

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21:579.23"315

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОМОТОРА ГЕНА *ZmHAK1*
КУКУРУЗЫ И РЕГУЛИРУЮЩИХ ЕГО ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ^{1, 2}

© 2020 г. Н. Sheng^a, D. L. Cong^b, Н. Y. Ju^{a, *}

^aCollege of Plant Science, Jilin University, Changchun, 130062 P. R. China

^bCollege of Pharmacy, Jilin University, Changchun, 130021 P. R. China

*e-mail: juhy@jlu.edu.cn

Поступила в редакцию 07.01.2019 г.

После доработки 07.03.2019 г.

Принята к публикации 14.03.2019 г.

Дефицит калия (K^+) в почве может существенно влиять на урожайность и развитие растений, которые обычно удовлетворяют потребность в этом элементе, используя транспортеры K^+ и/или K^+ -каналы. Белки семейства высокоаффинных переносчиков калия (*ZmHAK*) играют решающую роль в поглощении и распределении K^+ в растениях кукурузы (*Zea mays* L.). В настоящей работе проведен функциональный анализ промотора гена *ZmHAK1* кукурузы и факторов транскрипции, которые регулируют экспрессию этого гена. Семейство генов *HAK* кукурузы включает 34 члена, и анализ их филогенетического дерева показывает как эволюционную консервативность, так и разнообразие. В промоторе гена *ZmHAK1* выявлено множество функциональных элементов, связанных с абиотическим стрессом. С помощью репортерной конструкции pCambia1301:Pro*ZmHAK1*:GUS активность промотора гена *ZmHAK1* выявлена в корнях, стеблях и листьях кукурузы. В дрожжевой одногибридной системе показано, что промотор *ZmHAK1* взаимодействует с факторами транскрипции *ZmRAP2.11* и *ZmARF2*, и эти взаимодействия картированы в разных частях промотора. Фактор транскрипции *ZmRAP2.11* локализуется в ядре, тогда как *ZmARF2* обнаружен как в ядре, так и в цитоплазме клетки. Полученные данные указывают на важную роль гена *ZmHAK1* в процессе поглощения ионов калия и, возможно, в ответе растений кукурузы на абиотический стресс.

Ключевые слова: *ZmHAK1*, промотор, факторы транскрипции, кукуруза

DOI: 10.31857/S0026898420030155

ВВЕДЕНИЕ

Калий (K^+) – важный элемент, на долю которого приходится до 10% сухой массы растений [1]. K^+ играет важную роль не только в росте и развитии сельскохозяйственных культур, но и в их урожайности и качестве [2, 3]. K^+ участвует во многих физиологических процессах, таких как активация ферментов, поддержание тургора клеток, рост растений и движение органов [4]. Клеточная вакуоль представляет собой камеру хранения, в которой концентрация K^+ составляет от 100 до 200 мМ. Концентрация K^+ в растениях существенно выше, чем в почве (всего около 0.1–1 мМ) [5]. Поэтому для поглощения K^+ из почвы корни растений должны использовать транспортеры K^+ и K^+ -каналы. Кроме того, растения выработали различные механизмы поглощения K^+ в соответствии

с содержанием K^+ в среде. Ранее показали, что при высокой концентрации K^+ (>0.3 мМ) в среде растения поглощают K^+ пассивно через каналы белки с низким сродством к K^+ , в то время как при низкой концентрации K^+ (<0.2 мМ) в окружающей среде K^+ активно транспортируется с помощью высокоаффинных переносчиков [6, 7]. За последние годы у высших растений обнаружены различные транспортеры K^+ и K^+ -каналы [1, 8, 9]. Влияние этих двух транспортных систем на поглощение K^+ соответствует концентрациям K^+ во внешней среде. Транспортеры становятся активными при низкой концентрации K^+ , а K^+ -каналы активны при высокой концентрации K^+ [6, 10]. Семейство KUP/HAK/KT – наиболее изученное и наиболее распространенное семейство высокоаффинных переносчиков K^+ в растениях [11]. Например, HAK5 *Arabidopsis* является пере-

¹ Текст представлен авторами на английском языке.

² Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898420030155 для авторизованных пользователей. Сокращения: 4-MU – 4-метилумбеллиферон (4-methylumbelliferone); GUS – β-глюкоуронидаза (β-glucuronidase); Y1H – дрожжевая одногибридная система (yeast one-hybrid assay); CPRG – хлорфенол красный-β-D-галактопиранозид (chlorophenol red-β-D-galactopyranoside); MeJA – метилжасмонат (methyl jasmonate).

носчиком K^+ [11, 12]. В это семейство входит также *HAK1*, который играет важную роль в K^+ -опосредованной регуляции роста и солеустойчивости растений риса при низких концентрациях K^+ [13].

Применение трансгенной технологии требует понимания роли генов и связанных с ними регуляторных механизмов, а также их места и уровня экспрессии в растениях. Поскольку экспрессия чужеродного гена контролируется факторами транскрипции, особенно важно определить регуляторные элементы в промоторе чужеродного гена [14]. Показано, что промоторы многих генов индуцируются различными факторами [15, 16]. Например, промотор гена *AlHAK1* индуцируется абсцизовой кислотой (АВА), засухой и высокой температурой [17]. Передача сигнала в растениях, находящихся в условиях стресса, а также связанная с этим регуляция межгенных сетей изучены довольно подробно [18, 19]. В довольно сложную транскрипционную программу у растений в условиях стресса вовлечены сотни факторов транскрипции [20]. По-видимому, экспрессия генов подвергается сложной регуляции в ответ на калиевый стресс [21–24]. Транскрипционный фактор *RAP2.11* может отвечать на низкий уровень K^+ , связываясь непосредственно с элементами *ERE* и *GCC-box* в промоторе гена *HAK5 in vitro* и *in vivo* [25]. Более того, фактор ауксинового ответа *ARF2* (отрицательный регулятор) связывается с промотором *HAK5* и регулирует его транскрипцию, а остаток серина в положении 689 *ARF2* может служить сайтом фосфорилирования в ответ на низкое содержание K^+ [26].

Кукуруза — одна из основных продовольственных культур, обладающая уникальными характеристиками, на урожайность которой сильно влияет дефицит калия. Чтобы увеличить поглощение калия из почвы и обеспечить растение необходимым количеством K^+ проводится поиск высокоаффинных переносчиков калия. Однако изучению высокоаффинных переносчиков K^+ в растениях кукурузы посвящено лишь небольшое число публикаций [26, 27]. Ген *ZmHAK1* кукурузы, кодирующий высокоаффинный переносчик калия, ранее был клонирован в нашей лаборатории. В настоящей работе проведен полногеномный поиск генов семейства *HAK* кукурузы (*ZmHAK*). Кроме того, проведен анализ промотора гена *HAK1* и изучено взаимодействие *ZmHAK1* с факторами транскрипции *ZmRAP2.11* и *ZmARF2*. Полученные результаты способствуют пониманию механизмов регуляции *ZmHAK1*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Множественное выравнивание последовательностей, филогенетический анализ, определение координат генов в хромосомах. Последовательности генов и белков семейства *HAK* арабидопсиса, ку-

курузы и риса получены из базы данных геномов растений Phytozome (доступна на сайте: <https://phytozome.jgi.doe.gov>). Эти последовательности выравнивали с использованием ClustalW, а полученное выравнивание анализировали с помощью ресурса MEGA7 для построения филогенетических деревьев [28]. Филогенетические деревья строили с использованием методов соединения соседних усредненных точек и *p*-расстояния. Значение начальной загрузки оценивали после 1000 итераций. Филогенетические деревья визуализировали с помощью онлайн-программы Evolview (доступна онлайн: <http://www.evolgenius.info/evolview/>).

Геномные координаты каждого из генов *HAK* кукурузы получали из базы данных Phytozome 12 *Zea mays* Ensembl-18 (доступна на сайте: <https://phytozome.jgi.doe.gov>). Информацию о длине каждой хромосомы получали из базы данных по сравнительной функциональной геномике “Грамена” (доступна на сайте: <http://www.gramene.org>). Расположение генов *HAK* кукурузы на хромосоме изображали с помощью программного обеспечения Circos.

Растительный материал. Семена *Nicotiana tabacum* получены из Лаборатории питания растений Университета Цзилинь. Растения выращивали в горшках в тепличных условиях: 16 ч освещения при 25°C и 8 ч темноты при 20°C, относительная влажность 70–80%.

Анализ *in silico*. Предполагаемые ТАТА-бокс и сайт инициации транскрипции предсказывали с использованием программы распознавания промотора растений TSSP [29]. Распределение различных факторов транскрипции и регуляторных элементов, включая полноразмерные и короткие версии промоторов, определяли по базе данных PLANTCARE (доступна онлайн: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

Клонирование промотора гена *ZmHAK1*. Полноразмерная область промотора 2246 п.н. гена *HAK1* кукурузы и четыре укороченных с 5'-конца фрагмента получены с помощью ПЦР-амплификации [P1 (–1217), P2 (–735), P3 (–323), P4 (–6)]. С этой целью разработаны пять различных наборов прямых праймеров (табл. S1, см. Приложение 1), и использован один и тот же обратный праймер. Затем полноразмерный и укороченные промоторы клонировали в вектор pMD-18T. Наличие вставок проверяли с помощью ПЦР-амплификации и секвенирования. Фрагменты промотора гена *HAK1*, клонированные в вектор pMD-18T, амплифицировали с помощью праймеров, указанных в табл. S1 (см. Приложение 1), и клонировали в плазмиду pCambia1301 по сайтам рестриктаз PstI и NcoI (“Takara”, КНР) перед открытой рамкой считывания репортерного гена *GUS*.

Трансформация растений с помощью агроинфильтрации. Культуры *Agrobacterium*, трансформированные рекомбинантными плазмидами pCambia1301:

GUS, растили в 10 мл жидкой среды LB (1% пептона, 0.5% дрожжевого экстракта, 0.5% NaCl), содержащей 50 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл рифампицина, при 28°C и перемешивании (200 об./мин) в течение 16 ч. Использовали два способа трансформации растений с помощью агробактерий. При первом способе после достижения культуры $OD_{600} = 0.5-0.6$ клетки агробактерий собирали центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин и суспендировали в инфльтрационной среде (2 мМ $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$, 10 мМ $CaCl_2$, 50 мМ MES, pH 5.6, 10 г/л *D*-фруктозы, 0.1 мМ ацетилсиригтон). Суспензию агробактерий вводили в хорошо развитые листья растения табака с помощью шприца объемом 1 мл и анализировали через 2–3 дня. При другом способе различные органы табака разрезали на маленькие кусочки и предварительно культивировали на среде MS в течение 2 дней для формирования каллуса. Полученный каллус инкубировали с суспензией агробактерий в течение 30 мин под вакуумом. Избыток суспензии агробактерий удаляли на стерильной бумаге, помещали каллус в среду MS и культивировали при слабом освещении и 28°C в течение 2 дней. Последующие эксперименты проводили на выращенном органе.

Гистохимическая окраска на активность β -глюкоуридазы (GUS). Органы растения погружали в окрашивающий раствор GUS (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.0, 2 мМ 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -*D*-глюкуроновая кислота, 10 мМ EDTA, 0.1% Тритон X-100), выдерживали в вакууме в течение 30 мин, а затем инкубировали в течение 12–16 ч в темноте при 37°C. Обработанные органы растений несколько раз промывали 70%-ным спиртом, чтобы полностью удалить хлорофилл и другие пигменты. Листья табака растили в порошок в жидком азоте. Измельченные образцы помещали в предварительно охлажденную пробирку объемом 1.5 мл, а затем добавляли 600 мкл буфера для экстракции GUS (100 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.0, 10% SDS, 500 мМ EDTA, pH 8.0, 0.1% Тритон X-100, 25 мМ β -меркаптоэтанол) и тщательно перемешивали. Гомогенат центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин при 4°C и собирали супернатант. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [30], калибровочную кривую строили с использованием бычьего сывороточного альбумина (BSA). Измеряли поглощение при OD_{595} , концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой. Всего 250 мкл образца добавляли в 450 мкл предварительно нагретого реакционного буфера при 37°C (конечная концентрация 4-метилумбеллиферил -*D*-глюкуронида (MUG) составляла 2 мМ), тщательно перемешивали. В точках 0, 10, 20, 30 и 40 мин отбирали по 50 мкл образца, немедленно добавляли 950 мкл раствора для остановки реак-

ции (0.2 М Na_2CO_3) и инкубировали в темноте в водяной бане при 37°C. Интенсивность флуоресценции образца измеряли с помощью спектрофлуориметра (RF-5301рс) при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны излучения 455 нм. Количество 4-метилумбеллиферона (4-ME), образующегося в результате реакции, рассчитывали по калибровочной кривой. Активность GUS рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{активность GUS} = 4\text{-MU (нмол/мл)} / [\text{белок (мг/мл)} \times \text{время (мин)}].$$

Дрожжевая одногибридная система (Y1H). Для создания системы Y1H полноразмерные кДНК генов *ZmRAP2.11* и *ZmARF2*, полноразмерный промотор *ZmHAK1* и его фрагменты [PZmHAK1 (–1669...–573 п.н.), $\Delta P1$ (–1669...–1223 п.н.), $\Delta P2$ (–1243...–883 п.н.), $\Delta P3$ (–903...–471 п.н.), $\Delta P4$ (–499...–109 п.н.), $\Delta P5$ (–151...–139 п.н.), $\Delta P6$ (+121...–573 п.н.)] амплифицировали со специфичными праймерами (табл. S1, Приложение 1) и клонировали в векторы pGAD424 (AD; мишень) и pLacZi (AC; приманка) бесшовным методом с использованием ферментов из набора TransGen Biotch:Peasy-Uni. В итоге получили плазмиды AD-ZmARF2, AD-ZmRAP2.11, AC-PZmHAK1, AC- $\Delta P1$, AC- $\Delta P2$, AC- $\Delta P3$, AC- $\Delta P4$, AC- $\Delta P5$ и AC- $\Delta P6$. Различными комбинациями плазмид (плазида с “приманкой” в линейаризованном виде) трансформировали клетки штамма дрожжей YМ4271 и выращивали в течение 2 дней при 30°C на чашках с агаром SD-Leu/-Ura.

Определение активности β -галактозидазы. В качестве субстрата β -галактозидазы использовали CPRG (хлорфенол красный- β -*D*-галактопиранозид). Минимум три независимых колонии растили при 30°C в течение 12–16 ч в жидкой среде SD-Leu/-Ura, переносили в YPD и растили в течение 3–5 ч до плотности $OD_{600} = 0.5-0.8$. Затем клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буфере 1 (HEPES 23.8 г/л, NaCl 9 г/л, *L*-Asp 0.65 г/л, BSA 10 г/л, Твин-20 500 мкл/л, pH 7.25–7.3). Суспензию клеток помещали в жидкий азот на 1 мин, затем переносили в водяную баню (37°C, 1 мин) и повторяли этот цикл 3 раза. Далее добавляли буфер 2 (CPRG 1.355 г/л, растворенный в буфере 1) и инкубировали при температуре 30°C. После окрашивания опытной реакционной смеси в желтый цвет в опытные образцы и в отрицательный контроль добавляли 3 мМ $ZnCl_2$, время реакции записывали в минутах. Пробирки центрифугировали (13000 об./мин, 1 мин), супернатант осторожно переносили в чистые кюветы, чтобы определить значение OD_{578} . Активность β -галактозидазы рассчитывали по формуле: активность (у.е.) β -галактозидазы = $1000 \times OD_{578} / (t \times V \times OD_{600})$, t = время инкуба-

ции, $V = 0.1$ мл \times коэффициент концентрации (коэффициент концентрации 15).

Субклеточная локализация. Полноразмерную кДНК *ZmRAP2.11* и *ZmARF2* получали с помощью ПЦР-амплификации с использованием ген-специфичных праймеров (табл. S1, Приложения 1) и клонировали в донорный вектор Gateway pDONOR207 путем гомологичной рекомбинации. Донорные векторы рекомбинировали с репортерными векторами pEarleyGate101. Полученными плазмидами *ZmARF2-GFP* и *ZmRAP2.11-GFP* трансформировали агробактерии и вводили в листья табака. Флуоресценцию GFP в клетках эпидермиса листьев табака наблюдали с использованием флуоресцентного микроскопа (Nikon DS-Ri2) через 4–5 дней.

Статистический анализ. Данные представлены в виде среднего, разброс данных – в виде стандартной ошибки ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). Сравнение групп данных выполняли с помощью теста ANOVA в составе программного обеспечения SPSS (версия 19.0). Значение $P < 0.05$ рассматривали как статистически значимое (** соответствует $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Белки HAK кукурузы и их филогенетические связи с ортологами из Arabidopsis и риса

С целью поиска других членов семейства HAK в растениях кукурузы проведен поиск последовательностей, обладающих наибольшим сходством с *ZmHAK1*, в базе данных Phytozome. Из полученных последовательностей отобрали 34, которые рассматривали как члены семейства генов *ZmHAK*. Все 34 последовательности приведены в табл. S2 (см. Приложение 2). Предсказанные белки семейства HAK состоят из 336–921 аминокислотных остатков, имеют молекулярную массу 37.3–100.8 кДа и изоэлектрическую точку 5.85–9.29. Все белки HAK содержат домен транспорта K^+ . Кроме того, с помощью WOLF pSORT предсказана субклеточная локализация этих белков. Согласно полученным ранее результатам [31], белки HAK предположительно локализованы на клеточной мембране, а также могут находиться в цитоплазме, ядре, митохондриях и эндоплазматической сети (табл. S2, Приложение 2).

Чтобы изучить эволюционные взаимоотношения между белками семейства HAK кукурузы и других видов, мы использовали последовательности генов и белков кукурузы (34 гена), *A. thaliana* (13 генов) и риса (27 генов) и построили филогенетические деревья (рис. 1). Полученные филогенетические деревья имеют сходную структуру. Мы разделили эти гены и соответствующие белки на семь кластеров. Кластер I содержал 17 членов (9, 5, 3 у кукурузы, риса и арабидопсиса соответственно). Кластер II включал три члена (по одно-

му у кукурузы, риса и арабидопсиса). Кластер III состоял из 9 членов (4, 3 и 2 у кукурузы, риса и арабидопсиса соответственно), как и кластер IV (по три у каждого вида). Кластер V включает 10 членов (4, 3, 3 у кукурузы, риса и арабидопсиса соответственно). Кластер VI содержит 8 членов (по 4 у кукурузы и риса соответственно), а кластер VII – 18 (9, 8, 1 у кукурузы, риса и арабидопсиса соответственно). Согласно результатам филогенетического анализа члены семейства HAK кукурузы обычно группируются с семейством HAK риса и арабидопсиса. Например, в кластере II GRMZM2G146140 образует одну ветвь с OsHAK13 и At2g30070, что указывает на консервативность членов семейства HAK у разных видов растений. Напротив, GRMZM2G125387 и GRMZM2G315137, GRMZM2G005040 и GRMZM2G327234, GRMZM2G084486 и GRMZM2G097505 формируют отдельные ветви на филогенетическом дереве, предполагая, что HAK может быть специфичным для видов растений.

Положение генов семейства HAK на хромосомах кукурузы

Положение генов HAK на хромосомах кукурузы представлено на рис. 2. Все 34 гена HAK неравномерно распределены по 10 хромосомам, наибольшее количество генов HAK7 находится на хромосоме 1, тогда как на хромосоме 5 локализован только один ген. *ZmHAK1* расположен на хромосоме 2. Можно отметить, что ряд генов HAK дублирован.

Анализ промотора гена ZmHAK1 in silico

Промотор гена *ZmHAK1* анализировали *in silico* с помощью PlantCARE. Показано, что промотор содержит несколько основных регуляторных элементов (табл. 1), в том числе 11 СААТ-боксов и четыре ТАТА-боксов. Промотор содержит также элементы, связанные с индукцией гормонами, такие как АВРЕ (контролируемый абсцизовой кислотой), CGTCA- и TGACG-мотивы (контролируемые MeJA), р-боксы (контролируемый гиббереллином), и TGA-элемент (контролируемый ауксином) (рис. 3). Кроме того, обнаружены элементы, реагирующие на изменение освещенности и засуху.

Клонирование промотора ZmHAK1 и получение репортерных векторов

В целях изучения активности промотора и описания экспрессии *ZmHAK1*, полноразмерную последовательность промотора этого гена и четырех его укороченных вариантов (P1, P2, P3 и P4) длиной 2246, 1782, 1300, 888 и 571 п.н., соответственно (рис. 4а), клонировали из генома кукурузы сорта JiDan27 (а именно 4–144) и встраива-

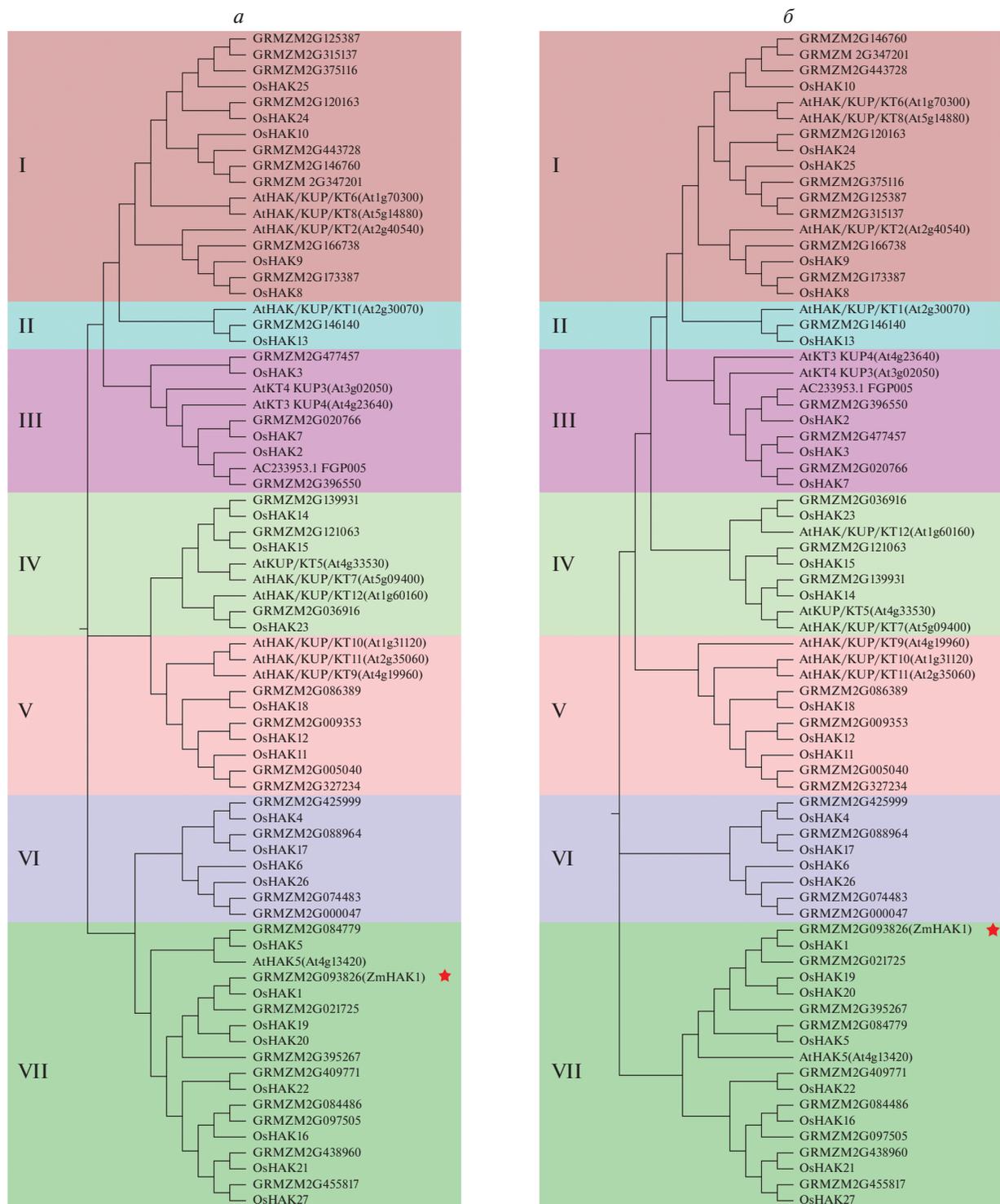


Рис. 1. Филогенетический анализ семейства НАК у растений кукурузы, риса и *Arabidopsis*. Филогенетические деревья получены с использованием матрицы CDS (кодирующие последовательности) (а) или белковой матрицы (б). Римскими цифрами показаны номера групп (I–VII). Красной звездочкой указан *ZmHAK1* (GRMZM2G093826).

ли в вектор экспрессии pCambia1301:GUS с удаленным промотором 35S (рис. 4б). Экспрессионные конструкции, содержащие пять вариантов промотора гена *ZmHAK1*, соединенного с репортер-

ным геном *GUS*, переносили в *Agrobacterium* (штамм ЕНА105). Для ПЦР-валидации бактериальных трансформантов использовали специфичные праймеры.

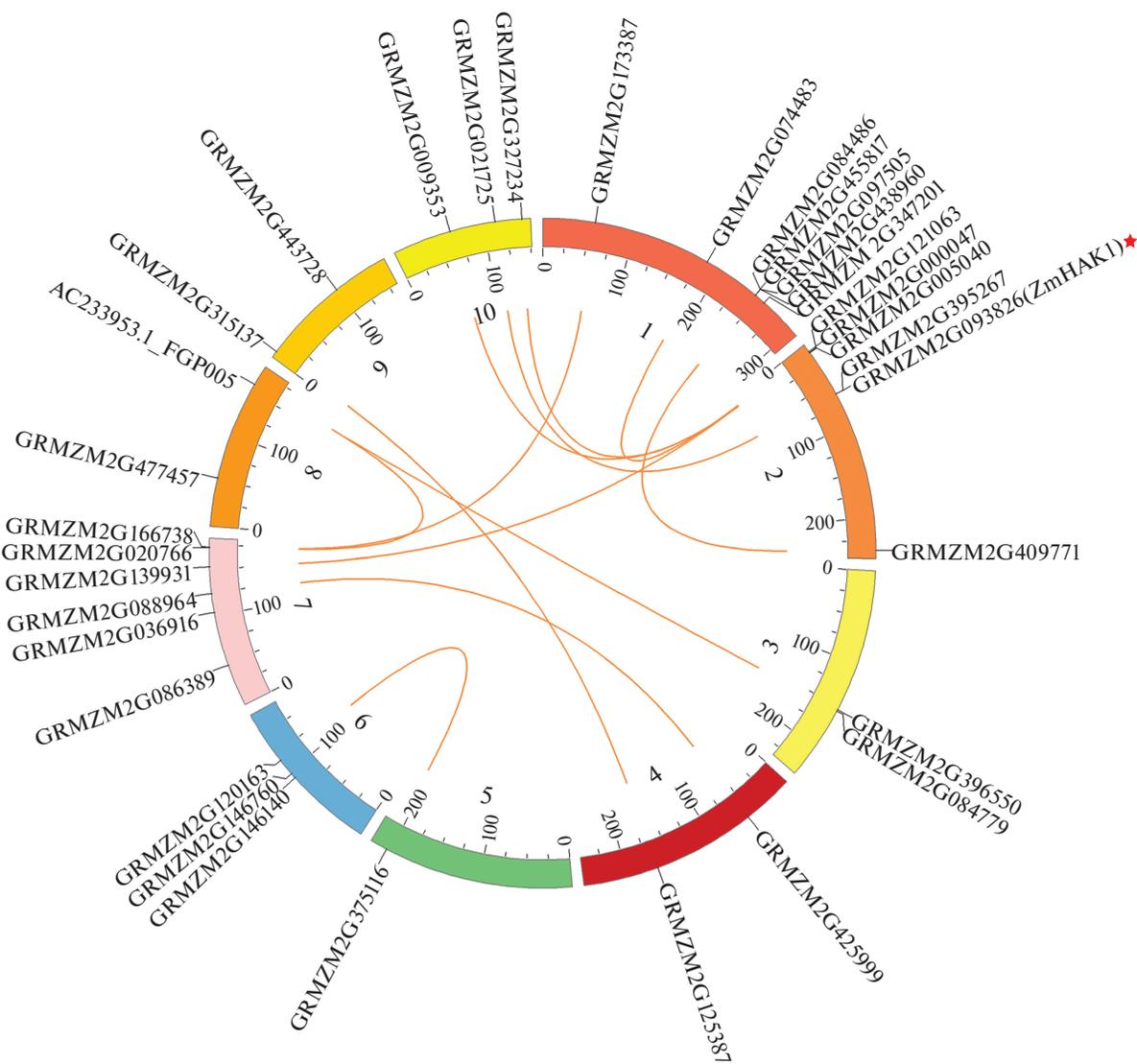


Рис. 2. Положение и дупликация генов *HAK* на хромосомах кукурузы. Каждая хромосома окрашена своим цветом и имеет свой номер. Положение каждого гена *HAK* на хромосоме отмечено короткой черной линией, а два гена с фрагментами дупликации связаны между собой оранжевой линией. Красной звездочкой обозначен *ZmHAK1* (GRMZM2G093826).

Кратковременная экспрессия репортерной конструкции под контролем промотора ZmHAK1 в растениях табака

Химерные гены Pro_{ZmHAK1}:GUS экспрессировали в различных органах табака, включая корни, стебли и листья, используя агроинфильтрацию. Активность вариантов промотора *ZmHAK1* оценивали по активности GUS, выявленной с помощью гистохимического окрашивания. Полученные результаты указывают на то, что ген *GUS*, контролируемый полноразмерным промотором *ZmHAK1*, экспрессируется в корнях, стеблях и листьях табака (рис. 5, б1–б4). В отрицательном контроле (нетрансформированный материал) активность GUS не выявлена (рис. 5, в1–в4); в по-

ложительном контроле (pCambia1301:Pro_{CaMV35S}:GUS) высокую активность GUS наблюдали в корнях, стеблях и листьях (рис. 5, а1–а4). Важно отметить, что активность GUS, экспрессируемой под контролем полноразмерного промотора *ZmHAK1*, близка к активности в положительном контроле.

Мы также анализировали активность делеционных вариантов промотора *ZmHAK1*. Показано, что полноразмерный промотор более эффективно повышает экспрессию GUS (рис. 5д), чем положительный контроль (рис. 5з), его варианты P1 (рис. 5е) и P2 (рис. 5ж) проявляют средний уровень активности, в то время как P3 (рис. 5з) и P4 (рис. 5у) не способны определять экспрессию GUS. Эти результаты подтверждаются также

Таблица 1. *Cis*-регуляторные элементы промотора *ZmNAK1*, обнаруженные с помощью PlantCARE

<i>Cis</i> -регуляторный элемент	Положение в промоторе гена <i>ZmNAK1</i>											Описание	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
А-бокс	-1518												<i>Cis</i> -регуляторный элемент
ABRE	-1050	-398	-1047	+382	-1048	-401							<i>Cis</i> -регуляторный элемент, участвующие в ответе на абсцизовую кислоту
ACE	+122												<i>Cis</i> -регуляторный элемент, контролируемый освещенностью
AE-бокс	-1228												Часть составного модуля, реагирующего на свет
ARE	-504												<i>Cis</i> -регуляторный элемент, активируемый в анаэробных условиях
Бокс 4	-755	-436											Часть составного модуля, реагирующего на свет
CAAT-бокс	-1186	-513	-922	-197	-997	-480	-819	-482	-1173	-466	-996		Базовый <i>cis</i> -регуляторный элемент промоторов и энхасеров
CAT-бокс	-1713												<i>Cis</i> -регуляторный элемент, функционирующий в меристеме
ССААТ-бокс	+271												Сайт связывания МУВНv1
CGTCA мотив	-1571	-714	-1370	-593	-1460	-717							<i>Cis</i> -регуляторный элемент, вовлеченный в ответ на MeJA (метилжасмонат)
G-бокс	-1048	+382	-1	-399	-881	+251							<i>Cis</i> -регуляторный элемент, вовлеченный в реакцию на свет
GC мотив	-1336												Энхансероподобный элемент, участвующий в ответе на недостаток кислорода
I-бокс	+22	+419											Часть элемента, вовлеченного в реакцию на свет
MBS	-337												Сайт связывания МУВ, вовлеченный в ответ на засуху
O2-сайт	-1243	+217	-694										<i>Cis</i> -регуляторный элемент, вовлеченный в регуляцию метаболизма зеина
p-бокс	-917												Гиббереллин-чувствительный регуляторный элемент
Sp1	-1522	-676											Светочувствительный регуляторный элемент
TATA-бокс	-930	-724	-855	+292									Центральная часть промотора, находящаяся около -30 старта транскрипции
TGA-элемент	-270	+320	+176	-143	+266								Ауксин-чувствительный регуляторный элемент
TGACG-мотив	-1571	-714	-1369	-593	-1460	-717							<i>Cis</i> -регуляторный элемент, вовлеченный в ответ на MeJA

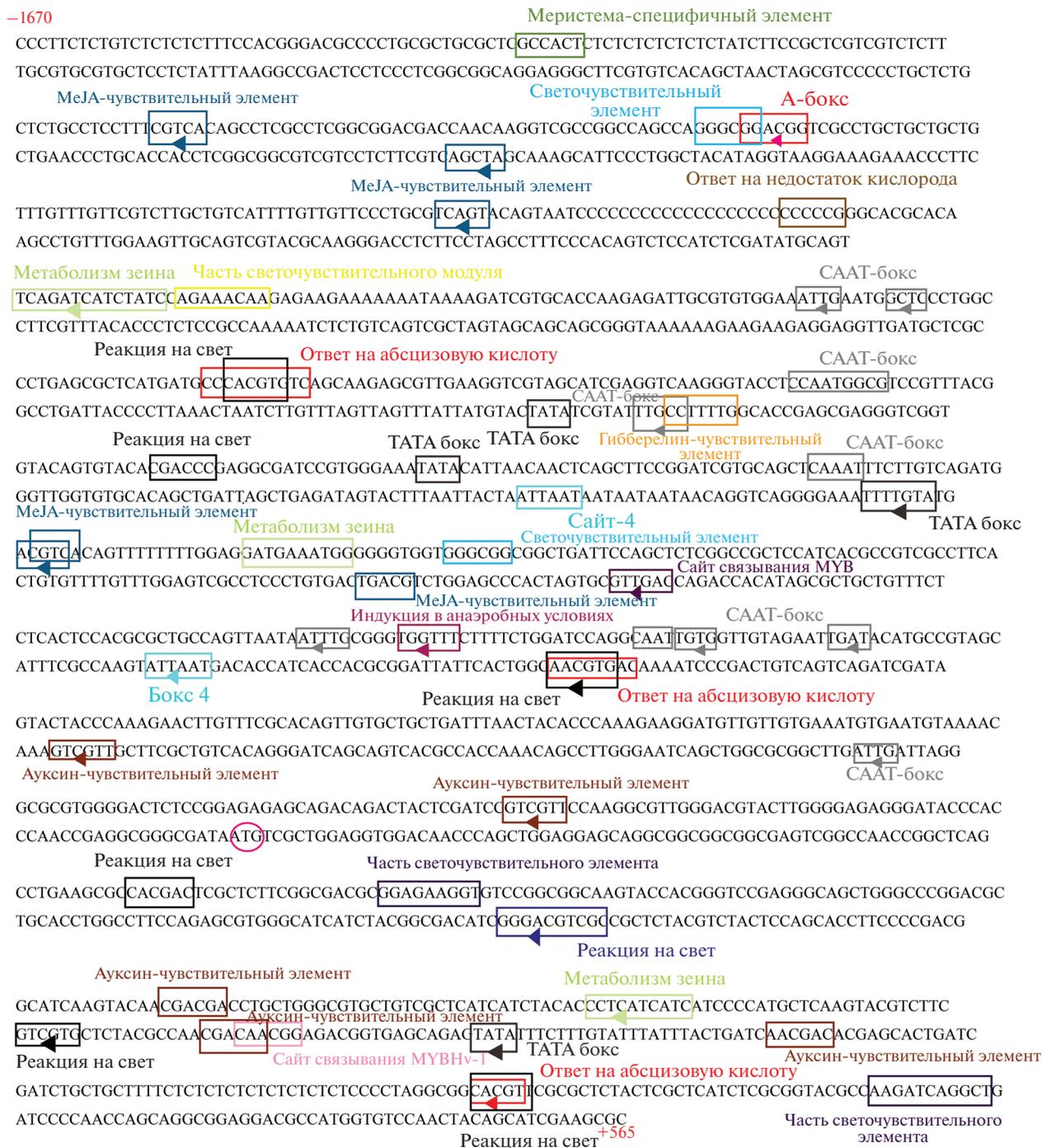


Рис. 3. Нуклеотидная последовательность и положение предполагаемых сайтов связывания факторов транскрипции в промоторной области *ZmHAK1*, предсказанных с помощью PlantCARE. Последовательности предсказанных *cis*-регуляторных элементов в промоторе *ZmHAK1* выделены прямоугольниками определенных цветов, рядом с которыми написана функция или название соответствующего элемента. Стрелки указывают направление *cis*-регуляторного элемента, стартовый кодон ATG обведен овалом.

данными количественного анализа активности GUS (рис. 5к). Таким образом, полноразмерный промотор *ZmHAK1* обладает высокой активностью и может использоваться в дальнейших экспериментах.

Промотор ZmHAK1 взаимодействует с факторами транскрипции ZmRAP2.11 и ZmARF2

Факторы транскрипции, которые связываются с промотором *ZmHAK1*, идентифицировали с использованием дрожжевой одногибридной си-

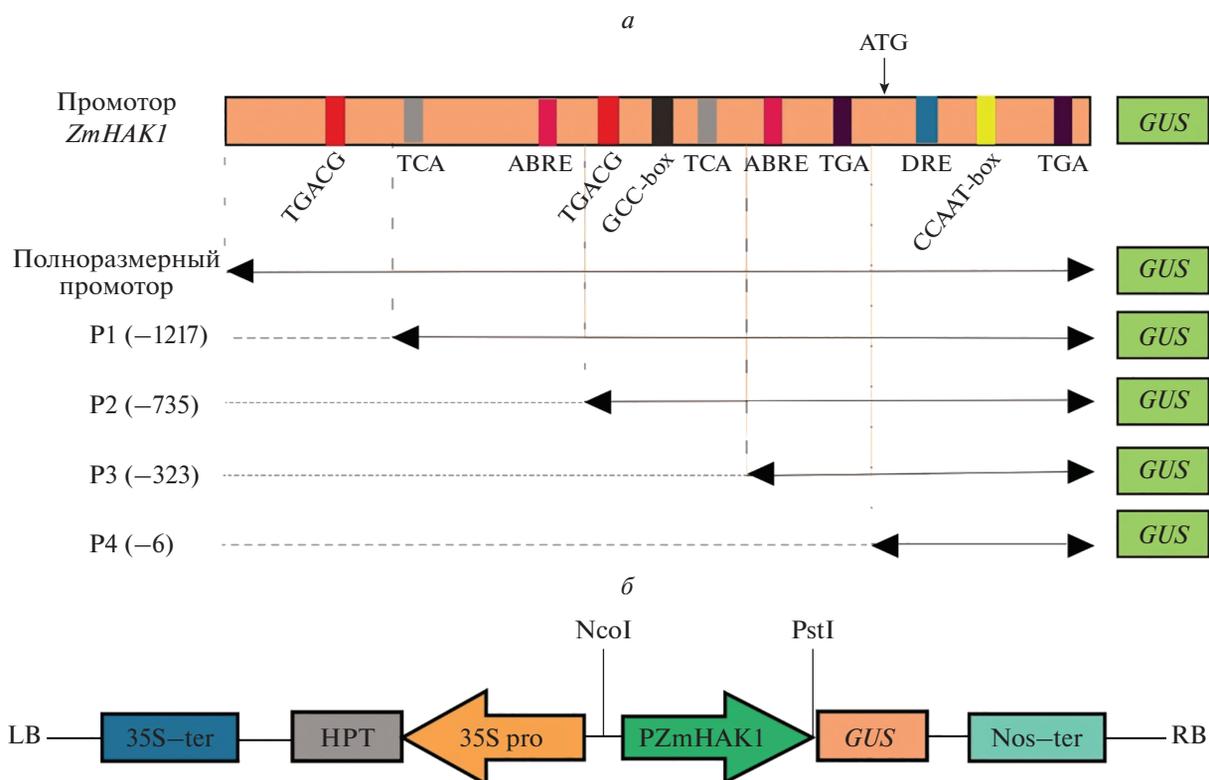


Рис. 4. Схемы репортерных экспрессионных конструкций с вариантами промотора *ZmHAK1*, соединенного с геном *GUS*. *a* – Расположение *cis*-регуляторных элементов в промоторе гена *ZmHAK1* обозначено прямоугольниками разных цветов. Схема химерных репортерных генов с полноразмерным промотором *ZmHAK1* и его укороченными вариантами (P1, P2, P3 и P4). *б* – Общая схема экспрессионной конструкции pCambia1301 с промотором *ZmHAK1*, клонированным по сайтам *NcoI* и *PstI*.

стемы. Гены *ZmARF2* и *ZmRAP2.11* клонировали в вектор pGAD424 и трансформировали им штамм дрожжей YM4271 одновременно с вектором *placZi*, экспрессирующим ген *lacZ* под контролем промотора *ZmHAK1* (рис. 6а). В качестве отрицательно контроля использовали следующие три группы котрансформированных плазмид: пустой вектор pGAD424 и пустой вектор *placZi* (AD/AC), пустой вектор pGAD424 и вектор *placZi* с промотором *ZmHAK1* (AD/AC-*ZmHAK1*), вектор pGAD424, экспрессирующий *ZmRAP2.11* или *ZmARF2*, и пустой вектор *placZi* (AD-*ZmRAP2.11*/AC; AD-*ZmARF2*/AC). Колонии с положительным сигналом высевали и культивировали для количественных экспериментов с CPRG. Результаты определения активности репортерного гена в присутствии полноразмерного промотора *ZmHAK1* и гена *ZmRAP2.11* представлены на рис. 6б. Показано, что активность β-галактозидазы в опыте значительно выше, чем в отрицательном контроле. Аналогичные результаты получены и в случае полноразмерного промотора *ZmHAK1* и гена *ZmARF2* (рис. 6в). Это указывает на существование взаимодействий между факторами транскрипции

ZmRAP2.11 и *ZmARF2* и полноразмерным промотором *ZmHAK1*.

Чтобы определить специфическую последовательность промотора *ZmHAK1*, участвующую в связывании факторов транскрипции, мы разделили промотор на шесть перекрывающихся фрагментов с сегментами между каждым фрагментом (рис. 6а). Результаты количественного анализа активности β-галактозидазы с помощью CPRG указывают на то, что *ZmRAP2.11* взаимодействует с фрагментами ΔP3 (–903...–471 п.н.) и ΔP6 (+121...+573 п.н.) промотора *ZmHAK1* (рис. 6з), а *ZmARF2* взаимодействует с ΔP1 (–1669...–1223 п.н.) и ΔP6 (+121...+573 п.н.) промотора *ZmHAK1* (рис. 6д).

Субклеточная локализация факторов транскрипции *ZmRAP2.11* и *ZmARF2*

Чтобы определить внутриклеточную локализацию белков *ZmARF2* и *ZmRAP2.11*, полноразмерные кДНК соответствующих генов без стоп-кодонов лигировали в модифицированный экспрессионный вектор pEarleyGate101 по технологии Gateway. Полученные плазмиды, несущие химерные репортерные гены *ZmARF2-GFP*

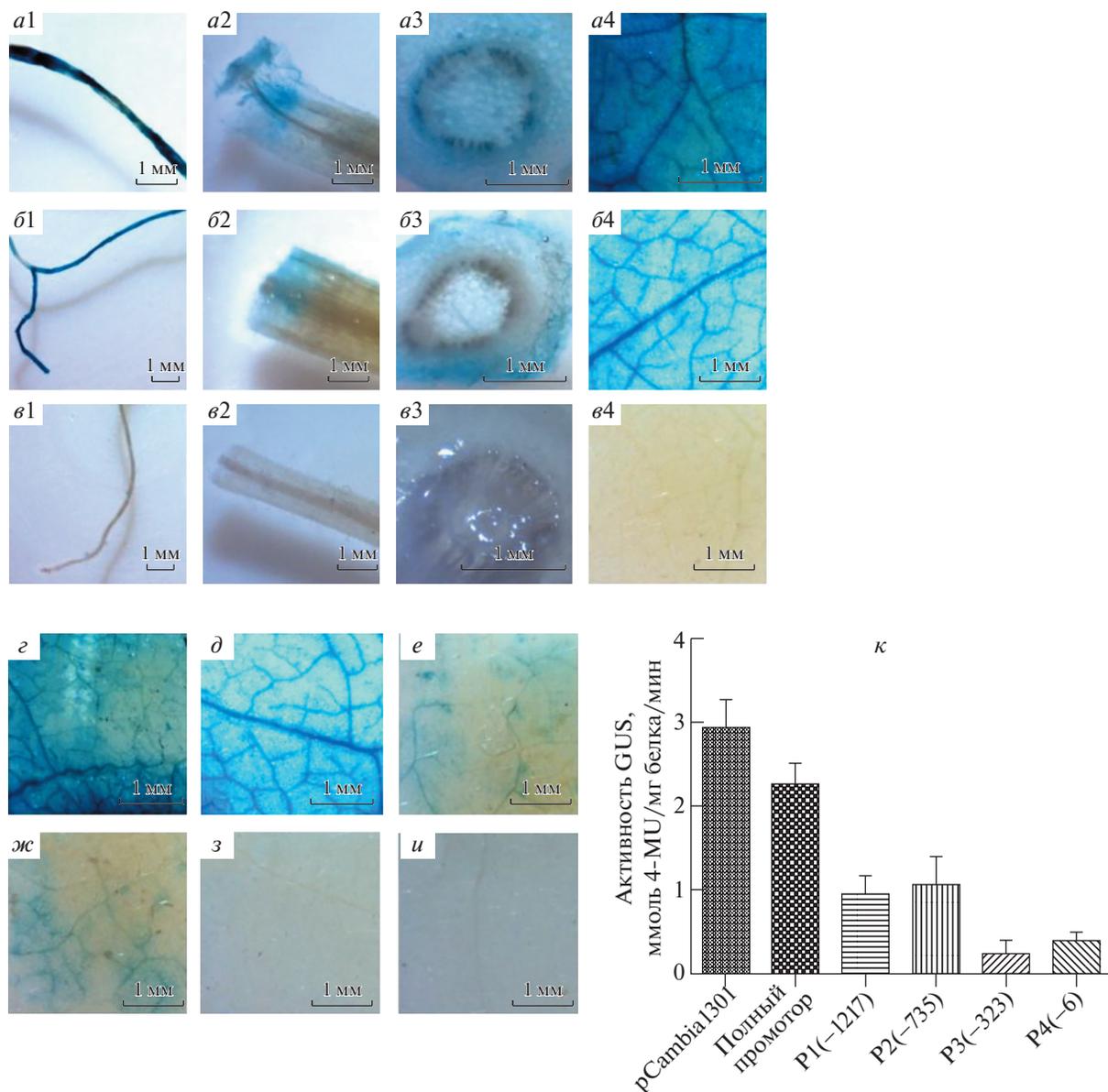


Рис. 5. Гистохимический анализ активности GUS под контролем вариантов промотора гена *ZmHAK1* при временной трансформации растений табака. *a–в* – Определение активности GUS с помощью X-Gluc в различных органах (корень (1); стебель (2); поперечное сечение среза стебля (3); листья (4)). *a1–a4* – Положительный контроль – органы, трансформированные CaMV35S:GUS. *b1–b4* – Окрашивание органов, трансформированных GUS под контролем полноразмерного промотора *ZmHAK1*. *v1–v4* – нетрансформированные органы. *z–u* – Активность GUS в листьях под контролем промотора CaMV35S (*z*), полноразмерного промотора *ZmHAK1* и его делеционных вариантов (*d–u*). *к* – Активность GUS через 48 ч после инфильтрации листьев табака *Agrobacterium*, содержащей конструкции Pro_{CaMV35S}:GUS (положительный контроль) или промотор *ZmHAK1* (полноразмерный или делеционные варианты P1, P2, P3 и P4). Данные представлены как среднее значение, вычисленное из четырех независимых экспериментов.

и *ZmRAP2.11-GFP*, инъецировали в листья табака с помощью агроинфильтрации. После трансформации регистрировали флуоресцентные сигналы GFP. В качестве отрицательного контроля использовали неинъецированные листья табака (рис. 7а). Листья табака, трансформированные “пустым” вектором pEarleyGate101, служили положительным контролем. Сигналы зеленой флу-

оресценции наблюдали в ядре и мембране клеток табака (рис. 7б). После трансформации конструкцией, кодирующей *ZmRAP2.11*, сигнал флуоресценции обнаружен в ядре листьев табака, что указывает на локализацию *ZmRAP2.11* в ядре (рис. 7в). После трансформации конструкцией, кодирующей *ZmARF2*, флуоресценцию обнаруживали в ядре и мембране клеток эпидермиса листьев таба-

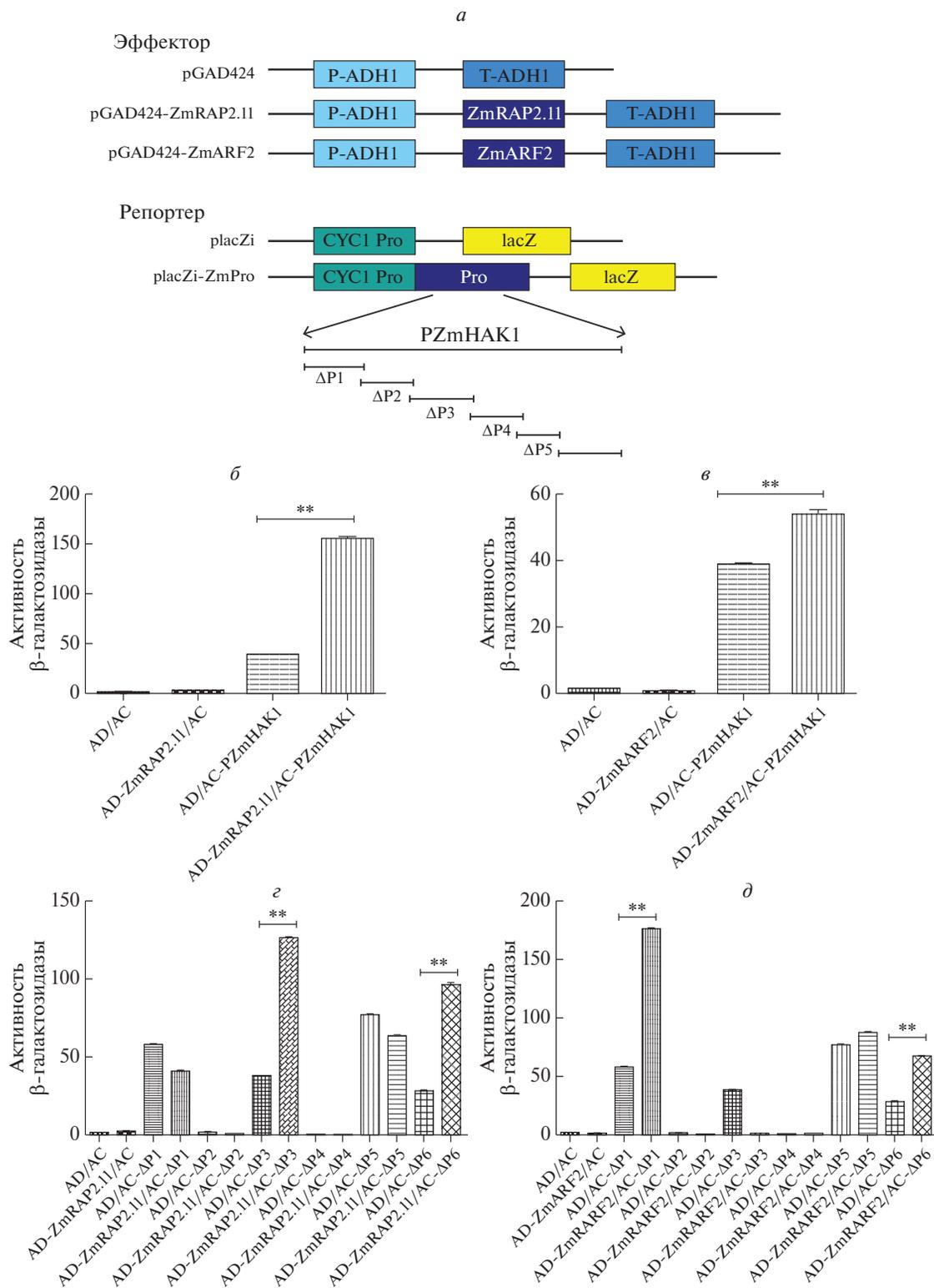


Рис. 6. Взаимодействие промотора *ZmHAK1* с факторами транскрипции *ZmRAP2.11* и *ZmARF2* в одногибридной дрожжевой системе. *a* — Общая схема генетических конструкций, использованных в дрожжевой одногибридной системе. Гены *ZmRAP2.11* и *ZmARF2* клонировали в вектор pGAD424 (эффектор), а полноразмерный промотор *ZmHAK1* и шесть его вариантов — в вектор placZi (репортер). *б*, *в* — Результаты количественной оценки активности β-галактозидазы (у.е.) указывают на то, что оба фактора транскрипции — *ZmRAP2.11* и *ZmARF2* — взаимодействуют с полноразмерным промотором *ZmHAK1*. *г* — *ZmRAP2.11* взаимодействует также с вариантами ΔP3 и ΔP6 промотора *ZmHAK1*. *д* — *ZmARF2* взаимодействует с вариантами ΔP1 и ΔP6 промотора *ZmHAK1*.

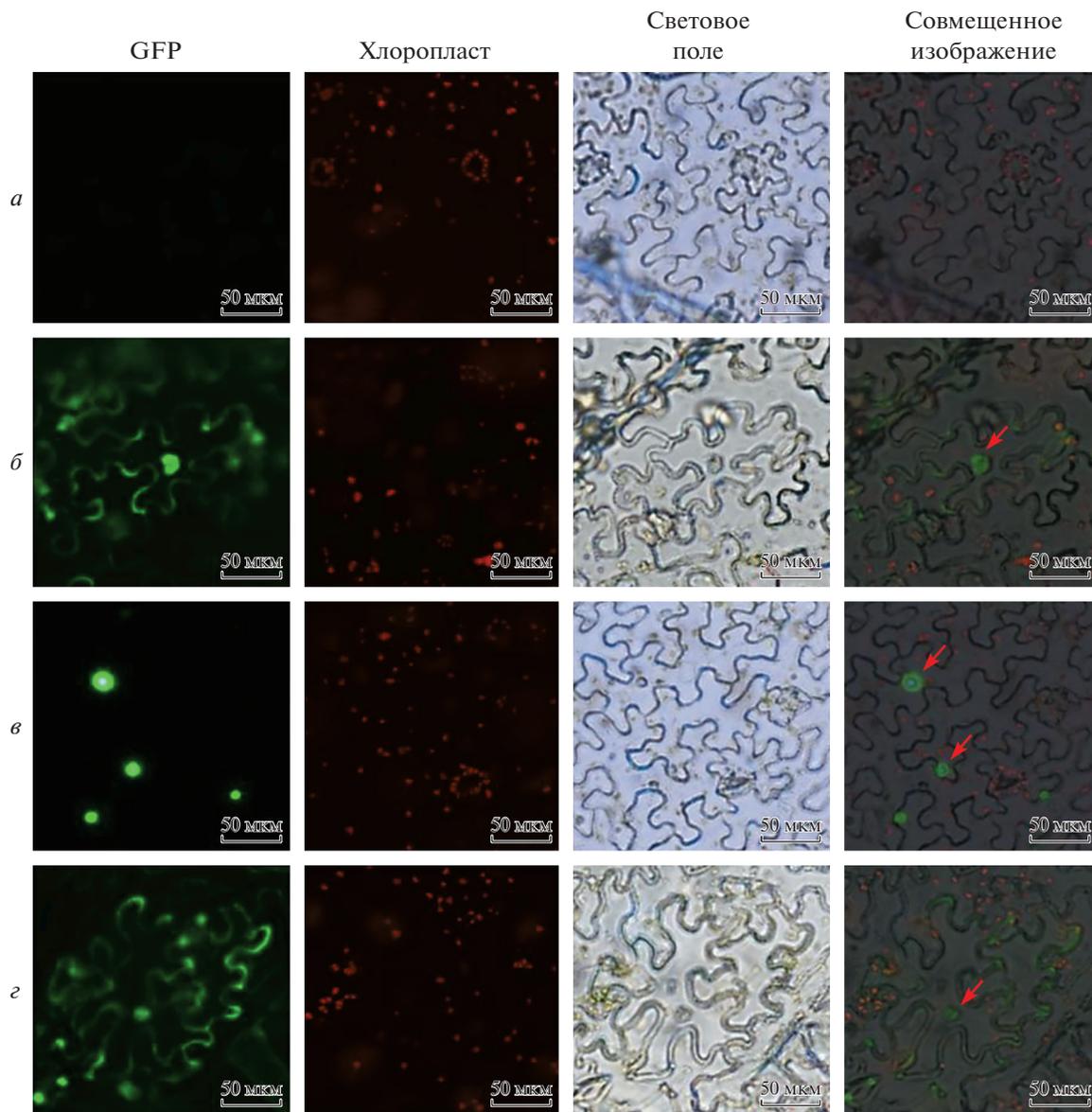


Рис. 7. Субклеточная локализация *ZmRAP2.11* и *ZmARF2* в листьях табака. Флуоресцентные сигналы визуализировали с помощью сканирующей микроскопии. *а* – Листья табака дикого типа. *б* – Листья после инъекции пустым вектором pEarleyGate 101. *в* – Сигнал конструкции, кодирующей *ZmRAP2.11*-GFP. *г* – Сигнал конструкции, кодирующей *ZmARF2*-GFP. Слева направо: зеленая флуоресценция, автофлуоресценция хлоропластов, световое поле и совмещенное изображение. Красные стрелки указывают на ядро.

ка, которая не перекрывалась с автофлуоресценцией хлоропластов, что указывает на локализацию *ZmARF2* как в мембране, так и в ядре (рис. 7г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство растительных КТ/КUP/НАК-транспортеров играют значительную роль в высокоаффинном транспорте K^+ [18, 32–37], например, ген *AtHAK5* может быстро и значительно индуцироваться при низкой концентрации калия [17, 18, 38–40]. Нами ранее обнаружен и клониро-

ван высокоаффинный переносчик калия *ZmHAK1* кукурузы. Мы обнаружили, что последовательность гена *ZmHAK1* имеет высокое сходство с последовательностью гена *OsHAK1* риса. Его филогенетический анализ показал, что эти два гена принадлежат к одному кластеру, что указывает на то, что они могут иметь сходную функцию [41]. Мы также показали, что *ZmHAK1* хорошо экспрессируется в корнях и стеблях кукурузы, что может повысить адаптацию растений к низкому содержанию калия и действию высоких концентраций солей. Однако проведено мало исследова-

ний функции промотора *ZmHAK1* и его регуляции. В настоящей работе мы обнаружили, что полноразмерный промотор *ZmHAK1* обеспечивает высокую активность GUS в корнях, стеблях и листьях табака в экспериментах с временной экспрессией репортерных конструкций. Промотор *ZmHAK1* взаимодействует с факторами транскрипции *ZmRAP2.11* и *ZmARF2*. С помощью делеционного анализа показано, что транскрипционный фактор *ZmRAP2.11* взаимодействует с фрагментами $\Delta P3$ и $\Delta P6$ промотора *ZmHAK*, а фактор *ZmARF2* – с фрагментами $\Delta P1$ и $\Delta P6$ промотора *ZmHAK1*. В экспериментах по субклеточной локализации установлено, что *ZmRAP2.11* находится в основном в ядре, тогда как *ZmARF2* обнаруживается как в цитоплазме, так и в ядре. Широко распространено мнение, что тандемная экспансия и удвоение сегментов хромосом являются важным механизмом эволюции семейств генов [40]. В настоящей работе мы обнаружили 34 гена кукурузы, очень похожих на *ZmHAK1* и неравномерно распределенных по 10 хромосомам. Мы также изучили эволюционную связь между семейством генов *HAK* кукурузы (34 гена) и других видов, включая *Arabidopsis thaliana* (13 генов) и рис (27 генов). Анализ филогенетического дерева показал, что гены *HAK* консервативны среди разных видов растений.

Растительные гормоны, такие как салициловая кислота и MeJA, участвуют в реакции растений на биотические и абиотические стрессы [42]. Промотор *ZmHAK1* содержит несколько *cis*-действующих элементов, потенциально способных участвовать в клеточном ответе на биотические и абиотические стрессы. Мы обнаружили, что полноразмерный промотор *ZmHAK1* активен в корнях, стеблях и листьях табака, и активность полноразмерного промотора выше, чем у четырех 5'-укороченных фрагментов. Ранее показали, что ген *HAK* кукурузы кодирует высокоаффинный переносчик калия, уровень транскрипции которого чувствителен к изменениям внутриклеточной и внеклеточной концентрации калия. В случае высокой концентрации K^+ ген *HAK1* экспрессируется на низком уровне. При снижении концентрации ионов калия наблюдается быстрая индукция гена *HAK1* [27, 43]. Поэтому регуляция гена *HAK1* на уровне транскрипции представляется важной. Тем не менее, транскрипционной регуляции семейства *HAK1* посвящено мало исследований. В 2012 году сообщено, что транскрипционный фактор *RAP2.11* может положительно регулировать уровень транскрипции гена *HAK5*, и ген *HAK5* может также реагировать на этилен и активные формы кислорода [25]. Протеинкиназа *SlPK23* может регулировать активность белка *HAK5* путем его фосфорилирования [44]. В последние годы также сообщалось, что фактор *ARF2* может негативно регулировать экспрессию *HAK5* и реагировать на

изменение концентрации калия посредством изменения статуса аутофосфорилирования [26]. Нами обнаружено, что промотор гена *ZmHAK1* взаимодействует с факторами транскрипции *ZmRAP2.11* и *ZmARF2*. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными, указывающими на то, что фрагмент $\Delta P3$ промотора содержит GCC-box, который специфически взаимодействует с *RAP2.11* [19], а $\Delta P1$ имеет три последовательности TGTC, которые специфически связывают *ARF2* [45]. $\Delta P6$ может содержать элементы, специфичные для обоих факторов транскрипции, что мы предполагаем проверить в дальнейшем.

Для дальнейшего изучения взаимодействия промотора *ZmHAK1* с факторами транскрипции *ZmRAP2.11* и *ZmARF2* мы проанализировали характеристики этих двух факторов. *ZmRAP2.11* относится к семейству AP2/ERF факторов транскрипции. Факторы транскрипции этого семейства связаны в основном с ростом и развитием растений, а также с абиотическим стрессом [46–51]. Сообщалось, что фактор ответа на ауксин – *ARF2*, обеспечивает связь между сигнальными путями, активируемыми абсцизовой кислотой и ауксином [52]. Ауксин участвует во многих процессах и играет важную роль в нормальном росте и развитии растений. Многие абиотические стрессы могут влиять на содержание или распределение ауксина в растениях [53]. Мы обнаружили, что *ZmARF2* локализуется как в мембране, так и в ядре и может играть важную роль в регуляции *ZmHAK1*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Key Projects of Natural Science Foundation (20140101009JC) и International Cooperation Projects (20190701074GH), Science and Technology Department of Jilin Province, P. R. China. Авторы выражают благодарность Longhai Cui и Xuyan Li за любезно предоставленный вектор PEarleyGate101.

Hui Sheng выполнил значительную часть экспериментов, анализировал данные и написал манускрипт. Huiyan Ju и Dengli Cong составили план исследований и редактировали манускрипт. Все авторы прочитали и одобрили манускрипт.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Véry A., Sentenac H. (2003) Molecular mechanisms and regulation of K^+ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 575–603.
2. Wang Y., Wu W.H. (2015) Genetic approaches for improvement of the crop potassium acquisition and utilization efficiency. *Curr. Opin. Plant Biol.* **25**, 46–52.

3. Pettigrew W.T. (2008) Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton. *Physiol. Plant.* **133**, 670–681.
4. Nieves-Cordones M., Aleman F., Martinez V., Rubio F. (2014) K⁺ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. *J. Plant. Physiol.* **171**, 688–695.
5. Maathuis F.J. (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **12**, 250–258.
6. Epstein E., Rains D.W., Elzam O.E. (1963) Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **49**, 684–692.
7. Maathuis F.J., Sanders D. (1994) Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 9272–9276.
8. Maser P., Thomine S., Schroeder J.I., Ward J.M., Hirschi K., Sze H., Talke I.N., Amtmann A., Maathuis F.J., Sanders D., Harper J.F., Tchieu J., Gribskov M., Persans M.W., Salt D.E., Kim S.A., Guerinot M.L. (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 1646–1667.
9. Ward J.M., Mäser P., Schroeder J.I. (2009) Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 59–82.
10. Kochian L.V., Xin-Zhi J., Lucas W.J. (1985) Potassium transport in corn roots: IV. Characterization of the linear component. *Plant Physiol.* **79**, 771–776.
11. Ahn S.J., Shin R., Schachtman D.P. (2004) Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K⁺ uptake. *Plant Physiol.* **134**, 1135–1145.
12. Gierth M., Maser P., Schroeder J.I. (2005) The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **137**, 1105–1114.
13. Chen G., Hu Q., Luo L., Yang T., Zhang S., Hu Y., Yu L., Xu G. (2015) Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant Cell Environ.* **38**, 2747–2765.
14. Wang F., Liu J., Li J., Zhang S., Pan H. (2014) Functional analyses of the maize *CKS2* gene promoter in response to abiotic stresses and hormones. *Acta Physiol. Plantarum.* **36**, 1867–1878.
15. Delatorre C.A., Cohen Y., Liu L., Delatorre C.A., Cohen Y., Liu L., Peleg Z., Blumwald E. (2012) The regulation of the *SARK* promoter activity by hormones and environmental signals. *Plant Sci.* **193**, 39–47.
16. Tao Y., Wang F., Jia D., Li J., Zhang Y., Jia C., Wang D., Pan H. (2015) Cloning and functional analysis of the promoter of a stress-inducible gene (*ZmRXO1*) in maize. *Plant Mol. Biol. Reporter.* **33**, 200–208.
17. Zhang G.H., Wang H., Wang X.D., Feng M., Li H.M., Li S.Y. (2012) Isolation of the promoter region of HAK gene from *Aeluropus litoralis* and functional analysis in rice. *Yi Chuan.* **34**, 742–748.
18. Chen W.J., Zhu T. (2004) Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. *Trends Plant Sci.* **9**, 591–596.
19. Golladack D., Lüking I., Yang O. (2011) Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Repts.* **30**, 1383–1391.
20. Amtmann A., Blatt M.R. (2009) Regulation of macro-nutrient transport. *New Phytol.* **181**, 35–52.
21. Ashley M.K., Grant M., Grabov A. (2006) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *J. Exp. Bot.* **57**, 425–436.
22. Wang Y., Wu W. (2017) Regulation of potassium transport and signaling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **39**, 123–128.
23. Wang Y., Wu W. (2013) Potassium transport and signaling in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 451–476.
24. Cherel I., Lefoulon C., Boeglin M., Sentenac H. (2014) Molecular mechanisms involved in plant adaptation to low K⁺ availability. *J. Exp. Bot.* **65**, 833–848.
25. Kim M.J., Ruzicka D., Shin R., Schachtman D.P. (2012) The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.11 modulates plant response to low-potassium conditions. *Mol. Plant.* **5**, 1042–1057.
26. Zhao S., Zhang M., Ma T., Wang Y. (2017) Phosphorylation of ARF2 relieves its repression of transcription of the K⁺ transporter gene *HAK5* in response to low potassium stress. *Plant Cell.* **28**, 3005–3019.
27. Zhang Z., Zhang J., Chen Y., Li R., Wang H., Wei J. (2012) Genome-wide analysis and identification of *HAK* potassium transporter gene family in maize (*Zea mays* L.). *Mol. Biol. Rep.* **39**, 8465–8473.
28. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evolution.* **33**, 1870–1874.
29. Shahmuradov I.A. (2003) PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucl. Acids Res.* **31**, 114–117.
30. Kruger N.J. (1994) The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* **32**, 9–15.
31. Shen Y., Shen L., Shen Z., Jing W., Ge H., Zhao J., Zhang W. (2015) The potassium transporter OsHAK21 functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice. *Plant Cell Environ.* **38**, 2766–2779.
32. Banuelos M.A., Garcíadeblas B., Cubero B., Rodríguez-Navarro A. (2002) Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol.* **130**, 784–795.
33. Martínez-Cordero M.A., Martínez V., Rubio F. (2004) Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Mol. Biol.* **56**, 413–421.
34. Nieves-Cordones M., Miller A.J., Aleman F., Martínez V., Rubio F. (2008) A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Mol. Biol.* **68**, 521–532.
35. Santa-Maria G.E., Rubio F., Dubcovsky J., Rodríguez-Navarro A. (1997) The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell.* **9**, 2281–2289.
36. Su Q., Feng S., An L., Zhang G. (2007) Cloning and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a K⁺ transporter, AlHAK, from the graminaceous halophyte, *Aeluropus litoralis*. *Biotechnol. Lett.* **29**, 1959–1963.
37. Yang T., Zhang S., Hu Y., Wu F., Hu Q., Chen G., Cai J., Wu T., Moran N., Yu L., Xu G. (2014) The role of a potassium transporter OsHAK5 in potassium acquisition and transport from roots to shoots in rice at low potassium supply levels. *Plant Physiol.* **166**, 945–959.

38. Armengaud P., Breitling R., Amtmann A. (2004) The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiol.* **136**, 2556–2576.
39. Shin R., Schachtman D.P. (2004) Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 8827–8832.
40. Leister D. (2004) Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance gene. *Trends Genet.* **20**, 116–122.
41. Zhang Zh.B., Zhang J.W., Chen Y.J., Li R.F., Wang H.Zh., Wei J.H. (2012) Genome-wide analysis and identification of HAK potassium transporter gene family in maize (*Zea mays* L.). *Mol. Biol. Rep.* **39**, 8465–8473.
42. Ohshima M., Itoh H., Matsuoka M., Murakami T., Ohashi Y. (1990) Analysis of stress-induced or salicylic acid-induced expression of the pathogenesis-related 1a protein gene in transgenic tobacco. *Plant Cell.* **2**, 95–106.
43. Qin Y.J., Wu W.H., Wang Y. (2019) *ZmHAK5* and *ZmHAK1* function in K⁺ uptake and distribution in maize under low K⁺ conditions. *J. Integr. Plant. Biol.* **61**(6), 691–705. <https://doi.org/10.1111/jipb.12756>
44. Ragel P., Rodenas R., Garcia-Martin E., Andres Z., Villalta I., Nieves-Cordon M., Rivero R.M., Martinez V., Pardo J.M., Quintero F.J., Rubio F. (2015) The CBL-interacting protein kinase CIPK23 regulates HAK5-mediated high-affinity K⁺ uptake in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **169**, 2863–2873.
45. Cherenkov P., Novikova D., Omelyanchuk N., Levitsky V., Grosse I., Weijers D., Mironova V. (2018) Diversity of cis-regulatory elements associated with auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **69**, 329–339.
46. Liu C., Zhang T. (2017) Expansion and stress responses of the AP2/EREBP superfamily in cotton. *BMC Genomics.* **18**, 118.
47. Li H., Wang Y., Wu M., Li L., Li C., Han Z., Yuan J., Chen C., Song W., Wang C. (2017) Genome-wide identification of AP2/ERF transcription factors in cauliflower and expression profiling of the ERF family under salt and drought stresses. *Front. Plant Sci.* **8**, 946.
48. Cui L., Feng K., Wang M., Wang M., Deng P., Song W., Nie X. (2016) Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of AP2/ERF transcription factors family in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics.* **17**, 636.
49. Li X., Gao B., Zhang D., Liang Y., Liu X., Zhao J., Zhang J., Wood A.J. (2018) Identification, classification, and functional analysis of AP2/ERF family genes in the desert moss *Bryum argenteum*. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, pii: E3637.
50. Li X., Tao S., Wei S., Ming M., Huang X., Zhang S., Wu J. (2018) The mining and evolutionary investigation of AP2/ERF genes in pear (*Pyrus*). *BMC Plant Biol.* **18**, 46.
51. Ahn H., Jung I., Shin S.J., Park J., Rhee S., Kim J.K., Jung W., Kwon H.B., Kim S. (2017) Transcriptional network analysis reveals drought resistance mechanisms of AP2/ERF transgenic rice. *Front. Plant Sci.* **8**, 1044.
52. Wang L., Hua D., He J., Duan Y., Chen Z., Hong X., Gong Z. (2011) Auxin Response Factor 2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene *HB33* mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **7**, e1002172.
53. Vanneste S., Friml J. (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell.* **136**, 1005–1016.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF *ZmHAK1* PROMOTER AND ITS REGULATORY TRANSCRIPTION FACTORS IN MAIZE

H. Sheng¹, D. L. Cong², and H. Y. Ju^{1,*}

¹College of Plant Science, Jilin University, Changchun, 130062 P.R. China

²College of Pharmacy, Jilin University, Changchun, 130021 P.R. China

*e-mail: juhy@jlu.edu.cn

Potassium (K⁺) deficiency in the soil may seriously affect the yield and quality of plants, which usually satisfy their potassium requirements by engaging their K⁺ transporters and/or channels. High-affinity potassium transporter (*ZmHAK*) family members play crucial role in the uptake and distribution of K⁺ in maize (*Zea mays* L.). Here, we describe the function of *ZmHAK1* promoter and its upstream regulatory transcription factors in maize. In this plant, *HAK* gene family includes 34 protein-encoding members, with their phylogenetic tree analysis showing both evolutionary conservativeness and diversity. *ZmHAK1* gene promoter contains many functional elements related to abiotic stress. Reporter construct pCambia1301:Pro*ZmHAK1*:GUS shows that the *ZmHAK1* gene is active in the roots, stems, and leaves. Using yeast one-hybrid experiment, we showed that the *ZmHAK1* promoter interacts with the transcription factors *ZmRAP2.11* and *ZmARF2*, and that these interactions occur on different fragments of the *ZmHAK1* promoter. Transcription factor *ZmRAP2.11* localizes in the nucleus, while *ZmARF2* is found both in the nucleus and in the cell cytoplasm. In conclusion, our results suggest that the *ZmHAK1* regulation has an important role in the process of absorbing potassium ions, and possibly in the response of maize to abiotic stress.

Keywords: *ZmHAK1*, promoter, transcription factors, maize