

**MOLECULAR GENETIC STUDY OF GENES RELATED TO
SUCROSE SYNTHESIS IN CASSAVA**

KESSARIN TUNGNGOEN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

ISBN 974-04-6208-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลในมันสำปะหลัง
MOLECULAR GENETIC STUDY OF GENES RELATED TO SUCROSE
SYNTHESIS IN CASSAVA

เกสริน ถังเงิน 4536523 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จรัญญา ณรงค์ชวานะ, D.Agr.Sc., สุพัชรี เนตรพันธุ์, Ph.D.,
อัญชรีรา สุขมาก, Ph.D., มาลินี สุขแสงพนมรุ้ง, Ph.D.

บทคัดย่อ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ได้แปงที่มีคุณภาพตามที่ต้องการได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำนั้น ต้องอาศัยองค์ความรู้ในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาล ตลอดจนถึงกระบวนการสังเคราะห์และเก็บสะสมแป้งเป็นหลัก ซึ่งงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาล ได้แก่ เอนไซม์ซูโครสฟอสเฟตซินเตส เอนไซม์ซูโครสฟอสฟาเตส และ โปรตีน14-3-3 ในเบื้องต้น ชิ้นส่วนของยีนเหล่านี้ได้ถูกโคลนโดยวิธี RT-PCR ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาลำดับเบสพบว่าชิ้นส่วนของยีนที่โคลนได้จากมันสำปะหลังมีความเหมือนกับยีนที่มีรายงานในพืชชนิดอื่นๆ สำหรับโปรตีน 14-3-3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหลายไอโซฟอร์ม โดยแต่ละไอโซฟอร์มอาจจะมิตบพาทในขบวนการทางชีวเคมีที่ต่างกัน full-length cDNA ของโปรตีน14-3-3 จึงถูกคัดแยกจาก cDNA library ที่สร้างขึ้นจากใบมันสำปะหลัง ซึ่งพบว่า cDNA ที่คัดแยกได้ประกอบด้วยเบสจำนวน 1,186 คู่ และกรดอะมิโนจำนวน 264 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน และมีความเหมือนกับโปรตีน 14-3-3 ของแอปเปิ้ล 95% และยาสูบ 94% ตามลำดับ จากการทดลองหาจำนวนชุดของยีนเหล่านี้ในมันสำปะหลังโดยเทคนิค Southern blot analysis พบว่ายีนเหล่านี้มีจำนวนมากกว่า 1 ชุด จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของมันสำปะหลังที่ระดับอายุและสภาพการปลูกซึ่งแตกต่างกันพบว่า มีการแสดงออกของยีนซูโครสฟอสเฟตซินเตสในระดับที่แตกต่างกัน คือพบมากในใบอ่อนและลดน้อยลงในใบแก่ และเมื่อสังเกตการแสดงออกของยีนนี้ในหัวมันสำปะหลังที่สภาพการปลูกต่างๆ พบว่ายีนนี้มีการแสดงออกมากขึ้นตามระดับปริมาณน้ำฝนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้มีการสังเคราะห์น้ำตาลจากแป้งเพื่อใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโต ส่วนการแสดงออกของยีน 14-3-3 นั้นมีแนวโน้มการแสดงออกเช่นเดียวกับยีนซูโครสฟอสเฟตซินเตส ในขณะที่ยีนซูโครสฟอสฟาเตสมีลักษณะการแสดงออกที่แตกต่างจากทั้งสองยีนข้างต้น คือมีการแสดงออกทั้งในหัวมันสำปะหลังที่สภาพการปลูกเดียวกัน อย่างไรก็ตามพบว่า ระดับการแสดงออกของยีนซูโครสฟอสฟาเตสจากหัวมันสำปะหลังที่เริ่มปลูกในฤดูฝนมีปริมาณมากกว่าในฤดูแล้งเล็กน้อย แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในใบแก่ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ขึ้นอยู่กับฤดูในการปลูก โดยปริมาณน้ำฝนน่าจะเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่สุดต่อการแสดงออกของทั้งสามยีน และส่งผลควบคุมการเก็บสะสมแป้งในหัวมันสำปะหลัง

MOLECULAR GENETIC STUDY OF GENES RELATED TO SUCROSE SYNTHESIS IN CASSAVA**KESSARIN TUNGNGOEN 4536523 SCBT/M****M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)****THESIS ADVISORS : JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc.,
SUPATCHAREE NETRPHAN, Ph.D, UNCHERA SOOKMARK, Ph.D.,
MALINEE SUKSANGPANOMRUNG, Ph.D.****ABSTRACT**

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz L.) is a prime crop for food, feed, and industrial raw materials. Utilization of cassava starch has currently been expanded, thus creating an increase demand in the global market. This research aims to study the sucrose to starch transition pathway in cassava. Genes encoding for enzymes involving in the synthesis of sucrose, such as sucrose-phosphate synthase (SPS), sucrose-phosphatase (SPP) and 14-3-3 proteins, have been studied in this project. Three partial cDNA clones encoding *MeSPS*, *MeSPP* and *Me14-3-3* were isolated by RT-PCR. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the three clones showed significant similarities to SPS, SPP and 14-3-3 protein from other plants. Due to the presence of various isoforms of 14-3-3 protein, a full-length 14-3-3 cDNA was isolated from a leaf cDNA library of cassava. The 1,186-bp *Me14-3-3* clone coded for a 264-amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 30 kDa. The deduced amino acid from the *Me14-3-3* clone showed homology with 14-3-3 from apple (95% identity) and tobacco isoform e1 (94% identity). Genomic Southern analysis suggested that genes encoding SPS, SPP, and 14-3-3 are present as multiple copies in the cassava genome. Expression patterns showed that *MeSPS* is expressed in both sink and source organs. However, the levels of *MeSPS* expression in young leaves were lower than in mature leaf. In tubers, the increase of SPS transcript corresponded to the high rainfall at the time of harvesting. This suggests that *MeSPS* may be activated by water supply and consequently driven sucrose synthesis for further growth. The overall expression pattern of *Me14-3-3* in tuberous root tissue was somewhat similar to that of *MeSPS*. *MeSPP* transcript could be detected in the young leaves and tubers, higher level of transcript was observed in tubers from the wet crop than in the dry crop. These results indicated that the levels of SPS, SPP and 14-3-3 transcripts in cassava tubers varied depending on planting season. Although this could be influenced by many factors, the amount of water supply might be one of the most important factors affecting expression of SPS, SPP and 14-3-3 and regulated the starch to sucrose transition in cassava storage roots.

**KEY WORDS: SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE / SUCROSE PHOSPHATASE /
14-3-3 PROTEIN / SUCROSE SYNTHESIS / CASSAVA****126 P. ISBN 974-04-6208-1**