Agricultural Sci. J. 49 : 3 (Suppl.) : 154-159 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 3 (พิเศษ) : 154-159 (2561)

การชักนำให้เกิดยอดและรากของกาบหอยแครงในสภาพปลอดเชื้อ

Shoot and Root Induction in Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Soland. ex Ellis) Under Sterile Conditions

รัตนา ขามฤทธิ์[1*] และ นิภาพร กันภู[1]

Rattana Khamrit[1*] and Nipaporn Kanpoo[1]

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย จังหวัดเลย 42000

[1]Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University, Loei, Thailand 42000

*Corresponding author: Rattana_ing@yahoo.com

บทคัดย่อ

กาบหอยแครง (*Dionaea muscipula* Soland. ex Ellis) เป็นพืชกินแมลง นิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับเนื่องจากความสวยงามของกาบ แต่การขยายพันธุ์ต้นกาบหอยแครงในสภาพธรรมชาติยังให้ผลผลิตไม่ค่อยดี ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิดต้นและรากของกาบหอยแครง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาบหอยแครงจากชิ้นส่วนใบอ่อนบนสูตรอาหาร ½ MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน พบว่าชิ้นส่วนใบอ่อนของกาบหอยแครงเกิดต้นสูงสุดบนสูตรอาหาร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น 100 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยจำนวนต้น 33.00±3.78 ต้นต่อชิ้นส่วน และค่าเฉลี่ยจำนวนใบ 4.18±0.75 ใบต่อต้น เมื่อนำต้นกาบหอยแครงมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นกาบหอยแครงที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากับ 88.89 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 6.22±0.22 รากต่อต้น

คำสำคัญ: กาบหอยแครง, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ABSTRACT

Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Soland. ex Ellis) is a carnivorous plant. Due to its attractive trapping leaves, it is popularly cultivated as an ornamental plant. Unfortunately, propagation of Venus flytrap under natural conditions usually results in low yields. Therefore, this research was carried out to find the optimal medium for shoot and root induction in Venus flytrap. Young leaf explants of Venus flytrap were cultured on half-strength Murashige and Skoog (½ MS) solidified medium supplemented with 6-benzylaminopurine (6-BAP) at various concentrations (0, 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mg/L) for 90 days. The results revealed that the highest percentage (100) of shoot formation was observed on 6-BAP-free ½ MS medium, with an average of 33.00±3.78 shoots per explant and 4.18±0.75 leaves per shoot. The obtained shoots were transferred to ½ MS medium supplemented with various concentrations (0, 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mg/L) of naphthalene acetic acid (NAA) for 30 days for root induction. The ½ MS medium containing

0.5 mg/L NAA was most suitable for root induction, yielding 88.89% of root formation with an average number of 6.22±0.22 roots per shoot.

Keywords: Venus flytrap, plant tissue culture, plant growth regulator

บทนำ

กาบหอยแครง (Venus flytrap) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดบริเวณที่ราบชายฝั่งทะเลทางตะวันออกของสหรัฐอเมริกา ในพื้นที่ที่มีดินปนทราย พืชสกุลนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ *Dionaea muscipula* Soland. ex Ellis กาบหอยแครงจะพบในสิ่งแวดล้อมที่มีไนโตรเจนต่ำ เช่น หนองน้ำ หรือทุ่งหญ้าสะวันนาที่เปียกชื้น เป็นพืชกินสัตว์ที่ดักจับ และย่อยกินเหยื่อที่จับได้ซึ่งส่วนมากเป็นแมลง กาบหอยแครงเป็นพืชที่นิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ ปัจจุบันมีการพัฒนาสายพันธุ์จนมีความหลากหลายทั้งสี ขนาด และลักษณะซี่ฟัน (Sangdanuch and Dowænwe, 2008) ทำให้ความต้องการกาบหอยแครงเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งในการขยายพันธุ์ต้นกาบหอยแครงในสภาพธรรมชาติยังใช้วิธีการเพาะเมล็ดหรือปักชำใบ ซึ่งผลผลิตที่ได้ยังไม่ค่อยดีนัก (Wongchaochant and Phumphothong, 2015) ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากตามต้องการ

Wongchaochant and Phumphothong (2015) รายงานการนำยอดของต้นกาบหอยแครงมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS และ ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดกาบหอยแครงที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดใหม่สูงสุด 95.7 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนการชักนำให้เกิดรากของยอดที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS และ ½ MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีอัตราการเกิดรากมากกว่ายอดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มีการเติม BA นอกจากนี้ Jala and Phaithoon (2013) รายงานการนำเอากาบและใบอ่อนกาบหอยแครงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากาบหอยแครงสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร ½ MS ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อย้ายแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมอีก 3 ครั้ง ทุก ๆ 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสพัฒนาเกิดเป็นต้นและรากได้สูงสุด ในส่วนของ Jang et al. (2003) ศึกษาการการเพิ่มปริมาณยอดกาบหอยแครงบนอาหารสูตร MS ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า อาหารสูตร ⅓ MS มีการเพิ่มปริมาณยอดสูงสุด คือ 19.55 ยอด และมีอัตราการเกิดรากสูงสุด คือ 9.7 รากต่อต้น ในขณะที่ Yanthan et al. (2017) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Drosera burmannii* Vahl. ซึ่งเป็นพืชกินแมลง พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดสูงสุด คือ 28.8 ยอด และมีอัตราการเกิดรากสูงสุด คือ 9.7 รากต่อต้น

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ใบอ่อนกาบหอยแครงเกิดต้นและศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ต้นกาบหอยแครงเกิดราก เพื่อให้ได้ต้นกาบหอยแครงปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น และเป็นข้อมูลในการขยายพันธุ์พืชสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตกาบหอยแครงเพื่อการค้าต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ใบอ่อนกาบหอยแครงเกิดต้น

นำใบอ่อนของต้นกาบหอยแครงล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที จากนั้นล้างใบอ่อนกาบหอยแครงด้วยน้ำยาล้างจานเป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำไหลผ่านจนฟองหมด นำใบอ่อนกาบหอยแครงแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด เขย่าเป็นเวลา

15 นาที แล้วย้ายไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที นำใบอ่อนกาบหอยแครงมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นตัดให้ได้ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น จำนวนต้นต่อชิ้นส่วน และจำนวนใบต่อต้น วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว

การทดลองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ต้นกาบหอยแครงเกิดราก

นำต้นกาบหอยแครงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากต่อต้น และความยาวราก วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาการชักนำใบอ่อนของกาบหอยแครงให้เกิดต้น เมื่อเพาะเลี้ยงใบอ่อนของกาบหอยแครงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนกาบหอยแครงเจริญเป็นต้นได้ในอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Figure 1) โดยใบอ่อนของกาบหอยแครงเจริญไปเป็นต้นได้ดีที่สุดบนสูตรอาหาร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนต้นเฉลี่ย 33±6.55 ต้นต่อชิ้นส่วน และจำนวนใบต่อต้นเฉลี่ยสูงสุด 4.18±0.75 ใบต่อต้น (Table 1) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใบอ่อนของกาบหอยแครงได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นเองในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Wongchaochant and Phumphothong (2015) พบว่ายอดกาบหอยแครงที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดใหม่สูงสุด และ Jang et al. (2003) พบว่ายอดกาบหอยแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ⅓ MS มีการเพิ่มปริมาณยอดสูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดของชิ้นส่วนพืช อายุและระยะพัฒนาที่แตกต่างกันทำให้พืชมีการตอบสนองต่อสูตรอาหารได้แตกต่างกันแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกัน (Kaveeta, 1998) แต่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Haque et al. (2003) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของกระเทียม พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเกิดยอดได้สูงสุด 95.55 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Zayova et al. (2012) พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้แคลลัสมะเขือเกิดต้นได้สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 14.3±0.97 ยอดต่อแคลลัส ส่วนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ใบอ่อนกาบหอยแครงไม่สามารถเกิดต้นได้ สอดคล้องกับกับรายงานของ Buddharaksa and U-Kong (2011) พบว่ายอดอ่อนของมะคังขาวที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดใหม่ได้สูงสุด 4.2±0.3 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA เป็น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดใหม่กลับลดลง โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.6±0.2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น เนื่องจากความเข้มข้นของ BA ที่สูงจนเกินไปจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดใหม่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากในเนื้อเยื่อพืชมีฮอร์โมนไซโตไคนิน การเพิ่มไซโตไคนินจากภายนอกเข้าไปจะทำให้ปริมาณไซโตไคนินภายในเซลล์พืชสูงเกินไปจึงมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บางชนิดมากจนเกินไปส่งผลให้เกิดอันตรายต่อชิ้นส่วนพืชได้ (Mok and Mok, 1994)

การชักนำต้นของกาบหอยแครงให้เกิดรากบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าต้นกาบหอยแครงมีการเกิดรากในอาหารทุกสูตร สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดราก คือ ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Figure 2) โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 88.89 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนรากต่อต้นเฉลี่ยสูงสุด 6.22±0.22 รากต่อต้น ส่วนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม NAA ต้นกาบหอยแครงมีความยาวรากสูงสุด โดยมีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 0.58±0.08 เซนติเมตร (Table 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Somsong (2013) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำต้นอ่อนมันเสาให้เกิดรากได้มากที่สุด 3.41 ราก และอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ความยาวรากมากที่สุด 5.62 เซนติเมตร เช่นเดียวกับ Verma (2012) ทำการศึกษาผลของออกซินต่อการเกิดรากของเบญจมาศ พบว่า ต้นของเบญจมาศที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดรากได้สูงสุด 88.66 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนรากต่อต้นเฉลี่ยสูงสุด 11.77 รากต่อต้น ทั้งนี้เนื่องจาก NAA มีฤทธิ์ของออกซินสูง สามารถเคลื่อนย้ายภายในต้นได้ดี และสลายตัวช้าจึงสามารถชักนำการเกิดรากได้ดี และ NAA สามารถชักนำให้เกิดการแตกรากใหม่เพิ่มขึ้นได้ Buddharaksa and U-Kong (2011)

สรุป

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำชิ้นส่วนใบอ่อนของกาบหอยแครงให้เกิดต้นคือ สูตรอาหาร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ต้นกาบหอยแครงเกิดรากคือ สูตรอาหาร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ในการให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Buddharaksa, P. and W. U-Kong. 2011. Conservation and propagation *Taminadia uliginosa* Retz. and *Sauropus androgynus* (L.) Merr. by technique of *in vitro* culture. Naresuan University Journal. 19(3): 1-7. (in Thai)

Haque, M.S., T. Wada and K. Hattori. 2003. Shoot Regeneration and Bulblet Formation from Shoot and Root Meristem of Garlic Cv Bangladesh Local. Asian Journal of Plant Sciences. 2(1): 23-27.

Jala, A. and S. Phaithoon. 2013. Micropropagationof *Dionaea muscipula* by Tissue Culture. Thai Journal of Science and Technology. 2(2): 134-139. (in Thai)

Jang, G., K. Kim and R. Park. 2003. Micropropagation of Venus fly trap by shoot culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 72: 95–98.

Kaveeta, R. 1998. Plant tissue culture: principles and techniques. 2th edition. Faculty of agriculture, Kasetsart University, Bangkok. 219 pp. (in Thai)

Mok, D.W.S. and M.C. Mok. 1994. Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Inc., Florida.

Sangdanuch, P. and W. Dowænwe. 2015. Carnivorous Plant. Amarin Printing & Publishing Public Company Limited, Bangkok. (in Thai)

Somsong, U., W. Gorwattananon and S. Jamjang. 2013. Tissue Culture of *Dioscorea alata* L. The Sci J of Phetchaburi Rajabhat University. 10(1): 30-39. (in Thai)

Verma, O.P. 2012. Standardization of auxin concentration for root induction in *Chrysanthemum morifolium*. Adv. Appl. Sci. Res. 3(3): 1449-1453.

Wongchaochant, S. and S. Phumphothong. 2015. *In vitro* Micropropagation of Venus Flytrap (*Dionaea muscipula* Soland. ex Ellis). Proceedings of 53rd Kasetsart University Annual Conference: Plants, Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics. (in Thai)

Yanthan, J.S., M. Kehie, S. Kumaria and P. Tandon. 2017. In vitro regeneration of *Drosera burmannii* Vahl.: a carnivorous plant of north-east India. Biotech. 7: 124-128.

Zayova, E., R. Vassilevska-Ivanova, B. Kraptchev and D. Stoeva. 2012. Indirect shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). Journal of Central European Agriculture. 13(3): 446-457.

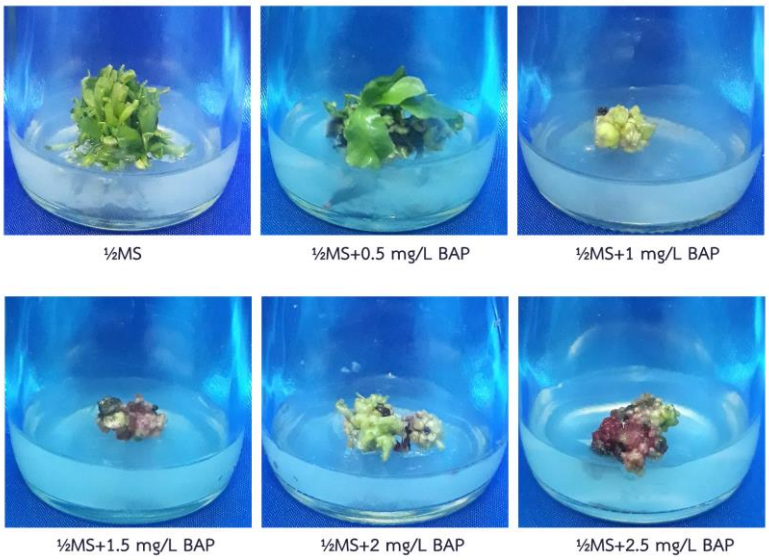

Figure 1 Growth of shoots of Venus flytrap regenerated on ½ MS medium supplemented with various concentrations of BAP for 90 days.

Figure 2 Growth of roots of Venus flytrap shoot cultured on ½ MS medium supplemented with various concentrations of NAA for 30 days.

Table 1 The effect of different concentrations of BAP on percentage of shoot formation, number of shoots per explant and number of leaves per shoot in the Venus flytrap.

BAP (mg/L)	percentage of shoot formation	number of shoots per explant (Mean±SE)	number of leaves per shoot (Mean±SE)
0	100	33.00±3.78[a]	4.18±0.75[a]
0.5	100	14.66±3.75[b]	4.15±0.38[a]
1	0	0.00±0.00[c]	0.00±0.00[b]
1.5	0	0.00±0.00[c]	0.00±0.00[b]
2	0	0.00±0.00[c]	0.00±0.00[b]
2.5	0	0.00±0.00[c]	0.00±0.00[b]

Means followed by the same letters within the same column are not significantly different at $p \leq 0.05$.

Table 2 The effect of different concentrations of NAA on percentage of root formation, number of roots and root length in the Venus flytrap.

NAA (mg/L)	percentage of root formation	number of roots (Mean±SE)	root length (cm) (Mean±SE)
0	88.89	3.22±0.40[bc]	0.58±0.08[a]
0.5	88.89	6.22±0.22[a]	0.31±0.11[b]
1	77.78	3.22±0.45[bc]	0.27±0.07[b]
1.5	44.44	1.56±0.73[c]	0.10±0.51[b]
2	77.78	3.89±1.35[b]	0.25±0.04[b]
2.5	33.33	1.11±0.11[c]	0.16±0.03[b]

Means followed by the same letters within the same column are not significantly different at $p \leq 0.05$.