

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของแอมโมเนียมไนเตรท และความชื้นสัมพัทธ์ ต่ออาการน้ำท่วม
ในการเพาะเลี้ยงยอดยูคาลิปตัส ลูกผสม*(Eucalyptus camaldulensis Dehnh. X Eucalyptus pellita F. Muell.)*Effect of Ammonium Nitrate and Relative Humidity on Hyperhydricity in
In Vitro Shoot Cultures of Eucalyptus Interspecific Hybrid
*(Eucalyptus camaldulensis Dehnh. X Eucalyptus pellita F. Muell.)*รัฐภูมิ รวมอัญมณี^{1,2*}Rattapum Roumunyamanee^{1,2*}สมคิด สิริพัฒน์ดิolk²Somkid Siripatanadilok²สุธีร์ ดวงใจ²Sutee Duangjai²¹บริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด 99 ม. 6 ต.วังศาลา อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี 71130

Siamforestry Co., Ltd 99 Moo 6 Wangsala, Thamuong, Kamjanaburi 71130, Thailand

²คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Faculty of Forestry, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding Author, E-mail: rattapur@scg.co.th

รับต้นฉบับ 22 มกราคม 2559

รับลงพิมพ์ 14 มีนาคม 2559

ABSTRACT

In vitro shoot cultures of Eucalyptus interspecific hybrid (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. X *Eucalyptus pellita* F. Muell.) have hyperhydricity problem in process therefore experimenting of suitable medium formula. A 3×4 in factorial designs in RCBD with two factors namely, ammonium nitrate concentration at three level (82.5 mg l⁻¹, 165 mg l⁻¹ and 330 mg l⁻¹) and four levels of filter (0, 1, 2 and 3 pore) to create different relative humidity. After four weeks, record relative humidity, hyperhydricity rate and number of shoots were record, One week after subculture to root induction medium root induction rate, quantity of root and root elongation were record.

The results showed that root elongation was significantly influenced by ammonium nitrate. Hyperhydricity rate, number of shoots, root induction rate, quantity of root and survival rate were significantly influenced by relative humidity, Number of shoots were decreased when relative humidity was decrease. Subculturing hyperhydricity shoot into root induction medium caused undeveloped or poor root and the plant died when applied to transplanting it died.

Analysis of data showed that treatment MS₉ had ammonium nitrate 82.5 mg l⁻¹ and relative humidity 78.66% as the treatment best of low hyperhydricity rate, many shoot, high root induction rate and many number of root. Reduction of ammonium nitrate concentration to half of the standard formula at 82.5 mg l⁻¹ can reduce production costs of seedlings.

Keywords: *In vitro* shoot, hyperhydricity, eucalyptus, relative humidity, ammonium nitrate

บทคัดย่อ

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยูคาลิปตัสลูกผสม มักจะพบปัญหาอาการน้ำท่วม (hyperhydricity) เป็นประจำ ซึ่งอาการน้ำท่วมดังกล่าวส่งผลทำให้ยอดไม่แข็งแรง ชักน้ำให้เกิดรากยาก เมื่อย้ายปลูกจะมีอัตราการรอดตายน้อย โดยปัจจัยหลักที่ส่งผลทำให้เกิดอาการน้ำท่วมได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน และ ความชื้นสัมพัทธ์ในขวดเพาะเลี้ยง จึงได้วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (3×4 in factorial designs in RCBD) โดยปรับปริมาณไนโตรเจนโดยใช้แอมโมเนียในเตรท 3 ระดับ (82.5, 165 และ 330 มิลลิกรัมต่อลิตร) และปรับความชื้นสัมพัทธ์โดยใช้รุกรองอากาศ 4 ระดับ (0, 1, 2 และ 3 รู) ทำการเพาะเลี้ยงด้วยสูตร MS คัดแปลง เพื่อเพิ่มปริมาณยอด เก็บข้อมูลความชื้นสัมพัทธ์ในขวดเพาะเลี้ยง อัตราการน้ำท่วม และการให้ยอด หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเพื่อชักน้ำให้ยอดช่อดำ และทำการชักน้ำให้เกิดราก เก็บข้อมูลอัตราการออกราก จำนวนราก และความยาวราก

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณแอมโมเนียในเตรทส่งผลต่อความยาวราก และจำนวนรุกรองอากาศส่งผลต่อจำนวนยอด อัตราการน้ำท่วม ความชื้นสัมพัทธ์ อัตราการออกราก จำนวนราก ความยาวราก อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยเฉพาะความชื้นสัมพัทธ์ และจำนวนยอด จะลดลงเมื่อจำนวนรุกรองอากาศมากขึ้น นอกจากนี้ยอดที่มีอาการน้ำท่วมจะไม่เกิดรากหรือเกิดรากแต่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งการทดลองที่มีประสิทธิภาพที่สุดได้แก่ ปริมาณแอมโมเนียในเตรท 82.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และรุกรองอากาศ 2 รู (ความชื้นสัมพัทธ์ 78.66 %) เนื่องจากมีอาการน้ำท่วมต่ำและมีปริมาณการเพิ่มยอดที่ดี เมื่อนำไปชักน้ำให้เกิดรากมีอัตราการออกรากสูง และจำนวนรากมาก นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนในการผลิตกล้าไม้ยูคาลิปตัสลูกผสมลงได้เนื่องจากใช้ปริมาณแอมโมเนียในเตรทลดลงจากสูตรปกติ 1 เท่า

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การน้ำท่วม ยูคาลิปตัส ความชื้นสัมพัทธ์ แอมโมเนียในเตรท

คำนำ

ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus spp.*) เป็นพรรณไม้ต่างถิ่น (exotic specie) ที่ประเทศไทยนำเข้ามาจากประเทศออสเตรเลียเพื่อนำมาปลูกเป็นไม้เศรษฐกิจสามารถเติบโตได้ในเกือบทุกสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ ของประเทศไทย เนื้อไม้ยูคาลิปตัสจึงเป็นวัตถุดิบที่สำคัญของอุตสาหกรรมชิ้นไม้สับและเชื้อกระดาษ จากการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามชนิดพันธุ์ ด้วยการนำ *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. ที่มีข้อดีคือปลูกได้อย่างกว้างขวางในประเทศและทนแล้งได้ดี มาผสมพันธุ์กับ *E. pellita* F.Muell. ที่มีข้อดีคือทนทานต่อโรคและแมลงมาผสมพันธุ์จนเป็นพันธุ์ลูกผสมแล้วนำมาขยายจำนวนในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) แต่ปัญหาดินอ่อนของยูคาลิปตัสลูกผสมที่นำมาเลี้ยงภายในขวดใช้อาหารพื้นฐานสูตร MS (Murashige and Skoog

medium) มีอาการน้ำท่วม (hyperhydricity) เมื่อทำการขยายเพิ่มจำนวน จะทำให้ดินอ่อนยูคาลิปตัสที่เลี้ยงมีอาการใบซีด (chlorosis) และตายในที่สุด

อาการน้ำท่วมเป็นอาการผิดปกติทางสรีรวิทยาของพืชที่เกิดจากความเครียด (stress) เกิดจากการได้รับฮอร์โมนและธาตุอาหารมากเกินไปหรือน้อยเกินไป เกิดความไม่สมดุลของอาหารและฮอร์โมน การได้รับแสงน้อยเกินไป (Cassells and Curry, 2001) ความเข้มข้นของวุ้นดำแอมโมเนียในอาหารมีปริมาณที่สูง (Franck *et al.*, 2004) อาการน้ำท่วมมีผลกระทบต่อพืช คือการทำหน้าที่ของปากใบ (stomata) ผิดปกติและความแข็งแรงของเซลล์ลดลง ผลที่ตามมาคือการรอดตายของพืชจากการย้ายชำออกนอกขวดเลี้ยงน้อยมากหรือโอกาสรอดตายเป็นศูนย์ (Kei-ichiro *et al.*, 1998) โดยทั่วไปอาการของการน้ำท่วม คือใบมีลักษณะโป่งแสงเกิดจากคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ลดลงหรือมีจำนวน

น้อย และปริมาณน้ำในเซลล์สูง มีการขาดของชั้นคิวติเคิล (cuticle) หรือมีชั้นคิวติเคิลบางลง เซลล์ด้อยการพัฒนาและพบว่าช่องว่างภายในเซลล์มีขนาดใหญ่ ในชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll) เป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบจากอาการน้ำท่วม (Cassells and Curry, 2001)

ปัญหาการนำน้ำที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกสูตรอาหารสังเคราะห์ สาเหตุการเกิดอาการน้ำท่วมมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง หลายกรณียังไม่สามารถตอบได้ว่าการเกิดอาการน้ำท่วมดังกล่าวเกิดจากสาเหตุใด (Gribble *et al.*, 1998) การแก้ไขอาการน้ำท่วมต้องแก้ตามปัจจัยที่ก่อให้เกิดอาการหรือบางกรณีเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน มีการทดลองการแก้ปัญหาอาการน้ำท่วมของพืชหลายชนิด โดยวิธีการแก้ปัญหาจะแตกต่างกันทั้งขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ก่อให้เกิดอาการน้ำท่วม เช่น การเพิ่มปริมาณวุ้นในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของคาร์เนชั่น (Sadhy *et al.*, 2005, Casanova *et al.*, 2008) แอปริคอต (*Prunus armeniaca*) (Tornero *et al.*, 2001) การเพิ่มรูระบายอากาศเพื่อให้อากาศจากภายนอกขวดผ่านเข้ามาในขวดได้ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Scrophularia yoshimura* (Lai *et al.*, 2005) และความสมดุลของฮอร์โมน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือยาว (Edgard *et al.*, 2001) ยูคาลิปตัส (Whitehouse *et al.*, 2002) คาร์เนชั่น (Manoj *et al.*, 2003) เป็นต้น

ในการศึกษาผลของแอมโมเนียมไนเตรทและความชื้นสัมพัทธ์ต่อการนำน้ำของยูคาลิปตัสลูกผสมสายต้น H20 มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสาเหตุและปัจจัยของอาการน้ำท่วมและพัฒนาสูตรอาหารเพื่อลดอาการน้ำท่วมในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อุปกรณ์ และวิธีการ

สายต้น (clone) ยูคาลิปตัสที่ศึกษา

ใช้สายต้นของยูคาลิปตัส 1 สายต้น คือ H20 เป็นยูคาลิปตัสลูกผสมข้ามชนิด *E. camaldulensis* Dehnh. x *E. pellita* F. Muell. ที่พบอาการน้ำท่วมในกระบวนการผลิตภายในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของบริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ แฟกทอเรียล (3 × 4 in factorial designs in RCBD) มี 2 ปัจจัย โดยปัจจัยแรกคือปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท และปัจจัยที่สองคือจำนวนรูกรองอากาศ (0, 1, 2 และ 3 รู) โดยจัดวางขวดเลี้ยงของแต่ละชุดการทดลอง (treatment) เป็นแถวแบบสุ่มแต่ละแถววางขนานตามความยาวของหลอดไฟ โดยมี 3 แถว บนแต่ละชั้นเลี้ยง แถวที่ 1 ได้รับความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ แถวที่ 2 ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และ แถวที่ 3 ได้รับความเข้มแสง 3,100 ลักซ์ ให้แสง ได้รับแสง ระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในหนึ่งชุดการทดลองมี 15 ขวด ใส่ชิ้นพืช 2 ชิ้นต่อขวด ให้หนึ่งชุดการทดลองเท่ากับ 1 ชั่วโมงทำการทดลอง 3 ชั่วโมง

วิธีการ

ทำการขยายยอดด้วยการตัดแบ่งชิ้นพืช (explants) ลงในสูตรอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP (6-benzylaminopurine) 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kinetin (N6-furfuryladenine) 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, D-cal-pan 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Biotin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นตัดแต่งและย้ายชิ้นพืชลงสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 82.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, 165 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 330 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละปริมาณใช้ฝาที่ถูกเจาะรู 4 แบบ 0, 1, 2 และ 3 รู แต่ละรูมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตรและหุ้มรูด้วยกระดาษทิชชู โดยมีตำแหน่งของรูดังแสดงใน Figure 1 เลี้ยงในขวดเจาะรูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นตัดยอดย้ายทั้งหมดย้ายไปลงอาหารสูตร G₄₀ ที่ประกอบด้วย MS basal 1 ลิตร + GA (gibberellic acid) 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร + ผงถ่าน 3 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงทำการตัดยอดทั้งหมดย้ายไปออกรากในอาหารสูตร MS basal 1 ลิตร + NAA (1-naphthaleneacetic acid) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่ใช้ฝาแบบปกติไม่เจาะรู

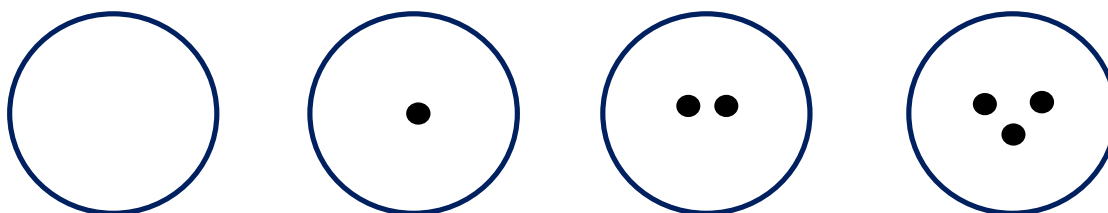


Figure 1 Number of pores diameter 2 mm. made on bottle covers.

การเก็บข้อมูล

การบันทึกข้อมูลในการทดลอง ทำการบันทึกอัตราการขยายจำนวนยอด อัตราการนำน้ำ และใช้เครื่องวัดความชื้น (ยี่ห้อ smart sensor รุ่น AR847) วัดความชื้นสัมพัทธ์ภายในขวด บันทึกผลในสัปดาห์ที่ 4 อัตราการเกิดราก จำนวนรากต่อชิ้น และใช้เวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (ยี่ห้อ MITUTOYO รุ่น 530-312) วัดความยาวราก บันทึกหลังจากนำยอดย้ายลงอาหารชกนักราก 7 วัน ส่วนจำนวนวันที่อาหารแห้งให้บันทึกเมื่อพบว่าอาหารแห้งจนติดกันขวด

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทและจำนวนรูกรองอากาศ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และวิเคราะห์ความต่างระหว่างค่าเฉลี่ยตามวิธีการ Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลและวิจารณ์

ผลของแอมโมเนียมไนเตรท

การขยายยอด

จากการวิเคราะห์อัตราการขยายยอดของยอดยูคาลิปตัสที่เลี้ยงในอาหาร MS คัดแปลงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แต่ละชุดการทดลองพบว่าปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทในอาหารมีอิทธิพลต่อการให้ยอด อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.059$) โดยที่ปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรท 330 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 13.51 ± 1.53 ถึง 14.31 ± 2.1 ยอดต่อขวด มีความสม่ำเสมอของยอดมากกว่าและมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า ชุดทดลองที่มีแอมโมเนียมไนเตรท 165 และ 82.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 1)

อัตราการนำน้ำ

ภายหลังการทดลองได้ 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทในอาหารมีอิทธิพลต่อการนำน้ำของเนื้อเยื่ออย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.76$) โดยที่ปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทที่ระดับ 165 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการนำน้ำเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ในช่วงระหว่าง 8.89 % ถึง 37.77 % (Table 1)

Table 1 Number of shoots and hyperhydricity rate of *in vitro* shoots of Eucalyptus interspecific hybrid H20 under difference NH_4NO_3 concentrations and number of filtered pores.

Treatment	NH_4NO_3 (g l^{-1})	No. of pores	% Relative humidity	No. of shoots/ bottle	% Hyperhydricity	Medium drying (day)
MS _c 1	330	1	81.96±1.47	14.04±0.32	19.99	60
MS _c 2	330	2	79.33±0.57	14.31±2.10	8.89	42
MS _c 3	330	3	73.50±2.27	13.51±1.53	8.89	21
MS _c 4	330	0	100	13.82±3.44	28.89	90
MS _c 5	165	1	81.26±0.40	14.17±2.30	8.89	60
MS _c 6	165	2	76.83±0.15	13.48±1.78	8.89	42
MS _c 7	165	3	73.46±0.72	12.35±1.81	8.89	21
MS _c (control)	165	0	100	13.17±2.96	37.77	90
MS _c 8	82.5	1	81.66±0.15	14.53±3.03	17.77	60
MS _c 9	82.5	2	78.66±2.13	13.55±1.75	8.89	42
MS _c 10	82.5	3	75.30±1.15	13.84±1.76	8.89	21
MS _c 11	82.5	0	100	12.66±2.14	24.44	90
P - value						
NH ₄ NO ₃			0.74 ^{ns}	0.059 ^{ns}	0.76 ^{ns}	
Filter			0.0001**	0.004**	0.0001**	
NH ₄ NO ₃ x Filter			0.23 ^{ns}	0.75 ^{ns}	0.02 ^{ns}	

Notes: ^{ns}: non-significant different at p-value ≥ 0.05 ; **: highly significant different at p-value < 0.01

ผลของปริมาณรุกรองอากาศที่ฝาปิดขวดต่อ ความชื้นสัมพัทธ์

ความชื้นสัมพัทธ์

ภายหลังการทดลองได้ 4 สัปดาห์ พบว่า จำนวนรุกรองอากาศมีอิทธิพลต่อความชื้นสัมพัทธ์ ภายในภาชนะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ทางสถิติ ($p < 0.0001$) โดยชุดการทดลองที่ไม่มีรุกรองอากาศ ซึ่งเป็นชุดทดลองควบคุมมีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยมากที่สุดคือ 100 % และชุดการทดลองที่มีรุกรองอากาศ 3 รู มีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยน้อยที่สุดอยู่ในช่วงระหว่าง 73.46 – 75.30 % (Table 1) จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อมีจำนวนรุกรองอากาศมากเท่าไร ความชื้นสัมพัทธ์ยิ่งลดน้อยลง และมีผลต่อความแห้งของอาหาร พบว่า ชุดการทดลองที่มีความชื้นสัมพัทธ์

73.46 – 75.30 % อาหารสังเคราะห์ที่แห้งลงอย่างรวดเร็วเพียง 21 วัน ชุดการทดลองที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 76.83 – 79.33 % อาหารสังเคราะห์ที่แห้งลงภายใน 42 วัน ชุดการทดลองที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 81.26 – 81.96 % อาหารสังเคราะห์ที่แห้งลงภายใน 60 วัน และชุดการทดลองที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100% อาหารเพาะเลี้ยงแห้งลงภายใน 90 วัน (Table 1) อาหารสังเคราะห์ที่แห้งลงอย่างรวดเร็วส่งผลต่อขึ้นพืช ทำให้ขึ้นพืชแห้งตามไปด้วยโดยเริ่มที่ใบจะแห้งเป็นสีน้ำตาล จนในที่สุดแห้งตายทั้งต้น

สำหรับรุกรองอากาศ พบว่าการใช้งานจริงเกิดความไม่สะดวกในการใช้งาน และมีข้อเสียหลายประการคือ การคายพิษเมื่อโดนความชื้นจะเปื้อนง่าย และทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย นอกจากนี้ก่อนการใช้งานต้องนำพิษและอุปกรณ์ไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้ว

นำมาเปลี่ยนในตู้ปลอดเชื้อ เกิดการทำงานหลายขั้นตอน ไม่สะดวกต่อผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้นจึงเห็นสมควรต่อยอด การทดลองนี้ต่อไป

การขยายยอด

ภายหลังการทดลองได้ 4 สัปดาห์พบว่าจำนวน รูกรองอากาศมีอิทธิพลต่ออัตราการขยายยอดอย่างมี นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยชุดการทดลองที่มี รูกรองอากาศ 1 รู มีอัตราการขยายยอดเฉลี่ยมากที่สุด อยู่ในช่วงระหว่าง 14.04 – 14.53 ยอดต่อขวด และชุดการ ทดลองที่มีรูกรองอากาศ 3 รู มีอัตราการขยายยอดเฉลี่ย น้อยที่สุดอยู่ในช่วงระหว่าง 12.35 – 13.51 ยอดต่อขวด (Table 1) จากผลการทดลองพบว่าอากาศถ่ายเทมากขึ้น จำนวนยอดจะลดลง Zabayed *et al.* (2001) ได้รายงาน ว่า อากาศที่ถูกถ่ายเทมากเกินไปจะมีผลเสียต่อจำนวน ยอดที่เพิ่มขึ้นและรูปแบบของยอด และรายงานของ Lai *et al.* (2005) กล่าวว่า การที่น้ำในอาหารสามารถระเหย ผ่านรูกรองอากาศพร้อมก๊าซต่างๆ จะมีอิทธิพลต่อการ ตอบสนองทางกายภาพ และเป็นเครื่องมือลดอาการ น้ำเน่าลงได้อย่างไรก็ตามอัตราการขยายจำนวนยอดลด ลงต่อขวดตามการแพร่ของก๊าซ

จากการสังเกตพบว่า ตัวอย่างในชุดทดลอง ที่ไม่มีรูกรองอากาศ เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์จะสังเกตเห็น ก้อนเนื้อเยื่อคล้ายแคลลัส ที่บริเวณ ใบ ยอด และ ลำต้น แต่ในตัวอย่างในชุดทดลองที่มีรูกรองทั้งสาม ชุดการทดลองไม่พบหรือพบน้อยมาก เมื่อเวลาผ่านไป ก้อนเนื้อเยื่อคล้ายแคลลัสจะขยายใหญ่จนปกคลุมยอด ใบ และลำต้น และจะแห้งตายในที่สุด ในการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อยูคาลิปตัส Roux and Van (1991) พบปัญหา ที่เกิดระหว่างการเพาะเลี้ยงยูคาลิปตัส โดยยูคาลิปตัสที่เพาะเลี้ยงนั้นมักมีการผลิตก้อนแคลลัสสี ขาวคล้ายน้ำตาล ปรากฏอยู่ที่ผิวใบ ลำต้น และแกนใบ พบในยูคาลิปตัสหลายชนิด ได้แก่ *E. dalrympleana*, *E. delagatensis*, *E. ficifolia*, *E. grandis*, *E. regnans* และ *E. gunnii* แคลลัสนี้เริ่มพัฒนามาจากรอยต่อของ

เนื้อเยื่อบริเวณก้านใบ และเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นจนปิดทับ ตาข้าง เป็นผลให้พืชทั้งใบ และเกิดการเสื่อมสภาพของ ยอดและกิ่งข้าง

อัตราการนำน้ำ

จำนวนรูกรองอากาศที่เจาะบนฝาและปิดด้วย กระจกยทึบมีอิทธิพลต่ออัตราการนำน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ยิ่งทางสถิติ ($p < 0.0001$) โดยชุดการทดลองที่มีรูกรอง อากาศ 2 และ 3 รู อัตราการนำน้ำเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 8.89 % และชุดการทดลองที่ไม่มีรูกรองอากาศ ซึ่งเป็นชุดทดลอง ควบคุมมีอัตราการนำน้ำเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ในช่วงระหว่าง 24.44 – 37.77 % (Table 1) จากผลการทดลองแสดง ว่าการเลี้ยงยอดยูคาลิปตัส เมื่อมีรูกรองอากาศ อัตราการ นำน้ำลดลง สอดคล้องกับรายงาน Read (1990) การมี รูถ่ายเทอากาศจะลดความชื้นสัมพัทธ์ในภาชนะเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด และลดอัตราการนำน้ำ ลง รายงานของ Debergh and Maene (1984) กล่าวว่า การจำกัดการแลกเปลี่ยนก๊าซภายในภาชนะเพาะเลี้ยง ทำให้พืชเติบโตช้าเป็นสาเหตุของรูปแบบเนื้อเยื่อที่ ผิดปกติและเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ รายงานของ Lai *et al.* (2005) กล่าวว่าหลังจากเปิดให้มีรูระบายให้ อากาศถ่ายเทไปมาระหว่างภายในและภายนอกภาชนะ เพาะเลี้ยง ชื้นพืชไม่ปรากฏอาการนำน้ำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพภาชนะถูกปิด ทำให้อากาศภายในภาชนะไม่ได้รับการถ่ายเทส่งผลให้ ความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่าปกติเมื่อเทียบกับอากาศภายนอก ขวด และภายในภาชนะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังพบ ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ ในช่วงเวลากลางวัน การสะสม ของก๊าซเอทิลีน (ethylene) และสารพิษอื่นๆ (Kozai *et al.*, 1992) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถูกปล่อยออกมาใน ปริมาณมากจากกระบวนการต่างๆของพืชที่ใช้ใน ขบวนการพัฒนาและเติบโต มีผลต่อกระบวนการคายน้ำ และการสังเคราะห์แสง รวมถึงกระตุ้นการสังเคราะห์ ก๊าซเอทิลีนมากขึ้นด้วย (Grodzinski *et al.*, 1981) การ สะสมของก๊าซเอทิลีนในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีผล

ไปยับยั้งการเติบโตและพัฒนาการ เพิ่มอัตราการงอกน้ำ และลดปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ใบ (Zobayed *et al.*, 2000) จากการสังเกตชันพืชที่มีอาการงอกน้ำ พบว่าลักษณะ

ทางกายภาพ มีใบบาง ใส และบิดม้วนเข้าหากกลางใบ ลำต้นโปร่งสีเขียว และอวบน้ำ แตกต่างกับชันพืช ปกติอย่างเห็นได้ชัด (Figure 2)



A

B

Figure 2 *In vitro* shoot of the interspecific hybrid H20A. Hyperhydricity shoot B. normal shoot.

การชักนำยอดให้ยืดยาว

ภายหลังจากการทดลองอาหารที่มีระดับ แอมโมเนียมไนเตรท และจำนวนรูกรองอากาศต่างๆ กันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำชันพืชทั้งหมดย้ายลงอาหาร ชักนำพืชให้ยืดยาวพบว่า ชันพืชที่มีอาการงอกน้ำ และ

ชันพืชปกติสามารถยืดยาวได้ปกติ แต่ชันพืชที่มีอาการ งอกน้ำจะมีลำต้นโปร่งแสง ใบโปร่งแสงและม้วนพับ เข้าหาเส้นกลางใบ มีความห่างระหว่างข้อใบ แตกต่าง จากชันพืชที่ปกติ ที่ใบมีขนาดใหญ่ ลำต้นไม่โปร่งแสง และมีสุขภาพดี (Figure 3)



A

B

Figure 3 *In vitro* shoot of the interspecific hybrid H20 in GA40 medium. A. Hyperhydricity shoot B. normal shoot.

การชักนำให้เกิดราก

อัตราการเกิดราก

ภายหลังจากการย้ายชิ้นพืชลงอาหารชักนำให้ให้ช่อดอกแล้ว นำชิ้นพืชทั้งหมดย้ายลงอาหารชักนำให้เกิดราก นาน 1 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นพืชที่มีอัตราการเกิดรากสูงสุด คือ ชิ้นพืชที่มาจากชุดการทดลอง MS₅, MS₇ และ MS₁₀ มีอัตราการเกิดรากมากที่สุด คือ 100% รองลงมา คือชุดการทดลอง MS₁, MS₂, MS₃, MS₄ และ MS₉ มีอัตราการเกิดราก คือ 96.67% (Table 2) จากการทดลองชุดการทดลองที่รูกรองอากาศพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การออกราก มากกว่าชุดการทดลองควบคุม มีอัตราการเกิดราก 86.67 % และชุดทดลองควบคุมมีอัตราการงอกสูงกว่าชุดการทดลองที่มีรูกรองอากาศ สอดคล้องกับรายงานของ Roux and Van (1991) พบว่า ชิ้นพืชที่นำน้ำชักนำให้ ออกรากได้ยาก และมีโอกาสที่ชิ้นพืชจะตาย ในการทดลองพบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนพืชที่มีอาการงอกไปเลี้ยงในอาหารชักนำราก นาน 1 สัปดาห์ ไม่เกิดราก หรือเกิดรากไม่สมบูรณ์ เมื่อนำไปย้ายชำกล้าจะตายแต่ในทางปฏิบัติจริง จะมีการคัดเลือกยอดที่สมบูรณ์ปราศจากการงอก นำไปทำการย้ายลงอาหารออกรากต่อไป

จำนวนราก

จากการทดลองเลี้ยงยอดในอาหารชักนำราก นาน 1 สัปดาห์ชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแอมโมเนียมและจำนวนรูกรองอากาศต่างกัน พบว่า แอมโมเนียมไนเตรทมีอิทธิพลต่อจำนวนรากอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.276$) ส่วนรูกรองอากาศมีอิทธิพลต่อจำนวนรากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.0001$) โดยชิ้นพืชที่มาจากชุดการทดลอง MS₉ มีจำนวนรากมากที่สุดเฉลี่ยต่อยอด 5.73 ราก รองลงมาคือชุดการทดลองที่มี MS₂, MS₃ และ MS₁₀ มีจำนวนรากเฉลี่ยต่อยอด 5.33, 5.30 และ 5.27 ราก ตามลำดับ (Table 2)

ความยาวราก

ปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทและจำนวนรูกรองอากาศมีอิทธิพลต่อความยาวรากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.0001$) โดยความยาวเฉลี่ยของรากมากที่สุดคือ 5.97 มิลลิเมตร มาจากชิ้นพืชที่มาจากชุดการทดลอง MS₁ รองลงมาคือ 5.32 มิลลิเมตรมาจากชุดการทดลอง MS₃ (Table 2)

Table 2 Roots induction rate, quantity of roots and root elongation from *in vitro* shoots eucalyptus interspecific hybrid under difference NH_4NO_3 and filtered pores after tranformed into root induction medium.

Shoots from treatment	NH_4NO_3 (g l^{-1})	No. of pores	Rooted shoot (%)	Root length ¹ (cm.)	No. of root ¹
MS _c 1	330	1	96.67	5.97±2.06a	4.10±0.99cd
MS _c 2	330	2	96.67	3.65±1.07ef	5.33±2.32ab
MS _c 3	330	3	96.67	5.32±1.24ab	5.30±1.62ab
MS _c 4	330	0	96.67	3.67±1.02ef	4.33±1.32cd
MS _c 5	165	1	100	4.12±1.34de	5.00±1.26abc
MS _c 6	165	2	93.3	3.22±0.94f	4.50±1.35bcd
MS _c 7	165	3	100	2.55±0.66g	4.13±1.61cd
MS _c (control)	165	0	86.67	3.55±1.23ef	3.83±0.95d
MS _c 8	82.5	1	93.3	3.55±1.91ef	4.70±1.68bcd
MS _c 9	82.5	2	96.67	4.87±1.21bc	5.73±2.03a
MS _c 10	82.5	3	100	4.60±1.35cd	5.27±2.10ba
MS _c 11	82.5	0	86.67	4.45±0.98cd	3.80±1.58d
P - value					
NH_4NO_3			0.647 ^{ns}	0.0001**	0.276 ^{ns}
Filter			0.003**	0.0001**	0.004**
NH_4NO_3 x Filter			0.890 ^{ns}	0.0001**	0.0001**

Notes: ^{ns}: non-significant different at p-value ≥ 0.05 ; **: highly significant different at p-value < 0.01

^{1/} The same characters appear in the same column means that there is non-significantly difference at 95% by DMRT

สรุป

ปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรท 330 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 13.51±1.53 ถึง 14.31±2.1 ยอดต่อขวด รองลงมาคือปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรท 82.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดทดลองที่มีแอมโมเนียมไนเตรท 165 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยอยู่ในช่วงน้อยที่สุด ซึ่งแอมโมเนียมไนเตรท 330 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสม่ำเสมอของยอดมากกว่าเพราะมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า ในชุดทดลองที่มีแอมโมเนียมไนเตรท 165 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการงอกน้ำเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ในช่วงระหว่าง 8.89% ถึง 37.77% ส่วน ปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรท 82.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการงอกน้ำเฉลี่ยน้อยที่สุดอยู่ในช่วงระหว่าง 8.89 % ถึง 24.44 %

จากจำนวนรูกรงอากาศที่ฝาปิดขวดมีผลต่อการพัฒนาของยอดยูคาลิปตัส ชุดการทดลองที่มีรูกรงอากาศ 1 รู มีอัตราการขยายยอดเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ในช่วงระหว่าง 14.04 – 14.53 ยอดต่อขวด และชุดการทดลองที่มีรูกรงอากาศ 2 และ 3 รู อัตราการงอกน้ำเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 8.89 %

การทดลองชักนำยอดด้วยวิธีการเพิ่มลดปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท และการเจาะรูเพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศ มีผลต่อเนื่องถึงการเกิดรากของยอด โดยชั้นพีชที่เลี้ยงในแอมโมเนียมไนเตรท 165 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความชื้นสัมพัทธ์ 81.2% และ 73.46% และแอมโมเนียมไนเตรท 82.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความชื้นสัมพัทธ์ 75.3 % มีอัตราการเกิดรากมากที่สุด คือ 100% ชั้นพีชที่เลี้ยงในแอมโมเนียมไนเตรท 330 มิลลิกรัมต่อลิตร มี

ความชื้นสัมพัทธ์ 81.96 % มีความยาวเฉลี่ยของรากที่มากที่สุดคือ 5.97 มิลลิเมตร และขึ้นพืชที่เลี้ยงในแอม โมเนียม ไนเตรท 82.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความชื้นสัมพัทธ์ 78.66 % มีจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นมากที่สุด คือ 5.73 รากต่อต้น

ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าชุดการทดลอง MS 9 ที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท 82.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีความชื้นสัมพัทธ์ 78.66 % เป็นชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเนื่องจากมีอัตราการงอกต่ำและมีการให้ยอดที่ดี รวมทั้งมีอัตราการออกรากและจำนวนรากสูง และรากไม่ยาวเร็วเกินไปซึ่งส่งผลต่อการย้ายชำที่อาจจะทำให้รากหักและเสียหายได้และใช้ปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทเพียง 82.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งลดลงจากสูตรมาตรฐาน 1 เท่า ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และลดต้นทุนของกล้าไม้ได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Casanova, E., L. Moysset and M.I. Trillas. 2008. Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious Carnation shoot. **Biolo Plantarum**. 52 (1): 1-8.
- Cassells, A. and R. Curry. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell Tiss. and Org.** 64 (2-3): 145-157
- Debergh, P.C. and L. Maene. 1984. Pathological and physiological problems related to the *in vitro* cultures of plants. **Parasitica**. 40: 69-75.
- Edgard, A.T.P., C.O. Wagner, L.F. Marina, M.B.C. Sonia, S.A. Raul, A.M.S. Eldo, R.C. Carlos and P.B.F. Elizabeth. 2001. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Sci**. 160: 857-868.
- Franck, T., C. Kevers, T. Gaspar, J. Dommes, C. Deby, R. Greimers, D. Serteyn and G. Deby-Dupont. 2004. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. **Plant Physiol. Bioch.** 42: 519-527
- Gribble, K., J. Tingle, V. Sarafis, A. Heaton and P. Holford. 1998. Position of water in vitrified plants by NMR imaging. **Protoplasma** 201: 110-114
- Grodzinski, B., I. Boesel and K. Horton. 1981. Effect of light and carbon dioxide on release of ethylene from leaves of *Xanthium strumarium*. **Plant Physiol.** 67: 272-3.
- Kei-ichiro, U., C. Susan and S. Kalidas. 1998. Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. Isolated from oregano. **Process Biochem.** 33 (4): 441-445.
- Kozai, T., K. Fujiwara, M. Hayashi, J. Aitken-Christie. 1992. The *in vitro* environment and its control in micropropagation, pp. 247-282. In Kurata K., Kozai T. (Eds.), **Transplant production system, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht**, The Netherlands.
- Lai, C. C., H. M. Lin, H. S. Tsay, S. M. Nalawade and W. Fang. 2005. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **J. Plant Physiology**. 162: 355-361
- Manoj, K.Y., A.K. Gaur and G.K. Garg. 2003. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell Tiss.** 72: 153-156
- Read, P.E. 1990. Environmental effects in micropropagations, pp. 95-125. In Ammirato

- PV, Evan DA, Shrap WR, Bajaj YPS (Eds.), **Handbook of plant cell culture**, Vol. 5. New York.
- Roux, J. J. I.E. and S. J. Van. 1991. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*. **Tree Physiol.** 9: 435-477.
- Sadhy, S., A. Piqueras, E. Hellin and E. Oimos. 2005. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plan Cell Tiss. Org.** 81: 149-158
- Tornero, O. P., J. Egea, E. Olmos and L. Burgos. 2001. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.** 37: 250-254.
- Whitehouse, A.B., Mark T.R. and G.A. Edward. 2002. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. **Plan Cell Tiss. Org.** 71: 245-252.
- Zobayed, S.M.A., J. Armstrong and W. Armstrong. 2000. Evaluation of closed system, diffusive and humidity-induced convective throughflow ventilation on the growth and physiology of cauliflower *in vitro*, **Plan cell Tiss. Org.** 59: 113-123.
- Zobayed, S.M.A., J. Armstrong and W. Armstrong. 2001. Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. **Ann. Bot.** 87: 53-9.
-