

การระบุและการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินและความเกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อ
ความเครียดที่เกิดจากความเค็มในข้าว *Oryza sativa* L.

นางสาวบงกช บุญบุรพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION AND EXPRESSION OF CALMODULIN GENES
AND INVOLVEMENT IN SALT STRESS RESPONSE IN RICE *Oryza sativa* L.

Ms. Bongkoj Boonburapong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University


Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University


492235


Thesis Title Identification and expression of calmodulin genes and involvement in salt stress response in rice *Oryza sativa* L.
By Miss Bongkoj Boonburapong
Field of Study Biochemistry
Thesis Advisor Assistant Professor Teerapong Buaboocha, Ph.D.
Thesis Co-advisor Assistant 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 Piamsak Menasveta, Ph.D.)

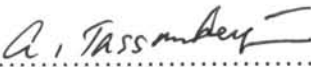
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Teerapong Buaboocha, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Supachitra Chadchawan, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

บงกช บุญนุรพงศ์: การระบุและการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินและความเกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดจากความเค็มในข้าว *Oryza sativa* L. (IDENTIFICATION AND EXPRESSION OF CALMODULIN GENES AND INVOLVEMENT IN SALT STRESS RESPONSE IN RICE *Oryza sativa* L.) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร.ธีรพงษ์ บัวบุชา, อ. ที่ปรึกษา ร่วม: ผศ. ดร.ศุภจิตรา ชัชวาล, 168 หน้า.

สิ่งกระตุ้นหลายชนิดทำให้ระดับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในไซโทพลาสซึมเพิ่มขึ้นชั่วคราวซึ่งมีรูปแบบที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้นนั้น ๆ โดยทั่วไปการส่งผ่านสัญญาณแคลเซียมที่เกิดขึ้นอาศัยการทำงานของโปรตีนที่มีส่วนของ EF-hand motif เป็นองค์ประกอบ โดยโปรตีนดังกล่าวจะเข้าจับกับ Ca^{2+} เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการเปลี่ยนแปลงแอกติวิตี หรือทำให้มีความสามารถในการเข้าจับโปรตีนเป้าหมายที่อยู่ภายในเซลล์ จาก functional analyses และ BLAST searches ของฐานข้อมูล TIGR สามารถจำแนกโปรตีนในจีโนมข้าวที่มี EF-hand motif เป็นองค์ประกอบได้ทั้งหมด 243 ชนิด และจากการสร้าง neighbor-joining tree โดยอาศัยค่า similarity ของลำดับกรดอะมิโน สามารถจำแนกกลุ่มของยีนที่สร้างแคลมอดูลิน (CaM) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องที่ไม่มีส่วนของโดเมนอื่น ๆ นอกจาก EF-hand motif เป็นองค์ประกอบได้ทั้งหมด 37 ชนิดโดยจำแนกเป็นยีนแคลมอดูลิน 5 ยีนและยีนสร้างโปรตีนคล้ายแคลมอดูลิน (CML) 32 ยีน นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาถึงลักษณะต่าง ๆ ของยีนได้แก่ โครงสร้างของยีน ตำแหน่งบนโครโมโซม การจัดเรียงตัวของ EF-hand motif การแสดงออกของยีนและการเปรียบเทียบยีน *Cam* และ *CML* จากข้าวและ *Arabidopsis* จากการทำ RT-PCR พบว่ายีน *OsCam* ทั้ง 5 ยีนและยีน *OsCML1* แสดงออกทั้งในใบ ราก ดอก เมล็ด และแคลลัส จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsCam* ในสภาวะเค็มด้วยวิธี RNA gel blot analysis พบว่ายีน *OsCam1-1* จะถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมากภายใน 30 นาทีถึงหนึ่งชั่วโมงและระดับการแสดงออกจะค่อยๆ ลดลง ในทางกลับกันยีน *OsCam* อื่น ๆ จะมีรูปแบบการแสดงออกที่ไม่เปลี่ยนแปลงภายใต้สภาวะเค็ม จากนั้นจึงทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 เปรียบเทียบกับ FL530 ซึ่งเป็นข้าวทนเค็มที่ได้มาจากการปรับปรุงสายพันธุ์ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าที่ใบของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ FL530 เมื่อได้รับสภาวะเค็ม ยีน *OsCam1-1* จะถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ขณะที่สภาวะเค็มจะไม่ทำให้ระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อศึกษาอิทธิพลของกรดแอบไซสิกจากภายนอกที่ได้รับก่อนสภาวะเค็ม 2 ชั่วโมงพบว่ากรดแอบไซสิกไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนในใบของ FL530 และในข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่ากรดแอบไซสิกทำให้ผลการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นจากสภาวะเค็มลดลง ในทางกลับกันกรดแอบไซสิกมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เพิ่มขึ้นในรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่ายีน *OsCam1-1* น่าจะมีหน้าที่สื่อสัญญาณกรดแอบไซสิกในราก แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกที่เกิดขึ้นใน FL530 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเกลือจะเพิ่มขึ้นในระดับที่น้อยกว่า และเมื่ออยู่ในสภาวะเค็มการแสดงออกของยีนจะคงอยู่นานขึ้น ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่ายีน *OsCam1-1* มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองความเครียดที่เกิดจากความเค็มโดยอาศัยกรดแอบไซสิก

ภาควิชา.....ชีวเคมี...

สาขาวิชา.....ชีวเคมี...

ปีการศึกษา.....2549.....

ลายมือชื่อนิติ.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

บุญนุรพงศ์
ธีรพงษ์

ศุภจิตรา ชัชวาล

4672311723 : MAJOR OF BIOCHEMISTRY

KEY WORD: calmodulin / calcium signaling / EF-hand / Salt stress / *Oryza sativa* L

BONGKOJ BOONBURAPONG: IDENTIFICATION AND EXPRESSION OF CALMODULIN GENES AND INVOLVEMENT IN SALT STRESS RESPONSE IN RICE *Oryza sativa* L. THESIS ADVISOR: ASSIST. TEERAPONG BUABOOCHA, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSIST. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., 168 pp.

A wide range of stimuli evoke transient increases of different magnitude and specialized characteristics in $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, which are typically transmitted by protein sensors that contain Ca^{2+} -binding EF-hand motifs. Ca^{2+} -binding results in conformation changes that modulate their activity or ability to interact with other proteins. By functional analyses and BLAST searches of the TIGR database, a maximum number of 243 proteins that possibly have EF-hand motifs were identified in the *Oryza sativa* L. genome. Using a neighbor-joining tree based on amino acid sequence similarity, a group of 37 *Oryza sativa* L. genes encoding calmodulin (CaM) and related proteins that do not possess functional domains other than the Ca^{2+} -binding EF-hand motifs was identified of which five loci of *Cam* genes and 32 genes coding for CaM-like (CML) proteins were defined. Extensive analyses of the gene structures, the chromosome locations, the EF-hand motif organization, expression characteristics and a comparative analysis of *Cam* and *CML* genes in rice and *Arabidopsis* are presented. By RT-PCR, each of the five *OsCam* and *OsCML1* genes were shown to express in leaves, roots, flowers, seeds and calli. Examination of *Cam* genes under salt stress by RNA gel blot analysis indicates that *OsCam1-1* expression was strongly induced at 0.5-1 hr followed by a decrease thereafter. In contrast, the mRNA levels of other *Cam* genes are relatively unchanged under salt stress. The expression patterns of *OsCam1-1* were further examined in KDML105 in comparison with FL530, a KDML105-derived salt-tolerant line. In leaves, expression of *OsCam1-1* gene was induced by salt stress whereas the salt stress did not increase its mRNA level in roots of both lines. In addition, effects of exogenous Abscisic acid (ABA) applied two hours before salt stress treatment were investigated. As a result, ABA did not have an effect on the induction by salt stress in FL530 leaves and appeared to counter the effect of *OsCam1-1* induction in leaves of KDML105. Conversely, ABA increased the expression of *OsCam1-1* gene in roots of both lines which suggests its possible role in mediating ABA actions in roots. However, the induction in FL530 occurred to a lesser extent without salt stress treatment and was prolonged under salt stress treatment, which suggests that *OsCam1-1* gene probably has an important role in salt stress response mediated by ABA.

Department.....Biochemistry...

Field of study....Biochemistry...

Academic year...2006.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Bongkoj Boonburapong

Teerapong Buaboocha

Supachitra Chadchawan

ACKNOWLEDGEMENT

This study was carried out during the past three years at the Department of Biochemistry, Faculty of science, Chulalongkorn University. I would sincerely like to acknowledge the efforts of many people who contribute to this work. This thesis could not be achieved without their following assistance, my thesis advisor Assistant Professor Dr. Teerapong Buaboocha and my coadvisor Assistant Professor Dr. Supachitra Chadchawan, for their generous advice, skillful assistance, technical helps, excellent guidance, enthusiasm, encouragement, instruction and support throughout this thesis. Without their kindness, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Associate Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Associate Professor Dr. Siriporn Sitthipraneed and Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon for serving as the member of the master thesis committees, for their available comments and useful suggestions.

Sincere thanks are also extended to all members and friends for lending a helping hand whenever needed, sharing the great time in laboratory, their warm assistant and friendship, at Department of Biochemistry Chulalongkorn University: Srivilai Phean-O-pas, Warintra Takpirom, Veerakorn Hotimavorakul, Wuttinun Raksajit, Wansiri Petchkroh, Surasak Laloknam, Radkaod Putong, Aporn Bualuang Surachai Srithumapiwat, Wanchai Yenpetch, Surachai Yaiyen, Sanya Kudan, Wipawee Beabprasert, Artit Chalorkul, Surachet Burut-Archanai and Prajuab Junniyom.

My appreciation also goes to my family who always stands beside me and unconditioning support me. It's always good to be with you.

Finally, I would like to thank CU. Graduate School Thesis Grant, Chulalongkorn University for the thesis fund.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGMENT.....	vi
CONTENT.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
Calcium signaling.....	3
The EF-hand motif.....	5
Ca ²⁺ -binding proteins.....	10
Calmodulin.....	12
Abscisic acid (ABA).....	20
Rice as a model monocot system.....	25
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	31
2.1 MATERIALS.....	31
2.1.1 Rice seeds.....	31
2.1.2 Instruments.....	31
2.1.3 Materials.....	32
2.1.4 Chemicals and reagent.....	33
2.1.5 Enzymes.....	36
2.1.6 Microorganism.....	36
2.1.7 Kits.....	36

2.1.8	Radioactive.....	36
2.2	Bacterial growth medium.....	37
2.3	METHODS.....	37
2.3.1	Database searches and analyses of gene structures and chromosomal distribution.....	37
2.3.2	Alignments and tree construction.....	38
2.3.3	Amino acid identity and motif analyses of proteins.....	39
2.3.4	Expressed Sequence Tags.....	39
2.3.5	Preparation of rice seedlings.....	40
2.3.6	Total RNA preparation.....	40
2.3.7	Formaldehyde-agarose gel electrophoresis.....	41
2.3.8	PCR Amplification of mRNA sequences.....	42
	a) Dnase Treatment.....	42
	b) Reverse Transcription.....	42
	c) PCR Amplification.....	43
2.3.9	Agarose gel electrophoresis.....	44
2.3.10	Extraction of DNA fragment from agarose gel.....	45
2.3.11	Cloning of <i>Cam</i> and <i>CML</i> genes and DNA Sequencing.....	46
	a) PCR Amplification.....	46
	b) Ligation.....	47
	c) Making competent cell of <i>E. coli</i> for electroporation.....	48
	d) Electrotransformation.....	48
	e) Plasmid DNA isolation.....	49

f) Restriction enzyme digestion.....	50
g) Sequencing Analysis.....	51
2.3.13 Probe preparation.....	51
a) PCR Amplification.....	51
b) Restriction enzyme digestion.....	52
2.3.14 Southern Blot Analysis.....	53
a) Genomic DNA preparation.....	53
b) Agarose gel electrophoresis.....	54
c) Southern blotting.....	55
d) Oligolabeling.....	55
e) Southern blot hybridization and autoradiography.....	56
2.2.15 Northern Blot Analysis.....	57
a) Northern blotting.....	57
b) Oligolabeling.....	58
c) Northern blot hybridization and autoradiography.....	58
CHAPTER III RESULTS AND DISCUSSION.....	60
Identification and phylogenetic analysis of	
EF-hand-containing Proteins.....	60
Rice CaM proteins.....	69
Rice CaM-like (CML) proteins.....	74
Number and structure of EF hand.....	76
<i>Cam</i> and <i>CML</i> gene structures and chromosomal distribution.....	80
Comparative analysis of rice and Arabidopsis <i>Cam</i> and <i>CML</i> gene.....	84

<i>Cam</i> and <i>CML</i> expression.....	88
Cloning of <i>Cam</i> and <i>CML</i> genes.....	93
Expression pattern of <i>Cam</i> and <i>CML</i> gene under salt stress in KDML 105.....	106
Genomic DNA blot analysis of <i>OsCam1-1</i>	111
rRNA can be used as a loading control.....	113
Expression pattern of <i>OsCam1-1</i> under salt stress in KDML105 and FL530.....	113
Expression pattern of <i>OsCam1-1</i> under salt stress with exogenous ABA application in KDML105 and FL530.....	118
CHAPTER IV CONCLUSION.....	125
REFERENCES.....	128
APPENDICES.....	141
APPENDIX A.....	142
APPENDIX B.....	160
APPENDIX C.....	161
APPENDIX D.....	162
BIOGRAPHY.....	168

LIST OF TABLES

Table		Page
3.1	Characteristics of 243 putative EF-hand-containing proteins in rice.....	61
3.2	Characteristics of <i>OsCam</i> and <i>OsCML</i> genes and the encoded proteins.	71
3.3	ESTs showing <i>OsCam</i> and <i>OsCML</i> expression in different tissues.....	89

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 A generic pathway of signal perception and signal transduction in Plants.....	2
1.2 Schematic diagram illustrating the mechanisms by which plant cells elevate $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in response to various signals and restore Ca^{2+} concentration to resting level.....	4
1.3 Repetitive Ca^{2+} Transients upon the Perception of a Primary Signal.....	6
1.4 The tertiary structure of EF hand motif.....	7
1.5 Consensus sequence for EF-hands.....	9
1.6 Ca^{2+} sensing proteins and their functions in plants.....	11
1.7 Calmodulin acts as a multifunctional protein.....	13
1.8 The Ca^{2+} -bound-calmodulin-mediated signal transduction in plants.....	15
1.9 Ribbon presentations of Calmodulin.....	17
1.10 Structure of <i>S</i> -(+)-abscisic acid.....	22
1.11 Pathway and Regulation of ABA Biosynthesis.....	24
1.12 <i>Oryza sativa</i> L.....	27
3.1 Phylogenetic tree showing the overall relatedness of EF-hand-containing proteins in rice.....	68
3.2 Neighbor-joining tree based on amino acid similarities among OsCaM and OsCML proteins.....	70
3.3 OsCaM protein sequence similarity with CaM from other species.....	72
3.4 Characteristics of EF hands in rice proteins.....	77
3.5 Schematic representation of the <i>OsCam</i> and <i>OsCML</i> genes.....	81

Figure	Page
3.6 Chromosomal distribution of the <i>OsCam</i> and <i>OsCML</i> genes in the rice genome.....	83
3.7 Phylogenetic relationships among rice and Arabidopsis CaM and CML proteins.....	86
3.8 The total RNA extracted from different organs of rice plants electrophoresed on a 1.5% formaldehyde agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.....	91
3.9 Expression pattern of the <i>OsCam</i> genes.....	92
3.10 Agarose gel electrophoresis of the amplified coding sequence of <i>OsCam1-1</i> (<i>OsCam1-li-CD</i>), 3'UTR of <i>OsCam1-1</i> (<i>OsCam1-li-3'</i>) and coding sequence of <i>OsCML1</i> (<i>OsCML1i-CD</i>).....	95
3.11 Agarose gel electrophoresis of the recombinant <i>OsCam1-li-CD</i> gene inserted in pGEM [®] -T vector (pGEM-T+ <i>OsCam1-li-CD</i>).....	96
3.12 Agarose gel electrophoresis of the recombinant <i>OsCam1-li-3'</i> gene inserted in pGEM [®] -T vector (pGEM-T+ <i>OsCam1-li-3'</i>).....	97
3.13 Agarose gel electrophoresis of the recombinant <i>OsCML1i-CD</i> gene inserted in pGEM [®] -T vector (pGEM-T+ <i>OsCML1i-CD</i>).....	98
3.14 DNA sequences of the coding region of <i>OsCam1-1</i> (<i>OsCam1-li-CD</i>), 3'UTR of <i>OsCam1-1</i> (<i>OsCam1-li-3'</i>) and the coding sequence of <i>OsCML1</i> (<i>OsCML1i-CD</i>) gene.....	99
3.15 Nucleotide sequence alignment of <i>OsCam1-li-CD</i> (<i>Oryza sativa indica</i>) with the <i>OsCam1-lj</i> (<i>Oryza sativa japonica</i>) used EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms.....	100

Figure	Page
3.16 Amino acid sequence alignment of <i>OsCaM1-1i-CD</i> (<i>Oryza sativa indica</i>) with <i>OsCaM1-1j</i> (<i>Oryza sativa japonica</i>) used EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms.....	102
3.17 Nucleotide sequence alignment of <i>OsCam1-1i-3'</i> (<i>Oryza sativa indica</i>) with the <i>OsCam1-1j</i> (<i>Oryza sativa japonica</i>) used EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms.....	103
3.18 Nucleotide sequence alignment of <i>OsCML1i-CD</i> (<i>Oryza sativa indica</i>) with <i>OsCML1j</i> (<i>Oryza sativa japonica</i>) used EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms.....	104
3.19 Amino acid sequence alignment of <i>OsCML1i-CD</i> (<i>Oryza sativa indica</i>) with <i>OsCML1j</i> (<i>Oryza sativa japonica</i>) used EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms.....	105
3.20 Agarose gel electrophoresis of the amplified <i>Cam</i> and <i>CML</i> probes....	107
3.21 Expression patterns of CaM-encoding genes under salt stress signals...	110
3.22 Genomic DNA blot analysis of <i>OsCam1-1</i> gene.....	112
3.23 Agarose gel electrophoresis of the digested elongation factor 1 α plasmid.....	114
3.24 rRNA can be used as a loading control.....	115
3.25 RNA blot analysis and quantitative comparison of <i>OsCam1-1</i> gene under salt stress in KDML105 and FL530.....	117