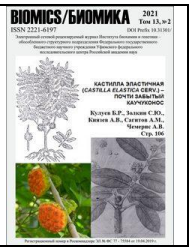
Биомика, 2021, Том 13, № 2, С. 166-175

BIOMICS/БИОМИКА

ISSN 2221-6197 http://biomicsj.ru



МикроРНК РАСТЕНИЙ: МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ И РОЛЬ В РАЗВИТИИ СИМБИОЗОВ С ПОЛЕЗНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Зорин Е.А., Кулаева О.А., Жуков В.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, 196608, ш. Подбельского, 3, E-mail: ezorin@arriam.ru

Резюме

МикроРНК (microRNAs, miRNAs) – это малые некодирующие молекулы РНК, выступающие в качестве пост-транскрипционных регуляторов экспрессии генов за счёт довольно строгой комплементарности к их мРНК и имеющие длину 20-24 нуклеотида. микроРНК растений контролируют широкий спектр физиологических процессов, в том числе питание, рост, защитные реакции и взаимодействие с другими организмами посредством модуляции экспрессии транскрипционных факторов, стресс-индуцируемых белков, ферментов биосинтеза гормонов и других генов. Бобовые растения способны к образованию мутуалистических симбиозов с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями и грибами арбускулярной микоризы. Как ранние, так и поздние этапы этих симбиозов контролируются сложными генетическими механизмами, и одним из таких механизмов является регуляция экспрессии генов посредством микроРНК. Для изучения микроРНК используют различные методы, однако за последние десять лет наиболее популярным инструментом в этой области стали технологии секвенирования следующего поколения. С их помощью возможно идентифицировать консервативные и новые микроРНК в геномах различных организмов (как модельных, так и немодельных), а также исследовать функционирование микроРНК в различных экспериментальных условиях с дополнительным применением данных транскриптомного и деградомного секвенирования. В статье описаны основные этапы работы с данными секвенирования микроРНК: контроль качества прочтений (с перечнем программ, применяющихся на данном этапе), выявление консервативных и новых микроРНК с помощью программы miRDeep2, поиск мишеней выявленных микроРНК с помощью PAREsnip2, функциональная аннотация мишеней и применение статистических тестов для анализа функционального обогащения, что облегчает интерпретацию полученных данных и позволяет сделать предположения о биологических последствиях активности выявленных микроРНК у исследуемого объекта. Эти сведения могут быть полезны исследователям, которые впервые работают с микроРНК *in silico* или хотят сэкономить время и ресурсы на поиск и анализ информации об инструментах, необходимых для работы с данными секвенирования микроРНК.

Ключевые слова: растения, корневые симбиозы, микроРНК, секвенирование следующего поколения, деградом

Цитирование: . Зорин Е.А., Кулаева О.А., Жуков В.А.МикроРНК растений: Методы изучения и роль в развитии симбиозов с полезными микроорганизмами *Biomics*. 2021. Т.13(2). С.166-175. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-13

© Авторы

PLANT microRNA: METHODS OF STUDYING AND THE ROLE IN THE DEVELOPMENT OF SYMBIOSES WITH BENEFICIAL MICROORGANISMS

Zorin E. A., Kulaeva O. A., Zhukov V. A.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
Russia, Saint Petersburg, Pushkin, 196608, Podbelsky chausse, 3, E-mail: ezorin@arriam.ru

Resume

MicroRNAs are small non-coding RNA molecules that act as post-transcriptional regulators of gene expression due to rather strict complementarity to their mRNA and have a length of 20-24 nucleotides. Plant microRNAs control a wide range of physiological processes, including nutrition, growth, resistance reactions and interaction with other organisms, via modulation of the expression of transcription factors, stress-induced proteins, hormone biosynthesis enzymes, and other genes. Legumes are able to form mutualistic symbioses simultaneously with nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhiza. Both the early and late stages of these symbiosis are regulated by complex genetic mechanisms. As it has become known in recent years, one of these mechanisms is the regulation of gene expression by microRNA. The study of microRNAs is carried out by various methods, but over the past decade, next-generation sequencing (NGS) technologies have become the most popular approach in this field. NGS is used to identify conservative and novel microRNAs in the genomes of various organisms (both model and non-model), as well as to study the functioning of microRNAs in various experimental conditions with the additional use of transcriptome and degradome sequencing data. The article describes the main stages of working with microRNA sequencing data: quality control of reads (with a list of programs required at this stage), identification of conservative and novel microRNAs using miRDeep2 tool, search for targets of identified microRNAs using PAREsnip2, functional annotation of targets and the use of statistical tests for the analysis of functional enrichment, which facilitates the interpretation of the data obtained and allows us to make assumptions about the biological consequences of the activity of identified microRNAs in the object under study. This information may be useful for researchers who deal with microRNAs *in silico* for the first time or want to save time and resources on searching and analyzing information about the tools needed to work with microRNA sequencing data.

Key words: Plants, root symbiosis, microRNAs, Next-Generation Sequencing, degradome

Citation:. Zorin E.A., Kulaeva O.A., Zhukov V.A. Plant microRNA: Methods of studying and the role in the development of symbiosis with beneFicial microorganisms *Biomics*. 2021. V.13(2). P. 166-175. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-13

© The Authors

Введение

МикроРНК (miRNAs) это малые некодирующие молекулы РНК, обычно длиной 20-24 нуклеотида, которые пост-транскрипционно регулируют экспрессию генов посредством довольно строгой комплементарности с продуктами их транскрипции [Yu et al., 2017]. МикроРНК являются представителем класса малых некодирующих РНК, который включает в себя микроРНК, малые интерферирующие РНК (small interfering RNAs, siRNAs) и piwi-interacting РНК (piRNAs) [Farazi et al., 2008], однако последние встречаются лишь у животных. У растений микроРНК контролируют экспрессию генов, кодирующих транскрипционные факторы, стресс-индуцируемые белки, ферменты биосинтеза гормонов и другие белки, влияющие на развитие, рост, и физиологию организма [Rogers, Chen, 2013]. Таким образом, микроРНК представляют собой элемент посттранскрипционного механизма регуляции экспрессии генов и, как следствие, транскриптомного разнообразия.

МикроРНК образуются в результате транскрипции генов микроРНК, которые иногда располагаются внутри интронов других генов. Например, геном *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. содержит 30, а *Oryza sativa* L. - 181 белок-кодирующий ген, содержащий гены микроРНК в своих интронах [Shapulatov et al., 2018]. Транскрипция происходит посредством РНК-полимеразы II (Pol II) с формированием первичной микроРНК (primary microRNA, pri-miRNA). Pri-miRNAs содержат шпильку и процессируются ферментом DICER-LIKE1 (DCL1) из семейства RNase III в miRNA/miRNA*-дуплексы. Эти дуплексы 2’-О-метилированы на 3’ концах посредством метилтрансферазы HUA ENHANCER1 (HEN1). Одна цепь из дуплекса встраивается в белковый комплекс ARGONAUTE1 (AGO1) с последующим формированием активного RNA-индуцированного сайленсинг комплекса (RISC) (Рис. 1) [Rogers, Chen, 2013]

На данный момент известно, что растительные микроРНК имеют более высокую степень комплементарности к своим мишеням (от 0 до 3 несовпадений), чем микроРНК животных, хотя в обоих случаях требуется высокий уровень комплементарности между 5’-концом микроРНК и мРНК-мишенью. Кроме того, микроРНК растений имеют более высокую эволюционную консервативность [Millar, Waterhouse, 2005].

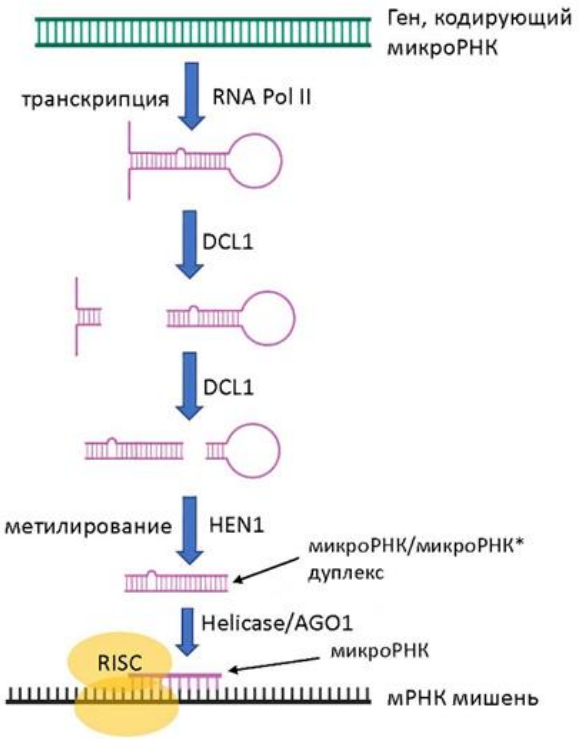


Рис. 1 Схематичное изображение механизмов биогенеза и действия микроРНК у растений.
Fig. 1 Schematic representation of the mechanisms of biogenesis and the action of microRNAs in plants.

МикроРНК участвуют в различных биологических процессах, необходимых для жизнедеятельности растений, в частности, в процессах развития [Knauer et al., 2013; Li, Zhang, 2016], питания [Marín-González, Suárez-López, 2012; Ouyang et al., 2014; Nguyen et al., 2015] и растительно-микробных взаимодействиях [Gautrat et al., 2020; Hoang et al., 2020; Okuma et al., 2020].

Роль микроРНК в развитии растительно-микробных симбиозов.

МикроРНК выступают в качестве системных и локальных регуляторов экспрессии генов, что наглядно продемонстрировано на примере растительно-микробных симбиозов. Показано, что микроРНК miR399 играет роль в регуляции клеточных ответов в течение развития симбиотических отношения между арбускулярной микоризой и *Medicago truncatula* Gaertn. [Branscheid et al., 2010]. miR399 экспрессируется в корнях в условиях с низким содержанием фосфатов, и её экспрессия понижается в микоризованных корнях, где miR399 негативно регулирует развитие арбускул на клеточном уровне через регуляцию экспрессии генов ауксиновых рецепторов [Müller, Harrison, 2019]. Также известно, что микроРНК miR171h участвует в контроле количества клубеньков, биосинтезе стриголактонов и вовлечена в сигнальный путь Myc-факторов через репрессию транскрипционного фактора NSP2 семейства GRAS. Сверхэкспрессия данной микроРНК приводит к снижению колонизации корней грибом арбускулярной микоризы и уменьшению количества клубеньков при симбиозе бобовых с азотфиксирующими почвенными бактериями, а сверхэкспрессия устойчивого к данной микроРНК варианта гена *NSP2* оказывает противоположный эффект [Hofferek et al., 2014; Pimprikar and Gutjahr, 2018]

Ген *LOST MERISTEMS (LOM)* - мишень представителей микроРНК семейства miR171. Эти гены также кодируют GRAS-белки и требуются для поддержания корневой и побеговой недетерминированности через регуляцию дифференцировки клеток меристемы. Показано, что у *M. truncatula* ген *LOM1* контролирует развитие симбиоза с грибом арбускулярной микоризы через взаимодействие с miR171a-f [Couzigou et al., 2017]. Интересно, что miR171b, один из представителей данного семейства микроРНК, имитирует мишень для других представителей этого же семейства с целью защитить транскрипт гена *LOM1* от деградации, вызванной связыванием с miR171a, c, d, e или f [Couzigou et al., 2017], и, таким образом, является необходимым элементом для успешного развития симбиоза, поскольку снижение экспрессии гена *LOM1* значимо снижает колонизацию корней [Couzigou et al., 2017]

Ранние стадии бобово-ризобиального симбиоза регулируются целым рядом микроРНК. Показано, что сверхэкспрессия miR319 подавляет экспрессию мРНК генов *TCP (TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PCF)*. В частности, гены *TCP3/4/10A/10B* являются мишенями miR319a у *M. truncatula* и сверхэкспрессия этой микроРНК значимо снижает экспрессию этих генов, что приводит к снижению количества клубеньков в ходе установления симбиотических отношений с азотфиксирующими бактериями [Wang et al., 2018]. Комплексный анализ показал, что микроРНК miR172 необходима для успешного проникновения клубеньковых бактерий в эпидермис корня *Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen. miR172 действует как регулятор экспрессии нескольких транскрипционных факторов типа APETALA2 (AP2), и, вероятно, играет важную роль в регуляции их экспрессии в ходе ранних этапов бактериального симбиоза. [Holt et al., 2015]

С использованием *in situ* гибридизации были обнаружены микроРНК, специфичные для различных функциональных зон клубеньков *M. truncatula*.

Высокий уровень экспрессии таких микроРНК как miR160, miR167, miR172, miR398, miR399 и miR2586, был выявлен в апикальной меристеме клубеньков. Более того, miR167, чьей мишенью являются гены, связанные с ответом на ауксин, обнаружена в больших количествах в периферических сосудистых пучках, в то время как miR172 и miR398 локализуются в зоне дифференцировки, а miR399 накапливается преимущественно в зоне азотфиксации [Lelandais-Brière et al., 2009].

Развитие и функционирование симбиозов с микроорганизмами – очень энергозатратные процессы для растения-хозяина. Чтобы минимизировать расход ресурсов, у бобовых растений существует механизм системной ауторегуляции клубенькообразования (AON) [Tsikou et al., 2018]. AON характеризуется дистанционным сигналингом (обменом молекулами) между побеговой и корневой частями растения с целью контроля как ранних этапов клубенькообразования, так и дальнейшей регуляции количества образуемых клубеньков [Ferguson et al., 2019]. У бобовых, пептиды CLE (CLAVATA3/ESR-related) действуют как сигнальные молекулы, транспортируемые из корней в побеги через ксилему непосредственно после инокуляции азотфиксирующими бактериями. У *M. truncatula* эту функцию выполняют пептиды CLE12 и CLE13. В побегах эти пептиды распознаются специальными рецепторами, (CLAVATA-like leucine-rich-repeat receptor like kinases (RLKs)), называемыми у *M. truncatula* SUNN (SUPER NUMERIC NODULES) и CLV2 (CLAVATA2). Распознавание CLE пептидов в побегах индуцирует синтез специальных побеговых ингибиторов (shoot-derived inhibitor (SDI)), которые возвращаются в корни и ингибируют клубенькообразование [Hoang et al., 2020].

Недавно было установлено, что роль SDI выполняет мобильная микроРНК miR2111, которая синтезируется в листьях и транспортируется в корни. Транскриптомной мишенью для miR2111 в корнях является ген *TOO MUCH LOVE (TML)*, который негативно регулирует клубенькообразование. Таким образом, для успешного и своевременного подавления клубенькообразования геном TML, CLE пептиды должны подавить синтез данной микроРНК в побегах, чтобы та, в свою очередь, перестала негативно регулировать экспрессию гена *TML* [Hoang et al., 2020]

Известно, что многие микроРНК обнаруживаются во флоэмном соке растений при недостатке питательных веществ в почве. Например, концентрация miR2111 повышается во флоэме у *A. thaliana* после долговременной нехватки фосфатов и вновь понижается после возобновления уровня фосфатов в почве. У *L. japonicus* представитель микроРНК этого семейства – miR2111-3 – это мобильный сигнал, транспортирующийся из побегов в корни и регулирующий клубенькообразование путём создания симбиотической восприимчивости растения в зоне где происходит инфекция. Экспрессия miR2111-3 понижается в побегах в момент, когда корни инфицируются азотфиксирующими бактериями или при воздействии нитратами на корни, что даёт право предположить, что данная микроРНК является сигнальной молекулой, связывающей симбиотический сигналинг и питательный статус растения. Эти данные можно экстраполировать и на симбиоз растения с грибом арбускулярной микоризы [Müller, Harrison, 2019].

Установлено, что микроРНК семейств miR171, miR164 и miR167a имеют одинаковый паттерн экспрессии как в азотфиксирующем, так и в арбускулярно-микоризном симбиозах [Jin et al., 2018] и, таким образом, представляют собой общий путь регуляции, и в ходе эволюции, вероятно, были рекрутированы растением в систему контроля азотфиксирующего симбиоза из эволюционно более древнего арбускулярно-микоризного симбиоза.

Участие микроРНК в различных физиологических процессах растений изучается около двадцати лет, однако многие аспекты этого ещё неизвестны и требуют более детального исследования.

Методы изучения микроРНК

Молекулы микроРНК являются перспективными биомаркерами, так как изменение их экспрессии часто ассоциировано с развитием различных патологических состояний человека. По этой причине в последние годы разработано множество методов выявления и анализа микроРНК, которые активно используются при исследованиях на различных объектах, включая животных и растения. Наиболее часто используемыми методами являются нозерн-блот (northern blotting) [Koscianska et al., 2011], RT-qPCR [Forero et al., 2019], микрочипы (microarrays) [Liu et al., 2008] и анализ с помощью технологий секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS) [Hu et al., 2017]. Множественные сравнительные исследования показали, что вышеперечисленные методы не являются взаимозаменяемыми, а скорее дополняют друг друга, и выбор конкретного инструмента зависит от цели исследования [Hu et al., 2017]. Однако по причине удешевления NGS в последние годы становится наиболее популярным инструментом выявления новых микроРНК и анализа их экспрессии.

NGS – это технологии секвенирования второго поколения, к которым относятся 454 (пиросеквенирование) [Rothberg and Leamon, 2008], Illumina [Quail et al., 2008] и Ion Torrent [Quail et al., 2012]. В рамках данной технологии подготовка

биологического материала для секвенирования осуществляется в несколько этапов: 1) экстракция РНК из клеток или тканей растений (например, с помощью RNAzol (https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/381/652/r4533bul.pdf, дата обращения: 28.07.2021)); 2) синтез второй цепи на матрице первой посредством обратной транскрипции; 3) амплификация синтезированных молекул кДНК; 4) секвенирование [Hu et al., 2017]. Благодаря низкой стоимости и высокой точности секвенирования, технологии компании Illumina стали наиболее распространённым методом изучения микроРНК.

В последние годы наблюдается рост числа исследований микроРНК растений, выполненных с использованием NGS-технологий. Метод используют как для идентификации микроРНК и их локализации в геномах растений [Wang, Zhang, 2013; Nithin et al., 2017; Yu et al., 2019], так и для выявления микроРНК, участвующих в конкретных физиологических реакциях с дополнительным привлечением данных секвенирования транскриптома и деградома модельных и немодельных объектов [Cao et al., 2018; Hu et al., 2021; Qiu et al., 2021; Yue et al., 2021]

В процессе секвенирования с помощью платформы Illumina происходит перекодирование светового сигнала от прочитанного нуклеотида в буквенный (так называемый base-calling) и запись в стандартизированный формат FASTQ (https://support.illumina.com/bulletins/2016/04/fastq-files-explained.html, дата обращения: 17.07.21).

После получения необработанных (сырых) данных в виде прочтений, необходимо провести биоинформатический анализ, включающий оценку качества сырых прочтений и их процессинг, позволяющий перейти к этапу выявления микроРНК и их мишеней, а также анализу их экспрессии. Далее мы остановимся на описании данных этапов работы более подробно.

Анализ данных секвенирования микроРНК, полученных с помощью технологии Illumina

Сырые прочтения

Сырые прочтения – это результат секвенирования, представленный в виде файлов в формате FASTQ. Такой формат записи позволяет получить информацию как о самой прочитанной последовательности, так и о качестве отдельного прочтения. В случае использования платформы Illumina, каждое прочтение содержит в своём составе как целевую молекулу, так и служебные последовательности (3’- и 5’-адаптеры для обратной транскрипции, адаптер, необходимый для амплификации и секвенирования), пришитые к целевой молекуле в процессе подготовки библиотеки.

Оценка качества и процессинг сырых прочтений

В процессе секвенирования каждому прочитанному нуклеотиду присваивается значение качества, выраженное количественно (так называемый, quality score (Q)). $Q = -10\log E$, где Q - это значение качества и E - частота ошибок. $Q10$, $Q20$, и $Q30$ отражают процент нуклеотидов, чей Q равен или больше чем 10, 20 и 30, соответственно (https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html, дата обращения: 17.07.21) К примеру, $Q20$ означает, что частота ошибок в процессе секвенирования равняется 1% или частота корректных нуклеотидов равняется 99%.

На первом этапе работы необходимо удалить прочтения, качество которых не превышает $Q20$, а также избавиться от служебных последовательностей, лигированных к микроРНК в процессе ПЦР-амплификации и секвенирования. Программа BBDuk из пакета BBTools (https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/, дата обращения: 17.07.21) проста в использовании и позволяет провести необходимые операции в кратчайшие сроки. После удаления прочтений плохого качества и служебных последовательностей необходимо оставить в наборе данных лишь прочтения в диапазоне длины зрелых микроРНК (от 18 до 25 нуклеотидов). Для проведения подобных операций разработан скрипт reformat.sh из пакета BBTools.

Поиск консервативных и новых микроРНК

Для полноценного выявления новых и консервативных микроРНК необходима качественная сборка генома исследуемого организма и набор зрелых консервативных микроРНК для исследуемого или близкородственных организмов. Получить набор известных консервативных микроРНК исследуемого или близкородственных организмов можно воспользовавшись открытой базой данных известных микроРНК «miRBase» [Kozomara et al., 2019]

Универсальным инструментом для выявления консервативных и новых микроРНК, а также анализа их экспрессии является miRDeep2 [Friedländer et al., 2012]. Запуск miRDeep2 позволяет в несколько этапов выявить как консервативные, так и новые микроРНК у исследуемого объекта, используя набор программ для детекции генов микроРНК, выявления предшественников микроРНК, анализа их вторичной структуры и валидации идентифицированных микроРНК (Рис. 2).

В случае заинтересованности в анализе микроРНК микросимбионта, присутствующего в изучаемом образце (например, гриба арбускулярной микоризы в корнях растения), исследователям следует выровнять полученные в ходе секвенирования прочтения на геномы изучаемых микро- и макросимбионтов отдельно и разделить прочтения на две группы в соответствии с результатами картирования, выявляя микроРНК параллельно у микро- и макросимбионта [Silvestri et al., 2019].

Рис. 2. Схема выявления новых и консервативных микроРНК с помощью miRDeep2 и их мишеней с помощью PAREsnip2
Fig. 2. Scheme of detection of novel and conservative microRNAs using miRDeep2 and their targets using PAREsnip2

Таблица 1.

Описание баз данных для анализа микроРНК / Table 1. Description of databases for microRNA analysis.

Название ресурса Database name	Источник / Source	Ссылка / Link
miRbase	[Kozomara et al., 2019]	http://www.mirbase.org/
PNRD	[Yi et al., 2015]	http://structuralbiology.cau.edu.cn/PNRD/
PmiREN	[Guo et al., 2020]	https://www.pmiren.com/
miRVIT	[Chitarra et al., 2018]	http://mirvit.ipsp.cnr.it/
PMTED	[Sun et al., 2013]	http://pmted.agrinome.org/
sRNAanno	[Chen et al., 2021]	http://www.plantsrnas.org/
PAmiRDB	[Satish et al., 2019]	http://bioinfo.icgeb.res.in:8080/pamirdb/
Rfam	[Kalvari et al., 2021]	https://rfam.xfam.org/

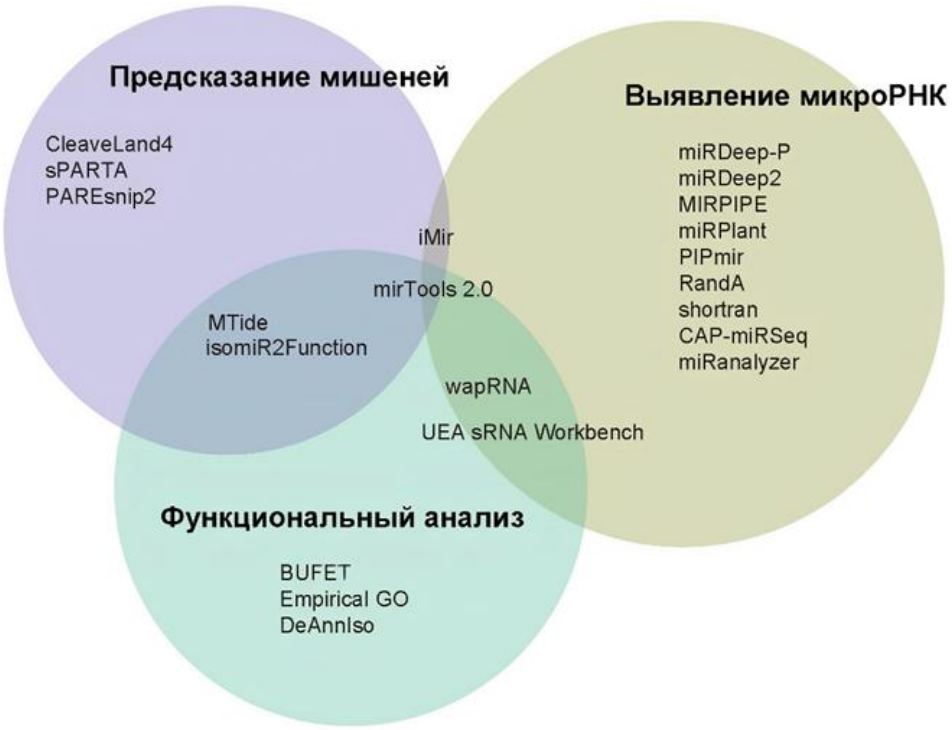


Рис. 3 Программы для анализа данных секвенирования микроРНК растений
Fig. 3 Tools for analyzing plant microRNA sequencing data

Помимо вышеперечисленных средств, в зависимости от целей и условий исследования, в работе могут быть полезны современные инструменты, описанные в Табл. 1 и на Рис. 3

Анализ мишеней выявленных микроРНК

Для получения информации о биологических последствиях работы выявленных микроРНК привлекают данные секвенирования лишь той части пула мРНК клеток, которая подверглась деградации посредством микроРНК в интересующих нас экспериментальных условиях. Пул деградировавших мРНК клетки называют деградомом [Lin et al., 2019]. Данная работа позволяет выявить транскрипты-мишени обнаруженных микроРНК на основе их строгой комплементарности и связать полученные данные с фенотипическими проявлениями.

Одним из методов секвенирования деградома является технология PARE (Parallel Analyses of RNA Ends) [German et al., 2009], являющаяся модифицированной версией метода Rapid amplification of 5′ complementary DNA ends (5′ RACE) (https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/references/protocols/nucleic-acid-amplification-and-expression-profiling/cdna-protocol/5-race-system-for-rapid-amplification-of-cdna-ends.html, дата обращения: 17.07.21). Как известно, зрелые последовательности мРНК несут так называемый «кэп» на 5’-конце, что защищает их от деградации. Технология PARE использует эту особенность и селективно секвенирует только последовательности мРНК, имеющие фосфорилированные 5’-и полиаденилированные 3’-концы, что позволяет секвенировать только последовательности мРНК, подвергшиеся деградации, в направлении от 5’- к 3’-концу. Таким образом, прочтения деградома на транскриптом изучаемого объекта должны картироваться, главным образом, стопками на небольшие участки транскрипта, расположенные по направление к 3’-концу от места сайта разрезания белком ARGONAUTE.

Программа PAREsnip2 [Thody et al., 2018] использует данные секвенирования микроРНК, деградома и референс (геном или транскриптом), а в качестве результата предоставляет информацию о всех потенциальных мРНК-мишенях для выявленных микроРНК (Рис. 2). Однако при работе с программами-предсказателями мишеней следует помнить, что степень комплементарности растительной микроРНК с их мишенями отличается от таковой у животных. Данный параметр, как правило, можно регулировать при запуске программ.

Для получения информации о биологических последствиях взаимодействия выявленных микроРНК со своими мишенями используют стандартные методы функциональной аннотации транскриптов-мишеней. В частности, чтобы определить биологические последствия, может быть проведён анализ обогащения по функциональной аннотации в терминах Gene

Ontology (GO) и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) для выявленных генов-мишеней. Анализ может быть выполнен как с применением онлайн сервисов agriGO [Tian et al., 2017] и GOEAST [Zheng, Wang, 2008], так и на языке программирования R с помощью пакетов TopGO (https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html, дата обращения: 17.07.21) , enrichR [Kuleshov et al., 2016], KEGGprofile (https://github.com/slzhao/KEGGprofile, дата обращения: 17.07.21). Дополнительно, функционально аннотированные мишени могут быть картированы на соответствующие метаболические пути с помощью KEGG Automatic Annotation [Moriya et al., 2007]

Заключение

Посттранскрипционная регуляция экспрессии мРНК, опосредованная малыми (от 18 до 24 нуклеотидов) молекулами РНК, называемыми микроРНК, является относительно недавно открытым механизмом, влияющим на многие аспекты физиологии как растений, так и животных [Hoang et al., 2020]. Бобовые растения, способные к образованию мутуалистических симбиозов одновременно с азотфиксирующими бактериями и грибами арбускулярной микоризы [Scheublin et al., 2006], используют микроРНК для локального и системного контроля над своими микросимбионтами за счет тонкой настройки экспрессии генов, ответственных за развитие симбиозов.

Удешевление методов секвенирования следующего поколения значительно повысило их популярность и спрос на них в области научных исследований. Одним из приложений NGS является секвенирование микроРНК и деградома клеток и тканей с целью изучения их влияния на паттерны экспрессии генов и отражения этих изменений в фенотипах как растительных, так и животных организмов. Не вызывает сомнения, что исследование микроРНК методами NGS набирает популярность по причине важной роли этого класса молекул в питании, росте, защите и других жизненно важных физиологических процессах различных организмов.

В данной работе сделан акцент на описании роли молекул микроРНК в установлении и функционировании растительно-микробных симбиозов, рассмотрены и систематизированы основные актуальные инструменты и один из возможных вариантов анализа данных секвенирования микроРНК и деградома. Эти сведения могут быть полезны исследователям, которые сталкиваются с подобным видом анализа впервые или хотят сэкономить время и ресурсы на поиск и анализ информации об инструментах, необходимых для анализа данных секвенирования микроРНК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90058.

Funding: The reported study was funded by RFBR, project number 19-316-90058.

References

1. Branscheid A., Sieh D., Pant BD., May P., Devers EA., Elkrog A., et al. Expression Pattern Suggests a Role of MiR399 in the Regulation of the Cellular Response to Local Pi Increase During Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interactions*. 2010; V. 23(7). P. 915–26. doi: 10.1094/MPMI-23-7-0915.

2. Cao C., Long R., Zhang T., Kang J., Wang Z., Wang P., et al. Genome-Wide Identification of microRNAs in Response to Salt/Alkali Stress in *Medicago truncatula* through High-Throughput Sequencing. *Int J Mol Sci*. 2018. V. 19(12). P. E4076. doi: 10.3390/ijms19124076.

3. Chen C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2005; V. 33(20). P. e179–e179. doi: 10.1093/nar/gni178.

4. Chen C., Li J., Feng J., Liu B., Feng L., Yu X., et al. sRNAanno—a database repository of uniformly annotated small RNAs in plants. *Hortic Res*. 2021. V. 8(1). P. 45. doi: 10.1038/s41438-021-00480-8.

5. Chitarra W., Pagliarani C., Abbà S., Boccacci P., Birello G., Rossi M., et al. miRVIT: A Novel miRNA Database and Its Application to Uncover Vitis Responses to Flavescence dorée Infection. *Front Plant Sci*. 2018. V. 9. P. 1034. doi: 10.3389/fpls.2018.01034.

6. Couzigou J-M., Lauressergues D., André O., Gutjahr C., Guillotin B., Bécard G., et al. Positive Gene Regulation by a Natural Protective miRNA Enables Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Cell Host Microbe*. 2017. V. 21(1). P. 106–12. doi: 10.1016/j.chom.2016.12.001.

7. Farazi TA., Juranek SA., Tuschl T. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*. 2008; V. 135(7). P. 1201–14. Doi: 10.1242/dev.005629.

8. Ferguson BJ., Mens C., Hastwell AH., Zhang M., Su H., Jones CH., et al. Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell Environ*. 2019. V. 42(1). P. 41–51. doi: 10.1111/pce.13348

9. Forero DA., González-Giraldo Y., Castro-Vega LJ., Barreto GE. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *BioTechniques*. 2019. V. 67(4). P. 192–9. doi: 10.2144/btn-2019-0065.

10. Friedländer MR., Mackowiak SD., Li N., Chen W., Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012. V. 40(1). P. 37–52. doi: 10.1093/nar/gkr688.

11. Gautrat P., Laffont C., Frugier F. Compact Root Architecture 2 Promotes Root Competence for Nodulation

through the miR2111 Systemic Effector. Curr Biol. 2020. V. 30(7). P. 1339-1345.e3. doi: 10.1016/j.cub.2020.01.084.
12. German MA., Luo S., Schroth G., Meyers BC., Green PJ. Construction of Parallel Analysis of RNA Ends (PARE) libraries for the study of cleaved miRNA targets and the RNA degradome. *Nat Protoc*. 2009. V. 4(3). P. 356–62. doi: 10.1038/nprot.2009.8.
13. Guo Z., Kuang Z., Wang Y., Zhao Y., Tao Y., Cheng C., et al. PmiREN: a comprehensive encyclopedia of plant miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2020. V. 48(D1). P. D1114–21. doi: 10.1093/nar/gkz894.
14. Hoang NT., Tóth K., Stacey G. The role of microRNAs in the legume-*Rhizobium* nitrogen-fixing symbiosis. *J Exp Bot.* 2020. V. 71(5). P. 1668–80. doi: 10.1093/jxb/eraa018.
15. Hofferek V., Mendrinna A., Gaude N., Krajinski F., Devers EA. MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* 2014. V. 14(1). P. 199. doi: 10.1186/s12870-014-0199-1.
16. Holt DB., Gupta V., Meyer D., Abel NB., Andersen SU., Stougaard J., et al. micro RNA 172 (miR172) signals epidermal infection and is expressed in cells primed for bacterial invasion in *Lotus japonicus* roots and nodules. *New Phytol*. 2015. V. 208(1). P. 241–56. doi: 10.1111/nph.13445.
17. Hu Y., Lan W., Miller D. Next-Generation Sequencing for MicroRNA Expression Profile. In: Huang J, Borchert GM, Dou D, Huan J, Lan W, Tan M et al., editors. *Bioinformatics in MicroRNA Research*. 2017. V. 1617. P. 169–77.
18. Hu Z., Nie Z., Yan C., Huang H., Ma X., Wang Y., et al. Transcriptome and Degradome Profiling Reveals a Role of miR530 in the Circadian Regulation of Gene Expression in *Kalanchoë marnieriana*. *Cells*. 2021. V. 10(6). P. 1526. doi: 10.3390/cells10061526.
19. Jin D., Meng X., Wang Y., Wang J., Zhao Y., Chen M. Computational investigation of small RNAs in the establishment of root nodules and arbuscular mycorrhiza in leguminous plants. *Sci China Life Sci.* 2018. V. 61(6). P. 706–17. doi: 10.1007/s11427-017-9203-7.
20. Kalvari I., Nawrocki EP., Ontiveros-Palacios N., Argasinska J., Lamkiewicz K., Marz M., et al. Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families. *Nucleic Acids Res*. 2021. V. 49(D1). P. D192–200. doi: 10.1093/nar/gkaa1047.
21. Knauer S., Holt AL., Rubio-Somoza I., Tucker EJ., Hinze A., Pisch M., et al. A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Dev Cell.* 2013. V. 24(2). P. 125–32. doi: 10.1016/j.devcel.2012.12.009.
22. Koscianska E., Starega-Roslan J., Sznajder LJ., Olejniczak M., Galka-Marciniak P., Krzyzosiak WJ. Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers. *BMC Mol Biol*. 2011. V. 12. P. 14. doi: 10.1186/1471-2199-12-14.
23. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47(D1). P. D155–62. doi: 10.1093/nar/gky1141.
24. Kuleshov MV., Jones MR., Rouillard AD., Fernandez NF., Duan Q., Wang Z., et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44(W1). P. W90-97. doi: 10.1093/nar/gkw377.
25. Lelandais-Brière C., Naya L., Sallet E., Calenge F., Frugier F., Hartmann C., et al. Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *Plant Cell*. 2009. V. 21(9). P. 2780–96. doi: 10.1105/tpc.109.068130.
26. Li C., Zhang B. MicroRNAs in Control of Plant Development: MicroRNAs AND PLANT DEVELOPMENT. *J Cell Physiol.* 2016. V. 231(2). P. 303–13. doi: 10.1002/jcp.25125.
27. Lin S-S., Chen Y., Lu M-YJ. Degradome Sequencing in Plants. In: de Folter S, editor. *Plant MicroRNAs*. 2019. V. 1932, P. 197–213.
28. Liu C-G., Calin GA., Volinia S., Croce CM. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc*. 2008. V. 3(4). P. 563–78. doi: 10.1038/nprot.2008.14.
29. Marín-González E., Suárez-López P. “And yet it moves”: Cell-to-cell and long-distance signaling by plant microRNAs. *Plant Sci.* 2012. V. 196. P. 18–30. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.009.
30. Millar AA., Waterhouse PM. Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Funct Integr Genomics*. 2005. V. 5(3). P. 129–35. doi: 10.1007/s10142-005-0145-2.
31. Moriya Y., Itoh M., Okuda S., Yoshizawa AC., Kanehisa M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res*. 2007; V. 35(Web Server issue). P. W182-185. doi: 10.1093/nar/gkm321.
32. Müller LM., Harrison MJ. Phytohormones, miRNAs, and peptide signals integrate plant phosphorus status with arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 2019. V. 50. P. 132–9. doi: 10.1016/j.pbi.2019.05.004.
33. Nguyen GN., Rothstein SJ., Spangenberg G., Kant S. Role of microRNAs involved in plant response to nitrogen and phosphorous limiting conditions. *Front Plant Sci*. 2015. V. 6. P. 629. doi: 10.3389/fpls.2015.00629.
34. Nithin C., Thomas A., Basak J., Bahadur RP. Genome-wide identification of miRNAs and lncRNAs in *Cajanus cajan*. *BMC Genomics*. 2017. V. 18(1). P. 878. doi: 10.1186/s12864-017-4232-2.
35. Okuma N., Soyano T., Suzaki T., Kawaguchi M. MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature

miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. *Nat Commun*. 2020. V. 11(1). P. 5192. doi: 10.1038/s41467-020-19037-9.
36. Ouyang S., Park G., Atamian HS., Han CS., Stajich JE., Kaloshian I., et al. MicroRNAs Suppress NB Domain Genes in Tomato That Confer Resistance to *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathog*. 2014. V. 10(10). P. e1004464. doi: 10.1371/journal.ppat.1004464.
37. Pimprikar P., Gutjahr C. Transcriptional Regulation of Arbuscular Mycorrhiza Development. *Plant Cell Physiol*. 2018. V. 59(4). P. 678–95. doi: 10.1093/pcp/pcy024.
38. Qiu T., Du K., Jing Y., Zeng Q., Liu Z., Li Y., et al. Integrated transcriptome and miRNA sequencing approaches provide insights into salt tolerance in allotriploid *Populus cathayana*. *Planta*. 2021. V. 254(2). P. 25. doi: 10.1007/s00425-021-03600-9.
39. Quail MA., Kozarewa I., Smith F., Scally A., Stephens PJ., Durbin R., et al. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nat Methods*. 2008. V. 5(12). P. 1005–10. doi: 10.1038/nmeth.1270.
40. Quail MA., Smith M., Coupland P., Otto TD., Harris SR., Connor TR., et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;V. 13. P. 341. doi: 10.1186/1471-2164-13-341.
41. Rogers K., Chen X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*. 2013. V. 25(7). P. 2383–99. doi: 10.1105/tpc.113.113159.
42. Rothberg JM., Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008. V. 26(10). P. 1117–24. doi: 10.1038/nbt1485.
43. Satish D., Mukherjee SK., Gupta D. PAmiRDB: A web resource for plant miRNAs targeting viruses. *Sci Rep*. 2019. V. 9(1). P. 4627. doi: 10.1038/s41598-019-41027-1.
44. Scheublin TR., Van Der Heijden MGA. Arbuscular mycorrhizal fungi colonize nonfixing root nodules of several legume species. *New Phytol*. 2006. V. 172(4). P. 732–8. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01858.x.
45. Schmittgen TD., Lee EJ., Jiang J., Sarkar A., Yang L., Elton TS., et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods San Diego Calif*. 2008; V. 44(1). P. 31–8. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.09.006.
46. Silvestri A., Fiorilli V., Miozzi L., Accotto GP., Turina M., Lanfranco L. *In silico* analysis of fungal small RNA accumulation reveals putative plant mRNA targets in the symbiosis between an arbuscular mycorrhizal fungus and its host plant. *BMC Genomics*. 2019. V. 20(1). P. 169. doi: 10.1186/s12864-019-5561-0.
47. Sun X., Dong B., Yin L., Zhang R., Du W., Liu D., et al. PMTED: a plant microRNA target expression database. *BMC Bioinformatics*. 2013. V. 14. P. 174. doi: 10.1186/1471-2105-14-174.
48. Shapulatov U., van Hoogdalem M., Schreuder M., Bouwmeester H., Abdurakhmonov IY., van der Krol AR. Functional intron-derived miRNAs and host-gene expression in plants. *Plant Methods*. 2018. V. 14(1). P. 83. doi: 10.1186/s13007-018-0351-2.
49. Thody J., Folkes L., Medina-Calzada Z., Xu P., Dalmay T., Moulton V. PAREsnip2: a tool for high-throughput prediction of small RNA targets from degradome sequencing data using configurable targeting rules. *Nucleic Acids Res*. 2018. V. 46(17). P. 8730–9. doi: 10.1093/nar/gky609.
50. Tian T., Liu Y., Yan H., You Q., Yi X., Du Z., et al. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res*. 2017. V. 45(W1). P. W122–9. doi: 10.1093/nar/gkx382.
51. Tsikou D., Yan Z., Holt DB., Abel NB., Reid DE., Madsen LH., et al. Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*. 2018. V. 362(6411). P. 233–6. doi: 10.1126/science.aat6907.
52. Wang H., Wang H., Liu R., Xu Y., Lu Z., Zhou C. Genome-Wide Identification of TCP Family Transcription Factors in *Medicago truncatula* Reveals Significant Roles of miR319-Targeted TCPs in Nodule Development. *Front Plant Sci*. 2018. V. 9. P. 774. doi: 10.3389/fpls.2018.00774
53. Wang T-Z., Zhang W-H. Genome-wide identification of microRNAs in *Medicago truncatula* by high-throughput sequencing. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013. V. 1069. P. 67–80. doi: 10.1007/978-1-62703-613-9_6.
54. Yi X., Zhang Z., Ling Y., Xu W., Su Z. PNRD: a plant non-coding RNA database. *Nucleic Acids Res*. 2015. V. 43(D1). P. D982–9. doi: 10.1093/nar/gku1162.
55. Yu L., Guo R., Jiang Y., Ye X., Yang Z., Meng Y., et al. Genome-wide identification and characterization of novel microRNAs in seed development of soybean. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019. V. 83(2). P. 233–42. doi: 10.1080/09168451.2018.1536513.
56. Yu Y., Jia T., Chen X. The 'how' and 'where' of plant micro RNAs. *New Phytol*. 2017. V. 216(4). P. 1002–17. doi: 10.1111/nph.14834.
57. Yue H., Huang L-P., Lu D-Y-H., Zhang Z-H., Zhang Z., Zhang D-Y., et al. Integrated Analysis of microRNA and mRNA Transcriptome Reveals the Molecular Mechanism of *Solanum lycopersicum* Response to Bemisia tabaci and Tomato chlorosis virus. *Front Microbiol*. 2021. V. 12. P. 693574. doi: 10.3389/fmicb.2021.693574.
58. Zheng Q., Wang X-J. GOEAST: a web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008. V. 36(Web Server issue). P. W358-363. doi: 10.1093/nar/gkn276.