

СОЗДАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ЗОНДА «СТЕБЕЛЬ-ПЕТЛЯ» ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОРНК miR165a В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ

Д.Н. Федорин, В.О. Чуйкова, А.Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 09.02.2023 г.

Аннотация. МикроРНК – класс малых некодирующих РНК, имеющих длину от 18 до 25 нуклеотидов и встречающихся в большинстве эукариотических организмов. Важную роль микроРНК могут играть в эпигенетических механизмах регуляции генома, включая метилирование ДНК, модификацию РНК и гистонов. МикроРНК принимают участие в регуляции разнообразных физиологических и биохимических процессов клетки. Имеется ряд светозависимых микроРНК, обеспечивающих реализацию сигнала от различных фоторецепторов растительной клетки. ПЦР в реальном времени позволяет провести количественную оценку зрелой микроРНК при использовании специфических праймеров «стебель-петля» с большой эффективностью и специфичностью. Типичный праймер для обратной транскрипции «стебель-петля» включает 5–8-нуклеотидную последовательность 3'-элемента, комплементарную 3'-концу зрелой микроРНК, последовательность стебля и петли, которая также содержит универсальный 3'-сайт праймирования для последующего ПЦР-РВ. Был разработан специфический зонд для количественной оценки зрелой микроРНК miR165a с помощью ПЦР в реальном времени, который представляет собой 80-нуклеотидную кДНК второй цепи на основе матрицы miR-N1, формируемой при проведении обратной транскрипции. Разработанный зонд охватывает соединение последовательности зрелой микроРНК-стебель-петля, не перекрывает прямой праймер и максимально увеличивает свою длину для увеличения своей температуры плавления. Для количественной оценки зрелой miR165a была выделена суммарная фракция микроРНК из листьев кукурузы. Результаты ПЦР-анализа кДНК, полученной на основе разработанного зонда из листьев кукурузы со специфическими праймерами к miR165a, показали наличие одной полосы при электрофоретическом исследовании, что является результатом специфического связывания праймеров с матрицей. Размер полученных ПЦР-продуктов составил ~80 пн., что совпадает с теоретически рассчитанным размером на основе разработанного зонда для данной микроРНК. Следовательно, использование в качестве матрицы зонда «стебель-петля» к miR165a при получении кДНК, позволяет проводить ее количественную оценку методом ПЦР в реальном времени в кукурузе в различных экспериментальных условиях.

Ключевые слова: микроРНК, экспрессия гена, полимеразная цепная реакция, зонд, регуляция

МикроРНК представляют собой одноцепочечные РНК длиной ~22 нуклеотида, которые регулируют экспрессию генов с помощью различных механизмов. В настоящее время описано более 4000 микроРНК в 168 видах организмов [1]. Выявлена ключевая роль микроРНК в связывании с 3'-нетранслируемым концом мРНК и последующем индуцировании деградации мРНК или ингибировании трансляции мРНК. МикроРНК, как эпигенетические модуляторы, влияют на уровни белка целевых мРНК без модификации последовательностей генов [2]. Кроме того, микроРНК

также могут регулироваться эпигенетическими модификациями, включая метилирование ДНК, модификацию РНК и гистонов. Известно, что микроРНК у растений нацелены в основном на факторы транскрипции и участвуют в различных аспектах роста и развития растений [3].

МикроРНК участвуют в световой регуляции метаболизма растений. Регуляция светозависимых микроРНК растений может происходить по меньшей мере через три различных механизма: регуляция транскрипции гена микроРНК и ее уровней, регуляция процессинга микроРНК посредством воздействия на компоненты механизма биогенеза микроРНК и регуляция функции ми-

кроРНК посредством контроля факторов RISC [4, 5]. В свою очередь, микроРНК могут нацеливаться на гены, кодирующие компоненты световых сигнальных путей, тем самым влияя на световые реакции, такие как фотоморфогенез и зависящее от фотопериода цветение [6].

Свет, фотопериод и циркадные часы модулируют уровни экспрессии генов микроРНК. Эта регуляция достигается за счет присутствия светочувствительных элементов в их промоторах и может быть вызвана специфическими свойствами света (красный, синий, дальний красный, УФ-А и УФ-В) [6].

Известно множество семейств светозависимых микроРНК: miR 156/157, miR167, miR170/171, miR398, miR172, miR396, miR408, miR160, miR164, miR858, miR827, miR403, miR530, miR2876, в том числе и miR 165/166 [7, 8].

miR165a имеет 18 нуклеотидов, полностью совпадающих с целевыми последовательностями генов семейства HD-ZIP III, за исключением АТНВ-15 с одним дополнительным несоответствием [9].

Поскольку различные качества света могут вызывать различные реакции развития, некоторые из которых могут быть вредными, было разработано несколько подходов к скринингу, чтобы понять, как свет, особенно при сильном освещении, УФ-А и УФ-В излучение может модулировать накопление микроРНК и их мишеней. Тринадцать семейств miRNA, в том числе и miR165/166, реагирует на УФ-В излучение. Это связано с тем, что данная микроРНК содержит многочисленные мотивы обеспечивающего реализацию светозависимого сигнала, такие как сайты GT-1, G-боксы, I-боксы, ССААТ-боксы и GATA-боксы [10, 11, 12], что согласуется с влиянием света на эти гены.

Среди мишеней УФ-В-регулируемых микроРНК являются факторы транскрипции, несколько факторов, участвующих в передаче сигналов ауксинов, и факторы, участвующие в ответах на другие стрессы [10, 11, 12]. В большинстве случаев, как и следовало ожидать, существует обратная корреляция между действием UV-B на микроРНК и на их соответствующие целевые транскрипты [10, 11, 12]. Например, у кукурузы увеличение miR165/166 коррелировало с ингибированием их целевого гена, кодирующего фактор транскрипции HD-ZIP III. В соответствии с ролью этих микроРНК в разграничении транскриптов HD-ZIP III на адаксиальной стороне зачатков листа [13], УФ-В-зависимая репрессия RLD1 была

связана с выгибанием листа, что указывает на роль miR165/166 в этом ответе на УФ-В [14].

Помимо ультрафиолетового излучения, высокий уровень освещенности также может быть вредным для развития различных видов растений. Сильное освещение контролирует экспрессию микроРНК. Глобальный анализ светорегулируемых микроРНК показывает, что на многочисленные семейства микроРНК влияют различные условия освещения [7]. Установлено, что световой сигнал окружающей среды способствует изменению активности miR165/166, опосредуемой через транскрипционный фактор PIF4 [15].

Наиболее изученной является miR165/166, обеспечивающая широкий спектр регуляторных механизмов эпигенетического контроля генома. Исследования данной микроРНК показали репрессию ряда генов в развитии растительного организма. miR165/166 HD-ZIP III поддерживает меристематические клетки, адаксиальную идентичность листьев, боковой рост корней и идентичность прокамбия [9].

Изменение содержания свободной miR165a носит фитохром-зависимый характер, что обусловлено вариацией ее содержания в клетках кукурузы в зависимости от состояния фитохрома. Колебания количества анализируемой микроРНК в клетках листьев кукурузы при облучении светом разной длины волны связано со скоростью ее синтеза из предшественника, с системой контроля и деградации, с участием микроРНК в регуляции гена [16].

В связи с этим, целью нашей работы являлась разработка специфического зонда для оценки изменения количества свободной микроРНК в листьях кукурузы.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта для исследования были использованы листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.), которая была выращена гидропонным способом при 25°C, 12-часовом световом дне с интенсивностью 90 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹. Белый свет получали от ламп дневного света в установке «Флора-1».

Выделение микроРНК из растительных образцов осуществляли с помощью модифицированного метода фенол-хлороформной экстракции. Применение полиэтиленгликоля 1500 с использованием в качестве осадителя 2.5 М LiCl в присутствии 96% этанола обеспечило высокий выход и качественную экстракцию микроРНК, которую

использовали для дальнейших аналитических исследований [17].

Для получения кДНК анализируемой микроРНК проводили обратную транскрипцию со специфическим разработанным зондом для miR165a. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью набора MMLV RT kit (ЗАО «Евроген») согласно рекомендациям производителя, на приборе Терцик (ДНК-Технология, Россия). Параметры проведения обратной транскрипции следующие: инкубация смеси при 16°C – 30 мин, 42°C – 30 мин, 85°C – 5 мин [18].

Количественную оценку зрелой микроРНК miR_165A проводили с помощью полимеразной цепной реакции на приборе Терцик (ДНК-Технология, Россия). В качестве прямого праймера использовали специфически созданную нуклеотидную последовательность 5'-CACTGATCGGACCAGGCTTCA-3', а обратного 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'. Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация - 95°C 3 мин, цикл - 95°C - 30 сек., 52°C – 30 сек., 72°C – 30 сек., финальная элонгация - 72°C – 10 минут.

Контроль качества РНК и продуктов амплификации со специфичными праймерами осуществлялся с помощью гель-электрофореза в 2% агарозном геле.

Каждый опыт проводился в 3-4 кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Для получения достоверных данных использовались методы статистической обработки. Результаты являются достоверными, если различия между ними не больше $p \leq 0.05$ [19].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применение фенол-хлороформной экстракции позволило выделить общую РНК клетки практически без следов дегградации (рис. 1А). Об этом свидетельствует наблюдаемое на геле преобладание количества 28S рРНК над 18S рРНК, что является одним из важных критериев качества препарата РНК. Для преципитации низкомолекулярных РНК из суммарной фракции, нами был применен в качестве специфического соосадителя ПЭГ 1500. Электрофорез в 2 %-ом агарозном геле показал эффективность используемой схемы, поскольку на электрофореграмме не обнаружено высокомолекулярных РНК, прежде всего 18S и 28S рРНК (рис. 1Б), но при этом показано наличие низкомолекулярных нуклеиновых кислот.

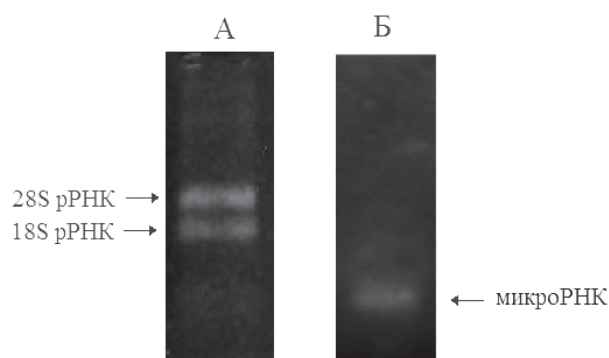


Рис. 1. Электрофореграмма суммарной РНК (А) и микроРНК (Б) из листьев кукурузы при фенол-хлороформной экстракции специфическим соосадителем полиэтиленгликоль 1500.

Для количественного определения микроРНК применяется схема обратной транскрипции-ПЦР. Для этого применяется специфически организованный праймер по типу «стебель-петля», обеспечивающий формирование кДНК-матрицы для дальнейшей ПЦР [20].

Конструкция олигонуклеотидов «стебель-петля» способна специфически обратно транскрибировать только выбранную зрелую микроРНК, которая впоследствии амплифицируется с помощью ПЦР. Типичный праймер для обратной транскрипции «стебель-петля» включает 5–8-нуклеотидную последовательность 3'-элемента, комплементарную 3'-концу зрелой микроРНК, последовательность стебля и петли, которая также содержит универсальный 3'-сайт праймирования для последующего ПЦР.

Наиболее важным соображением для дизайна анализа является знание точной последовательности микроРНК, представляющей интерес.

Схема разработки зонда для количественной оценки miR165a включает следующие этапы [18]:

Последовательность интересующей микроРНК: 5'- UCGGACCAGGCUUCAUCCCC-3'

Для увеличения размера ПЦР-продукта, необходимого для его количественной оценки методом ПЦР в реальном времени, использовали последовательность из 44 нуклеотидов, представляющую собой вариант «стебель-петля», 5'-GTTCGATC-CAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG-GATACGAC-3' [18] с комплементом из шести 3'-нуклеотидов. Эта шести нуклеотидная последовательность (выделено желтым) представляет собой последовательность зрелой микроРНК, что является праймером обратной транскрипции

«стебель-петля» miR165a: 5'- *GTCGTATCCAGTG-CAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACG-GGGAT* -3'.

Прямой праймер для ПЦР в реальном времени должен максимально перекрывать зрелую последовательность микроРНК, для этого за основу берутся первые 12 нуклеотидов 5'-конца зрелой микроРНК и 6 дополнительных 5'-нуклеотидов (выделено желтым), выбранных для получения температуры отжига праймеров близкой к 60°C. Полученная последовательность является прямым праймером для проведения ПЦР в реальном времени: 5'-*CACTGATCGGACCAGGCTTCA*-3'.

При разработке обратного праймера для проведения ПЦР в реальном времени в качестве основы использовали одну и ту же последовательность «стебель-петля» из 44 нуклеотидов. Последовательность обратного праймера, описанная, представляет собой: 5'-*GTGCAGGGTCCGAGG* T-3'.

Длина зонда, применяемого при проведении ПЦР в реальном времени, строго ограничена, так как большая половина длины miRNA покрыта прямым праймером. В идеале температура плавления зонда должна быть близка к 70°C, а его длина может составлять от 12 до 17 нуклеотидов. Связующее вещество малой бороздки (МГВ), которое конъюгировано с зондом, важно для увеличения Tm более короткой последовательности. При разработке этого зонда полезно предусмотреть конечные прямые и обратные нити продукта ПЦР.

После добавления к базовому зонду из 44 нуклеотидов последовательности обратного праймера для кПЦР, к 3'-концу последовательности стебельной петли добавили 20-нуклеотидный комплемент микроРНК, что увеличило размер целевого продукта амплификации до 64 нуклеотидов.

После этого добавили шесть 5'-концевых нуклеотидов прямого праймера для ПЦР-РВ к 5'-концу полученного ранее зонда. Результатом формирования специфического зонда для количественной оценки зрелой микроРНК miR165a с помощью ПЦР в реальном времени является 70-нуклеотидная кДНК второй цепи miR-N1, формируемая при проведении обратной транскрипции. Разработанный зонд охватывает соединение последовательности зрелой микроРНК-стебель-петля, не перекрывает прямой праймер и максимально увеличивает свою длину для увеличения своей температуры плавления: 5'-*GTCGTATC-CAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGGGAT*-3'.

Результаты ПЦР-анализа кДНК со специфическими праймерами к miR165a показали наличие одной полосы при электрофоретическом исследовании, что является результатом специфического связывания праймеров с матрицей (рис. 2). Размер полученных ПЦР-продуктов составил ~80 пн., что совпадает с теоретически рассчитанным размером на основе разработанного зонда для данной микроРНК.

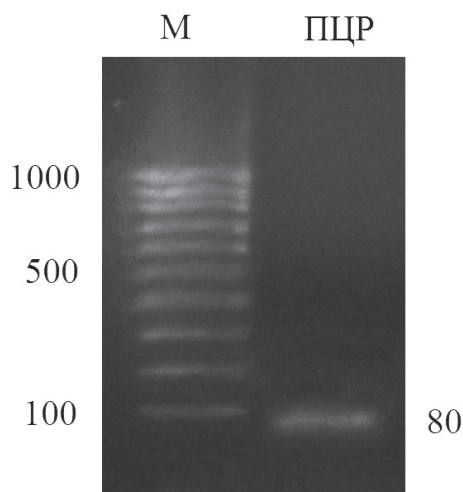


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов со специфическими праймерами к miR165a. М – маркеры длин нуклеотидных последовательностей, ПЦР – продукт амплификации.

Таким образом, разработанный зонд позволяет проводить количественную оценку miR165a в культуре в различных экспериментальных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение в ходе исследования модифицированной методики фенол-хлороформной экстракции суммарной клеточной РНК с применением полиэтиленгликоля 1500 в качестве соосадителя РНК позволило осуществить выделение микроРНК, которая может использоваться при количественном исследовании ее содержания в клетках исследуемых организмов методом ПЦР в реальном времени.

Результаты проведенного исследования показали, что разработка специфического зонда на основе 44 нуклеотидов, представляющего собой вариант «стебель-петля», дает возможность получить продукты амплификации нужного размера. 80-нуклеотидная кДНК второй цепи miR-N1, формируемая при проведении обратной транскрипции, позволяет провести количественную оценку свободной miR165a с помощью ПЦР в реальном времени.

Получение специфического продукта методом ПЦР из РНК листьев кукурузы свидетельствует о возможности применения разработанного зонда к miR165a на основе 44-нуклеотидной последовательности miR-N1, организованной по типу «стебель-петля», для проведения количественной оценки свободной зрелой микроРНК 165a.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borges F., Martienssen R.A. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2015. Vol. 16, pp. 727-741. DOI: 10.1038/nrm4085.
2. Chuang J., Jones P. // Pediatric Research. 2007. Vol. 61, pp. 24-29. DOI: 10.1203/pdr.0b013e3180457684.
3. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. // Annu Rev Plant Biol. 2006. Vol. 57. Pp. 19-53. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218.
4. Kim V.N., Nam J.W. // Trends Genet. 2006. Vol. 22, pp. 165–173. DOI: 10.1016/j.tig.2006.01.003.
5. Lee Y., Jeon K., Lee J.T., Kim S., Kim V.N. // EMBO J. 2002. Vol. 21, pp. 4663–4670. DOI: 10.1093/emboj/cdf476.
6. Sanchez-Retuerta C., Suarez-Lopez P., Henriques R. // Front. Plant Sci. 2018. Vol. 9:962. DOI: 10.3389/fpls.2018.00962.
7. Sun W., Xu X.H., Wu X., Wang Y., Lu X., Sun H., Xie X. // Front. Plant Sci. 2015. Vol. 29, e372. DOI: 10.3389/fpls.2015.00372.
8. Zhang H., He H., Wang X., Wang X., Yang X., Li L., Deng X.W. // Plant J., 2011. Vol. 65, pp. 346-358. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04426.x.
9. Zhou G-K., Kubo M., Zhong R., Demura T., Ye Z-H. // Plant and Cell Physiology. 2007. Vol. 48, pp. 391–404. Doi: 10.1093/pcp/pcm008.
10. Zhou X., Wang G., Zhang W. // Mol. Syst. Biol. 2007. Vol. 3:103. DOI: 10.1038/msb4100143.
11. Jia X., Ren L., Chen Q.-J., Li R., Tang G. // J. Plant Physiol. 2009. Vol. 166, pp. 2046–2057. DOI: 10.1016/j.jplph.2009.06.011.
12. Wang B., Sun Y., Song N., Wang X., Feng H., Huang L., Kang Z.S. // Genet. Mol. Res. 2013. Vol. 12, pp. 4213–4221. DOI: 10.4238/2013.October.7.7.
13. Juarez M.T., Kui J.S., Thomas J., Heller B.A., Timmermans M.C.P. // Nature. 2004. Vol. 428, pp. 84–88. DOI: 10.1038/nature02363.
14. Casati P., Stapleton A., Blum J., Walbot V. // Plant J. 2006. Vol. 46, pp. 613-627. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02721.x.
15. Huq E., Quail P.H. // EMBO J. 2002. Vol. 21, pp. 2441-2450. DOI: 10.1093/emboj/21.10.2441.
16. Zhang C., Fan L., Le B.H., Ye P., Mo B., Chen X. // Developmental Cell. 2020. Vol. 55, pp. 603-616. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.10.019.
17. Федорин Д.Н., Чуйкова В.О., Епринцев А.Т. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 885-892. DOI: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10895.
18. Martha F. Kramer. // Curr Protoc Mol Biol. 2011. Vol. 5:10. DOI: 10.1002/0471142727.mb1510s95.
19. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 351с.
20. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33, e179. DOI: 10.1093/nar/gni178.

*Воронежский государственный университет
Федорин Д. Н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки,
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Чуйкова В. О., бакалавр кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: v.chuykova2020@mail.ru*

*Епринцев А. Т., заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Voronezh State University
Fedorin D. N., assistant professor of biochemistry and cell physiology
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Chuykova V. O., Bachelor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology
E-mail: v.chuykova2020@mail.ru*

*Eprintsev A. T., head of the department of biochemistry and cell physiology
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

CREATION OF A SPECIFIC STEM-LOOP PROBE FOR IDENTIFICATION OF MIR165A MICRORNAS IN CORN LEAVES

D.N. Fedorin, V.O. Chuykova, A.T. Eprintsev

FSBEI HE "Voronezh State University"

Abstract. MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs ranging in length from 18 to 25 nucleotides and found in most eukaryotic organisms. MicroRNAs can play an important role in epigenetic mechanisms of genome regulation, including DNA methylation, RNA and histone modification. MicroRNAs are involved in the regulation of various physiological and biochemical processes in the cell. There are a number of light-dependent microRNAs that provide signal realization from various plant cell photoreceptors. Real-time PCR allows the quantification of mature miRNA using specific stem-loop primers with great efficiency and specificity. A typical primer for stem-loop reverse transcription includes a 5–8-nucleotide 3'-element sequence complementary to the 3'-end of the mature microRNA, a stem-loop sequence that also contains a universal 3'-priming site for subsequent RT-PCR. A specific probe was developed for the quantitative assessment of mature miR165a microRNA using real-time PCR, which is an 80-nucleotide second-strand cDNA based on the miR-H1 template, formed during reverse transcription. The designed probe spans the mature miRNA stem-loop sequence junction, does not overlap the forward primer, and maximizes its length to increase its melting point. To quantify mature miR165a, a total miRNA fraction was isolated from maize leaves. The results of PCR analysis of cDNA obtained on the basis of the developed probe from corn leaves with specific primers to miR165a showed the presence of one band during electrophoretic study, which is the result of specific binding of the primers to the template. The size of the obtained PCR products was ~80 bp, which coincides with the theoretically calculated size based on the developed probe for this miRNA. Therefore, the use of the stem-loop probe to miR165a as a template when obtaining cDNA makes it possible to quantify it by real-time PCR in corn under various experimental conditions.

Keywords: miRNA, gene expression, polymerase chain reaction, probe, regulation

REFERENCES

1. Borges F., Martienssen R.A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2015, Vol. 16, pp. 727-741. DOI: 10.1038/nrm4085.
2. Chuang J., Jones P., *Pediatric Research*, 2007, Vol. 61, pp. 24-29. DOI: 10.1203/pdr.0b013e3180457684.
3. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B., *Annu Rev Plant Biol.*, 2006, Vol. 57, pp. 19-53. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218.
4. Kim V.N., Nam J.W., *Trends Genet.*, 2006, Vol. 22, pp. 165–173. DOI: 10.1016/j.tig.2006.01.003.
5. Lee Y., Jeon K., Lee J.T., Kim S., Kim V.N., *EMBO J.*, 2002, Vol. 21, pp. 4663–4670. DOI: 10.1093/emboj/cdf476.
6. Sanchez-Retuerta C., Suarez-Lopez P., Henriques R., *Front. Plant Sci.*, 2018, Vol. 9:962. DOI: 10.3389/fpls.2018.00962.
7. Sun W., Xu X.H., Wu X., Wang Y., Lu X., Sun H., Xie X., *Front. Plant Sci.*, 2015, Vol. 29, e372. DOI: 10.3389/fpls.2015.00372.
8. Zhang H., He H., Wang X., Wang X., Yang X., Li L., Deng X.W., *Plant J.*, 2011, Vol. 65, pp. 346-358. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04426.x.
9. Zhou G-K., Kubo M., Zhong R., Demura T., Ye Z-H., *Plant and Cell Physiology*, 2007, Vol. 48, pp. 391–404. Doi: 10.1093/pcp/pcm008.
10. Zhou X., Wang G., Zhang W., *Mol. Syst. Biol.*, 2007, Vol. 3:103. DOI: 10.1038/msb4100143.
11. Jia X., Ren L., Chen Q.-J., Li R., Tang G., *J. Plant Physiol.*, 2009, Vol. 166, pp. 2046–2057. DOI: 10.1016/j.jplph.2009.06.011.
12. Wang B., Sun Y., Song N., Wang X., Feng H., Huang L., Kang Z.S., *Genet. Mol. Res.*, 2013, Vol. 12, pp. 4213–4221. DOI: 10.4238/2013.October.7.7.
13. Juarez M.T., Kui J.S., Thomas J., Heller B.A., Timmermans M.C.P., *Nature*, 2004, Vol. 428, pp. 84–88. DOI: 10.1038/nature02363.
14. Casati P., Stapleton A., Blum J., Walbot V., *Plant J.*, 2006, Vol. 46, pp. 613-627. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02721.x.
15. Huq E., Quail P.H., *EMBO J.*, 2002, Vol. 21, pp. 2441-2450. DOI: 10.1093/emboj/21.10.2441.
16. Zhang C., Fan L., Le B.H., Ye P., Mo B., Chen X., *Developmental Cell*, 2020, Vol. 55, pp. 603-616. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.10.019.
17. Fedorin D.N., Chuykova V.O., Eprintsev A.T., Сорбтсионныe i khromatograficheskiye

protsessy, 2022, Vol. 22, No 6, pp. 885-892. DOI: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10895.

18. Martha F. Kramer., Curr Protoc Mol Biol., 2011, Vol. 5:10. DOI: 10.1002/0471142727.mb1510s95.

19. Lakin G.F. Biometriya. – M.: Vyssh. shk., 1990. – 351s.

20. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J., Nucleic Acids Res, 2005, Vol. 33, e179. DOI: 10.1093/nar/gni178.