NU Science Journal 2006; 3(1): 95 - 109

สัณฐานวิทยาระยะแกมีโตไฟต์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างในหลอดทดลอง

กัญญารัตน์ มานิตยกุล คงศักดิ์ พร้อมเทพ และอนุพันธ์ กงบังเกิด*

Gametophytic Morphology of *Platycerium holttumii* Jonch. & Hennipm. *in vitro*

Kunyarut Manitayakul, Kongsakdi Promthep and Anupan Kongbangkerd*

หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
จังหวัดพิษณุโลก 65000

*Corresponding author. E-mail: anupank73@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง (*Platycerium holttumii* Jonch. & Hennipm.) ของแกมีโตไฟต์ในช่วงระยะต่างๆ และการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงสปอร์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างในหลอดทดลองบนอาหารสูตรดัดแปลง Miller & Miller (MM) (1961) ผลการศึกษาพบว่า สปอร์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างงอกภายใน 2 สัปดาห์ ต่อมาในสัปดาห์ที่ 5 มีการเจริญเติบโตเป็นโปรโตนีมา (protonema) และเริ่มพัฒนาเป็นโปรทาลัส (prothallus) ในสัปดาห์ที่ 7 และโปรทาลัส จะเจริญเติบโตเต็มที่ (mature prothallus) ในสัปดาห์ที่ 10 ในสัปดาห์ที่ 14 พบอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (antheridium) ต่อมาอีก 2 สัปดาห์ พบอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (archegonium) หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 22 มีการผสมพันธุ์กันของไข่ (egg) กับสเปิร์ม (sperm) และเจริญเติบโตไปเป็นต้นสปอโรไฟต์ ที่อายุประมาณ 26 สัปดาห์

คำสำคัญ : สัณฐานวิทยาระยะแกมีโตไฟต์ เฟินชายผ้าสีดา *In vitro*

Abstract

An investigation of the morphological characters and gametophytic developmental stages of *Platycerium holttumii* Jonch. & Hennipm. *In vitro* were observed. *In vitro* spore culture of *Platycerium holttumii* Jonch. & Hennipm. on Miller & Miller (MM) (1961) medium was also performed and investigated. The results found that spores germinated within 2 weeks. At 5 weeks after germination spore grew up to the protonema stage and developed to prothallus within 7 weeks

and then became mature prothallus after 10 weeks of culture. Antheridium and archegonium could be observed after 14 and 16 weeks of culture, respectively. The fertilization between eggs and sperms was noticed at 22 weeks and the embryo grew into sporophyte after 26 weeks of culture.

Keywords: *Platycerium holttumii* Jonch. & Hennipm., Gametophytic morphology, *In vitro*

บทนำ

เฟินเป็นพันธุ์ไม้ที่มีอยู่ทั่วไปที่เชื่อมโยงระหว่างพืชชั้นต่ำและพืชชั้นสูง ซึ่งแตกต่างจากพืชดอกอย่างเห็นได้ชัด เฟินเป็นพันธุ์ไม้ที่ไม่มีดอก ไม่มีเมล็ดแต่มีลักษณะของราก ต้น และใบที่สวยเช่นเดียวกับพืชมีดอก มีระบบการขยายพันธุ์ด้วยสปอร์ (spore) มีความคงทนต่อภูมิอากาศได้หลายรูปแบบ เฟินมีการกระจายอย่างกว้างขวางสามารถเจริญได้แทบทุกส่วนของโลก ยกเว้นบริเวณที่ปกคลุมด้วยน้ำแข็งอย่างถาวร (Lellinger, 1979) ในเขตร้อนชื้นจะมีเฟินอยู่เป็นจำนวนมากและแบ่งออกได้หลายชนิดตามลักษณะทางภูมิศาสตร์ นิเวศวิทยา ตลอดจนลักษณะการเจริญเติบโตของเฟิน เช่น เฟินที่เป็น อิฟิไฟต์ (epiphytic ferns) เฟินน้ำ (aquatic ferns) และเฟินภูเขา (mountain ferns) เป็นต้น (Holttum, 1954) ชาวยุโรปรู้จักนำเอามาปลูกเลี้ยงและยังนำเฟินหลายชนิดไปพัฒนาโดยการคัดเลือกพันธุ์หรือเพาะพันธุ์จนเกิดเป็นลูกผสมที่กลายพันธุ์ออกไปอย่างมากมาย และปลูกเลี้ยงกันจนกระทั่งเป็นที่ยอมรับแพร่หลายสู่ประชาชนทั่วโลก (Tagawa and Iwastsuki, 1972)

สำหรับในประเทศไทยนั้น เฟินเป็นไม้ประดับที่ได้รับความนิยมจากผู้ปลูกไม้ประดับทั่วไป เฟินสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบไม่ว่าจะเป็นการนำมาประดับเพื่อความสวยงาม และเสริมสร้างบรรยากาศได้เป็นอย่างดี (วิเชษฐ์ ค้าสุวรรณ, 2544) นำมาบริโภค ใช้เป็นยาสมุนไพร ใช้ในงานหัตถกรรม และนำมาทำเป็นเครื่องใช้และเครื่องประดับต่างๆ (อักษร ศรีเปล่ง, 2523) นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญโดยเป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นถึงความสมบูรณ์ของความหลากหลายทางชีวภาพ ในระบบนิเวศ และยังใช้เป็นตัวอย่างและแหล่งอ้างอิงทางชีววิทยาสำหรับการศึกษาวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา เกษตรศาสตร์ อนุกรมวิธาน สัณฐานวิทยา และศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพในสภาพแวดล้อมต่างๆ (สุธีรา ลิมปิพิชัย, 2540)

ปัจจุบันในประเทศไทยพบว่ามีเฟินถูกค้นพบจำนวนมาก และเฟินหลายชนิดมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว จากถิ่นที่อยู่อาศัยจากธรรมชาติจนทำให้เฟินเหล่านี้จัดอยู่ในสถานภาพพืชหายากและมีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ ทั้งนี้เกิดจากการทำลายสภาพป่าธรรมชาติโดยการตัดไม้ทำลายป่า การบุกรุกพื้นที่ป่าเพื่อใช้ในการเกษตร รวมถึงการบุกรุกเข้าไปเก็บและนำออกจากป่าเพื่อการค้า เนื่องจากเฟินมีสภาพการดำรงชีวิตที่ไวต่อแสงต่อน้ำความชื้นและธาตุอาหารต่างๆ สูง จึงทำให้เฟินจำนวนมากเกิด

การสูญพันธุ์ไปจากแนวการแพร่กระจายพันธุ์ที่มีสภาพแวดล้อมที่จำกัด เช่น เฟินในสกุล *Osmunda*, *Cyathea*, *Davallia* และ *Platycerium* เป็นต้น (สุธีรา ลิมปีพิชัย, 2540)

เฟินชายผ้าสีดาหูช้าง (*Platycerium holttumii* Jonch. & Hennipm.) เป็นเฟินประดับที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง พบในประเทศไทยทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีขนาดใหญ่มาก แตกริ้วประดับเป็นสามกิ่งใหญ่ๆ คล้ายเขากวาง ในปัจจุบันนี้ พบว่า เฟินชายผ้าสีดาหูช้างมีปริมาณลดลงมากในธรรมชาติ เนื่องจากถูกลักลอบเก็บไปขาย ประกอบกับสภาพป่าไม้ที่เป็นแหล่งกำเนิดและที่อยู่อาศัยของเฟินกำลังถูกคุกคาม และมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วจากการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งโอกาสที่เฟินจะรอดจนเจริญเติบโตเป็นต้นสปอโรไฟต์จึงเกิดได้ยากยิ่งขึ้น (จารุพันธ์ ทองแถม, 2536) และอาจจะสูญพันธุ์ได้หากไม่มีการอนุรักษ์ ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้เป็นการศึกษาสัณฐานของเฟินโดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาร่วม และการศึกษาพัฒนาการช่วงแกมีโตไฟต์ของเฟินในแต่ละขั้น ตั้งแต่เริ่มงอกจากสปอร์ จนกระทั่งเจริญเป็นต้นแกมีโตไฟต์ที่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (sperm) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (egg) มาผสมกันและพัฒนาไปเป็นต้นสปอโรไฟต์ อันจะเป็นแนวทางช่วยเพิ่มปริมาณเฟินให้มากขึ้นเพื่อที่จะได้ทดแทนเฟินที่กำลังใกล้จะสูญพันธุ์ในสภาพธรรมชาติ และเป็นแนวทางในการอนุรักษ์เฟินชายผ้าสีดาหูช้างให้คงอยู่ต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเพาะสปอร์

นำสปอร์เฟินชายผ้าสีดาหูช้างที่เก็บได้ไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลาประมาณ 5 นาที จากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง แล้วนำสปอร์ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Miller และ Miller (1961) (MM) วางเลี้ยงบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในห้องที่มีแสงสว่าง 8 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาการพัฒนาของเฟิน

นำตัวอย่างของเฟินที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีระยะการพัฒนาต่างๆ วางลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเขี่ยตัวอย่างลงบนสไลด์ และหยดน้ำหล่อเลี้ยงชิ้นตัวอย่าง พร้อมกับปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ สังเกตพัฒนาการของเฟินช่วงแกมีโตไฟต์ในระยะต่างๆ พร้อมบันทึกข้อมูลและถ่ายภาพ

3. การศึกษาสัณฐานวิทยา

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เฟินชายผ้าสีดาหูช้าง โดยวิธีทางไมโครเทคนิค โดยดัดแปลงจากวิธีการของธวัช ดอนสกุล (2534) และศึกษาระยะพัฒนาการต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron

Microscope, SEM) ซึ่งในกระบวนการการเตรียมตัวอย่างของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง ก่อนนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้น ทำได้โดยการ Dehydrate ตัวอย่างของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง ด้วยแอลกอฮอล์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แล้วนำไปเข้าเครื่องทำให้แห้งที่อุณหภูมิวิกฤต (Critical Point Drying, CPD) แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4. การหาเปอร์เซ็นต์การสร้างแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียม

สุ่มตรวจนับแกมีโตไฟต์จำนวน 500 แกมีโตไฟต์ เพื่อดูลักษณะการสร้างและจำนวนของแอนเธอริเดียมและ อาร์คีโกเนียม นับแกมีโตไฟต์ พร้อมบันทึกผลและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสร้างแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมได้จากสูตร $\frac{\text{จำนวนที่พบ}}{\text{จำนวนแกมีโตไฟต์ทั้งหมดที่สุ่มตรวจนับ}} \times 100$

ผลการทดลอง

จากการเพาะสปอร์เฟินชายผ้าสีดาหูช้างโดยวิธีการเพาะเลี้ยงสปอร์ในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร Miller & Miller (1961) พบว่า สปอร์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างใช้เวลาในการงอกเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์หลังจากทำการเพาะเลี้ยง โดยจะมีลักษณะเป็นตุ่มสีเขียวเล็กๆ และจากการเอานำสปอร์ที่งอก ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาพัฒนาการ พบว่า มีการแบ่งเซลล์เป็นเส้นสีเขียวยาวประมาณ 5-6 เซลล์เรียงต่อกัน เกิดลักษณะที่เรียกว่า โปรโตนีมา (Protonema) ในระยะนี้จะสังเกตเห็นไรซอยด์ (Rhizoids) แต่ยังไม่ชัดเจน และยังพบซากของอับสปอร์ที่แตกและ สปอร์ได้กระจายออกมาหมดแล้ว ในสัปดาห์ที่ 4 (รูป 1ก) จากการสังเกตต่อมาในสัปดาห์ที่ 5 พบว่า มีการแบ่งเซลล์ เป็นแผ่นบางๆ สีเขียว (รูป 1ข) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6-7 พบว่า เซลล์เหล่านี้เริ่มมีการแบ่งเซลล์ตามขวาง เกิดเป็นแผ่นบางๆ สีเขียว ที่เรียกว่า (Prothallus) ซึ่งสามารถสังเกตเห็นไรซอยด์ได้ชัดเจน (รูป 1ค) และในสัปดาห์ที่ 8 โปรทาลัส เหล่านี้เริ่มแผ่ขยายมากขึ้นจนมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจ (รูป 1ง) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 9-11 โปรทาลัสแผ่นบาง รูปหัวใจเหล่านี้ มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น มีขนาดใหญ่ขึ้น ความหนาเพิ่มขึ้น และมีไรซอยด์เพิ่มจำนวนมาก (รูป 1จ)

ที่ระยะพัฒนาการประมาณ 14 สัปดาห์ พบว่า โปรทาลัสเริ่มมีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ เรียกว่า แอนเธอริเดียม (antheridium) อยู่บริเวณเหนือไรซอยด์เล็กน้อย โดยจะกระจายทั่วไปตามความกว้างของโปรทาลัส และแทรกอยู่กับไรซอยด์ มีลักษณะเป็นทรงกลมยื่นออกมาจากผิวของแผ่นรูปหัวใจ แต่ยังสังเกตเห็นเซลล์สืบพันธุ์ เพศผู้ไม่ชัดเจน ภายในประกอบไปด้วยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เรียกว่า สเปิร์ม (sperm) (รูป 1ฉ) โดยระยะดังกล่าวพบว่า ยังไม่มีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียที่เรียกว่า อาร์คีโกเนียม (archegonium) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าแอนเธอริเดียมบางอัน เริ่มปล่อย

สเปิร์ม ซึ่งสามารถสังเกตเห็นตัวสเปิร์มชัดเจน มีลักษณะใส ขดเป็นเกลียว ถูกหุ้มอยู่ใน jacket cells ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงใสๆ บรรจุอยู่ภายในแอนเธอริเดียม (รูป 1ช) ในขณะเดียวกันยังพบแอนเธอริเดียมที่กำลังพัฒนาแต่ยังไม่พร้อมที่จะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ และสังเกตพบว่าเริ่มมีการสร้างอาร์คีโกเนียม (รูป 1ซ) และเมื่ออายุได้ประมาณ 18 สัปดาห์ พบว่า อาร์คีโกเนียมจะเจริญเติบโตเต็มที่และพร้อมที่จะผสมพันธุ์ โดยมีลักษณะคล้ายแจกันยื่นออกมาจากผิวของโปรทาลัสบริเวณรอยเว้าของแผ่นรูปหัวใจที่เรียกว่า น็อท (Notch) ภายในมีเซลล์สืบพันธุ์ คือ ไข่ (egg) (รูป 1ฌ) ในขณะที่แอนเธอริเดียม เริ่มมีการปล่อยสเปิร์มออกมาเป็นระยะๆ

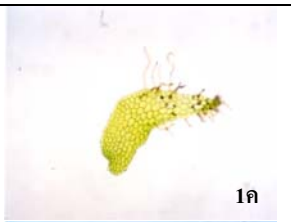
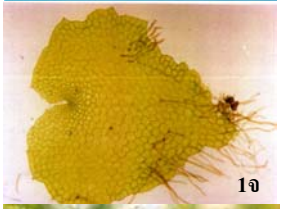
ต่อมาเมื่ออายุได้ประมาณ 22 สัปดาห์ สามารถสังเกตพบการผสมพันธุ์กันของสเปิร์มที่ถูกปล่อยออกมาจากแอนเธอริเดียมกับไข่ที่อยู่ในอาร์คีโกเนียมที่เจริญเติบโตเต็มที่ โดยส่วนที่เรียกว่า cover cell ของอาร์คีโกเนียมจะเปิดออกและมีการปล่อยสารเมือกออกมา (รูป 1ญ) จากนั้นสเปิร์มจะว่ายน้ำเข้าไปผสมพันธุ์กับไข่ที่ฝังตัวอยู่ในส่วนที่เรียกว่า venter ซึ่งเป็นบริเวณพื้นผิวของแผ่นโปรทาลัส และหลังจากการผสมพันธุ์กันของสเปิร์มและไข่แล้วพบว่าจะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นสปอโรไฟต์ มีใบสีเขียวเล็กเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 26 (รูป 1ฏ) และในสัปดาห์ที่ 27-28 พบว่า ยังคงมีการพัฒนาการเกิดแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียม รวมทั้งมีการผสมพันธุ์ของสเปิร์มและไข่เกิดขึ้นได้อีก

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาระยะแกมีโตไฟต์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงสปอร์ใน หลอดทดลองสามารถสรุปได้ผลดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงพัฒนาการระยะแกมีโตไฟต์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ลักษณะการเจริญเติบโต	รูป 1ก-1ฎ แสดงพัฒนาการของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง ในระยะต่างๆ
4	เป็นเส้นสีเขียวเรียงต่อกัน (protonema)	1ก
5	แบ่งเซลล์เป็นแผ่นบางๆ สีเขียว (prothallus)	1ข

ตาราง 1 (ต่อ)

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ลักษณะการเจริญเติบโต	ภาพแสดงพัฒนาการของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง ในระยะต่างๆ
6-7	แบ่งเซลล์ตามขวางขยายขนาดใหญ่มากขึ้น เป็นแผ่นบางๆ สีเขียว เห็นไรซอยด์ชัดเจน (prothallus)	 1ค
8	แผ่นบางๆ สีเขียวแผ่ขยายมากขึ้น มีลักษณะเริ่มคล้ายรูปหัวใจ (prothallus)	1ง
9-11	แผ่นบางๆ รูปหัวใจมีการเจริญเติบโตมากขึ้น มีขนาดใหญ่ขึ้น มีไรซอยด์จำนวนมาก (mature prothallus)	 1จ
14	เริ่มมีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (antheridium)	1ฉ
16	อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เริ่มมีการปล่อยสเปิร์ม (sperm)	1ช
16	เริ่มมีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (archegonium)	1ซ

ตาราง 1 (ต่อ)

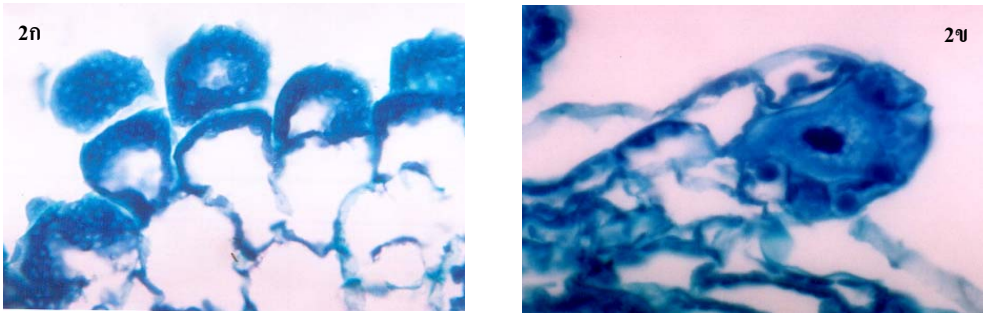
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ลักษณะการเจริญเติบโต	ภาพแสดงพัฒนาการของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างในระยะต่างๆ
18	อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (archegonium) เจริญเติบโตเต็มที่และพร้อมที่จะผสมพันธุ์	1ฌ
22	การผสมพันธุ์กันระหว่างสเปิร์ม (sperm) กับไข่ (egg)	1ญ
26	พบต้นสปอโรไฟต์	1ฎ

และจากการศึกษาพัฒนาการระยะต่างๆ ในช่วงแกมีโตไฟต์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง โดยสุ่มตรวจนับแกมีโตไฟต์ที่สร้างแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียม จำนวนทั้งหมด 500 แกมีโตไฟต์ และคำนวณอัตราส่วนเป็นร้อยละของแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมพบว่า แกมีโตไฟต์ที่สร้างแอนเธอริเดียมเพียงอย่างเดียวคิดเป็น 27.5 เปอร์เซ็นต์ และแกมีโตไฟต์ที่สร้างอาร์คีโกเนียมเพียงอย่างเดียวคิดเป็น 34.67 เปอร์เซ็นต์ และพบแกมีโตไฟต์ที่สร้างทั้งแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมคิดเป็น 37.83 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในตาราง 2) และจากการสังเกตยังพบว่า มีอาร์คีโกเนียมจำนวนมากกว่าแอนเธอริเดียม โดยจะพบอาร์คีโกเนียมตั้งแต่ 1-90 อัน และพบแอนเธอริเดียม ตั้งแต่ 1-40 อัน ซึ่งจำนวนสเปิร์มที่ถูกปล่อยออกจากแอนเธอริเดียม ใน 1 อัน จะมีประมาณ 20-25 ตัว

ตาราง 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การสร้างแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมจากการสุ่มตรวจนับในระยะแกมีโตไฟต์

ลักษณะของแกมีโตไฟต์	เปอร์เซ็นต์ (%)
บนแกมีโตไฟต์ที่สร้างแอนเธอริเดียมเพียงอย่างเดียว	27.50
แกมีโตไฟต์ที่สร้างอาร์คีโกเนียมเพียงอย่างเดียว	34.67
แกมีโตไฟต์ที่สร้างทั้งแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียม	37.83

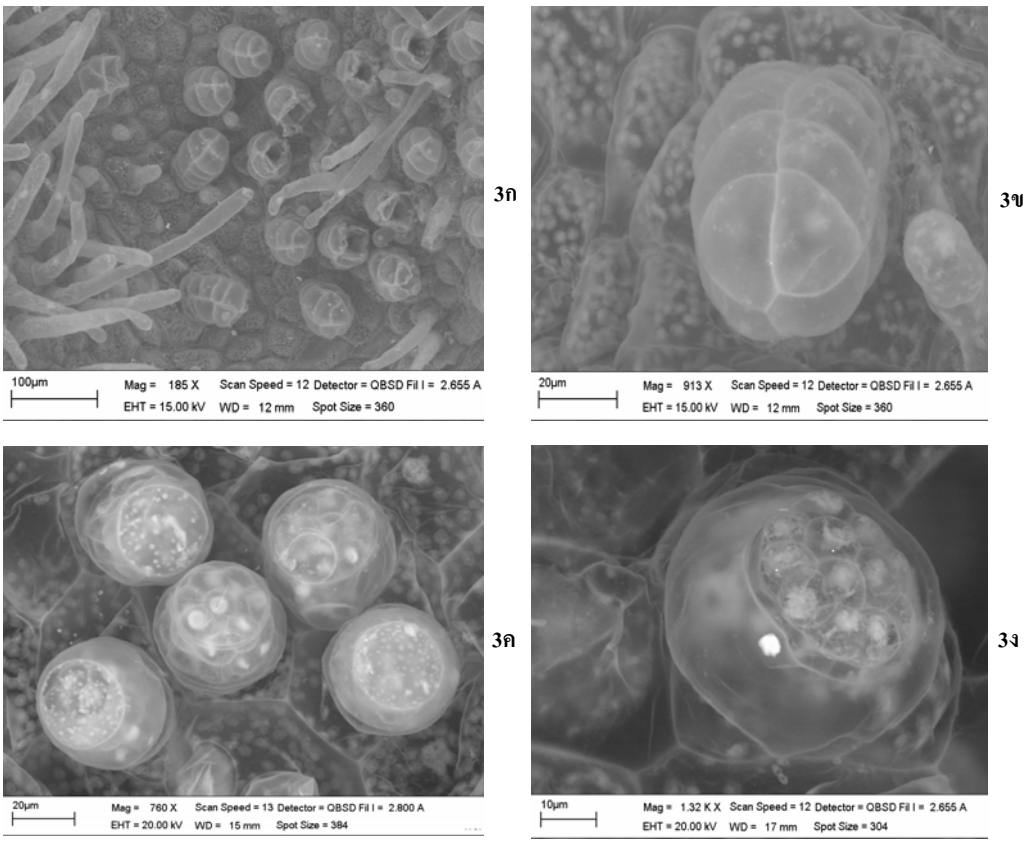
ในการศึกษาสัณฐานวิทยาของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง โดยวิธีการทางไมโครเทคนิค จากนั้นนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ พบว่า ส่วนของแอนเธอริเดียมจะมีลักษณะเป็นวงกลมยื่นออกมาจากบริเวณ ผิวหน้าโปรทาลัส โดยภายในแอนเธอริเดียมจะมีสเปิร์มขดเป็นวงกลมอยู่จำนวนมาก (รูป 2ก) ส่วนอาร์คีโกเนียม จะพบว่ามีเซลล์จำนวน 4 เซลล์เรียงต่อกัน และยื่นออกมาจากบริเวณผิวหน้าของโปรทาลัส เช่นเดียวกับแอนเธอริเดียม มีรูปร่างลักษณะคล้ายแจกัน ภายในมองเห็นไข่ (egg) ซึ่งมีลักษณะเป็นวงกลมที่ย้อมติดสีอย่างชัดเจน (รูป 2ข)



รูป 2 โครงสร้างภายในของแอนเธอริเดียม (2ก) และอาร์คีโกเนียม (2ข) ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างโดยวิธีการทางไมโครเทคนิค

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อศึกษารายละเอียดในเชิงลึก ทั้งลักษณะ ขนาด รูปร่าง โครงสร้างของพื้นผิวภายนอกของแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมได้ชัดเจนยิ่งขึ้น และสามารถวัดขนาดของแอนเธอริเดียม ได้โดยแอนเธอริเดียม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 26.76 ไมโครเมตร และอาร์คีโกเนียม มีขนาดความกว้างประมาณ 52.16 ไมโครเมตร มีความยาวประมาณ 56.69 ไมโครเมตร

และขนาดความกว้างของอาร์คีโกเนียมแต่ละเซลล์มีค่าประมาณ 28.42 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูป 3ก-3ง



รูป 3 แสดงลักษณะของอาร์คีโกเนียม (3ก และ 3ข) และแอนเธอริเดียม (3ค และ 3ง) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์เฟิน นั้นมีรายงานการศึกษามาตั้งแต่ปี 1955 (Steeves *et al.*, 1955) และพบว่ามีรายงานการศึกษาค้นคว้าอย่างต่อเนื่องเรื่อยมา ดังตัวอย่างงานของ Hennen และ Sheehan (1978) ที่ศึกษาถึงการขยายพันธุ์เฟินสกุล *Platyceriuin stemarii* ในหลอดทดลอง Hussey และ Cooke (1979) คิดค้นเทคนิคที่เรียกว่า Homogenization ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์เฟินสกุล *Platycerium* และ *Davallia* ต่อมา Swami และ Raghavan (1980) ศึกษาถึงการควบคุมกระบวนการเกิดสัณฐานวิทยาระยะแกมีโตไฟต์ของเฟินบางสกุล โดยแสงสว่างและฮอร์โมนพืช Richards และคณะ (1983) ได้ศึกษาถึงโครงสร้างของระบบสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเฟินในสกุล

Nephrolepis exaltata และ *Platycerium bifurcatum* และจากรายงานของ Camloh และ Gogala ในปี 1991 พบว่าการชักนำให้เกิดการแตกตายอดและรากใหม่ของ *Platycerium bifurcatum*. ในหลอดทดลอง นั้นสามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องอาศัยการทำงานของฮอร์โมนพืช นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาถึงผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการเจริญและการพัฒนาของเฟินกลุ่ม *Platycerium coronarium* (Koenig) Desv. (Kwa *et al.*,1995a, 1995b, 1995c, 1995d, 1997a and 1997b) และการศึกษาถึงการเพาะเลี้ยงและปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเฟินกลุ่ม *Platycerium bifurcatum* จากรายงานของ Ambrozic-Dolinsek และ Camloh (1997) Ambrozic-Dolinsek และคณะ (2002) Teng (1997) Teng และ Teng (1997) รวมไปถึงการศึกษาการเพาะเลี้ยงเฟินในสกุล *Osmunda* ในหลอดทดลอง (Morini, 2000) เป็นต้น

จากรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาถึงพัฒนาการและระยะการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเฟินกลุ่มต่างๆ นั้นยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะเฟินในกลุ่มของชายผ้าสีดาหูช้าง (*Platycerium holttumii* Jonch. & Hennipm.) ซึ่งมีรายงานการศึกษาในสภาวะในหลอดทดลอง ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับเฟินกลุ่ม *Platycerium* ชนิดอื่นๆ จากผลการทดลองการศึกษาสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างของระยะแกมีโตไฟต์ในช่วงระยะต่างๆ โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงสปอร์ในหลอดทดลองบนอาหารสูตร Miller & Miller (1961) นั้น พบว่า สปอร์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างใช้เวลาในการงอกเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำสปอร์ที่งอกไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอเพื่อศึกษาพัฒนาการ ตั้งแต่โปรโตนีมา จนกระทั่งถึงระยะโปรทาลัส ซึ่งกล้องจุลทรรศน์สเตริโอ นั้นเป็นกล้องจุลทรรศน์ที่เหมาะสำหรับศึกษาวัตถุที่มีขนาดใหญ่ แต่ไม่สามารถแยกรายละเอียดด้วยนัยน์ตาเปล่าๆ ได้ พัฒนาการของระยะแกมีโตไฟต์เริ่มแรกจะมีลักษณะเป็นสีเขียว มีการแบ่งเซลล์เป็นแผ่นบางๆ สีเขียว และแผ่นบางๆ สีเขียวมีการแผ่ขยายจนมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจ ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองของ Fernandez (1997) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงแกมีโตไฟต์ของ *Osmunda regalis* ที่สังเกตระยะการพัฒนาของแกมีโตไฟต์ และพบว่า มีรูปแบบการพัฒนาเป็นเส้นสาย เป็นรูปช้อนและเป็นรูปหัวใจ เช่นเดียวกัน ทั้งนี้ระยะเวลาในการพัฒนาตั้งแต่สปอร์เริ่มงอกและพัฒนาไปจนเป็นแผ่นโปรทาลัส ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง (*Platycerium holttumii* Jonch. & Hennipm.) ที่ทำการศึกษานั้น ใช้เวลาประมาณ 8 สัปดาห์ และสอดคล้องกับการทดลองของ Morel และ Wetmore (1951) ที่ศึกษาการเกิดของสปอร์ของเฟิน *Osmunda cinnamonea* L. และพบว่าการพัฒนาของเฟินดังกล่าวจนถึงระยะที่เป็นรูปหัวใจใช้เวลา 8 สัปดาห์เช่นเดียวกัน และจากการทดลองยังพบว่า ต่อมาแผ่นโปรทาลัส จะมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากการศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ เมื่ออายุได้ 14 สัปดาห์ เฟินเริ่มมีการสร้างแอนเธอริเดียมอยู่บริเวณเหนือไรซอยด์เล็กน้อย โดยกระจายทั่วไปตามความกว้างของโปรทาลัสแทรกอยู่กับไรซอยด์ มีลักษณะเป็นทรงกลม ภายในมีสเปิร์ม แต่ยังสังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจน และในเวลา 2 สัปดาห์ต่อมา

แอนเธอริเดียมเริ่มมีการปล่อยสเปิร์ม โดยช่วงแรกที่แอนเธอริเดียม ปล่อยสเปิร์มออกมานั้น จะมีรูปร่างกลม มีถุงใสๆ หุ้มอยู่ใน jacket cells โดยแอนเธอริเดียมจะปล่อยสเปิร์มออกมาประมาณ 20-25 ตัว ลักษณะของสเปิร์มจะมีลักษณะใส รูปร่างเป็นรูปเกลียว เมื่อสเปิร์มถูกปล่อยออกมาแล้วนั้น สเปิร์มจะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วอยู่บริเวณรอบๆ แผ่นโปรทาลัส และเมื่อปล่อยสเปิร์มออกมาหมดแล้ว แอนเธอริเดียมจะมีลักษณะคล้ายรูปโดนัท ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่า เริ่มมีการสร้างอาร์คีโกเนียมที่บริเวณน็อทและจากการศึกษาครั้งนี้ ยังพบการสร้างอาร์คีโกเนียมอยู่ที่บริเวณไรซอยด์เป็นจำนวนมากอีกด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการพัฒนาการสืบพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง ความชื้น และอัตราส่วนระหว่างแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียม เป็นต้น จึงทำให้พบแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมกระจายตามตำแหน่งต่างๆ ซึ่งจากระยะพัฒนาการที่กล่าวมานั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rubin และ Paolillo (1983) ที่ทำการทดลองศึกษาพัฒนาการเกี่ยวกับเพศของเฟิน *Onoclea sensibilis* บนอาหารวุ้นในสภาพปลอดเชื้อ เปรียบเทียบกับเฟินที่เลี้ยงในดินปลูก และในวัสดุปลูกที่เป็นขี้เถ้า พบว่า การพัฒนามีการเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อมและวัสดุปลูก เช่นเดียวกัน ซึ่งภายในอาร์คีโกเนียม ที่มีไข่ โดยในแต่ละอันจะมีไข่อยู่ 1 ใบ เมื่อแอนเธอริเดียมเจริญเติบโตเต็มที่ จะมีการปล่อยสเปิร์มออกมาผสมพันธุ์กับไข่ที่อยู่ภายในอาร์คีโกเนียม สำหรับอาร์คีโกเนียมเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่และพร้อมที่จะผสมพันธุ์แล้ว ส่วนของ cover cell จะเปิดออกและปล่อยสารเมือกออกมาเพื่อดึงดูดสเปิร์มเข้ามาผสมพันธุ์ และจากการทดลองสังเกตพบว่า ในช่วงระยะเริ่มแรก นั้น สเปิร์มจะยังไม่ได้เข้าไปผสมพันธุ์กับไข่ แต่จะว่ายน้ำหนี และเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม สเปิร์มจึงจะว่ายน้ำเข้าไปผสมพันธุ์กับไข่ที่ฝังตัวอยู่ใน venter และหลังจากที่มีการผสมพันธุ์กันระหว่างสเปิร์มกับไข่แล้ว จะมีการเจริญเติบโตไปเป็นต้นสปอโรไฟต์ ที่มีใบสีเขียวเล็กๆ เกิดขึ้น ในสัปดาห์ที่ 26 ส่วนอาร์คีโกเนียมที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์นั้นจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล นอกจากนี้แล้วยังสังเกตพบว่า แอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมนั้นมีการพัฒนาไม่พร้อมกัน โดยแอนเธอริเดียมมีพัฒนาการก่อนอาร์คีโกเนียมเป็นระยะเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ โดยทั้งแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียม นั้น อยู่ในระยะที่มีทั้งที่กำลังพัฒนา และพัฒนาเต็มที่แล้ว รวมทั้งที่พร้อมจะผสมพันธุ์โดยการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ เช่น แอนเธอริเดียมกำลังพัฒนาในขณะที่อาร์คีโกเนียมมีการพัฒนาเต็มที่แล้ว หรือแอนเธอริเดียมกำลังปล่อยสเปิร์มในขณะที่อาร์คีโกเนียมสลายไปแล้วหรือกำลังพัฒนาอยู่ หรือแอนเธอริเดียมกำลังปล่อยสเปิร์มเพื่อไปผสมพันธุ์กับไข่ที่อยู่ภายในอาร์คีโกเนียม เป็นต้น จากการศึกษานี้ สามารถกล่าวได้ว่า บนแกมีโตไฟต์นั้น มีการเกิดของแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมไม่พร้อมกัน ทำให้การผสมพันธุ์บนแผ่นโปรทาลัสแต่ละแผ่นเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน จึงทำให้การพัฒนาการเกิดไปเป็นต้นสปอโรไฟต์ไม่พร้อมกัน

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดในระยะต่างๆ ที่ช่วยทำให้มองเห็นภาพและรายละเอียดลักษณะ

ของขนาด รูปร่าง โครงสร้างของพื้นผิวภายนอกของแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สามารถดูภาพวัตถุได้ถึงสามมิติและขยายภาพของวัตถุที่ต้องการได้มากกว่า แต่จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้น ไม่สามารถบันทึกพัฒนาการได้อย่างครบถ้วน ทั้งนี้เนื่องมาจากในกระบวนการเตรียมตัวอย่างของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างก่อนนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้น มีขั้นตอนบางขั้นตอนโดยเฉพาะการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ ในระดับความเข้มข้นต่างๆ อาจมีผลทำให้พัฒนาการบางช่วงขาดหายไป เช่น การปล่อยสเปิร์ม การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การปล่อยสารเมือกของอาร์คีโกเนียมเพื่อดึงดูดสเปิร์ม เป็นต้น เนื่องจากในระหว่างกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์นั้น อาจทำให้สเปิร์มหรือสารเมือกต่างๆ หลุดปะปนและถูกชะล้างออกไป จึงทำให้สังเกตกระบวนการพัฒนาการต่างๆ ไม่ครบถ้วนและศึกษาได้เฉพาะลักษณะของขนาด รูปร่าง พัฒนาการบางช่วงของแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมเท่านั้น

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาโครงสร้างภายในของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง โดยวิธีการไมโครเทคนิค ทำให้มองเห็นโครงสร้างภายในของแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกเหนือจากการศึกษาพัฒนาการเพียงอย่างเดียวซึ่งจะมองเห็นเพียงแค่โครงสร้างภายนอก เนื่องจากกระบวนการตั้งแต่เริ่มต้นในการศึกษาครั้งนี้จะช่วยรักษาโครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ ให้คงสภาพเหมือนตอนที่ยังมีชีวิตอยู่ และยังมีกระบวนการการย้อมสีที่ช่วยทำให้มองเห็นโครงสร้างชัดเจนมากขึ้นและสามารถแยกโครงสร้างต่างๆ ได้ชัดเจนขึ้นอีกด้วย เช่น ตำแหน่งของไข่ในอาร์คีโกเนียมมองเห็นรูปร่างลักษณะชัดเจน หรือแอนเธอริเดียมมองจากกล้องจุลทรรศน์จะเห็นแค่ภายนอกว่ามีสเปิร์มอยู่ แต่เมื่อใช้วิธีการทางไมโครเทคนิคจะเห็นว่ามีสเปิร์มขดอัดกันแน่นอยู่เป็นจำนวนมาก เป็นต้น ทำให้สามารถมองเห็นแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมมีลักษณะยื่นออกมาจากผิวหน้าของโปรทาลัสอย่างชัดเจน และในการศึกษาสัณฐานวิทยาภายในของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง โดยวิธีการทางไมโครเทคนิค ยังพบว่า ส่วนของอาร์คีโกเนียมจะมีเซลล์จำนวน 4 เซลล์เรียงต่อกัน ยื่นออกมาจากบริเวณผิวหน้าของโปรทาลัส ซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้ายแจกันภายในมองเห็นไข่ มีลักษณะเป็นวงกลมชัดเจน ส่วนแอนเธอริเดียมจะมีลักษณะเป็นวงกลมยื่นออกมาจากบริเวณผิวหน้าโปรทาลัส เช่นเดียวกับอาร์คีโกเนียม ซึ่งภายในแอนเธอริเดียมจะมีสเปิร์มขดเป็นวงกลมอยู่จำนวนมาก

ส่วนการศึกษาสัณฐานวิทยาระยะแกมีโตไฟต์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้าง โดยวิธีการเพาะเลี้ยงสปอร์ในหลอดทดลอง สามารถสรุปได้ว่าสปอร์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างใช้เวลาในการงอก 2 สัปดาห์ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงต่อมาในสัปดาห์ที่ 4-5 มีการแบ่งเซลล์ไปเป็นโปรโตนีมา จากนั้นมีการพัฒนาเป็นแผ่นโปรทาลัส ในสัปดาห์ที่ 6-7 หลังจากนั้นแผ่นโปรทาลัสมีการเจริญเติบโตมากขึ้น เมื่ออายุ 14 สัปดาห์ เริ่มมีการสร้างแอนเธอริเดียม 2 สัปดาห์ต่อมามีการสร้างอาร์คีโกเนียม เมื่ออายุได้ 18 สัปดาห์ อาร์คีโกเนียมเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมที่จะผสมพันธุ์ ส่วนแอนเธอริเดียม เริ่มปล่อยสเปิร์ม ในสัปดาห์

ที่ 22 พบการผสมพันธุ์ของไข่และสเปิร์มและเจริญเติบโตเป็นต้นสปอโรไฟต์ในสัปดาห์ที่ 26 จากการศึกษาพัฒนาการระยะต่างๆ ในช่วงแกมีโตไฟต์ของเฟินชายผ้าสีดาหูช้างโดยการสุ่มตรวจนับแกมีโตไฟต์ที่สร้างแอนเธอริเดียมและอาร์คีโกเนียมจำนวน 500 แกมีโตไฟต์ จะพบอาร์คีโกเนียมตั้งแต่ 1-90 อัน และเอนเธอริเดียมตั้งแต่ 1-40 อัน ซึ่งจำนวนสเปิร์มที่ถูกปล่อยออกมาจากแอนเธอริเดียมมีประมาณ 20-25 อัน

ผลการศึกษานี้จะมีความสำคัญมากขึ้นตามลำดับ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมเฟินที่หายากและใกล้จะสูญพันธุ์ และอาจเพาะขยายพันธุ์เพื่อการค้า นอกจากนี้ยังสามารถนำเฟินชนิดต่างๆ มาผสมพันธุ์กันเพื่อให้เกิดลูกผสมที่สวยงาม และมีศักยภาพในการทำเป็นไม้ดอกไม้ประดับทางการค้าต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยแก่ผู้วิจัย ขอบคุณนิสิต คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จารุพันธ์ ทองแถม. (2536). เฟิน: สำหรับคนรักเฟินและผู้ปลูกเลี้ยง. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์อมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ป.

ธวัช ดอนสกุล. (2534). ชว 581 ไมโครเทคนิค. เอกสารคำสอน, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน, 224.

วิเชษฐ์ ค้าสุวรรณ. (2544). เฟิร์น. กรุงเทพฯ: ฐานเกษตรกรรม.

สุธีรา ลิมปิพิชัย. (2540). การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเฟิร์นที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ในประเทศไทยและสาเหตุการสูญพันธุ์. ในรายงานการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2540. ปทุมธานี: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, 1.

อักษร ศรีเปล่ง. (2523). เฟิร์น. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ambrozic-Dolinsek, J. and Camloh, M. (1997). Gametophytic and Sporophytic Regeneration from Bud Scales of the Fern *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C.Chr. *In vitro*. *Ann. Bot.*, *80*, 23-28.

Ambrozic-Dolinsek, J., Camloh, M., Bohanec, B. and Zel, J. (2002). Apospory in leaf culture of staghorn fern (*Platycerium bifurcatum*). *Plant Cell Rep*, *20*(9), 791-796.

Camloh, M. and Gogala, N. (1991). *Platycerium bifucatum*. Adventitious bud and root formation without growth factors *In vitro*. *Acta Hortic*, *289*, 89.

Fernández, H., Bertrand, A.M. and Sanchez-Tamés, R. (1997). Gemmation in cultured gametophytes of *Osmunda regalis*. *Plant Cell Rep*, *16*(5), 358-362.

Hennen, G.R., and Sheehan, T. J. (1978). *In vitro* propagation of *Platyceriuin Stemarii* (Beauvois) Desu. *Hort Sci*., *13*(3), 24-25.

Holttum, R.E. (1954). Flora of Malaya. Vol. II (Fern). Singapore: Government Printing Office.

Hussey, G. and Cooke, R.C. (1979). Homogenization as an aid in tissue culture propagation of *Platycerium* and *Davallia*. *Hort Sci*, *14*, 21-22.

Kwa, S.H., Wee, Y.C. and Kumar, P.P. (1995). Role of ethylene in the production of sporophytes from *Platycerium coronarium* (Koenig) Desv. frond and rhizome pieces cultured *In vitro*. *J. Plant Growth Regul*, *14*, 183-189.

Kwa, S.H., Wee, Y.C. and Kumar, P.P. (1995). Ammonium and nitrate uptake and nitrate reductase activity of photoautotrophic callus cultures of the fern *Platycerium coronarium* (Koenig) Desv. *In vitro* Cell. Dev. *Biol.-Plant*, *31*, 211-214.

Kwa, S.H., Wee, Y.C., Lim, T.M. and Kumar, P.P. (1995). Establishment and physiological analyses of photoautotrophic callus cultures of the fern *Platycerium coronarium* (Koenig) Desv. under CO_2 enrichment. *J. Exp. Bot.*, *46*, 1535–1542.

Kwa, S.H., Wee, Y.C., Lim, T.M. and Kumar, P.P. (1995). IAA-induced apogamy in *Platycerium coronarium (*Koenig) Desv. gametophytes cultured *In vitro*. *Plant Cell Rep*, *14*, 598-602.

Kwa, S.H., Wee, Y.C. and Kumar, P.P. (1997). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities of photoautotrophic callus of *Platycerium coronarium* (Koenig ex O.F. Muell.) Desv. under CO2 enrichment. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, *50*, 75-82.

Kwa, S.H., Wee, Y.C., Lim, T.M., and Kumar, P.P. (1997). Morphogenetic plasticity of callus reinitiated from cell suspension cultures of the fern *Platycerium coronarium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, *48*, 37-44.

Lellinger, D.B. (1979). “Fern” Encyclopedia Americana. *11*, 113-120.

Miller, J.H. and Miller, P.M. (1961). The Effect of Different Light Conditions and Sucrose on the Growth and Development of the Gametophyte of the Fern, *Onoclea sensibilis*. *Amer. J. Bot.*, *48*(2), 154-159.

Morel, G. and Wetmore, R.H. (1951). Fern callus tissue culture. *Amer. J. Bot.*, *38*(1), 141-143.

Morini, S. (2000). *In vitro* culture of *Osmunda regalis* fern. *J. Hortic. Sci. Biotech*, *75*(1), 31-34.

Richards, J.H., Beck, J.Z. and Hirsch, A.M. (1983). Structural investigations of asexual reproduction in *Nephrolepis exaltata* and *Platycerium bifurcatum. Am. J. Bot*, *70*(7), 993-1001.

Rubin, G. and Paolillo, D.J. (1983). Sexual development of *Onoclea sensibilis* on agar and soil media without the addition of antheridiogen. *Amer. J. Bot*, *70*(6), 811–815.

Steeves, T.A., Sussex, I.M. and Partanen, C.R. (1955). *In vitro* studies on abnormal growth of prothalli of the bracken fern. *Am. J. Bot*, *42*(3), 232-244.

Swami, P. and Raghavan, V. (1980). Control of morphogenesis in the gametophyte of a fern by light and growth hormones. *Can. J. Bot*, *58*, 1464-1473.

Tagawa, M. and Iwatsuki, K. (1972). Families and genera of the Pteridophytes known from Thailand. Memoirs of the Fac. Sci., Kyoto Univ., Ser. of biol. *5*(2), 67-88.

Teng, W.L. (1997). Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platycerium bifurcatum*. *Plant Cell Rep*, *17*, 77-83.

Teng, W.L. and Teng, M.C. (1997). *In vitro* regeneration patterns of *Platycerium bifurcatum* leaf cell suspension culture. *Plant Cell Rep*, *16*, 820-824.