found that the body size of reared queens was smaller than natural queens. The stingless bee queen development has consisted of 4 stages; egg, larva, pupa and adult. The duration of development stage of stingless bee queen from egg to adult emergence was 44.50 ± 0.53 days. After 3 days of virgin queens exposure with no impact on worker aggression in form of biting but fed the prospective queens, the new queens were then introduced into the queenless colonies. Within 12 hours of being released, *in vitro* queens were able to mate and lay viable eggs.

Keywords: Stingless bee queen, *Tetragonula laeviceps, in vitro* rearing, life cycle

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: การเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรง *Tetragonula laeviceps* (Smith) species complex ในรังเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมอย่างหนึ่งที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงไว้เพื่อเพิ่มขยายจำนวนรังในเชิงการค้า แต่เนื่องจากผึ้งชันโรงนางพญาที่มีจำกัดภายในรังทำให้ขยายรังได้น้อย การทดลองวิจัยในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญาในสภาพกึ่งธรรมชาติ วงจรชีวิตและการอนุบาลผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ โดยเพาะเลี้ยงภายใต้ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้น 70-75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณอาหารที่ตัวหนอนได้รับ 64 ไมโครลิตร พบอัตรารอดในระยะตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย เฉลี่ยอยู่ที่ 34.28, 39.10 และ 62.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขนาดของผึ้งชันโรงนางพญาเล็กกว่าผึ้งชันโรงนางพญาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ การศึกษาวงจรชีวิตของผึ้งชันโรงนางพญา พบว่ามีการเจริญเติบโต 4 ระยะ คือ ระยะไข่ ระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย ระยะเวลาการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะไข่จนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ใช้เวลาเฉลี่ย 44.50 ± 0.53 วัน การอนุบาลผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ 3 วัน พบว่าหากผึ้งชันโรงงานยอมรับผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ จะไม่กัดหรือทำร้ายและมีการป้อนอาหารให้ สามารถนำไปปล่อยไว้ในรังที่ไม่มีผึ้งชันโรงนางพญาได้ หลังจากปล่อยเข้าสู่รัง 12 ชั่วโมง พบว่าผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ผสมพันธุ์กับผึ้งชันโรงตัวผู้และวางไข่เพื่อเพิ่มจำนวนประชากร

คำสำคัญ: ผึ้งชันโรงนางพญา *Tetragonula laeviceps* การเพาะเลี้ยงสภาพกึ่งธรรมชาติ วงจรชีวิต

คำนำ

ผึ้งชันโรง *Tetragonula laeviceps* (Smith) species complex เป็นแมลงสังคมแท้จริงขนาดเล็กที่มีลักษณะคล้ายกับผึ้งรวงแต่ไม่มีเหล็กใน ไม่สามารถต่อยได้ จัดอยู่ในอันดับ Hymenoptera วงศ์ Apidae วงศ์ย่อย Meliponinae และเผ่า Meliponini (Sawatthum, 2013) เป็นแมลงที่พบแพร่กระจายในเขตร้อนชื้น ได้แก่ เขตกึ่งร้อนใต้เส้นรุ้งที่ 23.5 องศาเหนือและใต้ มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและระบบนิเวศการผสมเกสร เนื่องจากเป็นแมลงที่มีบทบาทสำคัญในการช่วยผสมเกสรพืชดอก ทำรังอยู่กับที่ หาอาหารในรัศมีประมาณ 300 เมตร (Boongird, 2014a) ดำรงชีวิตแบบสังคมชั้นสูง (Boongird, 2014b) รังของผึ้งชันโรงส่วนใหญ่จะสร้างอยู่ในโพรงเทียมและโพรงธรรมชาติ ได้แก่ ในโพรงต้นไม้ แต่โพรงเหล่านั้นต้องอยู่ในร่มเงา และโพรงปูนซีเมนต์ (Khamyotchai *et al*., 2015) ผึ้งชันโรงมีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการผสมเกสร (Jaiyen *et al*., 2018) เพราะการติดผลของพืชผลหลายชนิดต้องอาศัยการผสมเกสรที่มีประสิทธิภาพของผึ้งชันโรง อีกทั้งวิธีการเลี้ยงไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำมาเลี้ยงในรังไม้ขนาดเล็ก ใช้พื้นที่เพาะเลี้ยงน้อย สามารถเคลื่อนย้ายรังไปตามพื้นที่ที่ต้องการใช้ผึ้งชันโรงผสมเกสรได้ง่าย

การเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในประเทศเขตร้อนชื้น สำหรับประเทศไทยจะพบมากที่จังหวัดจันทบุรี ตราด สมุทรสงคราม และนครปฐม (Theanworrakant, 2015) ก่อให้เกิดการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญาเพื่อขยายรังเพิ่มขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่เกษตรกรใช้วิธีการแยกรังโดยนำผึ้งชันโรงงานตัวอ่อนถ้วยอาหารและชันใส่ในรังใหม่ แล้วนำถ้วยตัวอ่อนผึ้งชันโรงนางพญาจากรังอื่นมาใส่ พบว่าเป็นวิธีที่มีข้อจำกัดในเรื่องของการควบคุมพันธุกรรม จำนวนดักแด้ผึ้งชันโรงนางพญาที่เกิดขึ้นน้อยมากและใช้เวลานาน มีคณะผู้วิจัยจากมหาวิทยาลัยรามคำแหงวิจัยและศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงหรือการผลิตผึ้งชันโรงนางพญาด้วยวิธีเลียนแบบกึ่งธรรมชาติ (*in vitro*) โดยใช้หลักของเดียร์ซั่น (Dzierzon's Law) คือ ไข่ที่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อมีการพัฒนาและเจริญเติบโตไปเป็นเพศเมีย ซึ่งอาจเป็นผึ้งชันโรงงาน (worker) หรือผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ (virgin queen) หากมีการพัฒนาเป็นผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ต้องได้รับอาหารมากกว่าผึ้งชันโรงที่พัฒนาเป็นผึ้งชันโรงงาน เมื่ออายุได้ 10-12 ชั่วโมงขึ้นไป จนกระทั่งอายุ 3 วัน จึงเป็นผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ แต่ถ้าช่วงวิกฤตอาหารไม่สม่ำเสมอหรือความชื้นในการเพาะเลี้ยงไม่อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ตลอดจนอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงสูงหรือต่ำเกินไปก็อาจทำให้ตัวเต็มวัยของ

ผึ้งชันโรงกลายเป็นกึ่งผึ้งชันโรงนางพญากึ่งผึ้งชันโรงงานได้ หรืออาจเป็นผึ้งชันโรงงานตัวใหญ่ (big worker) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับผึ้งชันโรงนางพญาแต่ไม่สามารถวางไข่ได้ (Boongird, 2017) ดังนั้นจุดประสงค์การศึกษาวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาปริมาณอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญาในสภาพกึ่งธรรมชาติ วงจรชีวิต และการอนุบาลผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์จนได้ผึ้งชันโรงนางพญาที่ถูกต้องตามลักษณะผึ้งชันโรงนางพญาที่สมบูรณ์

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญาในสภาพกึ่งธรรมชาติ

สร้างถ้วยนางพญาเทียม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สูง 5 มิลลิเมตร และฝาปิดถ้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สูง 3 มิลลิเมตร เพื่อใช้ใส่อาหารเลี้ยงตัวอ่อนและไขผึ้งชันโรง สร้างถ้วยเทียมโดยการละลายไขผึ้งให้อยู่ในรูปของเหลว ใช้ไม้ปลายมนจุ่มลงในน้ำเชื่อม ไขผึ้งและน้ำเย็นทิ้งไว้ให้คงสภาพ สร้างฐานวางถ้วยนางพญาเทียม โดยละลายไขผึ้งให้อยู่ในรูปของเหลว เทลงกล่องพลาสติกมีฝาปิด ขนาด 5.5x5.5x2.3 เซนติเมตร ให้มีความสูงจากระดับฐาน 5 มิลลิเมตร เกลี่ยให้อยู่ในระดับเดียวกัน ทิ้งไว้ให้แข็งตัว ทำหลุม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ลึก 3 มิลลิเมตร คีบถ้วยนางพญาเทียมที่เตรียมไว้วางบนหลุม เชื่อมติดกับฐานด้วยไขผึ้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง ใช้ปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตร ดูดอาหารเลี้ยงตัวอ่อนจากถ้วยไข่ภายในรังธรรมชาติ จำนวน 2 ถ้วย แต่ละถ้วยมีปริมาณอาหารเฉลี่ย 16 ไมโครลิตร ใส่ลงในถ้วยนางพญาเทียม 1 ถ้วย เพื่อให้มีปริมาณอาหารเลี้ยงตัวอ่อนในถ้วย 32 ไมโครลิตร จากนั้นใช้เข็มฉีดยาที่ปรับปลายเข็มให้งอเล็กน้อย ช้อนไข่จากกระเปาะไข่ วางไข่ลงในถ้วยนางพญาเทียมให้ตั้งตรงบนผิวอาหาร ถ้วยละ 1 เซลล์ ปิดฝาด้วยไขผึ้ง เพื่อทำการศึกษา ดังนี้

ปริมาณอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญาในสภาพกึ่งธรรมชาติ

นำกล่องพลาสติกมีฝาปิด ขนาด 5.5x5.5x2.3 เซนติเมตร ภายในมีถ้วยนางพญาเทียมบรรจุไข่และอาหาร แต่ละถ้วยมีปริมาณอาหารเลี้ยงตัวอ่อนบรรจุถ้วยละ 32 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ที่ความชื้น 70-75 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการของ Baptistella *et al.* (2012) และ Menezes *et al.* (2013) ทำการเพิ่มอาหารเลี้ยงตัวอ่อนลงไปในถ้วย 1 ครั้ง เมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอนได้ 3 วัน สังเกตพฤติกรรมการกินอาหาร การเจริญเติบโตของตัวหนอนจนเข้าสู่ระยะดักแด้ และเปอร์เซ็นต์การรอด วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ถ้วย ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงตัวหนอน 96 ไมโครลิตร
กรรมวิธีที่ 2 เพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงตัวหนอน 64 ไมโครลิตร
กรรมวิธีที่ 3 เพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงตัวหนอน 32 ไมโครลิตร
กรรมวิธีที่ 4 ไม่เพิ่มปริมาณอาหาร

การศึกษาวงจรชีวิตของผึ้งชันโรงนางพญา

นำกล่องพลาสติกมีฝาปิด ขนาด 5.5x5.5x2.3 เซนติเมตร ภายในมีถ้วยนางพญาเทียมบรรจุไข่และอาหาร แต่ละถ้วยมีปริมาณอาหารเลี้ยงตัวอ่อนบรรจุถ้วยละ 32 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ที่ความชื้น 70-75 เปอร์เซ็นต์ (Baptistella *et al.*, 2012; Menezes *et al.*, 2013) สังเกตการเจริญเติบโตของตัวหนอนทุกวันจนพัฒนาไปเป็นผึ้งชันโรงนางพญาตัวเต็มวัย

การอนุบาลผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์

ทำการอนุบาลผึ้งชันโรงนางพญา โดยป้อนอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่ดูดจากกระเปาะไข่ ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน เมื่อผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์แข็งแรง ปล่อยผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ลงกล่องพลาสติกใส ทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ความสูง

11 เซนติเมตร ภายในบรรจุถ้วยน้ำหวานของผึ้งชันโรง 3 กรัม ถ้วยเกสรดอกไม้ 2 กรัม ถ้วยเลี้ยงตัวอ่อน 5 กรัม และใส่ผึ้งชันโรงงาน 15 ตัว สังเกตลักษณะของผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์เปรียบเทียบกับผึ้งชันโรงงาน และพฤติกรรมการตอบสนองระหว่างผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์กับผึ้งชันโรงงาน

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ปริมาณอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญาในสภาพกึ่งธรรมชาติ

การเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญาในสภาพกึ่งธรรมชาติ ภายในมีถ้วยนางพญาเทียมบรรจุเซลล์ไข่และอาหาร แต่ละถ้วยมีปริมาณอาหารเลี้ยงตัวอ่อนบรรจุเริ่มต้น ถ้วยละ 32 ไมโครลิตร ภายใต้ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้น 70-75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงตัวอ่อน 32 ไมโครลิตร ส่งผลให้ระยะตัวหนอนรอดชีวิต 34.28 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับการเพิ่มอาหารที่ 64 ไมโครลิตร ที่ระยะตัวหนอนรอดชีวิต 27.95 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับการเพิ่มอาหารที่ 96 ไมโครลิตร และไม่เพิ่มปริมาณอาหาร (Table 1) ระยะดักแด้การเพิ่มอาหารที่ 32, 64 และ 96 ไมโครลิตร ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ที่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดเท่ากับ 39.10, 42.11 และ 40.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับระยะตัวเต็มวัยเริ่มต้น การเพิ่มอาหารที่ 32 ไมโครลิตร พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของผึ้งชันโรงนางพญา 62.63 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าจะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับการเพิ่มอาหารที่ 64 ไมโครลิตร ที่พบอัตราการรอด 40.13 เปอร์เซ็นต์ แต่เปอร์เซ็นต์การรอดของการเพิ่มอาหารที่ 32 ไมโครลิตร มีค่ามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการเพิ่มอาหารที่ 32 ไมโครลิตร สามารถเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญาได้มากที่สุด แต่ขนาดของผึ้งชันโรงนางพญาจะเล็กกว่าผึ้งชันโรงนางพญาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญา *Scaptotrigona depilis* ของ Menezes *et al.* (2013) ที่เลี้ยงตัวอ่อนผึ้งชันโรงนางพญาด้วยปริมาณอาหาร 134 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาณอาหารเฉลี่ยที่พบในถ้วยเลี้ยงตัวอ่อนจากรังธรรมชาติ ส่วนเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของผึ้งชันโรงนางพญาอยู่ที่ 97.9 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับผลการศึกษาที่พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของผึ้งชันโรงนางพญาอยู่ที่ 62.63 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากว่าระหว่างการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญา พบเชื้อราเจริญบนถ้วยนางพญาเทียม เป็นเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งเจริญเติบโตในอากาศ ลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวแกมเขียว พบตุ่มเล็ก ๆ สีดำหรือสีน้ำตาลดำลักษณะเป็นขุยบริเวณปลายของเส้นใย (Tongklib and Kitpreechavanich, 2006) และพบไร *Tyrophagus* sp. เป็นไรศัตรูโรงเก็บที่กินซากของเสียต่าง ๆ ซึ่งพบทั่วไปในสภาวะที่มีความชื้น และเป็นพาหะนำเชื้อจุลินทรีย์ รบกวนระยะตัวหนอน (Menezes *et al.*, 2013) ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดต่ำ ไม่สามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะดักแด้ได้

จากการสังเกตพฤติกรรมการกินและการเจริญเติบโตของตัวหนอนจนเข้าสู่ระยะดักแด้ ดักแด้มีการพัฒนาเป็นทั้งผึ้งชันโรงงานและผึ้งชันโรงนางพญา เนื่องจากปัจจัยภายนอก เช่น การให้ปริมาณอาหารที่

Table 1. Survival rates of various stages of *Tetragonula laeviceps* (Smith) species complex in different volume of larval food in laboratory conditions at 28 ± 1 °C and 70-75 %RH

Volume of larval food	Survival rates (%)[1]			
	Larval stage	Pupal stage	Worker	Queen
128 microliters of larval food added	20.09 bc	40.13 a	45.00 a	0.00 b
96 microliters of larval food added	27.95 ab	42.11 a	40.13 a	40.13 a
64 microliters of larval food added	34.28 a	39.10 a	54.74 a	62.63 a
32 microliters of larval food added	9.32 c	0.00 b	0.00 b	0.00 b

[1] Means within the same column followed by the same letters are not significantly different at P≥0.05

แตกต่างกัน และปัจจัยภายใน เช่น พฤติกรรมการกิน โดยสังเกตพบว่า เมื่อให้อาหารเพิ่ม หลังจากไข่ฟักเป็นตัวหนอนอายุ 3 วัน สังเกตพฤติกรรมตัวหนอนทุก 3 ชั่วโมง ตัวหนอนมีพฤติกรรมการกินอาหาร โดยดูดอาหารเหลวเข้าทางช่องปากจนอาหารเลี้ยงตัวอ่อนหมด จากนั้นเปลี่ยนการสังเกตพฤติกรรมตัวหนอนทุก 12 ชั่วโมง พบว่าตัวหนอนเริ่มลอกคราบโดยการสร้างเยื่อสีขาวพันรอบตัวเพื่อขยายขนาดลำตัว สร้างปล้องด้านข้างลำตัว ระบบหมุนเวียนเลือด และระบบขับถ่าย ก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ จากการสังเกตเพิ่มเติมพบว่าตัวหนอนที่กินอาหารสม่ำเสมอทุกวัน มีการเจริญเติบโตไปเป็นผึ้งชันโรงนางพญาที่สมบูรณ์แข็งแรง ส่วนตัวหนอนที่ดูดอาหารกินน้อย ส่งผลให้อาหารเหลวเหลืออยู่ก้นถ้วยนางพญาเทียม ก่อให้เกิดเชื้อราบนตัวหนอน ตัวหนอนไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้และตาย อีกประการหนึ่งหากตัวหนอนดูดกินอาหารน้อย ตัวหนอนจะเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์และผิดปกติ หรือเจริญเติบโตไปเป็นผึ้งชันโรงงานแต่ขนาดลำตัวเล็ก

การศึกษาวงจรชีวิตของผึ้งชันโรงนางพญา

จากการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญาภายใต้ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้น 70-75 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการเจริญเติบโตของตัวหนอนทุกวันจนพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัย พบว่ามีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ ระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัยเริ่มต้น (Figure 1)

ระยะไข่ ไข่มีลักษณะทรงกระบอก สีขาวขุ่น (Figure 2a) หลังจากย้ายไข่ลงถ้วยนางพญาเทียม 12 ชั่วโมง ไข่โค้งงอ ตั้งฉากกับผิวอาหาร (Figure 2b) เพื่อเตรียมฟักเป็นตัวหนอน ใช้เวลาเฉลี่ย 4.13 ± 0.99 วัน

ระยะตัวหนอน หลังจากไข่ฟักเป็นตัวหนอนลอยอยู่บนผิวหน้าอาหาร มีลักษณะลำตัวโค้งงอคล้ายรูปตัว C นอนตะแคงข้าง (Figure 2c) สังเกตพบว่าบริเวณส่วนปลายของแต่ละด้านมีลักษณะแตกต่างกัน ด้านที่มีลักษณะใหญ่กว่าเป็นส่วนหัว มีปากสำหรับดูดกินอาหาร โดยการยืดส่วนหัวออกไปแล้วใช้ปากดูดอาหารเหลวเข้าสู่ร่างกาย ส่วนด้านที่เล็กและเรียวกว่าเป็นส่วนท้าย เริ่มสร้างอวัยวะขับถ่าย สังเกตจากกลุ่มโครงสร้างสีน้ำตาลอ่อนบริเวณส่วนปลายที่อยู่ภายในของลำตัวแต่อวัยวะยังเห็นไม่ชัดเจน เมื่อเวลาผ่านไปเฉลี่ย 1.38 ± 0.52 วัน ตัวหนอนเริ่มสร้างเส้นปล้องลำตัว (Figure 2d) เห็นแถบปล้องแบ่งกันชัดเจนและสังเกตเห็นเยื่อบาง ๆ สีใส รอบ ๆ ตัวหนอนเป็นเยื่อที่เกิดจากการลอกคราบครั้งที่ 1 ซึ่งสังเกตด้วยตาเปล่าไม่เห็นต้องสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จากนั้นเข้าสู่การลอกคราบครั้งที่ 2 โดยใช้เวลาเฉลี่ย 2.13 ± 0.35 วัน ในระยะนี้ ตัวหนอนมีการสร้างระบบหมุนเวียนเลือด (Figure 2e) เห็นหลอดเลือดและเส้นเลือดสีเหลืองชัดเจนบริเวณกึ่งกลางด้านบนของลำตัวและระบบขับถ่ายบริเวณส่วนท้ายของลำตัวเริ่มชัดเจน เป็นอวัยวะที่ชื่อว่าท่อมัลพิเกียน (Figure 2f) ซึ่งเป็นโครงสร้างระบบขับถ่ายของแมลง (Bee Health, 2010) จากนั้นใช้เวลาเฉลี่ย 2.63 ± 0.74 วัน ตัวหนอนจึงมี

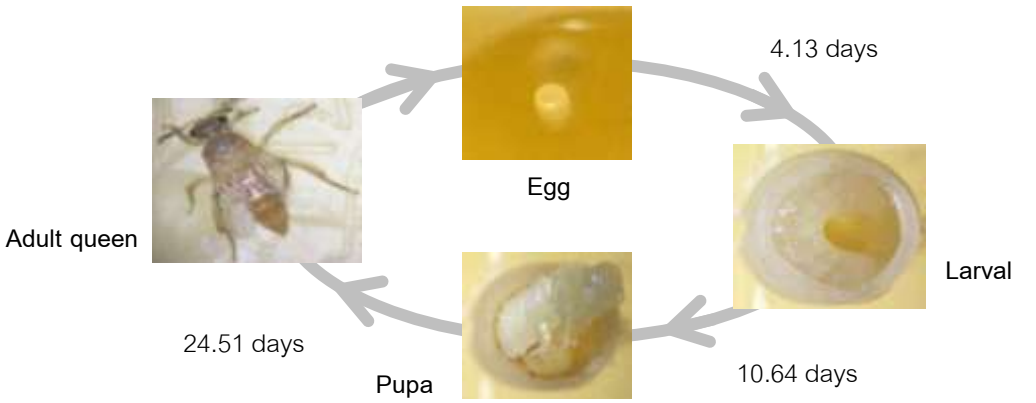

Figure 1. Life cycle of *Tetragonula laeviceps* (Smith) species complex queen

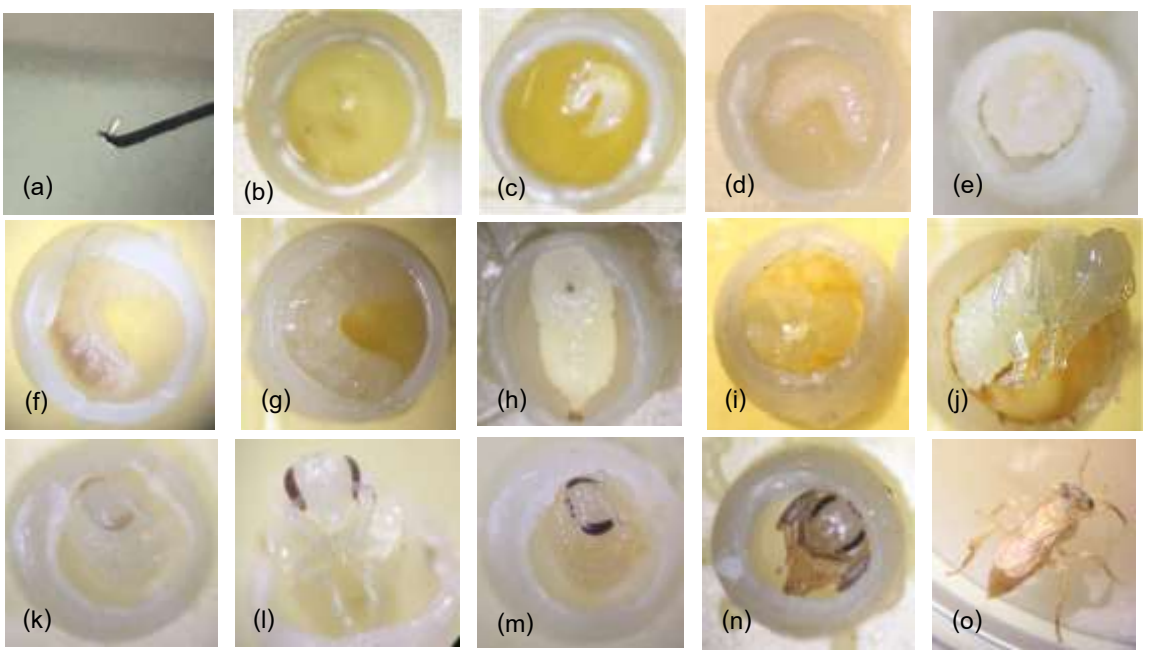

Figure 2. Egg (a), shape of egg after 12 hours ago (b), C-shape of larva in first instar (c), white web in first molting of larva (d), circulatory system (e), excretory system (f), lateral segments (g), thoracic segments and legs (h), pupa (i), pupa (white eyes) (j), pupa (light brown eyes) (k), pupa (dark brown eyes) (l), pupa (black eyes) (m), pupa (build wings) (n), newly emerged stingless bee (o)

การลอกคราบครั้งที่ 3 เพื่อสร้างปล้องด้านข้างลำตัวเห็นเป็นข้อปล้องชัดเจน (Figure 2g) ลักษณะนูนออกมาจากด้านข้างลำตัว ผิวหนังเริ่มแห้ง เต่งตึงและมันวาว จากนั้นเข้าสู่การลอกคราบครั้งที่ 4 ใช้เวลาเฉลี่ย 2.25 ± 0.71 วัน และเข้าสู่การลอกคราบครั้งสุดท้ายใช้เวลาเฉลี่ย 2.25 ± 0.46 วัน เพื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะดักแด้ ซึ่งก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ ตัวหนอนจะสร้างเยื่อลักษณะหนา ห่อหุ้มลำตัวเพื่อปรับขนาดลำตัวให้พร้อมเพื่อสร้างอวัยวะอื่น ๆ ใช้เวลาเฉลี่ย 2.63 ± 0.52 วัน จากนั้นเริ่มสร้างหนวดซึ่งเป็นอวัยวะส่วนหัว เริ่มสร้างกราม (mandible) ซึ่งเป็นอวัยวะส่วนปาก และสร้างปล้องอก (Figure 2h)

ระยะดักแด้ เป็นระยะเปลี่ยนแปลงจากตัวหนอนไปสู่ตัวเต็มวัย ระยะนี้จะไม่มีการให้อาหาร ดักแด้อยู่นิ่งจนกว่าเป็นตัวเต็มวัย (Figure 2i) ก่อนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ดักแด้มีการพัฒนาสีตารวม เริ่มจากตารวมสีขาว (Figure 2j) ใช้เวลาเฉลี่ย 6.13 ± 0.99 วัน เปลี่ยนเป็นตารวมสีน้ำตาลอ่อนจนเป็นสีน้ำตาลเข้ม (Figures 2k, 2l) ใช้เวลาเฉลี่ย 8.75 ± 0.71 วัน จากนั้นตารวมเปลี่ยนเป็นสีดำ (Figure 2m) เริ่มสร้างปีกบริเวณตุ่มปีกตรงส่วนอก ปีกที่สร้างยังไม่มีขนปีก ลักษณะปีกสีน้ำตาลแกมดำ (Figure 2n)ใช้เวลาเฉลี่ย 9.63 ± 0.74 วัน

ระยะตัวเต็มวัย เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยเริ่มต้นเริ่มเดิน แต่สภาพยังอ่อนแรง (Figure 2o) เนื่องจากขายังไม่แข็งแรงต้องทำการอนุบาล 2.63 ± 0.52 วัน ระยะเวลาการเจริญเติบโตจากระยะไข่จนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยเริ่มต้นอยู่ที่ 44.50 ± 0.53 วัน (Table 2)

การอนุบาลผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์

จากการอนุบาลผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ 3 วัน เมื่อผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์แข็งแรงสมบูรณ์ สังเกตลักษณะผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์เทียบกับผึ้งชันโรงงาน พบว่าส่วนหัวของผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์แคบกว่าส่วนอก หน้าสอบ เมื่อเทียบกับผึ้งชันโรงงานที่ส่วนหัวใหญ่กว้างเท่ากับส่วนอก และหน้าค่อนข้างกลม (Figure 3, a) ขาหลังของผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์มีลักษณะลีบ เมื่อเทียบกับผึ้งชันโรงงานที่

Table 2. Durations of various developmental stages of *Tetragonula laeviceps* (Smith) species complex

Developmental stages	Mean ± S.D. (days)	Range (days)
Egg	4.13 ± 0.99	3-6
First instar larva	1.38 ± 0.52	1-2
Second instar larva	2.13 ± 0.35	2-3
Third instar larva	2.63 ± 0.74	2-4
Fourth instar larva	2.25 ± 0.71	1-3
Fifth instar larva	2.25 ± 0.46	2-3
Pre-pupa	2.63 ± 0.52	2-3
Pupa (white eyes)	6.13 ± 0.99	4-7
Pupa (brown eyes)	8.75 ± 0.71	8-10
Pupa (black eyes)	9.63 ± 0.74	9-11
Newly emerged adult	2.63 ± 0.52	2-3
Egg to adult emergence	44.50 ± 0.53	44-45

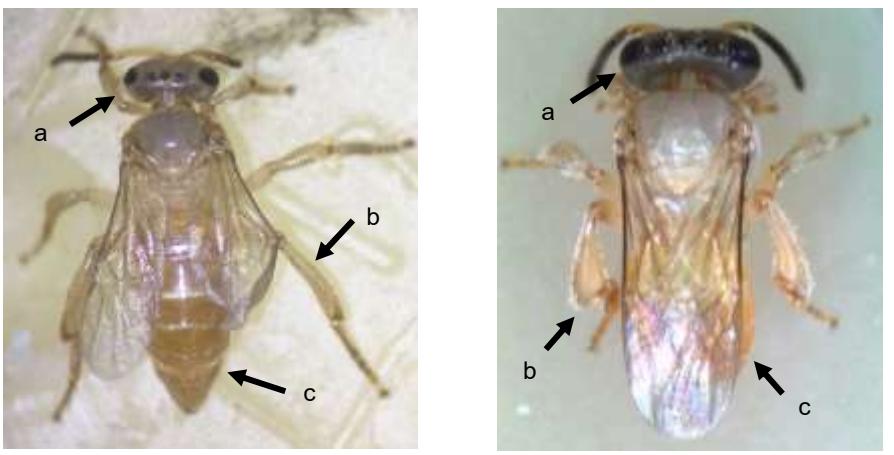

Figure 3. External structure of virgin stingless bee queen (left) compare with worker (right); head and thorax (a), hind legs (b), abdomen (c)

ขาหลังจะใหญ่กว่าและมีอวัยวะสำหรับเก็บเกสรดอกไม้ (Figure 3, b) ปล้องท้องผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์เรียวสอบไปยังส่วนปลาย ความยาวเลยปีก เมื่อเทียบกับผึ้งชันโรงงานที่ปล้องท้องมีลักษณะทรงกระบอก ไม่เรียวแหลม (Figure 3, c)

สำหรับผึ้งชันโรงที่มีการเจริญเติบโตไปเป็นผึ้งงานตัวใหญ่ (big worker หรือ Intermediate caste) ส่วนหัวมีลักษณะใหญ่เท่ากับส่วนอกเหมือนผึ้งชันโรงงาน เมื่อเทียบกับส่วนหัวของผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ที่มีลักษณะแคบกว่าส่วนอกและหน้าสอบ (Figure 4)

ส่วนของ tibia บริเวณขาคู่ที่ 3 ของ big worker มีขนเห็นได้ชัดเจนเหมือนผึ้งชันโรงงาน ซึ่งบริเวณเป็นที่ตั้งของตะกร้าเก็บเกสรที่พบในผึ้งชันโรงงาน (Figure 5)

ส่วนท้องของ big worker มีลักษณะกึ่งผึ้งชันโรงงาน กึ่งผึ้งชันโรงนางพญา คือ ส่วนท้องยาวเลยปีกแต่ไม่เรียวสอบไปยังส่วนปลาย มีลักษณะก้ำกึ่งว่าจะเป็นผึ้งชันโรงงานหรือผึ้งชันโรงนางพญา (Figure 6)

Figure 4. Head of big worker (left) compare with virgin stingless bee queen (right)

Figure 5. Tibia of worker (left) compare with big worker (right)

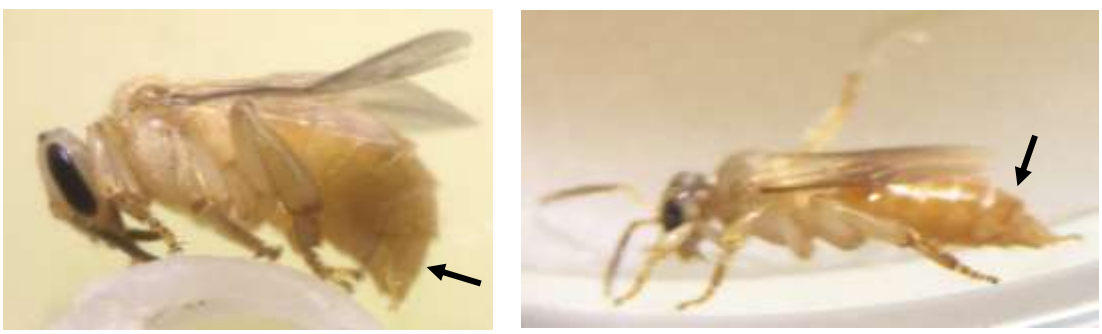

Figure 6. Abdomen of big worker (left) compare with virgin stingless bee queen (right)

ลักษณะ big worker ที่เพาะเลี้ยงได้จากการทดลอง มีลักษณะใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Boongird (2018) ที่รายงานว่าผึ้งงานตัวใหญ่ หรือ big worker ส่วนของ tibia มีขนเหมือนผึ้งชันโรงงาน (Figure 7a) ฟันกรามมีลักษณะเหมือนผึ้งชันโรงงาน (Figure 7b) เนื่องจากเนื้อเยื่อที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงในช่วงระหว่างการพัฒนาการเจริญเติบโต ไม่ได้รับสารอาหารในปริมาณที่เหมาะสม อีกทั้งรังไข่ฝ่อ ถุงเก็บน้ำเชื้อไม่พัฒนา จึงไม่สามารถทำหน้าที่แทนนางพญาได้

สังเกตพฤติกรรมระหว่างผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์และผึ้งชันโรงงานพบว่า หากผึ้งชันโรงงานยอมรับ ไม่ทำร้ายหรือกัดผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ มีการป้อนอาหาร (Figure 8) สามารถนำผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ปล่อยสู่รังที่ไม่มีผึ้งชันโรงนางพญาได้ หลังจากปล่อยเข้าสู่รัง 12 ชั่วโมง พบว่าผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ผสมพันธุ์กับผึ้งชันโรงตัวผู้และวางไข่เพื่อเพิ่มจำนวนประชากรภายในรัง สำหรับพฤติกรรมของผึ้งชันโรงงานที่ไม่ยอมรับผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ในขณะที่ทำการอนุบาล เนื่องจากผึ้งชันโรงงานทุกตัวมีกลิ่นของผึ้งชันโรงนางพญาแม่รังตัวเก่าติดอยู่ ผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ตัวใหม่ที่ได้ไม่ว่าจะมีกลิ่นหรือไม่มีกลิ่น ผึ้งชันโรงงานไม่สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นความแตกต่างของกลิ่นผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ที่ไม่เหมือนกลิ่นของผึ้งชันโรงงานนั้น ก่อให้เกิดพฤติกรรมการทำร้ายหรือไม่ยอมรับผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ตัวใหม่

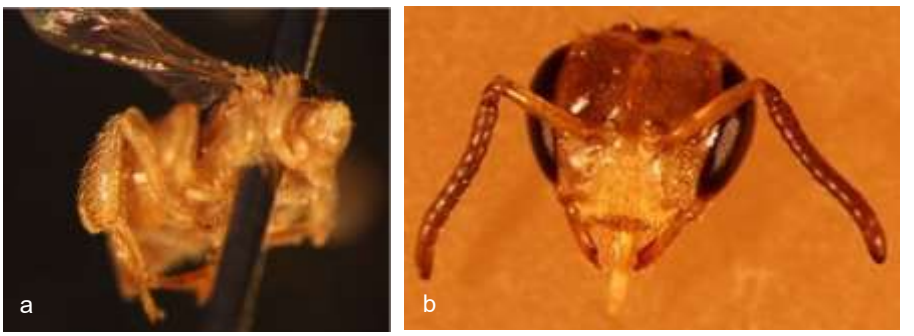

Figure 7. Tibia of big worker (a), mandible of big worker (b)

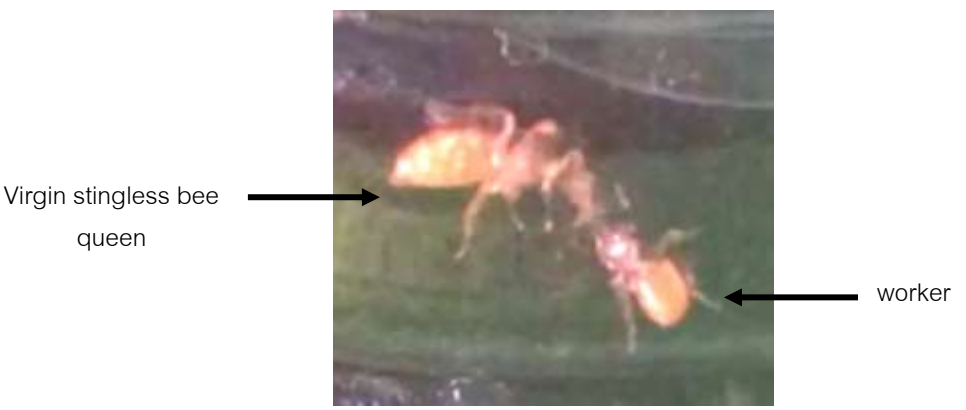

Figure 8. Interaction between virgin stingless bee queen and worker

สรุป

จากการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญา *Tetragonula laeviceps* (Smith) species complex ในสภาพกึ่งธรรมชาติภายใต้ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้น 70-75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณอาหารที่ตัวหนอนได้รับ 64 ไมโครลิตร เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรงนางพญามากที่สุด พบอัตรารอดในระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัยเฉลี่ยอยู่ที่ 34.28, 39.10 และ 62.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผึ้งชันโรงนางพญาที่เพาะเลี้ยงมีลักษณะตรงตามลักษณะของผึ้งชันโรงนางพญา สามารถผสมพันธุ์ขยายรังและวางไข่ได้

การศึกษาวงจรชีวิต พบการเจริญเติบโต 4 ระยะ คือ ระยะไข่ ระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย ระยะเวลาการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะไข่จนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ใช้เวลาเฉลี่ย 44.50 ± 0.53 วัน

การอนุบาลผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ 3 วัน สังเกตพฤติกรรมพบว่าหากผึ้งชันโรงงานยอมรับผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ จะไม่กัดหรือทำร้ายและมีการป้อนอาหารให้ แสดงว่ากลิ่นของผึ้งชันโรงนางพญาแม่รังที่ผึ้งชันโรงงานอาศัยอยู่นั้น หมดไปจากตัวผึ้งชันโรงงานตัวนั้นแล้ว จึงจะปล่อยผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ตัวใหม่ลงไปไว้ในรังที่ไม่มีผึ้งชันโรงนางพญา ก่อนการผสมพันธุ์จะเริ่มขึ้น หลังจากปล่อยเข้าสู่รัง 12 ชั่วโมง พบว่าผึ้งชันโรงนางพญาพรหมจรรย์ผสมพันธุ์กับผึ้งชันโรงตัวผู้ และวางไข่เพื่อเพิ่มจำนวนประชากร

เอกสารอ้างอิง

Baptistella, A.R., C.C.M. Souza, W.C. Santana and A.A.E. Soares. 2012. Techniques for the *in vitro* production of queens in stingless bees (Apidae, Meliponini). Sociobiology 59(1): 297-310.

Bee Health. 2010. Illustrations from morphology of the honey bee larva by J.A. Nelson. (Online). Available: https://articles.extension.org/pages/26466/illustrations-from-morphology-of-the-honey-bee-larva-by-ja-nelson (September 21, 2018).

Boongird, S. 2014a. Managing colonies of the fusco bee, *Tetragonula fuscobalteata* (Cameron) (Hymenoptera; Apidae) for the pollination of durian, *Durio zibethinus* Murr., and its impact on honey composition. Ramkhamhaeng Research Journal of Sciences and Technology 17(2) : 23-39. (in Thai)

Boongird, S. 2014b. Taxonomy of Stingless Bees in Thailand. Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok. 135 p. (in Thai)

Boongird, S. 2017. Stingless bees. Paper presented at Workshop on *In Vitro* Rearing of Stingless Bee Virgin Queen. Agricultural Technology Promotion Center (Economic Insects), Chiang Mai Province, Chiang Mai. 12 p. (in Thai)

Boongird, S. 2018. Beekeeping with Fusco Bee. Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok. 116 p. (in Thai)

Jaiyen, S., J. Kulsarin, S. Buranapanichpan and K. Khamyotchai. 2018. Effects of hive patterns on storage pot arrangement of stingless bees, *Tetragonula laeviceps* species complex. Journal of Agriculture 34(2): 215-226. (in Thai)

Khamyotchai, K., H. Bänziger and J. Kulsarin. 2015. Nest entrance architectural types of *Tetragonula laeviceps* (Smith) a stingless bee species complex (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in Thailand and Peninsular Malaysia. Journal of Agriculture 31(1): 1-9. (in Thai)

Menezes, C., A. Vollet-Neto and V.L.I. Fonseca. 2013. An advance in the *in vitro* rearing of

stingless bee queens. Apidologie 44: 491-500.

Theanworrakant, N. 2015. Stingless bee hive types. Paper presented at Workshop on Culture of Stingless Bee. National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani. 1 p. (in Thai)

Sawatthum, A. 2013. Miracle of Stingless Bees. Triple Group Co., Ltd., Pathum Thani. 27 p. (in Thai)

Tongklib, C. and V. Kitpreechavanich. 2006. *Aspergillus* isolated from Thailand and their ability on animal feed enzyme production. Paper presented at the 44th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok. 8 p.

การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Cordyceps tenuipes* (Peck) เพื่อการผลิตเห็ดถั่งเฉ้าหิมะบนดักแด้ไหม

Strain Improvement of *Cordyceps tenuipes* (Peck) for Snowflake Cordyceps Production on Silkworm Pupae

ฐิติณิชา ไชยชนะ[1] จิราพร กุลสาริน[1*] ปิยะวรรณ สุทธิประพันธ์[1] ไสว บูรณพานิชพันธุ์[1] และ ธัญญา ทะพิงค์แก[2]

Thitinicha Chaichana[1], Jiraporn Kulsarin[1*], Piyawan Suttiprapan[1], Sawai Buranapanichpan[1] and Tanya Tapingkae[2]

[1]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีและพัฒนาการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50300

[2]Department of Technology and Development in Agriculture, Faculty of Agricultural Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai 50300, Thailand

**Corresponding author: Email: j.tayuti@gmail.com*

(Received: 20 November 2018; Accepted: 23 January 2019)

Abstract: Snowflake cordyceps, *Cordyceps tenuipes* (Peck), is an entomopathogenic fungus which has been described as pharmaceutics due to its bioactive compounds in fruiting body or synnemata. Thus, the objective aimed to improve the fungal strain using ultraviolet radiation for high content of bioactive compounds such as adenosine. The result revealed that the characteristics and growth of the fungus have changed after exposing to ultraviolet C radiation of wavelength 254 nm from fluorescent lamps 30 watt (GHangqing T8, China). The colonies were white in color, thick mycelia and full grown on PDA. The colonies of QSDS1-1 isolate exposed to UVC for 0.5 and 5 minutes and QSDS1-2 isolate exposed to 0.5 and 10 minutes showed fully grown on PDA with white and thick mycelia. Then, these four selected colonies were tested for fruiting body production using a silkworm pupa as a substrate. It was obvious that the fungal isolate QSDS1-2 after exposing to UVC for 10 minutes yielded the rapid growth of yellow fruiting body with sharp at the end. There were white conidia on the terminal end of fruiting body which the average length was 2 cm. The fresh and dry weights of fruiting body were 1.10 and 0.50 g, respectively. The adenosine content from fruiting body of QSDS1-2 exposed UVC for 10 minutes was 50.11 mg/100 g.

Keywords: Snowflake cordyceps, silkworm pupae, strain improvement, UVC radiation, *Cordyceps tenuipes*

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: เห็ดถั่งเฉ้าหิมะ (snowflake cordyceps: *Cordyceps tenuipes* (Peck)) เชื้อราแมลงที่มีสารออกฤทธิ์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และเภสัชวิทยา โดยพบมากในก้านดอกเห็ดหรือก้านซูสปอร์ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราชนิดนี้ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสี UVC ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 30 วัตต์ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ผลการศึกษาพบว่า เชื้อราที่ผ่านการฉายรังสีมีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม โดยมีโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คือ ไอโซเลท QSDS1-1 หลังฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 5 นาที และไอโซเลท QSDS1-2 หลังฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 10 นาที จากนั้นนำทั้ง 4 ไอโซเลทมาทำการศึกษาการสร้างก้านดอกเห็ดบนดักแด้ไหม พบว่าไอโซเลท QSDS1-2 ที่ได้รับการฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้อย่างรวดเร็ว มีลักษณะปลายแหลม สีเหลือง และบริเวณปลายก้านดอกเห็ดมีผงสีขาว (โคนิเดีย) เกาะติดอยู่ ขนาดของก้านดอกเห็ดมีความยาวเฉลี่ย 2 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.10 และ 0.20 กรัม ตามลำดับ และพบปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 50.11 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

คำสำคัญ: เห็ดถั่งเฉ้าหิมะ ดักแด้ไหม ปรับปรุงพันธุ์ รังสี UVC *Cordyceps tenuipes*

คำนำ

เห็ดถั่งเฉ้าหิมะ หรือถั่งเฉ้าเกาหลี (snowflake cordyceps) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cordyceps tenuipes* (Peck) ชื่อเดิมคือ *Paecilomyces tenuipes* และ *Isaria tenuipes* อยู่ในวงศ์ Cordycipitaceae (Kepler *et al*., 2017) เห็ดชนิดนี้เป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงอันดับ Lepidoptera (Xu *et al.,* 2006) ที่พบได้ทั่วไปบนพื้นที่สูงของประเทศเกาหลี ซึ่งมีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า Snowflake Dongchunghacho มีรายงานว่าเห็ดถั่งเฉ้าหิมะ *C. tenuipes* เป็นอาหารสุขภาพแบบดั้งเดิม และเป็นยาแผนโบราณในประเทศเกาหลี จีน และญี่ปุ่น (Xu and Yun, 2004) เห็ดถั่งเฉ้าหิมะนี้มีสารออกฤทธิ์สำคัญประเภทต่าง ๆ ซึ่งมีคุณสมบัติในทางการแพทย์ และเภสัชวิทยาเป็นอย่างมาก โดยสารออกฤทธิ์นี้พบมากในก้านซูสปอร์ (synnemata) หรือก้านดอกเห็ด (fruiting body) เช่น polysaccharide (Lu *et al.,* 2007) nucleotide (Xu *et al.,* 2003) cordycepin, adenosine (Du *et al.,* 2012) และ N6-(2-hydroxyethyl) adenosine ที่ช่วยกระตุ้นการไหลเวียนเลือด เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ฟื้นฟูระบบต่าง ๆ ภายในร่างกายให้แข็งแรง (Chen *et al.,* 2008) ปัจจุบันยังไม่พบการรายงานการพัฒนาหรือปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราชนิดนี้ ซึ่งจากรายงานของ Ma *et al.* (2011) พบว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยการชักนำการกลายพันธุ์เป็นหนึ่งวิธีอันมีประสิทธิภาพที่นำมาใช้ในทางจุลชีววิทยา ซึ่งการฉายรังสี UV เป็นวิธีการหนึ่งในการชักนำการกลายพันธุ์ของเชื้อราได้ จึงเป็นแนวทางในการพัฒนาสายพันธุ์เชื้อรา *C. tenuipes* ด้วยการฉายรังสี UV เพื่อปรับปรุง และคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา *C. tenuipes* ที่สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้ดีที่สุด ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการสร้างก้านดอกเห็ดที่สมบูรณ์แข็งแรงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าสายพันธุ์เดิม นอกจากนี้อาจช่วยเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ได้จากก้านดอกเห็ด ซึ่งเป็นประโยชน์ทางเภสัชกรรม และเป็นการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเฉ้าหิมะในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* ที่ได้จากดักแด้ไหมมาทำการเพาะเลี้ยงบน PDA โดยทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อด้วยเปิดแสงไฟ UV ไว้ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ตัดก้านดอกเห็ดที่ขึ้นบนตัวดักแด้ไหมมาทำการเพาะเลี้ยงบน PDA เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. tenuipes* ที่ผ่านการคัดเลือกโดยสังเกตลักษณะการเจริญของเส้นใย และลักษณะโคโลนี

บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดทั้งหมดได้ 4 ไอโซเลท คือ QSDS1-1, QSDS1-2, QSDS1-3 และ QSDS1-4 จากนั้นนำเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 วัน เมื่อเชื้อ *C. tenuipes* เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *C. tenuipes* โดยการฉายรังสี UVC

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. tenuipes* เจริญอยู่ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ QSDS1-1, QSDS1-2, QSDS1-3 และ QSDS1-4 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จานใหม่ จากนั้นนำไปฉายรังสี UVC ด้วยหลอดหลอดฟลูออเรสเซนต์ 30 วัตต์ ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างกัน คือ 0.5, 1, 5, 10 นาที และไม่ฉายรังสี UVC โดยให้หลอด UVC ห่างจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 เซนติเมตร ทำการเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้แสงรังสี UVC สัมผัสกับโคโลนีโดยตรง ซึ่งประยุกต์จากวิธีการของ Radha *et al.* (2012) และ Brown (2010) โดยทดสอบเชื้อรา *C. tenuipes* 4 ไอโซเลท ในแต่ละไอโซเลท แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กรรมวิธี (5 ระยะเวลาการฉายรังสี) ทำกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ และคัดเลือกจากลักษณะการเจริญเติบโตที่มีการพัฒนาที่ดีที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

หลังการฉายรังสี UVC นำเชื้อไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส ทำการสังเกตการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อราทุก ๆ 3, 5, 7 และ 9 วัน โดยทำการบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา *C. tenuipes* แต่ละไอโซเลทที่ได้รับรังสี UVC ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน จากนั้นทำการสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *C. tenuipes* ที่มีการเจริญเติบโตดี และมีแนวโน้มเกิดการกลายพันธุ์

3. การทดสอบการสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ของเชื้อรา *C. tenuipes* หลังจากการฉายรังสี UVC

3.1 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณถั่งเฉ้าหิมะ *C. tenuipes* ในอาหารเหลว (Sabouraud dextrose broth; SDB)

นำเชื้อรา *C. tenuipes* ที่คัดเลือกมาทำการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว SDB ผสมดักแด้ไหม โดยนำเชื้อราที่ตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ใส่ลงในอาหารเหลว จำนวน 6 ชิ้นต่อขวด จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Luerdara *et al.* (2016) สังเกตลักษณะของอาหารเหลวในแต่ละกรรมวิธีเพื่อนำมาทำการทดลองต่อไป

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* บนดักแด้ไหม

นำอาหารเหลวในข้อ 3.1 มาทดสอบการสร้างดอกเห็ดด้วยการฉีดเข้าตัวดักแด้ไหม โดยทำการล้างดักแด้ไหมด้วยน้ำเปล่า และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ประมาณ 1 นาที นำไปผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการฉีดเชื้อรา *C. tenuipes* ที่คัดเลือกได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ฉีดเข้าใต้ผิวหนังดักแด้ไหม ทั้ง 5 กรรมวิธี คือ การฉายรังสี UVC ที่ระยะเวลา 0 นาที (ชุดควบคุม) 0.5, 1, 5 และ 10 นาที วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ จำนวนซ้ำละ 50 ตัว นำไปบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน สังเกตผลการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สี ความสูง น้ำหนักสด และแห้งของก้านดอกเห็ด

3.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ดถั่งเฉ้าหิมะบนดักแด้ไหม

นำเห็ดถั่งเฉ้าหิมะที่ผ่านการอบแห้ง อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง มาสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญ โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์หาสาร adenosine ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC) ตามวิธีการของ Huang *et al.* (2009) โดยใช้ยี่ห้อ Shimadzu คอลัมน์ Restek - USA รุ่น

Ultra IBD ขนาด 4.6 × 150 มิลลิลิตร ที่มีอนุภาค 5 ไมครอน และตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) เป็นอัลตร้าไวโอเล็ต (UV) ที่กำหนดความยาวคลื่นเท่ากับ 254 นาโนเมตร โดยมีสภาวะที่ใช้สำหรับแยกสาร ได้แก่ สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ น้ำ และ methanol (90:10) อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารที่ฉีดเท่ากับ 5 ไมโครลิตร อุณหภูมิของช่องใส่คอลัมน์เท่ากับ 32 องศาเซลเซียส ใช้สารมาตรฐาน adenosine ของบริษัท Sigma Chemical Corporation เตรียมสารละลายมาตรฐาน adenosine อยู่ในช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0-50 และ 0-100 ppm เพื่อเปรียบเทียบค่าสารสำคัญในแต่ละกรรมวิธี

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ QSDS1-1, QSDS1-2, QSDS1-3 และ QSDS1-4 ในที่มืด เป็นเวลา 20 วัน พบว่า ลักษณะโคโลนีเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 มีโคโลนีสีขาวครีม เส้นใยบาง เจริญฟูเล็กน้อย เรียงตัวเป็นวงแหวนซ้อนกันจากตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาด 6.9 เซนติเมตร (Figure 1a) ในขณะที่ไอโซเลท QSDS1-2 มีโคโลนีสีขาว คล้ายขุยหรือผงแป้งโรยไว้ เส้นใยบาง เจริญเป็นรอยบุ๋มรอบชิ้นวุ้น และฟูเป็นวงแหวนซ้อนกันตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.8 เซนติเมตร (Figure 1b) ส่วนไอโซเลท QSDS1-3 โคโลนีเป็นสีขาว เส้นใยหนาคล้ายสำลี เจริญฟูเป็นวงกลมชน ใต้ฝาจานเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะตรงกลางโคโลนี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 4.8 เซนติเมตร (Figure 1c) และไอโซเลท QSDS1-4 โคโลนีมีลักษณะสีขาวนวล เส้นใยหนา เจริญฟูเป็นวงกลมจากบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.7 เซนติเมตร (Figure 1d) เห็นได้ว่าโคโลนีของเชื้อรา *C. tenuipes* จากลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท มีลักษณะที่แตกต่างกัน จึงนำมาทำการฉายรังสีเพื่อชักนำการกลายพันธุ์ และปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

2. การทดสอบการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *C. tenuipes* โดยการฉายรังสี UVC

จากการนำเชื้อรา *C. tenuipes* ทั้ง 4 ไอโซเลท บ่มในที่มืดเป็นเวลา 9 วัน พบว่า มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน คือ

ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ไม่ฉายรังสี UVC ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญบนพื้นผิวอาหารเป็นรอยบุ๋มลึกลงไปเล็กน้อยตรงบริเวณกลางชิ้นวุ้นในไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยหนา คล้ายก้อนสำลี เจริญฟูรอบชิ้นวุ้นเป็นวงกลม ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 1 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยหนาเจริญฟู รอบชิ้นวุ้นเป็นวงกลมขยายเป็นวงกว้าง และไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที ไม่มีการเจริญของเส้นใยบนชิ้นวุ้น

ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ไม่ฉายรังสี UVC ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบเป็นวงกลมบนพื้นผิวอาหาร ในไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยหนาคล้ายก้อนสำลีเจริญฟูบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับ

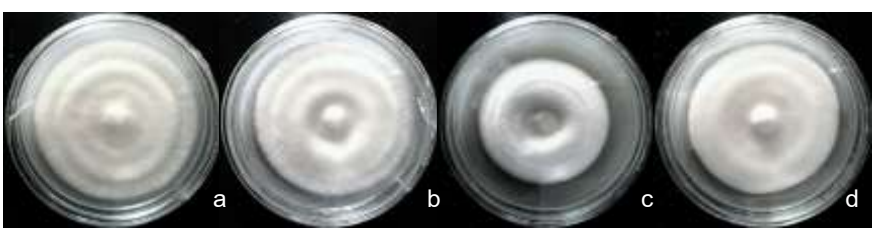

Figure 1. Four isolates of *Cordyceps tenuipes* on PDA at days 20 in dark condition: QSDS1-1 (a), QSDS1-2 (b), QSDS1-3 (c) and QSDS1-4 (d)

ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 1 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญรอบชิ้นวุ้นเป็นวงกลม ในไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยเริ่มเจริญได้เพียงบางส่วนบนชิ้นวุ้น และไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที มีสีขาว เส้นใยหนา คล้ายก้อนสำลี เจริญฟูบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ

ไอโซเลท QSDS1-3 ที่ไม่ฉายรังสี UVC ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญบนพื้นผิวอาหารเป็นรอยบุ๋มลึกลงไปเล็กน้อยตรงบริเวณกลางชิ้นวุ้น ในไอโซเลท QSDS1-3 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยเจริญเรียบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวงกลม ส่วนไอโซเลท QSDS1-3 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 1 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบรอบชิ้นวุ้นอาหารเป็นวงกลม ในไอโซเลท QSDS1-3 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบบนชิ้นวุ้นอาหารเป็นวงกลม และไอโซเลท QSDS1-3 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที ไม่มีการเจริญของเส้นใยบนชิ้นวุ้น

ไอโซเลท QSDS1-4 ที่ไม่ฉายรังสี UVC ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญบนพื้นผิวอาหารเป็นรอยบุ๋มลึกลงไปเล็กน้อยตรงบริเวณกลางชิ้นวุ้น ในไอโซเลท QSDS1-4 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนไอโซเลท QSDS1-4 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 1 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบติดผิวอาหาร สำหรับไอโซเลท QSDS1-4 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบรอบชิ้นวุ้น และไอโซเลท QSDS1-4 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที มีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบติดผิวอาหาร

จากการฉายรังสี UVC ลงบนเชื้อรา *C. tenuipes* มีการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมโดยไอโซเลท QSDS1-1 ก่อนฉายรังสี UVC มีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม เส้นใยบาง เจริญฟูเล็กน้อย และเรียงตัวเป็นวงแหวนซ้อนกัน แต่หลังจากได้รับการฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 5 นาที ทำให้โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีขาว เส้นใยหนา และฟูเป็นวงกลมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เช่นเดียวกับไอโซเลท QSDS1-2 ที่ก่อนฉายรังสี UVC มีลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยบาง คล้ายขุยหรือผงแป้งโรยไว้ เจริญบุ๋มรอบชิ้นวุ้น และเป็นวงแหวนซ้อนกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อได้รับการฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 10 นาที ลักษณะโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีขาว เส้นใยหนาขึ้น เจริญฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Abdel Hamed *et al.* (2012) ที่ได้รายงานว่า การฉายรังสี UV สามารถทำให้เส้นใยของเชื้อรา *Aspergilus parasiticus* และ *A. flavus* มีชีวิตรอดหลังการฉายรังสี UV และเกิดการกลายพันธุ์โดยเส้นใยมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันก่อนฉายรังสี

การนำเชื้อรา *C. tenuipes* ทั้ง 4 ไอโซเลท บ่มในที่มืดเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน เนื่องจากเส้นใยเจริญให้เห็นถึงความแตกต่างที่ 9 วัน โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราแต่ละกรรมวิธีแตกต่างกัน เห็นได้ว่ามีลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน Ban *et al.* (1998) รายงานว่า ลักษณะเชื้อราที่แข็งแรง จะมีเส้นใยหนา เป็นสีขาว เจริญขึ้นฟูคล้ายก้อนสำลีชนกับฝาจานเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อราที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสี UVC ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับการศึกษาดังกล่าว มีทั้งหมด 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที (Figure 2a) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.25 เซนติเมตร อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย 0.18 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟูคล้ายก้อนสำลีเป็นวงกลมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ส่วนไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที (Figure 2b) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.95 เซนติเมตร อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย 0.18 เซนติเมตร มีลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที (Figure 2c) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.10 เซนติเมตร อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย 0.10 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟู และ ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที (Figure 2d) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.50 เซนติเมตร อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย 0.18 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา

เจริญฟู ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาสายพันธุ์เชื้อรา *C. tenuipes* ต่อไป

หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหาร PDA เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว SDB พบว่า เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร PDA (Figure 3)

3. การทดสอบการสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ของเชื้อรา *C. tenuipes* หลังจากการฉายรังสี UVC

3.1 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณถั่งเช้าหิมะ *C. tenuipes* ในอาหารเหลว (Sabouraud dextrose brtoh; SDB)

เมื่อนำเชื้อรา *C. tenuipes* ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วทั้ง 4 ไอโซเลท มาทำการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว SDB เขย่าในที่มืด เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า อาหารเหลวที่มีเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 0 นาที (ชุดควบคุม) เจริญอยู่ มีลักษณะขุ่น คล้ายวุ้นเหลว ๆ เป็นสีน้ำตาลแดง มีการเพิ่มปริมาณของสปอร์ และเส้นใย โดยเส้นใยเริ่มมีการจับตัวเป็นกลุ่มตะกอนเล็ก ๆ คล้ายเม็ดสาคู ส่วนเชื้อราไอโซเลท QSDS1-1 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที อาหารเหลวมีลักษณะขุ่นขึ้นเล็กน้อย เป็นวุ้นเหลว ๆ สีน้ำตาลเหลือง เส้นใยไม่จับตัวเป็นกลุ่ม สำหรับไอโซเลท QSDS1-1 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที อาหารเหลวมีลักษณะขุ่น สีน้ำตาล และมีแผ่นเส้นใยสีขาวบาง ๆ ลอยอยู่ด้านบนของอาหารเหลว ไอโซเลท QSDS1-2 (ชุดควบคุม) อาหารเหลวมีลักษณะขุ่น มีสีน้ำตาลเหลือง เป็นวุ้นเหลว ๆ เส้นใยไม่จับตัวเป็นกลุ่ม ไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที อาหารเหลวมีลักษณะขุ่นข้น สีน้ำตาลแดง เริ่มมีการจับตัวของเส้นใยเป็นกลุ่มตะกอนเล็ก ๆ คล้ายเม็ดสาคู และมีแผ่นเส้นใยสีขาวบาง ๆ ลอยอยู่บนผิวด้านบนของอาหารเหลว และไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที อาหารเหลวมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย สีน้ำตาลเข้ม เส้นใยไม่จับตัวเป็นกลุ่ม เป็นวุ้นเหลว ๆ (Figure 4) จึงนำเชื้อเหล่านี้ฉีดเข้าสู่ดักแด้ไหมเพื่อทดสอบการสร้างก้านดอกเห็ดต่อไป

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* บนดักแด้ไหม

หลังการฉีดเชื้อรา *C. tenuipes* บนดักแด้ไหม เป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่า เชื้อราไอโซเลท QSDS1-1 ในชุดควบคุม เส้นใยเปลี่ยนจากสีครีมเข้มเป็นสีน้ำตาลอ่อน เส้นใยยุบตัวลง ไม่สามารถสร้างก้านดอกเห็ดต่อไปได้ (Figure 5a) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 0.927 กรัม และ

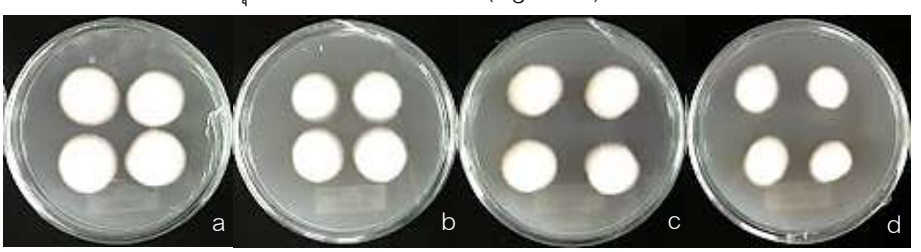

Figure 2. Characteristics of *Cordyceps tenuipes* colonies at days 9 after exposed for UVC radiation: isolate QSDS1-1 after UVC received for 0.5 (a) and 5 minutes (b), QSDS1-2 after UVC received for 0.5 (c) and 10 minutes

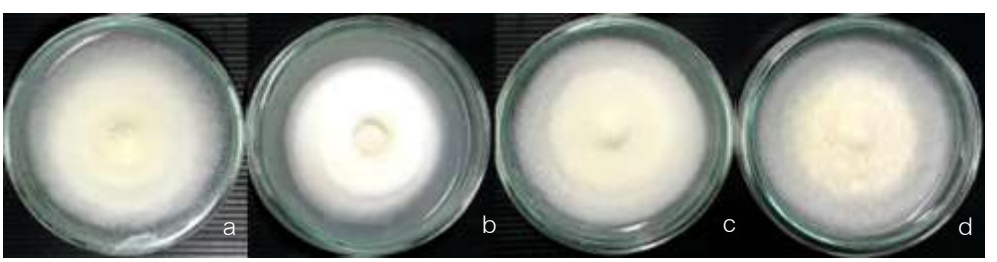

Figure 3. Characteristics of *Cordyceps tenuipes* at qualified: isolate QSDS1-1 after UVC received for 0.5 (a) and 5 minutes (b), QSDS1-2 after UVC received for 0.5 (c) and 10 minutes (d)

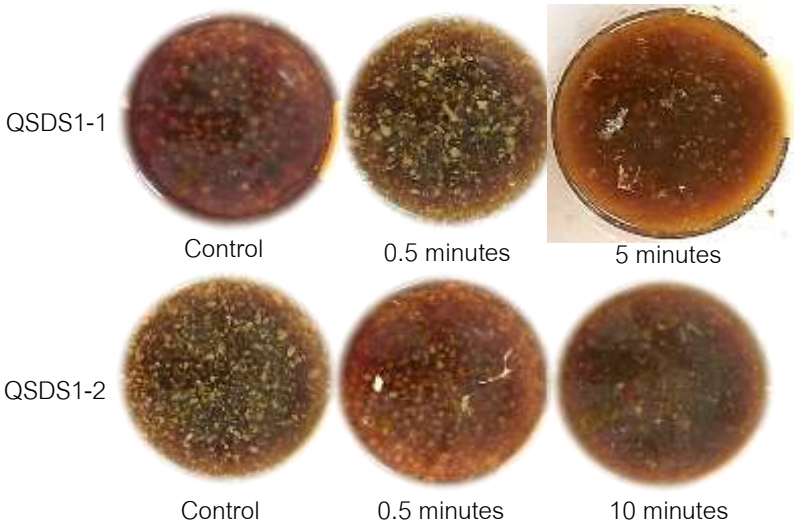

Figure 4. Characteristics of *Cordyceps tenuipes* in Sabouraud dextrose borth at day 7

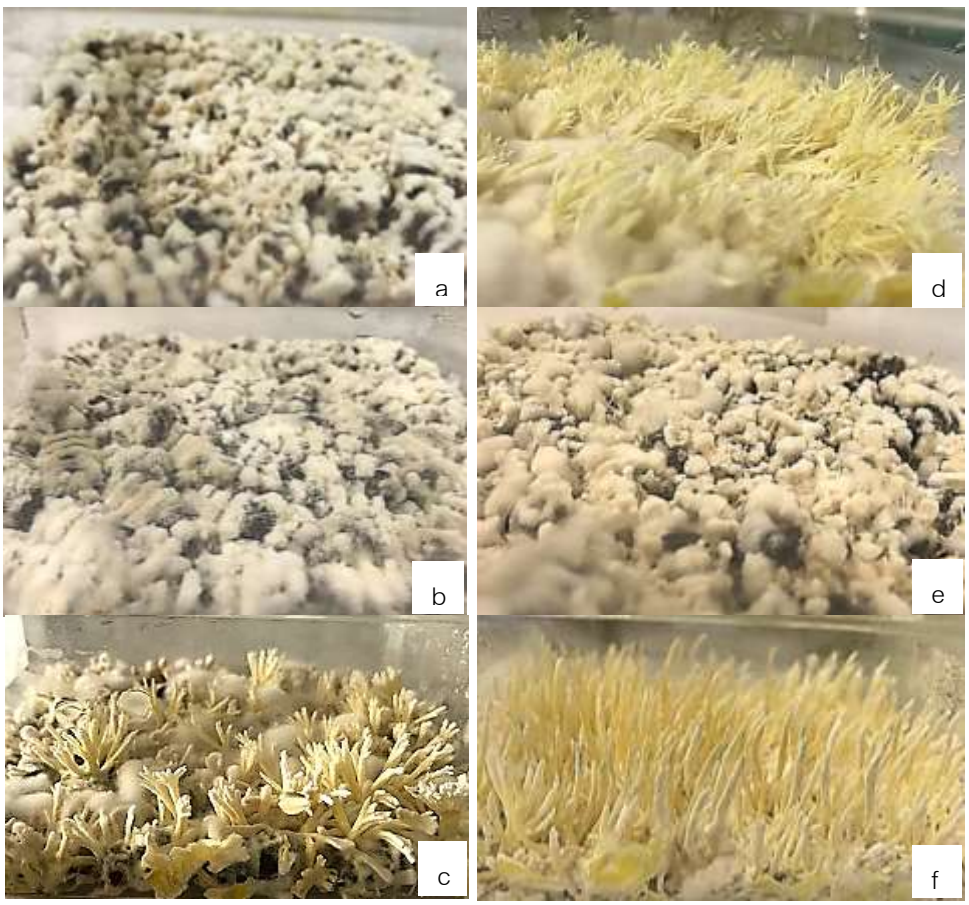

Figure 5. Characteristics of *Cordyceps tenuipes* on pupae before injection at day 20: isolate QSDS1-1 (Control) (a) isolate QSDS1-1 after receiving UVC for 0.5 (b) and 5 minutes (c), QSDS1-2 (Control) (d), QSDS1-2 after receiving UVC for 0.5 (e) and 10 minutes (f)

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.194 กรัม ส่วนกรรมวิธีที่ฉีดด้วยเชื้อราไอโซเลท QSDS1-1 ฉายรังสี UVC 0.5 นาที ลักษณะเส้นใยสีขาวฟู คล้ายขุยหรือผงแป้งโรยไว้ จึงไม่สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้ (Figure 5b) โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 0.959 กรัม และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.183 กรัม และกรรมวิธีที่ฉีดด้วยเชื้อราไอโซเลท QSDS1-1 ฉายรังสี UVC 5 นาที (Figure 5c) มีการสร้างก้านดอกเห็ดขึ้นบนดักแด้ไหมบางส่วน โดยเป็นก้านคล้ายปะการัง มีลักษณะอวบ สีเหลือง ส่วนบริเวณปลายของก้านดอกเห็ดมีสีขาว เป็นกลุ่มสปอร์เล็ก ๆ เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) ก้านดอกเห็ดมีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 1.036 กรัม และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.199 กรัม สำหรับเชื้อราไอโซเลท QSDS1-2 กรรมวิธีที่เป็นชุดควบคุม มีเส้นใยสีขาวฟู คล้ายสำลี และเกิดตุ่มเห็ดเล็ก ๆ ปลายแหลม แทงออกมาบนกลุ่มของเส้นใยที่อัดตัวกันแน่น (ก้านซูสปอร์) มีลักษณะเป็นฝอย ขนาดก้านเล็ก มีความยาวประมาณ 1.6 เซนติเมตรโดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 0.944 กรัม และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.193 กรัม (Figure 5d) ส่วนกรรมวิธีที่ฉีดด้วยเชื้อราไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC 0.5 นาที ลักษณะเส้นใยมีสีครีมจนถึงน้ำตาลอ่อน เส้นใยยุบตัว และไม่สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้ (Figure 3e) โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 1.054 กรัม และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.199 กรัม และกรรมวิธีที่ฉีดด้วยเชื้อราไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC 10 นาที มีการสร้างก้านดอกเห็ดเป็นก้านปลายแหลมสีเหลือง มีความยืดตัวอย่างรวดเร็ว บริเวณปลายก้านดอก เห็ดมีสีขาว และมีสปอร์เล็ก ๆ สีขาวเกาะที่ปลายก้านดอกเห็ด (โคนิเดีย) มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ทั่วบริเวณลำตัวดักแด้ไหม (Figure 5f) โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 1.098 กรัม และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.202 กรัม

3.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ดถั่งเฉ้าหิมะบนดักแด้ไหม

จากการนำก้านดอกเห็ดถั่งเฉ้าหิมะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC 0.5 และ 5 นาที และ ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC 0.5 และ 10 นาที บนดักแด้ไหม จากนั้นนำไปอบแห้ง สกัดสาร และวิเคราะห์ปริมาณสาร adenosine ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที มีปริมาณสาร adenosine สูงที่สุดเท่ากับ 50.11 มิลลิกรัม/100 กรัม รองลงมา คือ ก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 38.73 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ไม่ฉายรังสี UVC (0 นาที) มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 27.70 มิลลิกรัม/100 กรัม สำหรับก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 10.42 มิลลิกรัม/100 กรัม รองลงมาคือ ก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 8.69 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ไม่ฉายรังสี UVC (0 นาที) มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 6.05 มิลลิกรัม/100 กรัม แสดงให้เห็นว่าก้านดอกเห็ดที่เจริญบนดักแด้ไหม จากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ได้รับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที มีปริมาณสาร adenosine สูงกว่าก้านดอกเห็ดของ Hong *et al*. (2007) ได้รายงานเกี่ยวกับปริมาณสาร adenosine ที่พบในส่วนของก้านดอกเห็ดถั่งเฉ้าหิมะ และวัสดุเพาะ มีปริมาณสารที่แตกต่างกัน โดยก้านดอกเห็ดมีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 0.033 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าในส่วนวัสดุเพาะที่มีค่าเพียง 0.013 เปอร์เซ็นต์

เชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ได้รับการฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้อย่างรวดเร็ว มีลักษณะปลายแหลม สีเหลือง และบริเวณปลายก้านดอกเห็ดมีผงสีขาว (โคนิเดีย) เกาะติดอยู่ ขนาดของก้านดอกเห็ดมีความยาวเฉลี่ย 2.00 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.10 และ 0.20 กรัม ตามลำดับ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร adenosine พบมีค่าเท่ากับ 50.11 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Table 1)

Table 1. Adenosine content in fruiting body of *Cordyceps tenuipes* grown on silkworm pupae after exposing to UVC

UVC radiation exposure	Adenosine content (mg /100 g)
QSDS1-1 (0 min)	6.05 e[1]
QSDS1-1 (0.5 min)	8.69 de
QSDS1-1 (5 min)	10.42 d
QSDS1-2 (0 min)	27.70 c
QSDS1-2 (0.5 min)	38.73 b
QSDS1-2 (10 min)	50.11 a

[1] Means within the same column followed by the same letters are not significantly different at $P \geq 0.05$

สรุป

จากการนำเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1, QSDS1-2, QSDS1-3 และ QSDS1-4 ทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสี UVC ที่ระยะเวลา 0.5, 1, 5 และ 10 นาที พบว่า เชื้อรา *C. tenuipes* ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างไปจากเดิม แต่มีเชื้อรา 4 ไอโซเลทที่มีลักษณะที่ดี คือ เชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 หลังฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 5 นาที และไอโซเลท QSDS1-2 หลังฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 10 นาที โดยมีลักษณะของโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3.25, 2.95, 3.10 และ 2.50 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.18, 0.18, 0.10 และ 0.18 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อรา *C. tenuipes* ทั้ง 4 ไอโซเลทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ 9 วัน ไปเพาะเลี้ยงบนดักแด้ไหม พบว่า จากข้อมูลในตารางที่ 1 ทำให้เห็นได้ว่าปริมาณของสาร adenosine ของก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC และไม่ฉายรังสี UVC มีปริมาณสาร adenosine สูงกว่าเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 แสดงว่าเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเฉ้าในเชิงอุตสาหกรรมได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ เชียงใหม่ กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ให้การสนับสนุนดักแด้ไหมและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Abdel Hameed, A.A, A.M. Ayesh, M. Abdel Razik and H.F. Abdel Mawla, 2012. Ultraviolet radiation as a controlling and mutating agent of environmental fungi. Management of Environmental Quality: An International Journal 24(1): 53-63.

Ban, K.W., D.K. Park, J.O. Shim, Y.S. Lee, C.H. Park, J.Y. Lee and M.W. Lee. 1998. Cultural characteristics for inducing fruting-body of *Isaria japonica*. The Korean Journal of Mycology 26(3): 380-386.

Brown, A.E. 2010. Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology. McGraw-Hill Book Company, New York. 447 p.

Chen, X.M., J.X. Lu, Y.D. Zhang, J.T. He, X.Z. Guo, G.Y. Tian and L.Q. Jin. 2008. Studies of

macrophage immuno-modulating activity of polysaccharides isolated from *Paecilomyces tenuipes*. International Journal of Biological Macromolecules 43(3): 252-256.

Du, L., J. Song, H. Wang, P. Li, Z. Yang, L. Meng and L. Teng. 2012. Optimization of the fermentation medium for *Paecilomyces tenuipes* N45 using statistical approach. African Journal of Microbiology Research 6(32): 6130-6141.

Hong, I.P., S.H. Nam, G.B. Sung, I.M. Chung, H. Hur, M.W. Lee, M.K. Kim and S.X. Guo. 2007. Chemical components of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson. Mycobiology 35(4): 215-218.

Huang, L., Q. Li, Y. Chen, X. Wang and X. Zho. 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in products of *Cordyceps* spp. African Journal of Microbiology Research 3(12): 957-961.

Kepler, R.M., J.J. Luangsa-ard, N.L. Hywel-Jones, C.A. Quandt, G.H. Sung, S.A. Rehner, M.C. Aime, T.W. Henkel, T. Sanjuan, R. Zare, M. J. Chen, Z.Z. Li, A.Y. Rossman, J.W. Spatafora and B. Shrestha. 2017. A phylogenetic-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). International Mycological Association Fungus 8(2): 335-353.

Lu, R., T. Miyakoshi, G.Y. Tian and T. Yoshida. 2007. Structural studies of *Paecilomyces tenuipes* Samson polysaccharide-part-2. Carbohydrate Polymer 67(3): 343-346.

Luerdara, K., J. Kulsalin, S. Buranapanichpan and T. Tapingkae. 2006. Growth of gold cordyceps (*Cordyceps militaris*) on pupae of Nanglai Thai native silkworm and eri silkworm. Journal of Agriculture 32(1): 95-102.

Ma, C.X., D.L. Jiang and X.Y. Wei. 2011. Mutation breeding of *Emericella foeniculicola* TR21 for improved production of tanshinone. Process Biochemistry 46(10): 2059-2063.

Radha, S., R.H. Ba, A. Sridevi, N.B.L. Prasad and G. Narasimha. 2012. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. European Journal of Experimental Biology 2(5): 1517-1528.

Xu, C.P. and J.W. Yun. 2004. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. Enzyme and Microbial Technology 35(1): 33-39.

Xu, C.P., S.W. Kim, H.J. Hwang and J.W. Yun. 2006. Production of exopolysaccharides by submerged culture of an enthomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. Bioresource Technology 97(5): 770-777.

Xu, C.P., S.W. Kim, H.J. Hwang, J.W. Choi and J.W. Yun. 2003. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. Process Biochemistry 38(7): 1025-1030.

ผลของการใช้แมลงกินได้เป็นส่วนผสมในอาหาร SDB (Sabouraud Dextrose Broth) และวัสดุเพาะต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช้าสีทอง *Cordyceps militaris* (L.) Link

Effects of Edible Insects as Ingredient in Sabouraud Dextrose Broth and Culture Media on Growth of Gold Cordyceps, *Cordyceps militaris* (L.) Link

โสภิณ คำแสนศรี[1] จิราพร กุลสาริน[1*] ไสว บูรณพานิชพันธุ์[1] ธัญญา ทะพิงค์แก[2] และ สิริญา คัมภิโร[1]

Sopin Khumsaensri[1], Jiraporn Kulsarin[1*], Sawai Buranapanichpan[1], Tanya Tapingkae[2] and Siriya Kumpiro[1]

[1]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีและพัฒนาการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50300

[2]Department of Technology and Development in Agriculture, Faculty of Agricultural Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai 50300, Thailand

**Corresponding author: Email: j.tayuti@gmail.com*

(Received: 27 November 2018; Accepted: 18 January 2019)

Abstract: Gold cordyceps (*Cordyceps militaris* (L.) Link) contained of cordycepin and adenosine as bioactive compounds, which described as a medicine and functional food. It can grow on several insect species, especially edible insects in order Lepidoptera, Orthoptera and Coleoptera. The objective was to study the effect of edible insects as an ingredient in Sabouraud dextrose broth (SDB) and the culture media on the growth and the bioactive compound of *C. militaris*. The four tested edible insect species were pre-pupa and pupa of silkworm (*Bombyx mori*), adult cricket (*Gryllus bimaculatus*), bamboo caterpillar (*Omphisa fuscidentalis*) and mealworm (*Tenebrio molitor*). The result revealed that the SDB mixed with cricket yielded the highest viability of 3.5×10^3 cfu/ml. Then, the media were blended with two kinds of media, Riceberry rice + all tested edible insects and Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) rice + all tested edible insects. It was obvious that *C. militaris* culturing on KDML105 rice + silkworm pupa gave the maximum fruiting body length of 3.14 cm whereas the average highest fresh and dry weights, 5.56 and 1.17 g, obtained from Riceberry rice + silkworm pre-pupa medium. The content of bioactive compounds, cordycepin and adenosine, in the fruiting bodies and the media were analyzed. The highest cordycepin content (1,266.74 mg/100 g) was found in fruiting body culturing on KDML105 rice + cricket medium while the highest adenosine content (94.91 mg/100 g) was found in KDML105 rice + cricket medium. The result of this study will be a guideline to develop the technique of gold cordyceps culture for farmers and researchers in the future.

Keywords: Culture media, edible insects, *Cordyceps militaris*, Sabouraud dextrose broth

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: เห็ดถั่งเฉ้าสีทอง (*Cordyceps militaris* (L.) Link) มีสารออกฤทธิ์ที่มีสรรพคุณทางยาและใช้บริโภคเพื่อปรับสมดุลในร่างกาย ได้แก่ cordycepin และ adenosine เห็ดชนิดนี้เป็นเชื้อราที่เจริญเติบโตได้ดีในแมลงหลายชนิดในอันดับ Lepidoptera, Orthoptera และ Coleoptera โดยเฉพาะแมลงกินได้ จึงทำการศึกษาผลของแมลงกินได้เป็นส่วนผสมในอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) และวัสดุเพาะ ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารออกฤทธิ์สำคัญของเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง โดยใช้แมลงกินได้ทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ และดักแด้ไหม ตัวเต็มวัยจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ หนอนเยื่อไผ่ และหนอนนก ผลการศึกษาพบว่า อาหาร SDB ผสมจิ้งหรีด ให้ค่าความมีชีวิตสูงสุดที่ 3.5×10^3 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำอาหาร SDB นี้ ถ่ายลงวัสดุเพาะที่ประกอบด้วยข้าวไรซ์เบอรี่ (Riceberry) และข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) ผสมแมลงกินได้ชนิดต่าง ๆ พบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมดักแด้ไหม มีความยาวสูงสุดเท่ากับ 3.14 เซนติเมตร ขณะที่น้ำหนักสดและแห้งเฉลี่ยสูงสุดของก้านดอกเห็ดได้จากการเพาะบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่ผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีค่าเท่ากับ 5.56 และ 1.17 กรัม ตามลำดับ ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมจิ้งหรีด ตรวจพบว่ามีสาร cordycepin ปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 1,266.74 มิลลิกรัม/100 กรัม ส่วน adenosine พบมากที่สุดในวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมจิ้งหรีด ปริมาณ 94.91 มิลลิกรัม/100 กรัม ผลการศึกษานี้ช่วยให้เห็นแนวทางในการพัฒนาและเสริมสร้างเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเฉ้าสีทองแก่เกษตรกรและนักวิจัยในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: วัสดุเพาะ แมลงกินได้ *Cordyceps militaris* Sabouraud dextrose broth

คำนำ

เห็ดถั่งเฉ้าสีทอง (Gold Cordyceps) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cordyceps militaris* (L.) Link เป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงอันดับ Lepidoptera และ Coleoptera (Sato and Shimazu, 2002) มีสรรพคุณทางยาสูง จึงถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ หรือบริโภคเพื่อปรับสมดุลและฟื้นฟูระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเฉ้า เพื่อผลิตก้านดอกเห็ด (fruiting body) และเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ในก้านดอกเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง สารออกฤทธิ์สำคัญที่พบในเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง ได้แก่ สาร cordycepin ช่วยต่อต้านมะเร็ง และรักษาสมดุลของร่างกาย สาร adenosine ช่วยชะลอความชราและ cordycepic acid ช่วยเพิ่มเมแทบอลิซึมในเลือด ลดอาการหอบหืด โรคหัวใจขาดเลือด เป็นต้น (Almagro *et al*., 2011; Dong *et al*., 2012; Khan *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2010) โดยเฉพาะสาร cordycepin เป็นสารที่มีปริมาณสูงในเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง และมีมูลค่าทางการค้า จากการศึกษาของ Zhang *et al*. (2016) พบว่า การเจริญของเซลล์เห็ด และปริมาณของสารออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อรา สารอาหารที่เหมาะสม (แหล่งไนโตรเจน คาร์บอน และแร่ธาตุต่าง ๆ) และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม Mao and Zhong (2006) รายงานว่า การเติมอาหารเสริมเข้าไปในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น protein, yeast extract และ peptone เป็นต้น ช่วยในเรื่องของการเจริญของเซลล์เห็ด ส่วนแหล่งคาร์บอน เช่น adenine, adenosine, glucose, glycine, L-aspartic acid และ L-glutamine ช่วยเสริมสร้างสาร cordycepin ในเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง (Mao *et al*., 2005; Masuda *et al*., 2007) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเฉ้าสีทองต้องการสารจำพวกโปรตีน และกรดอะมิโนเป็นส่วนใหญ่ จากการศึกษาของ Hong *et al*. (2010) มีการฉีดเชื้อเห็ดถั่งเฉ้าสีทองเข้าไปในดักแด้ไหม (*Bombyx mori*) แล้วเกิดก้านดอกเห็ดขึ้น และ Sato and Shimazu (2002) รายงานว่า เชื้อเห็ดถั่งเฉ้าสีทองสามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้ในหนอนนก (*Tenebrio molitor*) ระยะดักแด้ นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ธัญพืชเป็นวัสดุเพาะ พบว่าข้าวไรซ์เบอรี่ผสมดักแด้ไหม และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมดักแด้ไหม มีแนวโน้มนำไปพัฒนาเป็นวัสดุเพาะเห็ดถั่งเฉ้าสีทองได้ ปัจจุบันแมลงได้รับความนิยมนำมาเป็นส่วนประกอบในอาหารของมนุษย์และสัตว์มากขึ้น (van

Huis *et al*., 2013) จึงมีการเพาะเลี้ยงแมลงเพิ่มขึ้นจนกลายเป็นระดับอุตสาหกรรม ซึ่งแมลงที่นิยมนำมาเป็นอาหารมีหลายชนิด เช่น ดักแด้ไหม จิ้งหรีด หนอนเยื่อไผ่ และหนอนนก เป็นต้น แต่เนื่องด้วยแมลงเหล่านี้มีโปรตีนและกรดอะมิโนสูง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงนำแมลงกินได้ชนิดต่าง ๆ มาใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อราเห็ดในอาหารเหลว วัสดุเพาะ รวมทั้งปริมาณของสารออกฤทธิ์ในก้านดอกเห็ดที่เพิ่มขึ้น ช่วยลดต้นทุนการผลิตเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง และเป็นแนวทางช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่แมลงกินได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองในอาหารเหลวที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน

ทำการเตรียมแมลง โดยนำแมลงสด 5 ชนิด ได้แก่ หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ (silkworm pre-pupa) และดักแด้ไหม (silkworm pupa) พันธุ์ J108 x นางลาย สระบุรี ตัวเต็มวัยจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ (cricket) หนอนเยื่อไผ่ (bamboo caterpillar) และหนอนนก (mealworm) ล้างให้สะอาด ต้มในน้ำเดือด 30 นาที ผึ่งให้แห้งและใส่ถุงพลาสติก และแช่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยนำมีดตัดเชื้อรา *C. militaris* บนจานอาหารวุ้น ขนาด 0.25 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำเข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยชิ้นวุ้นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ พันขอบจานด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการปนเปื้อน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ตามแนวทางของ Hong *et al*. (2010) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ทำการวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว Sabouraud dextrose broth (SDB) ที่ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ผสมแมลง ทั้งหมด 6 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ โดยทำการเพิ่มปริมาณเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว โดยนำเชื้อรา *C. militaris* ที่เตรียมไว้บนอาหารวุ้น ขนาด 0.25 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในอาหารเหลว จำนวน 4 ชิ้นต่อซ้ำ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในห้องมืด อุณหภูมิ 18-22 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Luerdara *et al*. (2016) บันทึกผลความมีชีวิต (viability) มีหน่วยเป็นหน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร (cfu/ml) และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา (dry mass) ทุก ๆ 3 วัน หลังจากเขย่า รวมเวลา 21 วัน

การศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน

ทำการเตรียมวัสดุเพาะโดยนำข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และข้าวไรซ์เบอรี่ (Riceberry) ผสมแมลงแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ ได้แก่ วัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ และดักแด้ไหม พันธุ์ J108 x นางลาย สระบุรี ตัวเต็มวัยจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ หนอนเยื่อไผ่ และหนอนนก ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 และแบ่งใส่ขวดเพาะเตรียมสารอาหารสำหรับหุงโดยนำมันฝรั่งและข้าวโพดฝักอ่อนต้มในน้ำกลั่น กรองน้ำออกและผสมกับสารอาหารเสริมที่ชั่งไว้ผสมให้เข้ากัน เทสารอาหารผสมดังกล่าวลงในขวดเพาะ ขวดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากขวดเพาะนำไปนึ่งและผึ่งเย็น

ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะ โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดสอบการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมเป็นวัสดุเพาะไม่ผสมแมลง รวมทั้งหมด 6 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ โดยนำอาหารเหลวที่ดีที่สุดจากการทดลองแรก ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ใส่ลงบนวัสดุเพาะ และนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 18-22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในสภาพมืด จากนั้นให้แสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ก่อนเก็บเกี่ยวทำการบันทึกน้ำหนักเห็ดถั่งเฉ้าสีทองก่อนและหลังอบ ความสูงของก้านดอกเห็ด เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปของเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง

จากนั้นทำการวิเคราะห์สาร cordycepin และ adenosine ในเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ผสมแมลงกินได้ต่างชนิดกัน โดยวางแผนแบบ 2x6x2 factorial

experiment in CRD จำนวน 2 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1) วัสดุเพาะเห็ดถั่งเช้าสีทอง 2 ชนิด คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวไรซ์เบอรี่ ปัจจัยที่ 2) แมลงกินได้ที่ผสมวัสดุเพาะรวมถึงที่ไม่ผสมแมลง รวม 6 แบบ และปัจจัยที่ 3) ก้านดอกเห็ดถั่งเช้าสีทองและวัสดุเพาะ นำเห็ดถั่งเช้าสีทองอบแห้งบดละเอียด 1 กรัม มาสกัดสารด้วยน้ำกลั่น และ methanol อย่างละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และกรองเอาเฉพาะสารสกัดใส เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในสารสกัดเห็ดถั่งเช้าสีทอง ด้วยเครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC) (Huang *et al*., 2009) และทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเช้าสีทองในอาหารเหลวที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน

จากการนำเชื้อรา *C. militaris* เพาะเลี้ยงในอาหาร SDB ที่ผสมแมลงต่างชนิดกัน พบว่า 3 วัน หลังจากเขย่า อาหารเหลวทุกกรรมวิธี ค่าความมีชีวิตน้อย และไม่เกิดการสร้างสปอร์ มีการเจริญแบบ turbid โดยอาหารเหลวมีลักษณะขุ่นขึ้นเล็กน้อย เมื่อผ่านไป 6 วัน ทุกกรรมวิธีมีลักษณะขุ่นมากขึ้น มีการเพิ่มปริมาณของสปอร์และเส้นใยในอาหารเหลว โดยเส้นใยเริ่มจับตัวเป็นกลุ่มตะกอนเล็ก ๆ เรียกการเจริญแบบนี้ว่า flocculent มีน้ำหนักเชื้อราลดลง และและไม่สร้างสปอร์ หรือสร้างน้อย แต่เมื่อผ่านไป 9-21 วัน เป็นการเจริญแบบ pellicle คือมีแผ่นเส้นใย บาง ๆ ลอยอยู่ด้านบนอาหารเหลว หรือติดบริเวณขอบด้านข้างของขวดอาหาร มีลักษณะหนาและอัดตัวแน่น โดยอาหารเหลวทุกกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลงแตกต่างกับกรรมวิธีที่มีแมลงเป็นส่วนผสม ซึ่งอาหารเหลวที่ไม่ผสมแมลงมีลักษณะขุ่นน้อย และแผ่นเส้นใยมีลักษณะบางกว่า เมื่อตรวจความมีชีวิตของเชื้อรา *C. militaris* พบว่า หลังเขย่า 3-6 วัน มีค่าความมีชีวิตของทุกกรรมวิธีน้อยกว่า 2.5×10^2 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หลังจากเขย่า 9 วัน กรรมวิธีที่ผสมจิ้งหรีด หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ และดักแด้ไหม เพิ่มเป็น 3.5×10^2, 3.1×10^2 และ 2.8×10^2 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเขย่าไปถึง 12 วัน มีน้ำหนักของเชื้อราเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และอาหารเหลวผสมจิ้งหรีดมีน้ำหนักเชื้อรา และค่าความมีชีวิตสูงที่สุด คือ 0.34 กรัม และ 3.5×10^3 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาเป็นกรรมวิธีที่ผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ และดักแด้ไหม มีค่าความมีชีวิตเท่ากับ 2.5×10^3 และ 9.5×10^2 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นพบว่า เชื้อรามีค่าความมีชีวิตลดลงเรื่อย ๆ และเชื้อแผ่กระจาย (Table 1, 2)

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว SDB ที่ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ พบว่า ในช่วงแรกมีการเกิดบลาสโตสปอร์ (blastospores) และภายใต้แรงเหวี่ยงทำให้เส้นใยขาดออกจากบลาสโตสปอร์ และเพิ่มปริมาณมากขึ้น ทำให้อาหารเหลวข้นขึ้น แล้วอัดแน่นเป็นแผ่นลอยอยู่บนผิวอาหารเหลว หรือที่เรียกกันว่า รกถั่งเช้า ซึ่งลักษณะของอาหารเหลวนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Shrestha *et al*. (2006) ที่รายงานการเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว โดยช่วงแรกมีการเกิดโคนิเดีย เส้นใยและแผ่นเส้นใยตามลำดับ ทั้งนี้การเจริญของเชื้อราในลักษณะที่กล่าวมา ขึ้นอยู่กับแมลงชนิดต่าง ๆ ที่มีสารอาหารแตกต่างกัน จากค่าความมีชีวิตของ

Table 1. Viability of Sabouraud dextrose broth mixed with edible insect after inoculated with *Cordyceps militaris*

Edible insects	Viability of *C. militaris* (cfu/ml)						
	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days	18 days	21 days
Silkworm pupa	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	2.8×10^2	9.5×10^2	-	-	-
Silkworm pre-pupa	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	3.1×10^2	2.5×10^3	-	-	-
Cricket	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	3.5×10^2	3.5×10^3	-	-	-
Bamboo caterpillar	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	4.0×10^2	-	-	-
Mealworm	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	-	-	-
Without insect	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	-	-

Table 2. Dry mass of Sabouraud dextrose broth mixed with edible insect after inoculated with *Cordyceps militaris*

Edible insects	Dry mass of *C. militaris* (g)						
	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days	18 days	21 days
Silkworm pupa	0.17 bc[1]	0.06 b	0.10 ab	0.10 bc	0.20 ab	0.19 ab	0.11 bc
Silkworm pre-pupa	0.25 ab	0.18 ab	0.10 ab	0.29 a	0.21 ab	0.08 b	0.05 c
Cricket	0.28 a	0.14 ab	0.18 a	0.34 a	0.25 a	0.27 a	0.16 ab
Bamboo caterpillar	0.19 ab	0.24 a	0.18 a	0.29 a	0.14 ab	0.24 ab	0.13 abc
Mealworm	0.22 ab	0.08 ab	0.06 ab	0.17 b	0.19 ab	0.18 ab	0.24 a
Without insect	0.07 c	0.13 ab	0.04 b	0.07 c	0.10 b	0.09 ab	0.08 bc

[1] Means within the same column followed by the same letters are not significantly different at $P \geq 0.05$

เชื้อรา *C. militaris* พบว่า อาหารเหลวที่ผสมแมลงกินได้ช่วยกระตุ้นการสร้างบลาสโตสปอร์ภายในอาหารเหลว ทำให้มีค่าความมีชีวิตสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งหลังการเขย่า 12 วัน สปอร์ได้พัฒนาไปเป็นเส้นใย เกิดการแผ่กระจายในจานเพาะเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง พบไม่มีการกระตุ้นการสร้างสปอร์ จึงมีปริมาณบลาสโตสปอร์น้อย มีค่าความมีชีวิตน้อยกว่า 2.5×10^2 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร และหลังจากเขย่าอาหารเหลว 15 วันขึ้นไป จึงเกิดการแผ่กระจายของเส้นใยในจานเพาะเชื้อ แสดงว่าสารอาหารและระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อรา ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว SDB ดังนั้น จึงเลือกใช้อาหาร SDB ผสมจิ้งหรีด ที่มีระยะเวลาการเขย่า 12 วันในการทดลองต่อไปเนื่องจากมีน้ำหนักแห้งของเชื้อรา และ ค่าความมีชีวิตสูงที่สุด

การศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน

จากการคัดเลือกเชื้อรา *C. militaris* ในอาหาร SDB ผสมจิ้งหรีด ระยะเวลาเขย่า 12 วัน ใส่ลงบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวไรซ์เบอรี่ ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ พบว่า หลังจากปลูกเชื้อรา *C. militaris* 2 สัปดาห์ ทุกกรรมวิธีมีเส้นใยสีขาวปกคลุมทั่ววัสดุเพาะมีลักษณะฟู และเจริญลงไปถึงก้นขวด เมื่อให้แสงนาน 24 ชั่วโมง เส้นใยของทุกกรรมวิธีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม แต่ไม่เกิดก้านดอกเห็ด (fruiting body) หลังจากให้แสง 2 สัปดาห์ ทุกกรรมวิธีเริ่มมีก้านดอกเห็ดขึ้นบนวัสดุเพาะ และก้านดอกเห็ดมีความสูงเพิ่มขึ้น เมื่อให้แสงครบ 5 สัปดาห์ พบว่า ก้านดอกเห็ดจากกรรมวิธีที่ผสมดักแด้ไหมมีความสูงเฉลี่ยของก้านดอกเห็ดมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 3.14 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง และผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนเยื่อไผ่ จิ้งหรีด และหนอนนก ส่วนก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมหนอนเยื่อไผ่ ไม่ผสมแมลง หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ ดักแด้ไหม และจิ้งหรีด มีจำนวนก้านดอกเห็ดเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนนก (Figure 1) และพบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีน้ำหนักสดสูงที่สุดเท่ากับ 3.12 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง ผสมดักแด้ไหม จิ้งหรีด และหนอนเยื่อไผ่ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนนก ส่วนน้ำหนักแห้ง พบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีน้ำหนักสดสูงที่สุดเท่ากับ 0.77 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ผสมดักแด้ไหม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมจิ้งหรีด ไม่ผสมแมลง ผสมหนอนเยื่อไผ่ (Table 3)

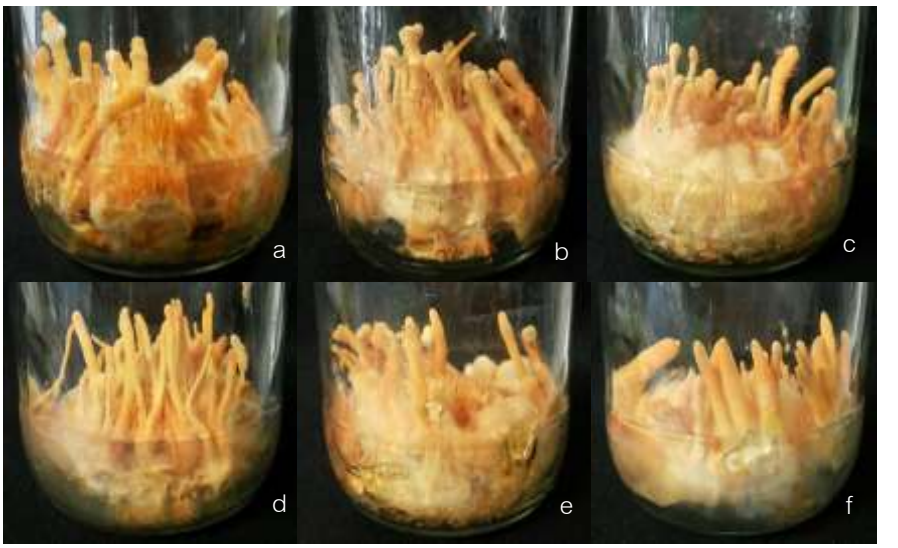

Figure 1. Characteristics of gold cordyceps on KDML105 rice mixed with edible insects after 5 weeks in light condition: silkworm pupa (a), silkworm pre-pupa (b), cricket (c), bamboo caterpillar (d), mealworm (e) and without insect (f)

Table 3. Growth of *Cordyceps militaris* on KDML105 rice mixed with edible insects

Edible insects	Fuiting body length (cm)	No. of fruiting body	Fruiting body weight (g)		Weight loss (%)
			Fresh	Dry	
Silkworm pupa	3.14 a[1]	22.0 a	2.45 ab	0.69 ab	71.84
Silkworm pre-pupa	2.80 ab	22.8 a	3.12 a	0.77 a	75.32
Cricket	2.42 b	20.8 ab	2.07 abc	0.61 b	70.53
Bamboo caterpillar	2.49 b	26.8 a	1.71 ab	0.42 c	75.44
Mealworm	2.40 b	13.2 b	1.01 bc	0.28 d	72.28
Without insect	2.83 ab	24.0 a	2.84 ab	0.58 b	79.58

[1] Means within the same column followed by the same letters are not significantly different at $P \geq 0.05$

สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* ในอาหาร SDB ผสมจิ้งหรีด บนข้าวไรซ์เบอรี่ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ เมื่อให้แสงครบ 5 สัปดาห์ พบว่า ก้านดอกเห็ดในทุกกรรมวิธีที่เพาะเลี้ยงในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ มีความสูงเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง ส่วนก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่ผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ หนอนนก และดักแด้ไหม มีจำนวนก้านดอกเห็ดเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) มีค่าเท่ากับ 14.60, 14.60 และ 14.20 ก้านต่อขวดเพาะ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนเยื่อไผ่ และไม่ผสมแมลง (Figure 2) และพบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีน้ำหนักสดสูงที่สุดเท่ากับ 5.56 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ผสมหนอนนกดักแด้ไหม และจิ้งหรีด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนเยื่อไผ่และไม่ผสมแมลง ส่วนน้ำหนักแห้ง พบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีน้ำหนักสดสูงที่สุดเท่ากับ 1.17 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ผสมจิ้งหรีด

และหนอนนก แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมดักแด้ไหม หนอนเยื่อไผ่ และไม่ผสมแมลง (Table 4)

จากผลการศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน พบว่า ก้านดอกเห็ดบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความสูงมากกว่าบนข้าวไรซ์เบอรี่ โดยวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมกับดักแด้ไหม มีความสูงเฉลี่ยของก้านดอกเห็ดมากที่สุด เท่ากับ 3.14 เซนติเมตร และมีจำนวนก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมแมลงกินได้มากกว่าบนข้าวไรซ์เบอรี่ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Leejae *et al.* (2015) รายงานว่า เห็ดถั่งเฉ้าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่เจริญเติบโตเป็นก้านดอกเห็ดน้อยกว่าบนข้าวขาวดอกมะลิ 105

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญของเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะผสมแมลงต่างชนิดกัน

จากการนำเห็ดถั่งเฉ้าสีทองอบแห้งไปสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญ และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ในก้านดอกเห็ด และวัสดุเพาะที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมจิ้งหรีด ให้สาร cordycepin และ adenosine ในปริมาณสูงที่สุด โดยก้านดอกเห็ดพบสาร cordycepin ปริมาณ 1,266.74 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ผสมดักแด้ไหม และข้าวไรซ์เบอรี่ผสมจิ้งหรีด

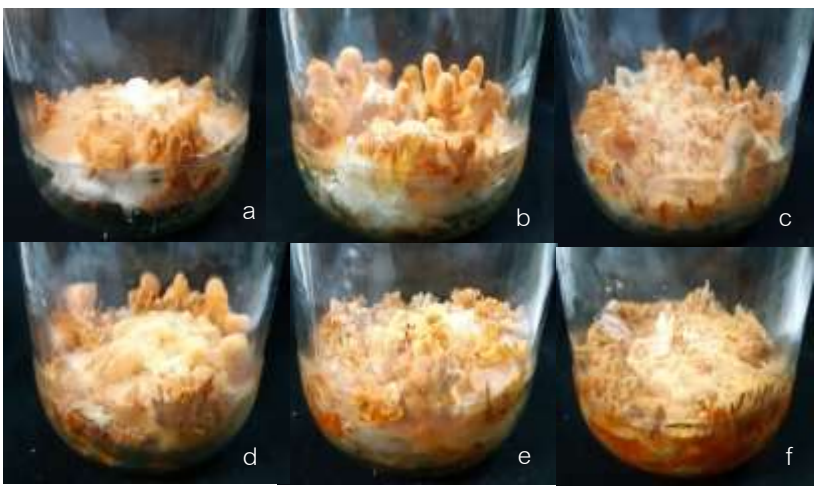

Figure 2. Characteristics of gold cordyceps on Riceberry rice mixed with edible insects after 5 weeks in light condition: silkworm pupa (a), silkworm pre-pupa (b), cricket (c), bamboo caterpillar (d), mealworm (e) and without insect (f)

Table 4. Growth of *Cordyceps militaris* on Riceberry rice mixed with edible insects

Edible insects	Fruiting body length (cm)	No. of fruiting body	Fruiting body weight (g)		Weight loss (%)
			Fresh	Dry	
Silkworm pupa	1.61 a[1]	14.20 a	4.13 ab	0.84 b	79.66
Silkworm pre-pupa	1.73 a	14.60 a	5.56 a	1.17 a	78.96
Cricket	1.60 a	11.80 ab	4.02 ab	0.94 ab	76.62
Bamboo caterpillar	1.36 ab	9.80 bc	3.86 b	0.79 b	79.53
Mealworm	1.58 a	14.60 a	5.02 ab	0.89 ab	82.27
Without insect	1.10 b	7.00 c	3.48 b	0.75 b	78.45

[1] Means within the same column followed by the same letters are not significantly different at $P \geq 0.05$

แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง (Table 5) ส่วนสาร adenosine มีปริมาณสูงที่สุดในวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 เท่ากับ 94.91 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง (Table 6)

จากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ดถั่งเช้าสีทองบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผสมแมลงกินได้ของแต่ละชนิด คือ ดักแด้ไหม หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ จิ้งหรีด หนอนเยื่อไผ่ และไม่ผสมแมลงโดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร cordycepin ในก้านดอกเห็ดถั่งเช้าสีทองบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 จะเห็นได้ว่ามีมากกว่าในก้านดอกเห็ดบนข้าวไรซ์เบอรี่ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Leejae *et al.* (2015) ที่มีสารสกัดจากก้านเห็ดถั่งเช้าสีทองบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 สูงกว่าสารสกัดจากก้านดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนข้าวไรซ์เบอรี่ นอกจากนี้ผลวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญ ในกรรมวิธีที่มีการผสมแมลงในวัสดุเพาะ ส่วนใหญ่มีสาร cordycepin และ adenosine สูงกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่แมลง โดยแมลงที่ใช้ในการวิจัยนี้ มีทั้งระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ซึ่งระยะการเจริญเติบโตของแมลงอาจมีปริมาณสารอาหาร หรือกรดอะมิโนที่ส่งผลต่อการเสริมสร้างสารออกฤทธิ์ในปริมาณแตกต่างกัน จึงเป็นแนวทางในการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของแมลงกินได้ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและสารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ดถั่งเช้าสีทองเพิ่มเติมต่อไป

Table 5. Contents of cordycepin in media and fruiting body of gold cordyceps (mg/100g)

Edible insects	KDML 105 rice		Riceberry rice	
	Fruiting body	Media	Fruiting body	Media
Silkworm pupa	1172.32 a[1]	262.07 h	440.29 fg	179.21 hi
Silkworm pre-pupa	974.06 bc	293.19 gh	601.62 ef	171.30 hi
Cricket	1266.74 a	312.91 gh	1136.78 ab	183.23 hi
Bamboo caterpillar	805.49 cd	293.19 gh	257.84 h	145.65 hi
Mealworm	715.68 de	44.94 i	887.52 cd	34.27 i
Without insect	843.82 cd	65.42 i	535.99 f	27.76 i

[1] Means within the same column and row followed by the same letters are not significantly different at $P \geq 0.05$

Table 6. Contents of adenosine in media and fruiting body of gold cordyceps (mg/100g)

Edible insects	KDML 105 rice		Riceberry rice	
	Fruiting body	Media	Fruiting body	Media
Silkworm pupa	30.20 bcd[1]	43.86 bc	21.64 bcd	15.93 bcd
Silkworm pre-pupa	24.72 bcd	51.90 b	19.26 bcd	13.18 cd
Cricket	31.45 bcd	94.91 a	34.09 bcd	21.40 bcd
Bamboo caterpillar	23.80 bcd	11.59 cd	16.21 bcd	13.50 cd
Mealworm	22.09 bcd	21.24 bcd	19.48 bcd	16.64 bcd
Without insect	16.50 bcd	6.33 cd	21.91 bcd	15.97 bcd

[1] Means within the same column and row followed by the same letters are not significantly different at $P \geq 0.05$

สรุป

อาหารเหลว SDB ที่ได้สารอาหารจากจิ้งหรีดเมื่อไปเขย่าในสภาพมืด นาน 12 วัน ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 18-22 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อรา *C. militaris* มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวดีที่สุด โดยมีค่าความมีชีวิตสูงที่สุด เท่ากับ 3.5×10^3 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร และมีความงอกของเชื้อราสูงที่สุด

หลังจากใส่อาหารเหลวดังกล่าวลงบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมดักแด้ไหม ให้ก้านดอกเห็ดมีความสูงที่สุดที่ 3.14 เซนติเมตร แต่ก้านดอกเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่ผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากที่สุด อีกทั้งสารออกฤทธิ์หลัก คือ cordycepin และ adenosine พบว่า วัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมจิ้งหรีด ให้ก้านดอกเห็ดที่มีสาร cordycepin สูงที่สุด และในวัสดุเพาะมีสาร adenosine มากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Almagro, L., A.B. Sabater-Jara, S. Belchi-Navarro, F. Fernandez-Perez, R. Bru and M.A. Pedreno. 2011. Effect of UV light on secondary metabolite biosynthesis in plant cell cutures elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. pp. 115-136. *In*: H. Vasanthaiah (ed.). Plants and Environment. InTech, Rijeka.

Dong, J.Z., M.R. Liu, C. Lei, X.J. Zheng and Y. Wang. 2012. Effects of selenium and light wavelengths on liquid cuture of *Cordyceps militaris* Link. Applied Biochemistry and Biotechnology 166(8): 2030-2036.

Hong, I.P., P.D. Kang, K.Y. Kim, S.H. Nam, M.Y. Lee, Y.S. Choi, N.S. Kim, H.K. Kim, K.G. Lee and R.A. Humber. 2010. Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. Mycobiology 38(2): 128-132.

Huang, L., Q. Li, Y. Chen, X. Wang and X. Zhou. 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. African Journal of Microbiology Research 3(12): 957-961.

Khan, M.A., M. Tania, D. Zhang and H. Chen. 2010. Cordyceps mushroom: A potent anticancer nutraceutical. The Open Nutraceuticals Journal 3(1): 179-183.

Leejae, S., N. Bakasatae, W. Intamon, C. Korkitpaisal, T. Sudsai and A. Prapaiwong. 2015. Antioxidant activity of caterpillar fungus (*Cordyceps militaris*) grown on rice berry and jasmine rice. pp. 210-217. *In*: Proceedings of RSU National Research Conference 2015. Rangsit University, Pathum Thani. (in Thai)

Luerdara, K., J. Kulsarin, S. Buranapanichpan and T. Tapingkae. 2016. Growth of gold cordyceps (*Cordyceps militaris*) on pupae of Nanglai Thai native silkworm and eri silkworm. Journal of Agriculture 32(1): 95-102. (in Thai)

Mao, X.B. and J.J. Zhong. 2006. Significant effect of $NH4^+$ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Enzyme and Microbial Technology 38: 343-350.

Mao, X.B., T. Eksriwong, S. Chauvatcharin and J.J. Zhong. 2005. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of

medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Process Biochemistry 40: 1667-1672.

Masuda, M., E. Urabe, H. Honda, A. Sakurai and M. Sakakibara. 2007. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Enzyme and Microbial Technology 40(5): 1199-1205.

Sato, H. and M. Shimazu. 2002. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. Applied Entomology and Zoology 37(1): 85-92.

Shrestha, B., W.H. Lee, S.K. Han and J.M. Sung. 2006. Observations on some of the mycelial growth and pigmentation characteristics of *Cordyceps militaris* isolates. Mycobiology 34(2): 83-91.

van Huis, A., J. van Itterbeeck, H. Klunder, E. Mertens, A. Halloran, G. Muir and P. Vantomme. 2013. Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security. FAO Forestry Paper 171. FAO, Rome.

Zhang, A.L., J.H. Lu, N. Zhang, D. Zheng, G.R. Zhang and L.R. Teng. 2010. Extraction, purification and anti-tumor activity of polysaccharide from mycelium of mutant *Cordyceps militaris*. Chemical Research in Chinese Universities 26(5): 798-802.

Zhang, Q., Y. Liu, Z. Di, C.C. Han and Z. Liu. 2016. The strategies for increasing cordycepin production of *Cordyceps militaris* by liquid fermentation. Fungal Genomics and Biology 6: 134, doi: 10.4172/2165-8056.1000134.

การผลิตมันเทศปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Production of SPFMV-free and SPCSV-free Sweet Potato Using Tissue Culture Techniques

ชฎาพร ไชยลังกา[1] ศิริมาศ ชัยชม[2] เสาวลักษณ์ พิมขันท์[2] และ เกวลิน คุณาศักดากุล[1*]

Chadaporn Chailangka[1], Sirimas Chaichom[2], Saowalak Phimkhan[2] and Kaewalin Kunasakdakul[1*]

[1]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง จ. เชียงใหม่ 50200

[2]Plant Biotechnology Research Center, Royal Project Foundation, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: kaewalin.k3@gmail.com*

(Received: 8 November 2018; Accepted: 31 January 2019)

Abstract: Two varieties of sweet potato cultivars SP02 (purple flesh) and SP08 (yellow flesh) were collected from Royal Agricultural Station Inthanon, Chiang Mai province, and planted under greenhouse condition. The plant samples showed viral leaf symptoms, chlorosis and purpling were clearly observed after planting for 90 days. Infections were proved by PCR for both *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) and *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV). Five criteria severity levels 0-4 (healthy normal-severest) were used to evaluate the diseases in 100 leaf-samples of each variety, results showed no healthy normal detection, severity at level 2 was the major percentage found at 48 and 45% for SP02 and SP08, respectively. Accordingly, the tissue culture plantlets were produced (culturing on MS medium) and used for virus-free production trials using meristem tip cultures with and without thermotherapy (kept under 37 ± 1 °C for 30 days). Excision of the meristem tip from the plantlets at the sizes of 0.3, 0.5 and 1 mm then cultured on the same medium for 90 days after that PCR were used for virus-free evaluation. The trials with thermotherapy of both varieties at the size 0.5 and 1 mm were succeeded to produce high rate of virus-free at 90.9-100% . However, excising of 0.3 mm meristem with thermotherapy trials affected survival rate of plant decreasing to 37.5%. Mass-production of virus-free plantlets testing for various concentrations of plant growth regulators supplemented in MS medium, after culturing for 30 days, the greatest number of node per plantlet of SP02 and SP08 were 11.1 and 13.8 respectively, on the medium supplemented with indole-3-acetic acid (IAA) at the concentration of 0.5 ppm and gibberellin (GA_3) at the concentration of 1 ppm.

Keywords: Sweet potato, SPFMV and SPCSV, virus-free plantlets

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: เก็บรวบรวมพันธุ์มันเทศจากสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SP02 (เนื้อสีม่วง) และ SP08 (เนื้อสีเหลือง) นำมาปลูกภายในโรงเรือนเป็นเวลา 90 วัน พบใบพืชแสดงอาการจุดสีเหลืองและจุดสีม่วง เมื่อตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR พบว่าเกิดจากการเข้าทำลายร่วมกันของไวรัส *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) และ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) การประเมินความรุนแรงของอาการโรคดังกล่าวด้วยเกณฑ์ 5 ระดับ ที่ 0-4 (ปกติ-รุนแรงที่สุด) ในตัวอย่างใบมันเทศแต่ละสายพันธุ์ ๆ ละ 100 ใบ ไม่พบใบพืชที่ปกติ ระดับความรุนแรงที่พบมากที่สุดในสายพันธุ์ SP02 และ SP08 คือระดับ 2 เท่ากับ 48 และ 45% ตามลำดับ จากการนำต้นมันเทศในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้ความร้อน (37 °C เป็นเวลา 30 วัน) และไม่ใช้ความร้อน มาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS และตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค PCR พบว่าการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.5 และ 1 mm มีการปลอดไวรัสทั้งสองชนิด 90.9-100% อย่างไรก็ตามการใช้ความร้อนและการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.3 mm ส่งผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของพืชต่ำลงเหลือเพียง 37.5% ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณมันเทศปลอดไวรัส พบว่า อาหาร MS ที่เติม IAA 0.5 mg/l และ GA_3 1 mg/l สามารถเพิ่มปริมาณมันเทศได้ดีที่สุดในทั้งสองสายพันธุ์ มีจำนวนข้อเฉลี่ย 11.1 และ 13.8 ข้อต่อต้น ตามลำดับ

คำสำคัญ: มันเทศ ไวรัส SPFMV และ SPCSV ต้นอ่อนพืชปลอดไวรัส

คำนำ

มันเทศ (*Ipomoea batatas* L. Lam.) จัดอยู่ในวงศ์ Convolvulaceae เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญอันดับที่ 7 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง ข้าวบาร์เลย์ มันสำปะหลัง มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมันเทศ รวมประมาณ 20,302 ไร่ ผลผลิตรวม 352,999 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 2,673 กิโลกรัมต่อไร่ (Department of Agricultural Extension, 2017) มันเทศเป็นพืชหัวที่ให้ผลผลิตสูงสามารถนำมาใช้เชิงอุตสาหกรรมการแปรรูปเป็นแป้ง และอาหารเลี้ยงสัตว์ เป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วย คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งปริมาณสารอาหารที่สำคัญแปรตามสีเนื้อ เช่น เนื้อสีเหลือง และสีส้มจะมี provitamin A carotenoid ในระดับที่สูงเทียบเท่ากับในแครอท (Woolfe, 1992) ปัจจุบันมูลนิธิโครงการหลวงมีการส่งเสริมเกษตรกรให้ปลูกมันเทศเพิ่มมากขึ้นแต่ประสบปัญหาสำคัญจากการเข้าทำลายของไวรัสที่ติดกับท่อนพันธุ์ที่ใช้เพาะปลูก ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ไวรัสที่สำคัญ ได้แก่ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) และ *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) ทำให้พืชสร้างหัวลดลง ส่งผลเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Kokkinos and Clark, 2006) ไวรัสสามารถแพร่ระบาดโดยติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ และแมลงพาหะ เช่น แมลงหวี่ขาวและเพลี้ยอ่อน การใช้หัวพันธุ์หรือท่อนพันธุ์ปลอดไวรัสในการเพาะปลูกนับเป็นวิธีการที่ดีในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์มันเทศปลอดไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสนับสนุนการผลิตท่อนพันธุ์มันเทศ สายพันธุ์ SP02 และ SP08 ปลอดไวรัส สำหรับใช้ประโยชน์ในงานส่งเสริมการผลิตมันเทศของเกษตรกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมพันธุ์มันเทศ

รวบรวมหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ SP02 และ SP08 จากสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ นำมาปลูกภายใต้สภาพโรงเรือนกันแมลง ในกระถาง ขนาด 12 นิ้ว ที่บรรจุดินอบฆ่าเชื้อ ดูแลให้ปุ๋ยและน้ำตามวิธีการของมูลนิธิโครงการหลวง มันเทศสายพันธุ์ SP02 มีเนื้อสีม่วง ใบเป็นรูปฐานแยกหรือสองหยัก (lobed) ส่วนสายพันธุ์ SP08 มีเนื้อสีเหลือง ใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) (Figure 1)

Figure 1. Leaf shape, tuber shape and tuber section of sweet potato cultivars, SP02: purple flesh (A) and SP08: yellow flesh (B)

พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่ ได้แก่ สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหมอกจ๋าม อำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่

2. ลักษณะอาการโรคไวรัส และการตรวจวินิจฉัย

2.1 การประเมินความรุนแรงของโรคไวรัส

สังเกตอาการและบันทึกระดับความรุนแรงของโรคบนใบมันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อต้นมันเทศอายุ 90 วันหลังปลูก สายพันธุ์ละ 10 ต้น (ซ้ำ) ต้นละ 10 ใบ รวมจำนวน 100 ใบ โดยใช้เกณฑ์การประเมินพื้นที่ใบที่แสดงอาการจุดสีเหลืองและจุดสีม่วงเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 0 ไม่แสดงอาการ ระดับ 1: 1-25% ระดับ 2: 26-50% ระดับ 3: 51-75% และระดับ 4: 76-100% (Figure 2)

2.2 การตรวจสอบชนิดไวรัสด้วยเทคนิค PCR

สุ่มใบมันเทศแต่ละสายพันธุ์ ที่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองปนจุดสีม่วงจำนวน 20 ตัวอย่างมาตรวจสอบหาชนิดของเชื้อไวรัส โดยใช้การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ใช้คู่ primer สำหรับการตรวจหาเชื้อ SPFMV และ SPCSV โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kwak *et al*. (2014)

3. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศ

3.1 การเพาะเลี้ยงส่วนขยายพันธุ์เริ่มต้น

นำมันเทศสายพันธุ์ SP02 และ SP08 ที่เพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือนกันแมลงมาตัดส่วนตายอดและตาข้าง ความยาว 1 cm ล้างด้วยน้ำไหล 10 นาที จุ่มชิ้นพืชใน 70% ethanol เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนนำไปแช่ใน 1% electrolyzed oxidizing water (EO) ที่ผสม 2-3 หยด ของ Tween 20 เขย่าเบา ๆ 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) pH 5.6 ที่ เติม BAP เข้มข้น1 mg/l และ GA_3 เข้มข้น 0.5 mg/l นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25 ± 2 °C แสง 1200 lux 16 ชั่วโมง/วัน สังเกตและบันทึกการเจริญหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

3.2 ศึกษาการพัฒนาสูตรอาหาร MS

นำส่วนของยอดมันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ ความยาว 1 cm จากต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อ 3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ 3 ชนิด ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BAP), indole-3-acetic acid (IAA) และ gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 0-2 mg/l จำนวนรวม 14 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ ดังนี้

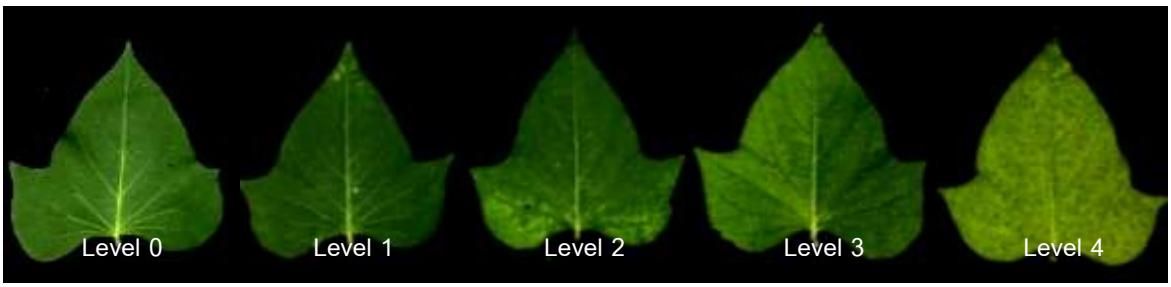

Figure 2. Five criteria severity levels of chlorosis symptom on sweet potato leaves comparing to total leaf-area: 0 = no symptom; 1= 1-25%; 2 = 26-50%; 3 = 51-75% and 4 = 76-100%

กรรมวิธีที่ 1 MS free hormone
กรรมวิธีที่ 2 MS + 0.5 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 3 MS + 1 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 4 MS + 1 mg/l BAP
กรรมวิธีที่ 5 MS + 2 mg/l BAP
กรรมวิธีที่ 6 MS + 1 mg/l GA_3
กรรมวิธีที่ 7 MS + 1 mg/l GA_3+ 0.5 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 8 MS + 1 mg/l GA_3+ 1 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 9 MS + 1 mg/l GA_3+ 1 mg/l BAP
กรรมวิธีที่ 10 MS + 1 mg/l GA_3+ 1 mg/l BAP+ 0.5 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 11 MS + 1 mg/l GA_3+ 1 mg/l BAP+ 1 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 12 MS + 1 mg/l GA_3+ 2 mg/l BAP
กรรมวิธีที่ 13 MS + 1 mg/l GA_3+ 2 mg/l BAP+ 0.5 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 14 MS + 1 mg/l GA_3+ 2 mg/l BAP+ 1 mg/l IAA

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) บันทึกลักษณะการเจริญ ความสูง จำนวนข้อ จำนวนใบ หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน พร้อมทั้งจำนวนร้อยละของการมีชีวิตรอดหลังออกปลูกเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (MS)

4. การกำจัดไวรัส SPFMV และ SPCSV

4.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Wondimu *et al.* (2012) โดยนำต้นมันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ให้ได้ขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญ เก็บในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BAP 1 mg/l ให้แสง 1200 lux 16 ชั่วโมง/วัน ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อเจริญ หลังเพาะเลี้ยง 30 วัน และนำต้นที่เจริญสมบูรณ์ไปใช้ในการตรวจสอบการปลอดไวรัสเช่นเดียวกับข้อ 2.2

4.2 การใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Feyissa and Dugassa (2011) นำต้นมันเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 30 วัน ไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 ± 2 °C เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำมาตัดส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ให้ได้ขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm นำไปเพาะเลี้ยง ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อเจริญหลังเพาะเลี้ยง 30 วัน และนำต้นที่เจริญสมบูรณ์ไปใช้ในการตรวจสอบการปลอดไวรัสเช่นเดียวกับข้อ 2.2

5. การตรวจสอบการปลอดโรคไวรัส

นำต้นกล้ามันเทศที่ผ่านการทำให้ปลอดไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และการใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดมาตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค PCR เช่นเดียวกับข้อ 2.2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการของโรคไวรัสในมันเทศและการตรวจวินิจฉัย

จากการศึกษาอาการโรคไวรัสบนใบมันเทศ หลังการเพาะปลูกได้ 90 วัน พบอาการจุดสีเหลือง และจุดสีเหลืองสลับม่วงบนใบมันเทศทั้งสองสายพันธุ์ และมักพบจุดสีเหลืองสลับม่วงบนใบล่าง (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kokkinos and Clark (2006) ที่กล่าวว่าอาการดังกล่าวเกิดจากการเข้าทำลายของ SPFMV และ SPCSV เข้าทำลายร่วมกัน ส่งผลให้พืชมีใบผิดรูป และการเจริญเติบโตช้าลง จากการประเมินความรุนแรงพบความรุนแรงระดับ 2 มากที่สุด 48 และ 45% ในสายพันธุ์ SP02 และ SP08 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาว 356 และ 583 คู่เบส ตรงกับขนาดนิวคลีโอไทด์ผลผลิตจากคู่ไพรเมอร์ SPFMV 1-F, SPFMV 1-R และ SPCSV uni-f1, SPCSV uni-r1 ที่ใช้ในการตรวจสอบ ตามลำดับ แสดงถึงการเข้าทำลายร่วมกันของไวรัสทั้ง 2 ชนิด

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศ

2.1 การเพาะเลี้ยงส่วนขยายพันธุ์เริ่มต้น

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตายอด และตาข้าง ของสายพันธุ์ SP02 และ SP08 ในอาหาร MS เป็นเวลา 30 วัน พบต้นมันเทศมีความสูงเฉลี่ย เท่ากับ 6.20 และ 5.15 cm ตามลำดับ และการเพาะเลี้ยงตายอดมีการเจริญของลำต้นและรากเร็วกว่าการใช้ตาข้าง

2.2 การพัฒนาสูตรอาหาร MS

จากการทดสอบสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ จำนวน 14 กรรมวิธี เป็นเวลา 30 วัน (Figure 4) พบว่า กรรมวิธีที่ 7 ที่เติม IAA 0.5 mg/l ร่วมกับ GA_3 1 mg/l สามารถเพิ่มจำนวนตาข้างของสายพันธุ์ SP02 และ SP08 มากที่สุด 11.1 และ 13.8 ข้อต่อต้น และมีอัตราการรอดหลังการนำออกปลูกมากที่สุด 60 และ 50% ตามลำดับ กรรมวิธีที่ 4 ทำให้ความยาวรากของมันเทศสายพันธุ์ SP02 มีความยาวรากยาวที่สุด 9.59 cm

3. การกำจัดไวรัส SPFMV และ SPCSV

3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

จากการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของทั้ง 2 สายพันธุ์ให้มีขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน พบการมีชีวิตรอดเฉลี่ย 50, 87.5 และ 95% ตามลำดับ และหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 65 วัน เนื้อเยื่อเจริญสามารถพัฒนาใบอ่อนคู่แรกได้ และสามารถจะเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ขนาดเล็กและเกิดรากบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม BAP เข้มข้น 1 mg/l ในเวลา 75 วัน (Figure 5) จากนั้นนำต้นมันเทศที่เจริญจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดทั้ง 3 ขนาด ที่นำออกปลูกเป็นเวลา 1 เดือน มาสังเกตอาการโรคไวรัสบนใบ พบว่า ต้นกล้าไม่แสดงอาการโรค (Figure 6) เช่นเดียวกับ Wang and Valkonen (2008) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของมันเทศขนาด 0.5 และ 1 mm มีอัตราการมีชีวิต 100% และการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาดเล็กมีร้อยละการปลอดโรคมากกว่าขนาดใหญ่

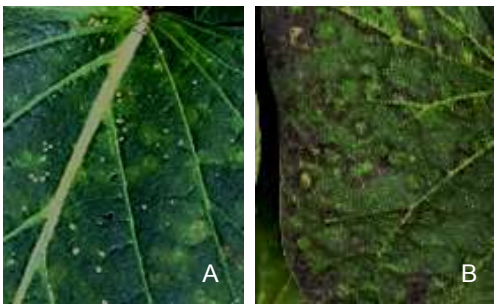

Figure 3. Viral symptoms on leaves of sweet potato cultivars SP02 and SP08 after planting for 90 days: (A) mild chlorosis; (B) chlorosis and purpling on older leaves

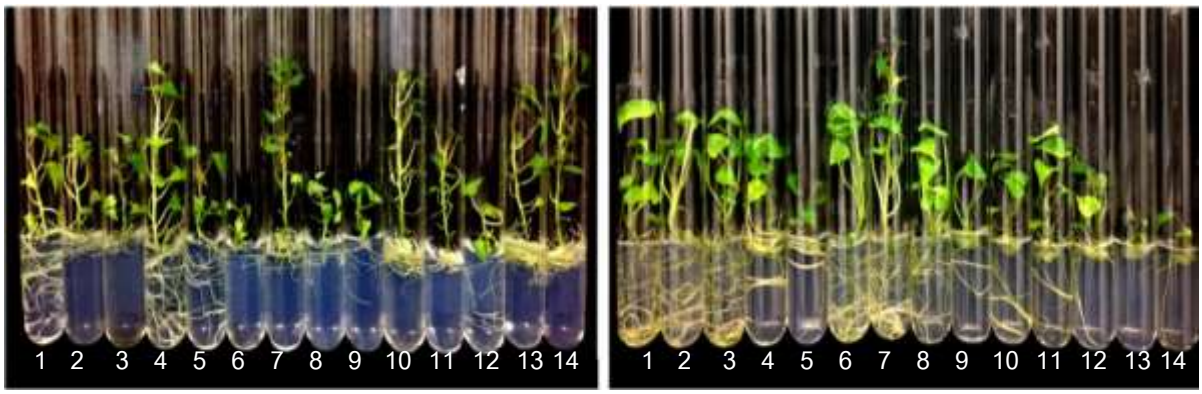

Figure 4. Growth of sweet potato plantlets after 30-day cultured on MS medium supplemented with various concentrations of plant growth regulators in 14 treatments, SP02 (A) and SP08 (B)

1 = MS free hormone
2 = MS + 0.5 mg/l IAA
3 = MS + 1 mg/l IAA
4 = MS + 1 mg/l BAP
5 = MS + 2 mg/l BAP
6 = MS + 1 mg/l GA_3
7 = MS + 1 mg/l GA_3+ 0.5 mg/l IAA
8 = MS + 1 mg/l GA_3+ 1 mg/l IAA9
9 = MS + 1 mg/l GA_3+ 1 mg/l BAP
10 = MS + 1 mg/l GA_3+ 1 mg/l BAP+ 0.5 mg/l IAA
11 = MS + 1 mg/l GA_3+ 1 mg/l BAP+ 1 mg/l IAA
12 = MS + 1 mg/l GA_3+ 2 mg/l BAP
13 = MS + 1 mg/l GA_3+ 2 mg/l BAP+ 0.5 mg/l IAA
14 = MS + 1 mg/l GA_3+ 2 mg/l BAP+ 1 mg/l IAA

Figure 5. Development stages of meristem tip culture of sweet potato: (A) meristem after cultured for 45 days, (B) 65 days and (C) 75 days

Figure 6. Sweet potato virus-free plantlets after transplanting for 45 days under net-proved house: (A) SP02 and (B) SP08

3.2 การใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

จากการเก็บต้นมันเทศในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 ± 2 °C เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นมันเทศมีลักษณะใบเหลืองเล็กน้อยแต่เนื้อเยื่อของต้นยังคงมีความแข็งแรง เมื่อนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดให้มีขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงระยะเวลา 30 วัน การมีชีวิตรอดเฉลี่ย 37.5, 75 และ 87.5% ตามลำดับ และหลังเลี้ยง เป็นเวลา 60 วัน เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นได้และไม่แสดงอาการโรคเช่นเดียวกับข้อ 3.1

4. การตรวจสอบการปลอดไวรัส

จากการตรวจสอบการปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV ด้วยเทคนิค PCR ในมันเทศทั้งสองสายพันธุ์ ที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญ พบว่าสายพันธุ์ SP02 ที่เจริญจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm มีการปลอดไวรัส 100, 90.9 และ 94.2% ตามลำดับ (Table 1) และสายพันธุ์ SP08 ที่เจริญจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5 และ 1 mm มีการปลอดไวรัส 100% (Figure 7) เช่นเดียวกับการรายงานของ Wang and Valkonen (2008) ที่พบว่าการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5-1 mm สามารถทำให้ต้นมันเทศปลอดไวรัส 87-100% ขณะที่การใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.3 mm มักมีอัตราการรอดเป็นศูนย์ ส่วนขนาด 0.5 และ 1 mm มีการปลอดไวรัส 100% (Table 1) (Figure 7) เช่นเดียวกับการรายงานของ Feyissa and Dugassa (2011) ที่กล่าวว่าการใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5 และ 1 mm สามารถกำจัดไวรัสได้ 88.99-100% แต่การใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาดเล็กมักมีอัตราการรอดชีวิตต่ำมาก

Table 1. Survival rates, regrowth and virus elimination percentages of two sweet potato cultivars after excisions of various size meristem tips with or without thermotherapy treatments

Treatments[a]	Survival rates (%)[b]		Regrowth rates (%)[c]		Virus elimination (%)[d]			
					SPCSV		SPFMV	
	SP02	SP08	SP02	SP08	SP02	SP08	SP02	SP08
Without thermotherapy :								
0.3 mm	50.0	45.0	5.0	11.1	100	100	100	100
0.5 mm	87.5	85.0	94.3	97.0	90.9	100	87.9	90.0
1 mm	95.0	95.0	92.1	92.1	94.3	100	88.6	97.1
37 ± 2 °C for 30 days								
0.3 mm	37.5	37.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5 mm	75.0	70.0	83.3	89.3	100	100	100	100
1 mm	87.5	87.5	94.3	94.3	100	100	100	100

[a] A total of 120 meristem tips of each size were included in three replicates of 40 meristem tips in each treatment

[b] Data were collected after 4 weeks of post-cuture on MS medium

[c] Data were collected after 3 months of post-cuture on MS+BAP 1 mg/l

[d] Number of virus free plantlets, detection with PCR technique

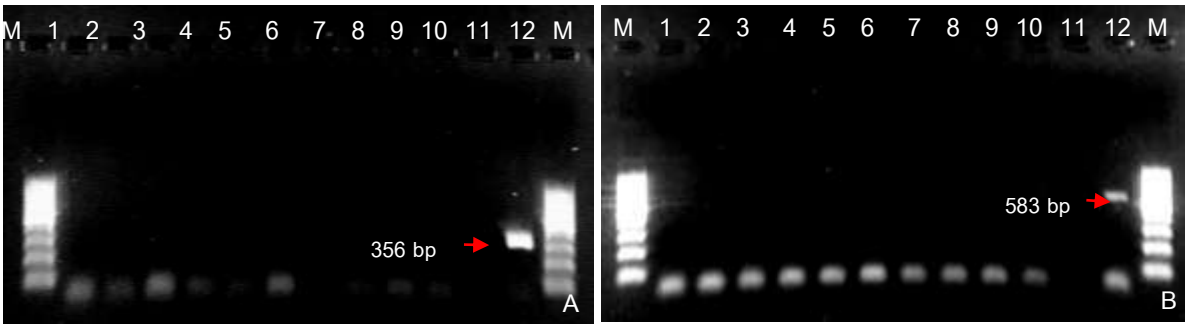

Figure 7. Detection for virus-free plantlets derived from meristem tip cultured with or without thermotherapy treatments by PCR technique. The expected sizes of amplification products from SPFMV and SPCSV were 356 and 583 nucleotides, respectively, (A) SPFMV: (Lane 1-5) SP02 plantlet trials of 0.3, 0.5, 1 mm without thermotherapy and 0.5 and 1 mm with thermotherapy; (Lane 6-10) SP08 plantlet trials of 0.3, 0.5, 1 mm without thermotherapy and 0.5 and 1 mm with thermotherapy; (B) SPCSV: (Lane 1-5) SP02 plantlet trials of 0.3, 0.5, 1 mm without thermotherapy and 0.5 and 1 mm with thermotherapy; (Lane 6-10) SP08 plantlet trials of 0.3, 0.5, 1 mm without thermotherapy and 0.5 and 1 mm with thermotherapy; (M) gene ruler DNA ladder mix; (Lane 11A, 11B) nuclease-free water (negative control); (Lane 12A, 12B) SPFMV and SPCSV (positive control), respectively

สรุป

จากการศึกษาอาการของโรคบนใบและตรวจสอบไวรัสในตัวอย่างมันเทศ สายพันธุ์ SP02 และ SP08 ด้วยเทคนิค PCR พบไวรัส SPFMV และ SPCSV เป็นสาเหตุโรค เมื่อนำต้นมันเทศดังกล่าวมาทำให้ปลอดไวรัสด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm ทั้งแบบใช้และไม่ใช้ความร้อน สามารถกำจัดไวรัสทั้ง 2 ชนิดออกจากพืชได้ 87.9-100% และพบว่าเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาดใหญ่ที่ 0.5-1 mm ส่งผลดีต่ออัตราการมีชีวิตรอดและการเจริญของพืช เมื่อใช้ความร้อนร่วมด้วย ทำให้สามารถกำจัดไวรัสทั้ง 2 ชนิดได้ถึง 100% และการมีชีวิตรอดหลังตัดเนื้อเยื่อเจริญสูงถึง 70% ขึ้นไป อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 mm ทั้งการใช้และไม่ใช้ความร้อนร่วมกันมีโอกาสในการกำจัดไวรัสทั้งสองชนิดได้ถึง 100% เช่นกัน หากแต่มีอัตราการมีชีวิตรอดและการเจริญค่อนข้างต่ำ สำหรับการเพาะเลี้ยงมันเทศปลอดไวรัสในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม IAA 0.5 mg/l GA_3 1 mg/l เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนมันเทศทั้งสองสายพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Taiwan ICDF Project in Royal Project Foundation (Thailand) โครงการ Gloriosa, Sweet Potato Virus-free Seedling and Grape Root Stock Production Project ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Department of Agriculture Extension. 2017. Sweet potato. (Online). Available: http://www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rortor/agronomy/29.Sweet%20potato.pdf (December 1, 2018). (in Thai)

Feyissa, T. and G. Dugassa. 2011. *In vitro* production of virus-free sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) by meristem culture and thermotherapy. SINET: Ethiopian Journal of Science 34(1): 17-28.

Kwak, H.R., M.K. Kim, J.C. Shin, Y.J. Lee, J.K. Seo, H.U. Lee, M.N. Jung, S.H. Kim and H.S. Choi. 2014. The current incidence of viral disease in Korean sweet potatoes and development of multiplex RT-PCR assays for simultaneous detection of eight sweet potato viruses. Plant Pathology Journal 30(4): 416-424.

Kokkinos, C.D. and C.A. Clark. 2006. Interactions among *Sweet potato chlorotic stunt virus* and different potyviruses and potyvirus strains infecting sweet potato in the United States. Plant Disease 90(10): 1347-1352.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Wang, Q.C. and J.P.T. Valkonen. 2008. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. Journal of Virological Methods 154: 135-145.

Wondimu, T., T. Feyissa and G. Bedada. 2012. Meristem culture of selected sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) cultivars to produce virus-free planting material. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 87(3): 255-260.

Woolfe, J.A. 1992. Sweet Potato: An Untapped Food Resource. Cambridge University Press, Cambridge. 643 p.

การผลิตดองดึง (*Gloriosa rothschildiana* O' Brien) ปลอดไวรัส CMV โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Production of CMV-free *Gloriosa rothschildiana* O' Brien Using Tissue Culture Techniques

พรสวรรค์ อุ่นศิลป์[1] ศิรินทร์ยา มีสวัสดิ์[2] และ เกวลิน คุณาศักดากุล[1*]

Pondsawan Unsilp[1], Sirinya Meesawat[2] and Kaewalin Kunasakdakul[1*]

[1]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1]Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง จ. เชียงใหม่ 50200

[2]Plant Biotechnology Research Centre, Royal Project Foundation, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: kaewalin.k3@gmail.com*

(Received: 7 February 2019; Accepted: 29 April 2019)

Abstract: *Gloriosa rothschildiana* O' Brien tubers from Nong Khiaw Royal Project Development Center were collected and planted under greenhouse condition. After planting for 90 days, stripe mosaic and distortion of leaves, mosaic pale on flower petals were clearly observed. Infections were proved by RT-PCR of *Cucumber mosaic virus* (CMV) Five criteria severity levels 0-4 (healthy normal-severest) were used to evaluate the diseases in 100 leaf-samples, no healthy normal detected, severity level 3 was the major percentage found at 33.75% followed by level 4, 2, 1 and 0 at 25, 20, 13.75 and 7.5 % respectively. Additionally, more severe of the symptom was less flower number per plant. Virus type checking by ELISA technique was proved for CMV infection. Then RT-PCR showed CMV-free treatments studies 100% succeed, excision of meristem at size 0.3 mm and 40 mg/l ribavirin treatment of *in vitro* shoot removal on tuber at size 0.5 cm with the survival rates at 75 and 100%, respectively. Culture medium, MS supplemented with BAP 3.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L was proper for production of gloriosa plantlets at rate 2.27 shoots and 2.20 mini-tuber per explant after culture for 12 weeks.

Keywords: Gloriosa, tissue culture, CMV-free plantlets

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: นำหัวพันธุ์ดองดึงจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ มาปลูกภายใต้โรงเรือนกันแมลง หลังปลูกได้ 90 วัน พบใบแสดงอาการด่างเป็นทางยาวตามแนวเส้นใบ รูปร่างบิดเบี้ยว ส่วนของกลีบดอกแสดงอาการด่างสีซีด จากการประเมินระดับความรุนแรงโดยแบ่งเป็น 5 ระดับ (0-4) พบว่าระดับความรุนแรงมากที่สุด คือ ระดับ 3 คิดเป็น 33.75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ ระดับ 4, 2, 1 และ 0 คิดเป็น 25, 20, 13.75 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าความรุนแรงในระดับสูงส่งผลให้จำนวนดอกต่อต้นน้อยลง การตรวจสอบชนิดไวรัสด้วยเทคนิค ELISA พบเกิดจากไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) เมื่อศึกษาวิธีการกำจัดไวรัส CMV โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร การเพาะเลี้ยงยอดจากหัวพันธุ์ขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิริน (ribavirin) ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร และการเพาะเลี้ยงยอดจากหัวพันธุ์ขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิริน 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราปลอดไวรัส 100 เปอร์เซ็นต์ และมีชีวิตรอดหลังการเพาะเลี้ยง 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของดองดึง ได้แก่ อาหาร MS ที่เติม BAP 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.27 ยอดต่อต้น และจำนวนหัวเฉลี่ยสูงสุด 2.20 หัวต่อต้น หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

คำสำคัญ: ดองดึง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นอ่อนพืชปลอดไวรัส CMV

คำนำ

ดองดึง (*Gloriosa rothschildiana* O' Brien) เป็นไม้ดอกประเภทหัวกึ่งไม้เลื้อย ดอกมีสีสันสวยงาม รูปทรงแปลกตา มีถิ่นกำเนิดจากประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกา และได้รับความนิยมปลูกในทวีปเอเชียเขตร้อน สำหรับประเทศไทยพบว่ามีการปลูกเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถางโดยมีพื้นที่เพาะปลูกที่สำคัญ ได้แก่ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว จังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนี้ยังมีการใช้ดองดึงเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และการเกษตร เช่น สารสกัดจากดองดึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ (George and Pandalai, 1949) ปัจจุบันการผลิตหัวพันธุ์ดองดึงกำลังเผชิญกับปัญหาการเข้าทำลายของไวรัส ส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิต จะพบอาการด่างที่ใบและกลีบดอก กลีบดอกมีขนาดเล็กลง และมีอายุในการปักแจกันของดอกลดลงมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (Royal Project Foundation, 2015) การระบาดของไวรัสเกิดจากเกษตรกรใช้หัวพันธุ์ที่มีการสะสมของไวรัสอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช ไวรัสสำคัญที่เข้าทำลายดองดึง ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) และ *Gloriosa fleck virus* (GFV) โดยเฉพาะไวรัส CMV ซึ่งเป็นไวรัสที่ยากต่อการป้องกันกำจัดเนื่องจากมีพืชอาศัยกว้างและมักเข้าทำลายร่วมกับไวรัสหลายชนิดก่อให้เกิดอาการโรคที่รุนแรงมากขึ้น (Araki *et al*., 1985) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตหัวพันธุ์ดองดึงปลอดไวรัส CMV ด้วยเทคนิคด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณหัวพันธุ์ปลอดไวรัสเพื่อแก้ไขปัญหาการขาดแคลนหัวพันธุ์ปลอดไวรัสของเกษตรกรผู้เพาะปลูกดองดึงตัดดอกในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ลักษณะอาการโรคไวรัสและการตรวจวินิจฉัย

1.1. การประเมินความรุนแรงของโรค

นำหัวพันธุ์ดองดึงจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 80 หัว โดยเลือกหัวพันธุ์ที่มีน้ำหนักประมาณ 30-60 กรัม มาปลูกภายในโรงเรือนกันแมลง หลังปลูกได้ 90 วัน บันทึกอาการผิดปกติและประเมินความรุนแรงของโรคไวรัสในแต่ละต้น โดยเลือกประเมินใบที่ 1-5 นับจากยอด กำหนดเกณฑ์การประเมินพื้นที่ใบที่แสดงอาการใบด่างเทียบกับ

พื้นที่ใบทั้งหมด แบ่งเป็น 5 ระดับความรุนแรง (0-4) ตามวิธีการของ Akbar *et al*. (2015) คือ ระดับ 0 ไม่แสดงอาการใบด่าง ส่วนระดับ 1-4 แสดงอาการด่างบนพื้นที่ใบตามลำดับ ดังนี้ 1: 1-25, 2: 26-50, 3: 51-75 และ 4: 76-100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1) และ การศึกษาผลกระทบของโรคไวรัสต่อการออกดอกของดองดึง โดยเลือกต้นดองดึงที่แสดงอาการโรคไวรัสในแต่ละระดับความรุนแรงระดับละ 6 ต้น วางแผนแบบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design: RCBD) บันทึกผลโดยนำจำนวนการออกดอกและเปรียบเทียบจำนวนดอกต่อต้น หลังปลูกได้ 18 สัปดาห์

1.2 การตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา

นำใบดองดึงที่แสดงอาการใบด่างในสภาพโรงเรือนจำนวน 20 ตัวอย่าง มาตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาชนิดของไวรัสด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้แอนติซีรัมของไวรัส CMV (Agdia Elkhart, Indiana, USA) อ่านผลจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader กำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่ให้ผลเป็นบวก (positive) มีค่ามากกว่าค่าที่อ่านได้จากแอนติซีรั่มทำปฏิกิริยากับใบดองดึงที่ไม่แสดงอาการใบด่างเป็น 2 เท่า ซึ่งให้ผลเป็นลบ (negative control) หรือไม่พบไวรัส CMV และ positive control คือ ตัวอย่างไวรัส CMV ที่สกัดได้จากใบพริกที่แสดงอาการใบด่าง

2. การผลิตดองดึงปลอดโรคไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Yadav *et al*. (2012) โดยนำหัวพันธุ์ดองดึงน้ำหนัก 40-50 กรัม มาตัดเอาเฉพาะปลายยอดความยาว 1-3 เซนติเมตร มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำไหล เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยแช่ลงในสารป้องกันและกำจัดเชื้อราแมนโคเซ็บ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วย 75% ethanol เป็นเวลา 25 นาที แล้วย้ายมาแช่ลงในน้ำ 1% electrolyzed oxidizing (EO) ที่ผสม 2-3 หยด ของ Tween 20 เขย่าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง พักไว้ให้แห้งแล้วนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (meristem) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยายที่ 20-40 เท่า ใช้มีดผ่าตัดตัดเอาส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร มาเลี้ยงบนอาหาร MS แล้วเพาะเลี้ยงไว้อุณหภูมิห้องที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 1,200 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ และนำตัวอย่างใบดองดึงที่เจริญเป็นต้นสมบูรณ์ไปตรวจสอบการปลอดไวรัสในขั้นต่อไป

2.2 การใช้สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กของดองดึง

นำส่วนยอดของดองดึง ความยาว 0.5 เซนติเมตร จากหัวพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิริน (ribavirin) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sochacki and Podwyszyñska (2012) แบ่งออกเป็น 3 กรรมวิธี ๆ ละ 15 ซ้ำ ดังนี้

(0) (1) (2) (3) (4)

Figure 1. Strip mosaic symptoms of *Gloriosa rothschildiana* O' Brien. Five criteria of severity levels rating at 0= No symptom, 1= 1-25%, 2= 26-50%, 3= 51-75%, 4= 76-100% observing in total leave area per plant

กรรมวิธีที่ 1 MS (control)
กรรมวิธีที่ 2 MS + 20 mg/L ribavirin
กรรมวิธีที่ 3 MS + 40 mg/L ribavirin

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) เพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 1,200 lux นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนยอด ความสูงต้น จำนวนหัว ความยาวหัว ความยาวราก จำนวนราก และจำนวนใบ หลังเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ พร้อมทั้งร้อยละการรอดชีวิต เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และนำต้นที่เจริญสมบูรณ์ไปตรวจสอบการปลอดไวรัสต่อไป

3. การตรวจสอบการปลอดไวรัส

นำต้นดองดึงที่ผ่านการทำให้ปลอดไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และการใช้สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงยอดของดองดึงขนาด 0.5 เซนติเมตร มาตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจหาไวรัส CMV ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang *et al*. (2017)

4. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงดองดึง

นำส่วนยอดดองดึง ความยาว 1 เซนติเมตร จากหัวพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzylaminopurine (BAP) และ napthalene acetic acid (NAA) ที่ความเข้มข้น 0-2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Chatterjee and Ghosh (2015) จำนวนรวม 6 กรรมวิธี ๆ ละ 15 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 MS free hormone (control)
กรรมวิธีที่ 2 MS + 0.5 mg/L NAA
กรรมวิธีที่ 3 MS + 1.0 mg/L BAP
กรรมวิธีที่ 4 MS + 2.0 mg/L BAP
กรรมวิธีที่ 5 MS + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA
กรรมวิธีที่ 6 MS + 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA

วางแผนการทดลองแบบ CRD เพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 1,200 lux นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนยอด และจำนวนหัว หลังเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการโรคไวรัส และการตรวจวินิจฉัย

1.1.การประเมินความรุนแรงของโรคไวรัส

จากการศึกษาอาการโรคไวรัสในดองดึงในสภาพโรงเรือน หลังปลูกได้ 90 วัน พบอาการใบด่างขีดสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อนเป็นทางยาวตามแนวเส้นใบ (stripe mosaic) ใบหงิกงอ มีรูปร่างบิดเบี้ยว และดอกมีสีซีดจาง และด่าง (Figure 2) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Koenig and Lesemann (1974) ที่พบการเข้าทำลายของไวรัส CMV ในดองดึงส่งผลให้พืชแสดงอาการด่างที่ใบและดอก หากมีอาการที่รุนแรงจะทำให้ลำต้นแคระแกร็น และไม่ออกดอก จากการประเมินระดับความรุนแรงของ

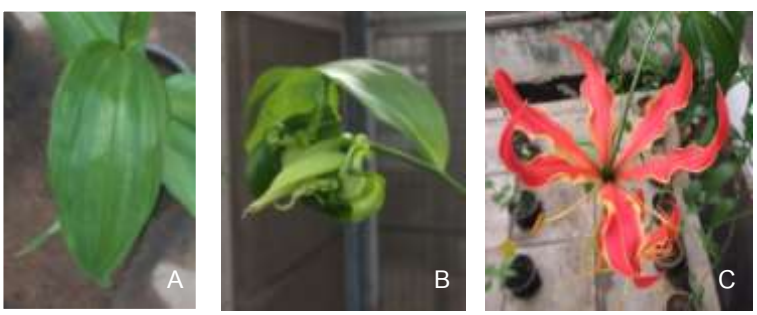

Figure 2. Viral symptoms in *Gloriosa rothschildiana* O' Brien after planting for 90 days: (A) stripe mosaic; (B) leaf curl and (C) pale mosaic on flower petals

อาการโรคไวรัสและการศึกษาผลกระทบของโรคไวรัสต่อการออกดอกของดองดึง พบว่ามีระดับความรุนแรงมากที่สุด คือ ระดับ 3 เฉลี่ย 33.75 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนดอกต่อต้นเฉลี่ย 3.17 ดอกต่อต้น รองลงมา ได้แก่ ระดับ 4, 2, 1 และ 0 ตามลำดับ เฉลี่ย 25, 20, 13.75 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีดอกเฉลี่ยต่อต้น 1.0, 4.0, 4.67 และ 5.33 ดอกต่อต้น ตามลำดับ และพบว่าความรุนแรงของโรคไวรัสต่อการออกดอกมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งหากดองดึงถูกไวรัสเข้าทำลายในระดับที่รุนแรงมากจะทำให้ไม่ออกดอก สอดคล้องกับการรายงานของ Niimi *et al*. (2003) ซึ่งศึกษาไวรัสที่เข้าทำลายพืชในสกุล *Lillium* ในประเทศญี่ปุ่น พบว่าไวรัส CMV มีความสำคัญ ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต การเกิดตาดอกและทำให้ดอกมีขนาดเล็กผิดปกติ กลีบดอกมีอาการสีซีดและด่าง

1.2 การตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา

จากการนำตัวอย่างใบดองดึงที่แสดงอาการใบด่างในสภาพโรงเรือนจำนวน 20 ตัวอย่าง มาตรวจสอบหาชนิดของไวรัสสาเหตุโรคด้วยเทคนิค ELISA อ่านผลจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยการเปรียบเทียบกับค่าของ negative control (0.457) โดยค่าที่สูงกว่าสองเท่าของค่า O.D.405 ของ negative control (0.194) จะถือว่าเป็นโรคหรือพบไวรัส จากการศึกษาในตัวอย่างที่แสดงอาการของใบด่าง จำนวน 20 ใบ พบไวรัส CMV ในตัวอย่างที่มีค่า ELISA (O.D.405) อยู่ในช่วง 0.924-1.495 จำนวน 17 ตัวอย่าง และไม่พบไวรัส CMV จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่มีค่า ELISA (O.D.405) 0.745, 0.836 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมที่เป็น positive control มีค่า ELISA (O.D.405) 2.545

2. การผลิตดองดึงปลอดไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งมีชีวิตรอดเฉลี่ย 75 เปอร์เซ็นต์ และหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดสามารถพัฒนาไปเป็นใบอ่อนคู่แรกได้ และสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์โดยมีความสูงจากโคนต้นจนถึงปลายใบประมาณ 3-4 เซนติเมตร ในเวลา 9 สัปดาห์ จากการสังเกตพบว่าใบดองดึงที่เจริญมาจากส่วนของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดนั้นไม่พบอาการด่างเมื่อเปรียบเทียบกับต้นดองดึงที่ไม่ได้ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Figure 3)

2.2 การใช้สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กของดองดึง

จากการนำยอดของดองดึงขนาด 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้ในทุกกรรมวิธี โดยมีชีวิตรอดเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการเติมสารริบาวิริน ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหาร MS มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่ลดลง โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.00 ยอดต่อต้น มีความสูงยอดเฉลี่ย 2.79 และ 2.40 เซนติเมตร ตามลำดับ มีจำนวนหัวเฉลี่ย 1.00 และ 0.93 หัวต่อต้น ตามลำดับ มีความยาวหัวเฉลี่ย 0.39 และ 0.21 เซนติเมตร ตามลำดับ มีจำนวนรากเฉลี่ย 3.60 และ 3.00 รากต่อต้น ตามลำดับ มีความยาวรากเฉลี่ย 0.37 และ

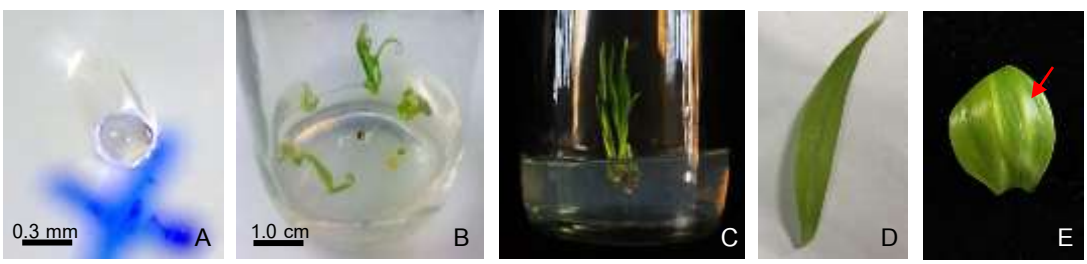

Figure 3. Growth and development of meristem-tip of *Gloriosa rothschildiana* O' Brien on MS medium: (A) at day 1; (B) at 4 weeks; and (C) at 9 weeks after culture; (D) healthy leaf of 3-month old seedling compared to; (E) mosaic symptom of the infected control

0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีจำนวนใบเฉลี่ย 2.53 และ 2.47 ใบต่อต้น ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม (MS) (Table 1)

4. การตรวจสอบการปลอดไวรัส

จากการตรวจสอบการปลอดไวรัส CMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำต้นดองดึงที่ผ่านการทำให้ปลอดไวรัสด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร มีการปลอดไวรัส 100 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิริน ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการปลอดไวรัส 26.67 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2, Figure 4) สอดคล้องกับการรายงานของ Masuda *et al*. (2011) ที่ได้ศึกษาการผลิตต้นลิลี (*Lilium brownii* var. *colchesteri*) ปลอดไวรัส CMV, LMoV และ LSV พบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร สามารถกำจัดไวรัสได้ 2 ชนิด คือ CMV และ LMoV ซึ่งมีการปลอดไวรัส 100 และ 73.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการเติมสารริบาวิรินความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหาร MS ที่ใช้เพาะเลี้ยงยอดอ่อน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถกำจัดไวรัส 2 ชนิด คือ CMV และ LSV มีการปลอดไวรัส 100 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่การเติมสารริบาวิรินลงในอาหาร MS ส่งผลให้การเจริญของจำนวนยอดลดลง

5. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงดองดึง

จากการศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ NAA จำนวน 6 กรรมวิธี เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า กรรมวิธีที่ 6 ที่เติม BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอด และจำนวนหัวได้สูงที่สุด

Table 1. Effects of various concentrations of ribavirin supplemented in MS media on shoot formation and mini-tuber induction in *Gloriosa rothschildiana* O' Brien after 5 weeks of cultures

Ribavirin (mg/L)	Shoot number	Shoot length (cm)	Tuber number	Tuber length (cm)	Root length (cm)	Root number	Leaves (no/plant)
0	1.27 a[1]	3.78 a	1.13 a	0.70 a	0.94 a	6.67 a	3.53 a
20	1.00 b	2.79 b	1.00 ab	0.39 b	0.37 b	3.60 b	2.53 b
40	1.00 b	2.40 c	0.93 b	0.21 c	0.26 c	3.00 c	2.47 b
CV (%)	24.27	12.63	24.65	27.88	23.37	15.96	18.15
LSD	0.19	0.28	0.19	0.89	0.09	0.52	0.38

[1] Means followed by the difference letters were significantly different at $P \leq 0.05$ by the least significant difference (LSD)

Table 2. Survival rates and virus elimination percentages of *Gloriosa rothschildiana* O' Brien after excision of meristem at size 0.3 mm and 20 and 40 mg/L ribavirin treatments

Treatment	No. of explants	No. of survival plant *in vitro*	survival rate (%)[1]	virus elimination (%)[2]
meristem 0.3 mm	20	15	75	100
ribavirin 40 ppm[3]	15	15	100	100
ribavirin 20 ppm[3]	15	15	100	26.67

[1] Data were collected after 12 weeks of post-meristem tip culture on MS medium and after 4 weeks of post-shoot culture on MS medium + ribavirin 40, 20 mg/L

[2] Number of virus free plantlets, detection with PCR technique

[3] Excision of *in vitro* shoot of the tuber at size 0.5 cm

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.27 ยอดต่อต้น และมีจำนวนหัวเฉลี่ยสูงสุด 2.20 หัวต่อต้น รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 5 ที่เติม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.60 ยอดต่อต้น และมีจำนวนหัวเฉลี่ย 1.93 หัวต่อต้น ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในขณะที่เติมเฉพาะ BAP 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ เติมเฉพาะ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าต้นดองดึงมีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์และไม่แข็งแรง (Figure 5)

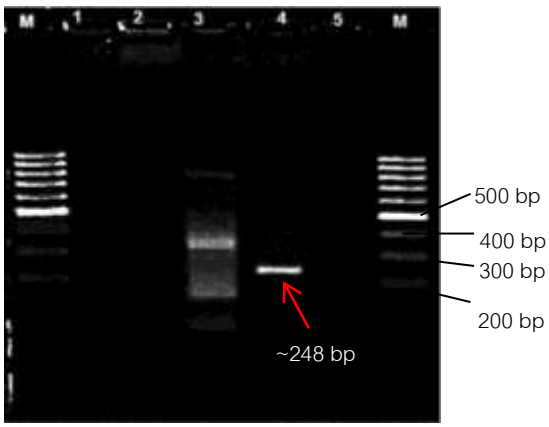

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products from leaves of gloriosa to detect CMV-free: (M) molecular marker 100 pb.; Lane 1: meristem culture; Lane 2: 40 mg/L ribavirin; Lane 3: in 20 mg/L ribavirin; Lane 4: primer for CMV (248 pb) and Lane 5: negative control

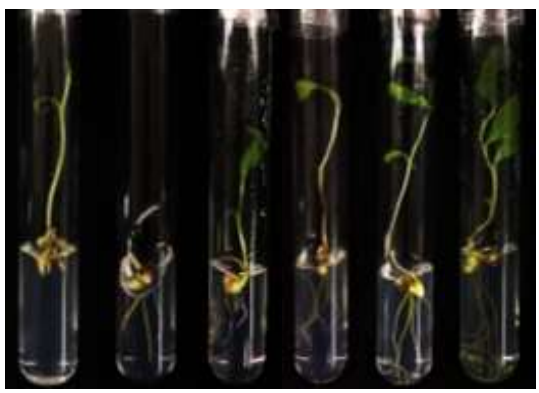

Figure 5. *In vitro* regeneration of *Gloriosa rothschildiana* O' Brien from shoot explants after 12 weeks cultured: (A) on MS medium with free-growth regulators; (B) MS + 0.5 mg/L NAA; (C) MS + 1.0 mg/L NAA; (D) MS + 2.0 mg/L BAP; (E) MS + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA and (F) MS + 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA

สรุป

จากการศึกษาลักษณะอาการใบด่างขีดเป็นทางยาวตามแนวเส้นใบของดองดึงพบมีความรุนแรงมากที่สุดในระดับ 3 คิดเป็น 33.75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาตรวจสอบชนิดของไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR และ EILSA พบไวรัส CMV เป็นสาเหตุโรค และเมื่อนำหัวพันธุ์ดองดึงที่เป็นโรคไวรัสมาทำให้ปลอดไวรัสด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร และการเพาะเลี้ยงยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิรินเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดไวรัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีชีวิตรอด 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เพาะเลี้ยงยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิริน เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดไวรัส CMV ได้ 26.67 เปอร์เซ็นต์ และมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหาร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นดองดึงโดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.27 ยอดต่อต้น และมีจำนวนหัวเฉลี่ยสูงสุด 2.20 หัวต่อต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Taiwan ICDF Project in Royal Project Foundation (Thailand) โครงการ Gloriosa, Sweet Potato Virus-free Seedling and Grape Root Stock Production Project ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Akbar, A., Z. Ahmad, F. Begum, Ubairah and N. Raees. 2015. Varietal reaction of *Cucumber mosaic virus*. American Journal of Plant Sciences 6: 833-838.

Araki, M., S. Yamashita, Y. Doi and K. Yora. 1985. Three viruses from gloriosa (*Gloriosa rothschildiana* O' Brien). Japanese Journal of Phytopathology 51(5): 632-636.

Chatterjee, T and B. Ghosh. 2015. An efficient method of *in vitro* propagation of *Gloriosa superba* L. - an endangered medicinal plant. Plant Science Research 37(1&2): 18-23.

George, M. and K. M. Pandalai. 1949. Investigation on plant antibiotics. part IV. future search for antibiotic substances in Indian medicinal plants. Indian Journal of Medical Research 37(2): 169-181.

Koenig, R. and D. Lesemann. 1974. A potyvirus from *Gloriosa rothschildiana*. Journal of Phytopathology 80(2): 136-142.

Masuda, J., N.Q. Thien, N.T. L Hai, M. Hiramatsu, M. Takeshita, J.H. Kim, M. Nakamura, H. Iwai and H. Okubo. 2011. Production of virus-free bulblets by meristematic tip culture with antiviral chemical in *Lilium brownii* var. *colchesteri*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 80(4): 469-474.

Niimi, Y., D.S. Han, S. Mori and H. Kobayashi. 2003. Detection of *Cucumber mosaic virus*, *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* in *Lilium* species by RT-PCR technique. Scientia Horticulturae 97: 57-63.

Royal Project Foundation. 2015. Annual Report 2015. The Royal Project Foundation, Chiang Mai. 145 p. (in Thai)

Sochacki, D. and M. Podwyszyñska. 2012. Virus eradication in narcissus and tulip by chemotherapy. Floriculture and Ornamental Biotechnology 6(Special Issue 2): 114-121.

Yadav, K., A. Aggarwal and N. Singh. 2012. Actions for *ex situ* conservation of *Gloriosa superba* L. - an endangered ornamental cum medicinal plant. Journal of Crop Science and Biotechnology 15(4): 297-303.

Zhang, Y., Y. Wang, Z. Xie, G. Yang, Z. Guo and L. Wang. 2017. Simultaneous detection of three lily viruses using triplex IC-RT-PCR. Journal of Virological Methods 249: 69-75.

การถ่ายทอดลักษณะแคระในเฟินกูดดอยใบมัน

Inheritance of Dwarfism in *Blechnum gibbum* Mett.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์[1*] มล. จารุพันธ์ ทองแถม[2] และ อนุพันธ์ สุรินรังษี[2]

Surawit Wannakrairoj[1*], M.L. Charuphant Thongtham[2] and Anuphan Surinranagsee[2]

[1]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

[2]โครงการพัฒนาเฟิน สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ มูลนิธิโครงการหลวง จ. เชียงใหม่ 50200

[2]Fern Development Project, Royal Agricultural Station Intanon, Royal Project Foundation, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: agrsuw@ku.ac.th*

(Received: 27 November 2018; Accepted: 17 April 2019)

Abstract: Silver lady fern (*Blechnum gibbum* Mett.) is a pot tree fern which has been utilized in many countries, in both sub-tropical and tropical regions of the world. A number of dwarf forms of the fern, occasionally found as a variance from spore germination of a common silver lady fern, has more desirable characteristics to be used for table decorations. Thus, the variance is highly desirable for consumers. Due to its inability to produce spore, the dwarf variance has a propagation constrain. To know how to reproduce this dwarf fern in commercial scale, an inheritance of dwarfism was investigated from spore germination using spores collected from the normal form which had produced some dwarf variances. Segregation in a population of 7,463 progenies was analyzed. Of which 2,341 are normal and 5,122 are dwarf. A chi-square goodness of fit test indicated 4 alleles, postulated as d_1, d_2, d_3 and d_4, as the dwarfism controllers. As an interallelic interaction among those four loci is a duplicate recessive epistasis. Therefore, germination of spores from the 4 loci heterozygotes could be adopted for mass production the dwarf form in the future.

Keywords: Fern, pot plant, genetic, breeding, duplicate recessive epistasis

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: เฟินกูดดอยใบมัน (*Blechnum gibbum* Mett.) เป็นเฟินต้นกระถางขนาดเล็กที่มีการใช้ประโยชน์ในหลายประเทศ ทั้งเขตกึ่งร้อนและเขตร้อนชื้น เฟินกูดดอยใบมันแคระซึ่งเกิดจากการกระจายตัวในการเพาะสปอร์ของเฟินกูดดอยใบมันต้นปกติ มีลักษณะที่เหมาะสมยิ่งขึ้นในการใช้ประดับในพื้นที่จำกัด เช่นโต๊ะทำงาน ทำให้เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค แต่เฟินกูดดอยใบมันแคระไม่สร้างสปอร์อันเป็นข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ จึงได้ศึกษารูปแบบการถ่ายทอดลักษณะแคระโดยการเพาะสปอร์ซึ่งเก็บจากเฟินกูดดอยใบมันต้นที่มีลักษณะปกติซึ่งมีประวัติเคยให้ลูกจำนวนหนึ่งที่มีลักษณะแคระ เพื่อเป็นแนวทางผลิตเชิงการค้าในอนาคต การศึกษาการกระจายตัวในรุ่นลูกจำนวน 7,463 ต้น พบว่ามีต้นปกติ จำนวน 2,341 ต้น และต้นแคระ จำนวน 5,122 ต้น ซึ่งเมื่อทดสอบโดย chi-square “goodness of fit test พบว่าลักษณะต้นแคระอยู่ภายใต้การควบคุมของอัลลีลแฝง จำนวน 4 ตำแหน่ง จึงกำหนดชื่อว่า อัลลีล d_1, d_2, d_3 และ d_4 ที่มีการทำงานแบบ duplicate recessive epistasis ดังนั้นการผลิตเฟินกูดดอยใบมันแคระให้ได้ปริมาณมากในเชิงการค้า จึงสามารถใช้วิธีเพาะสปอร์จากต้นที่เป็น heterozygote ของยีนทั้งสี่ตำแหน่ง

คำสำคัญ: เฟิน ไม้กระถาง พันธุกรรม ปรับปรุงพันธุ์ duplicate recessive epistasis

คำนำ

ไม้ประดับที่มีต้นหรือทรงพุ่มขนาดเล็ก กำลังเป็นที่สนใจของผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เพื่อใช้เป็นไม้กระถางประดับโต๊ะ (Amasino *et al*., 2005) ทรงพุ่มขนาดเล็กอาจเกิดจากการที่ทรงพุ่มกระชับโดยรักษาสัดส่วนของอวัยวะทุกส่วนไว้ (เล็กแบบย่อส่วน หรือ miniature) หรือเกิดจากการที่ทรงพุ่มกระชับโดยสัดส่วนของอวัยวะแต่ละส่วนเปลี่ยนไป (ลักษณะแคระ หรือ dwarfism) ความต้องการไม้ประดับแคระนี้ได้ทำให้มีความพยายามศึกษารูปแบบการถ่ายทอดลักษณะหรือพันธุกรรมของลักษณะนี้ในไม้ประดับบางชนิด เพื่อให้สามารถวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ในการศึกษาในกุหลาบ *Rosa chinensis minima* นั้นพบว่า ลักษณะแคระอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนข่ม 1 ตำแหน่ง (Dubois and de Vries, 1987)

เฟินในสกุลกูดดอย หรือ *Blechnum* อยู่ในวงศ์ Blechnaceae มีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ในเขตซีกโลกใต้ มีประมาณ 200 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่นั้น พบได้ในเขตหนาวและพื้นที่ภูเขาในเขตร้อนชื้น ของทวีปอัฟริกา อเมริกาใต้ และออสตราเซีย (Kramer *et al*., 1990) เฟินกูดดอยใบมัน (*Blechnum gibbum* Mett.) หรือ Silver Lady fern มีถิ่นกำเนิดในหมู่เกาะแปซิฟิค เป็นเฟินดิน ลำต้นเดี่ยวตั้งขึ้น สูง 90-120 เซนติเมตร ใบประกอบรูปขนนกชั้นเดียว ใบย่อยสีเขียวเป็นมัน ใบที่สร้างและไม่สร้างสปอร์มีรูปร่างคล้ายกัน (Holtum, 1968) แต่ใบที่สร้างสปอร์มักจะแคบกว่าใบที่ไม่สร้างสปอร์อย่างชัดเจน นิยมใช้ปลูกประดับสวน เนื่องจากปลูกเลี้ยงง่าย และเจริญเติบโตได้รวดเร็ว (Hoshizaki and Moran, 2002) การขยายพันธุ์เฟินเพื่อการค้าของมูลนิธิโครงการหลวง ได้พบว่าเฟินกูดดอยใบมันบางต้นสามารถให้ต้นกล้าจากสปอร์ที่มีลักษณะแคระ (dwarf) โดยมีลำต้นตั้งตรง สูงเพียง 20-25 เซนติเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มเพียง 10-15 เซนติเมตร ใบย่อยแข็ง เล็กละเอียด ย่นเป็นคลื่น และไม่มีใบสร้างสปอร์ เหมาะที่จะนำไปประดับพื้นที่ขนาดค่อนข้างเล็ก เช่นโต๊ะทำงาน เฟินกูดดอยใบมันแคระเป็นที่ต้องการของผู้พบเห็น แต่เนื่องจากการแตกหน่อน้อย และมีการสร้างสปอร์น้อยมาก จึงเป็นข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ในเชิงการค้า (Boonpermrasri, 2006; Saengdanuch, 2011) ดังนั้น จึงได้ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะแคระของเฟินกูดดอยใบมัน เพื่อเป็นแนวทางผลิตเฟินกูดดอยใบมันแคระในเชิงการค้าต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บรวบรวมใบที่สร้างสปอร์ในระยะที่อับสปอร์แก่แต่ยังไม่แตก จากเฟินกูดดอยใบมันจำนวน 1 ต้นที่มีลักษณะปกติแต่เคยมีประวัติให้ลูกจำนวนหนึ่งที่มีลักษณะแคระ ที่ปลูกในโรงจัดแสดงพันธุ์เฟิน ในสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ มูลนิธิโครงการหลวง เชียงใหม่

แล้วนำไปเช็ดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำลายสปอร์ที่อาจปนเปื้อนบนใบของเฟินกูดดอยใบมันที่ถูกเก็บรวบรวม เนื่องจากโรงจัดแสดงพันธุ์เฟินมีเฟินต้นอื่นที่อาจมีอับสปอร์แตก แล้วสปอร์ปลิวมาติดใบของเฟินกูดดอยใบมัน จากนั้นนำใบไปเก็บในซองกระดาษ ผึ่งให้แห้งเพื่อให้อับสปอร์แตก แล้วจึงนำสปอร์ไปเพาะในตะกร้าพลาสติกที่มีพีทมอสชื้นเป็นวัสดุเพาะ เมื่อโรยสปอร์แล้ว นำตะกร้าไปใส่ในถุงพลาสติคชนิดพีวีซี แล้วปิดปากถุง จากนั้นนำไปวางในโรงเรือนเฟิน ที่พรางแสงประมาณ 80-85 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิกลางวัน 25-27 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิกลางคืน 15-18 องศาเซลเซียส โดยเพาะสปอร์ในช่วงกลางเดือนเมษายน 2560 รวม 5 ตะกร้า

เมื่อสปอร์เจริญเป็นโพรทัลลัสและมีการผสมพันธุ์เกิดขึ้นแล้ว ได้เกิดต้นกล้าขึ้น ทำการย้ายต้นกล้าครั้งแรกหลังจากเพาะสปอร์ 8 เดือน ซึ่งต้นกล้าเข้าสู่ระยะ sporophyte สมบูรณ์แล้ว โดยแยกต้นที่มีลักษณะปกติและต้นที่มีลักษณะผิดปกติ จากนั้น ย้ายต้นกล้าอีก 2 ครั้ง จึงเก็บข้อมูลจำนวนต้นที่มีลักษณะปกติ และจำนวนต้นที่มีลักษณะแคระหลังจากย้ายต้นกล้าลงกระถางขนาด 3 นิ้ว (Figure 1)

นำข้อมูลไปทดสอบสัดส่วนของต้นที่มีลักษณะปกติ และต้นที่มีลักษณะแคระ ด้วย chi-square (χ^2) test เพื่อตรวจสอบ goodness of fit ของสัดส่วนตามสมมติฐาน โดยใช้สมมติฐานว่าต้นแม่พันธุ์เป็น heterozygote ในลักษณะต้นแคระ (ยีนทุกตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะต้นแคระ อยู่ในสภาพ heterozygous) เนื่องจากรุ่นลูกที่เคยได้จากการผสมตัวเอง มีทั้งลักษณะต้นปกติและลักษณะต้นแคระ ทั้งนี้ได้เริ่มจากการที่มียีน 2 ตำแหน่งควบคุมลักษณะ แล้วจึงเพิ่มจำนวนยีนควบคุมลักษณะครั้งละ 1 ตำแหน่ง จนได้ค่า χ^2 ที่ทำให้ยอมรับสมมติฐาน โดยคำนวณค่า χ^2 จากสูตร

$$\chi^2 = \Sigma (Oi-Ei)^2 / Ei$$

โดยที่ Oi = จำนวนต้นที่มีลักษณะ i
Ei = จำนวนทางทฤษฎีของต้นที่มีลักษณะ i

ผลการศึกษาและวิจารณ์

หลังจากได้ย้ายกล้าที่ได้จากการเพาะสปอร์ของเฟินกูดดอยใบมันซึ่งมีต้นลักษณะปกติ ทั้ง 5 ตะกร้าแล้ว 3 ครั้ง และแยกต้นกล้าตามลักษณะต้นที่เห็น พบว่าได้ต้นกล้าทั้งหมด 7,463 ต้น โดยมีต้นที่มีลักษณะปกติรวม 2,341 ต้น และต้นที่มีลักษณะแคระรวม 5,122 ต้น ซึ่งการที่มีการกระจายต้นในรุ่นลูกนั้น เป็นการยืนยันความถูกต้องของสมมติฐานที่ว่าเฟินกูดดอยใบมันซึ่งเป็นแม่พันธุ์นั้นเป็น heterozygote ในลักษณะต้นแคระ (Watts, 1980) การที่มีการกระจายต้นในรุ่นลูกเป็นเพียง 2 กลุ่ม โดยมีต้นกล้าซึ่งมีลักษณะต้นปกติเหมือนต้นแม่พันธุ์ในสัดส่วนที่ต่ำกว่าต้นกล้าซึ่งมีลักษณะต้นแคระ บ่งชี้ว่าต้องมียีนหลายตำแหน่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะต้นแคระ โดยยีนเหล่านั้นมีปฏิกิริยาต่อกันข้ามตำแหน่ง (interallelic interaction) แบบ epistasis (Watts, 1980)

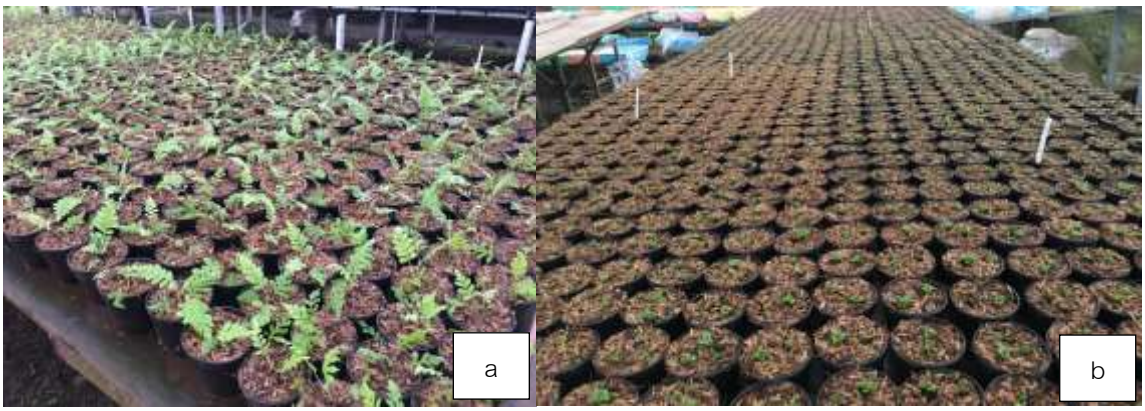

Figure 1. The normal form (a) and the dwarf form (b) of *Blechnum gibbum* after the third transplanting

เนื่องจากเฟินกูดดอยใบมันที่เป็น homozygous dominant และ homozygous recessive มีลักษณะต่างกันคือ homozygous dominant มีต้นลักษณะปกติ และ homozygous recessive มีต้นลักษณะแคระ จึงมี epistasis เพียงสองแบบที่จะทำให้รุ่นลูกจากการผสมตัวเองของต้น heterozygote มีการกระจายตัวเป็น 2 กลุ่ม คือ แบบ Duplicate dominant epistasis ซึ่งเป็นแบบที่ต้นซึ่งมีอัลลีล dominant แม้เพียงตำแหน่งเดียวจะมีลักษณะต้นปกติ ทำให้รุ่นลูกมีต้นมีลักษณะแคระในสัดส่วน $(1/4)^n$ เมื่อ n คือจำนวนตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะต้นแคระ และแบบ duplicate recessive epistasis ซึ่งเป็นแบบที่ต้นซึ่งมียีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะต้นแคระอยู่ในสภาพ homozygous recessive แม้เพียงตำแหน่งเดียว จะมีลักษณะต้นแคระ ซึ่งจะทำให้รุ่นลูกมีต้นที่มีลักษณะปกติในสัดส่วน $(3/4)^n$ (Watts, 1980) การที่รุ่นลูกมีต้นที่มีลักษณะปกติรวม 2,341 ต้น และต้นที่มีลักษณะแคระรวม 5,122 ต้น หรือมีต้นปกติในสัดส่วน 0.3136808 ของประชากรรุ่นลูก 7,463 ต้น จึงได้นำสัดส่วนของจำนวนต้นกล้าที่มีลักษณะปกติและต้นที่มีลักษณะแคระ มาทดสอบด้วย chi-square test โดยใช้สมมติฐานว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะต้นแคระ มีปฏิกิริยาต่อกันแบบ duplicate recessive epistasis เนื่องจาก epistasis แบบนี้ จะทำให้มีต้นซึ่งมีลักษณะปกติในสัดส่วนที่ต่ำลง เมื่อมียีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะต้นแคระต้นกล้ามากตำแหน่งขึ้น

ผลการทดสอบด้วย chi-square test (Table 1) พบว่าการมีต้นปกติในสัดส่วน 0.3136808 ของประชากรรุ่นลูก (ต้นที่มีลักษณะปกติรวม 2,341 ต้น และต้นที่มีลักษณะแคระรวม 5,122 ต้น) ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากสัดส่วนทางทฤษฎีของจำนวนต้นปกติ 0.31640625 ของประชากรรุ่นลูก หรือ $(3/4)^4$ หรือต้นที่มีลักษณะปกติรวม 2,361 ต้น และต้นที่มีลักษณะแคระรวม 5,102 ต้น ประกอบกับการที่ประชากรมีจำนวนมากกว่า 6.4×4^4 ต้น ทำให้สามารถทดสอบสัดส่วนดังกล่าวด้วย chi-square test ได้ที่ระดับความมั่นใจ 99% (Watts, 1980) พบว่าเฟินกูดดอยใบมัน มีอัลลีลแฝง 4 ตำแหน่ง ที่ควบคุมการเกิดลักษณะต้นแคระ (Figure 2) ซึ่งยีนเหล่านี้มีปฏิกิริยาต่อกันแบบ duplicate recessive epistasis จึงกำหนดให้อัลลีลทั้งสี่ตำแหน่ง ชื่อ d_1, d_2, d_3 และ d_4 ตามลำดับ นั่นคือ เฟินกูดดอยใบมันที่มีลักษณะแคระนั้นมีลักษณะพันธุกรรม (phenotype) เป็น $d_1d_1D_2_D_3_D_4_$, $D_1_d_2d_2D_3_D_4_$, $D_1_D_2_d_3d_3D_4_$, $D_1_D_2_D_3_d_4d_4$, $d_1d_1d_2d_2D_3_D_4_$, $d_1d_1D_2_d_3d_3D_4_$, $d_1d_1D_2_D_3_d_4d_4$, $D_1_d_2d_2d_3d_3D_4_$, $D_1_d_2d_2D_3_d_4d_4$, $D_1_D_2_d_3d_3d_4d_4$, $D_1_d_2d_2d_3d_3d_4d_4$, $d_1d_1D_2_d_3d_3d_4d_4$, $d_1d_1d_2d_2D_3_d_4d_4$, $d_1d_1d_2d_2d_3d_3D_4_$, หรือ $d_1d_1d_2d_2d_3d_3d_4d_4$

ดังนั้น การผลิตเฟินกูดดอยใบมันแคระในเชิงพาณิชย์ จึงควรใช้วิธีเพาะสปอร์จากต้นปกติที่เป็น heterozygote ของยีนทั้งสี่ตำแหน่งซึ่งจะมีอยู่ในสัดส่วน 0.1975308 หรือ $(2/3)^4$ ของประชากรที่มีลักษณะปกติ 462 ต้น จาก 2,341 ต้นของรุ่นลูกชุดนี้ และเนื่องจากใบของเฟินกูดดอยใบมันต้นปกติมีขนาดใหญ่ สามารถให้สปอร์จำนวนมาก จึงจะสามารถเกิดต้นกล้าเฟินกูดดอยใบมันแคระได้จำนวนมากเช่นกัน

Table 1. Phenotypic distribution in the progeny population with chi-square test for duplicate recessive epistasis

Observed ratio	Number of alleles	Expected ratio	Chi-square	*P*
2,341: 5,122	2	4,198: 3,265	1877.7	> 0.05
	3	3148: 4315	357.8	> 0.05
	4	2,361: 5,102	0.248	≤ 0.05

Figure 2. Normal and dwarf forms of *Blechnum gibbum* (a) at their marketable stage and (b) a close-up view of the dwarf form

สรุป

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะแคระในเฟินกูดดอยใบมันจากการกระจายตัวในรุ่นลูก พบว่าการที่รุ่นลูกมีต้นที่มีลักษณะปกติ จำนวน 2,341 ต้น และต้นที่มีลักษณะแคระ จำนวน 5,122 ต้น แสดงว่าลักษณะแคระอยู่ภายใต้การควบคุมของอัลลีลแฝง จำนวน 4 ตำแหน่ง ที่มีการทำงานแบบ duplicate recessive epistasis ดังนั้นการผลิตเฟินกูดดอยใบมันแคระให้ได้ปริมาณพอเพียงต่อ จึงสามารถใช้วิธีเพาะสปอร์ต้นที่เป็น heterozygote ของยีนทั้งสี่ตำแหน่งได้

เอกสารอ้างอิง

Amasino, R.M., F.M. Schomburg, S.D. Michaels and C. M. Bizzell. 2005. Dwarfism genes and dwarf plants. (Online). Available: https://www.warf.org/documents/technology-summary/ P01061US.pdf (October 29, 2018).

Boonpermrasri, A. 2006. Development of fern cultivars in Thailand and 'Rasmijoti, a new fern hybrid from the Royal Project Foundation. Home Agricultural Magazine 30(5): 215-223. (in Thai)

Dubois, L.A.M. and D.P. de Vries. 1987. On the inheritance of the dwarf character in Polyantha × *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss F_1-populations. Euphytica 36: 535-539.

Holtum, R.E. 1968. A Revised Flora of Malaya. Volume 2: Ferns of Malaya. Government Printing Office, Singapore. 653 p.

Hoshizaki, B.J. and R.C. Moran. 2002. Fern Grower's Manual. Timber Press, Portland, Oregon. 626 p.

Kramer, K.U., T.C. Chamber and E. Hennipman. 1990. Blechnaceae. pp. 60-68. *In*: K.U. Kramer and P.S. Green (eds.). The Families and Genera of Vascular Plants. Vol 1. Pteridophytes and Gymnosperms. Springer-Verlag, Wien, Berlin.

Saengdanuch, P. 2011. Royal Project Ferns. Amarin Printing and Publishing Co., Bangkok. 198 p. (in Thai)

Watts, L. 1980. Flower and Vegetable Plant Breeding. Grower Books, London. 182 p.

ความสามารถในการยืดปล้องและการแสดงออกของยีน *SK2* ในข้าวป่าสามัญภายใต้สภาพน้ำลึก

Internode Elongation Ability and *SK2* Gene Expression in Common Wild Rice Under Deep Water

ปฐมาภรณ์ มาสุด[1] ศันสนีย์ จำจด[1, 2] และ ต่อนภา ผุสดี[1*]

Patamaporn Masud[1], Sansanee Jamjod[1, 2] and Tonapa Pusadee[1*]

[1]สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

[1]Department of plant and soil sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]ศูนย์วิจัยข้าวล้านนา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

[2]Lanna Rice Research Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: tonapha.p@cmu.ac.th*

(Received: 28 December 2018; Accepted: 29 March 2019)

Abstract: Common wild rice is an important genetic resource since its adaptability to inappropriate environments such as floods or drought conditions. The objective of this study was to evaluate the internode elongation ability and the expression of *SK2* gene of common wild rice of Lamphun (WLP), Chiang Mai (WCM) and Roi Et (WRE) and Surin (WSR). The experiment was conducted in randomized complete block design (RCBD) with 3 replications. At sixty days old seeding, wild rice plants were submerged in the cement pot with water level up to 90% of the wild rice plant height in the deep water treatment for 14 day. Internode elongation ability were determined by recording of culm length, number of node and internode length. The results showed that the highest culm length, the highest number of node (3 nodes) and the highest internode elongation at internode 2, 3 and 4 (11.0, 7.6 and 2.9 cm, respectively). Considering the expression levels of *SK2* gene, the WLP illustrated the highest expression level. Positive correlations between culm length, internode elongation and the expression of *SK2* were found. Taken together, the results of this study showed that *SK2* gene is involved in response to deep water by internode elongation. The present research can be used as a basic information in selecting common wild rice germplasm for deep water rice breeding program.

Keywords: Common wild rice, deep water condition, internode elongation, *SK2* gene expression

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: ข้าวป่าสามัญเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีความสำคัญ เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น น้ำท่วม หรือแห้งแล้ง เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการยืดปล้องและการแสดงออกของยีน *SK2* ในข้าวป่าลำพูน (WLP) และข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) ข้าวป่าร้อยเอ็ด (WRE) และข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) ภายใต้สภาพน้ำลึก โดยวางแผนการทดลองแบบ randomize complete block design จำนวน 3 ซ้ำ นำข้าวป่าอายุ 60 วันหลังเพาะเมล็ด ย้ายลงบ่อซีเมนต์ที่มีปริมาณน้ำท่วมสูง 90% ของความสูงต้นข้าว เป็นเวลา 14 วัน บันทึกความสามารถในการยืดปล้อง โดยวัดความยาวต้น จำนวนข้อ และ ความยาวปล้อง หลังให้สภาพน้ำลึกครบ 14 วัน พบว่าข้าวป่าลำพูนมีความยาวต้นที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยมากที่สุด มีจำนวนข้อมากที่สุด (3 ข้อ) และมีความยาวปล้องในปล้องที่ 2, 3 และ 4 เฉลี่ยมากที่สุด (11.0, 7.6 และ 2.9 เซนติเมตร ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของยีน *SK2* พบว่าข้าวป่าลำพูนมีระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุด พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างความยาว และการยืดปล้องกับการแสดงออกของยีน *SK2* เมื่อนำข้อมูลมาเชื่อมโยงกันแล้วจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ยีน *SK2* เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาพน้ำลึกโดยการยืดปล้อง งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพันธุกรรมของข้าวป่าสามัญเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวน้ำลึกต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวป่าสามัญ สภาพน้ำลึก การยืดปล้อง การแสดงออกของยีน *SK2*

คำนำ

น้ำท่วมเป็นปัญหาที่ร้ายแรงในพื้นที่ลุ่มแม่น้ำของทวีปเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีพื้นที่ปลูกข้าวที่ได้รับผลกระทบประมาณ 15 ล้านไร่ สภาพน้ำท่วมขังเป็นเวลานานหลายสัปดาห์ถึงหลายเดือนส่งผลให้ข้าวมีผลผลิตลดลง (Singh *et al.*, 2017) ข้าวเป็นพืชกึ่งพืชน้ำ (semiaquatic species) มีการปรับตัวได้ดีเมื่อมีปริมาณน้ำในสภาพแวดล้อมที่มากเกินไป (Choi, 2011) โดยข้าวมีการปรับตัวเนื่องจากปัญหาน้ำท่วมขัง 2 รูปแบบ รูปแบบแรก คือ น้ำท่วมลึก (deep water floods) เป็นเวลานาน และน้ำท่วมแบบฉับพลัน (flash floods) ซึ่งเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้น ๆ (Nagai *et al.*, 2010) ในสภาพน้ำลึกเป็นเวลานาน ข้าวที่ไม่ทนน้ำลึกจะจมน้ำ และตายเมื่อออกซิเจนถูกนำออกไปจนหมด ส่วนข้าวทนน้ำลึกนั้นเมื่อเจอกับสภาพน้ำลึกจะมีการยืดใบ และปล้องอย่างรวดเร็ว การยืดปล้องช่วยให้ใบบนสุดของข้าวสามารถโผล่พ้นผิวน้ำเพื่อแลกเปลี่ยนแก๊สได้ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในส่วนของปล้องให้กลวง การยืดปล้องของข้าวน้ำลึกนี้จะไม่เกิดขึ้นเมื่อปลูกในสภาพปกติ ลักษณะพิเศษนี้จะแสดงออกมาเฉพาะในกรณีที่เกิดน้ำท่วมลึกเท่านั้น (Hattori *et al.*, 2011) ในทางตรงกันข้ามกับข้าวทนน้ำท่วมแบบฉับพลัน ข้าวจะแสดงการหยุดนิ่งและอยู่รอดในน้ำได้ 1-2 สัปดาห์ โดยหลีกเลี่ยงการใช้พลังงานในการเจริญเติบโต เมื่อปริมาณน้ำลดลงข้าวทนน้ำท่วมจะสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้อีกครั้ง (Nagai *et al.*, 2010)

จากการศึกษาของ Hattori *et al.* (2009) พบว่าลักษณะการตอบสนองต่อน้ำลึกนั้น ถูกควบคุมด้วยลักษณะทางปริมาณ (QTLs) พบ 3 QTLs บนโครโมโซมแท่งที่ 1, 3 และ 12 ในการศึกษาดังกล่าวได้ระบุว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการยืดปล้องภายใต้สภาพน้ำลึกนั้นคือ ยีนในกลุ่มของโปรตีน ethylene response factor ได้แก่ ยีน *SNORKEL2* (*SK2*) ซึ่งยังมีการระบุเพิ่มเติมว่ายีน *SK2* ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 12 โดยมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการยืดปล้อง (mechanism of internode elongation) ในสภาพน้ำท่วม ข้าวอยู่ในสภาพที่มีความเครียด (stress) เนื่องมาจากขาดออกซิเจน พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนพืช (phytohormones) 3 ชนิด ได้แก่ ethylene, gibberellin และ abscisic acid ซึ่ง Choi (2011) ได้อธิบายถึงกระบวนการที่ทำให้ข้าวเกิดการยืดข้อปล้องได้ เมื่อข้าวมีสภาพเครียดเนื่องจากน้ำลึก คือข้าวจะอยู่ในสภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) หรือ สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anoxia) ทั้ง 2 สภาวะมีผลทำให้มีปริมาณ CO_2 เพิ่มสูงขึ้น ต่อมา ethylene จะส่งสัญญาณกระตุ้นให้ยีน *SK1* และ *SK2* ทำงานที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญส่วนเหนือ

ปล้อง (intercalary meristem) ทำให้ส่วนของปล้องยืดตัวอย่างรวดเร็วเพื่อให้โผล่พ้นน้ำได้

ข้าวป่าสามัญ (common wild rice, *Oryza rufipogon* Griff.) เป็นแหล่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สำคัญสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว และเป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* L.) (Vaughan, 1994) แบ่งข้าวป่าสามัญตามลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัย (habitat) ได้ 2 ชนิด คือ ชนิดข้ามปี (perennial type) และชนิดปีเดียว (annual type) ข้าวป่าทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน (Mohapatra *et al.*, 2011) ซึ่ง Morishima *et al.* (1984) รายงานว่าข้าวป่าข้ามปีจะพบในบริเวณที่มีน้ำขัง เป็นแอ่งน้ำ มักมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อใหม่ ที่บริเวณส่วนของข้อ (node) ส่วนข้าวป่าปีเดียวพบบริเวณพื้นที่ค่อนข้างแห้งแล้งหรือมีระดับน้ำตื้น สามารถงอกและมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับความชื้นจากน้ำฝนในช่วงก่อนสิ้นสุดฤดูร้อน

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพันธุกรรมของข้าวป่าสามัญที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการยืดปล้อง และการแสดงออกของยีน *SK2* ในสภาพน้ำลึก เพื่อเข้าใจกลไกในการทนต่อสภาพน้ำลึกของข้าวป่า รวมถึงสามารถนำข้าวป่ามาใช้เป็นแหล่งความหลากทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวน้ำลึกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การประเมินความสามารถในการยืดปล้องของข้าวป่าในสภาพน้ำลึก

นำตัวอย่างข้าวป่าที่เก็บมาจากแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติ จำนวน 4 ประชากร แบ่งเป็น ชนิดข้ามปี 2 ประชากร และ ชนิดปีเดียว 2 ประชากร (Table 1) ทำลายการพักตัว (break dormancy) เพื่อให้ตัวอย่างข้าวป่าสามารถงอกพร้อมกัน เพาะตัวอย่างเมล็ดข้าวป่าบนกระดาษเพาะเมล็ด เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นย้ายปลูกลงกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร กระถางละ 1 ต้น วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ต้นต่อประชากรข้าวป่า 1 ประชากร เป็นเวลา 50 วัน จากนั้นย้ายข้าวป่าลงในบ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร เพื่อทดสอบการความสามารถในการยืดปล้อง โดยระดับน้ำในวันที่ 0 สูงประมาณ 90% ของความสูงต้นของข้าวป่า จากนั้นเพิ่มระดับน้ำครั้งละ 5 เซนติเมตร ทุก ๆ 2 วัน จนสิ้นสุดการทดลอง บันทึกข้อมูลความยาวต้น จำนวนข้อ และ ความยาวปล้องในวันที่ 0, 7 และ 14 หลังให้สภาพน้ำลึก (Figure 1)

การประเมินการแสดงออกของยีน *SNORKEL2* (*SK2*) ที่เกี่ยวข้องกับการยืดปล้องของข้าวป่า

การสกัด RNA

เก็บตัวอย่างส่วนของลำต้น (culm) ข้าวป่า หลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน สกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อในส่วนของข้อและปล้อง บดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วนำมาสกัดด้วย PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA) นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

การกำจัดดีเอ็นเอออกโดยการ Treat DNase I

กำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วย DNase I (Thermo scientific, Lithuania EU) โดยมีส่วนผสมในปฏิกิริยาดังนี้ อาร์เอ็นเอในปริมาณ 1 ไมโครกรัม,1 unit เอนไซม์ DNase I 1 ไมโครลิตร,

Table 1. Accession name, location and types of 4 common wild rice populations

No.	Accession name	Location	Types
1	WCM	San Sai district, Chiang Mai province	Perennial
2	WLP	Mueang district, Lamphun province	Perennial
3	WRE	Mueang district, Roi Et province	Annual
4	WSR	Sikhoraphum district, Surin province	Annual

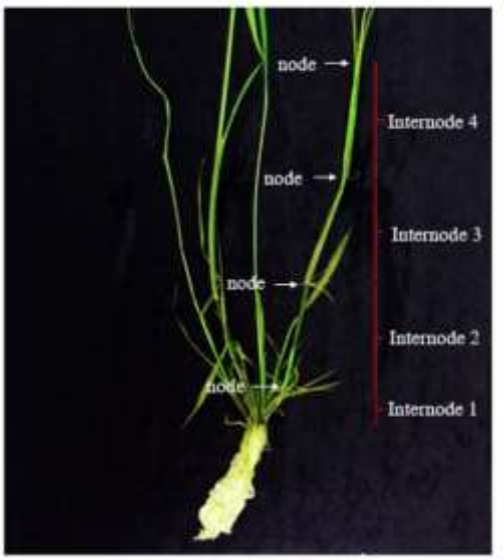

Figure 1. Position of node and internode of common wild rice

10X buffer 2 ไมโครลิตร และเติม DEPC-water เพื่อปรับปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 50 mM EDTA 1 ไมโครลิตร และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อจบปฏิกิริยานำมาลดอุณหภูมิบนน้ำแข็งประมาณ 2 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำอาร์เอ็นเอมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) สายแรก

สังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ด้วยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ดีเอ็นเอ primer ที่เป็น Oligo dT primer เป็นตัวตั้งต้นในการ สังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายแรก (first strand cDNA) ในทิศทาง 5' ⟶ 3' ด้วย Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific, Lithuania EU) โดยมีส่วนผสมในปฏิกิริยาดังนี้อาร์เอ็นเอ 30 ไมโครลิตร, 5X RT Buffer 10 ไมโครลิตร, Oligo $(dT)_{18}$ 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, Ribosafe RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร, Tetro Reverse Transcriptase (200u/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, DEPC-water 6 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำมาลดความร้อนบนน้ำแข็งประมาณ 2 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

ประเมินการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR analysis

โดยใช้ยีน *Actin1* (housekeeping gene) (forward primer: 5´GACTCTGGTGATGGTGTCAGC 3´, reverse primer:5´GGCTGGAAGAGGACCTCAGG 3´) เปรียบเทียบกับยีน *SK2* (forward primer: 5´CACTGGAGGCAACG-AATG 3´, reverse primer: 5´TAAAAGGACCAGAGGCAGC 3´) ปฏิกิริยา semi-quantitative RT-PCR ปริมาตรสุทธิประมาณ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร, deionized water 8 ไมโครลิตร, (10X) buffer + KCl 1 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 0.75 ไมโครลิตร, forward primer 0.1 ไมโครลิตร, reverse primer 0.1 ไมโครลิตร, (25 mM) dNTP 0.08 ไมโครลิตร Tag DNA Polymerase 0.08 ไมโครลิตร และ DMSO 0.3 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม FlexCycle2 (Analytik Jena, Germany) โดย

กำหนดเงื่อนไขอุณหภูมิและเวลา 3 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ และขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา นำผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis จากนั้นนำ agarose gel ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเครื่อง BLooK LED transilluminator (GeneDirex, Inc., Taiwan) บันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล

การวิเคราะห์ข้อมูล

วัดระดับการแสดงออกของยีนโดยการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ semi-quantitative RT-PCR ด้วยโปรแกรม Image J (Schneider *et al.*, 2012) โดยวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนแบบ relative โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีน *Actin1* ในการปรับค่า (normalization) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ RCBD เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยการวิเคราะห์ค่า LSD (least significant difference)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความยาวต้น (culm length)

ภายหลังจากให้สภาพน้ำลึกในบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 14 วัน พบความแตกต่างของความยาวต้นของข้าวป่าสามัญทั้ง 4 ประชากรที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (Figure 2) โดยวันที่ 7 หลังให้สภาพน้ำลึก พบว่าข้าวป่าสามัญทุกประชากรมีความยาวต้นเพิ่มขึ้น โดยข้าวป่าลำพูน (WLP) มีความยาวเพิ่มขึ้นมากที่สุดเท่ากับ 28.5 เซนติเมตร ส่วนข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) ข้าวป่าร้อยเอ็ด (WRE) และข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) มีความยาวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันเท่ากับ 17.9, 17.4 และ 16.9 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับวันที่ 14 หลังให้สภาพน้ำลึก พบว่าข้าวป่าทุกประชากรมีความยาวต้นเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน (P<0.05)

หลังจากให้สภาพน้ำลึกในบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 14 วัน พบความแตกต่างของการตอบสนองต่อสภาพน้ำลึกระหว่างข้าวป่าชนิดข้ามปีและชนิดปีเดียว โดยข้าวป่าลำพูน (WLP) มีความสามารถในการเพิ่มความยาวต้นในสภาพน้ำลึกที่ 7 วันแรกมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Okishio *et al.* (2014) ได้ทดสอบความสามารถ

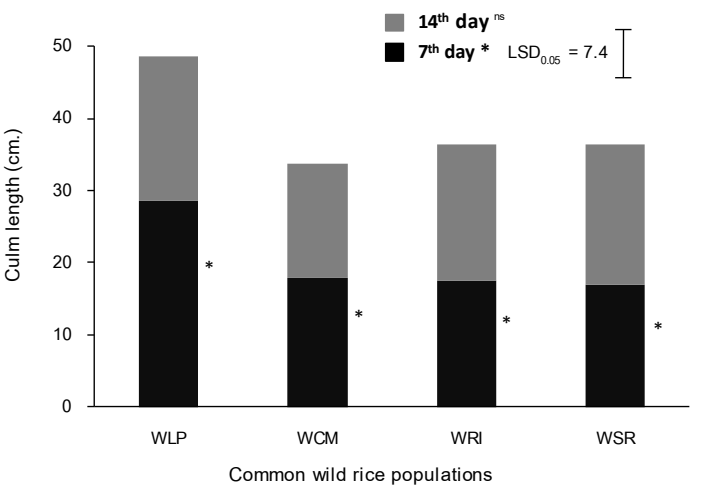

Figure 2. Culm length of 4 common wild rice populations on 7th day (■) and 14th day (■) after deep water treatment

ns indicates not significant difference at P<0.05

* indicates significant difference at P<0.05

ในการยืดตัวในประชากรข้าวป่าจากลุ่มแม่น้ำอะเมซอน (*Oryza grandiglumis*) คือ W0613 กับ RS8-H และข้าวปลูกพันธุ์ T442-57 กับ HA II พบว่าหลังสิ้นสุดการทดลองครบ 58 วัน ข้าวป่าทั้งสองประชากรสามารถยืดตัวได้ดีใกล้เคียงกับข้าวปลูกน้ำลึกพันธุ์ HAII ที่มีความสูง 240 เซนติเมตร และประชากรข้าวป่า W0613 และ RS8-H มีความสูงเป็น 245 และ 230 เซนติเมตร ตามลำดับ ในการทดลองของ Punyalue (2006) เรื่องการประเมินลักษณะประชากรข้าวป่าสามัญจากแหล่งปลูกข้าวของประเทศไทย ได้รายงานถึงลักษณะของประชากรข้าวป่าชนิดข้ามปี คือ ข้าวป่าลำพูนและ ข้าวป่าเชียงใหม่ ซึ่งถิ่นที่อยู่อาศัยอยู่ในบริเวณริมคลองที่มีระดับน้ำค่อนข้างลึก ทำให้มีการปรับตัวเนื่องจากระดับน้ำที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่ข้าวป่าลำพูน มีการตอบสนองได้ดีต่อการจำลองสภาพน้ำลึก

จำนวนข้อ (number of node)

ข้อปรากฏให้บันทึกข้อมูลได้หลังจากข้าวป่าอยู่ในสภาพน้ำลึกมากกว่า 7 วัน พบความแตกต่างของจำนวนข้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (Figure 3) โดยข้าวป่าชนิดข้ามปีทั้งสองประชากร คือ ข้าวป่าลำพูน (WLP) และข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) มีจำนวนข้อมากกว่าข้าวป่าชนิดปีเดียว คือ ข้าวป่าร้อยเอ็ด (WRE) และข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างประชากรข้าวป่าชนิดข้ามปี พบความแตกต่างของจำนวนข้อ โดยข้าวป่าลำพูน (WLP) มีจำนวนข้อมากที่สุด เฉลี่ยเท่ากับ 3 ข้อ มากกว่าข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) ที่มีจำนวนข้อเฉลี่ยเท่ากับ 2 ข้อ ส่วนในข้าวป่าชนิดปีเดียวไม่มีความแตกต่างระหว่างชนิด ทั้งข้าวป่าร้อยเอ็ด (WRE) และข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) มีจำนวนข้อ เฉลี่ยเท่ากับ 1 ข้อ

ความยาวปล้อง (internode length)

หลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน พบข้าวป่ามีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นจำนวน 4 ปล้อง (Figure 4) โดยไม่พบความแตกต่างของความยาวปล้องที่เพิ่มขึ้นในปล้องที่ 1 ระหว่างข้าวป่า 4 ประชากร แต่พบความแตกต่างของความยาวปล้องที่เพิ่มขึ้นระหว่างประชากรข้าวป่าในปล้องที่ 2, 3 และ 4

ปล้องที่ 2 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.001) โดยข้าวป่าลำพูน (WLP) มีความยาวปล้องเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 11.0 เซนติเมตร ข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) 6.2 เซนติเมตร และประชากรข้าวป่าร้อยเอ็ด (WRE) กับข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) มีความยาวปล้องเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 1.7 และ 3.0 เซนติเมตร ตามลำดับ

ปล้องที่ 3 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.001) โดยข้าวป่าลำพูน (WLP) มีความยาวปล้องเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 7.6 เซนติเมตร ส่วนข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) เฉลี่ยเท่ากับ 2.3 เซนติเมตร และข้าวป่าร้อยเอ็ด (WRE) เฉลี่ยเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร แต่ไม่ปรากฏปล้องที่ 3 ในข้าวป่าสุรินทร์ (WSR)

ปล้องที่ 4 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) โดยปล้องที่ 4 ปรากฏปล้องเฉพาะในข้าวป่าชนิดข้ามปี คือข้าวป่าลำพูน (WLP) และข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) โดยมีค่าเฉลี่ยความยาวปล้องเท่ากับ 2.9 และ 0.8 เซนติเมตร ตามลำดับ

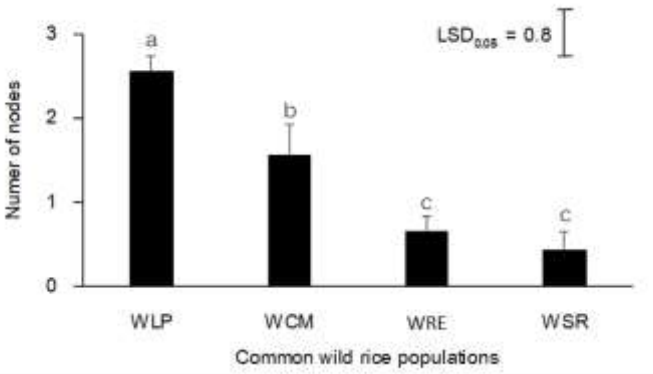

Figure 3. Number of nodes at 14th day after deep water treatment of 4 common wild rice populations

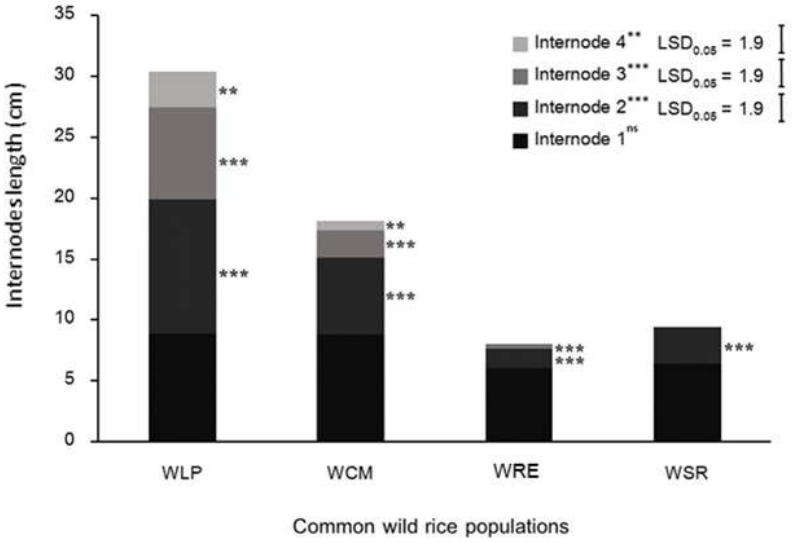

Figure 4. Internode length of internode number 1, 2, 3 and 4 at 14th day after deep water treatment of 4 common wild rice populations

ns indicates not significant

** indicates significant different at $P<0.01$

***indicates significant different at $P<0.001$

อย่างไรก็ตาม หลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน ข้าวป่าสามัญทั้ง 4 ประชากร มีการตอบสนองโดยการยืดปล้องเพื่อให้สามารถเจริญเติบโตให้พ้นจากระดับน้ำที่เสี่ยงต่อการมีชีวิต ซึ่งในปล้องที่ 2 ของข้าวป่าสามัญทุกประชากรจะมีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นมากที่สุด และข้าวป่าลำพูน (WLP) จะมีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นมากกว่าประชากรอื่นทั้งในปล้องที่ 2, 3 และ 4 ส่วนปล้องที่ 1 พบว่าข้าวป่าแต่ละชนิดมีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน

จากการศึกษาลักษณะจำนวนข้อและความยาวปล้องพบว่าข้าวป่าชนิดข้ามปี ได้แก่ ข้าวป่าลำพูน และข้าวป่าเชียงใหม่ มีจำนวนข้อและความยาวปล้องมากกว่าข้าวป่าชนิดปีเดียว ได้แก่ ข้าวป่าร้อยเอ็ด และ ข้าวป่าสุรินทร์ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Kihara *et al.* (1962) และ Anandan *et al.* (2015) รายงานว่าในพื้นที่ที่มีน้ำท่วมขัง ข้าวมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนข้อและปล้องอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่มีน้ำท่วมขัง ความสามารถในการเพิ่มความยาวปล้อง ได้มากหรือน้อยก็ต้องขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของข้าวประชากรนั้น ๆ ด้วย และยังกล่าวอีกว่า การยืดตัวของข้าวในสภาพน้ำลึกนี้สามารถยืดได้ดีที่สุดใน 3 ปล้องแรกนับจากโคนต้น

การแสดงออกของยีน *SK2*

การแสดงออกของยีน *SK2* จากเนื้อเยื่อปล้องของข้าวป่าแต่ละประชากรภายหลังให้สภาพน้ำลึกเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน *Actin1* (housekeeping gene) (Figure 5) พบว่าข้าวป่าทั้ง 4 ตัวอย่างมีระดับการแสดงออกของยีน *SK2* ที่แตกต่างกัน โดยข้าวป่าชนิดข้ามปี (WLP และ WCM) มีการแสดงออกของยีน *SK2* มากกว่าข้าวป่าชนิดปีเดียว (WRE และ WSR) เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละประชากร พบว่ามีข้าวป่าเพียง 3 ประชากรจากทั้งหมด 4 ประชากร ที่มีการแสดงออกของยีน *SK2* ซึ่งข้าวป่าลำพูน (WLP) มีระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุดมีค่า relative สูงที่สุด คือ 0.85 และไม่พบว่ามีการแสดงของยีน *SK2* ในข้าวป่าสุรินทร์ (WSR)

ผลจากการศึกษาพบว่าหลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน พบการแสดงออกของยีน *SK2* ในข้าวป่าลำพูน ข้าวป่าเชียงใหม่ และ ข้าวป่าร้อยเอ็ด แต่ไม่พบ

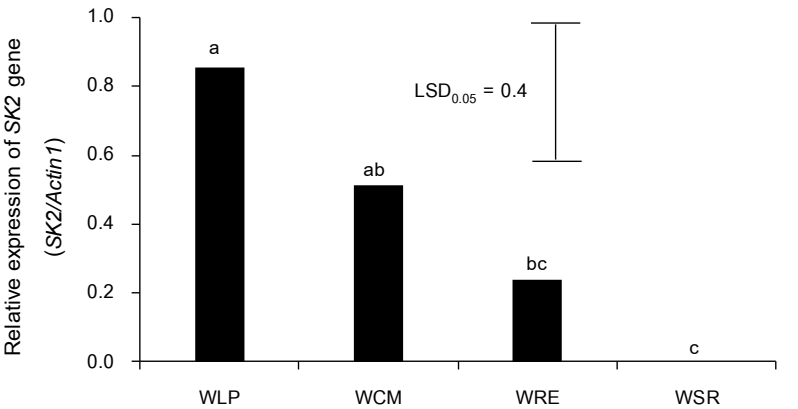

Figure 5. Relative expression of *SK2* gene in 4 common wild rice populations at 14th day after deep water treatment using semi-quantitative RT-PCR analysis

การแสดงออกของยีน *SK2* ในข้าวป่าสุรินทร์ ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกันกับ Hattori *et al*. (2009) ได้ระบุการแสดงออกของยีน *SK2* ที่เกี่ยวข้องกับการยืดปล้อง โดยทดลองในตัวอย่างข้าวป่าชนิดข้ามปี (W0120) และชนิดปีเดียว (W0106) พบยีน *SK1* และ *SK2* ในตัวอย่างของข้าวป่าชนิดข้ามปี (*Oryza rufipogon* Griff: W0120) โดยมีการตอบสนองต่อสภาพน้ำลึกอย่างรวดเร็ว แต่ในข้าวป่าชนิดปีเดียว (*Oryza nivara*: W0106) พบแค่ยีน *SK1* และมีการตอบสนองเพียงเล็กน้อย จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *SK2* นั้นมีการแสดงออกได้ดีในข้าวป่าชนิดข้ามปีมากกว่าชนิดปีเดียว อาจเนื่องมาจากมีปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมและการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดของประชากรข้าวป่าแต่ละชนิด การทำงานของยีน *SK2* เป็นตัวกำหนดความสามารถในการยืดปล้องของข้าว

ความสัมพันธ์ของลักษณะความยาวต้น จำนวนข้อ และความยาวปล้อง กับระดับการแสดงออกของยีน *SK2*

พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างลักษณะความยาวต้นของข้าวป่าที่ให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 7 วัน กับระดับการแสดงออกของยีน *SK2* ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร (r^2= 0.513**) (Figure 6a) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะความยาวต้นของข้าวป่าที่ให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน กับระดับการแสดงออกของยีน *SK2* ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร (r^2 = 0.006^{ns}) (Figure 6b) ส่วนจำนวนข้อภายหลังจากที่ให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับระดับการแสดงออกของยีน *SK2* ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร (r^2= 0.72***) (ข้อมูลไม่ได้แสดง) สำหรับลักษณะความยาวปล้องหลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วันพบความสัมพันธ์ในเชิงบวกในปล้องที่ 2 (Figure 7b) และปล้องที่ 3 (Figure 7c) กับระดับการแสดงออกของยีน *SK2* ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร (r^2= 0.715*** และ 0.675** ตามลำดับ) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะความยาวปล้องในปล้องที่ 1 (Figure 7a) และปล้องที่ 4 (Figure 7d) ของข้าวป่าที่ให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วันกับระดับการแสดงออกของยีน *SK2* ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร ซึ่งความสัมพันธ์ในเชิงบวกนี้มีความสอดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hattori *et al*. (2009) ที่วิเคราะห์ Grain-of-function ของยีน *SK2* โดยโคลนยีน *SK2* เข้าในข้าวปลูกพันธุ์ไม่ทนน้ำท่วม Taichung 65 (T65) และให้สภาพน้ำลึกเปรียบเทียบกับสภาพน้ำปกติเป็นเวลา 7 วัน พบว่าข้าวปลูกพันธุ์ไม่ทนน้ำท่วม Taichung 65 (T65) ที่ได้รับการโคลนยีน *SK2* มีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นได้มากที่สุด 19.5 เซนติเมตรเมื่อเทียบกับสภาพปกติ จากงานทดลองที่กล่าวมานี้สามารถยืนยันได้ว่า ยีน *SK2* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการยืดปล้องเพื่อตอบสนองต่อสภาพน้ำลึก ซึ่งเมื่อยีนมีการแสดงออกมากจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการยืดปล้องของประชากรข้าวป่าทั้ง 4 ประชากรได้

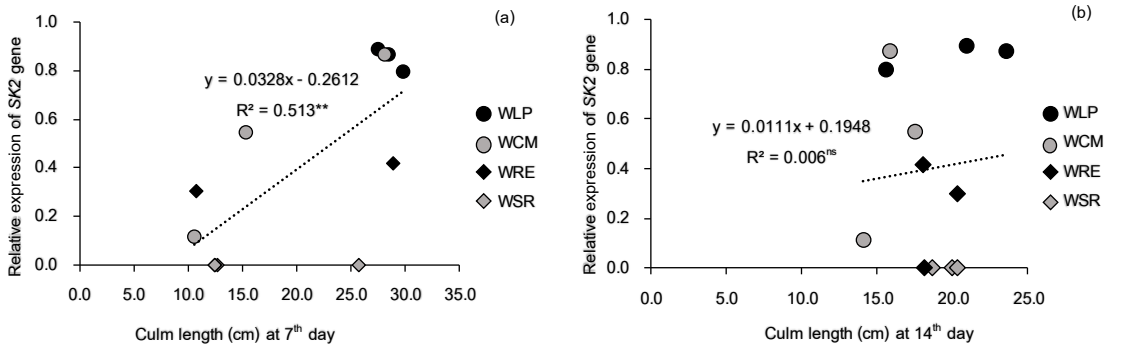

Figure 6. Correlation between culm length (cm) at 7th day (a) and 14th day (b) after deep water treatment with the level of *SK2* gene expression of 4 common wild rice populations

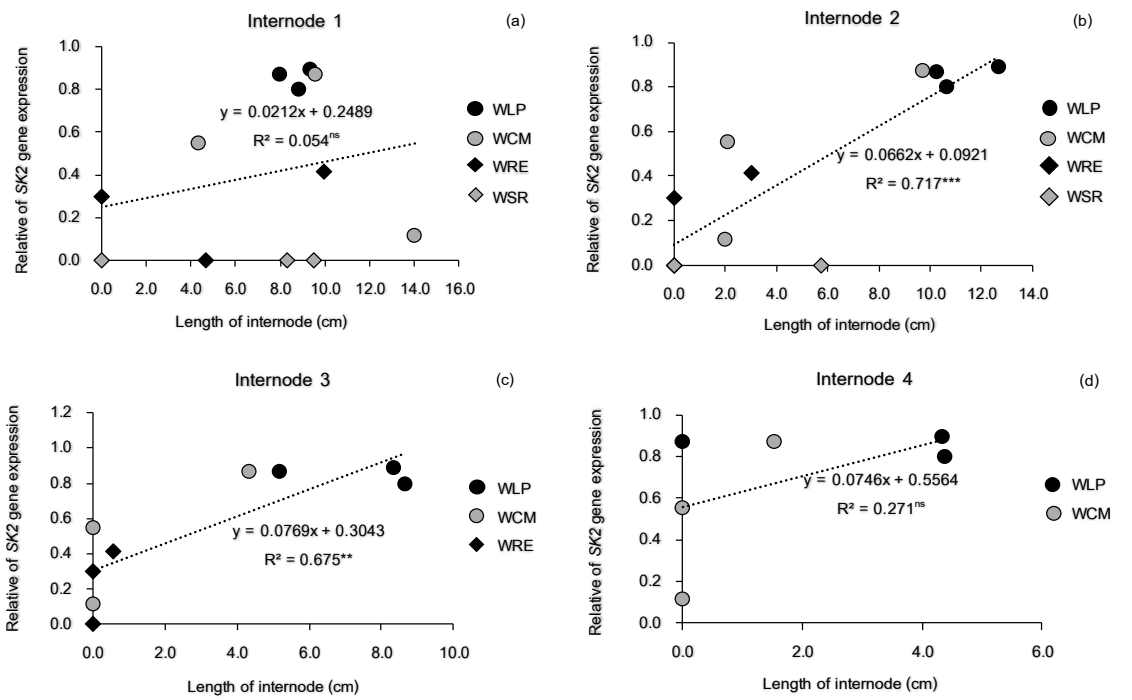

Figure 7. Correlation between internode length (cm): internode 1 (a), internode 2 (b), internode 3 (c) and internode 4 (d) after deep water treatment for 14 day with the level of *SK2* gene expression of 4 common wild rice populations

สรุป

จากการศึกษาความสามารถในการแสดงออกของข้าวป่าสามัญที่สภาพน้ำลึก พบว่าข้าวป่าสามัญทั้ง 4 ประชากร มีการตอบสนองต่อสภาพน้ำลึก ทำให้ลักษณะที่แสดงออกได้แก่ ลักษณะความยาวต้น ความยาวปล้องและจำนวนข้อ มีการตอบสนองที่ทำให้มีการแสดงออกแตกต่างกัน โดยพบว่าข้าวป่าลำพูนมีความสามารถในการยืดปล้องและการแสดงออกของยีน *SK2* สูงที่สุด ทั้งนี้หากต้องการปรับปรุงพันธุ์ข้าวปลูกที่มีความสามารถทนต่อสภาพที่ถูกน้ำท่วมขังหรือทนต่อสภาพน้ำลึกให้มีศักยภาพมากยิ่งขึ้น ข้าวป่าลำพูนจึงเป็นตัวเลือกหนึ่งที่เหมาะสมต่อการนำไปเป็นแหล่งพันธุกรรม (genetic resource) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป และถ้าต้องการทดสอบสภาพน้ำลึก เพื่อวัดความสามารถในการยืดปล้องของข้าวนั้น เวลาที่เหมาะสมในการทดสอบ 7 วัน ก็สามารถทำได้ แต่ถ้าหากต้องการทดสอบการตอบสนองของลักษณะอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่นการเพิ่มขึ้นของจำนวนข้อและความยาวปล้องในแต่ละปล้อง ควรใช้เวลาในการทดสอบอย่างน้อย 14 วัน จึงจะเพียงพอต่อการเก็บข้อมูลทำการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณงบประมาณในการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (TRG5780091) สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Anandan, A., S.K. Pradhan, S.K. Das, L. Behera and G. Sangeetha. 2015. Differential responses of rice genotypes and physiological mechanism under prolonged deepwater flooding. Field Crops Research 172: 153-163.

Choi, D. 2011. Molecular events underlying coordinated hormone action in submergence escape response of deepwater rice. Journal of Plant Biology 54(6): 365-372.

Hattori, Y., K. Nagai and M. Ashikari. 2011. Rice growth adapting to deepwater. Current Opinion in Plant Biology 14(1): 100-105.

Hattori, Y., K. Nagai, S. Furukawa, X.J. Song, R. Kawano, H. Sakakibara and M. Ashikari. 2009. The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. Nature 460(7258) : 1026-1030.

Kihara, H., T.C. Katayama and K. Tsunewaki. 1962. Floating habit of 10 strains of wild and cultivated rice. Japanese Journal of Genetics 37(1): 1-9.

Mohapatra, P.K., B.B. Panda and E. Kariali. 2011. Plasticity of tiller dynamics in wild rice *Oryza rufipogon* Griff.: A strategy for resilience in suboptimal environments. International Journal of Agronomy, Article ID 543237, doi: 10.1155/2011/543237.

Morishima, H., Y. Sano and H. I. Oka. 1984. Differentiation of perennial and annual types due to habitat conditions in the wild rice *Oryza perennis*. Plant Systematics and Evolution 144(2): 119-135.

Nagai, K., Y. Hattori and M. Ashikari. 2010. Stunt or elongate? Two opposite strategies by which rice adapts to floods. Journal of Plant Research 123(3): 303-309.

Okishio, T., D. Sasayama, T. Hirano, M. Akimoto, K. Itoh and T. Azuma. 2014. Growth promotion and inhibition of the Amazonian wild rice species *Oryza grandiglumis* to survive flooding. Planta 240(3): 459-469.

Punyalue, A. 2006. Characterization of common wild rice populations from main rice growing regions of Thailand. M. S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 76 p. (in Thai)

Schneider, C. A., W.S. Rasband and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods 9(7): 671-675.

Singh, A., E.M. Septiningsih, H.S. Balyan, N.K. Singh and V. Rai. 2017. Genetics, physiological mechanisms and breeding of flood-tolerant rice (*Oryza sativa* L.). Plant and Cell Physiology 58(2): 185-197.

Vaughan, D. A. 1994. The Wild Relatives of Rice: A Genetic Resources Handbook. International Rice Research Institute, Los Baños. 148 p.

การประเมินประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกสำหรับการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกอ้อย

Evaluation of Preemergence Herbicide Efficacy for Weed Control in Sugarcane Field

อภิรัฐ บัณฑิต*

Apirat Bundit*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: apirat.b@cmu.ac.th*

(Received: 8 November 2018; Accepted: 31 January 2019)

Abstract: Weed is the major factor influencing sugarcane yield loss in a competitive situation between the crop and weed. The most common method of weed control in sugarcane field has been conducted by herbicides. A field study was evaluated the efficacy of preemergence herbicide (diclosulam, diuron / hexazinone, indaziflam, imazapic + pendimethalin and sulfentrazone) application in sugarcane field as for a single row and double row. The results showed that the application of diuron / hexazinone at 210.6 + 59.4 g a.i./rai, indaziflam at 8 g a.i./rai, imazapic + pendimethalin at 12 + 148.5 g a.i./rai and sulfentrazone at 76.8 g a.i./rai controlled total weeds as in the similar level and it was not affected on crop growth under different planting methods. An exception was found in of diclosulam at 8.4 g a.i./rai which has the lowest level of total weed control when compared with the other herbicides. However, the highest level of broad spectrum activity was obtained with diuron / hexazinone and indaziflam. The indaziflam can provide a level of broad spectrum activity at low application rate than diuron / hexazinone. Therefore, indaziflam could provide a new alternative herbicide use in the sugarcane field.

Keywords: Preemergence herbicide, *Saccharum* spp., sugarcane, weed control

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: วัชพืชเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการสูญเสียผลผลิตอ้อยในสภาพการแข่งขันระหว่างพืชปลูกและวัชพืช การใช้สารกำจัดวัชพืชเป็นวิธีการควบคุมวัชพืชที่พบมากที่สุดในแปลงปลูกอ้อย ดังนั้น การศึกษาในสภาพแปลงจึงทำเพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอก (สาร diclosulam, สาร diuron / hexazinone, สาร indaziflam, สาร imazapic + pendimethalin และสาร sulfentrazone) ในแปลงปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและแถวคู่ ผลการทดลองพบว่า การใช้สาร diuron / hexazinone อัตรา 210.6 + 59.4 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, สาร indaziflam อัตรา 8 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, สาร imazapic + pendimethalin อัตรา 12 + 148.5 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ และสาร sulfentrazone อัตรา 76.8 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ควบคุมวัชพืชโดยรวมได้ระดับเดียวกัน และไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชปลูกภายใต้วิธีการปลูกต่างกัน ยกเว้นการใช้สาร diclosulam อัตรา 8.4 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีระดับการควบคุมวัชพืชโดยรวมต่ำสุดเมื่อเทียบกับการใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม การใช้สาร diuron / hexazinone และสาร indaziflam ควบคุมวัชพืชได้หลายชนิดมากที่สุด การใช้สาร indaziflam ควบคุมวัชพืชได้หลายชนิดโดยใช้สารอัตราที่ต่ำกว่าการใช้สาร diuron / hexazinone ดังนั้น สาร indaziflam จึงสามารถใช้เป็นสารทางเลือกชนิดใหม่ในแปลงปลูกอ้อยได้

คำสำคัญ: สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอก *Saccharum* spp. อ้อย การควบคุมวัชพืช

คำนำ

วัชพืชจัดเป็นปัญหาสำคัญในการปลูกอ้อย (*Saccharum* spp.) หากมีวัชพืชขึ้นแข่งขันภายในแปลงปลูกอ้อยอย่างรุนแรง สามารถส่งผลให้ผลผลิตอ้อยลดลง มีรายงานว่า การขึ้นแข่งขันของวัชพืชในแปลงปลูกอ้อยที่ประเทศเอธิโอเปียส่งผลทำให้ผลผลิตอ้อยลดลงสูงสุดถึง 70-80 เปอร์เซ็นต์ (Yirefu *et al*., 2013) และที่ประเทศฟิลิปปินส์ผลผลิตอ้อยจะลดลงในช่วง 25-93 เปอร์เซ็นต์ (Obien and Baltazar, 1979) อย่างไรก็ตาม การสูญเสียผลผลิตอ้อยที่เป็นสาเหตุอันเนื่องมาจากการแข่งขันของวัชพืชนั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแข่งขันของอ้อยแต่ละพันธุ์ ระยะเวลาที่มีการแข่งขันกับวัชพืช ชนิดวัชพืช และสภาพแวดล้อมบริเวณพื้นที่ปลูก (Ramburan and Nxumalo, 2017) ดังนั้น หากมีการปลูกและการป้องกันกำจัดวัชพืชที่เหมาะสมจะสามารถช่วยลดปัญหาของวัชพืชในแปลงปลูกอ้อยได้

ในประเทศไทยสามารถปลูกอ้อยได้ในช่วงต้นฝนและปลายฝน โดยเกษตรกรส่วนมากปลูกอ้อยต้นฝนในช่วงเดือนมีนาคม ถึง พฤษภาคม ซึ่งการปลูกอ้อยในช่วงนี้พบปัญหาจากการแข่งขันของวัชพืชอย่างมาก เนื่องจากวัชพืชมีการขึ้นแข่งขันในช่วงการงอกของอ้อย ส่วนอ้อยที่ปลูกในช่วงปลายฝน ตั้งแต่เดือนตุลาคม ถึง ธันวาคม (การปลูกอ้อยข้ามแล้ง) และเดือนมกราคมถึงมีนาคม (การปลูกอ้อยน้ำราด) มักมีปัญหาจากการแข่งขันของวัชพืชน้อยกว่าการปลูกอ้อยต้นฝน (Cane and Sugar Promotion Center Region 2, 2017) ระยะปลูกอ้อยมักพิจารณาจากการเลือกใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรในการเข้าปฏิบัติงานระหว่างแถวปลูกอ้อย และลักษณะประจำพันธุ์ของอ้อยเป็นหลัก ซึ่งการใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรในการปลูก ดูแลรักษา และการเก็บเกี่ยวอ้อย ควรใช้ระยะปลูกระหว่างแถว 1.5 เมตร เนื่องจากเครื่องจักรกลทางการเกษตรสามารถเข้าปฏิบัติงานได้สะดวก และถ้าใช้พันธุ์อ้อยที่มีการแตกกอน้อย ควรปลูกแบบแถวคู่ โดยใช้ระยะระหว่างแถว 1.5-1.6 เมตร และมีระยะระหว่างท่อนพันธุ์อ้อยแต่ละคู่ 25-30 เซนติเมตร ซึ่งทำให้รถตัดอ้อยสามารถเข้าไปทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สำนักบริหารอ้อยและน้ำตาลทราย, 2561) อย่างไรก็ตาม การแข่งขันของวัชพืชขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของพืชปลูกในพื้นที่ด้วย อาทิเช่น การเพิ่มความหนานแน่นของ *Cannabis sativa* (พืชปลูก) ต่อพื้นที่ โดยการเพิ่มจำนวนเมล็ดพันธุ์จาก 20 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ เป็น 60 หรือ 80 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ ส่งผลทำให้ปริมาณวัชพืชในแปลงปลูกลดลงเฉลี่ย 33 เปอร์เซ็นต์ (Vera *et al*., 2006) ดังนั้น ความหนาแน่นของต้นอ้อยต่อพื้นที่จึงอาจมีผลต่อการแข่งขันของวัชพืชในสภาพแปลงปลูกได้

เกษตรกรส่วนใหญ่มีการป้องกันกำจัดวัชพืชในช่วงแรกของการปลูกอ้อยโดยการใช้สารกำจัดวัชพืช เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดวัชพืชสูง ปฏิบัติได้สะดวกและรวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการกำจัดวัชพืชด้วยวิธีการอื่น ซึ่งสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอก (preemergence herbicide) ที่มีการแนะนำให้ใช้สำหรับการปลูกอ้อย ได้แก่ สาร Atrazine, สาร Ametryn, สาร Metribuzin สาร Pendimethalin และสาร Sulfentrazone เป็นต้น สารดังกล่าวเป็นสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกที่มีการแนะนำให้ใช้ในพื้นที่ปลูกอ้อยมาอย่างยาวนาน อย่างไรก็ตาม การใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดเดิมด้วยปริมาณการใช้สารเคมีที่มากเป็นระยะเวลานาน อาจส่งผลให้เกิดปัญหาวัชพืชต้านทานสาร (Heap, 2018) ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาการใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดใหม่เพิ่มเติม เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกอ้อย

ดังนั้น การป้องกันกำจัดวัชพืชในช่วงแรกของการปลูกอ้อยมีความสำคัญอย่างมากต่อการงอกและการเจริญเติบโตของอ้อย และเกษตรกรโดยส่วนใหญ่นิยมใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกสำหรับควบคุมวัชพืชในช่วงการงอกและการเจริญเติบโตของอ้อยช่วงแรกมากที่สุด การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกในแปลงปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและคู่สำหรับการปลูกอ้อยช่วงปลายฝน

อุปกรณ์และวิธีการ

ศึกษาการใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกสำหรับการควบคุมวัชพืชในการปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและแถวคู่ภายใต้สภาพแปลงปลูกในช่วงเดือนมกราคม ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2561 ณ ศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เตรียมแปลงปลูกอ้อยโดยใช้รถแทรกเตอร์ไถดินจำนวน 1 ครั้ง แล้วตากดินทิ้งไว้ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงไถพรวนอีก 1 ครั้ง ตามลำดับ แบ่งพื้นที่เป็นแปลงย่อย ขนาด 4.8×5.0 ตารางเมตร แต่ละแปลงย่อยทำร่องเตรียมปลูกลึก 10 เซนติเมตร มีระยะระหว่างร่อง 1.6 เมตร ปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยว (single row) โดยการวางท่อนพันธุ์อ้อย (พันธุ์ 9851) ที่มี 2-3 ตาต่อท่อนพันธุ์ ในร่องตามแนวนอน 1 แถว ส่วนการปลูกแบบแถวคู่ (double row) ทำโดยการวางท่อนพันธุ์อ้อยในลักษณะตามแนวนอน 2 แถวคู่กัน ซึ่งท่อนพันธุ์มีระยะห่างกัน 30 เซนติเมตร แล้วจึงกลบดินบนท่อนพันธุ์อ้อย ให้น้ำหลังปลูกด้วยระบบให้น้ำแบบฉีดฝอย (sprinkler irrigation) จนชุ่มทั้งแปลงจากนั้นให้น้ำ 3 สัปดาห์ต่อครั้ง

วางแผนการทดลองแบบ 2×7 factorial in randomized complete block design (RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ 14 กรรมวิธี ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ วิธีการปลูก (แถวเดี่ยว และแถวคู่) และปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการป้องกันกำจัดวัชพืช (Table 1) ปลูกอ้อยดังวิธีการที่กล่าวไว้ข้างต้น และหลังจากให้น้ำหลังปลูก 2 วัน จึงพ่นสารกำจัดวัชพืชดัง Table 1 ตามแต่ละกรรมวิธี โดยใช้ถังพ่นสารแบบสะพายหลัง ที่มีหัวฉีดรูปพัดริมเสมอ (flat fan) กำหนดปริมาณน้ำยาต่อพื้นที่ (spray volume) เท่ากับ 80 ลิตรต่อไร่

บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยและประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชของแต่ละกรรมวิธีดังต่อไปนี้

1) การเจริญเติบโตของอ้อย โดยสุ่มเก็บข้อมูลที่ 12 สัปดาห์หลังการพ่นสาร ประกอบด้วยการบันทึกความสูงเฉลี่ยต่อลำ โดยวัดจากผิวดินถึงจุดคอใบ จำนวน 10 ลำต่อแปลงย่อย มีหน่วยเป็นเซนติเมตรต่อลำ, จำนวนข้อปล้องเฉลี่ยต่อลำ โดยนับจำนวนข้อปล้อง จำนวน 10 ลำต่อแปลงย่อย มีหน่วยเป็นข้อต่อลำ, การแตกกอเฉลี่ยต่อท่อนพันธุ์ โดยนับจำนวนกอ จำนวน 4 ท่อนพันธุ์ต่อแปลงย่อย มีหน่วยเป็นกอต่อท่อนพันธุ์ และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่อลำ โดยนำลำอ้อย จำนวน 10 ลำต่อแปลงย่อย ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงชั่งน้ำหนักแห้ง มีหน่วยเป็นกรัมต่อลำ

2) ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืช (weed control) ประเมินจากการควบคุมวัชพืชโดยรวม (total weed; TW) และการควบคุมวัชพืชแต่ละชนิด ได้แก่ วัชพืชใบกว้าง (broadleaf weed; BL) วัชพืชใบแคบ (narrowleaf weed; NL) และกก (sedge; SG) โดยการประเมินด้วยสายตา (visual rating) ตามวิธีของ Vanhala

Table 1. List of the herbicide applied and weed control treatments

No.	Treatment	Recommended rate (g a.i.[4]/rai)
1	Hand weeding (at 4 and 8 WAP[1])	-
2	Weedy check	-
3	Diclosulam 84 % WG	8.4
4	Diuron 46.8% / Hexazinone 13.2% WG[2]	210.6 + 59.4
5	Indaziflam 50% W/V SC	8
6	Imazapic 24% W/V SL + Pendimethalin 33% W/V EC[3]	12 + 148.5
7	Sulfentrazone 48% W/V SC	76.8

[1]WAP = weeks after planting; [2]Pre mix herbicide; [3]Tank mix herbicide; [4]a.i. = active ingredient

et al. (2004) มีระดับ 0-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปรียบเทียบกับการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคน (hand weeding) เก็บบันทึกข้อมูลที่ 2, 4 และ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

3) ระดับอาการได้รับพิษของพืชปลูก (crop phytotoxicity) โดยการประเมินด้วยสายตาตามวิธีของ Vanhala *et al*. (2004) มีระดับ 0-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปรียบเทียบกับการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคน เก็บบันทึกข้อมูลที่ 2, 4 และ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

4) ความหนาแน่นของวัชพืชต่อพื้นที่ โดยใช้กรอบสี่เหลี่ยม (quadrat) ขนาดกว้าง 0.5 เมตร และยาว 0.5 เมตร สุ่มนับจำนวนต้นของวัชพืชโดยรวมและวัชพืชแต่ละชนิด (ใบกว้าง ใบแคบ และกก) จำนวน 2 จุดต่อแปลงย่อย ที่ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร มีหน่วยเป็นต้นต่อ 0.25 ตารางเมตร

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Fisher's protected least significant difference (LSD) test โดยใช้โปรแกรม R เวอร์ชั่น 2.9.1 (R Development Core Team, 2009)

ผลการทดลอง

การเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลง

การศึกษาผลของการใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกที่มีต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลองที่ 12 สัปดาห์หลังการพ่นสาร พบว่า การใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกในสภาพแปลงที่มีรูปแบบการปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและแถวคู่ ส่งผลทำให้อ้อยมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อพิจารณาวิธีการป้องกันกำจัดวัชพืช พบว่า การพ่นสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกแต่ละชนิดส่งผลทำให้ความสูง จำนวนข้อปล้อง และการแตกกอของอ้อยไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคน และการไม่กำจัดวัชพืชแล้วปล่อยให้วัชพืชขึ้นรบกวน (weedy check) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 10.3-16.2 เซนติเมตรต่อลำ, 2.1-3.0 ข้อต่อลำ และ 0.8-1.1 กอต่อท่อนพันธุ์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การไม่กำจัดวัชพืชแล้วปล่อยให้วัชพืชขึ้นรบกวนตลอดฤดูปลูกนั้น ส่งผลทำให้น้ำหนักแห้งของอ้อยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบกับกรรมวิธีอื่น โดยอ้อยจะมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 5.3 กรัมต่อลำ ขณะที่การกำจัดวัชพืชด้วยวิธีการอื่นทำให้อ้อยมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยอยู่ในช่วง 11.6-14.8 กรัมต่อลำ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 2)

ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชและอาการได้รับพิษของอ้อย

การประเมินประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชด้วยสายตาที่ 2 สัปดาห์หลังการพ่นสาร พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างวิธีการปลูกกับวิธีการป้องกันกำจัดวัชพืชอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม แปลงปลูกอ้อยแบบแถวคู่มีการควบคุมวัชพืชโดยรวมดีกว่าการปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญทาง

Table 2. Effect of different weed control treatments on the growth of sugarcane at 12 weeks after application

Treatment	Growth of sugarcane			
	Plant height (cm/stem)	Node (No./stem)	Tillering (No./sett)	Dry weight (g/stem)
Method (*M*)				
Single row	12.1[2]	2.3	0.9	11.3
Double row	15.6	2.9	1.0	12.3
LSD	-	-	-	-
Herbicide (*H*)				
Hand weeding	14.7	3.0	1.1	13.4 a
Weedy check	10.3	2.1	0.9	5.3 b
DL[1]	12.3	2.6	0.8	12.0 a
DR / HN	16.1	2.9	1.1	14.8 a
IF	13.7	2.5	0.8	11.6 a
IP + PL	15.5	2.5	0.9	12.3 a
SZ	16.2	2.8	0.9	13.5 a
LSD	-	-	-	5.14
Significance				
M	ns[3]	ns	ns	ns
H	ns	ns	ns	*
M x H	ns	ns	ns	ns

[1]DL = diclosulam, DR / HN = diuron / hexazinone, IF = indaziflam, IP + PL = imazapic + pendimethalin, SZ = sulfentrazone; [2]Data are means with the same letter are not significantly different; [3]ns = not significant, *$P < 0.05$

สถิติ โดยสามารถควบคุมวัชพืชโดยรวมได้ เท่ากับ 69.4 และ 64.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาวิธีการป้องกันกำจัดวัชพืช พบว่า การใช้สาร indaziflam (IF) สามารถควบคุมวัชพืชโดยรวมได้มากที่สุด เท่ากับ 81.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้สาร imazapic + pendimethalin (IP + PL), สาร sulfentrazone (SZ) และสาร diuron / hexazinone (DR / HN) เท่ากับ 78.8, 78.8 และ 71.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการใช้สาร diclosulam (DL) สามารถควบคุมวัชพืชโดยรวมได้น้อยที่สุด เท่ากับ 56.3 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาถึงประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชใบกว้าง พบว่า การใช้สาร indaziflam และสาร sulfentrazone สามารถควบคุมวัชพืชใบกว้างได้มากถึง 95.0 และ 93.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคน และการใช้สาร imazapic + pendimethalin, สาร sulfentrazone และสาร indaziflam สามารถควบคุมวัชพืชใบแคบได้มากถึง 96.5, 92.3 และ 91.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการใช้สาร diclosulam และสาร indaziflam สามารถควบคุมกกได้มากถึง 96.1 และ 95.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคนเช่นกัน (ไม่แสดงข้อมูล)

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชที่ 4 สัปดาห์หลังการพ่นสาร พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างวิธีการปลูกกับวิธีการป้องกันกำจัดวัชพืชอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและคู่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน เมื่อพิจารณาวิธีการป้องกันกำจัดวัชพืช พบว่า การใช้สาร imazapic + pendimethalin, สาร diuron / hexazinone,

สาร indaziflam และสาร sulfentrazone สามารถควบคุมวัชพืชโดยรวมได้ เท่ากับ 63.8, 60.0, 58.8 และ 58.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนการใช้สาร diclosulam มีการควบคุมวัชพืชโดยรวมได้น้อยที่สุด เท่ากับ 33.8 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) โดยการใช้สาร diuron / hexazinone สามารถควบคุมวัชพืชใบกว้างมากที่สุด เท่ากับ 84.6 เปอร์เซ็นต์ และการใช้สาร imazapic + pendimethalin, สาร sulfentrazone, สาร indaziflam และสาร diuron / hexazinone สามารถควบคุมวัชพืชใบแคบได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งเท่ากับ 89.1, 86.4, 81.6 และ 79.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการใช้สาร indaziflam, สาร imazapic + pendimethalin และสาร diclosulam สามารถควบคุมกกได้มากถึง 97.8, 97.6 และ 97.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ไม่แสดงข้อมูล)

และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชที่ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างวิธีการปลูกกับวิธีการป้องกันกำจัดวัชพืชอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและคู่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน เมื่อพิจารณาวิธีการป้องกันกำจัดวัชพืช พบว่า การใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพลดลง โดยการใช้สาร diuron / hexazinone, สาร indaziflam, สาร imazapic + pendimethalin และสาร sulfentrazone สามารถควบคุมวัชพืชโดยรวมได้เท่ากับ 46.3, 33.8, 33.8 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนการใช้สาร diclosulam มีการควบคุมวัชพืชโดยรวมได้น้อยที่สุด เท่ากับ 18.8 เปอร์เซ็นต์ (Table 3)

นอกจากนี้ การประเมินระดับอาการได้รับพิษของอ้อยที่ 2, 4 และ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร พบว่า อ้อยที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตปกติ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติเมื่อ

Table 3. Visual rating of total weed control at 2, 4 and 8 weeks after application (WAA)

Treatment	Total weed control (%)		
	2 WAA	4 WAA	8 WAA
Method (*M*)			
Single row	64.6 b[2]	52.5	36.3
Double row	69.4 a	54.4	35.9
LSD	4.46	-	-
Herbicide (*H*)			
Hand weeding	100.0 a	100.0 a	83.8 a
Weedy check	5.0 d	0.0 d	6.3 d
DL[1]	56.3 c	33.8 c	18.8 cd
DR / HN	71.3 b	60.0 b	46.3 b
IF	81.3 b	58.8 b	33.8 bc
IP + PL	78.8 b	63.8 b	33.8 bc
SZ	78.8 b	58.8 b	30.0 bcd
LSD	11.03	12.78	23.83
Significance			
M	*	ns	ns
H	**	**	**
M x H	ns[3]	ns	ns

[1]DL = diclosulam, DR / HN = diuron / hexazinone, IF = indaziflam, IP + PL = imazapic + pendimethalin, SZ = sulfentrazone; [2]Data are means with the same letter are not significantly different; [3]ns = not significant, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

เปรียบเทียบกับอ้อยที่มีการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคน และการไม่กำจัดวัชพืชแล้วปล่อยให้วัชพืชขึ้นรบกวน (Table 4)

จากการพิจารณาความหนาแน่นของวัชพืชที่ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างวิธีการปลูกกับวิธีการป้องกันกำจัดวัชพืช และจำนวนวัชพืชต่อพื้นที่ในแปลงปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและคู่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนวัชพืชโดยรวมอยู่ในช่วง 68.4-72.2 ต้นต่อ 0.25 ตารางเมตร และเมื่อพิจารณาวิธีการป้องกันกำจัดวัชพืชที่มีผลต่อความหนาแน่นของวัชพืช พบว่า การใช้สาร indaziflam, สาร diuron / hexazinone, สาร imazapic + pendimethalin และสาร sulfentrazone มีจำนวนวัชพืชโดยรวมน้อยที่สุด เท่ากับ 41.5, 46.5, 65.0 และ 69.4 ต้นต่อ 0.25 ตารางเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนวัชพืชโดยรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคน ในขณะที่การใช้สาร diclosulam มีจำนวนวัชพืชโดยรวมมากที่สุด เท่ากับ 111.5 ต้นต่อ 0.25 ตารางเมตร ซึ่งมีจำนวนวัชพืชโดยรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่กำจัดวัชพืชแล้วปล่อยให้วัชพืชขึ้นรบกวนตลอดฤดูปลูก อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาถึงจำนวนวัชพืชใบกว้างต่อพื้นที่ จะพบว่า การใช้สาร diuron / hexazinone, สาร diclosulam, และสาร indaziflam จะมีจำนวนวัชพืชใบกว้างน้อยที่สุด เท่ากับ 9.9, 13.8 และ 18.0 ต้นต่อ 0.25 ตารางเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนวัชพืชไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคน และการใช้สาร indaziflam, สาร imazapic + pendimethalin, สาร diuron / hexazinone และสาร sulfentrazone จะมีจำนวนวัชพืชใบแคบน้อยที่สุด เท่ากับ 15.9, 16.5, 22.5 และ 37.9 ต้นต่อ 0.25 ตารางเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคนเช่นกัน ส่วนจำนวนกกต่อพื้นที่จะมีจำนวนต้นที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติทุกกรรมวิธี (Table 5)

Table 4. The toxicity on sugarcane after applied the herbicides at 2, 4 and 8 weeks after application (WAA)

Treatment	Phytotoxicity (%)		
	2 WAA	4 WAA	8 WAA
Method (*M*)			
Single row	0.0[2]	0.0	1.7
Double row	0.0	0.3	1.3
LSD	-	-	-
Herbicide (*H*)			
Hand weeding	0.0	0.0	0.0
Weedy check	0.0	0.0	0.0
DL[1]	0.0	0.0	5.0
DR / HN	0.0	0.0	1.3
IF	0.0	0.0	1.3
IP + PL	0.0	0.0	1.3
SZ	0.0	1.3	1.3
LSD	-	-	-
Significance			
Method (*M*)	ns[3]	ns	ns
Herbicide (*H*)	ns	ns	ns
M x H	ns	ns	ns

[1]DL = diclosulam, DR / HN = diuron / hexazinone, IF = indaziflam, IP + PL = imazapic + pendimethalin, SZ = sulfentrazone; [2]Data are means with the same letter are not significantly different; [3]ns = not significant at $P = 0.01$

Table 5. Mean of the weed density as affected by different weed control treatments at 8 weeks after application

Treatment	Number of weeds (plant/0.25 m^2)			
	TW[2]	BL	NL	SG
Method (*M*)				
Single row	68.4	22.8	37.0	8.6
Double row	72.2	17.9	48.7	5.6
LSD	-	-	-	-
Herbicide (*H*)				
Hand weeding	39.5 b[3]	4.5 b	25.9 b	9.1
Weedy check	120.6 a	26.3 ab	92.8 a	1.6
DL[1]	111.5 a	13.8 b	94.1 a	3.6
DR / HN	46.5 b	9.9 b	22.5 b	14.1
IF	41.5 b	18.0 b	15.9 b	7.6
IP + PL	65.0 b	43.7 a	16.5 b	4.8
SZ	69.4 b	24.1 ab	37.9 b	7.3
LSD	41.47	25.23	35.63	-
Significance				
M	ns[4]	ns	ns	ns
H	**	**	**	ns
M x H	ns	ns	ns	ns

[1]DL = diclosulam, DR / HN = diuron / hexazinone, IF = indaziflam, IP + PL = imazapic + pendimethalin, SZ = sulfentrazone; [2]TW = Total weed, BL = Broadleaf weed, NL = Narrowleaf weed, SG = Sedge; [3]Data are means with the same letter are not significantly different; [4]ns = not significant, $^{**}P < 0.01$

วิจารณ์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกแต่ละชนิดไม่ทำให้การเจริญเติบโตของอ้อยลดลง และไม่พบอาการเป็นพิษของอ้อยอย่างรุนแรงหลังมีการพ่นสาร อาจเป็นเพราะว่า มีการใช้อัตราของสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกในปริมาณที่เหมาะสม จึงไม่ส่งผลทำให้อ้อยเกิดอาการเป็นพิษและไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของอ้อยระหว่างการปลูกอ้อยที่มีการใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกกับการปลูกอ้อยที่มีการกำจัดวัชพืชด้วยแรงงานคน นอกจากนี้ การเคลื่อนย้ายของสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกด้วยน้ำภายในดินอาจจะได้รับอิทธิพลมาจากคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของดินบางประการ ได้แก่ เนื้อดิน และอินทรียวัตถุ เป็นต้น (González-Delgado *et al*., 2017; Sebastian *et al*., 2017) โดยเนื้อดินของแปลงทดลองเป็นลักษณะดินร่วนปนทราย (sandy loam) และมีปริมาณอินทรียวัตถุระดับปานกลาง (0.92 เปอร์เซ็นต์) จึงส่งผลทำให้สารกำจัดวัชพืชมีการเคลื่อนย้ายหรือเกิดการสูญเสียด้วยการชะล้างได้ง่ายกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับดินเหนียวหรือดินที่มีปริมาณอินทรียวัตถุระดับสูง ดังนั้นอ้อยจึงไม่แสดงอาการเป็นพิษหลังจากพ่นสาร

ผลของการใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกในแปลงปลูกอ้อยที่มีวิธีการปลูกแตกต่างกัน พบว่า การใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกในแปลงปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและคู่ที่ 4 และ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร มีการควบคุมวัชพืชได้ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นการควบคุมวัชพืชที่

2 สัปดาห์หลังการพ่นสารในแปลงปลูกอ้อยแบบแถวคู่จะมีการควบคุมวัชพืชมากกว่าการปลูกแบบแถวเดี่ยวเพียงเล็กน้อย เนื่องจากมีการบันทึกข้อมูลประสิทธิภาพการใช้สารกำจัดวัชพืชครั้งสุดท้ายที่ 8 สัปดาห์หลังพ่นสาร ซึ่งอ้อยมีการเจริญเติบโตทางลำต้นไม่เพียงพอที่จะปกคลุมพื้นที่ได้ โดยในช่วงดังกล่าวอ้อยมีความสูงเพียง 14.7 เซนติเมตรต่อลำ และมีการแตกกอ 1.1 กอต่อท่อนพันธุ์ จึงมีการแข่งขันกับวัชพืชได้ไม่ชัดเจน และอาจมีปริมาณความหนาแน่นของวัชพืชในพื้นที่แตกต่างกัน จึงทำให้การควบคุมวัชพืชที่ 2 สัปดาห์หลังการพ่นสารในแปลงปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและแถวคู่มีความแตกต่างกันเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม การใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกในสภาพแปลงปลูกพืชทั่วไป มักมีช่วงระยะเวลาการควบคุมวัชพืชได้ดีที่สุดอยู่ในช่วง 4-8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร ขึ้นอยู่กับชนิดของสารกำจัดวัชพืช สภาพพื้นที่ และการปฏิบัติภายในแปลงเพาะปลูกพืชด้วย ซึ่งไม่ครอบคลุมระยะวิกฤติสำหรับการป้องกันกำจัดวัชพืชของอ้อยที่อยู่ในช่วงระยะเวลา 3-12 สัปดาห์หลังปลูก (Yirefu *et al*., 2012; Zafar *et al*., 2010) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการปลูกอ้อยด้วย โดยอาจมีการพ่นสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกซ้ำอีกครั้ง เพื่อเป็นการควบคุมวัชพืชในพื้นที่ได้ยาวนานมากขึ้น เป็นต้น ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาชนิด อัตราการใช้ และวิธีการใช้สารกำจัดวัชพืชเพิ่มเติม เพื่อให้มีการป้องกันกำจัดวัชพืชได้ครอบคลุมช่วงระยะวิกฤติสำหรับการป้องกันกำจัดวัชพืชในการปลูกอ้อย

การประเมินประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชด้วยสายตาที่ 2, 4 และ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร แสดงให้เห็นว่า การควบคุมวัชพืชโดยรวมมีแนวโน้มลดลง โดยการใช้สาร indaziflam, สาร imazapic + pendimethalin, สาร sulfentrazone และสาร diuron / hexazinone มีการควบคุมวัชพืชโดยรวมได้ดีที่สุด ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 70-80 เปอร์เซ็นต์ ที่ 2 สัปดาห์หลังการพ่นสาร หลังจากนั้น การใช้สาร imazapic + pendimethalin, สาร diuron / hexazinone, สาร indaziflam และสาร sulfentrazone ยังคงควบคุมวัชพืชโดยรวมได้ดี ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 60-64 เปอร์เซ็นต์ ที่ 4 สัปดาห์หลังการพ่นสาร อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชโดยรวมที่ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร การใช้สาร diuron / hexazinone, สาร indaziflam, สาร imazapic + pendimethalin และสาร sulfentrazone ตามลำดับ มีการควบคุมวัชพืชโดยรวมเหลือเพียง 30-45 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ในขณะที่การใช้สาร diclosulam มีการควบคุมวัชพืชโดยรวมได้น้อยที่สุดทุกระยะเวลา อาจเป็นเพราะ เกิดการสูญเสียสารกำจัดวัชพืชโดยการถูกน้ำชะล้างหลังมีการให้น้ำอ้อยทุก 3 สัปดาห์ จึงส่งผลทำให้สารกำจัดวัชพืชมีการเคลื่อนที่จากผิวดินลงสู่ดินชั้นล่างมากขึ้น สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกบางชนิดสามารถเคลื่อนที่ลงสู่ดินชั้นล่างได้ด้วยน้ำอย่างง่ายดาย อาทิเช่น สาร alachlor สามารถถูกชะล้างด้วยน้ำในดินได้ง่ายกว่าสาร bromacil และสาร diuron เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำของตัวสารและคุณสมบัติของดินบางประการ ส่งผลทำให้สาร alachlor ในดินถูกชะล้างอย่างง่ายดาย (El-Nahhal and Hamdona, 2017) ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาความสามารถในการเคลื่อนย้ายในดินของสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกแต่ละชนิดที่ทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เพิ่มเติม

สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกแต่ละชนิดมีความสามารถในการควบคุมวัชพืชได้แตกต่างชนิดกัน โดยการใช้สาร diuron / hexazinone, สาร imazapic + pendimethalin, สาร indaziflam และสาร sulfentrazone มีประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชโดยรวมไม่แตกต่างกันที่ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสาร ซึ่งการใช้สาร diclosulam, สาร diuron / hexazinone และสาร indaziflam สามารถควบคุมวัชพืชใบกว้างได้ดีที่สุด และการใช้สาร diuron / hexazinone, สาร imazapic + pendimethalin, สาร indaziflam และสาร sulfentrazone ควบคุมวัชพืชใบแคบได้ดีที่สุด ส่วนการควบคุมกกไม่มีความแตกต่างกันทุกกรรมวิธี จากผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ว่า การใช้สาร diuron / hexazinone ที่อัตรา 210.6 + 59.4 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ และสาร indaziflam ที่อัตรา 8 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ สามารถควบคุมวัชพืชใบกว้าง วัชพืชใบแคบ และกก ได้ครอบคลุมหลายชนิดมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารชนิดอื่น ซึ่งมีระดับการควบคุมวัชพืชไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การใช้สาร indaziflam จะมีอัตราการใช้ที่ต่ำกว่าการใช้สาร diuron / hexazinone ดังนั้น การใช้สาร indaziflam จึงเป็นสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกทางเลือก

ชนิดใหม่สำหรับการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกอ้อยที่มีประสิทธิภาพควบคุมวัชพืชได้ดีและลดปริมาณการใช้สารเคมีลงได้

สรุป

ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชของสารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอก (ได้แก่ สาร diclosulam, สาร diuron / hexazinone, สาร imazapic + pendimethalin, สาร indaziflam และสาร sulfentrazone) ที่อัตราแนะนำ ในการปลูกอ้อยแบบแถวเดี่ยวและแถวคู่ ไม่มีความแตกต่างกันที่ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสารกำจัดวัชพืช และการใช้สารกำจัดวัชพืชแบบก่อนงอกที่อัตราแนะนำไม่ส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของอ้อยลดลงที่ 12 สัปดาห์หลังการพ่นสารกำจัดวัชพืช นอกจากนี้ การใช้สาร diuron / hexazinone, สาร imazapic + pendimethalin, สาร indaziflam และสาร sulfentrazone มีประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชโดยรวมไม่แตกต่างกันที่ 8 สัปดาห์หลังการพ่นสารกำจัดวัชพืช อย่างไรก็ตาม การใช้สาร indaziflam จะมีอัตราการใช้ที่ต่ำกว่าการใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น ดังนั้น การใช้สาร indaziflam จึงสามารถใช้เป็นสารทางเลือกชนิดใหม่สำหรับการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกอ้อยเพื่อลดปัญหาของวัชพืชได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทีมงานวิจัยทางด้านวิทยาการวัชพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคุณองอาจ ศรีสงคราม บริษัท บาก้า จำกัด ที่สนับสนุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Cane and Sugar Promotion Center Region 2. 2017. Details of the data collection process in field. (Online). Available: http://kampangpetch.csrcenter.org/?page_id=249 (December 25, 2017). (in Thai)

El-Nahhal, Y. and N. Hamdona. 2017. Adsorption, leaching and phytotoxicity of some herbicides as single and mixtures to some crops. Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences 22(1): 17-25.

González-Delgado, A.M., M.K. Shukla, J. Ashigh and R. Perkins. 2017. Effect of application rate and irrigation on the movement and dissipation of indaziflam. Journal of Environmental Sciences 51: 111-119.

Heap, I. 2018. The international survey of herbicide resistant weeds. (Online). Available: http://www.weedscience.org (June 10, 2018).

Obien, S.R. and A.M. Baltazar. 1979. Weed control in sugarcane in the Philippines. pp. 45-55. *In*: Proceedings of the 9th Pest Control Council of the Philippines Conference, Manila.

Office of Agricultural Research and Development Region 5. 2018. Knowledge management; the technology of sugarcane production in the central and western regions. (Online). Available: http://www.sugarzone.in.th/cane/cane_know.pdf (October 30, 2018). (in Thai)

R Development Core Team. 2009. R: a language and environment for statistical computing, (Online). Available: https://cran-archive.r-project.org/bin/windows/base/old/2.9.1/ (February 10, 2015).

Ramburan, S. and N. Nxumalo. 2017. Regional, seasonal, cultivar and crop-year effects on sugarcane responses to residue mulching. Field Crops Research 210: 136-146.

Sebastian, D.J., S.J. Nissen, P. Westra, D.L. Shaner and G. Butters. 2017. Influence of soil properties and soil moisture on the efficacy of indaziflam and flumioxazin on *Kochia scoparia* L. Pest Management Science 73(2): 444-451.

Vanhala, P., D. Kurstjens, J. Ascard, A. Bertram, D.C. Cloutier, A. Mead, M. Raffaelli and J. Rasmussen. 2004. Guidelines for physical weed control research: flame weeding, weed harrowing and intra-row cultivation. pp. 208-239. *In*: Proceedings of the 6th EWRS Workshop on Physical and Cultural Weed Control, Lillehammer.

Vera, C.L., S.M. Woods and J.P. Raney. 2006. Seeding rate and row spacing effect on weed competition, yield and quality of hemp in the Parkland region of Saskatchewan. Canadian Journal of Plant Science 86(3): 911-915.

Yirefu, F., T. Tana, A. Tafesse and Y. Zekarias. 2012. Competitive ability of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars to weed interference in sugarcane plantations of Ethiopia. Crop Protection 32: 138-143.

Yirefu, F., T. Tana, A. Tafesse and Y. Zekarias. 2013. Weed interference in the sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantations of Ethiopia. Agriculture, Forestry and Fisheries 2(6): 239-247.

Zafar, M., A. Tanveer, Z.A. Cheema and M. Ashraf. 2010. Weed-crop competition effects on growth and yield of sugarcane planted using two methods. Pakistan Journal of Botany 42(2): 815-823.

การสะสมธาตุสังกะสีในข้าวไร่และข้าวนาสวนภายใต้การปลูกแบบไม่ขังน้ำและน้ำขัง

Zinc Accumulation in Upland and Wetland Rice Grown Under Non-flooded and Flooded Conditions

รรินธร รินสินจ้อย[1] สิทธิชัย ลอดแก้ว[2] และ ชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย[1*]

Rarinthorn Rinsinjoy[1], Sittichai Lordkaew[2] and Chanakan Thebault Prom-u-thai[1*]

[1]ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1]Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]ศูนย์วิจัยระบบทรัพยากรเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

[2]Center for Agricultural Resource System Research, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: chanakan15@hotmail.com*

(Received: 6 December 2018; Accepted: 27 March 2019)

Abstract: The objective of this study was to compare the responses of upland and wetland rice varieties namely KH CMU and CNT1, respectively grown under different water conditions to grain yield and Zn accumulation. The experiment was arranged in factorial in CRD with three replications. Yield, yield component and grain Zn concentration were evaluated in comparison between the rice ecotypes and water condition. The result showed that in CNT1, the wetland rice variety, was found to decreased yield by 30.8% in the aerobic condition compared with flooded condition. While, KH CMU, the upland rice variety had no significant difference between both water conditions affected on yield. The concentration of Zn in brown rice also responded differently between the two varieties grown under different water conditions. KH CMU grown under the aerobic condition had 20.7% Zn concentration in brown rice higher than under flooded condition, while it was not found the difference between both water conditions in CNT1. The result showed no significant correlation between Zn concentration in brown rice and grain yield in 2 rice varieties. This experiment indicated that upland rice and wetland rice varieties responded differently to water condition for both production and grain Zn accumulation in brown rice. The appropriate water management for each rice variety would be able to improve both yield and nutritional value in rice grain and consequently for rice consumers.

Keywords: Zinc, flooded, aerobic, upland rice, wetland rice

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของผลผลิตและการสะสมสังกะสีในพันธุ์ก่ำหอม มช. (ข้าวไร่) และ ชัยนาท 1 (ข้าวนาสวน) ที่ปลูกในสภาพขังน้ำและแอโรบิก วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลผลิต องค์ประกอบผลผลิตและความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องเพื่อเปรียบการสะสมสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้อง ผลการทดลองพบว่าพันธุ์ชัยนาท 1 เมื่อปลูกในสภาพแอโรบิกให้ผลผลิตเมล็ดลดลงร้อยละ 30.8 เปรียบเทียบกับการปลูกในสภาพน้ำขัง ขณะที่การจัดการน้ำไม่ส่งผลต่อความแตกต่างของผลผลิตในพันธุ์ก่ำหอม มช. สำหรับความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดพบว่าพันธุ์ก่ำหอม มช. เมื่อปลูกในสภาพแอโรบิกมีความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องมากกว่าการปลูกในสภาพน้ำขังร้อยละ 20.7 ขณะที่พันธุ์ชัยนาท 1 ไม่พบความแตกต่างของความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้อง และพบว่าความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องและผลผลิตไม่มีความสัมพันธ์กันในข้าวทั้งสองพันธุ์ การทดลองนี้บ่งชี้ว่าพันธุ์ข้าวนาสวนและข้าวไร่มีการตอบสนองต่อการจัดการน้ำในการปลูกแตกต่างกันในการสะสมธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าว การจัดการสภาพการปลูกที่เหมาะสมในข้าวแต่ละพันธุ์น่าจะเป็นแนวทางในการเพิ่มปริมาณธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการสำหรับผู้บริโภคข้าวได้ต่อไป

คำสำคัญ: สังกะสี น้ำขัง แอโรบิก ข้าวไร่ ข้าวนาสวน

คำนำ

การขาดธาตุสังกะสีเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อประชากรจำนวนหนึ่งในสามของโลก โดยพบประชากรป่วยเป็นโรคขาดธาตุสังกะสีตั้งแต่ร้อยละ 4-73 (Hotz and Brown, 2004) โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรในแถบทวีปเอเชียและอาฟริกาที่พบผู้ป่วยดังกล่าวถึงร้อยละ 10-60 (de Benoist *et al*., 2008) สาเหตุของการขาดธาตุสังกะสีส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคธาตุสังกะสีไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย เนื่องจากธาตุสังกะสีเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและเปลี่ยนสภาพของเนื้อเยื่อเจริญส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันและระบบทางเดินอาหาร (Brown *et al*., 2002) เกือบร้อยละ 50 ของพื้นที่เพาะปลูกพืชอาหารหลักในโลกเป็นพื้นที่ที่มีธาตุสังกะสีต่ำ (Cakmak, 2002) ที่มีสาเหตุมาจากความสามารถในการละลายของสังกะสีในดินต่ำและเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหาการขาดธาตุสังกะสีในพืชส่วนใหญ่ นอกจากบทบาทและความสำคัญในมนุษย์ ธาตุสังกะสียังมีบทบาทและความสำคัญในพืชเป็นอย่างมาก โดยเกี่ยวข้องกับเอนไซม์หลายชนิด โดยเอนไซม์ในพืชชั้นสูงจำนวนมากต้องการสังกะสีช่วยกระตุ้นกิจกรรม ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) แอลโดเลส (aldolases) ไอโซเมอเรส (isomerases) และทรานส์ฟอสฟอรีเลส (transphosphorylases) รวมทั้งมีบทบาทในเมทาบอลิซึมของดีเอ็นเอ การสังเคราะห์โปรตีนและการแบ่งเซลล์ (Coleman, 1992) โดยทั่วไปธาตุสังกะสีมีประจุไอออน Zn^{2+} (divalent cation) แต่ในสภาพที่มี pH สูง พืชอาจมีการดูดใช้ในรูป $ZnOH^{+}$ (monovalent cation) (Marschner, 1995) พืชชั้นสูงดูดใช้ธาตุสังกะสีผ่านกลไกการไหลมวลสาร (mass flow) และการแพร่ (diffusion) ของราก ซึ่งเป็นกลไกแบบ passive ที่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกับความเข้มข้นของธาตุสังกะสีที่เคลื่อนผ่านผนังเซลล์ของราก (Lee *et al*., 2010) โดยงานวิจัยของ Herren and Feller (1994) กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างท่อน้ำและท่ออาหารที่มีบทบาทในการขนส่งธาตุสังกะสีไปยังเมล็ดในระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา ในข้าวสามารถขนส่งธาตุสังกะสีจากต้นไปยังแกนกลางของช่อดอก (rachis) และท่อลำเลียงของเมล็ด (grain vascular bundle) ในระยะเติมเต็มเมล็ดและการขนส่งธาตุอาหารต่าง ๆ ไปยังส่วนของเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ผ่านวิถี apoplast จากชั้นของนิวเซลลัส (nucellus layer) ผ่านเข้าสู่ชั้นเยื่ออาลิวโรน (aleurone layer) และไปสู่เอนโดสเปิร์ม (endosperm) ซึ่งขั้นตอนนี้มีบทบาทสำคัญในการขนส่งธาตุสังกะสีไปเก็บไว้ยังเอนโดสเปิร์มของเมล็ดพืช

ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ลุ่มหรือเรียกว่าข้าวนาสวนจะปลูกภายใต้สภาพน้ำขัง ในเอเชียมีการผลิตข้าวลักษณะนี้คิดเป็นร้อยละ 70 ของการเพาะปลูกข้าวทั้งหมด (Farooq *et al*., 2007) โดยทั่วไปในดินที่มีน้ำขังอย่างต่อเนื่องจะพบการขาดธาตุสังกะสีรุนแรงมากขึ้นเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในดิน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่า pH มีอิทธิพลต่อความเป็นประโยชน์ของธาตุสังกะสีในดิน (Rehman *et al*., 2012) ปฏิกิริยาทางเคมีที่มีค่า pH มากขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการละลายธาตุสังกะสีในดินต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบกับดินในสภาพไม่ขังน้ำหรือสภาพไร่ ซึ่งมีปริมาณธาตุสังกะสีที่เป็นประโยชน์มากกว่าในสภาพน้ำขัง (Impa and Johnson-Beebout, 2012) อย่างไรก็ตาม การปลูกข้าวในสภาพไร่มักจะเน้นในเรื่องของศักยภาพในการผลิตและการใช้น้ำ (Yang *et al*., 2005) ในพื้นที่ที่มีน้ำจำกัด การลดลงของน้ำในดินอาจเป็นปัจจัยจำกัดการดูดใช้และการขนส่งธาตุสังกะสีของรากพืช (Yoshida, 1981) ในประเทศไทยมีการปลูกข้าวไร่พื้นที่รวม 668,486 ไร่ อยู่ในภาคเหนือ 343,461 ไร่ ชายแดนฝั่งตะวันตก 202,383 ไร่ ชายแดนฝั่งตะวันออก 41,979 ไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 42,293 ไร่ และภาคใต้ 38,370 ไร่ แต่ไม่พบพื้นที่ปลูกข้าวไร่ในภาคกลาง (Damrongkiat, 2012) ซึ่งในระบบการจัดการการเพาะปลูกที่สามารถผลิตเมล็ดข้าวที่มีธาตุสังกะสีสูงจะนำไปสู่การแก้ไขปัญหาการขาดธาตุสังกะสีในผู้บริโภคข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของผลผลิตและการสะสมธาตุสังกะสี ในพันธุ์ข้าวไร่และข้าวนาสวนภายใต้การจัดการน้ำที่แตกต่างกัน เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการกำหนดศักยภาพผลผลิตทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การปลูกข้าวและการเก็บข้อมูล

ดำเนินการทดลองในกระถางขนาดใหญ่ที่แปลงทดลองพืชไร่ ศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ และประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือพันธุ์ข้าว จำนวน 2 พันธุ์ คือข้าวไร่ (พันธุ์กำหอม มช.; KH CMU) และข้าวนาสวน (พันธุ์ชัยนาท 1; CNT1) และปัจจัยที่ 2 การจัดการสภาพน้ำในการปลูกคือการปลูกแบบขังน้ำ (flooded) และไม่ขังน้ำ (non-flooded) โดยเพาะกล้าข้าวทั้ง 2 พันธุ์เป็นเวลา 7 วัน ก่อนย้ายกล้าลงปลูกในกระถางซีเมนต์ที่ใส่ดินเตรียมไว้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระถางคือ 80 เซนติเมตร สูง 40 เซนติเมตร บรรจุดินแห้งกระถางละ 160 กิโลกรัม โดยดินที่ใช้ปลูกมีลักษณะดินร่วนปนทราย (sedimentation method) (Das, 2002) มีค่าปฏิกิริยาดินเป็นกรดปานกลางเท่ากับ 5.82 (ดิน:น้ำ, 1:1) (Jones, 2001) ปริมาณอินทรียวัตถุร้อยละ 1.38 (Walkley and Black, 1947) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 35.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Watanabe and Olsen, 1962) โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 39.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (NH_4OAc, pH 7) (Schollenberger and Simon, 1945) และสังกะสีที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Zn available, DTPA)(Lindsay and Norvell, 1978) 0.73 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปลูกกล้าข้าวทั้งสองพันธุ์จำนวนพันธุ์ละ 6 ต้น ระยะปลูก 25x25 เซนติเมตร ปลูกแบบต้นเดี่ยว โดยมีการจัดการน้ำ 2 แบบคือแบบขังน้ำและไม่ขังน้ำ ในกรรมวิธีที่ขังน้ำเริ่มขังน้ำในกระถางตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะสุกแก่ โดยรักษาระดับน้ำให้อยู่ที่ประมาณ 10 เซนติเมตร เหนือระดับผิวดิน ในสภาพไม่ขังน้ำ ก่อนย้ายกล้าลงปลูกในกระถางให้น้ำในดินจนสังเกตสภาพดินในกระถางอิ่มตัวด้วยน้ำ (ประมาณค่าความจุความชื้นสนามที่ 100 เปอร์เซ็นต์) โดยไม่มีน้ำท่วมขังเหนือระดับผิวดิน และเมื่อปลูกข้าวทั้งสองพันธุ์จึงรักษาระดับความชื้นในดินให้คงที่สังเกตจากผิวหน้าดินโดยให้น้ำวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น (ครั้งละประมาณ 3 ลิตร) จนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยว ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (urea) ในอัตรา 30 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ปุ๋ยฟอสฟอรัส (sodium dihydrogen orthophosphate) ในอัตรา 30 กิโลกรัมฟอสเฟต (P_2O_5) ต่อไร่ และปุ๋ยโพแทสเซียม (potassium chloride) ในอัตรา 30 กิโลกรัมโพแทชเซียม (K_2O) ต่อไร่ แบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งละเท่า ๆ กัน ครั้งแรกใส่ระยะแตกกอ ครั้งที่สองใส่ระยะกำเนิดช่อดอก และครั้งที่สามใส่ระยะออกดอก เก็บเกี่ยวเพื่อประเมิน

ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวแต่ละพันธุ์ ในระยะสุกแก่ นำตัวอย่างไปอบลดความชื้นที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (de Mello Prado and Caione, 2012) จากนั้นชั่งน้ำหนักแห้งพร้อมบันทึกข้อมูล ในส่วนของเมล็ดข้าวที่เป็นผลผลิตนำมาผึ่งแดดเพื่อลดความชื้นให้เหลือ 14 เปอร์เซ็นต์ ชั่งน้ำหนักแห้งพร้อมบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ความเข้มข้นธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้อง

การวิเคราะห์ทางเคมี

วิเคราะห์ความเข้มข้นธาตุสังกะสีที่สะสมในเมล็ดข้าวกล้อง โดยวิธีการ dry ashing เผาตัวอย่างโดยใช้อุณหภูมิ 535 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง และนำสารละลายตัวอย่างมาอ่านค่าด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer (AA) เปรียบเทียบความเข้มข้นจากสารละลายมาตรฐานของสังกะสี โดยมีตัวอย่างใบถั่วเขียวเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ (Bell *et al*., 1991)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีโดยหาค่า least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผล statistix 8 analytical software; SX หาความสัมพันธ์ของตัวแปรแต่ละคู่โดยวิธีหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (coefficient of correlation)

ผลการศึกษา

การศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ข้าวกับสภาพการปลูกพบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างพันธุ์ข้าวและสภาพการปลูกต่อผลผลิตเมล็ดและน้ำหนักฟางข้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (Figure 1) โดยพบว่าข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เมื่อปลูกในสภาพไม่ขังน้ำให้ผลผลิตเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 45.0 กรัม/ต้น เปรียบเทียบกับการปลูกในสภาพน้ำขังให้ผลผลิตเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 65.0 กรัม/ต้น (ลดลงร้อยละ 30.8) ขณะที่พันธุ์กำหอม มช. ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของผลผลิตที่ปลูกในสภาพไม่ขังน้ำและสภาพน้ำขัง (ผลผลิตเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 34.1 และ 33.7 กรัม/ต้น ตามลำดับ) ในขณะที่น้ำหนักแห้งฟางข้าวของพันธุ์ชัยนาท 1 ลดลงร้อยละ 33.7 จากการปลูกในสภาพน้ำขัง (ผลผลิตเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 47.2 กรัม/ต้น) เมื่อเทียบกับการปลูกในสภาพไม่ขังน้ำ (ผลผลิตเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 31.3 กรัม/ต้น) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของน้ำหนักแห้งฟางข้าวในพันธุ์กำหอม มช. (ผลผลิตเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 18.5 กรัม/ต้นในสภาพน้ำขัง และ 26.2 กรัม/ต้นในสภาพไม่ขังน้ำ) ไม่พบปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างพันธุ์ข้าวและสภาพการปลูกต่อเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีและน้ำหนัก 1,000 เมล็ด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และ

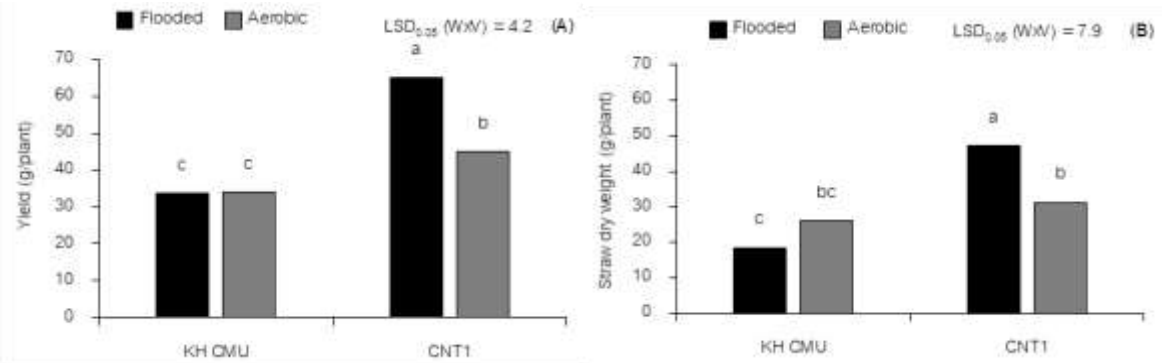

Figure 1. Grain yield (A) and straw dry weight (B) of 2 rice varieties (KH CMU and CNT1) grown in 2 water conditions (flooded and aerobic). Significant difference at P<0.05 indicated by different lowercase letters above the bars

นอกจากนี้ยังพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างพันธุ์ข้าวกับสภาพการปลูกต่อองค์ประกอบผลผลิตคือจำนวนหน่อต่อกอ และจำนวนรวงต่อกออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (Table 1) เมื่อปลูกข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในสภาพไม่ขังน้ำพบว่าจำนวนหน่อต่อกอลดลงร้อยละ 44.2 เมื่อเทียบกับสภาพน้ำขัง ในขณะที่พันธุ์กำหอม มช. เมื่อปลูกในสภาพน้ำขังให้จำนวนหน่อต่อกอลดลงร้อยละ 41.2 เมื่อเทียบกับการปลูกในสภาพไม่ขังน้ำ ในขณะที่การปลูกในสภาพไม่ขังน้ำมีจำนวนรวงต่อกอของพันธุ์ชัยนาท 1 ลดลงร้อยละ 41.9 ในขณะที่พันธุ์กำหอม มช. ไม่พบความแตกต่างของจำนวนหน่อต่อกอระหว่างสภาพการปลูกทั้งสองสภาพการปลูก

ความเข้มข้นของธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้อง

ความเข้มข้นธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องมีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างพันธุ์ข้าวและสภาพน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (Figure 2) โดยพันธุ์กำหอม มช. มีปริมาณธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องมากกว่าพันธุ์ชัยนาท 1 ในทั้งสองสภาพการปลูก โดยมีความเข้มข้นธาตุสังกะสีในสภาพไม่ขังน้ำมากกว่าสภาพน้ำขังร้อยละ 20.7 แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างสภาพการปลูกในพันธุ์ชัยนาท 1

ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตและความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้อง

ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตและความเข้มข้นสังกะสีในข้าวกล้องข้าวทั้งสองพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน (P<0.05) (Figure 3)

Table 1. Yield components (no. of tillers/hill, no. of panicles/hill, percent filled grain and 1,000 filled grains weight) of 2 rice varieties grown under 2 water conditions

Water condition	Variety	No. of tillers/hill	No. of panicles/hill	Filled grain (%)	1,000 Filled grains weight (g)
Flooded	KH CMU	5.7 d	5.3 c	96.8	27.1
	CNT1	31.0 a	27.0 a	97.5	29.8
Aerobic	KH CMU	9.7 c	9.7 c	97.8	30.5
	CNT1	17.3 b	15.7 b	98.2	28.6
F-test					
Water condition (W)		**	*	ns	ns
Varieties (V)		**	**	ns	ns
W x V		**	**	ns	ns
LSD (0.05) (W x V)		2.6	4.7	-	-
CV (%)		8.0	16.5	0.7	5.7

ns, *, ** indicates non-significant difference and significant difference at P<0.05 and P<0.01, respectively

Significant difference within column at P<0.05 indicated by different lowercase letters

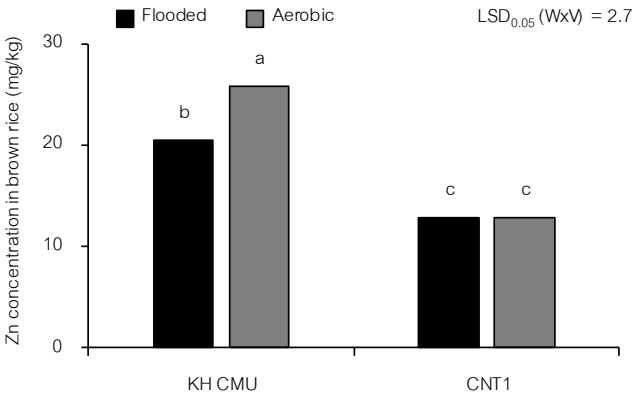

Figure 2. Zinc concentration in brown rice of 2 varieties (KH CMU and CNT1) grown in different water conditions (flooded and aerobic). Significant difference at $P<0.05$ indicated by different lowercase letters above the bars

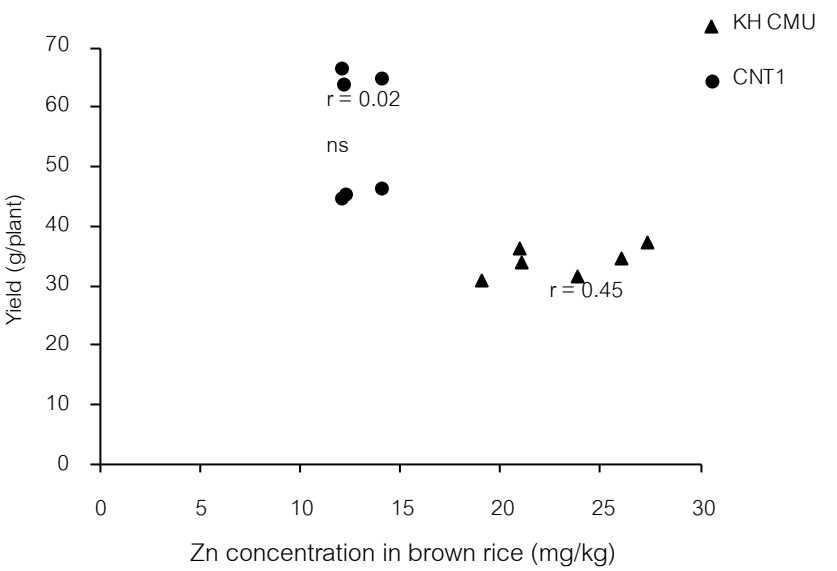

Figure 3. Correlation between grain zinc concentration in brown rice and grain yield in 2 rice varieties (KH CMU and CNT1)

วิจารณ์

ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าการตอบสนองของผลผลิตและความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวมีปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างพันธุ์ข้าวนาสวนและข้าวไร่และสภาพน้ำในการปลูกแบบขังน้ำและไม่ขังน้ำ ซึ่งการจัดการสภาพน้ำให้ได้ประโยชน์สูงสุดของทั้งผลผลิตและความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวควรต้องคำนึงถึงพันธุ์ข้าวที่ปลูกด้วย พันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวนาสวน มีการตอบสนองต่อสภาพน้ำอย่างชัดเจน โดยมีผลผลิตเมล็ด น้ำหนักแห้งฟาง จำนวนหน่อต่อกอ จำนวนรวงต่อกอลดลงอย่างมากเมื่อนำมาปลูกในสภาพไม่ขังน้ำ แสดงถึงการปรับตัวต่อสภาพการปลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขังและไม่ขังน้ำในระหว่างการปลูกในการสร้างผลผลิตที่ค่อนข้างจำกัดในข้าวพันธุ์

ชัยนาท 1 มีรายงานว่าข้าวนาสวนมีระบบรากค่อนข้างตื้น และมีลักษณะรวมเป็นกระจุก กระจายตัวอยู่ในระดับชั้นดินบนที่ 15-30 เซนติเมตร ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเป็นข้อจำกัดต่อการดูดใช้น้ำและธาตุอาหารในสภาพไม่ขังน้ำ (Serraj *et al*., 2011) ในขณะที่พันธุ์ก่ำหอม มช. ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวไร่ที่ปกติปลูกในสภาพไม่ขังน้ำพบว่ามีการปรับตัวต่อสภาพน้ำได้ดีกว่า โดยไม่พบความแตกต่างของผลผลิตในทั้งสองสภาพการปลูกทั้งน้ำหนักเมล็ดและฟางข้าวแม้จะมีจำนวนหน่อต่อกอที่ลดลงในการปลูกแบบไม่ขังน้ำเปรียบเทียบกับการปลูกในสภาพน้ำขัง แต่ไม่ส่งผลต่อผลผลิตและน้ำหนักแห้งฟาง ซึ่งแม้ว่าข้าวไร่มีลักษณะการกระจายของรากจะน้อยกว่าข้าวนาสวน แต่ข้าวไร่มีความยาวของรากที่มากกว่าข้าวนาสวน ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของข้าวไร่สำหรับการดูดใช้น้ำในชั้นดินลึกในกรณีที่เกิดภาวะเครียดในสภาพแห้งแล้ง ซึ่งรากบางส่วนอาจมีความยาวถึง 70-80 เซนติเมตร (Abe and Morita, 1994) อย่างไรก็ตาม ภายในพันธุกรรมของข้าวไร่ก็มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมในลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการต้านทานต่อการขาดน้ำได้มากกว่าข้าวนาสวน ซึ่งพบความแตกต่างของความกว้างใบ จำนวนหน่อ และความยาวของราก ระหว่างข้าว 2 พันธุ์ (Shashidhar *et al*., 2012) โดยรายงานของ Heinemann *et al*. (2011) ระบุว่าพืชหลายชนิดมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในการแลกเปลี่ยนก๊าซที่ใบเป็นผลจากยีนบางชนิดที่สามารถระงับการคายน้ำในสภาวะที่ดินจะแห้งสนิท ในขณะที่บางชนิดตอบสนองโดยลดการคายน้ำในสภาพดินอิ่มตัวด้วยน้ำสูง ซึ่งเชื่อว่าความแตกต่างดังกล่าวส่งผลให้ข้าวไร่และข้าวนาสวนมีความสามารถในการปรับตัวแตกต่างกันในภาพการปลูกที่ต่างกัน และมีผลทำให้เกิดความแตกต่างในการสร้างผลผลิต นอกจากนี้อาจส่งผลต่อความแตกต่างในการสะสมธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวด้วย Wissuwa *et al*. (2008) บ่งชี้ว่าความเข้มข้นของธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวมีความแตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ 8-47 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การทดลองนี้พบว่าพันธุ์ก่ำหอม มช. มีความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องมากกว่าพันธุ์ชัยนาท 1 ในทั้งสองสภาพการปลูก โดยการปลูกในสภาพไม่ขังน้ำมีปริมาณธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องมากกว่าสภาพน้ำขัง Jiang *et al*. (2008) แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการเคลื่อนย้ายของธาตุสังกะสีในต้นข้าวมีความสำคัญต่อปริมาณของธาตุสังกะสีในเมล็ด ขณะที่การดูดซึมธาตุอาหารของรากที่มากขึ้นไม่จำเป็นต้องมีผลต่อการสะสมธาตุสังกะสี เนื่องจากพืชมีกลไกเพื่อใช้ในการรักษาสมดุลธาตุสังกะสีด้วยการเคลื่อนย้ายทางไซเล็มและโฟลเอ็ม ซึ่งพบว่าปริมาณการเคลื่อนย้ายธาตุสังกะสีไปยังเมล็ดสามารถบ่งบอกสถานภาพธาตุสังกะสีของพืชได้ด้วย โดยมีรายงานว่าพืชที่ขาดแคลนสังกะสี จะพบการจับของธาตุสังกะสีอยู่ในเมทาบอลิกพูล ทำให้มีการเคลื่อนย้ายไปยังเมล็ดน้อย (Osothsapha, 2015) รายงานของ Wu *et al*. (2010) ระบุว่าในสภาพที่ดินมีธาตุสังกะสีเพียงพอ ธาตุสังกะสีที่สะสมในเมล็ด ได้มาจากการดูดธาตุอาหารจากราก ขณะที่ในสภาพที่ดินขาดธาตุสังกะสี พืชจะมีการลำเลียงธาตุสังกะสีจากส่วนของลำต้นมาสะสมไว้ในเมล็ด ทั้งนี้ค่าวิกฤตของการขาดธาตุสังกะสีในดินทั่วไปอยู่ในช่วง 0.5-1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Alloway 2008) ซึ่งการขาดธาตุสังกะสีของดินจากวิธีการ DTPA extraction method มีค่าเฉลี่ย 0.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Dobermann and Fairhurst, 2000) ในการวิเคราะห์ดินก่อนการทดลองพบว่าดินมีความเป็นประโยชน์ของธาตุสังกะสี 0.73 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่าการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องของข้าวทั้งสองพันธุ์และทั้งสองสภาพการปลูกอยู่ในช่วง 12.8-25.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เช่นเดียวกับการทดลอง Wissuwa *et al*. (2008) พบว่าในสภาพที่ดินขาดธาตุสังกะสี (ความเป็นประโยชน์ของธาตุสังกะสีในดิน 0.79-0.97 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สามารถให้ความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวเฉลี่ยในช่วง 7.8-27.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดมาจากเสถียรภาพและการดูดใช้สังกะสีซึ่งคาดว่าน่าจะขึ้นอยู่กับศักยภาพและกลไกทางสรีรวิทยาของข้าว แม้ในดินจะมีการขาดธาตุสังกะสีก็ตาม ทั้งนี้การจัดการการปลูกส่งผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ทางเคมีดิน ตัวอย่างเช่น เมื่อดินถูกน้ำขังเป็นเวลานานค่าศักย์รีดอกซ์ (redox potential; Eh) จะลดลง ซึ่งปกติแล้วดินในสภาพไม่ขังน้ำจะมีค่าศักย์รีดอกซ์ที่มากกว่าในสภาพน้ำขัง ในระบบการปลูกข้าวไร่ (ไม่ขังน้ำ) จะเกิดกระบวนการ oxidation ของเหล็ก ($Fe(OH)_3$)

โดยรากมีการปลดปล่อย O_2 ออกมาทำให้ค่า pH บริเวณรอบรากลดลง และค่า pH ที่ลดลงส่งผลต่อการปลดปล่อยสังกะสีจากส่วนที่ตกตะกอนในดิน (Abdullah 2015) ขณะที่ในดินนาน้ำขังมีปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้สังกะสีถูกตรึง เช่น การเกิดอนุมูลของ OH^-, PO_4^{-3}, S^{-2} และการเพิ่มขึ้นของ pH ส่งผลให้สังกะสีถูกตรึงให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำได้ แก่ ZnS, $Zn(OH)_2$, $ZnCO_3$ และ $Zn_3(PO_4)_2$ ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่าเมื่อ pH ของดินเพิ่มขึ้น 1 หน่วยการละลายได้ (solubility) ของสังกะสีจะลดลง 100 เท่า (Randhawa *et al*.,1978) แต่อย่างไรก็ตาม ค่าวิกฤตสังกะสีในดินอาจจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการจัดการสภาพแวดล้อม และการสะสมธาตุสังกะสีในส่วนต่างๆ ของพืชแต่ละชนิดอาจจะมีกลไกการดูดซึมของระบบรากและการลำเลียงธาตุอาหารแตกต่างกัน จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการดูดใช้ธาตุสังกะสีระหว่างข้าวไร่และข้าวนาสวน

สรุป

พันธุ์ข้าวไร่และข้าวนาสวนมีการตอบสนองของผลผลิตและการสะสมธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้องที่แตกต่างกันในการจัดการสภาพน้ำที่แตกต่างกัน เมื่อปลูกข้าวนาสวนในสภาพไม่ขังน้ำส่งผลให้ผลผลิตเมล็ดน้อยกว่าการปลูกในสภาพน้ำขัง (45.0 และ 65.0 กรัม/ต้น ตามลำดับ) แต่การจัดการน้ำที่ต่างกันไม่ส่งผลต่อความเข้มข้นสังกะสีในเมล็ดข้าวกล้อง (12.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ขณะที่ข้าวไร่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของผลผลิตเมล็ดระหว่างสภาพน้ำขังและไม่ขังน้ำ (33.7 และ 34.1 กรัม/ต้น ตามลำดับ) แต่การจัดการน้ำมีผลให้ความเข้มข้นธาตุสังกะสีในสภาพไม่ขังน้ำมากกว่าสภาพน้ำขัง (25.7 และ 20.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) ในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพการจัดการน้ำในการปลูก พบว่าพันธุ์ข้าวแต่ละชนิดมีเสถียรภาพในการรักษาผลผลิตและความเข้มข้นธาตุสังกะสีต่างกัน โดยข้าวนาสวนมีเสถียรภาพในการรักษาความเข้มข้นธาตุสังกะสีได้ดีกว่าข้าวไร่ ขณะที่ข้าวไร่มีเสถียรภาพในการรักษาผลผลิตเมล็ดได้ดีกว่าข้าวนาสวน เนื่องจากอาจมีการปรับตัวของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่ต่างกัน จึงควรมีการศึกษากลไกการตอบสนองและความสามารถในการเคลื่อนย้ายธาตุสังกะสีในข้าวแต่ละชนิดต่อไปในอนาคต เพื่อประโยชน์ในการจัดการการปลูกข้าวและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีผลผลิตและปริมาณธาตุสังกะสีในเมล็ดสูง เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในข้าวสำหรับผู้บริโภคข้าวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เป็นส่วนหนึ่งในการสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสรีรวิทยา สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

Abdullah, A.S. 2015. Zinc availability and dynamics in the transition from flooded to aerobic rice cultivation. Journal of Plant Biology & Soil Health 2(1): 2-5.

Abe, J. and S. Morita. 1994. Growth direction of nodal roots in rice: its variation and contribution to root system formation. Plant and Soil 165(2): 333-337.

Alloway, B.J. 2008. Zinc in soils and crop nutrition. 2nd ed. International fertilizer Industry Association and International Zinc Association, Brussels, and Paris. 139 p.

Bell, P.F., R.L. Chaney and J.S. Angle. 1991. Free metal activity and total metal concentrations as indices of micronutrient availability to barley (*Hordeum vulgare* (L.) 'Klages'). Plant and Soil 130: 51-62.

Brown, K.H., J.M. Peerson, J. Rivera and L.H. Allen. 2002. Effect of supplemental zinc on the

growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: a meta-analysis of randomized controlled trials. The American Journal of Clinical Nutrition 75(6): 1062-1071.

Cakmak, I. 2002. Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable ways. Plant and Soil 247(1): 3-24.

Coleman, J.E. 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. Annual Review of Biochemistry 61(1): 897-946.

Damrongkiat, C. 2012. Upland rice production with food security. pp. 2-23. *In*: Proceedings of the 2nd Academic Rice International Conference. Swissotel Le Concorde, Bangkok. (in Thai)

Das, B.M. 2002. Soil Mechanics Laboratory Manual Sixth Edition, Oxford University Press, New York. 215 p.

de Benoist, B., E. McLean, I. Egli and M. Cogswell. 2008. Worldwide Prevalence of Anaemia 1993-2005: WHO Global Database of Anaemia. World Health Organization, Geneva. 40 p.

de Mello Prado, R. and G. Caione. 2012. Plant analysis. pp. 115-134. *In:* R.N. Issaka (ed.). Soil Fertility Edited by Roland Nuhu Issaka. InTech, Rijeka.

Dobermann, A. and T.H. Fairhurst. 2000. Rice: Nutrient Disorders & Nutrient Management. Potash & Phosphate Institute (PPI), Potash & Phosphate Institute of Canada (PPIC) and International Rice Research Institute, Philippine. 191 p.

Farooq, M., S.M.A. Basra and N. Ahmad. 2007. Improving the performance of transplanted rice by seed priming. Plant Growth Regulation 51(2): 129-137.

Heinemann, A.B., L.F. Stone and N.K. Fageria. 2011. Transpiration rate response to water deficit during vegetative and reproductive phases of upland rice cultivars. Scientia Agricola 68(1): 24-30.

Herren, T. and U. Feller. 1994. Transfer of zinc from xylem to phloem in the peduncle of wheat. Journal of Plant Nutrition 17(9): 1587-1598.

Hotz, C. and K.H. Brown. 2004. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. Food and Nutrition Bulletin 25(1)(Supplement 2): S99-203.

Impa, S.M. and S.E. Johnson-Beebout. 2012. Mitigating zinc deficiency and achieving high grain Zn in rice through integration of soil chemistry and plant physiology research. Plant and Soil 361(1): 3-41.

Jiang, W., P.C. Struik, M. Zhao, H. Van Keulen, T.Q. Fan and T.J. Stomph. 2008. Indices to screen for grain yield and grain-zinc mass concentrations in aerobic rice at different soil-Zn levels. NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences 55(2): 181-197.

Jones, J.B., Jr. 2001. Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis. CRC Press, Boca Raton. 357 p.

Lee, S., H.J. Jeong, S.A. Kim, J. Lee, M.L. Guerinot and G. An. 2010. OsZIP5 is a plasma membrane zinc transporter in rice. Plant Molecular Biology 73(4): 507-517.

Lindsay, W.L. and W.A. Norvell. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Science Society of America Journal 42(3): 421-428.

Mahata, M.K., P. Debnath and S.K. Ghosh. 2012. Critical limits of zinc in soil and rice plant

grown in alluvial soils of west bengal, india. SAARC Journal of Agriculture 10(2): 137-146.

Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, Amsterdam. 889 p.

Osothsapha, Y. 2015. Nutrition of Plants. Kasetsart University Press, Bangkok. 548 p. (in Thai)

Papademetriou, M.K., F.J. Dent and E.M. Herath. 2000. Bridging the Rice Yield Gap in the Asia-Pacific Region. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok. 222 p.

Randhawa, N.S., M.K. Sinha and P.N. Takkar. 1978. Micronutrients. pp. 581-603. *In*: IRRI. Soils and Rice. International Rice Research Institute, Los Baños.

Rehman, H., T. Aziz, M. Farooq, A. Wakeel and Z. Rengel. 2012. Zinc nutrition in rice production systems: a review. Plant and Soil 361(1): 203-226.

Schollenberger, C.J. and R.H. Simon. 1945. Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil by ammonium acetate method. Soil Science 59(1): 13-24.

Serraj, R., K.L. McNally, I. Slamet-Loedin, A. Kohli, S.M. Haefele, G. Atlin and A. Kumar. 2011. Drought resistance improvement in rice: an integrated genetic and resource management strategy. Plant Production Science 14(1): 1-14.

Shashidhar, H.E., A. Henry and B. Hardy. 2012. Methodologies for Root Drought Studies in Rice. International Rice Research Institute, Los Baños. 65 p.

Walkley, A. and I.A. Black. 1947. Chromic acid titration method for determination of soil organic matter. Soil Science Society of America Proceedings 63: 257.

Watanabe, F.S. and S.R. Olsen. 1962. Colorimetric determination of phosphorus in water extracts of soil. Soil Science 93(3): 183-188.

Wissuwa, M., A.M. Ismail and R.D. Graham. 2008. Rice grain zinc concentrations as affected by genotype, native soil-zinc availability and zinc fertilization. Plant and Soil 306(1): 37-48.

Wu, C., L. Lu, X. Yang, Y. Feng, Y. Wei, H. Hao, P.J. Stoffella and Z. He. 2010. Uptake, translocation and remobilization of zinc absorbed at different growth stages by rice genotypes of different Zn densities. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(11): 6767-6773.

Yang, X., B.A.M. Bouman, H. Wang, Z. Wang, J. Zhao and B. Chen. 2005. Performance of temperate aerobic rice under different water regimes in North China. Agricultural Water Management 74(2): 107-122.

Yoshida, S. 1981. Fundamentals of Rice Crop Science. International Rice Research Institute, Los Baños. 269 p.

การประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียและชีวภัณฑ์ในการลดความเป็นพิษของอาร์เซนิกในดิน

Efficiency Evaluations of Bacteria and Bio-products in Reducing Arsenic Toxicity in Soils

กนกขวัญ ปัญญาสิทธิ์ ยุพา จอมแก้ว และ อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง*

Kanokkwan Panyasite, Yupa Chromkaew and Arawan Shutsrirung*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: arawan.s@cmu.ac.th*

(Received: 17 December 2018; Accepted: 15 March 2019)

Abstract: Microbial reduction of arsenic (As) plays an important role in arsenic (As) detoxification in contaminated soils. Arsenic reducing microorganisms i.e. isolate BPAs17 and FPAs24 were isolated from arsenic-contaminated soils, exhibited high potential in As resistance. In this study, therefore, the two isolates were used to test their effectiveness in soil-arsenic reduction. Preliminary study showed that liming for pH adjustment together with microbial application resulted in As reduction in all the treatments. Liming with BPAs17 application gave the highest reduction of As in soil. Therefore, isolate BPAs17 was used to evaluate its survival in three types of carriers. The results showed that mixed media (MMC) gave the highest BPAs17 population at all stages of incubation. From the results of the experiments, isolate BPAs17 was selected to mix with MMC to produce bio-product prototype. The bio-product was then used to test its effectiveness to reduce As in soils with initial As concentration of 50 mg/kg. The results showed that soil pH adjustment with the application of bio-product gave the highest reduction of As at both 7 and 30 days after incubation with the reduced values of only 24.7 and 20.8 mg/kg, respectively (reduction percentage of -50.6 and -58.5% , respectively). The results of the present investigation indicated that bio-product prototype could be applied for management of As contaminated soils.

Keywords: Arsenic reducing microorganisms, arsenic contaminated soils, microbial carrier, bio-product

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: การลดความเข้มข้นของอาร์เซนิก (As) โดยใช้จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการลดความเป็นพิษของ As ในดินปนเปื้อน จุลินทรีย์ลด As คือไอโซเลท BPAs17 และ FPAs24 ที่แยกได้จากดินปนเปื้อน As มีความสามารถสูงในการต้านทาน As ในการทดลองครั้งนี้จึงได้นำสองไอโซเลทนี้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณ As ในดิน ผลการทดลองเบื้องต้น พบว่า การใส่ปูนเพื่อปรับค่า pH ร่วมกับการใช้จุลินทรีย์ส่งผลให้ค่า As ลดลงในทุกกรรมวิธี โดยกรรมวิธีที่สามารถลด As ได้มากที่สุด คือ การใส่ปูนกับเชื้อ BPAs17 จึงได้เลือกไอโซเลทนี้มาทดสอบความอยู่รอดในวัสดุรองรับสามชนิด พบว่า mixed media (MMC) ให้จำนวนประชากรของ BPAs17 สูงสุดในทุกระยะการบ่ม จากผลการทดลองนี้จึงได้นำไอโซเลท BPAs17 มาผสมกับ MMC เพื่อผลิตเป็นชีวภัณฑ์ต้นแบบ แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการลด As ในดินที่มีค่า As เริ่มต้นที่ 50 mg/kg พบว่า กรรมวิธีการปรับ pH ดินร่วมกับการใช้ชีวภัณฑ์ทำให้ลดค่า As ได้มากที่สุด ทั้งที่ระยะ 7 และ 30 วัน หลังการบ่มเชื้อ คือ มีค่าเหลือเพียง 24.7 และ 20.8 mg/kg (ลดลง -50.6 และ -58.5% ตามลำดับ) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าชีวภัณฑ์ต้นแบบสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการดินที่ปนเปื้อน As ได้

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ลดอาร์เซนิก ดินปนเปื้อนอาร์เซนิก วัสดุรองรับหัวเชื้อจุลินทรีย์ ชีวภัณฑ์

คำนำ

สารหนู หรือ อาร์เซนิก (arsenic) เป็นธาตุกึ่งโลหะ (metalloid) มีสัญลักษณ์ทางเคมี คือ As เลขอะตอมเท่ากับ 33 มวลอะตอมเท่ากับ 74.92 อาร์เซนิกเป็นธาตุหนึ่งที่มีความเป็นพิษและตกค้างในดินเป็นเวลานาน ทั้งธาตุและสารประกอบของอาร์เซนิกมีพิษมาก เมื่อเข้าไปในร่างกายในระดับเกินค่ามาตรฐาน (0.01 mg/kg) จะเกิดอาการเป็นพิษอาร์เซนิกเรื้อรัง ได้แก่ ผลต่อระบบผิวหนัง ทำให้ผิวหนังหนาแข็งและเปลี่ยนสีที่เป็นลักษณะเฉพาะโรค ผื่นที่ตุ่มตามฝ่ามือฝ่าเท้าจนกระทั่งอาจกลายเป็นมะเร็งผิวหนัง ทำให้มีอาการชาจากความผิดปกติของเส้นประสาท ผลต่อระบบโลหิต ทำให้เป็นโรคโลหิตจาง แต่ถ้าได้รับอาร์เซนิกในปริมาณมากอยู่ในช่วง 1.5-500 mg/kg ของน้ำหนักตัวส่งผลทำให้เสียชีวิตได้ (Toxicology Information Center, 2002) อาร์เซนิกที่พบในธรรมชาติโดยทั่วไปมี 4 รูปแบบ ได้แก่ อาร์ซิเนท [arsenate, As(+5)] อาร์ซิไนท์ [arsenite, As(+3)] อาร์เซนิก [arsenic, As(0)] และ อาร์ซีน [arsine, As(-3)] (Sharma and Sohn, 2009) สารประกอบของอาร์เซนิก ได้แก่ อาร์เซนิกอินทรีย์ (organic arsenic) และ อาร์เซนิกอนินทรีย์ (inorganic arsenic) ซึ่งอาร์เซนิกอนินทรีย์ จะมีพิษร้ายแรงกว่า ธาตุอาร์เซนิกบริสุทธิ์ (As) และ อาร์เซนิกอินทรีย์ อาร์เซนิกอนินทรีย์ส่วนใหญ่พบในแหล่งโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้อาร์เซนิกและแหล่งที่มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืช ตลอดจนในบริเวณพื้นที่มีกิจกรรมการถลุงแร่ (Pollution Control Department, 1998) สารประกอบอาร์เซนิกอนินทรีย์แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) สารประกอบเวเลนซ์สาม (trivalent compound) เช่น arsenic trioxide (As_2O_3) sodium arsenite ($NaAsO_2$) และ arsenic trichloride ($AsCl_3$) 2) สารประกอบเวเลนซ์ห้า (pentavalent compound) เช่น arsenic pentoxide (AsO_5) และ arsenic acid (H_3AsO_4) การปนเปื้อนอาร์เซนิกในสิ่งแวดล้อม ส่วนมากมาจากการถลุงแร่ การเผาไหม้ถ่านหิน สารเคมีทางการเกษตร ยารักษาเนื้อไม้ สารเคมีที่ใช้กับปศุสัตว์ และการเผาขยะ ซึ่งมีปริมาณการปล่อยสารอาร์เซนิกรวมกันถึงปีละหลายหมื่นตัน (Matschullat, 2000) ซึ่งตามมาตรฐานของค่าโลหะหนักในดินเพื่อการเพาะปลูกของประเทศไทยกำหนดให้ค่าอาร์เซนิกทั้งหมด (total As) ไม่เกิน 3.9 mg/kg ต่อน้ำหนักดินแห้ง (Center of Excellence on Hazardous Substance Management, 2007) เทคโนโลยีการลดปริมาณสารพิษตกค้างและฟื้นฟูดินที่ปนเปื้อนโลหะหนักมีหลายวิธีการ เช่น วิธีการทางชีวภาพ และ วิธีการทางเคมีและฟิสิกส์ เป็นต้น โดยวิธีทางชีวภาพนั้นได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่ใช้กระบวนการย่อยสลายตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ จุลินทรีย์ พืช หรือวัสดุชีวภาพในการบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ใช้ต้นทุนต่ำและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีการศึกษาวิจัยที่ใช้แบคทีเรียและเชื้อรา ที่สามารถบำบัดอาร์เซนิก ได้แก่

สกุล *Aspergillus, Trichoderma, Staphylococcus, Pseudomonas* และ *Thiobacillus ferrooxidans* (Nateewattana, 2012; Khummalai *et al*., 2000)

อาร์เซนิกในดินทางการเกษตรบนพื้นที่สูงทางภาคเหนือของประเทศไทย มีความเข้มข้นสูงกว่าค่ามาตรฐาน (ไม่เกิน 3.9 mg/kg) (Shutsrirung, 2012) ในพื้นที่เกษตรดังกล่าวนี้ เกษตรกรมีการใช้สารเคมีเกษตรในปริมาณสูง และคาดว่าจะเป็นแหล่งหลักที่ทำให้ดินเกิดการปนเปื้อนอาร์เซนิก ดินชั้นบนที่มีอาร์เซนิกสูงโดยเฉพาะดินบริเวณรอบรากพืชมีแนวโน้มทำให้ปริมาณอาร์เซนิกในพืชเพิ่มขึ้นจึงทำให้มีความเสี่ยงสูงที่จะส่งผลด้านลบต่อสุขภาพของมนุษย์ ผลการวิจัยของ Shutsrirung (2016) ซึ่งได้คัดกรองจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราจากพื้นที่ ที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และ โลหะหนัก โดยนำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาทดสอบความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนัก 2 ชนิด คือ โซเดียมอาเซไนท์ ($NaAsO_2$) และแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) โดยทำการทดสอบในอาหารเหลว ผลการวิจัยสรุปว่า แบคทีเรียไอโซเลท 17 (BPAs17) มีความสามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดของ $NaAsO_2$ และ $CdCl_2$ เท่ากับ 500 mg/L และเชื้อราไอโซเลท 24 (FPAs24) เจริญเติบโตได้ใน $NaAsO_2$ ความเข้มข้นสูงสุดถึง 1000 mg/L และ $CdCl_2$ ถึงความเข้มข้น 250 mg/L จุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลทนี้จึงมีศักยภาพสูงในการนำมาการประยุกต์ใช้เพื่อลดอาร์เซนิกในดินและในพืช อย่างไรก็ตามการนำจุลินทรีย์ในภาคสนามส่วนใหญ่จะใช้ในรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งผลิตโดยมีวัสดุรองรับผสมกับจุลินทรีย์คัดเลือกเพื่อให้จุลินทรีย์มีชีวิตอยู่รอดในดินได้นาน วัสดุรองรับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและถือว่าเป็นวัสดุมาตรฐานคือ พีท (peat) เนื่องจากเป็นวัสดุอินทรีย์ธรรมชาติที่จุลินทรีย์สามารถมีความอยู่รอดได้นานและมีปริมาณสูง อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันพีทเป็นวัสดุราคาแพงและหายากในหลายประเทศ จึงมีการนำเอาวัสดุหลายประเภทมาทดสอบเป็นวัสดุรองรับแทนพีท เช่น ไบโอชาร์ (biochar) ลีโอนาร์ไดท์ (leaonardite) และเพอร์ไลท์ (perlite) เป็นต้น ไบโอชาร์ (biochar) คือ วัสดุที่คล้ายถ่านซึ่งผลิตโดยการเผาชีวมวลโดยกระบวนการ pyrolysis ซึ่งเป็นการเผาภายใต้สภาพไร้ออกซิเจน จากผลการทดลองพบว่า การใช้ไบโอชาร์เป็นวัสดุรองรับหัวเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสง สามารถให้ปริมาณเชื้อไรโซเบียมได้สูงใกล้เคียงกับการใช้พีทเป็นวัสดุรองรับ (Kremer and Peterson, 1983) ลีโอนาไดท์ (leaonardite) เป็นวัสดุอินทรีย์ธรรมชาติที่มีคาร์บอนและฮิวมัสสูง จึงมีศักยภาพในการนำมาทดแทนพีทได้ อย่างไรก็ตามลีโอนาไดท์ มี pH ต่ำ เมื่อนำมาผสมกับไบโอชาร์ อัตราส่วน 1:1 สามารถใช้เป็นวัสดุรองรับจุลินทรีย์ได้ โดยให้ปริมาณจุลินทรีย์ประมาณ 10^7-10^8 CFU/g (Shutsrirung, 2016) เพอร์ไลท์ (perlite) มีคุณสมบัติสามารถใช้เป็นวัสดุรองรับหัวเชื้อได้ คือ ผิวหน้าของเม็ดจะปกคลุมด้วยช่องว่างขนาดเล็กที่มีพื้นที่ผิวสูง ช่องว่างภายในเม็ดจะถูกเชื่อมติดกันด้วยความร้อนระหว่างการเผาทำให้มีความสามารถในการดูดซับได้ดี (Duangpatra, 2010)

การศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อลดปริมาณอาร์เซนิกในดินจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จะนำแบคทีเรียและเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกจากงานทดลองของ Shutsrirung (2015) ซึ่งผ่านการทดสอบในอาหารเหลวแล้วว่ามีศักยภาพสูงในการลดโลหะหนักอาร์เซนิกดังกล่าวข้างต้น มาทดสอบประสิทธิภาพในการลดอาร์เซนิกในดินพื้นที่สูงที่ปนเปื้อนอาร์เซนิก เพื่อคัดกรองเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แล้วจึงนำไปผลิตเป็นชีวภัณฑ์ลดสารอาร์เซนิก พร้อมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการลดอาร์เซนิกในดินและในพืช เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์และวิธีการ

จากผลการวิจัยของ Shutsrirung (2016) ได้แยกและคัดกรองจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราจากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก และได้นำมาทดสอบความต้านทานโลหะหนักโดยใช้ โซเดียมอาซิไนท์ ($NaAsO_2$) ผลการวิจัยสรุปว่า แบคทีเรียไอโซเลท 17 (BPAs17) และเชื้อราไอโซเลท 24 (FPAs24) (Figure 1) สามารถเจริญได้ในอาหารแข็งที่มีความเข้มข้นสูงสุดของ $NaAsO_2$ ที่ 500 และ 1,000 mg/L ตามลำดับ ในการทดลองนี้จึงได้นำเชื้อ

(A) (B)

Figure 1. Culture appearance on nutrient agar plate of BPAs17 (A) and FPAs24 (B)

ทั้งสองไอโซเลทมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษของอาร์เซนิกในดิน

การเตรียมตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินลึกประมาณ 15 cm จากแปลงเกษตรกรจากพื้นที่ ที่มีรายงานการปนเปื้อนโลหะหนัก อาร์เซนิก >3.9 mg/kg (Shutsrirung, 2012) มาผึ่งในที่ร่มให้แห้ง แล้วร่อนผ่านตะแกรง 2.0 และ 0.5 mm นำดินไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการของตัวอย่างดิน ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ปริมาณความต้องการปูน (lime requirement)(woodruff, 1948) อินทรียวัตถุ (%OM) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) โพแทสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K, Ca และ Mg) (Land Development Department, 2010) ดินที่ใช้ในการทดลอง มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 5.02 ทำการปรับ pH ของดินโดยใส่ปูนโดโลไมท์ตามค่าปริมาณความต้องการปูน เพื่อให้ได้ค่า pH ที่เหมาะสมมากขึ้น นอกจากสมบัติของดินแล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณอาร์เซนิกทั้งหมดในดิน โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น optima 4300 DV โดยใช้วิธีการ EPA method 3052

การทดสอบประสิทธิภาพหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการลดอาร์เซนิกในดิน

นำไอโซเลทต้านทานอาร์เซนิกสูง คือ BPAs17 และ FPAs24 มาเพิ่มปริมาณก่อนการทำการทดลองโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) จนได้ปริมาณเชื้อสูงสุด (≅ 10^9 CFU/mL) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเหลวในการทดสอบ โดยนำสารละลายหัวเชื้อผสมดินให้มีความชื้นที่ 60% ของ maximum water holding capacity (MWHC)) ของดินเมื่อผสมหัวเชื้อแล้วทำการบ่มตัวอย่างดินที่อุณหภูมิห้อง หลังการบ่มดิน 7 และ 30 วัน นำตัวอย่างดินมาวิเคราะห์สมบัติดินเพื่อหาค่า pH และปริมาณอาร์เซนิกทั้งหมดในดิน โดยการทดสอบประสิทธิภาพหัวเชื้อจุลินทรีย์นี้ มีทั้งหมด 6 กรรมวิธี ได้แก่ 1) ไม่ปรับ pH ดิน ไม่ใส่เชื้อ 2) ไม่ปรับ pH ดิน ผสม BPAs17 3) ไม่ปรับ pH ดิน ผสม FPAs24 4) ปรับ pH ดิน ไม่ใส่เชื้อ 5) ปรับ pH ดิน ผสม BPAs17 และ 6) ปรับ pH ดิน ผสม FPAs24 โดยที่แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ วิธีการปรับ pH ทำโดยการใช้ดิน 1 kg ผสมโดโลไมท์ 1.17 g เมื่อทำการปรับ pH แล้ว ค่า pH ดิน เท่ากับ 6.0

การคัดกรองวัสดุรองรับที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์คัดเลือกเพื่อผลิตเป็นชีวภัณฑ์ลดอาร์เซนิก

วัสดุที่นำมาทดสอบครั้งนี้มี 3 ชนิด ได้แก่ 1) ไบโอชาร์ (biochar) + ลีโอนาร์ไดท์ (leaonardite) (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) (BLC) 2) เพอร์ไลท์ (perlite) (PC) และ 3) วัสดุผสม (mixed media: ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว + พีทมอส 1:1 โดยปริมาตร แล้วทำการเติม ลีโอนาร์ไดท์ และโดโลไมท์ อย่างละ 5% ใน mixed media) (MMC) ก่อนการผสมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์เหลว ได้ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของวัสดุรองรับหัวเชื้อก่อนนำวัสดุรองรับหัวเชื้อไปทดสอบร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อินทรียวัตถุ (%OM) ไนโตรเจนทั้งหมด (% Total N)ฟอสฟอรัสทั้งหมด (% P_2O_5) โพแทสเซียมทั้งหมด (% K_2O) แคลเซียมทั้งหมด

(%Ca) และแมกนีเซียมทั้งหมด (% Mg) (Land Development Department, 2010)

คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดอาร์เซนิกในดินจากการทดสอบประสิทธิภาพในดินข้างต้นมาเพียง 1 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผสมกับวัสดุทดสอบ ตามวิธีการของ Shutsrirung (2015) นำหัวเชื้อจุลินทรีย์คัดเลือกมาผสมวัสดุแต่ละชนิด (3 ชนิด) ซึ่งได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว คือ BLC, PC และ MMC หลังการผสมเชื้อในวัสดุรองรับแล้วจึงทำการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง และทำการนับปริมาณเชื้อที่ 15, 30 และ 90 วันหลังการบ่มเชื้อ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในวัสดุรองรับหัวเชื้อ $\cong 10^6$ CFU/g วิธีการนึ่งฆ่าเชื้อ (sterile) ทำโดยการนำวัสดุรองรับแต่ละชนิดมาผ่านอุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที โดยให้มีความชื้นเหมาะสม (60% ของ MWHC)

ทำการคัดเลือกวัสดุรองรับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ปริมาณเชื้อสูงสุดจากการทดลองบ่มเชื้อทั้งหมด 90 วัน ข้างต้น เพียง 1 ชนิด เพื่อทดลองพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ และดำเนินการผลิตต้นแบบชีวภัณฑ์ (วัสดุรองรับคัดเลือกผสมจุลินทรีย์) ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น แล้วจึงนำชีวภัณฑ์มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการลดอาร์เซนิกในดินที่คัดเลือกไว้ โดยนำตัวอย่างดินมาเพิ่มปริมาณอาร์เซนิกให้มีความเข้มข้นในดินเริ่มต้นที่ 50 mg/kg ด้วยสารละลาย $NaAsO_2$ นำชีวภัณฑ์มาผสมดินโดยใช้อัตราส่วน ชีวภัณฑ์ : ดิน 1:5 โดยน้ำหนัก หลังการบ่มดิน 7 และ 30 วัน แล้วนำตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ค่า pH และปริมาณอาร์เซนิกทั้งหมดในดิน โดยมีทั้งหมด 4 กรรมวิธี กำหนดให้มีกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ดังนี้ 1) ไม่ปรับ pH ดิน ผสมชีวภัณฑ์ปราศจากเชื้อ 2) ไม่ปรับ pH ดิน ผสมชีวภัณฑ์ 3) ปรับ pH ดิน ผสมชีวภัณฑ์ปราศจากเชื้อ และ 4) ปรับ pH ดิน ผสมชีวภัณฑ์ (กรรมวิธีปรับ pH ดิน เมื่อทำการปรับ pH แล้ว ค่า pH ดิน เท่ากับ 6.5)

การวิเคราะห์โลหะหนักอาร์เซนิกทั้งหมดในดิน ได้ทำการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ ณ บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ ทำการย่อยตัวอย่างดินแห้ง 0.5 g ในกรด nitric เข้มข้น (HNO_3) 9 ml ผสม hydrofluoric (HF) 3 ml เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ microwave ตามวิธีการ EPA Method 3052 หลังจากเย็นแล้ว กรองสารแล้วเทสารที่เจือจางออกจนได้ปริมาตรที่กำหนดไว้ และ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น optima 4300 DV ผลลัพธ์ที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ แสดงผลเป็นหน่วยน้ำหนักแห้ง mg/kg

ผลการทดลอง

ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการลดปริมาณอาร์เซนิกในดิน

ดินที่ใช้ในการทดลอง ก่อนทำการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์สมบัติบางประการของดิน พบว่า ความเป็นกรดด่าง (pH) ก่อนการทดลองมีค่า 5.02 ปริมาณ OM 4.54% มีค่าสูง ส่วนปริมาณธาตุอาหารในดินมีค่าสูง คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total N) มีค่า 0.23% สำหรับฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) และโพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K, Ca และ Mg) มีค่า 310.8, 1288.5 และ 149.3 mg/kg ตามลำดับ มีค่าปริมาณอาร์เซนิกในดิน 3.48 mg/kg ซึ่งตามมาตรฐานโลหะหนักของคุณภาพดิน (soil guideline value) เพื่อการเพาะปลูกของประเทศไทย กำหนดให้ค่าอาร์เซนิกไม่เกิน 3.9 mg/kg ต่อน้ำหนักดินแห้ง (Center of Excellence on Hazardous Substance Management, 2007) ถึงแม้ว่าดินในพื้นที่เก็บตัวอย่างเคยมีรายงานว่ามีปริมาณอาร์เซนิกเกินค่ามาตรฐาน (>5.0 mg/kg) อย่างไรก็ตามตัวอย่างดินแปลงเกษตรกรที่เลือกเก็บมีค่าอาร์เซนิกที่ไม่เกินมาตรฐาน สำหรับผลของการปรับค่า pH ของดินโดยปูนโดโลไมท์ พบว่ามีค่า pH 6.0

เมื่อนำจุลินทรีย์สองไอโซเลทคือ BPAs17 และ FPAs24 บ่มกับดินทดสอบที่มีความเข้มข้นของ As เริ่มต้นที่ 3.48 mg/kg เป็นเวลา 30 วัน พบว่า โดยเฉลี่ยแล้ว กรรมวิธีที่ไม่มีการปรับ pH ดินทำให้ค่า As ในดินสูงขึ้น โดยกรรมวิธีไม่ปรับ pH ดิน ผสมเชื้อ BPAs17 มีค่า As สูงที่สุดคือ 3.70 mg/kg รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีไม่ปรับ pH ดิน ผสมเชื้อ FPAs24 (3.56 mg/kg) และกรรมวิธีที่ไม่ปรับ pH ดิน ไม่ใส่เชื้อ มีค่า As ต่ำสุด (3.52 mg/kg) คิดเป็น

เปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้น +6.3%, +2.3% และ +1.2% ตามลำดับ (Figure 2) ส่วนในดินที่มีการปรับ pH ดิน ส่งผลดีกว่าการไม่ปรับ pH โดยทำให้ค่า As ลดลง โดยที่การปรับ pH ดินผสมเชื้อ BPAs17 ทำให้ค่า As ลดลงจากค่าเริ่มต้นมากที่สุด รองลงมาได้แก่ การปรับ pH ดินผสมเชื้อ FPAs24 และการปรับ pH ดิน โดยไม่มีการใส่เชื้อ โดยค่าที่ลดลง คือ 3.12, 3.34 และ 3.43 mg/kg คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลง -0.40%, -4.02% และ -1.40% ตามลำดับ โดยทุกกรรมวิธีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองนี้จึงได้คัดเลือกแบคทีเรีย BPAs17 มาทำการทดสอบขั้นต่อไป

การคัดเลือกวัสดุรองรับที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์คัดเลือก

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติเคมีบางประการของวัสดุรองรับหัวเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ BLC, PC และ MMC พบว่า มีสมบัติแตกต่างกันมาก โดยที่ BLC มีค่า pH ต่ำที่สุดคือ 5.69 ในขณะที่ pH ของ perlite มีค่ามากที่สุด คือ 8.22 อย่างไรก็ตาม BLC มีค่า OM สูงกว่าวัสดุอื่น คือ 24.81% ส่วนธาตุอาหารในวัสดุนั้น PC มีปริมาณธาตุต่ำมากเกือบทุกธาตุยกเว้นโพแทสเซียม (%K_2O) (Table 1) ส่วนวัสดุที่มีปริมาณเกือบธาตุอาหารโดยเฉลี่ยแล้วสูงกว่าวัสดุอื่นคือ MMC โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ N, P_2O_5, K_2O, Ca และ Mg เท่ากับ 0.75, 0.47 1.56, 2.79 และ 0.86% ตามลำดับ

เมื่อนำแบคทีเรียคัดเลือก BPAs17 มาผสมกับวัสดุแยกแต่ละชนิดแล้วบ่มไว้ ผลการทดลองพบว่า วัสดุ MMC ให้การเพิ่มประชากรเชื้อสูงสุดทุกระยะเวลาการบ่ม ในทางตรงข้าม PC เป็นวัสดุที่ให้ประชากรเชื้อน้อยที่สุด โดยที่หลังการบ่ม 15 วัน MMC ให้จำนวนประชากร BPAs17 เท่ากับ 1.65×10^8 ส่วน BLC และ PC มีประชากร 9.00×10^7 และ 1.05×10^7 CFU/g ตามลำดับ (Table 2) หลังการบ่ม 30 วัน MMC ให้จำนวนประชากร BPAs17 เท่ากับ 2.62×10^7 ส่วน BLC และ PC มี

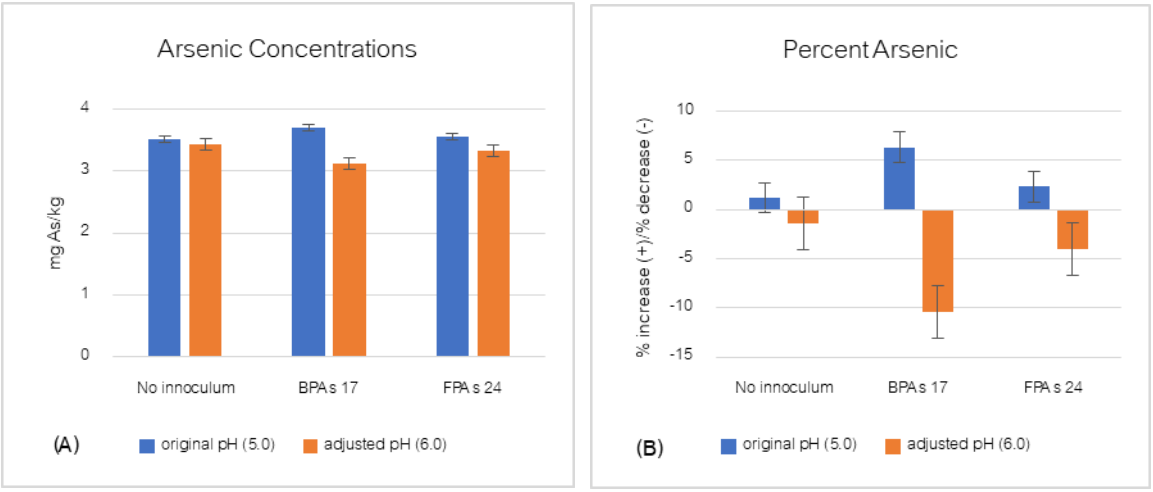

Figure 2. Efficiency of BPAs17 and FPAs24 in reduction of arsenic concentration (A) and percent reduction in soils after 30 days of incubation (B)

Table 1. Chemical properties of microbial carriers

Carriers	pH (1:10)	OM	N	P_2O_5	K_2O	Ca	Mg
		(%)					
BLC[1]	5.69	24.81	0.75	0.07	1.56	2.79	0.86
PC[2]	8.22	0.88	0.07	0.00	0.29	0.01	0.00
MMC[3]	6.85	8.51	0.64	0.47	0.36	2.76	0.60

[1]biochar + leonardite (1:1 V/V); [2]perlite; [3]mixed media: coconut husk compost: peat moss 1:1 V/V plus 5% dolomite

ประชากร 1.82×10^7 และ 0.35×10^7 CFU /g ตามลำดับ ส่วนที่ระยะ 90 วันหลังการบ่ม MMC ให้จำนวนประชากร BPAs17 เท่ากับ 2.10×10^7 CFU /g ส่วน BLC และ PC มีประชากร 9.00×10^5 และ 0.26×10^5 CFU /g ตามลำดับ โดยจำนวนประชากรหลังการบ่มทุกระยะของทุกกรรมวิธีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Table 2)

ประชากรทั้งหมดของ BPAs17 ในทุกวัสดุคือ BLC, PC และ MMC มีค่าสูงสุดหลังการบ่ม 15 วัน (8.22, 7.95 และ 7.02 log CFU/g ตามลำดับ) เมื่อบ่มระยะเวลานานกว่า 15 วัน ประชากรของเชื้อ BPAs17 ในทุกวัสดุมีแนวโน้มลดลง (Figure 3) โดยที่ PC เป็นวัสดุที่ทำให้ประชากร BPAs17 ลดลงมากกว่าวัสดุอื่น (4.41 log CFU/g) วัสดุ BLC ให้ประชากรแบคทีเรียสูงกว่า PC แต่มีอัตราการลดลงของประชากรใกล้เคียงกัน ส่วนวัสดุที่คงจำนวนประชากรได้ดีที่สุดคือ MMC ถึงแม้ว่าปริมาณเชื้อจะมีแนวโน้มลดลงแต่ MMC เป็นวัสดุที่ทำให้เชื้อมีความอยู่รอดได้นานและสูงที่สุด โดยจำนวนประชากรที่ระยะการบ่มที่ 30 และ 90 วัน ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (7.42 และ 7.32 log CFU/g ตามลำดับ) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกวัสดุ MMC เพื่อนำไปผลิตเป็นต้นแบบชีวภัณฑ์ของ BPAs17 แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการลดอาร์เซนิกในดินสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ต้นแบบในการลดปริมาณอาร์เซนิกในดิน

จากการทดลองข้างต้น ได้คัดเลือกแบคทีเรีย BPAs17 และวัสดุ MMC มาผลิตเป็นต้นแบบชีวภัณฑ์ แล้วนำชีวภัณฑ์ไปทดสอบประสิทธิภาพในการลดอาร์เซนิกในดิน ตัวอย่างดินที่ทดสอบได้นำมาเพิ่มปริมาณอาร์เซนิกให้มีความเข้มข้นในดินเริ่มต้นที่ 50 mg/kg ด้วยสารละลาย $NaAsO_2$ ทำการบ่มดินเป็นระยะเวลา 30 วัน ผลการทดสอบ พบว่า ที่ระยะเวลาการบ่ม 7 วัน กรรมวิธีที่ปรับ pH ดินและผสมเชื้อบ่มทำให้ค่า As ลดลงได้มากที่สุดเหลือเพียง 24.7 mg/kg (ลดลง -50.6%) (Figure 4) ส่วนอีกสามกรรมวิธีนั้น คือการไม่ปรับ pH ไม่ใส่เชื้อ, ไม่ปรับ pH ใส่เชื้อ BPAs17 และ ปรับ pH ไม่ใส่เชื้อ BPAs17

Table 2. Population of BPAs17 in 3 types of carriers after 15, 30 and 90 days of incubation

Carriers	BPAs 17 population (CFU/g)		
	15 days	30 days	90 days
BLC[1]	9.00×10^7b	1.82×10^7b	9.00×10^5b
PC[2]	1.05×10^7c	0.35×10^7c	0.26×10^5c
MMC[3]	1.65×10^8a	2.62×10^7a	2.10×10^7a
CV (%)	0.74	0.22	0.30

[1]biochar + leonardite (1:1 V/V); [2]perlite; [3]mixed media: coconut husk compost: peat moss 1:1 V/V plus 5% dolomite

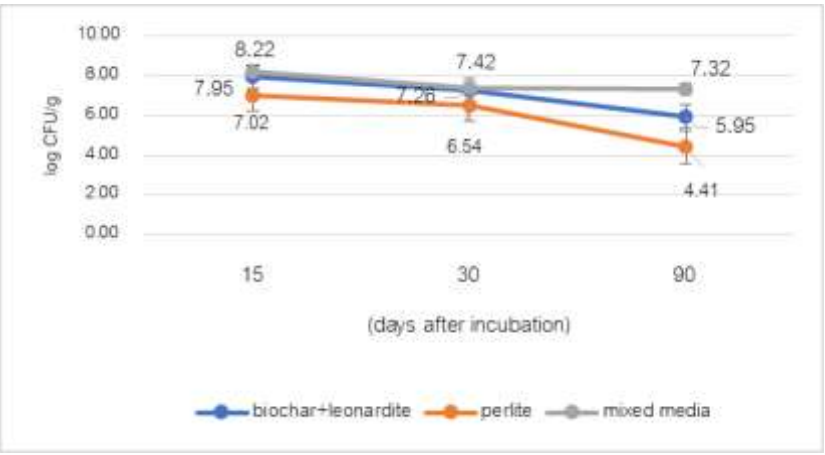

Figure 3. Population of BPAs17 (log CFU/g) in 3 types of carriers after 15, 30 and 90 days of incubation

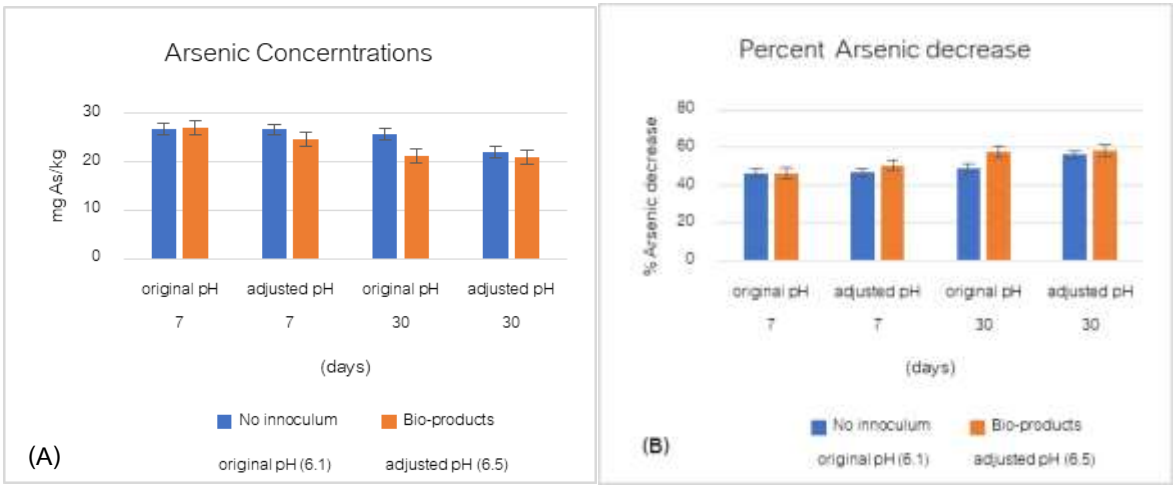

Figure 4. Efficiency of bio-product prototype using BPAs17 in reduction of arsenic concentration (A) and percent reduction in soils after 30 days of incubation (B)

ให้ค่าลดลงที่ใกล้เคียงกัน คือ 26.7, 26.9 และ 26.62 mg/kg คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลง เท่ากับ -46.6, -46.2, และ -46.7 ตามลำดับ (Figure 4) ผลการทดลองที่ระยะ 30 วัน เป็นไปในทำนองเดียวกับที่ระยะ 7 วัน โดยพบว่าการไม่ปรับ pH ไม่ใส่เชื้อ ทำให้ As ลดลงน้อยที่สุดคือเหลือ 25.6 mg/kg (-48.9%) กรรมวิธีปรับ pH ใส่เชื้อ BPAs17 ทำให้ As ในดินเหลือเพียง 20.8 mg/kg (-58.5%) ส่วนอีกสองกรรมวิธี คือ การปรับ pH ไม่ใส่เชื้อ และไม่ปรับ pH ใส่เชื้อ BPAs17 ทำให้ค่า As ในดินเหลือ 21.9 และ 21.1 mg/kg คิดเป็นค่าที่ลดลงเท่ากับ -56.1 และ -57.8% ตามลำดับ

วิจารณ์

จากผลการวิเคราะห์ดินที่ทำเกษตรกรรมในเขตพื้นที่สูงทางภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าอาร์เซนิกเป็นโลหะหนักที่พบว่ามีการปนเปื้อนสูงและพบมากกว่าโลหะหนักชนิดอื่น และมีความเสี่ยงสูงในการปนเปื้อนในพืชที่ปลูกในพื้นที่ดังกล่าว (Shutsrirung, 2012) ดังนั้นการบำบัดสารอาร์เซนิกที่ปนเปื้อนจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนเพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ การใช้จุลินทรีย์เป็นทางเลือกที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในวิธีการบำบัดมลพิษทางชีวภาพ เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่าวิธีการอื่นและไม่ก่อให้เกิดสารมลพิษทุติยภูมิ ในการทดลองครั้งนี้ได้นำ แบคทีเรีย BPAs17 และ เชื้อรา FPAs24 ที่มีความสามารถต้านทานอาร์เซนิกสูงมาทดสอบประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษของอาร์เซนิกในดิน การลดความเป็นพิษของอาร์เซนิกในดินเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidations และ reduction ของจุลินทรีย์ดิน ซึ่งมีงานวิจัยพบว่า ทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย ที่ทนอาร์เซนิกได้สูงมีศักยภาพในการลดสารพิษและโลหะหนักได้ (Bučková *et al*., 2007; Katsoyiannis *et al*., 2002) ถึงแม้ว่าอาร์เซนิก จะไม่สามารถถูกกำจัดออกจากแหล่งปนเปื้อนได้ง่ายนัก แต่สามารถถูกตรึง และ/หรือ เปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษน้อยลงได้ อย่างไรก็ตามอาร์เซนิกยังสามารถถูกรีดิวซ์ให้เป็น สารประกอบระเหย (volatile compounds) คือ arsine (AsH_3) และ methyl-arsines (Naher *et al*., 2015) และอาจส่งผลให้ลดความเข้มข้นของอาร์เซนิกในดินได้

ปฏิกิริยารีดอกซ์ของอาร์เซนิกในดินโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นเพื่อลดความเป็นพิษ และ/หรือ สร้างพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ กลไกลดความเป็นพิษของอาร์เซนิกในดินกลไกหนึ่งก็คือ การเปลี่ยนรูป As (III) ให้เป็น As (V) เพื่อให้มีความเป็นพิษน้อยลง (Naher *et al*., 2015) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในการทดลองนี้เมื่อมีการใส่จุลินทรีย์ในดินทำให้มีกิจกรรมการเปลี่ยนรูปอาร์เซนิกมากขึ้น เมื่อประกอบกับค่า pH ของดินที่ต่ำ (5.0) ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ค่าการละลายของโลหะหนักเพิ่มขึ้น

(Wisawapipat, 2012) และอาจเป็นปัจจัยร่วมกันที่ส่งผลให้อาร์เซนิกมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (6.3%) (Figure 2) อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่า การใช้ MMC ซึ่งเป็นวัสดุอินทรีย์ผลิตชีวภัณฑ์ ทำให้จุลินทรีย์มีแหล่งคาร์บอนและมีธาตุอาหารที่เหมาะสม ส่งผลให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีกว่าวัสดุอื่น ๆ (Figure 3) การปรับ pH ของดินเพียงอย่างเดียวผสมชีวภัณฑ์ไม่ใส่เชื้อ (pH 6.0) สามารถลดปริมาณอาร์เซนิกได้มากถึง -46.7% (Figure 4) แสดงให้เห็นว่าชีวภัณฑ์ที่ใส่ในอัตรา 1:5 มีแนวโน้มทำให้อาร์เซนิกในดินเจือจางลงได้มาก ดังนั้นควรมีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของอาร์เซนิกในชีวภัณฑ์ก่อนทำการทดลองด้วย นอกจากนี้ชีวภัณฑ์ที่ใช้เป็นวัสดุอินทรีย์จึงอาจมีผลในการดูดซับอาร์เซนิกได้ จากผลการทดลองของ Feng *et al.* (2013) แสดงให้เห็นว่า ตัวแปรของการดูดซับอาร์เซนิกมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear relationship) กับอินทรียวัตถุในดิน และ เขาสรุปว่าอินทรียวัตถุมีอิทธิพลสูงสุดต่อการดูดซับอาร์เซนิกเมื่อเทียบกับสมบัติของดินด้านอื่น ๆ นอกจากอินทรียวัตถุในดินแล้วความเข้มข้นและชนิดของสารประกอบอาร์เซนิก (arsenic species) ได้รับอิทธิพลจากค่า pH (Mandal and Suzuki, 2002) และค่าการละลายของอาร์เซนิกจะลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีพิษต่อแบคทีเรียน้อยลงด้วย Shutsrirung (2003) สรุปว่าแบคทีเรียไรโซเบียมในกลุ่ม Bj-A มีกลไกปลดปล่อยสารประกอบด่างในจานอาหาร (สังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของ indicator ที่ผสมในอาหาร) เพื่อเพิ่มค่า pH ของสภาพแวดล้อมให้มีความเป็นพิษน้อยลงและทำให้ไรโซเบียมกลุ่มนี้เจริญเติบโตได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่สามารถผลิตสารประกอบด่างได้ Wisawapipat (2012) กล่าวว่า pH ของดินเป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการเคลื่อนที่ของธาตุอาหารหรือสารมลพิษในดิน เมื่อดินอยู่ในสภาพที่เป็นกรดไฮโดรเจนไอออน (H^+) ในดินจะมีการแข่งขันกับโลหะหนักในดิน ส่งผลให้ดินดูดซับโลหะหนักได้ต่ำลง และทำให้โลหะหนักละลายมากขึ้น ดังนั้นการใช้วัสดุปูนเพื่อเพิ่มค่า pH ของดินจึงเป็นกลไกหนึ่งในการตรึงโลหะหนักในดิน โดยการทำให้โลหะดังกล่าวตกตะกอนกับสารจำพวกคาร์บอเนตหรือหมู่ไฮดรอกซิล การใส่ปูนเพื่อยกระดับ pH จึงเป็นการบำบัดอาร์เซนิกในดินที่ง่าย สะดวกและมีต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ พบว่า การใช้ชีวภัณฑ์ที่มีการผสมเชื้อแบคทีเรีย BPAs17 ร่วมกับการใส่ปูนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการลดความเป็นพิษของอาร์เซนิกได้มากขึ้น โดยทำให้อาร์เซนิกในดินลดลงถึง -58.5% หลังการบ่ม 30 วัน นอกจากนี้ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะมีกิจกรรมสูงหรือทำงานเต็มประสิทธิภาพเมื่อดินมี pH ค่อนข้างเป็นกลางและไม่เป็นกรดจัด (Vidali, 2001) จากการรายงานของ Ojuederie and Babalola (2017) ได้กล่าวว่ามีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย รา และสาหร่าย ในการบำบัดการปนเปื้อนของโลหะหนัก (อาร์เซนิก โครเมียม และแคดเมียม) ได้ผลดีทั้งในดินและในน้ำ ผลการทดลองของ Pinter et al. (2017) พบว่า นอกจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus* และ *Pseudomonas fluorescens* จะสามารถต้านทานและลดความเป็นพิษของอาร์เซนิกแล้ว ยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอื่น ๆ และยังสามารถเพิ่มชีวมวลของต้นอ่อนในสภาพที่มีความเข้มข้นของอาร์เซนิกสูงได้อีกด้วย จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ดินที่ปนเปื้อนอาร์เซนิกและมีปัญหาดินกรดควรมีการใส่ปูนเพื่อยกระดับ pH ให้เหมาะสมและควรใช้ชีวภัณฑ์ผสมจุลินทรีย์ต้านทานอาร์เซนิกเสริมเพื่อรับประกันความเสี่ยงในการปนเปื้อนของอาร์เซนิกในผลผลิตพืช อย่างไรก็ตามควรมีการนำชีวภัณฑ์ไปทดสอบในภาคสนามเพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของอาร์เซนิกในดินและในพืชด้วย

สรุป

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ต้านทานอาร์เซนิกสูงที่แยกได้จากดิน 2 ไอโซเลท คือ แบคทีเรีย BPAs17 และ เชื้อรา FPAs24 พบว่า การปรับ pH ดินผสมเชื้อ BPAs17 ทำให้ค่า As ลดลงจากค่าเริ่มต้นมากที่สุด จึงได้เลือก BPAs 17 มาบ่มในวัสดุรองรับสามชนิด สามารถคัดเลือกวัสดุ MMC ซึ่งให้จำนวนประชากรที่คงอยู่ของ BPAs17 ได้มากที่สุด จึงได้นำไปผลิตเป็นต้นแบบชีวภัณฑ์ (MMC + BPAs17) แล้วนำชีวภัณฑ์ไปทดสอบประสิทธิภาพในการลดอาร์เซนิกในดินผลการทดสอบ

แสดงให้เห็นชัดเจนว่า กรรมวิธีปรับ pH ใส่ชีวภัณฑ์ BPAs17 ทำให้ As ในดินเหลือเพียง 20.8 mg/kg (-58.5%) ดังนั้นชีวภัณฑ์ต้นแบบนี้จึงมีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

Bučková, M., J. Godočíková and B. Polek. 2007. Responses in the mycelial growth of *Aspergillus niger* isolates to arsenic contaminated environments and their resistance to exogenic metal stress. Journal of Basic Microbioly 47(4): 295-300.

Center of Excellence on Hazardous Substance Management. 2007. Study of heavy metals contents in soil and sugarcane grown in central, northern and north-eastern. Final report. Chulalongkorn University, Bangkok. 98 p. (in Thai)

Duangpatra, P. 2010. Soil Conditioners. Kasetsart University Press, Bangkok. 256 p. (in Thai)

Feng, Q., Z. Zhang, Y. Chen, L. Liu, Z. Zhang and C. Chen. 2013. Adsorption and desorption characteristics of arsenic on soils: kinetics, equilibrium, and effect of $Fe(OH)_3$ colloid, H_2SiO_3 colloid and phosphate. Procedia Environmental Sciences 18: 26-36.

Katsoyiannis, I., A. Zouboulis, H. Althoff and H. Bartel. 2002. As(III) removal from groundwaters using fixed-bed upflow bioreactors. Chemosphere 47(3): 325-332.

Khummalai, N., S. Jarudilokkul and V. Boonamnuayvitaya. 2000. Bioremediation of arsenic contaminated soil in the southern of Thailand. Pp. 349-360. *In:* Proceedings of the 10th Thai Institute of Chemical Engineering and Applied Chemistry. BITEC, Bangkok. (in Thai)

Kremer, R.J. and H.L. Peterson. 1983. Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. Applied and Environmental Microbiology 45(6): 1790-1794.

Land Development Department. 2010. Handbook of Soil Chemical Analysis. Document No. OSD-03. Land Development Department, Bangkok. 51 p. (in Thai)

Mandal, B.K. and K.T. Suzuki. 2002. Arsenic round the world: a review. Talanta 58(1): 201-235.

Matschullat, J. 2000. Arsenic in the geosphere - a review. Science of the Total Environment 249: 297-312.

Naher, U.A., F. Rahman, S.M.M. Islam, M.I.U. Sarkar and J.C. Biswas. 2015. Isolation of arsenic oxidizing-reducing bacteria and reclamation of As(III) in *in vitro* condition. Bangladesh Rice Journal 19(2): 99-101.

Nateewattana, J. 2012. Technology used for environmental arsenic remediation. Naresuan Phayao Journal: Health Science, Science and Tachnology 5(3): 258-270. (in Thai)

Ojuederie, O.B. and O.O. Babalola. 2017. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. International Journal of Environmental Research and Public Health 14(12): 1504, doi:10.3390/ijerph14121504.

Pollution Control Department. 1998. Arsenic. Integrated Promotion Technology Company, Bangkok. 52 p. (in Thai)

Pinter I.F., M.V. Salomon, F. Berli, R. Bottini and P. Piccoli. 2017. Characterization of the As(III) tolerance conferred by plant growth promoting rhizobacteria to *in vitro*-grown grapevine. Applied Soil Ecology 109: 60-68.

Sharma, V.K. and M. Sohn. 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. Environmental International 35(4): 743-759.

Shutsrirung, A. 2003. Characterization of native bradyrhizobia in soybean-growing areas of northern Thailand. Ph.D. Thesis. Mie University, Mie, Japan. 150 p.

Shutsrirung, A. 2012. Selection of microorganism in highland for soil quality improvement in acid and high arsenic soils. Final report. Highland Research and Development Institute (Public Organization), Chiang Mai. 56 p. (in Thai)

Shutsrirung, A. 2015. Research and development of bio-substances for reducing toxicity of residue substances in soils. Final report. Highland Research and Development Institute (Public Organization), Chiang Mai. 60 p. (in Thai)

Shutsrirung, A. 2016. Research and development of bio-substances for reducing toxicity of residue substances in soils. Final report. Highland Research and Development Institute (Public Organization), Chiang Mai. 70 p. (in Thai)

Toxicology Information Center. 2002. Danger and toxicity of arsenic. (Online). Available: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_txR_search.asp?info_id=121 (April 8, 2017). (in Thai)

Vidali, M. 2001. Bioremediation: an overview. Pure and Applied Chemistry 73(7): 1163-1172.

Wisawapipat, W. 2012. Remediation technologies of heavy contaminated soils using phosphate materials. Khon Kaen Agriculture Journal 40(4): 373-378. (in Thai)

Woodruff, C.M. 1948. Determination of the exchangeable hydrogen and lime requirement of the soil by means of the glass electrode and a buffer solution. Soil Science Society of America Proceedings 12: 141-142.

การประเมินการกร่อนดินและการสูญเสียธาตุอาหารภายใต้มาตรการอนุรักษ์ดินและน้ำในพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น

Assessing Soil Erosion and Nutrient Losses Under Soil and Water Conservation Measures in Maize Plantation, Khao Suan Kwang District, Khon Kaen Province

ธวัชชัย อินทร์บุญช่วย[1*] บุณฑริก ฉิมชาติ[2] จุฑารัตน์ มนูญโย[1] และ ศิริสุดา บุตรเพชร[1]

Tawatchai Inboonchuay[1*], Boontarik Chimchart[2], Jutarat Manoonyo[1] and Sirisuda Bootpetch[1]

[1]ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[1]Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2]กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[2]Soil Science Research Group, Agricultural Production Science Research and Development Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand

**Corresponding author: Email: fagrtci@ku.ac.th*

(Received: 8 November 2018; Accepted: 31 January 2019)

Abstract: A study on assessing erosion and nutrient losses under soil and water conservation measures in maize plantation of Khao Suan Kwang, Khon Kaen. The experiment was randomized complete block design with 4 replications and 7 treatments. The results revealed that among treatments were no significant differences in bulk density and saturated hydraulic conductivity of soils. The application of chemical fertilizer based on soil analysis with soybean, vetiver grass and mycorrhiza treatment was highest available water capacity of soil (14.92%). While the lowest value was obtained from farmer's practice (7.49%). The application of chemical fertilizer based on soil analysis with soybean, vetiver grass and mycorrhiza treatment induced lowest runoff (22.75 m^3/rai) , sediment (0.15 ton/rai) and nutrient losses (N = 0.011 P = 0.0039 and K = 0.0046 kg/rai). For economic value of soil erosion by water, the farmer's practice treatment had highest costs of erosion based on nutrient losses (21.98 baht/rai/ growing season). The application of chemical fertilizer based on soil analysis with soybean, vetiver grass and mycorrhiza treatment gave highest weight of ear (668.42 kg/rai), husks (117.33 kg/rai), cobs (88.89 kg/rai) and grains of maize (579.11 kg/rai). While the farmer practice tended to give the lowest of yield. Additionally, the application of chemical fertilizer based on soil analysis with soybean, vetiver grass and mycorrhiza treatment gave the highest concentration of nitrogen, phosphorus, and potassium in stems (1.83, 0.26 and 0.41%), leaves (1.16, 0.34 and 0.55%), husks (0.55, 0.34 and 0.31%), cobs (0.93, 0.18 and 0.35%) and grains of maize (1.47, 0.84 and 0.33%). Besides, the chemical fertilizer application based on soil analysis with soil and water conservation measures had the effect on increasing of organic matter and plant nutrient availability of the soil with compared to farmer practice. Therefore, maize plantations under soil and water

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

conservation measures are suitable systems which can reduce erosion and also the losses of nutrients by erosion in the upland maize plantation.

Keywords: Erosion, soil conservation, economic value, maize, upland soil

บทคัดย่อ: ศึกษาการประเมินการกร่อนดินและการสูญเสียธาตุอาหารภายใต้มาตรการอนุรักษ์ดินและน้ำในพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ใน อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ 7 ตำรับการทดลอง พบว่า ความหนาแน่นรวมของดินและค่าสัมประสิทธิ์การนำน้ำที่อิ่มตัวด้วยน้ำทุกตำรับการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา ส่งผลให้ค่าความจุน้ำใช้ประโยชน์ได้มีค่าสูงที่สุด (14.92%) ขณะที่วิธีปฏิบัติของเกษตรกรมีค่าต่ำที่สุด (7.49%) การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝกและปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา ส่งผลให้มีปริมาณน้ำไหลบ่า (22.75 ลูกบาศก์เมตร/ไร่) ตะกอน (0.15 ตัน/ไร่) และการสูญเสียธาตุอาหารต่ำที่สุด (N = 0.011 P = 0.0039 และ K = 0.0046 กิโลกรัม/ไร่) มูลค่าการสูญเสียทางเศรษฐศาสตร์จากการกร่อนดินพบว่าวิธีปฏิบัติของเกษตรกรมีการสูญเสียสูงที่สุด (21.98 บาท/ไร่/ฤดูปลูก) ด้านผลผลิตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พบว่า การใส่ปุ๋ยเคมีร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซามีผลให้น้ำหนักฝัก (668.42 กิโลกรัม/ไร่) เปลือก (117.33 กิโลกรัม/ไร่) ซัง (88.89 กิโลกรัม/ไร่) เมล็ด (579.11 กิโลกรัม/ไร่) และความเข้มข้นของธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่สะสมอยู่ในลำต้น (1.83 0.26 และ 0.41%) ใบ (1.16 0.34 และ 0.55%) เปลือก (0.55 0.34 และ 0.31%) ซัง (0.93 0.18 และ 0.35%) และเมล็ด (1.47 0.84 และ 0.33%) ของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สูงที่สุด นอกจากนี้ การใส่ปุ๋ยเคมีร่วมกับการอนุรักษ์ดินแบบต่าง ๆ มีผลให้ปริมาณอินทรียวัตถุในดินและธาตุอาหารพืชที่เป็นประโยชน์สูงกว่าวิธีปฏิบัติของเกษตรกร ดังนั้น การปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ภายใต้มาตรการอนุรักษ์ดินและน้ำบนพื้นที่ดอนสามารถลดการกร่อนดินและการสูญเสียธาตุอาหารได้

คำสำคัญ: การกร่อน การอนุรักษ์ดิน มูลค่าทางเศรษฐศาสตร์ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ดินดอน

คำนำ

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เป็นอย่างมาก ในปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดประมาณ 6.71 ล้านไร่ ผลผลิต 5.03 ล้านตัน และผลผลิตเฉลี่ย 676 กิโลกรัม/ไร่ ในขณะที่ความต้องการตลาดเฉลี่ยปีละ 7.95 ล้านตัน ดังนั้น ตลาดต้องการเพิ่มอีกถึง 2.92 ล้านตัน เนื่องจากภาคอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ยังคงขยายตัวเพิ่มขึ้น ทำให้ความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพื่อเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์เพิ่มขึ้น (Office of Agricultural Economics, 2017) พื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อยู่ในภาคเหนือประมาณร้อยละ 47 รองลงมาเป็นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ร้อยละ 28 และภาคกลางร้อยละ 25 มีพื้นที่ราบที่เหมาะสมกับการเพาะปลูกไม่เพียงพอต่อความต้องการเกษตรกรส่วนใหญ่จึงต้องใช้พื้นที่ภูเขาในการเพาะปลูก ซึ่งปัญหาที่เกษตรกรส่วนใหญ่พบเหมือนกันคือ ผลผลิตต่อไร่ต่ำ โดยเฉพาะในพื้นที่ดอนและพื้นที่ลาดชัน เนื่องจากประสบปัญหาหน้าดินถูกชะล้าง ส่งผลให้ผลิตภาพดิน (soil productivity) ลดลงอย่างรวดเร็ว (Lal, 2001; Lobo *et al.,* 2005) และยังไม่มีแผนในการแก้ไขปัญหา (Ekasing *et al.,* 2001) การสูญเสียดินจากการกร่อนเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นแพร่หลายทั่วโลก และมีผลกระทบต่อผลิตภาพของระบบนิเวศธรรมชาติและการเกษตร (Pimentel, 2006) การสูญเสียธาตุอาหารเนื่องจากการไหลบ่าและการกร่อนดินเป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมโทรมของพื้นที่เกษตร (Bertol *et al.,* 2003) ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส คาร์บอนอินทรีย์ โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และโซเดียมเป็นธาตุอาหารหลักที่ถูกพัดพาโดยการไหลบ่าและการกร่อนของดิน (Hidayat

et al., 2012) นอกจากนี้ ยังทำให้โครงสร้างของดินถูกทำลาย ส่งผลให้ความสามารถในการกักเก็บน้ำและความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลงตามไปด้วย (Cerdá, 2007) โดยทั่วไปการเพาะปลูกพืชเชิงเดี่ยวบนพื้นที่ลาดชันโดยไม่มีมาตรการอนุรักษ์ดินและน้ำและการจัดการดินที่เหมาะสม จะมีปริมาณการสูญเสียดินต่อปีสูงถึง 20 ตัน/ไร่/ปี (Land Development Department, 2011) ทั้งนี้มีงานวิจัยที่ได้ชี้ให้เห็นผลกระทบจากการปลูกข้าวโพดเชิงเดี่ยวในพื้นที่ลาดชัน เป็นเวลานานจะส่งผลให้ระบบนิเวศเสื่อมโทรม เกิดภัยแล้ง หน้าดินขาดความอุดมสมบูรณ์ โรคแมลงระบาดมากขึ้น เส้นทางน้ำตื้นเขิน รวมถึงส่งผลต่อสภาพสังคมของชุมชนในพื้นที่คือ ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น จึงทำให้หลายประเทศมีการศึกษาระบบการปลูกพืชเพื่อการอนุรักษ์ดินโดยเฉพาะกลุ่มประเทศในทวีปแอฟริกา เช่น บอตสวานา และไนจีเรีย มีการปลูกข้าวโพด ข้าวไร่ และข้าวฟ่าง แล้วปลูกพืชวงศ์ถั่วแซมระหว่างแถวพืชหลัก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในประเทศบราซิล และประเทศจีน เป็นที่ยอมรับกันว่าการใช้พืชวงศ์ถั่วในระบบการปลูกพืชทั้งในรูปของการปลูกพืชหมุนเวียน การปลูกเป็นพืชแซม และการปลูกเป็นปุ๋ยพืชสด จะช่วยให้พืชหลักมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตสูงขึ้น (Kaewkunya *et al.,* 2018) โดย Lima *et al.* (2018) พบว่าการปลูกข้าวโพดในบราซิล แซมด้วยถั่วพร้ามีการสูญเสียตะกอนดินน้อยกว่าการปลูกพืชเชิงเดี่ยว นอกจากนี้ Takim (2012) รายงานถึงข้อได้เปรียบของการปลูกพืชแซมข้าวโพด-ถั่วพุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกพืชเดี่ยวคือสามารถลดจำนวนวัชพืช และเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ที่ดิน ในขณะที่ Kasivivat *et al.* (2004) พบว่า การปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์คลุมด้วยปุ๋ยอินทรีย์ซากพืช ให้ผลผลิตข้าวโพดเฉลี่ยสูงสุด และพบว่าเมื่อมีการปลูกหญ้าแฝกกั้นเป็นแนวระดับช่วยลดการพังทลายของดิน และสามารถเก็บกักความชื้นในดินได้ดี นอกจากพืชวงศ์ถั่วแล้ว การใช้หญ้าแฝกในระบบอนุรักษ์ดินและน้ำในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์แพร่ขยายไปกว่า 120 ประเทศ เนื่องจากเป็นพืชที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ดี ช่วยลดการสูญเสียดิน และช่วยรักษาความชื้นในดิน (Greenfield, 1990) ในไนจีเรีย พบว่าข้าวโพดที่ปลูกเป็นพืชเดียวต่อเนื่อง 5 ปี โดยมีการปลูกหญ้าแฝกป้องกันการกร่อนดินร่วมในระบบ ทำให้ผลผลิตข้าวโพดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นร้อยละ 49.1 เปรียบเทียบกับการไม่มีหญ้าแฝก (Babalola *et al.,* 2005) และยังมีรายงานอื่นที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพเชิงบวกของหญ้าแฝกในระบบการปลูกพืช (Grimshaw, 1993; Levan and Truong, 2003; Oshunsanya, 2013; Sukhkasem *et al.,* 2017; Xia *et al.,* 1996) การใช้มาตรการอนุรักษ์ดินที่มีความเหมาะสมต่อพื้นที่จะช่วยลดปัญหาการกร่อนได้ ซึ่งนอกจากมาตรการดังกล่าว ยังพบว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีบทบาทต่อการรักษาโครงสร้างของดินให้มีความคงทนต่อการกร่อนดินได้เช่นเดียวกัน เนื่องจาก เส้นใยนอกรากพืชของรามีการแพร่กระจายอย่าง หนาแน่นในดิน จึงสามารถรักษาโครงสร้างดินให้มี ความคงทนแข็งแรงได้ดี (Bedini *et al.,* 2009; Poomipan, 2013)

ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณการกร่อนดิน การไหลบ่า ปริมาณธาตุอาหารในตะกอนดิน ผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ รวมทั้งประเมินมูลค่าการสูญเสียทางเศรษฐศาสตร์ จากผลกระทบของการกร่อนดินภายใต้มาตรการอนุรักษ์ดินและน้ำในพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดมาตรการอนุรักษ์ดินและน้ำที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่และพืชที่ปลูกเพื่อลดความเสื่อมโทรมของทรัพยากรดินลดผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อม และนำไปสู่การใช้ที่ดินเพื่อการเกษตรกรรมได้อย่างยั่งยืนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แปลงทดลองตั้งอยู่ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรขอนแก่น บ้านคำม่วง ต.คำม่วง อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น พิกัดที่ตั้ง 16° 51' N 102° 51' E ความสูง 210 เมตรจากระดับน้ำทะเล มีสภาพภูมิประเทศเป็นพื้นที่ลูกคลื่นลอนลาด (undulating) มีความลาดเทเฉลี่ย 4.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดดินวาริน (Typic Kandiustults) ลักษณะเนื้อดินเป็นดินทรายปนดินร่วน เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงกันยายน 2560 ขนาดแปลงกว้าง × ยาว เท่ากับ 4×5 เมตร จำนวน 28 แปลงย่อย และเพื่อป้องกันน้ำไหลบ่าจากแปลงข้างเคียง

จึงทำการฝังแผ่นสังกะสีล้อมรอบขอบแปลงในแต่ละแปลงย่อย โดยมีความสูงเหนือผิวดิน 30 เซนติเมตร ด้านท้ายแปลงทำการก่ออิฐสูง 30 เซนติเมตร และต่อท่อรองรับน้ำไหลบ่าไปยังบ่อดักตะกอน วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) ประกอบด้วย 7 ตำรับการทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ ได้แก่ 1) วิธีปฏิบัติของเกษตรกร (FP) 2) ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน (IF) (30-5-10: N-P_2O5-K_2O กก /ไร่ (Department of Agriculture, 2005) 3) ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง (IF+SB) 4) ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกหญ้าแฝก (IF+VG) 5) ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกหญ้าแฝก และใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา (IF+VG+AMF) 6) ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง และหญ้าแฝก (IF+SB+VG) 7) ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลืองหญ้าแฝกและใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา (IF+SB+VG+AMF)

ปลูกหญ้าแฝกในช่วงฤดูฝนเพื่อการอนุรักษ์ดินและน้ำ โดยปลูกเป็นแถวตามแนวอิฐบล็อคด้านท้ายแปลง ปลูกห่างจากอิฐบล็อคระยะ 15 เซนติเมตร ปลูกหญ้าแฝกให้แต่ละต้นห่างกัน 5 เซนติเมตร ปลูก 2 แถวให้ขนานกับแนวแรกโดยมีระยะระหว่างแถว 30 เซนติเมตร เตรียมเมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูก โดยคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม จากนั้นปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 ลักษณะแถวเดี่ยว ระยะปลูกต้น x แถว เท่ากับ 75 x 25 เซนติเมตร ตำรับการทดลองที่มีการปลูกถั่วเหลือง ให้ปลูกถั่วเหลืองในแถวเดียวกันกับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์โดยแทรกถั่วเหลืองระหว่างต้นข้าวโพด ปลูก 3 ต้นต่อหลุม สำหรับการใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน (30-5-10: N-P_2O_5-K_2O กิโลกรัม/ไร่) โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ได้แก่ ปุ๋ยรองพื้น และครั้งที่ 2 เมื่อข้าวโพดอายุประมาณ 2 เดือน โดยวิธีโรยข้างแถวของข้าวโพด ขณะที่ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา โดยใส่รองพื้นพร้อมปลูกแฝกอัตรา 2 กรัมต่อต้น เก็บข้อมูลตัวอย่างตะกอนดินและวัดปริมาณน้ำไหลบ่าผิวดินในบ่อดักตะกอนดินในช่วงที่มีฝนตก สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตลอดฤดูปลูก และนำตัวอย่างตะกอนดิน ไปวิเคราะห์เพื่อคำนวณหาปริมาณธาตุอาหารพืชหลักที่สูญเสีย จากนั้นเก็บเกี่ยวผลผลิต ข้าวโพดที่อายุประมาณ 120 วัน พื้นที่เก็บเกี่ยวกว้าง × ยาว เท่ากับ 3×3 เมตร สุ่มเก็บตัวอย่าง 8 ต้นต่อแปลงย่อย โดยตัวอย่างส่วนเหนือดิน แยกเป็น 5 ส่วน คือ เมล็ด ซัง เปลือก ลำต้นและใบของข้าวโพด ในแต่ละตำรับการทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เพื่อประเมินความเข้มข้นของธาตุอาหารในองค์ประกอบผลผลิต เก็บตัวอย่างดินหลังปลูกทุกแปลงย่อย ประกอบด้วย ตัวอย่างดินที่ถูกรบกวน (disturbed soil sample) เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี โดยใช้วิธีมาตรฐาน (Nation Soil Survey Center, 1996) ประกอบด้วย การกระจายของอนุภาคดิน โดยวิธีไปเปตต์ ความหนาแน่นรวม โดยวิธี core method พีเอชดิน โดยใช้อัตราส่วนดินต่อน้ำ เท่ากับ 1:1 สภาพการนำไฟฟ้า (electrical conductivity: EC_e) วัดในสารละลายดินที่สกัดจากดินซึ่งอิ่มตัวด้วยน้ำ (saturation extract) คาร์บอนอินทรีย์ โดยวิธี Walkley and Black titration อินทรียวัตถุ คำนวณจากคาร์บอนอินทรีย์คูณด้วย 1.724 ไนโตรเจนรวม โดยวิธี Kjeldahl method ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โดยวิธี Bray II โพแทสเซียมและเบสที่แลกเปลี่ยนได้โดยสกัดด้วย 1 M NH_4OAc pH 7.0 ความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน โดยการชะแคตไอออน ด้วยสารละลาย 1 M NH_4OAc pH 7.0 และตัวอย่างดินที่ไม่ถูกรบกวน (undisturbed soil sample) โดยใช้กระบอกเก็บตัวอย่างดิน (soil core) เก็บที่ระดับความลึก 0-20 เซนติเมตร เพื่อนำมาวิเคราะห์สมบัติดิน ได้แก่ ความหนาแน่นรวมของดิน สภาพนำน้ำขณะดินอิ่มตัวด้วยน้ำ และความจุน้ำใช้ประโยชน์

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ โดยวิธี ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ขึ้นไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสูญเสียดินและน้ำไหลบ่า

การสูญเสียดินและปริมาณน้ำไหลบ่าผิวดินแต่ละตำรับการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) โดยการสูญเสียดินในแต่ละตำรับการทดลองพบว่าวิธีปฏิบัติของเกษตรกร มีการสูญเสียดินมากที่สุด (0.68 ตัน/ไร่) ไม่แตกต่างกับการใส่ปุ๋ยตามค่า

Table 1. Effects of soil conservation measures combined with IF on runoff and soil loss

Treatments	Runoff (m^3/rai)	Soil loss (ton/rai)
Farmer practices	50.45[a]	0.68[a]
Fertilizer based on soil analysis	48.37[a]	0.61[b]
Fertilizer based on soil analysis +Soybean	39.21[b]	0.38[c]
Fertilizer based on soil analysis +Vetiver grass	29.23[c]	0.21[d]
Fertilizer based on soil analysis +Vetiver grass + Mycorrhizal biofertilizer	28.00[cd]	0.22[d]
Fertilizer based on soil analysis +Soybean + Vetiver grass	25.65[d]	0.16[e]
Fertilizer based on soil analysis +Soybean + Vetiver grass+ Mycorrhizal biofertilizer	22.75[e]	0.15[e]
F-test	**	**
CV (%)	24.9	19.1

[1]Means within the same column followed by the same letter indicated no statistical difference using by DMRT
** indicated significant difference at $P<0.01$

วิเคราะห์ดิน (0.61 ตัน/ไร่) รองลงมาคือการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลืองเท่ากับ 0.38 ตัน/ไร่ ขณะที่การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา (T7) มีน้ำหนักตะกอนดินน้อยที่สุด คือ 0.15 ตัน/ไร่ มีการสูญเสียดินน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ อย่างไรก็ดี ปริมาณ การสูญเสียดินทุกตำรับการทดลองอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (< 2.5 ตัน/ไร่/ปี) เมื่อเทียบกับเกณฑ์ของกรมพัฒนาที่ดิน (Land Development Department, 2000) ปริมาณน้ำไหลบ่าผิวดินจากแปลงทดลอง พบว่าวิธีปฏิบัติของเกษตรกร มีปริมาณน้ำไหลบ่ามากที่สุด เท่ากับ 50.45 ลูกบาศก์เมตร/ไร่ รองลงมาคือการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน เท่ากับ 48.37 ลูกบาศก์เมตร/ไร่ การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซามีปริมาณน้ำไหลบ่าน้อยที่สุด คือ 22.75 ลูกบาศก์เมตร/ไร่ สังเกตได้ว่าตำรับการทดลองที่มีการปลูกหญ้าแฝก มีแนวโน้มให้ปริมาณการสูญเสียดินและปริมาณน้ำไหลบ่าผิวดินลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน (Anecksamphant *et al.,* 1994; Kittiwirote and Kongkaew, 2007) ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Babalola *et al.* (2005) ที่พบว่า ดินที่ถูกกร่อนในแปลงที่ไม่มีการปลูกหญ้าแฝกจะมีการสูญเสียปริมาณธาตุอาหารมากกว่าในแปลงที่มีการปลูกหญ้าแฝกโดยเฉพาะไนโตรเจนซึ่งมีมากกว่า ถึงร้อยละ 40 (Sukhkasem *et al.,* 2017) นอกจากนี้การใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซามีบทบาทต่อการรักษาโครงสร้างของดินให้มีความคงทนต่อการกร่อน จากรายงานการวิจัยของ Wright and Upadhyaya (1998) พบว่าเส้นใยรานอกรากพืชของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีอิทธิพลต่อความแข็งแรงคงทนของเม็ดดิน จึงทำให้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันการกร่อนของดินได้เป็นอย่างดี

2. มูลค่าการสูญเสียทางเศรษฐศาสตร์จากการกร่อนดิน

วิธีปฏิบัติของเกษตรกรมีผลให้ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมทั้งหมดที่สูญเสียไปกับตะกอนดินมากที่สุด คือ 0.75, 0.035 และ 0.030 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ (Table 2) รองลงมา การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินมีการสูญเสียปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมทั้งหมด เท่ากับ 0.62, 0.028 และ 0.024 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ ขณะที่การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา มีการสูญเสียปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมทั้งหมดน้อยที่สุด คือ 0.11, 0.0039 และ 0.0046 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ ทั้งนี้ ไนโตรเจนเป็น ธาตุที่เปลี่ยนแปลงรูป หรือแปรสภาพได้ตลอดเวลา ซึ่งการสูญเสียไนโตรเจนโดยการชะละลาย (leaching) ไปกับฝนซึ่งดินในพื้นที่ในพื้นที่ศึกษาเป็นดินเนื้อหยาบ

Table 2. The economic value of soil erosion by water

Treatments	Soil loss	N loss	P loss	K loss	Economic value (baht)[1]			
	(……kg/rai/crop……)				N	P	K	Total
FP	681.01	0.75	0.035	0.030	19.56	1.57	0.85	21.98
IF_{DOA}	566.50	0.62	0.028	0.024	16.16	1.26	0.68	18.10
IF_{DOA} +SB	278.46	0.28	0.012	0.011	7.30	0.54	0.32	8.16
IF_{DOA} +VG	205.49	0.21	0.0061	0.0064	5.47	0.27	0.18	5.92
IF_{DOA} +VG+AMF	220.46	0.22	0.0064	0.0076	5.73	0.28	0.22	6.23
IF_{DOA} +SB+VG	163.18	0.15	0.0048	0.0058	3.91	0.22	0.17	4.30
IF_{DOA} +SB+VG+AMF	150.46	0.11	0.0039	0.0046	2.86	0.18	0.13	3.17

Remarks: FP = Farmer practices; IF = Fertilizer based on soil analysis; SB = Soybean; VG = Vertiver grass; MF = Mycorrhizal biofertilizer

[1]Urea (46-0-0) 600 baht per 50 kg bags, DAP (18-46-0) 1,035 baht per 50 kg bags, KCl (0-0-60) 860 baht per 50 kg bags (Office of Agricultural Economics, 2016)

ส่วนฟอสฟอรัสเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้น้อย แต่ก็ยังมีโอกาสติดไปกับดินที่เกิดจากการกร่อน ซึ่งในปีหนึ่งอาจสูญเสียฟอสฟอรัสประมาณ 1-3 กิโลกรัมฟอสฟอรัส/ไร่/ปี (หรือประมาณ 0.4-1.2% ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในชั้นไถพรวน) อีกทั้งจากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดินพบว่าดินมีค่า พีเอช 4.9 ซึ่งเป็นกรดจัด ทำให้ฟอสเฟตถูกตรึง โดยไอออนบวกที่ละลายได้พวก Fe^{+2} Al^{+3} และ hydrous oxide ของเหล็ก อะลูมินัม และแมงกานีส (Soil Science Faculty Staff, 2005) ในส่วนของโพแทสเซียมพบว่าดินที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ อยู่ในอันดับอัลทิซอลส์ ซึ่งดินในอันดับนี้มีการพัฒนาการสูง และเกิดกระบวนการชะละลายได้ดี จึงส่งผลให้โพแทสเซียมถูกชะละลายออกจากพื้นที่ได้ง่าย และชนิดแร่ดินเหนียวของดินในที่ดอนในอันดับนี้ส่วนใหญ่เป็นแร่ดินเหนียวที่มีกิจกรรมต่ำ ได้แก่ แร่เคโอลิไนต์ ซึ่งมีปริมาณ total-K ต่ำ และดินเนื้อหยาบจะมีปริมาณ total-K ต่ำกว่าดินเนื้อละเอียด (Havlin *et al.,* 2005) มูลค่าการสูญเสียทางเศรษฐศาสตร์ของธาตุอาหารหลักทั้งไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้จากตะกอนดินเมื่อเปรียบเทียบปริมาณธาตุอาหารที่สูญเสียเป็นจำนวนเงินจากราคาของแม่ปุ๋ยได้แก่ ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) ปุ๋ยไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP สูตร 18-16-0) และปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (MOP สูตร0-0-60) พบว่าวิธีปฏิบัติของเกษตรกร (T1) มีมูลค่าการสูญเสียสูงที่สุดคือ 21.98 บาทต่อไร่ รองลงมาคือการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน เท่ากับ 18.10 บาทต่อไร่ การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝกและปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา มีมูลค่าการสูญเสียเท่ากับ 3.17 บาทต่อไร่ ซึ่งการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพียงอย่างเดียวมีมูลค่าการสูญเสียสูงที่สุด ขณะที่การปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ภายใต้ระบบอนุรักษ์ดินและน้ำ มีมูลค่าการสูญเสียน้อย Khamkajorn (2015) ชี้ให้เห็นว่าการปลูกยางพาราร่วมกับการปลูกข้าวโพดตามด้วยถั่วเหลือง สามารถลดปริมาณน้ำไหลบ่า การสูญเสียธาตุอาหาร และมูลค่าการสูญเสียทางเศรษฐศาสตร์น้อยที่สุด

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ ไม่ได้มีการคำนวณผลตอบแทนจากการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ซึ่งต้องคำนึงถึง ต้นทุนเมล็ดพันธุ์ ปุ๋ย การเตรียมแปลง แรงงาน วัสดุในการอนุรักษ์ดิน โดยนำรายได้หักลบต้นทุนการผลิตทั้งหมด จะทำให้ทราบกำไรสุทธิในการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บนพื้นที่ดอน ซึ่งเป็นแนวทางให้เกษตรกรสามารถเลือกใช้มาตรการการอนุรักษ์ดินที่เหมาะสมและให้ผลตอบแทนสูงสุด

3. ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซาส่งผลให้น้ำหนักฝักปอกเปลือก (668.42 กิโลกรัม/ไร่) น้ำหนักเมล็ด (579.11 กิโลกรัม/ไร่) น้ำหนักเปลือก (117.33 กิโลกรัม/ไร่) และน้ำหนักซัง (88.89 กิโลกรัม/ไร่) ของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สูงที่สุด รองลงมาคือ ตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยเคมีร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง และหญ้าแฝก ขณะที่วิธีปฏิบัติของเกษตรกรมีแนวโน้มให้น้ำหนักฝัก เปลือก ซัง และเมล็ดของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์น้อยที่สุด (Table 3) อย่างไรก็ตาม ผลผลิตข้าวโพดในทุกตำรับการทดลอง มีผลผลิตต่ำกว่าเฉลี่ยของแปลงทดลองศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ (1,106 กิโลกรัม/ไร่) (Nakhon Sawan Field Crops Research Center, 2017) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก พื้นที่ทดลองเป็นดินเนื้อหยาบ ทำให้ง่ายต่อการสูญเสียธาตุอาหารจากการชะล้าง อิทธิพลของระบบปลูกพืชแซมทำให้เกิดการแก่งแย่งกันเมื่อปลูกร่วมกัน ได้แก่ แสง ความชื้น และธาตุอาหาร รวมไปถึงชนิดและลักษณะของการเจริญเติบโตของพืชที่ปลูกร่วมกัน (Kang *et al.,* 1981; Sampet, 1999)

4. ความเข้มข้นของธาตุอาหารในองค์ประกอบผลผลิตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝกและใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซาส่งผลให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่สะสมอยู่ในลำต้น (1.83%) ใบ (1.16%) เปลือก (0.55%) ซัง (0.93%) และเมล็ด (1.47%) ของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สูงที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกับตำรับการทดลองที่มีการปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชแซมในตำรับอื่น (IF+SB และ IF+SB+VG) อาจเนื่องจากถั่วเหลืองมีไรโซเบียมที่อาศัยอยู่ในปมรากถั่วสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปที่รากพืชดูดไปใช้ได้ (Mala, 2003) จึงทำให้มีการสะสมของไนโตรเจนในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มากขึ้น โดยตำรับการทดลองอื่นมีความเข้มข้นของไนโตรเจนใกล้เคียงกัน (Table 4) การใส่ปุ๋ยเคมีร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซาส่งผลให้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่สะสมอยู่ในลำต้น ใบ เปลือก ซัง และเมล็ดของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สูงที่สุด โดยมีความเข้มข้นสูงกว่าระดับวิกฤติขาดแคลน (0.29 %) ในส่วนของเมล็ดของทุกตำรับการทดลอง (0.73-0.84 %) เนื่องจากฟอสฟอรัสช่วยในการออกดอก และสร้างเมล็ดของพืช จึงมีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

Table 3. Effects of soil conservation measures combined with IF on ear number, weight of ear without husk, husk, cob and grain

Treatments	Ear without husk weight (kg/rai)	Husk weight (kg/rai)	Cob weight (kg/rai)	Grain weight (kg/rai)
FP	309.32^{e}	53.33^{d}	48.00^{c}	261.32^{e}
IF_{DOA}	440.87^{d}	67.55^{cd}	64.00^{bc}	376.87^{d}
IF_{DOA} +SB	522.65^{c}	88.89^{abc}	71.11^{b}	451.54^{cd}
IF_{DOA} +VG	501.31^{c}	85.33^{bc}	67.55^{b}	433.76^{cd}
IF_{DOA} +VG+AMF	600.87^{b}	92.44^{abc}	74.66^{ab}	526.21^{bc}
IF_{DOA} +SB+VG	632.86^{ab}	103.11^{ab}	74.06^{ab}	558.80^{ab}
IF_{DOA} +SB+VG+AMF	668.42^{a}	117.33^{a}	88.89^{a}	579.11^{a}
F-test	*	*	*	*
CV (%)	21.38	26.83	18.02	24.37

Remarks: FP = Farmer practices; IF = Fertilizer based on soil analysis; SB = Soybean; VG = Vetiver grass; AMF = Mycorrhizal biofertilizer

[1]Means within the same column followed by the same letter indicated no statistical difference using by DMRT

* indicated significant difference at $P<0.05$

Table 4. Concentration of N P K in grain, cob, husk, leaf and stem of maize at maturity stage

Treatments	N					P					K				
	Stem	Leaf	Husk	Cob	Grain	Stem	Leaf	Husk	Cob	Grain	Stem	Leaf	Husk	Cob	Grain
FP	0.89^{c}	0.67^{d}	0.25^{d}	0.76	1.07^{c}	0.18^{e}	0.28	0.12^{d}	0.15^{b}	0.73^{c}	0.18^{e}	0.28	0.12^{d}	0.15^{b}	0.73^{c}
IF_{DOA}	1.67^{ab}	0.76^{c}	0.38^{c}	0.83	1.24^{b}	0.22^{cd}	0.33	0.16^{c}	0.15^{b}	0.75^{c}	0.22^{cd}	0.33	0.16^{c}	0.15^{b}	0.75^{c}
IF_{DOA}+SB	1.70^{ab}	0.82^{c}	0.42^{bc}	0.95	1.22^{bc}	0.21^{d}	0.29	0.17^{bc}	0.15^{b}	0.75^{c}	0.21^{d}	0.29	0.17^{bc}	0.15^{b}	0.75^{c}
IF_{DOA}+VG	1.62^{b}	1.02^{b}	0.38^{c}	0.79	1.42^{a}	0.25^{ab}	0.33	0.17^{c}	0.17^{ab}	0.77^{bc}	0.25^{ab}	0.33	0.17^{c}	0.17^{ab}	0.77^{bc}
IF_{DOA}+VG+AMF	1.64^{b}	1.07^{ab}	0.48^{b}	0.86	1.37^{ab}	0.23^{bcd}	0.31	0.16^{c}	0.17^{ab}	0.74^{c}	0.23^{bcd}	0.31	0.16^{c}	0.17^{ab}	0.74^{c}
IF_{DOA}+SB+VG	1.72^{ab}	1.07^{b}	0.47^{b}	0.9	1.41^{a}	0.24^{abc}	0.34	0.19^{ab}	0.18^{a}	0.83^{ab}	0.24^{abc}	0.34	0.19^{ab}	0.18^{a}	0.83^{ab}
IF_{DOA}+SB+VG+AMF	1.83^{a}	1.16^{a}	0.55^{a}	0.93	1.47^{a}	0.26^{a}	0.34	0.20^{a}	0.18^{a}	0.84^{a}	0.26^{a}	0.34	0.20^{a}	0.18^{a}	0.84^{a}
F-test	*	*	*	ns	*	*	ns	*	*	*	*	ns	*	*	*
CV (%)	19.41	19.43	23.07	10.14	10.53	12.88	9.69	14.56	9.84	6.37	12.88	9.69	14.56	9.84	6.37

Remarks: FP = Farmer practices; IF = Fertilizer based on soil analysis; SB = Soybean; VG = Vetiver grass; AMF = Mycorrhizal biofertilizer

[1]Means within the same column followed by the same letter indicated no statistical difference using by DMRT

* indicated significant difference at $P<0.05$

ในช่วงที่เมล็ดสะสมแป้ง (Osotsapar, 2000) ในขณะที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่สะสมอยู่ในลำต้น ใบ เปลือก ซัง และเมล็ดของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สูงที่สุดในตำรับที่มีการใส่ปุ๋ยร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา ส่งผลให้โดยส่วนของใบ (0.33-0.55%) มีความเข้มข้นสูงที่สุดเนื่องจากส่วนใหญ่โพแทสเซียมจะสะสมอยู่ในลำต้นและใบข้าวโพด (Paisancharoen *et al.,* 2008) ขณะที่วิธีปฏิบัติของเกษตรกรมีความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมในลำต้น ใบ เปลือก ซัง และเมล็ดต่ำที่สุด (Table 4) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักในใบข้าวโพดที่ระยะเก็บเกี่ยวอยู่ในระดับวิกฤติขาดแคลน (Reuter and Robinson, 1997) อาจเนื่องจากพื้นที่ทดลองเป็นดินเนื้อหยาบ ทำให้ง่ายต่อการสูญเสียธาตุอาหารจากการชะล้าง

5. การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินหลังปลูกที่ระดับความลึก 20 เซนติเมตร

การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินเพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับวิธีการอนุรักษ์ดินในแต่ละตำรับการทดลองไม่มีผลให้ค่าความหนาแน่นรวม และสัมประสิทธิ์การนำน้ำที่อิ่มตัวด้วยน้ำแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นรวมและสัมประสิทธิ์การนำน้ำที่อิ่มตัวของดินหลังปลูกที่ระดับความลึก 20 เซนติเมตร มีค่าต่ำกว่าดินก่อนปลูก ค่าความจุน้ำใช้ประโยชน์ได้ของดินมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลืองและหญ้าแฝก มีค่าความจุน้ำใช้ประโยชน์ได้สูงที่สุด 19.20 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น การใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา เท่ากับ 14.92 เปอร์เซ็นต์ (Table 5) ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียมในดินของตำรับที่มีการใส่ปุ๋ยเคมีร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝกและใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซามีปริมาณธาตุอาหารดังกล่าวสูงที่สุด เนื่องจากมีการใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าที่วิเคราะห์ได้โดยมีอัตราสูงกว่าวิธีปฏิบัติของเกษตรกร ซึ่งปริมาณไนโตรเจนอาจเกิดจากการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมที่อาศัยอยู่ในปมรากถั่วเหลืองมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถใช้ประโยชน์ได้ (Yomyart, 2014) นอกจากนี้หญ้าแฝกยังช่วยลดการสูญเสียธาตุอาหารในดิน และกักเก็บน้ำในดินได้ดี (Greenfield, 1990) และการใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซาจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวรากพืชในการดูดน้ำ และธาตุอาหารจากดินมากขึ้น (Poomipan, 2013; Soil Science Faculty Staff, 2005) นอกจากนี้การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินด้านอื่นพบว่า ปฏิกิริยาดินทุกตำรับการทดลองอยู่ในระดับกรดจัด

Table 5. Physical and chemical properties of soil after planting at depth 0-20 cm

Treatment	Physical properties[1]			Chemical properties[1]								
	BD	K_{sat}	AWC	pH	EC_e	OM	Total N	Avail.P	Exch.K	Exch.Ca	Exch.Mg	CEC
	(g/cm^3)	(cm/h)	(%)		(dS/m)	(……%……)		(……mg/kg……)				(cmol/kg)
Before planting	1.74	8.82	8.19	5.53	0.16	0.24	0.0084	41.32	30.34	54.44	5.32	8.70
FP	1.62	2.17	7.49^{cd}	4.88	0.015^{a}	0.40^{b}	0.009^{b}	16.99^{d}	17.61^{d}	18.22^{b}	8.62^{c}	8.74^{d}
IF	1.61	2.21	8.28^{cd}	4.97	0.013^{b}	0.50^{a}	0.019^{a}	25.25^{c}	20.74^{bc}	22.08^{a}	16.40^{ab}	9.41^{bc}
IF +SB	1.52	2.32	8.72^{c}	4.92	0.013^{b}	0.52^{a}	0.019^{a}	25.01^{c}	19.72^{c}	21.56^{a}	16.65^{ab}	9.19^{c}
IF +VG	1.65	2.69	6.87^{d}	4.82	0.012^{b}	0.51^{a}	0.019^{a}	29.31^{b}	20.33^{c}	21.26^{a}	16.82^{ab}	9.61^{b}
IF +VG+AMF	1.63	2.84	9.46^{c}	4.81	0.012^{b}	0.51^{a}	0.021^{a}	33.89^{a}	22.40^{a}	20.76^{a}	16.17^{b}	9.60^{b}
IF +SB+VG	1.66	2.34	19.20^{a}	4.99	0.013^{b}	0.53^{a}	0.021^{a}	34.35^{a}	21.91^{ab}	21.07^{a}	16.98^{ab}	10.61^{a}
IF+SB+VG+AMF	1.67	2.43	14.92^{b}	5.07	0.012^{b}	0.57^{a}	0.024^{a}	36.01^{a}	22.91^{a}	22.13^{a}	17.09^{a}	10.88^{a}
F- test	ns	ns	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*
CV (%)	4.77	36.55	31.78	2.58	10.08	12.14	26.98	22.80	8.93	7.12	18.86	7.61

Remarks: FP = Farmer practices; IF = Fertilizer based on soil analysis; SB = Soybean; VG = Vetiver grass; AMF = Mycorrhizal biofertilizer; BD = Bulk density; K_{sat}= Saturated hydraulic conductivity; AWC= Available water capacity

[1] Means within the same column followed by the same letter indicated no statistical difference using by DMRT

ns: non-significant; * indicated significant difference at $P<0.05$

ถึงกรดจัดมาก เป็นไปได้ว่าปุ๋ยเคมีที่ใช้เป็นปุ๋ยยูเรีย (46%N) ซึ่งในสภาพดินไร่ที่มีการถ่ายเทอากาศดีจะส่งผลให้แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ถูกออกซิไดซ์ก่อให้เกิดไฮโดรเจนไอออน (H^+) จึงมีผลตกค้างทำให้ดินเป็นกรดได้ (Osotsapar *et al.,* 2008) ทำให้ปฏิกิริยาดินหลังปลูกลดต่ำลง และเนื่องจากพื้นที่ทดลองเป็นดินร่วนปนทรายอาจมีผลให้แคตไอออนต่าง ๆ ถูกชะล้างได้ง่ายโดยน้ำฝน ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ (Wongkrachang and Rattaneetu, 2013) ก่อให้เกิดไฮโดรเจนไอออนตกค้าง ส่งผลให้ความเป็นกรดในดินเพิ่มขึ้น ปริมาณอินทรียวัตถุในดินอยู่ในระดับต่ำถึงต่ำมาก ซึ่งมีค่าสูงขึ้นในดินหลังปลูกอาจเนื่องมาจากเศษเหลือของชีวมวลส่วนเหนือดินสามารถเพิ่มเติมอินทรียวัตถุในดินได้ ซึ่งการนำเศษซากพืชออกจากพื้นที่เพาะปลูกเป็นที่รู้กันโดยทั่วไปว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้คาร์บอนอินทรีย์ในดินลดลง (Mann *et al.,* 2002; Yang and Wander, 1999) ค่าการนำไฟฟ้าของดินอยู่ในระดับที่ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ลดลงในดินหลังปลูก เนื่องจากฟอสฟอรัสจะสูญเสียไปในรูปของผลผลิตเมล็ดมากกว่าส่วนอื่น นอกจากนี้ ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสจะขึ้นอยู่กับค่าพีเอช (Brady and Weil, 2008) ปริมาณความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนของดินอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำถึงปานกลาง (Land Classification Division, 1973; Soil Survey Division, 1993)

สรุป

การใช้มาตรการอนุรักษ์ดินและน้ำรูปแบบต่าง ๆ มีแนวโน้มที่จะเพิ่มค่าความจุน้ำใช้ประโยชน์ได้ โดยการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่วเหลือง หญ้าแฝก และปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา ส่งผลให้ปริมาณน้ำไหลบ่า (22.75 ลูกบาศก์เมตร/ไร่) ตะกอนดิน (0.15 ตัน/ไร่) และการสูญเสียธาตุอาหารต่ำที่สุด (N = 0.011 P = 0.0039 และ K = 0.0046 กิโลกรัม/ไร่) นอกจากนี้ยังพบว่าการปฏิบัติของเกษตรกรมีมูลค่าการสูญเสียทางเศรษฐศาสตร์จากการกร่อนดินสูงที่สุดเท่ากับ 21.98 บาท/ไร่ อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงผลตอบแทนทางเศรษฐกิจหลังจากหักต้นทุนการผลิต แรงงาน ต้นทุนวัสดุในการอนุรักษ์ดินที่เพิ่มขึ้นในการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อีกด้วย การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการปลูกถั่ว

เหลือง หญ้าแฝก และใส่ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซามีผลให้น้ำหนักฝัก (668.42 กิโลกรัม/ไร่) เปลือก (117.33 กิโลกรัม/ไร่) ซัง (88.89 กิโลกรัม/ไร่) เมล็ดของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (579.11 กิโลกรัม/ไร่) รวมทั้งเข้มข้นของธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่สะสมอยู่ในลำต้น ใบ เปลือก ซัง และเมล็ดสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการอนุรักษ์ดินแบบต่าง ๆ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของดิน พบว่า ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน ความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน และธาตุอาหารพืชที่เป็นประโยชน์ สูงกว่าวิธีปฏิบัติของเกษตรกร ดังนั้นการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ภายใต้มาตรการอนุรักษ์ดินและน้ำบนพื้นที่ดอนสามารถลดการกร่อนดินและการสูญเสียธาตุอาหารจากการกร่อนดินได้แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของระบบอนุรักษ์ดินและน้ำ ในรูปแบบต่าง ๆ ทั้งในระยะกลาง และระยะยาว เพื่อให้ได้รูปแบบของระบบอนุรักษ์ดินและน้ำสำหรับการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในพื้นที่ดอนอย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

Anecksamphant, C., S. Boonchee, P. Inthapan and U. Taejajai. 1994. Management of sloping land for sustainable agriculture in northern Thailand. Progress Report ASIALAND Network Phase II (1992-1994). Land Development Department, Bangkok.

Babalola, O., S.O. Oshunsanya and K. Are. 2005. Continuous cultivation of maize under vetiver grass strip management; runoff, soil loss, nutrient losses and maize yields. Ibadan Journal of Agricultural Research 2: 16-26.

Bedini, S., E. Pellegrino, L. Avio, S. Pellegrini, P. Bazzoffi, E. Argese and M. Giovannetti. 2009. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. Soil Biology and Biochemistry 41: 1491-1496.

Bertol, I.B., E.L. Mello, J.C. Guadagnin, A.L.V. Zaparolli and M.R. Carrafa. 2003. Nutrient losses by water erosion. Scientia Agricola 60: 581-586.

Brady, N.C. and R.R. Weil. 2008. The Nature and Properties of Soil. 14th ed. Pearson, Upper Saddle River, New Jersey.

Cerdá, A. 2007. Soil water erosion on road embankments in eastern Spain. Science of the Total Environment 378: 151-155.

Department of Agriculture. 2005. Recommendation of fertilizer application for economic crops. pp. 21-24. *In*: Paper No.8/2005. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok. (in Thai)

Ekasing, B., P. Gypmantasiri and K. Thong-ngam. 2001. Assess potentials, alternatives and needs of maize farmer in major maize growing areas of Thailand 2000. The Multiple Cropping Center, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. (in Thai)

Greenfield, J.C. 1990. Vetiver Grass (*Vetiveria* spp.): The Ideal Plant for Vegetative Soil and Moisture Conservation. Asia Technical Department, Agriculture Division, World Bank, Washington, D.C.

Grimshaw, R.G. 1993. The Role of Vetiver Grass in Sustaining Agricultural Productivity. Asia Technical Department, World Bank, Washington, D.C.

Havlin, J.L., J.D. Beaton, S.L. Tisdale and W.L. Nelson. 2005. Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management. 7th ed.

Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Hidayat, Y. K., Murtilaksono and N. Sinukaban. 2012. Characterization of surface runoff, soil erosion and nutrient loss on forest-agriculture landscape. Journal of Tropical Soils 17: 259-266.

Kaewkunya, C., A. Yubonwat, A. Muktawat, S. Pholpharit and O. Yonpim. 2018. Effects of intercropping on the performance of corn and cowpea grown on lateritic soil. Khon Kaen Agriculture Journal 46 (Supplement Issue 1): 405-411. (in Thai)

Kang, B.T., G.F. Wilson and L. Sipkens. 1981. Alley cropping maize (*Zea mays* L.) and leucaena (*Leuceana leucocephala* Lam) in southern Nigeria. Plant and Soil 63: 165-179.

Kasivivat, A., C. La-ied and S. Boonpradub. 2004. Study on Corn-based cropping system on sloping lands in Phetchabun province. Office of Agricultural Research and Development Region 2, Phetchabun. (in Thai)

Khamkajorn, T. 2015. Assessing erosion and nutrient losses under soil and water conservation measures in upland rubber plantation: A case study Wang Thong District, Phisanulok Province. M.S. Thesis. Naresuan University, Phisanulok. 93 p. (in Thai)

Kittiwirote, K. and T. Kongkaew. 2007. Soil erosion, nutrient balance and economic value of various soil and water conservation methods and farmer's perspective after transfer the knowledge of soil and Water conservation systems. Khon Kaen Agriculture Journal 35(4): 521-530. (in Thai)

Lal, R. 2001. Soil degradation by erosion. Land Degradation 12: 519-539.

Land Classification Division. 1973. Soil Interpretation Handbook for Thailand. Land Development Department, Bangkok. (in Thai)

Land Development Department. 2000. Soil Loss in Thailand. Land Development Department, Bangkok. (in Thai)

Land Development Department. 2011. Area and soil loss rates according to the land use in each regions of Thailand. (online) , Available: http://www.ldd.go.th/ofsweb/thaisoil/p1 0 . ht m (September 25, 2018). (in Thai)

Levan, D. and P. Truong. 2003. Vetiver grass system for erosion control on severe acid sulfate soil on southern Vietnam. pp. 284-292. *In*: P. Truong and H.P. Xia (eds.) Proceedings of the 3rd International Conference on Vetiver and Exhibition: Vetiver and Water. Guangzhou, China.

Lima, P.L.T., M.L.N. Silva, J.N. Quinton, P. V. G. Batista, B.M. Cândido and N. Curi. 2018. Relationship among crop systems, soil cover, and water erosion on a Typic Hapludox. Revista Brasileira de Ciência do Solo 42: e0170081.

Lobo, D., Z. Lozano and F. Delgado. 2005. Water erosion risk assessment and impact on productivity of a Venezuela soil. Catena 64(2-3): 297-306.

Mala, T. 2003. Organic Fertilizer and Bio-fertilizer: Application and Production Techniques. Kasetsart University Press, Bangkok. 300 p. (in Thai)

Mann, L., V. Tolbert and J. Cushmann. 2002. Potential environmental effects of corn (*Zea mays* L.) stover removal with emphasis on soil organic matter and erosion. Agriculture, Ecosystems and Environment 89(3): 149-166.

Nakhon Sawan Field Crops Research Center. 2017. Hybrid maize Nakhon Sawan 3. Office of Agricultural Research and Development Region 5, Nakhon Sawan. (in Thai)

National Soil Survey Center. 1996. Soil Survey Laboratory Methods Manual. Soil Survey Investigation No. 42, Version 3. United States Department of Agriculture, Lincoln, Nebraska.

Office of Agricultural Economics. 2017. Agricultural Statistics of Thailand 2016-2017. Office of Agricultural Economics, Bangkok. (in Thai)

Oshunsanya, S.O. 2013. Spacing effects of vetiver grass (*Vetiveria nigritana* Stapf) hedgerows on soil accumulation and yields of maize-cassava intercropping system in southwest Nigeria. Catena 104: 120-126.

Osotsapar, Y. 2000. Plant nutritions. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok. 529 p. (in Thai)

Osotsapar, Y., A. Wongmaneeroj and C. Hongprayoon. 2008. Fertilizers for Sustainable Agriculture. Kasetsart University Press, Bangkok. 519 p. (in Thai)

Paisancharoen, K., A. Nunthakit, S. Meunchang and P. Panpruik. 2008. Effect of organic, chemical and bio-fertilizers on maize (var. Nakhon Sawan 2) production in Wang Saphung soil series. Thai Agricultural Research Journal 26(1): 82-90. (in Thai)

Pimentel, D. 2006. Soil erosion: A food and environmental threat. Environment, Development and Sustainability 8: 119-137.

Poomipan, P. 2013. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant, soil and environment. Thai Journal of Science and Technology 2(2): 91-101. (in Thai)

Reuter, D.J. and J.B. Robinson. 1997. Plant Analysis: An Interpretation Manual, 2nd ed. CSIRO Publishing, Collingwood.

Sampet, C. 1999. Physiology of Crop Production. Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 284 p. (in Thai)

Soil Science Faculty Staff. 2005. Introduction to Soil Science. Kasetsart University Press, Bangkok. 547 p. (in Thai)

Soil Survey Division. 1993. Soil Survey Manual. United States Department of Agriculture Handbook No. 18. United States Government Printing Office, Washington, D.C.

Sukhkasem, A., S. Anusontpornperm, I. Kheoruenromne, A. Suddhiprakarn and S. Thanachit. 2017. Effect of long-term soil and water conservation measure on soil erosion and carbon sequestration under field crop practices. Khon Kaen Agriculture Journal 45(2): 285-296. (in Thai)

Takim, F.O. 2012. Advantages of maize-cowpea intercropping over sole cropping through competition indices. Journal of Agriculture and Biodiversity Research 1(4): 53-58.

Wongkrachang, S. and B. Rattaneetu. 2013. Sandy soils management for agriculture. Princess of Naradhiwas University Journal 5(4): 184-194. (in Thai)

Wright, S.F. and A. Upadhyaya. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of AM fungi. Plant and Soil 198: 97-107.

Xia, H.P., H.X. AO, D.Q. He and S.Z. Liu. 1996. A study on vetiver grass in soil amelioration, and soil and moisture conservation. Tropical Geography 16: 265-270.

Yang, X.M. and M.M. Wander. 1999. Tillage effects on soil organic carbon distribution and storage in silt loam soil in Illinois. Soil and Tillage Research 52: 1-9.

Yomyart, S. 2014. Rhizobium. The Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology, Bangkok. (in Thai)

การคัดกรองและการประเมินประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรีย เพื่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว

Screening and Efficiency Assessment of Rhizobacteria for Growth Enhancement of Rice Seedlings

อนุสรา พิศน้อย และ อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง*

Anusara Pidnoi and Arawan Shutsrirung*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: arawan.s@cmu.ac.th*

(Received: 17 December 2018; Accepted: 3 April 2019)

Abstract: Rice (*Oryza sativa* L.) is one the most important economic crop of Thailand and high input of chemical fertilizers is a common practice for rice production. This practice has given rise to several problems such as contamination of water, degradation of soil and loss of biodiversity ultimately leading to health risks for humans. The use of beneficial bacteria is an alternative to reduce the mention problems. Therefore, in the present study, rhizobacteria were isolated from 4 organic rice locations in Chiang Mai province i.e. Mae Wang district (2 sites), Mae Taeng district (1 site) and Phrao district (1 site). A total of 56 isolates of rhizobacteria was obtained. After preliminary qualitative-screening on agar plate, only 13 isolates showed promising abilities in nitrogen fixing and phosphate solubilizing abilities. The results of quantitative-screening in broth culture indicated that isolate RMW_4NF1 showed highest ability in nitrogen fixation followed by RMT_2NF4 (887.4 and 822.9 nmol C_2H_4/tube/24hr, respectively), and RMW_4NF1 exhibited highest ability in phosphate solubilization with value of 181.46 mgP/L. Evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) indicated that RMW_3NF4 could produce highest amount of IAA followed by RMT_2NF4 (34.93 and 31.05 mg IAA/L, respectively). From all the evaluations of plant growth promoting potential, six isolates i.e. RMW_2Egg2, RMW_2Egg8, RMW_4Egg5, RMW_4NF1, RMT_2Egg2 and RMT_2NF4 were selected to test their effectiveness on growth and nutrients uptake of rice seedlings. The results showed that the application of almost all the isolates gave significantly higher growth and nutrients uptake than the control. Isolate RMT_2NF4 gave 214 and 74% higher nitrogen and phosphorus uptake than the control, respectively. Therefore, this isolate has a high potential to be developed as biofertilizer for rice.

Keywords: Rice, rhizosphere soils, nitrogen fixing bacteria, phosphate solubilizing bacteria

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทยและการใช้ปุ๋ยเคมีในการปลูกข้าวก็ได้มีการปฏิบัติกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งทำให้ก่อให้เกิดปัญหาหลายประการ เช่น การปนเปื้อนมลพิษในแหล่งน้ำ การเสื่อมโทรมของดิน และการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพ ส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ การใช้แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในการปลูกข้าวจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาดังกล่าว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการแยกแบคทีเรียจากดินรอบรากข้าว จากพื้นที่ปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์จำนวน 4 พื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ อำเภอแม่วาง 2 พื้นที่ อำเภอแม่แตง 1 พื้นที่ และอำเภอพร้าว 1 พื้นที่ ได้ไรโซแบคทีเรียจำนวน 56 ไอโซเลท ทำการคัดกรองเชื้อที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนและย่อยละลายฟอสเฟตเบื้องต้นเชิงคุณภาพบนอาหารแข็ง โดยคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถสูงได้ 13 ไอโซเลท ผลของการคัดกรองเชิงปริมาณในอาหารเหลวพบว่า ไอโซเลท RMW_4NF1 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด รองลงมาคือ RMT_2NF4 (887.4 และ 822.9 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24 ชั่วโมง ตามลำดับ) และ RMW_4NF1 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงสุดถึง 181.46 มิลลิกรัม P/ลิตร เมื่อทำการประเมินการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) พบว่า RMW_3NF4 สามารถผลิต IAA ได้สูงที่สุดรองลงมาคือ RMT_2NF4 (34.93 และ 31.05 มิลลิกรัม IAA/ลิตร ตามลำดับ) จากศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งหมดที่ได้ประเมินจึงได้คัดเลือกไอโซเลทได้จำนวน 6 ไอโซเลท คือ RMW_2Egg2, RMW_2Egg8, RMW_4Egg5, RMW_4NF1, RMT_2Egg2 และ RMT_2NF4 มาทดสอบประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุอาหารของต้นกล้าข้าว พบว่า การใช้ไรโซแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าข้าวและการดูดใช้ธาตุอาหารเกือบทุกไอโซเลทให้ค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ไอโซเลท RMT_2NF4 ให้ค่าการดูดใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 214 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นไอโซเลทนี้จึงมีศักยภาพสูงในการนำมาพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับข้าว

คำสำคัญ: ข้าว ดินรอบรากพืช แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียย่อยละลายฟอสเฟต

คำนำ

ข้าวเป็นธัญพืชที่อยู่ในวงศ์ Gramineae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. นอกจากข้าวจะเป็นอาหารหลักของชาวไทยแล้ว ข้าวยังถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญยิ่งของประเทศไทย ในการผลิตข้าวนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่ได้มีการใช้ปุ๋ยเคมีในปริมาณสูงในนาข้าวอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน โดยเฉพาะปุ๋ยเคมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จึงเป็นสาเหตุให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินเสื่อมถอยลงมาก ดินมีสภาพเป็นกรดจัด ดินจับตัวกันเป็นก้อนแข็ง และทำให้จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ มีจำนวนลดลงมาก อีกทั้งยังทำให้ต้นทุนในการผลิตเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนที่ใช้ในนาข้าวมีการสูญเสียมากกว่า 50% จากกระบวนการต่าง ๆ เช่น volatilization, denitrification และ leaching ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดปัญหามลพิษสู่สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนมากเกินไปจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของไนเตรทในแหล่งน้ำใต้ดิน (Wattanaphayapkul, 2015) ดังนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จึงเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นอกจากแบคทีเรียที่อยู่ภายในพืชที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแล้ว มีแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizobacteria) ซึ่งมีความสามารถในการ ตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต สร้างฮอร์โมนพืช หรือ กิจกรรมอื่น ๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชได้ และมักเรียกรวมกันว่า plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้ก็เป็นแหล่งที่มาของไนโตรเจนในดินอีกแหล่งหนึ่ง โดยมีทั้งการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพาอาศัยกันและการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ เช่น การตรึงไนโตรเจนของอะโซโตแบคเตอร์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์อิสระที่มีอยู่ในดิน โดยไนโตรเจนที่ตรึงได้นั้นสามารถช่วยลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนลงได้ (Mala, 2007) ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้อาจแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมของดิน Yasari *et al.* (2008)

พบว่า จุลินทรีย์อิสระในดินสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 10-20 กิโลกรัมไนโตรเจน /เฮกแตร์ จากงานวิจัยของ Wanchai and Ruangsangka (2014) พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการละลายฟอสเฟตได้ 2 ชนิด คือ *Burkhoderia* sp. และ *Pantoea dispersa* ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของของข้าวพันธุ์ กข47 ทั้งในด้านความสูง จำนวนใบ ความยาวของราก และน้ำหนักแห้งของลำต้นในแต่ละตำรับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการวิจัยพบว่า เมื่อใส่เชื้อ *Brevibacillus borstelensis*, *Bacillus megaterium* และ *Brevibacillus agri* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก (indole-3-acetic acid: IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน (auxin) โดยมีผลต่อการยืดขยายรากและการเจริญเติบโตของข้าว (Insalud *et al.,* 2015) การใช้แบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชกลุ่ม PGPR ซึ่งรวมถึงกลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสฟอรัส และสร้างฮอร์โมนพืช จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมและสามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมีและลดปัญหามลพิษสู่สิ่งแวดล้อมได้ งานวิจัยนี้จึงทำการแยกไรโซแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว ทำการคัดกรองไรโซแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน คัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมาประเมินศักยภาพในการละลายฟอสเฟต การสร้าง IAA แล้วจึงมีนำมาทดสอบประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในระยะต้นกล้า เพื่อสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการประยุกต์ใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพแปลงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว

ทำการแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว (rhizosphere soils) จากพื้นที่ปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์ จำนวน 4 พื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ อำเภอแม่วาง 2 พื้นที่ อำเภอแม่แตง 1 พื้นที่ และอำเภอพร้าว 1 พื้นที่ โดยทำการสุ่มเก็บดินบริเวณ rhizosphere พื้นที่ละ 2 ตัวอย่าง ยกเว้นอำเภอพร้าว 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อด้วยวิธี soil dilution plate method โดยเจือจางที่ระดับ 10^{-1}-10^{-5} จากนั้น ดูดสารละลายดินที่มีความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ยลงบนผิวอาหารให้สม่ำเสมอโดยวิธี spread plate technique บนอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ egg albumin agar (glucose 1.0 กรัม, egg albumin 0.25 กรัม, K_2HPO_4 0.5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, $Fe_2(SO_4)_3.9H_2O$ 0.01 กรัม, agar 15 กรัม และ Burk's N-Free medium (Wilson and Knight, 1952) อาหารสองชนิดนี้ใช้สำหรับใช้แยกเชื้อแบคทีเรียทุกกลุ่ม และแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน ตามลำดับ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มีลักษณะแตกต่างกัน และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate บนอาหาร nutrient agar (NA) (nutrient broth (NB) ชนิดผงสำเร็จรูป 13 กรัม, agar 15 กรัม ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ± 0.2 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

การคัดกรองแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและแบคทีเรียย่อยละลายฟอสเฟต

นำแบคทีเรียที่คัดแยกให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด มาเพิ่มปริมาณเพื่อทำการคัดกรองความสามารถเชิงคุณภาพในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟต ด้วยวิธี drop plate technique โดยนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Burk's N-free medium และ Czapek's agar (sucrose 30 กรัม, $NaNO_3$ 2 กรัม, $Ca_3(PO_4)_2$ 0.9 กรัม, KCl 1.36 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.50 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม, Congo red 0.25% 10 มิลลิลิตร, agar 15 กรัม ปรับ pH เท่ากับ 7.3 ± 0.2 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร) เชื้อละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกเชื้อที่เจริญได้ดีทั้งบนอาหาร Burk's N-free medium และ เชื้อที่เจริญได้ดีและทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) บน Czapek's agar ได้มาก เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยคำนวณค่าประสิทธิภาพการย่อยละลายฟอสเฟต (clear zone ratio) เชื้อแบคทีเรียใดให้ค่าเฉลี่ยของ clear zone ratio สูง แสดงว่ามีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตได้ดี คัดเลือกมาทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวต่อไป

การประเมินความสามารถเชิงปริมาณในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

คัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญได้ดีจากวิธี drop plate technique มาทำการประเมินความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยวิธี acetylene reduction assay (ARA) ตามวิธีของ Weaver and Danso (1994) โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเอียง (agar slant) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเปลี่ยนฝาหลอดทดลองให้เป็นจุกยาง เพื่อดูดอากาศภายในออก 10% ของปริมาตรส่วนช่องว่างที่เหลือ เมื่อดูดอากาศออกแทนที่ด้วยก๊าซ acetylene ในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านค่า ethylene (C_2H_4) ที่เกิดจากการ reduce ก๊าซ acetylene (C_2H_2) จากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) โดยใช้เครื่อง gas chromatography (GC) ตัวอย่างเชื้อที่สามารถทำให้เกิดก๊าซ ethylene (C_2H_4) นำพื้นที่ใต้กราฟไปคำนวณหาปริมาณก๊าซ ethylene (C_2H_4) (Somasegaran and Hoben, 1994) ที่เกิดขึ้น

การประเมินความสามารถเชิงปริมาณในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

นำเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจากการประเมินศักยภาพเชิงคุณภาพ มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Pikovskaya (PVK) medium (Surange *et al*., 2013) 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มโดยเขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส ดัดแปลงจากวิธีของ Gaur (1990) โดยแยกเซลล์เชื้อแบคทีเรียออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 rpm 10 นาที นำส่วนสารละลายใส (supernatant) มาวัดปริมาณฟอสฟอรัสโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ wavelength 820 นาโนเมตร และ ทำการลบค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียจากทุกตัวอย่างก่อนการคำนวณ

การประเมินความสามารถในการผลิต indole 3-acetic acid (IAA) **ของแบคทีเรีย**

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมาทดสอบการผลิตฮอร์โมนพืชโดยการวัดปริมาณ IAA ดัดแปลงจากวิธีของ Gorden and Weber (1951) โดยการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร nutrient broth (NB) 25 มิลลิลิตร ที่ไม่เติม L-tryptophan และเติม L-tryptophan 0.2 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ IAA ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย หลังจากนั้นจึงทำการบ่มเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที วัดปริมาณ IAA ที่เกิดขึ้นหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน ซึ่งจะทำการวัด IAA ที่เกิดขึ้นใน supernatant โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ wavelength 530 นาโนเมตร ทำการลบค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียจากทุกตัวอย่าง คำนวณโดยเปรียบเทียบกับชุดสารละลายมาตรฐาน IAA 0, 10, 20, 50, 100 และ 150 µM

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ พันธุ์สันป่าตอง 1 ก่อนการเพาะเมล็ดทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโดยแช่ใน สารละลาย 3% hydrogen peroxide เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากนี้ทำการเพาะด้วยการห่อเมล็ดข้าวด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำผ้าขาวบางที่ห่อเมล็ดข้าวไปแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อครบ 24 ชั่วโมง รินน้ำกลั่นออก ทิ้งไว้อีก 48 ชั่วโมง จึงคัดเลือกเฉพาะเมล็ดข้าวที่มีส่วนรากและส่วนใบเท่ากันมาทำการทดลอง สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้คัดเลือกจากแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มาทดสอบประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของข้าวในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิและแสง (ช่วงแสง:ช่วงมืด 12:12 อุณหภูมิ 25°C ภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 5.8 klux) โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก ในอาหาร NB ให้ได้ปริมาณเชื้อสูงสุด ($\approx 10^9$ CFU/g) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอัตรา 1:50 (v/v) แช่เมล็ดข้าวที่ได้ทำการเพาะไว้จนมีรากงอกแล้วประมาณ 1 เซนติเมตร ในสารละลายเชื้อเจือจาง

นี้ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปลูกลงภาชนะที่ประกอบเหมือน Leonard jar (Somasegaran and Hoben, 1994) โดยภาชนะบนบรรจุทรายที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 300 มิลลิลิตร และภาชนะล่างบรรจุสารละลายอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free nutrient solution) (Punyadoung, 2007) โดยมีไส้ตะเกียงฝ้ายใส่ระหว่างกลางของภาชนะบนและล่างเพื่อให้สารละลายอาหารดูดซึมไปยังทรายที่ปลูกพืชได้ เติม N-free nutrient solution ภาชนะด้านล่างให้มีระดับที่เหมาะสมตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยทำการปลูกภาชนะละ 3 ต้น วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 9 ต้น เมื่อครบ 30 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของกล้าข้าว โดยทำการวัด ความสูงของต้นจากโคนต้นถึงปลายยอดที่ยาวที่สุด วัดความยาวรากจากโคนต้นถึงปลายรากที่ยาวที่สุดของแต่ละต้น ชั่งน้ำหนักสดของต้นและราก น้ำหนักแห้งของต้นและราก และทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุไนโตรเจน (% total N) และ ฟอสฟอรัส (% total P) ตามวิธีการของ Siwasilp (1984) โดยเปรียบเทียบกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรียกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนการใช้เชื้อแบคทีเรีย นำผลไปคำนวณหาการดูดใช้ธาตุอาหารในต้นข้าว ดังนี้ (น้ำหนักแห้ง x ความเข้มข้นของธาตุอาหาร)/100

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีทดลองโดยวิธี least significant difference (LSD) ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม Statisti for Window version 8

ผลการศึกษา

การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว

การแยกเชื้อจากดินรอบรากข้าวทั้งหมด 4 พื้นที่ สามารถแยกโคโลนีแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้ทั้งหมด 94 ไอโซเลท โดยคัดแยกได้จากอาหาร egg albumin agar ได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลท จากอาหาร Burk's N-free medium ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท เมื่อนำไอโซเลทที่แยกได้เบื้องต้นทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งในอาหาร NA พบว่ามีเพียง 56 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหาร NA ได้ดี โดยคิดเป็น 59% ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด (Table 1) จึงนำไปใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

การคัดกรองแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนและย่อยละลายฟอสเฟต

นำแบคทีเรีย 56 ไอโซเลท ที่เจริญได้ดีในอาหาร NA ไปทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการย่อยละลายฟอสเฟตเบื้องต้น พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถ

Table 1. Rhizobacteria isolated from rice rhizosphere soil of four locations in Chiang Mai

Locations (Chiang Mai)	Isolate code	Number of isolate		Number of isolate showing good growth on nutrient agar
		Egg albumin agar	Burk's N-free medium	
Mae Wang 1	RMW_1	8	4	12
	RMW_2	12	5	
Mae Wang 2	RMW_3	6	4	18
	RMW_4	7	7	
Mae Taeng	RMT_1	9	1	20
	RMT_2	10	5	
Phrao	RP	12	4	6
Total		64	30	56

เจริญได้บนอาหาร Burk's N-free medium จำนวน 48 ไอโซเลท และแบคทีเรียทั้งหมด 56 ไอโซเลท สามารถขึ้นได้บนอาหาร Czapek's agar แต่ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหารทั้งสองชนิดและสังเกตเห็น clear zone รอบโคโลนีได้มากและชัดเจนบนอาหาร Czapek's agar (Figure 1) ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการย่อยละลายฟอสเฟตได้ดีนั้นมีเพียง 13 ไอโซเลท คิดเป็น 23.2% ของไอโซเลท ที่ทดสอบ โดยผลการวัด clear zone ratio พบว่าค่าอยู่ในช่วง 1.11-4.00 โดยที่ไอโซเลทที่ย่อยละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งได้ดีที่สุด คือ RPEgg10 ให้ค่า clear zone กว้างที่สุด คือ 4.00 และไอโซเลท RMT_2Egg2 ให้ค่า clear zone น้อยที่สุด คือ 1.11 (ไม่ได้แสดงผลทั้งหมด) ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรีย 13 ไอโซเลทนี้เพื่อทำการทดสอบขั้นต่อไป

ศักยภาพเชิงปริมาณในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

ผลการทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียคัดเลือก 13 ไอโซเลท โดยวิธี acetylene reduction assay (ARA) พบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 498.6-887.4 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24 ชั่วโมง (Table 2) โดย RMW_4NF1 มีปริมาณการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด 887.4 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24ชั่วโมง และสูงกว่าไอโซเลทอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาได้แก่ RMT_2NF4 มีความสามารถตรึงได้สูง 822.9 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24ชั่วโมง ส่วนไอโซเลท RMW_3NF3 มีการตรึงไนโตรเจนน้อยที่สุด 498.6 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24ชั่วโมง

ศักยภาพเชิงปริมาณในการย่อยละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียคัดเลือก 13 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถเชิงปริมาณในการย่อยละลายฟอสเฟต ในอาหาร PVK broth ที่มี $Ca_3(PO_4)_2$ เป็นแหล่งฟอสเฟต พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือก 13 ไอโซเลท สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกสามารถละลายฟอสเฟตได้มากกว่า 100 มิลลิกรัม P/ลิตร โดยผลิตได้อยู่ในช่วง 111.2-181.4 มิลลิกรัม P/ลิตร กลุ่มที่สองผลิตได้น้อยกว่า 100 มิลลิกรัม P/ลิตร โดยผลิตได้อยู่ในช่วง 37.8-94.3 มิลลิกรัม P/ลิตร โดยที่ RMW_4NF1 มีปริมาณการย่อยละลายฟอสเฟตสูงที่สุดคือ 181.4 มิลลิกรัม P/ลิตร โดยมีค่าสูงกว่าไอโซเลทอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ RMW_3NF3 ย่อยละลายฟอสเฟตได้น้อยที่สุดคือ 37.8 มิลลิกรัม P/ลิตร (Table 2)

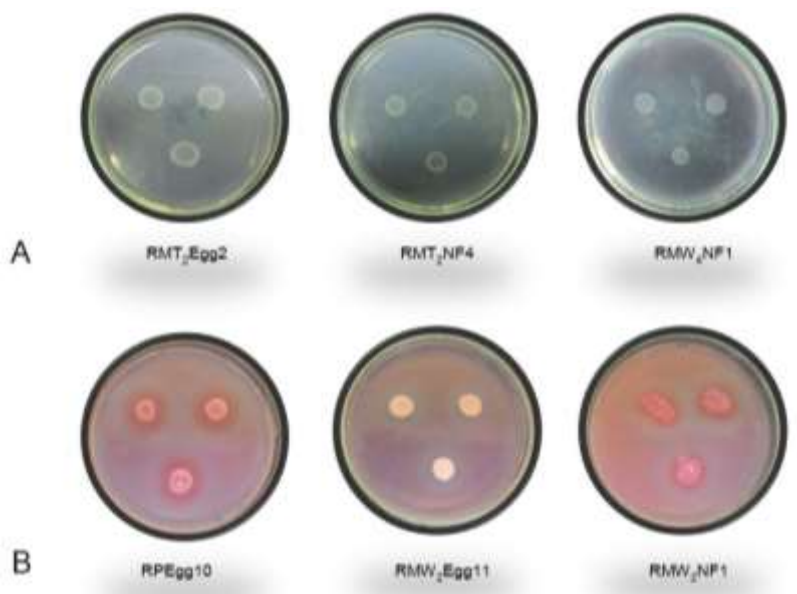

Figure 1. Examples of some bacterial isolates that showed good growth on Burk's N-free medium (A) and Czapek's agar with wide clear zones (B)

Table 2. Abilities of selected bacterial isolates in nitrogen fixation (nitrogenase activity) and phosphate solubilization

Isolate	Nitrogenase activity[1] (nmol C_2H_4/tube/24hr)	Phosphate solubilizing activity[1] (mg P/L)
RMW_1NF2	525.3h	132.7c
RMW_1NF3	531.2gh	113.0e
RMW_2Egg2	611.9e	81.1g
RMW_2Egg8	602.3e	94.3f
RMW_2Egg11	498.6i	39.6i
RMW_2NF1	552.3fg	111.5e
RMW_3NF3	524.7h	37.8i
RMW_3NF4	576.2f	68.3h
RMW_4Egg5	698.6d	146.6b
RMW_4NF1	887.4a	181.4a
RMT_2Egg2	744.1c	125.8d
RMT_2NF4	822.9b	126.4d
RPEgg10	482.5i	111.2e
F-test	*	*
CV (%)	2.45	1.93

[1]Mean values followed by the same letter are not significantly different at $P<0.05$ by LSD

ศักยภาพเชิงปริมาณในการผลิต IAA ของแบคทีเรีย

ทำการทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชโดยการวัดปริมาณ IAA โดยการนำแบคทีเรียคัดเลือก 13 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหาร NB ที่ไม่เติม L-tryptophan พบว่า สามารถผลิต IAA อยู่ในช่วง 0.13-14.45 มิลลิกรัม IAA/ลิตร โดยไอโซเลทที่ผลิตได้มากที่สุด คือ RMT_2NF4 มีค่าการผลิต IAA เท่ากับ 14.45 มิลลิกรัม IAA/ลิตร และไอโซเลทที่ผลิตได้น้อยที่สุด คือ RMW_1NF2 มีค่าการผลิต IAA เท่ากับ 0.13 มิลลิกรัม IAA/ลิตร และเมื่อเติม L-tryptophan 0.2 กรัม/ลิตร พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิต IAA อยู่ในช่วง 0.62-34.93 มิลลิกรัม IAA/ลิตร โดยไอโซเลทที่ผลิตได้มากที่สุด คือ RMW_3NF4 มีค่าการผลิต IAA เท่ากับ 34.93 มิลลิกรัม IAA/ลิตร และไอโซเลทที่ผลิตได้น้อยที่สุด คือ RMW_2NF1 มีค่าการผลิต IAA เท่ากับ 0.62 มิลลิกรัม IAA/ลิตร (Figure 2)

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและการดูดใช้ธาตุอาหาร

การทดลองนี้ใช้สารละลายที่ปราศจากไนโตรเจนในการทดสอบการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน (Table 2) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและการดูดใช้ธาตุอาหารในห้องปฏิบัติการได้ 6 ไอโซเลท ได้แก่ RMW_2Egg2, RMW_2Egg8, RMW_4Egg5, RMW_4NF1, RMT_2Egg2 และ RMT_2NF4 ผลการทดลองพบว่า การใช้เชื้อไรโซแบคทีเรียคัดเลือกทำให้การเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและรากดีกว่ากรรมวิธีควบคุม อย่างชัดเจน (Figure 3) เมื่อวัดการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว พบว่า กรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทให้ค่าความสูงต้นและความยาวรากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ยกเว้นการใส่เชื้อ RMW_2Egg8) โดยที่การใส่เชื้อ

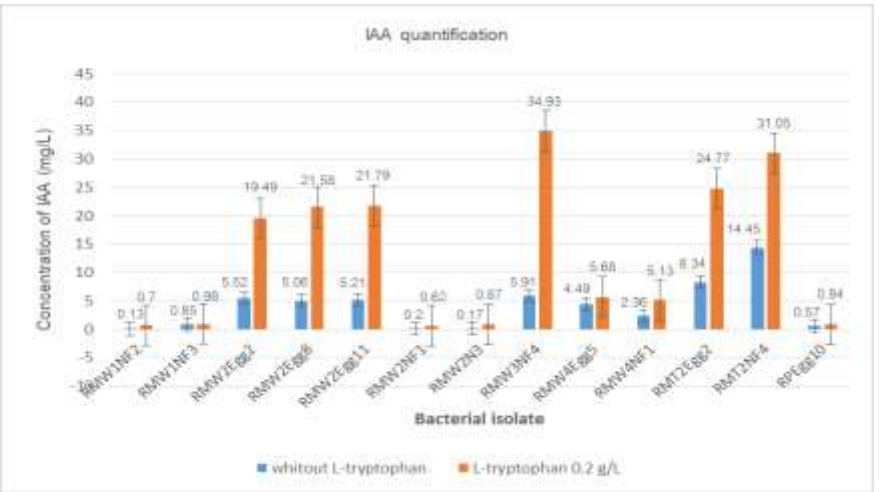

Figure 2. Concentration of IAA produced by selected bacterial isolates in NA medium with and without L-tryptophan

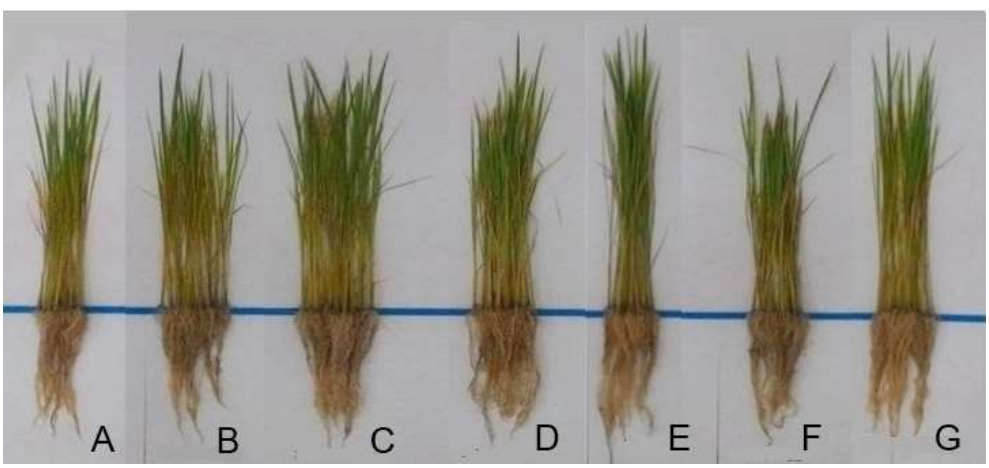

Figure 3. Rice seedlings inoculated with selected rhizobacteria (30 days after planting); Control (A), RMW_2Egg2 (B), RMW_2Egg8 (C), RMW_4Egg5 (D), RMW_4NF1 (E), RMT_2Egg2 (F) and RMT_2NF4 (G)

RMW_4NF1 ให้ค่าความสูงต้นกล้ามากที่สุด รองลงมาได้แก่ RMT_2NF4 และ RMW_2Egg8 ตามลำดับ (30.28, 29.83 และ 29.24 เซนติเมตร ตามลำดับ) และ การใส่เชื้อ RMW_4NF1 ก็ให้ค่าความยาวรากมากที่สุดเช่นกัน (17.56 เซนติเมตร) รองลงมาได้แก่ RMT_2NF4 และ RMW_4Egg5 ตามลำดับ (17.54 และ 16.04 เซนติเมตร ตามลำดับ) (Table 3) อย่างไรก็ตามพบว่าการใส่เชื้อ RMT_2NF4 ให้ค่าน้ำหนักสดของต้นและราก (8.61 และ 13.43 กรัม/ต้น ตามลำดับ) รวมทั้งน้ำหนักแห้งของต้นและราก (1.77 และ 1.18 กรัม/ต้น ตามลำดับ) สูงกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทุกกรรมวิธีที่ใส่เชื้อให้ค่า N uptake และ P uptake สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่การใส่เชื้อ RMT_2NF4 ให้ค่า N uptake และ P uptake (36.29 และ 1.95 มิลลิกรัม/ต้น ตามลำดับ) สูงที่สุด

Table 3. Effect of bacterial inoculation on growth and nutrients content of rice seedlings at 30 day after planting

Treatment	Root length[1] (cm)	Plant height[1] (cm)	Fresh weight[1] (g/9 plants)[2]		Dry weight[1] (g/9 plants)[2]		N uptake[1] (mg/9 plants)[2]	P uptake[1] (mg/9 plants)[2]
			Root	Leaves	Root	Leaves		
Control	15.39d	25.57g	6.94g	5.33g	0.64g	1.12f	11.54g	1.12c
RMW_2Egg2	15.56c	26.73f	8.01f	6.56f	0.74f	1.30e	23.79c	1.45b
RMW_2Egg8	15.26e	29.24c	11.24b	8.06b	1.02b	1.63b	25.27b	1.63b
RMW_4Egg5	16.04b	27.90e	10.49d	6.99d	0.93c	1.49c	18.18e	1.49b
RMW_4NF1	17.56a	30.28a	10.79c	7.87c	0.88d	1.63b	22.17d	1.63b
RMT_2Egg2	16.02b	28.43d	9.88e	6.74e	0.84e	1.32d	17.42f	1.45b
RMT_2NF4	17.54a	29.83b	13.43a	8.61a	1.18a	1.77a	36.29a	1.95a
F-test	*	*	*	*	*	*	*	*
CV (%)	0.13	0.07	0.31	0.38	2.01	1.99	3.6	7.5

[1]Mean values followed by the same letter are not significantly different at $P<0.05$ by LSD

[2]There were 9 seedlings per treatment

วิจารณ์

การศึกษาวิจัยไรโซแบคทีเรียในพืชหลายชนิด เช่น อ้อย (Yiam-on *et al.*, 2012) และข้าว (Maruekarajtinplaeng, 2014; Patel and Desai, 2015) พบว่า มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และ/หรือ ย่อยละลายฟอสเฟตได้และอาจเป็นทางเลือกที่ดีเพื่อลดหรือทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้มีการรายงานมา โดยไรโซแบคทีเรียที่แยกได้สามารถขึ้นในอาหารแข็งที่ปราศจากไนโตรเจน (Burk's N-free medium) ได้ประมาณครึ่งหนึ่งของไอโซเลทที่แยกได้ทั้งหมด (48/94 ไอโซเลท) และ ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการย่อยละลายฟอสเฟตได้ เมื่อคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนและย่อยละลายฟอสเฟตในอาหารแข็ง (13 ไอโซเลท) มายืนยันศักยภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA พบว่า RMW_4NF1 และ RMT_2NF4 มีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงมากคือ 887.4 และ 822.9 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24 ชั่วโมง ตามลำดับ Koomnok *et al.* (2007) ได้แยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากข้าว โดยสรุปว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่วัดโดยวิธี ARA ถือว่าอยู่ในเกณฑ์สูงหากมีค่า >100 นาโนโมล C_2H_4/หลอด/24ชั่วโมง ส่วนงานวิจัยของ Jatupornphipat *et al.* (2011) นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี ARA พบว่า ไอโซเลท SC05N2518 มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 350.64 นาโนโมล C_2H_4 ต่อมิลลิลิตรของก๊าซตัวอย่าง ในการทดลองนี้นอกจากไอโซเลท RMW_4NF1 และ RMT_2NF4 จะมีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงแล้วยังสามารถย่อยละลายฟอสเฟตได้สูงอีกด้วย (181.4 และ 126.4 mg P/L ตามลำดับ) ความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยละลายฟอสเฟต สอดคล้องกับงานวิจัยของ El-Komy (2005) ซึ่งรายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus megaterium* สามารถละลายฟอสเฟต ได้เท่ากับ 126.6 และ 106.5 มิลลิกรัม P/ลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการแยกแบคทีเรียจากบริเวณรอบรากมาส่งผลให้ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์โดยทั่วไปจะมีความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แปรผันมากกว่าดินที่ไม่มีการปลูกพืช (Marschner *et al.*, 2001)

นอกจากความสามารถตรึงไนโตรเจนและย่อยละลายฟอสเฟตได้แล้ว ไรโซแบคทีเรียไอโซเลทคัดเลือก

(13 ไอโซเลท) ทุกไอโซเลทยังสามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้ ถึงแม้จะไม่มีการเติม L-tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต IAA ก็ตาม อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเติม L-tryptophan พบว่าทุกไอโซเลทสามารถผลิต IAA ได้มากขึ้นอย่างชัดเจนแต่มีบางไอโซเลทเท่านั้นมีสามารถผลิตได้ในปริมาณสูงโดดเด่นมากกว่าไอโซเลทอื่น โดยเฉพาะไอโซเลท RMW_3NF4 และ RMT_2NF4 (34.93 และ 31.05 มิลลิกรัม IAA/ลิตร ตามลำดับ) ในการผลิต IAA ของแบคทีเรียนั้นโดยทั่วไปแล้วต้องการ Tryptophan เป็นสารตั้งต้น ซึ่งกลไกการสังเคราะห์ IAA ในแบคทีเรียมีหลายแบบ นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์บางกลุ่มที่ผลิต IAA ได้โดยไม่ต้องการ Tryptophan (Sarin *et al*., 2013) ปริมาณการผลิต IAA มีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละไอโซเลท จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืชมีความสามารถผลิต IAA ได้ จากการศึกษาของ Ahmad *et al*. (2008) พบว่า *Azotobacter* และ *Pseudomonas* ผลิต IAA อยู่ในช่วง 2.13-3.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *P. putida* และ *Trichoderma atroviride* สามารถผลิต IAA อยู่ในช่วง 3.3-6.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Gravel *et al*. (2007) แสดงความคิดเห็นว่า การนำเอาไรโซแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้กับพืช ก็มีความเป็นไปได้ที่ไรโซแบคทีเรียยังสามารถผลิต IAA ได้ เนื่องจากสารประกอบบางชนิดที่พืชขับออกมาจากราก (plant root exudates) มี L-tryptophan รวมอยู่ด้วย ดังนั้นจุลินทรีย์จึงสามารถผลิต IAA ได้โดยใช้สารตั้งต้นนี้ โดยตัวอย่างของผลการวิจัยพบว่าสารประกอบที่ขับออกมาจากรากของต้นกล้ามะเขือเทศและหัวผักกาดแดงมีปริมาณ L-tryptophan 2.8-5.3 และ 290-390 นาโนกรัม/กล้า/วัน ตามลำดับ (Kravchenko *et al*., 2004)

ผลของการใช้ไรโซแบคทีเรียคัดเลือก (6 ไอโซเลท) กับต้นกล้าข้าวแสดงให้เห็นว่า เชื้อแต่ละไอโซเลทให้ผลต่อการเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุอาหารแตกต่างกัน ไอโซเลท RMW_4NF1 และ RMT_2NF4 ซึ่งมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูง ส่งเสริมให้ต้นกล้าข้าวมีการเจริญเติบโตทางรากและต้นเหนือดิน โดยเฉลี่ยสูงกว่าการใช้ไอโซเลทอื่น นอกจากนี้ RMT_2NF4 ยังส่งผลให้ต้นกล้าข้าวมีการดูดใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้สูงที่สุดอีกด้วย ถึงแม้ว่า RMW_4NF1 จะมีความสามารถการตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่า RMT_2NF4 แต่ทำให้ต้นกล้าข้าวมีการดูดใช้ไนโตรเจนต่ำกว่า RMT_2NF4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์น่าจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยจุลินทรีย์แตกต่างกัน จากการทดลองครั้งนี้ พบว่า ทุกกรรมวิธี มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่ไม่แตกต่างกันโดยมีค่า 0.10-0.11 เปอร์เซ็นต์ (ไม่ได้แสดงผล) แต่ผลของการดูดใช้ฟอสฟอรัสที่มีความแตกต่างกันนั้นเกิดจากชีวมวลของต้นกล้าข้าวเพิ่มสูงขึ้นจากประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้ต้นกล้าข้าวมีการใช้ฟอสเฟตจาก N free nutrient solution ที่มีฟอสเฟตในรูปที่ใช้ประโยชน์ได้ (KH_2PO_4) เพิ่มสูงขึ้นตามการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่า กรรมวิธีควบคุมนั้นไม่มีการใช้เชื้อไรโซแบคทีเรียให้กับต้นกล้าข้าวแต่พบว่ามีการดูดใช้ไนโตรเจน (ประมาณครึ่งหนึ่งของกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ) ซึ่งไม่มีในสารละลายอาหาร จึงอาจกล่าวได้ว่าไนโตรเจนในกรรมวิธีควบคุมนั้นได้มาจากเมล็ด โดยที่เมล็ดข้าวมีความเข้มข้นของไนโตรเจนระหว่าง 1.27-1.53% (In-nok *et al*., 2016; Yesuf and Balcha, 2014) ส่วนการดูดใช้ฟอสฟอรัสของต้นกล้าข้าวในกรรมวิธีควบคุมนั้นได้มาจาก 2 แหล่ง คือ เมล็ดข้าวซึ่งมีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส 0.2-0.57% (In-nok *et al*., 2016; Malav and Ramani, 2016) และ KH_2PO_4 ที่เป็นส่วนผสมของ N-Free medium ผลของการดูดใช้ฟอสเฟตที่แตกต่างกันของทั้งกรรมวิธีควบคุมและการใส่เชื้อแบคทีเรียจึงไม่ได้เกิดจากประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงควรมีการทดลองในกระถางและมีกรรมวิธีที่ใส่แหล่งของฟอสเฟตที่อยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์หรือเป็นประโยชน์น้อยมาก เพื่อยืนยันความสามารถในการย่อยละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

จากผลการทดลองของ Keyeo *et al*. (2011) สรุปว่า การใช้แบคทีเรีย L2 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวได้เทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน และดีกว่าการใช้แบคทีเรีย L15, Sp7 และ Z78 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียบางไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถใช้ลดหรือทดแทนปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้ ถึงแม้ว่าในงานทดลองนี้ไม่มีกรรมวิธี

เปรียบเทียบกับการใช้ไนโตรเจนในสารละลายอาหาร แต่พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน RMT_2NF4 ที่แยกได้จากการทดลองครั้งนี้และมีความโดดเด่นในการตรึงไนโตรเจน จึงคาดว่าอาจได้ผลของการใช้ RMT_2NF4 ใกล้เคียงกับการใช้ไนโตรเจน ในทำนองเดียวกันกับงานทดลองของ Keyeo *et al*. (2011) อย่างไรก็ตาม ควรมีการนำไอโซเลทนี้ไปทดสอบเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้ นอกจากนี้ RMT_2NF4 ยังสามารถผลิต IAA ได้สูงอีกด้วย (31.05 มิลลิกรัม IAA/ลิตร) ซึ่งได้ส่งผลให้น้ำหนักแห้งของต้นและรากมากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ IAA เป็นออกซินธรรมชาติที่มีบทบาทในการเจริญของรากมากที่สุดโดยถ้าด้านล่างของรากมีปริมาณ IAA มาก จะมีผลในการกระตุ้นให้รากยาวและเกิดรากแขนงมาก (Tanimoto, 2005) และ IAA ยังมีบทบาทในการขยายตัวของเซลล์ (Boutté *et al*., 2007) ส่งผลต่อความสูงและน้ำหนักสดของต้นกล้าข้าว ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงผลของการใช้ RMT_2NF4 ที่มีแนวโน้มที่ดีมากต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุอาหารของต้นกล้าข้าว ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการที่ไอโซเลทนี้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และสร้างฮอร์โมน IAA ในปริมาณที่เหมาะสม Keyeo *et al*. (2011) แสดงความคิดเห็นว่า การสร้าง IAA ของแบคทีเรีย Sp7 และ Z78 อาจจะสูงเกินไปทำให้ส่งผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและมีค่าต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม

สรุป

การแยกไรโซแบคทีเรียจากข้าวในการทดลองครั้งนี้ พบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตได้ อย่างไรก็ตามมีเพียง 6 ไอโซเลท เท่านั้น คือ RMW_2Egg2, RMW_2Egg8, RMW_4Egg5, RMW_4NF1, RMT_2Egg2 และ RMT_2NF4 ที่มีความสามารถโดดเด่นในการตรึงไนโตรเจน การย่อยละลายฟอสเฟต และการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) จึงได้นำไปทดสอบประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทนี้ ต่อการเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุอาหารของต้นกล้าข้าว ผลการทดลองพบว่า การใช้ไรโซแบคทีเรียส่งผลให้การเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การใช้ไรโซแบคทีเรียยังเพิ่มการดูดใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ให้สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 50-215% และ 29.5-74% ตามลำดับ ไรโซแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงนี้จึงสามารถนำไปผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการผลิตข้าวเพื่อลดหรือทดแทนปุ๋ยเคมีได้ อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาในภาคสนามโดยการใช้เชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสมทั้งนี้เพื่อยืนยันผลของการใช้แบคทีเรียเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตข้าว และเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์อินทรีย์จากแบคทีเรียทางด้านการเกษตรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณ บริษัท TRISAP GROUP PTY LTD ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research 163(2): 173-181.

Boutté, Y., Y. Ikada and M. Grebe. 2007. Mechanisms of auxin-dependent cell and tissue polarity. Current Opinion in Plant Biology 10(6): 616-623.

El-Komy, H.M.A. 2005. Co-immobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. Food Technology Biotechnology 43(1): 19-27.

Gaur, A.C. 1990. Physiological functions of phosphate solubilizing micro-organisms. pp. 16-72. *In*: A.C. Gaur (ed.). Phosphate Solubilizing Micro-organisms as

Biofertilizers. Omega Scientific Publishers, New Delhi.

Gordon, S.A. and R.P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant Physiology 26(1): 192-195.

Gravel, V., H. Antoun and R.J. Tweddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry 39(8): 1968-1977.

In-nok, A., P. Poomipan and O. Thepsilvisut. 2016. Comparison on quality of rice var. Khao Dawk Mali 105 planted by using chemical and organic fertilizers in Surin province. Thai Science and Technology Journal 24(5): 766-776. (in Thai)

Insalud, N., P. Sangruan and K. Leechaikul. 2015. The influence of IAA producing bacteria on the stimulation of growth in rice. Agricultural Science Journal 46(3): 625-628. (in Thai)

Jatupornpipat, M., A. Rittiboon and C. Nopparat. 2011. Evaluation of nitrogen fixing efficiency of bacteria isolated from soils by acetylene reduction assay. pp. 1-6. *In:* Proceedings of the 21st Thai Institute of Chemical Engineering and Applied Chemistry. Prince of Songkla University, Songkhla. (in Thai)

Keyeo, F., O. Noor Ai'shah and H.G. Amir. 2011. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. Biotechnology 10(3): 267-273.

Koomnok, C., N. Teaumroong, B. Rerkasem and S. Lumyong. 2007. Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. ScienceAsia 33: 429-435.

Kravchenko, L.V., T.S. Azarova, N.M. Makarova and I.A. Tikhonovich. 2004. The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria. Microbiology 73(2): 156-158.

Mala, T. 2007. Organic Fertilizer and Biofertilizer: Production Techniques and Application. 2nd ed. Kasetsart University Press, Bangkok. 300 p. (in Thai)

Malav, K.J. and V.P. Ramani. 2016. Yield and nutrient content of rice as influenced by silicon and nitrogen application. Research Journal of Chemical and Environmental Sciences 4(4): 46-49.

Marschner, P., C.H. Yang, R. Lieberei and D.E. Crowley. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 33(11): 1437-1445.

Maruekarajtinplaeng, S. 2014. Diversity of nitrogen fixing bacteria isolated from rice rhizosphere soil in Phranakhon Si Ayutthaya province. VRU Research and Development Journal Science and Technology 9(3): 72-83. (in Thai)

Patel, P.V. and P.B. Desai. 2015. Isolation of rhizobacteria from paddy field and their traits for plant growth promotion. Research Journal of Recent Sciences 4: 34-41.

Punyadoung, C. 2007. Production of soybean-rhizobium inoculum by spray-drying. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 98 p. (in Thai)

Sarin, S., T. Prombunchachai, N. Nakaew and A. Chidburee. 2013. Isolation of indole acetic acid producing pink pigmented facultative methylotrophs (PPFMs) from *Murdannia loriformis* (Hassk.) R. Rao & Kammathy.

Naresuan University Journal 21(2): 12-24. (in Thai)

Siwasilp, N. 1984. Handbook of Soil, Plant and Fertilizer Analysis. Department of Soil Science and Conservation, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 138 p. (in Thai)

Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer-Verlag, New York. 397 p.

Surange, S., A.G. Wollum II, N. Kumar and C.S. Nautiyal. 1997. Characterization of rhizobium from root nodules of leguminous tree growing in alkaline soils. Canadian Journal of Microbiology 43(9): 891-894.

Tanimoto, E. 2005. Regulation of root growth by plant hormones- role for auxin and gibberellins. Critical Reviews in Plant Sciences 24(4): 249-265.

Wanchai, K. and S. Ruangsangka. 2014. Effect of phosphate-solubilizing bacteria immobilized on rice husk ash, on growth of RD47 rice. Agricultural Science Journal 45(2)(Suppl.): 513-516. (in Thai)

Wattanaphayapkul, W. 2015. Effects of wood vinegar and manure on growth, yield and seed quality of Hom Mali rice. Journal of Agriculture 31(3): 269-279. (in Thai)

Weaver, R.W. and S.K.A. Danso. 1994. Dinitrogen fixation. pp. 1019 -1046. *In*: R.W. Weaver, J.S. Angle, P.S. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai and A. Wollom. (eds.). Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Wilson, P.W. and S.G. Knight. 1952. Experiments in Bacterial Physiology. Burgess, Minneapolis. Minnesota, 49 p.

Yasari, E., A.M.E. Azadgoleh, H. Pirdashti and S. Mozafari. 2008. *Azotobacter* and *Azospirillum* inoculants as biofertilizers in canola (*Brassica napus* L.) cultivation. Asian Journal of Plant Sciences 7(5): 490-494.

Yesuf, E. and A. Balcha. 2014. Effect of nitrogen application on grain yield and nitrogen efficiency of rice (*Oryza sativa* L.). Asian Journal of Crop Science 6(3): 273-280.

Yiam-on, T., N. Riddech, P. Jaisil and S. Boonlue. 2012. Growth promotion of sugarcane by phosphate solubilizing bacteria in green house condition. Khon Kaen Agricultural Journal 40(Suppl. 3): 185-193. (in Thai)

Physicochemical Properties and Carbon and Nutrient Storages of Soils Derived from Volcanic Rock and Sandstone in Dry Dipterocarp Forest at Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Chiang Mai Province

คุณสมบัติทางกายภาพเคมีและการกักเก็บคาร์บอนและธาตุอาหารในดินที่เกิดจากหินภูเขาไฟและหินทรายในป่าเต็งรังที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

Chackapong Chaiwong[1*], Soontorn Khamyong[2], Niwat Anongrak[1],
Prasit Wangpakapattanawong[3] and Suparb Paramee[4]
จักรพงษ์ ไชยวงศ์[1*] สุนทร คำยอง[2] นิวัติ อนงค์รักษ์[1] ประสิทธิ์ วังภคพัฒนวงศ์[3] และ สุภาพ ปารมี[4]

[1]Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[1]ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
[2]Department of Highland Agriculture and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[2]ภาควิชาเกษตรที่สูงและทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
[3]Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[3]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
[4]Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok 10900, Thailand
[4]กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรุงเทพฯ 10900, Thailand
**Corresponding author: Email: chackapongc@gmail.com*

(Received: 18 October 2018; Accepted: 9 March 2019)

บทคัดย่อ: การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี การกักเก็บคาร์บอนและธาตุอาหารในดิน ที่เกิดจากหินวัตถุต้นกำเนิดดินต่างกัน 2 ชนิด คือ หินภูเขาไฟและหินทรายในป่าเต็งรัง ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ โดยใช้หลุมศึกษาลักษณะของดิน จำนวน 8 หลุม เก็บตัวอย่างดินตามระดับความลึก และนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีในห้องปฏิบัติการ จากผลการศึกษาพบลักษณะของดิน 2 กลุ่ม คือ ดินตื้น (ความลึก<40 ซม.) จัดอยู่ในอันดับ Inceptisols และดินลึก (ความลึก >100 ซม. ขึ้นไป) จัดอยู่ในอันดับ Ultisols และ Oxisols โดยที่ดินส่วนใหญ่มีปริมาณกรวดปนมากและมีความหนาแน่นต่ำยกเว้น ดินในอันดับ Oxisols โดยทั่วไปลักษณะของเนื้อดินหยาบถึงปานกลางในดินบน และปานกลางถึงละเอียดในดินล่าง ค่าปฏิกิริยาดินของดินที่เกิดจากหินทรายจะมีค่าต่ำกว่าดินที่เกิดจากหินภูเขาไฟ ปริมาณอินทรียวัตถุ คาร์บอน และไนโตรเจนทั้งหมดในดิน มีค่าสูงในดินบน และลดลงในดินล่าง ปริมาณของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และแคตไอออนที่สกัดได้ (โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม) มีค่าต่ำมากตลอดช่วงความลึกของดิน โดยที่ปริมาณอินทรียวัตถุ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแคตไอออนที่สกัดได้ทั้งในดินตื้นและดินลึกบนหินภูเขาไฟมีค่าสูงกว่าหินทราย ซึ่งดินป่าเต็งรังที่เกิดจากหินทั้ง 2 ชนิดนี้ มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีและการและความสามารถในการกักเก็บคาร์บอนและธาตุอาหารที่ต่างกัน ซึ่งเป็นปัจจัยมีผลต่อการเจริญเติบโต ผลผลิตและความหลากหลายของชนิดพืชในพื้นที่

คำสำคัญ: คาร์บอน ป่าเต็งรัง ธาตุอาหาร หินวัตถุต้นกำเนิด คุณสมบัติของดิน

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

Abstract: Comparison on physicochemical properties and carbon-nutrient storage in soils derived from two parent rocks, volcanic rock, and sandstone, under a dry dipterocarp forest (DDF) was studied in the Huai Hong Khrai Royal Development Study Center (HHK), northern Thailand. Eight soil pits were made in the DDF, and soil composite samples were collected along the depths. The samples were analyzed for physicochemical properties in a laboratory. Two groups of the soils were found; shallow (<40 cm depth) and deep (100 cm or more). The shallow soils were classified into Order Inceptisols, whereas deep soils were Ultisols, however, the soil pedon of volcanic rock was Oxisols. Most soils contained many gravels and very low bulk densities, except for the Oxisols. The textures of the soils were coarse to medium in topsoils and medium to fine in subsoils. Soil reaction of three soil pits on sandstone was more acid than those on volcanic rocks, except one pedon on sandstone had the neutral. The organic matter, carbon and total nitrogen content in all soils were high in surface soils and less in subsoils. Available phosphorus (P) and extractable cations of potassium (K), calcium (Ca) and magnesium (mg) were very low throughout the soil depths. Amounts of organic matter, carbon, nitrogen, available P and extractable cations in both shallow and deep soils on volcanic rocks were higher than those on sandstone. The DDF soils on two parent rocks had some differences in physicochemical properties and carbon-nutrient storages and are considered as the important factor on plant growth, production, and species diversity.

Keywords: Carbon, dry dipterocarp forest, nutrients, parent rocks, soil properties

Introduction

The dry dipterocarp forest is distributed widely on very dry areas in mainland of Southeast Asia. This forest composed of medium to tall trees which remain almost leafless during the dry season and had a closed to slightly open canopy (Bunyavejchewin, 1983). The DDF also covers large areas in northern Thailand. It is distributed on the undulating peneplain and ridges in the dry sites, sandy and lateritic soils. The dominant tree species in the forest are those in the family of Dipterocarpaceae including *Dipterocarpus tuberculatus*, *Dipterocarpus obtusifolius*, *Shorea obtusa* and *Shorea siamensis* (Phongkhamphanh *et al*., 2015). This forest covers an extensive area from a peneplain of about 150 m altitude to slopes and rides of up to 1,300 m (Smithinand *et al*., 1980). It is also the habitat of edible mushrooms, vegetables, medicinal plants, and woods, playing the ecological roles on carbon and nutrient cycles. The early record of the DDF area in Thailand was about 47% of the total forest area (Neal, 1967) and the current forest area has decreased dramatically due to forest clearing as a result of rapid expansion in the socioeconomic and increasing population of the country. The Royal Forest Department (RFD), Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation and other agencies, especially through the Royal Initiative Project, have implemented the conservation and sustainable uses of this forest to mitigate the harmful consequences of clearing forest. The Huai Hong Khrai Royal Development Study Center (HHK) was established in 1982 under the Royal Initiative of His Majesty King Bhumibol Adulyadej's in the Khun Mae Kuang National Forest Reserve, Chiang Mai, with objectives of creating center for studies, research and experimentation on appropriate methods for development of the northern region especially integrated watershed and forest

management. The forest ecosystem can be divided into two main compartments; plants and soil system. In the DDF, the forest floor (organic layers) is usually thinned or disappeared due to forest fire and rapid litter decomposition. The carbon sequestration by the forest through photosynthesis and carbon accumulation as carbohydrate in plant tissues are considered as the carbon sink (Kimmins, 2004; Waring and Running, 1998). A part of carbon is moved to the forest floor through litterfall and later accumulated in the soil system. However, most carbon in the forest floor under the DDF is almost moved to atmosphere through a forest fire and to the stream by soil erosion. A small part of carbon may be moved into and stored in the soil with variable amounts in different locations of the DDF. The roles of different parent rocks on soil physicochemical properties will further affect carbon-nutrient storages. This research aims to study physicochemical properties and carbon-nutrient storage in soils from different parent rocks, volcanic rock, and sandstone, in the DDF.

Materials and Methods

Site description

This research was carried out in the HHK, Doi Sa Ket District, Chiang Mai Province, at an altitudinal range from 320 m to 600 m above mean sea level. The HHK has an area of 1,359 ha with monsoon climate: the rainy season, May to October; winter, November to February and summer, March to April. The mean annual air temperature and rainfall were 22.5 °C and 1,360.5 mm respectively (the data collected from 1985 to 2016 at HHK Meteorological Station). Soils are developed from the colluvium and residuum rocks in periods of Permo-Triassic (andesite, basalt, and associated pyroclastic rocks), Carboniferous (sandstone, quartzite, and shale) and Permian (sandstone, siltstone, tuff, and chert) (Department of Mineral Resources, 1999). Two deciduous forests are observed, the dry dipterocarp forest and mixed deciduous forest. The forests were very poor as a result of selective tree cutting during forest concession and illegal cutting before the establishment of the Center in 1982. The areas are different: the DDF (650 ha) on volcanic rock and sandstone, the mixed deciduous forest (416 ha) on shale and limestone, and the other land uses including reservoir, agricultural and urban area (293 ha).

Soil sampling and physicochemical analysis

Eight representative soil pits were made inside eight 40 x 40 m sampling plots used for vegetation study and soil profiles were characterized according to Schoeneberger *et al*. (2002) and Soil Survey Division (1993). The soil samples within each soil pit were collected with three replications from the depths of 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-60, 60-80, 80-100 cm or depending on soil depths using disturbed and undisturbed (soil cores) method. The samples were air-dried and crushed to pass through a 2 mm sieve for analyzing soil physicochemical properties (Soil Survey Staff, 2004) including bulk density (BD by soil core method, gravel content (rock fragments larger than 2 mm), soil particle-size distribution by hydrometer method, pH by pH meter (soil and water at 1:1 ratio), organic carbon (C) by Walkley and Black titration method, total nitrogen (N) by Kjeldahl, available P by Bray II solution and spectrophotometer and extractable cations (K, Ca and mg) using 1N NH_4OAc, pH 7 and atomic absorption spectrometry (AAS). The carbon and nutrient storage were calculated from their contents multiplied by soil mass per hectare for each depth.

Results and Discussion

Soil profiles and classification

Table 1 shows site features and soil types in the DDF on volcanic rock and sandstone. The soil profiles included typical horizons. The B horizon can vary among soil types: young developed subsoil contained many gravel and rocks (Bw), more developing subsoil with high clay contents (Bt) and containing plinthite (Btv), and more developed subsoil with high iron oxides or oxic horizon (Bo). ***Volcanic rock:*** Two soil groups located in the middle slope sites were found, shallow (40 cm depth) and deep (200+ cm) soils. The shallow soils (pedons 1 and 2) had different site features: altitude, 589 m and 504 m, and slope gradient, 20% and 21%, and classified into Order Inceptisols with A/Bw/C profile while deep soils (pedons 3 and 4) had different values: altitude, 521 m, and 473 m and slope gradient, 4% and 3% at the middle and lower slope sites. Pedon 3 was classified into order Oxisols (A/Bo1/Bo2) whereas pedon 4 was the Ultisols (A/Bt/Btv). ***Sandstone:*** Both shallow and deep soils were observed. The shallow soils located in the upper slopes (pedons 5 and 6) with different site features: altitude, 409 m, and 519 m; slope gradient, 12%, and 4%, and classified into Order Inceptisols (A/Bw/C). The deep soils (pedon 7 and 8) had different features: altitude, 484 m, and 404 m, slope gradient 3% and 6%, located in the lower and middle slopes. Pedon 7 was the deep soil (200+ cm) classified into the Ultisols (A/Bt1/Btv) while pedon 8 had the intermediate-deep (160 cm)(A/Bt1/Bt2).

The shallow soils on two parent rocks (pedons 1, 2 and pedons 5, 6) were the initial stage and classified into Order Inceptisols due to soil profile development particularly cambic (Bw) horizon (Soil Survey Staff, 2014). The deep soil of pedon 3 was classified into Order Oxisols according to deep weathering of iron-rich volcanic rock with more reddish color and unclear difference of oxic horizon. The deep soils, pedons 7 and 8, were classified into low base soils, Order Ultisols, with the clear clay accumulation in subsoils (Bt) (Soil Survey Staff, 2014). The subsoil containing plinthite (Btv) was observed in pedon 4 and pedon 7 caused by iron oxides in both volcanic rock and sandstone saturated with water in the rainy season (Soil Survey Staff, 1993).

Table 1. Site characteristics and soil types in the DDF on two different parent rocks

Parent rock	Altitude (meter)	Slope (%)	Slope position	Soil depth (cm)	Soil profile	Soil order
Volcanic rock						
Pedon 1	589	21	Middle slope	40, shallow	A-Bw-C	Inceptisols
Pedon 2	504	20	Middle slope	40, shallow	A-Bw-C	Inceptisols
Pedon 3	521	4	Middle slope	200^{+}, deep	A-Bo1-Bo2	Oxisols
Pedon 4	473	3	Lower slope	200^{+}, deep	A-Bt-Btv	Ultisols
Sandstone						
Pedon 5	409	12	Upper slope	40, shallow	A-Bw-C	Inceptisols
Pedon 6	519	4	Upper slope	40, shallow	A-Bw-C	Inceptisols
Pedon 7	484	3	Lower slope	200^{+}, deep	A-Bt-Btv	Ultisols
Pedon 8	404	6	Middle slope	160, deep	A-Bt1-Bt2	Ultisols

Soil physical properties

1. Gravel content

Volcanic rock: The shallow soils classified into the Inceptisols contained some gravel amounts in 40 cm depths; 29.65 to 55.40% in pedon 1 and 4.28 to 35.0% in pedon 2. The gravel amounts were very low throughout the soil profile of deep soil, pedon 3 (Oxisols), but some higher amounts were observed in pedon 4 (Ultisols). ***Sandstone:*** Both two pedons of shallow soils, the Inceptisols, composed of high gravel amounts in 40 cm depths; 58.23 to 66.61% in pedon 5 and 53.83 to 64.95% in pedon 6. The amounts were lower in 100 cm deep soil; pedon 7 (Ultisols), 2.24 to 41.85%, but the higher amounts (45.76% to 78.07%) were found in 100 cm depth of pedon 8 (Ultisols) (Figure 1).

2. Bulk density and soil mass

Volcanic rock: The shallow soils had low to very low bulk densities; pedon 1, 0.79 to 1.11 mg/m^3 and pedon 2, 0.87 to 1.32 mg/m^3. As for deep soils, the values were different; pedon 3, low (1.06 to 1.19 mg/m^3) and pedon 4, very low (0.59 to 0.83 mg/m^3). The shallow soils had low amounts of soil mass; pedon 1, 0.37 mg/m^2 and pedon 2, 0.43 mg/m^2. As for deep soils, the amounts were higher; pedon 3, 1.13 mg/m^2 and pedon 4, 0.72 mg/m^2. ***Sandstone:*** Very low densities were found in shallow soils; pedon 5, 0.47 to 0.57 mg/m^3 and pedon 4, 0.61 to 1.01 mg/m^3. In deep soils, pedon 7 had very low values in surface soil and increased to low (1.03 to 1.45 mg/m^3) in subsoil while pedon 8 had very low densities throughout soil depth (0.45 to 0.95 mg/m^3). The shallow soils contained the low amounts of soil mass; pedon 5, 0.21 mg/m^2 and pedon 6, 0.34 mg/m^2. The higher amounts were measured for deep soils; pedon 7, 1.18 mg/m^2 and pedon 8, 0.60 mg/m^2 (Figure 1).

3. Soil particle-size distribution and texture

Soil particles include sand, silt, and clay. Percentages of these particles along soil depth are used to identify soil texture.

Volcanic rock: The sand percentages in shallow soils were medium to high; pedon 1, 62.0 to 76.72% and pedon 2, 50.6 to 60.60%. The silt and clay percentages varied in ranges; pedon 1, 4.28 to 12.0% and 17.28 to 26.0% and pedon 2, 12.30 to 19.20% and 20.20 to 35.30%, respectively. There was no clear clay accumulation in the B horizon. As for deep soils, sand percentages were low to medium; pedon 3, 27.40 to 68.20% and pedon 4, 27.20 to 61.20%. The values for silt and clay in the following order; pedon3, 5.0% to 10.20% and 21.60% to 66.40% and pedon 4, 12.0 to 19.40% and 22.80 to 59.60%. The clay accumulation occurred in B horizon. The shallow soils had loamy texture; pedon 1, sandy loam in surface soil and sandy clay

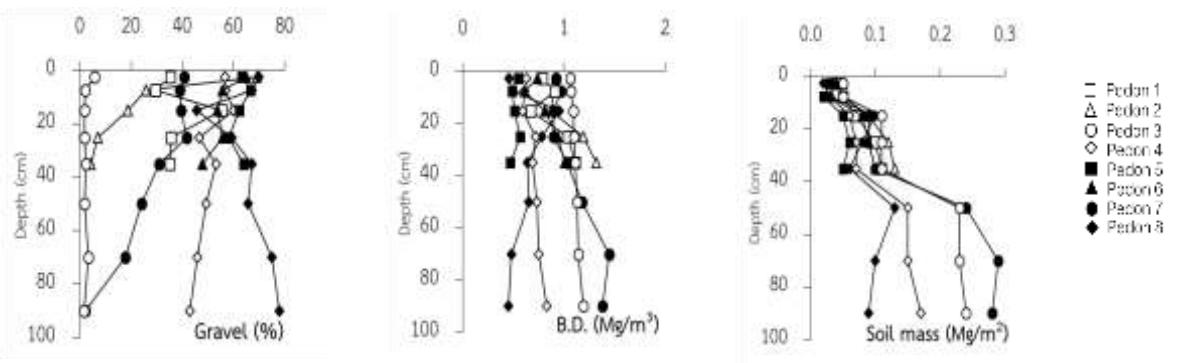

Figure 1. Some soil physical properties of eight soil pedons in the DDF

loam in the subsoil, and pedon 2, sandy clay loam in surface soil, and clay loam and sandy clay loam in the subsoil. Textures of deep soils were loamy and clayey; pedon 3, sandy clay loam and sandy clay in surface soil and clay in the subsoil, and pedon 4, sandy clay loam in surface soil and clay in the subsoil.

Sandstone: The sand percentages along soil depths of shallow soils were medium to high; pedon 5, 36.40 to 60.20% and pedon 6, 50.10 to 80.40%. The silt and clay percentages varied in ranges: pedon 5, 6.20 to 20.40% and 17.60 to 53.10%, and pedon 6, 12.0 to 23.40% and 7.60 to 33.60%, respectively. As for deep soils, the sand percentages were different; pedon 7, high in surface soil and low in the subsoil (28.76 to 74.16%) and pedon 8, high throughout the profile (63.12 to 83.34%). The silt and clay values were in the following order; pedon 7, 12.40 to 20.0% and 7.60% to 51.24%, and pedon 8, 3.50 to 24.20% and 6.44 to 29.40%. The clay content was increased in B horizon of deep soils. The shallow soils had loamy and sandy textures; pedon 5, sandy loam in surface soil and clay loam and clay in the subsoil, and pedon 6, loamy sand in surface soil and sandy loam and sandy clay loam in the subsoil. As for deep soils, they were loamy and clayey textures; pedon 7, sandy loam in surface soil and clay in the subsoil, and pedon 8, loamy sand in surface soil and sandy loam to sandy clay loam in the subsoil.

The young developing soils, Order Inceptisols, were shallowly containing large amounts of gravel and rocks. The more developing soils, Ultisols, were deeper and had smaller amounts of gravel and rocks. As for more developed soils, Order Oxisols, gravel and rocks were almost seen minimum caused by deep weathering. The volcanic rock is formed by crystallization from magma cooled at the earth's surface whereas most sandstones in Thailand are formed from all rock types deposited after being after transported by water that has been cemented together (Pye, 2007). The high content of sand and gravels in soils resulted from quartz which was difficult to weather at the beginning stage of soil development, it produces little residuum and soils tend to be shallow (Schaetzl and Anderson, 2005). In this study area, the soils on the volcanic rock were divided into shallow soils (pedon 1 and 2, Inceptisols) and deep soils (pedon 3, Oxisols and pedon 4, Ultisols). The shallow soils composed of mainly andesite and rhyolite which were difficult to weathering and thus many gravel and rocks have accumulated along the depth and resulted in low to very low bulk densities. The deep weathering was occurred in the Oxisols (pedon 3) and resulted in the fine-textured reddish profile. The Ultisols (pedon 4) had some remained gravel and rocks, and very low bulk densities. The shallow soils on sandstone (Pedon 5 and 6, Inceptisols) developed on the upper slope sites where moisture conditions were usually lower with higher soil erosion than the deep soils (pedons 7 and 8, Ultisols) located in the lower slopes. The sandstone soils were very fine sand cemented together and difficult to weather and contained the large amounts of gravel with low to very low bulk densities. The shallow soils have a course to intermediate textures. The variable topographic conditions might influence on different soil profiles between pedons 7 and 8; pedon 7 had loamy over clayey and pedon 8 had loamy and sandy over loam. The waterlogged condition might have occurred in the subsoil of pedon 7 indicated by the observation of plinthite (Btv) and grey color (Figure 2).

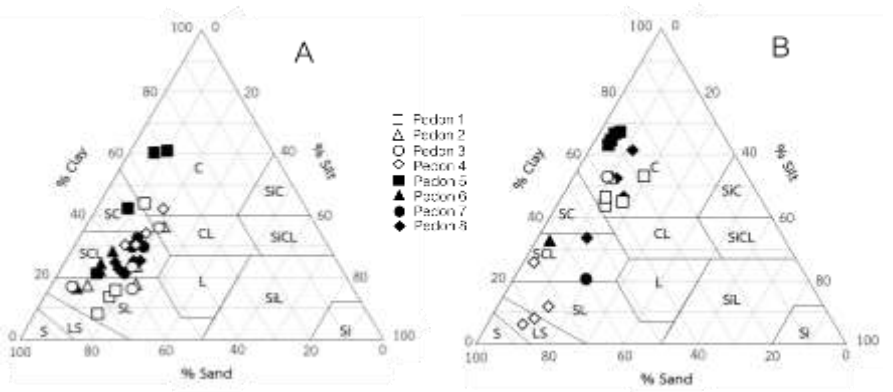

Figure 2. Soil particle size distribution of soil pedons at 0-30 cm (A) and 30-100 cm (B) in the DDF

Soil chemical properties

1. pH, *Volcanic rock:* The shallow soils (pedon 1) had slightly acid (pH, 6.10-6.42) throughout the depths. It varied from moderate acid to strong acid (5.27 to 5.65) for pedon 2. As for deep soils of pedon 3, the surface soil (0-20 cm) had moderate acid (5.71 to 5.85) and slightly acidic in the subsoil (6.21 to 6.31) whereas pedon 4 (Order Ultisols) had moderate acid to strong acid (5.24 to 5.96) in the surface soil and moderate to slight acid (5.62 to 6.12) in the subsoil. ***Sandstone:*** The shallow soils (pedons 5 and 6) had very strong acid (pH, 4.88 to 4.51) throughout the depths, except for extremely acidic at 5-10 cm depth. In deep soil of pedon 7 had very strongly acid (4.47 to 5.05) throughout the soil profile while pedon 8 had neutral (6.58 to 6.74).

2. Organic matter and carbon

The average content of soil organic carbon is calculated as 58% of organic matter (Nelson and Sommers, 1996). The carbon contents were usually moderate to high and very high in surface soils and less in the subsoils. ***Volcanic rock:*** In shallow soils (pedon 1 and 2), the carbon content was very high (31.64 to 33.96 g/kg) at 0-5 cm depth, moderate to high at 5-10 cm (12.02 to 21.94 g/kg) and moderately low to very low in the deeper horizon. In deep soils (pedons 3 and 4), it was high (21.29 to 25.19 g/kg) at 0-5 cm, moderate to moderately high (11.93 to 12.72 g/kg) at 5-10 cm, and low to very low in deeper layers. ***Sandstone:*** In shallow soils (pedons 5 and 6), the content was moderate (10.00 to 12.75 g/kg) at 0-5 cm depth, moderately low (6.90 to 7.40 g/kg) at 5-10 cm and low to very low in deeper horizons. In deep soils (pedon 7), it was moderate (12.91g/kg) at 0-5 cm depth, moderate low (8.57 g/kg) at 5-10 cm) and low to very low in deeper layers whereas pedon 8 had the high carbon contents (20.62 to 23.49 g/kg) at 0-10 cm depth, and low to very low in deeper soils.

3. Total N, *Volcanic rock:* The nitrogen contents in shallow soils (pedons 1 and 2) were almost very low throughout 40 cm depth. The low to very low contents were also observed in deep soils (pedons 3 and 4). ***Sandstone:*** The shallow soils (pedons 5 and 6) and deep soils (pedons 7 and 8) contained very low nitrogen contents throughout their profiles.

4. Available P and extractable K, Ca and Mg

Both shallow and deep soils on the two parent rocks contained very low concentrations of available phosphorus (P) and extractable potassium (K), calcium (Ca) and magnesium (mg).

The pH values (5.27 to 6.42) of soils on volcanic rock varied from slightly acidic to moderately and strongly acidic. These might be the effects of different mineral composition in parent rocks. The soils in pedons 1 and 2 derived from andesite and rhyolite while pedon 3 composed of mainly iron oxides and pedon 4 derived from other intermediate acid rocks. Three soil pedons on sandstone had more acid properties than those on volcanic rocks. They might contain the sand particles of more acid rocks. One pedon (pedon 8) had neutral properties due to sand deposit with limestone. The organic matter and carbon in soils on both rocks varied from moderate to high in surface soil and decreased to low and very low in subsoils. Decomposing above-ground litter and dead roots of ground-covered species resulted in the accumulations of organic matter and carbon in surface soils. However, most organic matters were lost through soil erosion and some were retained in the surface soil, and very small amounts were moved into the deeper soil horizons. The contents of total nitrogen and concentrations of available P and extractable K, Ca and mg were low to very low throughout the soil profiles. These soils had high soil erosion and most nutrients from decomposing litter were difficult to move into the subsoils (Figure 3).

Amounts of carbon and nutrient storage in soils

Carbon, *Volcanic rock:* Carbon amounts stored of shallow soils were estimated; pedon 1, 50.15 mg/ha and redon 2, 37.18 Mg/ha. As for deep soils, the amount was higher in pedon 3 (64.93 Mg/ha) and lower (33.30 Mg/ha) in pedon 4. The average carbon amount the soils derived from a volcanic rock was 46.39. ***Sandstone***: The carbon amounts in shallow soils were lower than those on volcanic rock; pedon 5, 40.95 Mg/ha and pedon 6, 19.14 Mg/ha. The amounts were higher in deep soils; pedon 7, 31.08 Mg/ha and pedon 8, 43.51 Mg/ha. The average carbon amount in the soils on sandstone was 26.17 Mg/ha. The DDF soils in other locations could store the variable carbon amounts. Naimphulthong (2011) reported that the soil on conglomerate, cloud store the carbon amount at 19.04 Mg/ha. The soil in community forest on sandstone, Lamphun, had the amount at 74.05 Mg/ha (Phonchaluen, 2009). As for the soils on

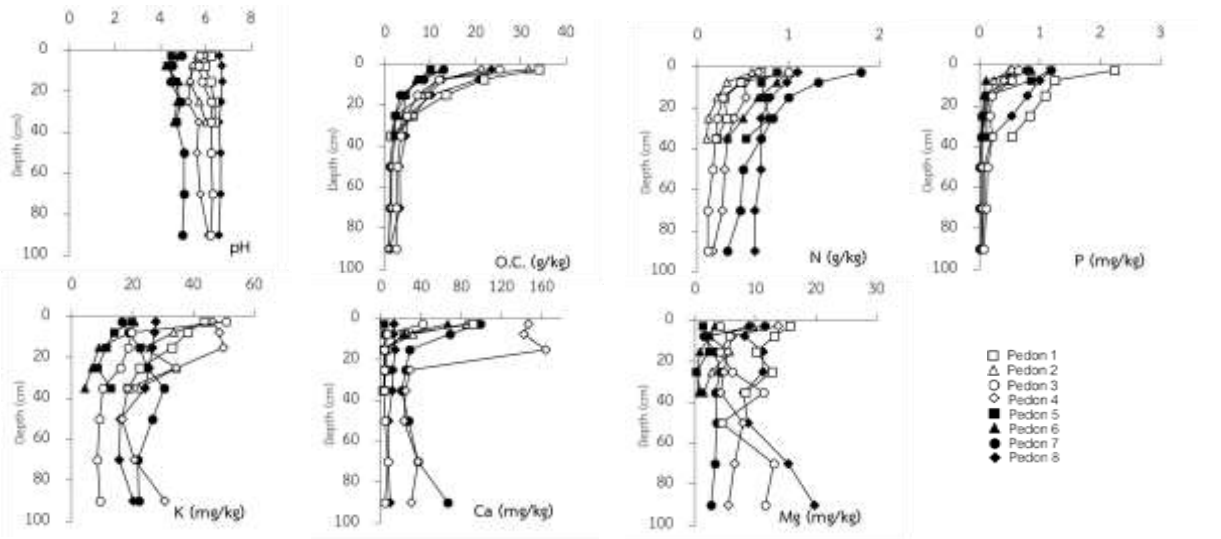

Figure 3. Some soil chemical properties of eight soil pedons in the DDF

a granitic rock, the amounts were in a range of 31.22-74.05 Mg/ha (Phongkhamphanh *et al*., 2015; Seramethakun, 2012; Wongin, 2011). The DDF soils contained the low carbon amount as compared to other forest soils. The community forest of lower montane forest could store the high carbon (2 m soil depth) at 322.71 Mg/ha. The amount of 262.47 Mg/ha (1 m depth) was found in the upper montane forest at the summit the highest mountain in Thailand, Doi Inthanon (Khamyong *and* Anongrak, 2016).

Nitrogen, *Volcanic rock:* The total nitrogen stored in shallow soils (pedon 1 and 2) were nearly the same, 2.86 Mg/ha to 2.88 Mg/ha. They were higher in deep soils; pedon 3, 8.92 Mg/ha and pedon 4, 5.90 Mg/ha. ***Sandstone:*** The nitrogen amount in shallow soils (pedons 5 and 6) were lower than those on volcanic rock; pedon 5, 0.87 Mg/ha and pedon 6, 0.81 Mg/ha. The amounts were higher in deep soils; pedon 7, 2.80 Mg/ha and pedon 8, 2.45 Mg/ha. The nitrogen storage in soils on a volcanic rock was higher than those on sandstone. In other locations, the amount in soil on conglomerate was 3.13 Mg/ha (Naimphulthong, 2011) while the sandstone soil in community forest had the value at 6.17 Mg/ha (Phonchaluen, 2009). As for granitic rock, the amounts varied between 3.30 Mg/ha and 7.47 Mg/ha (Phongkhamphanh *et al*., 2015; Seramethakun, 2012; Wongin, 2011). The higher amounts in lower and upper montane forests were reported as 17.19 Mg/ha and 10.21 mg/ha, respectively (Khamyong and Anongrak, 2016; Seeloy-ounkeaw *et al*., 2014).

Available P, *Volcanic rock:* The amounts of available P in shallow soils were 4.23 kg/ha in pedon 1 and 0.78 kg/ha in pedon 2. In deep soils, the amounts were 2.59 kg/ha in pedon 3 and 0.86 in pedon 4. The average amount in these soils was 2.12 kg/ha. ***Sandstone:*** The available P in shallow soils was 0.95 kg/ha in pedon 5 and 0.55 kg/ha in pedon 6. In deep soils, the amount was 1.15 kg/ha in pedon 7 and 2.43 kg/ha in pedon 8. The soils on volcanic rock and sandstone contained the low amounts of available P. In other locations, Naimphulthong (2011) found that the soil on conglomerate stored the amount at 7.87 kg/ha while the soil on sandstone in community forest was 6.36 kg/ha (Phonchaluen, 2009). As for granitic rock, the values varied from 4.0 kg/ha to 29.10 kg/ha (Phongkhamphanh *et al*., 2015; Seramethakun, 2012; Wongin, 2011). The higher amounts in lower and upper montane forests were reported as 65.70 kg/ha and 87.71 kg/ha, respectively (Khamyong and Anongrak, 2016; Seeloy-ounkeaw *et al*., 2014).

Extractable K, *Volcanic rock:* In shallow soils, the amount of ext. K was 118.03 kg/ha in pedon 1 and 141.74 kg/ha in pedon 2. They were higher in deep soils, 170.55 kg/ha in pedon 3 and 229.48 kg/ha in pedon 4. The average amount in these soils was 164.95 kg/ha. ***Sandstone:*** The amount of ext. K in shallow soils was lower than those on volcanic rock, 28.73 kg/ha in pedon 5 and 37.12 kg/ka in pedon 6. In deep soils, the amount was 317.53 kg/ha in pedon 7 and 154.03 kg/ha in pedon 8. The potassium in soils on a volcanic rock was higher than those on sandstone. The soil on conglomerate had the amount at 432.99 kg/ha (Naimphulthong, 2011) while the higher amount in sandstone soil was found, 977.38 kg/ha (Phonchaluen, 2009). They varied from 372.40 kg/ha in granite soil to 1,328.90 kg/ha in granodiorite soil (Phongkhamphanh *et al*., 2015; Seramethakun, 2012; Wongin, 2011). In lower and upper montane forests, the amounts were 2,261.19 kg/ha and 227.2 kg/ha, respectively (Khamyong and Anongrak, 2016; Seeloy-ounkeaw *et al*., 2014).

Extractable Ca, *Volcanic rock:* The amount in shallow soils was 66.39 kg/ha in pedon 1 and 77.01 kg/ha in pedon 2. As for deep soils, the amount was 78.66 kg/ha in pedon 3 and higher in pedon 4 (424.30 kg/ha). The average amount in these soils was 161.59 kg/ha. ***Sandstone:*** The amount in shallow soils was 7.75 kg/ha in pedon 5 and 51.0 kg/ha in pedon 2. In deep soils, the amount was 548.63 kg/ha in pedon 7 and 70.55 kg/ha in pedon 8. The calcium in soils on a volcanic rock was nearly the same as those on sandstone. Naimphulthong (2011) reported that the soil on the conglomerate cloud store the amount 1,738.24 kg/ha. The amounts in DDF soils on a granitic rock with granodiorite had varied greatly in the range of 372.40-3,896.13 kg/ha (Phongkhamphanh *et al*., 2015; Seramethakun, 2012; Wongin, 2011). The calcium in the soil on sandstone in Ban Sai Thong community forest was measured 1,234.31 kg/ha (Phonchaluen, 2009). The amounts in a lower and upper montane forest were 885.0 kg/ha. and 270.76 kg/ha, respectively (Khamyong and Anongrak, 2016; Seeloy-ounkeaw *et al*., 2014).

Extractable mg, *Volcanic rock:* The amounts in shallow soils was 47.36 kg/ha in pedon 1 and 16.49 kg/ha in pedon 2. In deep soils, the amount was 111.77 kg/ha in pedon 3 while 51.06 kg/ha in pedon 4. The average amount in these soils was 56.62 kg/ha. *Sandstone:* In shallow soils, the quantity was 3.02 kg/ha in pedon 5 and 4.32 in pedon 6. As for deep soils, the amount was 45.65 kg/ha in pedon 7 and 79.77 kg/ha in pedon 8. The magnesium amount in soils on a volcanic rock was higher than those on sandstone. The amount in soil on conglomerate was 563.0 kg/ha (Naimphulthong (2011) and in sandstone soil was 427.05 kg/ha (Phonchaluen, 2009). On granitic rock, they varied between 514.90 kg/ha and 1,287.50 kg/ha (Phongkhamphanh *et al*., 2015; Seramethakun, 2012; Wongin, 2011). In the lower and upper montane forests, the amounts were 885.0 kg/ha and 270.76 kg/ha, respectively, were measured (Khamyong and Anongrak, 2016; Seeloy-ounkeaw *et al*., 2014) (Figure 4).

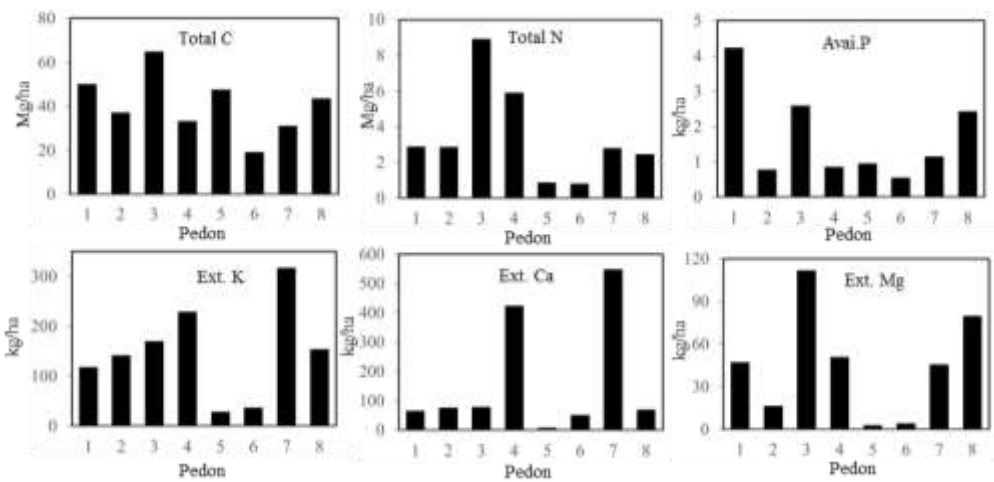

Figure 4. Carbon and nutrient storages in the DDF soils on volcanic rock and sandstone

Conclusions

Different parent rocks, volcanic rock, and sandstone had influenced on variations of soil physicochemical properties in the DDF including soil depth, types, bulk density, texture, acidity, contents, and amounts of carbon and macronutrients. Either shallow or deep soils could occur in the volcanic rock and sandstone areas. The shallow soils were classified into Order Inceptisols. The soil types of deep soils on volcanic rocks were Order Oxisols and Ultisols whereas those on sandstone were the Ultisols. The average amounts of carbon nitrogen and most extractable macronutrients except for calcium in soils on the volcanic rock were higher than the sandstone area. However, the amounts of carbon and macronutrient storage in the DDF soils on these parent rocks were low compared to other forest soils.

Acknowledgments

This research was supported by the National Research Council of Thailand (NRCT), Office of Royal Development and Office of Higher Education Commission. Authors are grateful to the undergraduate students, Pranode Somchaiyaphuma, Nuttaphong Duanden and Ronnagon Akarasiriteerakun who helped in the field and laboratory.

References

Bunyavejchewin, S. 1983. Analysis of the tropical dry deciduous forest of Thailand. I. Characteristics of dominance types. Natural History Bulletin of the Siam Society 31(2): 109-122.

Department of Mineral Resources. 1999. Geology map of SANSAI 1:50,000 scale. Geological Survey Division, Department of Mineral Resources, Bangkok.

Khamyong, S. and N. Anongrak. 2016. Carbon and nutrient storages in an upper montane forest at Mt. Inthanon summit, northern Thailand. Environmental and Natural Resources Journal 14(1): 26-38.

Kimmins, J.P. 2004. Forest Ecology: A Foundation for Sustainable Forest Management and Environmental Ethics. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 611 p.

Naimphulthong, W. 2011. Plant diversity, soil characteristics and nutrient accumulations in sedimentary rock forest ecosystem at petrified wood forest park, Tak Province. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 326 p.

Neal, G.D. 1967. Statistical Description of the Forest of Thailand. Military Research and Development Center, Bangkok. 346 p.

Nelson, D.W. and L.E. Sommers. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. pp. 961-1010. *In*: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston and M.E. Sumner (eds.). Methods of Soil Analysis, Part 3. Chemical Methods. Agronomy No. 5. SSSA Book Series. Madison, Wisconsin.

Phonchaluen, S. 2009. Plant species diversity, soil characteristics and utilization of Ban Sai Thong community forest, Pa Sak Sub-district, Muang District, Lamphun Province. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 192 p.

Phongkhamphanh, T., S. Khamyong and T. Onpraphai. 2015. Variations in plant diversity and carbon storage among subtypes communities in a dry dipterocarp

community forest of Mae Tha Sub-district, Mae On District, Chiang Mai Province. Thai Journal of Forestry 34(3): 83-98.

Pye, K. 2007. Geological and Soil Evidence Forensic Application. CRC Press, Boca Raton, Florida. 335 p.

Schaetzl, R.J. and S. Anderson 2005. Soils: Genesis and Geomorphology. Cambridge University Press, New York. 817 p.

Schoeneberger, P.J., D.A. Wysocki, E.C. Benham and W.D. Broderson. 2002. Field Book for Describing and Sampling Soils. Version 2.0. Natural Resources Conservation Service, National Soil Survey. U.S. Government Printing Office, Lincoln, Nebraska. 227 p.

Seeloy-ounkeaw, T., S. Khamyong, N. Anongrak. K, Sringernyuang and T. Ounprapai. 2014. Characteristics of forest soils under different management in Ban Nong Tao community forest, Mae Wang District, Chiang Mai Province. Journal of Science and Technology. Mahasarakham University 33(5): 445-453.

Seramethakun, T. 2012. Plant species diversity, soil characteristics and carbon stocks in subtype communities of natural pine forest, Galyani Vadhana District, Chiang Mai Province. Ph.D. Dissertation. Chiang Mai University, Chiang Mai. 86 p.

Smitinand, T., T. Santisuk and C. Phengklai. 1980. The manual of Dipterocarpaceae of mainland southeast Asia. Natural History Bulletin of the Siam Society 12: 1-110.

Soil Survey Division. 1993. Soil survey manual. Soil Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 18. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 315 p.

Soil Survey Staff. 2004. Soil Survey Laboratory Methods Manual: Soil Survey Investigations Report No. 42, Version 4.0. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 700 p.

Soil Survey Staff. 2014. Keys to Soil Taxonomy. 12th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service Press, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 360 p.

Waring, R.H., and S.W. Running. 1998. Forest Ecosystems: Analysis at Multiple Scales. Academic Press, San Diego. 370 p.

Wongin, P. 2011. Assessment of plant species diversity, forest condition and carbon stocks in dry dipterocarp forest ecosystem on a granitic rock at petrified wood forest park, Ban Tak District, Tak Province. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 116 p.

ผลของการเสริมรำข้าวขาวต่อการย่อยสลายในกระเพาะรูเมน และการย่อยได้ของโภชนะในโคเนื้อ

Effects of White Rice Bran Supplementation on Ruminal Degradability and Nutrient Digestibility in Beef Cattle

บุญฑริกา ปลั่งสูงเนิน[1] เสาวลักษณ์ แย้มหมื่นอาจ[1*] และ ณรกมล เลาห์รอดพันธ์[2]

Boontharika Plangsungnern[1], Saowaluck Yammuen-art[1*] and Norakamol Laorodphan[2]

[1]ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1]Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จ. พิษณุโลก 65000

[2]Division of Animal Science, Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok 65000, Thailand

**Corresponding author: Email: saowaluck.y@cmu.ac.th*

(Received: 5 November 2018; Accepted: 25 April 2019)

Abstract: The aims of this study were to analyse chemical compositions, ruminal degradability and nutrient digestibility in beef cattle of concentrate with different level of white rice bran. Concentrate with different level of white rice bran including T1 (0%), T2 (10%), T3 (20%) and T4 (30%) were formulated. Chemical composition were analysed by proximate analysis. Four fistulated Thai native beef cattles were used for ruminal degradability and nutrients digestibility. Ruminal degradability were analysed by nylon bag technique at 2, 4, 8, 10, 12, 24, 48, 72 and 96 h. The nutrients digestibility were analysed by *in vivo* digestibility. The experimental design of *in vivo* digestibility was 4×4 Latin square designs. The data of feed intake, refusal and fecal were carefully recorded. The results found that DM and OM decrease by level of white fine rice bran (P<0.05) EE T3 (20%) and T4 (30%) were the highest significantly (P<0.05). Even though the DM disappearance (%) were not significantly different. The soluble fraction (a) of T1 (0%) was the lowest (P<0.05). Furthermore, CP digestibility was quadratic decreased (P<0.05). NDF and ADF nutrient digestibility of T2 (10%) was significantly highest (P<0.05). These results are concluded that concentrate containing white rice bran 10% can be supplement in cattle.

Keywords: White rice bran, concentrate, nylon bag technique, *in vivo* digestibility, beef cattle

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ค่าการย่อยสลายในกระเพาะหมักและความสามารถการย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์ของอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาวในระดับที่แตกต่างกัน โดยทำการประกอบสูตรอาหารข้นที่มีการเสริมรำข้าวขาวต่างระดับได้แก่ T1 (0%) T2 (10%) T3 (20%) และ T4 (30%) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี proximate analysis ทำการวิเคราะห์การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยวิธี nylon bag technique และความสามารถในการย่อยได้ในโคเนื้อพื้นเมืองเพศผู้เจาะกระเพาะจำนวน 4 ตัว ทำการศึกษาการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยบ่มตัวอย่างอาหารเป็นเวลา 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาความสามารถในการย่อยได้ในตัวสัตว์ ใช้โคเจาะกระเพาะ เพศผู้ตอน จำนวน 4 ตัว วางแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square ทำการเก็บอาหารที่ให้อาหารที่เหลือและมูล จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่าค่า DM และ OM ของสูตรที่เสริมรำข้าวขาว ลดลงตามระดับของรำข้าวขาวที่เพิ่มสูงขึ้น (P<0.05) ค่า EE ของ T3 และ T4 มีค่ามากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) พบว่าค่าการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ส่วนที่ละลายได้ (washing loss) ของอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 0% มีค่าสูงกว่าระดับอื่น ๆ (P<0.05) นอกจากนี้ความสามารถในการย่อยได้ของเยื่อใยมีความแตกต่างแบบ quadratic (P<0.05) และความสามารถในการย่อยได้ของเยื่อใย NDF และเยื่อใย ADF พบว่า อาหารข้นที่เสริมรำข้าว 10% มีค่ามากกว่าระดับการเสริมอื่น ๆ (P<0.05) จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 10% เหมาะสมในการเสริมสำหรับโคเนื้อ

คำสำคัญ: รำข้าวขาว อาหารข้น เทคนิคถุงไนล่อน ความสามารถในการย่อยได้ในตัวสัตว์ โคเนื้อ

คำนำ

รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมสีข้าว และนิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยปกติแล้วในกระบวนการสีข้าวเป็นแบบหัวเดียว มีการขัดสี 2 ครั้ง และได้ผลพลอยได้ที่เรียกว่า รำละเอียด (rice bran) รำละเอียดสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานของโคได้ การใช้รำละเอียดในต่างประเทศมักใช้ในรูปผ่านการสกัดน้ำมัน โดยมีองค์ประกอบทางเคมี คือ CP=12.1%, EE=4.2%, CF=18.5% และ NFE=54.7% (Bhatt *et al.*, 2005) ในประเทศไทยนิยมใช้ในรูปไม่ผ่านการสกัดน้ำมัน พบว่ามีไขมันค่อนข้างสูงโดยมีองค์ประกอบเคมี คือ CP=14.32%, EE=17.50%, CF=4.78% และ NFE=42.56% โคเนื้อที่เลี้ยงด้วยรำละเอียดมีค่าพลังงานที่ย่อยได้สูงกว่าการเลี้ยงด้วย กากเมล็ดนุ่น และกากมะพร้าว (14.68, 9.01 และ 11.18 เมกะจูลต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) ค่าโภชนะที่ย่อยได้รวมทั้งหมดของโคที่เลี้ยงด้วยรำละเอียดมีค่าสูงกว่าที่เลี้ยงด้วยกากเมล็ดนุ่นและกากมะพร้าว (74.29, 68.22 และ 51.97% ตามลำดับ) และมีค่าพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ของโคที่เลี้ยงด้วยรำละเอียดมีค่าสูงกว่าที่เลี้ยงด้วยกากเมล็ดนุ่นและกากมะพร้าว (12.35, 7.44 และ 9.93 เมกะจูลต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) รำละเอียดมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนพลังงานรวม (GE) เป็นพลังงาน DE และ ME สูงกว่ากากเมล็ดนุ่นและกากมะพร้าว คือ 0.743, 0.490 และ 0.565 ตามลำดับ และ 0.625, 0.412 และ 0.502 ตามลำดับ) (Moonmat *et al.*, 2010) ในปัจจุบันได้ปรับปรุงกระบวนการเพื่อลดความเสียหายของข้าวระหว่างการสีให้น้อยโดยการสีข้าวแบบสองหัว ซึ่งทำการแยกเศษแกลบและฝุ่นจากหัวที่หนึ่งไปยังหัวที่สอง ทำให้ได้ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมสีข้าว เรียกว่า รำข้าวขาว (white rice bran) ซึ่งจะมีคุณค่าทางโภชนะแตกต่างจากรำละเอียด เนื่องจากรำละเอียดมีเศษแกลบปนทำให้รำข้าวขาวมีการปนเปื้อนน้อยกว่าจึงสันนิษฐานว่า รำข้าวขาวมีคุณค่าทางโภชนะสูงกว่ารำละเอียด แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการนำรำข้าวขาวมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนแหล่งวัตถุดิบอื่น ๆ และประสิทธิภาพการย่อยได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีค่าการย่อยสลายในกระเพาะหมักและความสามารถการย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์ของอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาวในระดับที่แตกต่างกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการทดลองและเตรียมอาหารข้น

ทำการผสมอาหารข้นสำหรับโคเนื้อโดยมีการเสริมรำข้าวขาวจากโรงสี จังหวัดพิษณุโลก โดยในสูตรอาหารจะประกอบด้วยรำข้าวขาวในระดับที่แตกต่างกัน จำนวน 4 สูตร (Table 1)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวขาว

ทำการสุ่มตัวอย่างของรำข้าวขาว และสูตรอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาวในแต่ละระดับจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง (dry matter, DM) อินทรียวัตถุ (organic matter, OM) โปรตีน (crude protein, CP) ไขมัน (ether extract, EE) และ เยื่อใย (crude fiber, CF) โดยวิธี proximate analysis (AOAC, 2000)

การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยวิธี nylon bag technique

ทำการศึกษาการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) นำอาหารทดลองประมาณ 3 กรัม ใส่ถุงไนลอน นำไปบ่มในกระเพาะรูเมนโดยใช้โคพื้นเมืองเจาะกระเพาะจำนวน 4 ตัว (หมายเลขอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองจากศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ : Ag001/2559(02/2559-03-18) ที่ได้รับหญ้าหมักแบบเต็มที่ (*ad libitum*) นำอาหารไปบ่มเป็นเวลา 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำถุงออกมาล้างด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 15 นาที นำมาอบที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำถุงไนลอนไปชั่งน้ำหนักตัวอย่างอาหารที่เหลือ และคำนวณค่าการย่อยสลายโดยใช้โปรแกรมสำเร็จ NEWAY (Ørskov and McDonald, 1970) ดังสมการ

$$P = A+B\ (1-e^{-ct})$$

P คือ ค่าการสลายตัวได้ที่ช่วงเวลาต่างกัน (%)
A คือ ค่าการย่อยสลายของส่วนที่ละลายได้ทันที (%)
B คือ ค่าการย่อยสลายของส่วนที่ไม่ละลายแต่สามารถเกิดการหมักย่อยได้ (%)
C คืออัตราการย่อยสลายของอาหารส่วน B (degradation rate, fraction/h)
T คือ ช่วงเวลา (h)

ความสามารถในการย่อยได้ของโภชนะในตัวสัตว์ (*in vivo* digestibility)

การย่อยได้ของโภชนะในโคเนื้อพื้นเมืองเจาะกระเพาะจำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ย 239.5 ± 22 กิโลกรัม อาหารทดลอง 4 สูตร คือ เสริมรำข้าวขาว 0, 10, 20 และ 30% วางแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square ระยะเวลาการทดลอง 14 วันแรกเป็นการปรับตัว (preliminary period) และ 5 วันสุดท้ายเป็นช่วงเก็บข้อมูล (collection period) โดยให้อาหารหยาบคือ หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมักและอาหารทดลองทั้ง 4 สูตรปริมาณ 1 กิโลกรัม ในเวลา 09.00 และ 16.00 น. โดยทำการชั่งน้ำหนักเก็บอาหารที่ให้ อาหารที่เหลือและน้ำหนักมูลในช่วงวันเก็บข้อมูล นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง อินทรียวัตถุ โปรตีน ไขมัน และเยื่อใย โดยวิธี

Table 1. Ingredients of experimented dietary treatments containing different levels of white rice bran

Item	Level of white rice bran			
	(T1) 0%	(T2) 10%	(T3) 20%	(T4) 30%
Ingredient (kg)				
ground corn	88.75	80.00	71.25	62.25
soy been meal	8.50	7.25	6.00	5.00
white rice bran	0.00	10.00	20.00	30.00
urea	1.25	1.25	1.25	1.25
premix	0.50	0.50	0.50	0.50
DCP P18	1.00	1.00	1.00	1.00

proximate analysis (AOAC, 2000) และวิเคราะห์ปริมาณผนังเซลล์ (neutral detergent fiber, NDF) ลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber, ADF) และ ลิกนิน (acid detergent lignin, ADL) โดยวิธี detergent method (Van Soest *et al.,* 1991) คำนวณค่าความสามารถในการย่อยได้ของโภชนะจากสมการของ Schneider and Flatt (1975)

$$\text{การย่อยได้ของโภชนะ (\%)} = \frac{\text{โภชนะที่กิน (กรัม)} - \text{โภชนะในมูล (กรัม)} \times 100}{\text{โภชนะที่กิน (กรัม)}}$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

องค์ประกอบทางเคมีและการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD ความสามารถในการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนวางแผนการทดลองแบบ 4×4 Latin square และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test และเปรียบเทียบแบบ orthogonal polynomial ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาค่าองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวขาวพบว่า รำข้าวขาวมีค่าวัตถุแห้ง 97.15% อินทรียวัตถุ 94.01% โปรตีนหยาบ 15.35% ไขมัน 10.62% เยื่อใยหยาบ 4.11% และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ง่าย 63.93% ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างเล็กน้อยโดยที่รำละเอียดมีปริมาณวัตถุแห้ง 88.29% โปรตีน 14.32% ไขมัน 17.50% และเยื่อใย 4.78% (Moonmat *et al*., 2010) เนื่องจากรำข้าวขาวมีการปนเปื้อนของแกลบและฝุ่นน้อยกว่ารำละเอียด จึงส่งผลให้มีค่าของวัตถุแห้งและโปรตีน มีค่ามากกว่ารำละเอียด นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไขมันและปริมาณเยื่อใย มีค่าน้อยกว่ารำละเอียด

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของอาหารข้น 4 สูตรที่ทำการเสริมรำข้าวขาวต่างระดับคือ 0, 10, 20 และ 30% (Table 2) พบว่า วัตถุแห้งและอินทรียวัตถุของสูตรที่เสริมรำข้าวขาว มีค่าลดลงตามระดับของรำข้าวขาวที่เพิ่มสูงขึ้น (P<0.05) ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน Bhatt *et al*. (2005) ที่รายงานไว้ว่าอาหารข้นที่เสริมรำข้าวในระดับ 13, 18 และ 23% มีปริมาณอินทรียวัตถุลดลงคือ 91.6, 90.9 และ 90.6 ตามลำดับ และค่าปริมาณไขมัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณรำข้าวขาวในสูตรอาหาร เนื่องจากรำข้าวขาวมีไขมันเป็นองค์ประกอบสูงถึง 10.62% ดังนั้นการเสริมรำข้าวขาวที่เพิ่มขึ้นในสูตรอาหาร

Table 2. Chemical composition of concentrate containing different levels of white rice bran

Items	White rice bran	Treatment				SEM	*P*-value
		T1 (0%)	T2 (10%)	T3 (20%)	T4 (30%)		
DM	97.15	95.57^{a}	95.29^{b}	95.17^{c}	95.30^{b}	0.056	0.003
OM	94.01	96.85^{a}	95.85^{b}	95.79^{b}	95.72^{b}	0.183	0.016
CP	15.35	17.51	17.07	17.31	16.29	0.240	0.803
EE	10.62	2.45^{c}	2.85^{bc}	3.72^{a}	3.36^{ab}	0.191	0.016
CF	4.11	2.71^{c}	3.09^{b}	3.26^{b}	3.88^{a}	0.162	0.001
NFE	63.93	74.18	72.85	72.19	71.50	0.430	0.110

$^{a-c}$ Means within row with significant difference between each treatment (P<0.05)

T1 = concentrate with white rice bran 0%, T2 = concentrate with white rice bran 10%, T3 = concentrate with white rice bran 20%, T4 = concentrate with white rice bran 30%

DM = dry matter, OM = organic matter, CP = crude protein, EE = ether extract, CF = crude fiber, NFE = nitrogen free extract

จึงทำให้ค่าไขมันเพิ่มขึ้น โดยอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 20 และ 30% มีปริมาณไขมันเท่ากับ 3.72 และ 3.36% ตามลำดับ ค่าปริมาณเยื่อใยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณรำข้าวขาว ซึ่งสอดคล้องกับ Soren *et al.* (2004) พบว่าเมื่อเสริมรำข้าวในสูตรอาหารข้นในปริมาณที่มากขึ้น (0, 41 และ 82%) พบว่าค่าปริมาณเยื่อใยเพิ่มขึ้น (6.38, 11.6 และ 15.94%) การลดข้าวโพดในสูตรอาหารจึงทำให้อาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 30% มีปริมาณเยื่อใยสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) คือ 3.88%

การศึกษาการย่อยได้โดยวิธีใช้ถุงไนลอน พบว่าอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาวระดับ 0, 10, 20 และ 30% ค่าการย่อยสลายที่ชั่วโมงที่ 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ (P>0.05) (Table 3)

อาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 0% มีส่วนที่ละลายได้ (soluble fraction) ต่ำกว่าอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 10, 20และ 30% มีความแตกต่างกันแบบ quadratic (P<0.001) คือ 4.26 เทียบกับ 4.76, 4.87 และ 4.75% เนื่องจากรำข้าวขาวมีส่วนที่ละลายได้ (water-soluble fraction, a) สูงถึง 58-60% (Yulistiani *et al.,* 2008) เพราะรำข้าวจัดว่าเป็นวัสดุเศษเหลือที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตละลายได้ทันที (Cone *et al.,* 1997) ดังนั้นเมื่อเติมรำข้าวในอาหารข้น ทำให้ค่า washing loss (a) สูงขึ้นตามลำดับของรำข้าว นอกจากนี้ค่าพารามิเตอร์ของการย่อยสลาย (degradability parameters) ที่ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ละลายแต่เกิดการย่อยสลายได้ (degradability of water insoluble), ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (potential degradability), ค่าอัตราการย่อยสลาย (rate of degradability) และค่าประสิทธิภาพการย่อยสลาย (effective degradability, ED) ของอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 0, 10, 20 และ 30% ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (P>0.05) (Table 4)

ผลของระดับรำข้าวขาวที่เสริมในอาหารข้นที่แตกต่างกัน (0, 10, 20 และ 30% ตามลำดับ) ต่อปริมาณการกินได้อิสระของวัตถุแห้งในโคที่ได้รับอาหารหยาบ คือ หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 หมัก พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ทั้งในแง่ของปริมาณการกินได้ทั้งหมดทั้งที่คิดเป็นปริมาณเฉลี่ย (kg/d) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว (%BW) หรือกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักเมแทบอลิก (g/kgBW$^{0.75}$) และเมื่อศึกษาปริมาณอาหารข้นที่โคได้รับ พบว่า โคที่ได้รับอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 0, 10, 20 และ 30% มีปริมาณการกินได้คิดเป็นกิโลกรัมต่อวัน, เปอร์เซ็นต์ metabolic body weight ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (Table 5)

ความสามารถในการย่อยได้ในตัวสัตว์ (*in vivo* digestibility) ของอาหารหยาบร่วมกันอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 0, 10, 20 และ 30% (Table 5) พบว่า ค่าการย่อยได้ของ DM, OM, CP, EE, NFE, NDF และ ADL แตกต่าง

Table 3. Dry matter disappearance (%) of concentrate containing different levels of white rice bran

Incubation time	Treatment				SEM	*P*-value	Effect	
	T1 (0%)	T2 (10%)	T3 (20%)	T4 (30%)			L	Q
at 2 hr	12.15	14.50	11.00	10.90	1.71	0.51	0.21	0.29
at 4 hr	17.15	20.30	16.70	18.61	0.88	0.57	0.93	0.95
at 8 hr	26.30	30.80	27.05	28.46	1.33	0.75	0.84	0.87
at 12 hr	34.35	39.90	36.05	37.05	1.71	0.81	0.81	0.83
at 24 hr	53.50	60.70	56.60	56.75	2.39	0.85	0.81	0.79
at 48 hr	76.50	83.30	79.20	78.48	2.53	0.88	0.94	0.81
at 72 hr	88.15	92.90	89.20	88.12	2.16	0.91	0.86	0.83
at 96 hr	94.17	97.12	93.67	92.36	1.81	0.89	0.62	0.79

L = linear, Q = quadratic

T1 = concentrate with white rice bran 0%, T2 = concentrate with white rice bran 10%, T3 = concentrate with white rice bran 20%, T4 = concentrate with white rice bran 30%

Table 4. Degradability parameters of concentrate containing different levels of white rice bran

Item	Treatment				SEM	*P*-value	Effect	
	T1 (0%)	T2 (10%)	T3 (20%)	T4 (30%)			L	Q
Fitted parameters								
- Fraction a (%)	6.86	8.26	4.88	7.32	0.56	0.15	0.72	0.87
- Fraction b (%)	94.43	92.00	92.55	88.47	1.44	0.63	0.20	0.45
Degradability parameters (%)								
- Soluble fraction (A)	4.26[b]	4.76[a]	4.87[a]	4.75[a]	0.08	0.002	0.035	<0.001
- Degradability of water insoluble fraction (B)	95.39	95.29	92.60	90.71	1.21	0.56	0.13	0.33
- Potential degradability (P)	99.64	100	97.43	95.41	1.19	0.60	0.16	0.37
- Rate of degradability (c, fraction/h)	0.03	0.04	0.04	0.04	0.00	0.73	0.71	0.67
Effective Degradability (%)								
- ED0.02	62.00	66.90	63.10	63.05	1.86	0.88	0.97	0.85
- ED0.05	41.05	46.30	42.35	43.20	1.66	0.81	0.88	0.84
- ED0.08	31.70	36.40	32.55	33.80	1.41	0.77	0.86	0.86

L = linear, Q = quadratic

[a, b] Means within row with different superscripts are significantly different (P<0.05)

T1 = concentrate with white rice bran 0%, T2 = concentrate with white rice bran 10%, T3 = concentrate with white rice bran 20%, T4 = concentrate with white rice bran 30%

อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ว่าค่าการย่อยได้ของเยื่อใยมีค่าแตกต่างกันแบบ quadratic (62.83, 65.46, 64.44 และ 63.96 ตามลำดับ) (*P*<0.05) เนื่องจากสูตรอาหารที่มีรำข้าวขาวมีปริมาณของไขมันแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับรำข้าวขาว ซึ่งสอดคล้องกับ Wachirapakorn *et al*. (2016) รายงานผลค่าไขมันของอาหารครบส่วนมีค่ามากขึ้น (2.5, 4.5, 6.0 และ 7.2 ตามลำดับ) ส่งผลต่อการย่อยได้ของเยื่อใยลดลง (55.5, 51.0, 50.7 และ 50.1%) เนื่องจากระดับไขมันรวมที่มากกว่า 3% ขึ้นไปในสูตรอาหารมีผลต่อความสามารถในการย่อยได้ของเยื่อใย (Allen, 2000; NRC, 2001) ทำให้ความสามารถในการย่อยได้ของเยื่อใยลดลง เนื่องจากไขมันไปเคลือบเยื่อใยทำให้จุลินทรีย์เข้าย่อยได้ยาก (Cheva-isarakul, 2003) และพบว่าความสามารถในการย่อยได้ลิกโนเซลลูโลสของอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 0, 20 และ 30% มีค่าน้อยกว่าอาหารข้นที่เสริมรำข้าว 10% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*<0.05) (54.33, 56.54 และ 55.11 เทียบกับ 62.19%) เนื่องจากอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 30% มีปริมาณเยื่อใยมากที่สุด (3.88%) จึงส่งผลให้ค่าความสามารถในการย่อยได้ลิกโนเซลลูโลสของโคที่ได้รับอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 30% มีค่าน้อยลง แต่ไม่มีค่าแตกต่างกันกับโคที่ได้รับอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาว 0 และ 20%

Table 5. Nutrient digestibility of silage and concentrate containing different levels of white rice bran

Item	Treatment				SEM	*P*-value	Effect	
	T1 (0%)	T2 (10%)	T3 (20%)	T4 (30%)			L	Q
Dry matter intake								
Total								
(kg/day)	6.61	6.37	6.61	6.35	0.05	0.10	0.24	0.50
(%BW)	2.79	2.69	2.82	2.64	0.03	0.11	0.21	0.38
(g/kgBW$^{0.75}$)	109.49	105.36	110.18	103.83	1.08	0.10	0.21	0.40
Roughage								
(kg/day)	3.97	3.73	4.02	3.70	0.06	0.11	0.32	0.57
(%BW)	1.69	1.59	1.72	1.55	0.03	0.12	0.27	0.44
(g/kgBW$^{0.75}$)	66.09	62.17	67.32	60.74	1.12	0.12	0.28	0.47
Concentrate								
(kg/day)	2.76	2.65	2.74	2.50	0.06	0.41	0.20	0.39
(%BW)	1.15	1.11	1.16	1.05	0.28	0.58	0.24	0.43
(g/kgBW$^{0.75}$)	45.34	43.47	45.31	41.13	0.99	0.49	0.29	0.52
Nutrient digestibility								
DM	74.98	69.38	68.54	71.02	1.06	0.06	0.19	0.05
OM	76.63	70.96	69.95	72.32	1.07	0.65	0.15	0.05
CP	71.92	69.00	68.01	70.61	1.06	0.39	0.59	0.39
CF	62.83	65.46	64.44	63.96	1.63	0.84	0.02	0.02
EE	63.82	63.95	65.42	66.17	1.60	0.92	0.57	0.85
NFE	79.04	76.72	75.14	77.25	1.02	0.66	0.46	0.44
NDF	64.05	62.26	62.13	59.78	0.76	0.69	0.65	0.90
ADF	54.33^{b}	62.19^{a}	56.54^{b}	55.11^{b}	2.66	0.01	0.90	0.71
ADL	30.37	41.35	32.66	31.11	2.40	0.12	0.60	0.76

L = linear, Q = quadratic

$^{a-c}$ Means within row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

T1 = concentrate with white rice bran 0%, T2 = concentrate with white rice bran 10%, T3 = concentrate with white rice bran 20%, T4 = concentrate with white rice bran 30%

สรุป

รำข้าวขาวมีปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่เหมาะสมในการนำมาประกอบในสูตรอาหารข้น เมื่อเพิ่มปริมาณรำข้าวขาวเสริมในสูตรอาหารข้น (10, 20 และ 30% ตามลำดับ) จะทำให้ปริมาณไขมันและเยื่อใยเพิ่มขึ้นตามปริมาณรำข้าวขาว ถึงแม้ว่าการเสริมรำข้าวขาวไม่มีผลต่ออัตราการไหลผ่านของอาหารในกระเพาะรูเมนแต่การเสริมรำข้าวขาวจะทำให้ส่วนที่ละลายน้ำได้ของอาหารขึ้นเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเสริมรำข้าวขาวไม่มีผลต่อปริมาณการกินได้ของโคแต่การเสริมรำข้าวขาวจะทำให้อาหารมีปริมาณเยื่อใยและไขมันสูงขึ้น ส่งผลให้การย่อยได้ของเยื่อใยลดลง ดังนั้นอาหารข้นที่เสริมรำข้าวขาวในระดับที่ 10% จึงเหมาะสมที่สุดในการเสริมสำหรับโคเนื้อ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2558 ที่สนับสนุนในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ นายอภิชาติ ศรีภัย นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอบคุณนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Allen, M.S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. Journal of Dairy Science 83: 1598-1624.

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.

Bhatt, R.S., S.R. Sharma, U. Singh, D. Kumar and K.S. Risam. 2005 . Effect of substituting groundnut cake with different levels of rice bran on growth and wool production of German Angora rabbits. World Rabbit Science 13(3): 179-187.

Cheva-isarakul, B. 2003. Biochemistry in Animal Science. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. (In Thai)

Cone, J.W., A.H. Van Gelder and F. Dreihuis. 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. Animal Feed Science and Technology 66: 31-45.

Moonmat, N., M. Otsuka, S. Udchachon and K. Sommart. 2010. Nutritive value and metabolizable energy evaluation of rice bran, kapok seed meal and coconut meal in Thai native beef cattle. Journal of Science and Technology Mahasarakham University 29(4): 382-388. (In Thai)

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, D.C.

Ørskov, E.R. and I. McDonald. 1970. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal Animal Science 92(2): 499-503.

Schneider, B.H. and W.P. Flatt. 1975. The Evaluation of Feeds Through Digestibility Experiments. University of Georgia Press, Georia, U.S.A.

Soren, N.M., R. Bhar, A.K. Chhabra and A.B. Mandal. 2004. Utilization of energy and protein in local Indian crossbred gilts fed diets containing different levels of rice bran. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 17(5): 688-692.

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 2nd ed. McGraw-Hill, New York. 672 p.

Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science 74: 3583-3597.

Wachirapakorn, C., C. Wongnen, A. Cherdthong and K. Phonsaen. 2016. Effects of dried ethanol by-product in total mixed ration on intake, digestibility, yield and milk composition of lactating cows. Journal of Agriculture 32(2): 247-259. (In Thai)

Yulistiani, D., Z.A. Jelan and J.B. Liang. 2008. Degradability of mulberry (*Morus alba*) and rice bran in the rumen of sheep fed different diets. Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences 13(4): 264-272.

Effects of Different Ambient Temperatures on Growth Performances, Digestibility, Carcass Traits and Meat Chemical Components in Fattening Rabbits

ผลของอุณหภูมิสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต การย่อยได้ ลักษณะซาก และองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อกระต่ายขุน

Attawit Kovitvadhi[1*], Pipatpong Chundang[1], Karun Thongprajukaew[2] and Chanin Tirawattanawanich[3]
อรรถวิทย์ โกวิทวที[1*] พิพัฒน์พงษ์ จันทร์แดง[1] การุณ ทองประจุแก้ว[2] และ ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช[3]

[1]Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
[1]ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[2]Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand
[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา 90110
[3]Innovation Cluster 2, Thailand Science Park, Ministry of Science and Technology, Pathum Thani 12120, Thailand
[3]กลุ่มนวัตกรรม 2 อุทยานวิทยาศาสตร์ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จ. ปทุมธานี 12120
**Corresponding author: Email: fvetawk@ku.ac.th*

(Received: 8 November 2018; Accepted: 31 January 2019)

บทคัดย่อ: จุดประสงค์ของการทดลองนี้คือการเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ คุณภาพซาก และองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อกระต่ายขุนที่ถูกเลี้ยงในโรงเรือนที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน กระต่ายหย่านมสายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์จำนวน 40 ตัวถูกสุ่มเข้ากลุ่มทดลองเพื่อเพาะเลี้ยงในโรงเรือนที่รักษาอุณหภูมิให้เหมาะสมและคงที่ (OT) ซึ่งไม่เกิดความเครียดจากความร้อน (Temperature Humidity Index: THI=21.5-23.1) และโรงเรือนระบบเปิดที่อุณหภูมิจะแปรเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อม (AT) ทำให้มีบางช่วงที่เกิดภาวะเครียดจากความร้อนได้ (THI=24.8-36.2) รวมทั้งอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้าง กลุ่ม AT มีน้ำหนักมีชีวิต อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน น้ำหนักเข้าฆ่า น้ำหนักซากอุ่น และน้ำหนักซากเย็นต่ำกว่ากลุ่ม OT (P<0.05) ในขณะที่กระต่ายในกลุ่ม AT มีอัตราการย่อยได้ของสารอาหารที่สูงกว่ากลุ่ม OT (P<0.05) นอกจากนี้พบว่าสัดส่วนของน้ำที่เพิ่มขึ้น และสารอาหารที่ลดลงในเนื้อกระต่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากความร้อน (P<0.05) จากผลการทดลองนี้การเพาะเลี้ยงกระต่ายภายใต้ความเครียดจากความร้อนส่งผลเสียตามมาในด้านของประสิทธิภาพการผลิต และองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อ

คำสำคัญ: อุณหภูมิโดยรอบ การย่อยได้ องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ ประสิทธิภาพ กระต่าย

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

Abstract: The study on growth performances, digestibility, carcass traits and meat chemical components of fattening rabbits between different environmental temperatures at housing was the objective of this study. Forty weaned New Zealand white rabbits were randomly separated and reared in an optimal controlled (OT) housing without heat stress environment (Temperature humidity index: THI=21.5-23.1) and an ambient temperature (AT) housing (opened housing) under a severe heat stress and wide temperature fluctuation during the day (THI=24.8-36.2). The AT group was lower in live weight, average daily weight gain, slaughter weight, hot carcass weight and cold carcass weight comparing to OT group (P<0.05), whereas the rabbits in AT group was higher in nutrient digestibility than the OT group (P<0.05). Moreover, higher proportion of water and lower nutrients were observed in the rabbit meat which lived under severe heat stress condition (P<0.05). Based on these results, the rearing rabbits under heat stress provided adverse consequences on productive performances and meat chemical components.

Keywords: Ambient temperature, digestibility, meat chemical components, performance, rabbit

Introduction

The production of meat rabbits is in increasing trend in several countries (FAOSTAT, 2018) including Thailand (Kovitvadhi *et al*., 2016a). Rabbits have a great potential to be an alternative livestock due to a short production cycle, low investment cost, low risk on epidemic disease and functional meat (FAOSTAT, 2018). The demand of rabbit meats in Thailand is still higher than productive efficiency around two times, which is the great opportunities to promote production of this animals (Kovitvadhi *et al*., 2016a). However, high ambient temperature (35-40°C) during summer (March to June) is a main problem of low productive efficiency (Kovitvadhi *et al*., 2016a). Body temperature of rabbits is increased following the increment of ambient temperature (Marai *et al*., 2002). Warm-blood animals need to maintain core temperature to conserve the normal enzyme activities and metabolisms. Therefore, the deterioration on productive performances, nutrient utilization and metabolisms is observed in animals that are produced under heat stress condition or high temperature humidity index (THI) environment (Marai *et al*., 2002). Heat dissipation can reduce and return the body temperature to optimal status. Unfortunately, rabbits are not well tolerance to high temperature environment because rabbits have a low function of sweat gland and dense fur, however a rising of respiratory rate and volume of blood circulation at ear lobe are main heat eradication mechanisms in rabbits (Marai *et al*., 2002). In Thailand, reproductive does are culled because of infertility and low survival rate of kittens during summer and farmers wait for raining season (July to October) to start the new production cycle (Kovitvadhi *et al*., 2016a). Therefore, high ambient temperature is a major factor which affects on productive performances of tropical rabbitry.

Most of experimental design was performed following the real management program which was continuous production along the year using seasons (summer *vs* winter) as main factors to study the effects from different environmental conditions (Chiericato *et al*., 1993; Dalle Zotte and Paci, 2014; Ghosh *et al*., 2008; Marai *et al*., 1999, 2001). As we known, there is clear that poor productive

performances in growing rabbits are found during summer (Marai *et al*., 2002). In contrast, if we can support housing that can rear rabbits under thermoneutral zone, the productivity should be improved (Hermes *et al*., 1999; Pla *et al*., 1994; Zeferino *et al*., 2011, 2013). The energy cost to decrease and control the housing temperature should be considered. The meat rabbits in Thailand have not been imported from other countries for more than ten years (Kovitvadhi *et al*., 2016a). Animals which can survive and provide good productive performances in tropical climate were selected by farmers. The resistance to high and fluctuation of temperature (genetic effects) may be developed in these meat rabbits in Thailand which providing benefits for farmers (Zeferino *et al*., 2011). Therefore, this study aims to investigate the differences on growth performance, digestibility, carcass traits and meat chemical components between optimal controlled and ambient condition (real production condition) of fattening rabbits.

Materials and Methods

Animals, housing, diets and experimental design

Forty weaned New Zealand white rabbits (40-days-old) were randomly selected with equal sex from rabbitry and distributed into optimal controlled (OT) and ambient temperature (AT) groups. The OT group lived in control temperature room (24 ± 1°C) at the Animal Experimental Unit, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand (13.844479N, 100.577498E); whereas rabbits in AT group were reared at ambient temperature from March to June 2017 during summer season at rabbitry, Kanchanaburi province, Thailand (14.04007N, 99.545354E). The temperature humidity index (THI) was calculated everyday which reported in Fig.1 following this equation: THI = dry bulb temperature in Celsius - [{0.31 - (0.31 × Relative humidity index)} × {dry bulb temperature in Celsius - 14.4}]. Absent and severe heat stress were considered, if THI is lower than 27.8 and higher than 28.9, respectively (Marai *et al*., 2001). The same individual cage, equipments, management system, diets and feeding were performed for both groups. The experiment was conducted from 40 to 93 days of age. A commercial pelleted diet (Lee Feed Mill, Publ. Co., Ltd., Phetchaburi, Thailand) which was appropriate for nutrient requirement and clean water were provided *ad libitum*. This study was carried out following the guidelines and achieved the allowance from Institutional Animal Care and Use Committee of Kasetsart University, Bangkok, Thailand (ACKU60-VET-015).

Growth performance and digestibility

The rabbit's live weight and feed intake were monitored every two weeks from 45 to 87 days old for calculating average daily feed intake (ADFI), average daily weight gain (ADG) and feed conversion ratio (FCR). Mortality and morbidity were controlled daily by the same observer. For digestibility study during experimental period, the feed intake was recorded and calculated, whereas diets were analyzed in duplicate for dry matter (DM), crude protein (CP), ether extract (EE), crude fiber (CF) and ash by ignition to 550°C for organic matter (OM) calculation, according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000). According to Kovitvadhi *et al*.'s (2016b) procedure, faeces were collected daily at 48 days old for four days period, weighted and stored at -20°C for chemical analysis in duplicate for DM, ash, EE and CP (AOAC, 2000). The calculation of apparent digestibility on DM and nutrients was conducted

following to the European standardized method (Perez *et al*., 1995).

Carcass traits and meat chemical components

At 93 days old, twenty rabbits per group were stunned by concussion and slaughtered without fasting. The carcasses were prepared following Kovitvadhi *et al*. (2016b) and the results were expressed as a percentage of slaughter weight (SW). The chilled carcass weight (CCW) after 24 h of chilling at 4°C was recorded, whereas thoracic organs, liver and kidneys were calculated as percentages of CCW. *Longissimus dorsi* (LD) and *Gastrocnemius* muscles (GC) were excised and lyophilized for chemical component analysis on DM, ash, EE and CP (AOAC, 2000) expressing as fresh matter.

Statistical analysis

All of the statistical analyses were performed by R-statistic with package Rcmdr in Rstudio (R Development Core Team, 2008). Statistical analyses for significant differences of each parameter between the groups were performed according to Student *t*-test, whereas Welch's *t*-test was applied in case of unequal variances. The significance was established at $P<0.05$.

Results and Discussion

The severe heat stress (higher than 28.9; Marai *et al*., 2001) and broad THI fluctuation between the day (THI=24.8-36.2) were observed in AT group, whereas the OT group was absence of heat stress and narrow THI difference between the day (THI=21.5-23.1; Figure 1). The group of animals which suffer from heat stress was lower in live weight after two weeks, ADG and ADFI comparing to animals who lived in optimal condition ($P<0.05$; Table 1). However, there was no statistically significant difference on FCR between the groups ($P=0.66$, Table 1). The DM in experimental diets was 90.7% as fed basis, whereas OM, ash, EE, CP, CF and nitrogen-free extract were 94.3, 5.69, 2.42, 16.1, 13.4 and 62.4%DM, respectively.

The negative consequences on live weigh, ADFI and ADG were observed during summer period comparing to winter period (Chiericato *et al*., 1993; Dalle Zotte and Paci, 2014; Ghosh *et al*., 2008; Marai *et al*., 1999, 2001) and also in heat stress

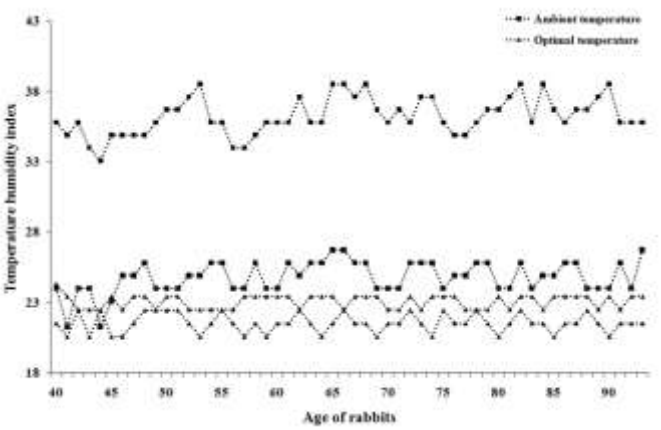

Figure 1. Temperature humidity index during experiment (the upper and lower lines of each temperature represent highest and lowest temperature humidity index of each day)

Table 1. Effects of different environmental conditions (optimal *vs* ambient temperatures) on growth performance, apparent digestibility, carcass traits and meat chemical components of fattening rabbits (n=20/group)

Items	Groups			
	Optimal (OT)	Ambient (AT)	SEM[1]	*P*-value[2]
Growth performance				
Live weight (g)				
at 45 days	928	922	14.3	0.84
at 59 days	1481	1330	44.1	0.08
at 73 days	1911	1621	50.4	0.004*
at 87 days	2237	1875	61.7	0.001*
Average daily weight gain (g/day)	28.8	22.7	1.17	0.01
Average daily feed intake (g/day)	118	87.6	5.02	0.001*
Feed conversion ratio	3.97	3.88	0.09	0.66
Apparent digestibility (%)				
Dry matter	56.4	68.2	1.96	0.001
Organic matter	63.5	75.8	2.17	0.001
Ether extract	79.9	89.2	1.83	0.01
Crude protein	63.3	76.4	2.02	0.001
Carcass traits				
Slaughter weight (SW) at 93 days (g)	2348	1963	74.0	0.01
Hot carcass weight (HCW) (g)	1481	1173	50.9	0.001
Skin, paws and feet (%SW)	17.3	23.8	0.85	0.001
Full gastrointestinal tract (%SW)	17.2	16.0	0.52	0.26*
Cold carcass weight (CCW) (g)	1296	1032	45.6	0.001*
Dressing percentage (%)	55.0	52.9	0.68	0.13
Liver (%CCW)	5.58	5.69	0.21	0.81
Kidney (%CCW)	1.11	1.08	0.02	0.59
Thoracic organs (%CCW)	1.49	1.53	0.06	0.80*
Chemical composition of Longissimus dorsi muscle				
Moisture (%Fresh matter)	72.2	75.2	0.39	0.001
Protein (%Fresh matter)	24.7	21.8	0.41	0.001
Ether extract (%Fresh matter)	0.61	0.33	0.06	0.03
Ash (%Fresh matter)	1.36	1.13	0.02	0.001
Chemical composition of Gastrocnemius muscle				
Moisture (%Fresh matter)	69.7	77.4	0.93	0.001*
Protein (%Fresh matter)	26.0	19.6	0.77	0.001*
Ether extract (%Fresh matter)	1.84	0.93	0.20	0.02
Ash (%Fresh matter)	1.48	1.07	0.04	0.001*

[1]Standard error of mean

condition comparing to optimal environmental temperature (Hermes *et al*., 1999; Pla *et al*., 1994; Zeferino *et al*., 2011, 2013). Moreover, the temperature fluctuation is another factor influencing these observed paramters (Pla *et al*., 1994). These results in this study are the same as other studies because rabbits cannot control a normal core temperature and heat prostration sets when the THI is higher than 30. Most of energy is allocated for heat dissipation pathway by increasing ventilation and blood flow to ear lobe to eradicate heat and return to normal core temperature. Therefore, there is less energy for growth which consequences on poor productive performances (Habeeb *et al*., 1993). In addition, the function of appetite center in hypothalamus is inhibited by the impulse from peripheral thermal receptor. Therefore, this pathway influences on the reduction of feed intake when the rabbits are under the high temperature environment (Marai *et al*., 2002) that was observed in this study and others (Chiericato *et al*., 1993; Marai *et al*., 2001; Zeferino *et al*., 2011). Moreover, rabbits in summer production period increased significantly water consumption, leading to reduce feed intake (Marai *et al*., 2001). Most of research articles and in this study were not observed the different on FCR (Marai *et al*., 1999, 2001; Zeferino *et al*., 2011) because the correlation in the same direction was presented between feed intake and weight gain.

The apparent digestibility on DM, OM, EE and CP was lower in OT group than in AT group (P<0.01, Table 1). Rabbits reared at 32°C were better on DM and CP digestibility than at 20°C (Hermes *et al*., 1999) which is in agreement with results of the current study. The longer gut transit time due to the lower feed intake at high temperature condition should be the cause of higher efficiency on nutrient digestibility. The lower CF digestibility of rabbits under optimal temperature group can be an evidence to confirm the higher gut flow rate than the high temperature group (Hermes *et al*., 1999). On the other hand, Marai *et al*. (2001) found the lower apparent digestibility on DM and CP of rabbits during summer production period comparing to winter. No differences of feed intake between summer and winter seasons in the study of Marai *et al*. (2001) may be the cause of this contrast results, whereas our studies and Hermes *et al*. (1999) observed the lower feed intake in rabbits under heat stress condition. Fortunately, there was no any morbidity or mortality of rabbit in any group during study. Therefore, rabbits can resist and survive in this AT condition in Thailand but the poor productive performances are presented.

SW, Hot carcass weight (HCW) and CCW of OT group were heavier than AT group (P<0.01, Table 1). The higher proportion of skin, paws and feet from SW was found comparing to AT group (P<0.001), however there were no statistical differences between groups on other carcass trait parameters (P>0.05, Table 1). The lower of HCW and CCW in rabbits rearing under heat stress are consequences from lower SW and poor productive performances (Chiericato *et al*., 1993; Dalle Zotte and Paci, 2014; Ghosh *et al*., 2008; Marai *et al*., 1999, 2001; Pla *et al*., 1994; Zeferino *et al*., 2013). Lower moisture and higher nutrients (protein, EE and ash) of LD and GC muscles were observed in OT group (P<0.05, Table 1). The meat from rabbits which rearing under 30°C is brighter than 18°C; this may be due to the higher proportion of water in the meat (Zeferino *et al*., 2013). The greater proportion of nutrients and lower proportion of moisture in meat of OT group may be the cause of the higher nutrient components comparing to the meat from AT group (Rotta *et al*., 2009). On the other hand, Hermes *et al*.

(1999) were not found any statistical difference between the diverse on housing temperatures at 20, 26 and 32°C on meat chemical components. However, the lower trend of EE in meat was presented respecting to the increasing of temperature (Hermes *et al*., 1999). Low energy intake and amount of fat storage in bodies of rabbits under hot ambient temperature were observed, resulting lower fat storage in their meat (Chiericato *et al*., 1993; Marai *et al*., 1999; Zeferino *et al*., 2013).

Conclusion

The rabbits rearing under severe heat stress condition (AT group) were lower in live weight, ADG, ADFI, SW, HCW and CCW, whereas higher in apparent digestibility on DM, OM, EE and CP were observed comparing to rabbits lived in the housing with controlled optimal temperature (OT group). Therefore, production of rabbits under hot climate did not deteriorate only the productive performances but also meat chemical components.

Acknowledgements

This research study received financial support from the Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. The authors would like to humbly thank to the farmers who in Kanchanaburi province which allow us to perform the experiment in their farms.

References

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington. 2200 p.

Chiericato, G.M., C. Rizzi and V. Rostellato. 1993. Effect of genotype and environmental temperature on the performance of the young meat rabbit. World Rabbit Science 1: 119-125.

Dalle Zotte, A. and G. Paci. 2014. Rabbit growth performance, carcass traits and hind leg bone characteristics as affected by the sire breed, season, parity order and sex in an organic production system. Animal Science Papers and Reports 32: 143-159.

FAOSTAT. 2018. World rabbit production. (Online). Available: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA (July 15, 2018).

Ghosh, S.K., A. Das, K.M. Bujarbaruah, A. Das, K.R. Dhiman and N.P. Singh. 2008. Effect of breed and season on rabbit production under subtropical climate. World Rabbit Science 16: 29-33.

Habeeb, A.A., A.I. Aboul-Naga and H.M. Yousef. 1993. Influence of exposure to high temperature on daily gain, feed efficiency and blood component of growing male Californian rabbits. Egyptian Journal of Rabbit Science 3: 73-80.

Hermes, I.H., B.M. Ahmed, M.H. Khalil, M.S. Salah and A.A. Al-Homidan. 1999. Growth performance, nutrients utilization and carcass traits of growing Californian rabbits raised under different ambient temperatures. Egyptian Journal of Rabbit Science 9: 117-138.

Kovitvadhi, A., P. Sanyathitiseree, L. Gasco and T. Rukkwamsuk. 2016a. Meat rabbit production in central, western and eastern Thailand: Social network and current status. pp. 961-964. *In*: Proceedings of the 11th World Rabbit Congress, Qingdao, China.

Kovitvadhi, A., L. Gasco, I. Ferrocino, L. Rotolo, S. Dabbou, V. Malfatto, F. Gai, P.G. Peiretti, M. Falzone, C. Vignolini, L. Cocolin and I. Zoccarato. 2016b. Effect of purple loosestrife (*Lythrum salicaria*) diet supplementation in rabbit nutrition on performance, digestibility, health and meat quality. Animal 10: 10-18.

Marai, I.F.M., A.A.M. Hebeeb and A.E. Gad. 2002. Rabbits' productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review. Livestock Production Science 78: 71-90.

Marai, I.F.M., M.S. Ayyat and U.M. Abd El-Monem. 2001. Growth performance and reproductive traits at first parity of New Zealand White female rabbits as affected by heat stress and its alleviation under Egyptian conditions. Tropical Animal Health and Production 33: 451-462.

Marai, I.F.M., M.S. Ayyat, H.A. Gabr and U.M. Abd El-Monem. 1999. Growth performance, some blood metabolites and carcass traits of New Zealand White broiler male rabbits as affected by heat stress and its alleviation under Egyptian conditions. Cahiers Options Méditerranéennes 41: 35-42.

Perez, J.M., F. Lebas, T. Gidenne, L. Maertens, G. Xiccato, R. Parigi-Bini, A. Dalle Zotte, M.E. Cossu, A. Carazzolo, M.J. Villamide, R. Carabaño, M.J. Fraga, M.A. Ramos, C. Cervera, E. Blas, J. Fernandez, L. Falcão-e-Cunha and J. Bengala Freire. 1995. European reference method for *in vivo* determination of diet digestibility in rabbits. World Rabbit Science 3: 41-43.

Pla, M., J. Fernandez Carmona, E. Blas and C. Cervera. 1994. Growth and some carcass traits of adult rabbits under high ambient temperature. World Rabbit Science 2: 147-151.

R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rotta, P.P., I.N. Prado, R.M. Prado, J.L. Moletta, R.R. Silva and D. Perotto. 2009. Carcass characteristics and chemical composition of the *Longissimus muscle* of nellore, caracu and Holstein-friesian bulls finished in a feed lot. Asian-Australian Journal of Animal Sciences 22: 598-604.

Zeferino, C.P., A.S.A.M.T. Moura, S. Fernandes, J.S. Kanayama, C. Scapinello and J.R. Sartori. 2011. Genetic group × ambient temperature interaction effects on physiological responses and growth performance of rabbits. Livestock Science 140: 177-183.

Zeferino, C.P., C.M. Komiyama, S. Fernandes, J.R. Sartori, P.S.S. Teixeira and A.S.A.M.T. Moura. 2013. Carcass and meat quality traits of rabbits under heat stress. Animal 7: 518-523.

ดัชนีบทความในวารสารเกษตร ฉบับที่ 1 และ 2 ปีที่ 35 (2562)

ฉบับที่ 1 มกราคม - เมษายน 2562	**หน้า**
การเร่งการสุกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ต่อคุณลักษณะทางเคมีกายภาพและสารหอมระเหย	1
ผลของสารละลายซิลเวอร์ไนเทรตและ NAA ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของดอกฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis*) เพศเมีย	13
ความหลากหลายอัลลีลของยีน *BADH2* และโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ในข้าวหอมพื้นเมืองที่สูง	23
ประสิทธิภาพและการตกค้างของสารโบรมาซิลและไดยูรอนสำหรับการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกสับปะรด	37
การคัดเลือกและการจำแนกชนิดแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากดินปลูกข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์	49
ผลของชนิดปุ๋ยพืชสดร่วมกับการจัดการปุ๋ยต่อผลผลิต การดูดใช้ธาตุอาหารและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของข้าวพันธุ์ กข47 ที่ปลูกในชุดดินอยุธยา	61
การตรวจสอบเชื้อไวรัสในเมลอนและแคนตาลูปที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน	75
ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณรอบรากผักกระเฉดที่ผลิตสารทุติยภูมิเพื่อยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน	87
การเข้าทำลายและการถ่ายทอดทางเมล็ดของ *Columnea latent* viroid ในพริก	101
การประเมินความต้านทานต่อโรคกาบใบเน่าและโรคเมล็ดด่างข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Sarocladium oryzae*	113
การปรับตัวของผู้ปลูกข้าวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในอำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่	125
แรงจูงใจของเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการประกันภัยพืชผลการเกษตรของธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตร จังหวัดเชียงใหม่	137
การเปรียบเทียบการปฏิบัติงานกับภาระงานที่กำหนดไว้ของเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย	147
ความรู้และการปฏิบัติในการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชของเกษตรกรผู้ปลูกหอมหัวใหญ่ อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่	159
การเปรียบเทียบต้นทุนและผลตอบแทนของการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวโพดเมล็ดพันธุ์ และการปลูกพืชที่หลากหลาย บริเวณลุ่มน้ำแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่	169
ฉบับที่ 2 พฤษภาคม - สิงหาคม 2562	
ผลของสารประกอบแคลเซียมและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อคุณภาพผลสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80	183
โครงสร้างประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงในจังหวัดเชียงราย	193
ผลของฤดูกาลต่อผลผลิตและคุณภาพเมล็ดดาวอินคา	205
อัตราปุ๋ยไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกระเทียมในอำเภอขุนยวม จังหวัดแม่ฮ่องสอน	215
การละลายฟอสเฟตและกลไกลดความเป็นพิษของแบคทีเรียต้านทานอาร์ซินิก	227
ลักษณะดินที่เกิดจากหินปูนระหว่างพื้นที่เกษตรกรรมและป่าไม้ในลุ่มน้ำแม่ตาว อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก	239
การใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ร่วมกับกรดโพรพิโอนิกเพื่อการควบคุมด้วงขี้ไก่ *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)	253
ชีววิทยาของไร *Tyrophagus pacificus* Fan & Zhang (Acari: Acaridae) ที่เข้าทำลายเห็ดถั่งเช้าสีทอง	263
ศักยภาพทางชีวภาพและตารางชีวิตของด้วงเต่าสีส้มเมื่อเลี้ยงด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นสีเขียว	271
ประสิทธิภาพของคาร์บาริล ฟิโปรนิล และไซเพอร์เมทรินต่อกิ้งกือตะเข็บสามสี *Antheromorpha uncinata* Jeekel	283
พลวัตประชากรและการควบคุมมอดข้าวเปลือกในโรงเก็บเมล็ดพันธุ์ข้าว	295
ผลของการใช้สารเคลือบบางชนิดกับดักแด้ไหมต่อพัฒนาการและคุณภาพของเห็ดถั่งเช้าสีทอง *Cordyceps militaris* (L.) Link	303
การผลิตก๊าซชีวภาพด้วยกระบวนการหมักย่อยร่วมของมูลนกแอ่นกินรังกับพืชน้ำ	311
ผลของการใช้เนื้อในเมล็ดมะขามป้อมในอาหารต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารในปลานิลแดง	321
ปัจจัยที่มีผลต่อความพึงพอใจในสวัสดิการของเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย	333

คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ (ต่อ)

2. **การเขียนเอกสารอ้างอิง** มีรูปแบบการเขียนมีดังนี้

วารสาร (Journals)

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ชื่อวารสาร (เขียนเต็ม) ปีที่(ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด.

Muthita, W. and N. Kuanprasert. 2004. Cytogenetics and flower color inheritance of fuchsias. Journal of Agriculture 20(1): 10-18. (in Thai)

Barcenas, N.M., T.R. Unruh and L.G. Neven. 2005. DNA diagnostics to identify internal feeders (Lepidoptera: Tortricidae) of pome fruits of quarantine importance. Journal of Economic Entomology 98(2): 299-306.

ในกรณีที่เป็นวารสารออนไลน์ ไม่สามารถระบุเลขหน้าเริ่มต้นและเลขหน้าสิ้นสุดได้ ให้ระบุ doi แทน

Bukhari, T., W. Takken and C.J.M. Koenraadt. 2011. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. Parasites & Vectors 4: 23, doi: 10.1186/1756-3305-4-23.

หนังสือ และตำรา (Books & Textbooks)

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อหนังสือ. สำนักพิมพ์, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

Ek-amnuay, P. 2016. Diseases and Pests of Economic Importance. 5th ed. Amarin Printing and Publishing PCL, Bangkok. 704 p. (in Thai)

Gullan, P.J. and P.S. Cranston. 2005. The Insects: An Outline of Entomology. 3rd ed. Blackwell Publishing, Malden. 505 p.

เรื่องย่อยในตำราหรือหนังสือที่มีผู้เขียนแยกเรื่องเขียน และมีบรรณาธิการ

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องย่อย. หน้า เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด. *ใน*: ชื่อบรรณาธิการ (บก.). ชื่อหนังสือ. สำนักพิมพ์, เมืองที่พิมพ์.

Krairiksh, S. and W. Namruangsri. 1997. Integrated pest control of mango. pp. 137-144. *In*: K. Jumroenma (ed.). Integrated Pest Control. The Agricultural Cooperative Federation of Thailand, Ltd., Bangkok. (in Thai)

Kubo, T. 2003. Molecular analysis of the honeybee sociality. pp. 3-20. *In*: T. Kikuchi, N. Azuma and S. Higashi (eds.). Gene, Behaviors and Evolution of Social Insects. Hokkaido University Press, Sapporo.

รายงานการประชุม สัมมนา (Reports and Proceedings)

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องย่อย. หน้า เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด. *ใน*: รายงานการประชุม สัมมนา. สถานที่จัดประชุม.

Tantarawongsa, P. and D. Ketrot. 2017. Diuron residue in soils under pineapple cultivation. pp. 17-24. *In*: Proceedings of 55th Kasetsart University Annual Conference: Plants, Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics, Bangkok. (in Thai)

Feigenbaum, S., A. Bar-Tal and D.L. Sparks. 1990. Dynamics of soil potassium in multicationic systems. pp. 145-161. *In*: Proceedings of the 22nd Colloquium of the International Potash Institute, Bern.

วิทยานิพนธ์ (Thesis)

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ระดับวิทยานิพนธ์. สถาบันการศึกษา, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

Maneepong, A. 2004. Effects of ozone treatments on postharvest quality and pesticide residue of Mandarin cv. Sai Nam Pung. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 100 p. (in Thai)

Liquido, N.J. 1982. Population ecology of *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter (Heteroptera: Miridae). Ph.D. Dissertation. University of Hawaii, Honolulu. 175 p.

เอกสารวิชาการอื่น ๆ

ชื่อผู้เขียน หรือหน่วยงาน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องหรือชื่อหนังสือ. ประเภทของเอกสาร. สถาบันหรือหน่วยงานที่จัดพิมพ์, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

Shutsrirung, A., C. Santasup and K. Kunasakdakul. 2010. Screening of bio-organic inputs for high quality tea production. Final Report. The Thailand Research Fund, Bangkok. 109 p. (in Thai)

Siriphontangmun, S., U. Nounart, S. Roumchaiapikun and S. Srijuntra. 2016. Insect Pests of Vegetable, Mushroom and Cut Flower. Technical Document. Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. 74 p. (in Thai)

สื่ออิเล็กทรอนิกส์

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: ที่อยู่ของไฟล์หรือเว็บไซต์ (URL) (เดือน วันที่, ปีที่ สืบค้นข้อมูล).

(ในกรณีที่ไม่มีข้อมูลปีที่ตีพิมพ์ ให้ระบุเป็นปีที่เข้าไปสืบค้นข้อมูล)

Department of Agricultural Extension. 2005. Hydroponics. (Online). Available: http://www.doae.go.th/ proster/nondin/htm (April 21, 2005). (in Thai)

Marja, L.L. 2000. How Mycostop® acts in the control of fungal plant diseases. (Online). Available: http://www.shkagro.com/otros/efecto_fungicida.pdf (April 1, 2016).

การส่งต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์

ให้ส่งบทความทาง online เท่านั้น ได้ที่ http://web.agri.cmu.ac.th/agjournal/submission/

การพิจารณาบทความ

1) ต้นฉบับที่ไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับของวารสารเกษตร จะไม่ได้รับการพิจารณา

2) ทุกบทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารเกษตร ต้องผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิไม่น้อยกว่า 2 ท่าน

3) กองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ในการตรวจและแก้ไขบทความทุกเรื่องที่เสนอเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารเกษตร (The Editorial Board claims a right to review and correct all articles submitted for publishing in Journal of Agriculture)

สำนักงานและการติดต่อสอบถาม (Office and Inquiries)

กองบรรณาธิการวารสารเกษตร
งานบริหารงานวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
จ. เชียงใหม่ 50200
โทร. 0 5394 4089-92 ต่อ 12 โทรสาร 0 5394 4089-92 ต่อ 12
Editorial Board, Journal of Agriculture
Division of Research and International Affairs, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
Tel: 0 5394 4089-92 ext. 12 Fax: 0 5394 4089-92 ext. 12
Email: agjournal22@gmail.com

(ดูตัวอย่างต้นฉบับที่เป็นทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษที่ http://journal.agri.cmu.ac.th/Document/49030001.pdf)

JOURNAL OF AGRICULTURE

A Technical Journal of Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

Volume 35, Issue 3 September - December 2019

In Vitro Rearing of Stingless Bee Queen *Tetragonula laeviceps* (Smith) Species Complex

Thaksaporn Sommitr, Jiraporn Kulsarin, Sawai Buranapanichpan, Somnuk Boongird, Kanokwan Khamyotchai and Krissana Ruangrit.....343

Strain Improvement of *Cordyceps tenuipes* (Peck) for Snowflake Cordyceps Production on Silkworm Pupae

Thitinicha Chaichana, Jiraporn Kulsarin, Piyawan Suttiprapan, Sawai Buranapanichpan and Tanya Tapingkae.....353

Effects of Edible Insects as Ingredient in Sabouraud Dextrose Broth and Culture Media on Growth of Gold Cordyceps, *Cordyceps militaris* (L.) Link

Sopin Khumsaensri, Jiraporn Kulsarin, Sawai Buranapanichpan, Tanya Tapingkae and Siriya Kumpiro.....365

Production of SPFMV-free and SPCSV-free Sweet Potato Using Tissue Culture Techniques

Chadaporn Chailangka, Sirimas Chaichom, Saowalak Phimkhan and Kaewalin Kunasakdakul.....375

Production of CMV-free *Gloriosa rothschildiana* O' Brien Using Tissue Culture Techniques

Pondsawan Unsilp, Sirinya Meesawat and Kaewalin Kunasakdakul.....385

Inheritance of Dwarfism in *Blechnum gibbum* Mett.

Surawit Wannakrairoj, M.L. Charuphant Thongtham and Anuphan Surinranagsee.....395

Internode Elongation Ability and *SK2* Gene Expression in Common Wild Rice Under Deep Water

Patamaporn Masud, Sansanee Jamjod and Tonapa Pusadee.....401

Evaluation of Preemergence Herbicide Efficacy for Weed Control in Sugarcane Field

Apirat Bundit.....413

Zinc Accumulation in Upland and Wetland Rice Grown Under Non-flooded and Flooded Conditions

Rarinthorn Rinsinjoy, Sittichai Lordkaew and Chanakan Thebault Prom-u-thai.....425

Efficiency Evaluations of Bacteria and Bio-products in Reducing Arsenic Toxicity in Soils

Kanokkwan Panyasite, Yupa Chromkaew and Arawan Shutsrirung.....435

Assessing Soil Erosion and Nutrient Losses Under Soil and Water Conservation Measures in Maize Plantation, Khao Suan Kwang District, Khon Kaen Province

Tawatchai Inboonchuay, Boontarik Chimchart, Jutarat Manoonyo and Sirisuda Bootpetch.....447

Screening and Efficiency Assessment of Rhizobacteria for Growth Enhancement of Rice Seedlings

Anusara Pidnoi and Arawan Shutsrirung.....461

Physicochemical Properties and Carbon and Nutrient Storages of Soils Derived from Volcanic Rock and Sandstone in Dry Dipterocarp Forest at Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Chiang Mai Province

Chackapong Chaiwong, Soontorn Khamyong, Niwat Anongrak, Prasit Wangpakapattanawong and Suparb Paramee.....475

Effects of White Rice Bran Supplementation on Ruminal Degradability and Nutrient Digestibility in Beef Cattle

Boontharika Plangsungnern, Saowaluck Yammuen-art and Norakamol Laorodphan.....487

Effects of Different Ambient Temperatures on Growth Performances, Digestibility, Carcass Traits and Meat Chemical Components in Fattening Rabbits

Attawit Kovitvadhi, Pipatpong Chundang, Karun Thongprajukaew and Chanin Tirawattanawanich.....495

ISSN 0857-0841

ารสารเกษตร ปีที่ 35 ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม 2562 หน้า 343-502 Journal of Agriculture Volume 35, Issue 3 September-December 2019 pp. 343-502