



รายงานโครงการวิจัย

การศึกษาศักยภาพการรับไนโตรเจนทางชีวภาพ กลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน
ที่สำคัญ และปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับอ้อย
ในอ้อยสายพันธุ์ไทย

Study on nitrogen derived from biological nitrogen fixing ability,
N₂-fixing bacterial community structure and interaction between
sugar cane and N₂-fixing bacteria on commercial sugar cane
varieties in Thailand

นางสาวกัลยกร โปรงจันทิก

KUNLAYAKORN PRONGJUNTHUEK

2558



รายงานโครงการวิจัย

การศึกษาศักยภาพการรับไนโตรเจนทางชีวภาพ กลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน
ที่สำคัญ และปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับอ้อย
ในอ้อยสายพันธุ์ไทย

Study on nitrogen derived from biological nitrogen fixing ability,
N₂-fixing bacterial community structure and interaction between
sugar cane and N₂-fixing bacteria on commercial sugar cane
varieties in Thailand

นางสาวกัลยกร โปรงจันทิก

KUNLAYAKORN PRONGJUNTHUEK

2558

คำปรารภ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในประเทศไทย เพราะนอกจากเป็นพืชอาหารและพืชอุตสาหกรรมแล้ว ปัจจุบันยังเป็นพืชพลังงานอีกด้วย เนื่องจากน้ำตาลจากอ้อยสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันจากน้ำมันดิบซึ่งเป็นทรัพยากรตามธรรมชาติ ปัจจุบันพื้นที่ปลูกอ้อยมีประมาณ 6 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 10 ตัน/ไร่ ในการผลิตอ้อยพบว่าอ้อยมีการตอบสนองต่อไนโตรเจนในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน แต่ความจำเป็นในการใช้พลังงานทดแทนอาจทำให้มีความเข้าใจว่าอ้อยมีความจำเป็นต้องใช้ในโตรเจนในการผลิตในปริมาณมากขึ้น จนทำให้ไทยต้องมีต้นทุนในการนำเข้าปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเพื่อการผลิตเป็นจำนวนมาก ในอนาคต นักวิจัยชาวบราซิลรายงานว่า อ้อยสายพันธุ์บราซิลมีความสามารถในการรับไนโตรเจนจากอากาศได้ 40-64% ทำให้ประเทศบราซิลผลิตอ้อยได้โดยที่มีต้นทุนค่าปุ๋ยไนโตรเจนต่ำ สำหรับในประเทศไทยมีข้อมูลการวิจัยเบื้องต้นพบว่าในพื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทยก็พบการแพร่กระจายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเช่นเดียวกัน ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำโครงการการศึกษาศักยภาพการรับไนโตรเจนทางชีวภาพ กลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่สำคัญ และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับอ้อยในอ้อยสายพันธุ์ไทย เพื่อให้ได้สายพันธุ์อ้อยที่มีศักยภาพในการรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่กับอ้อยสายพันธุ์ไทย และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาพันธุ์อ้อยที่ใช้ไนโตรเจนน้อย ลดปริมาณและต้นทุนในการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการผลิตอ้อยในประเทศไทย โดยที่ผลผลิตและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจไม่เปลี่ยนแปลง

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
ผู้วิจัย	4
บทนำ	5
บทคัดย่อ	8
1. การศึกษาศักยภาพของอ้อยสายพันธุ์ไทยในการได้รับไนโตรเจน จากการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ	12
2. การศึกษาลักษณะกลุ่มและปริมาณประชากรของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ในอ้อยพันธุ์ไทยโดยเทคนิค Real-Time PCR	18
3. การแสดงออกของยีน SHR5-receptor-like kinase ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพ การทำงานร่วมกันระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับอ้อยสายพันธุ์ไทย_	25
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	36
บรรณานุกรม	38
ภาคผนวก	41

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ	นางสาวกัลยกร โปรงจันทิก	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้าการทดลองที่ 1	นางสาวกัลยกร โปรงจันทิก	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้าการทดลองที่ 2	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
หัวหน้าการทดลองที่ 3	นางสาวอรุณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นายอรัญญ์ ชันติวิชัย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางอุชฎา สุขจันทร์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายมนต์ชัย มั่นสสิลา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายภัศชญณณ หมั่นแจ้	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางประไพ ทองระอา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทนำ

อ้อยเป็นพืชที่มีการสะสมน้ำตาล sucrose สูงถึง 10% และมีรายงานว่ามีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ในอ้อยหลายชนิด มีรายงานว่าในอ้อยสายพันธุ์บราซิลมีความสามารถในการรับไนโตรเจนจากอากาศได้ 40-64% ทำให้ประเทศบราซิลผลิตอ้อยได้โดยที่มีต้นทุนค่าปุ๋ยไนโตรเจนต่ำ สำหรับในประเทศไทยมีข้อมูลการวิจัยเบื้องต้นพบว่าในพื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทยก็พบการแพร่กระจายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเช่นเดียวกัน จึงมีสมมุติฐานว่าอ้อยสายพันธุ์ไทยก็สามารถรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้เช่นเดียวกัน แต่ยังไม่มีความชัดเจนที่ยืนยันที่แน่นอนว่าแต่ละพันธุ์มีปริมาณมากน้อยเพียงใดและมีจุลินทรีย์กลุ่มไหนในธรรมชาติที่มีศักยภาพในอ้อยทางเศรษฐกิจ 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 มีการนำไนโตรเจนออกไปจากพื้นที่ไปกับผลผลิตเพื่อการเผาเศษซากอ้อยประมาณ 16 กก.ไนโตรเจน ทั้งๆที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพียง 9.6-11.2 กก.ไนโตรเจน/ไร่/ปีเท่านั้น แสดงให้เห็นว่ามีไนโตรเจนอีก 4.8 – 6.4 กก.ไนโตรเจน/ไร่/ปี (บนสมมุติฐานที่ไม่มีการสูญเสียไนโตรเจนไปจากดิน) อีกทั้งผลผลิตก็ไม่พบว่าลดลง เมื่อมีการใช้พื้นที่ที่ติดต่อกัน จึงเป็นการสนับสนุนผลงานวิจัยที่พบว่าอ้อยได้รับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนในอากาศโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในต้นอ้อย (Boddey *et al.*, 2003) และ Basanta *et al.* (2003) ได้วิจัยโดยการหาสมดุลไนโตรเจน (N balance) และประเมินว่าการปลูกอ้อย 3 ปี (อ้อยปลูก 1 ปี และอ้อยต่อ 2 ปี) มีค่าเฉลี่ย 16.5 กก.ไนโตรเจน/ไร่ ถูกเคลื่อนย้ายเข้าไปในโรงงานและ 13.36 กก.ไนโตรเจน/ไร่ สูญเสียไปกับการเผา ในการทดลองนี้ไนโตรเจนมีการใส่ตอนปลูก 10 กก.ไนโตรเจน/ไร่ ดังนั้นไนโตรเจน 3 ตูปลูก เท่ากับ 26.1 กก.ไนโตรเจน/ไร่ ดังนั้น 3 ต่อ รวม 36 เดือนหลังจากปลูกมีการสะสมไนโตรเจนทั้งหมด 24.8 กก.ไนโตรเจน/ไร่ มาจากการตรึงไนโตรเจนหรือแหล่งอื่นๆ ภายนอก หลักฐานที่สำคัญสำหรับการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพในอ้อยในช่วงแรกมีการค้นพบแบคทีเรียสกุล *Beijerinckia* (Döberiner, 1961) และต่อมาได้มีการค้นพบแบคทีเรีย *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-Gonzalez *et al.*, 2011) เพื่อให้ได้สายพันธุ์อ้อยที่มีศักยภาพในการรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่กับอ้อยสายพันธุ์ไทย ใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาพันธุ์อ้อยที่ใช้ไนโตรเจนน้อย ลดปริมาณและต้นทุนในการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการผลิตอ้อยในประเทศไทย โดยที่ผลผลิตและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจไม่เปลี่ยนแปลง ลดการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกจากการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการผลิตอ้อยซึ่งมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นและเพิ่มศักยภาพในการผลิตพลังงานทดแทน เพิ่มศักยภาพในการแข่งขันและการพึ่งพาตนเองเช่นเดียวกับการผลิตอ้อยในบราซิลหลังทำการวิจัยประมาณ 15 ปี ก็พบว่ามีพันธุ์อ้อยสายพันธุ์บราซิลบางสายพันธุ์ที่สามารถรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ทั้งนี้เพราะความสัมพันธ์กันระหว่างสายพันธุ์อ้อยและชนิดจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในต้นอ้อย

การศึกษาลักษณะกลุ่ม (Community) และปริมาณประชากร (Population Rate) ของแบคทีเรีย PGPR ซึ่งเป็น Endophytic แบคทีเรีย ในเนื้อเยื่อต้นอ้อย มีความจำเป็นเพื่อศึกษาลักษณะการปฏิสัมพันธ์พื้นฐานของแบคทีเรียและอ้อยแต่ละสายพันธุ์ หากต้องการพัฒนาสายพันธุ์อ้อยที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ให้น้ำตาลมาก เพราะลักษณะของกลุ่มและปริมาณประชากรของแบคทีเรีย PGPR มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของอ้อย (Valeria *et al.*, 2012.) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและความสามารถในการช่วยละลายแร่ธาตุที่จำเป็นต่ออ้อยในดิน แปรผันไปตามลักษณะของสายพันธุ์อ้อย (Bashan and Levany, 1990) ทั้งนี้เราจะต้องไม่คัดเลือกเพียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียเท่านั้นแต่ต้องคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยด้วย (Munos-Rojas and Caballero-Mellado, 2003). ปัจจุบันเทคนิค Real-time PCR สามารถใช้ตรวจสอบชนิดเชื้อแบบเฉพาะเจาะจงถึงระดับ Species และ Subspecies (Schaad *et al.* 2001a) ได้แล้ว ยังได้เปรียบ Conventional PCR ซึ่งไม่สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ได้ แม้ว่าจะมีการพัฒนา PCR รูปแบบต่างๆ แต่ส่วนใหญ่จะมีวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก ในทางปฏิบัติไม่เหมาะสม โดยโอกาสเกิดความผิดพลาดในการทำ และหรือความถูกต้องแม่นยำมีมาก และมี reproductively ต่ำ นอกจากนี้ Real-time PCR ยังมี Sensitivity สูงกว่า วิธีการทาง Serology และประหยัดเวลาในส่วนที่ต้องใช้สร้างแอนติบอดีจำเพาะสำหรับแบคทีเรียกว่ามากอีกด้วย (Ozakman and Schaad, 2003)

Receptor protein kinases (RPKs) คือ ส่วนประกอบของระบบการส่งถ่ายสัญญาณ (signal transduction) ระหว่างเซลล์ โปรตีนนี้ค้นพบหน้าที่ในสัตว์ก่อนพืช เมื่อพบว่าพืชมีโปรตีนกลุ่มนี้เช่นกัน จึงเรียกว่า Receptor like kinases (RLKs) มีหน้าที่ช่วยในการสื่อสารระหว่างเซลล์ผ่านช่องว่างของพลาสมาเมมเบรน ทำให้เซลล์สามารถจดจำและตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมภายนอกระหว่างเซลล์ได้ RPKs มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน serine/threonin และ Tyrosin ในพืชมีการค้นพบครั้งแรกในข้าวโพดมีชื่อเรียกว่า ZmP1 เมื่อศึกษาหน้าที่ของโปรตีนสรุปได้ว่าพืชมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน serine/threonin ซึ่งตรงข้ามกับในสัตว์ที่มีความจำเพาะกับ Tyrosin (Becraft, 1998) RLKs ในพืชส่วนมากเป็นการส่งถ่ายสัญญาณ ทำให้พืชเกิดการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมระหว่างเซลล์ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเกิดปฏิสัมพันธ์กัน (interaction) ระหว่างเซลล์ เริ่มมีการศึกษา RLKs จากจีโนมของอะราบิโดบซิส พบยีนที่อยู่ในกลุ่ม RLKs มากกว่า 600 ยีน เมื่อนำมาศึกษาหน้าที่โดยวิธีการกลายยีน (mutagenesis) และการยับยั้งการทำงานของยีน (gene knockout) พบว่ามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของยีนในกลุ่ม RLKs มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบการต้านทานของพืช นอกจากนี้จะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อฮอร์โมน การผสมตัวเองไม่ติด (self-incompatibility) เป็นต้น (Shiu and Bleecker, 2001) การตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย endophytic ที่พบในพืช เช่น ข้าวโพด ข้าว และอ้อย นั้น จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการช่วยตรึงไนโตรเจน และช่วยการผลิตฮอร์โมนของพืชด้วย สำหรับกระบวนการทางโมเลกุลยังไม่ชัดเจนเกี่ยวกับการเกิดปฏิสัมพันธ์กันระหว่างแบคทีเรียและพืช ในปี 2006 มีการค้นพบยีน *SHR5* ในอ้อย ซึ่งเป็นยีนในกลุ่มโปรตีน receptor-like kinase (RLKs) เกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายสัญญาณ และการเกิดปฏิสัมพันธ์กันระหว่างพืชกับแบคทีเรีย endophytic โดยการแสดงออกของยีน *SHR5* ในอ้อยจะลดลง (down-regulated) เป็นผลมาจากแบคทีเรีย endophytic ที่มีประโยชน์เพียงอย่างเดียว ซึ่งไม่ใช่สาเหตุมาจากการการตอบสนองทั่วไปกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นหรือแม้แต่วิธีการต่างๆ เมื่อระดับของ

*SHR5*mRNA ลดลงทำให้ทราบว่าการทำงานร่วมกันระหว่างอ้อยและแบคทีเรีย endophytic มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Vinagre *et al.*, 2006) แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่พบในอ้อย เช่น *Gluconacetobacter diazotrophicus* *Herbaspirillum seropedicae* และ *H. rubrisubalbicans* สามารถเกิดการปฏิสัมพันธ์ร่วมกับกระบวนการส่งถ่ายสัญญาณ แล้วส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืชอาศัยได้ ซึ่งกลไกของพืชยอมให้มีการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียชนิด endophytic เท่านั้น และต้องไม่เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้แบคทีเรีย endophytic สามารถปฏิสัมพันธ์ เช่น การส่งถ่ายสัญญาณของเอทิลีน (ethylene signaling) ในอ้อย เพื่อส่งเสริมความสามารถของการตรึงไนโตรเจน (Cavalcante *et al.*, 2007) มีการศึกษาการตอบสนองต่อเอทิลีนในข้าวพบว่าการกระตุ้นเอทิลีนจากภายนอกทำให้การเจริญของรากข้าวลดลง เมื่อดูการแสดงออกของยีน *SHR5* กลับพบว่าสูงขึ้น (up-regulated) (Yin *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม *G. Diazotrophicus* เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่พบได้ทั่วไปในอ้อย ส่วนที่พบ ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และรากฝอย ซึ่งการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของพืชทำให้ทราบว่าพืชและ *G. Diazotrophicus* อยู่กับแบบพึ่งพาอาศัยกัน (Eskin *et al.*, 2014) *G. diazotrophicus* เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดีที่สุดที่พบในอ้อยและพืชตระกูลหญ้า รองลงมาได้แก่ *H. seropedicae* *H. rubrisubalbicans* และ *Burkholderia* sp. สามารถเจริญเติบโตอยู่ตามช่องว่างระหว่างเซลล์และท่อลำเลียง เป็นแบคทีเรีย endophytic ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัยช่วยตรึงไนโตรเจนและผลิตฮอร์โมนพืชเช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน เป็นต้น มีการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในอ้อยหลังจากการปลูกถ่าย *G. diazotrophicus* และ *H. rubrisubalbicans* ในฐานข้อมูล SUCEST (sugarcane EST sequence project) พบการแสดงออกของยีนจำนวนมากที่ช่วยให้อ้อยจดจำแบคทีเรียแล้วกระตุ้นการสร้างเครือข่ายสัญญาณเพื่อตอบสนองต่อความต้านทานในอ้อย ซึ่งพบว่า RPKs เป็นหนึ่งกลุ่มโปรตีนตัวรับสัญญาณที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง สามารถเป็นตัวแทนของอ้อยในการจดจำและทำงานร่วมกับแบคทีเรีย endophytic ได้ (Carvalho *et al.*, 2014) การทดลองนี้จึงได้นำยีน *SHR5-receptor-like kinase* มาศึกษาการแสดงออกของยีนในอ้อยเพื่อทดสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์กันระหว่างแบคทีเรียและอ้อย ซึ่งการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อยและสายพันธุ์อ้อย

บทคัดย่อ

ในการผลิตอ้อยพบว่าอ้อยมีการตอบสนองต่อไนโตรเจนในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน จนทำให้ไทยต้องมีต้นทุนในการนำเข้าปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเพื่อการผลิตเป็นจำนวนมากในอนาคต จากรายงานการผลิตอ้อยในบราซิล หลังทำการวิจัยประมาณ 15 ปี พบว่ามีพันธุ์อ้อยสายพันธุ์บราซิลบางสายพันธุ์ที่สามารถรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ทั้งนี้เพราะความสัมพันธ์กันระหว่างสายพันธุ์อ้อยและชนิดจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในต้นอ้อย วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อให้ได้สายพันธุ์อ้อยที่มีศักยภาพในการรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่กับอ้อย ทำการศึกษาในอ้อยพันธุ์ไทยที่นิยมปลูก 5 สายพันธุ์ คือ ขอนแก่น 3 อุทอง 84-12 สอน.92-11 สอน.88-92 และสอน.95-84 เปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์บราซิล Sp70-1284 หล้าเนเปียร์ปากช่อง อ้อยป่า TH99-132 (*Saccharum spontaneum*) และหล้ากินนีสีม่วง โดยศึกษาการเจริญเติบโตในสภาพแปลงไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเป็นเวลา 2 ปี (อ้อยปลูก และอ้อยต่อ 1) ผลการทดลองพบว่า อ้อยสายพันธุ์ไทยมีการเจริญเติบโตค่อนข้างดีและใกล้เคียงกัน ส่วนหล้าเนเปียร์ปากช่อง และอ้อยป่ามีการเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วนการศึกษาการใช้ไนโตรเจนที่ตรึงจากอากาศแบบชีววิธี อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์อุทอง 84-12 สามารถใช้ไนโตรเจนที่ตรึงจากอากาศแบบชีววิธีได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์บราซิล

การศึกษาลักษณะกลุ่มและปริมาณประชากรของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อยพันธุ์ไทยโดยเทคนิค Real-Time PCR ทำการศึกษาในอ้อยพันธุ์ไทยที่นิยมปลูก 5 สายพันธุ์ คือ ขอนแก่น 3 อุทอง 84-12 สอน.92-11 สอน.88-92 สอน.95-84 อ้อยสายพันธุ์บราซิล (Sp70-1284) หล้าเนเปียร์ปากช่อง อ้อยป่าTH99-132 (*S. spontaneum*) และหล้ากินนีสีม่วง โดยศึกษาการ Colonization ของแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า มีการโคโลไนซ์ของแบคทีเรียอย่างน้อย 2 ชนิดในใบและลำต้นอ้อย พบ *Gluconacetobacter diazotrophicus* ในใบของอ้อยพันธุ์บราซิล พบ *Azospirillum brasilense* ในลำต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 สอน.92-11 สอน.88-92 สอน.95-84 พันธุ์บราซิล และอ้อยป่า และพบ *Herbaspirillum seropedicae* ในลำต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 สอน.92-11 สอน.88-92 สอน.95-84 พันธุ์บราซิล อ้อยป่าและหล้ากินนีสีม่วง นอกจากนี้ยังพบ *A. brasilense* และ *H. seropedicae* ในบริเวณ rhizosphere ของอ้อยพันธุ์อุทอง 84-12 แต่ไม่พบในลำต้น จึงอาจสรุปได้ว่าลำต้นอ้อยสายพันธุ์อุทอง 84-12 ไม่เอื้อต่อการอยู่อาศัยของแบคทีเรียดังกล่าว แต่อาจมีระบบที่เอื้อต่อการอยู่อาศัยบริเวณรากและ rhizosphere

ยีน *SHR5-receptor-like kinase* อยู่ในกลุ่ม Receptor protein kinases (RPKs) เป็นส่วนประกอบของระบบการส่งถ่ายสัญญาณระหว่างเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถจดจำ เกิดการปฏิสัมพันธ์ และตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมภายนอกระหว่างเซลล์ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต ระบบการต้านทานของพืช และการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ซึ่งในอ้อยการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างพืชกับแบคทีเรีย endophytic ทำให้ยีน *SHR5* เกิดการ down-regulated งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *SHR5* ในอ้อยสายพันธุ์ไทยทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงปลูก ในสภาพโรงเรือนใช้อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 พบว่า การแสดงออกของยีน *SHR5* ในกรรมวิธีที่ 2 การเติมเชื้อ *G. diazotrophicus* มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 1.82 และกรรมวิธีที่ 6 เติม *G. diazotrophicus* และ *Azospirillum* spp. มีการแสดงออกน้อยสุดเท่ากับ 0.31 ซึ่งต่ำกว่าชุดควบคุม

แต่ทั้ง 8 กรรมวิธี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน สำหรับการศึกษาในสภาพแปลงปลูกของอ้อย ได้แก่ พันธุ์ขอนแก่น 3 พันธุ์อุ้มทอง 84-12 พันธุ์สอน.92-11 พันธุ์สอน.88-92 พันธุ์สอน.95-84 พันธุ์บราซิล Sp70-1284 พันธุ์ป่า Th99-132 (*Saccharum Spontaneum*) พันธุ์อุ้มทองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับหญ้าเนเปียร์ และหญ้ากินนีสีม่วง โดยมีพันธุ์ขอนแก่น 3 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นชุดควบคุม พบว่า การแสดงออกของยีน *SbSHR5* เกิดการ up-regulated ในอ้อยพันธุ์ สอน.88-92 และอ้อยพันธุ์สอน.95-84 เมื่ออายุ 2 เดือน และในอ้อยพันธุ์ สอน.95-84 เมื่ออายุ 4 เดือน และทุกกรรมวิธีในสภาพแปลงปลูกมีค่าการแสดงออกมากกว่าค่าควบคุม

จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้สามารถสรุปได้ว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เป็นอ้อยสายพันธุ์ไทยที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยชีววิธี โดย *A. brasilense* และ *H. seropedicae* ที่อาศัยอยู่ในลำต้นอ้อย

Abstract

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 varieties were planted (KK3, UT84-12, LK92-11, K88-92 and K95-84) and compared with Brazilian sugarcane varieties (Sp70-1284 and TH99-132 (*Saccharum 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.

A study on N₂-fixing bacterial community structure of Thai sugarcane varieties by Real-Time PCR techniques was done with five commercial Thai varieties (KK3, UT84-12, LK92-11, K88-92 and K95-84) and Brazilian sugarcane varieties (Sp70-1284 and TH99-132 (*S. spontaneum*)) Napeir Pak Chong 1 (*Pennisetum purpureum* cv. pakchong1) and purple guinea grass. The study on colonization of bacteria showed that at least two genera of bacteria could colonized the leaves and stems of sugarcane. *Gluconacetobacter diazotrophicus* was found in leaves of Sp70-1284, *Azospirillum brasilense* in stems of KK3, LK92-11, K88-92, K95-84 and Sp70-1284 and *Herbaspirillum seropedicae* in stems of LK92-11, K88-92, K95-84, Sp70-1284 and purple guinea grass. Moreover, *A. brasilense* and *H. seropedicae* were found in rhizosphere of UT84-12 but not found in stems. It might be concluded that stem of UT84-12 not conducive to the habitat of the bacteria but may have a system that is conducive to living roots and rhizosphere.

SHR5-receptor-like kinase gene belongs to Receptor protein kinases (RPKs) group, is a component of a signal transduction pathway. RPKs allow cells to recognize, interact, and respond to their extracellular environment. These proteins control a wide range of processes, including development, plant defend mechanism and hormone perception. The expression level of SHR5 is down-regulated in sugarcane plants which interacted plant-endophytic bacteria. This research aims to study *SHR5* gene expression in Thai sugarcane under the greenhouse and field condition. The sugarcane variety for greenhouse condition is KK 3. The expression level showed maximum 1.82 in treatment inoculated with *G. diazotrophicus* and the minimum 0.31

in treatment inoculated with *G. diazotrophicus* and *Azospirillum* spp. However, all treatments showed no change of expression under greenhouse condition. Results of field condition showed up-regulated of *SbSHR5* gene in 2 months of LK92-11 and K88-92 variety, and 4 months of K95-84 variety. Moreover, the expression levels in all treatments of field condition are expressed more than that of the control treatment.

All result can conclude that KK3 is Thai sugarcane varieties have a capable of biological nitrogen fixing by *A. brasilense* and *H. seropedicae* lived within stems.

การทดลองที่ 1 การศึกษาศักยภาพของอ้อยสายพันธุ์ไทยในการได้รับไนโตรเจนจากการตรึง
ไนโตรเจนทางชีวภาพ
Study on nitrogen derived from biological nitrogen fixing ability of
Thai sugarcane varieties

วิธีดำเนินการทดลอง

- อุปกรณ์

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

- วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 9 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3
- กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อุทอง 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 ปฏิกริยากรด-ด่าง ความต้องการปุ๋ย ค่าการนำไฟฟ้า อินทรีย์วัตถุ ไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ ธาตุอาหารรองและธาตุอาหารเสริม

เตรียมแปลงปลูกขนาด 9x7 ตร.เมตร โดยในปี 2557 เตรียมท่อนพันธุ์อ้อยตามที่กำหนดที่อายุใกล้เคียงกัน ตัดท่อนพันธุ์อ้อยแต่ละพันธุ์ท่อนละ 3 ตา ท่อนละ 2 ท่อน ส่วนปี 2558 เป็นการตัดแต่งต่อ ทำการใส่ปุ๋ยเพื่อปรับปฏิกริยาของดินให้เหมาะสมก่อนปลูกประมาณ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยเคมีฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมรองพื้นหลังอ้อยงอก 30 วัน ครั้งที่ 2 ใส่หลังจากครั้งแรก 60 วัน โดยแบ่งใส่ครั้งละ 50 เปอร์เซ็นต์ของอัตราที่กำหนดในแผนการทดลอง พร้อมกับธาตุอาหารรองและธาตุอาหารเสริมในปริมาณที่เหมาะสม

เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต โดยวัดความสูง จำนวนต้นตอกอ เก็บข้อมูลระยะเก็บเกี่ยวโดยหาผลผลิต น้ำหนักสดและแห้ง เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในต้น และในดินที่ระดับความลึก 0-20 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางลำ และจำนวนลำตอกอ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT ทำวัด

การตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) บริเวณรากอ้อย และ ศึกษาเปรียบเทียบการสะสมไนโตรเจนของอ้อยแต่ละพันธุ์ในแต่ละกรรมวิธี โดยวิธีการหาสมดุลของไนโตรเจน (Nitrogen balance)

$$\begin{aligned} \text{สมการ} \quad & \text{ปริมาณไนโตรเจนที่ใส่} = \text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอ้อย} \\ & + \text{ปริมาณไนโตรเจนในดิน} \quad \quad \quad + \text{ปริมาณไนโตรเจนที่ตกค้างในดิน} \end{aligned}$$

พร้อมทั้งวัดการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี ^{15}N natural abundance และคำนวณด้วยสมการของ Shearer and Kohl (1986) โดยทำการวัดปริมาณ ^{15}N โดยใช้ใบอ้อย

- เวลาและสถานที่ทดลอง

ระยะเวลา ตุลาคม 2557 - กันยายน 2558

สถานที่ ฅ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรเขาสวนกวาง

อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน

ผลวิเคราะห์ตัวอย่างดินทางเคมีบางประการ พบว่า ในดินชั้นไทรพรวน (Ap) มีปริมาณอินทรีย์วัตถุ 0.07% ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ต่ำ 1.13 และ 11.27 มก/กก ตามลำดับ (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์เนื้อดิน พบว่า ในดินชั้นไทรพรวนเนื้อดินเป็นทราย (sand) ชั้นถัดมาเป็นชั้นชะล้าง (E) เนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย (Loamy sand) และถัดจากชั้นนี้ลงไปตลอดหน้าตัดดินมีเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย (Sandy loam) ดังแสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองสามารถคำนวณปริมาณปุ๋ยที่ใช้ในการทดลองได้ ดังนี้ ปีแรก ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 0-6-12 กก/ไร่ $\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$ และปีที่ 2 (อ้อยต่อ 1) 0-9-18 กก/ไร่ $\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$

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	Thickness	Coarse Sand	Fine Sand	Total Sand	Silt	Clay	Texture
	(cm)	(%)					
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 อ้อยพันธุ์อุทอง 84-12 และกรรมวิธีที่ 3 พันธุ์สอน. 92-11 (ตารางที่ 3) และเมื่อพิจารณาผลผลิตและน้ำหนักแห้ง พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์ปากช่องมีค่าเฉลี่ยผลผลิตสูงที่สุด 5,248 กก/ไร่ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อุทอง 84-12 มีค่าเฉลี่ยผลผลิต 5,056 กก/ไร่ แต่มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งสูงที่สุด คือ 3,044 กก/ไร่ ดังตารางที่ 3

การทดลองในปี 2558 (อ้อยต่อ 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 อ้อยพันธุ์อุทอง 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 แสดงให้เห็นว่าอ้อยทุก

สายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ไม่ได้มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มเติมลงไปดิน นอกจากนี้ยังพบว่า กรรมวิธีที่ 7 หล้าเนเปียร์ปากช่อง มีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ James and Olivares (1997) ที่รายงานว่าหล้าเนเปียร์สามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ไม่ได้มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และจากการศึกษาของ Woodard and Sollenberger (2008) ที่ทำการทดลองในรัฐฟลอริดา รายงานว่า หล้าเนเปียร์สามารถให้ผลผลิตได้สูงถึง 7,000 กิโลกรัมต่อปี

3. เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในดินก่อนปลูกและหลังปลูก เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในพืช 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) หล้าเนเปียร์ปากช่อง (กรรมวิธีที่ 7) และหล้ากินนีสีม่วง (กรรมวิธีที่ 9) จากผลการทดลองในปี 2557 (อ้อยปลูก) และ 2558 (อ้อยต่อ 1) พบว่า กรรมวิธีที่ 7 หล้าเนเปียร์ปากช่อง มีค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนในพืชสูงที่สุด คือ 2.253% และ 2.490% (ตารางที่ 5 และ 6) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Woodard and Sollenberger (2008) ที่รายงานว่าหล้าเนเปียร์เป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนสูง รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ 9 หล้ากินนีสีม่วง มีค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนในพืช 2.057% และ 2.190% (ตารางที่ 5 และ 6) และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนในอ้อยสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า กรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุด รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อุทอง 84-12 ดังตารางที่ 5 และ 6

การวิเคราะห์ปริมาณ ^{15}N ในพืช เป็นการศึกษาการได้รับไนโตรเจนจากอากาศ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยที่มีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนที่ถูกตรึงแบบชีววิธี (Biological Nitrogen Fixation) ซึ่งในการทดลองนี้ไม่มีการใส่ปุ๋ย ^{15}N จากการทดลองในปี 2557 (อ้อยปลูก) พบว่า กรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีค่าเฉลี่ยปริมาณ ^{15}N 0.880 % ซึ่งสูงที่สุดในกลุ่มกรรมวิธีที่เป็นอ้อยสายพันธุ์ไทย รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อุทอง 84-12 มีค่าเฉลี่ยปริมาณ ^{15}N 0.877% โดยทั้ง 2 กรรมวิธีมีค่าเฉลี่ยปริมาณ ^{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 (อ้อยต่อ 1) ก็ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันดังตารางที่ 6 จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าอ้อยสายพันธุ์ไทยมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนที่ถูกตรึงแบบชีววิธี โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และกรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อุทอง 84-12

การวัดการตรึงไนโตรเจนในการทดลองนี้ เป็นการวัดการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆ ราก จากตารางที่ 5 และ 6 พบว่ากรรมวิธีที่ 3 อ้อยพันธุ์สอน. 92-11 มีค่าเฉลี่ยการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด 0.134 และ 0.141 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{root dry weight}$ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 7 กล้วยาเนเปียร์ปากช่อง มีค่าเฉลี่ยการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด 0.126 และ 0.129 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{root dry weight}$ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cavalcante and Döberiner (1988) ที่พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อยครั้งแรก ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมีชื่อว่า *Gluconacetobacter diazotrophicus* และ Singh *et al.* (2013) ที่แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (*G. diazotrophicus*) บริเวณรากของกล้วยาเนเปียร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Döberiner (1997) ที่พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในสกุล *Azospirillum* *Herbaspirillum* และ *Burkholderia* ในราก ลำต้นและใบของข้าวโพด ข้าว ข้าวฟ่างและกล้วยาเนเปียร์

สมดุลไนโตรเจนของการทดลองของทุกกรรมวิธีในแต่ละปี มีค่าเป็นลบ โดยกรรมวิธีที่ 7 กล้วยาเนเปียร์ปากช่อง มีค่าเฉลี่ยสมดุลไนโตรเจนต่ำที่สุด -1.252 และ -2.324 ในปีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อุทอง 84-12 ในปีที่ 1 (-0.968) และกรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในปีที่ 2 (-1.807) ดังตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ จากผลการทดลองข้างต้นสามารถอธิบายได้ว่า กล้วยาเนเปียร์ปากช่องและอ้อยสายพันธุ์ไทยที่ปลูกในดินโดยไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนสามารถใช้ไนโตรเจนที่ตรึงจากอากาศแบบชีววิธีได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์บราซิล (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	29.50

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดย DMRT

ตารางที่ 4 ความสูง จำนวนต้นตอกอ เส้นผ่าศูนย์กลางลำ ผลผลิตและน้ำหนักแห้ง ของอ้อยต่อ ปี 2558

กรรมวิธี	ความสูง (ซม.)	จำนวนต้นตอกอ	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	81.51

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดย DMRT

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในดินก่อนปลูกและหลังปลูก เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในพืช เปอร์เซ็นต์ ¹⁵N ในพืช การตรึงไนโตรเจน และสมดุลไนโตรเจน ของอ้อยปลูก ปี 2557

กรรมวิธี	%N ในดิน		%N ในพืช	% ¹⁵ N พืช	การตรึงไนโตรเจน ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{root dry weight}$)	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 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในพืช เปอร์เซ็นต์ ^{15}N ในพืช การตรึงไนโตรเจน และสมดุลไนโตรเจน (N balance) ของอ้อยต่อ ปี 2558

กรรมวิธี	%N ในดิน		%N ในพืช	% ^{15}N พืช	การตรึงไนโตรเจน ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{root dry weight}$)	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

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะกลุ่มและปริมาณประชากรของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อยพันธุ์ไทยโดยเทคนิค Real-Time PCR
Study of N_2 -fixing bacterial community structure of Thai sugarcane varieties by Real-Time PCR techniques.

วิธีดำเนินการทดลอง

1. ค้นคว้าข้อมูลทาง Bioinformatic จีโนมของแบคทีเรียในดิน 7 ชนิดคือ *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. จากฐานข้อมูล NCBI
2. ศึกษาข้อมูลยีน nifH ของแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด โดยจัดกลุ่มวิวัฒนาการของยีน สร้าง Phylogenetic dendrogram หรือ gene evolutionary dendrogram
3. สืบค้น Homology position ระหว่าง Genus และภายใน Species
4. ออกแบบ โพรเมอร์ เพื่อใช้ทดสอบชนิดสายพันธุ์ของ Bacteria
5. ทดสอบ sensitivity และ specificity ของ โพรเมอร์ ที่ออกแบบไว้กับแบคทีเรีย culture
6. เมื่อได้ โพรเมอร์ ที่เหมาะสม จึงนำ PCR product ไป Sequence เพื่อนำรหัสพันธุกรรมที่ได้มาออกแบบ probe สำหรับ Quantitative PCR
7. สังเคราะห์ probe สำหรับ Quantitative PCR ที่จะใช้ทดสอบแบคทีเรียที่ต้องการ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การค้นคว้าและวิเคราะห์ข้อมูลทาง Bioinformatic ยีน NifH ของแบคทีเรียทั้ง 7 genus

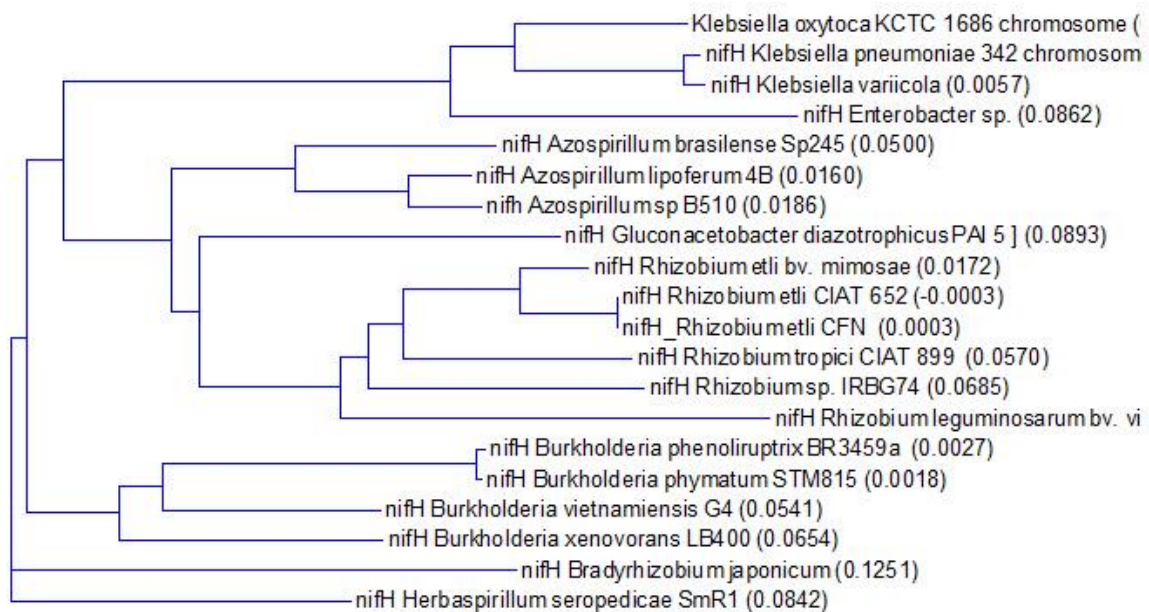
สืบค้นข้อมูล nifH จากฐานข้อมูล NCBI ของแบคทีเรียทั้ง 7 genus คือ *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter* และ *Herbaspirillum* ได้ข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมของยีน nifH จากแบคทีเรียทั้งหมด 19 species

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ Homology และ สร้าง gene evolutionary dendrogram (ภาพที่ 2) พบว่ามี Consensus position 90.9% และมี identity position 45% (ภาพที่ 1)

จากการวิเคราะห์ dendrogram พบว่า แบคทีเรียแต่ละ Genus มีการแบ่งแยกกลุ่มค่อนข้างชัดเจน และ species ภายใน Genus เดียวกันมีความแตกต่างกัน จึงสามารถนำ ยีน nifH มาใช้ในการออกแบบ Specific โพรเมอร์ ซึ่งใช้แบ่งแยกระหว่าง Genus และ species ของแบคทีเรียได้

nifH <i>Azospirillum</i> brasilense Sp245	387	CCTGGTGC
nifH <i>Azospirillum</i> lipoferum 4B	396	CCTGGTGC
nifH <i>Azospirillum</i> sp B510	396	CCTGGTGC
nifH <i>Gluconacetobacter</i> diazotrophicus PAI 5]	390	CCTGGTGC
nifH <i>Rhizobium</i> etli bv. mimosae	390	CCTGGTGC
nifH <i>Rhizobium</i> etli CIAT 652	390	CCTGGTGC
nifH <i>Rhizobium</i> tropici CIAT 899	390	CCTGGTGC
nifH <i>Rhizobium</i> sp. IRBG74	390	CCTGGTGC
nifH <i>Rhizobium</i> leguminosarum bv. viciae	390	CCTGGTGC
nifH <i>Enterobacter</i> sp.	390	CCTGGTGC
nifH <i>Klebsiella pneumoniae</i> 342 chromosome	390	CCTGGTGC
nifH <i>Burkholderia phenoliruptrix</i> BR3459a	390	CCTGGTGC
Consensus	399	CCTGGTGC

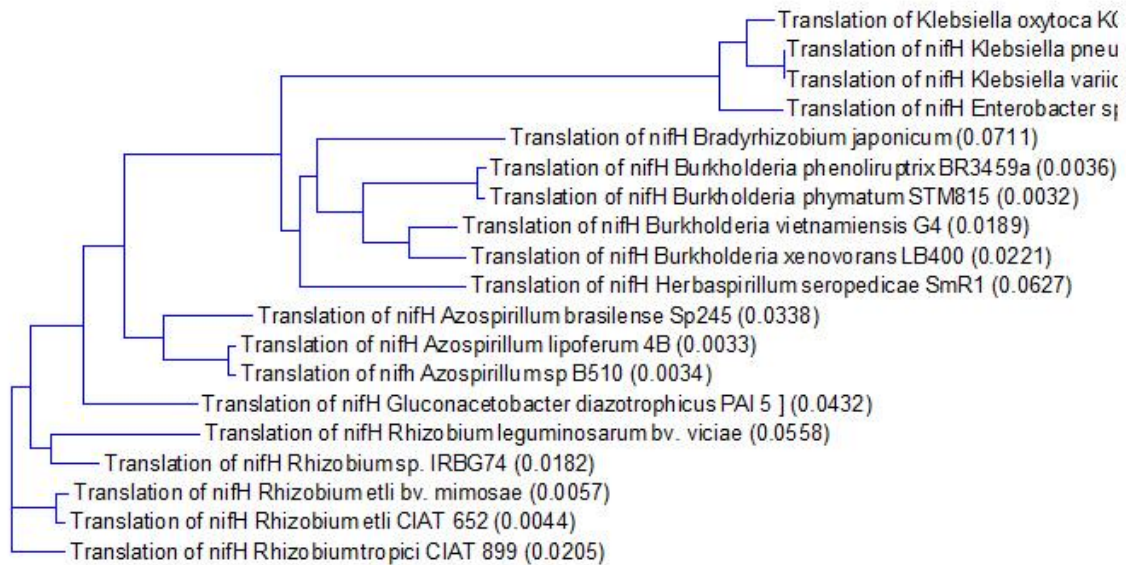
ภาพที่ 1 แสดง Alignment (บางส่วน) ของยีน nifH จากแบคทีเรีย 19 species



ภาพที่ 2 nifH gene evolutionary dendrogram ของแบคทีเรีย 19 species

นำข้อมูลยีนทั้งหมดมาจำลองการ Translation เพื่อวิเคราะห์ วิวัฒนาการระดับ Proteomic ของโปรตีน nifH พบว่าจากการวิเคราะห์ Homology สายเปปไทด์ consensus position 93.7% และมี identity position 56.5% จากการวิเคราะห์ protein evolutionary dendrogram พบว่ามีการแบ่งกลุ่มของโปรตีนระหว่าง Genus

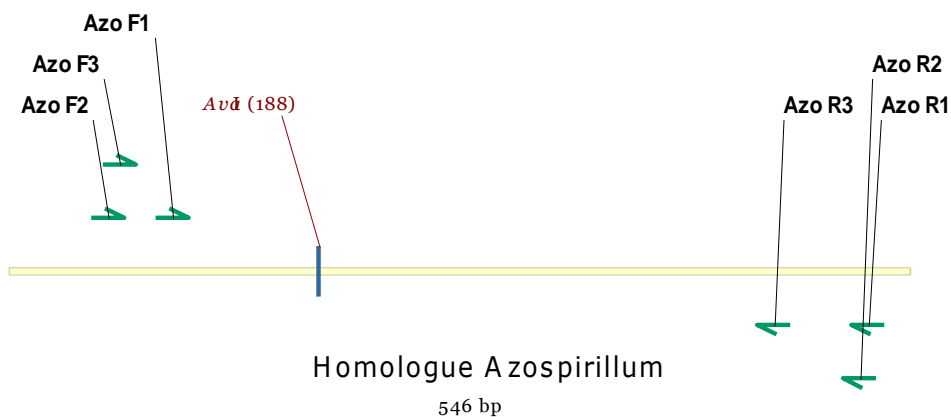
ค่อนข้างชัดเจนแต่ยังมีบาง Genus ที่มีวิวัฒนาการของโปรตีน NifH ใกล้เคียงกันเช่นในกลุ่ม *Enterobacter* และ *Klebsiella* กลุ่ม *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* และ *Herbaspirillum* (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 nifH gene evolutionary dendrogram ของ *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* และ *Herbaspirillum*

2. การออกแบบไพรเมอร์ เพื่อใช้ทดสอบชนิดสายพันธุ์ของ Bacteria

นำข้อมูล nifH gene alignment ทั้งหมดของแบคทีเรียมาวิเคราะห์ตำแหน่งที่ได้ 100% Homology ของแต่ละสายพันธุ์ภายใน genus เดียวกัน (ภาพที่ 5) และวิเคราะห์ Thermodynamic property ของบริเวณสายรหัสพันธุกรรมเพื่อหาบริเวณที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ (ภาพที่ 4) และสังเคราะห์ไพรเมอร์ (ตารางที่ 7) เพื่อเตรียมนำไปทดสอบ Sensitivity และ Specificity ต่อไป



ภาพที่ 4 ตำแหน่ง ไพรเมอร์ ที่เหมาะสมบนยีน nifH ของ genus *Azospirillum*

H <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	265	TCCGGCGGTCCGGAGCCGGGGGTCCGGCTGCGCCGGCCGCGCGGTGATCACCTCGATCAA
nifH <i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	274	TCCGGCGGTCCGGAGCCGGGGGTCCGGCTGCGCCGGCCGCGCGGTGATCACCTCGATCAA
nifH <i>Azospirillum</i> sp B510	274	TCCGGCGGTCCGGAGCCGGGGGTCCGGCTGCGCCGGCCGCGCGGTGATCACCTCGATCAA

ภาพที่ 5 แสดง Conserve region ของยีน nifH ใน *Azospirillum* อย่างน้อย 3 สายพันธุ์

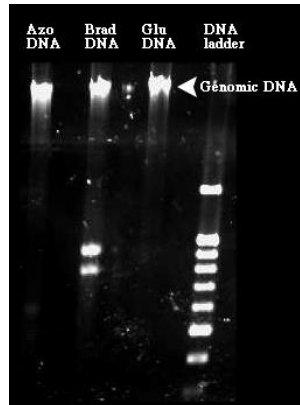
ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ ที่ได้รับการออกแบบสำหรับแบคทีเรียแต่ละ Genus และ/หรือ species

หมายเหตุ	Name	Sequence(5'-3')	Size(bp)
ใช้แอมยีน nifH <i>Gluconacetobactor</i>	Glu_F1	ATCGGCTACAAGGGCATCAA	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Gluconacetobactor</i>	Glu_R1	AGGGCTTGTTCATCGGTCTT	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Herbaspirillum</i>	Herb_F1	TCACTCAGACAAATCGCCTT	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Herbaspirillum</i>	Herb_R1	ATTCATCAACGACAGGCATC	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_F1	GACGTGATGAAGATCGG	17
ใช้แอมยีน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_F2*	TGCTCGGCGACGTGGTGT	18
ใช้แอมยีน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_R1*	ACACCACGTCGCCGAGCA	18
ใช้แอมยีน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_R2*	CATCGTGATCGGCGTCGG	18
ใช้แอมยีน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_R3*	TCCATCGTGATCGGCGTC	18
ใช้แอมยีน nifH <i>Klebsiella</i>	Kleb_F1	GATGGGTAAGAAAGTATGA	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Klebsiella</i>	Kleb_R1	AATGATGCTGGTGTCTTCTT	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Enterobacter</i>	Ent_F1	CGAAAGCGCAGAACCATT	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Enterobacter</i>	Ent_R1	TGCAGGTCGGGTCATATTCG	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Bradyrhizobium</i>	Brad_F1	ACAAATCGCCTTCTACGGGA	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Bradyrhizobium</i>	Brad_R1	ACGCGGCACGAAGTAGATCA	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_F1	ATCCGAAGGCCGACTCGACC	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_F2	TGGTCCGAGCTGGATCAGAAG	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_F3	GCTGGATCAGAAGATCCTGA	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_R1	CGCTCGTTGCAGATCAGGCC	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_R2	GTTGCAGATCAGGCCCGCA	20
ใช้แอมยีน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_R3	ATGCCCTTGGCGATGTTGTT	20

3. การทดสอบ sensitivity และ specificity ของไพรเมอร์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร) และดำเนินการสกัดจีโนมแบคทีเรีย 3 สกุล *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Gluconacetobactor* (Genomic DNA mini kit, blood and culture cell – geneaid) ทดสอบความบริสุทธิ์โดย run agarose gel 2% พบว่า

genomic DNA ของแบคทีเรียทั้งสามชนิดมีความบริสุทธิ์ในระดับที่น่าพอใจแต่ในส่วนของ *Bradyrhizobium* พบว่ามีลักษณะของ DNA fragment เกิดขึ้นจึงอาจต้องดำเนินการเลี้ยงเซลล์ใหม่และสกัดใหม่อีกครั้ง (ภาพที่ 6) จากนั้นทดสอบ Genomic DNA ด้วย ไพรเมอร์ 4 คู่ AzoF1+AzoR3 และ AzoF2+AzoR3 สำหรับ *Azospirillum* genomic DNA, BradF1+BradR1 สำหรับ *Bradyrhizobium* genomic DNA, GluF1+GluR1 สำหรับ *Gluconacetobactor* genomic DNA (ตารางที่ 8,9)



ภาพที่ 6 การทดสอบความบริสุทธิ์ของ Genomic DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย 3 ชนิด

Azo DNA : *Azospirillum* genomic DNA, Brad DNA : *Bradyrhizobium* genomic DNA,
Glu DNA : *Gluconacetobactor* genomic DNA

ตารางที่ 8 แสดงส่วนผสมของ Conventional PCR สำหรับตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์

Recipe	Volume (μ l)
GoTaq@Green Master Mix	12.5
Forward ไพรเมอร์ (Final concentration: 500 nM)	1.25
Reverse ไพรเมอร์ (Final concentration: 500 nM)	1.25
H ₂ O	9
DNA	1
Total	25

ตารางที่ 9 กระบวนการทำ PCR สำหรับ ไพรเมอร์ 4 คู่

Cycle		State
94°C	5 minutes	Denaturation
94°C	30 second	25 cycles
54°C	30 second	
72°C	30 second	
72°C	7 minutes	Elongation
4 °C	∞	Conservation

จากผล PCR พบว่า ไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 และ AzoF2+AzoR3 สำหรับ *Azospirillum* genomic DNA มีความเฉพาะเจาะจงสูงและสามารถตรวจพบ DNA ของแบคทีเรียในตระกูล *Azospirillum* ได้ โดยในส่วนของ ไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 ได้ PCR product ที่ขนาด 385 bp ไม่พบปฏิกิริยา PCR ใน NTC (Negative control) และพบ Unspecific PCR product ใน control genomic DNA ของแบคทีเรียชนิดอื่นซึ่งสามารถบอกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ในส่วนของ ไพรเมอร์ AzoF2+AzoR3 ได้ PCR product ที่ขนาด 424 bp ไม่พบปฏิกิริยา PCR ใน NTC (Negative control) และพบ Unspecific PCR product ใน control genomic DNA ใน *Gluconacetobactor* genomic DNA มีขนาดใหญ่กว่า 424 bp เล็กน้อยแต่สัญญาณอ่อนมากและไม่พบ Unspecific PCR product ใน *Bradyrhizobium* genomic DNA

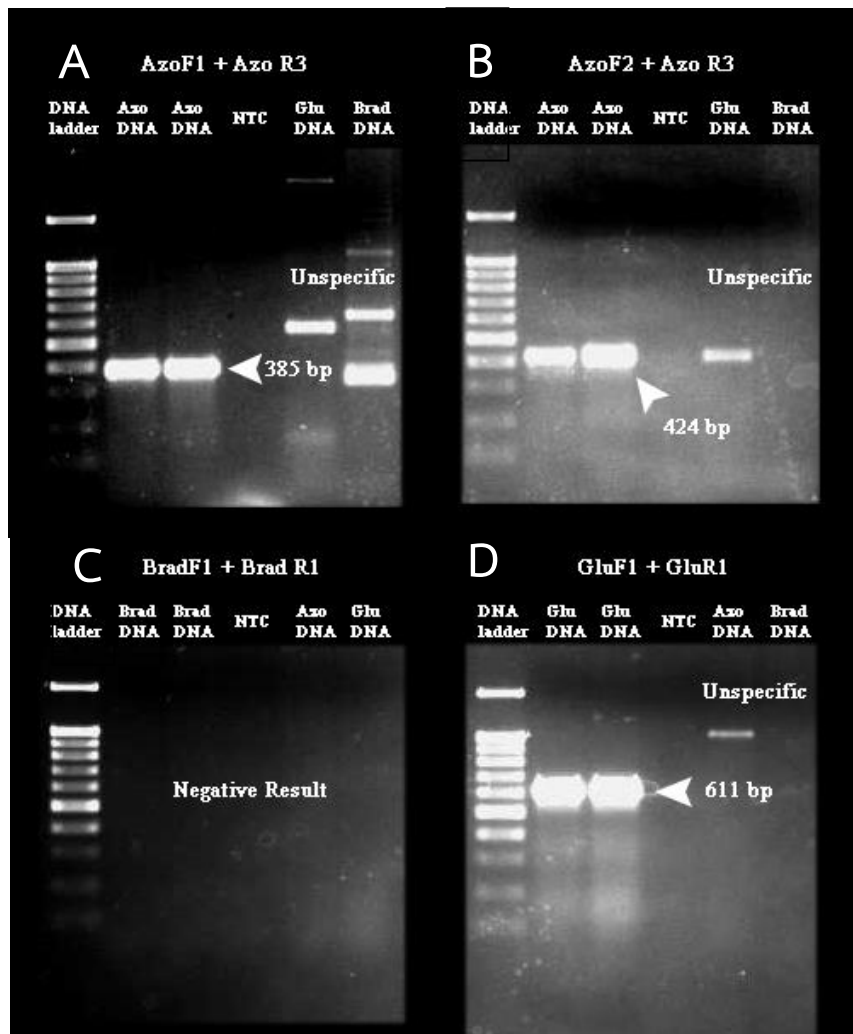
ในส่วนของ ไพรเมอร์ BradF1+BradR1 สำหรับ *Bradyrhizobium* genomic DNA ไม่พบปฏิกิริยาใดๆ เกิดขึ้น (ภาพที่ 7,C) ซึ่งอาจจะเกิดปัญหาจาก ไพรเมอร์ หรือ จาก *Bradyrhizobium* genomic DNA ซึ่งพบว่ามีลักษณะของการ Fragment เกิดขึ้น (ภาพที่ 6) ต้องดำเนินการเลี้ยงเชื้อและสกัด DNA ใหม่เพื่อตรวจสอบผลการทดลองอีกครั้ง

สำหรับไพรเมอร์ GluF1+GluR1 ใน *Gluconacetobactor* genomic DNA มีความเฉพาะเจาะจงสูงและสามารถตรวจพบ DNA ของแบคทีเรียในตระกูล *Gluconacetobactor* ได้ โดยในส่วนของ ไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 ได้ PCR product ที่ขนาด 611 bp ไม่พบปฏิกิริยา PCR ใน NTC (Negative control) และพบ Unspecific PCR product ใน control genomic DNA ของแบคทีเรียชนิดอื่นซึ่งสามารถบอกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน

เมื่อทดสอบการ Screening เบื้องต้นแล้วพบว่าวิธีการออกแบบไพรเมอร์ ได้ผลดีและสามารถตรวจพบแบคทีเรียตามที่ต้องการได้ด้วยความเฉพาะเจาะจง ทั้งนี้ในขั้นต่อไปจะเป็นการเลี้ยงและสกัด Genomic DNA เพิ่มเติมจากแบคทีเรียอีก 5 ตระกูลคือ *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium japonicum* และนำมาตรวจวิเคราะห์กับไพรเมอร์ที่เหลือ

4. การถอดรหัสพันธุกรรม PCR product และการออกแบบ probe สำหรับ Quantitative realtime PCR

ดำเนินการทำ Conventional PCR ในไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 และ AzoF2+AzoR3 สำหรับ *Azospirillum* genomic DNA และไพรเมอร์ GluF1+GluR1 ใน *Gluconacetobactor* genomic DNA จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการ run 2% gel agarose และตัดเจล จากนั้นส่งวิเคราะห์สายรหัสพันธุกรรม เพื่อเตรียมออกแบบ probe (Solegent, Korea)



ภาพที่ 7 (A,B) แสดงผลการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 และ AzoF2+AzoR3 ใน *Azospirillum* genomic DNA (C) แสดงผลการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ BradF1+BradR1 ใน *Bradyrhizobium* genomic DNA (D) แสดงผลการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ GluF1+GluR1 ใน *Gluconacetobactor* genomic DNA (หมายเหตุ NTC : Negative control, Azo DNA : *Azospirillum* genomic DNA, Brad DNA: *Bradyrhizobium* genomic DNA, Glu DNA : *Gluconacetobactor* genomic DNA)

การทดลองที่ 3 การแสดงออกของยีน *SHR5-receptor-like kinase* ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพ
การทำงานร่วมกันระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับอ้อยสายพันธุ์ไทย
Expression of *SHR5-receptor-like kinase* Gene Involving Interaction of
Entophytic Bacteria in Thai Sugarcane

วิธีดำเนินการทดลอง

- อุปกรณ์

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล
2. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
3. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (CFX96 Touch, BIORAD และ pOnePlus Real-Time PCR, ABI)
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส

- วิธีการ

1. การค้นหายีนและจำลองยีน *SHR5* ด้วยวิธี *insilico*

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศจากอินเทอร์เน็ต โดยเริ่มจากค้นหาข้อมูลยีน *SHR5* จาก NCBI นำกรดของยีน *SHR5* จากฐานข้อมูล GenBank มาแปลรหัสกลับเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเว็บไซต์ Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) จากนั้นนำมาค้นหาส่วนของ Whole-genome shotgun contigs โดยใช้ฐานข้อมูลของข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) ด้วยเว็บไซต์ BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) แล้วหาส่วนของ coding sequences (CDS) ด้วยเว็บไซต์ Softberry (<http://linux1.softberry.com/>)

2. การเตรียมตัวอย่างพืช

2.1 การเตรียมตัวอย่างอ้อยในสภาพโรงเรือน

นำท่อนพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ต้มฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส ปลูกในดินทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (ภาพผนวกที่ 1) แล้วเติมเชื้อจุลินทรีย์สภาพเหลวลงไป วางแผนการทดลองแบบ CRD ทั้งหมด 7 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่เชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 เติมเชื้อไอโซเลท BR11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)

กรรมวิธีที่ 3 เติมเชื้อไอโซเลท TS8 (*Azospirillum* spp.)

กรรมวิธีที่ 4 เติมเชื้อไรโซเบียม 3 ไอโซเลท (*Bradyrhizobium* spp. No. 1, 3 และ 14)

กรรมวิธีที่ 5 เติมเชื้อไอโซเลท Ri19 (*Herbaspirillum* spp.)

กรรมวิธีที่ 6 เติมเชื้อไอโซเลท BR11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) และ ไอโซเลท TS28 (*Azospirillum* spp.)

กรรมวิธีที่ 7 เติมไนโตรเจน 3 กรัม ต่อกระถาง

กรรมวิธีที่ 8 ชุตควบคุม ได้แก่ อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทุกกรรมวิธีรดด้วยน้ำ N-free อาทิตย์ละ 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง และให้น้ำต้มสุกเป็นการให้น้ำตามปกติ จนได้อายุครบสองเดือน (ภาพผนวกที่ 2 และ 3) แล้วเก็บตัวอย่างใบด้วยไนโตรเจนเหลวเมื่ออายุ 2 เดือน

2.2 การเตรียมตัวอย่างอ้อยในสภาพแปลงปลูก

เตรียมท่อนพันธุ์อ้อยลงปลูกในสภาพแปลงที่มีแหล่งไนโตรเจนต่ำ (ภาพผนวกที่ 4) เปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์ และหญ้ากีนี โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD แบ่งออกเป็น 9 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ (ภาพผนวกที่ 5) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3

กรรมวิธีที่ 2 อ้อยพันธุ์อุทอง 84-12

กรรมวิธีที่ 3 อ้อยพันธุ์ สอน.LK92-11

กรรมวิธีที่ 4 อ้อยพันธุ์ สอน.K88-92

กรรมวิธีที่ 5 อ้อยพันธุ์ สอน.K95-84

กรรมวิธีที่ 6 อ้อยพันธุ์บราซิล Sp70-1284

กรรมวิธีที่ 7 หญ้าเนเปียร์

กรรมวิธีที่ 8 อ้อยพันธุ์ป่า Th99-132 (*S. Spontaneum*)

กรรมวิธีที่ 9 หญ้ากีนีสีม่วง

กรรมวิธีที่ 10 อ้อยพันธุ์อุทองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กรรมวิธีที่ 11 ชุตควบคุม ได้แก่ อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เก็บตัวอย่างอ้อยในแปลงปลูกเมื่ออายุอ้อย 2 เดือน และ 4 เดือน ด้วยไนโตรเจนเหลว

3. การสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยชุด Nucleo Spin kit[®] ยี่ห้อ MACHERY-NAGEL

ทำการบดตัวอย่างอ้อย 1 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ในหลอดที่มีบัฟเฟอร์ RA1 ผสมให้เข้ากัน นำของเหลวที่ได้ใส่ลงไปในหลอด Nucleospin[®] filter unit แล้วปั่นที่ 11,000 xg นาน 1 นาที เพื่อกรองเอาส่วนใส 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม 70 เปอร์เซนต์เอทานอล 400 ไมโครลิตร แล้ววางบนน้ำแข็ง นำของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน Nucleospin[®] RNA plant แล้วปั่นที่ 11,000 xg นาน 30 วินาที ที่ของเหลว เติมบัฟเฟอร์ที่มี DNA sel บน membrane ตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างเมมเบรน 3 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ล้างด้วย RA2 200 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 30 วินาที แล้วทิ้งของเหลว

ครั้งที่ 2 ล้างด้วย RA3 600 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 11,000 xg นาน 30 วินาที แล้วทิ้งของเหลว

ครั้งที่ 3 ล้างด้วย RA3 250 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 11,000 xg นาน 2 นาที ย้ายเมมเบรนใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม RNase free water+Ribolock 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วปั่นที่ 11,000 xg นาน 1 นาที นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบ และเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

4. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสมด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ยี่ห้อ Thermo นำอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ oligo(dT)₁₈ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DEPC 6.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติมบัฟเฟอร์ 5X reaction 4.5 ไมโครลิตร Ribolock™ RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร ReverstAid M-MuLV 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *SHR5* ด้วยวิธี Real-time PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *SHR5* โดยใช้ *Ubi* endogenous gene เป็นยีนอ้างอิง ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังนี้

Ubi1 คือ 5'- ATG CAG ATC TTT GTG AAG AC -3'

Ubi2 คือ 5'- TTA CTG ACC ACC ACG AAG AC -3'

5.1 การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับตัวอย่างอ้อยในสภาพควบคุม ดัดแปลงตามวิธีของ Vinagre และคณะ (2006) ดังนี้

เตรียมปฏิกิริยาด้วยชุด SYBR® Select Master Mix ยี่ห้อ Applied Biosystems™ จำนวนรวมต่อปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ดังนี้ นำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จำนวน 0.5 ไมโครลิตร เติม SYBR Select Master Mix 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ *SHR5* forward (5'-TGA CCG AGC ACT CTT TGG TAA-3') 0.4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ *SHR5* reverse (5'-TCG AAT TAA TCC AGC AGC AGC-3') 0.4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 3.7 ไมโครลิตร

นำปฏิกิริยาที่ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Real-time CFX96 Touch ยี่ห้อ BIORAD โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

Initial denature	94 องศาเซลเซียส	นาน	5	นาที	} 30 รอบ
Denature	94 องศาเซลเซียส	นาน	10	วินาที	
Amplification	59 องศาเซลเซียส	นาน	20	วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	นาน	50	วินาที	
Melting Curve	95 องศาเซลเซียส	นาน	5	วินาที	
	65 องศาเซลเซียส	นาน	1	นาที	

5.2 การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับตัวอย่างอ้อยในสภาพแปลงปลูก โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากการจำลองยีน ดังนี้

เตรียมปฏิกิริยาด้วยชุด SYBR® Select Master Mix ยี่ห้อ Applied Biosystems™ จำนวนรวมต่อปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ดังนี้ นำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จำนวน 0.5 ไมโครลิตร เติม SYBR Select Master Mix 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ *SbSHR5* forward (5'-ATG GCG GCG GCC AGC ATC AGG TAC A-3') 0.4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ *SbSHR5* reverse (5'-TCA AGA AGG AGA ATC TCG TCC CTG G -3') 0.4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 3.7 ไมโครลิตร

นำปฏิกิริยาที่ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง

StepOnePlus Real-Time PCR ยี่ห้อ ABI โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

Initial denature	94 องศาเซลเซียส	นาน	5	นาที	} 30 รอบ
Denature	94 องศาเซลเซียส	นาน	10	วินาที	
Amplification	60 องศาเซลเซียส	นาน	20	วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	นาน	20	วินาที	
Melting Curve	95 องศาเซลเซียส	นาน	5	วินาที	
	65 องศาเซลเซียส	นาน	1	นาที	

- ระยะเวลาการทดลอง (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้น ต.ค. 2556 สิ้นสุด ก.ย. 2558 รวม 2 ปี

- สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การค้นหาและจำลองยีน *SHR5* ด้วยวิธี *insilico*

การค้นหาข้อมูลและจำลองยีนจากฐานข้อมูล พบว่าขนาดของยีน *SHR5-receptor-like kinase* ที่รายงานใน GenBank: DQ067098.1 *Saccharum hybrid cultivar SP70-1143 SHR5-receptor-like kinase mRNA, partial cds* เป็นแบบชิ้นส่วนยีนมีความยาว 3,084 เบส แต่เมื่อทำการจำลองยีนจากฐานข้อมูลจีโนมของข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) สามารถค้นหายีน *SbSHR5* ในส่วนของ CDS ได้เต็มยีนและแปรรหัสเป็น นิวคลีโอไทด์ของอ้อย จาก start codon ถึง stop codon มีความยาวของส่วน CDS ทั้งสิ้น 4ม248 เบส ดังภาพที่ 8

เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าตรงกับ *Saccharum hybrid cultivar SP70-1143 SHR5-receptor-like kinase mRNA, partial cds* มีค่า identity เท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการถอดรหัสเป็นโปรตีนแล้วได้กรดอะมิโนจำนวน 1,416 อะมิโน พบว่าตรงกับโปรตีน accession AAY67902.1 *SHR5-receptor-like kinase, partial (Saccharum hybrid cultivar SP70-1143)* มีค่า identity เท่ากับ 89 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 9 จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ในส่วนอนุรักษ์ (conserve) ของยีน *SbSHR5* ได้ขนาด 214 เบส เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่า ตรงกับ *Saccharum hybrid cultivar SP70-1143 SHR5-receptor-like kinase mRNA, partial cds* มีค่า identity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10) จึงนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนในอ้อยสภาพแปลงปลูก เนื่องจากการทดสอบไพรเมอร์ของยีน *SHR5* ที่ได้จากอ้อย hybrid cultivar SP70-1143 สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้เฉพาะในบางสายพันธุ์เท่านั้น และการปลูกเปรียบเทียบในสภาพแปลงปลูกมีการทดสอบหญ้าเนเปียร์และหญ้ากีนีร์ร่วมด้วย จึงได้จำลองยีน *SHR5* จากฐานข้อมูลใหม่ แล้วทำการออกแบบไพรเมอร์ในส่วนอนุรักษ์เพื่อเพิ่มความสามารถในการเพิ่มปริมาณยีนของหญ้าเนเปียร์และหญ้ากีนีร์ด้วย

1 MAAASIRYRH SSGGGSHGRR LLWLLACSW VAAASGQQQT ARTDPAEVAA LNTILGRWGL
 61 KASAAWNISG EPCSGVAVDV TDVDSNPIN PAIKCDCTYN NATVCHITKL KVYALNVVGO
 121 IPAELQNLTY LNNLNLQQNY LTGPVPSFMG KFPMQYLGIS LNNFTGELPS ELGNLSKLEQ
 181 IYFDSSGFSG PFPSTFSKLG KKLILWASDN EFTGKIPDFI GSLTQLEDLR FQGNSEFEGPI
 241 PKSLSNLTKL TSLILRNSRI SDTLATVNFS NLVGLTLLDL SFNNLTGQIP ESILNLDKLG
 301 FLFLGNNSLS GSLPDVKSPS LNNLDFSYNQ LSGSFPSWAT QDNLQLNLVA NNFVLGISNN
 361 SILPSGLNCL QQDIPCFRGS PEYSSFAVDC GSNRSMGTGSD NTFYEIDPTN IGAASYVVTG
 421 QTRWGVSNVG KFNEAPNGSY IYSSQQFQN ALDSELFQTA RMSPSSLRY Y GIGLENGNYT
 481 VELQFAEFAY PESPTWQSTG RRVFDIYIQG GLKEKNFDIR KTAGGRSYVA VYKKYNATVS
 541 KNFLEIHLFW AGKGTCCIPT QGYYGPMISA LSVTPNFTPT VRNGVPKKS KAGAIAGIVI
 601 GAAVVGAAAL AGIFMLVQKR RRVAQRQEEL YNMVGRPNVF SNAELKATD NFSSQNILGE
 661 GGYGPVYKKG LPDGRIIAVK QLSQTSHQGK SQFVTEVATI SAVQHRNLVK LYGCCIDSNT
 721 PLLVYEHEN GSLDRALFGD SGLSLDWRTR FEIILGIARG LTYLHEESSV RIVHRDIKAS
 781 NVLLDIDLTP KISDFGLAKL FDEKTHVST KIAGTFGYLA PEYAMRGHLT EKADVAFGV
 841 VALETVAGRS NTDSSLEEDR IYLFEWAWEL YERDQALGIL DARMEEFDSE EALRVISVAL
 901 LCTQGSPHQR PPMSRVVVKML TGDVEVTEVV AKPSYITEWQ RRGNTSYVT SDYSGDTTGE
 961 FSTQRETIAP LTPSPAMTGI IDDGRPPPPP PRRSPYRATR GRLPTSVSTP VGRRAPRAAA
 1021 AAGSRRR PAL EPKKGHPAAA FPFSLHLPS PPLPPTLVGR GALRLQIRGP LGRIRRPLL
 1081 SGSSSPG SWP AAHGRLTAC LVALNVFLVY FCRFFSR SRS RGDGEDDASS VASSPPASPK
 1141 ARDRRGVELA ITALPVFVHS SSSSSSGGGG GAGPAAAAA CAICIAKFAD GDEGRLLPRC
 1201 RLRFHARCVD REDGRRRFLR NGVDFGNCLG VSVLEEPVRA SHVTGESGNG SVGCGGDRLP
 1261 PRLDAGLPVR ASLRGRV LV WLRVWRRSA RLGILVGARL PPRASPGAR LPPRASPGA
 1321 APRGVAAADT SVQARTLLRA SPHRGRVRNG SALS GGGRRR PVRTYHHRGR VRKAPHGVPA
 1381 AGYHLSRGWV FEGFGNGSGR KLSSNFLSQG RDSPS*

ภาพที่ 9 ลำดับกรดอะมิโนของ SHR5-receptor-like kinase ที่จำลองได้จากข้าวฟ่าง
 จำนวน 1,416 อะมิโน

TGAAGGCGTCGGCGGCGTGGAACATCAGCGGCGAGCCCTGCAGCGGCGTCGCCGTCGACACCACCAACGTCGACGACA
 ACCCAACATCAACCCGGCCATCAAGTGC GACTGCACCTACAACAACGCCACCGTTTGCCACATCACCAAACCTGAAAG
 TGTATGCGTTGAATGTTGTCGGTCAGATAACCAGCCGAGCTGCAGAACCTCACCTATCT

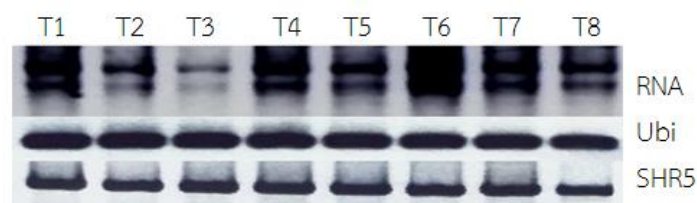
ภาพที่ 10 ส่วนของยีน *SbSHR5* ขนาด 214 เบส ที่นำมาศึกษาการแสดงออกของยีนในสภาพแปลงปลูก

2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *SHR5* ด้วยวิธี Real-time PCR

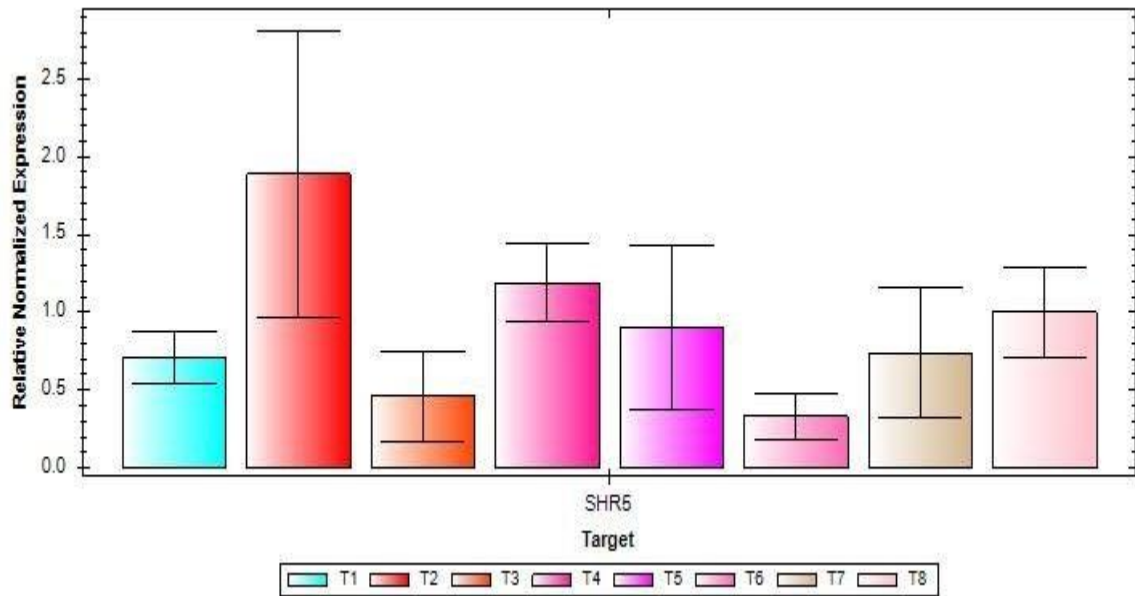
2.1 การแสดงออกของยีน *SHR5* ของอ้อยในสภาพโรงเรือน

การแสดงออกของยีน *SHR5* ในสภาพควบคุมเลือกทดสอบกับอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เนื่องจาก
 พันธุ์ขอนแก่น 3 เป็นพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตร และมีอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในสภาพปลอดโรคแบบการ
 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งสามารถใช้เป็นตัวควบคุมได้ จากการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุด Nucleo Spin kit[®] พบว่าได้อาร์

เอ็นที่บริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใช้ยีน *Ubi* endogenous gene เป็นยีนอ้างอิง สามารถเพิ่มปริมาณที่ค่า Amplification ได้ตั้งแต่ 55-60 องศาเซลเซียส แต่การเพิ่มปริมาณด้วยยีน *SHR5* ตามที่ Vinagre และคณะ (2006) รายงานไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส นั้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ แต่เมื่อศึกษาค่า Amplification ใหม่ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน *SHR5* ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ได้ที่ 59 องศาเซลเซียส และได้ขึ้นส่วนยีน *SHR5* และ *Ubi* ที่เพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง Real-time CFX96 Touch ดังภาพที่ 11 การทดลองการแสดงออกของยีน *SHR5* ในสภาพโรงเรือน เพื่อศึกษาการเกิดการปฏิสัมพันธ์กันของเชื้อแบคทีเรีย endophytic กับอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจน แบ่งออกเป็น 8 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่เชื้อ กรรมวิธีที่ 2 เติมเชื้อไอโซเลท BR11281 (*G. diazotrophicus*) กรรมวิธีที่ 3 เติมเชื้อไอโซเลท TS8 (*Azospirillum* spp.) กรรมวิธีที่ 4 เติมเชื้อไรโซเปียม 3 ไอโซเลท (*Bradyrhizobium* spp. No. 1, 3 และ 14) กรรมวิธีที่ 5 เติมเชื้อไอโซเลท Ri19 (*Herbaspirillum* spp.) กรรมวิธีที่ 6 เติมเชื้อไอโซเลท BR11281(*G. diazotrophicus*) และ ไอโซเลท TS28(*Azospirillum* spp.) กรรมวิธีที่ 7 ไม่ใส่เชื้อแต่เติมไนโตรเจน 3 กรัม ต่อกระถาง และกรรมวิธีที่ 8 ชุดควบคุม ได้แก่ อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีน *SHR5* พบว่า กรรมวิธีที่ 2 ที่มีการเติมเชื้อไอโซเลท BR11281 (*G. diazotrophicus*) มีการแสดงออกของยีนมากที่สุดมีค่าการแสดงออกเท่ากับ 1.82 สำหรับกรรมวิธีที่ 6 ที่เติมเชื้อไอโซเลท BR11281 (*G. diazotrophicus*) และ ไอโซเลท TS28 (*Azospirillum* spp.) มีการแสดงออกของยีนน้อยสุดที่ค่าการแสดงออกเท่ากับ 0.31 ซึ่งยีนมีการแสดงออกต่ำกว่าชุดควบคุม และกรรมวิธีที่ 2 เติมเชื้อ *G. diazotrophicus* และกรรมวิธีที่ 4 ที่เติมเชื้อ *Bradyrhizobium* spp. No. 1, 3 และ 14 มีค่าการแสดงออกมากกว่าชุดควบคุม คือ 1.82 และ 1.12 ตามลำดับ (ภาพที่ 11 และ ตารางที่ 10) ทั้งนี้ค่าการแสดงออกของยีน *SHR5* ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในและกรรมวิธีจากมากที่สุดไปน้อยสุด ได้แก่ กรรมวิธีที่ 6, 3, 1, 7, 5, 8, 4, และ 2 ตามลำดับ (ภาพที่ 13) อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *SHR5* ทั้ง 8 กรรมวิธี ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (no change) คือ ไม่แสดงการ up-regulated หรือ down-regulated (ตารางที่ 10) จากการทดลองดังกล่าวมีแนวโน้มการเกิด down-regulated ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ได้ เนื่องจากการแสดงออกของยีนส่วนใหญ่ต่ำกว่าชุดควบคุม ทั้งนี้อาจต้องมีการศึกษาปริมาณเชื้อของแบคทีเรีย endophytic ที่ใช้ในการปลูกถ่ายเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการเกิด ปฏิสัมพันธ์กันระหว่างอ้อยกับแบคทีเรียด้วย



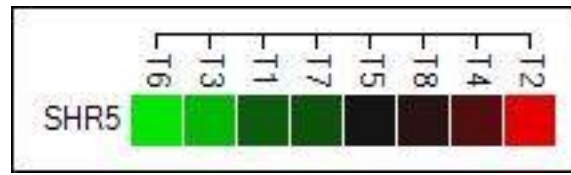
ภาพที่ 11 แสดงลักษณะอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยชุด Nucleo Spin kit[®] และการเพิ่มปริมาณของ ยีนอ้างอิง *Ubi* และยีนเป้าหมาย *SHR5* ด้วยเครื่อง Real-time CFX96 Touch ยี่ห้อ BIORAD ใน 1 เฟอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล



ภาพที่ 12 ปริมาณการแสดงออกของยีน *SHR5* ของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในสภาพโรงเรือน

ตารางที่ 10 การแสดงออกของยีน *SHR5* ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold
T1 ไม้ใส่เชื้อ	0.69	No change
T2 BR11281 (<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>)	1.82	No change
T3 TS8 (<i>Azospirillum</i> spp.)	0.43	No change
T4 <i>Bradyrhizobium</i> spp. No. 1, 3 และ 14	1.12	No change
T5 <i>Herbaspirillum</i> spp.	0.84	No change
T6 BR11281(<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>) และ TS28 (<i>Azospirillum</i> spp.)	0.31	No change
T7 ไม้ใส่เชื้อและเติมไนโตรเจน	0.72	No change
T8 ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	1.00	No change

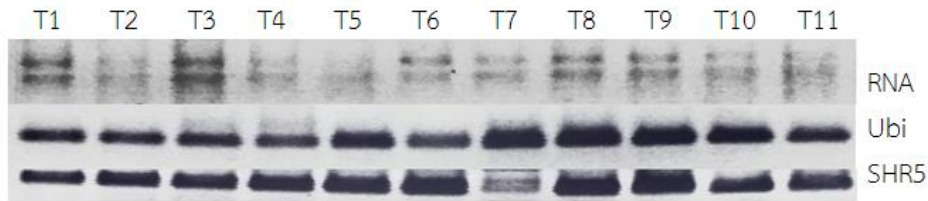


ภาพที่ 13 การแสดงออกของยีน SHR5 ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 สภาพโรงเรือนจากน้อยสุดไปหามากสุด

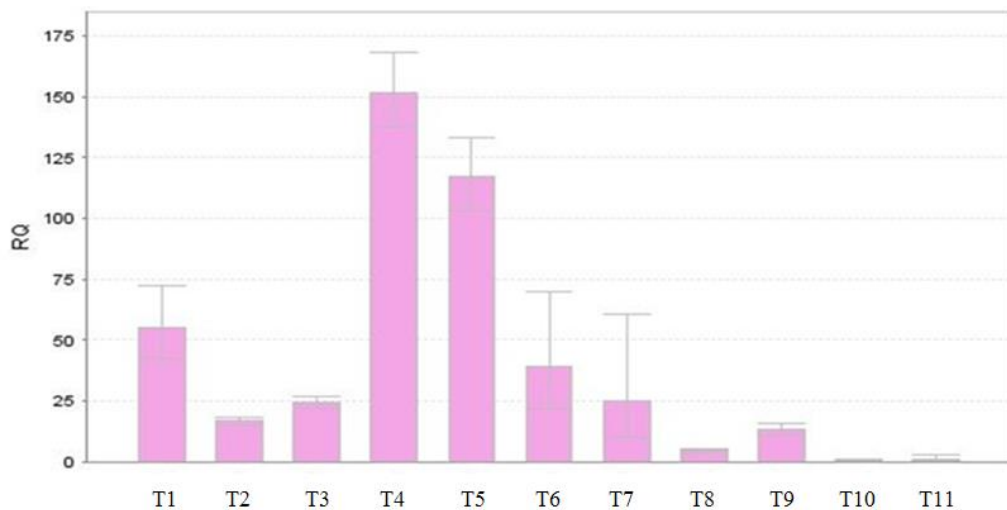
2.2 การแสดงออกของยีน SHR5 ของอ้อยในสภาพแปลงปลูก

การศึกษาการแสดงออกของยีน SHR5 ในสภาพแปลงปลูก ได้เปรียบเทียบกับอ้อยหลายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขอนแก่น 3 พันธุ์อุทอง 84-12 พันธุ์ สนอ.LK92-11 พันธุ์ สนอ.K88-92 พันธุ์ สนอ.K95-84 พันธุ์บราซิล Sp70-1284 พันธุ์ป่า Th99-132 (*S. Spontaneum*) พันธุ์อุทองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับหญ้าเนเปียร์ และหญ้ากินนีสีม่วง โดยมีพันธุ์ขอนแก่น 3 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นชุดควบคุม เนื่องจากมีการเปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์ และหญ้ากินนี การทดลองนี้จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ขึ้นมาใหม่ เนื่องจากไพรเมอร์ SHR5 ตามวิธี Vinagre และคณะ 2006 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนใน อ้อยพันธุ์ป่า Th99-132 (*S. Spontaneum*) หญ้าเนเปียร์ และหญ้ากินนีสีม่วงได้ จึงนำไพรเมอร์จากการออกแบบด้วยวิธี *insilico* โดยใช้จีโนมของข้าวฟ่างเพื่อหายีน SHR5 แบบเต็มยีนในส่วนของ CDS เมื่อนำมาหาส่วนอนุรักษ์ของยีนแล้วออกแบบไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณยีน *sbSHR5* ได้ในทุกกรรมวิธี (ภาพที่ 14 และ 16) การแสดงออกของยีน *sbSHR5* ในสภาพแปลงปลูกของอ้อย พบว่า เมื่ออายุ 2 เดือน อ้อยพันธุ์ สนอ.K88-92 และอ้อยพันธุ์ สนอ.K95-84 มีการแสดงออกแบบ up-regulated (ภาพที่ 15) มีค่าเท่ากับ 151.89 และ 117.07 ตามลำดับ โดยกรรมวิธีที่ 1-9 มีค่าการแสดงออกมากกว่าพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 11) เมื่ออายุครบ 4 เดือน พบว่า ค่าการแสดงออกของอ้อยพันธุ์ สนอ.K95-84 มีค่าการแสดงออกแบบ up-regulated (ภาพที่ 17) มีค่าเท่ากับ 114.65 (ตารางที่ 11) อย่างไรก็ตามค่าการแสดงออกของยีน *SbSHR5* ในทุกกรรมวิธีมีค่ามากกว่าอ้อยพันธุ์ควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปลูกในสภาพแวดล้อมมีปัจจัยมาเกี่ยวข้องมากกว่าในสภาพโรงเรือน และโปรตีน RLKs มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบการต้านทานของพืช การควบคุมการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อฮอร์โมน การผสมตัวเองไม่ติด (Shiu and Bleeker, 2001) จึงทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *SbSHR5* สูงขึ้นเมื่อปลูกในสภาพแปลงเปิด เนื่องจากไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมและปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนสูงขึ้นแบบ up-regulated ในอ้อยพันธุ์ สนอ.K88-92 และอ้อยพันธุ์ สนอ.K95-84 นั้น อาจมีหลายปัจจัยมาเกี่ยวข้อง ทั้งนี้ Afzal และคณะ (2008) ได้รายงานไว้ว่า RLKs เป็นศูนย์กลางการส่งสัญญาณระหว่างการจดจำของเชื้อสาเหตุโรคพืชด้วย ซึ่งการ down-regulated ของยีน SHR5 จะเกิดขึ้นเฉพาะกับแบคทีเรีย endophytic เท่านั้นตามรายงานของ Vinagre และคณะ (2006) แต่เมื่อมีเชื้อสาเหตุโรคพืชหรือถูกกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม การแสดงออกของยีนอาจเปลี่ยนแปลงไปได้ ซึ่ง Yin และคณะ (2015) ได้รายงานไว้ว่าพืชที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอทิลีน ยีน SHR5 มีการแสดงออกแบบ up-regulated

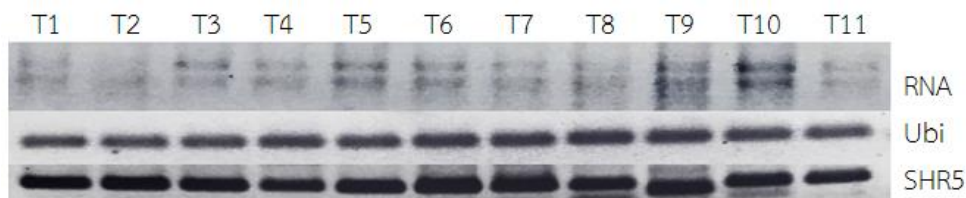
ด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามการนำยีน *SHR5* มาศึกษาการแสดงออก เพื่อศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์กันระหว่างอ้อยและแบคทีเรีย endophytic นั้น ควรอยู่ในสภาพควบคุมที่สามารถลดปัจจัยแวดล้อมภายนอกให้ได้มากที่สุด



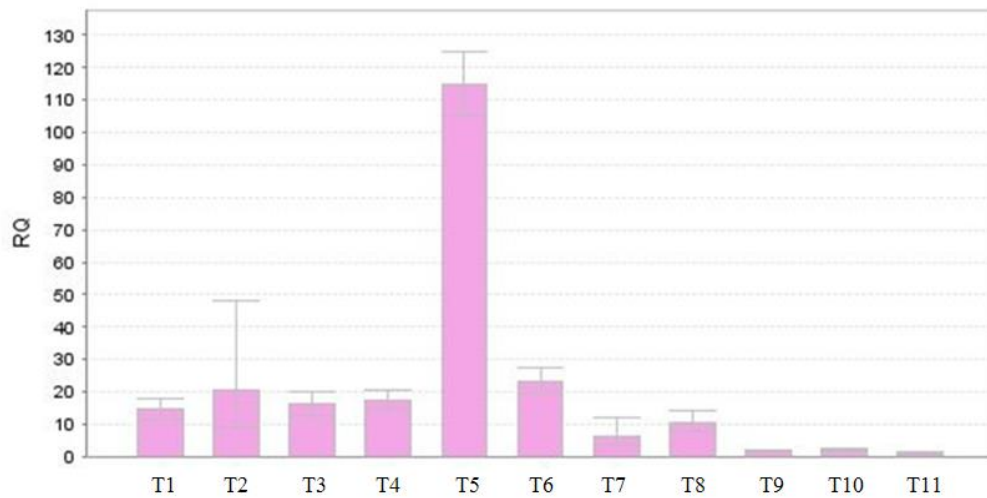
ภาพที่ 14 แสดงลักษณะอาร์เอ็นเอของตัวอย่างที่มีอายุ 2 เดือนในสภาพแปลงปลูก สกัดด้วยชุด Nucleo Spin kit[®] และการเพิ่มปริมาณของยีนอ้างอิง *Ubi* และยีนเป้าหมาย *SbSHR5* ด้วยเครื่อง StepOnePlus Real-Time PCR ยี่ห้อ ABI ใน 1 เฟอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล



ภาพที่ 15 ปริมาณการแสดงออกของยีน *SbSHR5* ของอ้อยอายุ 2 เดือน ในสภาพแปลงปลูก



ภาพที่ 16 แสดงลักษณะอาร์เอ็นเอของตัวอย่างที่มีอายุ 4 เดือนในสภาพแปลงปลูก สกัดด้วยชุด Nucleo Spin kit[®] และการเพิ่มปริมาณของยีนอ้างอิง *Ubi* และยีนเป้าหมาย *SbSHR5* ด้วยเครื่อง StepOnePlus Real-Time PCR ยี่ห้อ ABI ใน 1 เฟอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล



ภาพที่ 17 ปริมาณการแสดงออกของยีน *SbSHR5* ของอ้อยอายุ 4 เดือน ในสภาพแปลงปลูก

ตารางที่ 11 การแสดงออกของยีน *SbSHR5* ในสภาพแปลงปลูกของอ้อย

กรรมวิธี	Relative Quantity (RQ)	
	ตัวอย่างอายุ 2 เดือน	ตัวอย่างอายุ 4 เดือน
T1 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3	55.19	14.46
T2 อ้อยพันธุ์อุ้มทอง 84-12	16.83	20.65
T3 อ้อยพันธุ์ สนอ.LK92-11	24.46	16.03
T4 อ้อยพันธุ์ สนอ.K88-92	151.89	17.39
T5 อ้อยพันธุ์ สนอ.K95-84	117.07	114.65
T6 อ้อยพันธุ์บราซิล Sp70-1284	39.19	23.07
T7 หล้าเนเปียร์	24.80	6.41
T8 อ้อยพันธุ์ป่า Th99-132 (<i>S. Spontaneum</i>)	4.75	10.30
T9 หล้ากินนีสีม่วง	13.25	1.89
T10 อ้อยพันธุ์อุ้มทองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	1.00	1.86
T11 อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	1.00	1.00

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ในการผลิตอ้อยพบว่าอ้อยมีการตอบสนองต่อไนโตรเจนในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน จนทำให้ไทยต้องมีต้นทุนในการนำเข้าปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเพื่อการผลิตเป็นจำนวนมากในอนาคต จากรายงานการผลิตอ้อยในบราซิล หลังทำการวิจัยประมาณ 15 ปี พบว่ามีพันธุ์อ้อยสายพันธุ์บราซิลบางสายพันธุ์ที่สามารถรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ทั้งนี้เพราะความสัมพันธ์กันระหว่างสายพันธุ์อ้อยและชนิดจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในต้นอ้อย วัตถุประสงค์ของโครงการนี้เพื่อให้ได้สายพันธุ์อ้อยไทยที่มีศักยภาพในการรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่กับอ้อย เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาพันธุ์อ้อยที่ใช้ไนโตรเจนน้อย ลดปริมาณและต้นทุนในการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการผลิตอ้อย ทำการศึกษาในอ้อยพันธุ์ไทยที่นิยมปลูก 5 สายพันธุ์ คือ ขอนแก่น 3 อู่ทอง 84-12 สอน.92-11 สอน.88-92 และ สอน.95-84 เปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์บราซิล Sp70-1284 หนุ่เนเปียปากช่อง อ้อยป่า TH99-132 (*Saccharum spontaneum*) และหนุ่กีนีสีม่วง โดยศึกษาการเจริญเติบโตในสภาพแปลง ไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเป็นเวลา 2 ปี (อ้อยปลูก และอ้อยต่อ 1) วัดการตรึงไนโตรเจนบริเวณราก และทำการตรวจสอบการ colonization ของแบคทีเรียในรากเพื่อยืนยันการอาศัยอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียและอ้อย โดยเทคนิค Real-time PCR ประกอบกับได้นำยีน *SHR5-receptor-like kinase* มาศึกษาการแสดงออกของยีนในอ้อยเพื่อทดสอบการเกิดปฏิกริยาสัมพันธ์ (interaction) กันระหว่างแบคทีเรียและอ้อย ซึ่งการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อยและสายพันธุ์อ้อย ผลการทดลองพบว่า อ้อยสายพันธุ์ไทยมีการเจริญเติบโตค่อนข้างดีและใกล้เคียงกัน ส่วนหนุ่เนเปียปากช่องและอ้อยป่าเจริญเติบโตดีที่สุด ผลการวัดการตรึงไนโตรเจนจากรากของอ้อยพันธุ์ต่างๆ พบว่าอ้อยพันธุ์สอน.92-11 มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด (0.141 $\mu\text{mol/hr/pot}$) รองลงมา คือ พันธุ์ สอน.95-84 (0.105 $\mu\text{mol/hr/pot}$) ขอนแก่น 3 และ สอน.88-92 (0.82 $\mu\text{mol/hr/pot}$) และจากการศึกษาการ Colonization ของแบคทีเรีย โดย Real-Time PCR ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยพบว่า มีการ Colonize ของแบคทีเรียอย่างน้อย 2 ชนิดในใบและลำต้นอ้อย โดยพบ *Gluconacetobacter diazotrophicus* ในใบของอ้อยพันธุ์บราซิล Sp 70-1280 พบ *Azospirillum brasilense* ในลำต้นอ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 สอน.92-11 สอน.88-92 สอน.95-84 อ้อยพันธุ์บราซิล Sp70-1284 และอ้อยป่า TH99-132 และพบ *Herbaspirillum seropedicae* ในลำต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 สอน.92-11 สอน.88-92 สอน.95-84 อ้อยพันธุ์บราซิล Sp70-1284 อ้อยป่า TH99-132 และหนุ่กีนีสีม่วง นอกจากนี้ยังพบ *A. brasilense* และ *H. seropedicae* ในบริเวณ rhizosphere ของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 84-12 แต่ไม่พบในลำต้น จึงอาจสรุปได้ว่าลำต้นอ้อยสายพันธุ์อู่ทอง 84-12 ไม่เอื้อต่อการอยู่อาศัยของแบคทีเรียดังกล่าว แต่อาจมีระบบที่เอื้อต่อการอยู่อาศัยบริเวณรากและ rhizosphere จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เป็นอ้อยสายพันธุ์ไทยที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยชีววิธี โดย *A. brasilense* และ *H. seropedicae* ที่อาศัยอยู่ในลำต้นอ้อย โดยผลการทดลองของโครงการ เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้น เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดควรมีการทำวิจัยต่อในระยะยาวเช่นเดียวกับรายงานของนักวิจัยชาวบราซิล และควรมีการศึกษาในอ้อยสายพันธุ์ไทยที่นิยมปลูกเป็นอันดับแรก เพื่อให้ได้สายพันธุ์อ้อยที่มีศักยภาพในการรับไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ

โดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่กับอ้อยสายพันธุ์ไทย และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาพันธุ์อ้อยที่ใช้ไนโตรเจนน้อย ลดปริมาณและต้นทุนในการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการผลิตอ้อยในประเทศไทย โดยที่ผลผลิตและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจไม่เปลี่ยนแปลง

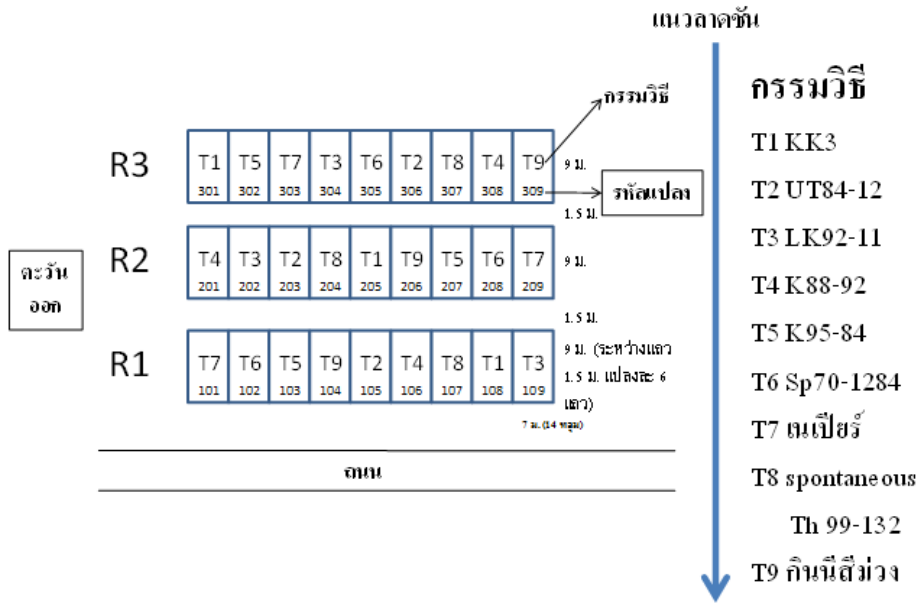
บรรณานุกรม

- Afzal A.J., A.J. Wood and D.A. Lightfoot. 2008. Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. The American Phytopathological Society. Vol.21 No.5, pp.507-517.
- Becraft W. Philip. 1998. Receptor kinases in plant development. trends in plant science Vol. 3, No. 10, pp. 384-388.
- Bashan Y. and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36:591-608.
- Bastana M. V., D. Dourado-Neto, K. Reichardt, O.O.S. Bacchi, J.C.M. Oliveira, P.C.O. Trivellin, L.C. Timm, T.T. Tominaga, V. Correchel, F.A.M. Cassaro, L.F. Pires 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., S. Urquiaga, B.J.R. Alves, V.M. Reis and J. Döbereiner. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil, 137:111-117.
- Boddey R.M., S. Urquiaga, B.J.R. Alves and V.M. Reis 2003. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. Plant Soil., 252: 139-149.
- Carvalho T.L., E. Pires, R. Sraiva, L. Vargas, A.C. Js Bomfim, H. Ballesteros, J.I. Baldani, P. CG. Ferreira and A.S. Hemerly. 2014. Nitrogen fixation in grasses – gluconacetobacter activates genes in sugarcane. Biomed Central, BMC Proceedings, 8(suppl4): O20, <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/8/s4/O02>.
- 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 J.J.V., C. Vargas, E.M. Nogueira, F. Vinagre, K. Schwarcz, J. I. Baldani, P. C. G. Ferreira and A.S. Hemerly. 2006. Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. Journal of Experimental Botany doi:10.1093/jxb/erl242, pp. 1-14.
- 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.
- Eskin N., K. Vessey and L. Tian. 2014. Research Progress and Perspectives of Nitrogen Fixing Bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in Monocot plants. *International Journal of Agronomy*, Volume 2014, Article ID 2080382. 13 pages.
- 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 graminaceous 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.
- Munos-Rojas, J. and J. Caballero-Mellado, 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and effect on plant grow. *Microbiol. Ecol.*, 46: 454-464.
- 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.
- Ozakman M. and N.W. Schaad. A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* 25: 232-239 (2003)
- 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.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. (Editors). 2001a. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn.
- Shearer G. and D.H. Kohl. 1986. N₂ fixation in field settings: Estimates based on natural ¹⁵N abundance. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 13: 699-756.
- Shiu S. and A.B. Bleecker. 2001. Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. Science's stake, www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2001/113/re22 . pp. 1-13.
- Singh B.P., Singh H.P. and E. Obeng. 2013. Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics. Chapter 13 Elephantgrass. 271-291.
- Valeria R. L., J. C. Bessalho-Filho, Luiza M. A., Fabio V. R., E. Daros and Ricardo A. O., 2012. The Selection of Sugarcane Families That Display Better Associations with Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Journal of Agronomy*, 11: 43-52.
- Vinagre F., C. Vargas, K. Schwarcz, J. Cavalcante, E. M. Nogueira, J. I. Baldani, P. C. G. Ferreira and A. S. Hemery. 2006. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 3, pp. 559–569.
- Woodard K.R. and L.E. Sollenberger. 2008. Production of Biofuel Crops in Florida : elephantgrass. SS-AGR-297. Institute of Food and Agricultural Sciences, Gainesville, Florida.
- Yin C., B. Ma, D. P. Collinge, B. J. Pogson, S. He, Q. Xiong, K. Duan, H Chen, C. Yang, X. Lu, Y. QinWang, W. Zhang, C. Chu, X. Sun, S. Fang, J. Chu, T. Lu, S Chen and J. Zhanga. 2015. Ethylene Responses in Rice Roots and Coleoptiles Are Differentially Regulated by a Carotenoid Isomerase-Mediated Abscisic Acid Pathway. *The Plant Cell*, Vol. 27: pp. 1061–1081.

ภาคผนวก



ภาพภาคผนวกที่ 1 แผนผังการปลูกอ้อยในสภาพแปลงปลูก



ภาพภาคผนวกที่ 2 ต้นอ้อยที่ปลูกในแปลงที่มีแหล่งไนโตรเจนต่ำ อายุ 2 เดือน



ภาพภาคผนวกที่ 3 แปลงทดลองอ้อยตอ 1



ภาพภาคผนวกที่ 4 การตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) บริเวณรากอ้อย



ภาพภาคผนวกที่ 5 รากอ้อยตอพันธุ์ขอนแก่น 3



ภาพภาคผนวกที่ 6 รากอ้อยตอพันธุ์อุทอง 84-12



ภาพภาคผนวกที่ 7 รากอ้อยตอพันธุ์สอน. 92-11



ภาพภาคผนวกที่ 8 รากอ้อยตอพันธุ์สอน.88-92



ภาพภาคผนวกที่ 9 รากอ้อยตอพันธุ์สอน. 95-84



ภาพภาคผนวกที่ 10 รากอ้อยตอพันธุ์ราชสีล Sp 70-1284



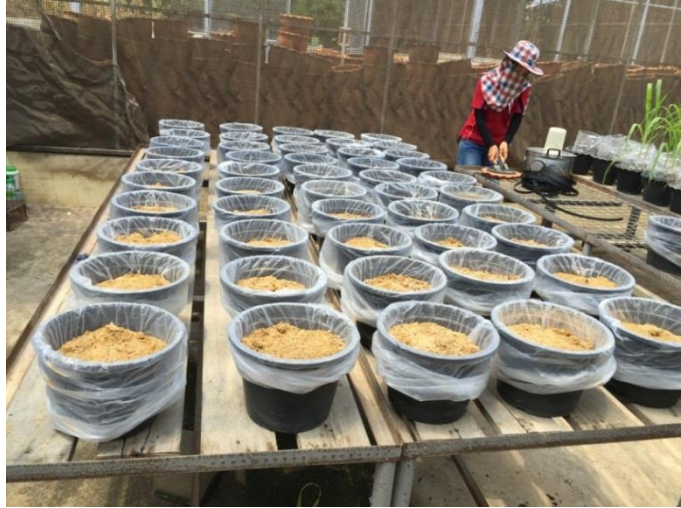
ภาพภาคผนวกที่ 11 รากหญ้าเนเปียร์ปากช่องปีที่ 2



ภาพภาคผนวกที่ 12 รากอ้อยป่า TH99-132 (*S. spontaneum*) ปีที่ 2



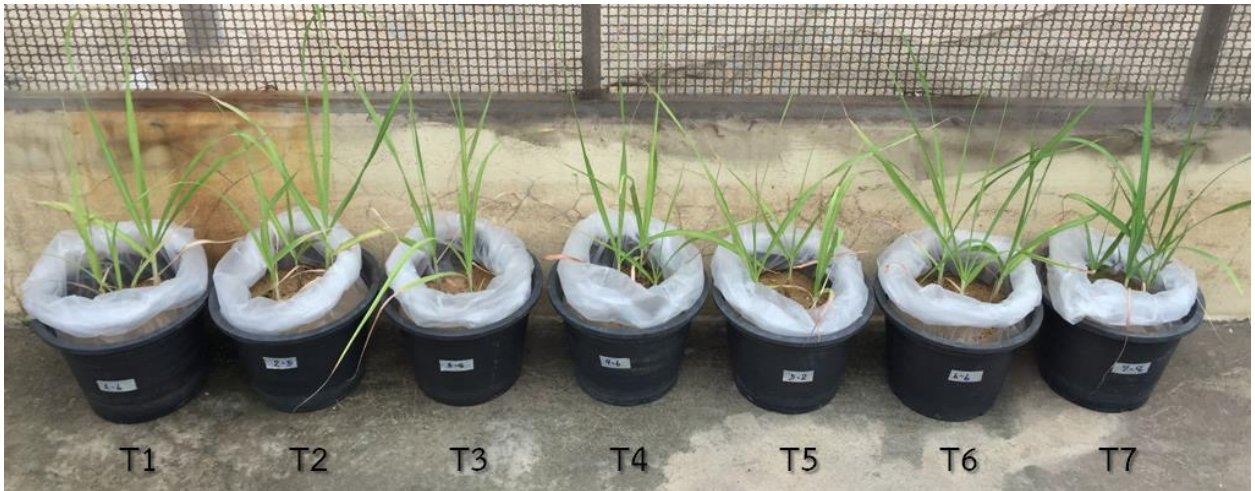
ภาพภาคผนวกที่ 13 รากหญ้ากินนีสีม่วงปีที่ 2



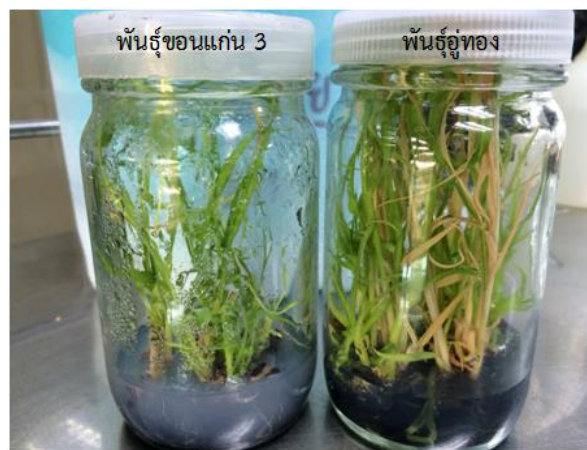
ภาพภาคผนวกที่ 14 การเตรียมดินก่อนการปลูกอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในสภาพโรงเรือน



ภาพภาคผนวกที่ 15 ลักษณะต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 อายุ 2 เดือน ในสภาพโรงเรือน



ภาพภาคผนวกที่ 16 เปรียบเทียบต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 กรรมวิธีที่ 1-7 อายุ 2 เดือน



ภาพภาคผนวกที่ 17 ต้นพันธุ์อ้อยในสภาพปลอดเชื้อพันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์อุทอง ที่ใช้เป็นชุดควบคุม