شناسایی و پیش بینی عملکرد RNAهای بلند غیر کدکننده پاسخگو به تنش خشکی در عدس (Lens culinaris L.)

راضیه خدیور ^۱، احمد اسماعیلی^{۲،*}، سید سجاد سهرابی^۳ و حسن ترابی پوده^٤ ۱- دانشآموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرمآباد ۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرمآباد ۳- استادیار، گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرمآباد ٤- دانشیار، گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرمآباد

(تاریخ دریافت: ۱٤٠١/٠٩/١٢ – تاریخ پذیرش: ۱٤٠١/١٢/١٥)

چکیدہ

تنش خشکی یکی از مهمترین عوامل محیطی است که بر رشد و بهره وری گیاهان زراعی از جمله عدس تأثیر میگذارد. در طی تکامل، تغییرات ژنتیکی حیاتی به وسیله RNAهای غیرکدکننده (ncRNAs) در پاسخ گیاهان به تنش خشکی و سایر تنش های غیرزیستی به وجود آمده است. در مطالعه حاضر، پس از شناسایی ncRNAها در پروفایل بیانی عدس، از داده های RPA-seq و واکنش Real-time PCR برای بررسی الگوی بیان برخی از RNA المای شناسایی شده تحت تنش خشکی استفاده شد. همچنین شبکه همیانی Real-time PCR برای بررسی الگوی بیان برخی از ncRNA مای شناسایی شده تحت تنش خشکی استفاده شد. همچنین شبکه همیانی Real-time PCR با استفاده از بسته نرم افزاری psych رسیم شد. در مجموع طی این مطالعه، ۲۵۹ توالی NRA-seq در عدس شناسایی شد. تعداد زیادی از RNA با استفاده از بسته نرم افزاری مریم شد. در مجموع طی این مطالعه، ۲۵۹ توالی LCUL_evgLocus_104392 و اکتش بودند. همچنین نتایج نشان داد که سه توالی LCUL_evgLocus_104392 و اکتش نوری این توالیها با ژنهای دارای بیان افتراقی در پاسخ به خشکی سبب شناسایی مسیرهای متابولیکی متأثر از این توالیها گردید. این مطالعه برای اولین بار توالیها با ژنهای دارای بیان افتراقی در پاسخ به خشکی سبب شناسایی مسیرهای متاثیر از این توالیها گردید. این مطالعه برای اولین بار توالیهای از میان ادرای بیشترین تغییر بیان در پاسخ به تنش خشکی بودند. بررسی همیانی اولین بار توالیهای به تنش خشکی می با شناسایی مسیرهای متابولیکی متأثر از این توالیها گردید. این مطالعه برای مکانیسم های پاسخ به خشکی می باشد. شبکهها هم بیان این توالیها و ژنهای دارای بیان افتراقی می تواند سبب درک بهتر مکانیسمهای پاسخ به خشکی در عدس شود.

واژگان كليدى: تنش خشكى، عدس، PLncPRO ،LncRNA

* نويسنده مسئول، آدرس پست الکترونيکی: ismaili.a@lu.ac.ir

مقدمه

گیاهان به عنوان موجوداتی بی تحرک، در طول چرخه زندگی خود اغلب با انواع مختلفی از تنش های زیستی و غیرزیستی روبرو می شوند (Zhang et al., 2019). در طی تکامل، مکانیسم های پیچیده ای برای شناسایی عوامل مختلف تنش زا برای ایجاد مسیرهای پیام رسانی و پاسخ فوری یا با تأخیر در گیاهان ایجاد شده است (He et al., 2018). در مکانیسم تحمل یا مقاومت به تنش ها، گیاهان با تنظیم و برنامه ریزی مجدد بیان ژنها در سطوح مختلف، چه در رونویسی، پس از رونویسی و چه در سطح ترجمه و بعد از آن، با شرایط آسیب رسان محیطی خو می گیرند (;Zhang et al., 2018). (Zhang et al., 2019; He et al., 2018).

عوامل تنظیمی، در کنترل بیان ژنها تحت انواع تنشهای زیستی و غیرزیستی نقش بسیار مهمی دارند (Raeesi زیستی و غیرزیستی نقش بسیار مهمی دارند (Sadati *et al.*, 2021; Jha *et al.*, 2020 عناصر تنظیم کننده بیان ژنها که در طیف وسیعی از فرآیندهای زیستی از جمله: مکانیسم رونویسی، تنظیم پردازش mRNA، مقابله با انواع تنشهای زیستی و غیرزیستی، گلدهی و نرعقیمی و همچنین تغییرات اپی-زنتیک نقش مهمی دارند، Ing non-coding (مای تنظیم کننده در طیف وسیعی از ارگانیسمها از جمله گیاهان و حیوانات شناسایی شدهاند (Jha *et al.*, 2020).

Amarkal، توالی هایی با طول بیش از ۲۰۰ نو کلئوتید هستند که در خانواده RNAهای غیر کدکننده قرار می گیرند (RNAهای توالی یابی (et al., 2021). در سال های اخیر، ظهور فناوری های توالی یابی نسل جدید (NGS) منجر به شناسایی بیشتر AncRNAها در موجودات مختلف شده است. در خانواده های مختلف گیاهی نیز تعداد زیادی از IncRNAها شناسایی شده است، با این حال نیز تعداد زیادی از IncRNAها شناسایی شده است، با این حال تعداد AncRNAها شناسایی شده است، با این حال *موجودات مختلف گیاهی از تعداد زیادی از Solanum tuberosum Arabidopsis thalina* و Setaria italica *Populus trichocarpa aestivum* (Trivedi and Asif, 2020). Trivedi and Asif, 2020).

در حيوانات IncRNAها توسط RNAپليمراز II رونويسي می شوند در حالی که شواهدی از نقش RNA پلیمراز IV در رونویسی این عناصر در گیاهان نیز وجود دارد (Chen and Carmichael, 2010). همچنين بررسي منابع نشان مي دهد كه اغلب IncRNAها با مشارکت siRNAها در خاموشی ژنها نقش دارند (Waseem et al., 2021). طبقهبندی IncRNAها فرأیندی چالشبرانگیز است. همچنین روشهای شناسایی این عناصر تنظیمی نیز در حال توسعه میباشد (Jarroux et al., 2017). تاکنون از ویژگیهایی نظیر، نوع توالی، موقعیت ژنومی، سازوکار عملکرد، مکانیسم هدف قرار دادن و اثر اعمال شده در توالی DNA برای شناسایی و طبقهبندی IncRNAها استفاده شده است (Ma et al., 2013). هرچند شناسایی و تفسیر عملکرد این گروه از عناصر تنظیمی در آغاز راه خود قرار دارد با این حال بر اساس مکان ژنی، این گروه از RNAهای غیرکدکننده را می توان در سه گروه الف: بینژنی، ب: اینترونی و ج: IncRNAهای موجود در توالی آنتی سنس دسته بندی نمود (Ma et al., 2013).

شواهد نشان میدهد که فعالیت IncRNAها سطحی از تنظیم مولکولی مهم در مکانیسم پاسخ به تنش گرما و خشکی در گیاهان زراعی فراهم میسازد. برای مثال در مطالعه ژین و همکاران (Xin et al., 2011) که IncRNA که دارای نقش مؤثری در پاسخ به تنش گرما در گندم بودند با استفاده از توالی یابی Solexa و ریزآرایه مبتنی بر پلتفرم Affymetrix شناسایی شدند (Xin et al., 2011). در مطالعه ويدونگ و همكاران (Weidong et al., 2020)، IncRNAهای تنظیمکننده ژنهای پاسخ گو به تنش خشکی که نقش مؤثری در سنتز و پیامرسانی اتیلن و ABA، پیامرسانی وابسته به یون کلسیم، سنتز نشاسته و ساکارز و فرآیندهای متابولیکی مختلف در برنج داشتند، شناسایی شدند (Weidong et al., 2020). همچنین در پژوهشی تعداد ۱ncRNA ۲۰ پاسخگو به تنش خشکی در سورگوم شناسایی شد (Qi et al., 2013)، که از این بین تنها یک IncRNA پاسخ گو به خشکی دارای همولوژی بالایی با IncRNA ارزن دمروباهی بود که نشان دهنده

حفاظتشدگی کم IncRNAها است (Qi et al., 2013). به طور کلی شواهد در حال ظهور نشان می دهند که IncRNAها با تنظیم رونویسی ژنهای مختلف پاسخ گو به تنش یا با فراخوانی مکانیسمهای پیچیدهای همچون تغییر در وضعیت پیچیدگی کروماتین بر پاسخها به خشکی تأثیر می گذارند (Liu et al., 2013).

عدس زراعی (Lens culinaris Medikus) گیاهی خودگردهافشان و ديپلوئيد (2*n* = 2*x* = 14) است که با اندازه ژنومی معادل ٤ گیگا باز (Arumuganathan and Earle, 1991)، یکی از اصلی ترین اعضای خانواده حبوبات دانهای بهشمار می رود (Khazaei et al., 2016). عملکرد عدس نیز مانند سایر گیاهان در مناطق کشت در سرتاسر دنیا بهدلیل شرایط محیطی نامطلوب از جمله رخ داد تنش خشکی با افت شدید عملکرد روبرو میشود. کشور ما نیز با داشتن مناطق خشک و نیمهخشک و همچنین دامنه دمایی با نوسانات بالا، از شرایط مطلوب و بهینه جهت کشت عدس به طور کامل بر خوردار نبوده (Sohrabi et al., 2022) و میانگین عملکرد این محصول در مناطق کشت عدس که غالباً دیم میباشند، از میانگین جهانی پایینتر است (Sabaghpour *et al.*, 2013). همچنین شواهد نشان میدهد که بیشترین میزان افت عملکرد عدس در مناطق با اقلیم گرم و خشک بهعلت رخ داد تنشهای غیرزیستی از جمله تنش خشكي مي باشد (Kumar et al., 2013).

هرچند در جهت بهبود عملکرد و توسعه کشت حبوبات دانهای پژوهش های متعددی صورت گرفته است، اما برنامههای اصلاحی برای بهبود عملکرد کمی و کیفی این محصولات از جمله عدس، بهدلیل کمبود محتوای ژنتیکی Sultana *et al.*, بهدلیل کمبود محتوای ژنتیک با چالش های زیادی مواجه میباشد (...Sultana *et al.* 2014). استفاده از روش های مهندسی ژنتیک و زیستفناوری بهمنظور بهبود روش های کلاسیک، افزایش کارایی و دقت در نوترکیبی حاصل از آمیزش ها و افزایش دامنه خزانه ژنی عدس امری ضروری است (Kumar *et* 2014). با توجه به اینکه تنش های غیرزیستی منجر به تغییر در بیان ژنهای متعددی در بافتها و دورههای نموی

مختلف میشوند، از اینرو انتظار میرود که با تحلیل ترنسکریپتوم (Transcriptome)، ژنهایی که تحت تنش تغییر بیان داده را شناسایی نمود. از اینرو هدف از پژوهش حاضر شناسایی و بررسی نقش IncRNAها در پاسخ عدس به تنش خشکی بود.

مواد و روشها

جمع آوری و سرهمبندی ترنسکریپتوم عدس: در گام نخست، كتابخانه دادههاي توالىيابي شده ترنسكريپتوم عدس تحت شرایط تنش خشکی و شاهد که در پژوهش حسینی و همکاران (Hosseini et al., 2021) ایجاد شده بودند، از پایگاه داده NCBI به آدرس https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra دانلود شد. یس از تعیین کیفیت دادهها توسط نرمافزار FastQC، دادههای کم کیفیت در فرآیند تریم توسط نرمافزار Trimmomatic (نسخه ۲۷/۰)، حذف و در نهایت پس از ادغام کتابخانههای مختلف توسط نرمافزار CLC genomics workbench (نسخه ۲۱)، سرهمبندی ترنسکریپتوم گیاه عدس انجام شد. مستندسازی توالی رونوشتهای بهدستآمده با بلاست آنها توسط ابزار BLASTx عليه پايگاه پروتئينهاي (Non redundant protein database: NR) غيرتكرارى انجام شد. پس از نقشهیابی خوانش ها با اسمبلی ایجاد شده، رونوشتهای با بیان افتراقی (Differentially expressed genes: DEGs) با استفاده از بسته نرمافزاری edgeR با در نظر گرفتن آستانه log2 Fold د ۲۰/۰ $FDR \leq \cdot/ \cdot$ مشخص شدند. Change

شناسایی AncRNAاها: به منظور شناسایی AncRNAها در ترنسکریپتوم عدس از بسته نرم افزاری (PLncPRO) استفاده شد (Singh *et al.*, 2017). در این بسته نرم افزاری ابتدا با استفاده از مدل گیاهان دولپه و ویژگیهای ثبت شده IncRNAها در این مدل به شناسایی توالیهای احتمالی IncRNA پرداخته می شود. پس از تشخیص توالیهای احتمالی با استفاده از پارامترهای پیش فرض نرم افزار، به جداسازی توالیهایی که به احتمال بالاتری به عنوان IncRNA شناخته شدند، اقدام شد (Singh *et al.*, 2017).

در مرحله نهایی پس از مستندسازی توالیهای بهدست آمده با استفاده از بانکهای اطلاعاتی متعدد پروتئینی از جمله NR IncRNA و CCD، تنها توالیهایی بهعنوان IncRNA انتخاب شدند که رکورد مشابهی در هیچکدام از پایگاههای داده مذکور نداشتند. در نهایت با استفاده از دادههای بیانی مرحله قبل میزان بیان هر توالی مشخص شد و توالیهای IncRNA که بیشترین تغییر بیان را در تیمار مورد نظر نشان دادند، انتخاب و بیان آنها در شرایط مذکور با استفاده و اکنش Real-time PCR

بررسی شبکه همیانی IncRNAs-DEGs بهمنظور بررسی شبکه هم.یانی mRNA و nncRNA منتخب از بسته نرمافزاری psych در محیط R استفاده شد (Revelle and نرمافزاری Revelle, 2015 در محیط R استفاده شد (Revelle, 2015 Cytoscape و RNAهای منتخب، از نرمافزار pEGs (نسخه ۳/۹) برای ترسیم شبکه هم.یانی استفاده شد. در نهایت Bindea) ClueGO استفاده شد. در نهایت بهمنظور مستندسازی عملکردی از افزونه CueGO (Bindea) (et al., 2009) و جهت شناسایی ژنهای هم.یان کلیدی از افزونه cytoscape استفاده شد

کشت و اعمال تنش: بذور عدس (رقم گچساران، رقم عدس معرفی شده برای مناطق گرمسیر) در گلدانهای حاوی پیتماس، ورمی کولیت و ماسه با نسبت (۱:۱:۱) کشت شدند. گلدانها به اتاق رشد با متوسط دمای روزانه C^o ۲۳ تحت چرخههای تاریکی/روشنایی، ۸ /۱٦ ساعت منتقل شدند. اعمال تنش کم آبیاری، بر روی گیاهچههای ۲۱ روزه مطابق با شرایط اعمال شده در مطالعه قبل (%PEG 20 بهمدت ۷۲ ساعت) صورت گرفت

(Hosseini <i>et al.</i> , 2021). گروه کنترل در شرایط بهینه تا
پایان آزمایش نگهداری شد. پس از اعمال تنش از برگ
گیاهان نمونهبرداری و بلافاصله در ازت مایع قرار داده
شدند و تا زمان استخراج RNA در یخچال با دمای ۸۰-
سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و ساخت کتابخانه cDNA: استخراج RNA از RNA از بافت برگ یودر شده با استفاده از کیت xPlus (شرکت سیناکلون، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج RNA، سنجش کیفیت با استفاده از الکتروفورز نمونه RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام و همچنین کمیت و خلوص RNA نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ بررسی شد. پس از استخراج RNA برای حذف آلودگی احتمالی DNA موجود در نمونهها، از روش تيمار با أنزيم DNase I) DNase I Scientific, USA) استفاده شد. همچنین بهمنظور ساخت كتابخانه cDNA از RNA استخراج شده، از كيت RNA كتابخانه First Strand cDNA Synthesis Kit شركت فرمنتاز (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, US) استفاده شد. واکنش qRT-PCR: ابتدا بهمنظور طراحی آغازگرها، توالیهای مورد نظر در فرمت Fasta از فایل سرهمبندی نهایی استخراج شدند. سپس برای اطمینان بیشتر توالیهای مورد نظر با پیشنویس اولیه ژنوم عدس BLASTn (https://knowpulse.usask.ca/Lens) شدند. برای طراحی آغازگر از نرمافزار AlleleID (نسخه ۲) استفاده شد. فهرست آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ ارائه شده است.

qRT-PCR	, واکنثر	شده برای	ای استفادہ	۱- أغاز گره	جدول
---------	----------	----------	------------	-------------	------

Table 1. Primer sequences used for qRT-PCR reaction				
11	* É.I.: Ĩ 11 -		دمای اتصال	اندازه محصول
مستحصله توالی TL company	نوالی اعار در پیسرو دومورده موجونیم Eom	نوالی اعار در پسرو مصروروه مورستین و Bayana	(°C)	(جفتباز)
Sequence ID	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Tm (°C)	Product size (bp)
LCUL_evgLoc us_104392	5'-CAAAGAGITTIGATATTTAGITTICC-3'	5'-AGTTCTGAATGAAATGTTCTTAGG-3'	50.4	115
LCUL_evgL ocus_61876	5'-ATGCTATCCCAACACATCAATG-3'	5'-GCCATACTCAGAAGATACAGAGG-3'	52.9	112
LCUL_evgL ocus_99066	5'-TATGCGGCTGTTTTGGAATGTAAG-3'	5'-TGAAGATACCTCAAGAATTAGACG-3'	51	142

بررسی بیان نسبی توالیهای انتخاب شده با استفاده از روش qRT-PCR مبتنی بر رنگ SYBR green انجام گرفت. برای انجام واکنش از روتور ۷۲ چاهکی دستگاه Rotor-Gene Q شرکت Qiagen استفاده گردید. در این مطالعه از مستر میکس SYBR Premix Ex Taq II شركت TaKaRa براى انجام واكنش qRT-PCR استفاده گرديد. قبل از انجام واكنش -qRT PCR تمامى نمونه ها به نسبت ٥: ١ رقيق شدند. واكنش -PCR PCR در دو تکرار فنی و سه تکرار بیولوژیکی انجام گرفت. مراحل تكثير عبارتاند از: واسرشتهسازى اوليه بهمدت ٥ دقیقه، سپس ٤٠ چرخه شامل واسرشتهسازی سازی ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه، اتصال ۱۵ ثانیه در دمای اتصال (مناسب برای جفت آغازگر مورد نظر) و بلندسازی ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه و درنهایت بلند سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بهمدت ۳ دقیقه در نظر گرفته شد. اختصاصیت آغازگرهای بهکار گرفتهشده با استفاده از ژل آگارز و منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. بعد از واکنش، منحنی استاندارد رسم شد و کارایی واکنش آغازگرها مورد ارزیابی قرار گرفت. نرمالسازی Ct ژنهای مورد بررسی با استفاده از Ct ژن کنترل داخلی (GAPDH) انجام گرفت. تغییر نسبی بیان ژنها با استفاده از روش ^{۵۵۵۲} 2 مورد اندازه گیری قرار گرفت .(Livak and Schmittgen, 2001)

نتايج و بحث

سرهمبندی نوپدید، پیرایش و پالایش دادهها: سرهمبندی نوپدید، پیرایش و پالایش دادها: از فرآیند پیرایش و پالایش دادهها، حذف خوانشهای با کیفیت پایین و توالیهای آداپتور از خوانشهای خام، کیفیت پایین و توالیهای آداپتور از خوانشهای خام، ماند (جدول ۲). سرهمبندی نوپدید ترنسکریپتوم برگ عدس با استفاده خوانشهای تمیز شده از طریق نرمافزار Trinity انجام و از بسته نرمافزاری استفاده شد. پس از زدودن توالیهای تکراری، ۵۳۷۹۱ یونی ژن بهدست آمد. طول بلندترین

رونوشت سرهمبندی شده و N50 به ترتیب ۲۰۹۲ و ۱۵۳۹ محاسبه شد. تمام یونی ژنها با استفاده از BLASTx (cutoff E-value < 10⁻⁵) علیه پایگاه پروتئین های غیر تکراری (NR) بلاست شدند. درمجموع ۲۳۹۰ یونی ژن توسط پایگاه داده NR (۲۰/۲۵ درصد) مستندسازی شدند.

شناسایی توالیهای IncRNA در پروفایل بیانی عدس: از مجموع رونوشتهای بهدست آمده (۵۳۷۹۱)، ۱۹۲۷ توالى با استفاده از مدل PLncPRO بهعنوان LncRNA پیش بینی شدند. پس از فرآیند حاشیهنویسی توالیها با استفاده از پایگاه داده Pfam تعداد توالی های IncRNA باقیمانده (غیرکدکننده) به ۲۰۰۳ مورد تقلیل یافت. علاوهبر این برای تائید نهایی توالیهای LncRNA از مدل CPC و الگوريتم LncRNA2 نيز استفاده شد. پس از فيلتر سختگیرانه ذکر شده تعداد توالی های IncRNA باقی مانده به ۳۵۹۰ رسید. برای اطمینان بیشتر توالی IncRNAهای پیش بینی شده با استفاده از ٤ پایگاه داده IncRNA گیاهی (GreeNC و PLncDB ،CANTATA ،PNRD) مورد كنكاش قرار گرفتند. نتايج جستجوى عليه چهار پايگاه مذکور، توالی های شناسایی شده را در چهار گروه قرار داد، بەطورى كە ١١ توالى پيش بينى شدە توسط ھر چھار پايگاه داده تائید شد (جدول ۲). همچنین نتایج نشان داد که ۱۵۱۸ توالی حداقل یکبار در گیاهان مختلف شناسایی شده و ۲۰۷۲ توالی نیز برای اولین بار در عدس گزارش میشوند. همچنین نتایج بلاست علیه ٤ پایگاه داده نشان داد که ده گیاه برتر از نظر میزان شباهت با توالیهای شناسایی شده اغلب متعلق به خانواده حبوبات بوده و قرابت بسيار بالايي با عدس دارند. در بین گیاهان با قرابت بالا، نخودفرنگی (Pisum sativum)، شبدر قرمز (Trifolium pratense) و يونجه سربريده (Medicago truncatula) به ترتيب بيشترين میزان شباهت را با توالیهای IncRNA پیشبینی شده در عدس نشان دادند (شکل ۱).

و یژ گی ها	مقدار	
Attributes	Value	
تعداد خوانشهای خام	104460818	
Number of raw reads	174400010	
تعداد خوانش،های تمیز شده	180056006	
Number of cleaned reads	180930096	
تعداد رونوشت	53701	
Number of transcripts	55791	
كوتاهترين طول رونوشت (نوكلئوتيد)	200	
Shortest transcript length (NT)	200	
بلندترين طول رونوشت (نوكلئوتيد)	20(22	
longest transcript length (NT)	20623	
تعداد نوكلئوتيد	62724167	
Number of nucleotides		
ميانگين طول رونوشت (نوكلئوتيد)	1166.070	
Mean length of transcript (NT)	1166.072	
تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱ کیلو نوکلئوتید	222.00	
The number of transcripts with a length of more than 1 Kb	23269	
تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱۰ کیلو نوکلئوتید	15	
The number of transcripts with a length of more than 10 Kb	17	
تعداد رونوشتهای دارای قاب خوانش باز		
Number of transcripts with open reading frames	44128	
N90 (nt)	556	
N70 (nt)	1042	
N50 (nt)	1584	
N30 (nt)	2244	
N10 (nt)	3596	
GC%	41.92	

جدول ۲- ویژگیهای سرهمبندی ترنسکریپتوم عدس تحت تنش خشکی

Table 2.	Characteristics	of transcri	ptome assembly	v of lentil	under drought str	ess
				/		

جدول ۳- نتايج حاشيهنويسي LncRNA هاي شناسايي شده عليه چهار پايگاه داده شامل PLncDB ،CANTATA ،PNRD و

GreeNC

Table 3. The results of identified LncRNA annotation against four databases, including PNRD, CANTATA, PLncDB, and GreeNC

تعداد پایگاه تائید کننده توالیهای IncRNA	تعداد توالی IncRNA شناسایی شدہ
No. of databases that confirm lncRNA sequences	No. of identified lncRNA sequence
4	11
3	370
2	418
1	719
0	2072
مجموع	3590
Total	



شکل ۱- توزیع فراوانی خانوادههای گیاهی که با توالیهای IncRNA شناسایی شده قرابت دارند Figure 1. Distribution of plant families related to identified IncRNA sequences

نرمال شده این مجموعه داده در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که DEGs ۱۸ با LCUL_evgLocus_61876 با LCUL_evgLocus است. همچنین نتایج نشان داد که از DEG ٤٨ که با LCUL_evgLocus_104392 همييان هستند، ۳۸ ژن بهطور مشترک با LCUL_evgLocus_99066 همییان بوده و ده ژن بهطور اختصاصى با LCUL_evgLocus_104392 هم بيان مى باشند. در مقابل از DEG ٤٣ كه با LCUL_evgLocus_99066 همییان بودند تنها ۵ DEG به صورت اختصاصی و سایر DEGها بهصورت مشترک با LCUL_evgLocus_104392 همییان بودند. مستندسازی عملکردی و شناسایی مسیرهای متابولیکی شبکه همبیان: مستندسازی عملکردی و شناسایی مسیرهای متابولیکی شبکه همبیان با استفاده از افزونه ClueGO انجام شد. بدین منظور پس از تبدیل مشخصه DEGهای بهدست آمده به مشخصه ژنهای آرابیدوپسیس، گروههای کارکردی در سه حوزه فرایندهای زیستی (Biological Processes:) BP)، عملكرد مولكولي (Molecular Function: MF) و جايگاه سلولى (Cellular Components: CC) تعيين شدند (شكل ٤ الف، ب و ج).

بررسی بیان توالیهای IncRNA شناسایی شده در پروفایل بیانی عدس تحت تنش خشکی با در نظر گرفتن 5 < TPM (Transcripts per million) انجام شد. نتایج نشان داد که از ۳۵۹۰ توالی شناسایی شده تنها ۱۳۱ مورد دارای TPM بالای ٥ بودند. گروهبندی (مبتنیبر بیان) توالیهای پیشبینی شده بر اساس مقادیر (Log₁₀ (TPM+1 و روش UPGMA نشان داد که IncRNAها در دو گروه کاملاً مجزا قرار می گیرند. گروه کوچکتر ۳۰ عضو داشته و بیان این IncRNAها در شرایط تنش خشکی با کاهش مواجه می شوند و در مقابل در گروه بزرگتر که ۱۰۱ مورد از IncRNAها را به خود اختصاص داده است، بیان در شرایط تنش خشکی افزایش یافت (شکل ۲). شبکه همبیانی LncRNAها و DEGsهای شناسایی شده: بەمنظور شناسایی شبکه همبیانی بین IncRNAهای پیشبینی شده و DEGsهای شناسایی شده تحت تنش خشکی در عدس از ۲۰۵ ژن با افتراق بیان معنی دار و دارای 5 < TPM LCUL_evgLocus_104392) lncRNA ۳ به همراه ۳ LCUL_evgLocus_99066 و LCUL_evgLocus_61876 دارای بیان افتراقی و TPM استفاده شد. شبکه همییانی ایجاد شده با استفاده از ماتریس همبستگی مبتنی بر مقادیر بیان



Figure 2. Heatmap expression profiles for lncRNAs identified in the lentil transcriptome under drought stress. Red and blue colors indicate high and low expression levels, respectively.



شکل ۳- شبکه همپیانی LncRNAs-DEGs عدس تحت تنش خشکی. عناصر مربع و دایرهای شکل بهترتیب IncRNAها و DEGها را نشان میدهند. رنگ آبی، قرمز و حاشیه بیرونی زرد بهترتیب عناصر همپیان با LCUL_evgLocus_104392 LCUL_evgLocus و LCUL_evgLocus_99066 میباشند. عناصر دارای دو رنگ، بهصورت مشترک با دو IncRNA همپیان هستند.

Figure 3. LncRNAs-DEGs co-expression network of lentil under drought stress. Square and circular shapes represent lncRNAs and DEGs, respectively. Blue, red, and yellow edges are co-expressed elements with LCUL_evgLocus_61876, LCUL_evgLocus_104392, and LCUL_evgLocus_99066, respectively. Elements with two colors are co-expressed with two lncRNAs.



Figure 4. Functional annotation of LncRNA-DEGs co-expression network of lentil under drought stress based on (a) biological processes, (b) molecular functions and (c) cellular component.

شناسایی و پیشبینی عملکرد RNAهای بلند غیر کدکننده پاسخگو ...

در حوزه فرآیند زیستی (BP) چهار زیرگروه شامل تنظیم ریتم شبانهروزی، پاسخ به یون روی، واکنش نوری فتوسنتزی و هموستازی یون سلولی دارای بیشترین تعداد ژن همییان بودند. در این حوزه عملکردی ۲۱ ژن همبیان دخیل بود که از میان آنها بر اساس معيار درجه (Degree)، سه ژن FER2، FER1 و FRO2 جزء مهمترین ژنها بهشمار میروند. در حوزه عملکرد مولکولی (MF) چهار زیرگروه شامل اتصال کلروفیل، فعالیت اکسیدوردوکتاز و اثر بر يون هاى فلزى، اتصال تركيبات آهن-ferrousدار و اتصال تركيبات آهن-ferricدار، داراي بيشترين تعداد ژن همييان بودند. در این حوزه عملکردی ۸ ژن همبیان دخیل بود که از میان آنها چهار ژن بر اساس معیار درجه (Degree)، FER1 ، FER2 و PAP3جزء مهمترین ژنها بهشمار میروند. همچنین در حوزه جایگاه سلولی (CC) سه زیرگروه شامل فتوسیستم، فتوسیستم I و مرکز واکنش فتوسیستم I دارای بیشترین تعداد ژن همییان بودند. در این حوزه عملکردی ۷ ژن همییان شامل PSAE-2 ،PSAD-2، PSAO ،PSI-P ،LHCB2.3 ،PSAH2 و PSAR دخيل بودند.

علاوهبر این نتایج بررسی مسیرهای متابولیکی که ژنهای همبیان در آن دخیل بودند (شکل ۵) نشان داد که مسیرهای فتوستنز و فتوستنز – پروتئینهای آنتن گیرنده نور توسط ژنهای همیان شناسایی شده به طور معنی داری غنی سازی شده اند. مجموعه ژنهای شناسایی شده در مسیرهای غنی سازی شده شامل ژنهای PSAO PSAK PSAH2 PSAE-2 PSAD-2 PETEI PSAR PSBR LHCB4.1 و LHCB4.1 بود.

اعتبار سنجی بیان محاسبه شده با استفاده از دادههای حاصل از توالىيابى RNA، سه توالى LncRNA منتخب د LCUL_evgLocus_104392 ،LCUL_evgLocus_61876) و LCUL_evgLocus_99066) در مطالعه حاضر با استفاده از qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مقایسه بیان نسبی این سه توالی در دو حالت RNA-Seq و RRT-PCR نشان داد که از سه توالی مورد نظر دو توالی (LCUL_evgLocus_99066 e LCUL_evgLocus_104392) دارای بیانی تقریباً مشابه در دو حالت سنجش میباشند. با این حال بیان توالی LCUL_evgLocus_61876 در دو حالت سنجش اختلاف داشتند. بر اساس نتایج qRT-PCR توالى LCUL_evgLocus_99066 با بيان نسبى (Fold Change) معادل ۱/۹٤ بیشترین میزان تغییرات مثبت را نشان داد که در مقایسه با روش RNA-seq نیز همین توالی بیشترین میزان بیان را (Log2FC = ۳/۰۱) را نشان داد. بررسی میزان بیان LCUL_evgLocus_61876 با استفاده از روش qRT-PCR نشان داد که این توالی تحت تنش خشکی با کاهش بیان روبرو می گردد، بهطوری که میزان بیان نسبی آن معادل ۲٤/۰۰ بهدست آمد. این در حالی است که بیان این توالی در روش RNA-seq مثبت و

اعتبارسنجی بیان LncRNAهای شناسایی شده: به منظور

خديور و همكاران



معادل ۱/۱۷ بود.

شکل ۵- مسیرهای متابولیکی غنی شده توسط شبکه هم بیانی LncRNA-DEGs در عدس تحت تنش خشکی Figure 5. Metabolic pathways enriched by LncRNA-DEGs co-expression network in lentils under drought stress



شکل 3– اعتبار سنجی دادههای بیانی IncRNAهای انتخابی دخیل در تنش خشکی توسط RNA-seq با استفاده از qRT-PCR. مقادیر بیان نسبی برحسب روش qRT-PCR و تجزیه و تحلیل RNA-seq با خطای استاندارد به ازای سه تکرار زیستی ارائه شده است.

Figure 6. Validation of expression data of selected lncRNAs involved in drought stress by RNA-seq using qRT-PCR. Relative expression values of qRT-PCR and relative expression changes from RNA-seq are presented with the SE of three biological replicates.

غیرکدکننده و نقش مکانیسمهای تنظیمی آنها برای کنترل ژنهای دخیل در واکنشهای مختلف زیستی و پاسخ به تنش، درک ما از تنظیم ژن در گیاهان را ارتقا داده است Au *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2020; Kumar and) (Chakraborty, 2021

در پژوهشهای متعدد نقش IncRNAها در فرآیند رشد، مقاومت به بیماریها، تحمل به انواع مختلف تنشها و سایر فرآیندهای زیستی از طریق بازسازی کروماتین، اصلاح هیستون، پیرایش متناوب، یا عمل بهعنوان شبیهساز هدف Nejat and Mantri, 2018; Patra *et al.*, 2018 ثبت شده است (,2023; Sun *et al.*, 2018 ثبت شده است (,2023). تاکنون مطالعاتی که به شناسایی therpare *et al.*, 2018 ماهای مکانیسمهای مولکولی تنظیمی پیچیده آنها یا حاشیهنویسی عملکردی در گیاه عدس منجر شود، انجام نگرفته است. در این مطالعه شناسایی و پیش بینی عملکرد دهم مورد بررسی قرار گرفت که منجر به شناسایی ۳۵۹۰ توالی nerNA برای اولین بار در گیاه عدس شد.

در تحقیقی توسط فوکودا و همکاران (Fukuda *et al*.,) 2019) که در آن به بررسی تعداد IncRNA در گیاه آرابیدوپسیس در شرایط کمبود مواد مغذی پرداختند تعداد کمبود آب از جمله مهمترین تنشهای غیرزیستی است که منجر به تغییرات در خصوصیات فیزیولوژیک، مورفولوژیک، اکولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان میشود (Zhang et al., 2018; Kollist et al., 2019) که در نهایت، این تغییرات میتواند بر رشد کلی گیاه تأثیر بگذارد و منجر به کاهش عملکرد و یا از دست رفتن گیاه شود (Singh et al., 2017). کشور ما نیز در نواحی خشک و نیمهخشک کره زمین واقع شده و احتمال رخ داد پدیده خشکسالی و افت عملکرد محصولات ناشی از آن در اغلب مناطق کشت بالاست.

گیاهان دارای چندین مکانیسم پیچیده برای درک عوامل آسیبرسان زیستی و غیرزیستی هستند که شامل ایجاد مسیرهای پیامرسانی و پاسخ مناسب با برنامهریزی مجدد بیان ژنهای متعدد در سطح رونویسی، پس از رونویسی و اپیژنتیک برای سازگاری تحت شرایط محیطی آسیبرسان است (Waseem *et al.*, 2020). تاکنون چندین مکانیسم پیچیده در گیاهان در سطوح ژنتیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی برای حفظ هموستازی سلولی خود در محیطهای نامطلوب شناسایی شده است (2020; Waseem *et al.*, 2020).

شناسایی و پیش بینی عملکرد RNAهای بلند غیر کدکننده پاسخگو ...

IncRNA ٦٠ با بیان متفاوت شناسایی شد. همچنین در مطالعهای مشابه، کومار و همکاران (Kumar et al., 2022) بود بر روی گیاه ارزن مروارید (Pennisetum glaucum L.) تحت شرایط تنش خشکی پرداختند. نتایج این مطالعه حاکی از نقش حیاتی RNAهای بلند غیرکدکننده (IncRNAs) در فرایندهای بیولوژیکی مختلفی دخیل در پاسخ به تنش خشکی بود (Kumar et al., 2022). در مجموع IncRNAs ۸۷۹ در گیاه ارزن شناسایی شد که از این تعداد، ۱۹۸ از IncRNAs در ریشه و برگ گیاهان تحت تنش خشكي فعاليت داشتند. بهطور كلى تعداد قابل توجهي از RNAهای بلند غیر کدکننده در شرایط تنش خشکی در گیاهان همچون گوجهفرنگی، پنبه، موز، کلزا، برنج و چغندرقند شناسایی شده است که می تواند نویدبخش تأثیر مهم این توالی در شرایط تنش خشکی باشد (-Lamin Samu et al., 2022; Lu et al., 2017; Muthusamy et al., 2015; Nejat and Mantri, 2018; Tan et al., 2020; .(Weidong et al., 2020; Zou et al., 2023

مطالعه حاضر سه IncRNA تحت عناوین در LCUL_evgLocus_61876 ،LCUL_evgLocus_104392 و LCUL_evgLocus_99066 بهعنوان IncRNAهای دارای بيان افتراقى با 5 < TPM شناسايى شدند. مطالعات هستیشناسی ژنهای همبیان با سه IncRNA مذکور نشان داد که IncRNAs های مربوطه در مکانیسمهای مهم سلولی از جمله فرآیند زیستی، عملکردهای مولکولی و تجمع در مکانهای خاصی از سلول دخیل هستند و همچنین در فعالیتهای زیستی همچون انتقال سیگنالهای هورمونی، پاسخ به ریتم شبانهروزی، پاسخ به یون روی، واکنش نوری و فتوسنتزی، هموستازی، فعالیت اکسیدوردوکتاز، یونهای مغذی، اتصال ترکیبات آهن و فتوسیستم نقش حیاتی در مكانيسم پاسخ به تنش ايفا ميكنند. در مطالعه مشابه با نتايج این مطالعه، تأثیر یک IncRNAs جدید، تحت شرایط خشکی در گیاه کاساوا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان از ارتباط مستقیم این RNA غیرکدکننده با عوامل رونویسی و متابولیسمها دارد و بهعنوان یک عامل میانجی گر در پاسخ به خشکی بود (Dong et al., 2022).

همچنين مطالعه توسط کين و همکاران (Qin et al., 2017) نشان داد که IncRNAهای دخیل در پاسخ به تنش خشکی در Arabidopsis بهعنوان یک تنظیم کننده مثبت پاسخ گیاه به تنش خشکی و شوری نقش ایفا میکند. همچنین در یک مطالعه در پاسخ به تنش خشکی در گیاه صنوبر مشخص شد که IncRNAهای بهعنوان یک عامل میانجیگر در تنظیم بیان ژنهای پاسخ به تنش نقش ایفا میکنند. نتایج مطالعات مذكور نقش احتمالي سه IncRNA شناسايي شده در مطالعه حاضر بهعنوان میانجیگر در تنش خشکی را تائید میکنند. با جمعبندی نتایج حاصل از این تحقیق و سایر نتایج ذکر شده از محققین دیگر باید به این نکته اشاره نمود که IncRNAها می توانند با به کار گیری مکانیسمهای پیچیدہ مبتنی بر endogenous target mimic) eTM)، تنظیم با واسطه رونویسی، تنظیم کروماتین، یا تنظیم مستقیم رونویسی ژنهای مختلف در مسیر پاسخ به خشکی به این تنش واكنش نشان دهند (Lamin-Samu et al., 2022; Lu et al., 2017; Muthusamy et al., 2015; Nejat and Mantri, 2018; Tan et al., 2020; Weidong et al., 2020; .(Zou et al., 2023

خديور و همكاران

با توجه به مکانیسم پیچیده و تعداد زیاد ژنهای دخیل در تحمل به تنشهای خشکی، به مطالعاتی با جزییات بیشتر برای درک بهتر این فرآیند نیاز است. در این مطالعه، تجزیه و تحلیل توالی های حاصل از RNA-seq، سه IncRNA مهم در واکنش به تنش خشکی را نشان داد اما باید به این اشاره نمود که تجزیه و تحلیل RNA-seq چشم اندازه جامعی را از بیان IncRNAها نشان میدهد و اعتبار سنجی عملکردی با استفاده از qRT-PCR در پاسخ به تنش های خشکی نیاز است؛ بنابراین در این مطالعه سه تا از مهمترین IncRNA که توسط تجزیه و تحلیل RNA-seq بهدست آمده است با استفاده از qRT-PCR مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که رونوشتLCUL_evgLocus_99066 با بیانی نسبی (Log2FC) معادل ۱/۹٤ بیشترین میزان تغییرات را به خود اختصاص داد در مقابل LCUL_evgLocus_61876 با تغيير بيان معادل ٢٤/٠-Log2FC كمترين ميزان را نشان داد.

یژوهش های ژنتیک گیاهی / جلد ۹ / شماره ۲ / ۱٤۰۱

با مقايسه نتايج حاصل از اين مطالعه با ساير مطالعات مي-

توان به این نتیجه دست پیدا کرد که مراحل مختلف رشد

گیاه، گونه و نوع بافت می تواند تأثیر متفاوتی در میزان بیان

IncRNA داشته باشد. IncRNAها با تأثیر در مکانیسمهای

مولکولی پیچیده و مسیرهای متابولیتی همچون متابولیسم

فیتوهورمون، ساکارز و نشاسته می توانند در سازگاری

گیاهان با محیطهای چالش برانگیز نقش داشته و به گیاه

برای تحمل تنش های غیرزیستی مختلف ازجمله تنش

بهطور کلی در مطالعه حاضر برای اولینباربه شناسایی و

تعیین نقش IncRNAها در گیاه عدس تحت شرایط تنش

خشکی با استفاده از فناوری توالی یابی RNA پرداخته شد.

در مجموع طی این مطالعه، IncRNA ۳۵۹۰ در عدس

شناسایی شد. تعداد زیادی از IncRNAها با ژنهای مرتبط

با تنظیم ریتم شبانهروزی، پاسخ به یون روی، واکنش نوری

فتوسنتزي و هموستازي يون سلولي همبيان بودند. يافتههاي

ما نشان داد که IncRNAهای شناسایی شده در پاسخ به

تنش خشکی ممکن است بیان ژنهای هدف خود را با

افزایش بیان و یا با کاهش بیان تنظیم کنند. نتایج این مطالعه

می تواند به عنوان پایهای برای تحقیقات آتی IncRNA باشد

و گامی در جهت بینش بهتر در مورد عملکرد IncRNA در

توسعه و اصلاح ارقام متحمل به تنش خشکی ارائه دهد.

در نهایت می توان از ژنهای مورد بررسی به عنوان ژنهای

نامزد در بهبود ژنتیکی تحمل به خشکی در عدس بهره برد.

خشکی کمک کند.

تغييرات بيان IncRNAهای LCUL_evgLocus_104392 و RNA- در پاسخ به تنش در نتایج LCUL_evgLocus_99066 seq و qRT-PCR روابط مثبتی نشان دادند که این امر نشان دهنده اعتبار دادههای حاصل از RNA-seq بود. اگرچه IncRNAها پروتئینی را کد نمیکنند، اما اغلب می توانند مولکولهای RNA را تولید کنند که نقش های عملکردی دارند. IncRNAها بیان ژن را در حالت سیس یا ترانس در هسته کنترل می کنند (Urquiaga et al., 2020). Actingهای cis-Acting و trans-acting بهترتیب بیان ژن را در مکانهای نزدیک و دور تنظیم میکنند. با وجود اینکه هیچ پایگاه دادهای با حاشیهنویسی مستقیم برای IncRNAها وجود ندارد، اما آنها اغلب با ژنهای كد كننده پروتئين هدف خود بيان مي شوند؛ عملكردهاي بيولوژيكي فرضي IncRNAها اغلب با انجام همبيان و مكانيابي و با تجزیه و تحلیل عملکردی ژنهای هدف آنها حدس زده می شود. در مطالعهای بر روی گیاه گوجهفرنگی تحت شرایط تنش خشکی به ساختارهای تولیدمثلی پرداخته شد که نتایج حاصل از این مطالعه ضمن تائید نقش IncRNAها در تنظیم بیان ژنها در طول دوره رشد، تولیدمثل و پاسخ به شرایط تنش در این مرحله را تائید میکند. در این مطالعه، ۱ncRNA ۲۸۱۷ بهطور خاص در بافت بساک بیان شدند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که ۸۹/٤ درصد از IncRNA های بیان شده در این مطالعه هم بهعنوان IncRNAهای سیس و هم ترانس عمل می کنند که بر پیچیدگی عملکرد مولکولی IncRNAها می افزایند و تفاوت بیان در IncRNA در زمان تنش می تواند گویای این امر باشد (Lamin-Samu et al., 2022).

References

- Arumuganathan, K. and Earle, E.D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, **9:** 208-218.
- Au, P.C.K., Zhu, Q.H., Dennis, E.S. and Wang, M.B. (2011). Long non-coding RNA-mediated mechanisms independent of the RNAi pathway in animals and plants. *RNA Biology*, 8: 404-414.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pagès, F., Trajanoski, Z. and Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25: 1091-1093.
- Chen, L., Zhu, Q.H. and Kaufmann, K. (2020). Long non-coding RNAs in plants: emerging modulators of gene activity in development and stress responses. *Planta*, **252**: 92.
- Chen, L.L. and Carmichael, G.G. (2010). Decoding the function of nuclear long non-coding RNAs. *Current Opinion in Cell Biology*, **22**: 357-364.

- **Dong, S.M., Liang, X., LI, Z.B., Jie, S., Yan, H.B., LI, S.X., Liao, W.B. and Ming, P.** (2022). A novel long non-coding RNA, DIR, increases drought tolerance in cassava by modifying stress-related gene expression. *Journal of Integrative Agriculture*, **21:** 2588-2602.
- Fukuda, M., Nishida, S., Kakei, Y., Shimada, Y. and Fujiwara, T. (2019). Genome-wide analysis of long intergenic noncoding RNAs responding to low-nutrient conditions in *Arabidopsis thaliana*: possible involvement of trans-acting siRNA3 in response to low nitrogen. *Plant and Cell Physiology*, 60: 1961-1973.
- He, M., He, C.Q. and Ding, N.Z. (2018). Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers In Plant Science*, 9: 1771.
- Hosseini, S.Z., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Fallahi, H., Rezaei Nejad, A. and Sohrabi, S.S. (2021). Dissecting the molecular responses of lentil to individual and combined drought and heat stresses by comparative transcriptomic analysis. *Genomics*, 113: 693-705.
- Jarroux, J., Morillon, A. and Pinskaya, M. (2017). History, discovery, and classification of lncRNAs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1008:**1-46
- Jha, U.C., Nayyar, H., Jha, R., Khurshid, M., Zhou, M., Mantri, N. and Siddique, K.H. (2020). Long non-coding RNAs: Emerging players regulating plant abiotic stress response and adaptation. *BMC Plant Biology*, **20**: 1-20.
- Khazaei, H., Caron, C.T., Fedoruk, M., Diapari, M., Vandenberg, A., Coyne, C.J., Mcgee, R. and Bett, K.E. (2016). genetic diversity of cultivated lentil (*Lens culinaris* Medik.) and its relation to the world's agro-ecological zones. *Frontiers in Plant Science*, **3901**: 7.
- Kollist, H., Zandalinas, S.I., Sengupta, S., Nuhkat, M., Kangasjärvi, J. and Mittler, R. (2019). Rapid responses to abiotic stress: priming the landscape for the signal transduction network. *Trends in Plant Science*, 24: 25-37.
- Kumar, B., Kumar, A., Jaiswal, S., Iquebal, M.A., Angadi, U.B., Tomar, R.S., Rai, A. and Kumar, D. (2022). Genome-wide identification of long non-coding RNAs in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.)) genotype subjected to drought stress. *Agronomy*, 12(8): 1976.
- Kumar, K. and Chakraborty, S. (2021). Roles of long non-coding RNAs in plant virus interactions. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **30:** 684-697.
- Kumar, S., Barpete, S., Kumar, J., Gupta, P. and Sarker, A. (2013). Global lentil production: constraints and strategies. *SATSA Mukhapatra–Annu Tech Issue*, **17:** 1-13.
- Kumar, S., Hamwieh, A., Manickavelu, A., Kumar, J., Sharma, T. and Baum, M. (2014) Advances in Lentil Genomics. In: Gupta, S., Nadarajan, N. and Gupta, D.S., Eds., *Legumes. in the Omic Era.* pp. 111-130, Springer New York, USA.
- Lamin-Samu, A.T., Zhuo, S., Ali, M. and Lu, G. (2022). Long non-coding RNA transcriptome landscape of anthers at different developmental stages in response to drought stress in tomato. *Genomics*, 114(4): 110383.
- **Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Lu, X., Wang, X., Chen, X., Shu, N., Wang, J., Wang, D., Wang, S., Fan, W., Guo, L., Guo, X. and Ye, W. (2017). Single-base resolution methylomes of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) reveal epigenome modifications in response to drought stress. *BMC Genomics*, 18: 297.
- Ma, L., Bajic, V.B. and Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, **10**: 924-933.
- Muthusamy, M., Uma, S., Backiyarani, S. and Saraswathi, M.S. (2015). Genome-wide screening for novel, drought stress-responsive long non-coding RNAs in drought-stressed leaf transcriptome of drought-tolerant and -susceptible banana (*Musa* spp) cultivars using Illumina high-throughput sequencing. *Plant Biotechnology Reports*, 9: 279-286.
- Nejat, N. and Mantri, N. (2018). Emerging roles of long non-coding RNAs in plant response to biotic and abiotic stresses. *Critical Reviews in Biotechnology*, **38**: 93-105.
- Patra, G.K., Gupta, D., Rout, G.R. and Panda, S.K. (2023). Role of long non coding RNA in plants under abiotic and biotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, **194:** 96-110.
- Qi, X., Xie ,S., Liu, Y., Yi, F. and Yu, J. (2013). Genome-wide annotation of genes and noncoding RNAs of foxtail millet in response to simulated drought stress by deep sequencing. *Plant Molecular Biology*, 83: 459-473.

- Qin, T., Zhao, H., Cui, P., Albesher, N. and Xionga, L. (2017). A nucleus-localized long non-coding rna enhances drought and salt stress tolerance. *Plant Physiology*, **175**: 1321-1336.
- Raeesi Sadati, S.Y., Jahanbakhsh Godehkahriz, S., Ebadi, A. and Sedghi, M. (2021). Study of expression pattern of some transcription factors in wheat under drought stress and zinc nanoparticles. *Plant Genetic Researches*, 7(2): 135-144 (In Persian).
- **Rafeie, M., Amerian, M.R., Sorkhi, B., Heidari, P. and Asghari, H.R.** (2020). Effect of exogenous brassinosteroid application on grain yield, some physiological traits and expression of genes related to this hormone signaling pathway in wheat under drought stress. *Plant Genetic Researches*, **6**(2): 157-172 (In Persian).
- Revelle, W. and Revelle, M.W. (2015). Package 'psych'. *The comprehensive R archive network*, 27: 337-338.
- Sabaghpour, S., Seyedi, F., Mahmoodi, A., Safikhani, M., Pezeshkpour, P., Rostemi, B., Kamel, M., Ferayedi, Y., Alahyari, N. and Poursiabidi, M. (2013). Cultivar release: kimiya, a new high yielding lentil cultivar for moderate cold and semi warm climate of Iran. *Seed and Plant Improvement Journal*, 29: 397-399.
- Singh, U., Khemka, N., Rajkumar, M.S., Garg, R. and Jain, M. (2017). PLncPRO for prediction of long non-coding RNAs (lncRNAs) in plants and its application for discovery of abiotic stressresponsive lncRNAs in rice and chickpea. *Nucleic Acids Research*, 45(22): 183.
- Sohrabi, S.S., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Fallahi, H. and Hosseini, S.Z. (2022). Identification of key genes and molecular mechanisms associated with temperature stress in lentil. *Gene*, **807**: 145952.
- Sultana, R., Choudhary, A.K., Pal, A.K., Saxena, K.B., Prasad, B.D. and Singh, R. (2014) Abiotic stresses in major pulses: Current status and strategies. In: Gaur, R.K. and Sharma, P., eds., *Approaches to Plant Stress and their Management*. pp. 173-190. Springer Science & Business Media, Berlin, DE.
- Sun, X., Zheng, H. and Sui, N. (2018). Regulation mechanism of long non-coding RNA in plant response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503: 402-407.
- Tan, X., Li, S., Hu, L. and Zhang, C. (2020). Genome-wide analysis of long non-coding RNAs (lncRNAs) in two contrasting rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes subjected to drought stress and re-watering. *BMC Plant Biology*, 20: 81.
- Trivedi, P.K. and Asif, M.H. (2020). Updates on plant long non-coding RNAs (lncRNAs): the regulatory components. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140: 259-269.
- Urquiaga, M.C.O., Thiebaut, F., Hemerly, A.S. and Ferreira, P.C.G. (2020). From trash to luxury: the potential role of plant lncRNA in DNA methylation during abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, **11**: 603246.
- Waseem, M., Liu, Y. and Xia, R. (2021). Long non-coding RNAs, the dark matter: an emerging regulatory component in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1): 86.
- Weidong, Q., Hongping, C., Zuozhen, Y., Biaolin, H., Xiangdong, L., Bing, A., Yuan, L., Yu, H., Jiankun, X. and Fantao, Z. (2020). Systematic characterization of long non-coding RNAs and their responses to drought stress in dongxiang wild rice. *Rice Science*, 27: 21-31.
- Weidong, Q., Hongping, C., Zuozhen, Y., Biaolin, H., Xiangdong, L., Bing, A., Yuan, L., Yu, H., Jiankun, X. and Fantao, Z. (2020). Systematic characterization of long non-coding rnas and their responses to drought stress in dongxiang wild rice. *Rice Science*, 27: 21-31.
- Xin, M., Wang, Y., Yao, Y., Song, N., Hu, Z., Qin, D., Xie, C., Peng, H., Ni, Z. and Sun, Q. (2011). Identification and characterization of wheat long non-protein coding RNAs responsive to powdery mildew infection and heat stress by using microarray analysis and SBS sequencing. *BMC Plant Biology*, **11**: 1-13.
- Zhang, C., Tang, G., Peng, X., Sun, F., Liu, S. and Xi, Y. (2018). Long non-coding RNAs of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) in multiple dehydration stresses. *BMC Plant Biology*, **18**: 79.
- Zou, C., Guo, Z., Zhao, S., Chen, J., Zhang, C. and Han, H. (2023). Genome-wide analysis of long non-coding RNAs in sugar beet (Beta vulgaris L.) under drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 14. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1118011.

Identification and Functional Prediction of Long Non-Coding RNAs Responsive to Drought Stress in *Lens culinaris* L.

Razieh Khadivar¹, Ahmad Ismaili^{2,*}, Seyed Sajad Sohrabi³ and Hasan Torabi Podeh⁴

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
- 2- Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Water Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received: December 3, 2022 – Accepted: March 6, 2023)

Abstract

Drought stress is one of the main environmental factors that affects growth and productivity of crop plants, including lentil. In the course of evolution evolution, crucial genetic regulations mediated by non-coding RNAs (ncRNAs) have emerged in plant in response to drought and other abiotic stresses. In the present study, after identifying lncRNAs within the expression profile of lentil, RNA-seq data and real-time PCR analyses were employed to examine the expression pattern of some of the identified lncRNAs under drought stress. Additionally, psych R package was used to generate the lncRNAs-DEGs co-expression network. A total of 3590 lncRNA sequences were identified in lentils transcriptome. Numerous lncRNAs were co-expressed with genes involved in circadian rhythm regulation, zinc ion response, photosynthetic photoreaction, and ion homeostasis. The LCUL_evgLocus_104392, LCUL_evgLocus_99066 and LCUL_evgLocus_61876 sequences were differentially expressed genes in response to drought stress, led to the identification of metabolic pathways associated with these sequences. In this study, lncRNA sequences were identified for the first time in lentil, and provided useful insights into the function of lncRNA in plant resistance to drought stress. The lncRNAs-DEGs co-expression network can lead to a better understanding of drought response mechanisms in lentil.

Keywords: Drought stress, Lentil, LncRNA, PLncPRO

DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.5.8

Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2025-04-24