

**MOLECULAR GENETIC STUDY OF PROTEINS
DIFFERENTIALLY EXPRESSED DURING CASSAVA
(*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ) TUBER DEVELOPMENT**

MANASSAWE LERTPANYASAMPATHA

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

2006

ISBN 974-04-7370-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของโปรตีนที่แสดงออกในช่วงการพัฒนาของหัวมันสำปะหลัง
(MOLECULAR GENETIC STUDY OF PROTEINS DIFFERENTIALLY EXPRESS
DURING CASSAVA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ) TUBER
DEVELOPMENT)

มนัสวี เลิศปัญญาสัมปทา 4636272 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จริญญา ณรงค์ชวนะ, D.Agr.Sc., สุพัชรี เนตรพันธุ์, Ph.D.,
อัญชิวรา สุขมาก, Ph.D.

บทคัดย่อ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญเป็นอันดับสามของประเทศไทย ปัจจุบันนี้แป้งมันสำปะหลังจะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด แต่จากการที่แป้งมันสำปะหลังมีขนาดและโครงสร้างเม็ดแป้งแบบจำเพาะ ทำให้การใช้ประโยชน์จากแป้งมันสำปะหลังยังถูกจำกัดในอุตสาหกรรมบางประเภท พื้นฐานที่สำคัญที่จะใช้ในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแป้งมันสำปะหลังทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพจำเป็นต้องใช้ความรู้ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แป้งและการสร้างหัวมันสำปะหลังมาเป็นส่วนประกอบ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำการศึกษาในระดับโปรตีนมาประยุกต์ใช้เพื่อที่จะบ่งชี้ถึงโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งและ/หรือเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาของรากสะสมของแป้งมันสำปะหลัง จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาในระดับกายวิภาคศาสตร์ของรากมันสำปะหลัง การวิเคราะห์ขนาดเม็ดแป้งและปริมาณ amylose ของแป้งและการเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนในสภาวะที่แตกต่างกัน เช่น เนื้อเยื่ออายุ พันธุ์ และอวัยวะของพืช โดยใช้เทคนิค Two-dimensional gel electrophoresis และ LC-MS/MS ในงานวิจัยนี้ใช้มันสำปะหลังสองสายพันธุ์ในการศึกษา ได้แก่ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ ระยะเวลา 1 จากการวิเคราะห์ขนาดเม็ดแป้งและปริมาณ amylose ของแป้งมันสำปะหลังที่อายุต่าง ๆ กัน พบว่าขนาดเม็ดแป้งและปริมาณ amylose ขึ้นอยู่กับอายุและปริมาณน้ำฝนในช่วงฤดูปลูก ส่วนการศึกษาทางด้านกายวิภาคศาสตร์โดยการย้อมด้วย Toluidine Blue พบว่ามันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อรากแบบทุติยภูมิ จากการศึกษาดังกล่าวสามารถแบ่งเนื้อเยื่อรากออกเป็นสองส่วน ได้แก่ cortex และ parenchymatous tissues โดยเนื้อเยื่อทั้งสองส่วนนี้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาในระดับโปรตีนด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จากการทดลองพบว่าโปรตีนที่พบทั้งหมดประมาณ 200 จุด และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนของทั้งสองเนื้อเยื่อพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่แสดงออกเฉพาะใน cortex หรือเฉพาะใน parenchymatous tissues เท่านั้น ส่วนการเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนในมันสำปะหลังทั้งสองสายพันธุ์พบว่ามีโปรตีนบางกลุ่มที่แสดงออกเฉพาะในพันธุ์ระยะของ 1 จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี LC-MS/MS พบว่ามีโปรตีนที่สามารถบ่งชี้ได้ทั้งหมด 66 จาก 127 จุด จากผลดังกล่าวสามารถแบ่งโปรตีนออกเป็นกลุ่มตามหน้าที่ คือ energy metabolism, protein folding and stabilization, stress response, secondary metabolism, protein synthesis and degradation, protease inhibitors, cytoskeleton, transcription, และ translation. นอกจากนี้การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนในอวัยวะต่าง ๆ ของพืชพบว่า intermediate root กับ cortex และ parenchymatous tissues ของรากสะสมมีรูปแบบของโปรตีนที่คล้ายกัน ในขณะที่รากและใบของมันสำปะหลังมีรูปแบบของโปรตีนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

MOLECULAR GENETIC STUDY OF PROTEINS DIFFERENTIALLY EXPRESS
DURING CASSAVA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ) TUBER
DEVELOPMENT

MANASSAWE LERTPANYASAMPATHA 4636272 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc.,
SUPATCHAREE NETRPHAN, Ph.D., UNCHERA SOOKMARK, Ph.D.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is ranked as the third most important crop of Thailand. Its starch has great potential for several industrial applications. The objectives of this project were to perform anatomical analysis of cassava root, to determine starch granule size distribution and amylose content of cassava starch, and to compare expression profiles of cassava soluble proteome in various conditions such as different tissues, ages, cultivars, and organs using two-dimensional gel electrophoresis and LC-MS/MS. Two cassava cultivars, Kasetsart 50 and Rayong 1, were used in this investigation. Granule size distribution and amylose content of cassava starch were not only affected by developmental stage of the root but also by environmental conditions such as rainfall precipitation level. Based on anatomical studies of cassava root with Toluidine Blue, it was found that secondary growth was required during the development of cassava storage root. For the analysis of proteins by 2D-SDS-PAGE, storage root was divided into two major parts, cortex and parenchymatous tissues. Among the 200 protein spots identified by 2D-SDS-PAGE, expression profiles of most proteins were found to be somewhat similar in both cortex and parenchymatous tissues. Exceptionally, some proteins were observed only in one tissue type, thus identified as tissue-specific proteins. In addition, comparative analysis of proteins from two different cultivars also led to the identification of cultivar-specific proteins. Based on LC-MS/MS analysis, identity of 66 protein spots could be obtained. These proteins span various functional categories from energy metabolism, protein folding and stabilization, stress response, secondary metabolism, protein synthesis and degradation, protease inhibitors, cytoskeleton, transcription, and translation. Moreover, comparative analysis of protein profiles from leaf, fibrous root, intermediate root, cortex, and parenchymatous tissues of storage root was carried out. While similar patterns were observed in intermediate root, cortex, and parenchymatous tissues of storage root, a significantly different profile was detected in leaf as compare to roots.

KEY WORDS: CASSAVA / 2D-GEL ELECTROPHORESIS / LC-MS/MS
124 P. ISBN 974-04-7370-9