

УДК 577.2

DOI: 10.31040/2222-8349-2024-0-2-48-56

Обзор

РОЛЬ МИКРОРНК В РАЗВИТИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ХОЛОДУ

© Ф.Р. Гималов

Растения, в силу своей прикрепленности к месту обитания, вынуждены приспосабливаться к изменениям в окружающей среде, в том числе к перепадам температуры, лимитирующим рост, развитие и продуктивность. Абиотические стрессы стали серьезной проблемой из-за их широко распространенного характера и разрушительного воздействия на растения. Однако растения разработали сложные пути восприятия изменений окружающей среды и реагирования на них. Механизмы реализации устойчивости растений к гипотермии исследуются давно, и транскрипционный контроль экспрессии генов, чувствительных к холоду, довольно подробно изучен. Чтобы включить защитные механизмы, растения запускают сеть генетических регуляторов, включая изменение экспрессии значительной части генов с помощью транскрипционных и/или трансляционных регуляторов. К важным участникам ответной реакции растений на холодостресс можно отнести микроРНК. Ключом к пониманию вовлеченности микроРНК в стрессовые реакции растений послужили исследования, показавшие регуляцию их экспрессии при стрессовых воздействиях. МикроРНК – это малые некодирующие РНК, проявляющие себя как важные регуляторные компоненты в растениях. Экспрессия микроРНК включает транскрипцию генов микроРНК посредством РНК-полимеразы II, многоступенчатый процессинг первичных транскриптов с помощью фермента DICER-LIKE1 (DCL1) и формирование эффекторного комплекса, состоящего из микроРНК и белков семейства ARGONAUTE (AGO). Такие комплексы взаимодействуют с комплементарными РНК-мишенями, подавляя их экспрессию. Таким образом, микроРНК регулируют разнообразные биологические процессы, в том числе и ответы на изменения в окружающей среде. В настоящее время микроРНК рассматриваются как важный инструмент регулирования работы генов. Такие значимые процессы в растениях, как поддержание гомеостаза, рост и развитие, переход от вегетативной фазы к репродуктивной, передача сигналов и реакция на различные стрессы, регулируются микроРНК. В статье рассматривается роль микроРНК в ответе растений на холодостресс, проводится анализ мишеней микроРНК, обсуждаются перспективы использования микроРНК в практике улучшения устойчивости растений к внешним воздействиям.

Ключевые слова: микроРНК, холодостресс, передача сигналов, устойчивость к холодострессу.

Введение. МикроРНК – это класс некодирующих РНК длиной около 19–21 н.п. Они образуются в результате транскрипции генов микроРНК. При этом формируется первичная микроРНК (primary microRNA, pri-miRNA), содержащая шпильчатую структуру, которая затем процессируется ферментом DCL1 в дуплекс miRNA/miRNA*. Одна цепь микроРНК связывается с белком ARGONAUTE (AGO) с формированием РНК-индуцированного сайленсинг комплекса (RISC), который в дальнейшем участвует в регуляции экспрессии соответствующих РНК-мишеней [1–3].

Растения, подвергшиеся стрессу, используют множество механизмов регуляции генов для восстановления клеточного гомеостаза, включая посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов [4, 5].

Выявлена многоступенчатость передачи низкотемпературного сигнала из внешней среды, включающая снижение текучести клеточных мембран, что запускает специфические сигнальные каскады, в том числе активацию кальциевых каналов и увеличение потока ионов кальция в цитоплазму, сопровождаемое активацией кальций-зависимых протеинкиназ, участвующих, по-видимому, в регуляции активности факторов транскрипции, задействованных в экспрессии генов, чувствительных к холоду (COR-генов) и участвующих в адаптации к действию низкой температуры [6, 7]. В дополнение к контролю транскрипции, опосредованному транскрипционными факторами, экспрессию генов при холодострессе контролируют и эпигенетические модификации, главным образом, путем ремоделирования хроматина,

изменяющего доступность хроматина для механизмов транскрипции [8, 9].

Все больше свидетельств о том, что важную роль в реакции растений на биотические и абиотические стрессы играют микроРНК [10–12]. Впервые в нематодах *Caenorhabditis elegans* были выделены гены *lin-4*, кодирующие малые РНК, которые содержали последовательности, комплементарные повторяющемуся элементу последовательности в 3'-нетранслируемой области (UTR) мРНК *lin-14*, позволившие предположить, что *lin-4* регулирует трансляцию *lin-14* посредством антисмыслового взаимодействия РНК-РНК [13]. Вскоре было показано, что посттранскрипционный ген сайленсинг у растений коррелирует с активностью малых РНК [14].

Открытие большого количества микроРНК у животных побудило ученых искать микроРНК в растениях. В 2002 г. несколько исследовательских групп независимо идентифицировали более 100 микроРНК у арабидопсиса с использованием технологии прямого клонирования [15, 16]. Кроме клонирования, для идентификации микроРНК используются также такие методы, как секвенирование, генетический скрининг и некоторые биоинформатические подходы. На основе подобных исследований формируются различные базы данных, которые содержат доступные для поиска данные о микроРНК. Одной из наиболее значительных баз данных микроРНК является miRBase (<http://www.mirbase.org>) с возможностью поиска по определенным данным [17]. Большую информацию о растительных микроРНК, об их мишенях, профилях экспрессии, вторичной структуре дает биоинформационная база данных PMRD <http://mirnablog.com/plant-micronadatabase-goes-online/> [18].

Обнаружение микроРНК в растениях указывает на то, что этот класс некодирующих РНК возник на ранних этапах эволюции эукариот. Некоторые из этих микроРНК высококонсервативны в растениях, и могут быть обнаружены в рисе, кукурузе, табаке и других растениях [19–21].

Дальнейшие исследования выявили, что микроРНК регулируют экспрессию генов посредством направленного расщепления мРНК, трансляционной репрессии, ремоделирования хроматина и/или метилирования ДНК. Профили экспрессии большинства микроРНК, участвующих в росте и развитии растений, значительно изменяются во время стресса. При этом микроРНК проявляют довольно высокую эволюци-

онную консервативность у разных видов растений, соответственно, и семейства микроРНК, и их комплементарные сайты в целевых мРНК достаточно консервативны. Благодаря такой значительной комплементарности своим мишеням, растительные микроРНК управляют расщеплением этих мишеней [22]. Поэтому идентификация микроРНК-мишеней является первым важным шагом в исследовании функций микроРНК. Следовательно, степень посттранскрипционной регуляции генов, осуществляемой с помощью микроРНК, в любом организме может быть полностью понята только путем идентификации не только компонента микроРНК, но и набора их РНК-мишеней.

Большинство продуктов мРНК-мишеней микроРНК являются факторами транскрипции и могут участвовать в процессах развития, от прорастания семян до их созревания [22]. Поэтому считается, что микроРНК регулируют в первую очередь процессы развития. Однако выделение микроРНК, которые или активируются, или подавляются абиотическими стрессами [23], указало на прямую связь между микроРНК и реакциями растений на стресс.

Показано участие микроРНК в ответных реакциях растений на биотические и абиотические стрессы [24, 25], в регуляции экспрессии генов устойчивости хозяина или генов патогена [26]. Подобно другим сигнальным молекулам, микроРНК растений могут перемещаться из одной ткани в другую через сосудистую систему. Эти мобильные микроРНК могут играть важную роль в поддержании гомеостаза растений и в реакции на биотические и абиотические стрессы окружающей среды.

Изменение профиля микроРНК растений при холодовом стрессе. Биологическую роль микроРНК определяют, исследуя или гены микроРНК с пониженной активностью микроРНК, или гены-мишени, продуцирующие мРНК, резистентные к соответствующим микроРНК. Другим подходом является изучение экспрессии клонированных генов микроРНК в трансгенных растениях [27].

Колебания температуры в течение дня и при смене времен года является обычным явлением, и растениям приходится перепрограммировать профили экспрессии своих генов, чтобы приспособиться к таким перепадам температуры. Длительное воздействие холода влияет на рост и развитие растений, ограничивает их про-

странственное распределение и может вызвать повреждения в клетках.

Растения из регионов с умеренным климатом устойчивы к охлаждению, но не к заморозкам; однако они могут повысить свою устойчивость к холоду, подвергаясь воздействию низких температур, посредством процесса, известного как холодовая акклимация [28]. В то же время тропические и субтропические растения, такие как рис, томаты, чувствительны к холоду, и страдают от переохлаждения на всех стадиях роста и развития. К настоящему времени показано, что значительное участие в стрессовом ответе растений на холод, в частности, путем пост-транскрипционной регуляции соответствующих генов, принимают микроРНК [25]. Так, у растений *A. thaliana*, выращиваемых в условиях холодной акклимации (4°C) в течение 3 часов, 6 часов и 2 суток, обнаружили 93 дифференциально экспрессируемых микроРНК, и 14 из них чувствительны к холоду [29].

Из однодольных растений наиболее широко исследуется рис, который является почти для трети населения земного шара одним из основных продуктов питания [30]. Поэтому неудивительно, что рис, у которого известна полная последовательность генома, стал важной модельной системой в геномике зерновых и биотехнологии. Одним из наиболее серьезных абиотических стрессов, отрицательно влияющих на урожайность риса, является холодовый стресс, вызывающий сокращение сроков вегетации, повреждения тканей и задержку роста. В реакции на холодовый стресс у данной культуры значительную роль играют микроРНК, идентифицировать которые позволили высокопроизводительные технологии секвенирования. С использованием микрочипов были определены 18 чувствительных к холоду микроРНК у данного растения [31]. Часть из них была видоспецифична для риса, другие имели общие последовательности с микроРНК арабидопсиса. Три микроРНК оказались сгруппированы внутри интрона и совместно транскрибировались с геном хозяина при холодовом стрессе. МикроРНК в рисе в основном подавлялись в ответ на холодовый стресс, и, таким образом, их мишени включались в ответ на холод. У риса (*Oryza sativa* L.) обнаружено консервативное семейство генов miR319, состоящее из двух представителей, *Osa-miR319a* и *Osa-miR319b* [32]. Данное семейство микроРНК 319 выявлено у многих растений [33]. Оказалось, что избыточная экс-

прессия *Osa-miR319b* в рисе приводит к расширению листовых пластинок и задержке развития. Экспрессия *Osa-miR319b* подавлялась холодовым стрессом, а сверхэкспрессия *Osa-miR319b* приводила к повышенной устойчивости к холодовому стрессу, о чем свидетельствуют более высокие показатели выживаемости и содержание пролина. Кроме того, экспрессия нескольких генов, чувствительных к холодовому стрессу, таких как *DREB1A/B/C*, *DREB2A*, *TPP1/2*, была повышена в трансгенных линиях *Osa-miR319b*.

Экспрессия генов в значительной степени зависит от *cis*-элементов, имеющихся в промоторном регионе. Анализ *cis*-элементов также может быть эффективным инструментом исследования функций микроРНК, как и в случае с белок-кодирующими генами. Анализ вышележащих последовательностей генов микроРНК показал наличие известных *cis*-действующих регуляторных последовательностей, характерных для регуляторных элементов, взаимодействующих с фитогормонами, таких как ABRE, GARE, MeJA-чувствительный элемент (мотив CGTCA) и SA-чувствительный элемент (элемент TCA). Эти данные указывают на то, что эти микроРНК, весьма вероятно, регулируются фитогормонами при холодовом стрессе. Кроме того, было также идентифицировано несколько элементов, связанных со стрессом. Эти данные свидетельствуют о том, что эти микроРНК, весьма вероятно, участвуют в реакциях на другие абиотические стрессы в дополнение к холоду [31].

Анализ мишеней микроРНК. Прогнозирование микроРНК-мишеней для дифференциально экспрессируемых микроРНК у арабидопсиса выявило повышенную представленность транскриптов, нацеленных на мРНК, которые кодируют белки, участвующие в регуляции транскрипции [29]. Например, индуцируемые холодом и другими абиотическими стрессами микроРНК miR408 регулируют транскрипты, кодирующие белки семейства фитоцианинов, участвующие в переносе электронов между белками, а также транскрипты фитофенолоксидаз, называемые лакказами, которые окисляют флавоноиды во время развития семян и стрессовых воздействий окружающей среды. Они необходимы для поддержания функций клеточной стенки и важны для регуляции биологических путей, необходимых для реакции на абиотический стресс [34, 35].

Интересная работа была проведена на растениях арабидопсиса с микроРНК miR394a [36]. В этом исследовании было обнаружено, что экспрессия транскрипционных факторов CBF1, CBF2 и CBF3 повышена у растений, сверхэкспрессирующих miR394a, и мутантов *lcr*, у которых не работает ген LCR (Leaf Curling Responsiveness), по сравнению с контрольными растениями дикого типа, что позволяет предположить, что опосредованная miR394 толерантность к холоду у арабидопсиса, возможно, зависит от экспрессии CBF. Как известно, белки CBF1/2/3 принадлежат к семейству APETALA2/этилен-чувствительных факторов транскрипции, которые связываются с CRT/DRE (элементом, реагирующим на С-повтор/дегидратацию) и активируют транскрипцию многих генов, индуцируемых холодовым стрессом, для придания растениям устойчивости к абиотическим стрессам [37]. Вклад генов CBF в акклиматизацию к холоду подтверждается открытием, что конститутивная сверхэкспрессия CBF1, CBF2 или CBF3 в трансгенных растениях, которая индуцирует экспрессию многих генов COR, и некоторые из белков COR, как полагают, важны для устойчивости к замораживанию даже без предварительного воздействия холода [2]. Повышение устойчивости к холоду через CBF-зависимый сигнальный путь достигается и при активации микроРНК miR397, при этом возрастает содержание транскрипционного фактора CBF, что приводит к индукции чувствительных к холоду COR генов [38].

Поиск мишеней, подавляемых микроРНК растений риса при холодовом стрессе, с использованием базы данных мРНК генома риса, показал, что это, в основном, факторы транскрипции, MADS-бок-белки и широкий спектр белков, не являющихся факторами транскрипции [31]. Генами-мишенями для микроРНК Osa-miR319b могут быть факторы транскрипции OsPCF6 и OsTCP21, имеющие ядерную локализацию, так как степень индукции OsPCF6 и OsTCP21 была подавлена в растениях, сверхэкспрессирующих Osa-miR319b. Как и ожидалось, понижение экспрессии OsPCF6 и OsTCP21 привела к повышению устойчивости к холодовому стрессу, частично, за счет модификации поглощения активного кислорода. В совокупности эти результаты показывают, что Osa-miR319b играет важную роль в реакции растений на холодовый стресс, возможно, через воздействие на OsPCF6 и OsTCP21 [32].

Для идентификации мишеней малых РНК в рисе на уровне транскриптома был применен также подход «деградомного секвенирования», при котором идентифицируются остатки расщепления малых РНК-мишеней путем секвенирования 5'-концов некапсированных РНК. Была сгенерирована библиотека кДНК из полиаденилированных транскриптов, содержащих 5'-монофосфат, выделенный из риса 3-недельного возраста (*O. sativa* spp *japonica* cv. Nipponbare). Библиотека затем была секвенирована, и набор данных был проанализирован вычислительным путем. В общей сложности было подтверждено, что 160 генов-мишеней являются мишенями для микроРНК, которые включали новую консервативную мишень для miR398, мишени для девяти консервативных микроРНК и мишени для микроРНК, специфичных для риса [39]. Мишени для микроРНК156 риса были вычислены, основываясь на характеристиках депонированных последовательностей микроРНК растений и последовательности генома риса [40]. Оказалось, что мишенями для этих микроРНК являлись связывающие промотор-подобные гены (SPL), кодирующие несколько транскрипционных факторов (OsWRKY71, MYB).

Перечень растений, у которых исследованы микроРНК в связи с устойчивостью к холодовому воздействию, расширяется. Так, из библиотеки малых РНК репы (*Brassica rapa*) была выделена последовательность микроРНК miR1885, экспрессия которой возрастала при холодовой обработке растений [41]. В промоторном регионе гена MIR1885 обнаружен мотив LTR (CCGAAA), сходный с *cis*-элементами COR-генов, чувствительных к низкой температуре. Как наиболее вероятные мишени для miR1885 были определены два R (RESISTANCE) гена *Vn.TIR.A09* и *Vn.TNL.A03*, кодирующие иммунные белки, вовлеченные в ответ на воздействие патогенов. С использованием трансгенных линий рапса с сверхэкспрессией miR1885 было показано, что в таких линиях содержание транскриптов генов-мишеней было ниже, чем в растениях дикого типа, что указывает на негативный характер регуляции R генов miR1885 [41].

Стресс-чувствительное изменение содержания miR319 показано у растений дыни, экспонированных 11 суток в условиях пониженной температуры роста [42]. Функциональная роль данной микроРНК в холодовом ответе связана с биосинтезом антоциана, вовлеченным в низкотемпературный сигналинг.

У растений рапса изменение экспрессии микроРНК miR1885 отражается на степени устойчивости к холоду, соответственно, miR1885 и ее мишени могут быть потенциальным кандидатом для выведения устойчивых к холоду сортов данной культуры (Yu et al., 2023).

Исследования относительной экспрессии микроРНК у томатов (*Solanum lycopersicum*) в начальные этапы холодового воздействия (0, 1, 4 и 16 ч) показали, что в этих условиях активизировалась экспрессия miR167, miR169, miR172 и miR393, в частности, было обнаружено, что miR172 имеет самый высокий уровень экспрессии [43]. Кроме того, были идентифицированы гены-мишени выбранных микроРНК и оценены профили их экспрессии у холодочувствительных и холодоустойчивых сортов томата. Было обнаружено, что предполагаемые паттерны экспрессии целевых генов различались между сортами. Также было установлено, что в различных микроРНК томатов имелись последовательности регуляторных элементов, таких, как АБК-чувствительные элементы (ABRE, miR172, miR393), этилен-чувствительные элементы (ERE, miR 172) и MYB-связывающий сайт, вовлеченный в ответ на засуху (miR167, miR172) и др., что свидетельствует о важности гормонов в системе защиты от холода, опосредуемой микроРНК [43].

Перспективы использования микроРНК в практике улучшения устойчивости растений к внешним воздействиям. Большой объем исследований на арабидопсисе и некоторых других растениях привел к пониманию того, что микроРНК, вовлеченные в процессы роста и развития, ответные реакции растений на различные стрессы, могут быть использованы в стратегиях улучшения растительных культур, развиваемых в последнее время. Такие исследования особенно актуальны для растений, неустойчивых к действию низких температур.

Исследование возможностей повышения устойчивости к низким температурам тропического декоративного растения антуриум *Anthurium andraeanum*, очень восприимчивого к холодовому воздействию, привело к идентификации и клонированию предшественника микроРНК miR158 (Aa-miR158) [44]. Было показано, что холодовый стресс вызывает повышение содержания miR158 в тканях растения. Более того, сверхэкспрессия Aa-miR158 в растениях арабидопсиса улучшала их устойчивость к хо-

лодовому стрессу. Известно, что холодовый стресс вызывает накопление активных форм кислорода (АФК), что может вызвать нарушения в липидном слое клеток [45]. Однако у растений с сверхэкспрессией микроРНК уровень малонового диальдегида при холодовом стрессе была существенно ниже, чем в растениях дикого типа [44]. Установлено, что одним из генов-мишеней для miR158 является ген синтазы терпена *c48247* (TPS) [46]. Предположительно, Aa-miR158 может регулировать функционирование *c48247* на этапе трансляции.

У растений чая (*Camellia sinensis*) двух сортов (холодоустойчивый сорт Yingshuang и чувствительный к холоду сорт Baiye 1) идентифицированы 106 микроРНК с известной последовательностью и 98 потенциально новых микроРНК. При различающемся по времени воздействию низкой температуры обнаружены чувствительные к холоду семейства микроРНК – 18 у сорта Yingshuang и 14 у сорта Baiye 1. Идентифицированы гены-мишени этих микроРНК, при этом наибольшая представленность была у генов, отвечающих за процессы развития, регуляцию транскрипции и стрессовые ответы [47].

Холодовый стресс серьезно влияет на рост, развитие и урожайность такого тропического растения как маниока, который используется в качестве продукта питания, корма для животных, а также как важный источник биоэтанола. Исследование библиотек микроРНК, полученных из проростков маниоки, обработанных холодом и не подвергнутых холодной обработке, показало, что 12 микроРНК и 31 соответствующая им мишень вовлечены в реакцию на холодовый стресс. В частности, miR159, miR164 и miR396 участвовали в реакции на холодовый стресс путем усиления регуляции некоторых транскрипционных факторов, вовлеченных в регуляцию экспрессии нижележащих генов [48].

Понять механизмы микроРНК-опосредованных стрессовых реакций позволяет изучение паттернов экспрессии микроРНК в условиях низкотемпературного стресса. Так, у двух сортов травянистого растения *Hemerocallis fulva*, контрастных по устойчивости к низким температурам, при различных температурных обработках (20°C и -4°C в течение 8 часов) было идентифицировано 333 чувствительных к холоду микроРНК, включая 85 предположительно новых и 248 консервативных микроРНК [49]. Гены-мишени были в основном вовлечены в метаболические процессы и формирование кле-

точных компонентов. Дифференциальные уровни экспрессии 10 микроРНК были подтверждены с помощью количественной ОТ–ПЦР, что позволило предположить, что некоторые микроРНК (например, *ath-miR165a*, *ath-miR166a*, *ath-miR395a* и *novel-miR67*) могут быть вовлечены в процессы, связанные с реакцией растений на низкую температуру.

Сравнение профилей экспрессии микроРНК, выделенных из растений лорангуса, применяемых в китайской медицине, подвергнутых низкотемпературному воздействию в течение 12 и 36 часов, позволило идентифицировать 103 дифференциально экспрессирующихся при холодной обработке микроРНК. Часть микроРНК, такие как *miR390a*, *miR160b*, *miR171b* и *miR167c*, реагировали на холод в ранние сроки, в то время как *miR408* функционировала в течение всего периода воздействия холода. Показано, что мишенями данных микроРНК могут быть транскрипционные факторы, вовлеченные в реакцию на холод, абиотический стимул и процессы развития/прорастания семян, соответственно [50].

У растений с длительным периодом роста как у деревьев, также проводились исследования регулирующей роли микроРНК в реакции на стрессовые условия окружающей среды в процессе их развития. Из подвергшихся абиотическому стрессу тканей *Populus trichocarpa* (*Ptc*) клонированы и идентифицированы 68 предполагаемых последовательностей микроРНК, которые на основе гомологии последовательностей могут быть классифицированы в 27 семейств [51]. Среди них девять семейств являются новыми, что увеличивает число известных семейств *Ptc-miRNA*, с 33 до 42. Для клонированных *Ptc*-микроРНК было предсказано в общей сложности 346 мишеней мРНК. Экспрессия большинства новых микроРНК изменялась в ответ на холод, тепло, засоление, обезвоживание и механические воздействия. Анализ известных *Ptc*-микроРНК на микрочипах выявил 19 дополнительных *Ptc*-микроРНК, чувствительных к холодовому стрессу. Эти результаты раскрывают возможную роль микроРНК в регуляторных сетях, связанных с долгосрочным ростом древесных пород, и предоставляют полезную информацию для выращивания деревьев с более высоким уровнем стрессоустойчивости [51].

Анализ изменений в профилях экспрессии микроРНК гибридов сельскохозяйственных культур позволил предположить о значении микроРНК-опосредованной регуляторной сети

при объяснении молекулярных механизмов такого интересного феномена как гетерозис, когда гибриды первого поколения проявляют лучшие агрономические показатели по сравнению с родительскими линиями. В гибридных формах большинство идентифицированных микроРНК проявляет пониженную экспрессию, что приводит к усилению экспрессии целевых генов и более высоким показателям по сравнению с родительскими линиями [52].

Заключение. Таким образом, за долгую эволюционную историю растения выработали сложную регуляторную сеть для контроля функциональной экспрессии генов, необходимых для выживания и процветания, такую как транскрипционное программирование, регулируемое транскрипционными факторами. Многочисленные данные исследований демонстрируют, что малые молекулы РНК длиной 21–24 нуклеотида, в основном микроРНК, играют доминирующую роль в посттранскрипционной регуляции генов, посредством взаимодействия с комплементарными им мРНК-мишенями, особенно предпочтительно воздействуя на факторы транскрипции в растениях [53].

Как прикрепленные организмы, растения вынуждены преодолевать различные биотические и абиотические стрессы, такие как воздействие патогенов, засуха, жара, холод и минеральное голодание. Соответственно, растения нуждаются в достижении баланса между развитием растения и активацией стрессовых ответов ввиду ограничения доступных ресурсов. В координацию биологических процессов, при выборе между развитием и стрессовым ответом, наряду с транскрипционными факторами, вовлечены и некоторые микроРНК [53]. Исследования показали, что микроРНК действуют как регуляторы, контролирующие экспрессию генов во время роста и развития растений и реакцию на биотический и абиотический стресс. Более половины мишеней микроРНК, выделенных из широко распространенных сельскохозяйственных культур, были представлены транскрипционными факторами, вовлеченными в процессы регулирования развития или ответных реакций на стрессы [54]. Также среди мишеней микроРНК выявлен обширный класс *R* (*resistance*) генов, кодирующих белки, распознающие специфические патогенные эффекторы и запускающие опосредованные *R* генами иммунные ответы [54, 55]. Участие микроРНК в

развитии устойчивости растений к холодному стрессу разнообразно, и происходит через активацию экспрессии генов, включенных CBF-зависимый путь (COR-гены), генов, связанных с регулированием уровня активных форм кислорода [44] и соединений, необходимых для поддержания функций клеточной стенки [34, 35], а также воздействием на множество других мРНК-мишеней.

Посттранскрипционная регуляция генов, управляемая микроРНК (miRNA), представляет собой один из наиболее консервативных и хорошо охарактеризованных механизмов регуляции генов. Исходя из того, что в настоящее время известно о биогенезе, предпочтениях по мишеням, биологических функциях и молекулярных механизмах микроРНК как о ключевых регуляторах экспрессии генов, их можно рассматривать в качестве нового важного инструмента в деле генетического улучшения растений [56, 57].

Литература

- Xie Z., Khanna K., Ruan S. Expression of microRNAs and its regulation in plants // *Seminars in Cell and developmental Biology*. 2010. V. 21. P. 790–797.
- Iwakawa H., Tomari Y. Life of RISC: formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex // *Molecular Cell*. 2022. V. 82. P. 30–43.
- Sunkar R., Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.-K. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation // *Trends Plant Sci*. 2007. V. 12(7). P. 301–309.
- Janska A., Marsik P., Zelenkova S., Ovesna J. Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? // *Plant Biol (Stuttg)*. 2010. V. 12(3). P. 395–405.
- Kawaguchi R., Girke T., Bray E.A., Bailey-Serres J. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 2004. V. 38. P. 823–839.
- Chinnusamy V., Zhu J.-K., Sunkar R. Gene regulation during cold stress acclimation in plants // *Methods Mol. Biol*. 2010. V. 639. P. 39–55.
- Гималов Ф.П. Восприятие растениями холодного сигнала, или как устроен растительный «термометр» // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2018. № 2. С. 19–24.
- Banerjee A, Wani SH, Roychoudhury A. Epigenetic control of plant cold responses // *Front Plant Sci*. 2017. V. 8. P. 1643.
- Гималов Ф.П., Фарафонов Д.С. Метилирование ДНК растений в связи с устойчивостью к стрессовым факторам среды // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2017. № 4. С. 89–94.
- Sunkar R., Zhu J.K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 2001–2019.
- Bej S., Basak J. MicroRNAs: the potential biomarkers in plant stress response // *American Journal of Plant Sciences*. 2014. V. 5. P. 748–759.
- Sun G. MicroRNAs and their diverse functions in plants // *Plant Mol. Biol*. 2012. V. 80. P. 17–36.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // *Cell*. 1993. V. 75. P. 843–854.
- Hamilton A.J., Baulcombe D.C. A species of small antisense RNA in posttranscription gene silencing in plants // *Science*. 1999. V. 286. P. 950–952.
- Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B., Bartel D.P. MicroRNAs in plants // *Genes Dev*. 2002. V. 16. P. 1616–1626.
- Llave C., Xie Z., Kasschau K.D., Carrington J.C. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA // *Science*. 2002. V. 297. P. 2053–2056.
- Zhang B., Wang Q. MicroRNA-based biotechnology for plant improvement // *J. Cell. Physiol*. 2015. V. 230. P. 1–15.
- Zhang Z., Yu J., Li D., Zhang Z., Liu F., Zhou X., et al. PMRD: plant microRNA database // *Nucleic Acid Research*. 2010. V. 38. D806–D813.
- Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA // *Mol. Cell*. 2004. V. 14. P. 787–799.
- Sunkar R., Zhou X., Zheng Y., Zhang W., Zhu J.-K. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing // *BMC Plant Biol*. 2008. V. 8:25.
- Zhang B.H., Pan X.P., Wang Q.L., Cobb G.P., Anderson T.A. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis // *Cell Res*. 2005. V. 15. P. 336–360.
- Jones-Rhoades M.W., Matthew W., Bartel D.P., Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants // *Annu. Rev. Plant Biol*. 2006. V. 57. P. 19–53.
- Sunkar R., Zhu J.K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 2001–2019.
- Apostolova E., Gozmanova M., Nacheva L., Ivanova Z., Toneva V., Minkov I., Baev V., Yahubyan G. MicroRNA profiling the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* unveils essential regulators of survival under severe drought // *Biologia Plantarum*. 2020. V. 64. P. 541–550.
- Tripathia S., Boseb P. Role of microRNAs in biotic and abiotic stress tolerance in plants // *Virology and Mycology*. 2023. V. 12. № 258. Iss. 1.
- Razna K., Cagan L. The role of microRNAs in genome response to plant-lepidoptera interaction // *Plants*. 2019. V. 8. P. 529.

27. Gupta P.K. MicroRNAs and target mimics for crop improvement // *Current Science*. 2015. V. 108. № 9. P. 1624–1633.
28. Гималов Ф.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. О восприятии растением холодного сигнала // *Успехи современной биологии*. 2004. Т. 124. № 2. С. 187–198.
29. Tiwari B., Habermann K., Arif A.A., Weil H.L., Garcia-Molina A., Kleine T., Mühlhaus T., Frank W. Identification of small RNAs during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Plant Biology*. 2020. V. 12. № 1. P. 298. 10.1186/s12870-020-02511-3.
30. Khush G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice // *Plant Molecular Biology*. 1997. V. 35. P. 25–34.
31. Lv D.K., Bai X., Li Y., Ding X.D., Ge Y., Cai H., Ji W., Wu N., Zhu Y.-M. Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays // *Gene*. 2010. V. 459. P. 39–47.
32. Wang S., Sun X., Hoshino Y., Yu Y., Jia B., Sun Z., Sun M., Duan X., Zhu Y. MicroRNA319 positively regulates cold tolerance by targeting OsPCF6 and OsTCP21 in Rice (*Oryza sativa* L.) // *PLOS One*. 2014. V. 9(3). e91357.
33. Cuperus J.T., Fahlgren N., Carrington J.C. Evolution and functional diversification of MIRNA genes // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 431–442.
34. Abdel-Ghany S.E., Pilon M. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283(23). P. 15932–15945.
35. Liang M., Haraldsen V., Cai X., Wu Y. Expression of a putative laccase gene, ZmLAC1, in maize primary roots under stress // *Plant Cell Environ*. 2006. V. 29(5). P. 746–53.
36. Song J.B., Gao S., Wang Y., Li B.W., Zhang Y.L., Yang Z.M. miR394 and its target gene LCR are involved in cold stress response in *Arabidopsis* // *Plant Gene*. 2016. V. 5. P. 56–64.
37. Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 1997. V. 94. P. 1035–1040.
38. Dong C.-H., Pei H. Over-expression of miR397 improves plant tolerance to cold stress in *Arabidopsis thaliana* // *J. Plant Biol*. 2014. V. 57(4). P. 209–217.
39. Li Y.F., Addo-Quaye C., Zhang L., Saini A., Jagadeeswaran G., Axtell M.J., Zhang W., Sunkar R. Transcriptome-wide identification of micro-RNA targets in rice // *Plant J*. 2010. V. 62(5). P. 742–759.
40. Zhou M., Tang W. MicroRNA156 amplifies transcription factor-associated cold stress tolerance in plant cells // *Molecular genetics and genomics*. 2019. V. 294(2). P. 379–393.
41. Yu X., Xu P., Zhang W., Wang X., Zhu Y., Liang W., He Y. Multi-omics analysis reveals a link between Brassica-specific miR1885 and rapeseed tolerance to low temperature // *Plant Cell Environ*. 2023. V. 46(11). P. 3405–3419.
42. Bustamante A., Marques M.C., Carbonell A.S., Mulet J.M., Gomez G. Alternative processing of its precursor is related to miR319 decreasing in melon plants exposed to cold // *Scientific reports*. 2018. V. 8. P. 15538.
43. Koc I., Filiz E., Tombuloglu H. Assessment of miRNA expression profile and differential expression pattern of target genes in cold-tolerant and cold-sensitive tomato cultivars // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2015. V. 29. № 5. P. 851–860.
44. Jiang L., Fu Y., Sun P., Tian X., Wang G. Identification of microRNA158 from *Anthurium andraeanum* and its function in cold stress tolerance // *Plants*. 2022. V. 11. P. 3371.
45. Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination // *Plant J*. 2017. V. 90. P. 856–867.
46. Jiang L., Tian X.K., Fu Y.X., Liao X.Z., Wang G.D., Chen F.D. Comparative profiling of microRNAs and their effects on abiotic stress in wild-type and dark green leaf color mutant plant of *Anthurium andraeanum* “Sonate” // *Plant Physiol. Biochem*. 2018. V. 132. P. 258–270.
47. Zhang Y., Zhu X., Chen X., Song C., Zou Z., Wang Y., Wang M., Fang W., Li X. Identification and characterization of cold-responsive microRNAs in tea plant (*Camellia sinensis*) and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis // *BMC Plant Biology*. 2014. V. 14. P. 271.
48. Li S., Cheng Z., Peng M. Genome-wide identification of miRNAs targets involved in cold response in cassava // *Plant Omics J*. 2020. V. 01. P. 57–64.
49. Cheng P., Zhang H., Jiang C., Jin L. Identification and differential expression of cold-stress-responsive microRNAs in cold-tolerant and -susceptible *Hemerocallis fulva* // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 2023. V. 51. Iss. 3. P. 451–465.
50. Fu J., Wan L., Song L., He L., Jiang N., Long H., Huo J., Ji X., Wei Y., Wei S., Pan L. Identification of microRNAs in *Taxillus chinensis* (DC.) Danser Seeds under cold stress // *BioMed. Research International*. 2021. V. 2012. ID 5585884.
51. Lu S.F., Sun Y.H., Chiang V.L. Stress-responsive microRNAs in *Populus* // *Plant J*. 2008. V. 55. P. 131–151.
52. Zhao P., Ding D., Zhang F., Zhao X., Xue Y., Li W., Fu Z., Li H., Tang J. Investigating the molecular genetic basis of heterosis for internode expansion in maize by microRNA transcriptomic deep sequencing // *Functional & Integrative Genomics*. 2015. V. 15. P. 261–270.
53. Li C., Zhang B. MicroRNAs in control of plant development // *J. Cellular Physiology*. 2015. V. 231. P. 303–313.

54. Tang J., Chu C. MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits // *Nature plants*. 2017. V. 3. P. 17077.

55. Максимов И.В., Шеин М.Ю., Бурханова Г.Ф. РНК-интерференция в защите растений от грибной и оомицетной инфекции // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. № 3. С. 219–234.

56. Rani J. MicroRNA utilization as a potential tool for stress tolerance in plants // In book: *Botany – Recent Advances and Applications*. Ed. Bimal Kumar Ghimire. 2021. P. 1–15.

57. Gupta P.K. MicroRNAs and target mimics for crop improvement // *Curr. Sci.* 2015. V. 108. P. 1624–1633.



THE ROLE OF MICRORNAS IN THE DEVELOPMENT OF PLANT RESISTANCE TO COLD

© F.R. Gimalov

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of Russian Academy of Sciences,
71, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Plants, as sessile organisms, are forced to adapt to changes in the environment, including temperature changes that limit growth, development and productivity). Abiotic stresses have become a serious problem due to their widespread nature and destructive effects on plants. However, plants have developed complex ways to perceive and respond to environmental changes. The mechanisms of plant resistance to hypothermia have been studied for a long time and transcriptional control of expression of genes sensitive to cold has been studied in some detail. To activate protective mechanisms, plants trigger a network of genetic regulators, including changing the expression of a significant part of genes using transcriptional and/or translational regulators. microRNAs can be considered important participants in the response of plants to cold stress. The key to understanding the involvement of microRNAs in plant stress reactions was studies that showed the regulation of their expression under stress. microRNAs are small non-coding RNAs that manifest themselves as important regulatory components in plants. microRNA expression includes transcription of microRNA genes by RNA polymerase II, multistage processing of primary transcripts using the enzyme DICER-LIKE1 (DCL1) and the formation of an effector complex consisting of miRNAs and proteins of the ARGONAUTE (AGO) family. Such complexes interact with complementary RNA targets, suppressing their expression at the transcriptional and post-transcriptional levels. Thus, microRNAs regulate a variety of biological processes, including responses to changes in the environment. Currently, microRNAs are considered as an important tool for regulating the work of genes. Such significant processes in plants as maintaining homeostasis, growth and development, transition from the vegetative to the reproductive phase, signaling and response to various stresses are regulated by microRNAs. The article describes the role of microRNAs in the response of plants to cold stress, analyzes microRNA targets, and discusses the prospects for using microRNAs in the practice of improving plant resistance to external influences.

Keywords: microRNAs, cold stress, signal transduction, cold stress tolerance.