การขยายพันธุ์แหนแดงโดยการใช้สปอร์

Propagation of Azolla through Sporocarps

นันทกร บุญเกิด[1] สมพร ชุนห์ลือชานนท์[2] และ ประยูร สวัสดี[2]

Nantakorn Boonkerd[1] Somporn Choonluchanon[2] and Prayoon Swatdee[2]

ABSTRACT

Azolla microphylla sporocarps were collected using three methods, fresh sporophytes, dry sporophytes and fermented sporophytes. Their germination and fertilization were performed on three media; water, modified IRRI and modified IRRI + N. Poor germination and fertilization were obtained from sporocarps collected from fresh and dry Azolla sporophytes. Germination and fertilization percentages of 92 and 85 respectively were obtained from sporocarps collected from fermented sporophytes. The media for propagating spores did not differ in their effect on germination. It was recommended that water agar was adeguate for propagation of Azolla sporocarps, and that fermentation of sporocarps at least 2 months was to be used in order to promote germination.

Keywords: Azolla propagation

บทคัดย่อ

แหนแดง (Azolla) เป็นพืชน้ำชนิดหนึ่งที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นปุ๋ยในนาข้าว แต่การขยายพันธุ์แหนแดงที่ทำลังทำอยู่ในปัจจุบันเป็นการใช้ต้น ซึ่งมีปัญหาในการเลี้ยงข้ามฤดู เนื่องจากแหนแดงเป็นพืชที่ผลิตสปอร์ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องการหาวิธีการที่จะใช้ทำการขยายพันธุ์โดยทางสปอร์ โดยนำสปอร์ที่เก็บมาจากแหนแดงพันธุ์ *A. microphylla* ใช้ 3 ชนิด คือ สปอร์สด สปอร์ตากแห้ง และสปอร์ที่ผ่านการหมักมาก่อน นำมาทำการเพาะบนอาหาร 3 ชนิด คือ น้ำ น้ำยาปลูกพืชสูตร IRRI และน้ำยาสูตร IRRI + N ผลการทดลองพบว่า สปอร์ที่ได้จากสปอร์สดและตากแห้งมีความงอกต่ำมาก ส่วนที่ได้จากการหมักจะให้เปอร์เซนต์การผสมและงอกเป็นต้นสูงถึง 92 และ 85 ตามลำดับ สำหรับอาหารเพาะสปอร์พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน แต่แนะนำให้ใช้อาหารวุ้นที่ใส่น้ำอย่างเดียว เพราะง่ายต่อการเตรียมและมีความปนเปื้อนน้อยและควรใช้สปอร์ที่ผ่านการหมักแล้วอย่างน้อย 2 เดือน

คำหลัก : แหนแดง การขยายพันธุ์

(1) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000

(2) กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

Soil Microbloiogy Research Group. Soil Science Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900

คำนำ

แหนแดง *(Azolla)* เป็นพืชน้ำชนิดหนึ่งที่สามารถตรึงไนโตรเจนร่วมกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *(Anabaena azolae)* ดังนั้นแหนแดงจึงเหมาะที่ใช้เป็นปุ๋ยพืชสดในนาข้าวได้ดี จากผลการวิจัยของ นันทกร และคณะ(2534) พบว่า**ไนโตรเจนในแหนแดงสามารถใช้เป็นปุ๋ยข้าวได้ดีเท่ากับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนจากยูเรีย** แหนแดงมีประวัติการใช้เป็นปุ๋ยในนาข้าวมานาน เช่น ในเวียตนามและจีน (Lumpkin and Plucknett 1982) เนื่องจากแหนแดงเป็นพืชที่เจริญเติบโตเร็ว ดังนั้นการเลี้ยงแหนแดง จึงต้องเอาใจใส่ดูแล เพราะเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะต้องมีการเก็บออกหรือนำไปใช้ทำประโยชน์อย่างอื่นมิฉะนั้นมันจะตาย จึงเป็นจุดอ่อนประการหนึ่งที่เป็นอุปสรรคต่อการเก็บรักษาแหนแดงไว้ใช้ในฤดูการทำนาต่อไป เพราะถ้าเกษตรกรขาดการเอาใจใส่แหนแดงก็อาจตายและสูญหายไปได้ แหนแดงเป็นพืชที่สามารถผลิตสปอร์เพื่อการขยายพันธุ์ได้ แต่จนกระทั่งบัดนี้ยังไม่มีรายงานว่ามีการใช้สปอร์แหนแดงเพื่อการขยายพันธุ์ได้สำเร็จ การศึกษาทางด้านชีววิทยาของการเกิดสปอร์ในแหนแดง ได้มีผู้ทำการศึกษามาบ้างแล้ว (Lucas and Duckett 1980, Calvert *et al.* 1983, Campbell 1983, Zhiyan 1983, Konar and Kapoor 1974, Fowler 1975, Fowler and Stenntt-Willson 1978) และชี้ให้เห็นว่ามีทางเป็นไปได้ที่จะมีการขยายพันธุ์แหนแดงทางสปอร์ (Kona and Kapoor 1974)

แหนแดงสามารถผลิตสปอร์ 2 ชนิด (เพศผู้และเพศเมีย) ในต้นเดียวกันแต่อยู่คนละส่วน (Fig. 1a) กระเปาะสปอร์เพศผู้ (Fig. 1a, b) มีขนาดใหญ่กว่าสปอร์เพศเมีย (Fig. 1a) กระเปาะประกอบด้วยสปอร์เป็นจำนวนมาก (Fig. 1c) และในหนึ่งกระเปาะสปอร์ประกอบด้วย กลุ่มสปอร์เล็กเรียกว่า massulae อีกประมาณ 3-10 กลุ่ม (Fig. 1d) ขึ้นอยู่กับชนิดของแหนแดง

ทั้งสปอร์เพศผู้และเพศเมียจะงอกเป็น gametophytes ซึ่งส่วนหนึ่งจะเป็นไข่ และ อสุจิ การผสมกันระหว่างไข่และอสุจิจะทำให้เกิดเป็น ไซโกต (Zygote) ซึ่งต่อมาจะพัฒนาเป็นต้นแหนแดงขนาดเล็ก (Fig. 2)

การงอกของสปอร์ (germination) ในที่นี้หมายถึง การพัฒนาของสปอร์เพศเมีย คือ gametophyte ซึ่งจะสังเกตได้จาก floats เริ่มกางออก (Fig. 3a G) การเจริญพันธุ์ (fertilization) คือขบวนการผสมพันธุ์ระหว่างไข่ของสปอร์เพศเมียและอสุจิของสปอร์เพศผู้ ซึ่งสังเกตได้จากการเกิดเป็นต้นเล็ก ๆ (Fig.3b) การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์จะสังเกตได้จากหมวกของสปอร์เพศเมียหลุดออก (Fig.3b,F) และต่อจากนั้นแหนแดงอ่อนจะเริ่มแตกกิ่งก้านเพื่อพัฒนาเป็นต้นเต็มวัย (Fig.3f) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาหาวิธีการต่าง ๆ เพื่อที่จะทำการขยายพันธุ์แหนแดงโดยการใช้สปอร์ เพื่อที่จะได้แนะนำให้เกษตรกรใช้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนงานวิจัย

ได้วางแผนการวิจัยแบบ factorial in randomized block ใน split plot design มี 4 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีหลักคือ วิธีการเก็บสปอร์และมีวิธีการทดลองประกอบด้วย 3 x 4 factorial ของอาหารเพาะสปอร์ 3 สูตร คือ น้ำ IRRI IRRI + N และความเข้มข้นของวุ้น 4 ระดับ คือ 0, 0.2, 0.5 และ 1.0%

วิธีการเก็บสปอร์

การศึกษาครั้งนี้เก็บสปอร์ของแหนแดง, *A. microphylla* 3 วิธี คือ

1) เก็บสปอร์สดจากต้นแหนแดงสด ให้ชื่อว่า "fresh spores"
2) เก็บสปอร์จากต้นแหนตากแดดแห้งสนิท ให้ชื่อว่า "dry spores"
3) เก็บสปอร์จากต้นแหนแดงหมักไว้ 2 เดือน ให้ชื่อว่า "compost spores"

วิธีการแยกสปอร์ออกจากต้นแหนแดงทั้ง 3 วิธีนั้น กระทำเช่นเดียวกันคือนำเอาต้นแหนแดงมาใส่ในเครื่องปั่นขนาด 2 ลิตร ปั่นที่ความเร็ว 90 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านตะแกรงร่อนขนาดต่าง ๆ จากขนาดรูห่างไปหาถี่ คือ 2830, 1000, 710, 500, 315 และ 250 ไมครอน ตามลำดับ สปอร์ส่วนใหญ่จะพบอยู่ในตะแกรงขนาดของรู 710 และ 500 ไมครอน ดังนั้นจึงใช้วัสดุที่เหลืออยู่ในตะแกรงขนาด 710 และ 500 ไปทำการแยกเอาสปอร์ออกโดยใช้กล้องจุลทัศน์สเตอริโอ สปอร์ที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำไปใช้ทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้อาหาร 3 ชนิด ได้แก่

1) น้ำ
2) สูตรของ IRRI (Peter *et al.* 1980)
3) สูตร IRRI + 0.5 M NH_4Cl 5 ml ต่อลิตร

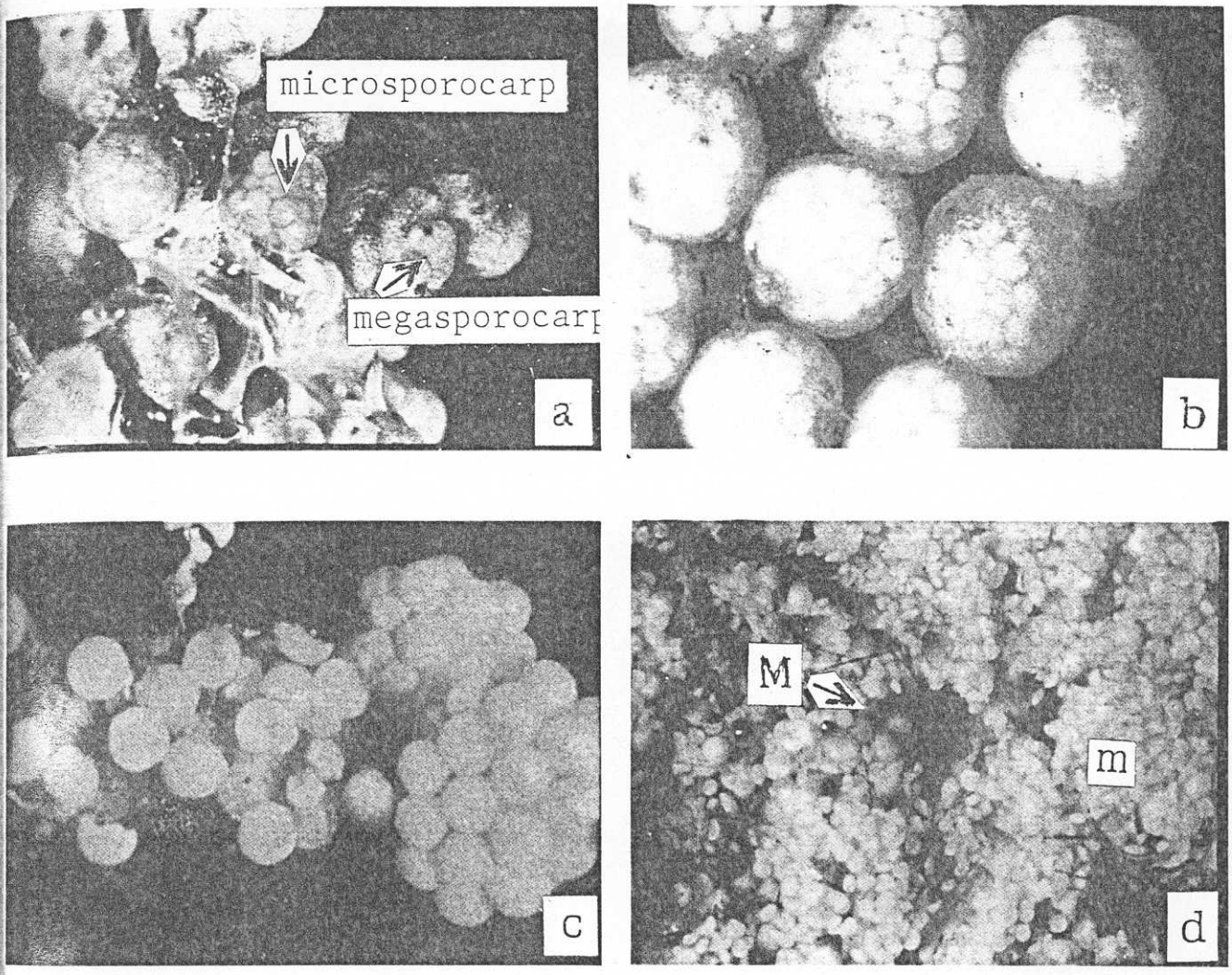

Fig. 1 Sporocarps formation in Azolla

a. sporophyte with megasporocarps and microsporocarps

b. detached microsporocarps

c. microsporangia

d. massulae (m) and megaspores (M)

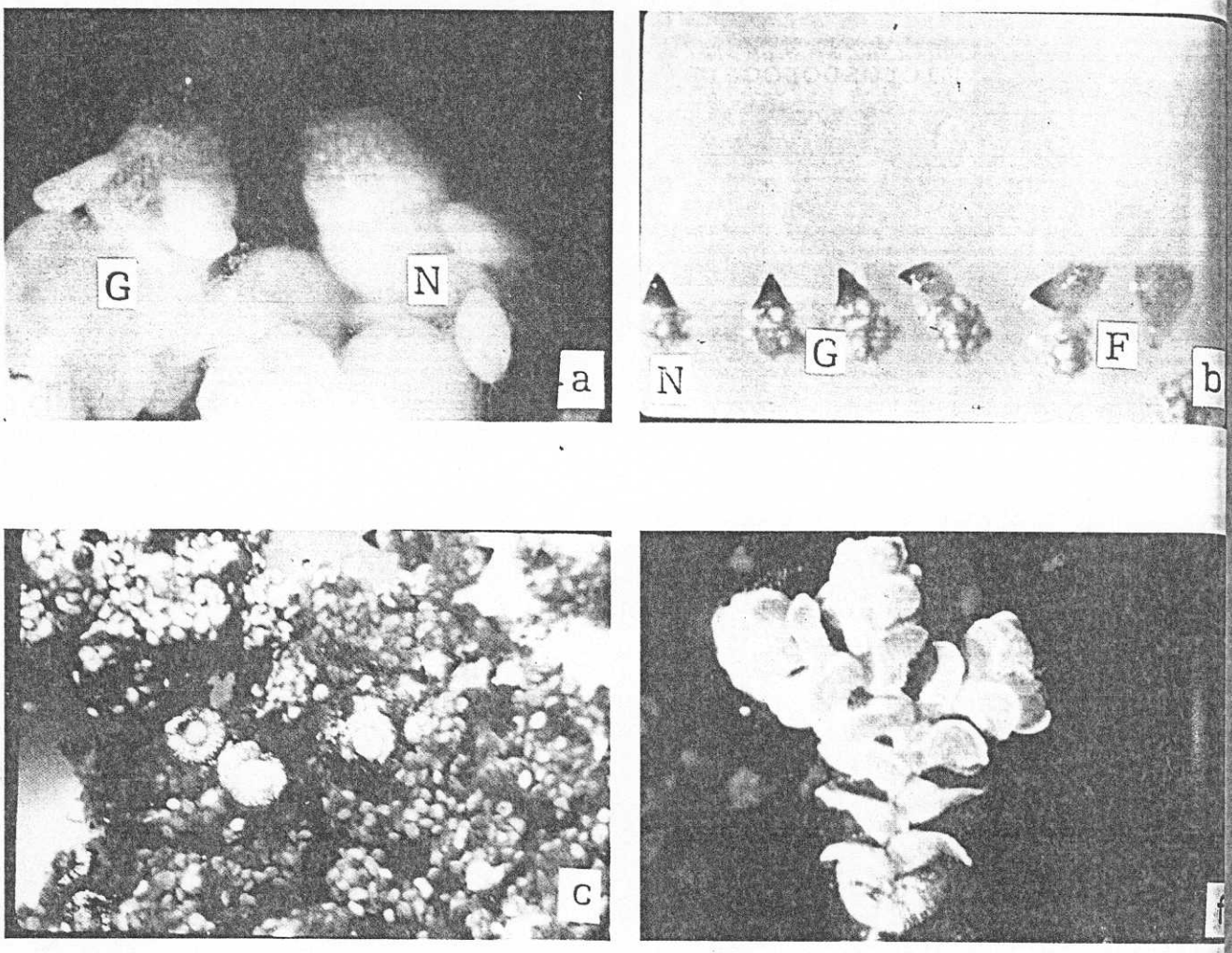

Fig. 3 Germination and fertilization of Azolla spores

a. comparing germinated (G) and nongerminated (N) megaspores

b. steps of germination (G) and fertilization (F)

c. showing young sporophytes with nongerminated spores

d. mature sporophyte

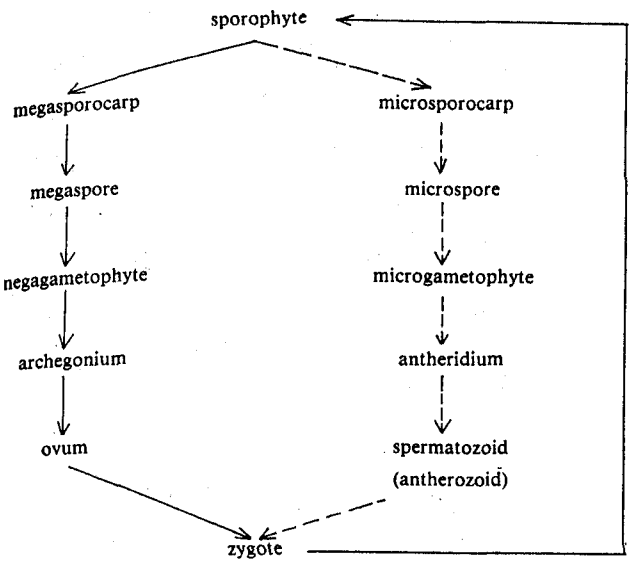

Fig. 2 A scheme of sporophyte progapation through sporocarps.

ในอาหารเพาะสปอร์แต่ละชนิด ใส่วุ้นในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 4 ความเข้มข้น คือ 0, 0.2, 0.5 และ 1.0%

วิธีเพาะสปอร์

ทำการเพาะสปอร์แหนแดงบนเพลทแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ที่บรรจุอาหารเพาะเชื้อสูตรต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว โดยใส่สปอร์เพศเมีย 50 สปอร์ต่อเพลท พร้อมด้วย massulae ที่ติดอยู่ แล้วนำเพลทบรรจุสปอร์นี้ไปวางไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 25° - 30°C ภายใต้แสง 40 ME/m^2/s โดยได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน นับการงอกของสปอร์เพศเมียหลังจากการเพาะแล้ว 10 วัน โดยดูจากการเปิดของ floats ถ้าพบ floats เปิด ให้นับว่างอก การตรวจอัตราการเจริญพันธุ์ (fertilization) นั้น ทำการตรวจในระยะเวลาประมาณ 15-20 วัน หลังจากเพาะ โดยนับต้นที่งอกมาจากสปอร์เพศเมีย

ผลการทดลองและวิจารณ์

อัตราการงอกและการเจริญพันธุ์

การงอกของสปอร์เพศเมียที่เก็บมาจากแหนแดงสดบนอาหารเพาะชนิดต่าง ๆ ที่แสดงไว้ใน Table 1 พบว่าการงอกของสปอร์บนอาหารเพาะเชื้อสูตรของ IRRI ที่ไม่มีวุ้นและมีวุ้นในอัตราต่าง ๆ สูงกว่าการเพาะบนสูตรของ IRRI ที่มีไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าจากการงอกของสปอร์ที่เพาะบนวุ้นอย่างเดียวที่มีความเข้มข้น 0.2% ให้ผลดีเท่ากับสูตรของ IRRI และพบว่าการเพาะบนอาหารสูตรของ IRRI กับ 0.2% วุ้น ให้ความงอกสูงสุดถึง 49.2% ผลของการเจริญพันธุ์พบว่า ให้ผลทำนองเดียวกันกับการงอกบนอาหารเพาะสปอร์ต่าง ๆ แต่ให้เปอร์เซนต์ค่อนข้างต่ำ การที่มีการเจริญพันธุ์ต่ำอาจจะเป็นเพราะว่าการเกิดอสุจิจากสปอร์เพศผู้ช้าไป จึงทำให้การเจริญพันธุ์ไม่เกิด (Table 1)

สปอร์ที่เก็บมาจากต้นแห้งพบว่ามีความงอกต่ำมาก (Table 2) ความงอกสูงสุดพบเพียง 8% เท่านั้น สาเหตุที่มีความงอกต่ำอาจจะเป็นเพราะว่า สปอร์มีความชื้นต่ำ มีความตึงผิวสูงเนื่องจากความแห้งจึงทำให้น้ำเข้าไปได้ยาก จึงไม่มีการกระตุ้นให้พ้นจากสภาพการพักตัว Konkar and Kapoor (1974) ได้รายงานว่าสปอร์แหนแดงพันธุ์ *A. pinnata* มีสภาพการพักตัวนาน 5 ถึง 6 เดือน

การงอกและการเจริญพันธุ์ของสปอร์แหนแดงที่เก็บมาจากการหมักแหนแดง 2 เดือน พบว่ามีความงอกดีมาก (Table 3) พบมีความงอกสูงสุดถึง 92.0% ในขณะที่ความงอกต่ำสุดมีถึง 61.4% การผสมวุ้นลงไป 0.2% ในอาหารเพาะสปอร์ทุกสูตร พบว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจมาก ฉะนั้นการหมักสปอร์เพียง 2 เดือนจึงเป็นการเพียงพอที่จะตัดวงจรการพักตัวของสปอร์

การเปรียบเทียบการเจริญพันธุ์ของสปอร์ที่เก็บมาจาก 3 วิธีบนอาหารเพาะสปอร์ได้แสดงใน Fig. 4 พบว่าสปอร์ที่เก็บมาจากการหมักให้การเจริญพันธุ์สูงในอาหารเพาะสปอร์ทุกชนิดและสูงกว่าจากการเก็บทุกวิธี แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าสูตรอาหารเพาะเชื้อทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันในด้านให้ความงอกของสปอร์ แต่ก็พบว่าสูตร IRRI ที่ผสมไนโตรเจนมีเชื้อราและสาหร่ายขึ้นเมื่อเก็บไว้นาน ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้น้ำผสมวุ้นทำการเพาะสปอร์จะเหมาะสมกว่า

การศึกษาครั้งนี้กับสปอร์แหนแดงไม่พบความแตกต่างระหว่างการใช้น้ำกลั่นเพาะกับสูตร IRRI ซึ่งผสมธาตุอาหารพืชต่าง ๆ ครบทุกตัว ซึ่งไม่สนับสนุนผลงานของ Haupt (1985) ที่พบว่าการใส่ธาตุอาหารต่าง ๆ ในปริมาณต่ำมากสามารถกระตุ้นให้สปอร์ของเฟิร์นหลายชนิดงอกได้ดี ดังนั้นเพื่อความสะดวกจึงแนะนำให้ใช้เพียงน้ำผสมวุ้น 0.2% เพื่อทำการเพาะสปอร์ และควรหมักสปอร์อย่างน้อย 2 เดือนก่อนนำมาทำการเพาะ

Table 1. Germination and fertilization of fresh spores in different media.

Media	Germination[1/] %	Fertilization[1/] %
Water + 0 agar	12.6 def[1/]	8.0 de
Water + 0.2% agar	39.2 ab	20.0 c
Water + 0.5% agar	19.2 de	6.6 de
Water + 1.0% agar	24.0 cd	9.4 de
IRRI + 0 agar	40.0 ab	37.4 a
IRRI + 0.2% agar	49.2 a	30.6 b
IRRI + 0.5% agar	36.0 abc	24.6 bc
IRRI + 1.0% agar	37.2 abc	10.6 c
IRRI + N + 0 agar	15.2 def	2.6 de
IRRI + N + 0.2% agar	6.0 df	0 e
IRRI + N + 0.5% agar	1.2 f	0.6 e
IRRI + N + 1.0% agar	5.2 ef	0.6 e
CV (%)	25.2	29.1

Table 2. Germination and fertilization of dry spores in different media.

Media	Germination[1/] %	Fertilization[1/] %
Water + 0 agar	7.2	4.0
Water + 0.2% agar	7.2	6.6
Water + 0.5% agar	8.0	4.6
Water + 1.0% agar	7.2	3.2
IRRI + 0 agar	6.0	5.2
IRRI + 0.2% agar	7.2	6.0
IRRI + 0.5% agar	5.2	4.6
IRRI + 1.0% agar	4.0	3.2
IRRI + N + 0 agar	0.6	0
IRRI + N + 0.2% agar	3.2	3.2
IRRI + N + 0.5% agar	2.6	2.6
IRRI + N + 1.0% agar	4.0	0.6
CV (%)	77.5	88.0

1/ Means in a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

ผลการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า ประสบผลสำเ
เป็นอย่างมากเพราะสามารถพบวิธีการเพาะสปอร์แหนแดง
กระทั่งงอกและเจริญเติบโตเป็นต้นได้ และเป็นงานชิ้นแ
ที่ประสบผลสำเร็จในเรื่องนี้โดยผ่านการวิจัยที่สมบูรณ์ ควา
สำเร็จครั้งนี้ สามารถทำให้งานวิจัยแหนแดงสามารถก้าว
ได้อีกมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการแก้ปัญหาเรื่องการเ
รักษาพันธุ์แหนแดงเพื่อใช้ในการศึกษาทางด้านการปรับปรุงพั
ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการศึกษากันอย่างต่อเนื่อง ตลอดจนการผ
ข้ามพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ในการนำไปใช้ในสภาวะแวดล้
ต่าง ๆ และที่สำคัญที่สุด คือการทำให้เกษตรกรได้รับคว
สะดวก การใช้ในการขยายพันธุ์จากสปอร์แทนการใช้ต้น การ
ต้นนั้นเกษตรกรจะต้องใช้เป็นจำนวนมาก และเสี่ยงต่อการต
สูงมากเนื่องจากการบอบช้ำจากการขนส่งและที่สำคัญคือก
เก็บข้ามฤดูเพื่อใช้ปลูกในฤดูต่อไป ซึ่งไม่สามารถเก็บได้
สภาพของต้น แต่สามารถเก็บได้ในสภาพสปอร์

Table 3. Germination and fertilization of composted spores in differ media.

Media	Germination[1/] %	Fertilization[1/] %
Water + 0 agar	78.0 bc[1/]	58.7 de
Water + 0.2% agar	87.4 a	83.3 a
Water + 0.5% agar	84.6 ab	82.7 a
Water + 1.0% agar	77.4 c	72.7 c
IRRI + 0 agar	75.4 c	74.7 bc
IRRI + 0.2% agar	84.6 ab	81.3 ab
IRRI + 0.5% agar	86.6 a	83.3 a
IRRI + 1.0% agar	90.0 a	86.7 a
IRRI + N + 0 agar	78.0 bc	71.3 c
IRRI + N + 0.2% agar	92.0 a	85.3 a
IRRI + N + 0.5% agar	72.6 c	58.0 d
IRRI + N + 1.0% agar	61.4 d	34.7 e
CV (%)	9.87	11.10

1/ Means in a column followed by the same letter are not significan different at the 5% level.

พันธุ์แหนแดงเพื่อใช้ในการศึกษาทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการศึกษา ตลอดจนการผสมข้ามพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ในการนำไปใช้ในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ และที่สำคัญที่สุด คือการทำให้เกษตรกรได้รับความสะดวก การใช้ในการขยายพันธุ์จากสปอร์แทนการใช้ต้น การใช้ต้นนั้นเกษตรกรจะต้องใช้เป็นจำนวนมาก และเสี่ยงต่อการตายสูงมากเนื่องจากการบอบช้ำจากการขนส่งและที่สำคัญคือการเก็บข้ามฤดูเพื่อใช้ปลูกในฤดูต่อไป ซึ่งไม่สามารถเก็บได้ในสภาพของต้น แต่สามารถเก็บได้ในสภาพสปอร์

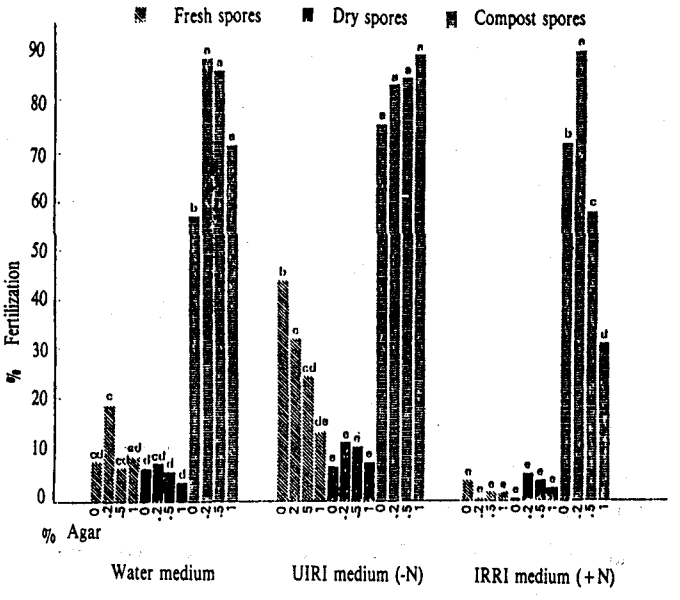

Fig. 4 Fertilization of *Azolla* spores in three media

เอกสารอ้างอิง

นันทกร บุญเกิด ประยูร สวัสดี และออมทรัพย์ นพอมรบดี. 2534. การใช้จุลินทรีย์ดินเพื่อการบำรุงดิน ใน: เอกสารวิชาการประจำปี 2534 กรมวิชาการเกษตร. หน้า 211-242

Calvert, H.E., S.K. Perkins and G.A. Peters. 1983. Sporocarp structure in the heterosporous water fern *Azolla mexicana*. *Presl. scanning electron Microse.* III: 1499-1510.

Cambel, D.H. 1983. On the development of *Azolla filiculoides*. *Lam.* Amn. Bot. 7: 155-187.

Fowler, L. 1975. Megaspores and massulae of *Azolla prisca* from the Isle of Wight. *Palaeontology 18: 483-507.*

Fowler, K. and J. Stennett-Willson. 1978. Sporoderm architecture in modern form Azolla. Fern Gas. 11 : 405-412.

Haupt, W. 1985.Effects of nutrients and light pretreatment of phytochrome-mediated fern-spore germination. *Planta. 164: 63-86.*

Kona, R.N. and P.K. Kapoor. 1974. Embriology of Azolla pinnata. Phytomorphology 24: 228-267.

Lucas, R.C. and J.G. Duckett. 1980. A cytological study of the male and female sporocarps of the heterosporous fern *Azolla filiculoides* Lam. *New Phytol.* 85: 409-418.

Lumpkin, J.A. and D.L. Plucknett. 1982. History. *In Azolla as a Green Manure: Use and Management in Crop Production, Westview Press, Colorado. P. 5-14.*

Peter, G.A., T.B. Ray, B.C. Wyne and R.E. Toia Jr. 1980. Azolla Anabaena association: Morphological and physiological studies, *In* eds W.E. Newton and W.H. Orme Johnson. Nitrogen Fixation. Vol. II. University Park Press, Baltimore. P. 293-309.

Zhiyan, Z. 1983. Quaternary record of *Azolla pinnata from China and its sporoderm ultrastructure. Rev. Paleobot. Palynol.* 39: 109-129.