



วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj>



ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการชักนำภูมิต้านทานของอ้อยต่อโรคใบขาว

Efficacy of beneficial microorganisms in inducing resistance of sugarcane against sugarcane white leaf disease

วีรกรณ์ แสงไสย^{1*} และ ไตรเดช ข่ายทอง²

Weerakorn Saengsai^{1*} and Tridate Khaithong²

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ตำบลศิลา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40000

² Khon Kaen Field Crops Research Center, Sila, Mueang Khon Kaen, Khon Kaen, 40000

³ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

² Plant Pathology, Plant Protection Development Office. Department of Agriculture 10900

บทคัดย่อ: โรคใบขาวของอ้อย (sugarcane white leaf disease) ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ความเสียหายต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตอ้อย โดยอ้อยที่ติดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในระดับเชื้อประมาณ 100 copies/ไมโครลิตร จะยังไม่แสดงอาการของโรค แต่เชื้อจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นและทำความเสียหายต่ออ้อยในระยะเวลาต่อมา การชักนำให้พืชสร้างภูมิต้านทานเพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้จุลินทรีย์เป็นสารชักนำภูมิต้านทานทางชีวภาพเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบขาวโดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* No.15 และ *Streptomyces* No.8 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ได้มาจากการคัดเลือกที่สามารถชักนำภูมิต้านทานของอ้อย เปรียบเทียบกับปุ๋ยชีวภาพ PGPR-3 ผลการทดลอง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถลดการเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยได้ โดยการแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร พบปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา 256.7 copies/ไมโครลิตร ส่วนการแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร พบปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา คือ 357.7 copies/ไมโครลิตร การแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วย PGPR-3 พบปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา 494.7 copies/ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่แช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยน้ำเปล่า ซึ่งพบปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา 12,540 copies/ไมโครลิตร จากปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เท่ากันที่ประมาณ 158 copies/ไมโครลิตร การแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยปุ๋ยชีวภาพ PGPR-3 สามารถเพิ่มความสูง 22.30% จำนวนราก 60.73% ความยาวราก 97.68% และปริมาณคลอโรฟิลล์ 97.68% การใช้จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดและปุ๋ยชีวภาพ PGPR-3 สามารถสามารถกระตุ้นการผลิตสารชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการชักนำภูมิต้านทาน เช่น สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 35% เอนไซม์ ascorbate peroxidase 90.8% และ guaiacol peroxidase 92.3% และลดการผลิตสาร malondialdehyde ที่ก่อความเสียหายในเซลล์พืชได้ 93.4% จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน PRs พบว่า การแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* No.15 แสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น ได้แก่ PR6-4 92.7% และ PR10-11 92.5%

คำสำคัญ: ชักนำภูมิต้านทาน; อ้อย; ใบขาว; จุลินทรีย์

ABSTRACT: White leaf disease in sugarcane, caused by phytoplasma, is a major factor contributing to yield and quality loss. Sugarcane infected with approximately 100 copies/ μ l of the pathogen is in the latent stage, during which asymptomatic. Inducing plant resistance is a strategy that enhances broad-spectrum disease tolerance, offering protection against various pathogens. The use of effective microorganisms is one promising approach to stimulate such resistance. This study aimed to induce resistance in sugarcane and reduce the impact of white leaf

* Corresponding author: weerakorn.saengsai@gmail.com

Received: date; December 4, 2025 Revised: date; April 20, 2026

Accepted: date; April 28, 2026 Published: date; August 24, 2026

disease. The initial phytoplasma concentration in infected plants was approximately 158 copies/ μ l. After seven applications of beneficial bacterial treatments, phytoplasma increased at a significantly lower rate in the treatment groups. The lowest concentrations were observed in the group treated with *Bacillus subtilis* No.15 at 10^8 cfu/ml (256.7 copies/ μ l), followed by *Streptomyces* No.8 at the same concentration (357.7 copies/ μ l), compared to the infected control (12,540 copies/ μ l). Moreover, soaking setts and spraying with PGPR-3 enhanced plant growth parameters, including plant height (22.30%), root number (60.73%), root length (97.68%), and chlorophyll content (97.68%). All of microbial treatments stimulated the production of biochemical markers associated with induced resistance, including hydrogen peroxide (35%), ascorbate peroxidase (90.8%), and guaiacol peroxidase (92.3%), while reducing the production of malondialdehyde (MDA) by 93.4%. Gene expression analysis revealed that *PR6-4* was upregulated by 92.7% and *PR10-11* by 92.5% in the *B. subtilis* No.15.

Keywords: induced resistance; sugarcane; white leaf disease; microorganism

บทนำ

โรคใบขาวอ้อยเป็นโรคที่ทำความเสียหายต่อการปลูกอ้อย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เป็นแหล่งปลูกอ้อยที่สำคัญของประเทศ ความรุนแรงของโรคมักมากหรือน้อยแตกต่างกันไปตามสภาพภูมิอากาศในแต่ละปีและตามพื้นที่ โรคใบขาวอ้อยเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา (Phytoplasma) อ้อยที่เป็นโรคใบจะเป็นสีขาว ลำต้นแคระแกร็น มีการแตกกอมากขึ้น และไม่มีกรวยปล้อง ถ้าระบาดรุนแรงทำให้ต้นตายได้ หรือไม่สามารถไถดอในรุ่นต่อไปได้ สาเหตุของการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางของโรคใบขาว เกิดจากการนำท่อนพันธุ์อ้อยที่มีเชื้อสาเหตุโรคไปใช้เป็นท่อนพันธุ์และมีการถ่ายทอดผ่านแมลงพาหะ คือ เพลี้ยจักจั่นปีกลายจุดสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovittatus*) (ยุภา และคณะ, 2548) ปัจจุบันปัญหาการระบาดของโรคใบขาว อ้อยมีความรุนแรงมากขึ้นเนื่องจากการขยายพื้นที่ปลูกอ้อย จึงทำให้ขาดแคลนท่อนพันธุ์อ้อยที่ดี มีการนำท่อนพันธุ์อ้อยที่แฝงโรคไปปลูกขยายพันธุ์หรือนำไปปลูกยังแหล่งที่ไม่มีการระบาดของโรค รวมทั้งขาดการเฝ้าระวังและความเข้าใจในเรื่องการเกิดโรคและการระบาดของโรคใบขาวอ้อย จากการศึกษาประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตอ้อยที่ติดเชื้อใบขาวของ วีรกรณ์ และคณะ (2567) ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญเติบโตอ้อยได้ดี จำนวน 2 โยไซเลท ได้แก่ *Streptomyces* No.8 และ *Bacillus subtilis* No.15 นำมาใช้ในการการเจริญเติบโตของอ้อยที่ติดโรคใบขาว จากข้อมูลผลการดำเนินงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า อ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาวในระดับเชื้อประมาณ 100 copies/ μ l เป็นระดับเชื้อที่สามารถชักนำให้เกิดอาการใบขาวได้ มีอัตราการรอดชีวิต 100% มีจำนวนลำเฉลี่ย 11 ลำ ความสูงเฉลี่ย 256 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางลำเฉลี่ย 3.09 จำนวนข้อเฉลี่ย 27 ข้อ และค่าปริมาตรเฉลี่ย 21.08 (วีรกรณ์ และคณะ, 2567) ในสภาวะเครียด ซึ่งประกอบด้วย สภาพแวดล้อม ดิน สภาวะแล้ง แต่พืชสามารถฟื้นตัวได้หากมีเชื้อในระดับนี้ หากสามารถลดสภาวะเครียดในพืช โดยการเพิ่มความแข็งแรงภายในพืชด้วยวิธีการต่างๆ จะทำให้พืชสามารถควบคุมระดับความรุนแรงของโรคได้ ในการที่จะลดปริมาณเชื้อโรคพืชอันจะก่อให้เกิดโรคจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืชโดยอาศัยสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ซึ่งมีกลไกหรือวิธีการเป็นศัตรูต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชอยู่ 4 รูปแบบ ประกอบด้วย การสร้างสารปฏิชีวนะ การสร้างผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ การแข่งขัน คือ การแข่งขันระหว่างสิ่งมีชีวิตสองหรือมากกว่าสองชนิดที่มาอยู่ร่วมกันในด้านต่าง ๆ เช่น ที่อาศัย แหล่งอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และสารที่จำเป็นต่อการเจริญ ตลอดจนก๊าซออกซิเจน การเป็นเชื้อปรสิตและตัวห้ำ กรณีที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งเจริญอยู่ใกล้เคียงหรือบนส่วนของเชื้อโรคพืชเข้าทำลายเชื้อโรคพืชเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร หรือสารประกอบต่าง ๆ จากเชื้อโรคพืช การชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อโรค เป็นกลไกที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปกระตุ้นให้ต้นพืชสร้างกลไกหรือสร้างสารต่าง ๆ ที่มีผลในการต่อต้านหรือยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช กลไกดังกล่าวอาจเกิดจากสปอร์หรือเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยตรง หรืออาจเกิดจากผลผลิตของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จากรายงานการศึกษาวิจัย Ratchaseema et al. (2021) ได้ศึกษาสาร Benzothiadiazole (BTH) และ salicylic acid (SA) ต่อการชักนำภูมิต้านทานแบบ Systemic Acquired Resistance: SAR ของอ้อยต่อเชื้อไฟโตพลาสมาที่เกี่ยวข้องกับโรคใบขาวอ้อยการพ่นสาร BTH และ SA มีแนวโน้มช่วยเพิ่มปริมาณกรดซาลิไซลิก สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และลดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อ โดยการพ่น BTH ที่ความเข้มข้น 2.4 mM และ SA ที่ความเข้มข้น 2.4 mM แสดงประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดความเข้มข้นของเชื้อไฟโตพลาสมา

Sharma et al. (2019) พบว่า เชื้อ *Klebsiella* spp. strain MBE02 เป็นเชื้อกลุ่ม PGPR ที่สามารถควบคุมเชื้อ *Aspergillus niger* และ *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสงได้ โดยพบการแสดงออกของยีนในถั่วลิสง ได้แก่ NPR1 และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสม JA และ ET เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ MBI600 สามารถชักนำภูมิคุ้มกันต้านทานโรคในมะเขือเทศ พบว่า มีการสะสมสาร SA ในมะเขือเทศ (Sharma et al., 2019) เชื้อ *Bacillus* sp. CHEP5 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานต่อเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคริโคนเน่าในถั่วลิสง ลดการเกิดโรคได้ 16.69% (Figueredo et al., 2017) เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ CHAO สามารถกระตุ้นให้มะเขือเทศผลิต salicylic acid (SA) ซึ่งเป็นสารที่สำคัญต่อกระบวนการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานในพืช จนพืชสามารถต้านทานการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne javanica* ทำให้ตัวอ่อนตาย และปริมาณไส้เดือนฝอยลดลงจนไม่ทำให้เกิดโรค (Siddique and Shaukat, 2004) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถ ในการชักนำให้พืชต้านทานโรคมากที่สุดคือ เชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยพบว่าสามารถกระตุ้นการผลิตสาร phytoalexin ในพืช หรือผลิตสารเพื่ต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum graminicola* และ *Magnaporthe grisea* เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* และเชื้อไวรัส *Green-mottle mosaic virus* เป็นต้น (Harman et al., 2004) จากรายงานจุลินทรีย์ที่สามารถชักนำความต้านทานโรคของพืชผ่านการกระตุ้นกิจกรรมของชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์พืช แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษากลไกดังกล่าวในอ้อยอย่างชัดเจน ดังนั้น การศึกษารั้วนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการชักนำภูมิคุ้มกันของอ้อยต่อโรคใบขาวอ้อย

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างพืช

คัดเลือกกล้าอ้อยพันธุ์กก.ขอนแก่น 3 อายุ 10 เดือน ที่ติดเชื้อใบขาวและตรวจหาปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค PCR ที่เชื้อระดับ 100 copies/ μ l จากแปลงเกษตรกรที่มีประวัติการเกิดโรคใบขาวใน อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น ปลุกและทดสอบที่โรงเรือนทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว

การเก็บตัวอย่างใบอ้อยหลังพบเชื้อครั้งที่ 6 เก็บใบลำดับที่สามจากใบยอดมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ โดยแต่ละหน่วยการทดลองจะเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

เทคนิค Nested-PCR: การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ครั้งที่ 1 ด้วยไพรเมอร์ MLOX/Y : ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ส่วนผสมของปฏิกิริยา ประกอบด้วย 75 นาโนกรัม/ไมโครลิตร DNA template, 0.5 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ MLOX (5' GTT AGG TTA AGT CCT AAA ACG AGC 3') และ MLOY (5' GTG CCA AGG CAT CCA CTG TAT GCC 3'), 1X PCR buffer, 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP, 0.1 U Taq polymerase ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย 95 °ซ นาน 2 นาที ตามด้วย 95 °ซ นาน 1 นาที 55 °ซ นาน 30 วินาที 72 °ซ นาน 1 นาที จำนวน 24 รอบ ตามด้วย 72 °ซ นาน 7 นาที เก็บรักษาที่ 25 °ซ ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ 700 bp การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ครั้งที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ P1/P2 ใช้ผลผลิตจากชุดที่ 1 เจือจาง 1:100 ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ P1 (5' GTC GTA ACA AGG TAT CCC TAC CGG 3') และ P2 (5' GGT GGG CCT AAA TGG ACT TGA ACC 3') อย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์, 1X PCR buffer, 1 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP, 0.1 U Taq polymerase รอบการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย 95 °ซ นาน 2 นาที ตามด้วย 94 °ซ นาน 1 นาที 60 °ซ นาน 30 วินาที 72 °ซ นาน 1 นาที จำนวน 24 รอบ ตามด้วย 72 °ซ นาน 7 นาที เก็บรักษาที่ 25 °ซ ขนาดผลผลิต 210 bp ตรวจผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis โดยใช้สีฟลูออเรสเซนต์ SYBR gold การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้เครื่อง Veriti™ Thermal Cycler บันทึกผลด้วยเครื่อง Gel Documentation ผลบวก คือ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (Sakunrungsirikul et al., 2013; Hanboonsong et al., 2006) เปรียบเทียบจำนวน copy number ของเชื้อไฟโตพลาสมาใช้พลาสมิดลูกผสม pUC1318 ที่มีชิ้นส่วนของ 16S -23S rDNA ขนาด 1,200 bp เป็นต้นแบบในการตรวจ ทำการคำนวณ copy number ของ พลาสมิดลูกผสม ดังนี้ $Number = (amount (ng) \times 6.022 \times 10^{23}) / (length (bp) \times 1 \times 10^9 \times 650)$ โดย 650 คือ น้ำหนักเฉลี่ยของ base pair (bp)

เทคนิค Realtime-PCR: การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา real-time PCR ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนประกอบใน ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 15 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหน่วยตัวอย่าง มีดังนี้ 10X PCR buffer A ใช้ความเข้มข้น 1X, 2.5 ไมโครโมลาร์ dNTPs ใช้ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์, 25 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ Taq DNA polymerase (Vivantis, Malaysia) ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อหนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.33 ไมโครโมลาร์ MLOX (5'-GTTAGTTAAGTCCTAAAACGAGC-3') and MLOY (5'-GTGCCAAGGCATCCACTGTATGCC-3') ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม และ 10X SYTO9 ที่ความเข้มข้น 0.2X ผสมสารละลายให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System, 384-well, laptop (Applied Biosystems™, Germany) โดยเริ่มจากขั้นตอน pre-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 10 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 20 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55-60 °ซ เป็นเวลา 20 วินาที และ extension ที่ อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 10 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอน denaturing ถึง extension เป็นจำนวน 40 รอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *Streptomyces* No.8 บนอาหารแข็ง arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 7-10 วัน หรือจนกว่าจะพบการสร้างสปอร์ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดชิ้นอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่ในอาหารเหลว AGMB ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร/flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน เลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* No.15 บนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดชิ้นอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่ในอาหารเหลว NB ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร/flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 วัน

การทดสอบ Dual culture bioassay

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* No.8 และเชื้อ *B. subtilis* No.15 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเชื้อรา *Colletotrichum falcatum* เชื้อสาเหตุโรคเน่าแฉงในอ้อยด้วยวิธี Dual culture bioassay นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* No.8 เลี้ยงบนอาหาร AGMA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* No.15 เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน เลี้ยงเชื้อรา *C. falcatum* บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย มาเจาะบริเวณโคโลนี ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และเชื้อรา *C. falcatum* ใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใย จากนั้นนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร จากนั้นไปบ่มอุณหภูมิห้อง (25 ± 0.5 องศาเซลเซียส) ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ และเก็บผลการทดสอบ โดยทำการวัดการยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่ 7 วัน คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยโดยใช้สูตร Inhibition (%) = $((R1 - R2) / R1) \times 100$ เมื่อ R1 คือรัศมีกลางของโคโลนีของเชื้อรา

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการส่งเสริมการเจริญของรากอ้อย

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการส่งเสริมการเจริญของรากอ้อย นำท่อนอ้อยพันธุ์กว.ขอนแก่น 3 มาตัดให้ได้ขนาด 1 ข้อตา นำแช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 50 °ซ นาน 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเชื้อที่ติดมากับท่อนพันธุ์ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาปรับความเข้มข้น ให้ได้ 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร แช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารแขวนลอยของแบคทีเรีย นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่มในสภาพชื้น นาน 7 วัน บันทึกการงอกและความยาวรากอ้อย

ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการชักนำภูมิต้านทานของอ้อยต่อโรคใบขาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 13 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซ้ำ กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุมไม่เป็นโรค กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วย PGPR-3 (ตามคำแนะนำกรมวิชาการเกษตร) กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยเชื้อ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยเชื้อ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 7 แช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วย PGPR 3 กรรมวิธีที่ 8 แช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 9 แช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 10 แช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 11 แช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* No.15

ความเข้มข้น 10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร กรรมวิธีที่ 12 กรรมวิธีควบคุมเป็นโรค คัดเลือกลำอ้อยพันธุ์กว.ขอนแก่น 3 จากกองที่มีการติดเชื้อใบขาวที่ผ่านการตรวจหาปริมาณเชื้อ แบบ pool sampling ในหนึ่งกอง ด้วยเทคนิค PCR ที่เชื้อระดับ 100 copies/ไมโครลิตร ใช้แบคทีเรียความเข้มข้น 1×10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร แช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารแขวนลอยของแบคทีเรีย นาน 1 ชั่วโมง นำอ้อยมาปลูกด้วยวิธีการชำข้อในถุงเพาะชำ เมื่ออ้อยอายุ 30 วัน ย้ายปลูกในกระถางขนาด 15 นิ้ว พันสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 6 ครั้ง เก็บตัวอย่างใบอ้อยมาตรวจกลไกการชักนำภูมิคุ้มกัน ตีพิมพ์สถานะออกซิเดชันและการต่อต้านสถานะการติดเชื้อ สารในกลุ่ม oxidation การเก็บตัวอย่างใบอ้อยหลังพ่นเชื้อครั้งที่ 6 เก็บใบลำดับที่สามจากใบยอดมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ โดยแต่ละหน่วยการทดลองจะเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Ascorbate Peroxidase (APX): การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ APX โดยดัดแปลงวิธีการวัดมาจากวิธีของ Nakano and Asada (1998) โดยเก็บตัวอย่างใบอ้อยน้ำหนัก 0.1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวเติมสาร extraction buffer (HEPES buffer (pH 7.0)) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารผสมกัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำปฏิกิริยาโดย เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 760 ไมโครลิตร ตามด้วย 1 mM EDTA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 5 mM ascorbate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายส่วนใสที่ได้ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1mM hydrogen peroxide ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (เติมก่อนวัด) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 290 นาโนเมตร ส่วน Blank คือ น้ำกลั่น บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่เวลาเริ่มต้นที่ 0 และ 1 นาที

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Guaiacol Peroxidase (GPX): การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ GPX โดยดัดแปลงวิธีการวัดมาจากวิธีของ Ghamsari et al. (2007) โดยเก็บตัวอย่างใบอ้อยน้ำหนัก 0.1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมสาร extraction buffer (GPX) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารผสมกัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำปฏิกิริยาโดย เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 830 ไมโครลิตร ตามด้วย 10X 60 mM potassium phosphate buffer (pH 6.1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 28 mM guaiacol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายส่วนใสปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1 mM hydrogen peroxide ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (เติมก่อนวัด) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 470 nm ส่วน Blank คือ น้ำกลั่น บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่เวลาเริ่มต้นที่ 0 และ 1 นาที

การวัดปริมาณ Hydrogen Peroxide (H_2O_2): เก็บตัวอย่างใบอ้อยน้ำหนัก 0.1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลว เติม 0.2 M perchloric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง เขย่าให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำปฏิกิริยาโดยดูดส่วนใสปริมาตร 800 ไมโครลิตร ตามด้วยสาร 4 M KOH ปริมาตร 63 ไมโครลิตร เขย่าให้สารผสมกัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้ชุด Kit (Hydrogen peroxide test Method: photometric Wasser Stoff peroxide-test) โดยเติมสาร Reagent 1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และสาร Reagent 2 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายส่วนใส ปริมาตร 13.4 ไมโครลิตร แล้วเขย่าสารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง และบันทึกผลการทดลอง รายงานผลในหน่วย มิลลิกรัม/ลิตร

การวัดปริมาณโปรตีนรวม: เก็บตัวอย่างใบอ้อยน้ำหนัก 0.1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลว เติม extraction buffer (0.25M NaCl ใน 0.05 M Sodium phosphate buffer (pH7.0)) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำปฏิกิริยาโดยนำสารละลายส่วนใสปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย Bradford reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ส่วน Blank เติม extraction buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลาย Bradford reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 595 นาโนเมตร แล้วบันทึกค่าดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวม โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin) แสดงปริมาณโปรตีนในหน่วย mg/g FW

การหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA): การวัดปริมาณ MDA โดยดัดแปลงวิธีการวัดมาจากวิธีของ Heath and Packer (1968) โดยเก็บตัวอย่างใบอ้อยน้ำหนัก 0.1 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมสาร 0.1% TCA reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไป

ป่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสาร TBA reagent [0.5% (w/v) TBA ใน 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)] ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °ซ เพื่อเร่งปฏิกิริยา ในการรวมตัวของ MDA และ TBA เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร และ 600 นาโนเมตร โดยใช้ TBA reagent ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1% TCA reagent 0.2 มิลลิลิตร เป็น blank นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ MDA จากค่า Extinction coefficient = 155 mM⁻¹cm⁻¹ และแสดงปริมาณ MDA ในหน่วย nmole/g FW

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชักนำภูมิคุ้มกันด้านทานภายในพืช (PRs)

เก็บตัวอย่างใบอ้อยหลังจากฝนเช็ดครั้งที่ 6 เก็บตัวอย่างใบอ้อยลำดับใบที่สามจากใบยอดมาสกัดอาร์เอ็นเอหน่วยการทดลอง ละ 3 ซ้ำ การสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จากตัวอย่างใบอ้อยดำเนินการโดยใช้ชุดสกัด GF-1 Total RNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °ซ วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ตรวจวัดด้วย เครื่อง NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) จากนั้นนำ RNA ไปสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ oligo(dT) primer และเอนไซม์ reverse transcriptase ภายใต้เงื่อนไข 42 °ซ เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 85 °ซ เป็นเวลา 5 นาที cDNA ที่ได้ถูกนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วย PCR โดยใช้ยืนยันอ้างอิง การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา real-time PCR ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนประกอบใน ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 15 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหน่วยตัวอย่าง มี ดังนี้ 10x PCR buffer A ใช้ความเข้มข้น 1X, 2.5 ไมโครโมลาร์ dNTPs ใช้ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์, 25 ไมโครโมลาร์ MgCl₂ Taq DNA polymerase (Vivantis, Malaysia) ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อหนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ไพรมอร์ความเข้มข้น 0.33 ไมโครโมลาร์ (PR6-4FCCGAGAAGCAGTTCTACGAC; PR6-4R AGTTGCAGGTGATGAAGACG และ PR10-11F CCTCAGTCATGCCGTTTCAGC; PR10-11R CCTCAGAGAGCGTTTGCTTG) (Souza et al., 2017) ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม และ 10X SYTO9 ที่ความเข้มข้น 0.2X ผสม สารละลายให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System, 384-well, laptop (Applied Biosystems™, Germany) โดยเริ่มจากขั้นตอน pre denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 10 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 20 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55-60 °ซ เป็นเวลา 20 วินาที และ extension ที่ อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 10 วินาที ทำซ้ำ ในขั้นตอน denaturingถึง extension เป็นจำนวน 40 รอบ วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชักนำความต้านทานโรค ดำเนินการโดยใช้ยีน *Actin* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) และประเมินระดับการแสดงออกของยีนแบบสัมพัทธ์ (relative gene expression) ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ตามวิธีของ Livak and Schmittgen (2001) โดยคำนวณค่า ΔCt จากความแตกต่างระหว่างค่า Ct ของ ยีนเป้าหมาย (target gene) และยีนอ้างอิง จากนั้นคำนวณค่า ΔCt โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างทดลอง (sample) และตัวอย่าง ควบคุม (calibrator) ตามสมการ: $Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{sample}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{calibrator}}$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบจำแนกทางเดียว (one way analysis of variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของดัลแคน (Duncan's Multiple Range Test : DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ผลการศึกษา

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย: ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคอ้อยและการส่งเสริม การเจริญของรากอ้อยหลังบ่ม 7 วัน แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* No.8 และ *B. subtilis* No.15 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. falcatum* สาเหตุโรคเน่าแฉกในอ้อยบนอาหาร PDA ได้ 65.33 และ 64.50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในด้านการส่งเสริมการเจริญของราก กรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์ด้วยปุ๋ยชีวภาพ PGPR-3 ให้ผลดีที่สุด โดยมีจำนวน รากเฉลี่ย 39.25 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 2.32 เซนติเมตร รองลงมาคือการแช่ท่อนพันธุ์ด้วย *Streptomyces* No.8 ซึ่งมีจำนวนราก

เฉลี่ย 35.78 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 1.85 เซนติเมตร และการแช่ท่อนพันธุ์ด้วย *B.subtilis* No.15 ซึ่งมีจำนวนรากเฉลี่ย 34.54 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 1.56 เซนติเมตร โดยทุกกรรมวิธีแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมที่ไม่แช่เชื้อจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1; Figure 1) นอกจากนี้ เมื่อประเมินการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 2 เดือน ภายใต้สภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า กรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์ร่วมกับการพ่นเชื้อให้ผลส่งเสริมการเจริญเติบโตดีกว่าการพ่นเพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะการแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยปุ๋ยชีวภาพ PGPR-3 ซึ่งให้อ้อยมีความสูงเฉลี่ย 77.67 เซนติเมตร และมีปริมาณคลอโรฟิลล์เฉลี่ย 52.53 มิลลิกรัม/กรัม รองลงมา คือ การแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วย *B. subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ซึ่งมีความสูงเฉลี่ย 76.33 เซนติเมตร และมีปริมาณคลอโรฟิลล์เฉลี่ย 49.23 มิลลิกรัม/กรัม และการแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วย *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ซึ่งมีความสูงเฉลี่ย 75.63 เซนติเมตร และมีปริมาณคลอโรฟิลล์เฉลี่ย 50.60 มิลลิกรัม/กรัม โดยกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์ร่วมกับการพ่นเชื้อจุลินทรีย์หลายกรรมวิธีมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาของ Saengsai et al. (2025) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ เชื้อ *B. subtilis* No.15 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในอ้อยในแปลงทดสอบ พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนลำเฉลี่ย 11 ลำ ความสูงเฉลี่ย 256 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางลำเฉลี่ย 3.09 จำนวนข้อเฉลี่ย 27 ข้อ และค่าบrixเฉลี่ย 21.08 รายงานการศึกษาของ Ratchaseema et al. (2021) รายงานเชื้อ *Bacillus* spp. ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของพืช และเพิ่มค่าคลอโรฟิลล์ภายใต้ความเครียดจากโรคได้ 15-40 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) (Figure 2)

Table 1 Effective of Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) on root growth promotion of sugarcane DOA-KK3 after 7 days of incubation

Treatment	Root number	Root length (cm)
H ₂ O (control)	8.12 b	0.52 c
PGPR-3	39.25 a	2.32 a
<i>Streptomyces</i> No.8	35.78 a	1.85 b
<i>Bacillus subtilis</i> No.15	34.54 a	1.56 b
C.V. (%)	9.5	14.2

Mean in the same column followed by different lowercases were significantly different at the 5% level of probability by DMRT.

*=Significant at $p < 0.05$, **=Significant at $p < 0.01$ ns=not significant ($P < 0.05$).



Figure 1 Effective of Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) on root growth promotion of sugarcane DOA-KK3 after 7 days of incubation.

Table 3 Comparison of the efficiency of Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) in promoting the growth of sugarcane DOA-KK3 at 2 months of age

Treatment	Hight (cm)	Chlorophyll content (mg/g)
1.control healthy (ddH ₂ O)	35.32 c	42.82 c
2.PGPR-3 spraying	67.73 b	48.52 b
3. <i>Streptomyces</i> No.8 10 ⁶ cfu/ml spraying	67.63 b	47.63 bc
4. <i>Streptomyces</i> No.8 10 ⁸ cfu/ml spraying	65.33 b	48.93 b
5. <i>B. subtilis</i> No.15 10 ⁶ cfu/ml spraying	67.67 b	50.53 a
6. <i>B. subtilis</i> No.15 10 ⁸ cfu/ml spraying	64.43 b	50.60 a
7.PGPR-3 soaking and spraying	77.67 a	52.53 a
8. <i>Streptomyces</i> No.8 10 ⁶ cfu/ml soaking and spraying	74.43 a	50.60 a
9. <i>Streptomyces</i> No.8 10 ⁸ cfu/ml soaking and spraying	70.23 ab	51.74 a
10. <i>B. subtilis</i> No.15 10 ⁶ cfu/ml soaking and spraying	72.12 a	48.34 b
11. <i>B. subtilis</i> No.15 10 ⁸ cfu/ml soaking and spraying	74.45 a	49.12 b
12. control disease (ddH ₂ O)	30.34 c	39.66 c
C.V. (%)	12.3	15.2

Mean in the same column followed by different lowercases were significantly different at the 5% level of probability by DMRT. *=Significant at $p < 0.05$, **=Significant at $p < 0.01$ ns=not significant ($P < 0.05$).

**Figure 3** Growth promotion of sugarcane by Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) 30 days after planting.

(1.control healthy (ddH₂O) 2.PGPR-3 spraying 3.*Streptomyces* No.8 10⁶ cfu/ml spraying 4.*Streptomyces* No.8 10⁸ cfu/ml spraying 5.*B. subtilis* No.15 10⁶ cfu/ml spraying 6. *B. subtilis* No.15 10⁸ cfu/ml spraying 7. PGPR-3 soaking and spraying 8.*Streptomyces* No.8 10⁶ cfu/ml soaking and spraying 9.*Streptomyces* No.8 10⁸ cfu/ml soaking and spraying 10.*B. subtilis* No.15 10⁶ cfu/ml soaking and spraying 11.*B. subtilis* No.15 10⁸ cfu/ml soaking and spraying 12.Control disease (ddH₂O))

การชักนำภูมิต้านทานต่อเชื้อไฟโตพลาสมาเหตุโรคใบขาว

ผลต่อปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา: ตัวอย่างต้นอ้อยพันธุ์กวก.ขอนแก่น 3 อายุ 10 เดือน จำนวน 100 ต้น ที่มีการติดเชื้อโรคใบขาว และคัดเลือกด้วยเทคนิค Nested PCR และ Real-time PCR ที่ระดับปริมาณเชื้อประมาณ 100 copies/ไมโครลิตร เมื่อตรวจวิเคราะห์ก่อนเริ่มการทดลอง พบว่า มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 158 copies/ไมโครลิตร (**Table 4**) เมื่อนำมาปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลอง และประเมินผลเมื่ออ้อยอายุ 2 เดือน พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์สามารถลดอัตราการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นกล้าอ้อยได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมเป็นโรค โดยกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วย *Bacillus subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ให้ปริมาณเชื้อต่ำที่สุดเท่ากับ 256.7 copies/ไมโครลิตร รองลงมาคือกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วย *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 357.7 copies/ไมโครลิตร และกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์ และพ่นด้วย PGPR-3 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 494.7 copies/ไมโครลิตร ในทางตรงกันข้าม กรรมวิธีควบคุมเป็นโรคที่ไม่ได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ มีปริมาณเชื้อเพิ่มสูงถึง 12,540 copies/ไมโครลิตร (**Table 4**)

Table 4 Comparison of sugarcane white leaf phytoplasma concentration in 2-month-old sugarcane using quantitative real-time PCR (qPCR) technique

Treatment	Tm (Peak)	Mean Cp	Phytoplasma Conc. (copies/25 ng plant DNA)*
1.control healthy (ddH ₂ O)	0.00	0.00	0.0 e
2.PGPR-3 spraying	81.49	20.94	1,548.0 b
3. <i>Streptomyces</i> No.8 10^6 cfu/ml spraying	81.49	21.00	712.3 cd
4. <i>Streptomyces</i> No.8 10^8 cfu/ml spraying	81.30	22.56	432.3 cde
5. <i>Bacillus subtilis</i> No.15 10^6 cfu/ml spraying	81.49	21.71	1,045.0 bc
6. <i>Bacillus subtilis</i> No.15 10^8 cfu/ml spraying	81.45	22.91	560.0 cde
7.PGPR-3 soaking and spraying	81.49	23.98	494.7 cde
8. <i>Streptomyces</i> No.8 10^6 cfu/ml soaking and spraying	81.42	22.67	402.3 de
9. <i>Streptomyces</i> No.8 10^8 cfu/ml soaking and spraying	81.48	24.53	357.7 de
10. <i>Bacillus subtilis</i> No.15 10^6 cfu/ml soaking and spraying	81.49	23.99	480.3 cde
11. <i>Bacillus subtilis</i> No.15 10^8 cfu/ml soaking and spraying	81.34	24.23	256.7 de
12. control disease (ddH ₂ O)	81.50	18.43	12,540.0 a
C.V. (%)	-	-	23.23

Mean in the same column followed by different lowercases were significantly different at the 5% level of probability by DMRT. *=Significant at $p < 0.05$, **=Significant at $p < 0.01$ ns=not significant ($P < 0.05$).

ผลของการชักนำความต้านทานด้วยแบคทีเรียต่อการเปลี่ยนแปลงของสารและกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคใบขาว:

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของสารชีวเคมีและเอนไซม์ พบว่า กรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร มีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงที่สุดเท่ากับ 66.33 มิลลิกรัม/ลิตร รองลงมา คือ กรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยปุ๋ยชีวภาพ PGPR-3 และกรรมวิธีพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่า 65.87 และ 65.60 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีค่า 32.33 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX) พบว่า กรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 9.51 มิลลิกรัม รองลงมา คือ กรรมวิธีพ่นด้วย *Bacillus subtilis* No.15 ความ

เข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร และกรรมวิธีพ่นด้วยเชื้อ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่า 7.52 และ 7.51 มิลลิกรัม ตามลำดับ และแตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีควบคุมที่มีค่า 4.45 มิลลิกรัม สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ guaiacol peroxidase (GPX) พบว่า กรรมวิธีพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 7.97 มิลลิกรัม รองลงมาคือกรรมวิธีพ่นด้วย *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร และกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่า 7.87 และ 7.50 มิลลิกรัม ตามลำดับ ในทางกลับกันการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) พบว่า กรรมวิธีพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร มีปริมาณต่ำที่สุดเท่ากับ 2.30 มิลลิกรัม รองลงมา คือ กรรมวิธีพ่นด้วยปุ๋ยชีวภาพ PGPR-3 และกรรมวิธีควบคุมไม่เป็นโรค ซึ่งมีค่า 2.54 และ 2.77 มิลลิกรัม ตามลำดับ และต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมเป็นโรคที่มีค่า 6.70 มิลลิกรัม ขณะที่การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมพบว่า กรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเท่ากับ 3.89 มิลลิกรัม รองลงมา คือ กรรมวิธีควบคุมไม่เป็นโรค และกรรมวิธีพ่นด้วยปุ๋ยชีวภาพ PGPR-3 ซึ่งมีค่า 3.82 และ 3.78 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PR6-4* แสดงให้เห็นว่า กรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร มีการแสดงออกสูงที่สุดเท่ากับ 7.51 รองลงมาคือกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร และกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วย PGPR-3 ซึ่งมีค่า 7.46 และ 7.45 ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมไม่เป็นโรค (control healthy) ที่มีค่า 3.21 พบว่ากรรมวิธีดังกล่าวมีการแสดงออกของยีนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 4) ในทำนองเดียวกัน การแสดงออกของยีน *PR10-11* สูงที่สุดในกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร เท่ากับ 7.26 รองลงมาคือกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* No.15 ความเข้มข้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร และกรรมวิธีแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่า 6.65 และ 6.45 ตามลำดับ โดยสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมไม่เป็นโรคที่มีค่า 2.56 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 5)

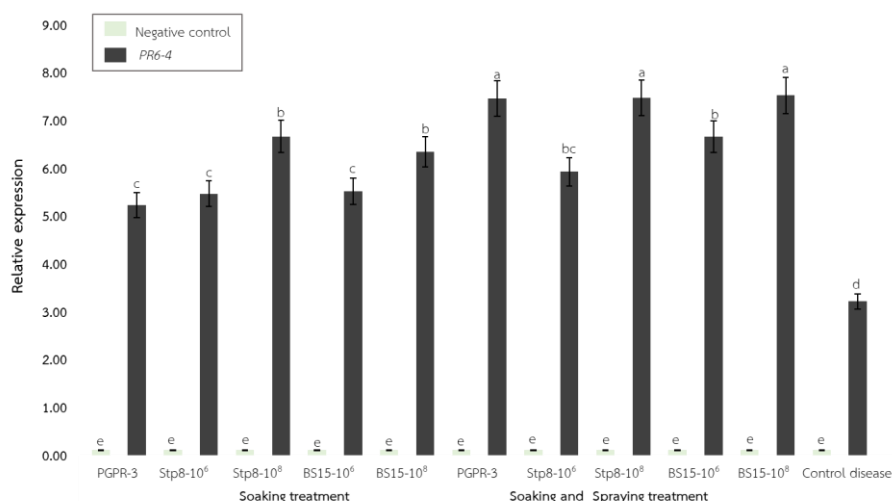


Figure 4 Comparative expression of the *PR6-4* gene in sugarcane at 30 days after treatment with resistance-inducing bacteria. 1. PGPR-3 spraying 2. *Streptomyces* No.8 10^6 cfu/ml spraying 3. *Streptomyces* No.8 10^8 cfu/ml spraying 4. *B. subtilis* No.15 10^6 cfu/ml spraying 5. *B. subtilis* No.15 10^8 cfu/ml spraying 6. PGPR-3 soaking and spraying 7. *Streptomyces* No.8 10^6 cfu/ml soaking and spraying 8. *Streptomyces* No.8 10^8 cfu/ml soaking and spraying 9. *B. subtilis* No.15 10^6 cfu/ml soaking and spraying 10. *B. subtilis* No.15 10^8 cfu/ml soaking and spraying 11. Control disease (ddH₂O))

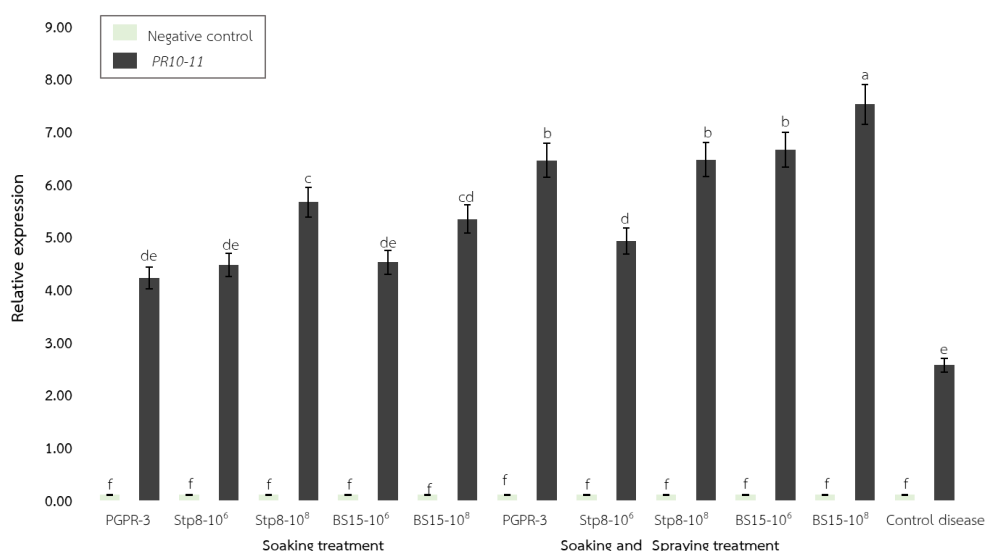


Figure 5 Comparative expression of the *PR10-11* gene in sugarcane at 30 days after treatment with resistance-inducing bacteria 1. PGPR-3 spraying 2. *Streptomyces* No.8 10⁶ cfu/ml spraying 3. *Streptomyces* No.8 10⁸ cfu/ml spraying 4. *B. subtilis* No.15 10⁶ cfu/ml spraying 5. *B. subtilis* No.15 10⁸ cfu/ml spraying 6.PGPR-3 soaking and spraying 7.*Streptomyces* No.8 10⁶ cfu/ml soaking and spraying 8. *Streptomyces* No.8 10⁸ cfu/ml soaking and spraying 9. *B. subtilis* No.15 10⁶ cfu/ml soaking and spraying 10.*B. subtilis* No.15 10⁸ cfu/ml soaking and spraying 11. Control disease (ddH₂O))

วิจารณ์

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีและกิจกรรมเอนไซม์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการชักนำภูมิต้านทานโรคใบขาวอ้อย ดำเนินการในอ้อยอายุ 2 เดือน ภายใต้สภาพโรงเรือนทดลอง ซึ่งปัจจัยแวดล้อมทั้งสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต เช่น อุณหภูมิ แสง ดิน น้ำ และศัตรูพืช มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช เมื่อพืชเผชิญกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะเกิดการสร้างอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ซึ่งในระดับต่ำทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสัญญาณ แต่เมื่อสะสมในระดับสูงจะก่อให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและทำลายองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ เช่น ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ (Heath and Packer, 1968) พืชจึงมีกลไกต้านออกซิเดชันทั้งในรูปของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น แอสคอร์เบต กลูตาไทโอน และแคโรทีนอยด์ รวมถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัด ROS เช่น ascorbate peroxidase (APX) และ glutathione peroxidase (GPX) (Nakano and Asada, 1988) จากการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่มีการแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณโปรตีนรวมสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม สอดคล้องกับแนวคิดของการชักนำภูมิต้านทานแบบ induced systemic resistance (ISR) โดยจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR (Harman et al., 2004; Sharma et al., 2019) นอกจากนี้ การสะสมของเมลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จาก lipid peroxidation พบว่า มีค่าต่ำในกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ แสดงถึงการลดความเครียดออกซิเดชันและการปกป้องโครงสร้างเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Heath and Packer, 1968) ในระดับโมเลกุล การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่า ยีนในกลุ่ม pathogenesis-related proteins (PR proteins) มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรค โดยยีน peptidase inhibitors (PR-6 family) ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ของศัตรูพืชและเชื้อโรค ซึ่งช่วยลดความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อ (Harman et al., 2004) ขณะที่ยีน Ribonuclease-like proteins (PR-10 family) มีบทบาทในการต้านเชื้อผ่านกิจกรรมคล้าย RNase และการกระตุ้นกลไกป้องกันอื่น ๆ ของพืช (Sharma et al., 2019) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรรมวิธีที่ใช้การแช่ท่อนพันธุ์ร่วมกับการพ่นเชื้อแบคทีเรีย มีการแสดงออกของยีน *PR6-4* และ *PR10-11* สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ บ่งชี้ว่าจุลินทรีย์สามารถกระตุ้นระบบป้องกันของพืชได้ทั้งในระดับสรีรวิทยาและระดับ

โมเลกุล สอดคล้องกับรายงานของ Ratchaseema et al. (2021) ที่พบว่าการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้านทานของพืชสามารถลดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาและเสริมความแข็งแรงของอ้อยได้

สรุป

การแช่ท่อนพันธุ์และตามด้วยพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ *B. subtilis* No.15 และ *Streptomyces* No.8 ความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาได้ ผลการแช่ท่อนพันธุ์และพ่นด้วยปุ๋ยชีวภาพ PGPR-3 สามารถเพิ่มความสูง จำนวนราก ความยาวราก และปริมาณคลอโรฟิลล์ การใช้จุลินทรีย์ทั้งสามชนิดสามารถกระตุ้น การผลิตสารชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการชักนำภูมิคุ้มกัน เช่น สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์ ascorbate peroxidase และ guaiacol peroxidase และลดการผลิตสาร malondialdehyde ที่ก่อความเสียหายในเซลล์พืช กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้พืชป้องกันการแสดงออกของยีน PRs พบการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น ได้แก่ PR6-4 และ PR10-11 การศึกษานี้เป็นแนวทางเลือกที่ดีอีกประการหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ค่อนข้างปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อมเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช

เอกสารอ้างอิง

- วีรกรรม แสงไสย์, สนิ่นารถ พลธิราช และชไมพร ไกยผ่าย. 2567. ประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรียในการสร้างเสริมความแข็งแรงให้อ้อยที่ติดเชื้อใบขาว. น. 202-210. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรม ครั้งที่ 5 วันที่ 5-6 มีนาคม 2567 มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ยุพา หาญบุญทรง, วรณภา ฤทธสนธิ์ และชุตินันท์ ชูสาย. 2548. การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเพลี้ยจักจั่นและการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. วารสารวิจัย มข. 10: 13-21.
- Ghamsari, L., E. Keyhani, and S. Golkhoo. 2007. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. Iranian Biomedical Journal. 11: 137–146.
- Hanboonsong, Y., W. Ritthison, C. Choosai, and P. Sirithorn. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. Journal of Economic Entomology. 99: 1531–1537.
- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. 2: 43–56.
- Heath, R. L., and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125: 189–198.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 25: 402–408.
- Nakano, Y., and K. Asada. 1988. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant and Cell Physiology. 28: 131–140.
- Ratchaseema, M. T. N., L. Ladsuwan, L. Soulard, P. Swangmaneecharern, P. Punpee, P. Klomsa-ard, K. Sriroth, and S. Keawsompong. 2021. The role of salicylic acid and benzothiadiazole in decreasing phytoplasma titer of sugarcane white leaf disease. Scientific Reports. 11: 15211.

- Saengsai, W., B. Rattawat, S. Phomthirat, C. Kaiyaphai, R. Chuekittisak, N. Khumla, and S. Sakuanrungsirikul. 2025. Antagonist bacteria in action: a strategy for managing sugarcane white leaf disease. *Journal of Phytopathogenic Mollicutes*. 15: 155–156.
- Sakuanrungsirikul, S., T. Wongwarat, S. Sankot, K. Kawabe, Y. Kobori, and S. Ando. 2013. Sugarcane white leaf and sugarcane grassy shoot diseases in Thailand and the detection methods. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*. 28: 1–6.
- Sharma, N., A. C. Chen, S. Navathe, R. Chand, and S. P. Pandey. 2019. A halotolerant growth-promoting rhizobacteria triggers induced systemic resistance in plants and defends against fungal infection. *Scientific Reports*. 9: 4054.
- Souza, T. S., R. O. Dias, and M. C. Silva-Filho. 2017. Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 118: 15–28.