การตรวจพิสูจน์โปรโมเตอร์ที่ถูกชักนำด้วยเอทานอลในข้าว

นางสาวปฏิภาณี ขันธโภค

ห้องสมุดคณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5176958333

IDENTIFICATION OF ETHANOL-INDUCIBLE PROMOTERS IN RICE

Miss Patipanee Khanthapok

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmacognosy
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	IDENTIFICATION OF ETHANOL-INDUCIBLE PROMOTERS IN RICE
By	Miss Patipanee Khanthapok
Field of Study	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Associate Professor Police Captain Suchada Sukrong, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Amorntip Muangprom, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Police Captain Suchada Sukrong, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Amorntip Muangprom, Ph.D.)

.....Examiner

(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

.....Examiner

(Assistant Professor Taksina Chuanasa, Ph.D.)

.....Examiner

(Associate Professor Jessada Denduangboripart, Ph.D.)

.....External Examiner

(Sittiruk Roytrakul, Ph.D.)

ปฏิภาณี ขันธโภค : การตรวจพิสูจน์โปรโมเตอร์ที่ถูกชักนำด้วยเอทานอลในข้าว. (IDENTIFICATION OF ETHANOL-INDUCIBLE PROMOTERS IN RICE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ภญ. ร.ต.อ. หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.อมรทิพย์ เมืองพรหม, 101 หน้า.

ประเทศไทยมีข้าวหลากหลายสายพันธุ์ปลูกกระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ข้าวสามารถใช้เป็นแหล่งทรัพยากรพันธุกรรมในการวิเคราะห์หน้าที่ยีนทั้งจีโนม รวมไปถึงระบบควบคุมการแสดงออกของยีน การตอบสนองต่อเอทานอลของพืชปกติแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่พืชอาจมีระบบควบคุมการแสดงออกของยีนที่ถูกชักนำด้วยเอทานอลอยู่ จากการศึกษาผลของเอทานอลต่อการเจริญของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 พบว่า เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 1 ไม่เป็นพิษต่อต้นข้าว จากการใช้เทคนิค cDNA-AFLP ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในช่อดอกอ่อนข้าวพบชิ้นดีเอ็นเอที่ตอบสนองต่อเอทานอลจำนวน 34 ตัวอย่าง ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้สอดคล้องกับยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีต่างๆ รวมไปถึงการตอบสนองต่อความเครียดและการควบคุมกระบวนการถอดรหัสดีเอ็นเอ เมื่อยืนยันการแสดงออกของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค semi-quantitative reverse transcription-PCR พบชิ้นดีเอ็นเอ 5 ตัวอย่าง ที่มีความเหมือนกับยีน *Os07g0240300*, *Os02g0175700*, *Os05g0392100*, *Os03g0569000* และ *Os07g0627300* รวมทั้งยีน *adh2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีเอทานอล จากยีนเหล่านี้พบว่า ยีน *Os07g0627300* ซึ่งถอดรหัสให้ Myb-related protein-like มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เปลี่ยนแปลงมากและมีการแสดงออกในทุกส่วนของข้าว ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้โปรโมเตอร์ของยีนนี้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดในส่วนต่างๆ ของพืช เมื่อทำการแยกและวิเคราะห์ *cis*-acting regulatory element ในบริเวณ 5' upstream region (UTR) ของยีน *Os07g0627300* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 พบว่า บริเวณ 5' UTR ของยีนนี้เป็น TATA-less promoter ซึ่งประกอบไปด้วย motif ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด

นอกจากนี้ ความหลากหลายทางชีวภาพของข้าวไทยยังแสดงถึงศักยภาพในการใช้ข้าวไทยเป็นวัตถุดิบสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ เช่น น้ำคั้นต้นกล้าธัญพืชจากข้าว จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำคั้นต้นกล้าที่เจริญอยู่ในระยะเริ่มแตกใบที่สอง จากข้าวสีและข้าวขาวรวม 14 สายพันธุ์และข้าวสาลี รวมถึงการหาปริมาณสารฟีนอลรวมและแอนโทไซยานินรวมพบว่า น้ำคั้นต้นกล้าที่มีสีม่วงจากข้าวสีมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าน้ำคั้นต้นกล้าจากข้าวขาวและข้าวสาลี น้ำคั้นต้นกล้าข้าวสีพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดในทุกวิธีทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์พบว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำคั้นต้นกล้าข้าวเป็นผลมาจากสารฟีนอลรวมและแอนโทไซยานินรวม เมื่อนำน้ำคั้นต้นกล้าข้าวสีพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด ก่ำน้อย และข้าวสาลีมาทดสอบฤทธิ์ปกป้องดีเอ็นเอพบว่า น้ำคั้นต้นกล้าจากข้าวสีพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด เท่านั้นที่มีฤทธิ์ปกป้องดีเอ็นเอแบบแปรผันตรงตามความเข้มข้น ทั้งนี้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีของข้าวสีพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด อาจเป็นผลมาจากแอนโทไซยานินรวมปริมาณสูงที่มีอยู่ในน้ำคั้นต้นกล้าข้าว

งานวิจัยนี้นำเสนอระบบควบคุมการแสดงออกของยีนจากข้าว อีกทั้งยังแสดงถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพจากต้นกล้าข้าวไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวสี เนื่องจากข้าวเป็นพืชต้นแบบในการศึกษาของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ดังนั้นองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับธัญพืชชนิดอื่นๆ ได้อีกหลายชนิด

ภาควิชา เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5176958333 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEYWORDS: RICE / THE JOINTING STAGE / ANTIOXIDANT POTENTIAL / ETHANOL-INDUCIBLE GENE / CDNA-AFLP / TATA-LESS PROMOTER / MYB-RELATED PROTEIN

PATIPANEE KHANTHAPOK: IDENTIFICATION OF ETHANOL-INDUCIBLE PROMOTERS IN RICE. ADVISOR: ASSOC. PROF. POL. CAPT. SUCHADA SUKRONG, Ph.D., CO-ADVISOR: AMORNTIP MUANGPROM, Ph.D., 101 pp.

Rice (*Oryza sativa* L.) has been distributed and cultivated throughout Thailand. Thai rice germplasm could be used as genetic resources for functional genomic analysis covering the system for controlling gene expression. The response to ethanol of normal plants indicated that the ethanol-inducible system may present in plants. Thus, effects of ethanol on the growth of rice plants were examined and ethanol-inducible genes in young rice panicles were identified. The Pathumthani 1 (PTT1) cultivar was used in this study. The results showed that 1% ethanol showed non-toxic effects to the rice plants. Using cDNA-AFLP, thirty-four transcript-derived fragments (TDFs) from panicles showed differential responses to ethanol application. The obtained TDFs were corresponding to genes involving different pathways including stress response and transcriptional regulation. Using semi-quantitative RT-PCR, five TDFs, which homologous to *Os07g0240300*, *Os02g0175700*, *Os05g0392100*, *Os03g0569000*, and *Os07g0627300* and *adh2*, were up-regulated. Among them, *Myb-related protein-like* (*Os07g0627300*) is highly conserved and generally expressed in several rice tissues, possibly be used to control a wide range of genes in different tissues. The 5' upstream region (UTR) of *Os07g0627300* was isolated and *cis*-acting regulatory elements were analyzed. The obtained 5' UTR was a TATA-less promoter containing a number of motifs involved in stress responses.

Furthermore, the biodiversity of Thai rice may also provide potent resources for the development of functional food, for example, cereal grass juices from rice. Therefore, juices squeezed from grasses harvested at the jointing stage for fourteen colored and white Thai rice cultivars and wheat (*Triticum aestivum* L.) were analyzed for antioxidant activity. Additionally, the total phenolic content (TPC) and total monomeric anthocyanin content (TMAC) were determined. Colored (purple) rice grass juices exhibited greater antioxidant potential than the grass juices from white rice and wheat. The colored rice cultivar 'Kum Doisaket' exhibited the highest antioxidant activity in all assays ($p < 0.05$). Correlation analysis indicated that the TPC and TMAC were responsible for the antioxidant activity. The DNA protective properties of the colored rice cultivars 'Kum Doisaket' and 'Kum Noi' and wheat were examined. Only the 'Kum Doisaket' cultivar exhibited a dose-dependent DNA protective effect. The notable antioxidant efficacy for the 'Kum Doisaket' cultivar may be influenced by the high level of anthocyanins present in its grass juice.

This finding provides an alternative way to regulate gene expression and suggests the possibility of developing functional foods from colored rice grass. Rice is a model plant of monocots; therefore, this knowledge could be widely applied to the other cereals.

Department: Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Field of Study: Pharmacognosy
Academic Year: 2013

Student's Signature Patipanee Khanthapok
Advisor's Signature Suchada Sukrong
Co-Advisor's Signature Amorntip Muangprom

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and appreciation to my thesis advisor, Assoc. Pol. Capt. Dr. Suchada Sukrong from the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for patient guidance, valuable suggestions, enthusiastic encouragement, and supports throughout my research. Her willingness to give her time so generously has also been appreciated.

My gratitude and appreciation are also expressed to my thesis co-advisor, Dr. Amorntip Muangprom from the Laboratory of Plant Molecular Genetics and Biotechnology, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, for the valuable advice, useful guidance, endless support, patience, and encouragement throughout my study.

I would like to express heartfelt respect and sincere gratitude to members of my thesis committee, including Prof. Dr. Kittisak Likhitwittayawuid, Assoc. Prof. Dr. Wanchai De-Eknamkul, Asst. Prof. Taksina Chuanasa, Assoc. Prof. Dr. Jessada Denduangboripart, and Dr. Sittiruk Roytrakul, for the helpful discussion and valuable suggestions.

I would like to thank the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund); and Cluster and Program Management Office (CPMO), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for financial support.

I would like to thank Assoc. Prof. Dr. Dumnern Kaaladee, Head of the Purple Rice Research Unit, Chiang Mai University, the Bureau of Seed Multiplication, Rice Department of Thailand; Kasem Kumsue; and Chuay Sasuk for providing rice seeds.

I am especially thanks to all members of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany and Laboratory of Plant Molecular Genetics and Biotechnology including other persons whose names have not been mentioned here for all the moral support and friendship.

Finally, I take my deepest pleasure to thanks my parents and family for their love, patience, and morale and financial supports. This thesis and degree are dedicated to them.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv
ENGLISH ABSTRACT v
ACKNOWLEDGEMENTS vi
CONTENTS vii
LISTS OF TABLES ix
LISTS OF FIGURES x
LISTS OF ABBREVIATIONS xii
CHAPTER I INTRODUCTION 1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW 5
2.1 Rice 5
2.2 Promoters used in gene expression system 6
2.2.1 Constitutive promoters 6
2.2.2 Tissue-specific promoters 7
2.2.3 Chemical-inducible expression systems 7
2.2.3.1 Ethanol-inducible expression system 8
2.3 Ethanol responses of non-transformed plant 10
2.4 Cereal grasses 10
2.4.1 Wheatgrass 11
2.4.2 Rice grass 12
CHAPTER III IDENTIFICATION OF ETHANOL-INDUCIBLE GENES AND ISOLATION OF THE *MYB-RELATED PROTEIN-LIKE* PROMOTER IN *ORYZA SATIVA* L. 13
3.1 Introduction 13
3.2 Materials and methods 16
3.3 Results 24
3.4 Discussion 46
3.5 Conclusion 52

Page

CHAPTER IV ANTIOXIDANT ACTIVITY AND DNA PROTECTIVE PROPERTIES OF RICE GRASS JUICES 53
4.1 Introduction 53
4.2 Materials and methods 54
4.3 Results 63
4.4 Discussion 74
4.5 Conclusion 77
CHAPTER V CONCLUSION 79
REFERENCES 82
APPENDIX 98
VITA 101

LISTS OF TABLES

Table		Page
3-1	Sequences of adaptors and pre-selective primers used in this study	20
3-2	Primers used in the amplification and sequencing of the 5' upstream region of *Os07g0627300* gene from genomic DNA of PTT1 cultivar	23
3-3	Homology of differential transcript-derived fragments (TDFs) obtained from cDNA-AFLP analysis of young rice panicles treated with 1% ethanol	32
3-4	Predicted *cis*-acting regulatory elements found in the *Os07g0627300* promoter by PLACE and PlantCARE databases	45
4-1	Rice and wheat cultivars used in this study	57
4-2	DPPH radical scavenging activity, ferric reducing capacity, and anti-lipid peroxidation activity in the ß-carotene/linoleic acid system and the ascorbate-Fe^{2+} system of rice grass and wheatgrass juices	67
4-3	Correlation coefficients between antioxidant activity assays, total phenolic content, and total monomeric anthocyanin content	70

LISTS OF FIGURES

Figure		Page
2-1	Schematic presentation of the ethanol-inducible gene expression system	9
3-1	Effects of ethanol on shoot dry weight and shoot length of rice at the seedling stage	25
3-2	Effects of ethanol on growth of rice plants at the reproductive stage (panicle initiation)	27
3-3	Effects of ethanol on yield and other agronomic traits of rice plants at the ripening stage	29
3-4	Samples of cDNA-AFLP profiles showing differential transcript-derived fragments (TDFs)	31
3-5	Expression analysis by semi-quantitative reverse transcription PCR of ethanol-inducible genes in young rice panicles	36
3-6	Expression analysis of *Myb-related protein-like* (*Os07g0627300*) in different tissues of rice plants	38
3-7	Phylogenetic relationship of rice myb-related protein-like (Os07g0627300) and other similar sequences from different species across kingdom	39
3-8	Sequence alignment of the 5' UTR of rice Myb-related protein-like gene	41
4-1	Color differences of the seed husk and pericarp, grasses, fresh grass juice and the dry extract of the colored rice cultivars Kum Doisaket (C-KDS) and Niaw Dum Chor Mai Phi (C-NDP), white rice cultivars Khao Dawk Mali 105 (W-KDML105) and Leb Nok Pattani (W-LNP), and wheat (WG)	64
4-2	DPPH radical scavenging activity of grass juices from colored rice, white rice, and wheat at concentrations ranging from 10-600 µg/ml	65

Figure | Page

4-3 Total phenolic content of grass juice from colored rice, white rice, and wheat 68

4-4 Total monomeric anthocyanin content of colored rice grass juices.... 69

4-5 DNA protective effects of grass juice from the colored rice cultivars Kum Doisaket (C-KDS) and Kum Noi (C-KN), and wheat (WG)..... 73

LISTS OF ABBREVIATIONS

%	Percentage
ß	Beta
µg	Microgram
µl	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
ε	Molar extinction coefficient
°C	Degree Celsius
A	Absorbance
ABA	Abscisic acid
ALCR	Alcohol-regulated transcription factor
BCB	ß-carotene bleaching
BHT	2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol
bp	Base pair
C3G	Cyanidin-3-glucoside
C3GE	Cyanidin-3-glucoside equivalents
CaMV 35S	Cauliflower mosaic virus 35S
cDNA	Complementary DNA
cDNA-AFLP	cDNA-amplified fragment length polymorphism
DE	Dry extract
DF	Dilution factor
DNA	Deoxyribonucleic acid

DPE	Downstream promoter element
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC_{50}	Median effective concentration
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
g	Gram
GAE	Gallic acid equivalents
h	Hour
HPLC	High performance liquid chromatography
Inr	Initiator
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Molecular weight
N	Normality
NC	Nicked circular
nm	Nanometer
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Round per minute
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SC	Supercoiled
SD	Standard deviation

SE	Standard error
ssp.	Subspecies
TBA	2-Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TCA	Trichloroacetic acid
TDFs	Transcript-derived fragments
TMAC	Total monomeric anthocyanin content
TPC	Total phenolic content
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-*s*-triazine
TSS	Transcription start site
UTR	Upstream region
w/v	Weight per volume