ผลของ BA, NAA และความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน (*Platycerium coronarium*) ในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of BA, NAA and Light Intensity on Growth and Development of *Platycerium coronarium in vitro*

ปฐมาภรณ์ ทิลารักษ์ *

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี อ. เขาคิชฌกูฏ จ. จันทบุรี 22210

Email: monmannu@yahoo.com

บทคัดย่อ

เฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน (*Platycerium coronarium*) พบมากในภาคใต้และภาคตะวันออก สามารถนำมาประดับตกแต่งสวน และบ้านเรือนให้สวยงาม จึงทำให้มีราคาค่อนข้างสูงส่งผลให้มีการลักลอบนำออกจากป่ามาขาย เฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านในธรรมชาติจึงลดจำนวนลงมาก ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการเพิ่มจำนวนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้ต้นเฟิร์นจำนวนมากในระยะเวลารวดเร็ว โดยทดสอบผล BA, NAA และความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านในสภาพปลอดเชื้อ ศึกษาผลของ BA และ NAA โดยนำแกมีโทไฟต์ และสปอร์โรไฟต์ที่ได้จากการเพาะสปอร์มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนพืช และเติม BA และ NAA ในความเข้มข้นต่างๆ (NAA 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA:BA 0.1:0.1, 0.2:0.2, 0.1:0.2 และ 0.2:0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า แกมีโทไฟต์มีการเจริญเติบโตโดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในแต่ละทรีตเมนต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยแกมีโทไฟต์มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ยมากที่สุดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 1.44 กรัม และสปอร์โรไฟต์มีการเจริญเติบโตโดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในแต่ละทรีตเมนต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ผลของฮอร์โมนพืชต่อการเจริญของสปอร์โรไฟต์พบว่ามีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ยมากที่สุดบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม BA : NAA อัตราส่วน 0.1:0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 1.45 กรัม ศึกษาผลของความเข้มแสง โดยนำต้นอ่อนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน มาทดสอบบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS โดยแปรผันความเข้มแสงที่ระดับ 1000 2000 3000 และ 4000 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า ต้นอ่อนเฟิร์นมีการเจริญเติบโตโดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในแต่ละทรีตเมนต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นอ่อนของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ 4,000 ลักซ์ โดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงที่สุด 2.93 กรัม

คำสำคัญ: เฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ฮอร์โมนพืช ความเข้มแสง แกมีโทไฟต์ และสปอร์โรไฟต์

Abstract

The *Platycerium coronarium* is widely found in the east and the south of Thailand. They can be used to decorate gardens and other places. This make them high price. They are stolen from the forests for trading so they are decreased in the large number in natures. This study need to increase the *Platycerium coronarium* by *in vitro* culture. We investigated the effects of BA, NAA and light intensity on

in vitro culture of *Platycerium coronarium*. The effect of BA and NAA were studied by subculture of gametophytes and sporophytes on MS medium added various of BA and NAA with the concentration of NAA 0.1 and 0.2 mg/L, BA 1.0 and 2.0 mg/L and NAA:BA 0.1:0.1, 0.2:0.2, 0.1:0.2 and 0.2:0.1 mg/L and MS medium without plant hormones for 4 months. We found that the growth of gametophytes increased significantly ($p<0.05$). The highest average increasing fresh weight of gametophyte (1.44 g) was found in MS medium with BA 0.2 mg/L. The effects of plant hormones on sporophytes were found that the growth of gametophytes increased non significantly ($p>0.05$). The highest average increasing fresh weight (1.45 g) was in MS medium containing NAA:BA 0.1:0.1 mg/L. The effect of light intensity were studied by subculture the plantlet of *Platycerium coronarium* on MS medium. We used various light intensities. There are 1,000, 2,000, 3,000 and 4,000 Luxs for 4 months. We found that the growth of plantlet increased significantly ($p<0.05$). The optimum of light intensity for the growth and developing of *Platycerium coronarium* plantets on *in vitro* culture was 4,000 Luxs with highest average increasing fresh weight (2.93 g).

Keyword: *Platycerium coronarium*; Plant tissue culture; Plant hormones; Light intensity; Gametophyte and Sporophyte

บทนำ

เฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน (*Platycerium coronarium*) เป็นเฟิร์นที่มีขนาดใหญ่และมีความสวยงามมากชนิดหนึ่งในโลก โดยมีใบโล่หรือใบกาบที่แตกเป็นพู่ชูขึ้นเป็นวง ซึ่งมีความสง่างามคล้ายมงกุฎ ใบที่สร้างสปอร์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องทอดห้อยย้อยลงคล้ายชายสไบหรือชายผ้านุ่งสตรีโบราณ จึงได้ชื่อว่าชายผ้าสีดา เฟิร์นชนิดนี้พบได้ตามคาคบไม้ใหญ่ เช่น ต้นยูง ต้นยาง ต้นตะเคียน ในป่าดิบชื้นภาคใต้ และภาคตะวันออก ของประเทศไทย นอกจากนี้พบทั่วไปในเขตเทือกเขาตะนาวศรี พม่า เวียดนาม ลาว กัมพูชา มาเลเซีย และอินโดนีเซีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเกาะสุมาตราพบมากในเขตป่าชายเลน และป่าพรุ แต่จะเกาะที่คาคบไม้ที่ได้แสงเพียงพอ

ชายผ้าสีดาสายผ้าม่านดูเหมือนจะจำกัดตัวอยู่ในประเทศไทยตอนล่าง โดยไม่เคยพบในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือเลย [1] จังหวัดจันทบุรีเป็นพื้นที่หนึ่งที่พบการกระจายตัวของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน ซึ่งปัจจุบันนี้มีจำนวนลดลงเป็นอย่างมากเนื่องจากมีการลักลอบนำออกจากป่ามาขาย เพราะมีความสวยงามเหมาะสำหรับใช้เป็นไม้ประดับ มีราคาค่อนข้างสูงและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ การลักลอบเก็บจากป่าจำนวนมากเพื่อนำมาจำหน่ายเป็นสาเหตุให้เฟิร์นมีจำนวนลดลงและอาจสูญพันธุ์ได้ในอนาคต การขยายพันธุ์เฟิร์นชายผ้าสีดาทำได้ทั้งการเพาะแบบธรรมชาติ และการเพาะด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งทำให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในระยะเวลารวดเร็ว

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายปัจจัยเช่น ฮอร์โมนพืช ความเข้มแสง ดังในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์น *Platycerium bifercatum* ซึ่งเป็นเฟิร์นสกุลเดียวกันนั้น พบว่าทั้ง ออกซิน และไซโทไคนิน มีผลต่อการเจริญพัฒนาของเฟิร์นโดยเมื่อนำส่วนของสปอร์โรไฟต์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีทั้งออกซินและไซโทไคนินในสัดส่วนที่เหมาะสมคือ NAA 5.3 ไมโครโมล และ 2ip 2.22 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดกรีนโกลบูลาร์บอดี้ (green globular body) ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นสปอร์โรไฟต์ใหม่ได้ [11] นอกจากนี้ ความเข้มแสงก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของเฟิร์นโดยความเข้มแสงที่เหมาะต่อการเจริญของเฟิร์นชายผ้าสีดาอย่างน้อยที่สุดคือ 100 ft หรือ 1,076 ลักซ์ [9] ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการทดสอบผลของฮอร์โมน BA, NAA และความเข้มแสงต่อการ

เจริญเติบโตของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ BA, NAA และความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านในสภาพปลอดเชื้อ

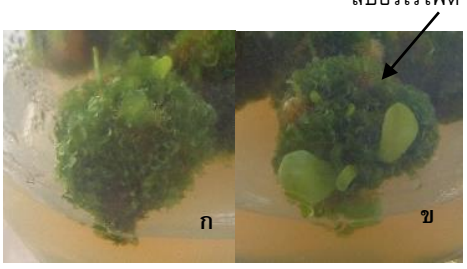
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ผลของฮอร์โมนพืชต่อการเจริญของแกมีโทไฟต์และสปอร์โรไฟต์

เพาะสปอร์เฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านจากต้นพันธุ์ที่มีอายุประมาณ 5 ปีในโรงเรือนพันธุ์ไม้ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี สปอร์ที่แก่แล้วสังเกตได้โดยสปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม สปอร์บางส่วนเริ่มหลุดจากอับสปอร์ หลังจากนั้นนำสปอร์เฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านชั่งน้ำหนักให้ได้ 0.005 กรัม ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโป-คลอไรต์ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำสปอร์ที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วเพาะบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2500 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากเพาะสปอร์เป็นเวลา 4 เดือน จะได้แกมีโท-ไฟต์ที่สมบูรณ์ที่มีลักษณะเหมือนช้อนขอบหยักมีโครโมโซมเป็นแฮพพลอยด์ (haploid) (ภาพที่ 1)

ในการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) โดยนำแกมีโทไฟต์ที่สมบูรณ์คัดเลือกออกมาเป็นกระจุกแต่ละกระจุกหนักประมาณ 0.05 กรัม ทำการบันทึกน้ำหนักเริ่มต้นจริง แล้วมาทดสอบผลของฮอร์โมนพืชต่อการเจริญ ย้ายมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS ที่เติม ฮอร์โมนพืชความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและใช้ NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.1:0.1, 0.2:0.2, 0.2:0.1และ 0.1:0.2 มก./ล ทั้งหมด 9 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด หลังจากนั้นบันทึกการเจริญเติบโตจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักสดเริ่มต้นที่บันทึกไว้ครั้งแรก เป็นระยะเวลา 4 เดือน โดยบันทึกน้ำหนักเดือนละ 1 ครั้ง แล้วหาค่าน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยทั้ง 4 เดือนของแต่ละทรีตเมนต์ พร้อมวิเคราะห์ความแตกต่างของน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นในแต่ละทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อแกมีโทไฟต์เจริญได้ประมาณ 6 เดือน จะมีการผสมระหว่างไข่และเสปิร์ม แล้วจึงพัฒนาเป็นต้นสปอร์โรไฟต์ ที่มีโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (diploid)ที่เจริญอยู่บนแกมีโทไฟต์ (ภาพที่ 1) ในการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) โดยนำต้นสปอร์โรไฟต์ที่มีอายุ 2 เดือน มีใบจริงยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แต่ละต้นมีน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 0.01 กรัม ทำการบันทึกน้ำหนักสดเริ่มต้นจริง แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนพืชความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้ NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.1:0.1, 0.2:0.2, 0.2:0.1 และ 0.1:0.2 มก./ล ทั้งหมด 9 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด หลังจากนั้นบันทึกการเจริญเติบโตจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักเริ่มต้นที่บันทึกไว้ครั้งแรก เป็นระยะเวลา 4 เดือน โดยบันทึกน้ำหนักสดเดือนละ 1 ครั้ง แล้วหาค่าน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยทั้ง 4 เดือนของแต่ละทรีตเมนต์ พร้อมวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดแต่ละทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 1 แกมีโทไฟต์ (ก) และสปอร์โรไฟต์ที่เจริญอยู่บนแกมีโทไฟต์ (ข) ของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน

2. ผลของความเข้มแสงต่อการเจริญของต้นอ่อนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านในสภาพปลอดเชื้อ

ทดสอบผลของความเข้มแสงต่อการเจริญของต้นอ่อนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) นำต้นอ่อนที่ได้หลังจากเจริญเป็นสปอร์โรไฟต์แล้วเป็นเวลา 4 เดือน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใบกาบ 1 เซนติเมตร พร้อมบันทึกน้ำหนักเริ่มต้น มาทดสอบบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS โดยแปรผันความเข้มแสงที่ 1000, 2000 3000 และ 4000 ลักซ์ ทั้งหมด 4 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด เลี้ยงในอุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการให้แสง16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้นบันทึกการเจริญเติบโตจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักเริ่มต้นที่บันทึกไว้ครั้งแรก บันทึกเดือนละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 4 เดือน พร้อมหาค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นทั้ง 4 เดือนของแต่ละทรีตเมนต์ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดแต่ละทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ศึกษาผลของฮอร์โมนพืชต่อการเจริญเติบโตแกมีโทไฟต์ และต้นสปอร์โรไฟต์ของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน บนอาหารสังเคราะห์

1.1 ผลของฮอร์โมนพืชต่อการเจริญของแกมีโทไฟต์

เมื่อผ่านไป 4 เดือน พบว่า การเจริญของแกมีโทไฟต์ ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมฮอร์โมนพืช และกลุ่มทดลองที่เติมฮอร์โมนพืชในความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละเดือนแกมีโทไฟต์มีน้ำหนักสดในแต่ละทรีตเมนต์เพิ่มขึ้น เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยทั้ง 4 เดือน ของแกมีโทไฟต์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละทรีตเมนต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยแกมีโทไฟต์ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแกมีโทไฟต์เพิ่มขึ้นมากที่สุด รองลงคือแกมีโทไฟต์ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนพืช ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

เมื่อสังเกตลักษณะการเจริญของแกมีโทไฟต์หลังจากเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละทรีตเมนต์มาเป็นเวลา 4 เดือน พบว่า แกมีโทไฟต์ที่เจริญในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนนั้นมีการเพิ่มจำนวนของแกมีโทไฟต์จำนวนมาก ในขณะที่แกมีโทไฟต์ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนพืชมีการแบ่งเซลล์เป็นแคลลัสโดยมีลักษณะของแคลลัสแตกต่างกันออกไปดังนี้ แกมีโทไฟต์ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมเฉพาะฮอร์โมน NAA ทุกความเข้มข้นพบมีการแบ่งเซลล์เป็นก้อนแคลลัสขนาดใหญ่จนสังเกตไม่เห็นแกมีโทไฟต์เดิม แคลลัสมีสีเขียวปนน้ำตาล และพบการเจริญพัฒนาจากแคลลัสเป็นสปอร์โรไฟต์ที่มีโครโมโซมเป็น 2n

แกมีโทไฟต์ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมเฉพาะฮอร์โมน BA พบมีการแบ่งเซลล์เป็นแคลลัสเล็กน้อยบริเวณแผ่นใบแกมีโทไฟต์ แคลลัสมีสีเขียวอ่อน แต่ไม่พบการเจริญพัฒนาจากแคลลัสเป็นสปอร์โรไฟต์ และแกมีโทไฟต์ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมทั้งฮอร์โมน NAA และ BA พบมีการแบ่งเซลล์เป็นแคลลัสเป็นก้อนขนาดใหญ่เช่นเดียวกับที่เติมฮอร์โมน NAA แต่ก้อนแคลลัสมีสีเขียวเข้ม และพบการเจริญพัฒนาจากแคลลัสเป็นสปอร์โรไฟต์

จากการทดลองพบความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสมากที่สุดคือความเข้มข้น NAA: BA ที่ 0.2 : 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสามารถแบ่งเซลล์ได้แคลลัสจำนวนมากและแคลลัสมีสีเขียว (รูปที่ 2 และ 3) การเกิดแคลลัสสามารถชักนำโดยฮอร์โมนพืช ฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทหลักต่อการเกิดแคลลัส คือ ออกซิน โดยจะกระตุ้นให้เซลล์กลับเข้าสู่การเจริญและพร้อมแบ่งเซลล์อีกครั้ง และออกซินที่ความเข้มข้นสูงๆ ยังกระตุ้นให้เกิด embryogenesis คือการเจริญเป็นต้นอ่อนของแคลลัส แต่เอมบริโอจะยังไม่พัฒนาจนกว่าความเข้มข้นของออกซินจะลดลงหรือหมดไป สำหรับไซโทไคนินจะทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างคลอโรฟิลล์ในแคลลัสและ

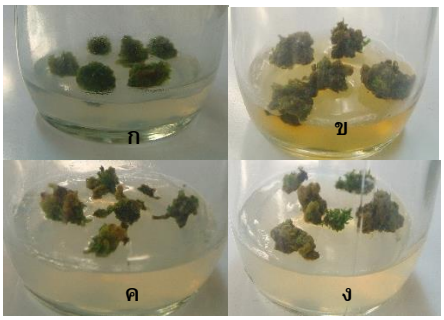
ทำให้ผนังเซลล์ของแคลลัสแข็งแรงทนต่อแรงดันเต่งที่เพิ่มขึ้น

ดังนั้นในการเจริญของแคลลัสจำเป็นต้องมีทั้งออกซินและไซโทไคนินทำงานร่วมกันในปริมาณที่เหมาะสม [5] ในเฟิร์น *Dryopteris affinis* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงแกมีโทไฟต์บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้น 4.43 ไมโครโมล และ0.53 ไมโครโมล ตามลำดับ นั้นสามารถชักนำให้แกมีโทไฟต์เกิดแคลลัสจำนวนมาก [6] และ ได้มีการทดลองเลี้ยงแกมีโทไฟต์ของเฟิร์นชายผ้าสีดา *Platycerium coronarium* บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D พบว่าเกิดแคลลัสจำนวนมาก แต่ในอาหารที่ไม่เติม 2,4-D ไม่พบการสร้างแคลลัส [10] เฟิร์น *Dryopteris affinis* sp. ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.43 ไมโครกรัม และ NAA 0.53 ไมโครกรัม พบว่า แกมีโทไฟต์เกิดเป็นแคลลัส และเมื่อนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนเป็นเวลา 1 เดือน พบมีการเจริญเป็นต้นสปอร์โรไฟต์จำนวนมาก [6] ถึงแม้ออกซินจะทำหน้าที่หลักในการสร้างแคลลัสและชักนำให้แคลลัสเกิด embryogenesis ได้ก็ตามแต่ก็จำเป็นต้องมีไซโทไคนินร่วมด้วยเพื่อให้เกิดการสร้างคลอโรฟิลล์และสร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ของแคลลัสซึ่งจำเป็นในการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างแคลลัส ดังนั้นในการชักนำให้แกมีโทไฟต์เกิดการสร้างแคลลัสได้ดีต้องใช้ทั้งออกซินและไซโทไคนินในสัดส่วนที่เหมาะสม

ตารางที่ 1 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของแกมีโทไฟต์ของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านเมื่อเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน

ชนิดและปริมาณฮอร์โมนพืช (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของแกมีโทไฟต์ (กรัม)				
	ระยะเวลา (เดือน)				
	1	2	3	4	น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย
MS (ไม่เติมฮอร์โมนพืช)	0.07^{ab}	0.35^{abc}	1.19^{b}	3.25^{d}	1.21 ^{cd}
MS+NAA 0.1	0.07^{ab}	0.48^{c}	1.02^{b}	2.18^{bc}	0.94 ^{abc}
MS+NAA 0.2	0.06^{a}	0.50^{c}	1.19^{b}	1.62^{ab}	0.84 ^{abc}
MS+BA 1.0	0.05^{a}	0.46^{bc}	1.16^{b}	1.64^{ab}	0.83 ^{abc}
MS+BA 2.0	0.10^{bc}	0.85^{d}	2.16^{c}	2.67^{cd}	1.44 ^{d}
MS+NAA:BA 0.1:0.1	0.07^{ab}	0.40^{abc}	1.21^{b}	2.39^{c}	1.02 ^{bc}
MS+NAA:BA 0.2:0.2	0.07^{ab}	0.30^{ab}	0.60^{a}	1.35^{a}	0.58 ^{ab}
MS+NAA:BA 0.2:.0.1	0.11^{c}	0.43^{bc}	0.78^{ab}	1.26^{a}	0.65 ^{ab}
MS+NAA:BA 0.1:0.2	0.08^{abc}	0.29^{ab}	0.59^{a}	1.26^{a}	0.55 ^{a}

*ตัวอักษรที่แตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ของแกมีโทไฟต์ที่เจริญอยู่บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่างๆ



รูปที่ 2 การเจริญของแกมีโทไฟต์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (ก) การเจริญของแกมีโทไฟต์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว (ข) การเจริญของแกมีโทไฟต์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียว (ค) และการเจริญของแกมีโทไฟต์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมทั้ง NAA และ BA (ง)

รูปที่ 3 การเจริญของแคลลัสเป็นสปอร์โรไฟต์มีลักษณะเป็นปุ่มสีเขียวบนก้อนแคลลัส

1.2 ผลของฮอร์โมนพืชต่อการเจริญของสปอร์โรไฟต์

เมื่อศึกษาการเจริญของสปอร์โรไฟต์เฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านเป็นระยะเวลา 4 เดือน บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนพืชและเติมฮอร์โมนพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ในแต่ละเดือน น้ำหนักสดของสปอร์โรไฟต์ในแต่ละทรีตเมนต์เพิ่มขึ้น เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยทั้ง 4 เดือน ของสปอร์โรไฟต์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละทรีตเมนต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยสปอร์โรไฟต์มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม NAA: BA อัตราส่วน 0.1:0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2)

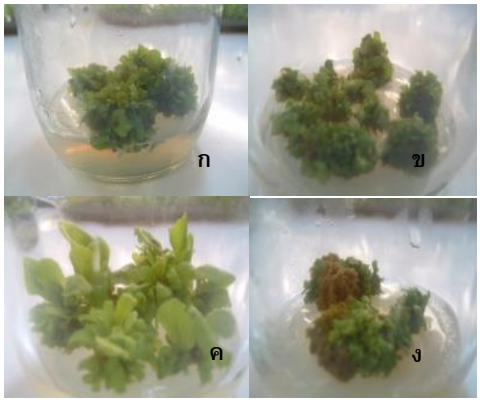
เมื่อสังเกตลักษณะการเจริญของสปอร์โรไฟต์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละทรีตเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยต้นสปอร์โรไฟต์ที่เจริญบนอาหาร MS ไม่เติมฮอร์โมนพืชเกิดการเพิ่มจำนวนของสปอร์โรไฟต์จำนวนมาก โดยใบมีขนาดเล็กยาวเจริญดี สปอร์โรไฟต์ที่เจริญบนอาหารสูตร MS ที่เติมเพียง BA ที่ทุกความเข้มข้นพบมีการเพิ่มจำนวนของสปอร์โรไฟต์จำนวนมากเช่นกัน โดยใบมีลักษณะแคบสั้นและเปราะ ต้นสปอร์โรไฟต์ที่เจริญบนอาหารสูตร MS ที่เติมเพียง NAA ที่ทุกความเข้มข้นพบการเพิ่มจำนวนของสปอร์โรไฟต์น้อย แต่ต้นเจริญดีมากมีแผ่นใบมีขนาดใหญ่ สปอร์โรไฟต์ที่เจริญบนอาหารสูตร MS ที่เติมทั้ง BA และ NAA ทุกความเข้มข้นมีการแตกต้นใหม่จำนวนมากลักษณะต้นเล็กใบเปราะ และมีการเกิดแคลลัสร่วมด้วยแคลลัสมีสีน้ำตาล (รูปที่ 4)

สปอร์โรไฟต์เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่มีโครโมโซมเป็น ดิพลอยด์ (2n) เป็นต้นจริงที่มีการเจริญของรากและต้น [1] การเจริญของสปอร์โรไฟต์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมฮอร์โมนพืชพบมีการเพิ่มจำนวนของสปอร์โรไฟต์ การเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีปริมาณของแร่ธาตุในอาหารมีมากพอที่จะชักนำให้สปอร์ไฟต์เกิดการแบ่งเซลล์สร้างต้นใหม่ได้ สปอร์โรไฟต์ที่เจริญบนอาหารที่มีฮอร์โมนพืชจะมีการเจริญที่แตกต่างกันออกไป เพราะฮอร์โมนพืชแต่ละชนิดจะมีผลกระตุ้นการเจริญของพืชที่แตกต่างกัน โดยออกซินมีผลชักนำให้เกิดการเจริญของรากส่วนไซโทไคนินมีผลต่อการชักนำให้เกิดเจริญของต้น [5] และเช่นเดียวกับ การทดลองเลี้ยงสปอร์โรไฟต์ของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS พบว่า เกิดการสร้างแคลลัสจำนวนมาก และสามารถนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้นสปอร์โรไฟต์ได้ โดยเติมฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ [10]

ตารางที่ 2 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของสปอร์โรไฟต์ของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านเมื่อเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน

ชนิดและปริมาณฮอร์โมนพืช (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของสปอร์โรไฟต์ (กรัม) ระยะเวลา (เดือน)				
	1	2	3	4	น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย
MS (ไม่เติมฮอร์โมนพืช)	0.11^{a}	0.33^{a}	2.13^{c}	2.82^{b}	1.35^{ab}
MS+NAA 0.1	0.16^{bc}	0.42^{ab}	1.91^{c}	2.59^{b}	1.27^{ab}
MS+NAA 0.2	0.17^{c}	0.62^{de}	1.97^{c}	2.43^{b}	1.30^{ab}
MS+BA 1.0	0.23^{d}	0.66^{def}	1.21^{a}	1.63^{a}	0.38^{a}
MS+BA 2.0	0.16^{bc}	0.46^{bc}	1.80^{bc}	2.43^{b}	1.21^{ab}
MS+BA:NAA 0.1:0.1	0.17^{c}	0.68^{efg}	2.20^{c}	2.74^{b}	1.45^{b}
MS+BA:NAA 0.2:0.2	0.27^{e}	0.85^{h}	1.48^{ab}	1.88^{a}	1.12^{ab}
MS+BA:NAA 0.1:0.2	0.12^{ab}	0.56^{cd}	2.05^{c}	2.59^{b}	1.33^{ab}
MS+BA:NAA 0.2:0.1	0.24^{de}	0.74^{fg}	1.44^{ab}	1.81^{a}	1.06^{ab}

* ตัวอักษรที่แตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ของสปอร์โรไฟต์ที่เจริญอยู่บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่างๆ

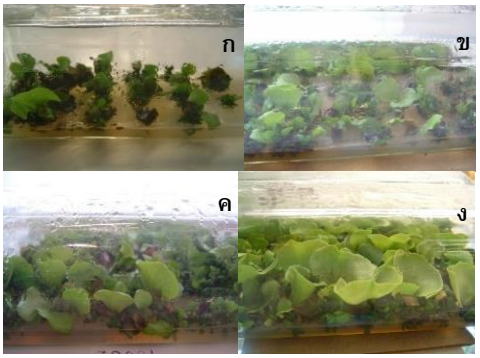


รูปที่ 4 การเจริญของสปอร์โรไฟต์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน (ก) สปอร์โรไฟต์ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม BA (ข) สปอร์โรไฟต์ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม NAA (ค) สปอร์โรไฟต์ที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม BA และ NAA (ง)

2. ศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงต่อการเจริญของต้นอ่อนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่าน

จากผลการทดลองพบว่าต้นอ่อนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านที่เจริญในความเข้มแสงที่กำหนด เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นโดยมีน้ำหนักสดของต้นเฟิร์นสูงขึ้นที่ทุกความเข้มแสง เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยทั้ง 4 เดือน ของต้นอ่อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละทรีตเมนต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นนั้นแปรผันตามความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้น ซึ่งความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ ต้นอ่อนเฟิร์นมีน้ำหนักต้นและขนาดต้นใหญ่มากที่สุด (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 5) คุณภาพของแสงมีผลต่อประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสงและการเจริญของเฟิร์น ความเข้มแสงที่เหมาะสมที่จะกระตุ้นให้โปรพลาสติดเจริญเป็นคลอโรพลาสต์ และประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ยังขึ้นอยู่กับคุณภาพของแสง [2] ดังนั้นต้นอ่อนเฟิร์นที่เจริญที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ จึงเจริญเติบโตได้ดีกว่าความเข้มแสงอื่นๆ ทั้งนี้ ในแกมี-

โทไฟต์ก็ยังพบว่ามีการเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 400 ft.-c [7] และความเข้มแสงที่เหมาะต่อการเจริญของเฟิร์นชายผ้าสีดาอย่างน้อยที่สุดคือ 100 ft หรือ 1,076 ลักซ์ โดยเฟิร์นชายผ้าสีดาไม่ต้องการความมืดในทุกระยะการเจริญเติบโต [9] การเจริญของเฟิร์น *Marsilea vestita* H. และ G. ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่ออยู่ในที่มืดหรือความเข้มแสงที่มากเกินไปจะมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเฟิร์น [8] ในสภาพธรรมชาติเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านมักจะพบที่คาคบไม้สูง ความสูงที่ระดับ 4-5 เมตรขึ้นไป [1] หรือเจริญบนคาคบไม้ใหญ่ที่ระดับความสูงต่างๆกัน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มแสงสูงถ้าเปรียบเทียบกับบริเวณอื่นในป่า [3] แสดงว่าเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านสามารถเจริญได้ดีในบริเวณที่มีความเข้มแสงสูง



รูปที่ 5 การเจริญของต้นอ่อนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ (ก) 2,000 ลักซ์ (ข) 3,000 ลักซ์ (ค) และ 4,000 ลักซ์ (ง)

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของต้นอ่อนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับความเข้มแสงระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 เดือน

ความเข้มแสง (ลักซ์)	น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น (กรัม)				
	ระยะเวลา (เดือน)				
	1	2	3	4	น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย
1,000	0.15^{ab}	0.87^{a}	3.28^{a}	4.61^{a}	1.88 ^{a}
2,000	0.11^{a}	1.00^{a}	3.81^{a}	5.45^{a}	2.02 ^{a}
3,000	0.12^{a}	0.95^{a}	3.80^{ab}	5.15^{a}	2.20 ^{a}
4,000	0.21^{b}	1.42^{a}	5.05^{b}	7.94^{b}	2.93 ^{b}

* ตัวอักษรที่แตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ของต้นอ่อนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านที่เจริญอยู่บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ความเข้มแสงต่างกัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแกมีโทไฟต์ของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านบนอาหารสังเคราะห์ พบว่า เฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านที่เจริญเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้น้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด และแกมีโทไฟต์เกิดแคลลัสจำนวนมาก ซึ่งสามารถนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้นสปอร์โรไฟต์ได้ โดยนำไปศึกษาต่อถึงปริมาณและชนิดของฮอร์โมนพืชที่เหมาะสม การเจริญของสปอร์โรไฟต์พบมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มมากที่สุดเมื่อเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม NAA:BA อัตราส่วน 0.1:0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ลักษณะการเจริญของสปอร์โรไฟต์ที่ได้ไม่สมบูรณ์ใบมีลักษณะต้นเล็กใบเปราะและมีแคลลัสเกิดร่วมด้วย โดยแคลลัสมีสีน้ำตาล การเจริญของสปอร์โรไฟต์นั้นพบการเจริญที่สมบูรณ์เมื่อเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมเพียง NAA โดยมีแผ่นใบขนาดใหญ่ นอกจากฮอร์โมนพืชจะมีผลต่อการเจริญของเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านแล้วความเข้มแสงก็มีผลต่อการเจริญของเฟิร์น

ชายผ้าสีดาสายผ้าม่านในสภาพปลอดเชื้อเช่นกัน โดยความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเฟิร์นมากที่สุด เนื่องจากน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มสูงที่สุด และจากการสังเกตพบว่าใบมีขนาดใหญ่สมบูรณ์มาก

ดังนั้นหากต้องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านในระยะแกมีโทไฟต์ ควรเลี้ยงในเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้เกิดแคลลัสและสามารถนำไปชักนำให้เกิดสปอร์โรไฟต์ได้ และในระยะสปอร์โรไฟต์ควรเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนก่อนเนื่องจากทำให้ได้ต้นใหม่จำนวนมากต้นเจริญดี แล้วจึงนำมาเลี้ยงต่อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม NAA เนื่องจากสปอร์โรไฟต์ที่ได้จะมีใบขนาดใหญ่สมบูรณ์และควรเลี้ยงที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์เพื่อให้ได้ต้นอ่อนเฟิร์นชายผ้าสีดาสายผ้าม่านสมบูรณ์มากขึ้นอีกก่อนที่จะนำออกไปอนุบาลต่อในโรงเรือน

เอกสารอ้างอิง

[1] จารุพันธ์ ทองแถม, ม.ล. และปิยเกษตร สุสถาน. 2550. **Ferns**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สารคดี.

[2] ปิยะดา ธีรกุลพิสุทธิ์. 2542. **สรีรวิทยาของพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

[3] ภัทรา แสงดานุช. 2549. **เฟินชายผ้าสีดา.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวนใ

[4] สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2552. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ โฟร์เพซ.

[5] George, F. E. 2008. Plant Tissue Culture Procedure-Background. (ed.) **Plant Propagation by Tissue Culture 3rd edition Volume 1. The Background**. Springer.http://www.springer.com/us/book/9781402050046. Accessed 14 September 2015.

[6] Fernandez, H. Bertrand A. M. and Sanchez-Tames, R. 1996. “Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. Affinis”. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 45: 93-97.

[7] Miller, H. J. and Miller, M. P. 1961. “The effect of different light conditions and sucrose on the growth and development of gametophyte on the fern, Onoclea Sensibilis”. American Journal of Botany. 48(2): 154-159.

[8] Mahlberg, G. P. and Yarus, S. 1977. “Effect of light, pH, temperature, and crowding on megaspore germination and sporophyte formation in Marsilea”. Journal of Experimental Botany. 28(5): 1137-1146.

[9] Vail, R. 1984. Platycerium hobbyist’s handbook. Arkansas: Desert Biological Publication.

[10] Siew – Haw, K. Yeow-Chin, W. Tit-Meng, C. and Prakash, P. K. 1997. “Morphogenetic plasticity of callus reinitiatiated from cell suspension cultures of the fern *Platycerium coronarium”.* **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 48: 37-44.

[11] Yue, K. L. and Yi, H. W. 2011. *“In vitro* propagation of *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C. chr. Via green globular body initiation”. **Botanical Studies**. 52: 455-463.