

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.02.002

黄强, 田益农, 黄惠芳, 等. 植物分子育种技术在改良木薯种质方面的应用[J]. 广西植物 2013, 33(2): 148 - 153

Huang Q, Tian YN, Huang HF *et al.* Application of plant molecular breeding in improving cassava germplasm[J]. *Guihaia* 2013, 33(2): 148 - 153

植物分子育种技术在改良木薯种质方面的应用

黄 强^{1,2}, 田益农^{1,2}, 黄惠芳^{1,2}, 彭靖茹^{1,2}, 侯学文^{3,4*}

(1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 南宁 530001; 2. 广西壮族自治区木薯研究所, 南宁 530001;

3. 华南农业大学 生命科学学院 分子植物生理研究室, 广州 510642; 4. 华南农业大学

生命科学学院 植物功能基因组与生物技术重点实验室, 广州 510642)

摘 要: 木薯是热带、亚热带地区的重要粮食作物和经济作物。培育出生产性状更加优良的木薯品种, 是推进木薯产业更快更好发展的重要基础。分子育种技术在培育优良木薯品种方面具有传统育种技术不可比拟的优势。该文介绍了近年来在提高植物抗寒性与病虫害抗性、降低氰苷含量、提高淀粉含量及组成、改变储存物种类、防止木薯收获后变质等方面的研究进展, 以便在这些研究进展的基础上, 利用植物分子育种技术加快获得具有抗逆能力提高、品质改良、产量增加、耐储藏等优良特性的木薯新品种。

关键词: 木薯; 分子育种; 种质改良

中图分类号: S188 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)02-0148-06

Application of plant molecular breeding in improving cassava germplasm

HUANG Qiang^{1,2}, TIAN Yi-Nong^{1,2}, HUANG Hui-Fang^{1,2},
PENG Jing-Ru^{1,2}, HOU Xue-Wen^{3,4*}

(1. *Guangxi Subtropic Crops Research Institute*, Nanning 530001, China; 2. *Guangxi Cassava Research Institute*, Nanning

530001, China; 3. *Lab of Molecular Plant Physiology, College of Life Sciences, South China Agricultural University*,

Guangzhou 510642, China; 4. *Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Biotechnology, College*

of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta*) is an important food and economic crop in tropical and subtropical areas. Breeding elite cassava cultivars is the most important foundation of cassava industry. Plant molecular breeding has obvious advantages compared to the traditional breeding. The advances in application of molecular approaches to improve cold tolerance, pest, pathogen and herbicide resistance, reduce cyanogens level, improve starch content, change storage composition and alleviate post-harvest physiological deterioration (PPD) in cassava were discussed to promote the cultivation of elite cassava cultivars with stress-resistant, increased quality, production and storage tolerance improved characteristics.

Key words: cassava; molecular breeding; germplasm improvement

木薯(*Manihot esculenta*) 是大戟科木薯属植物, 为该属植物中唯一的栽培种, 与马铃薯、红薯合称世界三大薯类作物。木薯起源于南美洲的亚马逊河流

域, 现广泛栽培在 30° N ~ 30° S 的热带、亚热带区域。木薯能在较难栽培其它作物的土地上生长并获得满意产量; 且木薯块根中的淀粉占鲜重的 30% 左

* 收稿日期: 2012-10-15 修回日期: 2012-12-24

基金项目: 广西主席基金(09203-03)

作者简介: 黄强(1967-), 男, 广西灵山县人, 研究员, 从事生物技术、品种引进等研究。(E-mail) rzshq@163.net。

通讯作者: 侯学文, 研究员, 研究方向为植物生物技术。(E-mail) hxw1969@scau.edu.cn。

右,被称为“淀粉之王”、“地下粮仓”(Balagopalan, 2002)。据2008年FAO的新闻公报,2006年世界木薯产量为2.26亿吨,已成为发展中国家的第四大粮食作物,为105个国家的近10亿人提供口粮。此外木薯是工业上最廉价的淀粉来源,用途十分广泛,特别是随着石油价格飙升,木薯淀粉作为燃料乙醇原料的价值日益凸显(王亚静等,2009)。社会对木薯淀粉的强劲需求,促使人们去培育种质更加优良的木薯品种。

木薯品种的培育有常规杂交育种和逐渐兴起的分子育种。木薯的常规育种由于木薯植株高度杂合、花粉育性低、有性子代分离严重以及优质种质资源的匮乏(如抗性基因资源贫乏)等问题,使得利用常规杂交育种获得优良的木薯品种困难较大以及所需时间较长。而近年来植物生物技术的发展,使得植物分子育种技术在改良植物品质方面的应用逐渐成熟。分子育种技术在培育木薯优良品种方面将具有如下优势:(1)该技术可以将其它物种来源的有益基因快速导入木薯基因组中,有效解决木薯抗性基因资源贫乏的问题;(2)木薯是无性繁殖,因此不存在转入的基因在有性生殖过程中的分离问题,使获得的转基因优良株系能快速形成品种;(3)在我国的主要栽培地区,木薯未开花即已收获,因此不存在外源基因随花粉漂移至其它近缘物种的问题;(4)木薯在我国主要作为工业原料,食用的比例很小,基本无需担心转基因木薯的安全性。木薯遗传转化体系如脆性胚性愈伤FEC、次生胚状体子叶、叶盘法以及次生胚状体等已经建立起来,为采用分子育种技术培育木薯品种扫清了障碍(Raemakers *et al.*, 1997; 李洪清等,1999)。可以预见,分子育种技术将在木薯优良品种的培育中逐渐占据主要地位(Taylor *et al.*, 2004)。本文将就分子育种技术在木薯育种的可能应用进行探讨,以期促进木薯分子育种工作的开展。

1 提高木薯淀粉含量与改变木薯淀粉构成

植物中淀粉生物合成途径已经比较清楚,并且从木薯基因组中发现并克隆了淀粉合成相关基因,这样就便于采用基因表达调控技术来提高木薯块根淀粉含量,或者改变木薯淀粉的组成与结构,使之更好地满足不同工业用途的需要。

木薯块根淀粉的生物合成是在块根淀粉体中,由腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)、可溶性淀粉合成酶(SSS)、颗粒淀粉合成酶(GBSS)、淀粉分支酶(SBE)以及脱分支酶(DBE)等多种酶协同作用,合成支链淀粉和直链淀粉(Munyikwa *et al.*, 1997)。AGPase是淀粉合成的关键限速步骤,如果能提高AGPase活性就有可能使淀粉产量增加。高等植物的AGPase是由大、小亚基构成的异源四聚体($\alpha_2\beta_2$),小亚基起催化作用,大亚基则调控小亚基的活性,而且它们之间必须协调表达才能表现出AGPase活性(Smith-White *et al.*, 1992)。而大肠杆菌中的AGPase是由单个*glgC*编码的同源四聚体,而且发现其336位的氨基酸由天冬氨酸(Asp)突变为甘氨酸(Gly)后,该酶对激活剂1,6-二磷酸果糖依赖性降低,并对抑制剂AMP的抑制不敏感,这一有利突变使大肠杆菌糖原合成比野生型增加了33%(Leung *et al.*, 1986)。鉴于此,在调控淀粉含量的植物分子育种研究中,大都采用大肠杆菌来源的*glgC*(Asp336Gly)基因代替植物来源的AGPase基因。Stark *et al.*(1992)将来自于拟南芥1,5-二磷酸羧化酶小亚基叶绿体转运肽(CTP)序列与*glgC*(Asp336Gly)融合,然后分别在35S组成型启动子、马铃薯块茎特异*patatin*启动子驱动下转入马铃薯中,结果发现在35S组成型启动子驱动下获得转基因苗的效率偏低,而且转基因苗的生长发育不正常;在马铃薯块茎特异*patatin*启动子不仅转化效率正常,而且转基因马铃薯株系的淀粉平均含量比对照增加了35%。姚庆荣等(2007)将35S启动子驱动的*glgC*(Asp336Gly)导入烟草中,发现转基因烟草株系淀粉含量比野生型平均增加了13.1%;随后她又将块根特异*sporamin*启动子驱动的*glgC*(Asp336Gly)导入木薯中,发现转基因木薯株系的AGPase活性增加1.39%~35.54%,淀粉含量最高增加1.59%。淀粉含量增加不明显的原因可能是没有采用质体转运肽CTP,导致AGPase未能被转运到其发挥功能的淀粉体中。Ihemere *et al.*(2006)采用马铃薯块茎特异*patatin*启动子驱动豌豆1,5-二磷酸羧化酶小亚基叶绿体转运肽序列与*glgC*(Asp336Gly)融合转化木薯,获得的转基因木薯株系AGPase活性提高了70%,在温室条件下不仅其块根数目增加,块根生物量为非转基因对照2.6倍,并且地上部生物量也明显增加。根据上述分析我们已经构建了将块根特异*sporamin*启动子驱动的木薯

AGPase 小亚基 CTP 序列与 *glgC* (Asp336Gly) 融合的转化载体, 并进行木薯转化实验来试图提高木薯淀粉含量。Lloyd *et al.* (1999) 报道调控马铃薯 AGPase 活性会影响其淀粉组成(支链与直链淀粉比例)、淀粉颗粒大小, 以及导入 *glgC* (Asp336Gly) 会导致淀粉磷酸化程度的变化。如果这些改变也能发生在转基因木薯中, 或许会拓展木薯淀粉的应用。

调控可溶性淀粉合成酶、颗粒淀粉合成酶、淀粉分支酶以及脱分支酶也能对木薯淀粉的组成和结构产生影响(Munyikwa *et al.*, 1997)。Raemakers *et al.* (2005) 通过反义技术下调木薯 GBSSI 的活性, 获得了不含直链淀粉的转基因木薯。对其淀粉性质分析表明, 虽然其淀粉颗粒分布、链长分布、磷酸化程度没有变化, 但其融化温度却提高了近 2 °C, 而且不需环境不友好的化学试剂处理, 其胶的透明度和稳定性明显提高, 这在工业应用中是一个有利的变化。我们也在采用 RNAi 技术调控木薯可溶性淀粉合成酶(SSS)、颗粒淀粉合成酶(GBSS) 的活性, 期望能获得淀粉性质优良的转基因木薯株系。

2 提高木薯抗病虫害能力

木薯虽然具有较强的抗病虫害能力, 但也会遭受如粉蚧、粉虱、天蛾幼虫、木薯花叶病毒、木薯褐条病等的危害。除了化学农药防治、常规选育或培育抗病品种外, 采用分子育种技术培育木薯抗病虫害新品种将会具有事半功倍的效果。目前针对不同的病虫害类型有相应的抗性基因可以使用。

对虫害, 目前可供选择的抗虫基因有 Bt 毒蛋白基因(主要针对鳞翅目、鞘翅目害虫)、植物凝集素基因(主要针对刺吸式口器的同翅目害虫)、蛋白酶抑制剂基因、淀粉酶抑制剂基因以及昆虫神经毒素基因等。如将 Bt 毒蛋白基因 *cry1Ab* 在组成型 35S 启动子驱动下转入木薯品种 CM 3306-4, SM1219-9, cv. 60444 中, 并对 *cry1Ab* 在木薯品种 60444 中的表达以及蛀茎虫、天蛾幼虫的抗性进行了初步测试, 结果是令人鼓舞的(Taylor *et al.*, 2004)。

对真菌、细菌病害, 目前可供选用的抗菌基因有植保素合成基因、几丁质酶基因、 β -葡聚糖酶基因、抗菌多肽以及广谱抗性基因 *PR* 等。

对病毒造成的危害, 目前通过扰乱病毒的脱壳、复制及转移等过程, 降低病毒的繁殖从而达到控制其危害的目的。RNAi 技术通过降低植物体内 RNA 含

量而有效降低病毒的繁殖是比较有效的方法。

3 提高木薯抵抗干旱、寒冷等逆境的能力, 扩大木薯种植范围

虽然相对于其它作物, 木薯的耐旱性已经比较高, 但木薯也时常受到季节性、区域性干旱的影响。如果能采用分子育种技术进一步提高木薯的抗旱性, 则对提高木薯的产量及种植范围具有重要意义。

干旱是植物在生长发育过程中常遇到的非生物逆境之一, 植物在进化过程中也发展出了许多相应的抗旱机制。目前已经发现了许多与植物抗旱相关的基因, 按照它们的功能类别可以划分为两大类: 第一类基因编码产物是在植物的抗旱性中直接起保护作用的蛋白质, 如合成渗透调节物质海藻糖、甘露醇、脯氨酸、甜菜碱、果聚糖等的关键酶类; 具有抗氧化保护作用的酶类, 如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT) 和抗坏血酸过氧化物酶(ASP) 等; 保护生物大分子及膜结构的蛋白质, 如胚胎发生晚期富集蛋白(LEA) 等; 水通道蛋白, 如主要内在蛋白(MIP) 等。第二类基因编码产物是在信号传导和抗逆基因表达过程中起调节作用的蛋白质因子, 包括(1) 传递信号和调控下游基因表达的转录因子, 如 *DREB*、*MYC/MYB*、*bZIP*、*WRKY* 和 *NAC* 类等基因。(2) 感应和转导干旱胁迫信号的蛋白激酶, 如 MAPK 和 CDPK 等;(3) 与第二信使生成有关的酶类, 如磷脂酶等不同磷脂水解磷酸二酯键, 可产生 IP₃、DAG、PA 等(康宗利等, 2006; 唐益苗等, 2009)。相信通过分子育种技术将这些抗旱基因导入木薯基因组中, 将会进一步提高木薯抗干旱的能力。

木薯起源于热带, 低温是限制其北移种植的首要问题。如果能通过基因工程技术提高木薯的耐寒性, 则有可能使木薯种植进一步北移, 这对增加木薯淀粉供应量十分有利。近年来的研究表明, 可用于提高植物抗寒性的基因有两类: 一是抗寒功能基因, 如来源于极地鱼类或植物的抗冻蛋白基因 *AFP*、脂肪酸去饱和酶基因(如甘油-3-磷酸脂酰基转移酶基因、植物硬脂酰 ACP 去饱和酶基因、 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因以及 Δ 6、 Δ 9、 Δ 12 基因等)、抗氧化酶基因(如超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和抗坏血酸过氧化物酶等) 以及合成渗透调节物质的关键酶基因(如合成海藻糖、甘露醇、脯氨酸、甜

菜碱、果聚糖等的关键酶基因)等;另一类是调控抗寒功能基因表达的调控基因,主要是与抗寒相关的转录因子基因,如 *CBF*、*DREB*、*ABP2* 和 *ICE1* 等转录因子(刘荣梅等 2008;陈儒钢等 2008)。利用这些基因在提高水稻(Shi *et al.* 2012)、甘薯(Kim *et al.* 2011)和小黑杨(王遂等 2011)等抗寒性方面已取得进展。目前在木薯抗旱、抗寒方面研究还不多,应加强木薯抗旱、抗寒等方面的分子育种研究。

4 降低木薯氰苷含量,拓展木薯应用范围

木薯的块根及叶片中均含有氰苷,如果处理不当会对人畜产生毒害。依据品种的不同,每千克新鲜木薯根含氰基化合物在 15 ~ 1 500 mg 之间,其中 2 ~ 5 mm 表皮含量较高,平均达 577 mg/kg。在木薯叶片中,Val、Ile 分别通过细胞色素氧化酶 P450s (*CYP79D1* 和 *CYP79D2*) 等酶的作用,被合成为氰基化合物亚麻苦苷(95%)、百脉根苷(5%),再经韧皮部转运木薯根部细胞的液泡中存储起来;当木薯根受伤时,亚麻苦苷、百脉根苷通过亚麻苦苷酶、氰基水解酶 HNL 等酶的作用,最后形成氢氰酸而释放出来。因为木薯根亚麻苦苷酶活性比叶片低,氰基水解酶 HNL 活性在根中很低或没有,导致木薯根中丙酮合氰化氢累积至毒性水平(Gallo *et al.* 2009)。根据上述氰化物的形成机制,可以采用三种手段来降低木薯块根氰苷的含量。

第一种方法是在木薯根中超表达 *HNL* 以加快根中有毒氰化物的降解。Siritunga *et al.* (2004) 用两个 35S 启动子驱动表达 *HNL*,获得的转基因株系叶片中 *HNL* 酶活性增加了 40% ~ 135%,根中 *HNL* 酶活性更是比对照增加了 8 ~ 13 倍,经 2 h 匀浆处理后测定转基因株系的丙酮合氰化氢含量是野生型的 1/3,说明转基因株系能用较短的时间脱除有毒氰化物,可以大大简化木薯块根的脱毒处理。重要的是转基因株系的亚麻苦苷含量、亚麻苦苷酶活性与野生型是一样的,这表明,亚麻苦苷作为植食性害虫的拒食剂和流动的还原态氮的有益作用仍然得以保留。第二种方法用 RNA 干扰技术抑制氰基化合物亚麻苦苷、百脉根苷的合成。Anderson *et al.* (2000) 的工作表明,木薯细胞色素氧化酶 P450s (*CYP79D1* 和 *CYP79D2*) 是催化合成氰基化合物亚麻苦苷、百脉根苷的第一个酶,而且是一个关键酶。

Siritunga & Sayre (2003) 用叶片特异的启动子反义表达 *CYP79D1/CYP79D2*,分析表明转基因株系叶片的 *CYP79D1/CYP79D2* 表达受到抑制,根部的表达未受影响;转基因株系叶片亚麻苦苷含量比野生型降低了 60% ~ 94% 之间,转基因株系根部的亚麻苦苷含量比野生型均降低了 99%。Jørgensen *et al.* (2005) 采用增强型 35 S 启动子构建 *CYP79D1* 和 *CYP79D2* 的干涉载体,获得的大部分转基因株系根部亚麻苦苷含量比野生型降低了 92%,叶片下降了 99%;采用韧皮部环割技术表明亚麻苦苷大部分是在枝条顶端合成,然后通过韧皮部转运到根部储存。采用原位 RT-PCR 检测表明,在叶片中 *CYP79D1* 和 *CYP79D2* 主要在靠近表皮的叶肉细胞中表达;在幼嫩的叶柄中,主要在表皮、皮层的前两层细胞、中柱鞘和内皮层、以及围绕乳汁管的薄壁细胞等部位表达。这一结果表明可以通过阻止叶片与叶柄中氰苷的合成来降低木薯根的氰苷含量。干涉株系氰苷含量低于野生型 25% 时,在 1/2MS 培养基上会表现出茎纤细、节较长、叶片小且易萎蔫、根发育不良等表现,但当转移至 MS 培养基时,这些表型会部分缓解,转移至土壤中时就会完全恢复而与野生型没有差异。说明以氰苷形式还原态氮输入根部的减少不会影响木薯块根的形成。

第三种方法是阻断氰苷向木薯根的转运。在巴西橡胶树中就发现亚麻苦苷以亚麻苦苷酶不敏感的亚麻双糖苷的形式转运(Selmar, 1993)。Lykkesfeldt & Møller (1994) 在木薯中也检测到亚麻双糖苷的存在,表明在木薯中也以类似的植外体的方式转运。如果是如此,那么调控 UDP-糖基转移酶的活性就可对木薯块根储存亚麻苦苷产生影响。但目前这方面研究资料较少,尚需进一步的研究验证。

5 提高木薯蛋白含量,增强木薯营养价值

木薯块根的蛋白含量仅为干重的 1% ~ 5%;虽然木薯叶中蛋白大约占干重的 21% ~ 39%,但必需氨基酸 Lys、Leu 和 His,以及含 S 氨基酸 Met 和 Cys 的含量较低(Yeoh *et al.* 1976),而且叶片的采收量及采收时间受到一定限制,这就使得长期以木薯为主粮的人群面临蛋白营养不良的风险。为提高木薯的营养价值,可考虑将其它来源的储藏蛋白基因在木薯根中表达。当把某一种蛋白作为强化营养添加

时,需要考虑其致敏性、营养价值、稳定性以及在靶器官的储存水平等方面。符合这些要求的储藏蛋白目前有向日葵种子白蛋白、干穗谷种子白蛋白、马铃薯块茎储藏蛋白(patatin)、甘薯块根储藏蛋白(sporamin A)和山药块根储藏蛋白(dioscorin)等。Chakraborty *et al.* (2000) 将干穗谷种子白蛋白在马铃薯块茎中表达,分析表明转该基因马铃薯总蛋白及多数必需氨基酸含量增加了 8 倍,说明采用类似手段提高木薯块根的蛋白含量是可行的。甘薯块根储藏蛋白(sporamin)和山药块根储藏蛋白(dioscorin)均分别占甘薯块根与山药块根储藏蛋白的 80% 以上,而且甘薯块根储藏蛋白(sporamin)对害虫有一定的拒食作用,山药块根储藏蛋白(dioscorin)具有猝灭自由基的抗氧化作用。它们的储藏器官的结构与木薯的非常相似,说明将它们木薯中成功表达的可能性很高,这样一方面可以提高木薯的营养价值,另一方面赋予木薯抗虫害、抗氧化的优良特性。Zhang *et al.* (2003) 将人工改造的储藏蛋白基因 ASP1 导入木薯品种 TMS60444 中,虽然在部分转基因株系中在转录和翻译水平均检测到该基因的表达,但总蛋白含量与野生型没有差异。这一尝试虽然未取得成功,但这一研究思路值得进一步试验。提高木薯营养价值的研究值得重视,特别是对改善以木薯为主粮的人口的营养状况将具有重要意义。

6 赋予木薯抗除草剂的能力,便于化学除草

化学除草是现代农业的发展方向,采用化学除草可降低生产成本和劳动强度、提高木薯产量,有效提高木薯种植的经济效益。草甘膦、草胺磷、百草枯等是广泛使用的广谱性除草剂,自然界中也存在对这些除草剂有抗性的生物,并分离出了相应的抗性基因,如果将这些抗性基因导入木薯中,就会获得对除草剂具有抗性的转基因木薯新品种。如 5-烯醇式丙酮莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)是草甘膦的作用位点,而分离自农杆菌 CP4 菌株的该酶对草甘膦不敏感,并且该突变基因已经被克隆;草胺磷乙酰转移酶(PAT)能够将草胺磷乙酰化而失去活性,编码该酶的基因被称为 *bar* 基因,该基因也已经被克隆到,在一些载体中被作物选择标记使用;在原核和真核生物中发现了一些对百草枯具有抗性的突变株,从中分离了转运体,它们可能以主动转运的方式

转运、隔离百草枯以达到解毒的目的(倪万潮等, 2009)。Sarría *et al.* (2000) 将 *bar* 基因导入木薯品种 MPer183 中,初步结果表明获得的转基因株系可以耐受 200 mg/L 的除草剂 Basta。Jo *et al.* (2004) 将来源于苍白杆菌 *pqrA* 基因在烟草中的过量表达,转基因株系增强了对百草枯的抗性。郭书巧等(2009) 从 2 个对百草枯具有高度抗性的土壤细菌 SPQ03 和 SPQ14 中克隆基因 *PnPQR* 和 *OaPQR*,将两个基因在大肠杆菌 BL21 菌株中异源表达,能提高大肠杆菌对百草枯的抗性。Fujita *et al.* (2012) 从拟南芥中发现一个多胺转运因子基因 *RMV1* 与百草枯的吸收转运有关,该基因突变的拟南芥株系对百草枯表现出高度抗性。据此推测,突变木薯的 *RMV1* 同源基因也能极大提高转基因木薯株系对百草枯的抗性。采用这一研究思路获得对除草剂具有抗性的木薯新品系,将会对木薯地的化学除草带来极大的便利,促进木薯的规模化种植。

7 减轻或消除木薯收获后变质,提高其商品性

取决于木薯品种和环境条件,新鲜的木薯在收获后 24 ~ 72 h 迅速变质而失去商业价值,这极大地限制了木薯市场价值的充分发挥。木薯收获后变质(PPD)是一个与环境条件高度相关的多基因控制的性状(Cortés *et al.*, 2002),且是一个主动的而非退行性的过程,是一个酶介导的氧化性的变质过程。Reilly *et al.* (2004) 发现木薯根在伤害后出现 O_2^- 和 H_2O_2 的氧化性爆发,虽然 SOD 的表达与酶活性基本没有变化,但过氧化物酶 POD 和过氧化氢酶 CAT 的转录水平及酶活性水平却明显提高。Chavez *et al.* (2000) 研究表明胡萝卜素含量高于 5 mg/kg 的阈值,就可明显减轻 PPD 的发生。再结合隔绝 O_2 的物理措施,也可减轻 PPD,说明 ROS 以及能调控 ROS 的酶及化合物在 PPD 的发生中起着重要作用。Huang *et al.* (2001) 采用 cDNA-AFLP 技术,在木薯 PPD 初始阶段筛选到了 70 个转录片段,其中约 40 个功能已知,分布于氧化逆境、碳水化合物代谢、蛋白代谢以及酚类物质合成等;Reilly *et al.* (2007) 采用基因芯片技术,在 PPD 过程中筛选到 72 个 EST,许多这些基因与 ROS 的转化、细胞壁修复、细胞程序性死亡、离子、水及代谢物转运、逆境响应、以及蛋白合成激活等。Owiti *et al.* (2011) 采用定量蛋白质

组学中的同位素标记相对和绝对定量技术 (iTRAQ) 在 PPD 早期和后期分别发现了 67 与 170 个蛋白上调,再次表明 PPD 是一个主动的过程;并发现了一些与 PPD 有关的新蛋白,如亚麻苦苷酶、富含谷氨酸蛋白、羟基肉桂酰转移酶、富含甘氨酸的 RNA 结合蛋白、 β -1,3-葡聚糖酶、果胶甲酯酶、成熟酶、脱氢抗坏血酸还原酶、丙二烯氧化环化酶和脂氧化酶等,这些蛋白与防御途径、细胞壁代谢途径以及信号传导途径等有关。随着对 PPD 分子机制的逐渐了解,人们将有可能采用分子生物学技术阻断 PPD 过程,比如提高木薯块根中胡萝卜素的含量或终止 ROS 过程等,对提高木薯的商业价值意义重大。

综上所述,植物分子育种技术可以在木薯的多方面品质改良发挥重要作用,创造出适合不同需要的新品种。我们正在根据这些研究思路开展相关基因克隆、遗传转化等工作,期望利用植物分子育种技术获得更能符合人们需要的木薯新品种。

参考文献:

- Anderson MD, Busk PK, Svendsen I *et al.* 2000. Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot esculenta*) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin [J]. *J Biol Chem* **275**: 1 966 - 1 975
- Balagopalan C. 2002. Cassava utilization in food feed and industry [M]//Hillocks RJ, Thresh JM, Bellotti AC (eds). Cassava Biology, Production and Utilization (s). Oxford, New York: CABI Publishing: 301 - 318
- Chakraborty S, Chakraborty N, Datta A. 2000. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3 724 - 3 729
- Chavez AL, Bedoya JM, Sanchez T *et al.* 2000. Iron, carotene and ascorbic acid in cassava roots and leaves [J]. *Food Nutr Bull*, **21**: 410 - 413
- Cortés DF, Reilly K, Beeching JR *et al.* 2002. Mapping genes implicated in post-harvest physiological deterioration in cassava (*Manihot esculenta*) [J]. *Euphytica* **128**: 47 - 53
- Fujita M, Fujita Y, Juchi S *et al.* 2012. Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 6 343 - 6 347
- Gallo M, Sayre R. 2009. Removing allergens and reducing toxins from food crops [J]. *Curr Opin Biotechnol* **20**: 191 - 196
- Guo SQ (郭书巧), Zheng Q (郑卿), Ni WC (倪万潮). 2009. PQR gene conferring paraquat resistance to the heterologous host *Escherichia coli* (PQR 转运体基因赋予大肠杆菌 BL21 百草枯抗性) [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报) (7): 98 - 103
- Huang J, Bachem C, Jacobsen E *et al.* 2001. Molecular analysis of differentially expressed genes during postharvest deterioration in cassava (*Manihot esculenta*) tuberous roots [J]. *Euphytica* **120**: 85 - 93
- Ihemere U, Arias-Garzon D, Lawrence S *et al.* 2006. Genetic modification of cassava for enhanced starch production [J]. *Plant Biotechnol J* **4**: 453 - 465
- Jo J, Won SH, Son D *et al.* 2004. Paraquat resistance of transgenic tobacco plants over-expressing the *Ochrobactrum anthropi* pqrA gene [J]. *Biotech Lett* **26**(18): 1 391 - 1 396
- Jørgensen K, Bak S, Busk PK *et al.* 2005. Cassava plants with a depleted cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. Distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport and blockage of the biosynthesis by RNA interference technology [J]. *Plant Physiol* **139**: 363 - 374
- Kang ZL (康宗利), Yang YH (杨玉红), Zhang LJ (张立军). 2006. Molecular mechanism of responding to drought stress in plants (植物响应干旱胁迫的分子机制) [J]. *J Maize Sci* (玉米科学) **14**(2): 96 - 100
- Kim YH, Kim MD, Park SC *et al.* 2011. SCOF-1-expressing transgenic sweetpotato plants show enhanced tolerance to low-temperature stress [J]. *Plant Physiol & Biochem* **49**: 1 436 - 1 441
- Leung P, Lee YM, Greenberg E *et al.* 1986. Cloning and expression of the *Escherichia coli* glgC gene from a mutant containing an ADP-glucose pyrophosphorylase with altered allosteric properties [J]. *J Bacteriol* **167**: 82 - 88
- Li HQ (李洪清), Li MR (李美茹), Liang CY (梁承邨) *et al.* 1999. Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (木薯的组织培养和基因转化) [J]. *Guihaia* (广西植物) **19**(4): 359 - 366
- Liu RM (刘荣梅), Li FL (李凤兰), Hu GF (胡国富) *et al.* 2008. Study on genetic engineering of cold-resistance in plants (植物抗寒基因工程研究) [J]. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报) **39**(2): 275 - 279
- Lloyd JR, Springer F, Buléon A *et al.* 1999. The influence of alterations in ADP-glucose pyrophosphorylase activities on starch structure and composition in potato tubers [J]. *Planta* **209**: 230 - 238
- Lykkesfeldt J, Møller BL. 1994. Cyanogenic glycosides in cassava *Manihot esculenta* Crantz [J]. *Acta Chem Scand* **48**: 178 - 180
- Munyikwa TRI, Langeveld S, Salehuzzaman SNIM *et al.* 1997. Cassava starch biosynthesis: new avenues for modifying starch quantity and quality [J]. *Euphytica* **96**: 65 - 75
- Ni WC (倪万潮), Guo SQ (郭书巧). 2009. Application of transporters in the mechanism of paraquat resistance (转运体在百草枯抗性中的应用) [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), **7**: 1 010 - 1 014
- Owiti J, Grossmann J, Gehrig P *et al.* 2011. iTRAQ-based analysis of changes in the cassava root proteome reveals pathways associated with post-harvest physiological deterioration [J]. *Plant J*, **67**: 145 - 156
- Raemakers CJM, Sofiari E, Jacobsen E *et al.* 1997. Regeneration and transformation of cassava [J]. *Euphytica* **96**: 153 - 161
- Raemakers K, Schreuder M, Suurs L *et al.* 2005. Improved cassava starch by antisense inhibition of granule-bound starch synthase I [J]. *Mol Breed* **16**: 163 - 172
- Reilly K, Bernal D, Cortés DF *et al.* 2007. Towards identifying the full set of genes expressed during cassava post-harvest physiological deterioration [J]. *Plant Mol Biol* **64**: 187 - 203

(下转第 158 页 Continue on page 158)

- Microcystis aeruginosa* to the allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*) [J]. *J Plant Physiol* **165**: 1 264 – 1 273
- Jia HJ(贾海江) ,Li XK(李先琨) ,Tang SC(唐赛春) ,et al. 2009. Allelopathic effects of *Eupatorium adenophorum* on seed germination of three woody plants in karst region(紫茎泽兰对三种岩溶地区木本植物种子萌发的化感作用) [J]. *Guihaia*(广西植物) **29**(5) : 631 – 634
- Liu MJ(刘梦佼) ,Hong L(洪岚) ,Shen H(沈浩) ,et al. 2012. Responses of *Mikania micrantha* to parasitization of *Cuscuta campestris* in total soluble protein content and activities of antioxidant enzymes(薇甘菊可溶性蛋白和抗氧化酶活性对田野菟丝子不同寄生密度的响应) [J]. *Guihaia*(广西植物) **31**(4) : 520 – 525
- Men YJ ,Hu HY ,Li FM. 2007. Effects of the novel allelochemical ethyl 2-methylacetoacetate from the reed (*Phragmites australis* Trin) on the growth of several common species of green algae [J]. *J Appl Physiol* **19**: 521 – 527
- Pan YM(潘玉梅) ,Tang SC(唐赛春) ,Pu GZ(蒲高忠) ,et al. 2008. Allelopathic effects of *Parthenium hysterophorum* aqueous extract on germination of *Bidens pilosa* and *Delavaya toxocarpa* (外来入侵植物银胶菊水提取物对三叶鬼针草和茶条木种子萌发的化感作用) [J]. *Guihaia*(广西植物) **28**(4) : 534 – 538
- Rudrappa T ,Bonsall J ,Gallagher JL ,et al. 2007. Root-secreted allelochemical in the noxious weed *Phragmites Australis* deploys a reactive oxygen species response and microtubule assembly disruption to execute rhizotoxicity [J]. *J Chem Ecol* **33**: 1 898 – 1 918
- Vymazal J ,Kropfelova L. 2005. Growth of *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* in constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic [J]. *Ecol Eng* **25**: 606 – 621
- Williamson GB ,Richardson D. 1988. Bioassays for allelopathy: measuring treatment responses with independent controls [J]. *J Chem Ecol* **14**: 181 – 187
- Zhang YL(张永亮) ,Luo XM(骆秀梅) . 2008. Research progress of reed Canarygrass(藯草的研究进展) [J]. *Acta Agr Sin*(草地学报) **16**(6) : 659 – 665
- Zhu XZ ,Jintun Zhang JT ,Ma KP. 2011. Soil biota reduce allelopathic effects of the invasive *Eupatorium adenophorum* [J]. *PLoS One* **6**(9) : 1 – 6

(上接第 153 页 Continue from page 153)

- Reilly K ,Gómez-Vásquez R ,Buschmann H ,et al. 2004. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration [J]. *Plant Mol Biol* **56**: 625 – 641
- Sarria R ,Torres E ,Angel F ,et al. 2000. Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Plant Cell Rep* **19**: 339 – 344
- Selmar D. 1993. Transport of cyanogenic glucosides: linustatin uptake by *Hevea* cotyledons [J]. *Planta* **191**: 191 – 199
- Shi JL ,Cao YP ,Fan XR ,et al. 2012. A rice microsomal delta-12 fatty acid desaturase can enhance resistance to cold stress in yeast and *Oryza sativa* [J]. *Mol Breed* **29**: 743 – 757
- Siritunga D ,Arias-Garcon D ,White W ,et al. 2004. Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification [J]. *Plant Biotechnol J* **2**: 37 – 43
- Siritunga D ,Sayre RT. 2003. Generation of cyanogen-free transgenic cassava [J]. *Planta* **217**: 367 – 373
- Smith-White BJ ,Preiss J. 1992. Comparison of protein of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources [J]. *J Mol Evol* **34**: 449 – 464
- Stark DM ,Timmerman KP ,Barry GF ,et al. 1992. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase [J]. *Science* **258**: 287 – 292
- Tang YM(唐益苗) ,Zhao CP(赵昌平) ,Gao SQ(高世庆) ,et al. 2009. Advances in genes related to plant drought tolerance(植物抗旱相关基因研究进展) [J]. *J Trit Crops*(麦类作物学报) , **29**(1) : 166 – 173
- Taylor N ,Chavarriaga P ,Raemakers K ,et al. 2004. Development and application of transgenic technologies in cassava [J]. *Plant Mol Biol* **56**: 671 – 688
- Wang S(王遂) ,Liu MR(刘梦然) ,Huang HJ(黄海娇) ,et al. 2011. Selection of cold resistant strains from *TaLEA* gene transferred *Populus simonii* × *P. nigra*(转 *TaLEA* 基因小黑杨抗寒株系的筛选) [J]. *J Northeast For Univ*(东北林业大学学报) **3**(9) : 5 – 7
- Wang YJ(王亚静) ,Bi YY(毕于运) ,Tang HJ(唐华俊) . 2009. The research development and trend of energy crops of China(中国能源作物研究进展及发展趋势) [J]. *Chin Sci & Technol Forum*(中国科技论坛) (3) : 124 – 129
- Yeoh HH ,Chew MY. 1976. Protein content and amino acid composition of cassava leaf [J]. *Phytochemistry* **15**: 1 597 – 1 599
- Zhang P ,Jaynes JM ,Potrykus I ,et al. 2003. Transfer and expression of an artificial storage protein(*aspl1*) gene in cassava(*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Transgen Res* **12**: 243 – 250