

文章编号: 1674-7054(2015)03-0329-06

低场核磁共振技术在木薯种茎低温贮藏中的运用

张振文 简纯平 林立铭 姚庆群 李开绵

(中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所/国家薯类加工专业技术研发分中心/
农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室, 海南 儋州 571737)

摘 要: 以华南5号(SC5)和华南9号(SC9)木薯的种茎为材料, 设药剂Ⅰ(预糊化氧化木薯淀粉)、药剂Ⅱ(预糊化氧化木薯粉)和对照(CK)3个处理, 利用低场核磁共振成像(LF-NMRI)技术, 研究木薯种茎在低温(0℃)贮藏过程中水分的相态和移动性, 探讨其对发芽率的影响。结果表明: 木薯种茎水分以自由水为主, 占55%~75%, 主要分布在种茎韧皮部; 与对照相比, 药剂处理可以提高种茎成活率, 且药剂Ⅰ效果较好; 同时发现, SC9种茎低温贮藏后成活率高于SC5, 可见SC9比SC5较耐低温。

关键词: 木薯种茎; 低温贮藏; 低场核磁共振成像

中图分类号: S533

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2015.03.019

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是大戟科木薯属植物,喜高温、高湿,主要分布在我国广西、广东和海南等华南九省区,江西和湖南是新兴发展的种植区,也是主要北移种植区域。然而,随着我国木薯种植区域极端低温天气频繁出现,木薯种茎在室外越冬贮藏受冻害、冻死的现象十分普遍,种茎越冬贮藏后种茎出苗率不足50%。因此,20世纪60年代以来,人们开始研究木薯种茎贮藏过程的生理、生化变化,并总结出窖藏、洞藏和大棚覆盖等贮藏形式开展木薯种茎的越冬贮藏,提出了我国不同片区木薯种茎贮藏的方法,取得了一定的实际应用效果^[1-7]。然而,却无法从理论上解释不同区域或贮藏方法对木薯种茎影响的主要原因,限制了这些贮藏技术的推广运用。众所周知,水是生物体的基本组成成分,在多数细胞中水分子占60%~90%,低温胁迫下如何提高水分的有效利用是保证生物体细胞的正常生理代谢的关键,也是影响作物适应环境能力的重要因素之一^[8]。目前,无损伤地检测植物水分变化的技术包括低场核磁共振成像技术(Low Field Nuclear Magnetic Resonance Imaging, LF-NMRI)、红外线技术和中子技术等^[9-11]。其中,LF-NMRI是1种无损伤分析检测技术,是20世纪80年代发展起来的1种波普学研究技术,通过检测能反映分子流动性的氢核的横向弛豫时间来确定检测对象的水分含量和水分的移动性^[12]。这一技术已经广泛应用于多个学科领域,包括天然产物化学结构鉴定、生物分子定量分析和代谢产物动态变化研究等^[13-16]。为此,笔者以木薯种茎为研究对象,利用核磁共振技术分析探讨2个常见品种的木薯种茎在低温贮藏过程中水分相态及其移动性,了解水分相态与种茎耐低温贮藏性能的差异情况及其相关性,了解木薯种茎耐低温能力,旨在为北移种植区域的木薯种茎贮藏技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为华南5号(*M. esculenta* cv. SCATC5, SC5)和华南9号(*M. esculenta* cv. SCATC9, SC9)木薯的种茎,每段长30 cm。

收稿日期: 2015-01-18

基金项目: 现代农业产业技术体系(CARS-12); 国家薯类加工技术研发分中心和农业部木薯种质资源创新利用重点实验室资助

作者简介: 张振文(1971-),男,副研究员,主要从事采后生理研究。E-mail: scuta96@163.com

通信作者: 李开绵(1964-),男,研究员,主要从事木薯遗传育种研究。E-mail: likaimian@sohu.com

1.2 方法

1.2.1 试验方法 本试验设药剂 I (预糊化氧化木薯淀粉)、药剂 II (预糊化氧化木薯粉) 和对照 (CK) 3 个处理, 每个处理的样本量为 10, 重复 3 次。将 1.0% 的药剂 I、药剂 II 溶解后分别涂抹到木薯种茎表面, 然后和对照一起放置于 0 °C、湿度为 80% 的恒温箱中贮藏 10 d。检测时, 截取 10 cm 的种茎, 称量后放置样品槽中, 采用上海纽迈科技有限公司核磁共振成像系统 (MacroMR12-150H-I) 采集各相态水 (结合水 A_{21} 、束缚水 A_{22} 和自由水 A_{23}) 和水移动性 (T_{21} , T_{22} , T_{23})。数据采集时根据共振获得的不同波谱峰, 软件计算出所获得各峰面积, 取其中峰比例大于 10% 的峰 (只有 3 个), 这 3 个峰面积除以被检测物的质量即获得质量归一化原始数据, 根据大小分别标为 A_{23} (自由水)、 A_{22} (束缚水) 和 A_{21} (结合水); 而各峰达到峰顶点的时间即各相态水的弛豫时间, 分别用 T_{23} (自由水)、 T_{22} (束缚水) 和 T_{21} (结合水) 表示。检测后纵切种茎, 在 80 °C 的烘箱干燥 48 ~ 50 h, 然后测定其含水量。

1.2.2 数据统计与分析方法 采用上海纽迈电子科技有限公司生产的 MacroMR12-150H-I 系统采集分析数据, 利用 Sigmaplot11.0 制作图表, 用 SAS 统计分析软件进行多重比较 (新复极差法)。

2 结果与分析

2.1 低温贮藏后种茎含水量的变化 处理前 SC5 和 SC9 种茎含水量分别是 63.90% 和 65.38%; 在 0 °C 低温条件下, 药剂 I 处理贮藏 10 d 后, 其含水量基本保持不变, 分别是 63.32% 和 65.45%, 说明该处理保水性很好, 能够维持 2 个品种木薯种茎含水量基本不变。LF-NMRI 成像结果 (图 1) 显示: 种茎中水分主要集中在芽眼和韧皮部, 图像呈现白色发亮; 而木质部含水量低, 中柱髓部含水量基本无法检测到, 故 LF-NMRI 成像为黑色。

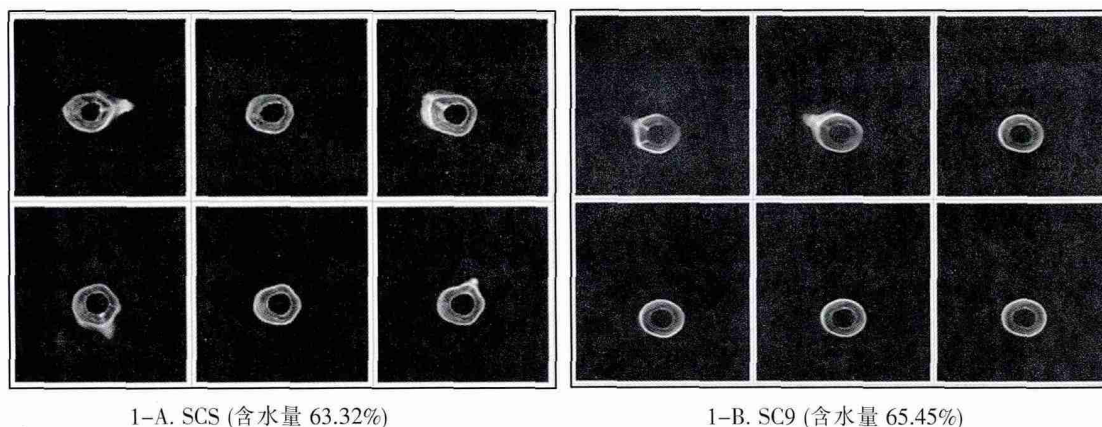


图 1 药剂 I 处理对种茎水分含量的影响

Fig. 1 Effect of Treatment I on the water content of two cassava stems

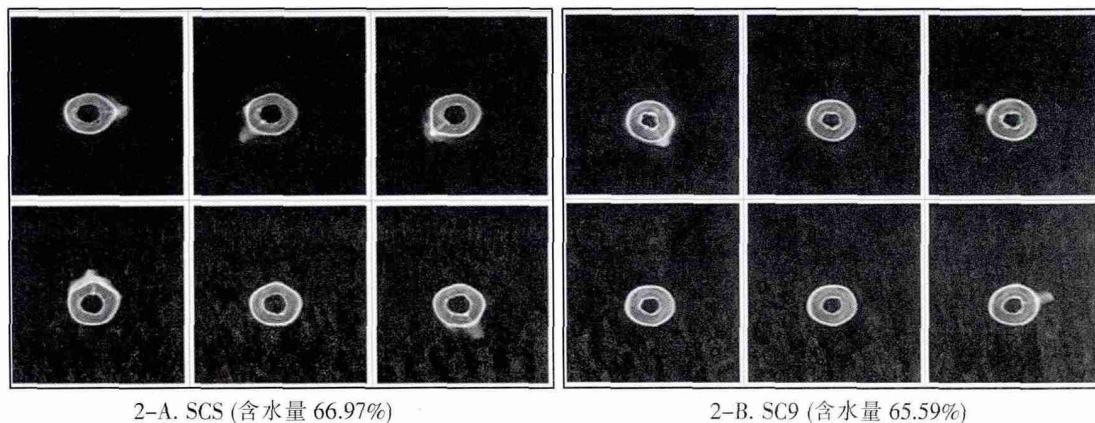
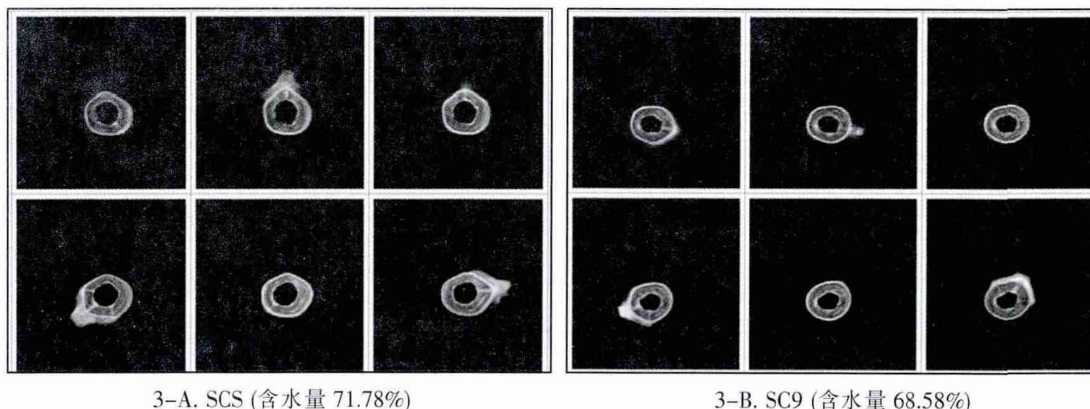


图 2 药剂 II 处理种茎水分含量的影响

Fig. 2 Effect of Treatment II on the water content of two cassava stems

从图2可知,在药剂Ⅱ处理低温贮藏10 d后,水分主要分布在种茎的韧皮部,其中,SC5的种茎含水量为66.97%,比药剂Ⅰ处理的增加了6.65%。可见,药剂Ⅱ吸水性比药剂Ⅰ处理好。

从图3可知,非药剂处理2个品种的韧皮部和眼芽处均有较亮的共振影像,说明含有较高的水分。检测发现,贮藏后2个品种种茎的含水量均有不同程度的升高。其中,SC5品种的种茎增加了12.33%,达到71.78%;而SC9品种的种茎增加了4.89%,达到68.58%。可见,SC5种茎低温贮藏期间吸水性能明显高于SC9品种的种茎,这些增加的水分很可能是由于贮藏环境过高的湿度(80%)引起的。



3-A. SC5 (含水量 71.78%)

3-B. SC9 (含水量 68.58%)

图3 2个品种种茎非药剂处理低温贮藏后水分成像

Fig. 3 Image of water content in two cassava stems of the control (CK)

从图2可知,在药剂Ⅱ处理低温贮藏10 d后,水分主要分布在种茎的韧皮部,其中,SC5的种茎含水量为66.97%,比药剂Ⅰ处理的增加了6.65%。可见,药剂Ⅱ吸水性比药剂Ⅰ处理好。

从图3可知,非药剂处理2个品种的韧皮部和眼芽处均有较亮的共振影像,说明含有较高的水分。检测发现,贮藏后2个品种种茎的含水量均有不同程度的升高。其中,SC5品种的种茎增加了12.33%,达到71.78%;而SC9品种的种茎增加了4.89%,达到68.58%。可见,SC5种茎低温贮藏期间吸水性能明显高于SC9品种的种茎,这些增加的水分很可能是由于贮藏环境过高的湿度(80%)引起的。

2.2 低温贮藏后水相态分析 植物组织中水分的相态包括结合水、束缚水和自由水3种相态,在不同胁迫状态其含量有所变化,从而影响细胞的生理生化过程^[11]。

2.2.1 药剂Ⅰ对种茎水相态的影响 经药剂Ⅰ处理的种茎,在低温贮藏10 d后,3种相态水的含量情况见图4。从图4可知,SC5、SC9种茎的自由水 A_{23} 分别占总含水量的58.31%和60.83%,分别降低了2.31%和15.78%,两者差异极显著。对于品种而言,药剂处理Ⅰ可以降低SC5种茎自由水 A_{23} 的含量和提高束缚水 A_{22} 的含量,这有利于降低自由水含量对种茎芽眼的冻害的影响,是低温下对芽眼的一种保护。然而,2种品种间存在差异,表现在SC5品种的种茎中 A_{23} 的含量高于SC9,而结合水 A_{21} 和束缚水 A_{22} 却低于SC9品种,从而导致SC9比SC5耐低温,因为低温胁迫下,过多的自由水将是导致冻害提前发生的主要原因^[17]。

2.2.2 药剂Ⅱ对种茎水相态的影响 经药剂Ⅱ处理的种茎,在低温贮藏过程中,自由水 A_{23} 含量也有一定的变化,从图5可知,在SC5和SC9种茎中分别占总含水量的63.18%和64.45%,与对照相比,SC5增加2.57个百分点,而SC9却减少1.59个百分点。可见,药剂Ⅱ处理后低温贮藏对SC9具有一定的保护效果,但不及药剂Ⅰ,且导致SC5种茎含水量的增加,这可能是导致其芽眼受冻出芽率低的主要原因。

2.3 低温贮藏后水移动性分析 水的运动性分别用 T_{21} 、 T_{22} 和 T_{23} 来表示结合水(A_{21})、束缚水(A_{22})和自由水(A_{23})达到低场核磁共振波顶峰的弛豫时间。

2.3.1 药剂Ⅰ对种茎水运动性的影响 从图6可知, A_{21} 的运动性 T_{21} 均处于较低的水平,差异不明显;但 A_{23} 的运动性差异显著,其中,经药剂处理后SC9的 A_{22} 、 A_{23} 的运动性均显著高于CK-SC9;而SC5经药剂处理后,其 A_{22} 、 A_{23} 的运动性(T_{22} 、 T_{23})极显著低于SC9。这可能是药剂Ⅰ处理后SC9比SC5更耐低温。因为这种水活动性的变化表现在生物体对外界胁迫的抗逆性,水分移动在保证细胞正常生理代谢过程中具有重要的作用,并受大分子结构改变的影响^[16,18]。

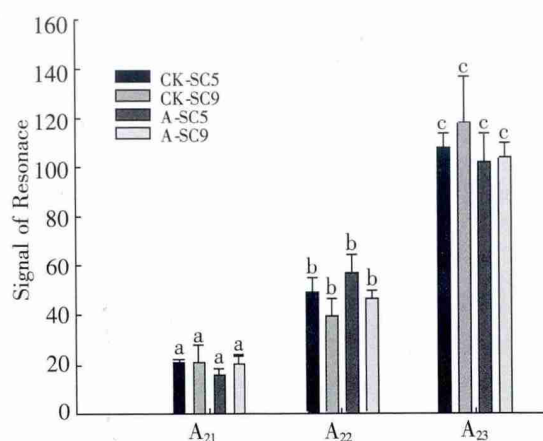


图4 药剂 I 对种茎低温条件不同相态水分含量的影响

Fig.4 Effect of Treatment I on different states of water content of cassava stems stored under low temperature

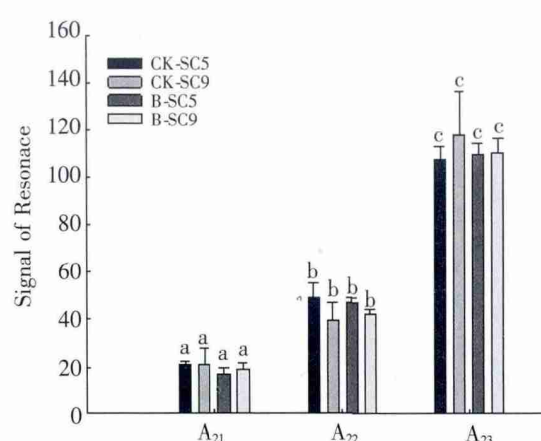


图5 药剂 II 对种茎低温条件不同相态水分含量的影响

Fig.5 Effect of Treatment II on different states of water content of cassava stems kept under low temperature

2.3.2 药剂 II 对种茎水运动性的影响 从图 7 可知, A_{21} 和 A_{22} 的运动性很低, 且处理及品种间无明显差异, 而 A_{23} 的运动性却有较大的差异, 其中, 药剂 II 处理后的 SC5 种茎 A_{23} 运动性略高于 CK, 而 SC9 却相反。这一结果与药剂 I 的处理恰恰相反, 也进一步验证了药剂 II 处理后 SC5 品种种茎的 A_{23} 含量增加, 而 SC9 的却减少的现象。

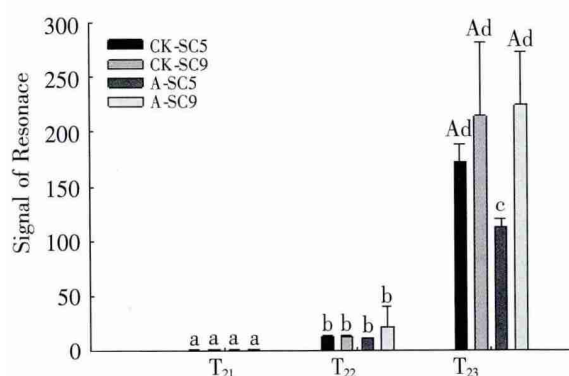


图6 药剂 I 对种茎低温条件水运动性的影响

Fig.6 Effect of Treatment I on water movement of cassava stems stored under low temperature

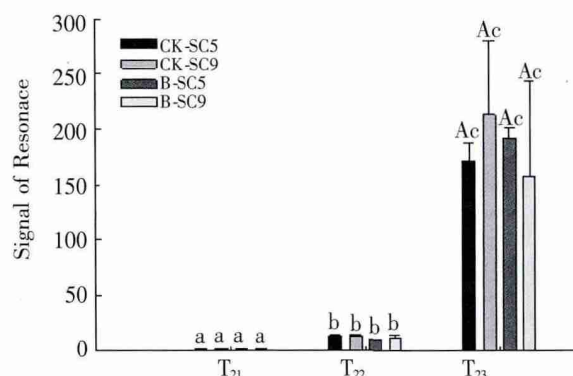


图7 药剂 II 对种茎低温条件水运动性的影响

Fig.7 Effect of Treatment II on water movement of cassava stem stored under low temperature

2.4 低温贮藏后种茎出芽率 种茎的安全越冬贮藏是研究种茎采后处理的关键。从图 8 可知, 药剂处理后能够在一定程度上提高种茎对低温的耐受能力, 但不同品种间存在极显著差异。总体而言, 药剂 I 均提高 2 种品种种茎低温条件下芽眼的存活率, 分别提高了 8 个百分点, 达到 96% (SC9) 和 72% (SC5); 而药剂 II 处理的作用效果不明显。且 2 种药剂处理后 SC9 种茎的成活率均高于 SC5, 说明 SC9 比 SC5 更耐低温贮藏。

3 讨论

热带、亚热带作物对低温十分敏感, 在 6 ~ 10 °C 的外界低温环境中很容易造成冷害、冻害甚至死亡^[19]。木薯以无性繁殖为主, 种茎在冬季收获后有近 40 d 的贮藏

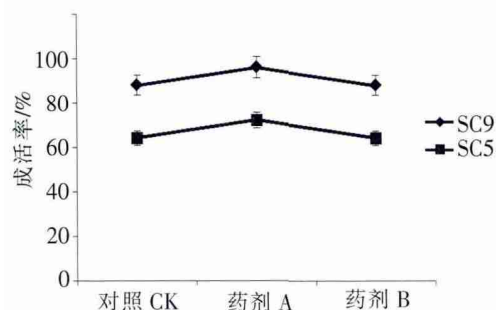


图8 2个品种处理后成活率比较

Fig.8 Comparison of survival ratios of cassava stems of two cassava varieties SC9 and SC5 under different treatments

期。虽然适当短期的低温驯化措施有利于提高种茎腋芽的耐低温能力^[20],但由于这段贮藏期的环境温度较低(0~6℃),持续时间也较长,而种茎耐低温的临界时间短(仅有4d)^[21],传统的窖藏、洞藏或坑藏等技术对提高种茎腋芽的耐低温能力十分有限,导致许多木薯种茎受冻严重,甚至全部被冻死^[1-6]。本研究发现在低温贮藏后,种茎的核磁共振成像中3个相态水均以自由水为主,主要集中在韧皮部且腋芽处水分含量较高,这可能是种茎为适应低温胁迫条件下水分异质性的一种调节结果^[22]。

低温胁迫是限制热带作物生长的主要环境因素之一。防止低温给热带作物生长过程的生理生化代谢带来的不良影响,是热带作物生产中的重要环节;防冻剂的使用,是防止或减轻冻害发生的关键手段^[23-24]。氧化木薯淀粉具有良好的抗冻性、成膜性和抗霉变性^[25-26]。本研究以氧化木薯粉(药剂Ⅰ)和氧化木薯淀粉(药剂Ⅱ)为抗冻剂,对木薯种茎表面进行处理。结果表明2种药剂处理对提高木薯耐低温贮藏能力具有一定的作用,但品种和药剂具有选择性,这可能是不同品种在贮藏过程失水率不同,而种茎的含水量与出芽率成正相关^[5],也可能是由于药剂的成膜性差异的原因,药剂Ⅰ是由纯木薯淀粉加工而成的氧化淀粉,具有良好的成膜性,而药剂Ⅱ中木薯淀粉只含有80%左右,还有20%的其他成分,成膜后通透性较好,但保湿效果较差。

LF-NMRI技术是近年来发展起来的一种非损伤检测细胞水分的物理方法^[18],可以快速检测样品中水分含量及相态、脂肪含量和蛋白质含量。本研究利用LF-NMRI技术检测木薯种茎低温贮藏后的水分相态及其动态性,不但可以了解种茎低温贮藏后水分的主要分布位置,还能证实种茎各相态水的比例,说明该技术在植物生理学研究方面具有广阔的应用前景。然而,由于产生磁场的核心部件对检测对象的尺寸有较为严格的限制,且无法做到实时检测和分析检测对象在贮藏过程的变化情况,因此,该技术有待进一步改进和升级。

致谢:衷心感谢上海纽迈科技有限公司黄柏林经理和高美连工程师为本研究提供低场核磁共振的仪器和技术支持!

参考文献:

- [1] 张受芷. 木薯种茎怎样安全贮藏[J]. 广西农业科学, 1964(8): 38-41.
- [2] 夏玉梅. 贮藏木薯种茎的经验[J]. 广西农业科学, 1964(8): 37.
- [3] 樊吴静, 罗兴录, 阮榆. 不同贮藏方式对木薯种茎发芽及其相关生理特性影响研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(33): 65-70.
- [4] 戴铁生. 木薯种茎坑贮好[N]. 湖南科技报, 2004-12-07(4).
- [5] 刘海刚, 沙毓沧, 袁理春, 等. 不同木薯品种(品系)种茎耐贮性研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34(8): 1416-1420.
- [6] 袁展汽, 林洪鑫, 刘仁根, 等. 木薯种茎地窖越冬贮藏技术[J]. 热带农业科学, 2013, 33(10): 24-26.
- [7] 刘斌, 申章佑, 甘秀芹, 等. 中国木薯种茎越冬贮藏区域划分及其安全贮藏方法[J]. 南方农业学报, 2013, 44(12): 1992-1996.
- [8] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2012.
- [9] 郝晓莉, 张本华, 张鉴, 等. 粮食含水率无损检测方法现状与前景展望[J]. 辽宁农业科学, 2004(1): 29-30.
- [10] 庄华梅, 何德. 核磁共振技术及其在生命科学中的应用[J]. 生物磁学, 2005, 5(4): 58-61.
- [11] 李然, 李振川, 陈珊珊, 等. 应用低场核磁共振研究绿豆浸泡过程[J]. 食品科学, 2009, 30(15): 137-141.
- [12] 文声扬, 王素娟, 李斌. 核磁共振技术研究冷冻处理对魔芋粉丝中水分的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 96-99.
- [13] 王志睿, 张兰兰, 黄昌全, 等. 粤东产钩吻生物碱提取物的红外光谱与核磁共振谱分析[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(1): 87-88.
- [14] 周志明, 刘买利, 张许, 等. 提高生物大分子NMR分辨率和灵敏度的有效方法: TROSY和CRINEPT[J]. 波谱学杂志, 2004, 21(3): 371-383.
- [15] ANTHONY M L, ROSE V S, NICHOLSON J K, et al. Classification of toxin-induced changes in ¹H NMR spectra of urine using an artificial neural network[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1995, 13(3): 205-211.
- [16] 阮榕生. 核磁共振技术在食品和生物体系中的应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 30-32.
- [17] 郑琪. 冻害对杂交玉米种子发芽特性及结构的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [18] ZIMMERMAN S, ZIMMERMAN A M, FULLERTON G D, et al. Water ordering during the cell cycle: nuclear magnetic resonance studies of the sea-urchin egg[J]. Journal of Cell Science, 1985, 79: 247-257.
- [19] 冯玉龙, 曹坤芳, 冯志立, 等. 夜间低温对不同光强下生长的两种热带树苗光合作用的影响[J]. 植物生理与分子生物

- 学学报 2002 28(6): 433 – 440.
- [20] 秦翠鲜 杨翠芳 郭元元 等. 低温胁迫对木薯腋芽部分生理指标的影响[J]. 热带作物学报 2011 32(5): 911 – 914.
- [21] 尹彩霞 尧瑞霞 乔爱民. 5 个木薯品种对低温胁迫的响应及其抗寒性评价[J]. 广东农业科学 2012 39(11): 30 – 33.
- [22] 叶学华 胡宇坤 刘志兰 等. 水分异质性影响两种根茎型克隆植物赖草和假苇拂子茅的水分存储能力[J]. 植物生态学报 2013 37(5): 427 – 435.
- [23] 田治国 王飞 宋义前 等. 几种防冻剂对树上干杏花期抗寒性及坐果率的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版) 2013 41(4): 108 – 112.
- [24] 张献辉 陈奇凌 王东健. 三种防冻剂在北疆枣树上的应用[J]. 北方园艺 2012(8): 42 – 43.
- [25] 曾丽娟 蓝仁华. 木薯淀粉在建筑涂料中的应用[J]. 涂料工业 2004 34(8): 52 – 55.
- [26] 李茂良 童张法 麻昌爱 等. 木薯交联氧化淀粉的制备及性能研究[J]. 现代食品科技 2008 25(2): 157 – 171.

Application of Low Field Nuclear Magnetic Resonance Imaging in Detecting Water Content of the Cassava Stem Stored under Low Temperature

ZHANG Zhenwen , JIAN Chunping , LIN Liming , YAO Qingqun , LI Kaimian

(Tropical Crops Genetic Resources Institute , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences; National R&D Centre for Potato
Processing / Ministry of Agriculture Key Laboratory of Conservation and Utilization of Cassava Genetic Resources , Danzhou 571737 , China)

Abstract: Stems of two cassava varieties SC5 and SC9 were treated with pregelatinized oxidized cassava starch (Treatment 1) , pregelatinized oxidized cassava meal (Treatment 2) and blank as control , and stored under low temperature (0 ℃) . The Low Field Nuclear Magnetic Resonance Imaging (LF-NMRI) method was used to determine the water states and water mobility of the treated cassava stems in view of exploring the effects of water states and water mobility on the survival rate of the treated cassava stems stored under low temperature. Observations showed that free water was the main state of water in the treated cassava stems , accounting for 55% – 75% , and mainly distributed in the phloem of the cassava stems. The two treatments improved the survival rate of the cassava stems stored under low temperature as compared to the control , and Treatment 1 gave a higher survival rate of the cassava stems than Treatment 2. At the same time , the SC9 had a higher survival rate than the SC5 after low temperature storage. It could be concluded that the SC9 was higher in tolerance to low temperature than the SC5.

Key words: cassava stem; low-temperature storage; Low Field Nuclear Magnetic Resonance Imaging