บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ไส้เดือนฝอยรากปม (Root-knot nematode) *Meloidogyne incognita* ที่ทำให้เกิดโรครากปมในพืช (root knot) จัดเป็นศัตรูพืชสำคัญที่มีระบาดในประเทศไทย และก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตของพืชเศรษฐกิจหลายกลุ่ม ทั้งกลุ่มผัก (พริกไทย ข่า ขิง พริก มะเขือ มะเขือเทศ แตงต่าง ๆ ผักชี กระเจี๊ยบเขียว ผักกาดหอม ผักคะน้า ผักกวางตุ้ง ฯลฯ) ไม้ผล (ฝรั่ง ลองกอง ลางสาด ลำไยมะละกอ ฯลฯ) ข้าว พืชไร่ (มันสำปะหลัง อ้อย ปอ ข้าวโพด ถั่วเขียว ฯลฯ) ไม้ดอกและไม้ประดับ (เยอบีร่า ปทุมมา กล้วยไม้ ดีปลี ฯลฯ) โดยมีพืชกว่า 60 ชนิด เสี่ยงต่อการถูกทำลายโดยไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งแพร่กระจายมากับการให้น้ำในบ่อดิน และปะปนอยู่ในดินหรือเครื่องมือทางการเกษตร (สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 2538) ในปี พ.ศ. 2549 มีรายงานการระบาดอย่างรุนแรงของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในพื้นที่ปลูกพริกที่จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งมีเนื้อที่ประมาณ 1,629 ไร่ การระบาดครั้งนี้สร้างความสูญเสียต่อผลผลิตราว 50 - 100 % นับเป็นมูลค่าความเสียหายถึง 50 - 80 ล้านบาทและในบางพื้นที่ มีการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นจำนวนมาก จนทำให้ไม่สามารถปลูกพริกได้อีกกระทั่งปัจจุบัน (นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และวราภรณ์ ประกอบ, 2550) นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยรากปมยังก่อปัญหาต่อระบบการให้น้ำแบบน้ำหยดที่ปัจจุบันเกษตรกรได้นำมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตในมันสำปะหลังอีกด้วย การเข้าทำความเสียหายกับพืชนั้น ไส้เดือนฝอยรากปมจะเข้าทำทางรากฝอย โดยความเสียหายเกิดขึ้นได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ทางตรงคือไส้เดือนฝอยรากปมเข้าแย่งอาหารพืช ทำให้ต้นพืชแคระแกรน ไม่เจริญเติบโตหรือตายไป และปล่อยเอนไซม์ละลายผนังเซลล์พืช ทำให้เซลล์หลายเซลล์รวมเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ อีกทั้งปล่อยฮอร์โมนกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์บริเวณรากมากผิดปกติ จึงทำให้เกิดปมบริเวณรากพืช ส่วนทางอ้อมคือ การเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมทำให้พืชต้านทานต่อโรคน้อยลง จึงเป็นตัวเปิดทางให้จุลินทรีย์ก่อโรคพืชอื่นเข้ามาทำลายพืชเพิ่มเติม (secondary invasion) (สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 2528) ซึ่งการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาขาดทุน เนื่องจากจะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดและป้องกัน อีกทั้งวิธีการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้คือ การใช้สารเคมี (สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 1996) ซึ่งสามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ในระยะเวลาสั้นๆ ประมาณ 2-4 สัปดาห์ เมื่อสารเคมีหมดฤทธิ์ ไส้เดือนฝอยรากปมก็จะเข้าทำลายซ้ำและเกิดการระบาดต่อไปอีก และการใช้สารเคมี นอกจากจะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในดินลดลงแล้ว ยังทำให้ไส้เดือนฝอยรากปมดื้อต่อสารเคมีอีกด้วย นอกจากนี้การใช้สารเคมีบางชนิดที่ใช้ความเข้มข้นมากเกินไปจะมีผลทำให้เกิดการทำลายรากพืช ทำให้รากเน่าหรือยับยั้งการแตกรากใหม่ ทำให้ไม่ได้ผลผลิตตามที่ต้องการและคุณภาพของผลผลิตลดลง ทั้งยังส่งผลต่อสุขภาพของเกษตรกร และเกิดการตกค้างในระบบนิเวศ ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อห่วงโซ่อาหาร ตลอดจนผู้บริโภค

ปัญหาดังกล่าวข้างต้น ทางเลือกที่เหมาะสมในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม คือการควบคุมโดยชีววิธี ซึ่งมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) ในกลุ่มของ

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR) ที่อาศัยในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรคในพืชและสร้างปฏิชีวนะควบคุมโรคพืชได้ ตลอดจนสร้างเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรคพืช โดยจากการศึกษาของ Siddiqui และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 พบว่า เอนไซม์โปรตีเอส (Protease) จาก *Pseudomonas fluorescens* สามารถควบคุมโรครากปมจาก *M. incognita* ได้ (Siddiqui และคณะ ในปี ค.ศ. 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lian และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 ที่พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. ซึ่งอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย PGPR สามารถกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไปทำลายผนังเซลล์ของไส้เดือนฝอยรากปม ทำให้ไส้เดือนฝอยรากปมตาย (Lian และคณะ, 2007) จากเหตุผลที่ได้กล่าวมาข้างต้นเอนไซม์โปรตีเอสจึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยจะทำการคัดเลือกแบคทีเรีย PGPR ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่มีประสิทธิภาพในการทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม (J2) ซึ่งเป็น infective stage ได้ดีที่สุด จากนั้นจึงทำการแยกยีนโปรตีเอส แล้วนำมาโคลนเข้าเวคเตอร์ที่เหมาะสม เพื่อผลิตรีคอมบีแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส ใน *Escherichia coli* และทดสอบคุณสมบัติของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสที่ได้ ซึ่งการผลิตรีคอมบีแนนท์โปรตีนนั้น มีข้อดีตรงที่เป็นการคัดเลือกลักษณะของเอนไซม์โปรตีเอสที่ต้องการ คือมีประสิทธิภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยรากปมระยะ J2 ได้ดีที่สุดและสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก จึงเหมาะกับการผลิต เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในภาคการเกษตรที่มีความสะดวกในการผลิต ซึ่งแตกต่างจากการนำสารสกัดจากพืชมาใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งต้องมีการปลูกพืช บำรุงรักษา และใช้เวลาในการเติบโต ซึ่งการนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสมาประยุกต์ใช้นั้น อาจให้พร้อมกับการให้น้ำแก่พืช ส่วนตัวเซลล์ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้จากการศึกษานั้น ก็สามารถนำมาคลุกเมล็ดก่อนปลูกลงแปลงได้ ซึ่งจากวิธีการเหล่านี้นับได้ว่า การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธีด้วยรีคอมบีแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรีย PGPR เป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการแก้ไขปัญหาไส้เดือนฝอยรากปมให้กับเกษตรกรอย่างเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ลดการใช้สารเคมี สามารถนำไปใช้ได้ในทุกสภาพพื้นที่ รวมทั้งได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ สามารถพึ่งพาตนเองและแข่งขันในตลาดต่างประเทศได้

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกแบคทีเรีย PGPR รอบรากพืชที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส
2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีเอสในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*
3. จัดจำแนกแบคทีเรีย PGPR ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่มีประสิทธิภาพสูงสุด
4. ศึกษาการเพิ่มปริมาณและการโคลนยีนโปรตีเอสในเวคเตอร์ที่เหมาะสม
5. ศึกษาการแสดงออกของยีนในการผลิตรีคอมบีแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสใน *E. coli*
6. ศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบีแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ

ขอบเขตการวิจัย

เพื่อให้บรรลุความสำเร็จในการวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงกำหนดขอบเขตของโครงการวิจัยดังต่อไปนี้

1. คัดแยกแบคทีเรีย PGPR ที่สามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม ในเขตจังหวัดนครราชสีมา นำแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีเอสในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

2. ไส้เดือนฝอยรากปมที่ศึกษา ได้แก่ *M. incognita* ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยรากปมที่มีรายงานการระบาดที่รุนแรงในประเทศไทย

3. จัดจำแนกแบคทีเรีย PGPR ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita* และนำมาศึกษาการเพิ่มปริมาณ การโคลน การแสดงออกของยีน การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสใน *E. coli* และประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้เป็นการคัดเลือกแบคทีเรีย PGPR ซึ่งส่งเสริมการเจริญของพืช ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ดีที่สุด และนำยีนมาโคลน เพื่อ

1. ผลิตเป็นชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งใช้ต้นทุนในการกำจัดต่ำ และทำการถ่ายทอดเทคโนโลยีในระดับชุมชนที่ง่ายต่อการทำความเข้าใจและนำไปใช้

2. สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการแก้ปัญหาการแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในพื้นที่เกษตรกรรม