

doi 10.18699/vjgb-25-136

Компьютерное предсказание сети взаимодействий длинных некодирующих РНК и микроРНК кукурузы на основе транскриптома мутантной линии *fuzzy tassel*

Ц. Янь¹ , А.Ю. Пронозин , Д.А. Афонников 

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

 t.yan5@g.nsu.ru

Аннотация. Длинные некодирующие РНК (днРНК) играют важную роль в регуляции экспрессии генов, включая взаимодействия с микроРНК (миРНК), выполняя функцию молекулярных «губок». Для предсказания таких взаимодействий, как правило, применяются методы биоинформатики. Для уточнения предсказаний компьютерных программ можно использовать дополнительные данные на основе коэкспрессии миРНК и днРНК. В настоящей работе исследуются потенциальные взаимодействия между днРНК и миРНК у мутантной линии кукурузы *fuzzy tassel* (*fzt*), характеризующейся сниженной экспрессией некоторых миРНК вследствие мутации в гене *Dicer-like1* (*DCL1*) в тканях побега и соцветия. Проведена сборка транскриптомов на основе данных RNA-seq побега и соцветия кукурузы контрольной и мутантной линий. Данные были взяты из архива SRA NCBI. Для побега было идентифицировано десять днРНК, достоверно изменяющих свой уровень экспрессии между контрольной и мутантной группами, девять из них повышают экспрессию у мутантных растений. Для соцветия идентифицировано 34 дифференциально экспрессирующихся днРНК (20 с повышенным уровнем экспрессии у мутантных линий). Для днРНК с повышенным уровнем собственной экспрессии и миРНК с пониженным уровнем экспрессии в мутантных линиях были предсказаны потенциальные взаимодействия с помощью алгоритма машинного обучения PmiPred. С использованием программы IntaRNA подтверждена возможность комплементарного связывания для выявленных пар миРНК–днРНК, что позволило построить конкурирующие эндогенные РНК-сети. Анализ структуры этих сетей показал, что отдельные днРНК способны связывать несколько миРНК одновременно, подтверждая их регуляторную функцию в качестве «губок» для миРНК. Полученные результаты углубляют понимание посттранскрипционной регуляции у кукурузы и открывают перспективы для селекционных разработок, направленных на повышение стрессоустойчивости и продуктивности растений.

Ключевые слова: днРНК; миРНК; регуляция генов; кукуруза; мутация *fzt*; *DCL1*; биоинформатика; взаимодействие РНК; конкурирующие эндогенные РНК

Для цитирования: Янь Ц., Пронозин А.Ю., Афонников Д.А. Компьютерное предсказание сети взаимодействий длинных некодирующих РНК и микроРНК кукурузы на основе транскриптома мутантной линии *fuzzy tassel*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(8):1295-1303. doi 10.18699/vjgb-25-136

Финансирование. Работа поддержана бюджетным проектом № FWNR-2022-0020.

Благодарности. Обработка данных проводилась с использованием вычислительных ресурсов ЦКП «Биоинформатика» ИЦиГ СО РАН.

Computational prediction of the interaction network between long non-coding RNAs and microRNAs in maize based on the transcriptome of the *fuzzy tassel* mutant line

J. Yan¹ , A.Yu. Pronozin , D.A. Afonnikov 

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 t.yan5@g.nsu.ru

Abstract. Long non-coding RNAs (lncRNAs) play an important role in the regulation of gene expression, including interactions with microRNAs (miRNAs), acting as molecular “sponges”. Bioinformatics methods are generally used to predict such interactions. To refine computational predictions, additional evidence based on the co-expression of miRNAs and lncRNAs can be incorporated. In the present study, we investigated potential interactions between lncRNAs and miRNAs in the maize mutant line *fuzzy tassel* (*fzt*), which is characterized by reduced expression of certain

miRNAs due to a mutation in the *Dicer-like1 (DCL1)* gene in shoot and tassel tissues. Transcriptome assembly was performed based on RNA-seq data from maize shoot and tassel tissues of control and mutant lines, with data obtained from the NCBI SRA archive. In the shoot, 10 lncRNAs with significantly altered expression levels between control and mutant groups were identified, 9 of which were upregulated in the mutant plants. In the tassel, 34 differentially expressed lncRNAs were identified, with 20 showing increased expression in the mutant line. For lncRNAs with increased expression and miRNAs with decreased expression in the mutant line, potential interactions were predicted using the machine learning algorithm PmliPred. The IntaRNA program was used to confirm possible complementary binding for the identified miRNA–lncRNA pairs, which enabled the construction of competing endogenous RNA (ceRNA) networks. Structural analysis of these networks revealed that certain lncRNAs are capable of binding multiple miRNAs simultaneously, supporting their regulatory role as “sponges” for miRNAs. The results obtained deepen our understanding of post-transcriptional regulation in maize and open new perspectives for breeding strategies aimed at improving stress tolerance and crop productivity.

Key words: lncRNA; miRNA; gene regulation; maize; *fuzzy tassel (fzt)*; *DCL1*; bioinformatics; RNA interaction; competing endogenous RNA (ceRNA)

For citation: J. Yan, Pronozin A.Yu., Afonnikov D.A. Computational prediction of the interaction network between long non-coding RNAs and microRNAs in maize based on the transcriptome of the *fuzzy tassel* mutant line. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(8):1295–1303. doi 10.18699/vjgb-25-136

Введение

В последние годы благодаря быстрому развитию технологий высокопроизводительного секвенирования нового поколения стало возможным выявление десятков тысяч транскриптов, не кодирующих белки (Sheng et al., 2023). Первоначально такие последовательности считались шумом. Однако дальнейшие исследования показали, что около 75 % транскриптов в клетках не несут кодирующую функцию, но при этом активно участвуют в регуляции экспрессии генов (Wang L., Wang J.W., 2015). Некодирующие РНК (нкРНК) принято классифицировать на служебные и регуляторные. В свою очередь, регуляторные нкРНК делятся на малые и длинные в зависимости от длины молекулы (Li R. et al., 2016). На сегодняшний день биологические функции малых нкРНК, в особенности микроРНК (мРНК), достаточно хорошо изучены, они способны ингибировать экспрессию мРНК на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Однако функции длинных некодирующих РНК (днРНК) остаются недостаточно изученными, особенно у растений.

В последние годы исследователи обнаружили, что между днРНК и мРНК существуют сложные взаимодействия, играющие ключевую роль во множестве биологических процессов. Выделяют несколько механизмов взаимодействия (Pronozin, Afonnikov, 2025). Например, днРНК может выступать в качестве молекулярных «губок», комплементарно связываясь с мРНК, предотвращая их взаимодействие с мРНК мишениями. Такие взаимодействия участвуют в регуляции роста, развития, дифференцировки тканей и ответов на стресс у растений. Однако в связи с ограниченностью масштабных биологических экспериментов существует потребность в применении биоинформационных методов для выявления таких взаимодействий (Sheng et al., 2023).

Разработанный на сегодняшний день метод PmliPred позволяет обнаружить взаимодействия между днРНК и мРНК (Kang et al., 2020). Данный метод основан на использовании глубокого обучения для прогнозирования взаимодействий между молекулами. Информация о потенциальных взаимодействиях между мРНК и днРНК может быть полезна для моделирования регуляторных сетей, участвующих в экспрессии генов. Также полу-

ченные результаты могут стать основой для дальнейших функциональных экспериментов и иметь прикладное значение в селекционной практике. Следует отметить, что информацию о потенциальных взаимодействиях миРНК и днРНК можно получить на базе анализа их коэкспрессии (He et al., 2020).

Настоящая работа направлена на идентификацию взаимодействий между днРНК и мРНК у кукурузы с применением биоинформационических подходов с учетом данных по коэкспрессии миРНК и днРНК. В качестве модели для изучения использована мутантная линия кукурузы *fuzzy tassel (fzt)*, характеризующаяся нарушенным биогенезом миРНК вследствие мутации в гене *Dicer-like1 (DCL1)*, который играет ключевую роль в процессинге предшественников миРНК (Thompson et al., 2014). Нарушения в функции *DCL1* ведут к снижению уровня ряда зрелых миРНК, что, в свою очередь, вызывает дисбаланс в регуляторных взаимодействиях и, следовательно, экспрессии между миРНК и мРНК (Thompson et al., 2014). Мы предполагаем, что снижение концентрации миРНК может приводить к уменьшению образования пар с днРНК, являющимися для них «губками». В этом случае скорость деградации днРНК-«губок» будет снижаться, а концентрация их будет расти. Таким образом, мы считаем, что как и мРНК с повышенной экспрессией в линии кукурузы *fzt* (Thompson et al., 2014), так и днРНК с повышенным уровнем концентрации в этой линии могут быть мишениями этих миРНК. Полученные результаты позволят расширить наши представления о посттранскрипционной регуляции у растений и могут быть использованы для разработки новых селекционных стратегий, направленных на повышение стрессоустойчивости и продуктивности сельскохозяйственных культур (Zhang L. et al., 2009; Sun Q. et al., 2013).

Материалы и методы

Транскриптомные данные. В работе использовали данные RNA-seq из открытой базы данных NCBI SRA, GSM1277448–GSM1277461 (см. таблицу) (Thompson et al., 2014). Образцы делили на две группы: контрольную и мутантную. Мутантные линии содержали делецию в гене *Dicer-like1 (DCL1)*, который играл ключевую роль в

процессинге предшественников миРНК. Экспрессия оценивалась отдельно для тканей всего побега и соцветия как для длинных РНК, так и для миРНК.

Показано (Thompson et al., 2014), что у мутантных линий значительно снижена экспрессия 22 миРНК в побеге (miR398b-5p, miR408a-b-3p, miR408b-5p, miR394a-b-5p, miR167c-3p*, miR156a-3p*, miR167b-3p*, miR319b,d-5p*, miR169i-k-5p, miR167a-d-5p, miR168b-3p*, miR168a-3p*, miR156d-f-g-3p*, miR398a-b-3p, miR528a-b-3p, miR156e-3p*, miR397a-b-5p, miR159a-5p, miR2118b, miR399e,i-j-3p, miR160a-e,g-5p, miR398a-5p*) и 14 миРНК в соцветии (miR167d-3p*, miR167a-d-5p, miR172e, miR408a-b-3p, miR398b-5p*, miR394a-b-5p, miR167c-3p*, miR398a-b-3p, miR319a-d-3p, miR159a-b,f,j-k-3p, miR528a-b-5p, miR160a-e,g-5p, miR166j-k,n-3p, miR159a-5p*).

В качестве референсного генома использовали сборку кукурузы *Zea mays* версии 5 (Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0), загруженную вместе с аннотацией из базы данных Ensembl Plants (Bolser et al., 2017).

Последовательности миРНК были взяты из базы данных miRBase v. 22.1 (<https://www.mirbase.org/>).

Этапы биоинформатического анализа. Данная работа включала два основных блока биоинформатического анализа: сборку транскриптома с дальнейшим анализом дифференциальной экспрессии днРНК и анализ взаимодействий днРНК и миРНК с применением методов глубокого обучения. Более детальное описание каждого этапа приведено ниже.

Сборка и анализ транскриптома кукурузы. Сборка транскриптома (рис. 1) включала: предобработку данных, сборку транскриптома, выявление и аннотацию днРНК, а также оценку экспрессии транскриптов.

Фильтрацию прочтений производили с использованием программы Trimmomatic (Bolger et al., 2014) с применением следующих параметров: удаление адаптеров, удаление коротких прочтений длиной менее 36 нуклеотидов, а также фильтрацией по качеству прочтений. После предварительной обработки прочтения выравнивали на геном кукурузы с помощью программы STAR (Dobin et al.,

Библиотеки RNA-seq кукурузы (*Z. mays*), полученные из тканей побега и соцветия для контрольных растений и мутантной линии *fuzzy tassel* (fzt)

Идентификатор SRA	Название библиотеки	Источник РНК	Тип растения
GSM1277448	A619_mRNA_1	Побег	Контроль
GSM1277449	A619_mRNA_2		
GSM1277450	A619_mRNA_4		
GSM1277451	A619_mRNA_5		
GSM1277452	fzt_mRNA_1		Мутант
GSM1277453	fzt_mRNA_2		
GSM1277454	fzt_mRNA_4		
GSM1277455	fzt_mRNA_5		
GSM1277456	1Tm_Nsib		Соцветие Контроль
GSM1277457	2Tm_Nsib		
GSM1277458	3Tm_Nsib		
GSM1277459	1Tm_fzt		Мутант
GSM1277460	2Tm_fzt		
GSM1277461	3Tm_fzt		

2013). На основе полученных результатов картирования осуществляли сборку транскриптома с применением программы StringTie (Pertea et al., 2015). Для оценки качества собранного транскриптома использовали программу BUSCO (Simão et al., 2015). Для выявления и аннотации днРНК применяли программу ICAnnoLncRNA (Pronozin, Afonnikov, 2023). Расчет уровня экспрессии для найденных днРНК и других транскриптов производили с помощью программы Kallisto (Bray et al., 2016).

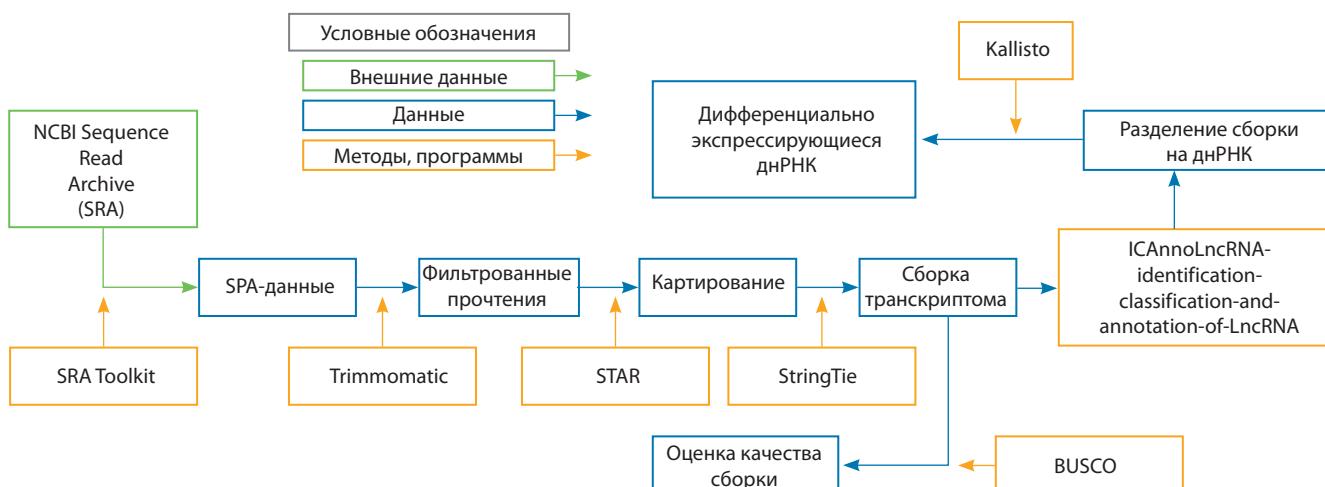


Рис. 1. Этапы биоинформатического конвейера сборки транскриптома кукурузы.

Зеленые прямоугольники содержат описание внешних данных; синие – данных использованных библиотек и промежуточных результатов; оранжевые – использованных программ.

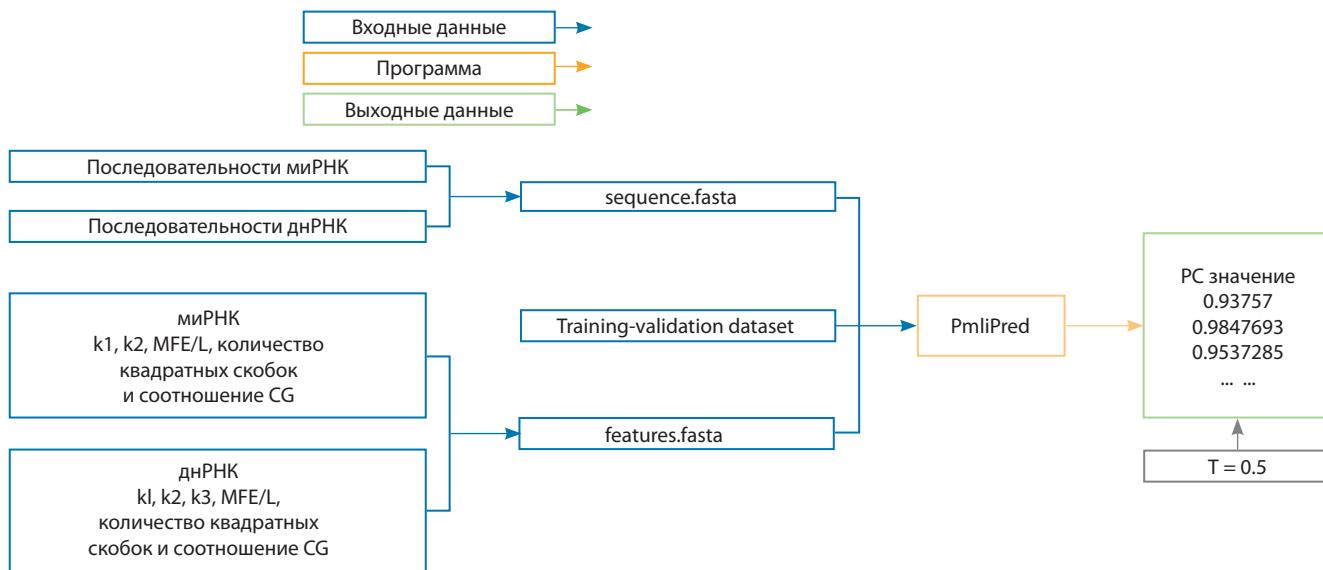


Рис. 2. Этапы предсказания взаимодействий между днРНК и миРНК с использованием модели PmliPred.

Синие прямоугольники содержат описание входных данных; зеленые – выходных данных; оранжевые – использованных программ. Показано пороговое значение доверительной вероятности $T = 0.5$.

Дифференциальная экспрессия днРНК у кукурузы. Анализ дифференциальной экспрессии днРНК выполняется отдельно для тканей побега и соцветия между контрольными и мутантными (*fzt*) линиями кукурузы. Статистическую обработку проводили с использованием пакетов DESeq2 и edgeR (Robinson et al., 2010; Love et al., 2014), значимыми считались различия в экспрессии при $p\text{-value} < 0.05$ с поправкой на множественное тестирование.

Для дифференциально экспрессирующихся днРНК были построены тепловые карты нормализованных значений экспрессии, позволяющие наглядно оценить паттерны экспрессии в разных биологических повторностях и подтвердить стабильность обнаруженных изменений между контрольной и мутантной группами.

Анализ взаимодействия между миРНК и днРНК. Для предсказания взаимодействий между молекулами днРНК и миРНК применяли метод PmliPred (Kang et al., 2020), включающий несколько последовательных этапов (рис. 2). На первом этапе формировались входные данные: нуклеотидные последовательности миРНК и днРНК, демонстрирующие понижение экспрессии миРНК и повышение экспрессии днРНК у мутантов по сравнению с контролем. На вход программы также подавались количественные характеристики последовательностей, извлеченные с помощью встроенных алгоритмов модели, и обучающая выборка последовательностей, предоставленная вместе с программой (Kang et al., 2020). Для миРНК использовали следующие признаки: «частоты k -меров» ($k = 1, k = 2$), «минимальная свободная энергия, нормированная по длине (MFE/L)», «количество спаренных нуклеотидов во вторичной структуре» и «отношение GC». Для днРНК дополнительно извлекали показатель частот k -меров ($k = 3$).

Сформированные данные использованы программой PmliPred для оценки вероятности взаимодействия между парами днРНК–миРНК (выходной параметр PC, дове-

рительная вероятность). Мы считали, что пара днРНК–миРНК взаимодействует, если $PC \geq 0.5$. Итоговые данные представляли в виде таблицы с вероятностями, отражающими степень предсказанного взаимодействия между молекулами миРНК и днРНК.

Анализ и визуализация взаимодействий между миРНК и днРНК. Полученные пары днРНК–миРНК разделяли на две группы на основе параметров взаимодействия: днРНК с повышенным уровнем собственной экспрессии в мутантной линии (тестовая группа) и днРНК с пониженным уровнем экспрессии (контрольная группа). Обе группы днРНК сравнивали со всеми миРНК с пониженным уровнем экспрессии (Thompson et al., 2014) (см. раздел «Транскриптомные данные»). В качестве порогового значения для отбора потенциальных взаимодействий в тестовой группе использовали максимальное значение параметра PC, рассчитанного программой PmliPred из контрольной группы. Если для пары миРНК и днРНК из тестовой группы параметр PC превышал любое из значений PC в контрольной группе, то считалось, что такие миРНК и днРНК взаимодействуют.

Последовательности отобранных миРНК и днРНК загружали в программу IntaRNA (Mann et al., 2017) для идентификации и визуализации взаимодействующих пар оснований. Из всех предсказанных взаимодействий отбирали только те пары, у которых число неспаренных оснований в области взаимодействий двух молекул менее 4, а длина области взаимодействий превышает 16 нуклеотидов.

Такие взаимодействия между днРНК и миРНК имеют важное биологическое значение. ДнРНК могут функционировать как конкурентные эндогенные РНК (сеРНК), или как «губки», связываясь с миРНК и тем самым препятствуя их взаимодействию с мРНК-мишениями. Это способствует регуляции экспрессии генов, участвующих в росте, развитии и стрессовых ответах растений (Pronozin, Afonnikov, 2025).

Результаты

Сборка транскриптома

В результате анализа транскриптомных данных *Z. mays*, охватывающих стадии побега и соцветия для контрольных и мутантных линий (*fz1*), было получено высокое качество исходных данных. Средняя доля уникально выровненных прочтений при картировании с использованием STAR (Dobin et al., 2013) составила 84.73 %, при этом только 3.10 % прочтений остались невыровненными. Для выровненных прочтений доля несовпадений на один нуклеотид составила в среднем 0.76 %, что указывает на высокую точность секвенирования и надежность данных для дальнейшего анализа.

Сборка транскриптов, выполненная с использованием StringTie (Pertea et al., 2015), была проверена с помощью инструмента BUSCO (Simão et al., 2015). Во всех 14 библиотеках доля полных BUSCO-групп превышала 95 %, достигая максимума в 98.8 % (в библиотеке SRR1041561 обнаружено 252 из 255 ожидаемых ортологов). Эти метрики указывают на полноту и качество полученных сборок и подтверждают их пригодность для последующего анализа экспрессии и идентификации некодирующих РНК.

Дифференциальная экспрессия днРНК между контрольными и мутантными образцами *Z. mays*

В ткани побега было идентифицировано 10 днРНК, достоверно изменяющих свой уровень экспрессии между контрольной и мутантной группами (табл. S1 Приложения)¹. Из них девять днРНК отличались повышенной экспрессией у мутантов, что позволяет предположить, что они могут служить мишениями для миРНК и участвовать в механизмах посттранскрипционной регуляции. Эти транскрипты рассматриваются в дальнейшем как кандидаты на мишени для миРНК.

Тепловая карта (рис. 3) демонстрирует систематические различия по экспрессии этих днРНК в исследованных транскриптомных библиотеках. Для 9 из 10 днРНК уровень экспрессии у мутантных растений повышен по сравнению с контролем.

В соцветии количество днРНК с дифференциальной экспрессией оказалось существенно выше – всего 34 (табл. S2). Среди них 20 днРНК показали повышенный уровень экспрессии в мутантной линии. Интересно отметить, что заметные различия в уровне транскрипции наблюдаются у целого ряда днРНК с ярко выраженной стадией специфичности, характерной только для соцветия.

Тепловая карта экспрессии днРНК для соцветия (рис. 4) также демонстрирует систематические различия их экспрессии в исследованных транскриптомных библиотеках. днРНК с пониженным и повышенным уровнями экспрессии у мутантных растений формируют два четко выраженных кластера.

В совокупности выявленные днРНК представляют собой приоритетный набор для последующего анализа

взаимодействий с миРНК и дальнейшей функциональной аннотации.

Оценка точности предсказания взаимодействия днРНК и миРНК

Проверка способности используемой модели предсказания различать между собой днРНК из тестовой группы (с повышенным уровнем экспрессии у мутантов) и контрольной группы (с пониженным уровнем экспрессии) представлена на рис. 5.

В ткани побега значения взаимодействия у тестовых днРНК (с повышенным уровнем экспрессии у мутантов) смещены в область выше 0.5, что может свидетельствовать о потенциальной способности этих транскриптов связываться с миРНК. Однако следует отметить, что контрольная группа представлена только одной днРНК, имеющей высокое предсказанное значение. Из-за того, что контрольной в этом эксперименте была всего одна днРНК (с понижением экспрессии у мутантов), оценить точность и дискриминирующую способность модели PmliPred затруднительно.

В ткани соцветия различия между группами проявляются еще более отчетливо: у тестовых днРНК значения взаимодействия преимущественно находятся выше 0.5, тогда как контрольные днРНК имеют распределение, смещенное в область ниже 0.5. Такое поведение модели указывает на ее способность эффективно разграничивать биологические классы на основе предсказанных параметров взаимодействия миРНК–днРНК.

Таким образом, модель PmliPred показала высокую дискриминирующую способность и может быть использована для предварительного отбора днРНК, потенциально вовлеченных во взаимодействие с миРНК.

Сети взаимодействий днРНК–миРНК в тканях кукурузы

Результаты, полученные с использованием программы предсказания взаимодействий миРНК и днРНК IntaRNA, показаны на рис. 6. На примере двух пар РНК видно, что они действительно формируют стабильные и протяженные участки комплементарного связывания друг с другом. В общей сложности было идентифицировано 13 достоверных пар днРНК–миРНК в побеге и 14 – в соцветии. Данные подтверждают, что отобранные днРНК не только демонстрируют повышенную экспрессию у мутантов, но и обладают высоким потенциалом специфического взаимодействия с миРНК, экспрессия которых у мутантов понижена. Это делает их обоснованными кандидатами в мишени для миРНК.

Визуализация сети выявленных взаимодействий в программе Cytoscape (рис. 7 и 8) показала, что некоторые днРНК потенциально способны связывать несколько миРНК одновременно. Например, lncrna_SRR1041561_10348.1 (в соцветии) взаимодействует сразу с пятью различными миРНК: zma-miR160a-e-g-5p, zma-miR167d-3p, zma-miR394a-b-5p, zma-miR408a-b-3p и zma-miR172e, что свидетельствует о ее возможной функции как «губки» в рамках сеРНК-механизма. Другой пример – lncrna_SRR1041554_35279.1 в побеге, связанный с zma-miR2118b, zma-miR160a-e-g-5p и zma-miR167b-3p.

¹ Табл. S1 и S2 Приложения см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx51.pdf>

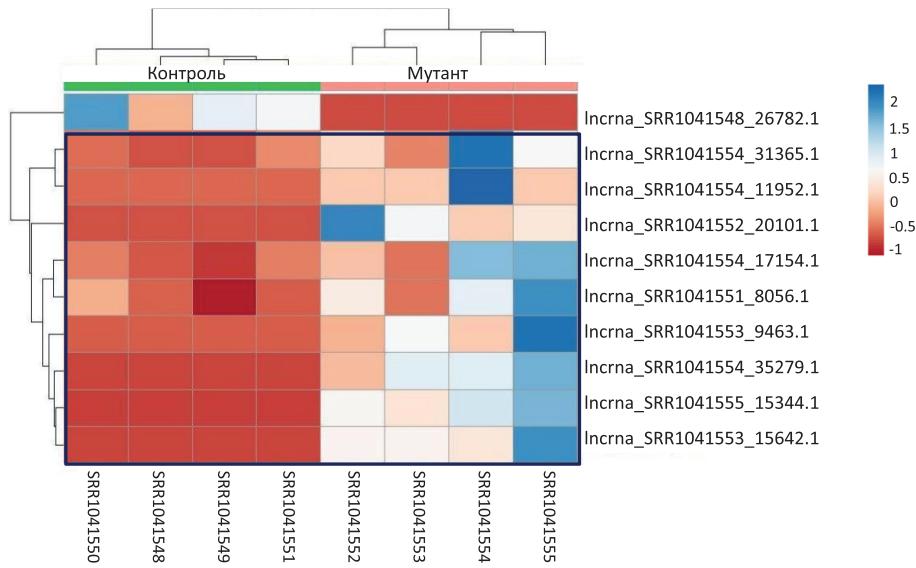


Рис. 3. Тепловая карта экспрессии днРНК с измененной экспрессией в побеге.

Здесь и на рис. 4: цветовая шкала справа отражает нормализованный уровень экспрессии: синий цвет соответствует высокой экспрессии, красный – пониженной. Синей рамкой выделены ячейки, соответствующие днРНК, повышающим экспрессию в мутантной линии.

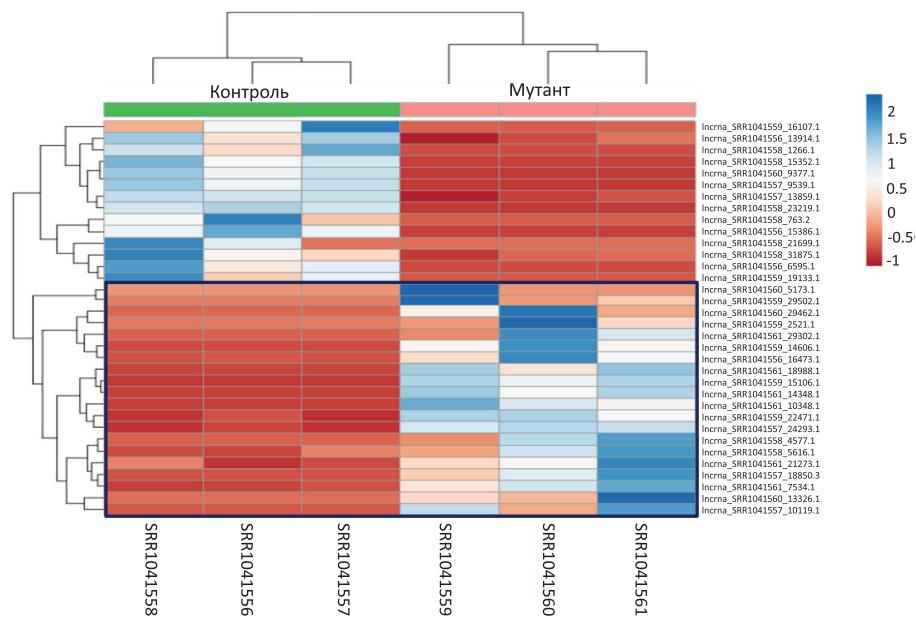


Рис. 4. Тепловая карта экспрессии днРНК с измененной экспрессией в соцветии.

Обсуждение

Проведенный анализ показал, что 9 из 14 идентифицированных днРНК способны формировать потенциальные взаимодействия с некоторыми миРНК одновременно, что указывает на их возможную роль в качестве конкурирующих эндогенных РНК (ceRNA) – молекулярных «губок», связывающих миРНК и препятствующих их взаимодействию с мРНК-мишениями. Это взаимодействие позволяет днРНК опосредованно регулировать экспрессию различных генов, участвующих в ключевых биологических процессах.

Среди предсказанных миРНК-партнеров находятся хорошо охарактеризованные регуляторы роста, развития и стрессовых ответов растений (Jones-Rhoades et al., 2006; Sunkar et al., 2012):

- miR156 контролирует переход от ювенильной к взрослой фазе, цветение, морфогенез листьев и ветвление за счет подавления генов *SPL* (Preston, Hileman, 2013; Wang H., Wang H., 2015);
- miR167 и miR160 регулируют путь ауксина через подавление *ARF*-генов, влияя на корнеобразование, развитие листьев, цветов, семян и соматический эмбриогенез

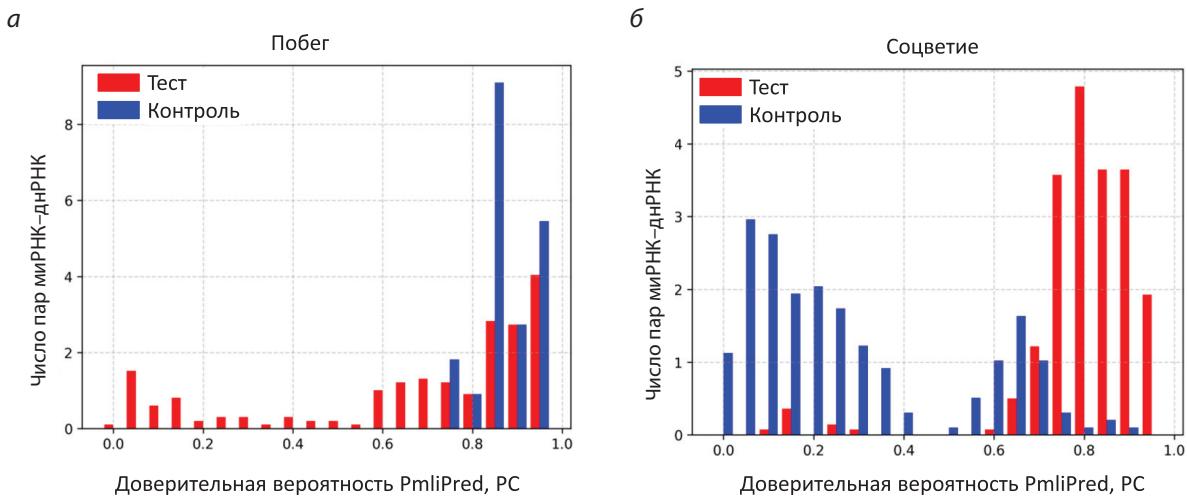


Рис. 5. Распределение предсказанных значений взаимодействий миРНК-днРНК (побег и соцветия).

a - побег: красным цветом показаны значения для тестовой группы (днРНК с повышенным уровнем экспрессии), синим - для контрольной группы (днРНК с пониженным уровнем экспрессии); *б* - соцветие: аналогично красным - тестовая группа, синим - контрольная (днРНК с повышенным уровнем экспрессии). Ось X – доверительная вероятность взаимодействия (PC), предсказанная программой PmiIPred; ось Y – число рассмотренных пар миРНК-днРНК.

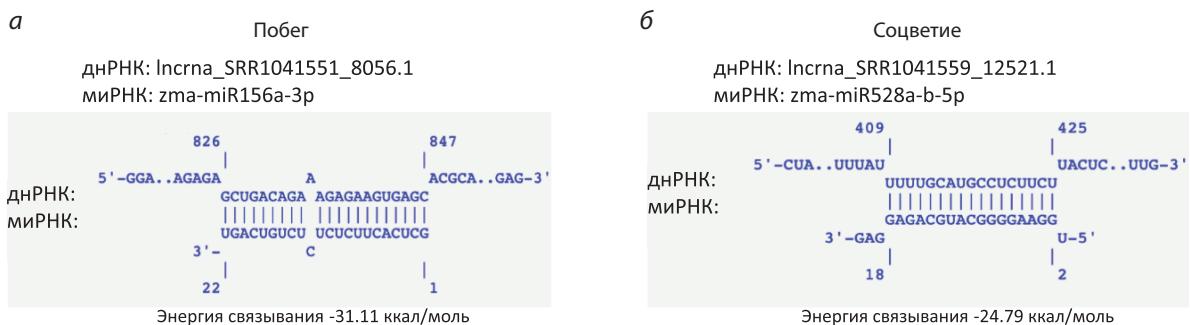


Рис. 6. Примеры взаимодействий миРНК-днРНК, рассчитанных программой IntaRNA.

a - побег: zma-miR156a-3p и IncRNA_mapped_SRR1041551_8056.1; *б* – соцветие: zma-miR528a-b-5p и IncRNA_mapped_SRR1041559_12521.1. Показаны области спаривания и структура взаимодействия, основанная на минимальной свободной энергии (в ккал/моль).

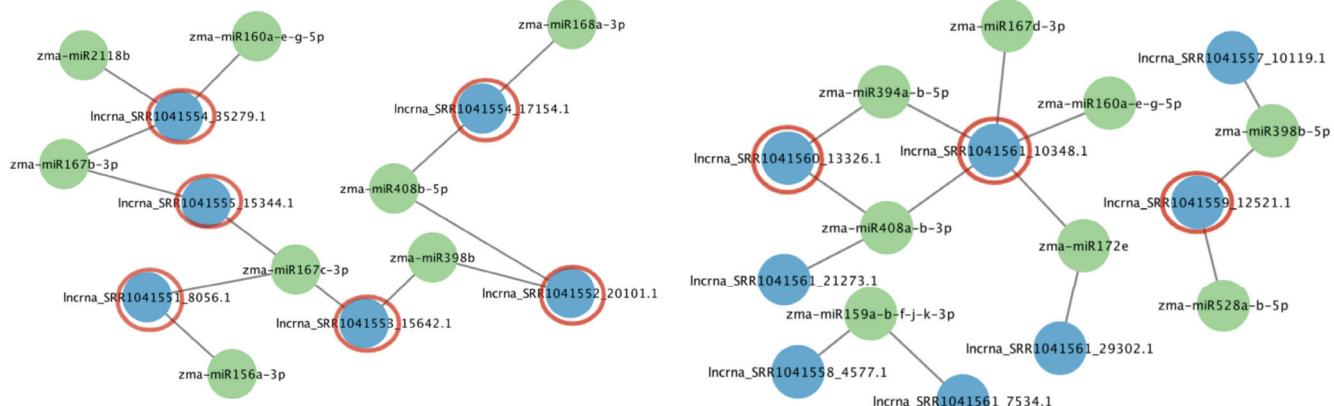


Рис. 7. Сети взаимодействий миРНК-днРНК в побеге кукурузы.

Здесь и на рис. 8: зеленые круглые узлы – миРНК; синие – днРНК; красные круги обозначают днРНК, которые, возможно, обладают функцией «губки».

Рис. 8. Сети взаимодействий миРНК-днРНК в соцветии кукурузы.

(Caruana et al., 2020; Wang Y. et al., 2020; Barrera-Rojas et al., 2021);

- miR168 участвует в поддержании стабильного уровня белка AGO1 – центрального компонента РНК-интерференции, регулируя тем самым всю миРНК-систему (Martínez de Alba et al., 2011; Li W. et al., 2012);
- miR172 управляет началом цветения и органогенезом через подавление генов *AP2*-типа (Ripoll et al., 2015; Zhang B. et al., 2015);
- miR2118 активирует биогенез фазированных siRNA (phasiRNA), играя критическую роль в иммунитете и развитии пыльников (Canto-Pastor et al., 2019; Jiang P. et al., 2020);
- miR398 и miR408 обеспечивают антиоксидантную защиту, регулируя уровень супероксиддисмутаз и металличесвязывающих белков, а также отвечают на широкий спектр абиотических стрессов (Jiang A. et al., 2021; Zou et al., 2021; Gao et al., 2022);
- miR394 влияет на формирование листьев, развитие плодов и активность меристем (Song et al., 2015; Sun P. et al., 2017);
- miR528 вовлечен в редокс-гомеостаз, устойчивость к вирусным инфекциям, солевому стрессу и регулирование лигнификации (Wu et al., 2017; Sun Q. et al., 2018).

Функциональная аннотация взаимодействующих миРНК свидетельствует о том, что большинство из них участвует не только в развитии морфологических структур растений, но и в сложной системе регуляции ответа на биотические и абиотические воздействия.

Более того, выявленные сети ceRNA подтверждают, что посттранскрипционная регуляция в растениях реализуется через тонко скоординированные взаимодействия между некодирующими и кодирующими РНК. Наличие днРНК, связывающих несколько регуляторных миРНК, указывает на возможность существования центров регуляторного перекрестного влияния в РНК-сетях, что представляет особый интерес для функциональной валидации.

Полученные результаты подчеркивают значимость системного подхода к изучению транскриптомных данных, поскольку именно такие подходы позволяют обнаружить скрытые уровни регуляции и перспективные молекулярные мишени. Кроме того, эти данные могут служить теоретической основой для разработки новых агрономически ценных сортов кукурузы с повышенной устойчивостью к стрессам и улучшенными адаптационными характеристиками.

Заключение

В настоящей работе проведен комплексный анализ транскриптомных данных кукурузы (*Z. mays*) с целью выявления потенциальных взаимодействий между миРНК и днРНК. По результатам дифференциальной экспрессии, полученным при сравнении контрольных и мутантных образцов, определены днРНК и миРНК, имеющие потенциальное взаимодействие.

Для прогноза потенциальных пар миРНК–днРНК была применена модель PmliPred, основанная на методах машинного обучения. Дальнейший структурный анализ с использованием инструмента IntaRNA подтвердил наличие стабильных сайтов комплементарного связывания

между выбранными молекулами, что свидетельствует о высокой достоверности предсказанных взаимодействий.

На основе отобранных пар взаимодействий были построены сети конкурирующих эндогенных РНК (ceRNA-сети), демонстрирующие, что отдельные днРНК способны связывать несколько миРНК одновременно. Это подтверждает гипотезу об их участии в механизмах посттранскрипционной регуляции в качестве «губок» для миРНК, способных модулировать активность регуляторных молекул и влиять на экспрессию генов-мишеней.

Дополнительно была проведена визуализация ключевых взаимодействий в среде Cytoscape, что позволило наглядно представить структуру и потенциальную функциональную значимость выявленных регуляторных связей. Полученные результаты подтверждают роль днРНК как важного компонента регуляторных сетей растений и создают платформу для дальнейших функциональных исследований.

Список литературы / References

- Barrera-Rojas C.H., Otoni W.C., Nogueira F.T.S. Shaping the root system: the interplay between miRNA regulatory hubs and phytohormones. *J Exp Bot.* 2021;72(20):6822-6835. doi [10.1093/jxb/erab299](https://doi.org/10.1093/jxb/erab299)
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120. doi [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170)
- Bolser D.M., Staines D.M., Perry E., Kersey P.J. Ensembl Plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomic data. In: van Dijk A. (Ed.) *Plant Genomics Databases. Methods in Molecular Biology.* Vol. 1533. New York: Humana Press, 2017; 1-31. doi [10.1007/978-1-4939-6658-5_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6658-5_1)
- Bray N., Pimentel H., Melsted P., Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* 2016;34(5):525-527. doi [10.1038/nbt.3519](https://doi.org/10.1038/nbt.3519)
- Canto-Pastor A., Santos B., Valli A., Summers W., Schornack S., Baulcombe D. Enhanced resistance to bacterial and oomycete pathogens by short tandem target mimic RNAs in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(7):2755-2760. doi [10.1073/pnas.1814380116](https://doi.org/10.1073/pnas.1814380116)
- Caruana J.C., Dhar N., Raina R. Overexpression of *Arabidopsis microRNA167* induces salicylic acid-dependent defense against *Pseudomonas syringae* through the regulation of its targets *ARF6* and *ARF8*. *Plant Direct.* 2020;4(9):e00270. doi [10.1002/pld3.270](https://doi.org/10.1002/pld3.270)
- Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21. doi [10.1093/bioinformatics/bts635](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635)
- Gao Y., Feng B., Gao C., Zhang M., Zhang X., Han X., Liu P., Wang B., Li Z. The evolution and functional roles of *miR408* and its targets in plants. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1):530. doi [10.3390/ijms23010530](https://doi.org/10.3390/ijms23010530)
- He X., Guo S., Wang Y., Wang L., Shu S., Sun J. Systematic identification and analysis of heat-stress-responsive lncRNAs, circRNAs and miRNAs with associated co-expression and ceRNA networks in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Physiol Plant.* 2020;168(3):736-754. doi [10.1111/ppl.12997](https://doi.org/10.1111/ppl.12997)
- Jiang A., Guo Z., Pan J., Yu B., Chen D., Li Y. The PIF1-miR408-PLANTACYANIN repression cascade regulates light-dependent seed germination. *Plant Cell.* 2021;33(5):1506-1529. doi [10.1093/plcell/koab060](https://doi.org/10.1093/plcell/koab060)
- Jiang P., Lian B., Liu C., Fu Z., Shen Y., Cheng Z., Ding Y. 21-nt phasiRNAs direct target mRNA cleavage in rice male germ cells. *Nat Commun.* 2020;11(1):5191. doi [10.1038/s41467-020-19034-y](https://doi.org/10.1038/s41467-020-19034-y)
- Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Rev Plant Biol.* 2006;57:19-53. doi [10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218)

- Kang Q., Jun M., Jun C., Zhang Y., Wang W. PmliPred: a method based on hybrid model and fuzzy decision for plant miRNA–lncRNA interaction prediction. *Bioinformatics*. 2020;36(10):2986-2992. doi [10.1093/bioinformatics/btaa074](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa074)
- Li R., Yang Y.F., Li R., Zhu H.L., Luo Y.B. Functions of long non-coding RNA and its interacting mechanisms. *Chin Bull Life Sci.* 2016; 28(6):703-711. doi [10.13376/j.cbls.2016090](https://doi.org/10.13376/j.cbls.2016090)
- Li W., Cui X., Meng Z., Huang X., Xie Q., Wu H., Jin H., Zhang D., Liang W. Transcriptional regulation of *Arabidopsis MIR168a* and *ARGONAUTE1* homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiol.* 2012;158(3):1279-1292. doi [10.1104/pp.111.188789](https://doi.org/10.1104/pp.111.188789)
- Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi [10.1186/s13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8)
- Mann M., Wright P.R., Backofen R. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA–RNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W435-W439. doi [10.1093/nar/gkx279](https://doi.org/10.1093/nar/gkx279)
- Martínez de Alba A.E., Jauvion V., Mallory A.C., Bouteiller N., Vaucheret H. The miRNA pathway limits AGO1 availability during siRNA-mediated PTGS defense against exogenous RNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):9339-9344. doi [10.1093/nar/gkr590](https://doi.org/10.1093/nar/gkr590)
- Pertea M., Pertea G.M., Antonescu C.M., Chang T.C., Mendell J.T., Salzberg S.L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol.* 2015;33(3):290-295. doi [10.1038/nbt.3122](https://doi.org/10.1038/nbt.3122)
- Preston J.C., Hileman L.C. Functional evolution in the plant *SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* gene family. *Front Plant Sci.* 2013;4:80. doi [10.3389/fpls.2013.00080](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00080)
- Pronozin A.Y., Afonnikov D.A. ICAnnoLncRNA: a snakemake pipeline for a long noncoding RNA search and annotation in transcriptomic sequences. *Genes.* 2023;14(7):1331. doi [10.3390/genes14071331](https://doi.org/10.3390/genes14071331)
- Pronozin A.Y., Afonnikov D.A. The role of long noncoding RNAs in plants. *Russ J Genet.* 2025;61:1-18. doi [10.1134/S1022795424701345](https://doi.org/10.1134/S1022795424701345)
- Ripoll J.J., Bailey L.J., Mai Q.A., Wu S.L., Hon C.T., Chapman E.J., Ditta G.S., Estelle M., Yanofsky M.F. microRNA regulation of fruit growth. *Nat Plants.* 2015;1(4):15036. doi [10.1038/nplants.2015.36](https://doi.org/10.1038/nplants.2015.36)
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139-140. doi [10.1093/bioinformatics/btp616](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616)
- Sheng N., Huang L., Gao L., Zhao W., Zhang Y., Wang X. A survey of computational methods and databases for lncRNA-miRNA interaction prediction. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* 2023; 20(5):2810-2826. doi [10.1109/TCBB.2023.3264254](https://doi.org/10.1109/TCBB.2023.3264254)
- Simão F.A., Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*. 2015; 31(19):3210-3212. doi [10.1093/bioinformatics/btv351](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351)
- Song J.B., Shu X.X., Shen Q., Guo C.Y., Jiang J., Xie L.H., Liu Y.F., Yang Z.M. Altered fruit and seed development of transgenic rape-seed (*Brassica napus*) over-expressing microRNA394. *PLoS One.* 2015;10(5):e0125427. doi [10.1371/journal.pone.0125427](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125427)
- Sun P., Cheng C., Lin Y., Zhu Q., Lin J., Jin Y., Yuan H., Lin Y. Combined small RNA and degradome sequencing reveals complex microRNA regulation of catechin biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*). *PLoS One.* 2017;12(2):e0171173. doi [10.1371/journal.pone.0171173](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171173)
- Sun Q., Csorba T., Skourtis-Stathaki K., Proudfoot N.J., Dean C. R-loop stabilization represses antisense transcription at the *Arabidopsis FLC* locus. *Science.* 2013;340(6132):619-621. doi [10.1126/science.1234848](https://doi.org/10.1126/science.1234848)
- Sun Q., Liu X., Yang J., Wang Y., Zhang Y., Li J., Wang N., Li H., Wang J. MicroRNA528 affects lodging resistance of maize by regulating lignin biosynthesis under nitrogen-luxury conditions. *Mol Plant.* 2018;11(6):806-814. doi [10.1016/j.molp.2018.03.013](https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.03.013)
- Sunkar R., Li Y.F., Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci.* 2012;17(4):196-203. doi [10.1016/j.tplants.2012.01.010](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.010)
- Thompson B.E., Basham C., Hammond R., Sidorenko L., Becker M.G., Neuffer M.G., Meeley R.B., Timmermans M.C.P., Chandler V.L., Hake S. The dicer-like1 homolog fuzzy tassel is required for the regulation of meristem determinacy in the inflorescence and vegetative growth in maize. *Plant Cell.* 2014;26(12):4702-4717. doi [10.1105/tpc.114.132670](https://doi.org/10.1105/tpc.114.132670)
- Wang H., Wang H. The miR156/SPL module, a regulatory hub and versatile toolbox, gears up crops for enhanced agronomic traits. *Mol Plant.* 2015;8(5):677-688. doi [10.1016/j.molp.2015.01.008](https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.008)
- Wang L., Wang J.W. Coding function for non-coding RNA in plants—insights from miRNA encoded peptide (miPEP). *Sci China Life Sci.* 2015;58(5):503-505. doi [10.1007/s11427-015-4854-z](https://doi.org/10.1007/s11427-015-4854-z)
- Wang Y., Liu W., Wang X., Yang R., Wu Z., Wang H., Wang L., Hu Z., Guo S., Zhang H., Lin J., Fu C. MiR156 regulates anthocyanin biosynthesis through *SPL* targets and other microRNAs in poplar. *Hortic Res.* 2020;7:118. doi [10.1038/s41438-020-00341-w](https://doi.org/10.1038/s41438-020-00341-w)
- Wu J., Yang R., Yang Z., Yao S., Zhao S., Wang Y., Li P., ... Zhou X., Chu C., Qi Y., Cao X., Li Y. ROS accumulation and antiviral defense control by microRNA528 in rice. *Nat Plants.* 2017;3:16203. doi [10.1038/nplants.2016.203](https://doi.org/10.1038/nplants.2016.203)
- Zhang B., Wang L., Zeng L., Zhang C., Ma H. *Arabidopsis* TOE proteins convey a photoperiodic signal to antagonize CONSTANS and regulate flowering time. *Genes Dev.* 2015;29(9):975-987. doi [10.1101/gad.251520.114](https://doi.org/10.1101/gad.251520.114)
- Zhang L., Chia J.M., Kumari S., Stein J.C., Liu Z., Narechania A., Maher C.A., Guill K., McMullen M.D., Ware D. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS Genet.* 2009; 5(11):e1000716. doi [10.1371/journal.pgen.1000716](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000716)
- Zou H., Guo X., Yang R., Wang D., Liu K., Gan L., Yuan Y., Qi J., Wang Y. MiR408-SmLAC3 module participates in salvianolic acid B synthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7541. doi [10.3390/ijms22147541](https://doi.org/10.3390/ijms22147541)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.07.2025. После доработки 06.10.2025. Принята к публикации 07.10.2025.