

บทความวิจัย (Research Article)

การประเมินการตรึงไนโตรเจนโดยเอนโดไฟติกแบคทีเรียในอ้อยด้วยวิธีสมดุลไนโตรเจน Evaluating nitrogen fixation by endophytic bacteria in sugarcane with nitrogen balance method

ธนวิต ตียาพันธ์^{1*}, เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม¹ และ รัตญา ยานะพันธ์²
Tanawit Tiayaphan^{1*}, Benjawan Rerkasem¹ and Rataya Yanaphan²

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ CMU-NRU #1 ในอ้อยอยู่ทอง 3 ด้วยวิธีสมดุลไนโตรเจน และศึกษาผลการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนในอ้อย รวมไปถึงวิธีการที่เหมาะสมในการปลูกอ้อย/ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อย ดำเนินการปลูกในกระถางบรรจุทราย รดด้วยสารละลายอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน วางแผนการทดลองแฟคทอเรียล ปลูกด้วยท่อนพันธุ์อ้อยมีระดับไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 2 ระดับ คือต่ำ (C30) และสูง (C40) และได้แบ่งเก็บตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณไนโตรเจนในท่อนที่จะใช้ปลูกไว้แล้ว ปลูกอ้อยโดยเพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูกอ้อยและปลูกเชื้อ 1 สัปดาห์ (P+) และไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก (P0) เก็บข้อมูลคลอโรฟิลล์สัปดาห์ละครั้ง ด้วยเครื่องวัดคลอโรฟิลล์ที่ใบอ่อนที่แผ่ขยายเต็มที่ ตำแหน่งบนสุดทุกสัปดาห์ ที่ 4 - 8 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างดิน ราก ใบ วัดความเข้มข้นธาตุไนโตรเจน และปริมาณธาตุไนโตรเจน ในส่วนต่างๆ ของต้นอ้อย และประเมินการตรึงไนโตรเจนด้วยสมดุลไนโตรเจน (ปริมาณไนโตรเจนในต้นหลังปลูก - ปริมาณไนโตรเจนในท่อนก่อนปลูก) พบว่า การปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน มีผลในการเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ เพิ่มน้ำหนักแห้ง เพิ่มความเข้มข้นและปริมาณไนโตรเจนในต้นอ้อย ในขณะที่วิธีการเพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูกและไนโตรเจนในท่อนพันธุ์ที่ใช้ปลูกมีผลเพียงเล็กน้อย การปลูกเชื้อมีผลในการเพิ่มการตรึงไนโตรเจนจากอากาศอย่างชัดเจน โดยทำให้สมดุลไนโตรเจนในอ้อยเพิ่มขึ้นมากกว่าหนึ่งเท่าตัว การปลูกด้วยท่อนพันธุ์ที่มีไนโตรเจนต่ำ จะให้สมดุลไนโตรเจนสูงกว่าเมื่อปลูกด้วยท่อนพันธุ์ที่มีไนโตรเจนสูงถึง 24% และการเพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูกให้สมดุลไนโตรเจนสูงกว่าไม่เพาะ 28%

สรุปได้ว่า การปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน CMU-NRU #1 มีผลในการเพิ่มการตรึงไนโตรเจนในอ้อย นอกจากนี้วิธีการปลูกอ้อย/ใส่เชื้อโดยการเพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูกอ้อยเป็นวิธีที่เหมาะสมและมีผลในการเพิ่มการตรึงไนโตรเจน และอ้อยที่ปลูกจากท่อนพันธุ์ที่มีไนโตรเจนสูง จะทำให้ตรึงไนโตรเจนได้ต่ำกว่าอ้อยที่ปลูกจากท่อนพันธุ์ที่มีไนโตรเจนต่ำ

คำสำคัญ: อ้อย, การตรึงไนโตรเจนในอ้อย, แบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน, สมดุลไนโตรเจน

¹ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

² สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง องค์การมหาชน อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

¹ Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai Province 50200

² Highland Research and Development Institute Public Organization, Chiang Mai Province 50200

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

Abstract

The objectives of this experiment were to evaluate nitrogen (N) fixation by endophytic bacteria (strain CMU-NRU #1) on sugarcane (cv. U-Thong 3) with nitrogen balance method and the effect of N status of the sugarcane cutting and method of inoculation. A pot experiment was conducted in sand culture supplied with N-free nutrient solution. Sugarcane plants were grown with a factorial combination of two levels of N in the cutting (low, C30 and high, C40) that were (P+) and were not (P0) pre-planted, inoculated (I+) and uninoculated (I0) with the endophytic N fixing bacteria. Nitrogen content of the planting material was determined before planting. Chlorophyll content in YEB (youngest emerged leaf blade) was recorded by a chlorophyll meter every week from 4 to 8 weeks after planting. At 8 weeks plants were harvested to measure shoot dry weight, root dry weight, nitrogen concentration and nitrogen content in plant parts. Nitrogen fixation was determined with N balance method (N content before planting – N content after planting). Inoculation with endophytic bacteria CMU-NRU #1 increased N content in YEB, plant dry weight, nitrogen concentration and nitrogen content in sugarcane, with some slight effects of pre-planting and nitrogen status of the sugarcane cuttings. Nitrogen balance was more than doubled by inoculation with the N fixing endophyte, while it was 24% higher when planted with cuttings from low N than high N plants, and 28% higher when the cuttings were preplanted compared with not preplanted.

It is concluded that inoculation with endophytic bacteria (strain CMU-NRU #1) increased nitrogen fixation in sugarcane. Moreover, pre-planting sugarcane cuttings before inoculation had a stimulatory effect on N fixation and planting with cuttings from low N plants was more beneficial to N fixation than cuttings from high N plants.

Keywords : Sugarcane, nitrogen fixation, sugarcane, endophytic bacteria, nitrogen balance

บทนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจหลักชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่เกษตรกรนิยมปลูกกันมาก เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลและพลังงานทดแทนในรูปของเอทานอลการปลูกอ้อยในประเทศไทยนั้นยังประสบปัญหาในเรื่องต้นทุนการผลิตที่สูง โดยเฉพาะต้นทุนของปุ๋ยไนโตรเจน โดยพบว่า จะใส่ปุ๋ยในอ้อยปลูก 50-100kg N/ha และ ในอ้อยต่อ 75-150kg N/ha ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงเทียบกับในประเทศบราซิลจะไม่ใส่ปุ๋ย N ให้แก่อ้อยปลูกเลย และอ้อยต่อจะใส่ปุ๋ยเพียง 40-60 kg N/ha เท่านั้น เนื่องมาจากนักวิจัยชาวบราซิลได้บุกเบิกการวิจัยเรื่องการตรึงไนโตรเจน โดยวิธีชีวภาพมาตั้งแต่ก่อน พ.ศ. 2500 [6] และได้พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในอ้อย (nitrogen fixing endophytic bacteria หรือ endophytic diazotroph) ที่

สามารถเปลี่ยน dinitrogen (N_2) จากบรรยากาศไปเป็นแอมโมเนีย (NH_3) ที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ด้วยกิจกรรมของระบบเอนไซม์ nitrogenase ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน [10] สอดคล้องกับการวัดไนโตรเจน (N_2) ที่ตรึงได้จากอากาศด้วยวิธี ^{15}N ที่แยกไนโตรเจนในต้นอ้อยที่ตรึงได้จากอากาศและไนโตรเจนจากในดินในแปลงอ้อยใน 4 รัฐของบราซิล (São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, and Pernambuco) พบว่าไนโตรเจนในต้นอ้อยถึง 70% เป็นไนโตรเจนที่ตรึงได้จากอากาศ ดังนั้น จึงสามารถอธิบายว่าเหตุใดระบบการปลูกอ้อยในบราซิลจึงยังยืนอยู่ได้นับหลายสิบปีถึงแม้จะได้รับไนโตรเจนในปุ๋ยน้อยกว่าที่เก็บเกี่ยวออกไป [4]

การจัดการระบบปลูกอ้อยที่มีประสิทธิภาพที่ใช้ประโยชน์สูงสุดการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีชีวภาพจึงมีโอกาสูงในการที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการปลูก

อ้อย ผลิตน้ำตาล และเอทานอลในประเทศไทย ที่น่าจะมีโอกาสใช้ประโยชน์จากทรัพยากรพันธุกรรมของระบบการตรึงไนโตรเจนซิมไบโอซิส *Saccharum – endophyticdiazotrophs* นี้ได้ดีกว่าบราซิล เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในศูนย์กลางความหลากหลายทางพันธุกรรมของอ้อย มีทั้งอ้อยพื้นเมือง อ้อยป่า (*S. spontaneum*) อีกทั้งยังมีพันธุ์อ้อยจากแหล่งอื่นๆ ทั่วโลก ที่นำเข้ามาปลูกเป็นเวลาหลายร้อยปีแล้วในการศึกษาทางจุลชีววิทยาได้มีการพบแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์มากมายอยู่ภายในส่วนต่างๆ ของอ้อยในประเทศไทย ทั้งต้น ใบ และราก และพบหลายสายพันธุ์ที่มีปฏิกริยาตรึงไนโตรเจนสูงเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารปราศจากไนโตรเจนและวัดด้วย acetylene reduction assay [1] การศึกษาจึงมุ่งประเมินความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ในอ้อยด้วยวิธีสมดุลไนโตรเจน (nitrogen balance) [10] และศึกษาผลการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนในอ้อย รวมไปถึงศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการวิธีการปลูกอ้อย/ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อย

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ทำการทดลองโดยวางแผนแบบแฟคทอเรียลสามปัจจัย ประกอบด้วย 1) ชนิดของท่อนพันธุ์อ้อย โดยคัดเลือกจากต้นที่มีระดับไนโตรเจนที่ต่างกัน ซึ่งวัดค่าจากใบอ่อนสุดที่แผ่ขยายเต็มที่ (youngest emerged blade, YEB) ด้วยเครื่องวัดคลอโรฟิลล์ (Minolta 502 มีหน่วยเป็นค่า SPAD) ที่ 30 และ 40 หน่วย (C30, C40) 2) การปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์สายพันธุ์ CMU-NRU #1(I+) และไม่ปลูกเชื้อ (I0) และ 3) วิธีการปลูกอ้อย/ใส่เชื้อโดยเพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูกอ้อย/ใส่เชื้อ 1 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มโอกาสติดเชื้อในรากงอกใหม่ (P+) และไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก (P0) วางแผนการทดลองสุ่มตลอด (Factorial in Completely Randomized Design) ทวนซ้ำ 10 ครั้ง นำท่อนพันธุ์อ้อยที่มี 2 ข้อมาผ่าครึ่งตามทางยาวให้มีตาข้างละ 1 ตาท่อนพันธุ์ครึ่งหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในท่อนพันธุ์ที่ปลูก นำท่อนพันธุ์อีกครึ่งหนึ่งไปปลูกในกระถางดินเผา ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 ซม. ลึก 30 ซม. บรรจุทรายที่ผ่านการล้างสะอาดและอบฆ่า

เชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กระถางละ 1 ท่อนพันธุ์ รดด้วยสารละลายอาหารปราศจากไนโตรเจน (N-free sand culture) ที่ประกอบด้วย Ca^{2+} 1.0 mM; P 0.05 mM; Fe-citrate 0.01 mM; Mg^{2+} 0.25 mM; K^+ 0.25 mM; Mn 1 μM ; Zn 0.05 μM ; Cu 0.02 μM ; Co 0.01 μM ; Mo 0.01 μM และ B 0.2 μM (สูตรปรับปรุงจาก Broughton and Dillworth 1970) ที่ 8 สัปดาห์หลังปลูกวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ YEB (youngest emerged blade) ด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์ และเก็บเกี่ยวเพื่อนำน้ำหนักแห้ง วิเคราะห์แยกส่วนใบ ตัน รากด้วยวิธี Kjeldahl เพื่อหาปริมาณธาตุไนโตรเจน และสมดุลไนโตรเจน (N สูดท้าย – N เริ่มต้น) [10] ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย โดยใช้ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (p , 0.05)

ผลการทดลอง

ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบอายุน้อยที่สุดที่แผ่ขยายเต็มที่ (YEB)

เชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ ทำให้อ้อยมีคลอโรฟิลล์ในใบ YEB เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ยังพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างผลของการเพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก และไนโตรเจนในท่อนพันธุ์ ($\text{P} \times \text{C}$ $p < 0.05$) โดยอ้อย C30 (N ต่ำ) ที่ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูกมีคลอโรฟิลล์ในใบสูงสุด

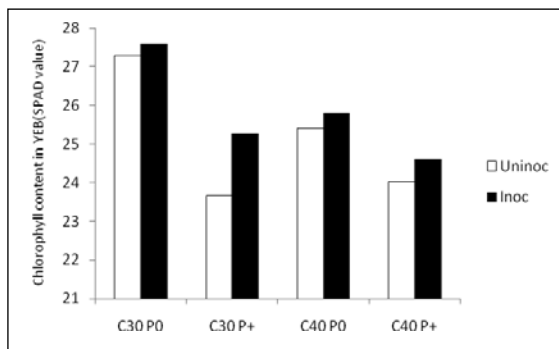
ความแปรปรวน	P	C	I	PxC	PxI	CxI	PxCxI
ผล	***	**	*	*	ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างที่ $p < 0.05$

* = แตกต่างที่ $p < 0.05$

** = แตกต่างที่ $p < 0.01$

*** = แตกต่างที่ $p < 0.001$



ภาพที่ 1 ผลการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ YEB ในอ้อยพันธุ์อู่ทอง 3 ด้วยท่อนพันธุ์ที่มีไนโตรเจนต่ำ (C30) และสูง (C40) ที่ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก (P0) และเพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์ (P+)

น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน

อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ ต่อ น้ำหนักแห้งในส่วนเหนือดิน มีปฏิสัมพันธ์กับการเพาะท่อนก่อนปลูก ($IXP < 0.001$) และสถานภาพไนโตรเจนในต้นอ้อยที่ใช้ทำท่อน ($IXC < 0.05$) (ตารางที่ 1) โดยการปลูกเชื้อ ทำให้น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินของอ้อยที่เพาะให้รากงอกเพิ่มขึ้นจาก 9.61 เพิ่มขึ้นเป็น 11.03 g/plant แต่ไม่มีผลในอ้อยที่ไม่ได้เพาะท่อนก่อนปลูก นอกจากนี้การปลูกเชื้อ ในอ้อย C40 ทำให้น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินของอ้อยเพิ่มขึ้นจาก 9.33 เพิ่มขึ้นเป็น 10.19 g/plant แต่ไม่มีผลในอ้อย C30

น้ำหนักแห้งราก

อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ ต่อ น้ำหนักแห้งราก มีปฏิสัมพันธ์ 3 ทาง กับการเพาะท่อนก่อนปลูก และสถานภาพของไนโตรเจนในท่อนพันธุ์ ($IXP \times C < 0.001$) (ตารางที่ 2) โดยการปลูกเชื้อทำให้น้ำหนักแห้งรากเพิ่มขึ้นมากที่สุด 55% จากท่อน C30 ที่ไม่ได้เพาะให้รากงอกก่อน (P0C30) แต่ไม่มีผลในอ้อยที่ปลูกจากท่อน C40 ที่ไม่ได้เพาะให้รากงอกก่อน (P0C40) และการปลูกเชื้อทำให้น้ำหนักแห้งรากเพิ่มขึ้น 26% จากท่อน C30 ที่เพาะให้รากงอกก่อน (P+C30) และเพิ่มขึ้น 34% จากท่อน C40 ที่เพาะให้รากงอกก่อน (P+C40)

ความเข้มข้นไนโตรเจนรวมทั้งหมด

อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ ต่อ ความเข้มข้นไนโตรเจนโดยรวมในอ้อยมีปฏิสัมพันธ์ 3 ทางกับการเพาะท่อนก่อนปลูก และสถานภาพของไนโตรเจนในท่อนพันธุ์ ($IXP \times C < 0.05$) (ตารางที่ 3) โดยการปลูกเชื้อ ทำให้นิโตรเจนในอ้อยมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญเฉพาะที่ปลูกจากท่อน C40 ที่มีการเพาะให้รากงอกก่อนปลูก

ปริมาณธาตุไนโตรเจนรวมทั้งหมด

อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ ต่อ ปริมาณไนโตรเจนที่สะสมในอ้อย มีปฏิสัมพันธ์ 3 ทางกับการเพาะท่อนก่อนปลูก และสถานภาพของไนโตรเจนในท่อนพันธุ์ ($IXP \times C < 0.001$) (ตารางที่ 4) โดยการปลูกเชื้อ ทำให้อ้อยสะสมไนโตรเจนได้เพิ่มขึ้น 15% จากท่อน C30 ที่ไม่ได้เพาะให้รากงอกก่อน (P0C30) และเพิ่มขึ้น 20% จากท่อน C30 ที่เพาะให้รากงอกก่อน (P+C30) และเพิ่มขึ้น 34% จากท่อน C40 ที่เพาะให้รากงอกก่อน (P+C40) แต่ไม่มีผลในอ้อยที่ปลูกจากท่อน N สูง ที่ไม่ได้เพาะให้รากงอกก่อน (P0C40)

สมมูลไนโตรเจน

ไม่พบปฏิสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ ที่มีต่อสถานภาพไนโตรเจนในท่อนพันธุ์และวิธีการเพาะท่อนก่อนปลูก ($IXP \times C, IXP, IXC \text{ NS } < 0.05$) (ตารางที่ 5) แต่พบความแตกต่างของการปลูกเชื้อ ($I < 0.001$), การเพาะท่อนก่อนปลูก ($P < 0.05$) และสถานภาพไนโตรเจนในต้นอ้อย ($C < 0.05$) กล่าวคือการปลูกเชื้อทำให้สมมูลไนโตรเจนเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก 11.4 mg N/plant (เมื่อไม่ปลูกเชื้อ) เป็น 26.6 mg N/plant (เมื่อปลูกเชื้อ) ส่วนการเพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูกทำให้สมมูลไนโตรเจนสูงกว่าอ้อยที่ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 27% นอกจากนี้ ท่อนพันธุ์จากต้นอ้อยไนโตรเจนต่ำ (C30) ให้สมมูลไนโตรเจนสูงกว่าท่อนที่มาจากต้นอ้อยไนโตรเจนสูง (C40) 23%

ตารางที่ 1 ผลการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน ในอ้อยพันธุ์อุทุมพร 3 ด้วย
 ท่อนพันธุ์ที่มีไนโตรเจน 2 ระดับ และการเพาะท่อนพันธุ์/ใส่เชื้อ 2 วิธี

การเพาะท่อนพันธุ์/ใส่เชื้อ (P)	ชนิดท่อนพันธุ์ (C) ¹	การปลูกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (I)		เฉลี่ย			
		ไม่ปลูกเชื้อ	ปลูกเชื้อ				
		น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (g/plant)					
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก (P0)	C30	10.29	9.39	9.84			
	C40	9.28	9.16	9.22			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์ (P+)	C30	9.85	10.85	10.35			
	C40	9.38	11.22	10.30			
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก		9.78 Aa	9.27 Ba	9.53 B			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์		9.61 Ab	11.03 Aa	10.32 A			
	C30	10.07 Aa	10.12 Aa	10.09			
	C40	9.33 Bb	10.19 Aa	9.76			
เฉลี่ย		9.70 b	10.15 a				
F-test	P***	C ^{ns}	I*	PxC ^{ns}	PxI***	CxI*	PxCxI ^{ns}
LSD _{0.05}	0.39		0.39		0.56	0.56	

ns = ไม่แตกต่างที่ p<0.05, * = แตกต่างที่ p<0.05, ** = แตกต่างที่ p<0.001

¹ ท่อนพันธุ์คัดเลือกจากต้นที่มีระดับไนโตรเจนที่แตกต่างกันวัดด้วยเครื่องวัดคลอโรฟิลล์ที่ 30 (C30) และ 40 (C40) SPAD unit
 ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกันแสดงความแตกต่างในคอลัมน์เดียวกันด้วย LSD ที่ p<0.05

ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกันแสดงความแตกต่างในแถวเดียวกันด้วย LSD ที่ p<0.05

ตารางที่ 2 ผลการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งราก ในอ้อยพันธุ์อุทุมพร 3 ด้วยท่อนพันธุ์
 ที่มีไนโตรเจน 2 ระดับ และการเพาะท่อนพันธุ์/ใส่เชื้อ 2 วิธี

การเพาะท่อนพันธุ์/ใส่เชื้อ (P)	ชนิดท่อนพันธุ์ (C) ¹	การปลูกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (I)		เฉลี่ย			
		ไม่ปลูกเชื้อ	ปลูกเชื้อ				
		น้ำหนักแห้งราก (g/plant)					
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก (P0)	C30	4.94 Cb	7.65 Ca	6.29			
	C40	7.09 ABa	7.00 Ca	7.05			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์ (P+)	C30	7.67 Ab	9.66 Aa	8.67			
	C40	6.32 Bb	8.48 Ba	7.40			
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก		6.02	7.32	6.67			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์		7.00	9.07	8.03			
	C30	7.74	8.65	7.48			
	C40	6.31	6.70	7.22			
เฉลี่ย		6.51	8.20				
F-test	P***	C ^{ns}	I***	PxC***	PxI ^{ns}	CxI**	PxCxI***
LSD _{0.05}	0.39		0.39	0.56		0.56	0.79

ตารางที่ 3 ผลการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนต่อความเข้มข้นไนโตรเจนทั้งหมดในอ้อยพันธุ์อุทอง 3 ด้วยท่อนพันธุ์ที่มีไนโตรเจน 2 ระดับ และการเพาะท่อนพันธุ์/ใส่เชื้อ 2 วิธี

การเพาะท่อนพันธุ์/ใส่เชื้อ (P)	ชนิดท่อนพันธุ์ (C) ¹	การปลูกเชื้อแบคทีเรีย		เฉลี่ย			
		ตรึงไนโตรเจน (I)					
		ไม่ปลูกเชื้อ	ปลูกเชื้อ				
ความเข้มข้นไนโตรเจนทั้งหมด (%)							
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก (P0)	C30	0.449 Aa	0.458 Aa	0.454			
	C40	0.440 Aa	0.436 Ba	0.438			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์ (P+)	C30	0.393 Ca	0.405 Ca	0.399			
	C40	0.414 Bb	0.443 Ba	0.428			
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก		0.444	0.447	0.446			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์		0.404	0.424	0.414			
	C30	0.421	0.432	0.426			
	C40	0.427	0.439	0.433			
เฉลี่ย		0.424	0.435				
F-test	P***	C ^{ns}	I**	PxC***	PxI*	CxI ^{ns}	PxCxI*
LSD _{0.05}	0.007		0.007	0.010	0.010		0.014

ตารางที่ 4 ผลการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ในอ้อยพันธุ์อุทอง 3 ด้วยท่อนพันธุ์ที่มีไนโตรเจน 2 ระดับ และการเพาะท่อนพันธุ์/ใส่เชื้อ 2 วิธี

การเพาะท่อนพันธุ์ /ใส่เชื้อ (P)	ชนิดท่อนพันธุ์ (C) ¹	การปลูกเชื้อแบคทีเรีย ตรึงไนโตรเจน (I)		เฉลี่ย			
		ไม่ปลูกเชื้อ	ปลูกเชื้อ				
		ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (mg N/plant)					
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก (P0)	C30	68.2 ABb	78.1 Ca	73.1			
	C40	71.8 Aa	70.1 Da	70.9			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์ (P+)	C30	68.8 Ab	82.9 Ba	75.9			
	C40	65.0 Bb	87.1Aa	76.0			
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก		70.0	74.1	72.0			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์		66.9	85.0	75.9			
		C30	68.5	80.5	74.5		
		C40	68.4	78.6	73.5		
เฉลี่ย		68.4	79.5				
F-test	P***	C ^{ns}	I***	PxC***	PxI ^{ns}	CxI ^{ns}	PxCxI***
LSD _{0.05}	2.0		2.0	2.8			4.0

ตารางที่ 5 ผลการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนต่อสมมูลไนโตรเจน ในอ้อยพันธุ์อุทอง 3 ด้วยท่อนพันธุ์ที่มีไนโตรเจน 2 ระดับ และการเพาะท่อนพันธุ์/ใส่เชื้อ 2 วิธี

การเพาะท่อนพันธุ์/ใส่เชื้อ (P)	ชนิดท่อนพันธุ์ (C) ¹	การปลูกเชื้อแบคทีเรีย ตรึงไนโตรเจน (I)		เฉลี่ย			
		ไม่ปลูกเชื้อ	ปลูกเชื้อ				
		สมมูลไนโตรเจน (mg N/plant)					
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก (P0)	C30	11.5	24.6	18.1			
	C40	9.7	21.0	15.3			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์ (P+)	C30	16.7	31.0	23.9			
	C40	7.5	29.9	18.7			
ไม่เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก		10.6	22.8	16.7 B			
เพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูก 1 สัปดาห์		12.1	30.5	21.3 A			
	C30	14.1	27.8	21.0 A			
	C40	8.6	25.4	17.0 B			
เฉลี่ย		11.4 b	26.6 a				
F-test	P*	C*	I***	PxC ^{ns}	PxI ^{ns}	CxI ^{ns}	PxCxI ^{ns}
LSD _{0.05}	3.6	3.6	3.6				

ns = ไม่แตกต่างที่ $p < 0.05$, * = แตกต่างที่ $p < 0.05$, ** = แตกต่างที่ $p < 0.001$

¹ ท่อนพันธุ์คัดเลือกจากต้นที่มีระดับไนโตรเจนที่แตกต่างกันวัดด้วยเครื่องวัดคลอโรฟิลล์ที่ 30 (C30) และ 40 (C40) SPAD unit ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกันแสดงความแตกต่างในคอลัมน์เดียวกันด้วย LSD ที่ $p < 0.05$

ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกันแสดงความแตกต่างในแถวเดียวกันด้วย LSD ที่ $p < 0.05$

วิจารณ์ผลการทดลอง

การใช้ประโยชน์จากการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีชีวภาพ ก่อให้เกิดโอกาสสูงในการที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกอ้อยอีกทั้งความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ที่อยู่ในอ้อยที่สามารถเปลี่ยน dinitrogen (N_2) จากบรรยากาศไปเป็นแอมโมเนีย (NH_3) มีผลต่อพืชสามารถนำไปใช้ได้ [10] และมีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย ซึ่งจากการประเมินการตรึงไนโตรเจนในแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ในอ้อยพบได้ว่าการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ CMU-NRU #1 ลงไปในอ้อยน่าจะช่วยเพิ่มความสามารถในการตรึงไนโตรเจนซึ่งส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของการสะสมน้ำหนักรากในส่วนต่างๆในอ้อย และการสะสมปริมาณไนโตรเจนในอ้อย อีกทั้ง สมมูลไนโตรเจนด้วยซึ่งสอดคล้องกับอัมพิกา [1] ที่ศึกษาการตรวจวัดความสามารถการตรึงไนโตรเจนในแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์

จากส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อยเคียวพันธุ์มาลีซาทอ้อยป่า และอ้อยพันธุ์อุทอง 3 ในอาหารเลี้ยงยารเป็นอิสระจากต้นอ้อยด้วย Acetylene reduction assay พบว่า CMU-NRU #1 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ

แต่การนำผลไปใช้ในการผลิตอ้อยในแปลงจำเป็นต้องคำนึงถึง 2 เงื่อนไข ได้แก่ (ก) การติดเชื้อเข้าสู่ส่วนต่างๆ ของต้นอ้อย และ (ข) สถานภาพของไนโตรเจนในท่อนอ้อยและในดิน จากการศึกษากระบวนการติดเชื้อ ด้วยเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Acetobacter diazotrophicus* พบว่ารากโดยเฉพาะหมวกรากและรอยแยกตามโคนรากแขนง เป็นตำแหน่งสำคัญของการติดเชื้อในอ้อย [7] เช่นเดียวกับการทดลองที่ใช้อ้อยที่เพาะก่อน 1 สัปดาห์ซึ่งมีรากอกจะส่งผลให้การสะสมน้ำหนักราก ปริมาณไนโตรเจนและสมมูลไนโตรเจนสูงกว่าที่ไม่ได้เพาะ เนื่องจากเกิดการติดเชื้อที่รวดเร็วกว่าของรากที่ได้เริ่มงอกแล้ว

เมื่อพิจารณาจากค่าสมมูลไนโตรเจนในการทดลองที่ปลูกอ้อยด้วยท่อนพันธุ์จากต้นอ้อยไนโตรเจนสูง (C40) จะส่งผลให้มีสมมูลไนโตรเจนเฉลี่ยต่ำคือ 17.0 mg N/plant ซึ่งต่ำกว่าอ้อยที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์จากต้นที่มีไนโตรเจนต่ำ (C30) ที่มีสมมูลไนโตรเจนเฉลี่ย 21.0 mg N/plant แสดงให้เห็นว่า สภาพที่ไนโตรเจนที่มีน้อยเกินไปในช่วงงอก และตั้งตัวเป็นข้อจำกัดในการสร้างรากสร้างใบ อีกทั้งการสังเคราะห์แสงที่ผลิตอาหารและพลังงานเลี้ยงทั้งแบคทีเรียและเพื่อใช้ในการเติบโตของต้นพืชเอง ในขณะที่การมีไนโตรเจนในรูปไนเตรท หรือแอมโมเนีย ที่พืชสามารถนำไปใช้ได้มากเกินไป จะมีผลในการยับยั้งกิจกรรมเอ็นไซม์ตรึงไนโตรเจน (Nitrogenase) และการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีชีวภาพของพืชและแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา (Symbiosis) อาจถูกกระตุ้นหรือยับยั้งจากไนโตรเจนในรูปที่พืชสามารถใช้ได้ เช่นที่มีอยู่ในดินหรือใส่เป็นปุ๋ย [9]

ในการปลูกอ้อยโดยอาศัยการตรึงไนโตรเจนด้วยแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์แทนปุ๋ย จึงต้องมีการควบคุมไนโตรเจนในท่อนอ้อย ในดิน และที่ใส่ให้เป็นปุ๋ย ให้พอดีไม่มากเกินไปหรือน้อยไป เครื่องวัดคลอโรฟิลล์ ที่วัดความเข้มข้นคลอโรฟิลในพืช (เครื่อง Minolta 502 มีหน่วยเป็นค่า SPAD) ใช้ประเมินสถานภาพไนโตรเจนในพืชได้แม่นยำ สะดวกและรวดเร็ว ได้มีการนำมาใช้ในการจัดการปุ๋ยไนโตรเจนได้ผลเป็นอย่างดี ในข้าว [2] และไม้ผล [8] สำหรับในอ้อยอุ้มทอง 3 พบว่า ค่า SPAD มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยยะสำคัญกับความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบ ($r = 0.48, p < 0.001$) ดังนั้นจึงน่าจะนำมาใช้ในการจัดการไนโตรเจนในอ้อยได้

สรุปผลการทดลอง

การปลูกเชื้อแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ CMU-NRU #1 ทำให้อ้อยมีสมมูลไนโตรเจนเพิ่มขึ้นภายในเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียฯ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพการอยู่ร่วมแบบพึ่งพากับอ้อยอุ้มทอง 3 ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มน้ำหนักแห้งและการสะสมไนโตรเจน การเพาะท่อนพันธุ์ก่อนปลูกทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีชีวภาพในอ้อยนี้เพิ่มขึ้น แต่การใช้ท่อนพันธุ์จากต้นที่มีไนโตรเจนสูงจะทำให้

การตรึงไนโตรเจนลดลง ระบบนี้มีโอกาสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตอ้อยและลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน จึงสมควรมีการทดสอบในระดับแปลง เพื่อที่จะได้นำไปใช้ในการปลูกอ้อย เพื่อการผลิตน้ำตาลและเอทานอลต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. อัมพิกา เมืองทอง. การแยกและการหาลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในอ้อย. [วิทยานิพนธ์ปริญญาโท]. สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2554.
2. Balasubramanian, V., A.C. Morales, R.T. Cruz, T.M. Thiyagarajan, R. Nagarajan, M. Babu, S. Abdulrachman and L.H. Hai. International Rice Research Notes 2000; 25(1): 4-8.
3. Boddey, R.M., J.C. Polidoro, A.S. Resende, B.J.R. Alves and S. Urquiaga. Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to sugar cane and other grasses. Aust. J. Plant Physiol 2001; 28: 889-895.
4. Boddey, R.M., S. Urquiaga, B.J.R. Alves and V. Reis. Endophytic N fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. Plant Soil 2003; 252: 139-149.
5. Broughton, W.J., M.J. Dilworth. Control of leghaemoglobin synthesis in snake bean. Biochem. J. 1971; 125: 1075 - 1080.
6. Döbereiner, J and A.P. Ruschel. Uma nova espécie de Beijerinckia. Rev. Biol. 1958; 1: 261-272.
7. James, E.K., V.M. Reis, F.L. Olivares, J.I. Baldani and J. Döbereiner. Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing acterium *Acetobacter diazotrophicus* J. Exp. Bot. 1994; 45: 757-766

8. Li, Y.C., A.K. Alva, D.V. Calvent and M. Zhang. A rapid nondestructive technique to predict leaf nitrogen status of grapefruit tree with various nitrogen fertilization practices. *HortTechnology* 1998; 8: 81-86.
9. Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2 nd ed. Academic Press, London. 1995. 899 pp.
10. Unkovich, M., D. Herridge, M. People, G. Cadish, B. Boddey, K. Giller, B. Alves and P. Chalk. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agriculture systems. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra. 2008.