

การเปรียบเทียบสัณฐานวิทยา และการเจริญเติบโตของแหนแดง Comparative study of the morphology and growth of *Azolla*

สุรางค์รัตน์ พันแสง^{1*} และ พวงผกา แก้วกรม¹

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

*Email: surangrat.pun@pcru.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสัณฐานวิทยา และการเจริญเติบโตของแหนแดง โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาผ่านกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เก็บตัวอย่างแหนแดง (*Azolla*) จากมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ (AZ-1) และวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ (AZ-2) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยพิจารณาจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ปกติ (vegetative cell) และขนใบ (epidermal trichomes) พบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์จัดอยู่ใน section *Azolla* แหนแดงใน section นี้ ใบที่กำลังเจริญจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 เซนติเมตร เจริญเติบโตในแนวนอน สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของแหนแดง พบว่าระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 มีผลต่อการเจริญของแหนแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แหนแดงให้ผลผลิตมากที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 0.5 กรัม/กระถาง ในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคิดเป็นผลผลิตของน้ำหนักแห้ง 0.95 กรัม/ตารางเมตร อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ 0.12 ต่อวัน การวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมดของแหนแดงจะมีค่าอยู่ในช่วง 2.92-3.73% จากผลการวิเคราะห์พบว่า สายพันธุ์ AZ-2 มีค่าไนโตรเจนทั้งหมดสูงที่สุด จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าแหนแดงสายพันธุ์ AZ-2 เป็นสายพันธุ์ที่ดี ใช้เป็นปุ๋ยในนาข้าวสามารถเพิ่มผลผลิตได้

คำสำคัญ: สัณฐานวิทยา, การเจริญเติบโต, แหนแดง

Abstract

This study aimed to comparative study of the morphology and growth of *Azolla* by observing their morphology through stereo microscope and scanning electron microscope (SEM) analysis. Two isolated of *Azolla* were collected from Phetchabun Rajabhat University (AZ-1) and Wat Dao Ruang, Na Pa, Mueang Phetchabun District, Phetchabun (AZ-2). The morphological study which was based on diameter of vegetative cell and epidermal trichomes found that the two isolated was classified in *Azolla* section. *Azolla* in this section, diameter of leaves was ranged from 1-3 cm and grow horizontally. The growth of *Azolla*, showed that the concentration of K_2HPO_4 affected on the growth of *Azolla* had significantly different at the statistical level of 95%. At K_2HPO_4 0.5 g/pot at the third week of cultivation, *Azolla* was reported as the highest growth with dry weight at 0.95 g/m² and the relative growth rate at 0.12 d⁻¹. The total nitrogen content of *Azolla* was range from 2.92 - 3.73%. The results showed that strain AZ-2 had the

highest total nitrogen concentration. From this experiment concluded that *Azolla* species AZ-2 was a good type. Which can be used as bio-fertilizer in paddy fields to increase rice yields.

Keywords: morphology, growth, *Azolla*

1. บทนำ

ประชากรมนุษย์จะเพิ่มขึ้นเป็น 9 พันล้านคนภายในปี 2050 นอกจากนี้ความมั่งคั่งที่เพิ่มขึ้นจะสร้างความต้องการที่มากขึ้นสำหรับเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากนม [1] การผลิตโปรตีนจากพืชจึงมีผลต่ออุปทานอาหารทั่วโลก แหนแดง (*Azolla*) เป็นพืชทดแทนสำหรับการผลิตอาหารโปรตีน ปัจจุบันทั่วโลกประกอบด้วย 7 สายพันธุ์ [2] แหนแดงมีอัตราการเติบโตสัมพัทธ์สูง (RGRs) เมื่อเจริญเติบโตอย่างอิสระบนผิวน้ำ เช่น ไม่ต้องแย่งแสง อัตราการเติบโตสัมพัทธ์มากกว่า 0.5 ต่อวัน หรือชีวมวลเพิ่มขึ้นสองเท่าในเวลาน้อยกว่า 2 วัน [3] ลักษณะเฉพาะของแหนแดง คือ ในใบมีไซยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่โดยดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันกับแหนแดง แบบพึ่งพาอาศัยกัน สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ในใบของแหนแดงมีโพรงขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นที่อาศัยของไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียได้รับอาหารจากแหนแดง ส่วนแหนแดงจะได้นิโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ความสัมพันธ์นี้ทำให้แหนแดงกลายเป็นปุ๋ยพืชสดที่สำคัญ การตรึงไนโตรเจนโดย *Nostoc azollae* 0.15-0.17 mg N h⁻¹ ต่อกรัมของชีวมวลแห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *Rhizobia* ที่อาศัยในปมรากถั่ว (*Glycine max*) [4] เนื่องจากการเจริญเติบโตสูงและอัตราการตรึงไนโตรเจน ส่งผลให้แหนแดงถูกนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าวในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มาเป็นเวลาหลายศตวรรษ การใช้แหนแดงเป็นปุ๋ยชีวภาพช่วยเพิ่มความยั่งยืนของการปลูกข้าวโดยการลดความต้องการปุ๋ยรวมไปถึงลดการปล่อยก๊าซไนโตรเจนและก๊าซเรือนกระจก (GSG) จากนาข้าว [5] นอกจากนี้ยังสามารถลดการเจริญเติบโตของวัชพืชนาข้าวได้เป็นอย่างดี ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของแหนแดง เพื่อเป็นทางเลือกให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ในระบบเกษตรพอเพียงต่อไป

2. วิธีการทดลอง/วิธีการวิจัย

คัดเลือกแหนแดงที่มีลักษณะแตกต่างกันจากแหล่งน้ำในพื้นที่ อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ (ตารางที่ 1) นำแหนแดงที่ได้มาล้างน้ำเบา ๆ ในน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม สำหรับการนำมาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตารางที่ 1 สายพันธุ์แหนแดงที่คัดเลือกมาใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์	แหล่งที่เก็บ
Azolla1 (AZ-1)	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์
Azolla2 (AZ-2)	คลองวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์

2.1 การจำแนกแหนแดงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1.1 การศึกษาลักษณะโครงสร้างของ vegetative โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำตัวอย่างใบของแหนแดงที่คัดเลือกได้มาแช่ใน glutaraldehyde 2.0% ใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 ทิ้งไว้ค้างคืนเพื่อทำการตรึงตัวอย่างให้คงอยู่ในสภาพเดิม นำมาล้างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 10-15 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน osmium tetroxide 1% เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำมาทำการดองน้ำออกอย่างช้า ๆ ด้วยการล้างด้วยเอทานอล 30, 50, 70, 90, 95 และ 100% เป็นเวลา 10-15 นาที ชุดละ 2 ครั้ง ตัวอย่างที่

ได้จะนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง critical point dryer จากนั้นนำตัวอย่างไปหุ้มด้วยทองด้วยเครื่อง ion sputter นำตัวอย่างที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 85, 100, 120, 200 และ 800 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่เหมือนหรือแตกต่างกันของเห็ดนางแดงแต่ละสายพันธุ์

2.1.2 การวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด

นำตัวอย่างเห็ดนางแดงไปอบที่ 70 °C เป็นเวลา 24 ชม. บดตัวอย่างให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม บันทึกรหัสที่แน่นอน ลงในหลอด Kjeldahl และใช้หลอดเปล่า 1 หลอดเป็น sample blank เติม mixed catalyst (ผสม $K_2SO_4 : CuSO_4 \cdot 5H_2O$ อัตราส่วน 100:10) ลงไปประมาณ 5 กรัม เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้นลงไป 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ส่วนผสมทั้งหมดคลุกเคล้ากัน นำไปย่อยใน digestion block ในตู้ดูดควันที่อุณหภูมิ 400 °C ประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีของสารละลายที่ย่อยใสหรือสีขาวขุ่น ทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายกรดบอริก 50 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพูขนาด 125 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น ก่อนเริ่มกลั่นเติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 35% NaOH ลงไป 25 มิลลิลิตร ใช้กรดบอริกจับแก๊สแอมโมเนียที่เกิดขึ้น สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว ได้สารละลายที่กลั่นแล้ว นำกรดบอริกที่ได้ไปไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 M HCl กระทั่งสีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีชมพูเทียบกับ blank

2.2 สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดนางแดง

นำเห็ดนางแดงจากตารางที่ 1 มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในกระถางที่มีความสูง 20 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ที่มีอาหารเหลว N-free medium (ตารางที่ 2) ควบคุมสภาพแวดล้อม

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ประกอบด้วย

ชุดการทดลองที่ 1 : AZ-1

T1 = ชุดควบคุม (control)

T2 = K_2HPO_4 อัตรา 0.5 กรัม/กระถาง

T3 = K_2HPO_4 อัตรา 1.0 กรัม/กระถาง

T4 = K_2HPO_4 อัตรา 1.5 กรัม/กระถาง

T5 = K_2HPO_4 อัตรา 2.0 กรัม/กระถาง

ชุดการทดลองที่ 2 : AZ-2

T6 = ชุดควบคุม (control)

T7 = K_2HPO_4 อัตรา 0.5 กรัม/กระถาง

T8 = K_2HPO_4 อัตรา 1.0 กรัม/กระถาง

T9 = K_2HPO_4 อัตรา 1.5 กรัม/กระถาง

T10 = K_2HPO_4 อัตรา 2.0 กรัม/กระถาง

ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมปกติ โดยใช้เห็ดนางแดงเริ่มต้น 3 กรัม/กระถาง และใส่ปุ๋ยฟอสเฟตทุก ๆ 7 วัน วัดการเจริญเติบโตทุก 7 วัน ในช่วงเวลา 10.00 น. โดยใช้กระชอนตักเห็ดนางแดงในแต่ละหน่วยทดลองขึ้นจากกระถาง พักไว้เป็นเวลา 15 นาที นำเห็ดนางแดงไปชั่งน้ำหนักสด บันทึกข้อมูล ทำการบันทึกน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของเห็ดนางแดง โดยการหา doubling time

$$\text{doubling time} = \ln 2 / \text{RGR}$$

$$\text{RGR (Relative growth rate)} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t - 1)$$

W_1 = น้ำหนักเริ่มต้น

W_2 = น้ำหนักสุดท้าย

t = จำนวนวันที่ใช้ในการเลี้ยง [6]

ตารางที่ 2 การเตรียม stock ของอาหารเหลว N-free medium

Stock solution	สารเคมี	ความเข้มข้น (กรัมลิตร)
1	CaCl ₂	55.50
2	MgSO ₄ . 7H ₂ O	49.50
3	KCl	37.50
4	KH ₂ PO ₄	13.60
5	FeEDTA.Na	30.00
6	Micro nutrient	
	H ₃ BO ₃	2.86
	MnCl.4H ₂ O	1.81
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.22
	CoCl .6H ₂ O	0.10
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.08
	MnO ₃	0.02

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

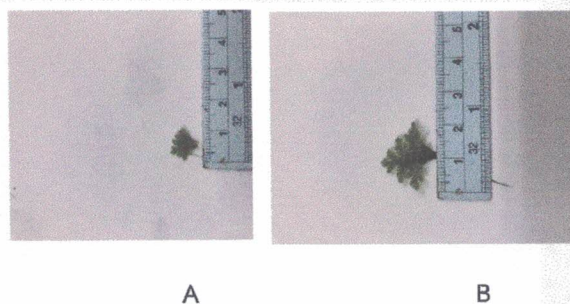
3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดนางฟ้า

เห็ดนางฟ้าทุกสายพันธุ์คัดเลือกจากมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ และคลองวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ในการจำแนกสายพันธุ์เห็ดนางฟ้านี้ จะทำการเลี้ยงเห็ดนางฟ้าในสารละลายอาหาร N-free medium ภายใต้สภาพโรงเรือน ในการศึกษาขั้นแรกทำเมื่อเห็ดนางฟ้าอายุได้ 14 วัน โดยจะนำมาศึกษาลักษณะโครงสร้างทาง vegetative ภายใต้กล้องถ่ายภาพ ดังภาพที่ 1 ตารางที่ 3 โดยสายพันธุ์ AZ-1 และ AZ-2 ต้นเห็ดนางฟ้าจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร และ 2.2 เซนติเมตรความยาว 0.6 และ 1.5 เซนติเมตร ตามลำดับ และกล้องจุลทรรศน์ stereo ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างเบื้องต้นจำแนกได้ว่าเห็ดนางฟ้าทั้ง 2 สายพันธุ์จัดอยู่ใน section *Azolla* (ประกอบด้วยสายพันธุ์ *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* และ *A. rubra*) ตาม tentative identification key [7] เห็ดนางฟ้าใน section นี้ ใบที่กำลังเจริญจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 เซนติเมตร เจริญเติบโตในแนวนอน การวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมดของเห็ดนางฟ้า (ตารางที่ 3) จะมีค่าอยู่ในช่วง 2.92-3.73% สายพันธุ์ AZ-2 มีค่าไนโตรเจนทั้งหมดสูงที่สุด ตามด้วยสายพันธุ์ AZ-1 ซึ่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหลักที่ช่วยเพิ่มผลผลิตในนาข้าว ปริมาณไนโตรเจนในเห็ดนางฟ้าโดยปกติจะมีค่าประมาณ 0.25% ขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ สภาพภูมิอากาศ และเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยง [8] เห็ดนางฟ้าที่ได้รับธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมจะมีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 2.548 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าทุกชุดการทดลอง [9] เนื่องจากเห็ดนางฟ้าดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยกันกับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศโดยการทำงานของเอนไซม์ที่มีธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ ไนโตรเจนที่ถูกตรึงจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนในรูปที่เห็ดนางฟ้าสามารถใช้ได้

ตารางที่ 3 ขนาดของหนวดแดง (เซนติเมตร) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของหนวดแดงแต่ละสายพันธุ์

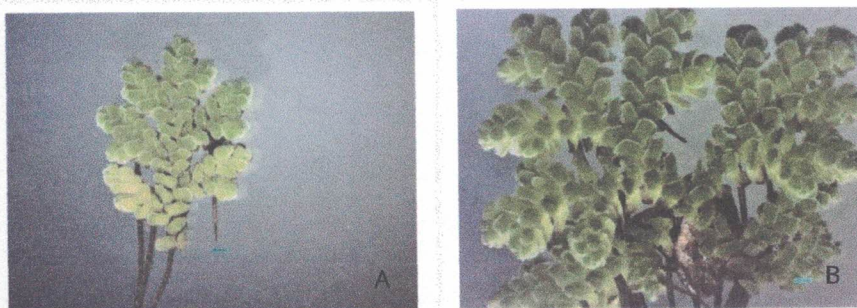
ตัวอย่าง	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ม.ช.)	ยาว (ม.ช.)	% ไนโตรเจนทั้งหมด
AZ-1	1.0	0.6	2.92
AZ-2	2.2	1.5	3.73

ตารางที่ 3 ขนาดของหนวดแดง (เซนติเมตร) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของหนวดแดงแต่ละสายพันธุ์



ภาพที่ 1 ลักษณะทางสรีรวิทยาของโครงสร้าง vegetative ภายใต้กล้องถ่ายภาพ

(A) AZ-1 (B) AZ-2



ภาพที่ 2 ลักษณะทางสรีรวิทยาของโครงสร้าง vegetative ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo (กำลังขยาย 0.66)

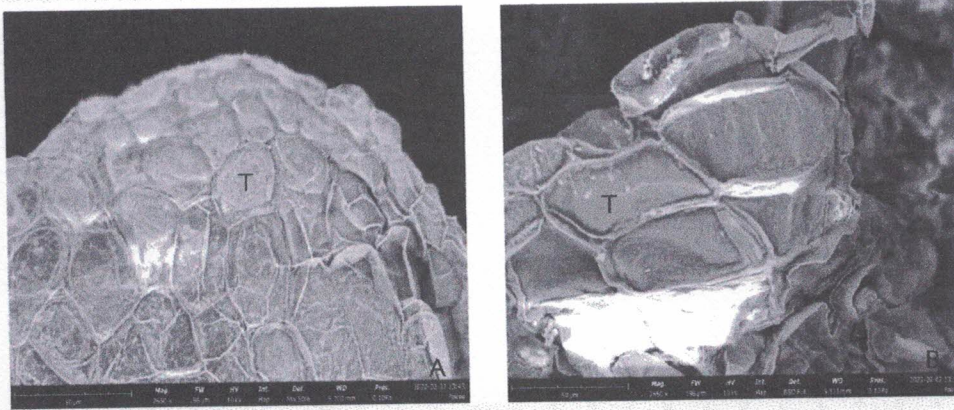
(A) AZ-1 (B) AZ-2

ปี 1976 [10] ได้แนะนำว่าลักษณะบางอย่าง เช่น ชนิดของขนใบ (trichome หรือ epidermal leaf hair) เป็นลักษณะที่สำคัญที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์หนวดแดง จึงมีความจำเป็นจะต้องศึกษาลักษณะขนใบซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง vegetative โดยสังเกตความแตกต่างของขนใบในแต่ละสายพันธุ์ด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ดังภาพที่ 3 โดยลักษณะขนใบของสายพันธุ์ AZ-1 จะมีรูปร่างค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30-40 ไมโครเมตร สายพันธุ์ AZ-2 มีรูปร่างเป็นวงรี กว้างประมาณ 20 ไมโครเมตร ยาว 50 ไมโครเมตร โดยพบว่าทั้งสองสายพันธุ์ขนใบ มีลักษณะเรียงตัวกันเป็นแถวในแนวตั้ง พบขนใบ 1 เซลล์หรือมากกว่า

จากการจำแนกของ [11] เซลล์ขนใบเป็นส่วนหนึ่งที่ใช้สำหรับจำแนกสายพันธุ์ของหนวดแดง โครงสร้างของเซลล์ขนใบประกอบด้วย 2 เซลล์ คือ ก้านเซลล์ (pedicel cell) และส่วนปลายหรือยอดของขนใบ (apical trichome cell) แต่เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของ vegetative บางส่วนในแต่ละสายพันธุ์ยังมีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงควรมีการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของหนวดแดง (sporocarp)

จากการศึกษาของ [12] นอกจากไตรโคมของใบและกายวิภาคศาสตร์ของรากแล้วคุณลักษณะของ vegetative ก็ไม่
มีประโยชน์ ควรมีการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง glochidial septation โครงสร้างของ
สปอร์ และโครงสร้างอื่น ๆ ร่วมด้วย สำหรับใช้ในการจัดจำแนกอนุกรมวิธานของแหนแดงร่วมด้วย

[8] จำแนกสายพันธุ์แหนแดง 3 สายพันธุ์ (AZ01, AZ02 และ AZ03) โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการ
วิเคราะห์ดีเอ็นเอ พบว่าแหนแดงทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ใน section *Azolla* โดย AZ01 คือ *A. microphylla*, AZ02 คือ *A.*
cristata และ AZ03 คือ *A. filiculoides*



ภาพที่ 3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของขนใบ (epidermal trichomes)

(A) รูปขนใบของ AZ-1 (B) รูปขนใบของ AZ-2

T คือ ปลายหรือยอดของขนใบ (apical trichome cell) กำลังขยาย 2650X

3.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของแหนแดง

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่า ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 มีผลต่อการเจริญของแหนแดงอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แหนแดงสามารถเจริญได้ใน K_2HPO_4 ที่ระดับความเข้มข้นไม่สูง โดยพบว่าแหน
แดงให้ผลผลิตมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 0.5 กรัม ในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคิดเป็นผลผลิตของน้ำหนัก
แห้ง 0.95 กรัม/ตารางเมตร รองลงมา ได้แก่ ชุดการทดลองที่ไม่เติม K_2HPO_4 และที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 1 กรัม
ตามลำดับ จากการศึกษารายงานของ [13] พบว่า แหนแดงเจริญเติบโตเต็มที่ในระยะเวลา 13-15 วันของการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองในภาพที่ 4 พบว่า ในสัปดาห์ที่สองของการเพาะเลี้ยงแหนแดงมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์
(RGR) สูงสุด คือ ที่ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 0.5 กรัม โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ 0.12 ต่อวัน รองลงมา ได้แก่
ที่ชุดการทดลองที่ไม่เติม K_2HPO_4 และที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 1 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 1.5 และ 2.0
กรัม แหนแดงมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่ำ [14] รายงานว่า ธาตุฟอสฟอรัสในรูปฟอสเฟต (PO_4^{2-}) ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่
จำกัดการเจริญเติบโตของแหนแดงเป็นอย่างมาก เนื่องจากฟอสฟอรัสมีบทบาทสำคัญต่อการเร่งการเจริญเติบโตของแหนแดง
โดยหากมีปริมาณฟอสฟอรัสเพียงพอในน้ำที่ใช้เลี้ยงแหนแดง อาจไม่จำเป็นต้องให้ไนโตรเจนทั้งในรูปแอมโมเนียม (NH_4^+) หรือ
ไนเตรต (NO_3^-) ซึ่งยังคงทำให้แหนแดงมีการเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่อง

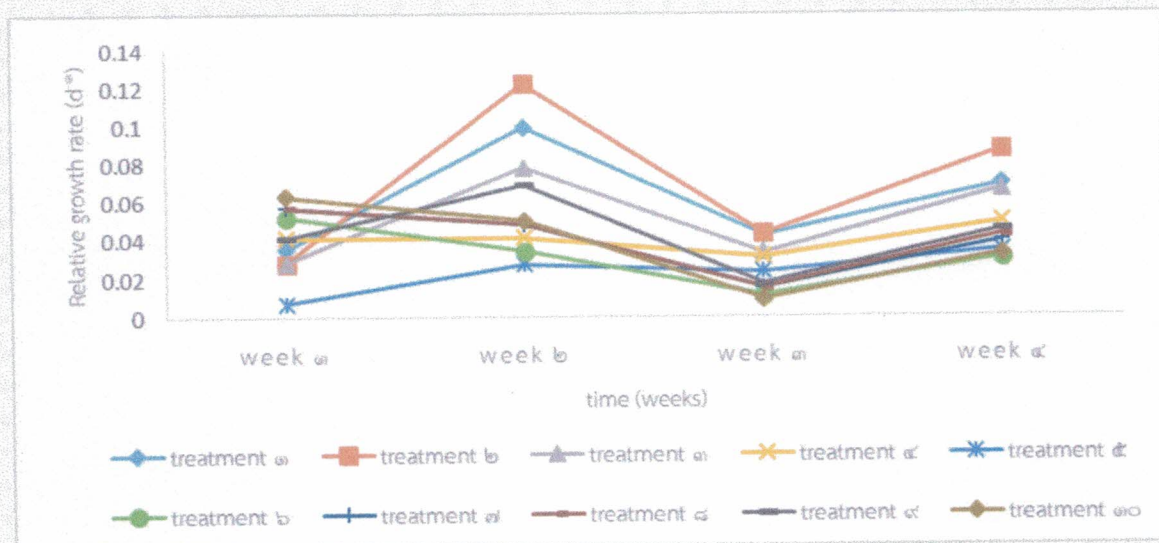
เมื่อแหนแดงได้รับธาตุอาหารหลักทั้งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม รวมถึงธาตุอาหารอื่นๆ จากปุ๋ยคอกทั้ง
2 ชนิด ย่อมทำให้แหนแดงมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการส่งเสริมซึ่งกันและกันของธาตุอาหารที่หลากหลาย
ดังเช่นการศึกษาของ [15] ที่รายงานว่า จุลธาตุอย่างเหล็กและโมลิบดีนัมที่มีอยู่ในมูลโคช่วยเพิ่มความสามารถในการตรึง
ไนโตรเจนจากอากาศให้กับทั้งแหนแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ทำให้แหนแดงมีการสะสมของไนโตรเจนเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4 น้ำหนักแห้งของแทนแดงที่เลี้ยงในอาหารโฮกแลนด์ (Hoagland 's solution) ที่ระดับความเข้มข้นของฟอสเฟตต่าง ๆ กัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

Treatment	Dry Weight (g)			
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
1	0.23±0.01 ^{cd}	0.46±0.01 ^b	0.83±0.02 ^b	0.99±0.03 ^b
2	0.22±0.00 ^d	0.52±0.01 ^a	0.95±0.00 ^a	1.37±0.03 ^a
3	0.22±0.01 ^e	0.38±0.02 ^e	0.61±0.01 ^c	0.88±0.00 ^c
4	0.24±0.03 ^c	0.32±0.00 ^s	0.50±0.01 ^d	0.68±0.01 ^d
5	0.19±0.00 ^e	0.23±0.00 ^h	0.32±0.02 ^s	0.39±0.01 ^h
6	0.26±0.01 ^b	0.33±0.01 ^f	0.39±0.03 ^f	0.49±0.02 ^s
7	0.27±0.02 ^b	0.38±0.02 ^{de}	0.47±0.00 ^e	0.62±0.02 ^e
8	0.27±0.01 ^b	0.38±0.03 ^e	0.47±0.01 ^e	0.66±0.01 ^d
9	0.24±0.01 ^c	0.39±0.00 ^d	0.50±0.02 ^d	0.62±0.00 ^e
10	0.28±0.02 ^a	0.40±0.03 ^c	0.46±0.03 ^e	0.55±0.02 ^f
F-test	**	**	**	**

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)



ภาพที่ 4 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ของแทนแดงที่ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ต่างกัน

4. บทสรุป

แทนแดงทุกสายพันธุ์คัดเลือกมาจากจากคลองวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ และมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ศึกษาลักษณะโครงสร้างทาง vegetative ภายใต้กล้องถ่ายภาพและกล้องจุลทรรศน์ stereo ซึ่งการสังเกตลักษณะโครงสร้างเบื้องต้นจำแนกได้ว่าแทนแดงทั้ง 2 สายพันธุ์จัดอยู่ใน section *Azolla* ใบที่กำลังเจริญจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 เซนติเมตร เจริญเติบโตในแนวนอน ค่าไนโตรเจนทั้งหมดของแทน

แดงจะมีค่าอยู่ในช่วง 2.92-3.73% และเมื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตของແໜແດງระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 มีผลต่อการเจริญของແໜແດງอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แໜແດງสามารถเจริญได้ใน K_2HPO_4 ที่ระดับความเข้มข้นไม่สูง และในสัปดาห์ที่สองของการเพาะเลี้ยงແໜແດງมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (RGR) สูงสุด คือ ที่ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 0.5 กรัม โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ 0.12 ต่อวัน

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ประเภทโครงการทุนอุดหนุนงานวิจัยที่บูรณาการตามศาสตร์พระราชา สัญญาเลขที่ PCRU_2564_RK002 งบประมาณเงินรายได้ของมหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 ขอขอบพระคุณเจ้าอาวาสวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ สำหรับตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดสอบ งานบริหารการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ในการขอใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการ

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] H.C.J. Godfray, J.R. Beddington, I.R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J.F. Muir et al., Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327(2010)812–818.
- [2] G.M. Wagner, *Azolla*: a review of its biology and utilization. *Bot Rev* 63(1997)1–26.
- [3] K. Maejima, S. Kitoh, E. Uheda and N. Shiomi, Response of 19 *Azolla* strains to a high concentration of ammonium ions. *Plant and Soil*. 234(2001)247-252.
- [4] P. Brouwer, A. Brautigam, V.A. Buijs, A.O.E. Tazelaar et al., Metabolic adaption, a specialized leaf organ structure and vascular responses to diurnal N_2 fixation by *Nostoc azollae* sustain the astonishing productivity of *Azolla* ferns without nitrogen fertilizer. *Front Plant Sci*. 8(2017)442.
- [5] J. Liu, H. Xu, Y. Jiang, K. Zhang, Y. Hu and Z. Zeng, Methane emissions and microbial communities as influenced by dual cropping of *Azolla* along with early rice. *Sci Rep*. 7(2017)40635.
- [6] D.S. Mitchell. The development of excessive populations of aquatic plant. In: *Aquatic Vegetation and Its Use and Control*. UNESCO, Paris, 1974.
- [7] T.A. Lumpkin and D.W. Plucknett. *Azolla as a Green Manure: Use and Management in Crop Production*. Boulder: West View Press, 1982.
- [8] โชคชัย วณภู. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไซยาโนแบคทีเรียกับແໜແດງเพื่อใช้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในนาข้าวอินทรีย์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 2553.
- [9] ภาณุพงศ์ นุ้ยผุด, จารุวัตร จันทรประดิษฐ์ และยุพิน พิมโคตร. ผลของเหล็กและโมลิบดีนัมต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไนโตรเจนของແໜແດງ. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 29, สงขลา, 2562. 896-901.
- [10] A.R.H. Martin, Some structure in *Azolla* megaspores and an anomalous form. *Review of Paleobotany and Palynology*. 12(1976)141.
- [11] T.A. Lumpkin and D.W. Plucknett. *Azolla as a Green Manure: Use and Management in Crop Production*. Boulder: West View Press. 1982.

- [12] D.G. Dunham and K. Fowler. Taxonomy and species recognition in *Azolla* Lam. In Proceeding 1985 *Azolla* utilization International Rice Research Institute, Fuzhou, Fujian, China, 1987, 7-16.
- [13] N. Tokhum, C. Boonthai Iwai. and M. Ta-oun. Wastewater Treatment from Piggery farm by Using *Azolla* microphylla. In Proceedings of the 12th Graduate Research Conference Khon Koen University, Thailand, 2011, 779-783.
- [14] R. Sadeghi, R. Zarkami, K. Sabetrafter and P.V. Damme, A review of some ecological factors affecting the growth of *Azolla* spp. *Caspian Journal of Environment Science*. 11(1)(2013)65-67.
- [15] M. Biswas, S. Parveen, H. Shimozawa and N. Nakagoshi N., Effects of *Azolla* species on weed emergence in a rice paddy ecosystem. *Weed Biology Management*. 5(2005)176-183.