อนงค์นุช ผลวงษ์ : บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในมะเขือเทศต่อการเข้าทำลายของหนอนเจาะสมอฝ้าย [*Heliothis armigera* (Hübner)] และหนอนกระทู้หอม [*Spodoptera exigua* (Hübner)] [DEFENSIVE ROLE OF TOMATO POLYPHENOL OXIDASES AGAINST COTTON BOLLWORM [*Heliothis armigera* (Hübner)] AND BEET ARMYWORM [*Spodoptera exigua* (Hübner)]] อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ทิพยผ่อง, 130 หน้า. ISBN 974-533-568-1

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญ ซึ่งมีสารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพหลายชนิด ในมะเขือเทศเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases; PPOs) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนฟีนอลลิก (phenolics) เป็นควิโนน (quinones) และอาจเกี่ยวข้องในการต้านทานแมลง แต่บทบาทนี้ยังไม่ได้รับการพิสูจน์อย่างแน่ชัดในมะเขือเทศ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) คัดเลือกพืชดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งถูกดัดแปลงให้มีระดับ PPO activity ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ประเมินบทบาทในการต้านทานแมลง 2) ศึกษาการแสดงออกของ PPO ในสภาพปกติและเมื่อถูกแมลงเข้าทำลาย 3) ศึกษาบทบาทของ PPO ในการต้านทานต่อการเข้าทำลายของหนอนเจาะสมอฝ้าย [*Heliothis armigera* (Hübner)] และหนอนกระทู้หอม [*Spodoptera exigua* (Hübner)] โดยการเปรียบเทียบการเข้าทำลาย อัตราการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์การตาย น้ำหนักดักแด้ และระยะเวลาตั้งแต่ฟักถึงเข้าดักแด้ ของหนอนเจาะสมอฝ้ายและหนอนกระทู้หอม เมื่อนำมาเลี้ยงด้วยใบและผลของมะเขือเทศที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีระดับ PPO สูงขึ้น (overexpressing PPO; OP) และลดลง (underexpressing PPO; UP) เปรียบเทียบกับมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม (nontransformed; NT)

จากการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมโดยวิธี PPO activity assay ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกต้องและแม่นยำที่สุด พบว่าได้ต้น UP19-3 ที่มีระดับ PPO activity ในใบต่ำกว่า NT 1.2-30.5 เท่า ได้ต้น OP18 ที่มีระดับ PPO activity สูงกว่า NT 1.6-25.3 เท่า และได้ต้น OP28 ที่มีระดับ PPO activity สูงกว่า NT 1.6-11.4 เท่า โดยระดับ PPO activity ในใบของมะเขือเทศทุกจีโนไทป์มีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุของต้นมะเขือเทศ และพบว่าระดับ PPO activity ในผลอายุ 4 สัปดาห์ ของ OP18 มีค่าสูงกว่า NT และ UP 3.4 และ 29.8 เท่า ตามลำดับ ส่วน UP19-3 มีระดับ PPO activity ต่ำที่สุด (ต่ำกว่า NT 8.7 เท่า) รูปแบบการแสดงออกของ PPO ในผลของมะเขือเทศต่างจีโนไทป์มีความแตกต่างกัน ในผลของ UP พบการแสดงออกของ PPO เฉพาะที่บริเวณ epidermis ใน NT นอกจากจะพบการแสดงออกของ PPO ที่บริเวณ epidermis แล้วยังพบ PPO ที่ pericarp, placenta, embryo และ seed coat ด้วย ส่วนใน OP มีการแสดงออกของ PPO สูงกว่า NT ในทุกเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะที่บริเวณ seed coat และ embryo เมื่อใบข้อที่ 4 ของมะเขือเทศทุกจีโนไทป์ถูกหนอนกระทู้หอม

กัดกิน พบว่ามีการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity 1.7-21.3 เท่า เฉพาะในใบที่เกิดบาดแผล (local induction) แต่ไม่พบการกระตุ้นเพิ่มระดับในใบข้อที่ 6 (systemic induction)

จากการประเมินความต้านทานของใบมะเขือเทศ UP, NT และ OP ต่อหนอนเจาะสมอฝ้าย พบว่าพืช UP มีพื้นที่ใบข้อที่ 8 ที่ถูกหนอนเจาะสมอฝ้ายกัดกินสูงกว่า NT และ OP และหนอนเจาะสมอฝ้ายที่กัดกินใบข้อที่ 8 ของพืช UP มี simple growth rate สูงกว่าหนอนเจาะสมอฝ้ายที่กัดกินใบข้อที่ 8 ของพืช NT และ OP มากถึง 3.0 และ 2.9 เท่า ตามลำดับ และพบว่าหนอนเจาะสมอฝ้ายที่กัดกินใบข้อที่ 8 ของพืช OP มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุด นอกจากนี้พบว่าระดับ PPO activity มีความสัมพันธ์ในทางลบกับ simple growth rate ของหนอนเจาะสมอฝ้ายและพื้นที่ใบที่ถูกกัดกิน เป็นการยืนยันบทบาทของ PPO ในการต้านทานแมลงชนิดนี้ ส่วนการประเมินความต้านทานต่อหนอนกระทู้หอมให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน โดยพบว่าหนอนกระทู้หอมที่กัดกินใบมะเขือเทศข้อที่ 4 และ 8 ของมะเขือเทศ UP มี simple growth rate สูงกว่าหนอนกระทู้หอมที่กัดกินใบของมะเขือเทศ NT และ OP มากถึง 2.4 และ 3.8 เท่าตามลำดับ และใบของต้น UP มักถูกกัดกินมากกว่าจีโนไทป์อื่น จากการทดสอบความต้านทานต่อหนอนกระทู้หอมในผลมะเขือเทศ พบว่า UP19-4 มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักเนื่องจากการกัดกินสูงกว่าจีโนไทป์อื่น ส่วน simple growth rate และ relative growth rate ของหนอนกระทู้หอมที่กัดกินผลมะเขือเทศแต่ละจีโนไทป์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า PPO ในมะเขือเทศมีบทบาทสำคัญในการต้านทานการเข้าทำลายของหนอนเจาะสมอฝ้ายและหนอนกระทู้หอม โดยความต้านทานอาจเกิดจากการสร้างเอนไซม์ PPO ขึ้นตลอดเวลา (constitutive defense) ในต้นมะเขือเทศ และ/หรือมีการชักนำให้สร้างเพิ่มขึ้น (induced defense) เมื่อถูกหนอนกระทู้หอมและหนอนเจาะสมอฝ้ายเข้าทำลาย ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มี PPO activity สูงขึ้นอาจเพิ่มความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืช และลดปริมาณการใช้สารกำจัดศัตรูพืชที่เป็นพิษ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

ANONGNUT BHONWONG : DEFENSIVE ROLE OF TOMATO POLYPHENOL OXIDASES AGAINST COTTON BOLLWORM [*Heliothis armigera* (Hübner)] AND BEET ARMYWORM [*Spodoptera exigua* (Hübner)]. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PIYADA THIPYAPONG, Ph.D. 130 PP. ISBN 974-533-568-1

POLYPHENOL OXIDASE/ TOMATO/ *Lycopersicon esculentum* Mill./ COTTON BOLLWORM/ *Heliothis armigera* (Hübner)/ BEET ARMYWORM/ *Spodoptera exigua* (Hübner)/ DEFENSIVE ROLE/ INSECT RESISTANCE

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is an economically important vegetable crop with numerous health-beneficial compounds. Tomato polyphenol oxidases (PPOs) catalyze the oxidation of phenolics to quinones and have been implicated in insect resistance. This defensive role, however, has not been conclusively proven in tomato. The objectives of this study were 1) to select transgenic tomato plants with modified PPO activity levels suitable for use as a platform for defensive role against insect evaluation, 2) to examine PPO expression under normal condition and in response to insect infestation and 3) to evaluate the defensive role of PPO against cotton bollworm [*Heliothis armigera* (Hübner)] and beet armyworm [*Spodoptera exigua* (Hübner)]. The foliage consumption, larval growth rate, mortality percentage, pupal weight and larval life-span of cotton bollworms and beet armyworms feeding on foliar and fruits of transgenic tomato overexpressing PPO (OP) and underexpressing PPO (UP) were evaluated in comparison with those feeding on

nontransformed (NT) plants.

Selection of transgenic tomato using PPO activity assay, the most accurate and precise method, allowed efficient obtainment of UP19-3 plants with 1.2-30.5 fold lower foliar PPO activity levels than NT, OP18 plants with 1.6-25.3 fold higher foliar PPO activity than NT, and OP28 plants with 1.6-11.4 fold higher foliar PPO activity than NT. The foliar PPO activity levels of all genotypes appeared to increase as tomato plants aged. In 4-week-old fruits, it was found that OP18 had 3.4 and 29.8 fold higher PPO activity than those of NT and UP, respectively whereas UP19-3 had the lowest PPO activity (8.7 fold lower than NT). Differential PPO expression patterns were observed in fruits of various tomato genotypes. In UP only the epidermis showed PPO expression. This epidermal expression was also observed in NT. In addition, PPO was also detectable in pericarp, placenta, embryo, and seed coat of this genotype. Similarly, OP fruits expressed PPO in all of these tissues, but at higher levels than NT, especially in seed coat and embryo. When node 4 leaflets of all tomato genotypes were infested by beet armyworm, their PPO activity levels were locally induced by 1.7-21.3 fold. No systemic induction was observed at node 6 leaves.

Evaluation of cotton bollworm resistance in foliar of UP, NT and OP plants showed that more foliage was consumed in node 8 leaves of UP than NT and OP. And simple growth rates of cotton bollworms feeding on node 8 leaves of UP plants were upto 3.0 and 2.9 times higher than on NT and OP leaves, respectively. Moreover, percent mortality was the highest in larvae feeding on node 8 leaves of OP plants. In addition, PPO activity levels were found to be negatively correlated with simple growth rate of cotton bollworm and leaf area consumed, substantiating the defensive role of PPO against this insect. Similar results were obtained when these plants

were evaluated for beet armyworm resistance. Simple growth rates of beet armyworms feeding on both nodes 4 and 8 leaves of UP plants were upto 2.4 and 3.8 times higher than on NT and OP leaves, respectively. And more UP foliage was usually consumed than others. The beet armyworm resistance evaluation in fruits found significantly higher percent weight loss due to larval consumption in UP19-4 compared to other genotypes. However, no significant difference in simple and relative growth rates was found among tomato genotypes with varied PPO activity levels.

These results indicate that tomato PPO provides a crucial role in resistance to both cotton bollworm and beet armyworm. The resistance may be contributed by constitutive PPO and/or PPO induced in response to cotton bollworm and beet armyworm infestation. Therefore, breeding of tomato to increase PPO activity levels may increase resistance to insect pests and minimize the usage of toxic pesticides.

School of Crop Production Technology Student's Signature _____

Academic Year 2005 Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____