หัวข้อวิจัย การคัดเลือกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชและการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสเพื่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม
ผู้ดำเนินงานวิจัย ดร. ณัฐบดี วิริยาวัฒน์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรชาติ สินวรณ์
หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ปี พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

การคัดเลือกแบคทีเรีย PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลังที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม ในเขตจังหวัดนครราชสีมา จำนวนทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชได้แก่ phosphate solubilization assay, siderophore production และ protease activity พบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชและมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ทั้งสิ้น 17 ไอโซเลท นำมาสกัด Genomic DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน Conserved region ของ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ นำไปวิเคราะห์ลำดับเบส เปรียบเทียบกับลำดับเบสอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI เลือกไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุด 2 ไอโซเลท ได้แก่ DK4 และ DK36 ซึ่งให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสบน skimmed milk agar 6.5 และ 6.2 ซม. ตามลำดับ และมีลำดับเบสคล้ายกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* strain V26 และ *Bacillus subtilis* strain DL5-1 นำแต่ละไอโซเลทมาสกัด Genomic DNA และเพิ่มปริมาณยีนโปรตีเอส ขนาด 1,577 bp นำไปโคลนเข้าเวคเตอร์ pET30b แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เพื่อชักนำให้เกิดการแสดงออก (expression) ผลการศึกษาพบว่าไอโซเลท DK4 และ DK36 มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบน SDS - PAGE ขนาด 37 kDa เมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสในการไฮโดรไลส์เคซีน พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่ 151.83 และ 155.41 Uml^{-1} ตามลำดับ เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีเอสมาศึกษาประสิทธิภาพของในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 พบร้อยละของการตายของตัวอ่อนระยะ J2 เท่ากับ 74 และ 75 ตามลำดับ

Research Title Isolation of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PRPG) and production of recombinant protease enzyme to control root-knot nematode *Meloidogyne incognita*
Resaercher Dr. Nuttabodee Viriyawattana
Assistant Professor. Dr. Surachart Sinworn
Organization Faculty of Science and Technology, Suan Dusit Rajabhat university.
Year 2015

Abstract

Isolation of PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) that can generate proteases enzymes to kill second stage juvenile (J2) of root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*. A total of 60 soil samples around the cassava roots with no history of Root-knot Disease from Nakhon Ratchasima Province were collected. The isolated bacteria capable of promoting the growth of plants include phosphate solubilization assay, siderophore production and protease activity. Bacteria capable of promoting the growth of the plant and is capable of generating enzymes proteases total of 17 isolates were extracted Genomic DNA and increase the amount of DNA segments Conserved region of the 16S rRNA technique with PCR using specific primers. To sequence analysis compared with other sequences in the GenBank database of NCBI. Two bacterial isolates that can generate enzyme protease were selected, including DK4 and DK36 which the diameter of the clear zone on skimmed milk agar 6.5 and 6.2 cm, respectively, and a sequence similar to the sequence of *Bacillus subtilis.* strain V26 and *Bacillus subtilis* strain DL5-1. Genomic DNA of both isolate was extracted and protease genes 1,577 bp was cloned into the vector pET30b then introduced into *E. coli* host cells to induce expression. The study found that isolates DK4 and DK36 are the expression of recombinant proteins on SDS - PAGE 37 kDa. The activity of the protease enzyme on casein hydrolysis at 151.83 and 155.41 Uml^{-1}, respectively. Efficacy of recombinant proteases in destroying J2 of root-knot nematodes found percentage of mortality equal to 74 and 75, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือและความอนุเคราะห์จากหลายฝ่ายในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

และงานวิจัยนี้จะเกิดขึ้นไม่ได้เลย หากไม่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในปีงบประมาณ 2557 ซึ่งเล็งเห็นความสำคัญของการวิจัยนี้ ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

ประโยชน์อันเนื่องมาจากงานวิจัยฉบับนี้จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่บิดา มารดาและคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนให้มีความรู้จนถึงปัจจุบัน

คณะผู้วิจัย
2558

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญภาพ		ช
บทที่ 1	**บทนำ**	**1**
	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
	วัตถุประสงค์	2
	ขอบเขตการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	**แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	**4**
	ไส้เดือนฝอยรากปม	4
	อนุกรมวิธานของไส้เดือนฝอยรากปม	4
	ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม	4
	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	6
	วงจรชีวิต	6
	การเกิดปม	8
	ความสำคัญทางเศรษฐกิจ	8
	การวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย	9
	Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)	11
	กลไกการให้ธาตุอาหารและการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช	16
	กลไกทางอ้อม	16
	กลไกทางตรง	17
	Recombinant-DNT (rDNT) Technology	23
	กระบวนการผลิต Recombinant Protein ในระดับอุตสาหกรรม	23
	การผลิตโดยใช้ Prokaryotic Cell	25
	การผลิตโดยใช้ Eukaryotic Cell	25
	ขั้นตอนการรวบรวมโปรตีน และการทำให้บริสุทธิ์	26
	การตรวจหาปริมาณโปรตีนเป้าหมาย	26

วิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Electrophoresis 28
วิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี 29
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง 30
สมมติฐานการวิจัย 32
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 33

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 34
ประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง 34
การเก็บรวบรวมข้อมูล 34
เครื่องมือในการวิจัย 35
การวิเคราะห์ข้อมูล 36

บทที่ 4 ผลการวิจัย 41
การคัดแยกแบคทีเรีย 41
การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Activities) ของแบคทีเรียรอบรากพืช 42
การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส 48
การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีเอส การโคลนยีนและนำเข้าสู่เซล์เจ้าบ้าน 53
การวิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส 56
ศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสต่อตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita* 57

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 59
สรุปผลการวิจัย 59
การอภิปรายผล 61
ข้อเสนอแนะ 62

บรรณานุกรม 63
บรรณานุกรมภาษาไทย 63
บรรณานุกรมภาษาอังกฤษ 63

ประวัติผู้วิจัย 65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่าง Plant Growth Rhizobacteria	14
2.2	ตัวอย่าง PGPR ที่ช่วยในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช	15
2.3	หัวเชื้อ Plant Growth Promoting Rhizobacteria เชิงการค้าที่ใช้ในต่างประเทศ	21
4.1	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสจากปฏิกิริยาการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skimmed milk agar	47
4.2	ความสามารถของเอนไซม์โปรตีเอสในการย่อยสลายเคซีน เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	48
4.3	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ยีนของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทกับลำดับเบสอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI	53
4.4	ความสามารถของเอนไซม์โปรตีเอสในการย่อยสลายเคซีน เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ไส้เดือนฝอยรากปม *M .incognita* ระยะ J2 larva	5
2.2	วงจรการก่อโรคของไส้เดือนฝอยรากปม *M .incognita*	7
2.3	ภาพวาดส่วนประกอบบริเวณหัวของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช	10
2.4	*Pseudomonas* spp.	11
2.5	*Azospirillum* spp.	12
2.6	*Azotobacter* spp.	12
2.7	โครงสร้าง ferrioxamine B	18
2.8	โครงสร้าง indole-3-acetic acid (IAA)	19
2.9	โครงสร้างของเอธิลีน	19
2.10	วิถีการสังเคราะห์เอทธิลีน	20
2.11	กรอบแนวคิดการวิจัย	33
3.1	แสดงเวคเตอร์ pTZ57R/T ซึ่งนำมาใช้ในการเชื่อมต่อกับ DNA โดย A คือตำแหน่งแทรกชิ้นส่วน DNA	38
3.2	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA และยีนโปรตีเอสของแบคทีเรียโดยใช้เครื่อง Thermocycler	38
3.3	การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis	39
4.1	แปลงมันสำปะหลังในพื้นที่ทดลอง	41
4.2	รากมันสำปะหลังที่มีแบคทีเรียอาศัยอยู่รอบราก	42
4.3	ตัวอย่างโคโลนีแบคทีเรียที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar	43
4.4	ตัวอย่างโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถสร้าง siderophore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar	44
4.5	ปฏิกิริยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skimmed milk agar เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยให้ลักษณะโซนใสรอบๆ โคโลนีประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 และ DK24 ตามลำดับ	45
4.6	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 และ DK24 ตามลำดับ	49

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.7	ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน Conserved regions ของ 16S ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ถึง 10 PCR product ขนาด 750 bp จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียรอบรากมันสำปะหลังไอโซเลทที่ DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 DK24 และ DK27 ตามลำดับ	51
4.8	ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนของยีนโปรตีเอสด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ยีนโปรตีเอสจากไอโซเลท DK4; เลน 2 ยีนโปรตีเอสจากไอโซเลท DK36	54
4.9	ผลการทำ PCR product ส่วนของยีนโปรตีเอสให้บริสุทธิ์ เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ถึง 3 ยีนโปรตีเอสจากไอโซเลท DK4; เลน 4 ถึง 6 ยีนโปรตีเอสจากไอโซเลท DK36	54
4.10	การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีเอส บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21 (DE3)	55
4.11	รีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส	56
4.12	การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส	56
4.13	ประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีเอสต่อตัวอ่อนระยะ J2 บริเวณรากพืช	57
4.14	การทดสอบโปรตีเอสต่อร้อยละการตายของไส้เดือนฝอย	58
4.15	ร้อยละการตายของไส้เดือนฝอยต่อการใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียรอบรากพืช	58