รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย -

2. ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาศักยภาพการรับไนโตรเจนทางชีวภาพ กลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่สำคัญและปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับอ้อยในอ้อยสายพันธุ์ไทย
Study on nitrogen derived from biological nitrogen fixing ability, N_2-fixing bacterial community structure and interaction between sugar cane and N_2-fixing bacteria on commercial sugar cane varieties in Thailand

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การศึกษาศักยภาพของอ้อยสายพันธุ์ไทยในการได้รับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Study on nitrogen derived from biological nitrogen fixing ability of Thai sugarcane varieties

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวกัลยกร โปร่งจันทึก	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวอรุโณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายอรัญญ์ ขันติยวิชย์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางอุชฎา สุขจันทร์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายมนต์ชัย มนัสสิลา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางประไพ ทองระอา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

ในการผลิตอ้อยพบว่าอ้อยมีการตอบสนองต่อไนโตรเจนในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน จนทำให้ไทยต้องมีต้นทุนในการนำเข้าปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเพื่อการผลิตเป็นจำนวนมากในอนาคต จากรายงานการผลิตอ้อยในบราซิลหลังทำการวิจัยประมาณ 15 ปี พบว่ามีพันธุ์อ้อยสายพันธุ์บราซิลบางสายพันธุ์ที่สามารถรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ทั้งนี้เพราะความสัมพันธ์กันระหว่างสายพันธุ์อ้อยและชนิดจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในต้นอ้อย วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อให้ได้สายพันธุ์อ้อยที่มีศักยภาพในการรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่กับอ้อย ทำการศึกษาในอ้อยพันธุ์ไทยที่นิยมปลูก 5 สายพันธุ์ คือ ขอนแก่น 3 อู่

ทอง 84-12 สอน.92-11 สอน.88-92 และสอน.95-84 เปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์บราซิล Sp70-1284 หญ้าเนเปียร์ปากช่อง อ้อยป่า TH99-132 *(S. spontaneum)* และหญ้ากินนีสีม่วง โดยศึกษาการเจริญเติบโตในสภาพแปลงไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเป็นเวลา 2 ปี (อ้อยปลูก และอ้อยตอ 1 ผลการทดลองพบว่า อ้อยสายพันธุ์ไทยมีการเจริญเติบโตค่อนข้างดีและใกล้เคียงกัน ส่วนหญ้าเนเปียร์ปากช่อง และอ้อยป่ามีการเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วนการศึกษาการใช้ไนโตรเจนที่ตรึงจากอากาศแบบชีววิธี อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์อู่ทอง 84-12 สามารถใช้ไนโตรเจนที่ตรึงจากอากาศแบบชีววิธีได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์บราซิล

In production of sugarcane, responding of nitrogen was different in each area make the price of import nitrogen chemical fertilizer raise in the future. Reports from Brazil after researched for 15 years found that some Brazilian sugarcane varieties can obtained nitrogen from Biological Nitrogen Fixation because of the relationship between microorganisms that live in the stem of sugarcane. The purpose of this experiment was study on nitrogen derived from biological nitrogen fixing ability in Thai sugarcane varieties. Five sugarcane species were planted (KK3 UT84-12 LK92-11 K88-92 and K95-84) and compared with Brazilian sugarcane varieties (Sp70-1284 TH99-132 (*S. spontaneum*)) Napeir Pak Chong 1 (*Pennisetum purpureum* cv. pakchong1) and purple guinea grass. Grown without nitrogen fertilizer for two years, the results showed that all Thai sugarcane varieties are growing quite well and similar. Napeir Pak Chong 1 and TH99-132 are grown the best. For Biological Nitrogen Fixation ability, KK3 and UT84-12 showing high ability when compared with Brazilian sugarcane varieties.

6. คำนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในประเทศไทย เพราะนอกจากเป็นพืชอาหารและพืชอุตสาหกรรมแล้ว ปัจจุบันยังเป็นพืชพลังงานอีกด้วย เนื่องจากน้ำตาลจากอ้อยสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันจากน้ำมันดิบซึ่งเป็นทรัพยากรตามธรรมชาติ ปัจจุบันพื้นที่ปลูกอ้อยมีประมาณ 6 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 10 ตัน/ไร่ ในการผลิตอ้อยพบว่าอ้อยมีการตอบสนองต่อไนโตรเจนในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน แต่ความจำเป็นในการใช้พลังงานทดแทนอาจทำให้มีความเข้าใจว่าอ้อยมีความจำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนในการผลิตในปริมาณมากขึ้น จนทำให้ไทยต้องมีต้นทุนในการนำเข้าปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเพื่อการผลิตเป็นจำนวนมากในอนาคต ซึ่งในการผลิตปุ๋ยเคมีต้องใช้พลังงานจากก๊าซธรรมชาติเป็นทั้งพลังงานและวัตถุดิบในการผลิต มีการประเมินกันว่าทำให้เกิดปัญหาการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก

ในประเทศอินเดีย อเมริกา โคลัมเบียและออสเตรเลีย ในการผลิตอ้อยมีการใส่ไนโตรเจน 24-32 กก.ไนโตรเจน/ไร่/ปี ในการผลิตที่บราซิลมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 9.6-11.2 กก.ไนโตรเจน/ไร่/ปี ซึ่งมีความใกล้เคียงกับอัตราแนะนำในประเทศไทยที่อยู่ระหว่าง 12-18 กก./ไนโตรเจน/ไร่/ปี ในบราซิล Boddey *et al.* (2003) ได้คำนวณว่าในผลผลิตเฉลี่ย 11.2 ตัน/ไร่ มีการนำไนโตรเจนออกไปจากพื้นที่ไปกับผลผลิตเพื่อการเผาเศษซากอ้อย

ประมาณ 16 กก.ไนโตรเจน ทั้งๆที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพียง 9.6-11.2 กก.ไนโตรเจน/ไร่/ปีเท่านั้น แสดงให้เห็นว่ามีไนโตรเจนอีก 4.8 – 6.4 กก.ไนโตรเจน/ไร่/ปี (บนสมมติฐานที่ไม่มีการสูญเสียไนโตรเจนไปจากดิน) อีกทั้งผลผลิตก็ไม่พบว่าลดลง เมื่อมีการใช้พื้นที่ติดต่อกัน จึงเป็นการสนับสนุนผลงานวิจัยที่พบว่าอ้อยได้รับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนในอากาศโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในต้นอ้อย (Boddey *et al*., 2003) และ Basanta *et al*. (2003) ได้วิจัยโดยการหาสมดุลไนโตรเจน (N balance) และประเมินว่าการปลูกอ้อย 3 ปี (อ้อยปลูก 1 ปี และอ้อยตอ 2 ปี) มีค่าเฉลี่ย 16.5 กก.ไนโตรเจน/ไร่ ถูกเคลื่อนย้ายเข้าไปในโรงงานและ 13.36 กก.ไนโตรเจน/ไร่ สูญเสียไปกับการเผา ในการทดลองนี้ไนโตรเจนมีการใส่ตอนปลูก 10 กก.ไนโตรเจน/ไร่ ดังนั้นไนโตรเจน 3 ฤดูปลูก เท่ากับ 26.1 กก.ไนโตรเจน/ไร่ ดังนั้น 3 ตอ รวม 36 เดือนหลังจากปลูกมีการสะสมไนโตรเจนทั้งหมด 24.8 กก.ไนโตรเจน/ไร่ มาจากการตรึงไนโตรเจนหรือแหล่งอื่นๆ ภายนอก หลักฐานที่สำคัญสำหรับการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพในอ้อยในช่วงแรกมีการค้นพบแบคทีเรียสกุล *Beijerinckia* (Döberiner, 1961) และต่อมามีการค้นพบแบคทีเรีย *Gluconoacetobacter diazotrophicus* (Li and Macrae, 1992; Reis *et al*. 1994; dos Reis *et al*. 2000) และสกุลอื่นๆ ได้แก่ *Herbaspirillum* และ *Burkholderia* ก็มีการค้นพบเพิ่มขึ้นในราก ต้น และมีการนำไปใช้ในอ้อย (James, 2000; Boddey *et al*., 2003; Perin *et al*., 2006; Castrol-Gonzaler *et al.,* 2011)

เพื่อให้ได้สายพันธุ์อ้อยที่มีศักยภาพในการรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่กับอ้อยสายพันธุ์ไทย ใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาพันธุ์อ้อยที่ใช้ไนโตรเจนน้อย ลดปริมาณและต้นทุนในการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการผลิตอ้อยในประเทศไทย โดยที่ผลผลิตและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจไม่เปลี่ยนแปลง ลดการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกจากการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการผลิตอ้อยซึ่งมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นและเพิ่มศักยภาพในการผลิตพลังงานทดแทน เพิ่มศักยภาพในการแข่งขันและการพึ่งพาตนเอง เช่นเดียวกับการผลิตอ้อยในบราซิลหลังทำการวิจัยประมาณ 15 ปี ก็พบว่ามีพันธุ์อ้อยสายพันธุ์บราซิลบางสายพันธุ์ที่สามารถรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ทั้งนี้เพราะความสัมพันธ์กันระหว่างสายพันธุ์อ้อยและชนิดจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในต้นอ้อย

7. วิธีดำเนินการทดลอง

- อุปกรณ์

<u>ปี 2557</u>

1. อ้อยสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์ต่างประเทศ
2. สารเคมีในการวิเคราะห์ด้าน เคมี ชีวเคมี และชีววิทยาโมเลกุล
3. เครื่อง Gas Chromatograph
4. ตู้เขี่ยเชื้อ

- วิธีการ

วางการทดลองแบบ RCB จำนวน 9 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3

กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อู่ทอง 84-12

กรรมวิธีที่ 3 อ้อยพันธุ์ สนอ.LK92-11
กรรมวิธีที่ 4 อ้อยพันธุ์ สนอ.K88-92
กรรมวิธีที่ 5 อ้อยพันธุ์ สนอ.K95-84
กรรมวิธีที่ 6 อ้อยพันธุ์บราซิล Sp70-1284
กรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์
กรรมวิธีที่ 8 อ้อยพันธุ์ป่า Th99-132 (*S. Spontaneum*)
กรรมวิธีที่ 9 หญ้ากินนีสีม่วง

ก่อนปลูกวิเคราะห์ดินเพื่อประเมินความอุดมสมบูรณ์ของดินก่อนการทดลอง ได้แก่ ปฏิกิริยากรด- ด่าง ความต้องการปูน ค่าการนำไฟฟ้า อินทรียวัตถุ ไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ ธาตุอาหารรองและธาตุอาหารเสริม

เตรียมแปลงปลูกขนาด 9x7 ตร.เมตร เตรียมท่อนพันธุ์อ้อยตามที่กำหนดที่อายุใกล้เคียงกัน ตัดท่อนพันธุ์อ้อยแต่ละพันธุ์ท่อนละ 3 ตา ท่อนละ 2 ท่อน ใส่ปูนเพื่อปรับปฏิกิริยาของดินให้เหมาะสมก่อนปลูกประมาณ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยเคมีรองพื้นหลังอ้อยงอก 30 วัน ครั้งที่ 2 ใส่หลังจากครั้งแรก 60 วัน โดยแบ่งใส่ครั้งละ 50 เปอร์เซ็นต์ของอัตราที่กำหนดในแผนการทดลอง พร้อมกับธาตุอาหารรองและธาตุอาหารเสริมในปริมาณที่เหมาะสม

เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต โดยวัดความสูง จำนวนต้นต่อกอ เก็บข้อมูลระยะเก็บเกี่ยวโดยหาผลผลิตน้ำหนักสดและแห้ง เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในต้น และในดินที่ระดับความลึก 0-20 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางลำ และจำนวนลำต่อกอ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT ทำวัดการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) บริเวณรากอ้อย และ ศึกษาเปรียบเทียบการสะสมไนโตรเจนของอ้อยแต่ละพันธุ์ในแต่ละกรรมวิธี โดยวิธีการหาสมดุลของไนโตรเจน (Nitrogen balance)

สมการ ปริมาณไนโตรเจนที่ใส่ + ปริมาณไนโตรเจนในดิน = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอ้อย + ปริมาณไนโตรเจนที่ตกค้างในดิน

พร้อมทั้งวัดการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ^{15}N natural abundance และคำนวณด้วยสมการของ Shearer and Kohl (1986)

- เวลาและสถานที่ทดลอง

ระยะเวลา ตุลาคม 2557 - กันยายน 2558
สถานที่ ณ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
ศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรเขาสวนกวาง
อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน

ผลวิเคราะห์ตัวอย่างดินทางเคมีบางประการ พบว่า ในดินชั้นไถพรวน (Ap) มีปริมาณอินทรียวัตถุ 0.07% ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ต่ำ 1.13 และ 11.27 มก/กก ตามลำดับ (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์เนื้อดิน พบว่า ในดินชั้นไถพรวนเนื้อดินเป็นทราย (sand) ชั้นถัดมาเป็นชั้นชะล้าง (E) เนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย (Loamy sand) และถัดจากชั้นนี้ลงไปตลอดหน้าตัดดินมีเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย (Sandy loam) ดังแสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองสามารถคำนวณปริมาณปุ๋ยที่ใช้ในการทดลองได้ดังนี้ ปีแรก ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 0-6-12 กก/ไร่ N-P_2O_5-K_2O และปีที่ 2 (อ้อยตอ 1) 0-9-18 กก/ไร่ N-P_2O_5-K_2O

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์ทางเคมีบางประการในแต่ละชั้นของแปลงทดลอง

Depth (cm)	Thickness (cm)	pH	O.M. (%)	Available P (mg/kg)	Available K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	CEC (c mole/kg)
Ap	0 - 32	4.12	0.07	1.13	11.27	64.83	27.53	1
E	32 - 51	4.23	0.11	0.43	6.06	40.47	26.9	0.5
B21t	51 - 73	4.16	0.11	0.87	24.43	124.8	57.49	0.5
B22t	73 - 130	4.25	0.05	0.62	24.07	143.7	168.4	3.5
B23t	130 - 180	4.11	0.1	0.87	16.89	74.75	121.1	2.5
125 cm	125 cm	4.06	0.04	0.72	20.28	112.9	208.8	3.5

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์เนื้อดินในแต่ละชั้นของแปลงทดลอง

Depth (cm)	Thickness (cm)	Coarse Sand (%)	Fine Sand (%)	Total Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Texture
Ap	0 - 32	35.9	54	89.89	6.61	3.49	Sand
E	32 - 51	36.08	50.44	86.52	9.57	3.91	Loamy Sand
B21t	51 - 73	33.66	46.74	80.4	6.89	12.7	Sandy Loam
B22t	73 - 130	33.5	45.39	78.89	7.55	13.56	Sandy Loam
B23t	130 - 180	32.94	46.93	79.87	7.99	12.14	Sandy Loam
125 cm	125 cm	32.8	45.33	78.13	8.1	13.76	Sandy Loam

2. การเจริญเติบโตและผลผลิตของอ้อย

การทดลองในปี 2557 (อ้อยปลูก) พบว่าทุกกรรมวิธีมีค่าเฉลี่ยความสูง จำนวนต้นต่อกอ และเส้นผ่าศูนย์กลางลำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) โดยกรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์ปากช่องมีค่าเฉลี่ยความสูง สูงที่สุด 284.8 เซนติเมตร กรรมวิธีที่ 9 หญ้ากินนีสีม่วงมีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อกอสูงที่สุด 26.9 และกรรมวิธีที่ 4 อ้อยพันธุ์สอน. 88-92 และกรรมวิธีที่ 5 อ้อยพันธุ์สอน. 95-84 มีค่าเส้นผ่าศูนย์กลางลำสูงที่สุด คือ 3.10 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อู่ทอง 84-12 และกรรมวิธีที่ 3 พันธุ์สอน. 92-11 (ตารางที่ 3) และเมื่อพิจารณาผลผลิตและน้ำหนักแห้ง พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์ปากช่องมีค่าเฉลี่ยผลผลิตสูงที่สุด 5,248 กก/ไร่ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อู่ทอง 84-12 มีค่าเฉลี่ยผลผลิต 5,056 กก/ไร่ แต่มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งสูงที่สุด คือ 3,044 กก/ไร่ ดังตารางที่ 3

การทดลองในปี 2558 (อ้อยตอ 1) พบว่ามีผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันกับปี 2557 โดยกรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์ปากช่องมีค่าเฉลี่ยความสูง สูงที่สุด 135.9 เซนติเมตร กรรมวิธีที่ 9 หญ้ากินนีสีม่วงมีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อกอสูงที่สุด 38.1 และกรรมวิธีที่ 4 อ้อยพันธุ์สอน. 88-92 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางลำสูงที่สุด คือ 2.17 เซนติเมตร (ตารางที่ 4) และเมื่อพิจารณาผลผลิตและน้ำหนักแห้ง พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์ปากช่องมีค่าเฉลี่ยผลผลิตและน้ำหนักแห้งสูงที่สุด 7,090 และ 3,314 กก/ไร่ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อู่ทอง 84-12 (5,589 และ 2,709 กก/ไร่) ดังตารางที่ 3

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า ในปี 2557 ทุกกรรมวิธีทดลองมีค่าเฉลี่ยความสูง จำนวนต้นต่อกอ และเส้นผ่าศูนย์กลางลำสูงกว่าปี 2558 (ตารางที่ 3 และ 4) ดังจะเห็นได้จากค่าเฉลี่ยความสูงของทุกกรรมวิธีในปี 2558 มีค่าน้อยกว่าปี 2557 ประมาณ 30 – 82 % โดยกรรมวิธีที่ 1 – 6 มีค่าเฉลี่ยความสูงลดลงมาก แสดงให้เห็นว่าอ้อยทั้ง 6 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากไม่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน แต่เมื่อพิจารณาถึงค่าเฉลี่ยผลผลิตพบว่า ปี 2557 ทุกกรรมวิธีมีค่าเฉลี่ยผลผลิตและน้ำหนักต่ำกว่าปี 2558 แสดงให้เห็นว่าอ้อยทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบได้ดีแม้ไม่ได้มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มเติมลงไปในดิน นอกจากนี้ยังพบว่า กรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์ปากช่อง มีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ James and Olivares (1997) ที่รายงานว่าหญ้าเนเปียร์สามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ไม่ได้มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และจากการศึกษาของ Woodard and Sollenberger (2008) ที่ทำการทดลองในรัฐฟลอริด้า รายงานว่า หญ้าเนเปียร์สามารถให้ผลผลิตได้สูงถึง 7,000 กิโลกรัมต่อปี

3. เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในดินก่อนปลูกและหลังปลูก เปอร์เซ็นต์ในโตรเจนในพืช เปอร์เซ็นต์ ^{15}N ในพืช การตรึงไนโตรเจนจากรากพืช และสมดุลไนโตรเจน (N balance)

เพื่อเป็นการยืนยันการรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาปริมาณไนโตรเจนในดินก่อนปลูก หลังปลูก ปริมาณไนโตรเจนในพืช ปริมาณ ^{15}N ในพืช รวมไปถึงการวัดการตรึงไนโตรเจนจากรากพืช และนำไปคำนวณสมดุลไนโตรเจน (N balance) ของอ้อยพันธุ์ไทย (กรรมวิธีที่ 1 – 5) เปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์บราซิล (กรรมวิธีที่ 6) อ้อยป่า (กรรมวิธีที่ 8) หญ้าเนเปียร์ปากช่อง (กรรมวิธีที่ 7) และหญ้ากินนีสีม่วง (กรรมวิธีที่ 9) จากผลการทดลองในปี 2557 (อ้อยปลูก) และ 2558 (อ้อยตอ 1) พบว่า

กรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์ปากช่อง มีค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนในพืชสูงที่สุด คือ 2.253% และ 2.490% (ตารางที่ 5 และ 6) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Woodard and Sollenberger (2008) ที่รายงานว่าหญ้าเนเปียร์เป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนสูง รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ 9 หญ้ากินนีสีม่วง มีค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนในพืช 2.057% และ 2.190% (ตารางที่ 5 และ 6) และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนในอ้อยสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า กรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุด รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อู่ทอง 84-12 ดังตารางที่ 5 และ 6

การวิเคราะห์ปริมาณ ^{15}N ในพืช เป็นการศึกษาการได้รับไนโตรเจนจากอากาศ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยที่มีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนที่ถูกตรึงแบบชีววิธี (Biological Nitrogen Fixation) จากการทดลองในปี 2557 (อ้อยปลูก) พบว่า กรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีค่าเฉลี่ยปริมาณ ^{15}N 0.880 % ซึ่งสูงที่สุดในกลุ่มกรรมวิธีที่เป็นอ้อยสายพันธุ์ไทย รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อู่ทอง 84-12 มีค่าเฉลี่ยปริมาณ ^{15}N 0.877% โดยทั้ง 2 กรรมวิธีมีค่าค่าเฉลี่ยปริมาณ ^{15}N ใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ 6 อ้อยพันธุ์บราซิล Sp70-1284 และกรรมวิธีที่ 8 อ้อยป่า มีค่าเฉลี่ยปริมาณ ^{15}N เท่ากับ 0.877 % และ 0.847% (ตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nogueira *et al*. (2001) ที่รายงานว่า อ้อยสายพันธุ์บราซิลมีความสามารถในการใช้ประโยชน์ไนโตรเจนที่ถูกตรึงจากอากาศได้สูง และรายงานของ Boddey *et al*. (1991) ที่รายงานว่าอ้อยป่าสายพันธุ์บราซิล (*S. spontaneum*) มีความสามารถในการใช้ประโยชน์ไนโตรเจนที่ถูกตรึงจากอากาศ โดยปริมาณไนโตรเจนที่สะสมในพืชได้มาจากการตรึงไนโตรเจนแบบชีววิธีปริมาณ 25 - 60% ส่วนการทดลองในปี 2558 (อ้อยตอ 1) ก็ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันดังตารางที่ 6 จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าอ้อยสายพันธุ์ไทยมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนที่ถูกตรึงแบบชีววิธี โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และกรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อู่ทอง 84-12

การวัดการตรึงไนโตรเจนในการทดลองนี้ เป็นการวัดการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆ ราก จากตารางที่ 5 และ 6 พบว่า กรรมวิธีที่ 3 อ้อยพันธุ์สอน. 92-11 มีค่าเฉลี่ยการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด 0.134 และ 0.141 μmol C_2H_4/hr/root dry weight รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์ปากช่อง มีค่าเฉลี่ยการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด 0.126 และ 0.129 μmol C_2H_4/hr/root dry weight ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cavalcante and Döberiner (1988) ที่พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อยครั้งแรก ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมีชื่อว่า *Gluconacetobacter diazotrophicus* และ Singh *et al*. (2013) ที่แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (*G. diazotrophicus*) บริเวณรากของหญ้าเนเปียร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Döberiner (1997) ที่พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในสกุล *Azospirillum Herbaspirillum* และ *Burkholderia* ในราก ลำต้นและใบของข้าวโพด ข้าว ข้าวฟ่างและหญ้าเนเปียร์

สมดุลไนโตรเจนของการทดลองของทุกกรรมวิธีในแต่ละปี มีค่าเป็นลบ โดยกรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์ปากช่อง มีค่าเฉลี่ยสมดุลไนโตรเจนต่ำที่สุด -1.252 และ -2.324 ในปีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อู่ทอง 84-12 ในปีที่ 1 (-0.968) และกรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในปีที่ 2 (-1.807) ดังตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ จากผลการทดลองข้างต้นสามารถอธิบายได้ว่า หญ้าเนเปียร์ปากช่องและอ้อยสายพันธุ์ไทยที่

ปลูกในดินโดยไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนสามารถใช้ไนโตรเจนที่ตรึงจากอากาศแบบชีววิธีได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์บราซิล (กรรมวิธีที่ 6 และ 8)

ตารางที่ 3 ความสูง จำนวนต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางลำ ผลผลิตและน้ำหนักแห้ง ของอ้อยปลูก ปี 2557

กรรมวิธี	ความสูง (ซม.)	จำนวนต้นต่อกอ	เส้นผ่าศูนย์กลางลำ (ซม.)	ผลผลิต (กก/ไร่)	น้ำหนักแห้ง (กก/ไร่)
1	171.6 b	3.3 bc	2.70 ab	3,790	2,091
2	179.2 b	2.3 c	2.83 a	5,056	3,044
3	156.0 b	3.8 bc	2.87 a	3,300	1,771
4	176.9 b	3.6 bc	3.10 a	2,731	1,856
5	222.2 ab	3.5 bc	3.10 a	3,662	1,934
6	209.5 ab	3.8 bc	2.40 b	3,932	2,034
7	284.8 a	7.6 bc	1.47 c	5,248	2,425
8	187.3 b	16.1 ab	1.03 d	3,520	2,020
9	188.7 b	26.9 a	0.53 e	3,373	2,190
CV (%)	**21.10***	**86.05***	**9.58***	**34.90^{ns}**	**29.50^{ns}**

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 4 ความสูง จำนวนต้นต่อกอ เส้นผ่าศูนย์กลางลำ ผลผลิตและน้ำหนักแห้ง ของอ้อยตอ ปี 2558

กรรมวิธี	ความสูง (ซม.)	จำนวนต้นต่อกอ	เส้นผ่าศูนย์กลางลำ (ซม.)	ผลผลิต (กก/ไร่)	น้ำหนักแห้ง (กก/ไร่)
1	34.5 b	3.4 b	1.80 ab	3,205	1,813
2	58.1 b	2.8 b	1.93 ab	5,589	2,709
3	33.9 b	3.7 b	1.67 bc	3,982	1,820
4	36.1 b	2.9 b	1.90 ab	4,196	2,283
5	49.1 b	3.0 b	2.17 a	4,004	1,927
6	37.1 b	1.6 b	1.03 d	2,339	1,671
7	135.9 a	9.2 b	1.40 cd	7,090	3,314
8	132.9 a	11.6 b	0.57 e	2,486	1,422
9	42.0 b	38.1 a	0.47 e	2,304	1,486
CV (%)	**34.66***	**90.41***	**26.80***	**83.42^{ns}**	**81.51^{ns}**

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในดินก่อนปลูกและหลังปลูก เปอร์เซ็นต์ในโตรเจนในพืช เปอร์เซ็นต์ ^{15}N ในพืช การตรึงไนโตรเจน และสมดุลไนโตรเจน ของอ้อยปลูก ปี 2557

กรรมวิธี	%N ในดิน		%N ในพืช	% ^{15}N พืช	การตรึงไนโตรเจน ($\mu mol\ C_2H_4/hr/root\ dry\ weight$)	N balance
	ก่อนปลูก	หลังปลูก				
1	0.060	0.037	1.753	0.880	0.088 ± 0.016	-0.863 ± 0.531
2	0.056	0.041	1.830	0.877	0.070 ± 0.013	-0.968 ± 0.704
3	0.067	0.040	1.303	0.597	0.134 ± 0.096	-0.496 ± 0.132
4	0.064	0.032	1.280	0.703	0.087 ± 0.013	-0.281 ± 0.152
5	0.052	0.039	1.570	0.710	0.122 ± 0.013	-0.646 ± 0.187
6	0.054	0.040	1.627	0.877	0.077 ± 0.001	-0.700 ± 0.725
7	0.056	0.031	2.253	1.043	0.126 ± 0.091	-1.252 ± 0.265
8	0.054	0.033	1.660	0.847	0.103 ± 0.040	-0.722 ± 0.567
9	0.060	0.035	2.057	1.080	0.096 ± 0.030	-1.019 ± 0.738

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในดินก่อนปลูกและหลังปลูก เปอร์เซ็นต์ในโตรเจนในพืช เปอร์เซ็นต์ ^{15}N ในพืช การตรึงไนโตรเจน และสมดุลไนโตรเจน (N balance) ของอ้อยตอ ปี 2558

กรรมวิธี	%N ในดิน		%N ในพืช	% ^{15}N พืช	การตรึงไนโตรเจน ($\mu mol\ C_2H_4/hr/root\ dry\ weight$)	N balance
	ก่อนปลูก	หลังปลูก				
1	0.066	0.045	1.910	0.900	0.082 ± 0.058	-1.807 ± 0.377
2	0.054	0.047	1.833	0.863	0.063 ± 0.029	-1.764 ± 0.567
3	0.074	0.046	1.363	0.603	0.141 ± 0.090	-1.195 ± 0.229
4	0.068	0.036	1.393	0.687	0.082 ± 0.018	-1.280 ± 0.282
5	0.058	0.044	1.450	0.710	0.105 ± 0.026	-1.331 ± 0.069
6	0.060	0.046	1.810	0.860	0.071 ± 0.014	-1.724 ± 0.553
7	0.073	0.036	2.490	1.063	0.129 ± 0.088	-2.324 ± 0.390
8	0.067	0.038	1.787	0.843	0.100 ± 0.035	-1.657 ± 0.738
9	0.069	0.040	2.190	1.097	0.082 ± 0.005	-2.080 ± 0.912

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเจริญเติบโตของอ้อยสายพันธุ์ไทย และสายพันธุ์บราซิลในสภาพแปลงที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเป็นเวลา 2 ปี (อ้อยปลูก และอ้อยตอ 1) อ้อยสายพันธุ์ไทยมีการเจริญเติบโตค่อนข้างดีและใกล้เคียงกันส่วนหญ้าเนเปียร์ปากช่อง และอ้อยป่ามีการเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วนการศึกษาการใช้ไนโตรเจนที่ตรึงจากอากาศแบบชีววิธี อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์อู่ทอง 84-12 สามารถใช้ไนโตรเจนที่ตรึงจากอากาศแบบชีววิธีได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์บราซิล

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาต่อยอด เช่น การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สำหรับอ้อยที่มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น

2. นำข้อมูลที่ได้ไปศึกษาต่อในเชิงลึก และพัฒนาอ้อยสายพันธุ์ไทยที่สามารถใช้ไนโตรเจนที่ตรึงจากอากาศแบบชีววิธีได้

3. เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาพันธุ์อ้อยที่ใช้ไนโตรเจนน้อย ลดปริมาณและต้นทุนในการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการผลิตอ้อย

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

Bastana M. V., Dourado-Neto D., Reichardt K., Bacchi O.O.S., Oliveira J.C.M., Trivellin P.C.O., Timm L.C., Tominaga T.T., Correchel V., Cassaro F.A.M., Pires L.F. and J.R. de Macedo. 2003. Management effects on nitrogen recovery in a sugarcane crop grown in Brazil. Geoderma., 116: 235-248.

Boddey R.M., Urquiaga S., Alves B.J.R., Reis V.M. and J. Döbereiner. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil, 137:111-117.

Boddey R.M., Urquiaga S., Alves B.J.R. and V.M. Reis 2003. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. Plant Soil., 252: 139-149.

Castro-Gonzalez R., Martinez-Aguilar L., Ramirez-Trujillo A. and P. Estrada-de los Santos. 2011. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. Plant Soil. doi: 10.1007/s11104-0110768-0.

Cavalcante V.A. and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soils, 108: 23-31.

Döbereiner J. 1961. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. Plant soil., 15: 211-216.

Döbereiner J. 1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs. Plant and Soil, 110: 207-212.

Döbereiner J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. Soil Biol. Biochem., 29: 771-774.

dos Reis F.B.Jr., Reis V.M., Urquiaga S. and J. Döbereiner. 2000. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum spp*. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane (*Saccharum* spp.). Plant Soil., 219: 153-159.

James E.K.. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field.Crop. Res., 65: 197-209.

James E.K. and F.L. Olivares. 1997. Infection and colonization of sugarcane and other graminaseous plants by endophytic diazotrophs. Critical Reviews in Plant Science, 17: 77-119.

Li R.P. and I.C. Macrae. 1992. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. Soil Biochem., 24: 413-419.

Nogueira E. de M., Vinagre F., Masuda H.P., Vargas C., Muniz de Pádua V.L., Rodrigues da Silva F., V. dos Santos R., Baldani J.I., Ferreira P.C.G. and A.S. Hemerly. 2001. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans.* Genetics and Molecular Biology, 24(1-4): 199-206.

Perin L., Martinez-Aguilar L., Castro-Gonzalez R., Estrada-de los Santos P.,Cabellos-Avelar T., Guedes H.V., Reis V.M. and J. Caballero-Mellado. 2006. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3103-3110.

Reis V.M., Olivares F.S. and J. Döbereiner. 1994. Improved methodology for isolation and identification of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. World J. Microbiol. Biotechnol., 10: 101-104.

Shearer G. and D.H. Kohl. 1986. N_2 fixation in field settings: Estimates based on natural ^{15}N abundance. Aust. J. Plant. Physiol., 13: 699-756.

Singh B.P., Singh H.P. and E. Obeng. 2013. Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics. Chapter 13 Elephantgrass. 271-291.

Woodard K.R. and L.E. Sollenberger. 2008. Production of Biofuel Crops in Florida : elephantgrass. SS-AGR-297. Institute of Food and Agricultural Sciences, Gaineville, Florida.

13. ภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่ 1 แปลงทดลองอ้อยตอ 1

ภาพภาคผนวกที่ 2 การตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) บริเวณรากอ้อย

ภาพภาคผนวกที่ 3 รากอ้อยตอพันธุ์ขอนแก่น 3

ภาพภาคผนวกที่ 4 รากอ้อยตอพันธุ์อู่ทอง 84-12

ภาพภาคผนวกที่ 5 รากอ้อยตอพันธุ์สอน. 92-11

ภาพภาคผนวกที่ 6 รากอ้อยตอพันธุ์สอน.88-92

ภาพภาคผนวกที่ 7 รากอ้อยตอพันธุ์สอน. 95-84

ภาพภาคผนวกที่ 8 รากอ้อยตอพันธุ์บราซิล Sp 70-1284

ภาพภาคผนวกที่ 9 รากหญ้าเนเปียร์ปากช่องปีที่ 2

ภาพภาคผนวกที่ 10 รากอ้อยป่า TH99-132 (S. spontaneum) ปีที่ 2

ภาพภาคผนวกที่ 11 รากหญ้ากินนีสีม่วงปีที่ 2