

หัวข้อวิจัย	การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne incognita</i> ในมันฝรั่ง เพื่อใช้ในพื้นที่เขตเกษตรกรรมมันฝรั่ง จังหวัดตาก
ผู้ดำเนินงานวิจัย	ดร. ณัฐบดี วิริยาวัฒน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรชาติ สินวรรณ
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ปี พ.ศ.	2558

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกไรโซแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเติบโตของมันฝรั่ง (plant growth promoting rhizobacteria : PGPR) และมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส (protease) แล้วนำเอนไซม์ที่ได้ไปทดสอบทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ นำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุมตัวอ่อนระยะ J2 ของไส้เดือนฝอยรากปมในพื้นที่แปลงปลูกมันฝรั่ง โดยทดลองในแปลงทดลองขนาด 1x2 เมตรแบบ Randomize Complete Block : RCB ซึ่งประกอบด้วย 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ โดยใช้สถิติวิเคราะห์ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) จากการศึกษาตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันฝรั่ง จำนวน 365 ตัวอย่าง พบไรโซแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ที่สามารถทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย จำนวน 60 ไอโซเลต โดยไอโซเลตที่ TK 23 สามารถทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด โดยเอนไซม์โปรตีเอสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ สามารถทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปมได้ถึง ร้อยละ 83 ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจาก 48 ชั่วโมง ทำลายตัวอ่อนได้ ร้อยละ 93 (protease activity unit : 159.16 Uml^{-1} ที่ 37°C , pH 7.0) เมื่อนำไปผลิตเป็นชีวภัณฑ์แบบน้ำและทดสอบในแปลงมันฝรั่ง จำนวน 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ พบว่า กรรมวิธีที่ 4 สามารถลดการทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมได้เฉลี่ยสูงสุด ร้อยละ 32.3 รองลงมา คือกรรมวิธีที่ 3 สามารถลดการทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมได้เฉลี่ย ร้อยละ 27.3 ถัดมาคือ กรรมวิธีที่ 2 และ 5 สามารถลดการทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมได้เฉลี่ย ร้อยละ 10.8 และ 8.3 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ 1 ไม่สามารถลดการทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมได้

Research Title	Selection of Protease producing rhizobacteria for control of Potatoes root-Knot Nematodes <i>Meloidogyne incognita</i> use in Potatoes Agricultural Land at Tak Province
Resaercher	Dr. Nuttabodee Viriyawattana Assistant Professor Dr. Surachat Sinworn
Organization	Faculty of Science and Technology, Suan Dusit Rajabhat University.
Year	2015

Abstract

The aim of this study was to isolate rhizobacteria that has the ability to promote the growth of potatoes (plant growth promoting rhizobacteria : PGPR) and have the ability to produce enzymes protease. Then the enzymes were tested destructive larvae J2 of *M. incognita* root - knot nematode in the laboratory. Used to produce Bioproduct to control the larvae J2 of root - knot nematodes in the area planted potatoes. The experimental plots measuring 1x2 meters are Randomize Complete Block: RCB consisting of five treatment, four replicates. Using statistical analysis, percentage, standard deviation and analysis of variance (ANOVA). The study found that the soil around the roots of potatoes on 365 samples found rhizobacteria have enzymes that can destroy the larvae of nematodes of the 60 isolates. The Isolate number TK 23 could destroy the larvae of the root-knot nematode best. The protease enzymes secreted outside the cell to destroy the larvae of nematodes root knot up to 83 percent within 24 hours. After 48 hours, destroying the embryo of 93 percent (protease activity unit: 159.16 Uml-1 at 37 °C, pH 7.0). When used to produce Bioproduct and bring to potato field trials five treatments, four replicates found that treatment four could reduce root-knot nematode has the highest average by 32.3 percent. Followed by treatment three could reduce root - knot nematode has averaged 27.3 percent. Treatment two and five could reduce root - knot nematode has averaged 10.8 and 8.3 percent, respectively. The treatment one could not reduce the damage of root - knot nematodes.

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือและความอนุเคราะห์จากหลายฝ่ายในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้และงานวิจัยนี้จะเกิดขึ้นไม่ได้เลย หากไม่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ในปีงบประมาณ 2557 ซึ่งเล็งเห็นความสำคัญของการวิจัยนี้ ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

ประโยชน์อันเนื่องมาจากการงานวิจัยฉบับนี้จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแต่บิดา มารดาและคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนให้มีความรู้จนถึงปัจจุบัน

คณะผู้วิจัย

2558

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
 บทที่ 1 บทนำ	 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
 บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	 5
ไส้เดือนฝอยรากปม	5
อนุกรมวิธานของไส้เดือนฝอยรากปม	6
ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม	6
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	7
วงจรชีวิต	8
การเกิดปม	10
ความสำคัญทางเศรษฐกิจ	11
การวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม	12
Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)	15
กลไกการให้ธาตุอาหารและการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช	18
กลไกทางอ้อม	18
กลไกทางตรง	20
มันฝรั่ง	27

ลักษณะทั่วไป	28
สภาพที่เหมาะสม	29
การปลูก	30
ฤดูปลูก	30
พันธุ์มันฝรั่ง	30
การเตรียมพันธุ์	31
การจัดการหัวพันธุ์	32
การเตรียมดิน	33
วิธีปลูก	33
การปฏิบัติดูแลรักษา	34
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	38
สมมติฐานการวิจัย	41
กรอบแนวคิดในการวิจัย	42
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	43
การคัดแยกไรโซแบคทีเรีย	43
การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช	
(Plant Growth Promoting Activities)	43
Phosphat solubilization assay	43
Siderophore production	43
Protease activity	43
การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีเอสจากไรโซแบคทีเรีย	
ในการทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปม	44
การจำแนกชนิดของไรโซแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่มี	
ประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของ <i>M. incognita</i>	44
การนำเอนไซม์โปรตีเอสมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในรูปแบบน้ำมาทดสอบ	
ประสิทธิภาพในแปลงทดสอบของเกษตรกรอาสาสมัคร	44
บทที่ 4 ผลการวิจัย	46
ผลการศึกษาการคัดแยกไรโซแบคทีเรีย	46
การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช	47
Phosphat solubilization assay	47
Siderophore production	48

Protease activity	49
ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจากไรโซแบคทีเรีย	52
ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีเอสจากไรโซแบคทีเรีย ในการทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของของ <i>M. incognita</i>	55
ผลการจำแนกชนิดของไรโซแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่มี ประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของ <i>M. incognita</i>	56
ผลทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีเอสจากไรโซแบคทีเรียจาก ไรโซแบคทีเรียในแปลงทดลอง	57
บทที่ 5 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	62
อภิปรายผล	62
ข้อเสนอแนะ	63
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	64
สรุปผลการวิจัย	65
ผลผลิต	66
รายงานการเงิน	67
บรรณานุกรม	69
ประวัติผู้วิจัย	71

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่าง PGPR ที่ช่วยในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช	17
2.2	หัวเชื้อ Plant Growth Promoting Rhizobacteria เชิงการค้าที่ใช้ ในต่างประเทศ	25
4.1	ความสามารถของเอนไซม์โปรตีเอสในการย่อยสลายเคซีน เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	54

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i> ระยะ J2 larva	7
2.2	วงจรการก่อโรคของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i>	10
2.3	ภาพวาดส่วนประกอบบริเวณหัวของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช	14
2.4	<i>Pseudomonas</i> spp.	15
2.5	<i>Azospirillum</i> spp.	16
2.6	<i>Azotobacter</i> spp.	16
2.7	โครงสร้าง ferrioxamine B	21
2.8	โครงสร้าง indole-3-acetic acid (IAA)	22
2.9	โครงสร้างของเอธิลีน	23
2.10	วิธีการสังเคราะห์เอธิลีน	24
2.11	กรอบแนวคิดในการวิจัย	42
4.1	พื้นที่แปลงปลูกมันฝรั่งที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม อำเภอพบพระ จังหวัดตาก ที่คณะผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างดินรอบรากมันฝรั่ง เพื่อนำมาคัดแยกไรโซแบคทีเรีย	46
4.2	ลงพื้นที่เก็บตัวอย่างจากดินรอบรากมันฝรั่ง อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	47
4.3	ลักษณะ halo zone รอบโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar	48
4.4	โคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง siderophore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar	49
4.5	แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ให้ลักษณะโซนใสรอบๆ โคโลนีบนอาหาร skimmed milk agar	50
4.6	เอนไซม์โปรตีเอสที่หลั่งออกมาจากเซลล์แบคทีเรีย	53
4.7	การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.8	ร้อยละของการตายของไส้เดือนฝอยรอบรากพืช	55
4.9	ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ	57
4.10	การทดสอบในภาคสนามตามแนวชายขอบตลิ่งที่มีประวัติน้ำท่วม	58
4.11	หลังจากการฉีดชีวภัณฑ์ประเภทเอนไซม์โปรตีเอสที่สกัดจากแบคทีเรีย แปลงมันฝรั่งมีอัตรา การเหี่ยวเฉาลดลง ต้นมันฝรั่งแข็งแรงมากขึ้น	59
4.12	ผลผลิตมันฝรั่งมีความแข็งแรงและลดปัญหารากปมลงอย่างเห็นได้ชัด	59
4.13	เกษตรกรเก็บผลผลิตมันฝรั่งในแปลงที่มีการใช้เอนไซม์โปรตีเอส ที่สกัดจากแบคทีเรีย เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม	60
4.14	ผลผลิตมันฝรั่งที่เกษตรกรนำมาใส่ถุงเพื่อนำส่งโรงงานรับซื้อในพื้นที่	61