การเปรียบเทียบแบบรูปของโปรตีนที่ถูกชักนำด้วยไคโทซานในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 *Oryza sativa* L. 'Leung Pratew123' และสายพันธุ์กลายทนแล้ง LEUNG PRATEW123-TC171 ในภาวะแล้ง

นางสาวไมพร ไมโภคา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5373819423

COMPARISON OF CHITOSAN-INDUCED PROTEIN PATTERNS IN 'Leung Pratew123' RICE *Oryza sativa* L. 'Leung Pratew123' AND ITS DROUGHT RESISTANT MUTANT LINE, LEUNG PRATEW123-TC171, DURING DROUGHT STRESS

Miss Maiporn Maipoka

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Botany
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	COMPARISON OF CHITOSAN-INDUCED PROTEIN PATTERNS IN 'Leung Pratew123' RICE *Oryza sativa* L. 'Leung Pratew123' AND ITS DROUGHT RESISTANT MUTANT LINE, LEUNG PRATEW123-TC171, DURING DROUGHT STRESS
By	Miss Maiporn Maipoka
Field of Study	Botany
Thesis Advisor	Associate Professor Supachitra Chadchawan, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science

(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Tosak Seelanan, Ph.D.)

Supachitra Chadchawan .....Thesis Advisor

(Associate Professor Supachitra Chadchawan, Ph.D.)

.....Examiner

(Assistant Professor Kanogwan Seraypheap, Ph.D.)

Boonthida Kositsup .....Examiner

(Assistant Professor Boonthida Kositsup, Ph.D.)

Sittiruk Roytrakul .....External Examiner

(Sittiruk Roytrakul, Ph.D.)

ไมพร ไมโภคา : การเปรียบเทียบแบบรูปของโปรตีนที่ถูกชักนำด้วยไคโทซานในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 *Oryza sativa* L. 'Leung Pratew123' และสายพันธุ์กลายทนแล้ง LEUNG PRATEW123-TC171 ในภาวะแล้ง. (COMPARISON OF CHITOSAN-INDUCED PROTEIN PATTERNS IN 'Leung Pratew123' RICE *Oryza sativa* L. 'Leung Pratew123' AND ITS DROUGHT RESISTANT MUTANT LINE, LEUNG PRATEW123-TC171, 171 หน้า.

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทนแล้งมีการตอบสนองต่อไคโทซานในภาวะแล้งมากกว่าข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 - TC171 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายทนแล้ง การศึกษาครั้งนี้จึงเปรียบเทียบโปรตีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์กลายทนแล้งที่ได้รับไคโทซานในภาวะแล้ง โดยใช้วิธีการทางโปรติโอมิกส์ เพื่อระบุชนิดและแบบรูปการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างข้าวสองสายพันธุ์ในภาวะดังกล่าว พืชจะได้รับไคโทซานโดยการแช่เมล็ดในสารละลายไคโทซานชนิดโอลิโกเมอร์ที่มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดหมู่อะซิทิลเท่ากับ 80 ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และการฉีดพ่นทางใบเมื่อต้นกล้าข้าวอายุ 15 และ 30 วัน ก่อนที่จะได้รับภาวะแล้งด้วยการให้สาร polyethylene glycol 6000 ความเข้มข้น 10 % (w/v) โปรตีนจะถูกสกัดจากตัวอย่างใบและรากข้าวที่ได้รับภาวะแล้งเป็นระยะเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ด้วย GeLC-MS/MS พบโปรตีนที่ตอบสนองต่อไคโทซานในภาวะแล้งในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 จำนวน 401 และ 115 ชนิด ในเนื้อเยื่อใบและรากข้าวตามลำดับ ส่วนในข้าวสายพันธุ์กลายทนแล้งพบว่ามีโปรตีนที่ตอบสนองต่อไคโทซานในภาวะแล้งจำนวน 314 และ 88 ชนิด ในเนื้อเยื่อใบและรากข้าวตามลำดับ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ได้ถูกจัดแบ่งเป็นกลุ่มตามหน้าที่ โดยโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ ทรานโพซอน/รีโททรานโพซอน และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมเป็นกลุ่มหลัก transcriptional repressor ได้รับการคัดเลือกเพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับทรานสคริปชันด้วยวิธี quantitative reverse transcription polymerase chain reaction พบว่าแนวโน้มการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลจากการศึกษาโปรติโอมิกส์ ซึ่งสามารถอภิปรายถึงศักยภาพของบทบาทของการทำงานของยีนดังกล่าวที่มีต่อการทนแล้งจากการชักนำด้วยไคโทซานในข้าว

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต ไมพร ไมโภคา

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศุภชัย ชัยเจษฎ์

ปีการศึกษา 2556

5373819423 : MAJOR BOTANY
KEYWORDS: LPT123/LPT123-TC171/DROUGHT/CHITOSAN/PROTEOMICS

MAIPORN MAIPOKA: COMPARISON OF CHITOSAN-INDUCED PROTEIN PATTERNS IN 'Leung Pratew123' RICE *Oryza sativa* L. 'Leung Pratew123' AND ITS DROUGHT RESISTANT MUTANT LINE, LEUNG PRATEW123-TC171, DURING DROUGHT STRESS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., 171 pp.

Previous study showed that 'Leung Pratew123' rice (LPT123), a drought sensitive line, was more responsive to chitosan during drought stress than its drought resistant mutant line, Leung Pratew123-TC171 (LPT123-TC171). This study aimed to compare chitosan-induced protein patterns in LPT123 and LPT123-TC171 rice during drought stress by proteomics approach to display differentially expressed proteins and protein profiles. Plants were applied with 40 mg/L of 80% deacetylated oligomeric chitosan (O80) by seed soaking for 24 hrs and foliar spraying when seedlings were fifteen and thirty days old. Then plants were subjected to 10% polyethylene glycol (PEG) 6000 for 0, 2, 6 and 24 hrs. Total protein was extracted from rice leaf and root tissues and then total proteome were analyzed with GeLC-MS/MS. Chitosan-responsive proteins during drought stress in LPT123 rice were 401 and 115 proteins in leaf and root tissues, respectively. In LPT123-TC171 rice, chitosan-responsive proteins were 314 and 88 proteins in leaf and root tissues, respectively. These proteins were classified into several functional groups. Proteins with unknown function, transposable element, metabolic process were the predominant groups. Transcriptional repressor was selected for investigation at transcriptional level. The quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of transcriptional repressor gene expression revealed that the tendency of expression was consistent with proteomic data. The potential role of the gene in chitosan-induced drought tolerance in rice was discussed.

Department: Botany
Field of Study: Botany
Academic Year: 2013

Student's Signature Maiporn Maipoka
Advisor's Signature Supachitra Chadchawan

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest sincere gratitude to Associate Professor Dr. Supachitra Chadchawan, my advisor, for her kindness, suggestion and excellent guidance.

I would like to express my appreciation to Dr. Sittiruk Roytrakul who advises in proteomics technique. Special thanks are to the members of Proteomics Research Laboratory, Narumon Phaonakrop and Jantima Jaresitthikunchai, for helping in process of proteomics study.

I am grateful to the thesis committee, Assistant Professor Dr. Tosak Seelanan, Assistant Professor Dr. Kanogwan Seraypheap and Assistant Professor Dr. Boonthida Kositsup for their kindness and valuable suggestions to complete my thesis.

My appreciation is also expressed to Professor Elizabeth Van Volkenburgh for kindly providing research facilities, useful guidance and hospitality during the course of my research at University of Washington, Seattle, US.

I would like to thank to all members of proteomics group, Wasinee Pongprayoon, Nutwadee Chintakovid, Nawamin Sa-nguanmoo and Nontalee Chamnanmanoontham for helping me in proteomic works and members of Center of Excellence in Environment and Plant Physiology, Chulalongkorn University and of the Plant Growth Laboratory, University of Washington for their help and wonderful friendship. Many thanks are sent to everyone of my friends for many supports.

My sincere thanks are also expressed to all the professors and staffs at the Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for their advice and support.

I am indebted to the Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology for the scholarship under the Development and Promotion of Science and Technology Talent Project (DPST).

Finally, I would like to express the deepest appreciation to my family for their unconventional love and support.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES ix

LIST OF FIGURES x

LIST OF ABBREVIATIONS xii

CHAPTER I INTRODUCTION 1

CHAPTER II LITERATURE REVIEWS 3

Rice (*Oryza sativa* L.) 3

Plant responses to drought stress 4

Plant responses to chitosan 9

Proteomics 11

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS 13

Plant materials 13

Instruments 13

Chemicals and reagents 17

Methods 19

CHAPTER IV RESULTS 28

Identification of chitosan-responsive proteins in LPT123 and LPT123-TC171 rice during drought stress 28

Expression analysis of a chitosan-responsive gene during drought stress, *transcriptional repressor* 45

CHAPTER V DISCUSSION 51

Identification of chitosan-responsive proteins in LPT123 and LPT123-TC171 rice during drought stress 51

Page

Expression analysis of a chitosan-responsive gene during drought stress, *transcriptional repressor* 57

CHAPTER VI CONCLUSIONS 59

Identification of chitosan-responsive proteins in LPT123 and LPT123-TC171 rice during drought stress 59

Expression analysis of a chitosan-responsive gene during drought stress, *transcriptional repressor* 59

REFERENCES 60

APPENDIX 72

APPENDIX A CHEMICALS AND REAGENTS 73

APPENDIX B PROTOCOLS 77

APPENDIX C STANDARD CURVES AND PROTEIN LADDER 78

APPENDIX D CHITOSAN RESPONSIVE PROTEINS DURING DROUGHT STRESS IN LEAF AND ROOT TISSUES OF LPT123 AND LPT123-TC171 RICE 80

APPENDIX E BIOINFORMATIC ANALYSES OF A *TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR* 152

VITA 171

LIST OF TABLES

Table Page

4.1 Up-regulated and down-regulated proteins in predominant metabolic pathways....44

4.2 *In silico* characterization of stress-responsive *cis*-elements in 2 kb upstream region of *transcriptional repressor*....48

LIST OF FIGURES

Figure Page

2.1 Structure of chitosan....9

4.1 Venn diagram analysis of proteins found in leaf tissue and root tissue of LPT123 and LPT123-TC171 rice treated with and without chitosan during drought stress....31

4.2 Expression patterns of significantly chitosan up-regulated proteins and significantly chitosan down-regulated proteins during drought stress found in leaf tissue of LPT123 rice at 0, 2, 6 and 24 hours after drought treatment....32

4.3 Expression patterns of significantly chitosan up-regulated proteins and significantly chitosan down-regulated proteins during drought stress found in root tissue of LPT123 rice at 0, 2, 6 and 24 hours after drought treatment....33

4.4 Functional classification of chitosan-responsive proteins in leaf tissue and root tissue of drought-treated LPT123 rice....34

4.5 Schematic representation of chitosan-responsive proteins in drought-treated LPT123 rice in RNA-protein synthesis and an overview of metabolic pathway created by using MapMan software....35

4.6 Expression patterns of significantly chitosan up-regulated proteins and significantly chitosan down-regulated proteins during drought stress found in leaf tissue of LPT123-TC171 rice at 0, 2, 6 and 24 hours after drought treatment....38

4.7 Expression patterns of significantly chitosan up-regulated proteins and significantly chitosan down-regulated proteins during drought stress found in root tissue of LPT123-TC171 rice at 0, 2, 6 and 24 hours after drought treatment....39

4.8 Functional classification of chitosan-responsive proteins in leaf tissue and root tissue of drought treated LPT123-TC171 rice....40

4.9 Schematic representation of chitosan-responsive proteins in drought-treated LPT123-TC171 rice in RNA-protein synthesis and an overview of metabolic pathway created by using MapMan software....41

Figure Page

4.10 Venn diagrams showing significantly chitosan-responsive proteins during drought stress....43

4.11 Predicted co-expression network of total chitosan-responsive proteins in LPT123 rice and the enlargement of predicted co-expression network of transcriptional repressor analyzed with rice interactions viewer in the Bio-Analytic Resource for Plant Biology....47

4.12 Heat map showing expression level of *transcriptional repressor* under abiotic stresses downloaded from Rice Oligonucleotide Array Database....49

4.13 Expression patterns of chitosan responsive gene, *transcriptional repressor*, in leaf tissue of LPT123 and LPT123-TC171 rice during drought stress....50

LIST OF ABBREVIATIONS

%	percent
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
°C	degree Celcius
ABA	abscisic acid
ATP	2'-adenosine-5'-triphosphate
bp	base pair
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Da	Dalton
dATP	2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate
dCTP	2'-deoxycytosine-5'-triphosphate
dGTP	2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate
dTTP	2'-deoxythymidine-5'-triphosphate
dNTP	2'-deoxynucleotide-5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
ESI	electrospray ionization
g	gram
hr	hour
kb	kilobase pair
kDa	kilodalton
L	liter
LC	liquid chromatography
LPT123	Leung Pratew123
LPT123-TC171	Leung Pratew123 isogenic line
M	molar
mA	milliampere
mg	milligram

ml	milliliter
mM	millimolar
MS/MS	tandem mass spectrometry
N	normal
ng	nanogram
nm	nanometer
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolution per minute
S.E.	standard error
TBE buffer	Tris-borate electrophoresis buffer
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume