

木薯储藏根采后生理性变质研究进展

马秋香¹, 许佳¹, 乔爱民², 张鹏^{1*}

(1. 中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所植物分子遗传国家重点实验室及 SIBS-ETH 上海木薯生物技术中心, 上海 200032; 2. 仲恺农业工程学院农业与园林学院, 广州 510225)

摘要:木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是热带、亚热带地区重要的粮食作物和能源作物。木薯产量很高,储藏根富含淀粉,但收获后采后生理性变质严重,严重影响了木薯的开发和利用。结合近期研究工作,综述了木薯储藏根采后生理性变质的研究进展,包括采后生理性变质的检测标准、生化基础、抗采后生理性变质的杂交育种、以活性氧自由基为主要研究对象的功能基因组学与基因工程、应用前景及存在的问题,以期为木薯储藏根采后生理性变质的遗传改良提供参考。

关键词:木薯; 储藏根; 采后生理性变质; 活性氧自由基; 遗传改良

中图分类号:Q945.66

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2009)03-0309-06

Current Progress in Studies on Post-harvest Physiological Deterioration of Cassava Storage Roots

MA Qiu-xiang¹, XU Jia¹, QIAO Ai-min², ZHANG Peng^{1*}

(1. SIBS-ETH Shanghai Center for Cassava Biotechnology, National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China;

2. College of Agriculture and Landscape, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important food and bio-energy crop which mainly grows in marginal lands by subsistent farmers in tropics and subtropics. Cassava contains great amount of starch in its storage roots, but it rapidly undergoes physiological deterioration after harvest, which greatly affects storage life and subsequent starch processing. The current research progresses in post-harvest physiological deterioration (PPD) of cassava were reviewed, including the evaluation methods and biochemical basis, the hybridization breeding efforts to improve cassava resistant to PPD, and genetic engineering mainly related to reactive oxygen species for PPD modification. The perspectives and problems of PPD engineering in cassava were discussed to provide useful information for genetic improvement to delay PPD of storage roots in cassava.

Key words: Cassava; Storage roots; Post-harvest physiological deterioration; Reactive oxygen species; Genetic improvement

木薯(*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae, $2n=36$)广泛种植于全球热带地区,是全球第五大作物,为世界上近6亿人提供食物。木薯对光、热、水资源的利用率非常高,单位面积的生物能产量几乎高于其它所有栽培作物,具有抗旱、耐瘠薄、适应性广泛、储藏根淀粉含量高(达干重的85%)等特

性,在生物质能源的开发和利用中占有非常重要的地位^[1]。因此,可利用荒山、荒地、沙土地等边缘地带开展木薯种植,做到不与粮食争地;同时又有环境效益,符合生物能源与粮食生产和谐发展的长期战略,有利于保障国家的粮食安全^[1]。目前,我国已经建立了多家以木薯为原料进行非粮燃料乙醇

收稿日期:2008-07-17 接受日期:2008-09-11

基金项目:中国科学院先进工业生物技术创新基地重要方向项目(KSCX2-YW-G-026, KSCX2-YW-G-035);上海市浦江人才计划(08PJ14109)资助

* 通讯作者 Corresponding author

生产的企业,承担年产 1.0×10^6 t 燃料乙醇的任务;但是收获后木薯的储藏根不耐贮藏,易变质,必须在 3 d 内加工,否则储藏根周边部位出现褐变或青褐变,并且呈现长的筋状,被称之为木薯特有的“采后生理性变质”(post-harvest physiological deterioration, PPD; 图 1)^[2]。这种变质是由酚类等物质氧化所引起,会导致储藏根褐化及腐烂,影响其食用、加工及产品性能,给农民和淀粉及燃料乙醇加工企业造成严重的经济损失。据统计每年由于木薯采后生理性变质导致的损失都在收获量的 5% 以上,直接经济损失达 2 亿元以上。对于少量的储藏根,在收获后可通过立即封蜡、套袋或加工成干片来抑制生理性变质,但增加了原材料成本^[3-4],不适用于

规模化木薯加工企业。采收前两周对木薯的茎秆进行修剪可在一定程度上延缓储藏根的采后生理性变质,但会导致储藏根的食品品质和淀粉质量大大降低,限制了该方法的应用^[5-6]。至今,尚未有一种行之有效的方法可用于抑制木薯储藏根的采后生理性变质。因此,探索木薯采后生理性变质的内在生理生化变化,并研究其发生的原因、途径及其影响因素等,对有效抑制木薯采后生理性变质具有重要的理论和实践意义。

随着木薯生物技术的发展,利用功能基因组学及基因工程,从种质资源的遗传学角度来解决木薯的采后生理性变质问题,将对木薯产业化乃至全球木薯种植业产生重大的推动作用^[1]。

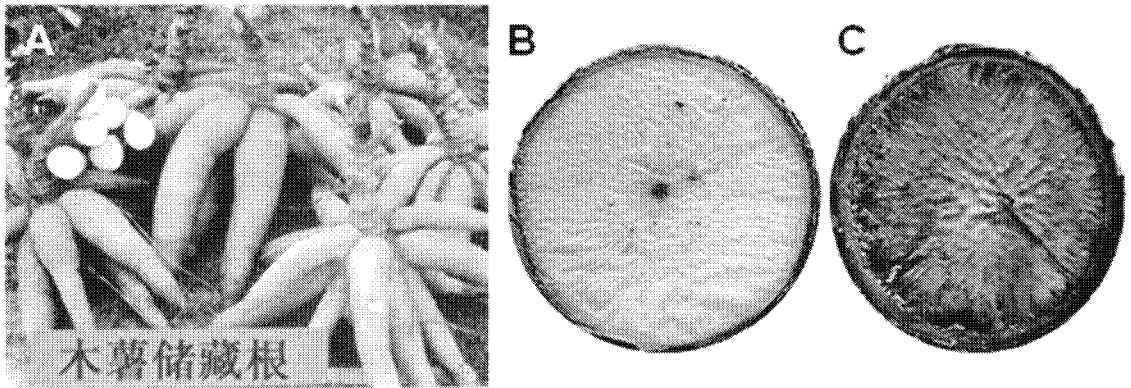


图 1 木薯储藏根采后生理性变质的发生

Fig. 1 The comparison of post-harvest physiological deterioration in cassava storage roots

A, B: 收获时 Harvesting; C: 收获后 72 h 72 hours after harvest

1 木薯采后生理性变质的检测标准

目前,对于木薯储藏根采后生理性变质没有统一性、定量的检测标准。普遍接受的是国际热带作物研究中心(The International Center for Tropical Agriculture, CIAT)建立的目测法。此方法是在恒温、恒湿条件下对木薯储藏根定期进行切块观察,根据变质程度(黑色斑点)作为检测标准(图 2)。这

个方法的优点是直接,但不能精确定量。最近,我们提出利用酶活琼脂糖扩散法来检测采后变质的程度。该方法是对木薯储藏根的总蛋白进行分析,然后测定采后生理性变质过程中涉及的关键酶的活性,例如纤维素酶、果胶酸裂解酶、果胶酶、 α -淀粉酶等,以期建立一个定性、定量的分析方法。目前正利用不同收获时期和不同基因型的木薯储藏根对该标准的可靠性进行验证。

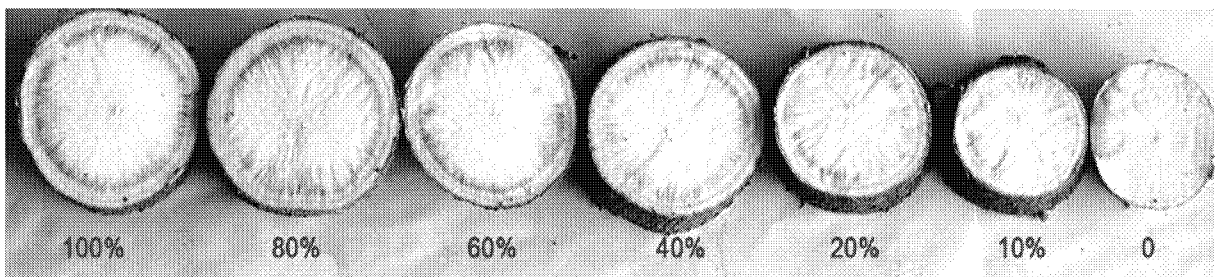


图 2 木薯储藏根采后生理性变质(PPD)程度的目测检测标准(CIAT 提供)

Fig. 2 The standard of post-harvest physiological deterioration (PPD) levels in cassava storage roots (Provided by CIAT)

2 木薯采后生理性变质的生理生化基础

早期关于木薯储藏根采后生理变质的研究主要集中在生理生化方面^[7-10]。木薯储藏根的变质过程可分为初级变质或生理性变质和次级变质。初级变质是一个内在的生理生化过程,而次级变质主要是由于微生物侵染所导致,是引起后期变质的主要原因。木薯初期变质发生相当迅速,与收获和储存过程中的机械伤害明显相关。在大多数情况下,初级变质发生于组织受伤部位^[1],最初维管组织出现深蓝色污点(即“vascular streaking”症状),接着储藏薄壁组织迅速出现大面积的污点。病原体从收获和处理过程中造成的伤口和擦伤处侵入,导致次级变质发生;并且在高度潮湿的环境下,通常会导致真菌性腐烂。大多数植物在组织受到伤害后会产生一系列的应答反应,如甘薯(*Ipomoea batatas*)通过启动受伤组织的防御体系,重新形成保护屏障(周皮)使暴露的组织愈合。一般的伤害反应与裂解酶、蛋白酶抑制蛋白和富含羟脯氨酸糖蛋白的防御功能直接相关。Wheatley^[11-12]等报道木薯储藏根的初级变质(生理性变质)与过氧化物酶介导的酚类化合物的氧化有关,出现呼吸速率增强、脂质成分改变、乙烯合成、伤口诱导的氧化爆发、酚类等次级代谢物的积累。其中涉及到的酚类化合物主要包括:东莨菪素、东莨菪苷、七叶武、原花青素、儿茶精及倍儿茶素。在受伤后24 h内,木薯储藏薄壁组织中东莨菪素含量最高。随着生理变质的发生,黄烷醇和原花青素的含量继续增加。Chavez^[13]等报道木薯储藏根中类胡萝卜素含量达到一定水平(5 mg kg⁻¹ FW)则可降低采后生理性变质的程度,进一步证实了采后生理性变质与酚类化合物有关。目前仅对乙烯的形成过程进行了研究。与其他的植物一样,木薯在伤口应答反应时产生乙烯,并表现出持续增加的趋势;但目前没有证据证明乙烯的产生与生理性变质有直接关系^[14]。采收前修剪可有效抑制生理性变质,但对乙烯的形成没有显著的影响,而且内生乙烯的应用对伤口应答反应也没有影响。生物膜在生物的氧化还原过程中起重要作用,生物膜的解体,会产生有害的分子或氧原子,例如过氧化物、纯态氧或者脂质过氧化物,从而导致严重的自我催化伤害^[15];而过氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶、单脱氢抗坏血酸还原酶、过氧化氢酶和过氧化物酶等则与氧原子及其衍生物的解

毒有关。木薯储藏根在采后生理性变质过程中,与损伤修复机制相关的酶发生转录或蛋白质水平上的变化,进行自我修复,但修复能力比较低;且这种修复能力有严格的条件限制,未剥离植物体的储藏根具有正常的伤口愈合反应^[16];而已经收获的储藏根的伤口愈合能力较弱,导致伤口反应逐渐扩散遍及整个储藏根,出现PPD现象。其原因可能是在进化过程中,伤口愈合反应对收获的储藏根没有实际的生物学意义而逐渐丢失^[17]。

3 木薯抗采后生理性变质的杂交育种

木薯在遗传上高度杂合,后代分离严重,且采后生理性变质由多基因控制,易受环境影响^[18],因此,利用木薯野生资源,结合传统育种技术培育抗采后生理性变质的木薯新品种进展缓慢,一直处于探索阶段。最近国际热带作物研究中心(CIAT)用木薯野生种 *M. walkerae* 与木薯栽培种 CM1520-10 进行杂交,杂交后代的储藏根表现出明显的采后生理性变质滞后的现象,为利用野生资源开展木薯抗采后生理性变质提供了可能^[19]。

4 木薯抗采后生理性变质的功能基因组学与基因工程

木薯采后生理性变质对木薯产业化具有重大影响,与木薯采后生理性变质相关的功能基因组学研究日益受到关注。放线(菌)酮抑制蛋白合成,表明PPD是一个基因表达和蛋白合成的过程,涉及多个生化途径与反应,其中较为重要的是活性氧(reactive oxygen species, ROS)途径。目前已对木薯采后生理性变质过程中与ROS清除相关的酶进行了较为详细的研究,包括过氧化氢酶(catalase, CAT)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanin ammo-nialyase, PAL)、过氧化物酶(peroxidase)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等^[17]。Beeching等^[18-23]利用cDNA-AFLP技术对PPD过程中相关的蛋白和酶进行分析,表明这些蛋白和酶涉及到信号转导、ROS、细胞壁修复、细胞程序化死亡、代谢物转运、信号传导等一系列生物过程。Reilly等^[12]利用木薯cDNA微阵列鉴定了72个特异表达的EST,其中63条为上调基因,9条为下调基因,这些基因涉及上述所有途径。Sakurai等^[24]对2万条全长cDNA进行克隆研究,表明与ROS相关的基因存在多拷贝现象,预示这些基因在逆境胁迫及采后生理

性变质过程中起着重要的作用。利用蛋白组学对采后不同时期木薯的蛋白组学的研究表明,许多与 ROS 及细胞程序化死亡相关的蛋白都有相应程度的表达,如过氧化氢酶、抗坏血酸过氧化物酶、谷胱甘肽转移酶等(未发表结果)。基于目前木薯采后生理性变质的研究进展,初步建立了其发生的分子模型(图 3)。

通过 RNAi 干扰或过表达 PPD 途径中的关键步骤或因子,可以从本质上延缓 PPD 的发生或降低其发生的程度。转基因技术是实现干扰、表达或过表达外源基因的有效途径。目前木薯的遗传转化仅局限在 TMS60444、MCo122 等几个模式品种上^[25],但该技术已有所突破并趋于成熟。木薯的遗传转化主要是用农杆菌侵染或基因枪轰击等技术,以体细胞胚子叶为转化材料,经芽器官发生或体细胞胚胎发生获得转基因植株;或以脆性胚性悬浮培养细胞为转化材料,经体细胞胚胎发生获得转基因植株。目前已利用转基因技术对木薯多种农艺性状进行改良,主要包括增强木薯的抗病毒能力、提高其营养品质、降低氰化物含量及提高生物质产量等^[26-29]。而关于延缓木薯采后生理性变质的研究还比较少。随着木薯转基因技术的不断成熟,为利用转基因技术延长木薯采后储藏期提供了可能。分子生物学研究表明采后生理性变质与 ROS 有着密切的关系,是一个氧化过程,但木薯自身修复的机制似乎不健全或受到抑制^[17]。因此,可利用转基因技术,在木薯储藏根中表达或过表达与超氧自由基清除机制相关的酶或蛋白,以达到延缓或抑制木薯储藏根采后生理性变质的目的。

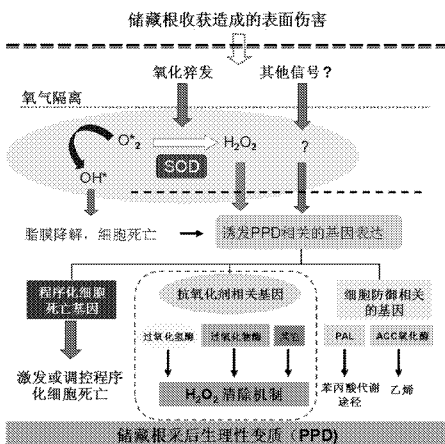


图 3 木薯 PPD 发生的分子模型

Fig. 3 Schematic molecular model of post-harvest physiological deterioration in cassava storage roots

5 应用前景与存在的问题

目前关于木薯储藏根采后生理性变质的研究虽然已经取得了一定进展,但是仍然有一些问题需要进一步探讨和解决:

(1)木薯采后生理性变质受多种因素的影响,如基因型、温度、湿度、储藏根收获时的生长状态及损伤程度等,因此需要建立一个可靠的鉴定木薯采后生理性变质的标准,为 PPD 的研究及检测提供依据。CIAT 建立的目测法很难定量,而酶活琼脂糖扩散法的关键是从采后生理性变质过程中所涉及的众多的酶中找到一个可靠的指示酶,检测 PPD 发生的程度。由于 PPD 过程涉及多个途径和多种因素,因此需要进行大量实验来确定这个关键酶。

(2)木薯储藏根采后生理性变质发生的生理生化基础是酚类化合物的氧化过程,与超氧自由基有着密切的关系。木薯芯片研究结果表明在采后生理性变质发生过程中许多与超氧自由基转换相关的酶强烈上调表达,因此,目前需要探索 ROS 产生及清除相关基因(酶)的时空表达与采后生理性变质之间的关系,了解在采后生理性变质发生过程中不同 ROS 清除机制和不同基因的作用。

(3)ROS 清除机制可有效地降低细胞内氧化反应造成的伤害。ROS 转换至少涉及下列 4 个步骤,超氧根负离子(O_2^-)经 SOD 转换成 H_2O_2 ,然后再经抗坏血酸-谷胱甘肽循环、谷胱甘肽过氧化物酶循环及过氧化物氧化还原酶循环转换成 H_2O 或经 CAT 转化成 O_2 (图 4)。

在拟南芥中关于上述循环的生理生化作用及 ROS 信号传导途径已经研究的比较清楚,但是在木薯中关于该循环的调控机制及其在木薯采后生理性变质中的作用研究非常少。因此,有望通过转基因技术,表达或干扰与 ROS 清除相关的基因,例如过表达 CAT、SOD 基因,加速由 H_2O_2 至 O_2 的转化;或者过表达抗坏血酸-谷胱甘肽循环、谷胱甘肽过氧化物酶循环及过氧化物氧化还原酶循环中关键的酶,促进 H_2O_2 至 H_2O 的转化;又或者通过 RNAi 技术干扰 NADPH 氧化酶的活性,阻碍细胞内氧化反应的发生,从而达到延缓或抑制采后生理性变质的目的,为我们进一步了解该过程的分子生物学及生理生化机理,建立木薯采后生理性变质过程中 ROS 清除机制的分子模型提供实验依据。

(4)通过转基因技术改良木薯采后生理性变质

的前提是获得稳定表达的转基因植株;而目的基因的稳定表达与整合拷贝数及插入位点有关,多拷贝转基因常常导致目的基因的沉默,因此必须获得足够的单拷贝转基因株系。因此在进行遗传转化时,需要对转化条件进行控制,如:共培养温度、时间、农杆菌浓度等,以使转基因木薯含有单拷贝的目的基因,符合转基因的要求。

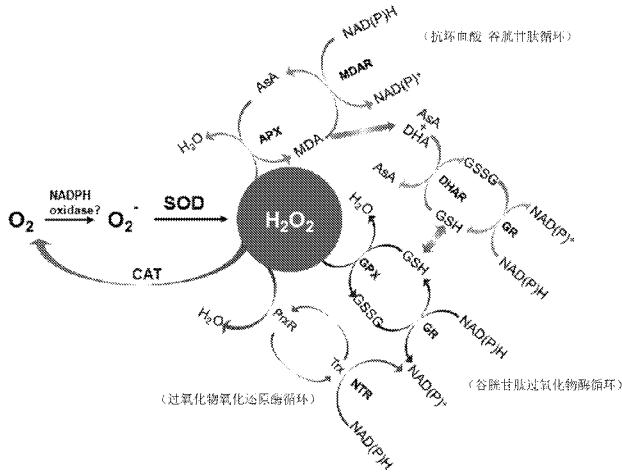


图 4 ROS 产生与清除的分子机制

Fig. 4 The molecular mechanism of ROS production and scavenging

APX: Ascorbate peroxidase; CAT: Catalase; DHAR: Dehydroascorbate reductase; GAR: Galacturonic acid reductase; GCS: γ -Glutamylcysteine synthetase; GPX: Glutathione peroxidase; GR: Glutathione reductase; SOD: Superoxide dismutase

目前,木薯生物技术和育种专家们正参与盖茨基金会资助的 BioCassava Plus 项目,其目标之一就是延缓储藏根采后生理性变质,这将使延缓或抑制木薯采后生理性变质成为可能。

参考文献

[1] Zhang P(张鹏). The harmonious development of food security and bio-energy using cassava and sweet potato in China [C]// The Annual Report of Life Sciences and Industrial Biotechnology. Beijing: Science Press, 2006: 39-47.(in Chinese)

[2] Plumbly R A, Rickard J E. Post-harvest deterioration of cassava [J]. Trop Sci, 1991, 31: 295-303.

[3] Booth R H. Storage of fresh cassava (*Manihot esculenta* Crantz) I. Post-harvest deterioration and its control [J]. Exp Agri, 1976, 12: 103-111.

[4] Booth R H. Storage of fresh cassava (*Manihot esculenta* Crantz) II. Simple storage techniques [J]. Exp Agri, 1977, 13: 119-128.

[5] Kato M D A, Decarvalho V D, Correa H. Effects of pruning on physiological deterioration, enzymatic activity and phenolic compound levels in cassava roots [J]. Pesq Agropec Bras, 1991, 26: 237-245.

[6] Reilly K, Gómez-Vásquez R, Buschmann H, et al. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration [J]. Plant Mol Biol, 2004, 56: 625-641.

[7] Wenham J E. Post-harvest deterioration of cassava: A biotechnology perspective [C]// FAO Plant Production and Protection Paper 130. Rome (Italy): FAO, 1995: 12-45.

[8] Hirose S. Physiological studies on post-harvest deterioration of cassava plants [J]. Jpn Agri Res Q, 1986, 19: 241-252.

[9] Rickard J E. Biochemical changes involved in the post-harvest deterioration of cassava roots [J]. Trop Sci, 1981, 23: 235-237.

[10] Rickard J E. Physiological deterioration of cassava roots [J]. J Sci Food Agri, 1985, 36: 167-176.

[11] Wheatley C C, Schwabe W W. Scopoletin involvement in post-harvest physiological deterioration of cassava root (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. J Exp Bot, 1985, 36: 783-791.

[12] Reilly K, Bernal D, Cortes D F, et al. Towards identifying the full set of genes expressed during cassava post-harvest physiological deterioration [J]. Plant Mol Biol, 2007, 64: 187-203.

[13] Chavez A L, Bedoya J M, Sanchez T, et al. Iron, carotene, and ascorbic acid in cassava roots and leaves [J]. Food Nutr Bull, 2000, 21(4): 410-413.

[14] Hirose S, Data E S, Quevedo M A. Changes in respiration and ethylene production in cassava roots in relation to post-harvest deterioration [C]// Uritani I, Reyes E D. Tropical Root Crops: Postharvest Physiology and Processing. Tokyo: Japan Scientific Societies, 1984: 83-98.

[15] Taylor N, Chavarriaga P, Raemakers K, et al. Development and application of transgenic technologies in cassava [J]. Plant Mol Biol, 2004, 56: 671-688.

[16] Mwenje E, Ride J P, Pearce R B. Distribution of Zimbabwean *Armillaria* groups and their pathogenicity on cassava [J]. Plant Pathol, 1998, 47: 623-634.

[17] Reilly K, Gómez-Vásquez R, Buschmann H, et al. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration [J]. Plant Mol Biol, 2003, 53: 669-685.

[18] Cortés D F, Reilly K, Beeching J R, et al. Mapping genes implicated in post-harvest physiological deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. Euphytica, 2002, 128: 47-53.

[19] CIAT. CIAT Annual Report 2006-2007 [C]. Cali, Colombia: CIAT Press, 2007: 8-9.

[20] Beeching J R. R7550: Generation and dissemination of knowledge on post-harvest physiological deterioration in cassava [M]// Final Technical Report, DFID Crop Post-Harvest Programme, London: DFID Documents, 2001: 5-20.

[21] Han Y, Gómez-Vásquez R, Reilly K, et al. Hydroxyproline-rich glycoproteins expressed during stress responses in cassava [J]. Euphytica, 2001, 120: 59-70.

[22] Huang J, Bachem C, Jacobsen E, et al. Molecular analysis of differentially expressed genes during postharvest deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tuberous roots [J]. Euphytica, 2001, 120: 85-93.

- [23] Reilly K. Oxidative stress-related genes in cassava post-harvest physiological deterioration [D]. Bath: University of Bath, UK, 2001: 6–82.
- [24] Sakurai T, Plata G, Rodríguez-Zapata F, et al. Sequencing analysis of 20000 full-length cDNA clones from cassava reveals lineage specific expansions in gene families related to stress response [J]. *BMC Plant Biol*, 2007, 7: 66.
- [25] Taylor N, Chavarriaga P, Raemakers K, et al. Development and application of transgenic technologies in cassava [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56: 671–688.
- [26] Zhang P, Jaynes J M, Potrykus I, et al. Transfer and expression of an artificial storage protein (*ASPI*) gene in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Transgenic Res*, 2003, 12: 243–250.
- [27] Zhang P, Vanderschuren H, Fütterer J, et al. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes [J]. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3: 385–397.
- [28] Vanderschuren H, Akbergenov R, Pooggin M, et al. Transgenic cassava resistance to African cassava mosaic virus is enhanced by viral DNA — A bidirectional promoter-derived siRNAs [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 64: 549–557.
- [29] Zhang P, Gruijssem W. Leaf senescence-inducible expression of isopentenyl transferase in cassava rendering it resistant to drought stress. Session: plants and abiotic stresses [C]// Tielkes E, Huelsebusch C, Haeuser I, et al. *The Global Food & Product Chain — Dynamics, Innovations, Conflicts, Strategies*. Germany: University of Hohenheim, Stuttgart, 2005: 260–272.