



Doctoral Thesis

Investigation of starch metabolism in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

Author(s):

Hostettler, Carmen Elisa

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010273670> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH Nr. 21850

**Investigation of starch metabolism in
Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

For the degree of Doctor of Sciences

Presented by

Carmen Elisa Hostettler

MSc ETH in Biology

Born 26th June 1981
Guggisberg BE

Accepted on the recommendation of

Prof. Samuel C. Zeeman, examiner
Prof. Wilhelm Gruissem, co-examiner
Dr. Angel Mérida, co-examiner
Dr. Herve Vanderschuren, co-examiner

2014

Summary

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a perennial shrubby plant grown in the tropical and subtropical regions for its starchy roots. In South America and Africa it is mainly grown as a security food and feed stock whereas in Asia the starch industry is the major consumer. In the last decades the economic interest of cassava as a starch crop increased markedly. However, cassava is vegetatively propagated and limited in germplasm.

Starch is the major carbohydrate in plants and an important raw material used for food and non-food industry for mankind. Plants store carbohydrates in form of starch, a polyglucan consisting of linear α -1,4 linked glucose units with α -1,6 branch points. The insoluble, semi-crystalline starch granules are either stored transiently in autotrophic (source) leaf tissues or as reserve compound in heterotrophic storage organs (sink; i.e. seeds and tubers). Transitory starch is synthesised during the day in source tissues from photosynthetically assimilated carbon. During the subsequent night transitory starch is degraded to meet the demand for carbohydrates in sink tissues. In most plants carbohydrates are transported through the phloem from source to sink in form of sucrose, a non-reducing disaccharide. In sink tissues sucrose is unloaded and converted to starch and stored as a carbohydrate reserve for long term. In the process of starch biosynthesis multiple enzymes are involved. Starch metabolism in source and sink tissues share some common features, however there are some differences in which enzymes are involved. Differences also occur depending on the botanical source, in respect of starch architecture, granule size and shape. These characteristics define physico-chemical properties. For the diverse industrial applications (i.e. pharmaceuticals, instant food, paper-making) starches of different characteristics are desired.

In order to increase the value of cassava as a starch crop the subject of my thesis was to identify possible key enzymes involved in cassava root starch metabolism. With the help of profound knowledge about starch metabolism and improved biotechnology tools, transgenic cassava plants can be engineered with better starch properties or increased yield.

In my first part of the thesis I have investigated the growth performance of cassava (cv. 60444) grown under defined greenhouse conditions. The interest was to study the photosynthetic capacity and the allocation of assimilated carbon in form of starch and soluble sugars. In the first part the main focus was on leaf and stem tissue at different developmental stages. Hence, photosynthetic capacity and non-structural carbohydrates were visualized and measured from leaf and stem tissue at different developmental stages. Integration of photosynthetic rate and accumulated carbohydrate revealed a high source capacity of cassava leaves. Hence, more carbohydrates are accumulated than needed throughout the day.

In a second part of my thesis I asked the question what key enzymes are involved in remobilizing root starch. Therefore, storage roots, harvested from untreated cassava plants and 10 days after cutting off the aerial plant material were compared. Analysed starch levels and amylolytic enzyme activity revealed a negative correlation. Further, a large scale proteome analysis indicated a metabolic transition from sink to source. This analysis elucidated the involvement of an α -amylase, AMY3 to be a major enzyme responsible for starch mobilization.

In my third part of the thesis I focused on the attempt to modify starch properties in order to add economic value to cassava starch. Phosphorylated starches, the only naturally occurring modification, are used in paper-making industry to increase paper-strength. Depending on the botanical source the degree of starch-bound phosphate varies from high (i.e. 0.5% in potato) to low (i.e. 0.05 % in cassava). Phosphorylation of starch in plants is executed by a glucan, water dikinase (GWD) and dephosphorylated by two glucan phosphatases (SEX4, LSF2). Activity of GWD is redox regulated. Thus either the potato *StGWD* or the redox-insensitive and constitutively active *StGWD*_{C1084S} were transformed into cassava. Preliminary analysis revealed a positive functionality hence, an increase in total phosphate content. Secondly, cassava plants were transformed with an RNAi constructs targeting *SEX4* or *LSF2* transcript. The constructs were specifically expressed in root tissue to avoid manipulation of starch metabolism in other tissues. In order to increase starch yield an RNAi construct was made targeting *AMY3* as I could show that this is the major enzyme involved in starch mobilization.

Zusammenfassung

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) ist eine ausdauernde, strauchartige Pflanze die besonders in den Tropen und Subtropen für ihre stärkehaltigen Wurzeln angebaut wird. In Südamerika und Afrika wird Cassava als Nahrungs- und Futtermittelsicherheit angebaut während in Asien das Industrielle Interesse im Vordergrund steht. Das wirtschaftliche Interesse an Cassava als Kulturpflanze zur Gewinnung von Stärke ist in den letzten Jahrzehnten markant gestiegen. Durch die vegetative Vermehrung ist die genetische Diversität jedoch limitiert.

Stärke ist eines der wichtigsten Kohlenhydrate in Pflanzen und ein wichtiger Rohstoff für die Nahrungsmittel und nicht-Nahrungsmittel Industrie für die Menschheit. Pflanzen speichern ihre Kohlenhydrate in Form von Stärke, ein Polymer das aus Glucose Einheiten besteht, die linear α -1,4 zu linearen Ketten verbunden sind mit α -1,6 Verzweigungen. Die unlöslichen, semi-kristallinen Stärkekörner wird einerseits transient in autotrophen (Ort der Produktion, Source) Blattgewebe, oder als Reserveverbindung in heterotrophen Geweberorganen gespeichert (Ort des Verbrauchs, Sink, bsp. Samen und Knollen). Transiente Stärke wird am Tag aus photosynthetisch assimiliertem Kohlenstoff synthetisiert. Während der folgenden Nacht wird die transiente Stärke wieder abgebaut um den Bedarf an Kohlenhydraten in Sink Gewebe nachzukommen. In den meisten Pflanzen werden die Kohlenhydrate mittels dem Phloem vom Source zum Sink Gewebe transportiert in Form von Saccharose, einem nicht-reduzierenden Zweifachzucker. Im Sink Gewebe wird Saccharose vom Phloem entladen, in Stärke umgewandelt und als Reservekohlenhydrat über längere Zeit gespeichert. An der Stärke Biosynthese ist eine Mehrzahl an Enzymen beteiligt. Der Stärkemetabolismus in Source und Sink Geweben hat einige gemeinsame Eigenschaften wobei es auch Unterschiede bezüglich der Enzyme gibt, die beteiligt sind. Abhängig von der botanischen Herkunft kann es auch zu Unterschieden bezüglich der Stärke Zusammensetzung, Grösse und Form des Stärkekorns kommen. Diese Merkmale definieren die physikalisch-chemischen Eigenschaften. Für die diversen, industriellen Anwendungen (Pharmazeutika, Fertigprodukte und Papierherstellung) sind unterschiedliche Merkmale erwünscht.

Um Cassava als Kulturpflanze einen Mehrwert zu verleihen, war das Thema meine Doktorarbeit die Identifizierung möglicher Schlüsselenzyme die im Stärkemetabolismus von Cassava beteiligt sind. Mit Hilfe von fundiertem Wissen über den Stärkemetabolismus und den verbesserten biotechnologischen Werkzeugen kann eine Wertsteigerung von Cassava als Kulturpflanze für Stärke erreicht werden.

In meinem ersten Teil der Dissertation habe ich das Wachstumsverhalten von Cassava (cv. 60444) Pflanzen untersucht, die bei definierten Gewächshaus Bedingungen angezogen wurden. Das

Interesse lag in der Kapazität für Photosynthese und der Verteilung des assimilierten Kohlenstoffs in Form von Stärke und löslichen Zuckern. Der erste Fokus lag auf dem Blatt- und Stammgewebe zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Dabei wurden die photosynthetische Kapazität und die nicht-strukturelle Kohlenhydrate gemessen und visualisiert von Blatt- und Stammgewebe zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Das Vergleichen der Photosyntheserate mit der Menge an assimilierten Kohlenhydraten zeigte eine hohe Source Kapazität in den Cassava Blätter. Demzufolge werden mehr Kohlenhydrate synthetisiert während des Tages als verbraucht während der Nacht.

In einem zweiten Teil meiner Abhandlung habe ich die Frage gestellt welche Schlüsselenzyme benötigt werden um die Wurzelstärke zu mobilisieren. Dafür wurden Speicherwurzeln von Cassava Pflanzen verglichen 10 Tage nach Entblättern mit unbehandelten Kontrollpflanzen. Die analysierte Menge an Stärke und amylolytische Enzym Aktivität zeigte eine negative Korrelation. Des Weiteren hat eine umfangreiche Proteome Analyse auf einen Wechsel von Sink zu Source Metabolismus hingewiesen. Die Auswertung hat eine Beteiligung von α -amylase, AMY3 als wichtiges Enzym der Stärke Mobilisierung aufgezeigt.

Im dritten Teil meiner Doktorarbeit habe ich mich damit beschäftigt in Cassava Stärke mit modifizierten Eigenschaften herzustellen um der Stärke aus Cassava einen wirtschaftlich höheren Wert zu verleihen. Phosphorylierte Stärke – die einzige natürlich vorkommende Modifizierung, wird in der Papierherstellung gebraucht um das Papier zu stärken. Abhängig von der botanischen Quelle kann der Grad von Stärkegebundenem Phosphat von hoch (Bsp. 0.5% in Kartoffeln) und niedrig (Bsp. 0.05%, in Cassava) variieren. Die Pflanzenstärke wird durch die glucan, water dikinase (GWD) phosphoryliert und durch zwei glucan phosphatasen (SEX4, LSF2) dephosphoryliert. Die Aktivität von GWD ist Redox reguliert. So wurden das Kartoffel StGWD Protein oder die redox-insensitive und konstitutive aktive StGWD_{C1084S} Form in Cassava transformiert. Erste Ergebnisse zeigen eine positive Funktionalität und somit einen erhöhten Phosphatgehalt. Weiter, Cassava Pflanzen konnten mit einem RNAi Konstrukt gegen die Transkripte von SEX4 und LSF2 transformiert werden. Die Konstrukte wurden wurzelspezifisch exprimiert um das Verändern auf den Stärkemetabolismus in anderen Geweben zu verhindern. In einem dritten Ansatz mit dem Ziel den Stärkeertrag zu erhöhen habe ich ein RNAi Konstrukt entwickelt gegen das AMY3 Transkript, da ich zeigen konnte das dieses ein wichtiges Enzym ist um gespeicherte Stärke abzubauen.