

การระบุนที่เกี่ยวข้กับการตอบสนองต่อโคโทซานในข้าว *Oryza sativa* L.

และ *Arabidopsis thaliana* L.



นางสาวนนทลี ชำนาญนุญธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5373809123

2549742163

IDENTIFICATION OF GENES INVOLVING IN CHITOSAN RESPONSE IN RICE

Oryza sativa L. and *Arabidopsis thaliana* L.

Miss Nontalee Chamnanmanoontham

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biological Sciences

Faculty of Science

Chulalongkorn University

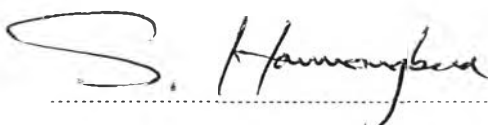
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University



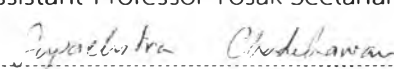
Thesis Title IDENTIFICATION OF GENES INVOLVING IN CHITOSAN
RESPONSE IN RICE *Oryza sativa* L. and *Arabidopsis*
thaliana L.
By Miss Nontalee Chamnanmanoontham
Field of Study Biological Sciences
Thesis Advisor Associate Professor Supachitra Chadchawan, Ph.D.
Thesis Co-Advisor Sittiruk Roytrakul, Ph.D.
Professor Luca Comai, Ph.D.

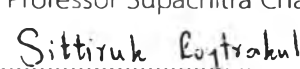
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

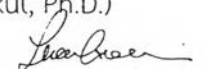

..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr. rer. nat.)

THESIS COMMITTEE



..... Chairman
(Assistant Professor Tosak Seelanan, Ph.D.)

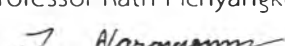

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Supachitra Chadchawan, Ph.D.)


..... Thesis Co-Advisor
(Sittiruk Roytrakul, Ph.D.)


..... Thesis Co-Advisor
(Professor Luca Comai, Ph.D.)


..... Examiner
(Assistant Professor Pongchai Hanyutanakorn, Ph.D.)


..... Examiner
(Assistant Professor Rath Pichyangkura, Ph.D.)


..... External Examiner
(Associate Professor Jarunya Narangajavana, Ph.D.)

นนทลี ขำนัญญธรรม : การระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อโคโทซานในข้าว *Oryza sativa* L. และ *Arabidopsis thaliana* L.. (IDENTIFICATION OF GENES INVOLVING IN CHITOSAN RESPONSE IN RICE *Oryza sativa* L. and *Arabidopsis thaliana* L.) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. ศุภจิตรา ชีชาลย์, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, Prof. Luca Comai Ph.D., 181 หน้า.

โคโทซานเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ทางการเกษตร รวมถึงการชักนำการเจริญเติบโตของพืช การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อโคโทซานของพืชในระดับโมเลกุล ด้วยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ ทรานสคริปโตมิกส์ และการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดในต้นกล้าข้าวพันธุ์ LPT123 ที่ได้รับการพ่นโคโทซานที่ 40 mg/L พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของโปรตีน 105 ชนิด ซึ่งส่วนมากเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมและการส่งสัญญาณ โคโทซานกระตุ้นการเกิดออกซิเดทีฟเบสท์และสารขจัดอนุมูลอิสระ เพื่อรักษาภาวะธำรงดุลของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่เป็นตัวส่งสัญญาณมากกว่าการเป็นพิษ โคโทซานยังทำให้เอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการไกลโคไลซิสและวัฏจักรเคลวิน รวมถึงส่วนประกอบในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพิ่มขึ้น นอกจากนี้โปรตีนตัวรับที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ PSKR และ BRL1 ยังถูกชักนำให้เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามการให้โคโทซานที่ 80 mg/L ใน *Arabidopsis* พบว่า มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าทั้งต้นและราก การวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์ พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของ 1,557 ยีน ซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมและการตอบสนองต่อความเครียด โคโทซานปริมาณสูง (HDC) ยับยั้งการเจริญของพืช โดยรบกวนการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและโปรตีนตัวรับหลายชนิด นอกจากนี้ยังส่งผลเสียต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยรบกวนระบบแสง I และ II ภาวะธำรงดุลของธาตุเหล็กและการกระตุ้นการสลายคลอโรฟิลล์ โคโทซานยังถูกจดจำการตอบสนองในรูปของ PAMPs เพื่อกระตุ้นการตอบสนอง การป้องกันและการตอบสนองต่อความเครียดของพืช HDC กระตุ้นการเพิ่มของโปรตีนตัวรับพ็อราร์อาร์ (PRRs) พ็อราร์ยีน (PR genes) ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ การส่งสัญญาณของฮอร์โมน และยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดทางกายภาพ กรดแอบไซซิก (ABA) และกรดจัสโมนิค (JA) น่าจะมีบทบาทที่โดดเด่นในการตอบสนองต่อ HDC ทั้งนี้การศึกษาโอมิกส์ทั้งสองวิธีแสดงให้เห็นว่า โคโทซานมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืชอย่างมีนัยสำคัญ และคลอโรพลาสต์เป็นหนึ่งในออร์แกเนลล์เป้าหมายของโคโทซาน การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ใน *Arabidopsis* ถูกสร้างขึ้นเพื่อคัดเลือกลายพันธุ์ที่มีลักษณะทนต่อโคโทซาน ในปริมาณสูง พบพืชกลายพันธุ์ 350 สายพันธุ์ที่แสดงลักษณะทนต่อโคโทซาน เช่น มีขนาดต้นใหญ่หรือมีรากยาวเมื่อเทียบกับพันธุ์ปกติ หลังจากการทดสอบยืนยันหลายครั้งมีเพียง 5 สายพันธุ์ที่มีลักษณะการทนต่อโคโทซานอย่างสม่ำเสมอ สุดท้ายเหลือเพียงสองสายพันธุ์ ได้แก่ 106A และ 161A ที่น่าจะมีการกลายพันธุ์ยีนเดี่ยวแบบด้อย ทั้งสองสายพันธุ์ถูกวิเคราะห์ลำดับเบสและระบุยีน ที่เกิดการกลายพันธุ์ พืชกลายพันธุ์ด้วยการแทรก T-DNA ที่มียีนที่น่าจะเกิดการกลายพันธุ์ถูกส่งจาก ABRC และนำมาศึกษาลักษณะการทนต่อโคโทซาน พืชกลายพันธุ์จาก ABRC ที่มีการแทรกในยีน *TOM3* หรือ *OPT4* แสดงให้เห็นการทนต่อโคโทซานที่ดีที่สุด และส่วนสุดท้ายยีนที่ถูกระบุใน *Arabidopsis* ถูกนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลโปรตีโอมิกส์ในข้าวพบว่า มี 9 ยีนที่ใกล้เคียงกันจากข้อมูลทรานสคริปโตมิกส์ และไม่พบยีนที่ใกล้เคียงกันจากข้อมูลยีนที่เกิดการกลายพันธุ์ การระบุยีนที่ตอบสนองต่อโคโทซาน ทำให้เกิดความเข้าใจในการตอบสนองของพืชต่อโคโทซานในระดับโมเลกุลได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนา การใช้ประโยชน์จากโคโทซานในการเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต นนทลี ขำนัญญธรรม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศุภจิตรา ชีชาลย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม Luca Comai

5373809123 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCES

KEYWORDS: CHITOSAN / RICE / PROTEOMICS / GENE / ARABIDOPSIS THALIANA

NONTALEE CHAMNANMANOONTHAM: IDENTIFICATION OF GENES INVOLVING IN CHITOSAN RESPONSE IN RICE *Oryza sativa* L. and *Arabidopsis thaliana* L.. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., CO-ADVISOR: SITTIRUK ROYTRAKUL, Ph.D., PROF. LUCA COMAI, Ph.D., 181 pp.

Chitosan is a natural degradable biopolymer that has a potential in agricultural utilization including plant growth induction. This study aimed to investigate the chitosan response in plants at the molecular level by proteomics, transcriptomics and mutagenesis techniques. Proteomic analysis of 'LPT123' rice seedlings treated with foliar application of chitosan at 40 mg/L revealed significant changes of 105 proteins mainly in metabolic process and signaling. Chitosan activated oxidative burst and ROS scavenger to balance ROS homeostasis in the level of signaling molecule rather than toxicity. It also enhanced key enzymes in glycolysis and Calvin cycle as well as photosynthetic components. In addition, two receptors involving in plant growth, PSKR and BRL1 were induced. Contrastly, application of chitosan at 80 mg/L in *Arabidopsis* illustrated that chitosan retarded seedlings growth both shoot and root development. Transcript profiling revealed significant change of 1,557 genes mainly in metabolic process and stress responses. High dose chitosan (HDC) inhibited plant growth by disturbing several growth-related genes and receptors. Besides, HDC adversely influenced on photosynthesis by disturbing photosystem I and II, iron homeostasis and promoting chlorophyll breakdown. Chitosan was recognized as PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) to activate defense and stress responses. HDC triggered pattern recognition receptors (PRRs), pathogen-related (PR) genes, transcription factors, hormone signaling, and abiotic stress responsive genes. Abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) appeared to play a prominent role in HDC response. Taken together, both omic approaches implied that chitosan significantly changed plant metabolism and chloroplast was one of the chitosan target organelles. EMS-induced mutagenized *Arabidopsis* was achieved to screen for chitosan-resistant mutants in HDC treatment. There were 350 mutants that showed the chitosan resistant phenotypes such as larger in plant size or longer roots compared to wild-type plants. After multiple confirmation tests, there were only 5 candidate mutants that consistently resisted to HDC. Finally, only two of five mutants seemed to possess recessive single gene mutation, which were 106A and 161A mutant lines. These two mutants were subjected to sequencing analysis and mutation identification. The T-DNA insertion mutants carrying putative mutated gene were ordered from ABRC stock center and were subjected to characterize in HDC treatment. The ABRC mutant carrying insertion in *TOM3* or *OPT4* gene showed the best chitosan-resistant phenotypes. Lastly, the identified genes in *Arabidopsis* were compared to proteomic data in rice. There were 9 orthologous genes from transcriptomic data and none of them from mutagenesis analysis. The identification of chitosan responsive genes suggested the better understanding of plant molecular responses to chitosan. It also provided basic information for the improvement of chitosan utilization for plant growth enhancement.

Field of Study: Biological Sciences

Academic Year: 2013

Student's Signature

Nontalee Chamnanmanoontham

Advisor's Signature

Supachitra Chadchawan

Co-Advisor's Signature

Sittiruk Roytrakul

Co-Advisor's Signature

Luca Comai

ACKNOWLEDGEMENTS

This dissertation would not have been complete without guidance, support and patience of several individuals who extended their valuable assistance in the preparation and completion of this thesis.

Above all, I would like to express my gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Supachitra Chadchawan for her patience, personal support, encouragement and valuable knowledge. Sincere and deepest appreciation expressed to Dr. Sittiruk Roytrakul and Professor Dr. Luca Comai for great advices and friendly assistance with various problems all the time as well as giving me extraordinary experiences throughout the work.

I am indebted and thankful to Assistant Professor Dr. Pongchai Harnyuttanakorn, Assistant Professor Dr. Rath Pichyangkura and Associate Professor Dr. Jarunya Narangajavana for serving on my dissertation committee and for providing valuable guidance and suggestions.

It is my pleasure to acknowledge the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D Program (Grant No. PHD/0211/2552) for providing financial support during my Ph.D study. For the research financial support and laboratory facilities, I would like to thank National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (FW656B-55), Intergrated Innovation Academic Center: IIAC Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project (CU56-FW09), and Department of Botany, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University.

I am most grateful to research assistants in Genome Institute at National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) particularly for proteomics technique and my colleagues in Center of Excellence in Environmental and Plant Physiology for their helpful and friendship and also all members in Comai lab at University of California, Davis, CA, USA. I will never forget the precious time that we were together.

I would like to express love and gratitude to my beloved family who provided so much support, endless love and encouragement throughout this dissertation.

Special thanks are also to Wanna Matayasuwan, Kansinee Hungsaprug, and Suttinee Poonsup for their support, warm friendship, and great advices for solving the obstacle in my life, and having exhilarating time we spent together.

Finally, I convey thanks to everybody who was important to the successful of my research, as well as expressing my apology that I could not mention personally one by one.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
TABLE CONTENTS	viii
FIGURE CONTENTS.....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	5
CHAPTER III METHODOLOGY	17
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION	36
CHAPTER V CONCLUSION	90
REFERENCES	92
APPENDICES.....	112
APPENDIX A CHEMICAL SOLUTIONS.....	113
APPENDIX B PROTEOMIC ANALYSIS	117
APPENDIX C TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS	134
APPENDIX D CHITOSAN MUTANT ANALYSIS	175
VITA.....	181



TABLE CONTENTS

	Page
Table 2.1 Common PAMPs responses	15
Table 4.1 List of significantly differentially expressed proteins in 'LPT123' rice leaves responsible for chitosan O80 at 40 mg/L. The data were analyzed by MEV software ($p < 0.05$).....	38
Table 4.2 List of major interacting proteins in chitosan response	44
Table 4.3 The list of chitosan responsive genes involved in plant growth and development	55
Table 4.4 The list of chitosan responsive genes involved in chlorophyll breakdown, photosynthesis and iron homeostasis	61
Table 4.5 The list of prominent chitosan-responsive genes involved in hormone signaling.....	69
Table 4.6 Leaf phenotypic classes of chitosan-insensitive <i>Arabidopsis</i> according to definition by Berná <i>et al.</i> (1999)	75
Table 4.7 Phenotype categories of wild type and mutant in the second screening	76
Table 4.8 Phenotypes of the putative mutants.....	78
Table 4.9 Root phenotype of F ₁ and F ₂ progeny (Ler cross) on the ½ MS medium supplemented with 80 mg/L chitosan	80
Table 4.10 List of T-DNA insertion mutants ordered from ABRC.....	82
Table 4.11 List of rice orthologous genes comparing between RNA-seq and proteomic data.....	88



FIGURE CONTENTS

	Page
Figure 2.1	The primary structure of chitin (a) and chitosan (b) 5
Figure 2.2	Preparation of chitosan 6
Figure 4.1	Functional categories of significantly differently expressed proteins in 'LPT123' rice leaves responsible for chitosan O80 at 40 mg/L. The given functions were retrieved from GO provided in rice genome annotation project.37
Figure 4.2	Hierarchical clustering of significantly differently expressed proteins in 'LPT123' rice leaves responsible for chitosan O80 at 40 mg/L. Each column indicated independent biological replication. The color ranging from green-black-red indicated the level of protein expression (green: low, black: middle, and red: high) 42
Figure 4.3	Gene co-expression network in chitosan response of 'LPT123' rice 45
Figure 4.4	The relative gene expression level of <i>OsBRL1</i> and <i>OsPSKR</i> in 'LPT123' rice seedlings treated with or without chitosan 49
Figure 4.5	Phenotype of <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Columbia grown on ½ MS medium supplemented with chitosan O80 at 0, 20, 40, 60, and 80 mg/L for 10 days 51
Figure 4.6	Functional categories of significantly expressed genes in <i>Arabidopsis</i> responsible for chitosan O80 at 80 mg/L. The given functions were retrieved from GO based on TAIR10 database 53
Figure 4.7	The intricate network of 1,571 chitosan-responsive genes examined by Arabidopsis Interactions Viewer in Bio-Analytic Resource database 54
Figure 4.8	Mapman display of biotic/abiotic stress genes responsive to high dose chitosan. Red color indicated gene induction and blue color indicated gene repression 64
Figure 4.9	Venn diagram of the overlap between genes differential regulated by chitosan in two studies. A: Povero's study, B: this study 74
Figure 4.10	Phenotype of putative CI mutant. A: 21I; B: 86B; C: 106A; D: 129A; E: 161A; F: 39A. (left plate: 0 mg/L of chitosan; right plate: 80 mg/L of chitosan) 78
Figure 4.11	Phenotype of wild-type <i>Arabidopsis</i> Col, <i>Ler</i> and F ₁ hybrid of <i>Ler</i> x Col 79
Figure 4.12	PCR confirmation of ABRC mutant to detect T-DNA insertion in genomic DNA 83



Figure 4.13 RT-PCR of ABRC mutant to detect the level of RNA84

Figure 4.14 Phenotype of wild-type plant and ABRC mutants grown on ½ MS medium with or without chitosan. Letter A to H indicated ABRC mutant line 1 to line 8. (left plate: 0 mg/L of chitosan; right plate: 80 mg/L of chitosan).....85



LIST OF ABBREVIATIONS

°C	degree Celsius
1-DE	one-dimensional electrophoresis
2-DE	two-dimensional electrophoresis
ABA	abscisic acid
ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
ACN	acetonitrile
AGI	Arabidopsis Genome Initiative
APS	ammonium persulfate
<i>AtEF1α</i>	Arabidopsis elongation factor 1 alpha
AUX	auxin
BSA	bovine serum albumin
Ca ²⁺	calcium ion
cDNA	complementary DNA
CI	chitosan-insensitive
CK	cytokinin
cm	centimeter
Col	Columbia
CuSO ₄	copper sulfate
Da	Dalton
dATP	deoxyadenosine triphosphate
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
DOC	deoxycholic acid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EF-Tu	elongation factor-Tu
EMS	ethyl methanesulfonate
ESI	electrospray ionization
ET	ethylene
FA	formic acid
g	gram
GO	gene ontology
H ₂ O	water

H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HCl	hydrochloric acid
i.d.	inner diameter
IAM	iodoacetamide
in-del	insertion-deletion
JA	jasmonic acid
k	kilo
kb	kilobase pairs in duplex nucleic acid kilobase in single-stranded nucleic acid
kDa	kilo Dalton
KOH	potassium hydroxide
L	liter
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LEA	late embryogenesis abundant
Ler	Landsberg <i>erecta</i>
Log ₂ FC	log ₂ Foldchange
LPT123	Leung Pra Tew 123
mg	milligram
min	minute
mL	milliliter
mm	millimeter
MNPs	multiple-nucleotide polymorphisms
mRNA	messenger RNA
M _w	molecular weight
NaCl	sodium chloride
NaCO ₃	sodium carbonate
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOAc, CH ₃ COONa	sodium acetate
NaOH	sodium hydroxide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCED	9- <i>cis</i> -epoxycarotenoid dioxygenase
ng	nanogram
NO	nitric oxide
no.	number
O80	oligomeric chitosan with deacetylation percentage of 80
OGs	oligogalacturonides



PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PCR	polymerase chain reaction
pI	isoelectric point
PRRs	pattern recognition receptors
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RLKs	receptor-like kinases
RLP	receptor-like protein kinases
RNA	ribonucleic acid
RNA-seq	RNA sequencing
RNase	ribonuclease
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolution per minute
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
RuBisCO	ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SA	salicylic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sec	second
SNPs	single-nucleotide polymorphisms
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TCA	trichloroacetic acid
TEMED	tetramethylethylenediamine
TFA	trifluoroacetic acid
™	trademark
UV	ultraviolet
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume
µg	microgram
µL	microliter
µM	micromolar

