



Doctoral Thesis

Investigation of Natural Tolerance to Post-Harvest Physiological Deterioration and Development of Methods to Prolong Shelf-Life of Cassava Storage Roots

Author(s):

Zainuddin, Ima Mulyama

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010638383> →

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

DISS. ETH NO. 22920

**Investigation of Natural Tolerance to Post-Harvest
Physiological Deterioration and Development
of Methods to Prolong Shelf-Life of
Cassava Storage Roots**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZÜRICH (Dr. sc. ETH Zürich)

Presented by
Ima Mulyama Zainuddin

M.Sc. in Plant Biotechnology, Institut Teknologi Bandung, Indonesia

Born on 30.05.1982
Citizen of Indonesia

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Wilhelm Gruissem, examiner
Prof. Dr. Hervé Vanderschuren, co-examiner
Prof. Dr. Enny Sudarmonowati, co-examiner
Prof. Dr. Samuel Zeeman, co-examiner

2016

ABSTRACT

Post-harvest physiological deterioration (PPD) is a major constraint to the cassava value chain. Due to PPD, cassava storage roots cannot be kept in a satisfactory condition for more than a few days after harvest as root quality and palatability diminish during storage. Recent insights come from OMICS studies have essentially contributed to gain understanding into the complexity of molecular events taking place during PPD. Knowledge of susceptibility trait to PPD however is not sufficient to reveal the PPD tolerance mechanism. The tolerance traits from natural sources of PPD tolerance is therefore need to be further explored. Once identified, PPD tolerance traits will be especially instrumental to discover novel approaches to delay PPD as well as to identify molecular markers linked to the trait for use as breeding marker. In the presented thesis, PPD assessment method was developed and used to investigate PPD tolerance in varieties and landraces from Indonesian cassava germplasm. Compared to previously established PPD assessment method, the proposed method was less prone to the development of microbial infection and allowed a homogenous and rapid development of typical PPD symptoms in cassava storage roots. Using the PPD assessment method and image-based PPD scores, we showed that the landrace Baturaja is prone to rapid onset of PPD while storage roots from the landraces Apuy, Manggu, and Mentega II display a consistent delayed onset of PPD after harvest. We subsequently performed a time course experiment and a HiSeq2000 RNASeq analysis to characterize transcriptome modulation in two selected cassava landraces (Baturaja and Apuy) contrasting for the onset of PPD. We confirmed that PPD onset is associated with up-regulation of ROS scavenging enzymes, up-regulation of cell wall pectolytic enzymes, down-regulation of enzymes involved in phospholipid and triacylglycerol biosynthesis, up-regulation of phytohormones biosynthesis (i.e. ethene) and up-regulation of genes involved in production of hydroxycoumarins and flavonoids compounds in the PPD susceptible landrace. Tolerance to PPD shows a clear association with cell structures and lipid metabolism maintenance immediately after wounding and therefore significantly reduce the changes occurring in storage root tissues after harvest. Suberization is an innate process that allows cell structure maintenance and that prevents the diffusion of molecules and pathogens at the site of wounding. We combined histochemical analysis and gene expression profiling to characterize suberization in cassava storage roots. Three cassava orthologs of suberization related genes (*MeFHT*, *MeCYP86A*, and *MeKCS6*) were identified their expression in suberizing layers of storage roots after wounding was analyzed. Abscisic acid (ABA) has been shown to enhance suberization in tomato and potato by gene alteration. We further tested whether application of ABA could stimulate suberization in cassava storage roots. We found that ABA could significantly delay the onset of PPD in field-grown cassava storage roots. However, application of ABA did not lead to significant increase of

suberin content at the wounding site of cassava storage roots despite a sharp increase in *MeFHT*, *MeCYP86A*, and *MeKCS6* transcripts in ABA treated roots. We hypothesize that dynamics of suberin biosynthesis as well as biosynthesis of other molecules might be involved in the observed delayed PPD in ABA treated cassava storage roots. Importantly, we demonstrate that ABA treatment is more effective at delaying PPD than root treatment with antioxidants such as ascorbate or glutathione. Our findings could have a major impact on the cassava value chain.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach der Ernte auftretende physiologische Qualitätsverschlechterung (PPD) gehört zu der grössten Einschränkung in Manioks Wertschöpfungskette. Aufgrund von PPD können Maniokstärkewurzeln nicht in einer zufriedenstellenden Qualität über mehrere Tage nach der Ernte gelagert werden. In diesem Zeitraum nimmt sowohl die Wurzelqualität als auch die Schmackhaftigkeit rapide ab. Jüngste Erkenntnisse aus der OMICS Forschung haben wesentlich dazu beigetragen die Komplexität der molekularen Ereignisse während PPD besser zu verstehen. Jedoch ist die Kenntnisgrundlage über eine PPD Anfälligkeit oder deren Toleranzmechanismus nur dürftig beschrieben. Aus diesem Grund ist es zwingend notwendig Toleranzeigenschaften einer natürlich auftretenden PPD Toleranz näher zu erforschen. Bei Identifizierung dieser Kerneigenschaften können mit Hilfe moderner Techniken PPD reduziert werden und auch molekulare Marker entwickelt werden, mit diesen dann eine zielgerichtete Züchten PPD toleranter Manioksorten beschleunigt werden kann. In der hier präsentierten Dissertation wurde eine PPD Bewertungsmethode entwickelt und eingesetzt um PPD tolerante indonesische Manioksorten und Manioklandrassen zu bewerten. Verglichen mit zuvor eingeführte PPD Bewertungsmethoden, zeigte sich die neue PPD Bewertungsmethode weniger Anfällig gegenüber mikrobieller Kontamination und ermöglichte eine homogene und schnelle Ausbildung charakteristischer PPD Symptome in Speicherwurzeln. Mit Hilfe unserer PPD Bewertungsmethode und der Bild-basierenden PPD-Werte konnten wir zeigen, dass die Landrasse Baturaja eine hohe Anfälligkeit gegenüber PPD zeigte, wohingegen die Speicherwurzeln der Landrassen Apuy, Manggu und Mentega II eine konsistent verzögerte PPD Ausbildung aufzeigte. Daraufhin führten wir mit zwei Landrassen, welche signifikant unterschiedliche PPD-Toleranzen vorwiesen, ein Time-Course-Experiment und eine Hiseq2000 RNAseq-Analyse durch. Dadurch erlangten wir neue Einblicke in die transkriptionelle Modulierung während der PPD-Symptomentwicklung. Wir bewiesen, dass eine PPD Ausbildung in der empfänglichen Landrasse mit einer Überregulation von ROS reinigenden Enzymen, eine Überregulation von Zellwand pectolytischen Enzymen, eine Herabregulation von Enzymen, welche in der Phospholipid- und Triacylglycerol-Biosynthese involviert sind, eine Überregulation der Phytohormon-Biosynthese und eine Überregulation von Genen, welche in der Produktion von Hydroxycoumarin- und Flavonoid-Bestandteilen involviert sind, assoziiert ist. Im Gegensatz hierzu zeigt die PPD tolerante Landrasse eine eindeutige transkriptionelle Assoziation mit Zellstruktur- und Lipidstoffwechselerhaltung. Dieser Effekt verminderte signifikant die transkriptionellen Unterschiede in der geernteten Speicherwurzel. Suberinisierung ist ein angeborener Mechanismus welcher eine Zellstruktur-Aufrechterhaltung unterstützt und dadurch eine Ausbreitung von Molekülen und Pathogenen an einer frischen Wunde einschränkt. Wir kombinierten histochemische Analysen mit Genexpression-

Studien um eine Suberinisierung in Speicherwurzeln näher zu charakterisieren. Daraus identifizierten wir drei Maniok-Gene (*MeFHT*, *MeCYP86A* und *MeKCS6*), welche in Suberinisierungsreaktionen involviert sind. Die Genexpression dieser Kandidatengene wurde in suberinisierenden Gewebeschichten unverzüglich nach einer verursachten Verwundung gemessen. Es wurde bewiesen dass Abscisinsäure (ABA) in Tomaten als auch bei der Kartoffel eine Suberinisierung verstärken kann. Daraufhin untersuchten wir ob ein Einsatz von ABA eine Suberinisierung in Maniok-Speicherwurzeln stimulieren könnte. Wir fanden heraus, dass ABA die Bildung einer PPD-Reaktion in Maniok signifikant verzögerte. Allerdings führte die ABA-Gabe einerseits zu keiner signifikanten Zunahme an Suberin andererseits jedoch zu einer starken Hochregulation der drei Kandidatengene (*MeFHT*, *MeCYP86A* und *MeKCS6*). Wir vermuten, dass die Dynamik der Suberin Biosynthese als auch die Biosynthese anderer Moleküle möglicherweise in der PPD Verzögerung durch ABA involviert sind. Die Resultate dieser Arbeit können einen grossen Einfluss auf die Wertschöpfungskette bei Maniok einnehmen.