

NGHIÊN CỨU HOẠT ĐỘNG CỦA PROMOTER LRR-RLK VIII ĐIỀU KHIỂN TÍNH CHỐNG CHỊU ARSENIC TRONG CÂY MÔ HÌNH *ARABIDOPSIS*

Nguyễn Thị Thúy Quỳnh¹, Nguyễn Huy Hoàng², Hao Jen Hoang³

¹Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Quốc gia Thành Công, Đài loan

Ngày nhận bài: 02.02.2015

Ngày nhận đăng: 20.4.2016

TÓM TẮT

Gen mã hóa cho Leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) là một kinase giống thụ thể gồm nhiều đoạn lặp lại giàu leucin, có vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng cũng như là tăng cường khả năng chống chịu các yếu tố stress của môi trường. Promoter LRR-RLK đã được nghiên cứu làm tăng biểu hiện gen trong những điều kiện stress có muối, paraquat... Tuy nhiên, cho đến nay chưa có tài liệu nào nghiên cứu về hoạt động của promoter LRR-RLK VIII dưới điều kiện stress bởi Arsenic (As). *Arabidopsis* là cây mô hình với bộ gen đã được giải trình tự đầy đủ và được sử dụng trong nghiên cứu các tính trạng quan trọng. Do đó, chúng tôi tiến hành phân lập promoter gen LRR-RLK từ cây *Arabidopsis*, đồng thời thiết kế vector chuyển gen ở thực vật mang cấu trúc promoter LRR-RLK VIII điều khiển gen GUS (beta-glucuronidase) dựa trên khung vector pCAMBIA1304. Các vùng chức năng trên promoter LRR-RLK VIII đã được xác định dựa trên cơ sở dữ liệu Plan Cis-acting regulatory DNA Elements (PLACE) cho thấy xuất hiện một số yếu tố điều hòa quan trọng như là W-box và ABRE. Bằng phương pháp nhuộm hóa mô tế bào với X-gluc cho thấy promoter LRR-RLK VIII điều khiển sự hoạt động của gen GUS đặc hiệu ở phần mô mạch và trụ dưới lá mầm ở cây chuyển gen thể hệ T1 trong môi trường có chứa As. Sự biểu hiện mạnh của gen mã hóa LRR-RLK VIII ở lá cây chuyển gen dưới tác động của As so với cây đối chứng đã được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR.

Từ khóa: *Arabidopsis*, Arsenic, leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK), GUS, promoter

MỞ ĐẦU

Arsenic (As) hay còn gọi là thạch tín là một trong những chất độc mạnh cho các sinh vật sống. As trong nước ngầm được sử dụng cho tưới tiêu có thể thâm nhập vào chuỗi thức ăn và từ đó đi vào cơ thể con người, nếu tích tụ trong thời gian dài sẽ gây ung thư hoặc rối loạn nội tiết (Rahman *et al.*, 2008). Hơn nữa, độc tính của As còn ức chế chức năng nội bào, phá hủy quá trình trao đổi chất, gây chết tế bào thực vật làm suy giảm sự phát triển của cây trồng và do đó dẫn đến giảm sản lượng cây trồng (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995). Do đó việc nghiên cứu tìm kiếm những gen có khả năng chống chịu As để nâng cao và ổn định sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng là một việc quan trọng và thiết thực.

Arabidopsis là cây mô hình với bộ gen đã được giải trình tự đầy đủ và được sử dụng trong nghiên cứu các tính trạng quan trọng. Trong nghiên cứu trước đây, bằng kỹ thuật microarray, chúng tôi đã

phân tích những thay đổi ở mức độ phiên mã của cây *Arabidopsis* khi xử lý với As và phát hiện được một số gen liên quan đến tính chống chịu As (Fu *et al.*, 2014). Một trong những gen đó là nhóm gen mã hóa cho Leucine-Rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK). LRR-RLK VIII được biết như là kinase giống thụ thể gồm một phần kinase trong tế bào chất, một phần gồm nhiều đoạn lặp lại giàu leucin và một phần nằm ở vùng màng chuyên tiếp. Chúng có mặt trong hầu hết các loài thực vật, có vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng cũng như là đáp ứng chống chịu các yếu tố stress của môi trường (Delphine *et al.*, 2010, Sun *et al.*, 2011).

Ở thực vật chuyển gen, bên cạnh tính chất mà gen đó qui định thì sự biểu hiện của gen ở vị trí nào trong cây được chuyển cũng rất quan trọng, và chịu sự điều khiển trực tiếp của promoter ở một số mô nhất định dưới điều kiện chống chịu với các yếu tố stress trong môi trường. Promoter LRR-RLK của rễ cây đậu *Medicago truncatula* chuyển gen thể hệ T0

và T1 đã được xác định là biểu hiện mạnh dưới điều kiện chịu mặn (Lorenzo *et al.*, 2009). Promoter NtLRR2 ở cây thuốc lá đã được phân lập và xác định thấy có một số yếu tố tác động cis (cis-acting elements) đáp ứng với các tác nhân gây bệnh và stress muối, như là W-box, GCC-box... (Xu *et al.*, 2009). Theo nghiên cứu của Osakabe *et al.*, (2005), promoter LRR-RLK đã được đưa vào vector pBI101-GUS và được biến nạp vào cây *Arabidopsis* thông qua chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58, các thí nghiệm nhuộm hóa mô tế bào với X-gluc cho thấy promoter này điều khiển gen GUS biểu hiện mạnh đặc hiệu trên các trụ dưới lá mầm và mô mạch của cây chuyển gen khi xử lý với abscisic acid (ABA). Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có công bố nào về promoter LRR-RLK ở cây chuyển gen dưới tác động của As. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và nghiên cứu hoạt động của promoter LRR-RLK VIII điều khiển tính chống chịu As từ cây *Arabidopsis*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Giống *Arabidopsis thaliana* Col-0 (CS22625) được cung cấp bởi Trung tâm ABRC của trường Đại học Ohio State, Mỹ, và được nuôi trồng *in vitro* tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử thực vật, khoa Khoa học sự sống, trường Đại học quốc gia Cheng Kung, Đài loan.

Vector tách dòng TOPO TA II chứa gen lacZ, vector chuyển gen pCAMBIA3014 chứa gen kháng hygromycine và gen chỉ thị β -glucuronidase (GUS), các chủng vi khuẩn DH5 α và *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 do Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử thực vật, khoa Khoa học sự sống, trường Đại học quốc gia Cheng Kung, Đài loan cung cấp.

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu được đặt mua từ các hãng có uy tín như Sigma (Mỹ), Merck (Đức), Invitrogen (Mỹ).

Phương pháp

Điều kiện sinh trưởng của *Arabidopsis* và xử lý hóa chất

Hạt giống *Arabidopsis* được khử trùng bằng NaClO 1.2% trong 10 phút, sau đó được rửa 4 lần với nước cất vô trùng. Những hạt này được gieo trên màng nylon đặt trên môi trường MS (Murashige-Skoog) bổ sung 1% saccharose và 1% phytigel, trong điều kiện nuôi cấy là 16 giờ chiếu sáng và 8

giờ không chiếu sáng ở nhiệt độ 20°C. Sau 4 ngày, màng nylon có chứa các cây con *Arabidopsis* được chuyển sang môi trường MS chứa 200 μ M Arsenic. Sau 24 giờ xử lý As, rễ cây *Arabidopsis* được cắt và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Phân lập promoter của gen LRR-RLK VIII từ *Arabidopsis*

Lá *Arabidopsis* của các mẫu đối chứng và mẫu xử lý với As trong 24 giờ được tách chiết DNA tổng số bằng kit DNA Plant Mini Kit (QIAGEN, Đức) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Mức độ tinh sạch của DNA được xác định bằng máy quang phổ Nanodrop và được điện di kiểm tra trên gel agarose.

Đoạn promoter 1,5 kb của gen LRR-RLK VIII (At1g53440) được xác định trình tự từ cơ sở dữ liệu promoter của thực vật Plantpromoterdb (<http://ppdb.agr.gifu-u.ac.jp>), và được phân lập từ DNA tổng số bằng cặp mồi đặc hiệu có thêm trình tự của hai enzyme giới hạn *Pst*I và *Spe*I (pLRR-*Pst*I-F: 5'-

TGCACTGCAGTGCAGTATTGTTGCAAAGGG TAG-3' và pLRR-*Spe*I-R: 5'-GGACTAGTCCTTCTCTCTTTTCTTCTCGG-3'). PCR theo chu trình nhiệt 94°C/2 phút, 35 chu kỳ (94°C/15 giây, 55°C/15 giây, 72°C/1 phút), 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự (1977) trên máy xác định trình tự ABI 3100-Avant (Applied Biosystems, Mỹ). Các vùng chức năng trên promoter của gen LRR-RLK VIII được phân tích từ cơ sở dữ liệu PLACE (A database of Plan Cis-acting regulatory DNA Elements, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.html>).

Sau khi xác định trình tự, đoạn promoter của gen LRR-RLK VIII được gắn vào vector TA-TOPO II, và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Bằng phương pháp chọn lọc xanh trắng, khuẩn lạc đơn mang vector tái tổ hợp được lựa chọn để nuôi cấy và tách chiết DNA plasmid. Sau đó cắt plasmid thu được bằng hai enzyme giới hạn *Pst*I và *Spe*I, đoạn DNA thu được có kích thước 1,5 kb sẽ được chuyển tiếp vào vector pCAMBIA1304 đã được cắt bỏ phần promoter 35S bằng phản ứng lai dưới sự xúc tác của T4 DNA ligase. Vector tái tổ hợp thu được chứa promoter LRR-RLK VIII thay thế đoạn 35S promoter và trực tiếp điều khiển gen GUS (pLRR::GUS), và được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101 bằng phương pháp xung điện được tiến hành theo Sambrook và Russell (2001).

Sàng lọc GV3101 mang vector tái tổ hợp trên môi trường LB đặc bổ sung kanamycin 50 mg/ml và rifamycin 50 mg/ml trong điều kiện 28°C trong 48-96 giờ. Sau đó chuyển vi khuẩn sang môi trường LB lỏng (có bổ sung hai loại kháng sinh trên) ở 28°C trong 24 giờ. Đồng thời tiến hành kiểm tra đoạn LRR-RLK VIII promoter bằng phương pháp colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu. Dịch huyền phù vi khuẩn mang vector tái tổ hợp pLRR::GUS được ly tâm ở 3000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút để thu cặn tế bào và pha loãng cho tới OD₆₀₀ = 0,8 trong 30 ml dung dịch đường saccharose 5% và 500 µl Silwet L-77. Tiến hành tạo cây chuyển gen bằng cách nhúng cây *Arabidopsis* 21 ngày tuổi vào dung dịch huyền phù vi khuẩn GV3101 chứa vector pLRR::GUS trong khoảng thời gian 15 giây theo phương pháp của Clough và Bent (1998). Những cây con này được trồng trong môi trường 16 giờ chiếu sáng và 8 giờ không chiếu sáng ở nhiệt độ 20°C. Hạt cây chuyển gen được thu hoạch và được gieo trồng trên môi trường MS rắn chứa 15 mg/l hygromycin. Sau 15 ngày, những cây con có rễ phát triển tốt sẽ được lựa chọn và được chuyển ra trồng trong chậu đất ở điều kiện 20°C.

Kiểm tra và phân tích sự biểu hiện của pLRR::GUS

Bằng kit DNA Plant Mini Kit (QIAGEN, Đức), DNA tổng số được tách từ lá cây chuyển gen T1. Sự có mặt của gen GUS được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu: GUS-F: 5'-TTCGATAACGTGCTGATGG-3' và GUS-R: 5'-AATAACGGTTCAGGCACAGCACA-3'. PCR theo chu trình nhiệt 94°C/2 phút, 30 chu kỳ (94°C/15 giây, 55°C/15 giây, 72°C/1 phút), 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra điện di trên gel agarose 2%.

Đánh giá sự biểu hiện của gen GUS trong các cây chuyển gen 7 ngày tuổi T1 dưới tác động của 100 và 200 µM Arsenic trong 24 giờ. Các mẫu cây được ngâm ngập trong dung dịch 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-gluc) nồng độ 0.05%, để 12 giờ trong tối ở nhiệt độ 37°C. Loại bỏ diệp lục bằng cồn 90% trong 2-3 giờ cho đến khi nhận rõ màu xanh lam đặc trưng (Jefferson *et al.*, 1987).

Phân tích biểu hiện của gen LRR-RLK VIII ở mức độ phiên mã

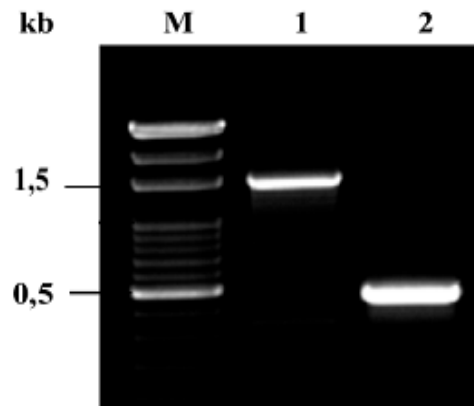
Lá cây *Arabidopsis* chuyển gen 4 ngày tuổi thể hệ T1 với các mẫu đối chứng và mẫu xử lý với

100 và 200 µM Arsenic trong 24 giờ được sử dụng để tách RNA tổng số bằng kit RNAeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Đức) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. 1 µg RNA tổng số được sử dụng để tổng hợp cDNA bằng ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, USA) với mồi oligo (dT)₁₅. Sự biểu hiện của gen LRR-RLK VIII được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu: pLRR-F: 5'-GTCTGTCGTGCACAAACATAC-3' và pLRR-R: 5'-TTGAGATTGCTCAAGGACTCAG-3, với chu kỳ nhân gen là: tách dây đơn ở 94°C trong 2 phút, tiếp theo đó là 30-35 chu kỳ: 94°C trong 15 giây, 56°C trong 30 giây, 72°C trong 60 giây, kéo dài phản ứng cuối là 72°C trong 10 phút. Gen actin được sử dụng như một đối chứng nội sinh nhằm chứng tỏ mức độ biểu hiện ở các mẫu là như nhau.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và thiết kế vector pCAMBIA 3104 chứa promoter gen LRR-RLK

Cặp mồi pLRR-*PstI*-F và pLRR-*SpeI*-R được thiết kế dựa trên trình tự đã được xác định trên cơ sở dữ liệu PlantPromoter DB, với kích thước tương ứng với tính toán lý thuyết là 1,5 kb. Kết quả trên hình 1 cho thấy sản phẩm PCR đặc trưng có kích thước đúng với kích thước của đoạn promoter cần khuếch đại. Sản phẩm PCR này đã được xác định và so sánh trình tự nucleotide đã được công bố trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy promoter LRR-RLK VIII đúng với trình tự gốc của gen và nằm đúng theo khung đọc mở, do đó đoạn promoter này được chuyển vào vector tái tổ hợp TA-TOPO II với cặp mồi đặc hiệu có chứa điểm nhận biết của enzyme giới hạn *PstI* và *SpeI* ở hai đầu. Sau đó, đoạn promoter này được cắt bằng *PstI* và *SpeI* rồi được chèn và thay thế vùng gen promoter 35S của vector pCAMBIA1304 đã được cắt bỏ promoter 35S bằng hai enzyme tương ứng. Cấu trúc vector pCAMBIA1304 có chứa đoạn gen GUS được đặt tên là pLRR::GUS. Kết quả này đã được chứng minh trên hình 1, kích thước đoạn gen GUS được thiết kế với cặp mồi đặc hiệu là 483 bp tương ứng với kết quả PCR. Vì vậy, cấu trúc này được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101 bằng phương pháp xung điện để phục vụ cho thí nghiệm chuyển gen vào cây *Arabidopsis*.

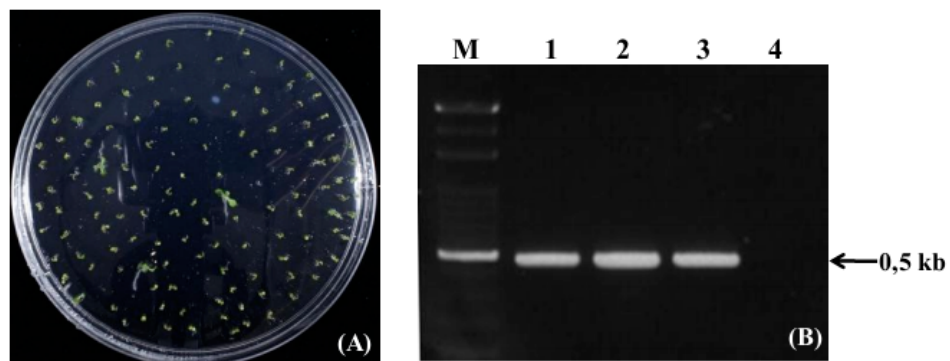


Hình 1. Kết quả thiết kế vector pCAMBIA1304 mang promoter gen LRR-RLK VIII phân lập từ *Arabidopsis*. M: Marker; 1: vector pCAMBIA1304 tái tổ hợp chứa đoạn gen promoter 1,5 kb được cắt bằng *Pst*I và *Spe*I; 2: vector pCAMBIA1304 tái tổ hợp chứa đoạn gen GUS 0,5 kb.

Phân lập các dòng *Arabidopsis* mang promoter gen LRR-RLK VIII

Cấu trúc gen pLRR::GUS được chuyển vào cây *Arabidopsis* 21 ngày tuổi thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens*. Vector pCAMBIA1304 có chứa gen kháng hygromycin, do đó hạt chuyển gen *Arabidopsis* thể hệ T0 được trồng trên môi trường MS rắn có chứa 15 mg/l hygromycin. Kết quả cho thấy, hơn 10 cây chuyển gen có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt, trong khi đó những cây khác không thể phát triển được trong môi trường kháng sinh hygromycin (Hình 2A). Những cây chuyển gen này được chuyển ra trồng trong chậu

đất để thu hoạch hạt cho các thí nghiệm sâu hơn. Đồng thời để khẳng định sự có mặt của gen chỉ thị GUS trong các dòng cây chuyển gen này, DNA tổng số từ lá của 3 cây chuyển gen được tách chiết và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen chỉ thị GUS. Sản phẩm PCR cho thấy cả 3 dòng chuyển gen pLRR::GUS (các giếng số từ 1 đến 3) đều xuất hiện 1 băng DNA đặc hiệu tương ứng với kích thước theo tính toán là 483 bp, trong khi đó ở cây *Arabidopsis* không chuyển gen (giếng số 4) không có sự xuất hiện băng DNA này (Hình 2B). Như vậy ở mức độ phân tử có thể nhận thấy rằng gen GUS đã được chuyển thành công vào cây *Arabidopsis*.

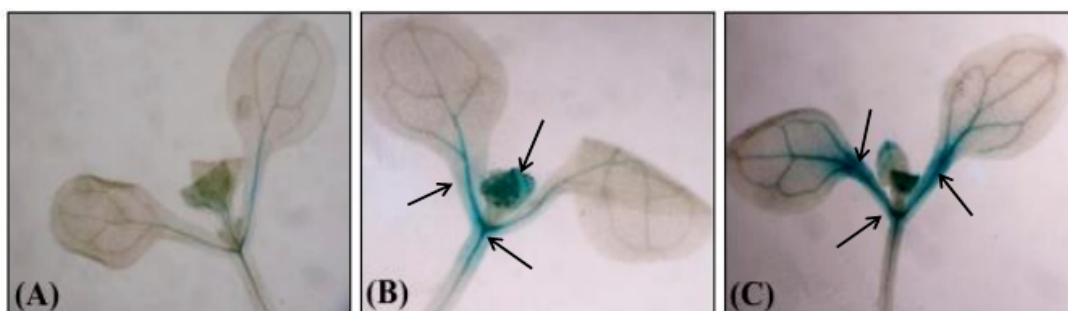


Hình 2. Chọn dòng cây chuyển gen trên môi trường chọn lọc bổ sung hygromycin (A) và kết quả PCR nhân gen GUS (B) từ DNA tổng số của 3 dòng chuyển gen (1- 3) và dòng cây không chuyển gen (4) (M:Marker).

Phân tích sự biểu hiện của gen GUS trên cây chuyển gen T1

Gen GUS mã hóa enzyme β -glucuronidase có khả năng phân giải cơ chất X-Gluc thành sản phẩm có màu xanh lam đặc trưng. Do đó, các nhà khoa học đã thiết kế gen GUS vào vector chuyển gen để làm chỉ thị để nhận biết các mô hay tế bào thực vật mang gen chuyển (Jefferson *et al.*, 1987). Trong nghiên cứu này, để đánh giá mức độ hoạt động của promoter LRR-RLK VIII ở thể hệ cây T1 chuyển gen, chúng tôi tiến hành thí nghiệm gây stress với As với hai nồng độ khác nhau. Kết quả nhuộm với X-Gluc ở các cây chuyển gen cho thấy phần mô mạch và trụ dưới lá mầm của các cây

chuyển gen trồng trong môi trường As với nồng độ 100 μ M As và 200 μ M As (Hình 3B, C) có màu xanh đậm hơn so với mẫu đối chứng (Hình 3A). Kết quả này chứng tỏ gen GUS thực sự có mặt trong genome của cây chuyển gen *Arabidopsis* thể hệ T1 và được điều khiển mạnh bởi promoter gen LRR-RLK VIII. Yuriko và cộng sự (2005) đã chỉ ra rằng, mức độ biểu hiện gia tăng của promoter gen PRK1 trong cây *Arabidopsis* bị xử lý với 100 μ M ABA (Abscisic Acid) trong 10 giờ so với cây đối chứng. Kết quả cho thấy hoạt tính GUS được phát hiện rất rõ trong mô mạch, lá mầm và trụ dưới lá mầm của cây *Arabidopsis* dưới tác dụng của ABA.

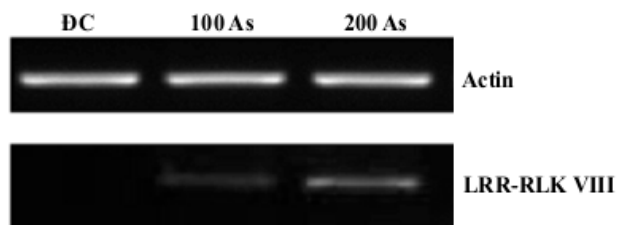


Hình 3. Phân tích biểu hiện gen GUS ở cây chuyển gen pLRR::GUS trong môi trường đối chứng không có As (A), và môi trường chứa 100 μ M As (B) và 200 μ M As (C).

Sự biểu hiện của gen LRR-RLK VIII trên cây chuyển gen T1

Sự biểu hiện của gen LRR-RLK VIII ở mức độ phiên mã của cây chuyển gen T1 dưới các điều kiện stress bởi As với hai nồng độ khác nhau (100 và 200 μ M) được phân tích bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả cho thấy sự biểu hiện mạnh của gen LRR-RLK VIII ở cây chuyển gen dưới sự điều khiển của

promoter so với cây đối chứng ở điều kiện thông thường (Hình 4). Hơn nữa, khi phân tích sâu hơn các vùng chức năng trên promoter LRR-RLK VIII dựa trên cơ sở dữ liệu PLACE, một số yếu tố điều hòa cis cũng như là các box quan trọng đã được xác định (Bảng 1). W-box và ABRE cũng được tìm thấy trong promoter LRR-RLK ở cây thuốc lá liên quan đến đáp ứng chống chịu bệnh và các stress muối (Xu *et al.*, 2009).



Hình 4. Sự biểu hiện của gen LRR-RLK VIII trong cây chuyển gen bằng RT-PCR.

Bảng 1. Xác định trình tự và vị trí của các yếu tố cis của promoter LRR-RLK VIII.

Yếu tố Cis	Trình tự	Vị trí
W-box	TTGAC	-1300
		-885
		-475
WB- box	TTTGAC	-886
		-476
LTRE	CCGAC	-988
TATA-box	TATAAAT	-638
		-322
ABRE	ACGTG	-1324
		-472

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và thiết kế được vector tái tổ hợp pCAMBIA1304 chứa đoạn promoter LRR-RLK VIII và gen GUS và được chuyển thành công vào cây mô hình *Arabidopsis* thông qua chủng vi khuẩn *A.tumefaciens* GV1301. Việc biểu hiện của gen GUS thông qua phản ứng nhuộm hóa mô tế bào với X-gluc đã chứng minh sự điều khiển biểu hiện của promoter LRR-RLK VIII dưới tác dụng của Arsenic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Carbonell-Barrachina AA, Burlo-Carbonell FM, Mataix-Beneyto JJ (1995) Arsenic uptake, distribution and accumulation in tomato plants: effect of arsenic on plant growth and yield. *J Plant Nutr* 18 (6): 1251-1261.

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16 (6): 735-743.

Delphine P, Christel L, Edouard J, Jocelyne G,

Guilleminot, Jean-Paul B, Michel D, Eric L (2010) RLK7, a leucine-rich repeat receptor-like kinase, is required for proper germination speed and tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 232 (6): 1339-1353.

Fu SF, Chen PY, Nguyen TTQ, Zeng QR, Huang TL, Lin CY, Huang HJ (2014) Transcriptome profiling of genes and pathways associated with arsenic toxicity and tolerance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 14 (94): 1-15.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive ADN versatile gen fusion marker in higher plants. *EMBO J* 16 (13): 3901-3907.

Lorenzo L, Merchan F, Laporte P, Thompson R, Clarke J, Sousa C, Crespi M (2009) A novel plant leucine-rich repeat receptor kinase regulates the response of *Medicago truncatula* roots to salt stress. *Plant Cell* 21 (2): 668-680.

Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17 (4): 1105-1119

Rahman MA, Hasegawaa H, Rahmanb MM, Mazid Miahc MA, Tasmind A (2008) Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.): Human exposure through food chain. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69 (2): 317-324.

Sambrook J, Russell D (2001) Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.*

Sun X, Wang GL (2011) Genome-wide identification, characterization and phylogenetic analysis of the rice LRR-kinases. *PLoS One* 6 (3): e16079

Xu ZS, Xiong TF, Ni ZY, Chen XP, Chen XP, Li LC, Gao DY, Liu P, Ma YZ (2009) Isolation and identification of two genes encoding leucine-rich repeat (LRR) proteins differentially responsive to pathogen attack and salt stress in tobacco. *Plant Sci.* 176 (1): 38-45.

Yuriko O, Kyonoshin M, Motoaki S, Masakazu S, Kazuko YS (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17 (4): 1105-1119.

STUDY ON ACTIVITY OF LRR-RLK VIII PROMOTER DRIVEN ARSENIC TOLERANCE IN *ARABIDOPSIS* MODEL PLANT

Nguyen Thi Thuy Quynh^{1,✉}, Nguyen Huy Hoang², Hao Jen Hoang³

¹*University of Education, Vietnam National University, Hanoi*

²*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*National Cheng Kung University, Taiwan*

SUMMARY

The Leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK), that is a receptor-like kinase consists of leucine rich repeat fragments, plays an important role in the plant growth and development as well as enhancing resistance ability against environmental stress factors. LRR-RLK promoter has been studied to increasing gene expression during stress conditions the stress conditions with salt, paraquat... However, no report has been studied on activity of LRR-RLK promoter in Arsenic (As) stress. *Arabidopsis* is a genome sequenced-model plant and has been widely used in the studies of important traits. In this study, LRR-RLK promoter was isolated from *Arabidopsis*, and constructed in plant expression vector pCAMBIA1304. In which, LRR-RLK VIII promoter drives the activity of GUS (beta-glucuronidase) gene. The functional regions of the LRR-RLK VIII promoter were determined and exposed some important regulatory elements such as W-box and ABRE using the database of Cis-acting Data Plan Regulatory DNA Elements (PLACE). Using the histochemical staining hypocotyls of T1 transgenic plant with X-gluc substrate indicated that LRR-RLK VIII promoter driven activity of GUS gene is tissue-specific in tissue vessel and hypocotyls of T1 during As stress. The increase expression of LRR-RLK VIII gene in transgenic leaves under As stress compare to control ones were also observed by RT-PCR technique.

Keywords: *Arabidopsis*, Arsenic, leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK), GUS, pCAMBIA1304, promoter

✉ Author for corresspondence: Tel: +84-437565633; E-mail: quynhntt-bio@vnu.edu.vn