สุลิตา กล้าการขาย : การกระตุ้นเพิ่มระดับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในมะเขือเทศเมื่อถูกหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) และเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย์ (*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 อลิฌาณ์ ตันตสวัสดิ์, 78 หน้า.

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases; PPOs)ในมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนสารฟีนอลลิก (phenolics) เป็นควิโนน (quinones) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการต้านทานแมลงในวงศ์ Lepidoptera โดยความต้านทานนี้อาจเป็นผลจากระดับ PPOs ที่สร้างอยู่เดิมหรือเกิดจากการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPOs งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระตุ้นเพิ่มระดับ PPOs เมื่อถูกแมลงปากกัดคือหนอนกระทู้ผัก และแมลงปากดูดคือเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย์เข้าทำลาย และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน PPO A, B, D, E และ F ในการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย์ 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 สำหรับการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย์บนใบข้อที่ 4 และ 6 พบว่าระดับ PPO activity ในใบข้อที่ 4, 6 และ 1-2 ก่อนและหลังการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติไม่ว่าจะให้เพลี้ยแป้งดูดกินใบข้อที่ 4 หรือ 6 ยีน PPO ต่าง ๆ มีรูปแบบการแสดงออกและตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย์แตกต่างกัน โดยพบการกระตุ้นการแสดงออกเฉพาะในยีน PPO B และ D เมื่อให้หนอนกระทู้ผักเข้าทำลายต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน 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

การแสดงออกในเนื้อเยื่อที่ไม่ถูกกัดกินบริเวณใกล้เคียง และ/หรือบริเวณที่ห่างไกล และเมื่อให้เพลี้ยแป้งแจ็คเบียดเลย์เข้าทำลาย พบการแสดงออกของ PPO B เพิ่มขึ้นในใบที่ถูกดูดกินโดยเฉพาะใบแผ่เต็มที่ (ข้อที่ 4) และพบการแสดงออกของ PPO D เพิ่มขึ้นชัดเจนในใบที่ถูกดูดกินโดยเฉพาะใบแก่ (ข้อที่ 6) ซึ่งการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยแป้งแจ็คเบียดส์เลย์มีส่วนคล้ายคลึงกัน โดยพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในใบที่ถูกเข้าทำลายโดยตรง แต่การกระตุ้นการแสดงออกในเพลี้ยแป้งมักจำกัดอยู่เฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อท่อลำเลียงและการกระตุ้นการแสดงออกอยู่ในระดับต่ำกว่าหนอนกระทู้ผัก จึงอาจเป็นผลให้ระดับ PPO activity ก่อนและหลังการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเข้าทำลายของแมลงกระตุ้นการเพิ่มระดับของ PPO activity ในเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหาย ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน PPO B และ D นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการส่งสัญญาณจากเนื้อเยื่อที่ถูกแมลงเข้าทำลายไปยังเนื้อเยื่ออื่นในต้นมะเขือเทศเพื่อกระตุ้นเพิ่มระดับ PPO activity ซึ่งอาจช่วยลดการเข้าทำลายของแมลง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อให้มีระดับ PPOs สูงขึ้น อาจเพิ่มความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชและลดปริมาณการใช้สารเคมีในการควบคุม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา สุสัตา กลำการขาย

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

SULITA KLAKANKHAI : 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