

การผลิตปุ๋ยไมคอร์ไรซาสำหรับทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีสำหรับเพาะกล้า ต้นอ่อน และเพิ่มผลผลิตยาสูบ

The mycorrhiza fertilizer for seedling, sprout and yield enhanced of Tobacco

นิรุจน์ เต็งพงศธร¹, ทัดพร คุณประดิษฐ์²

aDepartment of Microbiology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University,
202 Chang Phuek Rd., T.Chang Peuk, A.Muang,Chiang Mai 50300, Thailand.

บทคัดย่อ

การผลิตปุ๋ยไมคอร์ไรซาสำหรับทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีสำหรับเพาะกล้า ต้นอ่อน และเพิ่มผลผลิตยาสูบ มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกลายพันธุ์สายพันธุ์เชื้อราไมคอร์ไรซาและปลูกถ่ายเชื้อราไมคอร์ไรซา ลงในวัสดุที่เหมาะสม เพื่อขยายพันธุ์เชื้อราไมคอร์ไรซา และพัฒนารูปแบบและวิธีการใช้งานไมคอร์ไรซาสำหรับการเพาะกล้า อนุบาลต้นอ่อน และเพิ่มผลผลิตของต้นยาสูบ โดยแยกเชื้อไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดิน สามารถคัดแยกเชื้อไมคอร์ไรซาสามารถแยกเชื้อจากตัวอย่างดินได้ 5 ชนิด ได้แก่ Rhizopus oligosporus (M2), Rhizoctonia solani (M3), Rhizoctonia sp.1(M4), Cunninghamella sp.1(M5), Rhizopus sp.1 (M7) และได้ปลูกถ่ายเชื้อดินดินปลูกชนิดต่างๆ ได้แก่ วัสดุเพาะเมล็ดคอกเดิมของบริษัท (N), วัสดุเพาะเมล็ดสูตรที่ 1 (5), วัสดุเพาะเมล็ดสูตรที่ 2 (0) พบว่าการศึกษาการเจริญเติบโตของต้นของยาสูบโดยปลูกในดินปลูกชนิดต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่เติมเชื้อไมคอร์ไรซาการเจริญทางด้านจำนวนใบพบว่าในชุด M7 (N) มีจำนวนใบมากที่สุดคือ 6 ใบ และการศึกษาด้านความสูง ความกว้างใบ ความยาวใบ ในชุด Control (N) จะมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดและในชุดการทดลองที่ได้เติมเชื้อราไมคอร์ไรซามีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดคือชุด M4 (N) และรองลงมาคือชุด M3 (N)

คำสำคัญ : ไมคอร์ไรซา / กล้าและต้นอ่อน / เพิ่มผลผลิต

Abstract

Introduction and Objective The mycorrhiza is the usefulness fungi in the plants seedling process. Not only the infected prevention of the root system but they are extending the root surface area and helping the water and nutrients absorption and nutrients cycle in the soil. The purpose of this project is to study the mycorrhiza isolations and using as the fertilizer for the tobacco seedlings nursery and increases the productivity. **Methods** The mycorrhiza was isolate form soil samples. The Mycorrhiza was transfer to the soil mix media and soil media. The soil mix media contain the coconut cloudy, ashes husk and fertilizer. The tobacco seeds were put in to trays for seedling process and transplanted into the different seedling materials. The seedlings were measured by germination and growth rate of young tobacco. **Results** The 5 species of mycorrhiza were isolated and classified as Rhizoctonia solani, Rhizopus oligosporus,

Rhizopus nireg, *Rhizoctonia* sp. and *Cunninghamella* sp. The tobacco seedling and growth were studied in the soil mixed mycorrhiza media and soil media (control). The results shown that the growth of seedling process on soil media (control) was better than other soil mixed mycorrhiza media. Whereas, the tobacco growth were slightly different in each treatment. Conclusion That soil media (control) were better than soil mix media (add mycorrhiza) but the in the tobacco growth were not significantly different in soil mixed mycorrhiza . The using of soil mix media (mycorrhiza) could be using as the tobacco seedling process and nursery for the young tobacco.

Keywords: mycorrhiza / seedling and sprout / yield enhanced

บทนำ

ไมคอร์ไรซามีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการช่วยป้องกันการติดเชื้อโรคทางระบบรากของกล้าไม้และต้นไม้ว ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของรากทำให้มีประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำและธาตุอาหารต่าง ๆ เช่น ฟอสฟอรัส (P) ไนโตรเจน (N) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) และธาตุอื่น ๆ ให้แก่ต้นไม้มากกว่าปกติ ช่วยทำให้เกิดการหมุนเวียน ของธาตุอาหารในดินดีขึ้น และมีลักษณะทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพ ความเป็นกรดหรือด่างที่มากหรือน้อยเกินไป ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงและบำรุงพืชเศรษฐกิจ โดยเฉพาะต้นยาสูบ ซึ่งเป็นพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจที่สูง และนิยมปลูกอย่างกว้างขวางในภาคเหนือของประเทศไทย เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและมีการปลูกพืชชนิดนี้มาอย่างยาวนาน แต่ในปัจจุบันการใช้ปุ๋ยไมคอร์ไรซาจำเป็นต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ มีราคาที่สูง และไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร นอกจากนี้ยังมีราคาที่สูงทำให้รายได้ของเกษตรกรลดลง อย่างไรก็ตามเกษตรกรยังคงต้องใช้ปุ๋ยไมคอร์ไรซาอย่างต่อเนื่องเนื่องจากสามารถช่วยให้กล้าไม้มีอัตราการรอดตายสูง และช่วยเร่งให้ต้นไม้มีอัตราเจริญเติบโตสูงขึ้นกว่าปกติ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยและบริษัทเทพวงศ์จึงเห็นตรงกันในอนาคตที่จะผลิตปุ๋ยไมคอร์ไรซาออกมาเพื่อใช้ในการปลูกยาสูบและสามารถใช้กับพืชเศรษฐกิจอื่นได้ โดยสามารถผลิตออกมาในรูปแบบที่ใช้ได้ง่าย มีประสิทธิภาพสูงและราคาถูกลง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. แยกและคัดเลือกสายพันธุ์สายพันธุ์เชื้อราไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินรอบรากพืชที่รวบรวมจากพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินในจังหวัดเชียงใหม่
2. ปลูกถ่ายเชื้อราไมคอร์ไรซา ลงในวัสดุที่เหมาะสมเพื่อขยายพันธุ์เชื้อราไมคอร์ไรซาและพัฒนา รูปแบบและวิธีการใช้งานไมคอร์ไรซาสำหรับการเพาะกล้า อนุบาลต้นอ่อน และเพิ่มผลผลิตของต้นยาสูบ

การศึกษาลักษณะของเชื้อราไมคอร์ไรซา

คัดแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดิน

1. สํารวจและเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ป่าและพันธุ์ไม้ ของป่าเต็งรัง และป่าเบญจพรรณในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่

1.1 บริเวณพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ วิทยาเขตสะลวง – จี้เหล็ก จังหวัดเชียงใหม่

1.2 บ้านอ้าย อ.ไชยปราการ จ.เชียงใหม่

2. นำตัวอย่างดินที่ได้มาโดยใช้วิธี Soil dilution plating ในอัตราส่วน 10-3, 10-4, 10-5 แล้วเพาะเลี้ยงนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ¼ Potato dextrose agar (PDA) + 0.1 % Lactic acid v/v ด้วยวิธี Spread plate

3. จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สังเกตการณ์เจริญของเส้นใยเชื้อรา เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดเฉพาะปลายเส้นใย นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA และ subculture จะได้เชื้อบริสุทธิ์

วัสดุเพาะเมล็ด

สำรวจและหาวัสดุจากธรรมชาติที่หาได้ง่ายตามท้องตลาด ราคาถูกและมีคุณสมบัติอุ้มน้ำได้ดี สามารถให้ความชุ่มชื้นแก่ต้นอ่อนยาสูบ จึงได้เลือกวัสดุจากธรรมชาติ 2 ชนิดคือ ขุยมะพร้าวและดินปลูก โดยได้แบ่งเป็น 2 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1

1. ขุยมะพร้าว 4 กิโลกรัม
2. ดินปลูก 2 กิโลกรัม
3. จี๋เถ้าแกลบ 4 กิโลกรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำบรรจุใส่ถุง ๆ ละ 500 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่อวัสดุเย็นตัวลงนำไปปลูกถ่ายเชื้อไมคโคไรซาแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สังเกตการณ์เจริญของเส้นใยเชื้อรา เป็นเวลา 7 วันจากนั้นนำไปเพาะเมล็ดยาสูบ

สูตรที่ 2

1. ขุยมะพร้าว 4 กิโลกรัม
2. ดินปลูก 2 กิโลกรัม
3. จี๋เถ้าแกลบ 4 กิโลกรัม
4. ปุ๋ยสูตร 12-24-12 1 %

นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำบรรจุใส่ถุง ๆ ละ 500 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่อวัสดุเย็นตัวลงนำไปปลูกถ่ายเชื้อไมคโคไรซาแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สังเกตการณ์เจริญของเส้นใยเชื้อรา เป็นเวลา 7 วันจากนั้นนำไปเพาะเมล็ดยาสูบ

การวัดการเจริญเติบโตของกล้ายาสูบ

1. นับจำนวนใบ
2. การวัดความสูง โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์แบบดิลิจิตอล
3. การวัดขนาดความกว้างของใบ (2 ใบใหญ่สุด) โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์แบบดิลิจิตอล
4. การวัดขนาดความยาวของใบ (2 ใบใหญ่สุด) โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์แบบดิลิจิตอล

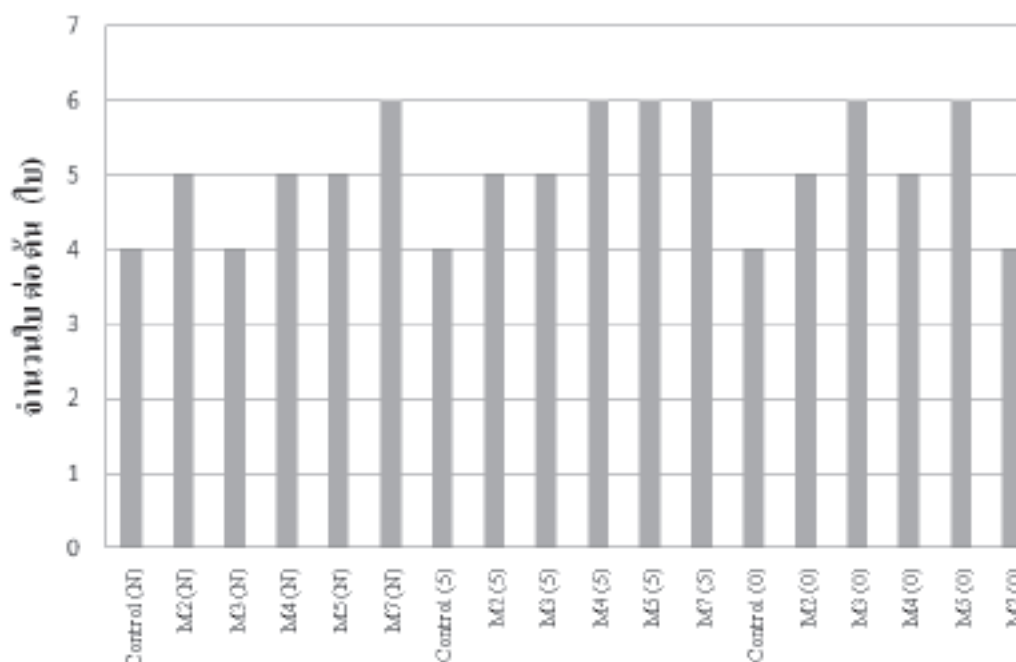
ผลการศึกษา

จากการคัดแยกเชื้อไมคอร์ไรซาสามารถแยกเชื้อจากตัวอย่างดินได้ 5 ชนิด ได้แก่ *Rhizopus oligosporus* (M2), *Rhizoctonia solani* (M3), *Rhizoctonia* sp.1(M4), *Cunninghamella* sp.1(M5), *Rhizopus* sp.1 (M7)

ผลจากการทดสอบเชื้อไมคอร์ไรซาโดยผสมลงในดินปลูกชนิดต่างๆ ได้แก่ วัสดุเพาะเมล็ดเดิมของบริษัท (N), วัสดุเพาะเมล็ดสูตรที่ 1 (5), วัสดุเพาะเมล็ดสูตรที่ 2 (0) ตามลำดับเพื่อศึกษาการใช้เชื้อไมคอร์ไรซาในการผลิตปุ๋ยและทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี สำหรับเพาะกล้าต้นอ่อนและเพิ่มผลผลิตยาสูบโดยพิจารณาจากความสูงของต้น จำนวนใบ ความกว้างและความยาวใบ ซึ่งปรากฏผลดังนี้

1. จำนวนใบต่อต้น

จากการปลูกต้นกล้ายาสูบลงในดินปลูกชนิดต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จำนวนใบของต้นยาสูบจะอยู่ในช่วง 2–6 ใบต่อต้นและเมื่อปลูกครบ 6 สัปดาห์ ชุดที่มีจำนวนใบมากที่สุดได้แก่ ชุดทดลองที่ M7(N), M4(5), M5(5), M7(5), M3(0), M5(0) โดยมีจำนวนใบ 6 ใบต่อต้น ดังภาพที่ 1

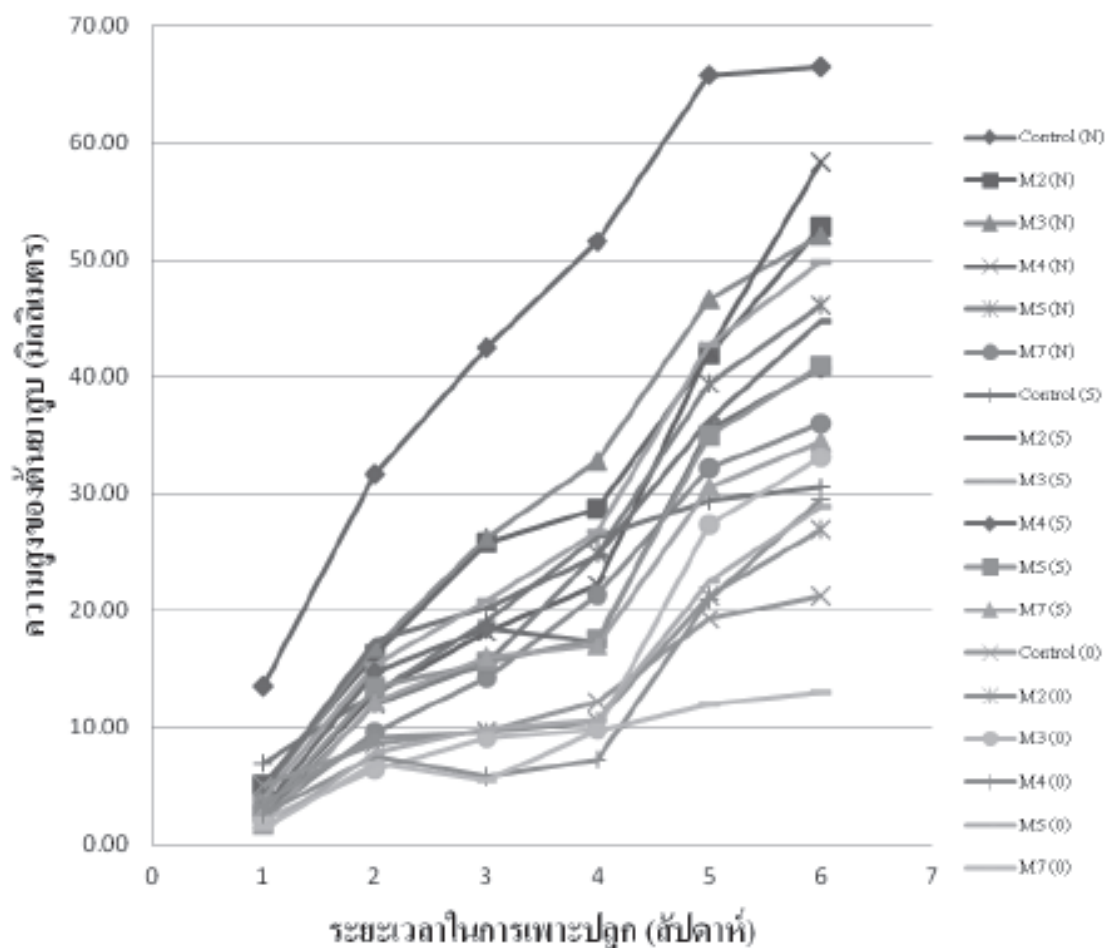


ภาพที่ 1 แสดงจำนวนใบต่อต้นของต้นยาสูบเมื่อปลูกครบ 6 สัปดาห์

2. ความสูง

จากการปลูกต้นกล้ายาสูบลงในดินปลูกชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ลักษณะการเจริญทางด้านความสูงของต้นยาสูบ มีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน ระหว่างชุดที่ผสมเชื้อไมคอร์ไรซากับชุด Control จะเห็นได้ว่าในชุด Control (N) มีความสูงโดยเฉลี่ยสูงที่สุดตลอดการทดลองและในสัปดาห์ที่ 6 จะเห็นได้ว่าชุด Control (N) มีความสูงโดยเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 66.48 มิลลิเมตรและในชุดการทดลองที่เติมเชื้อไมคอร์ไรซาจะเห็นได้ว่าในชุดการทดลอง M4(N) มีความสูงเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 58.41 มิลลิเมตร รองลงมาคือชุด M2(N),

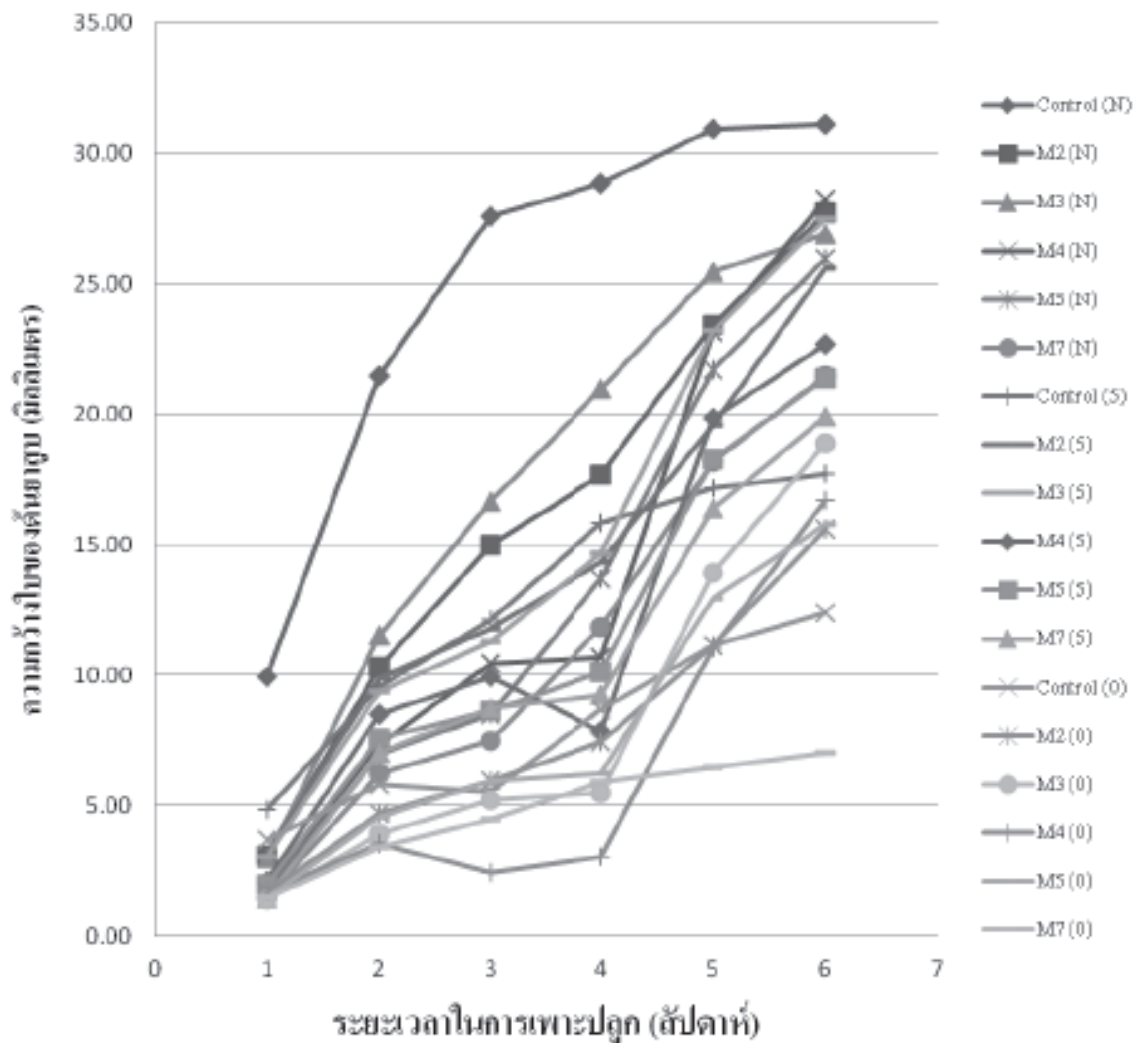
M3(N), M3(5), M5(N), M2(5), M5(5), M4(5), M7(N), M7(5), M3(0), Control(5), M4(0), M5(0), M2(0), Control(0), M7(0) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 52.84, 52.06, 49.77, 46.10, 44.78, 40.93, 40.73, 36.03, 34.41, 33.08, 30.52, 29.48, 28.84, 26.94, 21.27, 12.95 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยแสดงความสูงของต้นยาสูบ

3. ความกว้างใบ

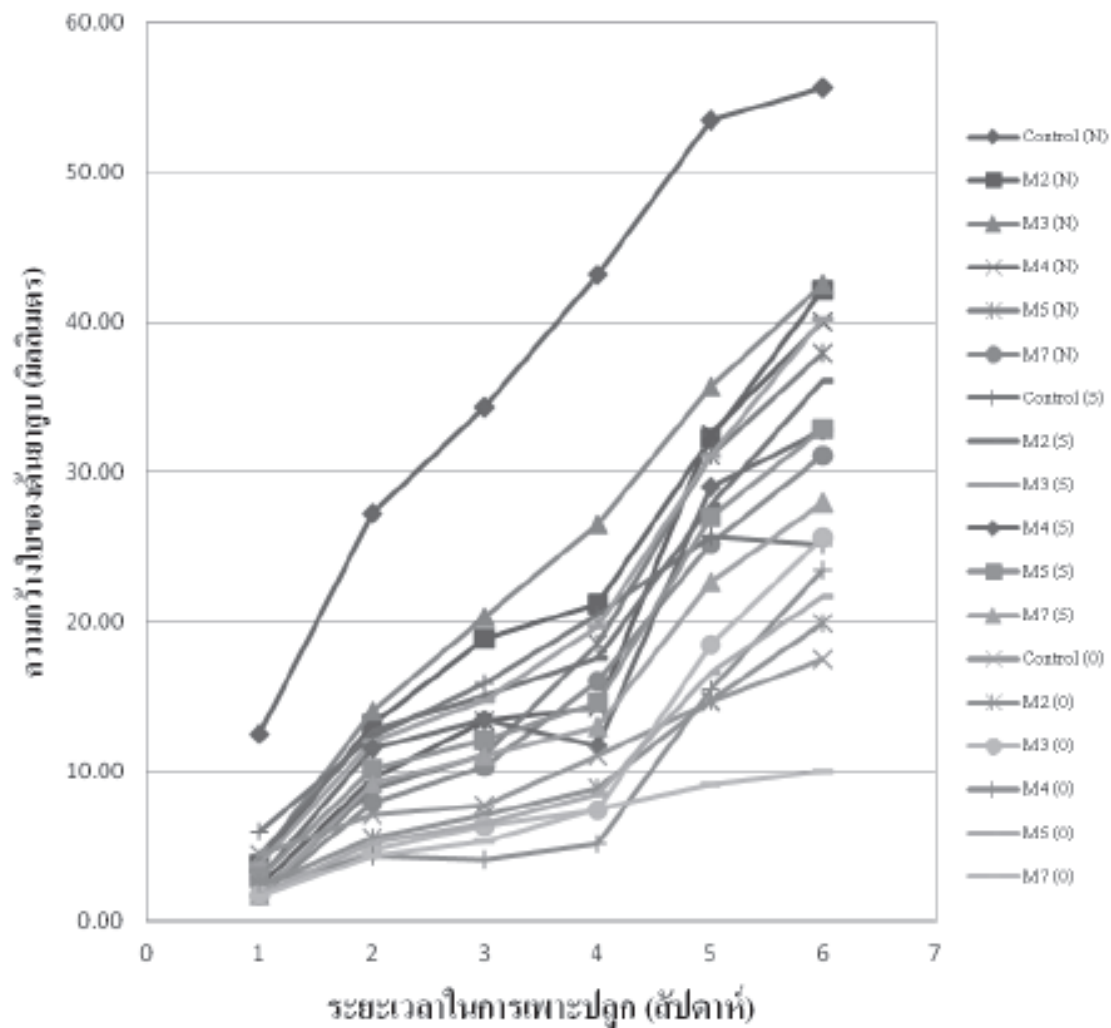
จากการวัดความกว้างใบของต้นยาสูบที่ปลูกในดินปลูกชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ผลปรากฏว่า ลักษณะการเจริญทางด้านความกว้างใบของต้นยาสูบ มีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันระหว่างชุดที่ผสมเชื้อไมคอร์ไรซา กับชุด Control จะเห็นได้ว่าในชุด Control (N) มีความกว้างโดยเฉลี่ยสูงที่สุดตลอดการทดลองและในสัปดาห์ที่ 6 ชุด Control (N) มีความกว้างใบโดยเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 31.98 มิลลิเมตรและในชุดการทดลองที่เติมเชื้อไมคอร์ไรซาจะเห็นได้ว่าในชุด M4(N) มีความกว้างใบเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 28.26 มิลลิเมตร รองลงมาคือชุดทดลอง M2(N), M3(5), M3(N), M5(N) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 27.75, 27.51, 26.91, 25.99 มิลลิเมตรตามลำดับ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยแสดงความกว้างใบของต้นยาสูบ

4. ความยาวใบ

จากการศึกษาความยาวใบของต้นยาสูบที่ปลูกในดินปลูกชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ผลปรากฏว่า ลักษณะการเจริญทางด้านความยาวใบของต้นยาสูบ มีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันระหว่างชุดที่ผสมเชื้อไมคอร์ไรซา กับชุด Control จะเห็นได้ว่าในชุด Control (N) มีความยาวโดยเฉลี่ยสูงสุดตลอดการทดลอง และในสัปดาห์ที่ 6 ชุด Control (N) มีความยาวใบโดยเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 55.68 มิลลิเมตรและในชุดการทดลองที่เติมเชื้อไมคอร์ไรซาจะเห็นได้ว่าในชุด M3(N) มีความยาวใบเฉลี่ยสูงสุดที่สุดคือ 42.50 มิลลิเมตร รองลงมาคือชุด M2(N), M3(S), M4(N) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.15, 40.18, 40.04 มิลลิเมตรตามลำดับ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยแสดงความยาวใบของต้นข้าว

สรุปและอภิปรายผล

การผลิตปุ๋ยไมคอร์ไรซาสำหรับทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีสำหรับเพาะกล้า ต้นอ่อน และเพิ่มผลผลิตข้าวในขั้นตอนแรกเป็นการในการหาวัสดุทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีสามารถจัดหาวัสดุทดแทนและสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ 2 สูตรคือ ดินปลูกสูตรที่ 1(5), ดินปลูกสูตรที่ 2 (0) จากการคัดแยกเชื้อไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินโดยใช้วิธี Soil dilution plating (จริยา 2536) สามารถคัดแยกเชื้อไมคอร์ไรซาได้ 5 ชนิดได้แก่ *Rhizoctonia solani* (M3), *Rhizopus oligosporus* (M2), *Rhizoctonia sp.1*(M4), *Cunninghamella sp.1*(M5), *Rhizopus sp.1* (M7) และ 0)

การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นของข้าวโดยปลูกในดินปลูกชนิดต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่าในชุดการทดลองที่เติมเชื้อไมคอร์ไรซาการเจริญทางด้านจำนวนใบพบว่าในชุด M7 (N) มีจำนวนใบมากที่สุดคือ 6 ใบ และการศึกษาด้านความสูงซึ่งจะเห็นได้ว่า ชุด Control (N) มีความสูงโดยเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 66.48 มิลลิเมตรและในชุดการทดลองที่ได้เติมเชื้อราไมคอร์ไรซาในชุด M4 (N) มีความสูงเฉลี่ย

รองลงมาคือ 58.41 มิลลิเมตรและในการเจริญทางด้านความกว้างใบซึ่งในชุด Control (N) มีความกว้างใบเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 31.98 มิลลิเมตร ชุดการทดลองที่ได้เติมเชื้อราไมคอร์ไรซาในชุด M4 (N) มีค่าเฉลี่ยรองลงมาที่สุดคือ 28.26 มิลลิเมตรซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาในด้านความยาวใบที่ในชุด Control (N) มีความยาวใบโดยเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 55.68 มิลลิเมตร ชุดการทดลองที่ได้เติมเชื้อราไมคอร์ไรซาในชุด M3 (N) มีความยาวใบเฉลี่ยรองลงมาคือ 42.50 มิลลิเมตร จะเห็นได้ว่าชุด Control เจริญได้ดีกว่าทุกชุดการทดลองที่ได้เติมเชื้อราไมคอร์ไรซาและในทุกปัจจัยที่ใช้ทดสอบ อาจเนื่องจากเชื้อราไมคอร์ไรซาที่เติมลงไปนั้นเป็นเชื้อราที่เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Rhizoctonia solani* จึงทำให้ผลการทดลองขัดแย้งกับการศึกษาของเมธาวิการณ (2554) ที่ได้ศึกษาเชื้อรา *Glomus claroideum* และเชื้อ *Gl. pastulatum* สามารถส่งเสริมการเจริญให้กับอ้อยได้ดีที่สุด สูงกว่าอ้อยที่ไม่ได้ปลูกเชื้อราไมคอร์ไรซา (ชุดควบคุม)

เอกสารอ้างอิง

- กิตติมา รามัญญะ. (2541). ความหลากหลายของราเวสทีคูลา-อาร์บัสคูลาไรไมคอร์ไรซาของสักและผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของกล้าสัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จริยา หาญวงษ์ และคณะ. (2536). คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์ สำหรับนักศึกษาแพทย์ ชั้นปีที่ 3. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สมจิตร อยู่เป็นสุข. (2549). ไมคอร์ไรซา. ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สาวตรี อักษรกูร. ปัจจัยที่มีผลต่อการเข้าอยู่อาศัยของ เชื้อราเวสทีคูลา อาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซา ในเนื้อเยื่อราก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โสภณ บุญลือ. ความสามารถในการอยู่รอดในดิน การเข้าอยู่อาศัยในรากข้าวโพดและถั่วลิสง และผลต่อการเจริญเติบโตของ ข้าวโพดของเชื้อราเวสทีคูลา อาร์บัสคูลาไรไมคอร์ไรซา.
- อำพรณ พรมศิริ. (2544). การใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาไรไมคอร์ไรซาสำหรับการผลิตสตรอเบอรี่พัฒนาชนบท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grave T. and Malajczuk N. (1996). **Monograph 32**, Canberra. 374 pp.
- Hawksworth, D. L.; Kirk, P. M.; Sutton, B. C. & Pegler, D. N. (1995). **Dictionary of the fungi**. Survey, 8 ed., International Mycological Institute, 412p.
- Jakobsen, I., Abbott, L.K. and Robson, A.D. **External hyphae of vascular-arbuscularmycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L.I. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots**. New Phytologist.;1992.120: 371-380. 86.
- Ogawa, M. 1992. **Soil microbiology and mycorrhizae**, pp. 101-110. In CFRL/TC Research Report No. 3. JICA-Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.
- Schenck, N.C. and Y. Perez. (1988). **Manual for the Identification of VA Mycorrhizal fungi**, 2d ed., INVAM, Univ. of Florida, Gainesville, Florida, USA. 241 p.