FUNCTIONAL STUDY OF STARCH BIOSYNTHESIS RELATED GENE USING CASSAVA GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM

LADDAWAN SAELIM

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

FUNCTIONAL STUDY OF STARCH BIOSYNTHESIS RELATED GENE USING CASSAVA GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM

LADDAWAN SAELIM 4837130 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc.,
SUPATCHAREE NETRPHAN, Ph.D., PUNCHAPAT SOJIKUL, Ph.D.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a tropical crop grown for its starchy thickened roots. Cassava starch is often modified to obtain products that meet the criteria for numerous applications. Genetically modified cassava might offer an alternative way without having to go through environmentally unfriendly treatment during chemical modification of native starch. The establishment of a transformation system for cassava also allows plant scientists to study the function of genes in cassava. In this study, a protocol for somatic embryogenesis and organogenesis of the two cassava cultivars, Kasetsart 50 (KU50) and Hanatee, were optimized. A system for cyclic somatic embryogenesis induction was carried out to produce young green cotyledons for transformation experiments. Suppression of the endogenous granule-bound starch synthase I (GBSSI) gene in cassava was carried out using RNA interference (RNAi) technique. Molecular analysis of the transgenic cassava indicated the presence of multiple copies of GBSSI-RNAi transgene in the transgenic cassava genome, which correlated with a dramatic decrease in GBSSI transcript level. By subjecting the *in vitro* storage roots of the transgenic cassava to iodine staining, the results further confirmed that suppression of the cassava endogenous GBSSI gene by RNAi negatively affected the amylose content of the roots. In addition to cassava, transformation of potato and tobacco were carried out to study the effect of the cassava phloem-specific promoter p54. Unfortunately, the cassava promoter could not be used to drive expression of foreign genes in these model plants. Due to the availability of an efficient transformation system and the ability of potato plants to form *in vitro* mini-tubers, this system would be most suitable to use in comparative analysis of the starch biosynthesis related genes from cassava.

KEY WORDS: CASSAVA/ GENETIC TRANSFORMATION/ RNA INTERFEREANCE/ GRANULE BOUND STARCH SYNTHASE

137 pp.

Copyright by Mahidol University

การศึกษาหน้าที่ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งของมันสำปะหลังโดยวิธีการถ่ายยีน
(FUNCTIONAL STUDY OF STARCH BIOSYNTHESIS RELATED GENE USING CASSAVA GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM)

ลัดดาวัลย์ แซ่ลิ้ม 4837130 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จรัญญา ฉรงคะชวนะ, D.Agr.Sc., สุพัชรี เนตรพันธุ์, Ph.D., ปัญจภัทร โสจิกุล, Ph.D.

บทคัดย่อ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย สืบเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของคุณสมบัติของแป้งมันสำปะหลัง การนำแป้งมันสำปะหลังไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆจึงยังไม่แพร่หลายเท่าที่ควร ในปัจจุบัน เทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทที่สำคัญในการพัฒนาเพื่อให้ได้สายพันธุ์พืชที่มีคุณสมบัติตามต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาหน้าที่ของยีนในกระบวนการต่างๆของพืชโดยการศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นเมื่อพืชมีการแสดงออกของยีนดังกล่าวในระดับที่ต่างออกไปจากเดิม งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาระบบการถ่ายยีนในมันสำปะหลังสายพันธุ์ไทยจำนวน 2 สายพันธุ์ได้แก่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์ห้านาที โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรองรับการศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อนำไปสู่การพัฒนาปรับปรุงเพื่อให้ได้สายพันธุ์มันสำปะหลัง ที่มีคุณสมบัติตามต้องการต่อไป งานวิจัยนี้ได้ทำการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis เพื่อให้ได้ cotyledon ที่นำไปใช้ในการถ่ายยีน การทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเพื่อใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน การชักนำให้เกิดรากสะสมภายในสภาวะปิดเพื่อใช้ศึกษาลักษณะของแป้งที่เปลี่ยนไป จากการยับยั้งการแสดงออกของยีน granule-bound starch synthase I (GBSSI) ของมันสำปะหลังด้วยวิธี RNA interference (RNAi) พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน GBSSI ลดลง ส่งผลให้มีการสังเคราะห์ amylose ในเนื้อเยื่อรากสะสมในปริมาณที่ลดลง นอกจากการถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลัง งานวิจัยนี้ยังได้ทำการถ่ายยีนเข้าสู่มันฝรั่งและยาสูบ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาบทบาทของโปรโมเตอร์ p54 ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่คัดแยกมาจากมัน สำปะหลังและสามารถควบคุมให้เกิดการแสดงออกของยีนเฉพาะในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงเท่านั้น แต่จากผลการทดลองนี้พบว่าโปรโมเตอร์ p54 ไม่สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนในพืชต้นแบบทั้งสองชนิดได้เลย อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของการนำมันฝรั่งมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาหน้าที่ของยีนในกลไกการสร้างแป้งควบคู่ไปกับระบบที่ศึกษาในมันสำปะหลังโดยตรง เนื่องจากระบบการถ่ายยีนในมันฝรั่งเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูง อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบคุณภาพแป้งในหัวมันฝรั่งจิ๋วได้อย่างชัดเจนอีกด้วย

137 หน้า

Copyright by Mahidol University