

การกระตุ้นเพิ่มระดับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases)
ในมะเขือเทศเมื่อถูกหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) และเพี้ยแป้ง
แจ๊คเบียดส์เลย์ (*Pseudococcus jackbeardsleyi*) เข้าทำลาย



นางสาวสุลิตา กล้าการชาย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2556

**INDUCTION OF TOMATO POLYPHENOL OXIDASES
IN RESPONSE TO COMMON CUTWORM (*Spodoptera
litura*) AND JACK BEARDSLEY MEALYBUG
(*Pseudococcus jackbeardsleyi*) INFESTATIONS**

Sulita Klakankhai



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science Program in Crop Science

Suranaree University of Technology

Academic Year 2013

การกระตุ้นเพิ่มระดับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ใน
มะเขือเทศเมื่อถูกหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) และเพ็ลลีย์แป้ง
แจ๊คเบียดส์เลย์ (*Pseudococcus jackbeardsleyi*) เข้าทำลาย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร. รุ่ง มรกต)

ประธานกรรมการ

(ศ. ดร. ปิยะดา อธิมาน์ คั่นตสวัสดิ์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร. ธวัชชัย ทิมชุมเหนือ)

กรรมการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(ศ. ดร. สุขกิจ ลิ้มปิจนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ผศ. ดร. สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

สุจิตา กล้าการขาย : การกระตุ้นเพิ่มระดับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในมะเขือเทศเมื่อถูกหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) และเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียร์ (*Pseudococcus jackbeardsleyi*) เข้าทำลาย (INDUCTION OF TOMATO POLYPHENOL OXIDASES IN RESPONSE TO COMMON CUTWORM (*Spodoptera litura*) AND JACK BEARDSLEY MEALYBUG (*Pseudococcus jackbeardsleyi*) INFESTATIONS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อภิวัฒน์ ต้นตสวัสดิ์, 78 หน้า.

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases; PPOs) ในมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนสารฟีนอลิก (phenolics) เป็นควิโนน (quinones) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานแมลงในวงศ์ Lepidoptera โดยความต้านทานนี้อาจเป็นผลจากระดับ PPOs ที่สร้างอยู่เดิมหรือเกิดจากการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPOs งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPOs เมื่อถูกแมลงปากกัดคือหนอนกระทู้ผัก และแมลงปากดูดคือเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียร์เข้าทำลาย และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F ในการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียร์ ทำการเปรียบเทียบระดับ PPO activity ก่อนและหลังการเข้าทำลายของแมลง พบว่าเมื่อให้หนอนกระทู้ผักกัดกินใบข้อที่ 4 ระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 ซึ่งได้รับความเสียหายเพิ่มขึ้น 4.2-146 เท่า ($p < 0.05$) และส่งผลให้ระดับ PPO activity ในใบอ่อน (ข้อที่ 1-2) ซึ่งอยู่ด้านบนเพิ่มขึ้น 2-2.8 เท่า ($p < 0.05$) ส่วนในใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่างมีระดับ PPO activity เพิ่มขึ้น 1.6-7.7 เท่า ($p < 0.05$) สำหรับการให้หนอนกัดกินใบข้อที่ 6 พบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 6 เพิ่มขึ้น 4.9-72 เท่า ($p < 0.01$) และส่งผลให้ระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 เพิ่มขึ้น 1.7-3.6 เท่า ($p < 0.05$) แต่ไม่พบการกระตุ้นเพิ่มในใบข้อที่ 1-2 สำหรับการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียร์บนใบข้อที่ 4 และ 6 พบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4, 6 และ 1-2 ก่อนและหลังการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติไม่ว่าจะให้เพลี้ยแป้งกัดกินใบข้อที่ 4 หรือ 6 ยีน PPO ต่าง ๆ มีรูปแบบการแสดงออกและตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียร์แตกต่างกัน โดยพบการกระตุ้นการแสดงออกเฉพาะในยีน PPO B และ D เมื่อให้หนอนกระทู้ผักเข้าทำลายต้นมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน PPO B promoter::GUS fusion พบการแสดงออกของ PPO เพิ่มขึ้นชัดเจนในใบที่ถูกกัดกิน โดยเฉพาะใบที่แผ่เต็มที่ (ข้อที่ 4) บริเวณเส้นใบหลัก (major veins) เส้นใบย่อย (minor veins) ก้านใบ และบริเวณรอยต่อระหว่างก้านใบกับลำต้น (abscission zone) สำหรับต้นที่มียีน PPO D promoter::GUS fusion พบการแสดงออกของ PPO D เพิ่มขึ้นชัดเจนในใบที่ถูกกัดกิน โดยเฉพาะใบแก่ (ข้อที่ 6) บริเวณเส้นใบหลัก เส้นใบย่อย และก้านใบ นอกจากนี้ยังพบการกระตุ้น

การแสดงออกในเนื้อเยื่อที่ไม่ถูกกักกั้นบริเวณใกล้เคียง และ/หรือบริเวณที่ห่างไกล และเมื่อให้เปลี้ย
แป็งแจ๊คเบียดเลยเข้าทำลาย พบการแสดงออกของ PPO B เพิ่มขึ้นในใบที่ถูกดูดกิน โดยเฉพาะใบแผ่
เต็มที (ข้อที่ 4) และพบการแสดงออกของ PPO D เพิ่มขึ้นชัดเจนในใบที่ถูกดูดกิน โดยเฉพาะใบแก่
(ข้อที่ 6) ซึ่งการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเปลี้ยแป็งแจ๊คเบียดเลยมีส่วน
คล้ายคลึงกัน โดยพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดในใบที่ถูกเข้าทำลายโดยตรง แต่การกระตุ้นการ
แสดงออกในเปลี้ยแป็งแจ๊คเบียดเลยมักจำกัดอยู่เฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อที่สัมผัสและการกระตุ้นการแสดงออกอยู่
ในระดับต่ำกว่าหนอนกระทู้ผัก จึงอาจเป็นผลให้ระดับ PPO activity ก่อนและหลังการเข้าทำลาย
ของเปลี้ยแป็งแจ๊คเบียดเลยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเข้าทำลายของแมลง
กระตุ้นการเพิ่มระดับของ PPO activity ในเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหาย ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้น
การแสดงออกของยีน PPO B และ D นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการส่งสัญญาณจากเนื้อเยื่อที่ถูกแมลงเข้า
ทำลายไปยังเนื้อเยื่ออื่นในต้นมะเขือเทศเพื่อกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ซึ่งอาจช่วยลดการเข้า
ทำลายของแมลง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุกรรมมะเขือเทศเพื่อให้มีระดับ PPOs สูงขึ้น อาจเพิ่มความ
ต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชและลดปริมาณการใช้สารเคมีในการควบคุม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนักศึกษา สุลิตา กล้าทรงขย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Dr. วิเศษ

SULITA KLAANKHAI : INDUCTION OF TOMATO POLYPHENOL
OXIDASES IN RESPONSE TO COMMON CUTWORM (*Spodoptera litura*)
AND JACK BEARDSLEY MEALYBUG (*Pseudococcus jackbeardsleyi*)
INFESTATIONS. THESIS ADVISOR : PROF. PIYADA ALISHA
TANTASAWAT, Ph.D., 78 PP.

INDUCTION/INSECT/PPO/RESISTANCE/*Solanum lycopersicum*

Polyphenol oxidases (PPOs) are enzymes that catalyze the oxidation of phenolics to quinones and have been implicated in the resistance of Lepidopteran insects in tomatoes (*Solanum lycopersicum*). This type of resistance may result from either constitutive or induced PPO levels. The objectives of this study were to evaluate the induction of PPO levels in response to infestations by a chewing insect, common cutworm (*Spodoptera litura*), and a sucking insect, Jack Beardsley mealybug (*Pseudococcus Jackbeardsleyi*), and to evaluate expression patterns of PPO A, B, D, E, and F genes in response to the infestations by both insects. The levels of PPO activity before and after infestations were compared. It was found that after infestation by common cutworms at leaf node 4, PPO activities increased about 4.2-146 fold ($p < 0.05$) at the injured leaf node 4, which led to 2-2.8 fold ($p < 0.05$) increase in PPO activities at upper young leaf nodes 1-2 and 1.6-7.7 fold ($p < 0.05$) increase in PPO activities at lower old leaf node 6. While the infestation by common cutworms at leaf node 6 resulted in 4.9-72 ($p < 0.01$) fold increase in PPO activity levels at node 6, leading to 1.7-3.6 fold ($p < 0.05$) increased PPO activity levels at upper leaf node 4. However, no increased PPO activity was found at leaf nodes 1-2. No significant differences in PPO activity levels before and after infestations were observed at any of the leaf nodes (nodes 4, 6 and 1-2) when either leaf node 4 or 6 was infested by the mealybug.

Various PPO gene members exhibited differential expression patterns in response to the common cutworm and mealybug infestations. Induced expression was only observed in PPO B and D. When transgenic tomatoes containing PPO B::GUS fusion were infested by the common cutworm, induced expression of PPO B was clearly observed locally in insect-fed leaves, particularly in mature leaves (node 4) at major veins, minor veins, petioles, and abscission zones. In contrast, the transgenic tomatoes containing PPO D::GUS fusion showed clear induced expression, especially in old leaves (node 6) at major veins, minor veins and petioles. Moreover, induced expression was found in uninjured tissues adjacent and/or distant to the insect-fed sites (systemic induction). Infestation by mealybug induced PPO B expression locally in insect-fed leaves, especially in mature leaves while PPO D was induced locally particularly in old leaves. The responses to infestations by both insects were partially similar in that the highest induction was observed locally in insect-fed leaves. However, the induced expression by mealybug infestation was usually only localized in vascular tissues and the induced expression levels were lower than those induced by common cutworms, which may lead to no significant difference in PPO activity levels before and after an infestation by mealybug. These results indicated that insect infestations induced PPO activity levels locally in injured leaves due to the induction of PPO B and D expression. In addition, signals were transduced from infested tissues to other tissues in tomato plants, resulting in increased PPO activity levels, which may help reduce insect infestations. Therefore, breeding of tomatoes by increasing PPO levels may enhance the resistance to insect pests as well as minimize the usage of pesticide control.

School of Crop Production Technology

Student's Signature Sulita K.

Academic Year 2013

Advisor's Signature Pirote Intanont

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลืออย่างดี ทั้งในด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย ดังต่อไปนี้

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา อลิมาณัฏ์ ตันตสวัสดิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และความเอาใจใส่ทั้งด้านการเรียน งานวิจัยที่ยิ่ง ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้จนเสร็จสมบูรณ์ เป็นแบบอย่างอาจารย์และนักวิจัยที่ดีและมีคุณธรรมแก่ข้าพเจ้าโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ อ. ดร. รุจ มรกต หัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ผู้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาในการทดลองอย่างดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้การประสิทธิ์ประสาทสติปัญญา วิชาความรู้ และอบรมสั่งสอนตลอดมา คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงษ์ คุณอรทัย นาชิน คุณนวลปรางค์ อุทัยดา คุณสมยงค์ พิมพ์พรม และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพืช อาคารเครื่องมือ 3 ทุกท่าน ผู้ช่วยอธิบายวิธีใช้เครื่องมือต่าง ๆ ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยส่วนหนึ่งสำหรับทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ๆ น้อง ๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจสำหรับการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาที่ให้การเลี้ยงดูอบรมและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

สุลิตา กล้าการชาย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาคผนวกตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ.....	ฒ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2. ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ข้อมูลทั่วไปของมะเขือเทศ.....	5
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ.....	6
2.3 สภาพแวดล้อม การปลูก และการดูแลมะเขือเทศ.....	7
2.4 พันธุ์มะเขือเทศที่นิยมปลูกในประเทศไทย.....	9
2.5 โรคของมะเขือเทศ.....	9
2.6 แมลงศัตรูมะเขือเทศ.....	10
2.7 หนอนกระทู้ผัก.....	11
2.8 เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์.....	12
2.9 กลไกการต้านทานแมลง.....	13

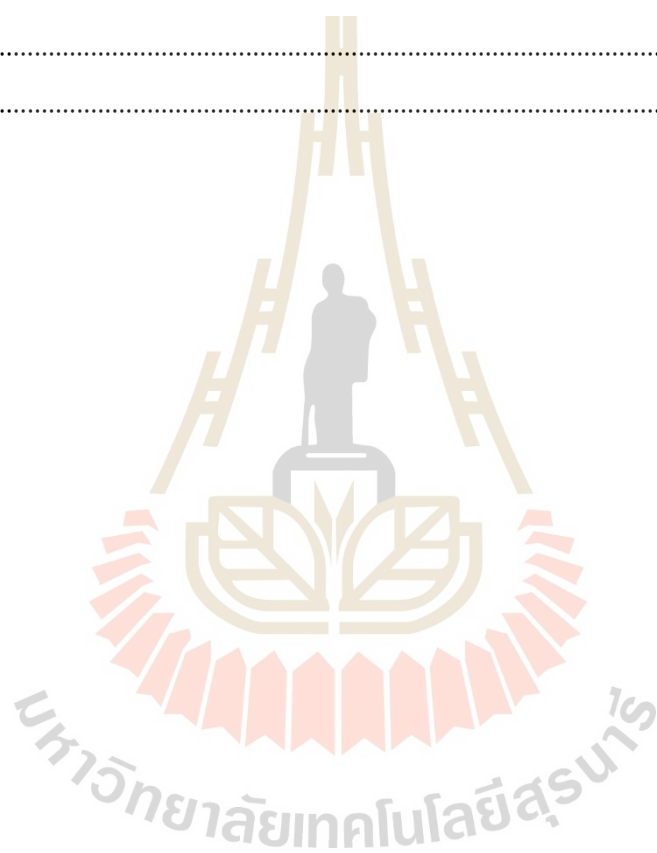
สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.10 เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส	14
2.11 การกระตุ้นเพิ่มระดับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส	16
2.12 การกระตุ้นเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนโพลีฟีนอลออกซิเดส.....	18
2.13 บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในการต้านทานโรคและแมลง	19
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	21
3.1 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	21
3.2 สถานที่ทำการทดลอง	22
3.3 ระยะเวลาการทดลอง	22
3.4 วิธีการทดลอง	22
3.4.1 การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหายจากการ เข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์	22
3.4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับ ความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้ง แจ๊คเบียดส์เลย์.....	25
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และอภิปรายผล	28
4.1 การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหายจากการ เข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์.....	28
4.1.1 การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหาย จากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก	30
4.1.2 การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหาย จากการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์.....	33
4.2 การแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความเสียหาย จากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์	35
4.2.1 การแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความ เสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก	35
4.2.2 การแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความ เสียหายจากการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์	40

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	45
6. สรุปผลการทดลอง.....	59
รายการอ้างอิง.....	60
ภาคผนวก.....	69
ประวัติผู้เขียน.....	78



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ค่าเฉลี่ยของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศที่ไม่ถูกกักกิน (control), ให้กักกินใบข้อที่ 4 และให้กักกินใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 1 29
2	ค่าเฉลี่ยของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศที่ไม่ถูกกักกิน (control), ให้กักกินใบข้อที่ 4 และให้กักกินใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2 30
3	ค่าเฉลี่ยของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศที่ไม่ถูกดูดกิน (control), ให้ดูดกินใบข้อที่ 4 และให้ดูดกินใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 1..... 34
4	ค่าเฉลี่ยของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศที่ไม่ถูกดูดกิน (control), ให้ดูดกินใบข้อที่ 4 และให้ดูดกินใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2..... 35

สารบัญภาคผนวกตาราง

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1. การเตรียม BSA standard ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ในการตรวจสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนรวม.....	70
2. การเตรียม Homogenate ที่ความเข้มข้น 5, และ 10 μl ในปริมาตร 1,000 μl ในการตรวจสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนรวม.....	70
3. ค่าการวิเคราะห์หาปริมาณของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินใบข้อที่ 4 และกักกินใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 1.....	70
4. ค่าการวิเคราะห์หาปริมาณของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินใบข้อที่ 4 และกักกินใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 1.....	71
5. ค่าการวิเคราะห์หาปริมาณของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินใบข้อที่ 4 และกักกินใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 1.....	71
6. ค่าการวิเคราะห์หาปริมาณของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินใบข้อที่ 4 และกักกินใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 1.....	71
7. ค่าการวิเคราะห์หาปริมาณของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 1-2 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินใบข้อที่ 4 และกักกินใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 1.....	72
8. ค่าการวิเคราะห์หาปริมาณของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินใบข้อที่ 4 และกักกินใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2.....	72
9. ค่าการวิเคราะห์หาปริมาณของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินใบข้อที่ 4 และกักกินใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2.....	72

สารบัญภาคผนวกตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
10. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินไบข้อที่ 4 และกักกินไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2	73
11. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินไบข้อที่ 4 และกักกินไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2	73
12. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 1-2 ที่ไม่ถูกกักกิน (control) กักกินไบข้อที่ 4 และกักกินไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2	73
13. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ไบข้อที่ 4 และดูดกิน ไบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้ง แจ็คเบียดส์เลย ครั้งที่ 1.....	74
14. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ไบข้อที่ 4 และดูดกิน ไบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย ครั้งที่ 1.....	74
15. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control), ดูดกิน ไบข้อที่ 4 และดูดกิน ไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย ครั้งที่ 1.....	74
16. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ไบข้อที่ 4 และดูดกิน ไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย ครั้งที่ 1.....	75
17. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 1-2 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ไบข้อที่ 4 และดูดกิน ไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย ครั้งที่ 1.....	75
18. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกดูดกิน (Control) ดูดกิน ไบข้อที่ 4 และดูดกิน ไบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย ครั้งที่ 2.....	75

สารบัญภาคผนวกตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
19. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูก ดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของ เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2.....	76
20. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูก ดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของ เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2.....	76
21. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูก ดูดกิน (control), ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของ เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2.....	76
22. ค่าการวิเคราะห์หาเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 1-2 ที่ไม่ ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของ เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2.....	77

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส	15
2. ตำแหน่งใบ ก้านใบ และลำต้นข้อต่าง ๆ สำหรับนำไปทดสอบ การแสดงออกของยีน	22
3. ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศก่อนและหลังการเข้าทำลาย ของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 1	31
4. ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศก่อนและหลังการเข้าทำลาย ของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2	32
5. ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศก่อนและหลังการเข้าทำลาย ของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 1	36
6. ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศก่อนและหลังการเข้าทำลาย ของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2	37
7. การแสดงออกของ PPO B::GUS ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อให้หนอนกระทู้ผัก กัดกินใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6	39
8. การแสดงออกของ PPO D::GUS ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อให้หนอนกระทู้ผัก กัดกินใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6	41
9. การแสดงออกของ PPO B::GUS ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อให้เพลี้ยแป้ง แจ๊คเบียดส์เลย์กัดกินใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6	42
10. การแสดงออกของ PPO D::GUS ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อให้เพลี้ยแป้ง แจ๊คเบียดส์เลย์กัดกินใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6	44
11. ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศข้อต่าง ๆ เมื่อให้หนอนกระทู้ผัก กัดกินใบข้อที่ 4 ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางการเคลื่อนที่ของสัญญาณ	47
12. ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศข้อต่าง ๆ เมื่อให้หนอนกระทู้ผัก กัดกินใบข้อที่ 6 ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางการเคลื่อนที่ของสัญญาณ	47
13. การกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B (ซ้าย) และ PPO D (ขวา) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศเมื่อให้หนอนกระทู้ผักกัดกินใบข้อที่ 4	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
14. การกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B (ซ้าย) และ PPO D (ขวา) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศเมื่อให้หนอนกระทู้ฝักกักกินใบข้อที่ 6	53
15. การกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B (ซ้าย) และ PPO D (ขวา) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศเมื่อให้เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ดูคกินใบข้อที่ 4	55
16. การกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B (ซ้าย) และ PPO D (ขวา) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศเมื่อให้เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ดูคกินใบข้อที่ 6	56

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AZ	=	Abscission zone
GUS	=	β -glucuronidase
JA	=	Jasmonic acid
MJ	=	Methyl jasmonate
NT	=	Non-transformed
OP	=	Overexpressed PPO
PAL	=	Phenylalanine ammonia lyase
PI	=	Proteinase inhibitor
PO	=	Peroxidase
PMSF	=	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVPP	=	Polyvinyl polypyrrolidone
PPO	=	Polyphenol oxidase
ROS	=	Reactive oxygen species
SP	=	Suppressed PPO
SA	=	Salicylic acid
TNB	=	5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid
X-Gluc	=	5-bromo-4-chloro-3-indole- β -D-glucuronide

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายแทบทุกประเทศ ซึ่งประเทศในเขตร้อนจัดให้มะเขือเทศเป็นพืชผัก แต่ประเทศแถบทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา และประเทศในเขตนานาชาติให้มะเขือเทศเป็นผลไม้ ผลสดของมะเขือเทศมีสารจำพวกแคโรทีนอยด์ ได้แก่ ไลโคปีน (lycopene) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) อีกทั้งมีวิตามินเอ และวิตามินซีในปริมาณสูง รวมทั้งมีแร่ธาตุโพแทสเซียม และกรดอะมิโน เช่น กรดกลูตามิก ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย ในประเทศไทย มีการนำมะเขือเทศไปใช้ประโยชน์ในการรับประทานผลสด และปรุงอาหาร ตลอดจนเป็นวัตถุดิบเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น มะเขือเทศบรรจุกระป๋อง ซอสมะเขือเทศ เป็นต้น มะเขือเทศสามารถเจริญเติบโตได้ในดินแทบทุกชนิด ชอบดินร่วนปนทราย อินทรีย์วัตถุมาก ระบายน้ำดี ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของดินในช่วง 6.0-6.8 ความชื้นของดินเหมาะสมและต้องการแสงแดดเต็มที่ตลอดวัน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 21-30 องศาเซลเซียส (ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์, 2551)

ปัญหาที่ทำให้ผลผลิตมะเขือเทศมีคุณภาพต่ำลง มีหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงศัตรู เช่น หนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera*) หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.)) และเพลี้ยแป้ง (*Pseudococcus Jackbeardsleyi*) (นงพร กิจบำรุง และคณะ, 2543; รุจ มรกต และคณะ, มปป; อนงค์นุช ผลวงษ์, 2548) โดยมีรายงานว่า หนอนกระทู้ผักสามารถเข้าทำลายมะเขือเทศในบริเวณยอด ใบ และผล ทำให้ผลผลิตเสียหาย (แสน ตีควัฒนา นนท์, 2520; กองกัญญาและสัตตวิทยา, 2543) ส่วนเพลี้ยแป้งจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากบริเวณกิ่ง ใบ ช่อดอก ผลอ่อน/แก่ ทำให้บริเวณที่ถูกทำลายเหี่ยว ต้นแคระแกร็น เกิดราสีดํา และตายในที่สุด

การป้องกันและกำจัดแมลง เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีในการควบคุมแมลง เช่น โมโนโคร-โทพอส อะซีเฟต ควินัลฟอส ฟอกซิม เมทามิโดฟอส และไดฟูเบนซูรอน (Ramzan et al., 1982) อย่างไรก็ตาม ผลกระทบจากการใช้สารเคมีนอกจากทำลายสุขภาพแล้วยังพบว่า การใช้สารเคมีเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต โดยคิดเป็น 1 ใน 3 ของต้นทุนในการผลิตมะเขือเทศต่อปี (Srinivasan, 2010) จึงมีการเลือกใช้สารสกัดชีวภาพจากธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากสะเดา และสารสกัดจากสาบเสือ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค รวมถึงมีการจัดการแบบผสมผสานเพื่อควบคุมศัตรูพืช (กองกัญญาและสัตตวิทยา, 2543; อนงค์นุช ผลวงษ์, 2548) อย่างไรก็ตาม

วิธีข้างต้นจะต้องใช้ระยะเวลาานาน และใช้สารสกัดปริมาณสูง อีกทั้งขั้นตอนการผลิตสารสกัดอาจทำให้มีต้นทุนสูงใกล้เคียง หรือมากกว่าการใช้สารเคมี จึงไม่เป็นที่แพร่หลายเท่าที่ควร ด้วยเหตุนี้ การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานแมลง โดยทำให้มีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายหรือมีกลไกในการป้องกันและต้านทานต่อแมลงสูงขึ้นและรวดเร็วกว่าเดิม จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่มีประสิทธิภาพในการลดการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช

มะเขือเทศ มีระบบกลไกการต้านทานทางกายภาพและเคมี ที่มีศักยภาพสำหรับการป้องกันและต้านทานการเข้าทำลายของแมลง รวมทั้งการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด โดยกลไกทางกายภาพ ได้แก่ การมีขนใบ (trichome) เพื่อป้องกันตัวเองจากแมลง ส่วนกลไกทางเคมีพบว่า พืชหลายชนิดตอบสนองต่อการเข้าทำลายของแมลงหรือปัจจัยความเครียดอื่น ๆ โดยการชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของสารประกอบปฐมภูมิและทุติยภูมิ (Rickman et al., 2003) เพื่อป้องกันตัวเองและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม เช่น เมื่อเกิดบาดแผลจากแมลงกัดกิน ต้น *Poplar* spp. จะสร้างโปรตีนอินฮิบิเตอร์ (proteinase inhibitor; PI) และเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase; PPO) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Constabel et al., 2000)

PPO เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนสารฟีนอลิก (phenolics) เป็นควิโนน (quinones) ซึ่งควิโนนอาจทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไฟล์ (nucleophiles) ในเซลล์ ได้แก่ โปรตีน กรดนิวคลีอิก ก่อให้เกิดการสร้างซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเรดิคัล (superoxide anion radical; O_2^-) และรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species; ROS) ชนิดอื่น หรือทำปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชัน (polymerization) อย่างรวดเร็วทำให้เกิดเม็ดสีสีน้ำตาล ซึ่งพบในฝักและผลไม้เมื่อเกิดบาดแผล เมื่อถูกโรค/แมลงเข้าทำลาย หรือเกิดการชราภาพ (senescence) PPO พบในพืชชั้นสูงทุกชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ (Constabel et al., 1995) แอปเปิ้ล (Pizzocaro et al., 1993) ถั่ว (Galezzi et al., 1981) และมันฝรั่ง (Vaidya et al., 2006) เป็นต้น โดยพบมากในใบ ราก หัว รากสะสมอาหาร ดอก และผล โดยปกติเอนไซม์ PPO มีการสร้างขึ้นตลอดเวลา และสามารถกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นได้ โดย PPO จะถูกเก็บอยู่ในไทลาคอยด์ (thylakoid) ส่วนสารฟีนอลิก (phenolics) ที่เป็นสารตั้งต้นจะอยู่ในแวคิวโอล (vacuole) แต่เมื่อถูกโรค/แมลงเข้าทำลายหรือเกิดการชราภาพ จะทำให้เซลล์แตก และปลดปล่อยสารฟีนอลิกให้มาทำปฏิกิริยากับออกซิเจนโดย มี PPO เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดการสร้างควิโนนขึ้น (Thipyapong et al., 2007)

PPO gene family ประกอบด้วยยีนสมาชิก 7 สมาชิก ได้แก่ A, A', B, C, D, E และ F ซึ่งมีรูปแบบการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่ต่างกัน โดยมีรายงานว่า PPO B เป็นสมาชิกที่ตอบสนองต่อเอทิลีน ซึ่งเป็นสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายของแมลง และอาจเป็นสัญญาณที่ส่งจากใบที่ถูกทำลายไปยังส่วนต่าง ๆ ของต้นเพื่อเพิ่มระดับ PPO activity (Thipyapong and Steffens, 1997; Newman et al., 2011) นอกจากนี้ โปรโมเตอร์ของยีน PPO B ยังมี ethylene responsive element

เช่นเดียวกับยีน polygalacturonase ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายกรดเพคติกของผนังเซลล์ และยีน 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ในระบบการสังเคราะห์เอทิลีน ดังนั้น PPO B จึงเป็นสมาชิกหนึ่งที่น่าจะมีส่วนร่วมในการต้านทานต่อการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช

อย่างไรก็ตาม แมลงศัตรูของมะเขือเทศนั้น มีความหลากหลายในการเข้าทำลาย เช่น ประเภทปากกัดกิน (chewing type) ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม ประเภทปากดูดกิน (sucking type) ได้แก่ เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยอ่อน ซึ่งอาจทำให้มะเขือเทศมีกลไกการป้องกัน/ต้านทานการเข้าทำลาย และระบบการส่งสัญญาณไปยังบริเวณอื่น ๆ และต้นอื่น ๆ ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีผู้ใดศึกษาการตอบสนองของสมาชิกยีน PPO ต่าง ๆ ต่อการเข้าทำลายของแมลงเหล่านี้ อย่างชัดเจน ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีความสำคัญต่อการพัฒนาสายพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อแมลง งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการตอบสนองของ PPO ต่อการเข้าทำลายของทั้งหนอนกระทู้ผัก และเพลี้ยแป้ง ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่มของแมลงทั้งปากกัดและปากดูด ผลการศึกษาที่ได้อาจนำไปสู่ความเข้าใจถึงกลไกความต้านทานการทำลายของแมลงศัตรูพืชมากขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศหรือพืชชนิดอื่น โดยการใช้ปริมาณ PPO เป็นลักษณะคัดเลือกหรือในอนาคตอาจใช้วิธีพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มระดับ PPO นอกจากนี้ เนื่องจาก PPO มีบทบาทสำคัญในการต้านทานโรคใบจุดของมะเขือเทศ และมีแนวโน้มที่จะให้ความต้านทานต่อโรค และแมลงได้หลายชนิด การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ หรือพืชชนิดอื่นเพื่อเพิ่มระดับ PPO จึงเป็นแนวทางที่สำคัญในการควบคุมศัตรูพืช เพื่อลดต้นทุนการผลิต ลดความเป็นพิษ และลดการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อม

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ในการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของแมลงปากกัด คือ หนอนกระทู้ผัก และแมลงปากดูดคือ เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ โดยการเปรียบเทียบระดับ PPO activity ก่อนและหลังการเข้าทำลาย เพื่อให้เข้าใจบทบาทของ PPO ในการต้านทานแมลงเพิ่มขึ้น

1.2.2 เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F ในการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก และเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 เมื่อดันพืชได้รับความเสียหายจากปัจจัยสิ่งมีชีวิต (biotic) หรือสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic) อาจมีการกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity ซึ่งอาจมีการควบคุมที่ระดับการถอดรหัสพันธุกรรม

(transcription) การแปลรหัสพันธุกรรม (translation) หรือหลังการแปลรหัสพันธุกรรม (post-translation)

1.3.2 ความต้านทานต่อความเครียดจากปัจจัยสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งไม่มีชีวิตที่เกิดจาก PPO มีผลมาจาก PPO ที่มีอยู่เดิม และ/หรือ PPO ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นเมื่อต้นพืชได้รับความเสียหาย

1.3.3 สมาชิกของ PPO gene family บางสมาชิกมีการแสดงออกสูงขึ้น เพื่อตอบสนองต่อการเข้าทำลายของแมลง และอาจมีบทบาทในการต้านทานแมลง

1.3.4 แมลงปากกัดและแมลงปากดูด มีวิธีการเข้าทำลายพืชแตกต่างกันจึงอาจกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ต่างกัน และอาจกระตุ้นการแสดงออกของแต่ละสมาชิกของ PPO gene family ต่างกัน

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ เน้นศึกษาการตอบสนองของ PPO ในมะเขือเทศ เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ซึ่งเป็นแมลงชนิดปากกัดและเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดเลย์ ซึ่งเป็นแมลงชนิดปากดูดโดยศึกษาใน 2 ระดับ คือ 1) ระดับเอนไซม์ โดยประเมินระดับ PPO activity โดยใช้มะเขือเทศพันธุ์ Money Maker 2) ระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้มะเขือเทศพันธุ์ Money Maker ที่ได้รับการตัดแปลงพันธุกรรมด้วยการเชื่อมต่อ PPO promoter A, B, D, E หรือ F และยีนรายงานผล β -glucuronidase (GUS) เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถประเมินบทบาทของ PPO ในต้นมะเขือเทศต่อการต้านทานแมลงชนิดปากกัด และปากดูด โดยเฉพาะในเรื่องกลไกความต้านทานของมะเขือเทศต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้ง ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่นักวิชาการในวงการปรับปรุงพันธุ์พืช พันธุวิศวกรรม และอนุชีววิทยาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

1.5.2 สามารถนำความรู้ที่ได้มาปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ หรือพืชชนิดอื่นให้มีความต้านทานต่อแมลงด้วยวิธีดั้งเดิม หรือวิธีพันธุวิศวกรรม เป็นการให้พืชต้านทานแมลงเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีเพื่อลดความเป็นพิษ และการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อม และลดมูลค่าการนำเข้าที่อาจส่งผลไปถึงการขาดดุลการค้าของประเทศ

1.5.3 ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ อย่างน้อย 1 เรื่อง

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเขือเทศ (tomato) เป็นพืชผักในวงศ์ Solanaceae เป็นพืชล้มลุก มีถิ่นกำเนิดจากประเทศแถบลาตินอเมริกาและอเมริกาใต้ ปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตดีในสภาพอากาศที่แตกต่างจากถิ่นกำเนิดเดิมได้ จึงพบแหล่งปลูกมะเขือเทศอยู่ทั่วโลก แหล่งผลิตใหญ่ได้แก่ อเมริกา อิตาลี สเปน และตุรกี ส่วนในเขตร้อนและกึ่งร้อน ได้แก่ ญี่ปุ่น และออสเตรเลีย แหล่งปลูกมะเขือเทศที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดหนองคาย อุดรธานี เชียงใหม่ ลำปาง เพชรบูรณ์ ขอนแก่น และนครปฐม (ศศิธร วุฒินิชย์, 2549)

2.1 ข้อมูลทั่วไปของมะเขือเทศ

มะเขือเทศเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คิดอันดับ 1 ใน 3 ของพืชสวนทั้งหมด เป็นพืชที่อุดมไปด้วยวิตามิน และสารต้านทานอนุมูลอิสระ (antioxidant) หลากหลายชนิด (Dorais et al., 2001) มีถิ่นกำเนิดมาจากบริเวณแอนเดียน (Andean) ของทวีปอเมริกาใต้ ประกอบด้วยพื้นที่ของประเทศโบลิเวีย ชิลี เอกวาดอร์ โคลัมเบีย และเปรู ต่อมามีการนำไปปลูกในประเทศเม็กซิโก แล้วแพร่หลายไปยังยุโรปในยุคค้นพบโลกใหม่ จากนั้นแพร่กระจายไปยังภูมิภาคส่วนต่าง ๆ ของโลก คือประเทศจีน เอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในศตวรรษที่ 17 และแพร่ไปยังญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกาในศตวรรษที่ 18 ปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตดีในสภาพอากาศที่แตกต่างจากถิ่นกำเนิดเดิมได้ จึงพบแหล่งปลูกมะเขือเทศอยู่ทั่วโลก จากรายงานของ Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) และกรมส่งเสริมการเกษตรพบว่าในช่วง พ.ศ. 2555-2556 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศรวมทั้งสิ้น 34,600 ไร่ ให้ผลผลิต 1.11 แสนตันต่อปี ซึ่งพื้นที่ปลูกมะเขือเทศส่วนใหญ่ (80-90%) ปลูกสำหรับส่งโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ส่วนมากปลูกในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดบึงกาฬ และสกลนคร เป็นต้น ในผลมะเขือเทศอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ โดยเฉพาะวิตามินซีและวิตามินเคสูง อีกทั้งยังมีโพแทสเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก ในปริมาณสูงอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีสารเบต้าแคโรทีน กรดมาลิก กรดซิตริก ซึ่งให้รสเปรี้ยว ทำให้เจริญอาหาร และมีกลูตามิกซึ่งเป็นกรดอะมิโนช่วยเพิ่มรสชาติให้อาหาร สารสำคัญในมะเขือเทศอีกชนิดหนึ่ง คือสารไลโคพีน (Lycopene) เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ที่มีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระ โดยทำให้อนุมูลของเซลล์มีอนุภาคเป็นกลาง ช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์

นอกจากนี้ ยังมีสรรพคุณทางยา ช่วยดับกระหาย บำรุงและกระตุ้นกระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต ทำงานได้ดี ช่วยขับสารพิษและสารตกค้างในร่างกาย เป็นยาระบายอ่อน ๆ ถ้ารับประทานผลสดเป็นประจำ จะช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งในลำไส้ มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งรังไข่ และโรคหัวใจ ช่วยเสริมสร้างกระดูกและป้องกันโรคกระดูกพรุนได้ (เมฆ จันทร์ประยูร, 2548) อีกทั้งยังช่วยลดอาการแสบร้อนผิวหนัง หลังถูกแดดเผา รักษาผิว ทำให้ผิวหนังเต่งตึง อ่อนนุ่มได้อีกด้วย นอกจากนี้ ใบมะเขือเทศยังมีกลิ่นซึ่งเป็นสารไล่แมลงและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคพืชได้อีกด้วย (กระทรวงการคลัง, 2543)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ

2.2.1 ลำต้น ตั้งตรง มีลักษณะเป็นไม้พุ่มเตี้ยกิ่งเลื้อย ความสูง 50-150 เซนติเมตร (ชม.) แตกกิ่งก้านมาก ลำต้นสีเขียว มีขนนุ่มปกคลุม และมีเมือกเหนียวมือ

2.2.2 ใบ เป็นใบประกอบ ออกสลับกัน ใบย่อยมีขนาดไม่เท่ากัน ปลายใบแหลม ขอบใบเป็นหยักลึกมีขนอ่อน ๆ บริเวณซอกใบ ก้านใบยาว 3-5 ซม. มีใบย่อย 5-9 ซม. ใบย่อยรูปสามเหลี่ยม ขอบใบจัก แผ่นใบขรุขระเล็กน้อย มีขนนุ่มปกคลุม สีเขียวเข้ม ขนาดใบย่อยกว้าง 2-4 ซม. ยาว 3-6 ซม.

2.2.3 ดอก มีลักษณะเป็นช่อบนลำต้นระหว่างข้อ มีกลีบเลี้ยงสีเขียว 5-10 กลีบ กลีบดอกสีเหลือง 5 กลีบ รูปร่างคล้ายดอกเชื่อมติดกันที่โคน เมื่อดอกบาน กลีบเลี้ยงและกลีบดอกจะโค้งออก กลีบเลี้ยงตอนแรกจะสั้นกว่า กลีบดอกแต่จะมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อผลแก่มีเกสรตัวผู้ 5 อัน ประกอบด้วยอับเรณูใหญ่และก้านอับละอองเรณูสั้นอยู่รองเกสรตัวเมีย

2.2.4 ผล เป็นผลเดี่ยว รูปทรงของผลมีตั้งแต่กลมจนถึงรี มีขนาดรูปร่างและสีต่างกัน ซึ่งมีขนาดเล็กประมาณ 3 ซม. จนถึงใหญ่ประมาณ 10 ซม. รูปร่างมีทั้งกลม กลมแบนหรือกลมรี ผิวเป็นมัน สีของผลจะขึ้นอยู่กับเมดิสี 2 ชนิด คือ ไลโคพีน ซึ่งทำให้เกิดสีแดงและแคโรทีน (carotene) ทำให้เกิดสีเหลืองแดง ส้ม และสีน้ำตาลอ่อน เนื้อภายในลำด้วยน้ำมีรสเปรี้ยว ภายในมีเมล็ดเรียงตัวเป็นช่อง ๆ และมีเมือกวันห่อหุ้มเมล็ด (อร่าม คู่ทรัพย์, 2543)

2.2.5 เมล็ด รูปร่างค่อนข้างกลมแบน สีน้ำตาลอ่อน ขนาด 0.2-0.5 ซม. มีขนสั้น ๆ ปกคลุมอยู่ที่เปลือกหุ้มเมล็ด (กิตติ บุญเลิศนิรันดร์, 2550)

2.2.6 ราก มะเขือเทศมีระบบรากเป็นแบบรากแก้ว มีรากแขนงเจริญไปตามแนวอนาไกลได้ถึง 60 ซม. และสามารถเจริญในแนวตั้งได้ลึกประมาณ 100-120 ซม. อีกทั้งยังสามารถเกิดรากแขนงได้ทั่วไปตามลำต้นที่สัมผัสกับผิวดิน ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของมะเขือเทศ (กิตติ บุญเลิศนิรันดร์, 2550)

2.3 สภาพแวดล้อม การปลูกและการดูแลรักษามะเขือเทศ

2.3.1 สภาพภูมิอากาศที่เหมาะสม

มะเขือเทศสามารถเจริญเติบโตทางด้านลำต้น ใบ และออกดอกได้ดีตลอดทั้งปี แต่การติดผลของมะเขือเทศต้องการสภาพอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิกลางวันที่เหมาะสมอยู่ที่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิกลางคืนประมาณ 16-20 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิกลางคืนสูงกว่า 22 องศาเซลเซียส จะทำให้มะเขือเทศไม่ติดผลหรือติดผลได้น้อยมาก ปริมาณฝนและความชื้นสูงเป็นสาเหตุสำคัญทำให้โรคทางใบและทางระบบรากกระบาดรุนแรง ดังนั้นฤดูปลูกที่เหมาะสมที่สุดจึงอยู่ในช่วงฤดูหนาว ทำให้ได้ผลผลิตสูง มีศัตรูพืชรบกวนน้อย ต้นทุนการผลิตจึงต่ำ แต่ถ้าต้องการปลูกมะเขือเทศในฤดูฝนควรปลูกบนพื้นที่สูงและมีการระบายน้ำดีเป็นพิเศษ (ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์, 2551)

2.3.2 สภาพดินที่เหมาะสมและการเตรียมดิน

ดินที่เหมาะสมในการปลูกมะเขือเทศมากที่สุดควรเป็นดินร่วน มีอินทรีย์วัตถุสูงและมีการระบายน้ำดี ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 6.5-6.8 ถ้าดินเป็นกรดหรือด่างมากเกินไป จะทำให้ดินขาดธาตุอาหารบางอย่างได้ หรือธาตุอาหารบางชนิดละลายออกมามากเกินไป จนพืชต่อต้านพืช การปลูกมะเขือเทศโดยทั่วไป ไม่ควรปลูกซ้ำที่เดิมหรือในพื้นที่ปลูกพืชในตระกูลเดียวกันกับมะเขือเทศมาก่อน เช่น พริก มะเขือ และยาสูบ เป็นต้น เพราะอาจมีเชื้อโรคต่าง ๆ สะสมอยู่ในดิน ซึ่งทำให้มะเขือเทศเป็นโรคได้ง่าย ดินต้องมีการระบายน้ำดี กำจัดวัชพืชให้หมด เพราะวัชพืชนอกจากจะแย่งน้ำ อาหาร และแสงแดดและยังเป็นที่อยู่อาศัย เพาะพันธุ์ของเชื้อโรคและแมลงได้เป็นอย่างดี ดังนั้น ถ้าหากมีการเตรียมดินให้ดีตั้งแต่เริ่มแรก จะป้องกันการรอกของวัชพืชไปได้ยาวนาน ควรเตรียมดินให้ลึก 30-40 ซม. ถ้าใช้รถไถควรไถ 2-3 ครั้ง โดยไถกลบดินไปมาและตากดินให้แห้ง 3-4 สัปดาห์ แล้วย่อยดินให้ละเอียดพอควร เพราะมะเขือเทศต้องการสภาพดินที่มีการระบายน้ำและถ่ายเทอากาศได้ดี ถ้าหากดินเป็นกรดให้ใช้ปูนขาวหว่านในอัตรา 100-300 กิโลกรัมต่อไร่ ควรใส่ปูนขาวก่อนปลูก 2-3 สัปดาห์ โดยใช้ปูนขาวหว่านและคลุกเคล้ากับดิน หรืออาจจะหว่านก่อนการเตรียมดินครั้งสุดท้าย (ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์, 2551)

2.3.3 วิธีการปลูก

แปลงปลูกควรไถพรวนแล้วยกแปลงให้สูงประมาณ 30 ซม. ระยะปลูก ระหว่างต้น 40 ซม. ระยะห่างระหว่างแถว 70 ซม. การปลูกทำได้ 2 วิธี

2.3.3.1 เพาะกล้าแล้วย้ายปลูก ใช้เมล็ดประมาณ 30-40 กรัม หยอดลงบนแปลงยาว 10 ม. กว้าง 1 ม. การหยอดเมล็ด ควรหยอดเป็นแถวห่างกันประมาณ 10 ซม. ลึกไม่เกิน 1 ซม. เมื่อหยอดเมล็ดแล้วกลบด้วยดินผสมปุ๋ยหมัก และคลุมแปลงด้วยฟางข้าว หรือหญ้าแห้งบาง ๆ ในช่วง 3 วันแรก ให้รดน้ำสม่ำเสมออย่าให้ผิวหน้าดินแห้ง และถ้าแดดจัดหรือฝนตกหนักต้องคลุมแปลงด้วยผ้าไนลอนหรือผ้าพลาสติก เพื่อป้องกันเมล็ดผ่นกระแทกลำต้นหรือใบเป็นรอยช้ำ ซึ่งเป็นสาเหตุของ

การเกิดโรคต่าง ๆ ได้ง่าย โรคที่สำคัญในแปลงกล้า คือ โรคโคนเน่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อฝนตกติดต่อกัน ความชื้นในอากาศและที่ผิวดินสูงสามารถป้องกันโดยนำเศษฟางหรือหญ้าที่ใช้คลุมแปลงออกให้หมด เพื่อให้แปลงกล้าโปร่งและระบายอากาศดี แล้วฉีดพ่นด้วยยากันรา ในช่วงที่กล้า มะเขือเทศอายุประมาณ 17-22 วัน ควรลดปริมาณน้ำที่ให้น้ำ และให้กล้าได้รับแสงแดดอย่างเต็มที่ ต้นกล้าจะแข็งแรง เหนียว ไม่อวบฉ่ำน้ำ ซึ่งมีผลให้กล้ารอดตายมาก หลังจากย้ายกล้า โดยทั่วไปการย้ายกล้าลงแปลงปลูกมักจะใช้กล้าอายุประมาณ 5-25 วัน หลังจากหยอดเมล็ดหรือเมื่อกล้ามีใบจริง 3-4 ใบ

2.3.3.2 หยอดเมล็ดลงแปลงปลูกโดยตรง ใช้ในกรณีที่สามารถให้น้ำได้ง่าย แต่จะเสียเวลาและแรงงาน ในการดูแลรักษามากกว่า อีกทั้งต้องใช้เมล็ดพันธุ์มากขึ้นเป็น 80-100 กรัมต่อไร่ ระยะปลูกที่เหมาะสม ระยะระหว่างแถว 1 ม. ระยะระหว่างต้น 25-50 ซม. ปลูก 1 ต้นต่อหลุม ถ้าใช้ระยะปลูกแคบจะได้ผลผลิตต่อพื้นที่มากขึ้น แต่การควบคุมโรคและการปฏิบัติงานอื่น จะยุ่งยากขึ้นด้วย ในฤดูแล้งควรปลูกถี่ ส่วนในฤดูฝนควรใช้ระยะปลูกห่าง เนื่องจากมะเขือเทศเจริญเติบโตดี มีทรงพุ่มสูงใหญ่กว่าฤดูอื่น ๆ

2.3.4 วิธีการดูแลรักษา

2.3.4.1 การให้น้ำ มะเขือเทศต้องการน้ำสม่ำเสมอตั้งแต่เริ่มปลูกไปจนถึงผลเริ่มแก่ ระยะที่มะเขือเทศต้องการน้ำมาก คือ ช่วงแรกของการเติบโตและช่วงที่ผลกำลังขยายขนาด หรือประมาณ 35-50 วัน หลังจากย้ายกล้า สำหรับช่วงที่กำลังติดผล หรือประมาณ 20-35 วัน ไม่ต้องการน้ำมาก เพราะอาจทำให้ผลแตก แต่ต้องพรวนดิน เพื่อให้รากเจริญเติบโตลงไปได้ลึก และรากกระจายทางด้านข้างได้ดี

2.3.4.2 การใส่ปุ๋ยช่วงแรกของการเจริญเติบโต ควรใส่ปุ๋ยยูเรีย อัตรา 50-100 กิโลกรัมต่อไร่ หลังจากที่ย้ายปลูก 15-20 วัน ใส่ปุ๋ย 15-15-15 อัตรา 50-70 กิโลกรัมต่อไร่ โดยโรยข้างต้นและพรวนดินกลบ เมื่ออายุได้ 35-40 วัน หลังย้ายปลูก ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 หรือ 13-13-21 ประมาณ 50 กิโลกรัมต่อไร่

2.3.4.3 การคลุมแปลงปลูก ควรคลุมด้วยฟางหรือหญ้าแห้ง เพื่อรักษาความชื้นของดินและเป็นการป้องกันการชะล้างผิวดินเมื่อฝนตก หรือให้น้ำ นอกจากนี้ ยังช่วยลดเปอร์เซ็นต์ผลเน่าและการระบาดของโรคทางใบ ซึ่งช่วยให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 20-40% แต่ฟางมักจะมีเชื้อราสเคอโรเตียมติดมาด้วย ทำให้เกิดโรคเหี่ยวต้นแห้งตายไป การคลุมฟางจึงควรคลุมให้ห่างโคนต้น เพื่อไม่ให้โคนต้นมีความชื้นสูงเกินไป

2.3.4.4 การพรวนดินกลบโคนต้น เมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้แล้วควรพรวนดินกลบโคนต้น โดยเปิดเป็นร่องระหว่างแถว เพื่อให้การให้น้ำทำได้สะดวก น้ำไม่ขัง และทำให้รากมะเขือเทศเกิดมากขึ้น ซึ่งทำให้ต้นแข็งแรงมากขึ้น และการพรวนดินกลบโคนก็เป็นการทำวัชพืชไปในตัว

ด้วย หลังจากพรวนดินกลบ โคนครั้งแรกแล้ว หลังจากนั้นอีก 1 เดือน ให้ทำการกลบ โคนอีกครั้ง หนึ่ง (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์, 2538; อร่าม คุ่มทรัพย์, 2543; เมฆ จันทร์ประยูร, 2548)

2.4 พันธุ์มะเขือเทศ

สามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

2.4.1 พันธุ์สำหรับปลูกขายตลาดสด มีพันธุ์ผลโตและพันธุ์ผลเล็ก พันธุ์ผลโตจะนิยมใช้ทำ สลัดและระดับจานอาหาร ซึ่งมีทรงผลกลมแบบแอปเปิ้ล ผลอ่อนมีสีผลเขียว มีไหลเขียว เมื่อสุกแก่ จะมีสีแดงจัด ติดผลดก แตกแขนงมาก จำนวนผลต่อช่อมาก รสชาติดี เนื้อหนาและแข็ง เปลือกไม่ เหนียว พันธุ์ที่ใช้รับประทานสดมีหลายพันธุ์ด้วยกัน เช่น พันธุ์สีดา พันธุ์สีดา มก. พันธุ์สีดาห่างฉัตร พันธุ์เอสวีอาร์ดีซี-4 และพันธุ์แอล 22 เป็นต้น

2.4.2 พันธุ์สำหรับส่งโรงงานอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่สุกแก่พร้อมกัน ผิวมัน เนื้อ หนาและแน่น ใสไม่กลวง น้ำหนักดี ผลสุกมีสีแดงจัดทั่วทั้งผล เนื้อมาก น้ำน้อย มีปริมาณกรดสูง เปลือกหนา โคนฝนเปลือกไม่แตก สามารถขนส่งได้ในระยะทางไกล ๆ และเก็บไว้ได้นานโดยไม่ เน่าเสีย เช่น พันธุ์ มข.0-2 พันธุ์คิงคอง และพันธุ์ชานมาซาโน × คาลเจ เป็นต้น (เมฆ จันทร์ประยูร, 2548)

2.5 โรคของมะเขือเทศ

มะเขือเทศ มีหลากหลายโรคซึ่งสาเหตุเกิดจากทั้งเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และการ ขาดธาตุอาหาร ซึ่งโรคที่สำคัญ ได้แก่

2.5.1 โรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

2.5.2 โรคเหี่ยวเหลือง (fusarium wilt) เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

2.5.3 โรคใบจุดวง (early blight) เกิดจากเชื้อรา *Alternaria solani*

2.5.4 โรคเหี่ยวจากเชื้อรา (southern blight) เกิดจากเชื้อรา *Sclectium rolfsii*

2.5.5 โรคครากำมะหยี่ (leaf mold) เกิดจากเชื้อรา *Cladosporium fulvum*

2.5.6 โรคใบไหม้ (late blight) เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora infestans*

2.5.7 โรคใบเหลืองปื้น (cercospora leaf mold) เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena*

2.5.8 โรคราเขม่า (grey leaf mold) เกิดจากเชื้อรา *Cercospora fuligena*

2.5.9 โรคราแป้ง (powdery mildew) เกิดจากเชื้อรา *Oidiopsis sp.*

2.5.10 โรคใบด่างเรียวเล็ก (cucumber mosaic virus) เกิดจากเชื้อไวรัส

2.5.11 โรคใบหงิกเหลือง (tomato yellow leaf curl) เกิดจากเชื้อไวรัส

2.5.12 โรคขาดธาตุอาหาร ได้แก่ โรคกันเน่า เกิดจากการขาดธาตุโบรอน โรคแผลแตกจากการขาดธาตุแคลเซียม โรคไส้ดำจากการขาดธาตุแคลเซียมและโบรอน โรคยอดม่วงจากการขาดธาตุฟอสฟอรัส (อนงค์ จันทรศรีกุล, 2536; สักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537; ศศิธร วุฒิพาณิชย์, 2549; พิสุทธิ เอกอำนาจ, 2550)

2.6 แมลงศัตรูของมะเขือเทศ

แมลงมีประมาณ 6,000,000 ชนิด โดย 50% ของแมลงทั้งหมดนั้นดำรงชีวิตด้วยการกินพืชเป็นอาหารหลัก (Chapman, 2006) แมลงศัตรูพืชจึงจัดเป็นปัญหาสำคัญของการเกษตร เนื่องจากสามารถลดปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ซึ่งแมลงศัตรูพืชที่สามารถทำความเสียหายแก่มะเขือเทศนั้น ส่วนใหญ่มีลักษณะการเข้าทำลายในบริเวณต่าง ๆ ของพืชที่แตกต่างกัน แต่ในที่นี่จะขอแบ่งชนิดของแมลงศัตรูมะเขือเทศออกตามลักษณะของการเข้าทำลายออกเป็น 3 ประเภทดังนี้

2.6.1 แมลงจำพวกกัดกินใบ/ยอดอ่อน/ผล ได้แก่ หนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton ballworm; *Heliothis armigera*) หนอนกระทู้หอม (beet armyworm; *Spodoptera exigua*) หนอนกระทู้ผัก (common cutworm; *Spodoptera litura*) แมลงพวกนี้ มีปากแบบกัดกิน (chewing type) สามารถกัดกินใบ ยอดอ่อน และผลทั้งหมด หรือกัดกินเฉพาะตัวใบแล้วเหลือเส้นใบไว้ ทำให้พืชขาดส่วนสังเคราะห์แสง ขาดที่สะสมอาหาร และขาดยอดอ่อนสำหรับการเจริญเติบโตต่อไป และเข้าเจาะผลเป็นรูทำให้ผลไม่มีคุณภาพ (Sharma, 2005) นอกจากนี้ หนอนชนิดนี้ยังสามารถเข้าทำลายในพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น ฝ้าย กะหล่ำปลี คื่นช่าย เป็นต้น (Sharma et al., 2005)

2.6.2 แมลงจำพวกดูดกินน้ำเลี้ยง ได้แก่ แมลงหวี่ขาวยาสูบ (tobacco whitefly; *Bemisia tabaci*) เพลี้ยอ่อน (aphid; *Myzus persicae*) เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียร์ดส์เลย์ (Jack Beardsley mealybug; *Pseudococcus jackbeardaleyi*) และมวนเขียวขี้ขาว (Green sting bug; *Nezara viridula*) แมลงจำพวกนี้ มีปากแบบดูด (sucking type) สามารถแทงและดูดน้ำเลี้ยงจากใบ ยอดอ่อน กิ่ง ลำต้น ดอก หรือผล ทำให้ส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ถูกดูดกินน้ำเลี้ยงมีรอยไหม้ ใบม้วนเหี่ยว ไม่เจริญเติบโต หรือแคระแกร็น นอกจากนี้ แมลงจำพวกนี้ยังเป็นสาเหตุสำคัญของการถ่ายทอด และแพร่กระจายโรคพืชที่มีเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุอีกด้วย (นุชนารถ จงเลขา, 2546 และ Padgham et al., 1990)

2.6.3 แมลงจำพวกดูดกินของเหลวที่ออกมาจากรอยชำ เช่น ปากของเพลี้ยไฟ (thrips) เป็นแมลงประเภทปากแบบเขี่ยดูด (rasping-sucking type) แมลงประเภทนี้ กินอาหารโดยใช้ส่วนของปากเขี่ยเนื้อเยื่อของพืชให้ชำก่อน แล้วจึงดูดกินของเหลวที่ออกมาจากรอยชำ โดยปากของแมลงประเภทนี้ มีลักษณะเป็นท่อสั้นรูปกรวย (conical beak) ประกอบด้วย mandible ซึ่งมีข้างซ้ายเพียงข้างเดียว มีลักษณะยาวและแหลมคม ส่วน labrum, labium และ hypopharynx จะยาวเป็นเข็มยึดหูดได้ เพลี้ยไฟ สามารถเข้าทำลายบนใบ ดอก และผลของมะเขือเทศ ทำให้มีอาการหงิกงอ เป็นคลื่น มี

สีขาวซีด หรือถ้ามีการทำลายรุนแรงจะเป็นรอยด่างสีน้ำตาลถึงดำ ใบเหี่ยวแห้ง ดอกไม่สมบูรณ์และตายในที่สุด (อินทวัฒน์ บุรีคำ, 2530 และ ทศนีย์ แจ่มจรรยา, 2533)

2.7 หนอนกระทู้ผัก (common cutworm)

หนอนกระทู้ผักจัดเป็นแมลงปากกัด อยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Noctuidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spodoptera litura*

2.7.1 รูปร่างและลักษณะชีวประวัติ ตัวเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง เมื่อกางปีกออกวัดจากขอบปีกหนึ่งไปอีกขอบปีกหนึ่งยาว 3.0 ซม. และจากหัวถึงปลายท้องยาว 1.5 ซม. เมื่อเกาะนิ่งอยู่กับที่จะหุบปีกเป็นรูปหลังคา ลำตัวสีน้ำตาลมีขนปกคลุมทั้งตัว มีมากบริเวณส่วนอก ด้านบนปีกคู่แรกสีน้ำตาลปนดำมีลวดลายสีน้ำตาลอ่อนสลับกับสีน้ำตาลไหม้ ปีกคู่ที่ 2 สีขาวบาง ที่ขอบปีกมีเส้นสีน้ำตาล ระยะตัวเต็มวัย 7-10 วัน เมื่อโตเต็มที่และได้รับการผสมพันธุ์แล้วจะวางไข่เป็นกลุ่มตามใบมะเขือเทศ สามารถวางไข่ได้ 1,775-3,230 ฟองต่อครั้ง กลุ่มไข่มีขนสีน้ำตาลปกคลุมไข่มีสีขาวนวลและค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและดำเมื่อใกล้ฟักออกเป็นตัวหนอน ระยะไข่ 3-7 วัน หลังจากนั้นหนอนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ มีขนาดเล็กสีเขียวอ่อน หัวดำตัวใสและอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกินอาหารใกล้ ๆ กัน เมื่อโตขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวและน้ำตาลอ่อน มีลายสีดำหรือน้ำตาลไหม้คาดตามขวางบนสันหลัง ลำตัวอ้วนป้อม มีจุดสีดำใหญ่บริเวณปล้องที่ 3 และบนส่วนท้องปล้องที่ 7-8 หัวมีสีดำกว่าลำตัว หนอนโตเต็มที่ยาว 3.5-4.0 ซม. ส่วนมากจะออกหากินเวลากลางคืน และซ่อนตัวตามซอกใบหรือใต้ดินในเวลากลางวัน หนอนลอกคราบ 4 ครั้ง ระยะหนอน 14-21 วัน คัดแต่หนอนที่โตเต็มที่ที่จะเข้าคักแด้ในดินตามรอยแตกกระแหง หรือกองเศษพืชลึกลงประมาณ 1-5 ซม. ขนาดคักแด้ 1.2-1.5 ซม. มีสีน้ำตาลดำ ระยะคักแด้ 7-12 วัน จึงสามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว และแพร่ระบาดอย่างกว้างขวาง (แสน ตึกวัฒนานนท์, 2520; กองกัญและสัตววิทยา, 2543)

2.7.2 พืชอาหาร หนอนกระทู้ผักมีพืชอาหารที่เป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจเกือบทุกชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วพุ่ม ถั่วมะแฮะ ปอเทือง ทานตะวัน ละหุ่ง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ฝ้าย ยาสูบ องุ่น ส้ม สตรอเบอร์รี่ กุหลาบ มันเทศ มะเขือ มะเขือเทศ ผักกาด คะน้า และกะหล่ำปลี เป็นต้น

2.7.3 ลักษณะการทำลาย หนอนชนิดนี้ทำลายมะเขือเทศโดยการกัดกินส่วนต่าง ๆ ของมะเขือเทศ เช่น ใบ ดอก และผล ตัวเต็มวัยชอบวางไข่อยู่บริเวณใต้ใบ เมื่อหนอนฟักตัวจะกัดกินใบดังกล่าว และลุกลามไปยังใบอื่น ๆ ของต้น ถ้าเป็นผลอ่อนหนอนจะเข้าเจาะไปใกล้กับรูของขั้วผลแล้วจึงเข้ากัดกินในเนื้อผล ทำให้ผลผลิตไม่มีคุณภาพ

2.7.4 ศัตรูธรรมชาติ ศัตรูธรรมชาติที่สำคัญที่พบทำลายหนอนกระทู้ผัก ได้แก่ แตนเบียนหนอน (*Microplitis maculipennis*) และมวนพิฆาต (*Eocanthecona furcellata*)

2.7.5 วิธีป้องกันกำจัด สารเคมีฆ่าแมลงซึ่งมีทั้งกลุ่มที่ออกฤทธิ์รุนแรง เช่น โมโนโครโตฟอส อะซิเฟต ควินัลฟอส ฟอกซิม เมทามิโดฟอส และไดฟูเบนซูรอน (Ramzan et al., 1982) เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้ สร้างปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันจึงมีการใช้สารชีวภัณฑ์แทนการใช้สารเคมี เช่น ไวรัส NPV แบคทีเรีย (*Bacillus thuringiensis*) และไส้เดือนฝอย (*Steinernema carpocapsae*) รวมทั้งสารสกัดจากสะเดา เป็นต้น (กองกัญและสัตววิทยา, 2543)

2.8 เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ (Jack Beardsley mealybug)

เพลี้ยแป้ง เป็นแมลงปากดูดจัดอยู่ในวงศ์ Pseudococcidae อันดับ Homoptera มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pseudococcus jackbeardsleyi*

2.8.1 รูปร่างและลักษณะชีวประวัติ เพลี้ยแป้งตัวเต็มวัยเพศเมีย มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 3.5-4 มม. ลักษณะลำตัวค่อนข้างแบน ผงลำตัวมีสีเทา มีหงสีขาวปกคลุมลำตัว ด้านข้างลำตัวมีเส้นแป้งเรียงกันประมาณ 17 เส้น เส้นแป้งด้านข้างลำตัวยาว 1 ส่วน 4 ของความกว้างลำตัว เส้นแป้งที่ปลายส่วนท้องยาวประมาณเท่ากับความกว้างของลำตัว ตัวเมียวางไข่บนผล กิ่ง และใบ สามารถวางไข่ได้ 300-500 ฟอง หลังจากนั้น 14 วัน ไข่จะฟักอยู่ในถุงใต้ท้องตัวเมีย ประมาณ 7-10 วันจึงจะออกเป็นตัวอ่อน ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ มีสีเหลืองและไม่มีหงสีขาว ตัวอ่อนจะคลานออกจากกลุ่มไข่ และหาที่เหมาะสมอาศัย ซึ่งตัวเมียจะมีการลอกคราบ 3 ครั้งไม่มีปีก และวางไข่หลังการลอกคราบ ส่วนตัวผู้จะลอกคราบ 4 ครั้ง มีปีกและขนาดเล็กกว่าตัวเมีย ในเวลา 1 ปี เพลี้ยแป้งสามารถขยายพันธุ์ได้ 2-3 รุ่น ในขณะที่อาหารขาดแคลนหรือไม่มีพืชอาหารหลัก เพลี้ยแป้งจะอาศัยอยู่ใต้ดินตามรากพืช เช่น รากหญ้าแห้วหมู โดยมีมดเป็นพาหะและกินสิ่งขับถ่ายของเพลี้ยแป้ง

2.8.2 พืชอาหาร พืชอาหารของเพลี้ยแป้งมักเป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจเกือบทุกชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วฝักยาว ทานตะวัน ละหุ่ง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ฝ้าย ยาสูบ องุ่น ส้ม กุหลาบ มันเทศ มะเขือ มะเขือเทศ พริก ผักกาด และกระน้ำ เป็นต้น

2.8.3 ลักษณะการเข้าทำลาย เพลี้ยแป้งจะดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณยอด ตา ใบ และ โคนใบ ทำให้ใบมะเขือเทศแคะแกระ็น หงิก กลายเป็นปม และเกิดราสีดำ การที่เพลี้ยแป้งทำให้ใบมีลักษณะหุดและหงิกงอนั้นเพื่อหลบศัตรูธรรมชาติ เช่น ค้างคาวทำลาย การเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศลดลงอย่างเห็นได้ชัด

2.8.4 ศัตรูธรรมชาติ ศัตรูธรรมชาติที่สำคัญที่ทำลายเพลี้ยแป้งชนิดนี้ ได้แก่ ค้างคาวลายหยัก (*Menochilus sexmaculatus*) ค้างคาวลายสมอ (*Coccinella transversalis*) ค้างคาวสีส้ม (*Micraspis discolor*) ค้างคาวลายจุด (*Harmonia octomaculata*) ค้างคาวบวมยเดส (*Stethorus* sp.) ค้างคาวเนฟัส (*Nephus ryuguss*) ค้างคาวสเตโธรัส (*Stethorus* sp.) ค้างคาวคลิฟโตลิมีส (*Cryptolaemus* sp.) แมลงช้างปีกใส (*Plesiochrysa ramburi*) และผีเสื้อลิง (*Spalgis epius*) (รจ มรกต และคณะ, มปป)

2.8.5 วิธีป้องกันกำจัด ใช้สารเคมี เช่น คาร์บาริล ไทอะมีโทแซม ไดโนทีฟูแรน โปรไทโอ-ฟอส และฟิริมิฟอสเมทิล นอกจากนี้ยังมีการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากสะเดา และสารสกัดจากสบงเสือ (กองกัญและสัตววิทยา, 2543)

2.9 กลไกการต้านทานแมลง (insect resistance mechanisms)

จากปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและแมลง (interactions between insects and host plants) พบว่า ขณะที่แมลงศัตรูพืชเข้าทำลายพืชชนิดต่าง ๆ นั้น พืชจะมีกระบวนการตอบสนองเพื่อปรับตัวให้เหมาะสมในการอยู่รอด สาเหตุที่พืชสามารถต้านทานแมลงได้นั้น อาจเกิดจากพืชมีสายพันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานการเข้าทำลายของแมลงได้เอง อันเนื่องมาจากพันธุกรรมของต้นพืชนั้น ๆ (genetic resistance) (Painter, 1968) โดยแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ คือ

2.9.1 ความไม่ชอบของแมลง (antixenosis) เป็นความต้านทานที่เกิดจากการแสดงออกของกลุ่มพืช และการตอบสนองของแมลง ซึ่งมีผลทำให้แมลงไม่ชอบ เช่น ไม่ชอบวางไข่ และ/หรือไม่ชอบอาศัยบนพืชชนิดนั้นเพื่อการเจริญเติบโตหรือสืบพันธุ์ สาเหตุที่แมลงไม่ชอบอาจเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ธาตุอาหารและชีวเคมีในพืชอาศัย เช่น ข้าวสาลีพันธุ์ CI 8591 มีความต้านทานต่อตัวอ่อนของด้วงกินธัญพืช (cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*)) เนื่องจากใบข้าวสาลีมีขนยาวและหนาแน่น ทำให้ *O. melanopus* เกิดความสับสน และขนที่ยาวนี้ ก็ยังไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของตัวหนอนมากกว่าข้าวสาลีพันธุ์อื่น ๆ ที่มีขนสั้น นอกจากนี้ สีของพืชก็เป็นอีกลักษณะหนึ่งที่ทำให้แมลงไม่ชอบ เช่น ฝ้ายพันธุ์ดอกสีแดงมีการเข้าทำลายของหนอนเจาะสมอฝ้ายน้อยกว่าพันธุ์ที่มีดอกสีขาว อายุของพืชก็มีส่วนสำคัญในการต้านทานแมลง โดยต้นฝ้ายที่มีอายุแก่จะถูกหนอนเจาะสมอฝ้ายเข้าทำลายได้น้อยกว่าต้นฝ้ายที่มีอายุน้อย เป็นต้น (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และวัชรินทร์ ชื่นสุวรรณ, 2543; นพพร สายัมพล, 2543; Schillinger, 1969)

2.9.2 การสร้างสารต้านทาน (antibiosis) เป็นความต้านทานที่เกิดจากกลุ่มพืชโดยตรงต่อวงจรชีวิตของแมลง เมื่อแมลงกินพืชชนิดนั้นเป็นอาหาร พืชสามารถตอบสนองโดยการอยู่รอด มีพัฒนาการ และสามารถสืบพันธุ์เพื่อดำรงเผ่าพันธุ์ได้ ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อแมลงดังนี้ 1) ทำให้อัตรการตายเพิ่มขึ้น 2) การเจริญเติบโตและการพัฒนาของแมลงลดลง ส่งผลทำให้แมลงมีขนาดเล็ก น้ำหนักลดลง และประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ลดลง 3) วงจรชีวิตผิดปกติ เข้าดักแต่เร็วขึ้น แต่เป็นดักแต่ที่ไม่สมบูรณ์ จึงทำให้ประชากรแมลงลดลง 4) สารอาหารในพืชลดลง ทำให้แมลงมีชีวิตรอดน้อยลง และ 5) มีลักษณะทางสรีรวิทยาผิดปกติทำให้มีพฤติกรรมที่เปลี่ยนไป (กฤษณา สัมพันธ์รักษ์, 2528; Horber, 1980)

2.9.3 ความทนทาน (tolerance) เป็นความต้านทานที่เกิดจากศักยภาพของพืช ที่สามารถเจริญเติบโต ขยายพันธุ์ เพิ่มผลผลิต และสามารถซ่อมแซมส่วนที่เสียหายได้ แม้ว่าจะมีความรุนแรง และมีจำนวนแมลงมากพอที่จะทำความเสียหายให้กับพืช อีกทั้งยังไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเพิ่มจำนวนประชากรของแมลง ลักษณะการทนทานนี้ ส่วนใหญ่จะเป็นแหล่งสะสมของแมลง จึงไม่เป็นที่ต้องการมากเท่าลักษณะต้านทาน (Panda and Khush, 1995; Pathak, 1977; ปริญญา ชินโนรส, 2530)

เมื่อพิจารณาถึงกลไกการต้านทานเมื่อแมลงเข้าทำลายพืช โดยกระบวนการป้องกันตัวเอง และตอบสนองต่อแมลงของต้นพืช อาจเกิดขึ้นในสองลักษณะร่วมกันคือ ลักษณะกลไกทางกายภาพ และลักษณะกลไกทางเคมี

กลไกทางกายภาพ เป็นกลไกที่พืชผลิตขึ้นซึ่งเป็นลักษณะที่มองเห็นได้ชัดเจน เพื่อป้องกันอันตรายจากแมลง เช่น การที่พืชมีเนื้อเยื่อพวกลิกนิน ใบ หนาม ขน และสารเมือก ซึ่งพืชขับออกมาเพื่อป้องกันไม่ให้แมลงศัตรูเข้ามาถึงเนื้อเยื่อ ส่งผลทำให้แมลงไม่ชอบกิน เช่น การสร้างลำต้นให้มีความแข็งแรงมากขึ้นพบในข้าวสาลีเพื่อป้องกันหนอนเจาะลำต้น (Wallace et al., 1973 อ้างโดย Norris and Kogan, 1980) ในขณะเดียวกันการสร้างไข (wax) ของต้นคาโนล่าเพื่อต้านทานหนอน *Helicoverpa armigera* (Shelomi et al., 2010) อีกทั้งยังพบการสร้างขนใบ/ลำต้น (glandular trichome) เพื่อดักจับแมลง (Tingey and Sinden, 1982; Stephen and Walter, 1991) ส่วนในมะเขือเทศ พบว่ามีการพัฒนาลักษณะทางกายภาพให้ดักจับแมลงศัตรูพืชได้ เช่น การพัฒนาของขนใบ/ลำต้น (Luckwills, 1943; Simmons et al., 2004; Kang et al., 2010; McDowell et al., 2011; Tian et al., 2012)

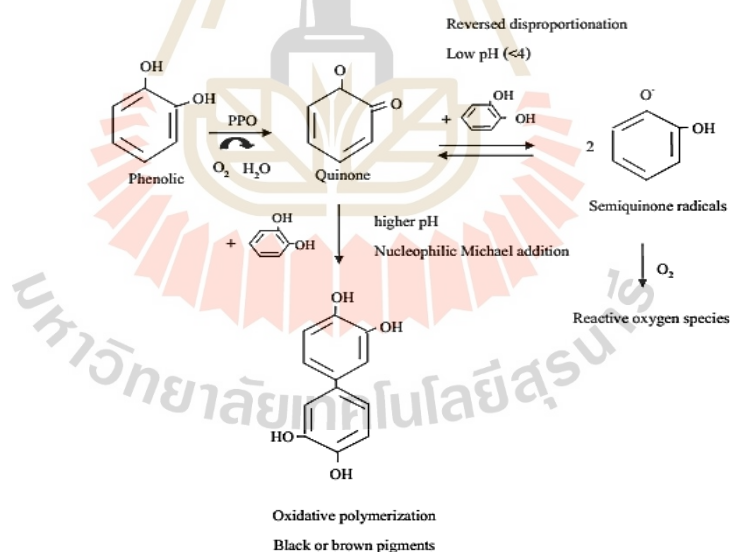
กลไกทางเคมี เป็นกลไกที่พืชมีการผลิตสารเคมีขึ้นมา เพื่อกำจัดแมลงศัตรู (กัญชวลี เจตยานนท์, 2541) โดยการผลิตสารปฐมภูมิและทุติยภูมิ (primary and secondary metabolites) บางชนิดที่เกิดจากกระบวนการชีวเคมี เช่น สารบางตัวยับยั้งการกิน (antifeedant) ทำให้แมลงไม่ชอบ สารบางตัวมีศักยภาพเพียงพอที่จะฆ่าแมลงศัตรูได้โดยตรง หรือยับยั้งกระบวนการพัฒนาของแมลง เช่น เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ อัลคาลอยด์ สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส สารยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และสารชีวเคมีอื่น ๆ (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และวัชรินทร์ ชื่นสุสุวรรณ, 2543; Tingey and Sinden, 1982; Tallamy and Raupp 1991; Karban and Baldwin 1997; Gatehouse, 2002)

2.10 เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases; PPOs)

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่เป็น copper metalloprotein (Steffen et al., 1994) ในมะเขือเทศพบกลุ่มยีน PPO อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ประกอบด้วยสมาชิกยีน PPO 7

สมาชิก คือ A, A', B, C, D, E และ F โปรตีนของ PPO มีขนาด 52-62 กิโลดาลตัน (kDAs) (Newman et al., 1993) โดยสมาชิกอื่นของ PPO ในแต่ละชนิดนั้น มีการแสดงออกแตกต่างกันในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น PPO B จะพบมากในใบและดอกอ่อน ส่วน PPO E/F พบว่ามีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอสูงในขนใบชนิด I และ IV นอกจากนี้ ในขนใบทั้ง 2 ชนิดนี้ยังพบการแสดงออกของ PPO A อีกด้วย ส่วน PPO D พบการแสดงออกในขนใบชนิด VI เท่านั้น (Thipyapong et al., 2004)

PPO พบในพืชชั้นสูงทุกชนิด มักพบในใบ ราก หัว รากสะสมอาหาร ส่วนของดอก และผล สำหรับในมะเขือเทศมีการสะสมในราก ลำต้น ดอก และผล แต่พบการแสดงออกสูงในใบอ่อนและดอกอ่อน ซึ่งในสภาพปกติ PPO จะถูกเก็บในไทลาคอยด์ (thylakoid) ของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ส่วนฟีนอลิก (phenolic) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (substrate) ถูกเก็บอยู่ในช่องว่างภายในเซลล์ (vacuole) แต่เมื่อถูกโรค/แมลงเข้าทำลายหรือเกิดการชราภาพ (senescence) ของเซลล์พืช เป็นผลให้เซลล์แตก จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารฟีนอลิกกับออกซิเจน (O_2) โดยมี PPO เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) กลายเป็นสารควิโนน (quinone) (Steffens et al., 1994) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (Steffen et al., 1994)

ควิโนนที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของ PPO นี้เป็นโมเลกุลที่สามารถเกิดปฏิกิริยา covalent และ crosslink กับ nucleophiles ภายในเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่สารประกอบจำพวก sulfhydryl, amine, amide, indole และ imidazole อย่างไรก็ตาม ควิโนนที่เกิดขึ้นนี้เมื่ออยู่ในสภาพที่มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำกว่า 4 ควิโนนจะทำปฏิกิริยา reverse disproportionation กับฟีนอลิกได้เป็น

semiquinone radicals สารดังกล่าว เมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จะเปลี่ยนสภาพเป็นอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) สามารถเข้าทำลายแมลงได้ (Lamb et al., 1989; Thipyapong et al., 1995; Bolwell, 1995; Stout, 1999) อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas syringae* และ *Alternaria solani* ได้เช่นกัน (Thipyapong and Steffens, 1997; Stout et al., 1999) แต่เมื่ออยู่ในสภาพที่มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) สูงขึ้น คิวโนนจะเกิดปฏิกิริยา nucleophilic michael addition ทำให้เกิดเม็ดสีน้ำตาล (Coseteng and Lee, 1987; Bachem et al., 1994) ซึ่งพบในผักและผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล (Hertog et al., 1992) มะเขือเทศ (John and Steffens, 2002) ยาสูบ (Constabel, 1998) มันฝรั่ง (Coetzer, 2000) และกล้วย (Unal, 2007) เป็นต้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวก่อให้เกิดความเสียหายทางด้านรสชาติ สี กลิ่นหอมของผลไม้ อีกทั้งยังลดมูลค่าทางการตลาดลงถึง 50% (Whitaker and Lee, 1995)

2.11 การกระตุ้นเพิ่มระดับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

โดยปกติในต้นมะเขือเทศจะมีการสร้าง PPO อยู่ตลอดเวลา โดยสามารถตรวจพบได้ในระดับอาร์เอ็นเอและเอนไซม์ (Moore and Flurkey, 1990; Constabel et al., 1995; Thipyapong et al., 1995; Thipyapong and Steffens, 1997) นอกจากนี้ เมื่อพืชได้รับบาดเจ็บจากการเข้าทำลายของโรค/แมลง จะเกิดการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO ส่งผลให้พืชได้รับความเสียหายจากโรคและแมลงน้อยลง การกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO ดังกล่าวในมะเขือเทศ ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของหนอนยาสูบ (*Manduca sexta*) หนอนกระทู้หอม (*S. exigua*) และหนอนเจาะสมอฝ้าย (*H. armigera*) ลดลงเมื่อเทียบกับต้นพืชที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (Stout et al., 1998; Cipollini and Redman, 1999; Thaler, 1999; Bhonwong, 2009) นอกจากนี้ เอนไซม์ดังกล่าวสามารถคงทนและอยู่ได้เป็นระยะเวลาานเพื่อประโยชน์ในการป้องกันตัวเองจากแมลงศัตรูพืชที่เข้ามาทำลายรอบที่สอง โดยงานวิจัยของ Stout et al (1998) พบว่า มะเขือเทศที่มีระดับ PPO และโปรตีนอินฮิบิเตอร์ (proteinase inhibitor; PI) สูงกว่าต้นปกติ นั้น สามารถต้านทานการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพด (*H. zea*) ได้ดีกว่าต้นที่มีระดับ PPO และโปรตีนอินฮิบิเตอร์เป็นปกติ ในขณะที่เดียวกันเมื่อมีศัตรูพืชเข้ามาทำลายอีกครั้ง เช่น เพลี้ยอ่อน (*Macrosiphum euphorbiae*) ไรสองจุด (*Tetranychus urticae*) หนอนกระทู้หอม (*S. exigua*) และเชื้อ *P. syringae* pv. *tomato* ต้นมะเขือเทศที่ได้รับการกระตุ้นจะสามารถแสดงอาการต้านทานต่อศัตรูพืชที่เข้าทำลายรอบที่สองได้ดีเช่นกัน และในมะเขือเทศที่มีระดับ PPO มากกว่าปกติจากการดัดแปลงพันธุกรรม (overexpressed PPO; OP) พบมีการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity จากเดิมที่มีอยู่แล้วให้สูงขึ้น เมื่อถูกแมลงศัตรูเข้าทำลาย ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักลดลง เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม (non-transfomed; NT) (Mahanil et al., 2008) ซึ่งให้ผลการวิจัยสอดคล้องกับ Bhonwong et al. (2009) ที่ให้หนอนเจาะสมอ

ฝ้ายและหนอนกระทู้หอมเข้าทำลายต้น OP ที่มีระดับ PPO มากกว่าปกติ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของหนอนทั้งสองชนิดลดลง นอกจากนี้ พื้นที่ใบที่ถูกหนอนเข้าทำลายก็ลดลงด้วย เมื่อเทียบกับต้น NT จึงส่งผลให้อัตราการเข้าทำลายของหนอนลดน้อยลง

นอกจากนี้เมื่อต้นพืชได้รับสถานะแล้งยังส่งผลต่อการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ด้วย โดยต้นมะเขือเทศที่ได้รับการคัดแปลงพันธุกรรมให้มีระดับ PPO น้อยกว่าปกติ (suppressed PPO; SP) จะสามารถทนแล้งได้ดีกว่าต้นที่มีระดับ PPO มากกว่า (ต้น OP และ NT) นอกจากนี้ ยังพบระดับ PPO activity เพิ่มขึ้น เมื่อต้นมะเขือเทศเริ่มเหี่ยว (Thipyapong et al., 2004)

นอกจากนี้ อุณหภูมิก็ยังมีผลต่อระดับ PPO activity ในกระบวนการแปรรูปผักกาดหอม โดยเมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 10-25 องศาเซลเซียส จะทำให้ระดับ PPO activity สูงขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 30 องศาเซลเซียส ก็จะทำให้ระดับ PPO activity ลดลง (Boo et al., 2011) รวมถึงการเกิดบาดแผลในผลแอปเปิ้ลขณะผ่านกระบวนการแปรรูป มีผลให้ระดับ PPO activity สูงขึ้น เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2 และ 27 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะทำให้ระดับ PPO activity ลดลง (Queiron et al., 2011)

ในขณะเดียวกัน การใช้สารเคมีกลุ่มฮอร์โมนหรือสัญญาณสามารถกระตุ้นการเพิ่มระดับ PPO activity ได้ โดยพบว่า กรดจาสโมนิก (jasmonic acid; JA) กระตุ้นการสังเคราะห์ PPO เพิ่มขึ้น โดยงานวิจัยของ Thaler et al. (2001) พบว่าฮอร์โมนดังกล่าว มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช โดยมีผลต่อระบบการจัดเก็บโปรตีน (protein storage) การดูดซึมของธาตุอาหาร (assimilation) และกลไกการป้องกันการเข้าทำลายของโรคและแมลง โดยทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณจากบริเวณแผลที่ถูกเข้าทำลายไปยังบริเวณอื่น ๆ ภายในต้นพืช (Muller et al., 1993; Doares et al., 1995) และสามารถส่งสัญญาณไปยังต้นอื่น ๆ ผ่านสัญญาณระเหยได้ด้วย (Constable, 1995; Thaler et al., 1996) ในขณะที่พืชเตรียมพร้อมกับการเข้าทำลายของโรคและแมลงจะสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ PPO, PI, lipoxygenase (Lox) และ peroxidase (PO) (Thaler et al., 1996) คณะวิจัยของ Thaler et al. (2001) พบว่า การให้ JA แก่พืชสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ PPO และ PI ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในสภาพแปลงทดลอง อีกทั้งสามารถลดอัตราการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชของมะเขือเทศ ได้แก่ หนอนผีเสื้อ ค้างคาวหมัดฝัก เพลี้ยอ่อน และเพลี้ยไฟ ซึ่งให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกับ Stout et al. (1998) ซึ่งได้ทดลองให้ *S. exigua* กัดกินต้นมะเขือเทศร่วมกับการให้ JA, methyl jasmonate (MJ) และการให้แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet light) พบว่าการให้ JA และ MJ มีผลทำให้ระดับการสังเคราะห์เอนไซม์ PPO และ PI สูงขึ้น เป็นผลให้อัตราการเจริญเติบโตของ *S. exigua* ลดลง แต่ถ้าวัดอัตราการสังเคราะห์เอนไซม์ดังกล่าวโดยใส่ตัวยับยั้งการทำงาน เช่น การใช้ Salicylic acid (SA) กลับพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของ *S. exigua* เพิ่มสูงขึ้น

2.12 การกระตุ้นเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนโพลีฟีนอลออกซิเดส

สำหรับการทดลองเพื่อศึกษาการกระตุ้นเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน โดยประเมินจากการทำงานของ โปรโมเตอร์ (promoter) นั้นนิยมใช้ยีน β -glucuronidase (GUS) ซึ่งเป็นยีนรายงานผล (reporter gene) เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ง่ายและชัดเจน ซึ่งสามารถตรวจสอบการแสดงออกได้โดยตรง บนเนื้อเยื่อเป้าหมายจากการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของเอนไซม์เบต้ากลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase) ทำให้เกิดสีฟ้า/น้ำเงิน บนเนื้อเยื่อจากปฏิกิริยาเปลี่ยนสารตั้งต้น 5-bromo-4-chloro-3-indole- β -D-glucuronide (X-Gluc) ซึ่งไม่มีสีเป็นสาร 5-bromo-4-chloro-indole ซึ่งจะมีสีฟ้า/น้ำเงิน ยีนรายงานผลนี้ ทำให้รู้ว่าส่วน โปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และแสดงออกมากน้อยอย่างไรในเนื้อเยื่อส่วนใด ดังนั้น เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน (โปรโมเตอร์ทำงาน) จะมีสีฟ้า/น้ำเงิน โดยมีระดับความเข้มของสีแปรผันกับระดับการแสดงออกของยีน ดังนั้น เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออก (โปรโมเตอร์ทำงาน) ก็จะมีสีฟ้า/น้ำเงิน โดยมีระดับความเข้มของสีแปรผันกับระดับการแสดงออกของยีน

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน PPO ต่าง ๆ โดยใช้มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่าง PPO promoter กับยีนรายงานผล GUS (PPO::GUS fusion) พบว่าเมื่อมะเขือเทศได้รับบาดเจ็บทางกล จะพบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกของ PPO F ในใบแก่ (ข้อที่ 5) ที่เกิดบาดแผล และในใบอ่อน (ข้อที่ 1-3) ซึ่งอยู่เหนือบาดแผล แต่หากถูกกระตุ้นด้วยเอทิลีนจะเกิดการส่งสัญญาณไปเพิ่มการแสดงออกที่ใบแก่ (ข้อที่ 7) นอกจากนี้ SA ยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ PPO F ให้เพิ่มขึ้นที่บริเวณลำต้นและในทุกระยะการพัฒนาของใบ (Thipyapong and Steffen, 1997) นอกจากนี้ เมื่อต้นมะเขือเทศมีความเครียดจากภาวะแห้งแล้ง พบการแสดงออกของ PPO B และ PPO D ส่วนใหญ่จะแสดงออกที่บริเวณรอยต่อระหว่างโคนก้านใบกับลำต้น (abscission zone) นอกจากนี้ PPO B ยังถูกกระตุ้นเพิ่มได้ที่ท่อลำเลียงของบริเวณเส้นใบด้วย (Thipyapong et al., 2004 a)

การเกิดโรคก็มีผลต่อการกระตุ้นเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน PPO โดยพบว่า สมาชิกของ PPO gene family มีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของโรคจากเชื้อ *P. Syringae* ต่างกัน โดย PPO F จะพบการแสดงออกบริเวณรอบบาดแผลที่เกิดบริเวณใบอ่อน และในก้านใบอ่อน (ข้อที่ 3) แต่ไม่พบการแสดงออกในใบแก่ ส่วน PPO E พบการแสดงออกในก้านใบข้อที่ 7 และที่เส้นใบและบริเวณใกล้บาดแผลบนใบและลำต้นข้อที่ 7 สำหรับ PPO D พบการแสดงออกเพิ่มในลำต้นข้อที่ 7 และ 8 โดยเฉพาะในบริเวณพารานไคมาของท่อลำเลียงน้ำ (xylem parenchyma) และพบมากในเส้นใบหลัก และเส้นใบย่อยของใบแก่ ส่วน PPO B พบการแสดงออกชัดเจนใน abscission zone ของลำต้นข้อที่ 7-8 (Thipyapong et al., 2004 b) ซึ่งแสดงว่าแต่ละสมาชิกอาจมีบทบาทแตกต่างกัน

สำหรับ PPO B พบว่า ตอบสนองต่อเอทิลีน โดยมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในระยะเวลาเจริญเติบโตและในระยะสืบพันธุ์ โดยแสดงออกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อที่ยังอ่อน เช่น เนื้อเยื่อลำเลียง (vascular tissue) ของใบอ่อน ดอกอ่อน รวมถึงตายอดด้วย และที่บริเวณ abscission zone ของก้านใบและลำต้น และยังพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในขนใบชนิดที่ I และชนิดที่ IV นอกจากนี้ ยังพบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกที่บริเวณเส้นใบหลัก (major veins) ของใบข้อที่ 4 ยีนนี้ จึงอาจมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการชราภาพและการต้านทานแมลง (Newman et al., 2011)

2.13 บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในการต้านทานโรคและแมลง

งานวิจัยที่ศึกษาบทบาทของ PPO ในการต้านทานโรคพืชมีหลายงานวิจัย ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Li and Steffens (2002) แสดงให้เห็นว่า มะเขือเทศที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรมให้มีระดับ PPO สูงขึ้นกว่าปกติ (OP) สามารถต้านทานโรคใบจุดที่มีสาเหตุมาจาก *P. syringae* pv. *tomato* โดยสามารถลดจำนวนแผลของโรคลง 15 เท่า และลดจำนวนประชากรของเชื้อในบริเวณแผลลง 100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ (NT) ในทางตรงข้ามต้นมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมที่มีระดับ PPO ลดลง (SP) จะอ่อนแอต่อโรคใบจุดดังกล่าวที่ โดยพบว่ามีจำนวนแผลที่เกิดจากโรคใบจุดบนใบข้อที่ 4 มากกว่าต้นปกติ 10 เท่า และมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 18 เท่า (Thipyapong et al., 2004 a) ส่วนในพืชชนิดอื่น ๆ ก็มีรายงานเช่นกัน โดยพบว่ามันฝรั่งสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคเน่าดำ (black rot) จะมีระดับ PPO, POD, phenylalanine ammonia lyase (PAL) ปริมาณ chlorogenic acid และ total soluble phenols สูงกว่าสายพันธุ์อ่อนแอ (Ngazde et al., 2011)

ส่วนการต้านทานแมลงนั้น พบว่ามะเขือเทศ OP มีความต้านทานต่อหนอนกระทู้ผักได้ดีกว่ามะเขือเทศ SP โดยทำให้อัตราการตายของหนอนกระทู้ผักเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับต้น SP นอกจากนี้มะเขือเทศ OP ยังทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายและหนอนกระทู้หอมเข้าทำลายน้อยลง ส่งผลให้พื้นที่ใบจากการเข้าทำลายลดลงและอัตราการเจริญเติบโตของหนอนลดลงเมื่อเทียบกับต้น SP และ NT (Mahani et al., 2008; Bhonwong et al., 2009) และ War (2013) กล่าวว่า เมื่อให้เพลี้ยอ่อนเข้าทำลายต้นถั่วลิสงพันธุ์ต้านทานที่มีระดับ PPO สูง ส่งผลทำให้เพลี้ยอ่อนตายเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ต้านทาน

งานวิจัยที่ผ่านมาแสดงถึงบทบาทของ PPO ในการต้านทานแมลงหลากหลายชนิดโดยมี ผู้เสนอกลไกในการต้านทานแมลง 2 กลไก ดังนี้

- 1) การสร้างสารโพลีเมอร์เหนียวสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ trichome exudate เพื่อตรึงแมลงขนาดเล็ก ทำให้เคลื่อนไหวและกินอาหารไม่ได้ จึงตาย เป็นกลไกที่พบในขนใบชนิด A หรือชนิด VI ในพืชตระกูล *Solanum* บางชนิดมีการสะสม PPO ระดับสูงในขนใบ พบว่าพืชดังกล่าวสามารถดักจับและก่อให้เกิดความต้านทานต่อแมลงหิวขาว (*Bemisia tabaci*) ไโร

(*Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval)) เพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae* (Sulzer)) และเพลี้ยจักจั่น (*Empoasca fabae* (Harris)) ไข่ (Stoner et al., 1968; Kisha, 1981; Tingey et al., 1982; Tingey and Sinden., 1982; Ryan et al., 1983; Steffens and Walter, 1991) นอกจากนี้ ขนใบชนิด B หรือชนิด IV ในพืชตระกูล *Solanum* บางชนิด ยังสามารถปลดปล่อย sugar ester ซึ่งมีฤทธิ์ไล่แมลงได้อีกด้วย

2) การลดคุณภาพทางอาหาร หรือความน่ากินของเนื้อเยื่อพืชที่มีต่อแมลง เนื่องจากควิโนน ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาอัลคิเลชัน (alkylation) กับกรดอะมิโนชนิด nucleophilic เช่น ไลซีน ฮิสติดีน ซิสเตอีน และเมทไธโอนีน ของโปรตีนต่าง ๆ ในพืชได้ จึงอาจมีผลให้ความสามารถในการย่อย (digestibility) ความน่ากิน (palatability) และคุณค่าทางอาหาร (nutritive value) ของเนื้อเยื่อพืชต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นลดลง (Mayer and Harel, 1979; Felton et al., 1989; Duffey and Felton, 1991) เมื่อไม่นานมานี้ Mahanil et al. (2008) และ Bhonwong et al. (2009) ได้รายงานบทบาทของ PPO ในมะเขือเทศที่มีผลต่อการต้านทานแมลงศัตรูพืชอันดับ Lepidoptera 3 ชนิด คือ หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.)) หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* (Hübner)) และหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera* (Hübner)) อย่างไรก็ตาม ความต้านทานดังกล่าว อาจเป็นผลจากระดับ PPO activity ที่สร้างอยู่เดิม (constitutive activity) หรือเกิดจากการกระตุ้นสร้างขึ้นเมื่อถูกแมลงกัดกิน (induced activity)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

การกระตุ้นเพิ่มระดับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases; PPO) เมื่อถูกแมลงเข้าทำลาย

ดำเนินการวิจัยโดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

1. การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์
2. การศึกษาการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. มะเขือเทศพันธุ์ Money Maker ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม โดยการถ่ายยีน PPO promoter: GUS fusion เข้าสู่ต้นมะเขือเทศโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ โดย PPO A::GUS มี 5' flanking DNA ของ PPO A promoter ขนาด 1.8 Kb, PPO B::GUS มี 5' flanking DNA ของ PPO B promoter ขนาด 2.5 Kb, PPO D::GUS มี 5' flanking DNA ของ PPO D promoter ขนาด 1 Kb, PPO E::GUS มี 5' flanking DNA ของ PPO E promoter ขนาด 1.7 Kb และ PPO F::GUS มี 5' flanking DNA ของ PPO F promoter ขนาด 6 Kb ที่เชื่อมต่อกับยีนรายงานผลเบต้ากลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase; GUS) (Thipyapong et al., 2004b)

2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงใน microtiter plate (spectra count microplatephotometer)
4. เครื่องดูดถ่ายสารปริมาณน้อย (adjustable pipettes)
5. เครื่องเขย่าสารละลาย (shaker)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
7. กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (stereo microscope)
8. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
9. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
10. เครื่องปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

11. เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
12. ชั้นไฟสำหรับเลี้ยงต้นไม้
13. ถ้วยและกล่องอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก
14. ชั้นน้ำพลาสติก ขวดพลาสติก ฟู่กัน คีมคีบ สำลี เทปกาวยางสองหน้า และผ้าขาวบาง
15. อุปกรณ์การเกษตร
16. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช	ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3
ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช	ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3
ห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา	ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3
ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยา	ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3

3.3 ระยะเวลาการทดลอง

กรกฎาคม 2553-ธันวาคม 2556

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การทดลองที่ 1: การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์

การทดลองนี้ ใช้หนอนกระทู้ผักเพื่อให้เป็นตัวแทนแมลงปากกัด เนื่องจากเป็นแมลงที่มีพืชอาศัยกว้างและเป็นแมลงศัตรูสำคัญของมะเขือเทศ สำหรับเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ให้เป็นตัวแทนของแมลงปากดูดที่เป็นแมลงศัตรูสำคัญที่เข้าทำลายมะเขือเทศ

เปรียบเทียบระดับ PPO activity ในใบของมะเขือเทศพันธุ์ Money Maker ก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์โดยใช้มะเขือเทศที่มีอายุ 6-8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 7 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น ประกอบด้วย 3 ทริตเมนต์ ได้แก่ 1) ไม่มีการเข้าทำลาย (control) 2) ให้เข้าทำลายใบข้อที่ 4 และ 3) ให้เข้าทำลายใบข้อที่ 6 โดยใบข้อที่ 1 นับจากยอด ใบข้อที่ 1-2 เป็นตัวแทนของใบอ่อน ใบข้อที่ 4 เป็นตัวแทนของใบอายุปานกลางที่แผ่ใบเต็มที่แล้ว และใบข้อที่ 6 เป็นตัวแทนของใบแก่ ทำการทดลอง 2 ครั้ง โดยปลูกมะเขือเทศที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ในกระถางขนาด 4 นิ้ว ที่วางอยู่บนชั้นไฟที่ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มของแสงประมาณ 4,000-6,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน

1. เก็บตัวอย่างใบข้อที่ 4 และ 6 ที่เป็นคู่กัน จำนวนข้อละ 1 ใบ นำไปตรวจวัดระดับ PPO activity ก่อนการกระตุ้นเพิ่มระดับ

2. ปลอ่ยแมลงเข้าทำลายบนใบ

2.1 ปลอ่ยหนอนกระทู้ผักวัย 2 จำนวน 3 ตัว โดยเก็บไข่จากแปลงปลูกพืชที่ไม่ได้ฉีดสารเคมี แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเทียม (อนงค์นุช ผลวงษ์, 2548) โดยให้ลอกคราบ 1 ครั้ง จากนั้นให้เข้าทำลายบนใบมะเขือเทศข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 แล้วจึงคลุมด้วยผ้าไนลอน สำหรับต้นที่ไม่มีการเข้าทำลาย ไม่ได้ทำการปลอ่ยหนอน แต่คลุมด้วยผ้าไนลอน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้หนอนกัดกินใบมะเขือเทศอย่างน้อย 50% ของพื้นที่ใบ

2.2 ปลอ่ยเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เฉลี่ยตัวเต็มวัยจำนวน 50 ตัว ที่เก็บจากแปลงปลูกพืชตามธรรมชาติ แล้วนำมาเลี้ยงบนผักทองที่กิ่งอ่อนกิ่งแก่ (รจ มรกต และคณะ, มปป) จนได้เพลี้ยแป้งตัวเต็มวัยที่มีขนาดเท่า ๆ กัน โดยปลอ่ยให้เข้าทำลายบนใบมะเขือเทศข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 ที่มีทรงตาข่ายไนลอนยึดติดกับใบมะเขือเทศเพื่อไม่ให้เพลี้ยแป้งเข้าทำลายบริเวณอื่น แล้วจึงคลุมด้วยผ้าไนลอนอีกชั้นหนึ่ง สำหรับต้นที่ไม่มีการเข้าทำลาย ไม่ได้ปลอ่ยเพลี้ยแป้ง แต่ทำการคลุมด้วยผ้าไนลอนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. หลังจากแมลงเข้าทำลาย เก็บตัวอย่างใบข้อที่ 1-2 และใบข้อที่ 4 และ 6 จำนวนข้อละ 1 ใบ เพื่อนำไปตรวจวัดระดับ PPO activity หลังการกระตุ้นเพิ่มระดับ

4. วิเคราะห์ระดับ PPO activity โดยใช้วิธีคัดแปลงจาก Thipyapong et al. (1995) ซึ่งจัดเป็นการตรวจวัดระดับ PPO activity เชิงปริมาณ (quantitative) โดยวัดจากปริมาณสารตั้งต้น (substrate) ที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน คำนวณต่อหน่วยปริมาณโปรตีนรวม ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

4.1 การสกัดโปรตีนเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนรวมและระดับ PPO activity

4.1.1 นำใบมะเขือเทศมาบดใน homogenization buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 M KCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 µg/ml leupeptin, 1% (v/v) Triton X-100, 3% (w/v) polyvinyl polypyrrolidone (PVPP))

4.1.2 ใส่ homogenization buffer ปริมาตร 1 ml ลงในโกร่งที่แช่เย็นอยู่บนน้ำแข็ง บดใบพืชให้ละเอียดแล้วเทใส่หลอด microcentrifuge จากนั้นวางบนน้ำแข็ง

4.1.3 ปั่นแยกเพื่อตกตะกอนชิ้นส่วนพืชโดยการปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

4.1.4 นำสารละลายส่วนบน (supernatant) ใส่ในหลอดใหม่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

เพื่อนำสารละลายที่ได้ (homogenate) มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวม (total protein) และระดับ PPO activity

4.2 การตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนรวม โดยวิธีของ Bradford (1976) มีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 เตรียม BSA standard ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 และ 25 µg/ml ดังรายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 1

4.2.2 เตรียม homogenate ตัวอย่างละ 2 ความเข้มข้น คือ 5 และ 10 µl ให้ได้ปริมาตรรวม 1,000 µl ดังรายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 2

4.2.3 ดูด BSA standard และ homogenate แต่ละความเข้มข้นมาใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ตัวอย่างละ 400 µl

4.2.4 เติม protein assay dye reagent concentrate (Bio-rad Laboratories, Inc., CA) ปริมาตร 100 µl แล้วผสมให้เข้ากัน

4.2.5 ดูดใส่ microtiter plate หลุมละ 200 µl ตัวอย่างละ 2 หลุม แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง

4.2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ด้วยเครื่อง spectra count microplate-photometer

4.2.7 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ BSA และ ค่าการดูดกลืนแสง หาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression)

4.2.8 คำนวณหาปริมาณโปรตีนของแต่ละตัวอย่าง โดยแทนค่าลงในสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีน (}\mu\text{g)}}{\text{ปริมาตรของ homogenate (}\mu\text{l)}}$$

4.3 การตรวจวัดระดับ PPO activity

4.3.1 เตรียม homogenate 4 ระดับความเข้มข้นซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่าง homogenate/ homogenization buffer คือ 10/30, 20/20, 30/10 และ 40/0 µl

4.3.2 เติมเอนไซม์ catalase (84 unit/µl) ปริมาตร 5 µl ลงใน homogenate ก่อนการวัดค่าดูดกลืนแสงนาน 15 นาที แล้วนำ homogenate ในแต่ละความเข้มข้นใส่ใน substrate solution (2.2 mg 4-methylcatechol, 1 ml TNB (15 mg 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid และ 30 mg sodium borohydride ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0)) ปริมาตร 1 ml

4.3.3 ทำการตรวจวัดระดับ substrate ที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่เกิดขึ้นต่อหนึ่งหน่วยเวลา (1 นาที) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm ทุก ๆ 5 วินาที แล้วบันทึกการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง

4.3.4 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเส้น เพื่อคำนวณหาค่า PPO activity ($\Delta OD \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ leaf homogenate) จากสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น แล้วคำนวณเทียบต่อหน่วยโปรตีนรวม โดยใช้สูตร

$$\text{PPO activity } (\Delta OD \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}) = \frac{\text{PPO activity } (\Delta OD \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ leaf homogenate})}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)}}$$

จากนั้นเปลี่ยนค่าของ PPO activity เป็น $\mu\text{mol quinone formed} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ โดยนำค่าที่ได้มาคูณ 0.272 (Esterbauer et al., 1977)

4.3.5 วิเคราะห์ความแตกต่างของระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 และ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระตู่ฝักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ โดยใช้วิธี paired t-test และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับ PPO activity ระหว่างการเข้าทำลายมะเขือเทศที่แตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows Version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

3.4.2 การทดลองที่ 2 : การศึกษาการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระตู่ฝักและเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์

ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F ในใบของมะเขือเทศคัดแปลงพันธุกรรม อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่มีโปรโมเตอร์ของยีน PPO A, B, D, E และ F ควบคุมการแสดงออกของยีนเบต้ากลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase; GUS) ซึ่งเป็นยีนรายงานผล (reporter gene) เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ง่ายและชัดเจน ซึ่งสามารถตรวจสอบการแสดงออกได้โดยตรงบนเนื้อเยื่อเป้าหมายจากการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของเอนไซม์ GUS ทำให้เกิดสีฟ้า/น้ำเงินบนเนื้อเยื่อจากปฏิกิริยาเปลี่ยนสารตั้งต้น 5-bromo-4-chloro-3-indole- β -D-glucuronide (X-Gluc) ซึ่งไม่มีสี เป็นสาร 5-bromo-4-chloro-indico ซึ่งมีสีฟ้า/น้ำเงิน ยีนรายงานผลนี้ทำให้รู้ว่าส่วน โปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และแสดงออกมากน้อยอย่างไรในเนื้อเยื่อส่วนใด ดังนั้นเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน (โปรโมเตอร์ทำงาน) จะมีสีฟ้า/น้ำเงิน โดยมีระดับความเข้มของสีแปรผันกับระดับการแสดงออกของยีน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งเป็น 3 ทริตเมนต์ คือ 1) ไม่มีการเข้าทำลาย 2) ให้เข้าทำลายใบข้อที่ 4 และ 3) ให้เข้าทำลายใบข้อที่ 6

โดยทดลอง จำนวน 7 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยมะเขือเทศ 1 ต้น ดังนั้น ในแต่ละกรรมวิธี ประกอบด้วยมะเขือเทศทั้งหมด 7 ต้น โดยทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

1. เก็บตัวอย่างใบข้อที่ 4 และ 6 ที่เป็นคู่กัน จำนวนข้อละ 1 ใบ นำไปประเมินระดับ GUS activity ก่อนการกระตุ้นเพิ่มระดับ

2. ปลอ่ยแมลงเข้าทำลายใบ

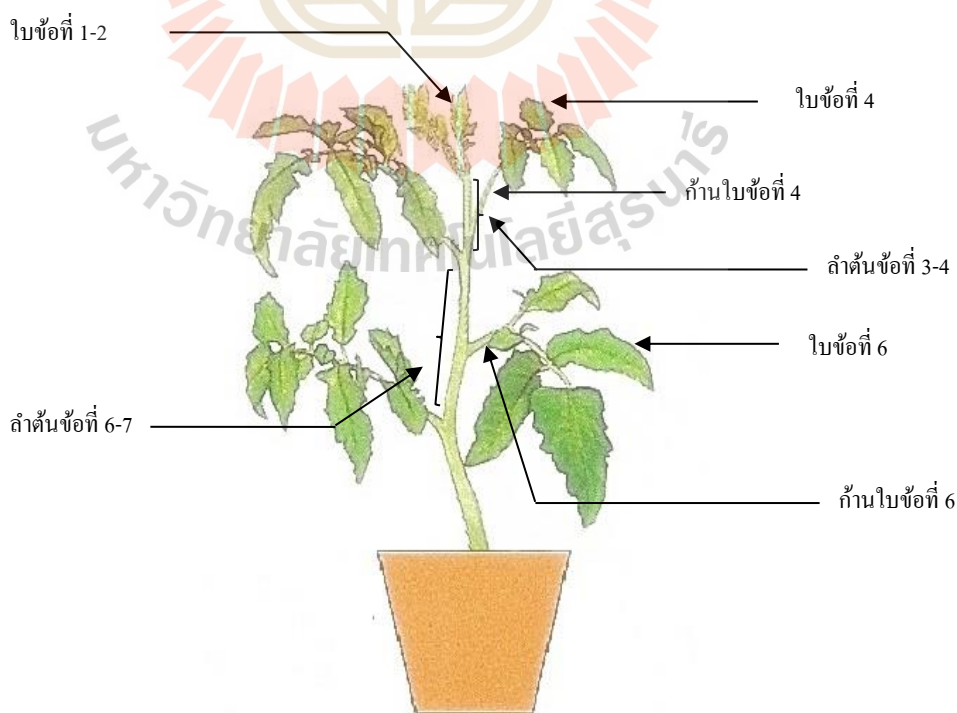
2.1 ปลอ่ยหนอนกระทู้ผักวัย 2 จำนวน 3 ตัว ให้เข้าทำลายบนใบมะเขือเทศข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 แล้วจึงคลุมด้วยผ้าไนลอน สำหรับต้นที่ไม่มีการเข้าทำลาย ไม่ได้ทำการปลอ่ยหนอน แต่คลุมด้วยผ้าไนลอน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.2 ปลอ่ยเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ตัวเต็มวัยจำนวน 50 ตัว ให้เข้าทำลายบนใบมะเขือเทศข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 แล้วจึงคลุมด้วยผ้าไนลอน สำหรับต้นที่ไม่มีการเข้าทำลาย ไม่ได้ทำการปลอ่ยเพลี้ยแป้งแต่คลุมด้วยผ้าไนลอนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. เก็บตัวอย่างพืช

3.1 ก่อนการเข้าทำลายเก็บเฉพาะเนื้อเยื่อใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6 ที่เป็นคู่กัน คู่ละ 1 ใบ

3.2 หลังการเข้าทำลาย เก็บเนื้อเยื่อใบข้อที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 ใบข้อที่ 6 ก้านใบข้อที่ 4 ก้านใบข้อที่ 6 ลำต้นข้อที่ 3-4 และลำต้นข้อที่ 6-7 ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ตำแหน่งใบ ก้านใบ และลำต้นข้อต่าง ๆ สำหรับนำไปทดสอบการแสดงออกของยีน

4. การประเมินระดับ GUS activity (GUS assay) เหน้กึ่งปริมาณ (semiquantitative) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

4.1 ตัดตัวอย่างพืชเป็นชิ้นขนาดเล็กแช่ใน GUS buffer (200 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.1% (v/v) Tritron X-100, 20% (v/v) methanol, 0.4 M sorbitol, 1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.2% (v/v) β -mercaptoethanol และ 0.5 mg/ml X-Gluc) แล้วนำไปเข้าเครื่องทำสุญญากาศ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อให้สารละลายเข้าไปในเนื้อเยื่ออย่างทั่วถึง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.2 บันทึกผลระดับสีฟ้า/น้ำเงิน จากปฏิกิริยาการเปลี่ยน X-Gluc ซึ่งไม่มีสี ให้เป็นสาร 5-bromo-4-chloro-indigo ซึ่งมีสีฟ้า/น้ำเงิน โดยเอนไซม์ GUS ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ดังนี้ เอพิดอร์มิส (epidermis) เมโซฟิลล์ (mesophyll) เส้นใบหลัก (major vein) เส้นใบย่อย (minor vein) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) พาเรนไคมาของท่อลำเลียงน้ำ (xylem parenchyma) คอร์เท็กซ์ (cortex) พิต (pith) และบริเวณรอยต่อของลำต้นกับก้านใบ (abscission zone) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบการแสดงออกจากการควบคุม โดยโปรโมเตอร์ของ PPO A, B, D, E และ F ในมะเขือเทศ คัดแปลงพันธุกรรมแต่ละจีโนไทป์ก่อนและหลังการเข้าทำลายโดยหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ๊ค เบียดส์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เลย์

4.1.1 การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก

จากการทดลอง ครั้งที่ 1 เมื่อให้หนอนกระทู้ผักกัดกินใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 ของมะเขือเทศพันธุ์ Money Maker ที่มีอายุ 6-8 สัปดาห์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยแบ่งการเข้าทำลายมะเขือเทศ ดังนี้ 1) ไม่ถูกกัดกิน (control) 2) ให้กัดกินใบข้อที่ 4 และ 3) ให้กัดกินใบข้อที่ 6 (นับใบข้อที่ 1 จากยอด) เพื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ก่อนและหลังการเข้าทำลายพบว่ามะเขือเทศที่ถูกหนอนกระทู้ผักกัดกินใบข้อที่ 4 นั้นมีระดับ PPO activity ของใบที่ถูกกัดกินเพิ่มขึ้นจากเดิม 4.2 เท่า ($p < 0.05$) นอกจากนี้การกัดกินในใบข้อที่ 4 ยังส่งผลต่อระดับ PPO activity ในใบที่ไม่ถูกกัดกินภายในต้นเดียวกันโดยกระตุ้นระดับ PPO activity ของใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่าง 1.6 เท่า ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับก่อนการกัดกิน (ภาพที่ 3)

ส่วนการให้หนอนกระทู้ผักกัดกินใบข้อที่ 6 พบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อ 6 เพิ่มขึ้น 4.9 เท่า ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการกัดกิน นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 ซึ่งอยู่ด้านบนของต้นเดียวกันเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการกัดกิน สำหรับต้นที่ไม่ถูกกัดกินมีระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 และใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบระดับ PPO activity ระหว่างการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ ในใบข้อที่ 4 และ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลาย พบว่าระดับ PPO activity ของต้นมะเขือเทศ ก่อนการเข้าทำลาย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างวิธีการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ ส่วนหลังการเข้าทำลาย พบว่าระดับ PPO activity ระหว่างการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งในใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6 โดยในใบข้อที่ 4 การให้กัดกินใบข้อที่ 4 ส่งผลให้ระดับ PPO activity สูงกว่าการไม่ถูกกัดกิน และการให้กัดกินใบข้อที่ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนในใบข้อที่ 6 การให้กัดกินใบข้อที่ 6 ส่งผลให้ระดับ PPO activity สูงกว่าการไม่ถูกกัดกินและการให้กัดกินใบข้อที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

ส่วนใบอ่อน (ข้อที่ 1-2) ซึ่งทำการตรวจวัดระดับ PPO activity เฉพาะหลังการกักกินของหนอน กระชู้ผักเท่านั้น พบว่าระดับ PPO activity ในต้นที่ให้หนอนกระชู้ผักกักกินใบข้อที่ 4 แตกต่างจากการเข้าทำลายวิธีอื่นทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีระดับสูงกว่าต้นที่ให้กักกินใบข้อที่ 6 และต้นที่ไม่ถูกกักกิน (ตารางที่ 1 ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศที่ไม่ถูกกักกิน (control) ให้กักกินใบข้อที่ 4 และให้กักกินใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระชู้ผัก ครั้งที่ 1

การเข้าทำลาย	PPO activity ($\mu\text{mol quinone formed min}^{-1} \text{.mg protein}^{-1}$)				
	ก่อนกักกิน		หลังกักกิน		
	ใบข้อที่ 4	ใบข้อที่ 6	ใบข้อที่ 1-2	ใบข้อที่ 4	ใบข้อที่ 6
ไม่ถูกกักกิน	5.207	1.743	20.829 b ¹	5.184 b	2.342 b
กักกินใบข้อที่ 4	4.786	1.559	58.516 a	20.142 a	2.438 b
กักกินใบข้อที่ 6	2.739	2.506	23.142 b	4.713 b	12.416 a

¹ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

การทดลองครั้งที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระชู้ผัก พบว่ามะเขือเทศที่ถูกหนอนกระชู้ผักกักกินใบข้อที่ 4 นั้นมีระดับ PPO activity ของใบที่ถูกกักกินเพิ่มขึ้นจากเดิม 146 เท่า ($p < 0.01$) นอกจากนี้ การกักกินในใบข้อที่ 4 ยังส่งผลต่อระดับ PPO activity ในใบที่ไม่ถูกกักกินภายในต้นเดียวกันโดยทำให้ระดับ PPO activity ของใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่างสูงขึ้น 7.7 เท่า ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการกักกิน (ภาพที่ 4)

ส่วนการให้หนอนกระชู้ผักกักกินใบข้อที่ 6 พบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 6 เพิ่มขึ้น 72 เท่า ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการกักกิน นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 ซึ่งอยู่ด้านบนของต้นเดียวกันเพิ่มขึ้น 3.6 เท่า ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการกักกิน (ภาพที่ 4)

เมื่อเปรียบเทียบระดับ PPO activity ระหว่างการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ ในใบข้อที่ 4 และ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลาย พบว่าระดับ PPO activity ของต้นมะเขือเทศ ก่อนการเข้าทำลาย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างวิธีการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ ส่วนหลังการเข้าทำลาย พบว่าระดับ PPO activity ระหว่างการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งในใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6 โดยในใบข้อที่ 4 การให้กักกินใบข้อที่ 4 ส่งผลให้ระดับ PPO activity สูงกว่าการไม่ถูกกักกิน

และการให้กักกินใบข้อที่ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนในใบข้อที่ 6 การให้กักกินใบข้อที่ 6 ส่งผลให้ระดับ PPO activity สูงกว่าการไม่ถูกกักกินและการให้กักกินใบข้อที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2) สำหรับต้นที่ไม่ถูกกักกินมีระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 และใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 4)

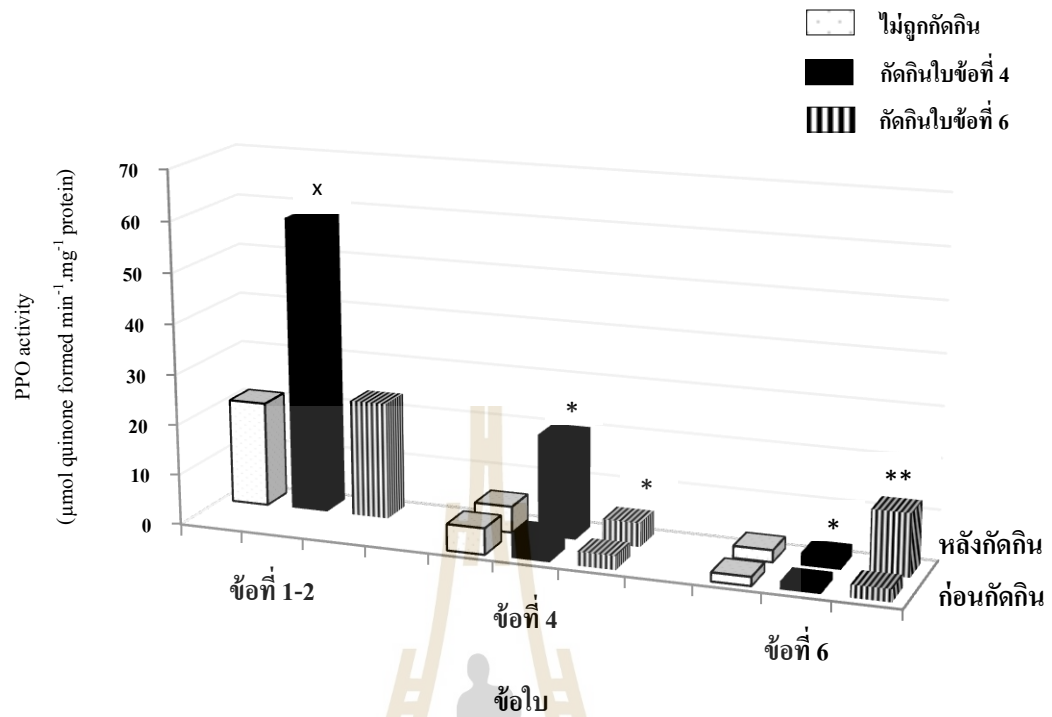
ส่วนใบอ่อน (ข้อที่ 1-2) ซึ่งทำการตรวจวัดระดับ PPO activity เฉพาะหลังการกักกินของหนอนกระทุ้งเท่านั้น พบว่าระดับ PPO activity ในต้นที่ให้หนอนกระทุ้งกักกินใบข้อที่ 4 สูงกว่าต้นที่ให้กักกินใบข้อที่ 6 และต้นที่ไม่ถูกกักกินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2 ภาพที่ 4)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศที่ไม่ถูกกักกิน (control) ให้กักกินใบข้อที่ 4 และให้กักกินใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทุ้ง ครั้งที่ 2

การเข้าทำลาย	PPO activity ($\mu\text{mol quinone formed min}^{-1} \text{.mg}^{-1} \text{ protein}$)				
	ก่อนกักกิน		หลังกักกิน		
	ใบข้อที่ 4	ใบข้อที่ 6	ใบข้อที่ 1-2	ใบข้อที่ 4	ใบข้อที่ 6
ไม่ถูกกักกิน	0.324	0.694	4.042 b ^{1/}	0.590 b	0.701 b
กักกินใบข้อที่ 4	0.167	0.502	12.428 a	24.378 a	3.888 b
กักกินใบข้อที่ 6	0.322	0.316	5.978 b	1.181 b	22.995 a

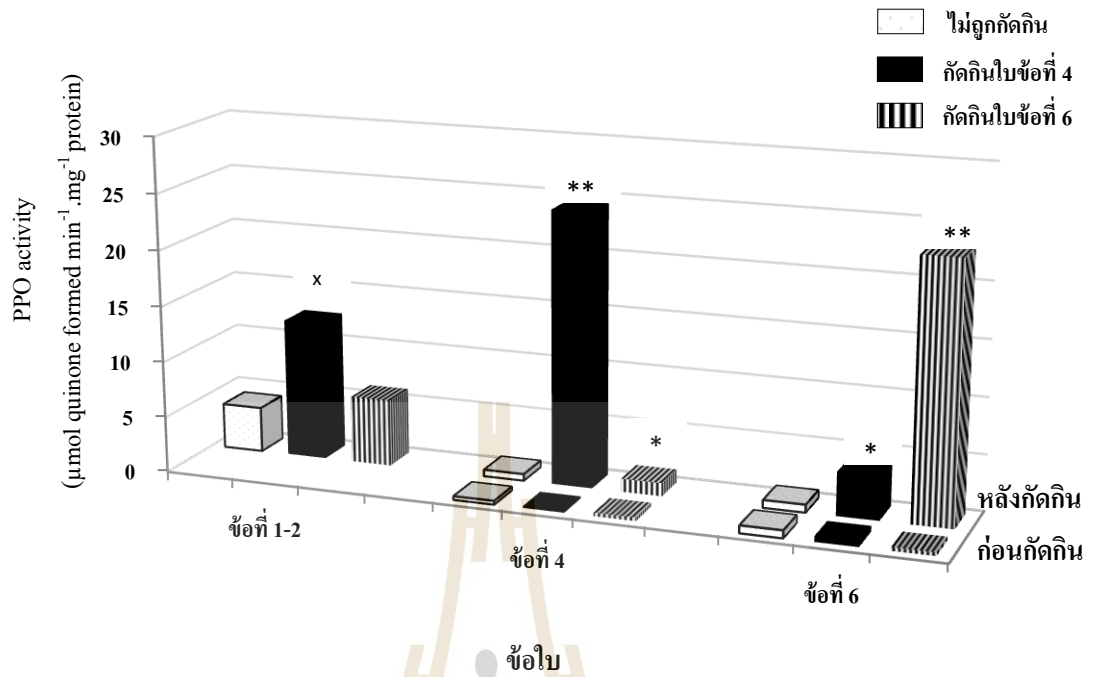
^{1/}ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ

Duncan's New Multiple Range Test



ภาพที่ 3 ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก
ครั้งที่ 1

- x มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเข้าทำลาย ($p < 0.05$)
- * มีความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการกััดกินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ** มีความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการกััดกินอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)



ภาพที่ 4 ระดับ PPO activity ในโบมะเทือเทศก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักครั้งที่ 2

- x มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการชำแหละ ($p < 0.05$)
- * มีความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการกัสดกนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
- ** มีความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการกัสดกนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

4.1.2 การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแฉักเบียดส์เลย์

จากการทดลองครั้งที่ 1 เมื่อให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 ของมะเขือเทศพันธุ์ Money Maker ที่มีอายุ 6-8 สัปดาห์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยแบ่งการเข้าทำลายในมะเขือเทศ ดังนี้ 1) ไม่ถูกดูดกิน (control) 2) ให้ดูดกินใบข้อที่ 4 และ 3) ให้ดูดกินใบข้อที่ 6 เพื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ก่อนและหลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้ง พบว่ามะเขือเทศที่ถูกเพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 4 นั้นมีระดับ PPO activity ของใบที่ถูกดูดกินเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการดูดกิน นอกจากนี้การดูดกินในใบข้อที่ 4 ยังส่งผลต่อระดับ PPO activity ในใบที่ไม่ถูกดูดกินภายในต้นเดียวกันโดยกระตุ้นระดับ PPO activity ของใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่าง 2.7 เท่า ($p < 0.05$) (ภาพที่ 5)

ส่วนการให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 6 พบว่าระดับ PPO activity ในใบที่ถูกดูดกินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 1.2 เท่า แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการดูดกิน นอกจากนี้ระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 ซึ่งอยู่ด้านบนของต้นเดียวกันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 1.3 เท่า แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการดูดกิน สำหรับต้นที่ไม่ถูกดูดกินมีระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 และใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการดูดกินไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 5)

เมื่อเปรียบเทียบระดับ PPO activity ระหว่างการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ ในใบข้อที่ 4 และ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลาย พบว่าวิธีการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการเข้าทำลายให้ระดับ PPO activity ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ส่วนใบอ่อน (ข้อที่ 1-2) ซึ่งทำการตรวจวัดระดับ PPO activity เฉพาะหลังการดูดกินของเพลี้ยแป้งเท่านั้น พบว่าระดับ PPO activity ในต้นที่ให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 4 มีแนวโน้มสูงกว่าต้นที่ให้ดูดกินใบข้อที่ 6 และต้นที่ไม่ถูกดูดกินเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 5)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ให้ดูดกินใบข้อที่ 4 และให้ดูดกินใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 1

การเข้าทำลาย	PPO activity ($\mu\text{mol quinone formed min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$)				
	ก่อนดูดกิน		หลังดูดกิน		
	ใบข้อที่ 4	ใบข้อที่ 6	ใบข้อที่ 1-2	ใบข้อที่ 4	ใบข้อที่ 6
ไม่ถูกดูดกิน	5.037	7.680	30.975	5.693	4.653
ดูดกินใบข้อที่ 4	13.74	4.335	40.833	13.613	11.915
ดูดกินใบข้อที่ 6	10.900	4.448	35.270	14.570	5.233

จากการทดลองครั้งที่ 2 พบว่ามะเขือเทศที่ถูกเพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 4 มีระดับ PPO activity ของใบที่ถูกดูดกินเพิ่มขึ้นจากเดิม แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการดูดกิน นอกจากนี้การดูดกินใบข้อที่ 4 ยังไม่มีผลต่อระดับ PPO activity ของใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่างเมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการดูดกิน (ภาพที่ 6)

ส่วนการให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 6 พบว่าระดับ PPO activity เพิ่มขึ้น 3 เท่าแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการดูดกิน นอกจากนี้ยังพบการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 ซึ่งอยู่ด้านบนของต้นเดียวกันเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับใบก่อนการดูดกิน สำหรับต้นที่ไม่ถูกดูดกินมีระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 และใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบระดับ PPO activity ระหว่างการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ ในใบข้อที่ 4 และ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลาย พบว่าวิธีการเข้าทำลายแบบต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการเข้าทำลายให้ระดับ PPO activity ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ส่วนใบอ่อน (ข้อที่ 1-2) ซึ่งทำการตรวจวัดระดับ PPO activity เฉพาะหลังการดูดกินของเพลี้ยแป้งเท่านั้น พบว่าระดับ PPO activity ในต้นที่ให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 4 มีแนวโน้มสูงกว่าต้นที่ให้ดูดกินใบข้อที่ 6 และต้นที่ไม่ถูกดูดกินเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4 ภาพที่ 6)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ให้ดูดกินใบข้อที่ 4 และให้ดูดกินใบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2

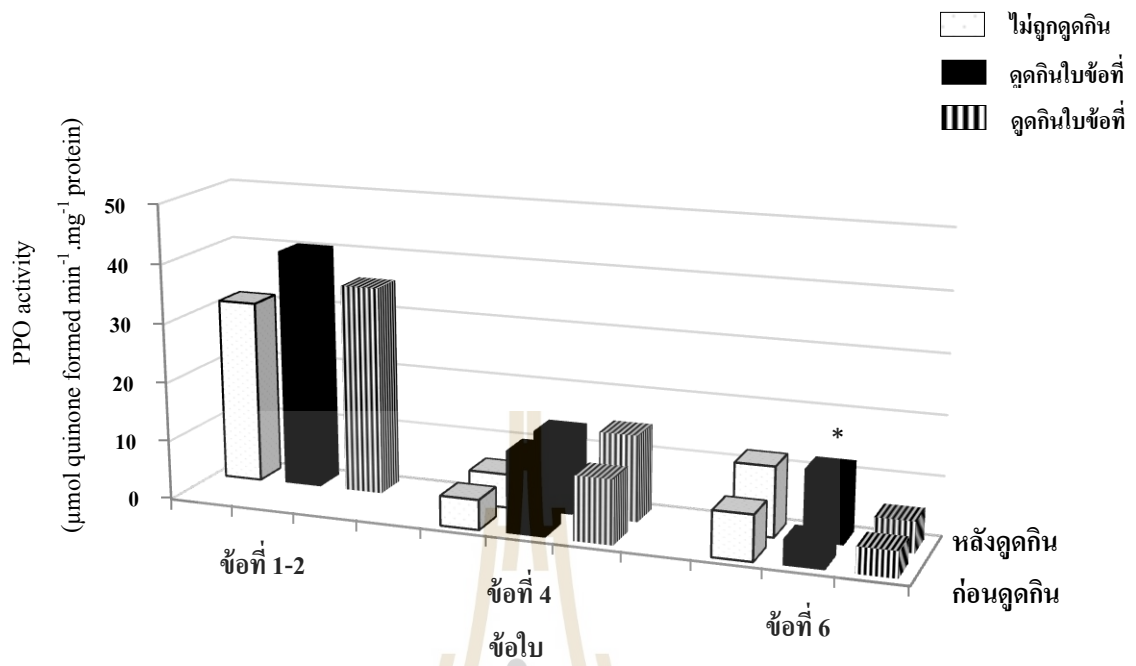
การเข้าทำลาย	PPO activity ($\mu\text{mol quinone formed min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$)				
	ก่อนดูดกิน		หลังดูดกิน		
	ใบข้อที่ 4	ใบข้อที่ 6	ใบข้อที่ 1-2	ใบข้อที่ 4	ใบข้อที่ 6
ไม่ถูกดูดกิน	0.210	0.303	1.324	0.346	0.624
ดูดกินใบข้อที่ 4	0.177	0.123	2.668	0.534	0.188
ดูดกินใบข้อที่ 6	0.249	0.249	1.859	0.626	0.761

4.2 การแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เลย์

4.2.1 การแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก

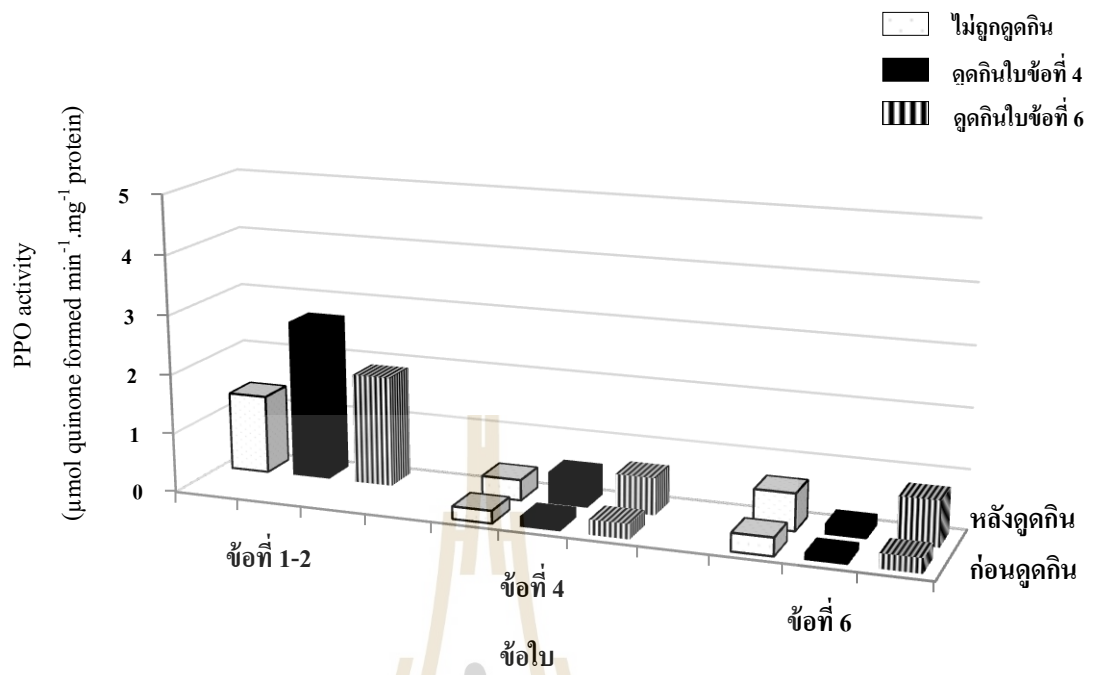
จากการศึกษาการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F โดยให้หนอนกระทู้ผักกัดกินใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 ของมะเขือเทศที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมโดยการถ่ายยีน PPO promoter: β -glucuronidase (GUS) fusion 5 จีโนไทป์ได้แก่ PPO A::GUS, PPO B::GUS, PPO D::GUS, PPO E::GUS และ PPO F::GUS เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้ต้นที่มีอายุ 6-8 สัปดาห์ และแบ่งการเข้าทำลายมะเขือเทศ ดังนี้ 1) ไม่ถูกกัดกิน (control) 2) ให้กัดกินใบข้อที่ 4 และ 3) ให้กัดกินใบข้อที่ 6 เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในใบข้อที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 ก้านใบข้อที่ 4 ใบข้อที่ 6 ก้านใบข้อที่ 6 ลำต้นข้อที่ 3-4 และลำต้นข้อที่ 6-7 ด้วยวิธี histochemical GUS assay ซึ่งประเมินระดับการแสดงออกจากการปรากฏสีฟ้า/น้ำเงินในเนื้อเยื่อพืช

สำหรับต้นที่มียีน PPO A::GUS, E::GUS และ F::GUS ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังถูกหนอนกระทู้ผักกัดกินในทุกกระยะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อใบและลำต้นทั้งในเซลล์เอพิเดอร์มิส (epidermis) มีโซฟิลล์ (mesophyll) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) พาเรนไคมาของท่อลำเลียงน้ำ (xylem parenchyma) คอร์เทกซ์ (cortex) และพิธ (pith)



ภาพที่ 5 ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศก่อนและหลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 1

* มีความแตกต่างกันระหว่างก่อนและหลังการกัดกินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

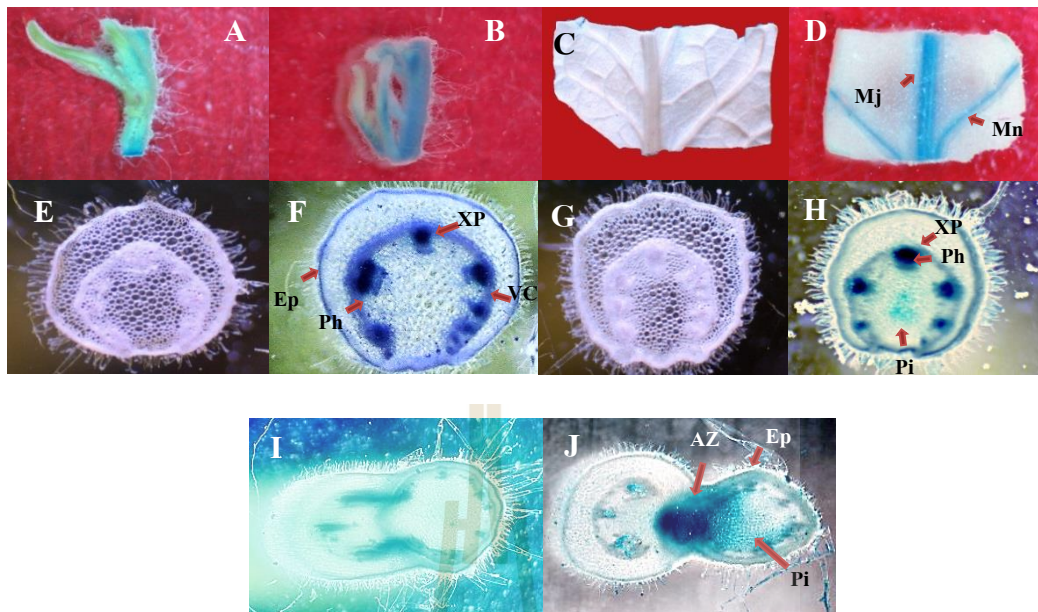


ภาพที่ 6 ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศก่อนและหลังการเข้าทำลายของเพลี้ย
 แี้งแจ็กเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2

สำหรับ PPO B เมื่อให้หนอนกระทุ้งปักกักกินใบข้อที่ 4 พบการแสดงออกที่บริเวณใบอ่อน (ข้อที่ 1-2) สูงกว่าต้นที่ไม่ได้ถูกกักกิน (ภาพที่ 7 A และ B) ส่วนใบข้อที่ 4 ที่ให้หนอนกระทุ้งปักกักกินโดยตรง พบว่ามีการแสดงออกสูงขึ้นไปบริเวณเส้นใบหลัก (major veins) และเส้นใบย่อย (minor veins) อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับก่อนการกักกิน (ภาพที่ 7 C และ D) และพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่างภายในต้นเดียวกัน (ไม่แสดงภาพ) นอกจากนี้ยังพบการกระตุ้นการแสดงออกที่บริเวณก้านใบ (petiole) ข้อที่ 4 โดยพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่เนื้อเยื่อลำเลียง (vascular tissue) ทั้งในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารและพารენไคมาของท่อลำเลียงน้ำรวมถึงวาสคิวลาร์แคมเบียม (vascular cambium) และพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่บริเวณเอพิเคอร์มิสและคอร์เทกซ์ด้วย เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกหนอนกระทุ้งปักกักกิน (ภาพที่ 7 E และ F) และพบการกระตุ้นการแสดงออกในก้านใบข้อที่ 6 ด้วย แต่มีการแสดงออกในระดับต่ำกว่าและบางขึ้นพบการแสดงออกบริเวณพิธ (ภาพที่ 7 G และ H) นอกจากนี้ยังพบการกระตุ้นการแสดงออกที่เนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 (internodes 3-4) อย่างชัดเจนที่บริเวณรอยต่อระหว่างก้านใบกับลำต้น (abscission zone) พิธและเนื้อเยื่อลำเลียง และมีการกระตุ้นการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่บริเวณเอพิเคอร์มิสและคอร์เทกซ์ เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกหนอนกระทุ้งปักกักกิน (ภาพที่ 7 I และ J) แต่ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่เนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกกักกิน (ไม่แสดงภาพ)

เมื่อให้หนอนกระทุ้งปักกักกินใบข้อที่ 6 พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 6 และก้านใบข้อที่ 6 เล็กน้อย และไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่บริเวณใบข้อที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 และก้านใบข้อที่ 4 ที่อยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกัน รวมถึงเนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 และเนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 เมื่อเทียบกับต้นก่อนกักกิน (ไม่แสดงภาพ)

สำหรับต้นที่ไม่ถูกกักกินไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในทุกเนื้อเยื่อทั้งในใบข้อที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 ใบข้อที่ 6 ก้านใบข้อที่ 4 ก้านใบข้อที่ 6 เนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 และเนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อก่อนทดลองและต้นที่ถูกหนอนกระทุ้งปักกักกิน (ไม่แสดงภาพ)



ภาพที่ 7 การแสดงออกของ PPO B::GUS ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อให้หนอนกระทุ้งฝักกั๊กกินใบข้อที่ 4
 A. ใบข้อที่ 1-2 ที่ไม่ถูกกั๊กกิน B. ใบข้อที่ 1-2 ที่ถูกกั๊กกินใบข้อที่ 4 C. ใบข้อที่ 4 ก่อนการ
 กั๊กกินใบข้อที่ 4 D. ใบข้อที่ 4 หลังถูกกั๊กกินใบข้อที่ 4 E. ก้านใบข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกั๊กกิน F.
 ก้านใบข้อที่ 4 ที่ถูกกั๊กกินใบข้อที่ 4 G. ก้านใบข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกั๊กกิน H. ก้านใบข้อที่ 6 ที่
 ถูกกั๊กกินใบข้อที่ 4 I. ลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 ที่ไม่ถูกกั๊กกิน J. ลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 ที่
 ถูกกั๊กกินใบข้อที่ 4

AZ, Abscission zone; Ep, epidermis; Mj, major vein; Mn, minor vein; Ph, phloem; Pi, pith; VC, vascular cambium; XP, xylem parenchyma

เมื่อให้หนอนกระทุ้งฝักกั๊กกินใบข้อที่ 4 ของต้นมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน PPO D:: GUS ไม่พบการแสดงออกของ PPO D ที่ใบข้อที่ 1-2 ทั้งในต้นที่ไม่ถูกกั๊กกินและต้นที่ถูกกั๊กกิน (ไม่แสดงภาพ) และส่วนใหญ่พบการแสดงออกของ PPO D ในใบข้อที่ 4 เพิ่มขึ้นที่บริเวณเส้นใบหลักและเส้นใบย่อยโดยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับก่อนการกั๊กกิน (ภาพที่ 8 A และ B) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นบริเวณก้านใบของข้อที่ 4 เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้กั๊กกิน โดยส่วนใหญ่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่เนื้อเยื่อลำเลียงทั้งในท่อลำเลียงอาหารและพารานโคมาของท่อลำเลียงน้ำ (ภาพที่ 8 C และ D) แต่ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ใบข้อที่ 6 ทั้งบริเวณเส้นใบหลักและเส้นใบย่อย และไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในก้านใบข้อที่ 6 เมื่อเทียบกับก่อนการกั๊กกิน (ไม่แสดงภาพ) นอกจากนี้ยังพบตัวอย่างบางชิ้นที่มีการแสดงออกของ PPO D เพิ่มขึ้นในลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 โดย

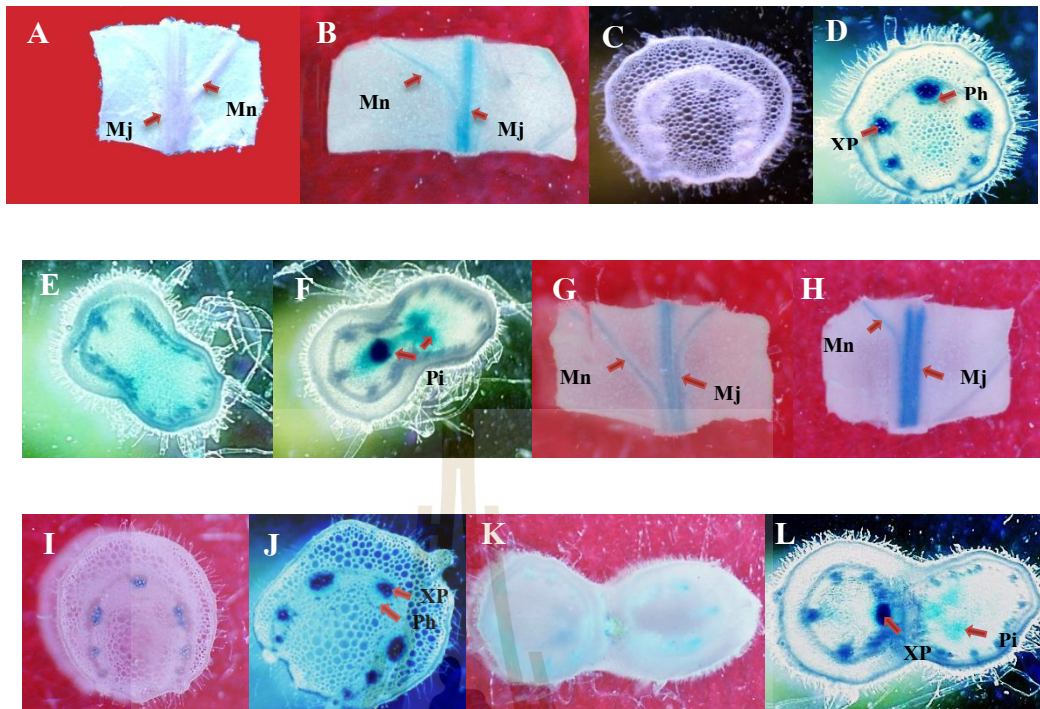
เห็นชัดเจนที่บริเวณพิช เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ถูกหนอนกระทุ้ฝักกักกิน (ภาพที่ 8 E และ F) แต่ไม่พบการแสดงออกในลำต้นข้อที่ 6-7 (ไม่แสดงภาพ)

ส่วนต้นที่ให้หนอนกระทุ้ฝักกักกินใบข้อที่ 6 ไม่พบการแสดงออกของ PPO D ที่ใบข้อที่ 1-2 ทั้งในต้นที่ไม่ถูกกักกินและต้นที่ถูกกักกิน (ไม่แสดงภาพ) ส่วนใหญ่พบการแสดงออกของ PPO D ในใบข้อที่ 6 บริเวณเส้นใบหลักและเส้นใบย่อยเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนจากเดิมที่มีอยู่แล้วก่อนการกักกิน (ภาพที่ 8 G และ H) และยังพบการแสดงออกของ PPO D เพิ่มขึ้นจากเดิมอย่างชัดเจนในก้านใบข้อที่ 6 โดยเฉพาะที่เนื้อเยื่อลำเลียงทั้งในพารนโคมาของท่อลำเลียงน้ำและท่อลำเลียงอาหาร เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกกักกิน (ภาพที่ 8 I และ J) และพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในใบข้อที่ 4 และในก้านใบข้อที่ 4 ที่อยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกัน (ไม่แสดงภาพ) ทั้งนี้ยังพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 โดยบางชิ้นพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่บริเวณท่อลำเลียงอาหาร พารนโคมาของท่อลำเลียงน้ำและพิช เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกหนอนกระทุ้ฝักกักกิน (ภาพที่ 8 K และ L) แต่ไม่พบการแสดงออกเพิ่มในลำต้นข้อที่ 3-4 (ไม่แสดงภาพ)

สำหรับต้นที่ไม่ถูกกักกินไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในทุกเนื้อเยื่อทั้งในใบข้อที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 ใบข้อที่ 6 ก้านใบข้อที่ 4 ก้านใบข้อที่ 6 รวมถึงเนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 และเนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อก่อนทดลองและต้นที่ถูกหนอนกระทุ้ฝักกักกิน (ไม่แสดงภาพ)

4.2.2 การแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแฉักเบียดส์เลย์

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F โดยให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 ของมะเขือเทศพันธุ์ Money Maker ที่มีอายุ 6-8 สัปดาห์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งแบ่งการเข้าทำลายในมะเขือเทศ ดังนี้ 1) ไม่ถูกดูดกิน (control) 2) ให้ดูดกินใบข้อที่ 4 และ 3) ให้ดูดกินใบข้อที่ 6 เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในใบข้อที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 ก้านใบข้อที่ 4 ใบข้อที่ 6 ก้านใบข้อที่ 6 ลำต้นข้อที่ 3-4 และลำต้นข้อที่ 6-7 ด้วยวิธี histochemical GUS assay ซึ่งประเมินระดับการแสดงออกจากการปรากฏสีฟ้า/น้ำเงินในเนื้อเยื่อพืช



ภาพที่ 8 การแสดงออกของ PPO D::GUS ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อให้หนอนกระทุ้ฝักกักดินใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 A. ใบข้อที่ 4 ก่อนกักดินใบข้อที่ 4 B. ใบข้อที่ 4 หลังกักดินใบข้อที่ 4 C. ก้านใบข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกักดิน D. ก้านใบข้อที่ 4 ที่ถูกกักดินใบข้อที่ 4 E. ลำต้นข้อที่ 3-4 ที่ไม่ถูกกักดิน F. ลำต้นข้อที่ 3-4 ที่ถูกกักดินใบข้อที่ 4 G. ใบข้อที่ 6 ก่อนถูกกักดิน H. ใบข้อที่ 6 หลังถูกกักดินใบข้อที่ 6 I. ก้านใบข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกักดิน J. ก้านใบข้อที่ 6 ที่ถูกกักดินใบข้อที่ 6 K. ลำต้นข้อที่ 6-7 ที่ไม่ถูกกักดิน L. ลำต้นข้อที่ 6-7 ที่ถูกกักดินใบข้อที่ 6
Mj, major vein; Mn, minor vein; Ph, phloem; Pi, pith; XP, xylem parenchyma

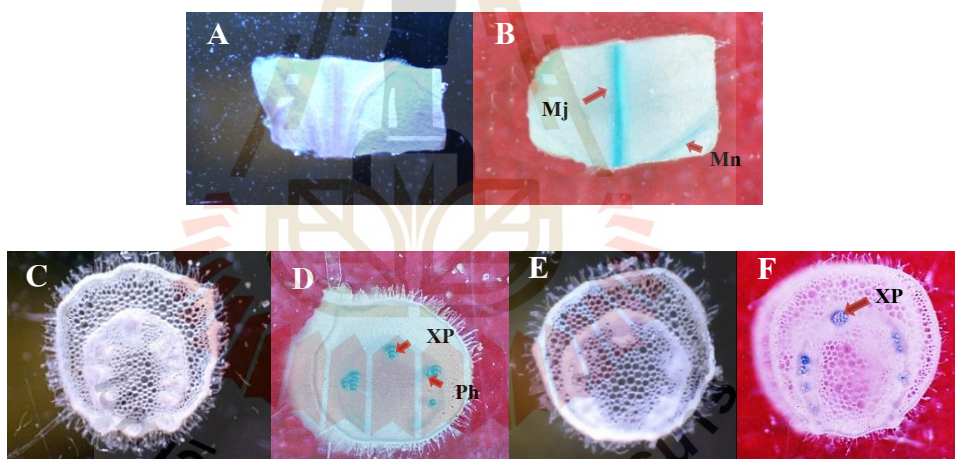
เมื่อให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบของต้นที่มียีน PPO A::GUS, E::GUS และ F::GUS ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังถูกเพลี้ยแป้งดูดกินในใบและลำต้นทุกระยะการเจริญเติบโตทั้งในเซลล์เอพิเดอร์มิส มีโซฟิลล์ ท่อลำเลียงอาหาร พาเรนไคมาของท่อลำเลียงน้ำ คอร์เทกซ์ และพิธ

สำหรับต้นที่มียีน PPO B::GUS เมื่อให้เพลี้ยแป้งดูดกินบนใบข้อที่ 4 พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ใบข้อที่ 4 บางชั้นบริเวณเส้นใบหลักและเส้นใบย่อยเมื่อเทียบกับการดูดกิน (ภาพที่ 9 A และ B) และยังพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่บริเวณก้านใบข้อที่ 4 โดยส่วนใหญ่พบมากที่พาเรนไคมาของท่อลำเลียงน้ำและท่อลำเลียงอาหาร เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกดูดกิน (ภาพที่ 9 C และ D) แต่ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 1-2 และลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 (ไม่แสดงภาพ) และไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 6 และก้านใบข้อที่ 6 รวมถึงลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 ที่อยู่ด้านล่าง

ภายในต้นเดียวกัน เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกคูดกิน (ไม่แสดงภาพ)

แต่เมื่อให้เพลี้ยแป้งคูดกินบนใบข้อที่ 6 พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในก้านใบข้อที่ 6 บางชิ้นเมื่อเทียบกับก่อนการคูดกิน โดยพบบริเวณพาเรncia ของท่อลำเลียงน้ำและท่อลำเลียงอาหารเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 9 E และ F) แต่ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 6 ที่ถูกคูดกินโดยตรงและไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 4 และก้านใบข้อที่ 4 ที่อยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกันเมื่อเทียบกับก่อนการคูดกิน (ไม่แสดงภาพ) ส่วนใบข้อที่ 1-2 ลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 และลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเช่นกัน เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกคูดกิน (ไม่แสดงภาพ)

สำหรับต้นที่ไม่ถูกคูดกินไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในทุกเนื้อเยื่อทั้งในใบข้อที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 ใบข้อที่ 6 ก้านใบข้อที่ 4 ก้านใบข้อที่ 6 รวมถึงเนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 และเนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อก่อนทดลองและต้นที่ถูกเพลี้ยแป้งคูดกิน (ไม่แสดงภาพ)



ภาพที่ 9 การแสดงออกของ PPO B::GUS ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อให้เพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เลียคูดกิน ใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 A. ใบข้อที่ 4 ก่อนการคูดกินใบข้อที่ 4 B. ใบข้อที่ 4 หลังถูกคูดกิน ใบข้อที่ 4 C. ก้านใบข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกคูดกิน D. ก้านใบข้อที่ 4 หลังถูกคูดกินใบข้อที่ 4 E. ก้านใบข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกคูดกิน F. ก้านใบข้อที่ 6 ที่ถูกคูดกินใบข้อที่ 6

Mj, major vein; Mn, minor vein; Ph, phloem; XP, xylem parenchyma

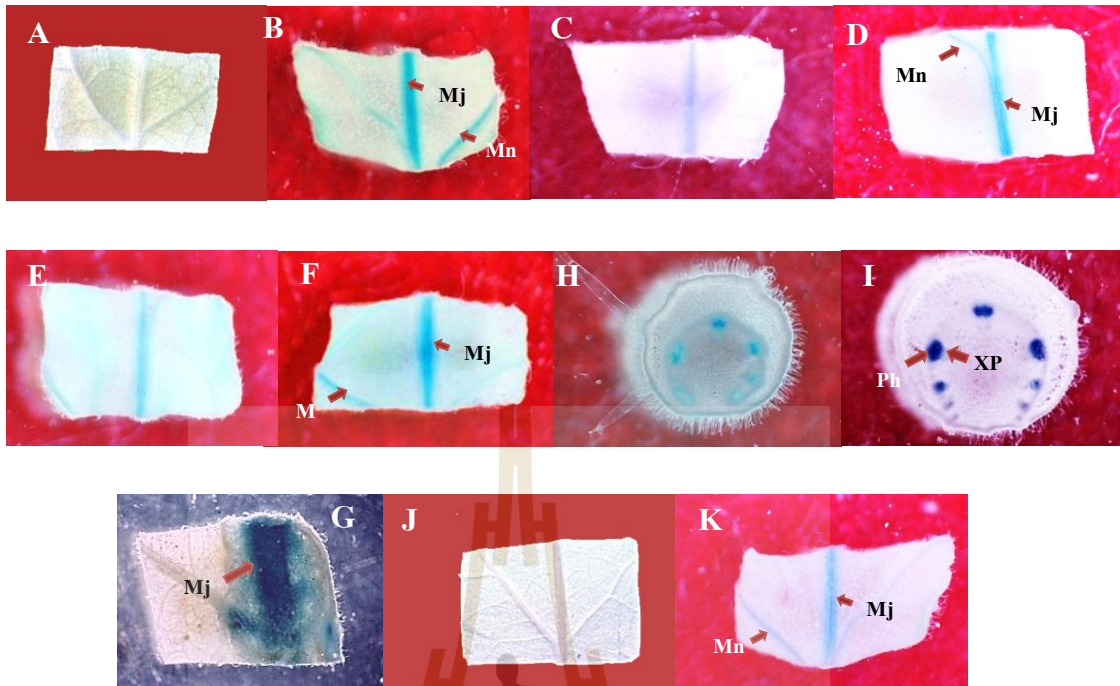
สำหรับต้นที่มียีน PPO D::GUS เมื่อให้เพลี้ยแป้งคูดกินบนใบข้อที่ 4 พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 4 บางชิ้นบริเวณเส้นใบหลักและเส้นใบย่อยเมื่อเทียบกับก่อนคูดกิน (ภาพที่ 10 A และ B) และส่งผลถึงใบข้อที่ 6 ที่อยู่ด้านล่างภายในต้นเดียวกัน โดยบางชิ้นพบการแสดงออกเพิ่มขึ้น

จากเดิมเล็กน้อยที่บริเวณเส้นใบหลักและเส้นใบย่อยเมื่อเทียบกับก่อนดูคกิน (ภาพที่ 10 C และ D) แต่ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในก้านใบข้อที่ 4 จากเดิมที่มีอยู่แล้วเล็กน้อย และไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 1-2 ก้านใบข้อที่ 6 รวมถึงลำต้นข้อที่ 3-4 และลำต้นข้อที่ 6-7 เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกดูคกิน (ไม่แสดงภาพ)

แต่เมื่อให้เพลี้ยแป้งดูคกินบนใบข้อที่ 6 ส่วนใหญ่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 6 ที่บริเวณเส้นใบหลักและเส้นใบย่อยเมื่อเทียบกับก่อนการดูคกิน (ภาพที่ 10 E และ F) และพบบางชิ้นที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นชัดเจนมากที่บริเวณเส้นใบหลักที่เพลี้ยแป้งเข้าทำลาย (ภาพที่ 10 G) และยังพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ก้านใบข้อที่ 6 บริเวณพารนไคมาของท่อลำเลียงน้ำและท่อลำเลียงอาหาร เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกดูคกิน (ภาพที่ 10 H และ I) นอกจากนี้ยังส่งผลถึงใบข้อที่ 4 ที่อยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกัน โดยพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่บริเวณเส้นใบหลักและเส้นใบย่อยของบางชิ้น (ภาพที่ 10 J และ K) แต่ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ก้านใบข้อที่ 4 และไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 1-2 ลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 และลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ถูกดูคกิน (ไม่แสดงภาพ)

สำหรับต้นที่ไม่ถูกดูคกินไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในทุกเนื้อเยื่อทั้งในใบข้อที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 ใบข้อที่ 6 ก้านใบข้อที่ 4 ก้านใบข้อที่ 6 รวมถึงเนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 3-4 และเนื้อเยื่อลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อก่อนทดลองและต้นที่ถูกเพลี้ยแป้งดูคกิน (ไม่แสดงภาพ)





ภาพที่ 10 การแสดงออกของ PPO D::GUS ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อให้เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลี้ยงดูคูดกิน ใบช่อที่ 4 หรือช่อที่ 6 A. ใบช่อที่ 4 ก่อนการคูดกินใบช่อที่ 4 B. ใบช่อที่ 4 หลังถูกคูดกิน ใบช่อที่ 4 C. ใบช่อที่ 6 ก่อนถูกคูดกินใบช่อที่ 4 D. ใบช่อที่ 6 หลังถูกคูดกินใบช่อที่ 4 E. ใบช่อที่ 6 ก่อนถูกคูดกินใบช่อที่ 6 F. ใบช่อที่ 6 หลังถูกคูดกินใบช่อที่ 6 G. ใบช่อที่ 6 หลังถูกคูดกินใบช่อที่ 6 H. ก้านใบช่อที่ 6 ที่ไม่ถูกคูดกิน I. ก้านใบช่อที่ 6 ที่ถูกคูดกินใบช่อที่ 6 J. ใบช่อที่ 4 ก่อนถูกคูดกินใบช่อที่ 6 K. ใบช่อที่ 4 หลังถูกคูดกินใบช่อที่ 6
Mj, major vein; Mn, minor vein; Ph, phloem; XP, xylem parenchyma

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของ หนอนกระทู้ผัก

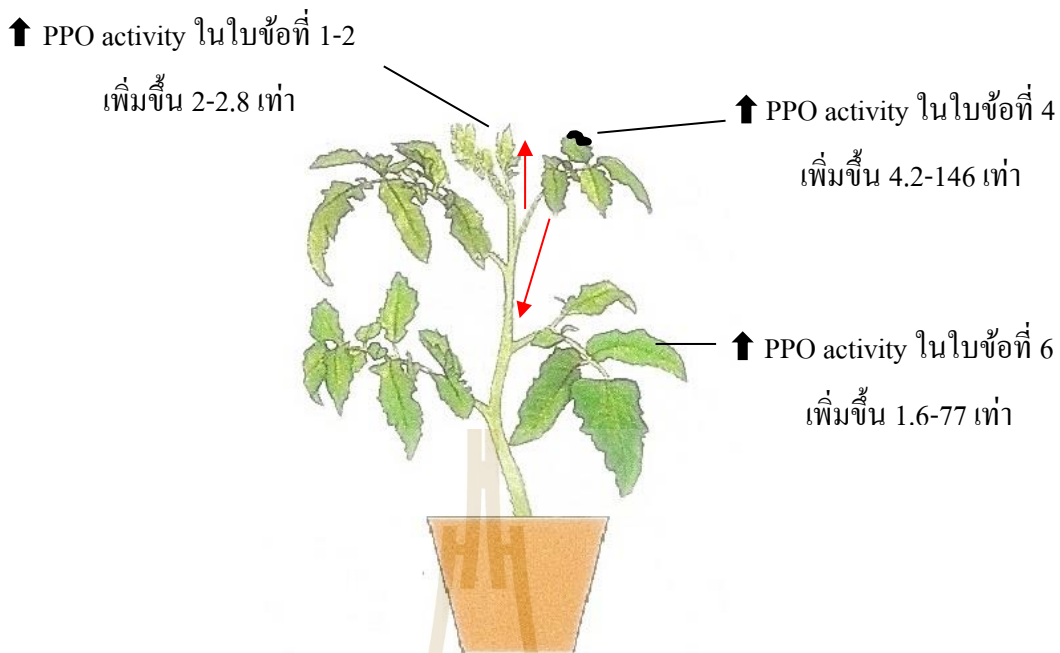
จากการทดลองให้หนอนกระทู้ผักกัดกินใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวัดระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6 ทั้งก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก เพื่อประเมินการกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity ในเนื้อเยื่อมะเขือเทศ ทั้งในบริเวณที่เกิดบาดแผล (local induction) และทั่วทั้งลำต้น (systemic induction) เมื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 หลังจากให้หนอนกัดกินใบข้อที่ 4 พบว่ามีระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดบาดแผลเพิ่มขึ้น 4.2 เท่า ($p < 0.05$) และ 146 เท่า ($p < 0.01$) ตามลำดับ และส่งผลให้ระดับ PPO activity ในใบอ่อน (ข้อที่ 1-2) ซึ่งอยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกันเพิ่มขึ้น 2.8 เท่า ($p < 0.05$) และ 2 เท่า ตามลำดับ ส่วนในใบข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกัดกิน ซึ่งอยู่ด้านล่างภายในต้นเดียวกันมีระดับ PPO activity เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า ($p < 0.05$) และ 7.7 เท่า ($p < 0.05$) ตามลำดับ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักบนใบข้อที่ 4 สามารถกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity ในเนื้อเยื่อมะเขือเทศทั้งในบริเวณที่เกิดบาดแผล และทั่วทั้งลำต้นด้วย โดยมีการส่งสัญญาณไปยังเนื้อเยื่อทั้งที่อยู่ด้านบนและด้านล่างของบาดแผล (ภาพที่ 11)

สำหรับการให้หนอนกระทู้ผักกัดกินใบข้อที่ 6 ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 พบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 6 ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดบาดแผลเพิ่มขึ้น 4.9 เท่า ($p < 0.01$) และ 72 เท่า ($p < 0.01$) ตามลำดับ และส่งผลให้ระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 ที่อยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกันเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า ($p < 0.05$) และ 3.6 เท่า ตามลำดับ แต่ไม่พบการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO ในใบข้อที่ 1-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักบนใบข้อที่ 6 สามารถกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity ในเนื้อเยื่อมะเขือเทศทั้งในบริเวณที่เกิดบาดแผลและในใบที่อยู่เหนือขึ้นไป (ภาพที่ 12) แต่พบว่าใบข้อที่ 1-2 ซึ่งอยู่ด้านบนสุดตอบสนองน้อยกว่าใบข้อที่ 4 ซึ่งอยู่ใกล้กับใบที่ถูกกัดกินมากกว่า อาจเนื่องจากใบบริเวณยอดอยู่ห่างไกลกว่า ทำให้ได้รับสัญญาณน้อยกว่า หรือใบข้อที่ 6 ตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักได้น้อยกว่าใบข้อที่ 4 ซึ่งมีอายุน้อยกว่า

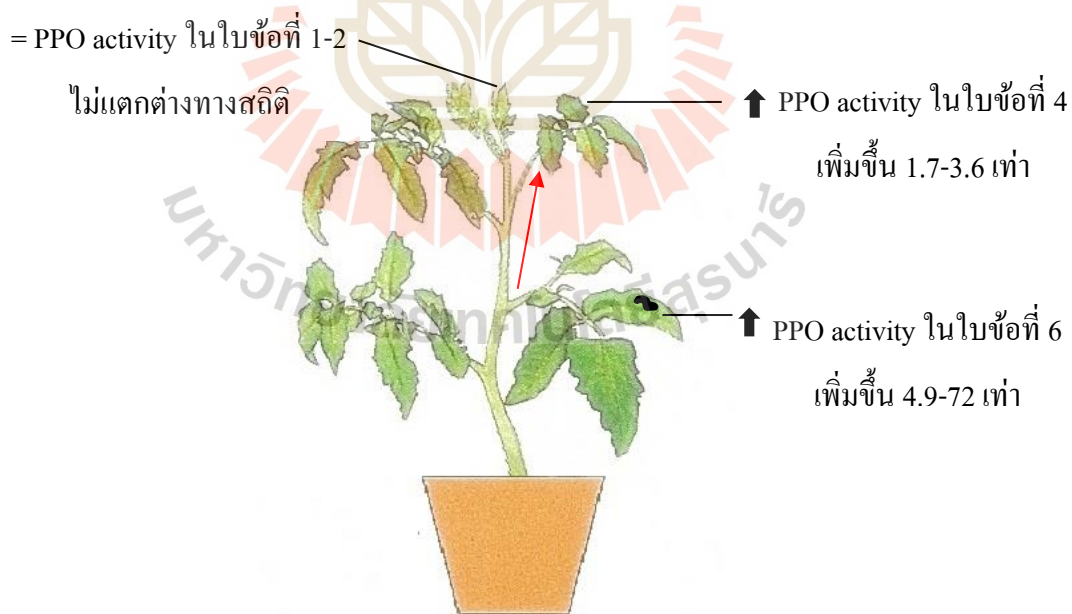
เมื่อเปรียบเทียบระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 กับใบข้อที่ 6 ในต้นเดียวกันก่อนการเข้าทำลาย โดยรวมพบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 มีแนวโน้มสูงกว่าในใบข้อที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับ Thipyapong et al. (1997) ที่พบการแสดงออกของ PPO ในระดับการลอกพันธุกรรมสูงที่สุดในใบและดอกอ่อน แต่การแสดงออกจะลดลงเมื่อเนื้อเยื่อมีอายุมากขึ้น

การกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity เมื่อถูกแมลงเข้าทำลายพบได้ในพืชหลายชนิด โดยแต่ละชนิดมีการแสดงออกที่แตกต่างกัน เช่นเมื่อให้หนอนผีเสื้อ forest tent (*Malacosoma disstri*) กัดกินใบข้อที่ 5-9 ของ hybrid poplar (*Populus* spp.) พบการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ในใบอ่อนข้อที่ 1-4 (systemic induction) ในระดับสูงกว่าการกระตุ้นเพิ่มในใบข้อที่ 5-9 โดยตรง (local induction) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากใบอ่อน มีการตอบสนองต่อความเสียหายจากการเข้าทำลายของแมลงได้ดีกว่าใบแก่ในพืชชนิดนี้ และ/หรือการเคลื่อนที่ของสัญญาณหยุดได้ดีกว่าใบแก่ (Constabel et al., 2000) ซึ่งแตกต่างจากในมะเขือเทศที่พบปริมาณการกระตุ้นระดับ PPO activity ในใบที่ถูกแมลงเข้าทำลายสูงกว่าใบที่ไม่ได้รับความเสียหายทั้งที่อยู่ด้านบนและด้านล่างของต้น

จากการทดลองพบว่าการกัดกินของหนอนกระทู้ผักสามารถชักนำให้เกิดการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ทั้งบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดบาดแผล และเนื้อเยื่อส่วนอื่นที่ไม่ได้รับความเสียหาย แสดงให้เห็นว่า PPO activity ที่พบในมะเขือเทศนั้นนอกจากจะเป็นกลไกการต้านทานที่เกิดจากการสร้างขึ้นตลอดเวลา (constitutive defense) แล้วยังสามารถถูกชักนำให้สร้างเพิ่มขึ้นได้เมื่อถูกหนอนกระทู้ผักเข้าทำลาย (induced defense) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานทดลองอื่น ๆ ที่ผ่านมา โดย Stout et al. (1994; 1998) ที่พบว่า ต้นมะเขือเทศที่ถูกทำลายโดยหนอนกระทู้ข้าวโพด (*Mythimna separate* Walker) มีระดับ PPO activity สูงกว่าต้นที่ไม่ถูกทำลาย นอกจากนี้ Rickman et al. (2003) ให้หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* (Hübner)) กัดกินใบมะเขือเทศเป็นเวลา 3 วัน พบว่าใบมะเขือเทศที่ถูกหนอนกัดกินมีระดับ PPO activity สูงกว่าใบที่ไม่ถูกกัดกิน



ภาพที่ 11 ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศข้อต่าง ๆ เมื่อให้หนอนกระตุ้มักัดกินใบข้อที่ 4 ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางการเคลื่อนที่ของสัญญาณ



ภาพที่ 12 ระดับ PPO activity ในใบมะเขือเทศข้อต่าง ๆ เมื่อให้หนอนกระตุ้มักัดกินใบข้อที่ 6 ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางการเคลื่อนที่ของสัญญาณ

และยังสอดคล้องกับ (Bhonwong et al., 2009) ซึ่งพบว่า การเข้าทำลายของหนอนกระทู้หอมบนใบมะเขือเทศข้อที่ 4 และข้อที่ 8 กระตุ้นระดับ PPO activity ให้สูงขึ้นกว่าเดิม ซึ่งการกระตุ้นสร้าง PPO เพิ่มขึ้น อาจเป็นผลมาจากสัญญาณที่พืชได้รับในบริเวณที่เกิดบาดแผล แล้วเกิดการกระตุ้นเอนไซม์ไลพอกซีจีเนส (lipoxygenase; LOX) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยา peroxidation ของไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการปล่อย linolenic acid เข้าสู่ octadecanoid pathway แล้วนำไปสู่การสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเพิ่มขึ้น ซึ่งได้แก่ methyl jasmonate (MJ) และ reactive oxygen species (ROS) โดยโมเลกุลเหล่านี้จะไปกระตุ้นให้ยีนต้านทาน (defense genes) ทำงาน เกิดการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช รวมถึงกระตุ้นให้สร้าง PPO เพิ่มขึ้นด้วย (Sommer et al., 1994; Fidantsef et al., 1999; Orozco-Cardenas et al., 2001 และ Koussevizky et al., 2004) ซึ่งสัญญาณที่พืชได้รับนี้อาจสร้างขึ้นโดยพืชเอง หรือมาจากแมลง (Stout et al., 1994) สัญญาณดังกล่าวอาจเป็น MJ หรือ เอทิลีนซึ่งเป็นสารระเหย หรืออาจเป็น jasmonic acid (JA) หรือ systemin (เปปไทด์ที่ประกอบด้วย 18 กรดอะมิโน) ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อลำเลียงได้ โดยพบว่าบาดแผลหรือ systemin สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานต่าง ๆ เช่น proteinase inhibitor (PI) และ PPOs นอกจากนี้การหลั่งสารบางชนิดของแมลงอาจมีส่วนชักนำการสร้าง JA ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นเพิ่มความต้านทานในพืชได้อีกด้วย (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554 และ Walters, 2011)

การกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์

สำหรับการเข้าทำลายโดยเพลี้ยแป้ง เมื่อให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวัดระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6 ทั้งก่อนและหลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้ง เพื่อประเมินการกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity ในเนื้อเยื่อมะเขือเทศทั้งในบริเวณที่เกิดบาดแผล และทั่วทั้งลำต้น พบว่าการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งบนใบข้อที่ 4 ทำให้ระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4 ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดบาดแผล และในใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ส่วนใหญ่ไม่แตกต่างจากก่อนการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 1-2 ที่อยู่บริเวณยอดภายในต้นเดียวกันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกันแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งบนใบข้อที่ 4 ไม่สามารถกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity ในเนื้อเยื่อมะเขือเทศทั้งในบริเวณที่เกิดบาดแผล และทั่วทั้งลำต้นได้เด่นชัดเท่าหนอนกระทู้ผัก

ส่วนการให้เพลี้ยแป้งดูดกินบนใบข้อที่ 6 พบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 6 ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดบาดแผลและในใบข้อที่ 4 และใบข้อที่ 1-2 ที่อยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกัน มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า การเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งบนใบข้อที่ 6

ไม่สามารถกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity ในเนื้อเยื่อมะเขือเทศทั้งในบริเวณที่เกิดบาดแผล และทั่วทั้งลำต้นได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบระดับ PPO activity จากการเข้าทำลายของแมลงทั้ง 2 ชนิด พบว่าการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักซึ่งเป็นตัวแทนของแมลงปากกัดกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ในใบที่ถูกทำลายโดยตรงสูงกว่าการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งซึ่งเป็นตัวแทนของแมลงปากดูด อาจเนื่องมาจากความรุนแรงของบาดแผลที่ถูกหนอนกัดกินนั้นมีมากกว่าบาดแผลที่เพลี้ยเจาะดูดน้ำเลี้ยงจากท่อลำเลียงซึ่งทำให้ระดับ PPO activity เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและไม่แตกต่างทางสถิติ นอกจากนี้แมลงปากดูดบางชนิด เช่น เพลี้ยอ่อนและแมลงหวี่ขาว สามารถกระตุ้นระบบส่งสัญญาณจำเพาะแบบยีนต่อยีน ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเพลี้ยและแมลงปากดูดชนิดอื่นกับพืชแตกต่างจากแมลงปากกัดซึ่งสร้างความเสียหายแก่เนื้อเยื่อพืชอย่างมาก (ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์, 2554)

อย่างไรก็ตาม หากเพิ่มจำนวนเพลี้ยแป้งที่เข้าทำลายให้มากขึ้นอาจส่งผลให้ระดับ PPO activity หลังการเข้าทำลายเพิ่มขึ้นด้วย และอาจพบการส่งสัญญาณขึ้นหรือลงภายในต้นเดียวกัน เช่นเดียวกับหนอนกระทู้ผัก ซึ่งควรทำการศึกษาต่อไป

การแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก

จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F ในใบของมะเขือเทศคัดแปลงพันธุกรรมโดยการถ่ายยีน PPO promoter::GUS fusion อายุ 6-8 สัปดาห์ โดยให้หนอนกระทู้ผัก เข้าทำลายใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ ยีนในใบข้อที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 ก้านใบข้อที่ 4 ใบข้อที่ 6 ก้านใบข้อที่ 6 ลำต้นข้อที่ 3-4 และลำต้นข้อที่ 6-7 พบว่าในสถานะปกติมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน PPO promoter::GUS fusion มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน เช่น ใน PPO B มักพบการแสดงออกในใบอ่อนและดอกอ่อน ส่วนใน PPO D พบการแสดงออกในใบแก่ข้อที่ 6-7 จากการทดลองพบว่าเมื่อต้นมะเขือเทศได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ระดับการแสดงออกของยีน PPO B และ PPO D เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการกระตุ้นในระดับการลอรหัสพันธุกรรม ส่วนใน PPO A, E และ F ไม่พบการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก เมื่อให้หนอนกระทู้ผักกัดกินใบข้อที่ 4 พบการกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B ในใบข้อที่ 4 โดยมีการแสดงออกอย่างชัดเจนที่เส้นใบหลัก (major veins) เส้นใบย่อย (minor veins) และก้านใบ (petiole) ข้อที่ 4 ในบริเวณเนื้อเยื่อลำเลียงอาหาร (phloem) และพาเรนไคมา ของท่อลำเลียงน้ำ (xylem parenchyma) รวมถึงวาสคิวลาร์แคมเบียม (vascular cambium) และบริเวณเอพิเดอร์มิส นอกจากนี้ ยังพบการส่งสัญญาณจากบริเวณที่เกิดบาดแผล ทำให้มีการกระตุ้นการแสดงออกที่บริเวณใบอ่อน (ข้อที่ 1-2) ซึ่งอยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกัน และพบการ

กระตุ้นการแสดงออกในใบและก้านใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่างภายในต้นเดียวกันด้วย แต่ระดับการแสดงออกต่ำกว่าในใบที่ถูกกักกินโดยตรง นอกจากนี้ PPO B ยังแสดงออกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อลำต้นข้อที่ 3-4 บริเวณรอยต่อระหว่างก้านใบกับลำต้น (abscission zones) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการหลุดร่วงของใบแสดงให้เห็นว่าการกักกินโดยหนอนกระตุ้นการทำงานของ PPO B promoter เป็นผลให้ระดับ GUS activity เพิ่มขึ้น โดยมีการกระตุ้นการแสดงออกทั้งบริเวณใกล้ ๆ บาดแผล และมีการส่งสัญญาณไปยังส่วนอื่น ๆ ทั้งด้านบนและด้านล่างของต้นเดียวกัน (ภาพที่ 13) ส่วนการให้หนอนกักกินใบแก่ (ข้อที่ 6) พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเฉพาะในใบ และก้านใบที่ได้รับ ความเสียหาย ส่วนในเนื้อเยื่อ อื่น ๆ ไม่พบการกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B (ภาพที่ 14) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าระยะการพัฒนาของใบมีผลต่อระดับการตอบสนองของ PPO B ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระตุ้น โดยพบการตอบสนองสูงกว่าในใบที่มีอายุน้อยกว่า

สำหรับ PPO D เมื่อให้หนอนกักกินใบข้อที่ 4 พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 4 ซึ่งได้รับความเสียหายที่เส้นใบหลัก เส้นใบย่อย และก้านใบข้อที่ 4 ในบริเวณต่อลำเลียงอาหาร และพารานไคมาของท่อลำเลียงน้ำ และในบางชิ้นพบการกระตุ้นการแสดงออกของ PPO D ในเซลล์พิชของของลำต้นข้อที่ 3-4 แต่ไม่พบการกระตุ้นการแสดงออกในใบข้อที่ 1-2 ซึ่งอยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกันและในใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่างภายในต้นเดียวกัน (ภาพที่ 13) ส่วนใน PPO D ให้หนอนกักกินใบแก่ (ข้อที่ 6) พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 6 ในใบบริเวณเส้นใบหลัก เส้นใบย่อย และก้านใบข้อที่ 6 ที่ได้รับความเสียหาย และพบการกระตุ้นการแสดงออกในใบและก้านใบข้อที่ 4 ซึ่งอยู่ด้านบนของต้นเดียวกัน ผลการทดลองนี้ บ่งชี้ว่าระยะการพัฒนาของใบมีผลต่อระดับการตอบสนองของ PPO D ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระตุ้น โดยพบการตอบสนองสูงกว่าในใบที่ได้รับ ความเสียหาย (ภาพที่ 14)

จะเห็นได้ว่าทั้ง PPO B และ PPO D มีการกระตุ้นการแสดงออกในเนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกกักกิน และบริเวณใกล้เคียงในระดับสูงกว่าบริเวณที่ห่างไกลออกไป เมื่อหนอนกักกินใบข้อที่ 4 ซึ่งเป็นใบแก่เต็มที่พบการแสดงออกของ PPO B สูงกว่า PPO D ในทางตรงข้ามเมื่อหนอนกักกินใบข้อที่ 6 ซึ่งเป็นใบแก่พบว่า PPO D ตอบสนองสูงกว่า PPO B

การแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F เมื่อได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแฉักเบียดส์เลย์

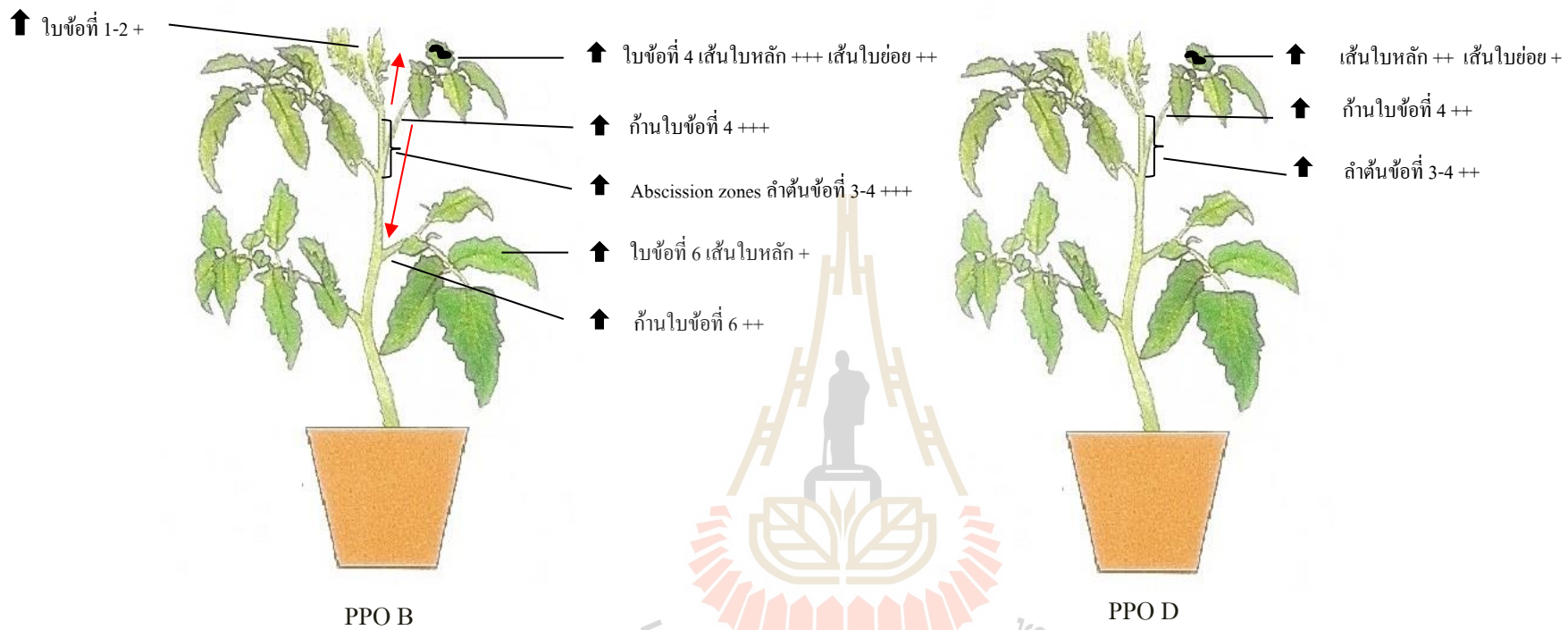
จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F ในใบของมะเขือเทศ คัดแปลงพันธุกรรมโดยการถ่ายยีน PPO promoter::GUS fusion อายุ 6-8 สัปดาห์ โดยให้เพลี้ยแป้งเข้าทำลายใบข้อที่ 4 หรือข้อที่ 6 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในใบข้อ

ที่ 1-2 ใบข้อที่ 4 ก้านใบข้อที่ 4 ใบข้อที่ 6 ก้านใบข้อที่ 6 ลำต้นข้อที่ 3-4 และลำต้นข้อที่ 6-7 พบว่า PPO A, E และ F ไม่ตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้ง

เมื่อให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 4 พบการแสดงออกของ PPO B เพิ่มขึ้นในใบข้อที่ 4 ซึ่งเป็นใบที่ถูกดูดกินบริเวณเส้นใบหลัก เส้นใบย่อย และก้านใบข้อที่ 4 ในบริเวณพารนไคมาของท่อลำเลียงน้ำ ท่อลำเลียงอาหารและบริเวณเอพิเคอร์มิส แต่ไม่พบการกระตุ้นการแสดงออกในใบที่ไม่ถูกดูดกินทั้งในใบข้อที่ 6 ซึ่งอยู่ด้านล่างและในใบข้อที่ 1-2 ซึ่งอยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกัน (ภาพที่ 15)

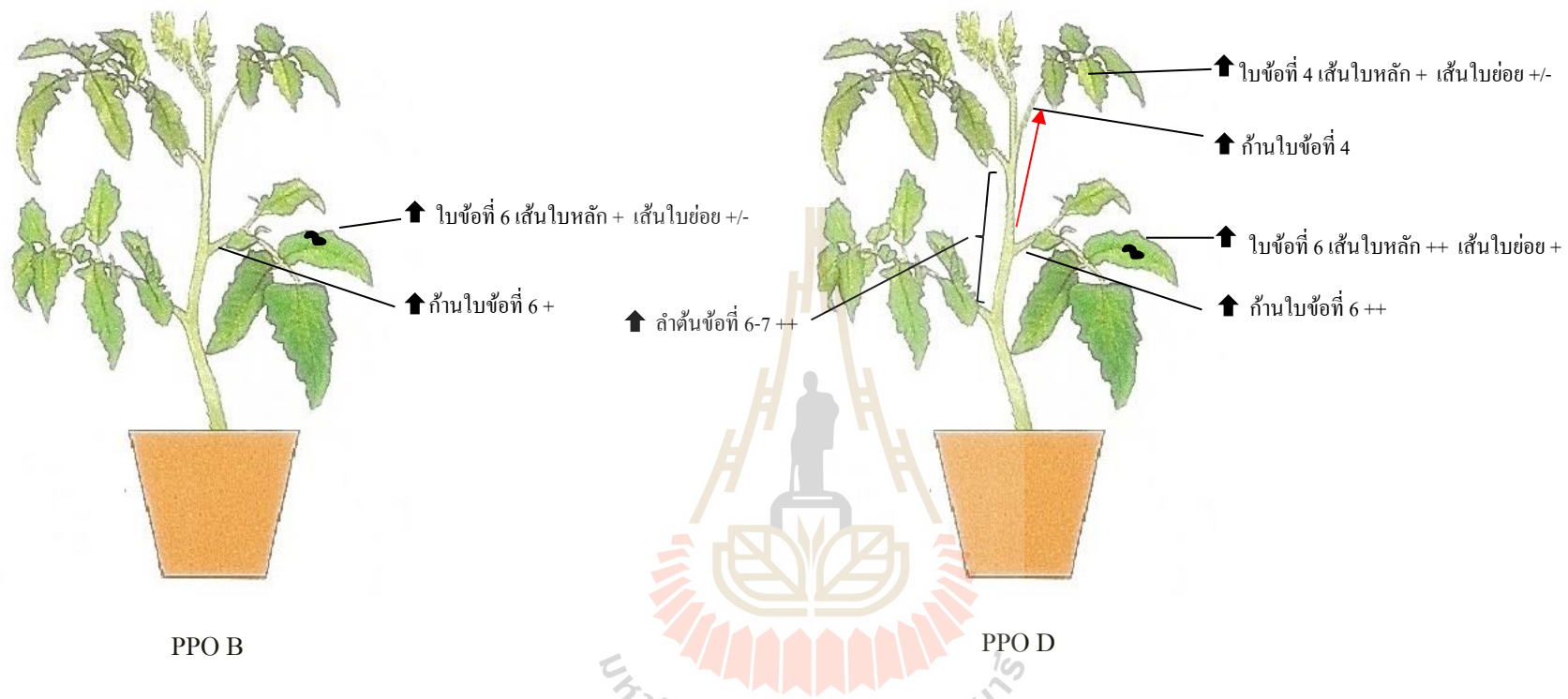
เมื่อให้เพลี้ยแป้งดูดกินบนใบข้อที่ 6 พบการแสดงออกของ PPO B ในก้านใบข้อที่ 6 บริเวณพารนไคมาของท่อลำเลียงน้ำและท่อลำเลียงอาหาร แต่ไม่พบการกระตุ้นการแสดงออกในใบที่ไม่ถูกดูดกินทั้งในใบข้อที่ 4 และในใบข้อที่ 1-2 ซึ่งอยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกัน (ภาพที่ 16)





ภาพที่ 13 การกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B (ซ้าย) และ PPO D (ขวา) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศเมื่อให้ฮอร์โมนกระตุ้นที่ข้อที่ 4

- + พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับปานกลาง
 - ++ พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับสูง
 - +++ พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับสูงมาก
- ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางเคลื่อนที่ของสัญญาณ



ภาพที่ 14 การกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B (ซ้าย) และ PPO D (ขวา) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศเมื่อให้หนอนกระทุ้ผักกาดกินโอบข้อที่ 6

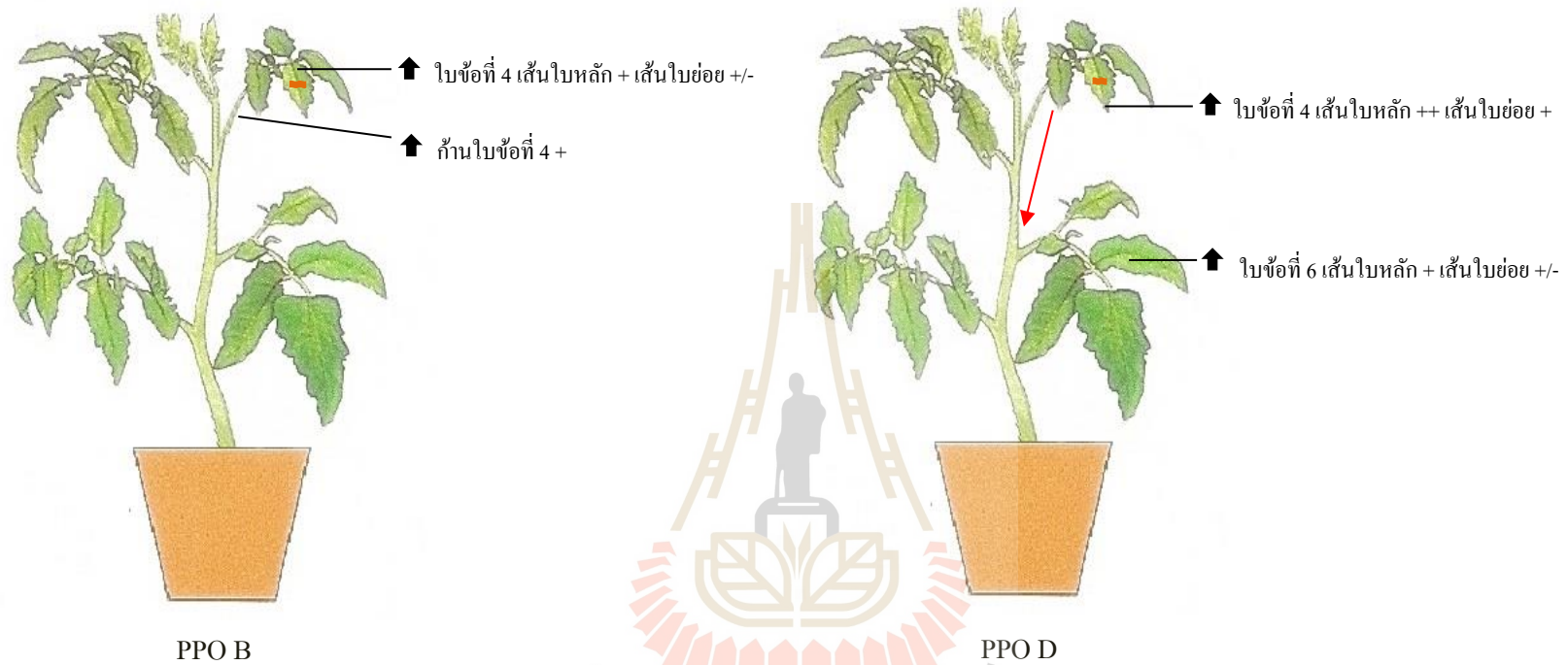
- +/- พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับต่ำ
 - + พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับปานกลาง
 - ++ พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับสูง
- ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางเคลื่อนที่ของสัญญาณ

สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของ PPO D เมื่อให้เพ็ลี่ยดูดกินบนใบข้อที่ 4 พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเส้นใบหลัก และเส้นใบย่อยของใบข้อที่ 4 และใบข้อที่ 6 แต่ไม่พบการกระตุ้นการแสดงออกในใบข้อที่ 1-2 ซึ่งอยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกัน (ภาพที่ 15)

เมื่อให้เพ็ลี่ยดูดกินบนใบข้อที่ 6 พบการแสดงออก PPO D เพิ่มขึ้นบริเวณเส้นใบหลัก และเส้นใบย่อย ของใบข้อที่ 6 โดยพบว่า บางชั้นมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นชัดเจนมากบริเวณเส้นใบหลัก ตรงตำแหน่งแผลเจาะดูด และพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในก้านใบข้อที่ 6 บริเวณพารนไคมาของท่อลำเลียงน้ำ และท่อลำเลียงอาหาร นอกจากนี้ พบการกระตุ้นการแสดงออกเล็กน้อยในใบข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกดูดกินแต่ไม่พบการแสดงออกในใบข้อที่ 1-2 ซึ่งอยู่ด้านบนภายในต้นเดียวกัน (ภาพที่ 16)

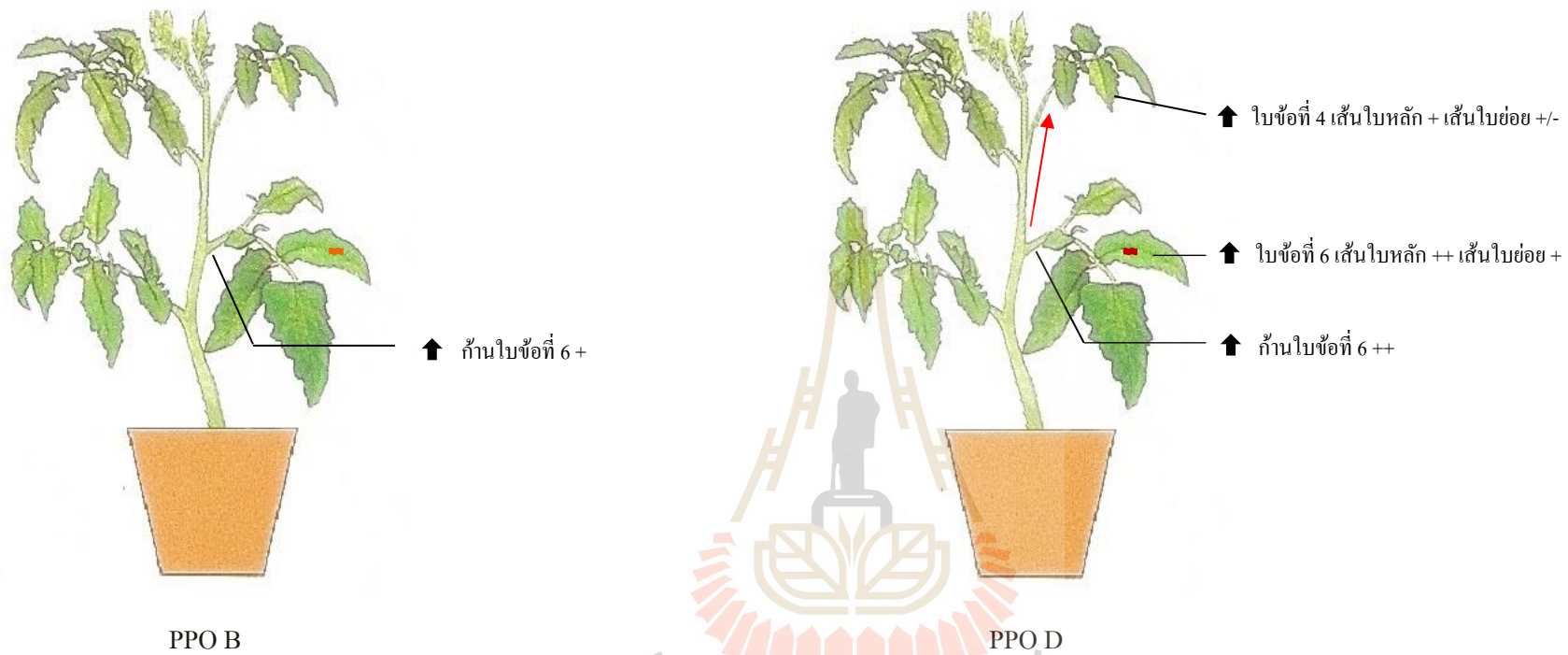
PPO B และ PPO D มีการกระตุ้นการแสดงออกในเนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกดูดกินและบริเวณใกล้เคียงในระดับสูงกว่าบริเวณที่อยู่ห่างออกไปเช่นเดียวกับการตอบสนองต่อหนอนกระทู้ฝัก อย่างไรก็ตาม พบว่าการกระตุ้นการแสดงออกของทั้ง PPO B และ PPO D ในการตอบสนองต่อเพ็ลี่ยแป้งมักจำกัดอยู่เฉพาะในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงเป็นส่วนใหญ่ และพบในเนื้อเยื่อบางชั้นเท่านั้น จึงอาจเป็นผลให้ระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศก่อนและหลังการเข้าทำลายไม่แตกต่างกันทางสถิติ

การที่การกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกของ PPO B และ PPO D ในการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเพ็ลี่ยแป้งแตกต่างจากหนอนกระทู้ฝัก อาจเนื่องจากเพ็ลี่ยแป้งเป็นแมลงประเภทปากดูด ซึ่งจะเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชผ่านการเจาะดูดและกินน้ำเลี้ยงจากท่อลำเลียงน้ำ และท่อลำเลียงอาหารโดยตรง ดังนั้นจึงมักพบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกเฉพาะในบริเวณเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหาร และพารนไคมาของท่อลำเลียงน้ำ



ภาพที่ 15 การกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B (ซ้าย) และ PPO D (ขวา) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศเมื่อให้เพ็ลลิวไรต์เจ็ลเบียดส์เลขคู่คินใบข้อที่ 4

- +/- พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับต่ำ
 - + พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับปานกลาง
 - ++ พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับสูง
- ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางเคลื่อนที่ของสัญญาณ



ภาพที่ 16 การกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B (ซ้าย) และ PPO D (ขวา) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศเมื่อให้เพ็ลลีสแป็งแจ็กเบียดส์เลย์ดูดกินใบข้อที่ 6

- +/- พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับต่ำ
 - + พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับปานกลาง
 - ++ พบการกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกในระดับสูง
- ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางเคลื่อนที่ของสัญญาณ

เมื่อถูกหนอนกระตุ้ผักและเพ็ลี่ยเป้งเข้าทำลาย มักพบการแสดงออกของ PPO B อย่างชัดเจนในบริเวณใบที่ถูกเข้าทำลายโดยตรง โดยเฉพาะที่เส้นใบหลักและเส้นใบย่อย คล้ายคลึงกับการตอบสนองต่อการขาดน้ำ (water stress) แต่การขาดน้ำกระตุ้นการแสดงออกในระดับสูงกว่าในใบแก่ (ข้อที่ 7) ในขณะที่แมลงกระตุ้นการแสดงออกในระดับสูงกว่าในใบแก่เต็มที่ (ข้อที่ 4) สำหรับ PPO D เมื่อถูกหนอนกระตุ้ผักและเพ็ลี่ยเป้งเข้าทำลายมักพบการแสดงออกเพิ่มขึ้น ที่เส้นใบหลัก และเส้นใบย่อย และยังพบที่ก้านใบ ซึ่งต่างจากการขาดน้ำ ที่ไม่พบการแสดงออกในบริเวณเหล่านี้ (Thipyapong et al., 2004b) PPO B และ PPO D เป็นยีน PPO เพียงสองยีนที่ตอบสนองต่อการขาดน้ำ เช่นเดียวกันกับการตอบสนองต่อแมลง โดยพบว่าในสภาวะแล้งทั้ง PPO B และ PPO D แสดงออกเพิ่มขึ้นในบริเวณ abscission zone ซึ่งอาจกระตุ้นการหลุดร่วงของใบแก่ เพื่อลดการคายน้ำและลดการตายของต้น สำหรับการตอบสนองต่อแมลงพบการกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B ใน abscission zone เช่นเดียวกัน แต่เมื่อถูกหนอนกระตุ้ผักกัดกินเท่านั้น ไม่พบเมื่อถูกเพ็ลี่ยเป้งเข้าทำลาย ซึ่ง Newman et al. (2011) พบว่าเอทิลีนสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B ในเนื้อเยื่อไม้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่บาดแผลรุนแรงจากการกัดกินของหนอนกระตุ้ผักกระตุ้นการสร้างเอทิลีน ที่ชักนำการแสดงออกของ PPO B ใน abscission zone ซึ่งอาจทำให้ใบหลุดร่วงเป็นการลดการเข้าทำลายของแมลงบนต้นพืช การสะสม PPO B ใน abscission zone จะช่วยส่งเสริมการตายของเซลล์และป้องกันการเข้าทำลายของโรคในบริเวณรอยแผลหลุดร่วง

จากการทดลองนี้ เมื่อให้หนอนกระตุ้ผักและเพ็ลี่ยเป้งเข้าทำลาย ไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นสำหรับ PPO F ทั้งในใบข้อที่ 4 และข้อที่ 6 ซึ่งให้ผลต่างจากการตอบสนองต่อโรคใบจุด (*Pseudomonas syringae*) ที่พบการแสดงออกของ PPO F เพิ่มขึ้นในบริเวณใกล้กับบาดแผลบนใบอ่อน ก้านใบข้อที่ 3 และลำต้นข้อ 7-8 ส่วนใน PPO D โรคใบจุดกระตุ้นการแสดงออกเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในใบแก่ข้อที่ 7 บริเวณเส้นใบหลักและเส้นใบย่อย และลำต้นข้อที่ 7-8 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการเข้าทำลายของหนอนกระตุ้ผัก ที่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในใบแก่ (ข้อที่ 6) บริเวณเส้นใบหลัก เส้นใบย่อย ก้านใบ และลำต้นบริเวณข้อที่ 6-7 นอกจากนี้ *P. syringae* ยังกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B ในบริเวณ abscission zone คล้ายคลึงกับการตอบสนองต่อหนอนกระตุ้ผัก (Thipyapong et al., 2004a)

ยีน PPO ต่าง ๆ มีรูปแบบการแสดงออกเพื่อตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระตุ้ผัก เพ็ลี่ยเป้งแจ็กเบียคส์เลย์ *P. syringae* และการขาดน้ำแตกต่างกัน บ่งชี้ว่าความเครียดแต่ละชนิดอาจเกี่ยวข้องกับระบบการส่งสัญญาณที่แตกต่างกันในเชิงปริมาณและ/หรือชนิดของสัญญาณ นอกจากนี้ยังแสดงถึงความซับซ้อนของการควบคุมการแสดงออกของสมาชิกยีน PPO แต่ละยีนเพื่อตอบสนองต่อปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ได้อย่างเหมาะสมและเอื้อต่อการอยู่รอดของพืช นอกจากนี้ ยังบ่งชี้ถึงบทบาทที่แตกต่างกันของยีน PPO แต่ละยีน PPO F น่าจะมีบทบาทสำคัญในการต้านทานโรค

ในขณะที่ PPO B และ PPO D อาจมีบทบาทสำคัญในการต้านทานแมลงศัตรูพืช

การเกิดการตอบสนองในเนื้อเยื่อต่าง ๆ มีผลดีต่อการต้านทานแมลงในพื้นที่ โดยอาจเกิดจากบทบาทของ SA, JA, MI, systemin และเอทิลีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นสัญญาณที่ส่งจากบริเวณบาดแผลที่ถูกเข้าทำลาย (local induction) ไปยังบริเวณอื่น ๆ ภายในต้นพืช เพื่อกระตุ้นให้เกิดความต้านทานในเนื้อเยื่อห่างไกล (systemic induction) (Muller et al., 1993; Doares et al., 1995; Bhonwong., 2009) อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้เข้าใจว่าสัญญาณใดมีบทบาทในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน PPO B และ PPO D ในการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของแมลงทั้งสองชนิด

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เลยกระตุ้นเพิ่มระดับของ PPO activity ในเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหาย ซึ่งพบว่าการกระตุ้นการแสดงออกของยีน PPO B และ D มักเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity นอกจากนี้ยังพบว่าการส่งสัญญาณจากเนื้อเยื่อที่ถูกแมลงเข้าทำลายไปยังเนื้อเยื่ออื่นในต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับความเสียหาย การกระตุ้นเพิ่มระดับ PPOs อาจช่วยลดการเข้าทำลายของแมลง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อให้มีระดับ PPOs สูงขึ้น อาจเพิ่มความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชและลดปริมาณการใช้สารเคมีในการควบคุม

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การเข้าทำลายของหนอนกระตุ้มเพิ่มระดับ PPO activity อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B และ PPO D โดยพบการกระตุ้นเพิ่มระดับสูงสุดในใบที่ถูกแมลงเข้าทำลายโดยตรง (local induction) นอกจากนี้ ยังพบการกระตุ้นเพิ่มในบริเวณอื่นของต้นเดียวกันด้วย (systemic induction) โดยมีการส่งสัญญาณจากใบที่ถูกเข้าทำลายทั้งขึ้นสู่ยอด และลงสู่ด้านล่าง ส่วนเปลือกแป้งแฉีกเบียดสลายกระตุ้นการแสดงออกของ PPO B และ PPO D เช่นเดียวกันแต่พบในระดับต่ำกว่า และการกระตุ้นการแสดงออกมักจำกัดอยู่เฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อลำเลียง เป็นผลให้ระดับ PPO activity ก่อนและหลังดูดกินไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับ PPO B มักพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในใบที่แก่เต็มที่ (ข้อที่ 4) ส่วน PPO D มักพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นใบใบแก่ (ข้อที่ 6) ผลการทดลองนี้แสดงว่า PPO B และ PPO D น่าจะมีบทบาทสำคัญในการต้านทานแมลง ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

ความรู้ที่ได้นี้ อาจนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศหรือพืชอื่น ๆ ให้ต้านทานแมลง โดยเพิ่มระดับ PPO ให้สูงขึ้นซึ่งอาจเพิ่มความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืช ช่วยลดปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่นอกจากจะเป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้ใช้และผู้บริโภค แล้วยังเป็นสารพิษปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วย

รายการอ้างอิง

- กระทรวงการคลัง. (2543) โรงงานยาสูบ. กำจัดแมลงโดยวิธีธรรมชาติ [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://thaitobacco.or.th/บทความทั่วไป>.
- กองกัญและสัตววิทยา. (2543). **แมลงศัตรูผัก**. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
กรุงเทพฯ. 97 หน้า.
- กิตติ บุญเลิศนรินทร์ และเชน รอดศิริ. (2550). **การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศรับประทานผลสดภายใต้สภาพโรงเรือน**. รายงานการวิจัย. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ วิทยาเขตพระนครศรีอยุธยา.
- เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์. (2538). **มะเขือเทศ**. ฐานเกษตรกรรม. นนทบุรี. 63 หน้า.
- ทัศนีย์ แจ่มจรรยา. (2533). **บทปฏิบัติการกัญญาวิทยาเบื้องต้น**. ภาควิชากัญญาวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 168 หน้า.
- ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และวัชรินทร์ ชู่นสุวรรณ. (2543). **เอกสารคำสอนวิชาหลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 199 หน้า.
- นุชนารถ จงเลขา. (2546). **การควบคุมโรคและศัตรูต่าง ๆ ของพืชผักแบบผสมผสาน**. ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง. หน้า 101-103.
- นพพร สายัมพล. (2543). **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 261 หน้า.
- นงพร กิจบำรุง, ปิยรัตน์ เขียนมีสุข, จักรพงศ์ พิริยพล, อุทัย เกตุนุติ และสมรวย รุ่งรัตนาวี. (2543). **แมลงศัตรูมะเขือเทศและการป้องกันกำจัด. การประชุมวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 12 ณ โรงแรมมารีออर्डิด รีสอร์ท จังหวัด ชลบุรี วันที่ 28-31 มีนาคม**. หน้า 267-280.
- ปริญญา ชินโนรส. (2530). **พืชด้านทานแมลง**. ว. กัญและสัตววิทยา 9: 51-57.
- ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. (2551). **การปลูกและขยายพันธุ์พริก พืชเศรษฐกิจสร้อยแรง สร้างเงินล้าน**. สำนักพิมพ์เพชรกระรัต. กรุงเทพฯ. 104 หน้า.
- ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์. (2554). **การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ด้านทานศัตรูพืช**. หจก. โคราชมาร์เก็ตติ้ง แอนด์ โปรดักส์ชั่น. นครราชสีมา. 199 หน้า.
- พิสุทธ์ เอกอำนาจ. (2550). **โรคและแมลงของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ**. โรงพิมพ์อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ. หน้า 348-353.

- เมฆ จันทร์ประยูร. (2548). **ผักพื้นบ้าน: เกล็ดลับคนอายุยืน**. บริษัท จูนพับลิชชิ่ง จำกัด. กรุงเทพฯ. 134 หน้า.
- รุจ มรกต, สุมาลี ควรวัดต์, กฤษณีย์ บรรจงปรี, ปฐมวดี บุตรกร และจุฑารัตน์ พรหมพุก. (มปป). **สู้รัฐ เพลี้ยแป้งศัตรูมันสำปะหลัง**. สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 31 หน้า.
- ศศิธร วุฒิปาณิชย์. (2549). **โรคของผักและการควบคุมโรค**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 58-76.
- ศักดิ์ สุนทรสิงห์. (2537). **โรคของผักและการป้องกันกำจัด**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 86-101.
- แสน ดิถวิฒนานนท์. (2520). **แมลงศัตรูผักบางชนิดในภาคกลางของประเทศไทย และการป้องกันกำจัด**. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อนงค์นุช ผลวงษ์. (2548). **บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในมะเขือเทศต่อการเข้าทำลายของหนอนเจาะสมอฝ้าย [*Heliothis armigera* (Hübner)] และหนอนกระทู้หอม [*Spodoptera exigua* (Hübner)]**. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- อนงค์ จันทร์ศรีกุล. (2536). **โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันกำจัด**. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิชย์. กรุงเทพฯ. หน้า 6-13.
- อร่าม กลุ่มทรัพย์. (2543). **เกษตรเศรษฐกิจในครัวเรือน ไม้ประดับเชิงธุรกิจ: เพื่อเศรษฐกิจพอเพียงตามแนวพระราชดำริในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว**. ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงพิมพ์อักษรไทย. กรุงเทพฯ. 111 หน้า.
- อินทวัฒน์ บุรีคำ. (2530). **บทปฏิบัติการทางเกษตร**. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 209 หน้า.
- Bachem, C.W.B., Speckmann, G.J., Van der Linde, P.C.G., Verheggen, F.T.M., Hunt, M.D., Steffens, J.C. and Zabeau, M. (1994). Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. **Biotechnol. J.** 12: 1101-1105.
- Bhonwong, A., Stout, M.J., Attajarusit, J. and Tantasawat, P. (2009). Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*). **J. Chem. Ecol.** 35: 28-38.
- Bolwell, G.P. (1995). Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants. **Trends Biochem. Sci.** 20: 492-495.

- Boo, H.O., Heo, B.K., Gorinstein, S. and Chon, S.U. (2011). Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. **Plant Sci.** 181: 479-484.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Chapman, A.D. (2006). **Numbers of Living Species in Australia and the World.** Australian Biological Resources Study. Canberra, Australia. 61 p.
- Cipollini, D.F. and Redman, A.M. (1999). Age-dependent effects of jasmonic acid treatment and wind exposure on foliar oxidase activity and insect resistance in tomato. **J. Chem. Ecol.** 25: 271-281.
- Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavsek, J. and Tumer, N. (2001). Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. **J. Agri. Food Chem.** 49: 652-657.
- Constabel, C.P., Bergey, D.R. and Ryan, C.A. (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92: 407-411.
- Constabel, C.P. and Ryan, C.A. (1998). A survey of wound and methyl jasmonate induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. **Phytochemistry** 47: 507-511.
- Constabel, C.P., Yip, L., Patton, J.J. and Christopher, M.E. (2000). Polyphenol oxidase from hybrid poplar cloning and expression in response to wounding and herbivory. **Plant Physiol.** 124: 285-295.
- Coseteng, M.Y. and Lee, C.Y. (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. **J. Food Sci.** 52: 985-989.
- Doares, S.H., Narvaez-Vasquez, J., Conconi, A. and Ryan, C.A. (1995). Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. **Plant Physiol.** 108: 1741-1746.
- Dorais, M., Papadopoulos, A.P. and Gosselin, A. (2010). **Greenhouse Tomato Fruit Quality.** John Wiley & Sons, Inc. USA. 339 p.
- Duffey, S.S. and Felton, G.W. (1991). Enzymatic antinutritive defenses of the tomato plant against insects. In Hedin, P.A. (ed.). Naturally Occurring Pest Bioregulators. American Chemical Society. Washington DC, USA. pp. 167-197.

- Esterbauer, H., Schwarzl, E. and Hayn, M. (1977). A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid. **Anal. Biochem.** 77: 468-494.
- Felton, G.W., Donato, K., Del Vecchio, R.J. and Duffey, S.S. (1989). Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **J. Chem. Ecol.** 15: 2667-2694.
- Fidantsef, A.L., Stout, M.J., Thaler, J.S., Duffey, S.S. and Bostock, R.M. (1999). Signal interaction in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II and pathogenesis-related protein P4 in the tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 54: 97-114.
- Galeazzi, M.A., Sgarbieri, V.C. and Constantinides, S.M. (1981). Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidases (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L). **J. food Sci.** 46: 150-155.
- Gatehouse, J.A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytol.** 156: 145-169.
- Hertog, M., Hollman, P. and Katan, M. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherland. **J. Agri. Food Chem.** 40: 2379-2383.
- Horber, E. (1980). Types and classification of resistance. In Maxwell, F.G. and Jennings, P.R. (eds.). *Breeding Plants Resistant to Insects*. Wiley. New York, USA. pp. 15-21.
- Karban, R. and Baldwin, I.T. (1997). **Induced responses to herbivory**. University of Chicago Press., Illinois, USA.
- Karban, R., Baldwin, I.T., Baxter, K.J., Laue, G. and Felton, G.W. (2000). Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. **Oecologia** 125: 66-71.
- Kisha, J.S.A. (1981). Observations on the trapping of the whitefly *Bemisia tabaci* by glandular hairs on tomato leaves. **Ann. Appl. Biol.** 97: 123-127.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. and Chory, J. (2007). Multiple signals from damaged chloroplasts converge on a common pathway to regulate nuclear gene expression. **Science** 316: 715-719.
- Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M. and Dixon, R.A. (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell** 56: 215-224.

- Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). **SPSS Programming and Data Management**, 3rd Edition. SPSS Institute. USA. 540 p.
- Luckwill, L. C. (1943). **The genus Lycopersicon: an Historical, Biological and Taxonomical Survey of the Wild and Cultivated Tomatoes**. Aberdeen Univ. Stud. 44 p.
- Li, L. and Steffens, J.C. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta** 215: 239-247.
- Mahanil, S., Attajarusit, J., Stout, M.J. and Thipyapong, P. (2008). Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. **Plant Sci.** 174: 456-466.
- Mayer, A.M. and Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry** 18: 193-215.
- McDowell, E.T., Kapteyn, J., Schmidt, A., Li, C., Kang, J.H., Descour, F. S., Larson, M., Schillmiller, A., Lingling, A., Jones, A.D., Pichersky, E., Soderlund, C.A. and Gang, D.R. (2011). Comparative functional genomic analysis of Solanum glandular trichome types. **Plant Physiol.** 155: 524-539.
- Moore, B.M. and Flurkey, W.H. (1990). Sodium dodecylsulfate activation of a plant polyphenol oxidase. **J. Biol. Chem.** 265: 4982-4988.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E. and Zenk, M.H. (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 90: 7490-7494.
- Newman, S.M., Eannetta, N.T., Yu, H., Prince, J., Tanksley S.D. and Steffens, J.C. (1993). Characterization of the tomato polyphenol oxidase gene family. **Plant Mol. Biol.** 21: 1035-1052.
- Newman, S.M., Tantasawat, P. and Steffens, J.C. (2011). Tomato polyphenol oxidase B is spatially and temporally regulated during development and in response to ethylene. **Molecules** 16: 493-517.
- Ngadze, E., Icishahayo, D., Coutinho, T.A. and Van der Waals, J.E. (2011). Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. **Plant Dis.** 96: 186-192.
- Norris, D.M. and Kogan, M. (1980). Biochemical and morphological bases of resistance. In Maxwell, F.G. and Jennings, R. (eds.). **Breeding Plants Resistant to Insects**. John Wiley. New York, USA. pp. 23-61.

- Orozco-Cardenas, M.L., Narvaez-Vasquez, J. and Ryan, C.A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense gene in tomato plants in response to wounding, systemin and methyl jasmonate. **The Plant Cell** 13: 179-191.
- Padgham, D.E., Kimmins, F.M. and Ranga Rao, G.V. (1990). Resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to *Aphis craccivora* (Koch). **Ann. Appl. Biol.** 117: 285-294.
- Painter, N.S. (1968). Diverticular disease of the colon. **Br. Med. J.** 3: 475-479.
- Panda, N. and Khush, G.S. (1995). **Host Plant Resistance to Insect**. Biddles Ltd. Oxon, UK. 431 p.
- Pathak, M.D. (1977). Defense of the rice crop against pests. **Ann. Acad. Sci.** 287: 287-295.
- Pizzocaro, F., Torreggiani, D. and Gilardi, G. (1993). Inhibition of apple polyphenol oxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. **J. Food Process Pres.** 17: 21-30.
- Queiroz, C., Ribeiro da Silva, A.J., Lopes, M.L.M., Fialho, E. and Valente-Mesquita, V.L. (2011). Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. **Food Chem.** 125: 128-132.
- Ramzan, M., Singh, D. and Bindra, O.S. (1982). Determination of economic threshold of cotton jassid, *Amrasca biguttula* (Ishida) on Okra. **Indian J. Ecol.** 9: 113-117.
- Rickman, E., Edwards, L. and Wise, E. (2003). The effect of induced defenses of the tomato plant on the performance and preference of the generalist beet armyworm and the specialist tobacco hornworm. **Plant-Animal Interact.** 3: 1-7.
- Schillinger, J.A. (1969). Three laboratory techniques for screening small grains for resistance to the cereal leaf beetle. **J. Econ. Entomol.** 62: 360-363.
- Sharma, H.C. (2005). **Heliothis/Helicoverpa Management: Emerging Trends and Strategies for Future Research**. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. UK. 469 p.
- Sharma, J., Satya, S., Kumar, V. and Tewary, D.K. (2005). Dissipation of pesticides during bread-making. **J. Chem. Health Saf.** 12: 17-22.
- Shelomi, M., Perkins, L.E., Cribb, B.W. and Zalucki, M.P. (2010). Effects of leaf surfaces on first-instar *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) behaviour. **Aust. J. Entomol.** 49: 289-295.
- Simmons, A.T., Gurr, G.M., McGrath, D., Martin, P.M. and Nicol, H.I. (2004). Entrapment of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on glandular trichomes of *Lycopersicon* species. **Aust. J. Entomol.** 43: 196-200.

- Srinivasan, R. (2010). **Safer Tomato Production Methods: A Field Guide for Soil Fertility and Pest Management**. AVRDC-The World Vegetable Center. Shanhua, Taiwan. 97 p.
- Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M. and Harel, E. (1994). Import, targeting and processing of plant polyphenol oxidase. **Plant Physiol.** 105: 1301-1311.
- Steffens, J.C. Harel, E. and Hunt, M.D. (1994). Polyphenol oxidase. In Ellio, B., Kuroki, G.W. and Stafford, H.A. (eds.). *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Plenum Press. New York, USA. pp. 275-312.
- Steffens, J.C. and Walters, D.S. (1991). Biochemical Aspects of glandular trichome-mediated insect resistance in the Solanaceae In Hedin, P.A. (ed.). *Naturally Occurring Pest Bioregulators*. ACS Press. Washinton DC, USA. pp. 136-149.
- Stoner, A.K., Frank, J.A. and Gentile, A.G. (1968). The relationship of glandular hairs on tomatoes to spider mite resistance. **Amer. Soc. Hort. Sci.** 93: 532-538.
- Stout, M.J., Fidantsef, A.L., Duffey, S.S. and Bostock, R.M. (1999). Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 54: 115-130.
- Stout, M.J., Workman, J. and Duffey, S.S. (1994). Differential induction of tomato foliar proteins by arthropod herbivores. **J. Chem. Ecol.** 20: 2575-2594.
- Stout, M.J., Workman, K.V., Bostock, R.M. and Duffey, S.S. (1998). Stimulation and attenuation of induced resistance by elicitors and inhibitors of chemical induction in tomato (*Lycopersicon esculentum*) foliage. **Entomol. Exp. Appl.** 86: 267-279.
- Stout, M.J., Workman, K.V., Bostock, R.M. and Duffey, S.S. (1998). Specificity of induced resistance in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Oecologia** 113: 74-81.
- Tallamy, D.W. and Raupp, M.J. (1991). **Phytochemical Induction by Herbivores**. John Wiley & Sons. New York, USA. 431 p.
- Thaler, J.S., Fidantsef, A.L., Duffey, S.S. and Bostock, R.M. (1999). Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. **J. Chem. Ecol.** 25: 1597-1609.
- Thaler, J.S., Karban, R., Ullman Karina Boege, D.E. and Bostock, R.M. (2002). Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites. **Oecologia** 131: 227-235.

- Thipyapong, P., Hunt, M. and Steffens, J.C. (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. **Phytochemistry** 40: 673-676.
- Thipyapong, P., Hunt, M. and Steffens, J.C. (2004a). Antisense down regulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta** 220: 105-117.
- Thipyapong, P., Melkonian, J. Wolfe, D.W. and Steffens, J.C. (2004b). Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. **Plant Sci.** 167: 693-703.
- Thipyapong, P. and Steffens, J.C. (1997). Tomato polyphenol oxidase: differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. **Plant Physiol.** 115: 409-418.
- Thipyapong, P., Stout, M.J. and Attajarusit, J. (2007). Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. **Molecules** 12: 1569-1595.
- Tian, D., Tooker, J., Peiffer, M., Chung, S.H. and Felton, G.W. (2012). Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Planta** 236: 1053-1066.
- Tingey, W., Plaisted, R., Laubengayer, J. and Mehlenbacher, S. (1982). Green peach aphid resistance by glandular trichomes in *Solanum tuberosum* × *S. berthaultii* hybrids. **Amer. Pot. J.** 59: 241-251.
- Tingey, W. and Sinden, S. (1982). Glandular pubescence, glycoalkaloid composition and resistance to the green peach aphid, potato leafhopper, and potato fleabeetle in *Solanum berthaultii*. **Amer. Pot. J.** 59: 95-106.
- Vaidya, B.K., Suthar, H.K., Kasture, S. and Nene, S. (2006). Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. **Biochem. Eng. J.** 28: 161-166.
- Ünal, M.Ü. (2007). Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). **Food Chem.** 100: 909-913.
- Wallace, L.E., McNeal, F.H. and Berg, M.A. (1973). Minimum stem solidness required in wheat for resistance to the wheat stem sawfly. **J. Econ. Entomol.** 66: 1122-1123.
- Walters, D.R. (2011). Plant defense: Warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants. Wiley-Blackwell. West Sussex, UK.
- Wang, J. and Constabel, C.P. (2004). Polyphenol oxidase overexpression in transgenic populus enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). **Planta** 220: 87-96.

- War, A.R., Paulraj, M.G., Ignacimuthu, S. and Sharma, H.C. (2013). Defensive responses in groundnut against chewing and sap-sucking insects. **J. Plant Growth Regul.** 32: 259-272.
- Whitaker, J.R. and Lee, C.Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning: an overview. In Lee, C.Y. and Whitaker, J.R. (eds.). *Enzymic Browning and It's Prevention*. ACS Sym. Washington DC, USA. pp. 2-7.





ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียม BSA standard ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ในการตรวจสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนรวม

	ปริมาตรที่ต้องเติม (μl)							
BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0	1	2	5	10	15	20	25
Homogenization buffer	10	10	10	10	10	10	10	10
ddH ₂ O	990	989	988	985	980	975	970	965
ปริมาตรรวม	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเตรียม homogenate ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 μl ในปริมาตร 1,000 μl ในการตรวจสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนรวม

	ปริมาตรที่ต้องเติม (μl)	
Homogenate	5	10
Homogenization buffer	5	0
ddH ₂ O	990	990
ปริมาตรรวม	1,000	1,000

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าการวิเคราะห์ห่าเวียนซ์ของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกัดกิน (control) กัดกินใบข้อที่ 4 และกัดกินใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	21.19	10.59	2.714ns
Error	16	62.45	3.90	
Total	18	83.64		

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าการวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกักดิน (control) กักดินไบข้อที่ 4 และกักดินไบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของหนอนกระทุ้ค ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	3.95	1.97	1.12ns
Error	18	31.79	1.75	
Total	20	35.74		

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าการวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกักดิน (control) กักดินไบข้อที่ 4 และกักดินไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทุ้ค ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	1043.48	521.738	9.227**
Error	17	961.31	56.548	
Total	19	2004.79		

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค่าการวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกักดิน (control) กักดินไบข้อที่ 4 และกักดินไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทุ้ค ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	439.61	219.81	13.09**
Error	18	302.18	16.788	
Total	20	741.79		

ตารางภาคผนวกที่ 7 ค่าการวิเคราะห์ห่าเวียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 1-2 ที่ไม่ถูกกักดิน (control) กักดินไบข้อที่ 4 และกักดินไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระพู่ฝัก ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	4725.90	2362.94	8.44**
Error	15	3917.80	279.84	
Total	17	8643.70		

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค่าการวิเคราะห์ห่าเวียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกักดิน (control) กักดินไบข้อที่ 4 และกักดินไบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของหนอนกระพู่ฝัก ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	0.079	0.039	0.689ns
Error	11	0.627	0.057	
Total	13	0.705		

ตารางภาคผนวกที่ 9 ค่าการวิเคราะห์ห่าเวียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกักดิน (control) กักดินไบข้อที่ 4 และกักดินไบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของหนอนกระพู่ฝัก ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	0.358	0.179	1.077ns
Error	12	1.994	0.166	
Total	14	2.352		

ตารางภาคผนวกที่ 10 ค่าการวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกกีดกัน (control) กีดกันไบข้อที่ 4 และกีดกันไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	1840.46	920.29	26.062**
Error	12	423.72	35.31	
Total	16	2264.17		

ตารางภาคผนวกที่ 11 ค่าการวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกกีดกัน (control) กีดกันไบข้อที่ 4 และกีดกันไบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	1453.76	726.88	64.46**
Error	12	135.32	11.28	
Total	14	1589.08		

ตารางภาคผนวกที่ 12 ค่าการวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของไบมะเชื้อเทศข้อที่ 1-2 ที่ไม่ถูกกีดกัน (control) กีดกันไบข้อที่ 4 และกีดกันไบข้อที่ 6 ก่อนและหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	154.23	77.12	5.16*
Error	9	134.59	14.95	
Total	11	288.82		

ตารางภาคผนวกที่ 13 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	118.81	59.40	2.11ns
Error	7	196.54	28.08	
Total	9	315.35		

ตารางภาคผนวกที่ 14 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	28.97	14.49	3.67ns
Error	9	35.54	3.95	
Total	11	64.51		

ตารางภาคผนวกที่ 15 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	152.31	76.15	0.55ns
Error	7	972.04	138.86	
Total	9	1124.35		

ตารางภาคผนวกที่ 16 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	122.85	61.42	4.13ns
Error	8	118.99	14.88	
Total	10	241.84		

ตารางภาคผนวกที่ 17 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 1-2 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	166.62	83.31	0.43ns
Error	7	1347.85	192.55	
Total	9	1514.47		

ตารางภาคผนวกที่ 18 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกดูดกิน (Control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	0.003	0.001	0.055ns
Error	11	0.287	0.026	
Total	13	0.290		

ตารางภาคผนวกที่ 19 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 ก่อนการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	0.041	0.020	0.971ns
Error	12	0.251	0.021	
Total	14	0.292		

ตารางภาคผนวกที่ 20 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 4 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	0.19	0.09	0.50ns
Error	11	2.05	0.19	
Total	13	2.24		

ตารางภาคผนวกที่ 21 ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 6 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็กเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	0.85	0.42	0.89ns
Error	12	5.70	0.48	
Total	14	6.55		

ตารางภาคผนวกที่ 22 ค่าการวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ของระดับ PPO activity ของใบมะเขือเทศข้อที่ 1-2 ที่ไม่ถูกดูดกิน (control) ดูดกิน ใบข้อที่ 4 และดูดกิน ใบข้อที่ 6 หลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ๊คเบียดส์เลย์ ครั้งที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
TRT	2	4.58	2.29	1.29ns
Error	12	21.38	1.78	
Total	14	25.96		



ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุลิตา กล้าการชาย เกิดเมื่อวันที่ 5 กันยายน พ.ศ. 2525 ที่อำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัยธานี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น และตอนปลายที่โรงเรียนหนองฉางวิทยา อำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัยธานี ในปี พ.ศ. 2543 ได้เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี ในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยสำเร็จการศึกษาปี พ.ศ. 2549 หลังจากนั้น ได้เข้าทำงานในตำแหน่งผู้ช่วยวิจัย ภายใต้โครงการวิจัยของ ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อติฉานนท์ ต้นตสวัสดิ์ นอกจากนี้ ยังเป็นผู้ช่วยวิจัย หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช รายวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และปี พ.ศ.2552 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี