รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพันธุ์สู่การเกษตรที่มั่นคงและยั่งยืน
2. **โครงการวิจัย** : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองคุณภาพสูง

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Efficiency of Bioactive Elicitor for Induced Resistance Gene Expression against Disease in Soybean
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต
   สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

   ผู้ร่วมงาน : นางสาวพรนิภา ถาโน
   สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
5. **บทคัดย่อ**

การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมักประสบปัญหาทางด้านโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ ซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ วิธีการป้องกันกำจัดโดยการส่งเสริมให้พืชสร้างระบบป้องกันตนเองจากเชื้อโรคด้วยการใช้สารกระตุ้นจึงเป็นแนวทางการจัดการโรคแนวทางหนึ่ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของ PR ยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง ได้แก่ สารเมทิลจัสโมเนตที่ระดับความเข้มข้น 30, 60, 90 และ 120 ppm และเอทิลอะซิเตท โดยฉีดพ่นถั่วเหลืองในระยะเริ่มออกดอกที่ระดับความเข้มข้น 3,000, 6,000, 9,000, 12,000 และ 15,000 ppm ในกระถางและพ่นด้วยน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่าเมทิลจัสโมเนตที่ความเข้มข้น 90 พีพีเอ็ม สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *PR4* สูงสุดโดยมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น 3.14 เท่า ในขณะที่เอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 6,000 ppm สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *PR10* สูงสุดโดยมากกว่าชุดควบคุมถึง 7.38 เท่า แต่ไม่มีการแสดงออกของยีน *PR4* ผลของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการเจริญเติบโต และองค์ประกอบผลผลิตในกระถางสภาพโรงเรือน พบว่า การพ่นสารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทกับต้นถั่วเหลืองทุกระดับความเข้มข้นมีจำนวนข้อต่อต้น จำนวนกิ่งต่อต้นและน้ำหนัก 100

กรมวิชาการเกษตร

เมล็ดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต แต่ความสูง จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การพ่นสารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทไม่ทำให้คุณภาพด้านความงอกและความแข็งแรงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีความงอกมาตรฐานเฉลี่ย 98 เปอร์เซ็นต์ และ ความแข็งแรงเฉลี่ย 98 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นการพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 พีพีเอ็ม สามารถลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนตที่ระดับความเข้มข้น 90 ppm จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : สารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ การแสดงออกของยีน ความต้านทานโรค ถั่วเหลือง

Abstract

Soybean seed production had problems from seed borne disease which effect to the poor quality of seed. The management of soybeans disease are safe from infestation by pathogen by inducing plants to resistance to pathogens using bioactive elicitors is a way of managing diseases. Therefore, this research investigated the effectiveness of bioactive elicitors in the expression of PR-genes that can stimulate disease resistance in soybeans such as methyl jasmonate at the concentration of 30, 60, 90 and 120 ppm and ethyl acetate at the concentration of 3,000, 6,000, 9,000, 12,000 and 15,000 ppm for spraying soybean in the R1 stage of growth in pot experiments and distilled water treated was use as the control. It was found that the concentration of 90 ppm methyl jasmonate was able to increase the expression of the *PR4* gene by up to 3.14 times, while ethyl acetate concentration of 6,000 ppm can increase the level of gene expression *PR10* by up to 7.38 times, but does not promote expression of *PR4.* The effect of bioactive elicitor on growth and yield of soybean was found that all concentration of bioactive elicitor had no effect on number of nod per plant, number branch per plant, dry weight of 100 seeds. Nevertheless, bioactive elicitor had a significant effect on the plant height, number of pods per plant and number of seeds per plant. Additionally, methyl jasmonate and ethyl acetate were no differences in standard germination and seed vigor by AA test which showed 98% and 98% respectively. Moreover, foliar methyl jasmonate at the concentration of 90 ppm could be reduced infected of *Cercospora kikuchii* causes the purple seed stain problem about 80%. Therefore, methyl jasmonate at the concentration of 90 ppm could be appropriated to apply for soybean seed production in the field further.

Keywords: elicitor, resistance gene, soybean

กรมวิทยาศาสตร์

6. คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญและมีบทบาทต่อเศรษฐกิจโลกตั้งแต่การผลิต การตลาด การแปรรูป และใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ มีการนำถั่วเหลืองมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น เมล็ดใช้สกัดน้ำมันแปรรูปในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกหลายชนิด แต่ถั่วเหลืองเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย โรคถั่วเหลืองสามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโต นอกจากนี้โรคหลายชนิดเป็นโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ เช่น โรครานำ้ค้าง โรคใบจุดนูน โรคแอนแทรคโนส โรคเมล็ดสีม่วง โรคเมล็ดโฟมอบซิส โรคใบจุดวง และโรคไวรัสใบด่าง มีเชื้อมากกว่า 200 ชนิดที่มีผลกระทบต่อการผลิตถั่วเหลือง และมีประมาณ 35 ชนิดที่เป็นเชื้อสำคัญทางเศรษฐกิจที่ทำให้ถั่วเหลืองมีผลผลิตลดลง โดยทั่วไปการปลูกถั่วเหลืองในทุกพื้นที่จะประสบปัญหาโรคและแมลงศัตรูจำนวนมาก ซึ่งทุกส่วนของต้นถั่วเหลืองมีความไวต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืชและมีผลต่อปริมาณและคุณภาพผลผลิตถั่วเหลืองทั้งสิ้น โดยการสูญเสียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักได้แก่ เชื้อโรคหรือสภาวะที่เกี่ยวข้อง ระยะการพัฒนาการเจริญของถั่วเหลืองและสุขภาพพืชในขณะเชื้อเข้าทำลาย ความรุนแรงของโรคต่อต้นถั่วเหลืองแต่ละต้น และจำนวนต้นถั่วเหลืองที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย การจัดการให้ถั่วเหลืองไม่เป็นโรคหรือจัดการให้ถั่วเหลืองปลอดภัยจากการเข้าทำลายจากเชื้อโรค โดยการส่งเสริมให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคโดยการใช้สิ่งไม่มีชีวิตเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีการนำมาใช้ โดยเฉพาะอีลิซิเตอร์ (elicitors) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการทางสรีระของพืชให้เกิดการเปลี่ยนแปลง สารดังกล่าวมีผลต่อการขับเคลื่อนกิจกรรมภายในพืชโดยมีกลไกการกระตุ้นกระบวนการทางสรีระของพืชหลายทาง กลไกที่พืชตอบสนองเมื่อได้รับอีลิซิเตอร์ คล้ายกับการตอบสนองเพื่อป้องกันตัวจากการรุกรานของเชื้อโรค หรือตอบสนองต่อสิ่งเร้าด้านสภาพแวดล้อม เนื่องจากอีลิซิเตอร์มีผลกระทบต่อเทแทบอลิซึมของพืชและกระตุ้นให้พืชสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์บางชนิดขึ้นมา นอกจากนี้มีรายงานว่าอีลิซิเตอร์หลายชนิดสามารถชักนำให้พืชมีการตอบสนองในลักษณะต่างๆ เช่น เพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์, สร้าง reactive oxygen species (ROS), สังเคราะห์ ethylene และมีการแสดงออกของ pathogenesis-related (PR) proteins รวมถึงการกระตุ้น hypersensitive response (HR) มีการวิจัยศึกษาผลของการฉีดพ่นด้วยอีลิซิเตอร์ salicylic acid, methyl salicylate และ ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6}, 10^{-3} และ 10^{-1} โมลาร์ของถั่วเหลืองในระยะ R1 (ระยะออกดอก) และระยะ R4 (ระยะติดเมล็ด) พบว่าเมื่อฉีดพ่นด้วย Methyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ในระยะ R1 สามารถเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์อย่างมีนัยสำคัญ และอีลิซิเตอร์ที่ทำการทดสอบทั้งสามชนิด ความเข้มข้นเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนมากกว่าระยะเวลาการฉีดพ่น (Zhang *et al*., 2006) นอกจากนี้การศึกษาผลของอีลีซิเตอร์ methyl jasmonate (20 µM) และ sodium nitroprusside (500 µM) ในถั่วเหลืองจำนวน 6 พันธุ์เพื่อส่งเสริมความสามารถในการต้านทาน cotton leaf worm (*Spodoptera littoralis*) พบว่าพันธุ์ Giza 82 และ 22 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อ cotton leaf worm (*Spodoptera littoralis*) ขณะที่พันธุ์

Giza 83 และ21 มีความต้านทานปานกลางและพันธุ์ Giza 35 และ111 มีความต้านทานสูง การฉีดพ่นทั้ง methyl jasmonate และ sodium nitroprusside มีผลต่อปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ กรดอะมิโน ไกลโคลิปิดและฟอสโฟลิปิดในรากถั่วเหลืองทุกสายพันธุ์ ขณะที่ Lipid peroxidation และ H_2O_2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากมีโปรตีนต้านทานในระบบป้องกันเซลล์ (Pathogenesis-related protein) เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการต้านทานเชื้อหลายชนิด ซึ่งสามารถแบ่งได้หลายกลุ่มตามลักษณะของลำดับเบสหรือการทำนายลำดับกรดอะมิโน ความสัมพันธ์ทางซีรั่มและกิจกรรมทางชีวภาพ มีรายงานว่ามี 4 กลุ่มของเอนไซม์ไคติเนส ได้แก่ *PR*-3, -4, -8 และ -11) อีก 1 กลุ่มของเอนไซม์-1,3-glucanases (*PR*-2), อีก 1 กลุ่มของเอนไซม์ proteinase inhibitors (*PR*-6) และอีก 1 กลุ่มของเอนไซม์ peroxidase ที่จำเพาะ (*PR*-9) เช่นเดียวกับกลุ่มของ PR-1 ที่ยังไม่ทราบคุณสมบัติทางชีวเคมี นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของ thaumatin-like PR-5 family และ birch allergen Betv1-related PR-10 family แต่อย่างไรก็ตามในพืชแต่ละชนิดไม่ได้มีโปรตีน *PR* ทุกกลุ่ม และ โปรตีน *PR* แต่ละกลุ่มบางชนิดยังมีกลุ่มย่อย (Van loon *et al*., 1997) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทเพื่อดูรูปแบบการแสดงออกของยีน pathogenesis-related (*PR*) proteins บางกลุ่มได้แก่ *PR2, PR4* และ *PR10*

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
2. กระถางดินเผาขนาด 12 นิ้ว
3. สารเคมีสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ และเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอ
4. เครื่อง ABI QuantStudioTM 6 (Applied Biosystems, Foster, city, CA, USA)

- วิธีการ

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 30 ppm
กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 60 ppm
กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 ppm
กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 120 ppm
กรรมวิธีที่ 5 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 3,000 ppm
กรรมวิธีที่ 6 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 6,000 ppm
กรรมวิธีที่ 7 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 9,000 ppm
กรรมวิธีที่ 8 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 12,000 ppm
กรรมวิธีที่ 9 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 15,000 ppm

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 10 น้ำเปล่า (ชุดควบคุม)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว จำนวน 3 กระถางต่อกรรมวิธีหยอดเมล็ดกระถางละ 2 เมล็ด พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงวันหนอนเจาะลำต้น หลังจากงอกประมาณ 1 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อถั่วเหลืองเจริญในระยะ R1 พ่นสารแต่ละกรรมวิธีทดลอง และดูแลรักษาแปลงตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

2. การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleo Spin Kit ยี่ห้อ MACHEREY-NAGEL นำใบถั่วเหลืองหลังจากพ่นสาร 3 วัน มาบดในโกร่งบด สกัด Total RNA โดยชุดสกัดสำเร็จรูปตามวิธีการของบริษัท นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบ

3. การสังเคราะห์ cDNA นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover ยี่ห้อ TOYOBO มีส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตรรวม 8 ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบได้แก่ อาร์เอ็นเอความเข้มข้น 0.5 pg-0.5 µg, 4X DN Master Mix 2 ไมโครลิตร, Nuclease-free Water 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียลเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดแล้วนำไปทำปฏิกิริยาต่อไปโดยมีส่วนผสมปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบของ Reacted solution ที่ได้จากข้างต้น 8 ไมโครลิตร และ 5x RT Master Mix II 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermal cycles โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 37oC เป็นเวลา 15 นาที, 50°C เป็นเวลา 5 นาที และ 98oC เป็นเวลา 5 นาที

4. การวิเคราะหการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

ศึกษาการแสดงออกของ PR gene โดยใช้ Soy Actin gene เป็นยีนอ้างอิงซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังนี้ PR2: Forward (5’-GTCTCCTTCGGTGGTAGTG), Reverse (5’-ACCCTCCTCCTGCTTTCTC) PR4: Forward (5’-GCTTGCGGGTGACAAATAC), Reverse (5’-ACACTCCCACGTCCAAATC) PR10: Forward (5’-GCCCAGGAACCATCAAGAAG), Reverse (5’-CGCTGTAGCTGTATCCCAAG) Actin: Forward (5’-GAGCTATGAATTGCCTGATGG), Reverse (5’-CGTTTCATGAATTCCAGTAGC)

การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยชุดน้ำยา THUNDERBIRD® SYBR®qPCR Mix ยี่ห้อ TOYOBO ในปฏิกริยาปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย cDNA ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น 1 ไมโครลิตร, Forward-primer 1 ไมโครลิตร, Reverse-primer 1 ไมโครลิตร, THUNDERBIRD® SYBR®qPCR Mix 4 ไมโครลิตร 50X Rox dye 0.04 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 12.96 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Real-time PCR รุ่น ABI QuantStudioTM 6 (Applied Biosystems, Foster, city, CA, USA) โดยกำหนดสภาวะดังนี้ Pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และ Extension 60 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที 40 รอบ ตามด้วยวิเคราะห melting curve

เพื่อยืนยันวา ผลิตภัณฑ (PCR product) ที่ไดจากการศึกษา ดวยวิธี real-time PCR เปนผลิตภัณฑที่ตองการ ซึ่งผลิตภัณฑที่ถูกตองมักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่ผลิตภัณฑที่เกิดจากการจับแบบไมจำเพาะ (non-specific product) หรือ primer-dimer จะให peak ที่มีขนาดกวางที่อุณหภูมิต่ำ การทำปฏิกริยาแต่ละครั้งจะมี negative control และ ชุดน้ำยามาตรฐานที่เตรียมจาก RT-PCR product การวิเคราะห์ผลจะเป็นการคำนวณแบบสัมพัทธ์ (Relative quantification) โดยหาอัตราส่วนการแสดงออกของยีน protein PR ต่อการแสดงออกของยีนอ้างอิง housekeeping gene ได้แก่ Soy actin โดยทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงก่อนว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ ก่อนนำไปคำนวณสูตร Comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta}Ct$) (Livak and Schmittgen, 2001)

การบันทึกข้อมูล

- องค์ประกอบของผลผลิตได้แก่ ความสูง จำนวนข้อ/ต้น จำนวนกิ่ง/ต้น จำนวนฝัก/ต้น และจำนวนเมล็ด/ฝัก น้ำหนัก 1,000 เมล็ด
- คำนวณเปอร์เซ็นต์เมล็ดติดเชื้อโดยวิธี Blotter method
- คุณภาพเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความงอก ความแข็งแรง
- การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบการต้านทานโรค

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด) ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ดำเนินการ ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

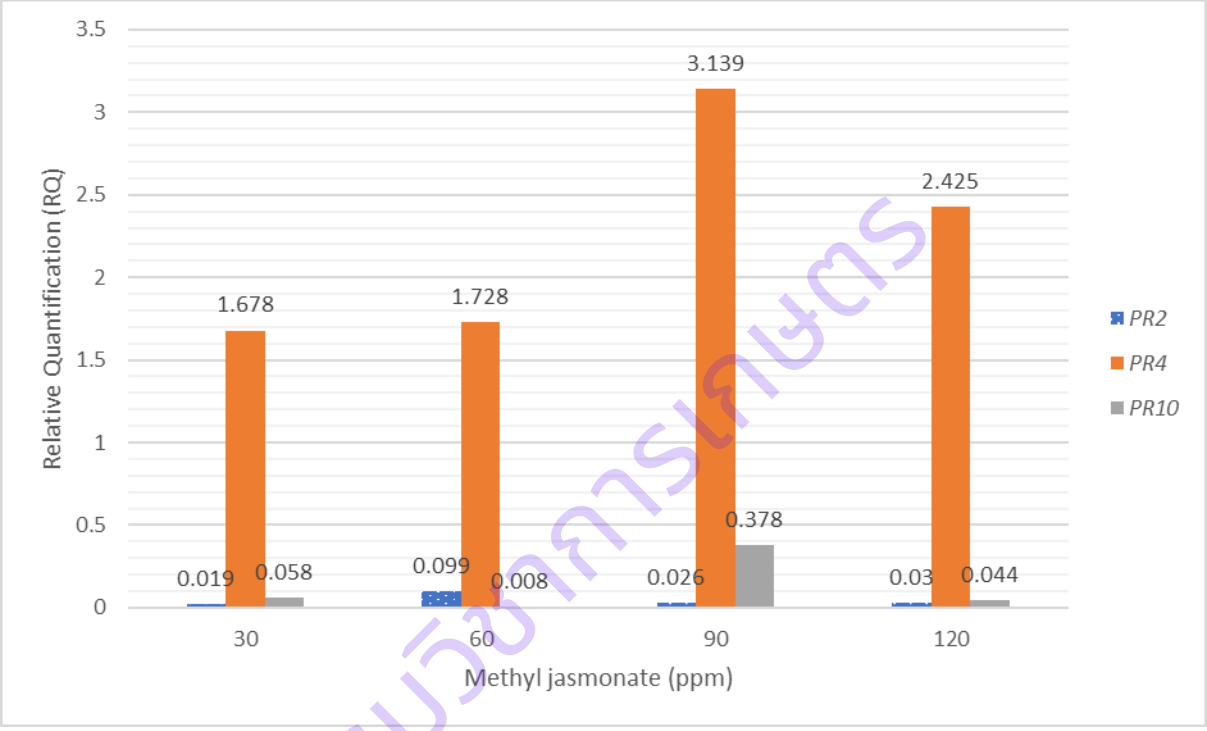
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของไบโออิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีน

จากการทดลองฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตที่ความเข้มข้น 30, 60, 90 และ 120 ppm พบว่าหลังฉีดพ่นเป็นระยะเวลา 3 วัน มีการแสดงออกของยีน *PR4* สูงสุดที่ความเข้มข้น 90 ppm โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 3.1 เท่า เมื่อเทียบกับ housekeeping gene (HKG) รองลงมาที่ความเข้มข้น 120 ppm มีการแสดงออกของยีน *PR4* เพิ่มขึ้น 2.4 เท่า ขณะที่ยีน *PR2* และ *PR10* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Agrawal และคณะ 2003 พบว่าการฉีดพ่น JA และ ABA ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.1% (v/v) ในต้นกล้าข้าวอายุ 2 สัปดาห์ สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *OsPR4* mRNA อย่างยิ่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานว่าจาสโมนิกช่วยให้พืชทนต่อโรคจากเชื้อราและทนต่อความเครียดที่มีจากหลายสาเหตุเนื่องจากกรดจาสโมนิกมีบทบาทเหนี่ยวนำให้พืชสังเคราะห์เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ประเภทสารอัลคาลอยด์ (Yan and Xie, 2015) ขณะที่การฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยเอทิลอะซีเตทที่ความเข้มข้น 3,000, 6,000, 9,000, 12,000 และ 15,000 ppm กลับพบว่ายีน *PR10* มีการแสดงออกสูงสุด โดยเอทิลอะซีเตทที่ความเข้มข้น 6,000 ppm มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนสูงสุดเท่ากับ 7.4 เท่า รองลงมาที่ความเข้มข้น 9,000 ppm การแสดงออกของยีนสูงสุดเท่ากับ 6.6 เท่า ส่วนยีน *PR4* มีการเพิ่มการแสดงออกเพิ่มขึ้น 0.6 เท่าที่ความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตท 6,000 ppm แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการแสดงออกของยีน *PR2* ทุกความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตท (ภาพที่ 2)

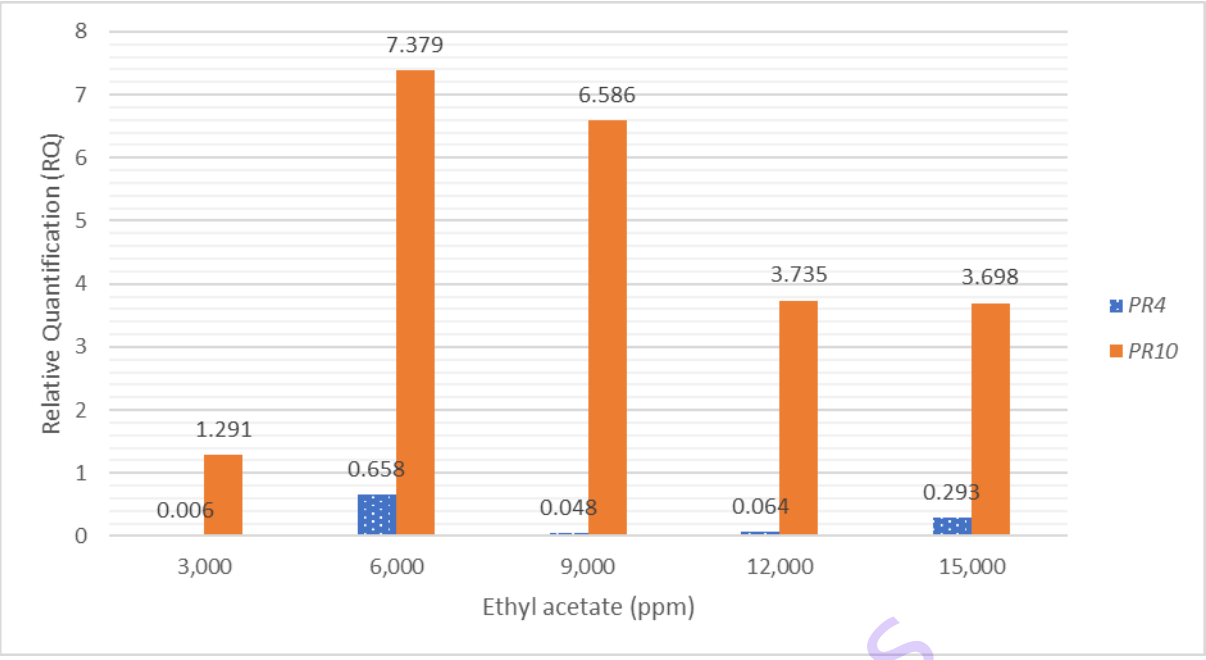
กรมวิชาการเกษตร

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตท สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนโปรตีน *PR* ที่เกี่ยวข้องกับระบบความต้านทานโรค ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการป้องกันการรุกรานของเชื้อทั้งในระบบการตอบสนองแบบเฉียบพลันหรือแบบกระจาย เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อกระจายเพิ่มขึ้น มีการค้นพบว่าการสังเคราะห์โปรตีน PR ถูกควบคุมตั้งแต่กระบวนการถอดรหัสของยีน โปรตีน *PR* จะถูกสังเคราะห์ขึ้นหลังจากได้รับเชื้ออย่างน้อย 8 ชั่วโมง (Matsuoka and Ohashi, 1986) และโปรตีนนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเฉพาะบริเวณที่ถูกกระตุ้น แต่จะไม่มีการส่งโปรตีน PR ไปยังบริเวณอื่น เนื่องจากโปรตีน PR มีบทบาทสำคัญต่อการจัดการโรค



ภาพที่ 1 ผลของความเข้มข้นของเมทิลจัสโมเนตต่อการแสดงออกของยีน *PR2, PR4* และ *PR10* ในถั่วเหลือง

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2 ผลของความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตทต่อการแสดงออกของยีน *PR4* และ *PR10* ในถั่วเหลือง

ผลของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการเจริญเติบโต และองค์ประกอบผลผลิต

จากการพ่นสารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทกับต้นถั่วเหลืองตามกรรมวิธศึกษา พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของสารให้ผลของจำนวนข้อต่อต้น จำนวนกิ่งต่อต้นและน้ำหนัก 100 เมล็ดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต แต่ความสูง จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการพ่นสารเมทิลจัสโมเนต มีความสูงอยู่ระหว่าง 65-81 เซนติเมตร จำนวนข้อ 14-16 ข้อต่อต้น จำนวนกิ่ง 2 กิ่งต่อต้น จำนวนฝัก 49-80 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น 79-136 เมล็ด ซึ่งการพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนตที่ระดับความเข้มข้น 120 ppm มีผลทำให้ต้นถั่วเหลืองมีความสูง จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้นสูงสุด เท่ากับ 81 เซนติเมตร จำนวนฝัก 80 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น 136 เมล็ด (ตารางที่ 1) ในขณะที่การพ่นด้วยเอทิลอะซีเตทมีความสูงอยู่ระหว่าง 66-76 เซนติเมตร จำนวนข้อ 14-16 ข้อต่อต้น จำนวนกิ่ง 2-3 กิ่งต่อต้น จำนวนฝัก 57-93 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น เท่ากับ 102-161 เมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของไบโออิลิซิเตอร์ต่อการเจริญและองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลือง

กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนข้อต่อต้น	จำนวนกิ่งต่อต้น	จำนวนฝักต่อต้น	จำนวนเมล็ดต่อต้น	จำนวนเมล็ดเสียต่อต้น	น้ำหนักแห้ง 100 เมล็ด (กรัม)
Methyl jasmonate 30 ppm	74.99ab	15a[1/]	2a	70abc	109abc	24ab	17.90a
Methyl jasmonate 60 ppm	65.44a	14a	2a	49a	79a	8a	16.66a
Methyl jasmonate 90 ppm	75.28ab	15a	2a	62ab	91ab	22ab	18.17a
Methyl jasmonate 120 ppm	81.52b	16a	2a	80bc	136bcd	25b	17.14a
Ethyl acetate 3,000 ppm	72.61ab	16a	2a	69abc	122abcd	15ab	17.05a
Ethyl acetate 6,000 ppm	76.91ab	15a	2a	57ab	102abc	12ab	17.31a
Ethyl acetate 9,000 ppm	73.41ab	15a	2a	66ab	140cd	15ab	16.62a
Ethyl acetate 12,000 ppm	66.56a	14a	3a	71abc	112abc	23ab	17.91a
Ethyl acetate 15,000 ppm	69.57ab	15a	3a	93c	161d	14ab	16.81a
Water (control)	71.84ab	15a	3a	57ab	95abc	13ab	17.67a
Mean	72.81	15	2.3	67.4	114.7	17.1	17.32
C.V. (%)	9.94	7.93	3.05	24.70	27.46	50.29	6.64

1/ In a column, values followed by a common letter are not significantly different by Duncan's Multiple Rang Test ($p \leq 0.05$)

ผลของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

การพ่นสารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทกับต้นถั่วเหลืองทำให้คุณภาพด้านความงอกและความแข็งแรงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต ซึ่งต้นถั่วเหลืองหลังจากพ่นสารสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์หลังการเก็บเกี่ยวเมล็ดถั่วเหลืองมีความงอกมาตรฐานเฉลี่ย 98 เปอร์เซ็นต์ และ ความแข็งแรงเฉลี่ย 98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) นอกจากนี้การพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้สูงถึง 80%

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของไบโออิลิซิเตอร์ต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

กรรมวิธี	ความงอกมาตรฐาน (%)	ความแข็งแรงโดยวิธีเร่งอายุ (%)	ปริมาณการเข้าทำลายของเชื้อ *C. kikuchii* (%)
Methyl jasmonate 30 ppm	97a[1/]	98a	68b
Methyl jasmonate 60 ppm	98a	98a	42ab
Methyl jasmonate 90 ppm	98a	98a	20a
Methyl jasmonate 120 ppm	97a	97a	39ab
Ethyl acetate 3,000 ppm	96a	99a	60b
Ethyl acetate 6,000 ppm	96a	98a	49ab
Ethyl acetate 9,000 ppm	97a	97a	54b
Ethyl acetate 12,000 ppm	99a	97a	47ab
Ethyl acetate 15,000 ppm	98a	97a	58b
Water (control)	98a	98a	57b
C.V. (%)	1.88	1.97	38.10

1/ In a column, values followed by a common letter are not significantly different by Duncan's Multiple Rang Test ($p \leq 0.05$)

กรมวิชาการเกษตร

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

- จากการฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ 2 ชนิดคือ เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตท พบว่าการฉีดพ่นเมทิลจัสโมเนตให้ผลดีที่สุด โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 90 ppm ทำให้ถั่วเหลืองมีการแสดงออกของยีน *PR4* สูงสุด โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 3.1 เท่า สำหรับผลของเมทิลจัสโมเนตต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตถั่วเหลืองพบว่า ถั่วเหลืองมีจำนวนข้อต่อต้น จำนวนกิ่งต่อต้นและน้ำหนัก 1000 เมล็ดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต แต่ความสูง จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยิ่งไปกว่านั้นการพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 ppm เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีผลต่อการลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้ดีที่สุด

- การศึกษาด้าน *PR* ยีนจะเป็นแนวทางหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อระบบการป้องกันโรคของพืช การใช้เทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการเพิ่มการแสงออกของยีนที่เกี่ยวข้องโปรตีน PR ด้วยกลไกการป้องกันต่างๆต่อเชื้อสาเหตุโรคสามารถประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางต่อการต้านทานโรคต่างๆ ดังนั้นพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกหรือรวมกันของโปรตีน PR สามารถนำมาใช้สำหรับการจัดการโรคที่มีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จได้ ในเบื้องต้นของการควบคุมยีนของโปรตีน PR นั้นเป็นที่เข้าใจกัน แต่การศึกษากลไกที่แน่นอนของการควบคุมยีนและการรับยีนจะทำให้เกิดวิธีการใหม่สำหรับเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมสำหรับพืชเพื่อป้องกันโรคพืชได้ในอนาคต

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ได้สูตรสารอิลิซิเตอร์ เมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 ppm สำหรับฉีดพ่นถั่วเหลืองเพื่อกระตุ้นการต้านทานโรคและลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง ที่จะนำไปพัฒนาต่อในการประยุกต์ใช้ในแปลงของเกษตกร

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลกที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

Agrawal, G.K., N.-S. Jwa, K.-S. Han, V. P.Agrawal and R. Rakwal. 2003. Isolation of a novel rice PR4 type gene whose mRNA expression is modulated by blast pathogen attack and signaling components. Plant Physiol and Biochem. 41:81-90.

Livak, K.J and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2−**ΔΔ**CT method. Methods. 25:402-8.

L.C. Van Loon. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Euro J. of Plant Patho. 103: 753-765.

Matsuoka, M. and Y. Ohashi. 1986. Induction of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves. Plant Physiol. 80:505-510.

Upchurch, R.G. and M. E. Ramirez. 2010. Defense-related gene expression in soybean leaves and seeds inoculated with *Cercospora kikuchii* and *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. Physiol. and Molecular Plant Patho. 75:64-70.

Yan, C. and D. Xie. 2015. Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent. Plant Biotechnol. J. 13:1233-1240.

Zhang, B., N. Hettiarachchy, P. Chen, R. Horax, B. Cornelious and D. Zhu 2006. Influence of the Application of Three Different Elicitors on Soybean Plants on the Concentrations of Several Isoflavones in Soybean Seeds. J. Agric. Food Chem. 54: 5548-555.

กรมวิชาการเกษตร