



Doctoral Thesis

Molecular and biochemical understanding of post-harvest physiological deterioration in cassava roots and approaches for its modulation

Author(s):

Adhiambo Owiti, Judith

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006023037> →

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 No. 18521

**Molecular and Biochemical Understanding of Post-harvest
Physiological Deterioration in Cassava Roots and Approaches for its
Modulation**

A dissertation submitted to the

ETH Zurich

for the degree of Doctor of Science

Presented by

Judith Adhiambo Owiti

MSc in Biochemistry

Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology (JKUAT)

Nairobi, Kenya

born April 8, 1976

Citizen of Kenya

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Wilhelm Gruissem, examiner

Dr. John Beeching, co-examiner

Dr. Peng Zhang, co-examiner

2009

Abstract

An important constraint that limits the full realization of cassava's potential in developing countries is the short storage life of harvested roots. Cassava roots undergo rapid deterioration 24 - 48 hours after harvest, a phenomenon referred to as post harvest physiological deterioration (PPD) which renders the roots unpalatable and reduces the marketability of the roots. PPD is a polygenic trait attributed to a cascade of signaling events which are triggered by oxidative damage at the wound site. To gain a broader understanding of the molecular and biochemical events associated with PPD, we have undertaken a proteomics profiling experiment to analyze changes in cassava root proteins during PPD.

In this experiment, the isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) analysis coupled with mass spectrometry was adopted to investigate the changes in protein expression patterns in cassava roots in response to PPD. Proteins samples were extracted from cassava roots during early PPD (0, 6, 12 and 24h) and compared. Additionally protein samples from the late PPD time points (0, 48 72 and 96h) were also compared. Proteins were extracted from both cytosolic and membrane fractions of the early and late PPD time points and the entire experiment repeated. The analysis generated 8 datasets, and a total of 8, 960 proteins were identified from cassava. Due to a high degree of redundancy in the protein identifications, the data was filtered by generating *Arabidopsis thaliana* orthologs of the proteins identified.

A total of 1110 unique proteins were obtained, and 711 proteins had no known ortholgs in *Arabidopsis*. A total of 60 proteins were found to be significantly regulated in both replicates in the same direction and in corresponding sample identities. Of these 33 proteins were shown to be up-regulated and 27 proteins were down-regulated relative to the 0h control.

Real time-PCR (qPCR) analysis and enzyme assays were used to confirm if transcriptional activity and enzyme activity of a selection of the proteins identified by iTRAQ correlated with the changes depicted at the protein level. Transcript analysis revealed the up-regulation of pectin methyl esterase during PPD, which was in agreement with the change in abundance of this protein observed during PPD, and also the increase in the enzyme activity. The up-regulation of Cu-Zn superoxide dismutase (CSD1.2), and beta 1,3-glucanase protein during early PPD (6-12h) revealed by iTRAQ was also confirmed via qPCR, however the total enzyme activity of superoxide dismutase and beta 1,3-glucanase increased throughout during PPD.

The proteomics experiment led to the identification of proteins that are regulated in cassava during PPD. These included mainly enzymes involved in ROS detoxification, cell wall metabolism, wound and stress response, and secondary metabolite biosynthesis. In the study documented in this thesis, the combination of transcriptomics, proteomics, and enzymatic assays has led to the generation of comprehensive data on transcriptional and post-translational modulation of key enzymes involved in PPD.

Résumé

Une des contraintes les plus importantes pour la production de manioc dans les pays en développement demeure la courte durée de conservation après la récolte. Les racines de manioc subissent une rapide décomposition physiologique (en 24 à 48h) après la récolte, un phénomène identifié sous le nom de dégradation physiologique post-récolte. Ce phénomène réduit l'appétence ainsi que la valeur marchande des racines de manioc. La dégradation physiologique post-récolte est un caractère multigénique attribué à une cascade d'évènements qui sont initiés par un stress oxydatif au niveau du site de lésion. Pour mieux comprendre les évènements moléculaires et biochimiques associés avec la dégradation physiologique post-récolte, nous avons développé une étude protéomique afin d'analyser les changements du protéome au cours de la dégradation physiologique post-récolte dans les racines de manioc.

Dans l'étude présente, la technologie iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) couplée à la spectrométrie de masse a été utilisée pour caractériser les changements des profils d'expression des protéines dans les racines de manioc au cours de la dégradation physiologique post-récolte. Les échantillons protéiques ont été prélevés sur des racines de manioc au début de la dégradation post-récolte (0, 6, 12 et 24h) et à des stades avancés de la dégradation post-récolte (0, 48, 72 et 96h). L'ensemble des échantillons ont été comparés sur base de leurs profils d'expression protéique. Les fractions cytosolique et non soluble ont également été extraites séparément et analysées. L'ensemble de l'expérience a été répétée. L'analyse a généré 8 bases de données et un total de 8960 protéines identifiées. A cause d'un niveau de redondance élevé dans les protéines identifiées, les bases de données ont été filtrées en recherchant les orthologues d'*Arabidopsis thaliana* pour l'ensemble des protéines identifiées. Au total, 1110 protéines uniques (orthologues d'*Arabidopsis*) ont été obtenues après l'application du filtre ainsi que 711 protéines n'ayant pas d'orthologues dans le génome d'*Arabidopsis*. Soixante protéines ont montré le même type de régulation (positive ou négative, temps post-récolte) dans les deux répliques biologiques. Parmi ces 60 protéines, 33 ont montrés une augmentation significative de leur niveau d'expression tandis que 27 ont montrés une baisse significative de leur niveau d'expression. Des analyses par PCR semi-quantitative en temps réel et par réactions enzymatiques ont également été utilisées afin de confirmer les

changements au niveau des transcripts et des activités enzymatiques pour certaines protéines sélectionnées afin de caractériser une corrélation potentielle avec les résultats obtenus par iTRAQ. L'analyse des transcripts a révélé l'accumulation de transcripts codant pour la méthylestérase de pectine au cours de la dégradation physiologique post-récolte. Cette observation est corrélée avec l'accumulation de cette enzyme au cours de la dégradation physiologique post-récolte. Les augmentations de la Cu-Zn superoxyde dismutase et de la glucanase β -1,3 identifiées par l'iTRAQ au début de la dégradation physiologique post-récolte (6-12h) ont également été confirmées par PCR semi-quantitative en temps réel. Les activités enzymatiques mesurées pour ces enzymes ont révélé une augmentation tout au long de la dégradation physiologique post-récolte.

Les expériences protéomiques ont conduit à l'identification de protéines qui soit s'accumulent ou sont dégradées dans les racines de manioc au cours de la dégradation physiologique post-récolte. Il s'agit essentiellement d'enzymes impliquées dans la détoxification des espèces réactives d'oxygène, dans le métabolisme de la paroi, dans la réponse aux lésions et au stress, ainsi que la biosynthèse des métabolites secondaires.

Dans cette thèse, la combinaison d'approches protéomique, transcriptomique et enzymatique a généré un ensemble de données qui permettent de caractériser les modulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles d'enzymes-clés impliquées dans la dégradation physiologique post-récolte des racines de manioc.