



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12137

Оценка образования РНК-интерферирующего комплекса с miR775A электрофоретическим методом в листьях кукурузы при нормоксии и гипоксии

Дмитрий Николаевич Федорин,

Анна Евгеньевна Хомутова, Александр Трофимович Епринцев 

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru 

Аннотация. Недостаток кислорода наиболее чувствительно отражается на окислительных процессах клетки, в частности митохондриальном дыхании, и требует координации клеточного метаболизма. Одним из инструментов молекулярной эпигенетической регуляции служат микроРНК – класс некодирующих малых молекул РНК (20-22 нт), регулирующие экспрессию целевых генов на посттранскрипционном уровне путем ингибирования трансляции или расщепления их мРНК. Как известно, микроРНК могут действовать по пути РНК-интерференции, или связываться с комплексом РНК-индуцированного транскрипционного сайленсинга (RITS). Исследование роли микроРНК в адаптивной реакции клеточного метаболизма на гипоксический стресс изменения при гипоксии, как механизма молекулярного контроля, вызывает особый интерес. Применение фенол-хлороформной экстракции со специфическим осадителем для рибонуклеиновых кислот LiCl позволило получить из листьев кукурузы суммарную клеточную РНК. Полученные препараты РНК были хорошего качества, о чем свидетельствует наличие 2х четко выраженных полос 28S и 18S рРНК и отсутствие следов деградации. Полученные препараты суммарной клеточной РНК использовали в качестве матрицы при оценке формирования РНК-интерферирующих комплексов, образованных в виде дуплексных элементов РНК:РНК по принципу комплементарности между микроРНК775А и мРНК-мишенью. Для оценки образования РНК-интерферирующего комплекса с miR775A применяли метод аналитического электрофореза в агарозном геле со специфичным флуоресцентным зондом, содержащим ROX. Данный метод позволил выявить соотношение количества образовавшихся РНК-интерферирующих комплексов клеточной мРНК с miR775A, разделенных на основе их молекулярных масс, в образцах при развитии гипоксических условий. Электрофорез в агарозном геле с последующей денситометрией показал наличие только одного интерферирующего комплекса с электрофоретической подвижностью 0.23-0.25 ед. Результаты показали, что miR775A взаимодействует с одной мРНК-мишенью в клетках листьев кукурузы в норме и при гипоксии. Количественная оценка интенсивности флуоресценции образованного комплекса мРНК-miR775A-зонд по эмиссии ROX свидетельствует об увеличении анализируемого показателя в образцах, выделенных из листьев кукурузы в условиях гипоксического стрессе.

Ключевые слова: *Zea mays*, микроРНК, электрофорез, денситометрия, РНК-интерференция

Для цитирования: Федорин Д.Н., Хомутова А.Е., Епринцев А.Т. Оценка образования РНК-интерферирующего комплекса с miR775A электрофоретическим методом в листьях кукурузы при нормоксии и гипоксии // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2024. Т. 24, № 2. С. 289-298.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12137>

Original article

Electrophoretic method and assessing the formation of an RNA-interfering complex with miR775A in corn leaves under the conditions of normoxia and hypoxia

Dmitry N. Fedorin, Anna E. Khomutova, Alexander T. Eprintsev 

Voronezh State University, Voronezh, Russia, bc366@bio.vsu.ru 

Abstract. Oxidative processes in cells, in particular mitochondrial respiration, are most sensitive to a lack of oxygen, therefore, it requires cell metabolism coordination. MicroRNAs are one of the tools of the molecular epigenetic regulation. These are a class of non-coding small RNA molecules (20-22 nt) that are able to regulate target genes expression at the post-transcriptional level by inhibiting the translation or cleavage of their mRNAs. It is known that microRNAs can act by RNA interference or can bind to an RNA-induced transcriptional silencing (RITS) complex. The study of the role of microRNAs in the adaptive response of cell metabolism to hypoxic stress as a mechanism of molecular control is of particular interest. Phenol-chloroform extraction with a specific precipitant for LiCl ribonucleic acids made it possible to obtain the total cellular RNA from corn leaves. The resulting RNA preparations were of good quality, which was indicated by the presence of 2 distinct bands of 28S and 18S rRNA and the absence of traces of degradation. The resulting preparations of total cellular RNA were used as a matrix to assess the formation of RNA interfering complexes which formed as RNA:RNA duplexes based on complementarity between microRNA775A and the target mRNA. The method of analytical agarose gel electrophoresis with a specific fluorescent probe with ROX was used to assess the formation of an RNA interfering complex with miR775A. This method made it possible to identify the ratio of the number of formed RNA-interfering complexes of cell mRNA with miR775A separated on the basis of their molecular masses in the samples under hypoxic conditions. Electrophoresis in agarose gel followed by densitometry revealed the presence of only one interfering complex with an electrophoretic mobility of 0.23-0.25 units. The results showed that miR775A interacted with a single target mRNA in corn leaf cells under normal conditions and under the conditions of hypoxia. Quantitative assessment of the fluorescence intensity of the formed complex of mRNA-miR775A-probe by ROX emission indicated an increase in the analysed indicator in samples isolated from corn leaves under hypoxic stress.

Keywords: *Zea mays*, microRNA, electrophoresis, densitometry, RNA interference

For citation: Fedorin D.N., Khomutova A.E., Eprintsev A.T. Electrophoretic method and assessing the formation of an RNA-interfering complex with miR775A in corn leaves under the conditions of normoxia and hypoxia. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 289-298. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12137>

Введение

МикроРНК (miR) играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов-мишеней на посттранскрипционном уровне. Ряд микроРНК участвуют в модуляции толерантности к различным абиотическим стрессам. Ранее было показано изменение экспрессии ряда микроРНК в ответ на заболачивание и гипоксию [1]. miR159, miR164, miR167, miR393, miR408 и miR528 в основном участвуют в развитии корней и реакциях на стресс, но также оказались ключевыми регуляторами в условиях кратковременной гипоксии у кукурузы [2].

Несмотря на наличие данных о реакции растений на снижение уровня кислорода и механизмах контроля координации экспрессии генов-мишеней [3], важным представляется исследование участия микроРНК в ответной реакции клеток на стрессовый фактор. У растений микроРНК часто регулируют группы транскрипционных факторов, действующих путем нацеливания на почти иде-

ально комплементарные мРНК для эндонуклеолитического расщепления и ингибирования трансляции [4, 5]. Регуляция посредством микроРНК, по-видимому, играет важную роль в адаптации транскриптома к стрессовым факторам.

Поскольку активация микроРНК снижает количество целевых мРНК, микроРНК, активация которых происходит при гипоксии, может подавлять негативные регуляторы гипоксической реакции или замедлять рост растений во время стресса. И наоборот, подавление микроРНК увеличивает количество их целевых мРНК, что может помочь в адаптации к стрессу [6]. miR775 представляет собой уникальную микроРНК, специфичную для *Arabidopsis thaliana*, которая посттранскрипционно регулирует экспрессию генов-мишеней при гипоксическом стрессе. Роль miR775A проявляется в адаптации клеточного метаболизма за счет координации путей передачи сигналов этилена и путями биосинтеза АБК [7].

Идентификация мишеней микроРНК является сложным, но очень важным эле-



ментом в объяснении функций микроРНК. Действие микроРНК на их мишени мРНК трудно проиллюстрировать, поскольку множественные микроРНК нацелены на один и тот же ген и наоборот [8-10]. Высокая комплементарность спаривания с мишенями является основным требованием для функционирования микроРНК растений. Многочисленные лабораторные и биоинформатические исследования направлены на выявление эффективных методологий распознавания мишеней микроРНК. Однако сообщалось о нескольких факторах, влияющих на взаимодействие микроРНК:мРНК, которые можно классифицировать следующим образом [11]. Комплементарность между микроРНК и ее мишенью является ключевой особенностью стабильности дуплекса микроРНК:мРНК [12]. Одним из простых и эффективных методов идентификации мРНК, связанных с микроРНК, является электрофоретическое разделение суммарной клеточной мРНК, с последующей идентификацией дуплекса микроРНК:мРНК. Анализ изменения электрофоретической подвижности разных по размеру матричных РНК (мРНК) представляет собой чувствительный метод анализа взаимодействия РНК-РНК. Данный метод изучения взаимодействия микроРНК и ее целевой мРНК, основан на образовании комплекса [13], идентифицируемого по эмиссии флуорофора, входящего в состав специфического нуклеотидного зонда, в качестве которого выступает комплементарный к анализируемой микроРНК [14].

В связи с этим, целью данного исследования являлось применение электрофоретического метода в идентификации дуплекса микроРНК775А:мРНК-мишеней в листьях кукурузы при гипоксии.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования в работе использовали листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом

при 12 часовом световом дне. Создание низких концентраций кислорода в среде осуществлялось путем помещения растений с предварительно удаленной корневой системой на 24 часа в вакуум-эксикатор, в который подавался азот. В качестве контрольной группы использовались растения с предварительно удаленной корневой системой, помещенные в вакуум-эксикатор в условиях нормальной аэрации. Для исключения влияния фотосинтетической системы обе группы растений предварительно экспонировались в темноте в течение 24 часов до проведения эксперимента. На протяжении всего времени эксперимента растения также находились в условиях отсутствия источников света [15].

Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. В качестве осадителя использовали LiCl [16]. Качественный анализ РНК проводили путем электрофоретического исследования в геле 1% агарозы. Красителем выступал бромистый этидий. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим методом на приборе NanoPhotometer C40 (Implen, Германия).

Анализ РНК-интерференции и РНК-зависимого метилирования ДНК проводили с применением флуоресцентного зонда ROX-miR775A, представляющего собой нуклеотидную последовательность, комплементарную зрелой микроРНК775A с флуорофором ROX на 3'-конце. Для анализа брали 100 нг суммарной клеточной РНК. Результаты оценивали электрофоретическим методом в 1% агарозном геле. Интеркалирующим красителем электрофореграмм нуклеиновых кислот выступал SybrGreen I. Фотовозбуждение SYBR Green I проводили облучением при 312 нм и оценивали эмиссию ROX.

Денситометрический анализ гелей осуществляли с применением программного обеспечения GelAnalyzer 19.1

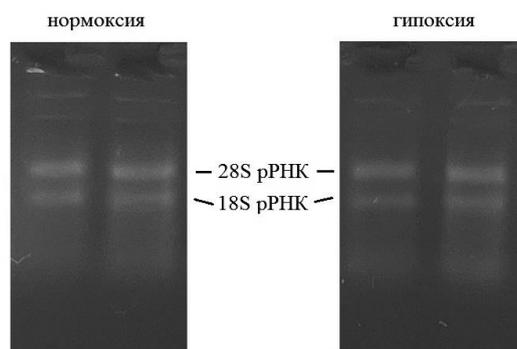


Рис. 1. Типичная электрофореграмма суммарной клеточной РНК из листьев кукурузы, выделенной фенол-хлороформной экстракцией с LiCl в качестве специфического осадителя рибонуклеиновых кислот. Нормоксия – растения, выдержанные в обычных условиях. Гипоксия – растения, подвергшиеся воздействию низких концентраций кислорода, созданная средой азота.

Fig. 1. A typical electrophoretogram of total cellular RNA from corn leaves isolated by phenol-chloroform extraction with LiCl as a specific precipitant of ribonucleic acids. Normoxia means plants were kept under normal conditions. Hypoxia means plants were exposed to low oxygen concentrations due to the nitrogen environment.

(www.gelalyzer.com). Каждый опыт проводился в 3-4 кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. На рисунках приводятся данные опытов, каждое значение есть среднее из трех измерений. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев [17]. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0.05$. Изображения электрофореграммы представляют собой данные типичного эксперимента, повторенного три-четыре раза.

Обсуждение результатов

Из листьев кукурузы, выращенных в нормоксии и при гипоксических условиях, была проведена экстракция суммарной РНК. Из приведенных данных на рисунке 1 видно, что в гелевых пластинках наблюдается очевидное преобладание количества 28S рРНК над 18S, во всех образцах в разное время эксперимента, что является одним из важных критериев качества препарата РНК. Высокое качество полученных препаратов позволило использовать их в качестве матрицы при оценке формирования РНК-

интерферирующих комплексов, основанных на образовании дуплексных элементов по принципу комплементарности между микроРНК775А и мРНК-мишенью [13].

Известно, что микроРНК могут осуществлять посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов путем РНК-интерференции. Поступая из ядра в цитоплазму, miR связывается комплексом РНК-индуцированного сайленсинга (RISC). Репрессия целевого транскрипта с помощью микроРНК может происходить посредством ингибирования трансляции, ускорения экзонуклеолитического распада мРНК или разрезания в пределах образования дуплексов микроРНК-мРНК [18]. Это способствует временной регуляции гена-мишени, а также подавление синтеза соответствующего белка. Кроме того, микроРНК может связаться с ДНК при формировании комплекса RITS, что приводит к переформированию гетерохроматина, в том числе, посредством метилирования [19].

Для оценки образования РНК-интерферирующего комплекса с miR775А применяли метод аналитического электрофореза со специфичным флуоресцентным зондом. Данный метод позволил выявить

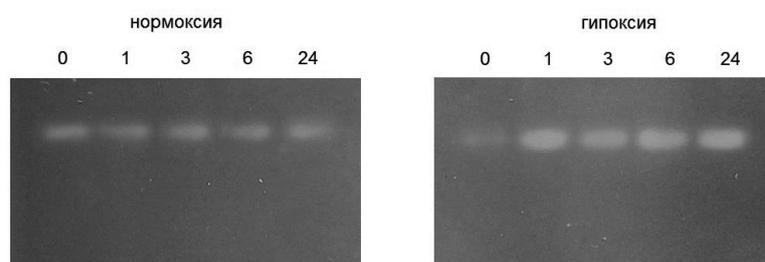


Рис. 2. Электрофореграмма образцов РНК-интерферирующего комплекса с miR775A в листьях кукурузы при нормоксии и гипоксии. 0, 1, 3, 6, 24 – растения, выдержанные в соответствующих экспериментальных условиях в течение 1, 3, 6 и 24 часов

Fig. 2. Electrophoretogram of samples of the RNA interfering complex with miR775A in corn leaves under normoxia and hypoxia conditions. 0, 1, 3, 6, 24 stands for plants kept under corresponding experimental conditions for 1, 3, 6, and 24 hours

соотношение количества образовавшихся РНК-интерферирующих комплексов мРНК клетки с miR775A в образцах при различных по времени гипоксических условиях.

Электрофорез в агарозном геле позволил установить наличие РНК-интерферирующего комплекса, формирующегося при участии микроРНК miR775A. При этом, результаты свидетельствуют об образовании одного интерферирующего комплекса с анализируемой микроРНК (рис. 2).

Результаты электрофореза указывают на то, что miR775A действует по пути РНК-интерференции, связываясь с комплексом RISC, и посттранскрипционно взаимодействует с комплементарной ей мРНК. Об этом свидетельствуют образовавшиеся флуоресцентные структуры – триплексы, представляющие собой комплекс мРНК- miR775A-зонд (рис. 2).

Электрофоретическое разделение суммарной РНК, выделенной из листьев кукурузы в норме и при гипоксии, позволяет провести выделение отдельных мРНК генов на основании их размеров. Инкубация гелевой пластинки с флуоресцентным зондом к miR775A привела к формированию единственного специфического триплекса с мРНК-мишенью во всех анализируемых образцах. Результаты электрофоретического исследования с зондом к miR775A указывают на

наличие в анализируемых образцах суммарной РНК из листьев кукурузы в норме и при гипоксии одной мишени для сайленинга при участии комплекса RISC.

Денситометрия электрофоретических пластинок позволила выявить изменение в величине интенсивности флуоресценции комплекса мРНК- miR775A-зонд. В образцах из листьев кукурузы в нормоксии величина пиков образованного комплекса в разное время эксперимента характеризуется постоянной величиной. Кроме того, результаты денситограммы указывают на однородность пика флуоресценции с электрофоретической подвижностью 0.23-0.25 ед., что подтверждает формирование только одного интерферирующего клеточной мРНК комплекса с микроРНК775A (рис. 3).

Результаты денситометрии образцов суммарной РНК из листьев кукурузы, подвергшихся воздействию гипоксических условий, показывают однородность формирования комплекса мРНК- miR775A-зонд. Установлено, что электрофоретическая подвижность интерферирующего комплекса микроРНК775A с клеточной мРНК комплекса составляет величину 0.23-0.25 ед., что подтверждает наличие только одной мРНК-мишени (рис. 4), соотносящейся с таковой в образцах мРНК из листьев кукурузы в нормоксии. На денситограмме видно, что интерферирующий комплекс совпадает по анализируемым показателям такового у

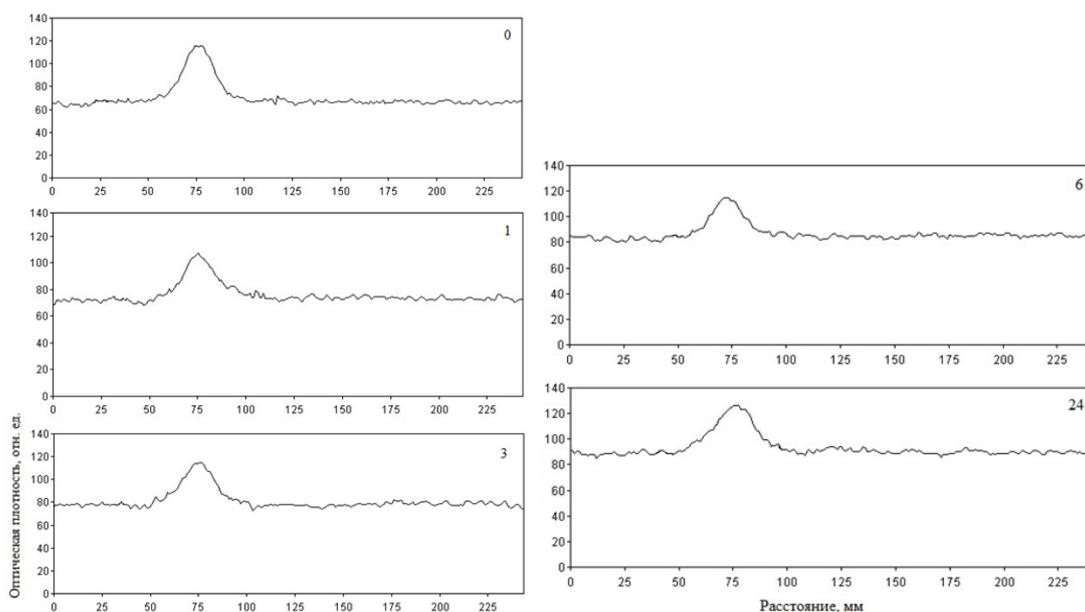


Рис. 3. Денситограмма образцов РНК-интерферирующего комплекса с miR775A в листьях кукурузы в норме. 0, 1, 3, 6, 24 – растения, выдержанные в стандартных условиях в течение 1, 3, 6 и 24 часов.

Fig. 3. Densitogram of samples of the RNA interfering complex with miR775A in corn leaves under normal conditions. 0, 1, 3, 6, 24 stands for plants kept under standard conditions for 1, 3, 6, and 24 hours.

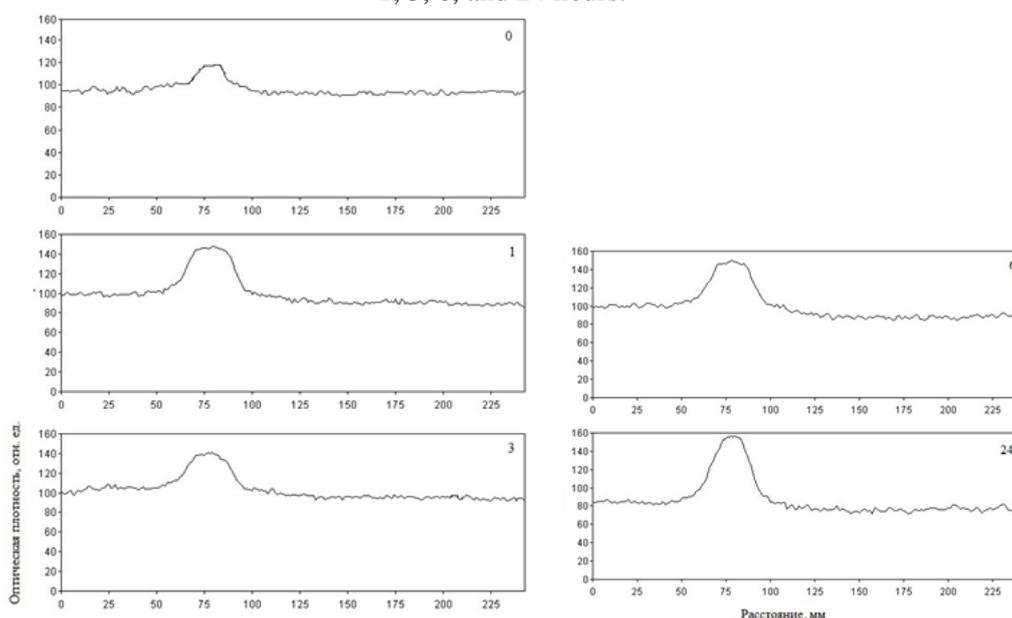


Рис. 4. Денситограмма образцов РНК-интерферирующего комплекса с miR775A в листьях кукурузы при гипоксии. 0, 1, 3, 6, 24 – растения, выдержанные в условиях гипоксии в течение 1, 3, 6 и 24 часов.

Fig. 4. Densitogram of samples of the RNA interfering complex with miR775A in corn leaves under the conditions of hypoxia. 0, 1, 3, 6, 24 stands for plants kept under hypoxia conditions for 1, 3, 6, and 24 hours.

контрольных растений, что свидетельствует об отсутствии изменений в количестве мишеней для РНК-интерференции

при участии miR775A. Количество интерферирующих комплексов с мик-

Таблица 1. Количественные характеристики флуоресценции комплекса мРНК- miR775A-ROX в образцах суммарной РНК из листьев кукурузы в норме и при гипоксии
 Table 1. Quantitative characteristics of fluorescence of mRNA- miR775A-ROX complex in samples of the total RNA from corn leaves under normal conditions and under conditions of hypoxia

		Время эксперимента, ч				
		0	1	3	6	24
Интенсивность флуоресценции, отн. ед.	норма	117	112	118	118	125
	гипоксия	118	150	147	153	158

роРНК775А в листьях кукурузы при гипоксическом стрессе не изменяется на протяжении 24 часов эксперимента.

Мишенью чувствительных к гипоксии микроРНК, в частности miR775A, являются факторы транскрипции, принадлежащие к семействам MYB [20]. Белки MYB составляют большое семейство растительных транскрипционных факторов, члены которых выполняют множество функций в биологических процессах растений [21]. Транскрипционный фактор AtMYB2, индуцируемый гипоксией, действует как ключевой регуляторный фактор при индукции промотора фермента алкогольдегидрогеназы (ADH1) при низком уровне кислорода [22]. Это свидетельствует об участии miR775A в регуляции окислительного метаболизма, подвергающегося ингибированию при недостатке кислорода.

Количественная оценка результатов денситометрического анализа электрофореграмм указывает, что при нормоксии в образцах «Контроль 0ч» величина оптической плотности достигла 117 отн.ед, а в образце «Контроль 1ч» – 112 отн.ед. В образце «Контроль 3ч» и «Контроль 6ч» оптическая плотность достигла 118 отн.ед. В образце «Контроль 24ч» наблюдался скачок до 125 отн.ед. (табл. 1). Следовательно, в норме в клетках листьев кукурузы находится стабильный уровень мРНК-мишени для miR775A, на что указывает практически постоянный уровень

флуоресценции ROX при формировании интерферирующего комплекса.

При гипоксии в образцах «Опыт 0ч» величина оптической плотности достигала 118 отн.ед. В образцах «Опыт 1ч» и «Опыт 3ч» зафиксирована оптическая плотность величиной 150 отн.ед. и 147 отн.ед., соответственно. В образцах «Опыт 6 ч» и «Опыт 24 ч» величина оптической плотности увеличивалась и достигла значений 153 и 158 отн.ед, соответственно (табл. 1).

Увеличение флуоресценции ROX сформированных комплексов мРНК-miR775A-зонд указывает на интенсификацию деградации мРНК-мишени за счет увеличения miR775A и образования большего количества интерферирующих комплексов. Интенсификация РНК-интерференции с участием miR775A в листьях кукурузы при развитии гипоксии указывает на участие последней в негативной регуляции, обеспечивающей формирование ответной реакции клеточного метаболизма на стрессовое воздействие.

Заключение

На первом этапе нами успешно проведена экстракция тотальной РНК из зеленых листьев кукурузы с последующей обратной транскрипцией мРНК. Для экстракции РНК применяли фенол-хлороформную экстракцию со специфическим осадителем РНК – хлоридом лития. Основной принцип предполагает взаимодействие между сахаром рибозы РНК и положительными катионами (литием),

что позволяет образовывать комплексы только с РНК, осаждаемые в присутствии этанола, не допуская присутствия ДНК и белка [23]. Применение этого вещества позволило выделить общую РНК практически без следов деградации.

Оценка образования РНК-интерферирующего комплекса с помощью специфического ROX-содержащего зонда показала, что микроРНК miR775A действует по пути РНК-интерференции, связываясь с комплексом RISC, и посттранскрипционно взаимодействует с комплементарной ей мРНК.

Количественная оценка интенсивности флуоресценции образованного комплекса мРНК-miR775A-зонд по эмиссии ROX свидетельствует об увеличении анализируемого показателя в образцах, выделенных из листьев кукурузы в условиях гипоксического стресса. Наибольшая интенсивность флуоресценции наблюдалась на 24 час стрессового воздействия, в то время как в нормоксии величина данного показателя практически не изменялась на протяжении всего эксперимента.

Электрофоретическое разделение мРНК суммарной вытяжки клеточной РНК в 1% агарозном геле, основанное на различии их молекулярных масс, позволило провести количественную оценку

Список литературы/References

1. Hou, Y., Jiang, F., Zheng, X., Wu Z. Identification and analysis of oxygen responsive microRNAs in the root of wild tomato (*S. habrochaites*). *BMC Plant Biol.* 2019; 19: 100. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1698-x>
2. Liu Z., Kumari S., Zhang L., Zheng Y., Ware D. Characterization of miRNAs in response to short-term waterlogging in three inbred lines of *Zea mays*. *PLoS One.* 2012; 7: e39786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039786>
3. Bailey-Serres J., Chang R. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. *Annals*

формирования интерферирующих комплексов с miR775A. Результаты исследования свидетельствуют, что в нормоксии и при гипоксическом воздействии на растения кукурузы в клетках листьев формируется только один комплекс, основанный на комплементарном взаимодействии мРНК-мишени и флуоресцентного специфического зонда miR775A-ROX. Формирование единственного дуплекса мРНК-miR775A указывает на регуляцию формирования белкового компонента, кодируемого данной мРНК. Белки MYB, выполняющих регуляторную функцию в биологических процессах растений, являются мишенью для микроРНК775A [21]. Следовательно, при гипоксии в клетках листьев кукурузы микроРНК775A контролирует количество транскрипционного фактора семейства MYB, регулирующего клеточный ответ в стрессовых условиях.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

of Botany. 2005; 96: 507-518. <https://doi.org/10.1093/aob/mci206>

4. Vazquez F. Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends in Plant Science.* 2006; 11: 460-468. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.07.006>

5. Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L., Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science.* 2008; 320: 1185-1190. <https://doi.org/10.1126/science.1159151>

6. Betti F., Ladera-Carmona M. J., Perata P., Loreti E. RNAi Mediated Hypoxia Stress Tolerance in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*



- 2020; 21: 9394. <https://doi.org/10.3390/ijms21249394>
7. Mishra V., Singh A., Gandhi N., Das S.S., Yadav S., Kumar A., Sarkar A.K. A unique miR775-GALT9 module regulates leaf senescence in Arabidopsis during post-submergence recovery by modulating ethylene and the abscisic acid pathway. *Development*. 2022; 149: dev199974. <https://doi.org/10.1242/dev.199974>
8. Riffo-Campos A.L., Riquelme I., Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose? *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 1987. <https://doi.org/10.3390/ijms17121987>
9. Kulkarni S.R., Vanechoutte D., de Velde J.V., Vandepoele K. TF2Network: predicting transcription factor regulators and gene regulatory networks in Arabidopsis using publicly available binding site information. *Nucl. Acids Res.* 2018; 46: e31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1279>
10. Wani SH, Tripathi P, Zaid A, Challa G.S., Kumar A., Kumar V., Upadhyay J., Joshi R., Bhatt M. Transcriptional regulation of osmotic stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.* 2018; 97: 469-487. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0761-6>
11. Tyagi S., Sharma S., Ganie S.A., Tahir M., Mir R.R., Pandey R. Plant microRNAs: biogenesis, gene silencing, web-based analysis tools and their use as molecular markers. *3 Biotech.* 2019; 9: 413. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1942-y>
12. Ding J., Zhou S., Guan J. Finding microRNA targets in plants: current status and perspectives. *Genom Proteom Bioinform.* 2012; 10: 264-275. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2012.09.003>
13. Morita T., Maki K., Aiba H. Detection of sRNA-mRNA Interactions by Electrophoretic Mobility Shift Assay. *Methods Mol. Biol.* 2012; 905: 235-244. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-949-5_15
14. Paugh S.W., Coss D.R., Bao J., Lauder milk L.T., Grace C.R., Ferreira A.M., Brett Waddell M., Ridout G., Naeve D., Leuze M., LoCascio P.F., Panetta J.C., Wilkinson M.R., Pui C-H., Naeve C.W., Uberbacher E.C., Bonten E.J., Evans W.E. MicroRNAs Form Triplexes with Double Stranded DNA at Sequence-Specific Binding Sites; a Eukaryotic Mechanism via which microRNAs Could Directly Alter Gene Expression. *PLoS Comput. Biol.* 2016; 12: e1004744. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004744>
15. Eprintsev A.T., Anokhina G.B., Gataullina M.O., Fedorin D.N. Rol' epigeneticheskikh mekhanizmov v regulyatsii aktivnosti 2-OGDG i MDG v list'yakh kuku ruzy (*Zea mays* L.) pri gipoksii. *Fiziologiya rasteniy.* 2021; 68: 187-193. <https://doi.org/10.31857/S0015330321010061>
16. Chomczynski P., Sacchi N. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
17. Lakin G.F. Biometrics. M.: Higher school, 1990. 351p. (In Russ.)
18. Voinnet O. Origin biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell.* 2009; 136: 669-687. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>
19. Bhattacharjee S., Roche B., Martienssen R.A. RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS) complex structure and function. *RNA Biology.* 2019; 16: 1133-1146. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1621624>
20. Moldovan D., Spriggs A., Yang J., Pogson B.J., Dennis E.S., Wilson I.W. Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 2010; 61: 165-177. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp296>
21. Ambawat S., Sharma P., Yadav N.R., Yadav R.C. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2013; 19: 307-321. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0179-1>
22. Hoeren F.U., Dolferus R., Wu Y., Peacock W.J., Dennis E.S. Evidence for a



role for AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics*. 1998; 149: 479-490. <https://doi.org/10.1093/genetics/149.2.479>

23. Gautam A. Lithium Chloride-Based Isolation of RNA. In: DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert. *Springer, Cham*. 2022: 69-72. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4_8

Информация об авторах / Information about the authors

Д.Н. Федорин – доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, доцент, кандидат биологических наук. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Е. Хомутова – бакалавр кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Т. Епринцев – заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, профессор, доктор биологических наук. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

D.N. Fedorin – Associate Professor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Associate Professor, Candidate of Biological Sciences. Voronezh State University, Voronezh, Russia

A.E. Khomutova – Bachelor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia

A.T. Eprintsev – Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Professor, Doctor of Biological Sciences. Voronezh State University, Voronezh, Russia

Статья поступила в редакцию 29.01.2024; одобрена после рецензирования 03.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 29.01.2024; approved after reviewing 03.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.