



ISSN: 2676-7309



Lorestan University

Identification, Functional Prediction, and Expression Analysis of Long Non-Coding RNAs in Lentil (*Lens culinaris* L.) Under Salt Stress

Saba Saeidi | Ahmad Ismaili | Seyed Sajad Sohrabi

Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding author ✉: ismaili.a@lu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received: June 15, 2025;
Received in revised form: October 18, 2025;
Accepted: October 28, 2025;
Available online: December 30, 2025

Keywords:
Salt stress,
Gene expression regulation,
Lentil,
LncRNA

ABSTRACT

Throughout evolution, plants have developed complex molecular mechanisms to cope with biotic and abiotic stresses, many of which are driven by the reprogramming of gene expression. Multiple genetic factors regulate the molecular responses of plants to unfavorable environmental conditions, among which long non-coding RNAs (lncRNAs) play a significant role. LncRNAs play a pivotal role in regulating gene expression, epigenetic modifications, and signaling pathways, significantly contributing to responses against both biotic and abiotic stresses. In this study, for the first time, the identification, functional determination, and expression analysis of lncRNAs in lentil (*Lens culinaris* L.) under salt stress conditions were investigated. LncRNAs were identified using the lentil transcriptome reference, which was generated by assembling RNA sequencing data from the leaf and root tissues of lentil under both stress and control conditions. After filtering protein-coding sequences, several lncRNA sequences were identified using PLncPRO software. The relative expression levels of the identified sequences were measured, and the co-expression network with differentially expressed genes (DEGs) was constructed. To validate the RNA-seq data, the expression of selected lncRNAs was analyzed by qRT-PCR. The processing and refinement of the expression profile of lentil under salt stress resulted in the identification of 7677 lncRNA sequences, with 722 sequences being identified for the first time in lentil. Gene expression analysis revealed that 90 sequences in leaf tissue and 48 in root tissue showed increased expression under salt stress. Functional analysis of the co-expressed genes indicated that these genes were involved in biological processes such as translation, ion transport, and stress response. Metabolic pathway enrichment analysis identified 18 significant pathways, including S-adenosyl-L-methionine cycle, abscisic acid biosynthesis, and cytosolic glycolysis. The qRT-PCR validation confirmed the correlation of RNA-seq and qRT-PCR results with a 95% correlation coefficient. In conclusion, the results of this study revealed that the identified lncRNAs play a significant role in regulating key genes involved in essential metabolic pathways in lentil's molecular response to salt stress. Identifying and analyzing these lncRNAs in lentil can provide a better understanding of the molecular mechanisms underlying these stress responses. Investigating the interactions of these identified RNAs with other regulatory molecules, such as ABA and protein-coding genes, could contribute to the development of breeding strategies aimed at improving lentil's tolerance to both biotic and abiotic stresses.



Cite this article: Saeidi, S., Ismaili, A. and Sohrabi, S.S. (2025). Identification, functional prediction, and expression analysis of long non-coding RNAs in lentil (*Lens culinaris* L.) under salt stress. *Plant Genetic Research*, 12(2): 55–74.

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2081840.1027>



© Author(s) retain the copyright.

Homepage: <https://www.pgr.lu.ac.ir> | Publisher: Lorestan University

Introduction

Throughout evolution, plants have developed complex molecular mechanisms to cope with a variety of biotic and abiotic stresses, which are primarily driven by the reprogramming of gene expression. Stress conditions, such as drought, salinity, temperature extremes, and pathogen attacks, induce a wide range of molecular responses, including the activation of stress-responsive genes and the regulation of various physiological processes. Among the genetic factors that regulate these responses, long non-coding RNAs (lncRNAs) have recently emerged as critical players. These RNA molecules, which do not code for proteins, participate in diverse biological processes, such as gene expression regulation, chromatin remodeling, epigenetic modifications, and signal transduction. LncRNAs have been shown to influence plant responses to both biotic and abiotic stresses, including salinity, by modulating gene expression and interacting with key regulatory pathways. Despite their importance, the role of lncRNAs in lentil (*Lens culinaris* L.), particularly under salt stress conditions, has not been thoroughly studied. In this research, we aimed to identify and characterize lncRNAs in lentil under salt stress, and to explore their functional involvement in stress-related processes.

Materials and Methods

In this study, for the first time, the identification, functional determination, and expression analysis of specific lncRNAs in lentil (*Lens culinaris* L.) under salt stress conditions were investigated. To achieve this, the expression profile of lentil under salt stress was constructed by RNA sequencing (RNA-seq) data obtained from both stressed and control conditions, which included both leaf and root tissues. After filtering protein-coding sequences using BLASTx results and setting a minimum sequence length of 200 nucleotides for the remaining sequences, several candidate lncRNAs were identified using the PLncPRO software, which is specifically designed for lncRNA prediction. Subsequently, the relative expression levels of these identified sequences were measured, and their co-expression network with differentially expressed genes (DEGs) under salt stress was constructed. To validate the RNA-seq expression data, the expression levels of selected lncRNAs were analyzed using qRT-PCR, following RNA extraction and cDNA synthesis. This comparative approach allowed for the validation of the lncRNA expression patterns and their involvement in salt stress response.

Results and Discussion

The results revealed that the expression profile of lentil under salt stress consisted of 36,680 contigs. After removing non-target sequences and using the specific features of lncRNAs, 7,677 lncRNA sequences were identified. A further comparison of these sequences with known lncRNAs from various plant species showed that 772 sequences were newly identified in lentil. Gene expression analysis indicated that among the identified lncRNAs, 90 sequences in leaf tissue showed increased expression, while 7 sequences showed decreased expression. In the root tissue, 48 sequences exhibited increased expression, and 57 sequences showed decreased expression in response to salt stress. These findings suggest that lncRNAs play a role in modulating the expression of genes involved in stress adaptation mechanisms. Functional analysis of the genes associated with the co-expression of differentially expressed lncRNAs (DE-lncRNAs) and DEGs highlighted that these genes were primarily involved in biological processes (BP) such as translation, stress response, and ion transport. In terms of molecular functions (MF), key activities included protein binding, metal ion binding, and regulatory roles in signal transduction. At the cellular component (CC) level, the most significant localization of these genes was found in the nucleus and cytoplasm, where they likely participate in regulating gene expression and maintaining cellular homeostasis under stress conditions. Additionally, metabolic pathway enrichment analysis identified 18 significant metabolic pathways that are enriched with DE-lncRNAs and their co-expressed genes; notably, the S-adenosyl-L-methionine cycle, abscisic acid biosynthesis, and cytosolic glycolysis pathways

were prominently involved. These pathways are essential for maintaining cellular functions during stress and are known to be critical in managing osmotic stress and oxidative damage during salt stress. This suggests that the salt stress response involves the activation of specific regulatory networks, which operate similarly in both tissues. The validation of the expression of three selected LncRNA sequences using qRT-PCR further confirmed the reliability of the RNA-seq data, with a high degree of correlation (95%) between the results from RNA-seq and qRT-PCR. This validation strengthens the evidence that the identified lncRNAs are indeed involved in the response of lentil to salt stress.

Conclusion

In conclusion, the findings of this study provide new insights into the role of lncRNAs in the molecular response of lentil to salt stress. The identified lncRNAs appear to regulate key genes involved in important metabolic pathways related to stress adaptation, such as translation, ion transport, and osmotic regulation. These findings suggest that lncRNAs are crucial for maintaining cellular homeostasis and facilitating stress response mechanisms under salt stress conditions. Future research should focus on exploring the interactions of these identified lncRNAs with other regulatory molecules, such as abscisic acid (ABA), as well as protein-coding genes involved in stress response pathways. This will contribute to the development of novel breeding strategies aimed at enhancing the salt tolerance of lentil and other crops. Moreover, the integration of lncRNA-based strategies with traditional breeding methods holds the potential to improve the tolerance of lentil to both biotic and abiotic stresses, ultimately benefiting agricultural productivity.

Author Contributions

S. Saeidi contributed to investigation, data interpretation, and manuscript drafting. A. Ismail was responsible for conceptualization, supervision, and manuscript revision. S.S. Sohrabi provided consultation, contributed to data analysis, and assisted with manuscript revision. All authors read and approved the final manuscript.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors would like to thank anonymous reviewers for their valuable suggestions in manuscript revision.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

شناسایی، پیش‌بینی عملکرد و بررسی بیان RNAهای بلند غیر کدکننده در عدس تحت تنش شوری

صبا سعیدی | احمد اسماعیلی* | سید سجاد سهرابی

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

گیاهان در طی تکامل برای مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی، به سازوکارهای مولکولی پیچیده‌ای مجهز شده‌اند که اغلب آن‌ها ناشی از تنظیم مجدد بیان ژن‌ها است. عوامل ژنتیکی متعددی پاسخ مولکولی گیاهان به شرایط نامطلوب محیطی را تنظیم می‌کنند که از آن جمله می‌توان به RNA بلند غیرکدکننده (lncRNAs) اشاره کرد. در گیاهان lncRNAs نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها، تغییرات اپی‌ژنتیکی و مسیرهای پیام‌رسانی ایفا می‌کنند. در این پژوهش، برای اولین بار شناسایی، تعیین عملکرد و تحلیل بیان lncRNAs در گیاه عدس (*Lens culinaris L.*) تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی lncRNAs از مرجع ترنسکرپتومی عدس که از سرهم‌بندی داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA بافت‌های برگ و ریشه عدس در دو شرایط تنش شوری و بهینه ایجاد شده بود، استفاده شد. پس از پالایش توالی‌های کدکننده پروتئین، با استفاده از نرم‌افزار PLncPRO، توالی‌های lncRNA شناسایی شدند. مقادیر بیان نسبی این توالی‌ها اندازه‌گیری و شبکه هم‌بیانی آن‌ها با ژن‌های افتراقی (DEGs) تشکیل شد. به‌منظور تأیید نتایج، بیان برخی از lncRNAs با استفاده از واکنش qRT-PCR سنجیده شد. پردازش و پالایش پروفایل بیانی عدس تحت تنش شوری منجر به شناسایی ۷۳۷ توالی lncRNA شد که از این تعداد، ۷۲۲ توالی برای اولین بار در گیاه عدس شناسایی گردید. تحلیل بیان ژن‌ها نشان داد که ۹۰ توالی در بافت برگ و ۴۸ توالی در بافت ریشه تحت تنش شوری افزایش بیان داشتند. تحلیل عملکردی ژن‌های هم‌بیان نشان داد که این ژن‌ها در فرآیندهای زیستی مانند ترجمه، انتقال یون و پاسخ به تنش دخیل هستند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیرهای متابولیکی ۱۸ مسیر مهم را شناسایی کرد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به Cytosolic glycolysis و Abscisic acid biosynthesis، S-adenosyl-L-methionine cycle اشاره کرد. اعتبارسنجی نتایج با استفاده از qRT-PCR همبستگی ۹۵ درصدی نتایج RNA-seq و qRT-PCR را تأیید کرد. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که lncRNAs شناسایی شده با کنترل برخی از ژن‌های مهم در مسیرهای متابولیکی حیاتی در پاسخ مولکولی گیاه عدس به تنش شوری نقش ایفا می‌کنند و شناسایی و تحلیل آن‌ها در این گیاه می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی این پاسخ‌ها کمک کند. بررسی تعاملات RNAها شناسایی شده در این مطالعه با سایر مولکول‌های تنظیمی، مانند ABA و ژن‌های کدکننده می‌تواند به توسعه استراتژی‌های اصلاحی برای بهبود تحمل عدس به تنش‌های زیستی و غیرزیستی کمک نماید.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۲۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۷/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۰۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹

واژگان کلیدی:

تنش شوری،

تنظیم بیان ژن،

عدس،

LncRNA

مقدمه

نامطلوب واکنش نشان دهد. پروتئین‌های تنظیمی مانند عوامل رونویسی نقش کلیدی در فعال‌سازی یا مهار ژن‌ها در پاسخ به تنش‌ها دارند، در حالی که توالی‌های تنظیمی به این پروتئین‌ها کمک می‌کنند تا در زمان مناسب و به‌طور دقیق بیان ژن‌ها را تنظیم کنند (Tiwari *et al.*, 2024). یکی از عناصر ژنتیکی جدید و مهم در این زمینه، RNAهای بلند غیرکدکننده (Long non-coding RNAs: LncRNA) هستند (Li *et al.*, 2022). این مولکول‌ها، که طولی بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید دارند، به‌طور مستقیم در ترجمه پروتئین نقش ندارند، اما می‌توانند از طریق تعامل با پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های تنظیمی، فرآیندهایی مانند تنظیم اسمزی، تعادل یونی و پاسخ به تنش اکسیداتیو را تسهیل کنند (Dhakate *et al.*, 2020). این مولکول‌ها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عناصر تنظیمی شناخته می‌شوند که نقش اساسی در حفظ بقا و رشد گیاه تحت شرایط تنش ایفا می‌کنند.

شواهد متعددی در خصوص نقش LncRNAs در تنظیم مولکولی پاسخ گیاهان به شوری در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله خانواده حبوبات گزارش شده است (Dhakate *et al.*, 2020). نتایج پژوهش داکاته و همکاران (Dhakate *et al.*, 2020) نشان داد که LncRNAs به‌عنوان عناصر تنظیمی مهمی در سطوح رونویسی، پسارونویسی و اپی‌ژنتیک، در پاسخ لگوم‌ها به تنش‌هایی مانند شوری، خشکی، گرما، سرما و کمبود عناصر غذایی دخیل بوده و می‌توانند اهداف بالقوه‌ای برای بهبود تاب‌آوری اقلیمی لگوم‌ها باشند (Dhakate *et al.*, 2020). نتایج مطالعه سان و همکاران (Sun *et al.*, 2026) نشان داد که افزایش بیان MtCIR2 (LncRNA) در *Medicago truncatula* منجر به کاهش بیان و جهش در این عنصر تنظیمی منجر به افزایش جوانه‌زنی دانه‌ها در شرایط تنش شوری شد. یافته‌های مطالعه مذکور نشان‌دهنده مکانیزم جدیدی بود که در آن LncRNAs به‌طور اپی‌ژنتیکی پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی را از طریق یوبیکوتیناسیون هیستون‌ها تنظیم می‌کنند و تعامل پیچیده‌ای میان LncRNA و مکانیسم اپی‌ژنتیک در پاسخ به تنش شوری در حین جوانه‌زنی دانه‌ها را نشان داد (Sun *et al.*, 2026). در مطالعه‌ای بر روی *Melilotus albus* با هدف شناسایی

گیاهان در طول چرخه زندگی خود با طیف وسیعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی روبه‌رو می‌شوند که تأثیر قابل‌توجهی بر رشد، بقا و عملکرد آن‌ها دارد (Ismaili *et al.*, 2016; Khadivar *et al.*, 2023; Zulfiqar and Ashraf, 2023). تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که رشد و بهره‌وری گیاهان زراعی را در مناطق وسیعی از جهان محدود می‌کند (Haghigi Asl *et al.*, 2025; Fu and Yang, 2023). افزایش میزان نمک‌های محلول در خاک و آب آبیاری منجر به اختلال در جذب آب، سمیت یونی و عدم تعادل تغذیه‌ای شده که در نهایت، رشد گیاه را مختل می‌کند (Zhao *et al.*, 2021). این تنش محیطی تقریباً بر تمام جنبه‌های رشدی گیاه از جمله جوانه‌زنی، رشد رویشی و زایشی تأثیر می‌گذارد. همچنین شوری از طریق کاهش سطح برگ، محتوای کلروفیل، محتوای کربوهیدرات و پروتئین، هدایت روزنه‌ها و به میزان کمتری با کاهش کارایی فتوسنتز II بر فتوسنتز تأثیر منفی می‌گذارد (Bae *et al.*, 2025). در شرایط شور، تجمع یون‌های سمی مانند سدیم (Na^+) و کلرید (Cl^-) در بافت‌های گیاه باعث آسیب به سیستم فتوسنتزی گیاه، اختلال در تعادل یونی و کاهش جذب عناصر ضروری مانند پتاسیم و کلسیم می‌شود (Bae *et al.*, 2025). علاوه بر این، تنش شوری منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species: ROS) می‌شود که تنش اکسیداتیو ایجاد کرده و در صورت عدم مدیریت، به مرگ سلولی منجر خواهد شد (Anee *et al.*, 2025).

گیاهان برای سازگاری به شرایط نامطلوب پیرامونشان از جمله تنش شوری، سازوکارهای متعددی از جمله تنظیم بیان ژن، تنظیم اسمزی و تعادل یونی را به‌کار می‌گیرند (Mahajan *et al.*, 2025). این مکانیسم‌ها شامل تغییرات در متابولیسم گیاه و تنظیم دقیق فعالیت‌های بیوشیمیایی هستند که به گیاه کمک می‌کنند تا به‌طور مؤثرتر با این نوع از شرایط آسیب‌زا مواجه شوند (Tiwari *et al.*, 2021). همچنین در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، گیاهان از مجموعه‌ای پیچیده از عوامل ژنتیکی برای تنظیم بیان ژن‌ها استفاده می‌کنند. این عوامل شامل پروتئین‌ها و توالی‌های تنظیمی هستند که به‌طور هماهنگ عمل می‌کنند تا گیاه به شرایط

مولکول‌های تنظیمی در فرآیندهای ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی مرتبط با تنش شوری شناخته شده‌اند و می‌توانند در تنظیم تولید ABA و پاسخ‌های دفاعی گیاه به شوری دخیل باشند (Hossain *et al.*, 2019).

مرور منابع نشان داد که برخلاف سایر گیاهان زراعی مانند برنج، گندم، سویا، گوجه‌فرنگی و ذرت که در آن‌ها نقش IncRNAs به خوبی بررسی شده، در عدس تاکنون مطالعه‌ای در خصوص نقش IncRNAs در پاسخ به تنش شوری گزارش نشده است. با توجه به اینکه عدس در مناطق نیمه‌خشک کشت می‌شود و اغلب با مشکل شوری خاک و آب آبیاری مواجه است، شناسایی IncRNAs تنظیم‌کننده پاسخ به تنش شوری در این گیاه، می‌تواند به برنامه‌های اصلاحی عدس با هدف نیل به افزایش تحمل عدس به تنش شوری و توسعه ارقام متحمل‌تر کمک نماید. در این راستا، پژوهش حاضر با هدف شناسایی و تعیین نقش IncRNAs در گیاه عدس تحت تنش شوری انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، پردازش، سرهم‌بندی و مستندسازی داده‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکرپتوم عدس: به‌منظور تهیه پروفایل بیانی گیاه عدس تحت تنش شوری، داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA عدس تحت تنش شوری و شاهد (Goudarzi *et al.*, 2024) از پایگاه داده NCBI:SRA با کد دسترسی PRJNA487923 دریافت شدند. پس از دریافت داده‌های خام، کیفیت‌سنجی داده‌ها با استفاده از ابزار FastQC انجام شد. در این مرحله، ویژگی‌های مختلفی مانند توزیع نمره کیفیت خوانش‌ها، توزیع طول خوانش‌ها و وجود باقی‌مانده توالی‌های آداپتور مورد بررسی قرار گرفت. پس از کیفیت‌سنجی، خوانش‌های با طول کمتر از ۷۵ نوکلئوتید و با نمره کیفیت کمتر از ۳۰ ($\text{Phred quality score} < 30$) با اعمال تنظیمات مورد نظر در نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه ۰/۲۷) حذف شدند. داده‌های تمیز شده به‌عنوان ورودی برای مرحله سرهم‌بندی ترنسکرپتوم استفاده شدند.

به‌منظور ایجاد پروفایل بیانی عدس تحت تنش شوری، توالی‌های تمیز شده (Clean reads) با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۰) تحت تنظیمات پیش‌فرض،

IncRNAsی پاسخ‌دهنده به شوری، نتایج نشان داد که این RNAها با تنظیم هورمون‌های گیاهی مانند ABA و GA در فرآیندهای جوانه‌زنی دانه تحت تنش شوری دخالت دارند. این یافته‌ها به درک مکانیزم‌های مولکولی پاسخ گیاهان به شوری کمک کرده و می‌توانند در بهنزدادی و افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش‌ها مؤثر باشند (Zong *et al.*, 2021). با توجه به نتایج مطالعات متعدد مشخص شد که مکانیسم‌های مولکولی تحمل به تنش‌ها، از جمله شوری، در گیاهان با توجه به ویژگی‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و ساختاری، به شیوه‌ای منحصر به فرد تنظیم می‌گردد. این تفاوت‌ها به‌ویژه در فرآیندهای مولکولی مانند تنظیم بیان ژن‌ها، تغییرات اپی‌ژنتیکی و فعالیت‌های آنزیمی می‌تواند بستگی به ویژگی‌های خاص هر گونه گیاهی داشته باشد؛ بنابراین، بررسی پاسخ به تنش‌ها در هر گیاه به‌طور مستقل اهمیت دارد.

عدس زراعی (*Lens culinaris* Medikus) یکی از مهم‌ترین گیاهان خانواده حبوبات است که به‌دلیل دارا بودن محتوای بالای پروتئین، فیبر، مواد معدنی و ویتامین‌ها نقش مهمی در تأمین امنیت غذایی بشر دارد. این گیاه، خودگشن، دیپلوئید ($2n = 2x = 14$) و دارای اندازه ژنومی در حدود ۴ گیگابایت است (Baum and Kumar, 2024). عدس به‌طور عمده در مناطق دیم کشت می‌شود و مانند بسیاری از گیاهان، تحت تأثیر تنش‌های محیطی قرار دارد که منجر به کاهش عملکرد آن می‌شود (Tripathi *et al.*, 2025). تنش شوری یکی از چالش‌های جدی در تولید عدس محسوب می‌شود، زیرا این تنش باعث کاهش جوانه‌زنی، کند شدن رشد، تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی، و کاهش عملکرد نهایی دانه می‌شود (Goudarzi *et al.*, 2024; Mahdavian, 2023; Paul *et al.*, 2023). پاسخ مولکولی عدس به تنش شوری به‌عنوان یک گیاه متحمل به شوری، شامل تغییرات پیچیده‌ای در بیان ژن‌ها، تنظیم هورمون‌ها و مسیرهای متابولیکی است. گزارش شده است که گیاه عدس برای حفظ تعادل اسمزی و کاهش اثرات منفی تنش شوری، بیان ژن‌های مربوط به فرآیند تنظیم اسمزی، آنتی‌اکسیدان‌ها و مسیرهای بیوشیمیایی مرتبط با غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم را مجدداً تنظیم می‌کند. همچنین، گزارش شده است که IncRNAs نیز به‌عنوان

کشت و اعمال تنش: در این پژوهش پس از تهیه بذور عدس (رقم گچساران) از مرکز تحقیقات دیم گرمسیری کشور، ایستگاه گچساران، بذور در گلدان‌های حاوی پیت‌ماس، ورمیکولیت و ماسه با نسبت (۱:۱:۱) کشت شدند. تا زمان اعمال تیمار گلدان‌ها به اتاق رشد با متوسط دمای روزانه ۲۳ درجه سانتی‌گراد تحت چرخه تاریکی/روشنایی، ۱۶۸ ساعت منتقل شدند. سه تکرار (هر تکرار شامل ۵ گلدان) برای هر گروه تیمار شوری و شاهد در نظر گرفته شد. اعمال تنش شوری بر روی گیاهچه‌های ۲۱ روزه، مطابق با شرایط اعمال شده در مطالعه گودرزی و همکاران (Goudarzi *et al.*, 2024) صورت گرفت. بعد از اعمال تنش شوری در مرحله رشد رویشی (قبل از اینکه به مرحله گلدهی برسند)، گلدان‌های به آزمایشگاه منتقل شدند و اندام‌های هوایی و زمینی آن‌ها شامل برگ، ساقه و ریشه به صورت جداگانه و همزمان برداشت و درون فویل گذاشته شده و بلافاصله در ازلت مایع قرار داده شدند و در نهایت در یخچال ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از بافت گیاهی با استفاده از کیت دنا زیست (RNA Isolation Kits) طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده صورت گرفت و پس از استخراج RNA، سنجش کیفیت و کمیت RNA استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (نانودراپ) و ژل-آگارز یک درصد انجام شد. نمونه‌هایی که دارای کیفیت و کمیت مناسبی بودند، انتخاب شده و برای سنتز cDNA استفاده شدند. همچنین برای حذف آلودگی DNA ژنومی، از تیمار با آنزیم *DNase I* (Thermo Fisher Scientific, USA) استفاده شد. به منظور سنتز cDNA، از کیت سنتز cDNA شرکت سیناکلون استفاده شد. با توجه به غلظت RNA استخراجی هر نمونه، مقدار RNA یکسان و معادلی برای همه نمونه‌ها استفاده شد.

طراحی آغازگر و انجام واکنش qRT-PCR: به منظور طراحی آغازگرها، توالی‌های موردنظر در فرمت Fasta از فایل سرهم‌بندی نهایی استخراج شدند. سپس برای اطمینان بیشتر، توالی‌های مورد نظر با پیش‌نویس (Draft) اولیه ژنوم عدس BLASTn شدند. برای طراحی آغازگر از نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶) استفاده شد. در نهایت برای ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده از نرم‌افزار Primer-BLAST پایگاه NCBI استفاده شد. فهرست آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

سرهم‌بندی شدند. این نرم‌افزار از روش De Bruijn Graph برای سرهم‌بندی خوانش‌ها بهره می‌برد. در این روش، خوانش‌های کوتاه به قطعات کوچک‌تر به نام k-mer تبدیل می‌شوند و سپس از هم‌پوشانی این k-mer ها برای سرهم‌بندی و تشکیل قطعات به هم پیوسته بزرگ‌تری به نام کانتینگ استفاده می‌شود. در مراحل بعد، برای حذف کانتینگ‌های اضافی و بهبود کیفیت اسمبلی (فایل سرهم‌بندی)، از بسته نرم‌افزاری EvidentialGene tr2aacds (نسخه ۲۰۱۳/۰۷/۲۷) استفاده شد. همچنین برای مستندسازی رونوشت‌های به دست آمده، از BLASTx علیه پایگاه داده پروتئین‌های غیر تکراری (Non-Redundant proteins: NR) استفاده شد. در نهایت، برای شناسایی رونوشت‌های با بیان افتراقی، از حدود آستانه $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ و $\text{FDR} \leq 0.01$ استفاده شد. این معیارها برای شناسایی رونوشت‌هایی که تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفته و تغییرات قابل توجهی در بیان آن‌ها مشاهده شده بود، به کار برده شدند.

شناسایی lncRNAs: به منظور شناسایی lncRNAs در ترنسکرپتوم عدس از ابزارهای LncFinder-plant و PLEK و استفاده از بسته نرم‌افزاری PLncPRO مورد سنجش قرار گرفتند. بدین منظور پس از حذف رونوشت‌های کدکننده پروتئین (انطباق پایگاه داده پروتئینی از جمله nr, Swisprot, Pfam و CCD) و حذف توالی‌های با طول کمتر از ۲۰۰ نوکلئوتید، با استفاده از مدل گیاهان دولپه و ویژگی‌های ثبت شده lncRNAs در این مدل به شناسایی توالی‌های احتمالی lncRNA پرداخته شد. پس از تشخیص توالی‌های احتمالی با استفاده پارامترهای پیش فرض به جداسازی توالی‌هایی که به احتمال بالاتری به عنوان lncRNA شناخته می‌شوند، اقدام شد. ترسیم شبکه هم‌بیانی DEGs-DE-lncRNA: به منظور بررسی شبکه هم‌بیانی ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) و lncRNAs با بیان افتراقی (DE-lncRNA) از بسته نرم‌افزاری psych در محیط R استفاده شد. پس از به دست آوردن ماتریس همبستگی از نرم‌افزار Cytoscape برای ترسیم شبکه هم‌بیانی استفاده شد. سپس به منظور مستندسازی عملکردی از افزونه ClueGO و جهت شناسایی ژن‌های هم‌بیان کلیدی از افزونه cytoHubba استفاده شد.

جدول ۱- فهرست آغازگرهای طراحی شده برای واکنش qRT-PCR

Table 1. List of designed primers for qRT-PCR

شناسه	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	دمای اتصال (سانتی‌گراد)	طول قطعه تکثیر (جفت‌باز)
ID	Forward primer	Reverse primer	Ta temperature (C)	Product length (bp)
<i>LncRNA1</i>	5-GCTGGAATCGTG AAGAAG-3	5-CCATAATACCAC ATAACAACG-3	50.4	164
<i>LncRNA2</i>	5-TCAGAAGAATCA GCAGAGTCC-3	5-GCAACCACAGTA TCAGAATCC-3	54.4	145
<i>LncRNA3</i>	5-GTGACCGAGTT GTCTAAG-3	5-TTATATGTATATGT ATCTGTTCCC-3	50	200
<i>GAPDH</i>	5-TTGGTTACACTG AAGACGATG-3	5-TGGCAATGTGA ACAATGAGG-3	53.3	177

توالی‌هایی که داری آداپتور بوده و همچنین حذف خوانش‌های با کیفیت پایین، ۳۳۱۰۵۷۹۴۱ خوانش با کیفیت باقی‌ماند (جدول ۲). با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench سرهم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم عدس از طریق مونتاژ خوانش‌های تمیز شده انجام شد. پس از زدودن توالی‌های تکراری، ۳۶۶۸۰ یونی‌ژن به دست آمد (جدول ۲). پارامتر N50 برای مرجع ترانسکرپتومی عدس ۱۸۱۴ نوکلئوتید محاسبه شد. همچنین پس از حذف کانتیگ‌های اضافی محتوای درصد GC، ۳۹/۰۵ درصد محاسبه شد. طول بلندترین رونوشت سرهم‌بندی شده ۱۹۲۸۲ نوکلئوتید و تعداد رونوشت‌های دارای قاب خوانش‌باز (ORF)، ۱۶۸۶۱ عدد محاسبه شد.

نتایج بلاست X پروفایل بیانی عدس تحت تنش شوری در مقابل پایگاه پروتئینی NR نشان داد که بیشترین تعداد رونوشت عدس (۹۹۰۰) رونوشت) با گونه نخودفرنگی (*Pisum sativum*) و پس از آن با ماشک زمستانی (*Vicia villosa*) منطبق بود (شکل ۱). در مجموع از ۳۶۶۸۰ یونی‌ژن تعداد ۲۵۷۹۶ (۷۰/۳۲ درصد) با $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ در پایگاه ذکر شده دارای رکورد مشابهی بودند.

شناسایی LncRNAs: به‌منظور شناسایی توالی LncRNA در عدس ابتدا ۱۰۸۸۴ رونوشتی که برای آن‌ها رکورد مشابهی در پایگاه داده Nr یافت نشده بود مورد کنکاش قرار گرفتند. از مجموع رونوشت‌های بدون حاشیه نویسی، ۲۲۱۶ توالی توسط الگوریتم CPAT به‌عنوان توالی کدکننده قلمداد شده و حذف شدند. در مرحله بعد، نتیجه پالایش توالی‌ها با استفاده از سه بسته ذکر شده منجر به شناسایی ۷۶۷۷ توالی شد که پتانسیل بالایی داشتند که به‌عنوان LncRNA قلمداد شوند.

بررسی بیان نسبی ژن‌های lncRNA انتخاب شده با استفاده از روش qRT-PCR مبتنی بر رنگ SYBR green انجام شد. برای انجام واکنش از روتور ۷۲ چاهکی دستگاه Rotor-Gene Q شرکت Qiagen استفاده گردید. در این مطالعه از مسترمیکس Ex Taq II SYBR Premix شرکت سیناکلون برای انجام واکنش qRT-PCR استفاده شد. قبل از انجام واکنش qRT-PCR، تمامی نمونه‌ها به نسبت ۱:۵ رقیق شدند. این واکنش در دو تکرار فنی و سه تکرار زیستی انجام گردید. مراحل تکثیر به این شرح بود: واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه واکنش (شامل مرحله واسرشت‌سازی: به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال: به مدت ۱۵ ثانیه در دمای مناسب برای هر جفت آغازگر و طویل‌سازی به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه. اختصاصیت آغازگرهای به‌کاررفته با استفاده از ژل آگارز و منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. پس از اتمام واکنش، منحنی استاندارد رسم و کارایی واکنش آغازگرها نیز ارزیابی گردید. نرمال‌سازی Ct ژن‌های مورد بررسی با استفاده از Ct ژن کنترل داخلی (*GAPDH*) انجام شد تا تغییرات نسبی بیان ژن‌ها به‌درستی محاسبه گردد. تغییرات نسبی بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد.

نتایج و بحث

سرهم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم عدس تحت تنش شوری: از جمع‌آوری داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA بافت‌های مختلف عدس در شرایط تنش شوری و شاهد در مجموع ۳۸۳۵۸۴۵۴۸ خوانش خام به‌دست آمد. پس از حذف

مختلف (پایگاه داده PLncDB) بسیار متغیر بوده به طوری که از ۶۰ عدد در *Ganoderma lucidum* تا ۸۶۸۵۲ در *Elaeis guineensis* در نوسان بود (جدول ۵).

بررسی بیان توالی‌های LncRNA شناسایی شده در پروفایل بیانی عدس تحت تنش شوری با در نظر گرفتن معیار بیان نرمال شده "تعداد در میلیون" (Counts per million: CPM) بیشتر از ۵ انجام شد. نتایج نشان داد که از بین توالی‌های شناسایی شده تنها ۴۱۲ مورد دارای CPM بالای ۵ بودند. گروه‌بندی (مبتنی بر بیان) توالی‌های پیش‌بینی شده بر اساس مقادیر CPM و روش گروه جفتی بدون وزن با میانگین حسابی (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean: UPGMA) نشان داد که lncRNAs شناسایی شده در بافت ریشه و برگ عدس از نظر بیان در دو گروه مجزا قرار می‌گیرند (شکل ۳). همچنین نتایج نشان داد که تغییر بیان توالی‌های شناسایی شده به نوع بافت بیشتر از تنش شوری وابستگی نشان می‌دهد.

درصد احتمال پیش‌بینی برای توالی‌های احتمالی بیشتر از ۹۰ درصد بود. جهت اطمینان از صحت شناسایی توالی‌های LncRNA در عدس، این توالی‌ها علیه سه پایگاه LncRNA BLASTn (GreeNC و PLncDB، CANTATA) گیاهی شدند. نتایج بلاست (جدول ۳) نشان داد که از میان توالی‌های شناسایی شده ۷۴۷ توالی در هر سه پایگاه داده LncRNA قبلاً شناسایی شده بودند. علاوه بر این نتایج نشان داد که ۷۷۲ توالی برای اولین بار در ترنسکرپتوم عدس شناسایی شده‌اند. همچنین نتایج بلاست نشان داد که ده گیاه برتر از نظر میزان شباهت با توالی‌های شناسایی شده، متعلق به خانواده حبوبات بوده و قرابت بسیار بالایی با عدس نشان دادند. در بین گیاهان با قرابت بالا، نخود فرنگی، شبدر قرمز و *Medicago truncatula* به ترتیب بیشترین میزان شباهت را با توالی‌های LncRNA پیش‌بینی شده در عدس نشان دادند (شکل ۲). همچنین مرور منابع نشان داد که فراوانی LncRNA در گیاهان

جدول ۲- آمار پایه خوانش‌های خام و تمیز شده حاصل از توالی یابی RNA بافت‌های مختلف عدس تحت تنش شوری

Table 2. Basic statistics of raw and cleaned reads from RNA sequencing of different lentil tissues under salt stress

بافت Tissue	کد نمونه Sample code	تعداد خوانش خام Raw reads count	تعداد خوانش تمیز شده Clean reads count	تعداد خوانش‌های از دست رفته Lost reads count	درصد خوانش‌های از دست رفته Lost reads count
برگ Leaf	شاهد ۱ Control 1	47168052	42806973	4361079	9.25
	شاهد ۲ Control 2	53627360	49125592	4501768	8.39
	تنش شوری ۱ Salt stress 1	48876204	41102198	7774006	15.91
	تنش شوری ۲ Salt stress 2	46208922	38814091	7394831	16.00
ریشه Root	شاهد ۱ Control 1	49730474	42512675	7217799	14.51
	شاهد ۲ Control 2	39545866	34235256	5310610	13.43
	تنش شوری ۱ Salt stress 1	50120116	41777599	8342517	16.65
	تنش شوری ۲ Salt stress 2	48307554	40683577	7623997	15.78
	کل Total	383584548	331057941	52526607	13.73

جدول ۳- پارامترهای سرهم‌بندی ترنسکرپتوم عدس تحت تنش شوری

Table 3. Lentil transcriptome assembly parameters under salt stress

ویژگی‌ها Features	ارزش Value
تعداد رونوشت Number of transcripts	36680
طول کوتاه‌ترین رونوشت (نوکلئوتید) Shortest transcript length (nt)	200
طول بلندترین رونوشت (نوکلئوتید) Longest transcript length (nt)	19282
تعداد نوکلئوتید Number of nucleotides	47017751
میانگین طول رونوشت‌ها (نوکلئوتید) Transcripts length mean (nt)	1281.83
تعداد رونوشت‌های با طول بیشتر از ۱ کیلوباز Number of transcripts longer than 1 kb	17725
تعداد رونوشت‌های با طول بیشتر از ۱۰ کیلوباز Number of transcripts longer than 10 kb	15
تعداد رونوشت‌های دارای قاب خوانش‌باز Number of transcripts with open reading frames	16861
N90 (nt)	619
N70 (nt)	1220
N50 (nt)	1814
N30 (nt)	2598
N10 (nt)	4150
محتوای GC (درصد) GC content (%)	39.05

جدول ۴- توزیع LncRNAs شناسایی شده با استفاده از پایگاه‌های LncRNA گیاهی

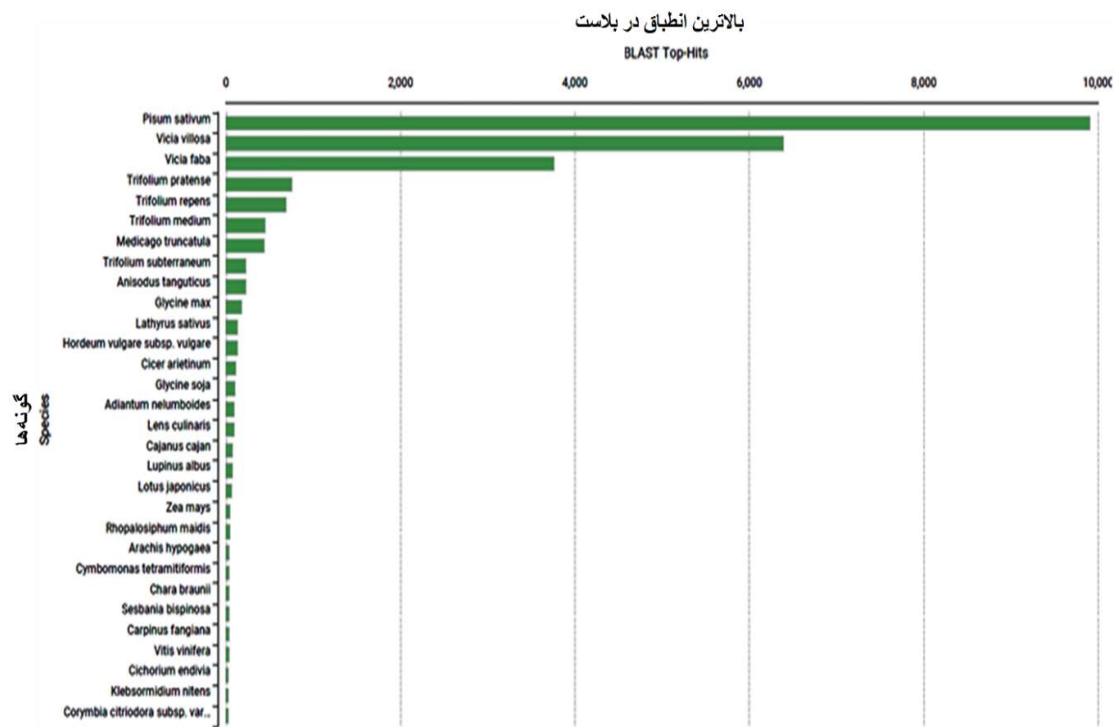
Table 4. Distribution of identified LncRNAs using plant LncRNA databases

تعداد پایگاه LncRNA گیاهی databases Number of plant LncRNA	تعداد توالی Number of sequences
شناسایی شده در یک پایگاه Identified in one database	4755
شناسایی شده در دو پایگاه Identified in two databases	1403
شناسایی شده در سه پایگاه Identified in three databases	747
جدید Novel	772
کل Total	7677

جدول ۵- فراوانی LncRNAs شناسایی شده در گیاهان مختلف

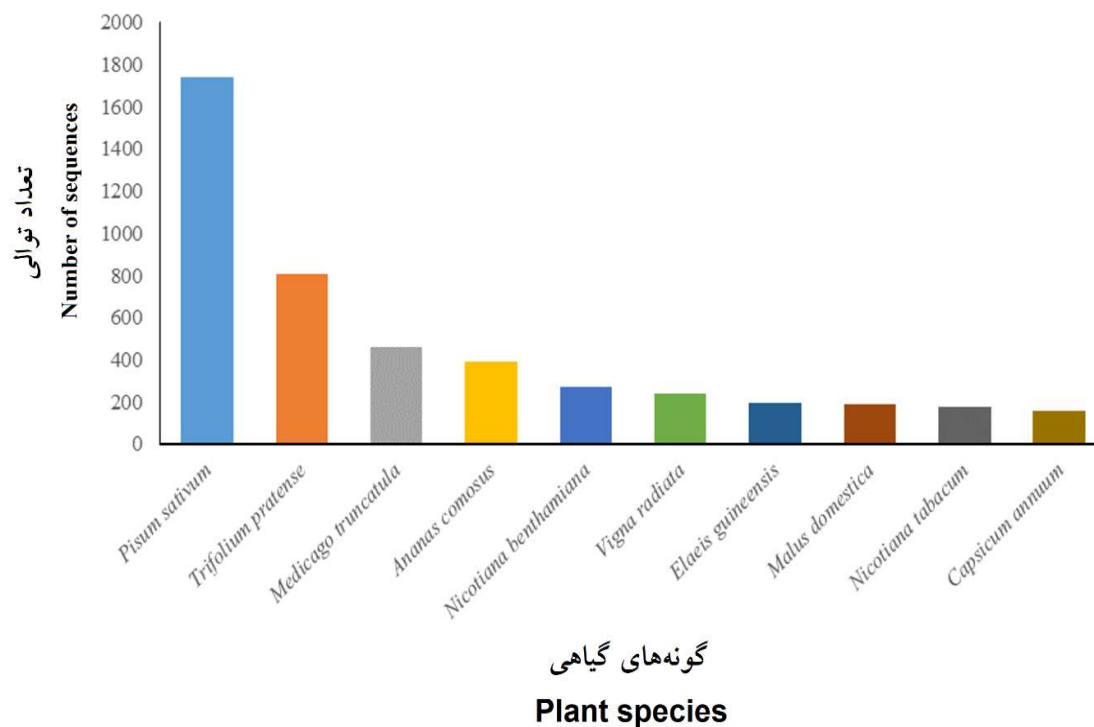
Table 5. Frequency of identified LncRNAs in different plant species

ردیف Row	گونه‌های گیاهی Plant species	پایگاه داده LncRNA LncRNA database				
		PLncDB	Greenc	CANTATAdb	RNAcentral	Ensembl
1	<i>Ananas comosus</i>	52201	3376	0	0	0
2	<i>Aquilegia coerulea</i>	3333	0	0	0	0
3	<i>Arabidopsis lyrata</i>	8901	4363	7593	0	0
4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13599	3008	4373	3887	3879
5	<i>Arachis ipaensis</i>	17088	0	0	0	0
6	<i>Brachypodium distachyon</i>	12821	5584	4945	0	0
7	<i>Brassica napus</i>	49250	0	12010	0	0
8	<i>Brassica rapa</i>	17519	0	8501	3	0
9	<i>Capsella grandiflora</i>	2746	1394	0	0	0
10	<i>Capsella rubella</i>	8012	1458	0	0	0
11	<i>Capsicum annuum</i>	35503	0	0	0	0
12	<i>Cicer arietinum</i>	8002	0	0	0	0
13	<i>Citrus clementina</i>	10943	2192	0	0	0
14	<i>Citrus maxima</i>	6959	0	0	0	0
15	<i>Citrus sinensis</i>	12405	2562	0	0	0
16	<i>Coffea arabica</i>	16424	0	0	0	0
17	<i>Cucumis sativus</i>	8753	1929	7348	0	0
18	<i>Daucus carota</i>	15096	0	0	0	0
19	<i>Dunaliella salina</i>	584	0	0	0	0
20	<i>Durio zibethinus</i>	4469	0	0	0	0
21	<i>Elaeis guineensis</i>	86852	0	0	0	0
22	<i>Eutrema salsugineum</i>	4366	1669	0	0	0
23	<i>Fragaria vesca</i>	12237	3503	0	0	0
24	<i>Ganoderma lucidum</i>	60	0	0	0	0
25	<i>Glycine max</i>	12577	6689	3096	44	0
26	<i>Gossypium barbadense</i>	32192	0	0	0	0
27	<i>Gossypium raimondii</i>	21101	4216	0	0	0
28	<i>Hordeum vulgare</i>	25884	0	7970	8	0
29	<i>Lactuca sativa</i>	13394	0	0	0	0
30	<i>Linum usitatissimum</i>	10451	2598	0	0	0
31	<i>Lotus japonicus</i>	2936	0	0	0	0
32	<i>Malus domestica</i>	33706	4126	10924	0	0
33	<i>Manihot esculenta</i>	18515	3468	9504	0	0
34	<i>Medicago truncatula</i>	17449	9676	3590	3871	0
35	<i>Micromonas commoda</i>	758	351	0	0	0
36	<i>Micromonas pusilla</i>	332	651	0	0	0
37	<i>Musa acuminata</i>	15546	4071	3001	1	0
38	<i>Nicotiana benthamiana</i>	48045	0	0	0	0
39	<i>Nicotiana tabacum</i>	31028	0	0	0	0
40	<i>Oryza sativa</i>	11565	5237	2788	14	0
41	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	83	501	0	0	0
42	<i>Panax ginseng</i>	23016	0	0	0	0
43	<i>Panicum hallii</i>	4212	0	0	0	0
44	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7801	1946	0	0	0
45	<i>Physcomitrella patens</i>	19319	9690	1498	0	0
46	<i>Pisum sativum</i>	45729	0	0	0	0
47	<i>Prunus persica</i>	13022	3301	2902	0	0
48	<i>Ricinus communis</i>	5322	4198	0	0	0
49	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	17834	0	0	0	0
50	<i>Setaria italica</i>	12425	3492	4208	0	0
51	<i>Solanum lycopersicum</i>	8741	3440	4716	560	0
52	<i>Solanum tuberosum</i>	16485	6680	5790	0	0
53	<i>Sorghum bicolor</i>	27623	5305	2600	0	0
54	<i>Spirodela polyrhiza</i>	3364	2111	0	0	0
55	<i>Theobroma cacao</i>	11340	4268	5256	0	0
56	<i>Trifolium pratense</i>	17733	0	10179	0	0
57	<i>Triticum aestivum</i>	43659	38820	0	7	0
58	<i>Vigna radiata</i>	20557	0	0	0	0
59	<i>Vitis vinifera</i>	16209	2526	4542	2	0
60	<i>Zea mays</i>	32397	18110	10761	3446	0



شکل ۱- توزیع گونه های گیاهی دارای بیشترین قرابت ژنتیکی با ترنسکرپتوم عدس تحت تنش شوری

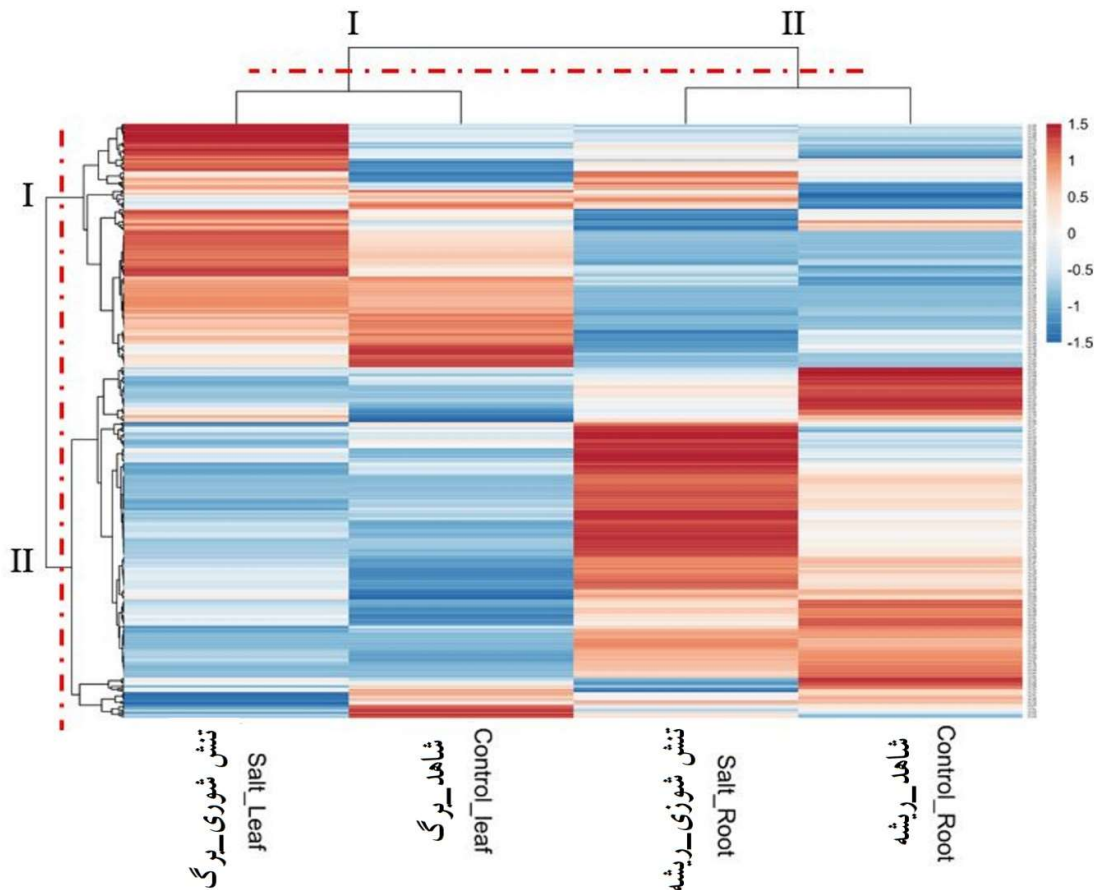
Figure 1. Distribution of plant species with the highest genetic similarity to the lentil transcriptome under salt stress.



گونه های گیاهی
Plant species

شکل ۲- توزیع فراوانی خانواده های گیاهی که با توالی های LncRNA شناسایی شده در عدس قرابت ژنتیکی دارند

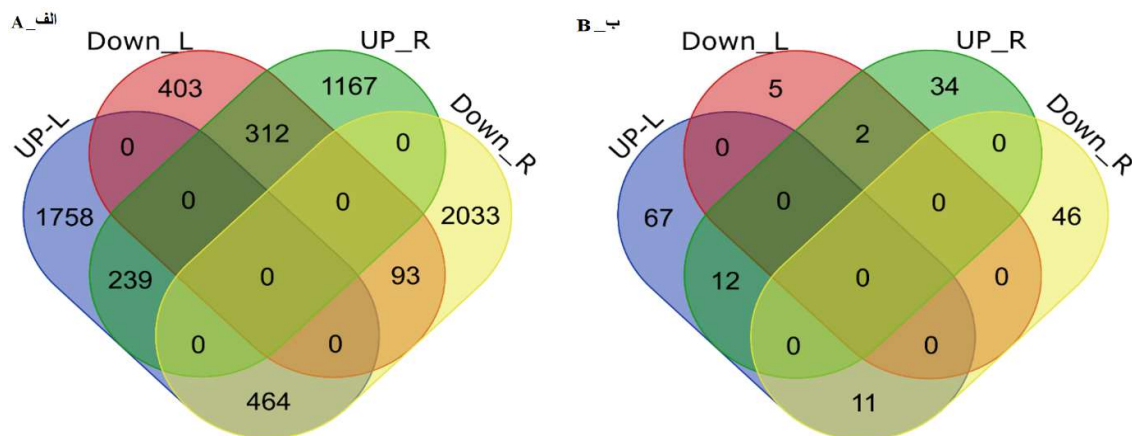
Figure 2. Distribution of plant families with genetic similarity to the identified LncRNA sequences in lentil



شکل ۳- نقشه حرارتی بیان LncRNAs شناسایی شده در پروفایل بیانی عدس تحت تنش شوری
Figure 3. Heatmap of the expression of identified LncRNAs in the lentil expression profile under salt stress

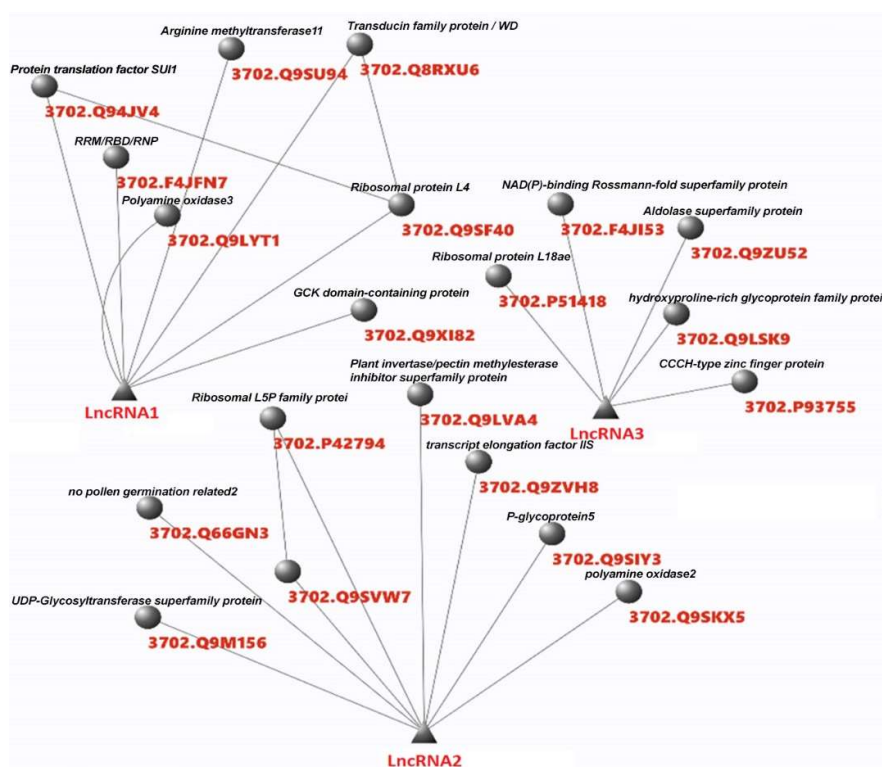
مقابل در بافت ریشه به ترتیب ۴۸ و ۵۷ توالی افزایش و کاهش بیان معنی‌دار نشان دادند. شبکه هم‌بیانی DE-LncRNA و DEGs: به منظور ترسیم شبکه هم‌بیانی، پس از پالایش IncRNAs با پتانسل بالا و ژن‌های هدف آن‌ها، تنها از رونوشت‌هایی که به‌طور مشترک هم در بافت برگ و هم در بافت ریشه افتراق بیان نشان داده بودند، استفاده شد (چهارده توالی LncRNA و ۳۳۰ توالی کدکننده). همچنین برای این توالی‌ها شرط CPM بیشتر از ۵ نیز در نظر گرفته شد. علاوه بر این به‌منظور افزایش اعتبار و صحت شناسایی، در این بخش تنها از توالی‌های LncRNA (سه توالی از چهارده توالی LncRNA) که در هر سه پایگاه داده مرتبط با IncRNAs گیاهی تأیید شده بود، استفاده شد (شکل ۵).

تغییر بیان ژن‌های کدکننده و IncRNAs شناسایی شده: پس از مقایسه بیان تمام رونوشت‌های پروفایل بیانی عدس در حالت تنش شوری در بافت‌های ریشه و برگ در مقابل وضعیت شاهد در همان بافت‌ها، مشخص شد که در مجموع ۶۴۶۹ توالی در این مقایسه‌ها، افتراق بیان معنی‌داری داشته‌اند (شکل ۴-الف)؛ به طوری که ۲۴۶۱ و ۸۰۸ توالی در بافت برگ به ترتیب افزایش و کاهش بیان در همین شرایط در بافت ریشه ۱۷۱۸ و ۲۵۹۰ توالی به ترتیب افزایش و کاهش بیان معنی‌داری نسبت به حالت شاهد نشان داده‌اند. در میان توالی‌های با افتراق بیان ۱۷۷ LncRNA شناسایی شد (شکل ۴-ب). توزیع توالی‌های LncRNA دارای افتراق بیان مشخص کرد که ۹۰ توالی در بافت برگ افزایش و ۷ توالی کاهش بیان نشان داده‌اند و در



شکل ۴- توزیع تغییرات بیان الف) رونوشت‌ها و ب) LncRNAs شناسایی شده در پروفایل بیانی عدس تحت تنش شوری. در شکل عبارات UP, Down, L, و R به ترتیب نشان‌دهنده افزایش بیان، کاهش بیان، بافت برگ و بافت ریشه می‌باشد.

Figure 4. Distribution of expression changes in (A) transcripts and (B) identified lncRNAs in the lentil under salt stress. UP, Down, L, and R represent up-regulation, down-regulation, leaf tissue, and root tissue, respectively.



شکل ۵- شبکه برهمکنش DE-LncRNAs و DEGs شناسایی شده تحت تنش شوری در عدس. اجسام مثلث و دایره به ترتیب DE-LncRNAs و DEGs را نشان می‌دهند.

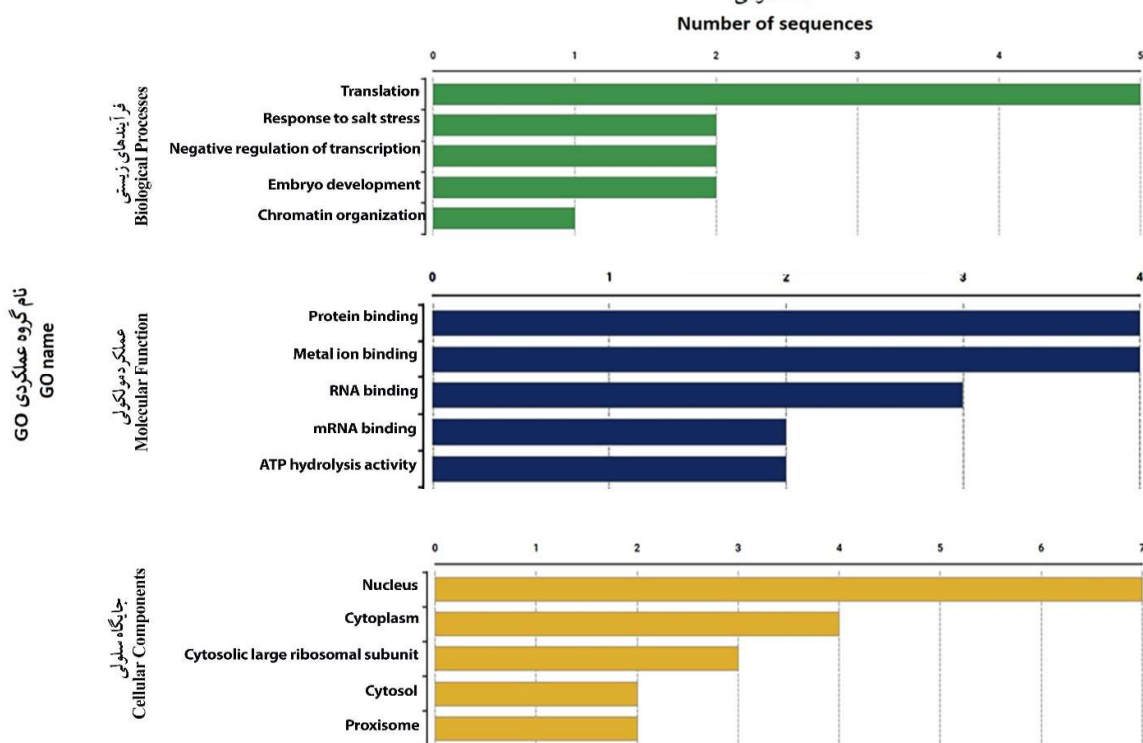
Figure 5. Protein-protein Interaction networks of DE-LncRNAs and DEGs identified under salt stress in lentil. The triangular and circular shapes represent DE-LncRNAs and DEGs, respectively.

مستندسازی عملکردی (شکل ۶) و شناسایی مسیرهای متابولیکی (جدول ۶) شبکه هم‌بیان با استفاده نرم‌افزار OmicsBox نشان داد که در حوزه فرآیندهای زیستی (BP)

شبکه هم‌بیانی DE-LncRNA و DEGs مشخص کرد که LncRNA2 دارای بیشترین برهمکنش (با ۸ DEGs) و LncRNA3 کمترین میزان برهمکنش (با ۵ DEGs) بود.

بالاتری به نسبت جایگاه‌های دیگر بودند. علاوه بر این نتایج بررسی مسیرهای متابولیکی که ژن‌های هم‌پیمان در آن دخیل بودند (جدول ۵) نشان داد که مسیرهای متابولیکی چرخه اس-آدنوزیل-ال-متیونین، مسیر حفاظت متیونین و بیوستز آرژنین توسط ژن‌های هدف به‌طور معنی‌داری غنی شده‌اند.

در سه جایگاه ترجمه، پاسخ به تنش شوری و تنظیم منفی رونویسی دارای بیشترین میزان فراوانی ژنی بودند. در حوزه عملکرد مولکولی (MF) در سه جایگاه اتصال پروتئین، اتصال یون فلزی و اتصال RNA دارای بیشترین میزان فراوانی بودند. در حوزه جایگاه سلولی (CC) هسته، سیتوپلاسم و زیرواحد ریبوزومی بزرگ سیتوزولی دارای میزان فراوانی ژنی



شکل ۶- مستندسازی عملکردی ژن‌های هدف LncRNAs شناسایی شده در عدس تحت تنش شوری
Figure 6. Functional annotation of target genes of the identified lncRNAs in lentil under salt stress

جدول ۶- مسیرهای متابولیکی غنی شده توسط ژن‌های هدف LncRNAs شناسایی شده در عدس تحت تنش شوری

Table 6. Enriched metabolic pathways of target genes of identified lncRNAs in lentil under salt stress

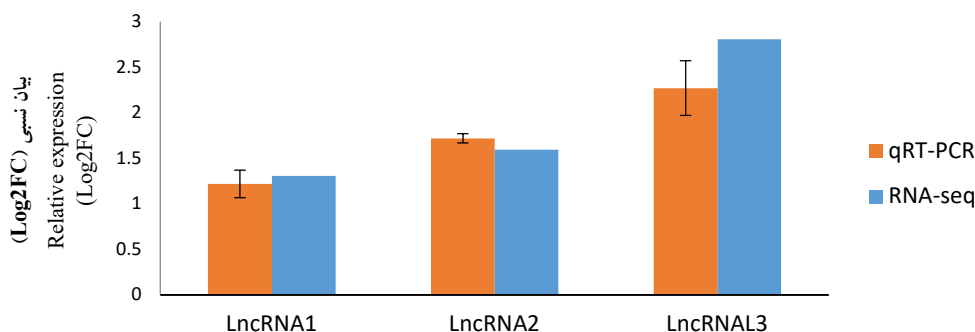
ردیف Row	مسیر متابولیکی Pathway	FDR
1	S-adenosyl-L-methionine cycle	2E-06
2	Methionine salvage pathway	9E-06
3	Arginine biosynthesis	1E-05
4	Brassinosteroid signaling	1E-05
5	Beta-alanine biosynthesis I	2E-05
6	Arginine biosynthesis II (acetyl cycle)	2E-05
7	Abscisic acid biosynthesis	2E-05
8	TCA cycle (plant)	2E-05
9	Mugineic acid biosynthesis	2E-05
10	Cytosolic glycolysis	2E-05
11	Abscisic acid homeostasis	3E-05
12	Calvin cycle	3E-05
13	Ethylene biosynthesis from methionine	3E-04
14	Calvin cycle	3E-04
15	Strigolactone signaling	4E-04
16	Polyisoprenoid biosynthesis	5E-04
17	Leucine biosynthesis	7E-04
18	Generation of superoxide radicals	1E-02

بنابراین، داده‌های حاضر نه تنها یک تحلیل بیان، بلکه استفاده از مرجع ترنسکرپتومی عدس برای مشخص شدن جزئیات احتمالی پاسخ مولکولی این گیاه نسبت به تنش شوری بود.

الگوی بیان افتراقی LncRNAs در دو بافت ریشه و برگ عدس نیز از نظر زیستی قابل توجه است. در برگ، تعداد LncRNAs افزایش بیان یافته (۹۰ توالی) به مراتب بیشتر از توالی‌های کاهش یافته (۷ توالی) بود، در حالی که در ریشه، الگوی پاسخ متعادل‌تر و دوطرفه‌تری مشاهده شد (۴۸ توالی افزایش بیان و ۵۷ توالی کاهش بیان). این تفاوت می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که ریشه به‌عنوان نخستین محل ادراک شوری، احتمالاً نیازمند تنظیم دقیق‌تر و دوطرفه‌تر شبکه‌های ژنی (فعال‌سازی برخی مسیرها و خاموشی برخی دیگر) است، در حالی که برگ بیشتر وارد فاز سازگاری ثانویه و بازتنظیم متابولیسم/فتوسنتز می‌شود که غالباً با القای شبکه‌های محافظتی همراه است (Li et al., 2023; Wang et al., 2015). در عین حال، نتایج گروه‌بندی با استفاده از نقشه‌حرارتی نشان داد که اثر نوع بافت بر الگوی بیان LncRNAs قوی‌تر از اثر تنش شوری بوده است. وانگ و همکاران (Wang et al., 2015) در تحقیقات روی *Medicago truncatula* مشاهده کردند که LncRNAs پاسخ‌گو به تنش شوری در برگ و ریشه الگوهای بیان متفاوتی داشتند و برخی LncRNAs فقط در یک بافت تغییر یافتند، که این موضوع نشان‌دهنده پاسخ اختصاصی بافت‌ها به تنش است (Wang et al., 2015).

اعتبارسنجی بیان برخی از lncRNAs: به‌منظور اعتبارسنجی بیان محاسبه شده با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA، ۳ توالی منتخب در مطالعه حاضر با استفاده از qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۷). نتایج مقایسه بیان نسبی این توالی‌ها در دو حالت RNA-Seq و qRT-PCR نشان داد که از بین توالی‌های مورد بررسی، LncRNA3 در دو حالت بیشترین مقدار بیان نسبی (qRT-PCR = $2/27 \text{ Log2FC}$ و RNA-Seq = $2/81 \text{ Log2FC}$) را نشان داد. در مقابل برای توالی LncRNA1 کمترین میزان بیان معادل $1/21 \text{ Log2FC}$ در روش qRT-PCR ثبت شد. نتایج تحلیل همبستگی وجود همبستگی مثبت و معنی‌داری ($r = 95^{**}$) بین مقادیر بیان نسبی توالی‌های مورد بررسی دو روش مذکور را نشان داد.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که پاسخ مولکولی عدس به تنش شوری، نه تنها یک پاسخ تک‌عاملی، بلکه یک شبکه تنظیمی چندلایه است که در آن LncRNAs در کنار ژن‌های کدکننده و مسیرهای متابولیکی به‌عنوان یک عنصر تنظیمی کلیدی نقش ایفا می‌کنند. شناسایی ۷۶۷۷ توالی LncRNA در ترنسکرپتوم عدس تحت شوری و همچنین مشاهده تغییرات بیان معنی‌دار در زیرمجموعه‌ای از این توالی‌ها در برگ و ریشه، نشان داد که بخش غیرکدکننده ترنسکرپتوم عدس نیز همانند سایر گیاهان، به‌طور فعال در بازآرایی پاسخ به تنش مشارکت دارد. شایان ذکر است بخش قابل‌توجهی از LncRNAs شناسایی شده در این مطالعه در پایگاه‌های گیاهی موجود، گزارش نشده بودند؛



شکل ۷- سنجش بیان نسبی LncRNAs شناسایی شده در عدس تحت تنش شوری با استفاده از روش RNA-seq و qRT-PCR. در این شکل، خطاهای استاندارد با استفاده از ارور بار نشان داده شده است.

Figure 7. Relative expression analysis of identified lncRNAs in lentil under salt stress using RNA-seq and qRT-PCR methods. Error bars represent the standard error of the mean.

و حتی نوعی تعادل میان رشد و تحمل به تنش را تنظیم کنند؛ بدین صورت که گیاه با بازتخصیص منابع، رشد را تا حدی محدود می‌کند تا بقا تحت شوری افزایش یابد (Li and Zhang, 2025; Shi et al., 2025). شواهدی از ارتباط بین lncRNAs با تنظیم هورمونی به‌ویژه ABA در مطالعات عملکردی روی *Medicago truncatula* (خویشاوند نزدیک‌تر عدس در لگوم‌ها) بیشتر گزارش شده و مبین این موضوع بود که lncRNAs پاسخ‌گو به شوری می‌توانند حساسیت جوانه‌زنی به شوری را از طریق تغییر در متابولیسم و سیگنالینگ ABA و نیز مسیرهای مرتبط با GA تنظیم کنند (Wang et al., 2015). در مطالعه سان و همکاران (Sun et al., 2026) نیز، شواهدی از دخالت توالی lncRNA-MtCIR1 در تعدیل متابولیسم/سیگنالینگ ABA و تغییر در تجمع یون Na^+ به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی تحمل شوری گزارش شده است.

یافته‌های پژوهش حاضر در مقایسه با سایر لگوم‌ها و گیاهان، از نظر الگوی کلی همسو است، هرچند تفاوت‌های کمی بین گونه‌ها قابل انتظار است. برای مثال، در *Melilotus albus* نیز شناسایی گسترده lncRNAs پاسخ‌گو به تنش شوری، همراه با شبکه‌های cis/trans/miRNA-mediated بود (Xifang et al., 2021). در نخود (*Cicer arietinum*) نیز گزارش شده که lncRNAs القاشونده در شرایط تنش شوری در ریشه، عمدتاً به فرایندهای متابولیسمی و تنظیم تنش مرتبطانند و اعتبارسنجی qRT-PCR برای بخشی از آن‌ها هم‌جهتی نتایج RNA-seq را تأیید می‌کند (Kumar et al., 2021). این هم‌راستایی بین عدس و نخود، احتمال وجود ماژول‌های تنظیمی مشترک lncRNA را مطرح می‌کند. در مقابل، همان‌طور که در جدول ۵ ارائه شده بود تعداد lncRNAs شناسایی شده برای برخی از گونه‌های گیاهی بسیار بیشتر گزارش شده بود که احتمالاً به تفاوت در کیفیت مرجع ژنومی، عمق توالی‌یابی، راهبرد سرهم‌بندی، و پیچیدگی ژنومی گونه‌ها مربوط می‌شود.

در مجموع، مطالعه حاضر با شناسایی گسترده lncRNAs در ترنسکرپتوم عدس، تعیین ژن‌ها و توالی‌های lncRNA با بیان افتراقی در برگ و ریشه، مشخص کردن فرایندهای

از منظر عملکردی، تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های حاضر در شبکه هم‌بیانی DEGs-DE-LncRNA، تصویری منسجم از جهت‌گیری گیاه برای ارائه پاسخ به تنش شوری ارائه داد. غلبه فرایندهای زیستی مرتبط با ترجمه و پاسخ به تنش شوری، همراه با عملکردهای مولکولی مانند اتصال پروتئین و اتصال یون فلزی، نشان می‌دهد که lncRNAs احتمالاً در سطح تنظیم ماشین ترجمه، پایداری کمپلکس‌های پروتئینی و نیز تنظیم پروتئین‌های وابسته به یون/فلز (که در هم‌ایستایی یونی و واکنش‌های اکسیدوردوکی نقش دارند) اثرگذارند. فراوانی جایگاه‌های سلولی هسته و سیتوپلاسم نیز با ماهیت شناخته‌شده lncRNAs همخوان است؛ زیرا این مولکول‌ها هم در تنظیم رونویسی و کروماتین (در هسته) و هم در پایداری RNA، ترجمه و شبکه‌های رقابتی RNA (در سیتوپلاسم) نقش ایفا می‌کنند (Chekanova, 2015). این نتایج با یافته‌های جدید در حوزه lncRNAs گیاهی نیز سازگار است که بر چندسطحی بودن عملکرد lncRNAs (رونویسی، پسا‌رونویسی و اپی‌ژنتیک) تأکید دارند (Saha et al., 2025). همگرایی تحلیل هم‌بیانی با غنی‌سازی مسیرهای متابولیسمی یکی دیگر از یافته‌های پژوهش حاضر بود. شناسایی مسیرهایی مانند S-adenosyl-L-methionine cycle، Cytosolic glycolysis و Abscisic acid biosynthesis به‌عنوان مسیرهای غنی‌شده، این فرضیه را تقویت کرد که lncRNAs پاسخ‌گو به تنش شوری در عدس، احتمالاً در یک فرآیند چندوجهی شامل تنظیم هورمون، متابولیسم و انرژی درگیر هستند. حضور مسیر بیوستتر ABA قابل انتظار و از نظر زیستی معنادار بود؛ ABA هورمون محوری پاسخ به شوری است و در تنظیم بسته‌شدن روزنه‌ها، تنظیم اسمزی، فعال‌سازی ژن‌های دفاعی و تعدیل شبکه‌های عوامل رونویسی نقش کلیدی دارد (Mahajan et al., 2025). از سوی دیگر، غنی‌شدن مسیر S-adenosyl-L-methionine cycle بسیار قابل تصور بود، زیرا این مسیر در نقطه اتصال چند فرآیند مهم قرار می‌گیرد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که متیونین و مسیرهای مرتبط با آن می‌توانند با سیگنالینگ ABA و ROS در تحمل شوری مرتبط باشند

شوری را میسر می‌سازد. به‌طور کلی یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که lncRNAs در عدس صرفاً رونوشت‌های جانبی نیستند، بلکه احتمالاً اجزای تنظیمی بالقوه‌ای هستند که می‌توانند در طراحی راهبردهای اصلاحی برای تحمل شوری به‌کار گرفته شوند.

مرتبط با تنش شوری، ترجمه، اتصال پروتئین/یون و جایگاه‌های هسته/سیتوپلاسم و قرار گرفتن در مسیرهای هورمونی و متابولیکی کلیدی مانند ABA و گلیکولیز به‌عنوان نقش عملکردی احتمالی lncRNAs و ژن‌های هدف آن‌ها، افزایش درک پاسخ مولکولی عدس به تنش

References

- Anee, T.I., Sewelam, N.A., Bautista, N.S., Hirayama, T. and Suzuki, N. (2025). Roles of ROS and NO in Plant Responses to Individual and Combined Salt Stress and Waterlogging. *Antioxidants*, 14(12): 1455. <https://doi.org/10.3390/antiox14121455>
- Bae, N., Shim, S.H., Alavilli, H., Do, H., Park, M., Lee, D.W., Lee, J.H., Lee, H., Li, X., Lee, C.H., Jeon, J.S. and Lee, B.H. (2025). Enhanced salt stress tolerance in plants without growth penalty through increased photosynthesis activity by plastocyanin from Antarctic moss. *Plant Journal*, 121(1): e17168. <https://doi.org/10.1111/tpj.17168>
- Baum, M. and Kumar, J. (2024). Lentil genome sequencing: Establishing a comprehensive platform for molecular breeding. In *The Lentil Genome: Genetics, Genomics and Breeding* (pp. 217-236). <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19409-2.00008-9>
- Chekanova, J.A. (2015). Long non-coding RNAs and their functions in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 27: 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.003>
- Dhakate, P., Ambreen, H., Chakraborty, A., Singh, B., Yadav, M., Tiwari, M., Singh, G., Pandey, V. and Bhatia, S. (2020). Comprehending lncRNA-mediated gene regulation during abiotic stresses and reproductive development in legumes. In *Long Noncoding RNAs in Plants: Roles in Development and Stress* (pp. 151-176). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821452-7.00010-6>
- Fu, H. and Yang, Y. (2023). How Plants Tolerate Salt Stress. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(7): 5914-5934. <https://doi.org/10.3390/cimb45070374>
- Goudarzi, M., Ismaili, A., Sohrabi, S.S., Nazarian-Firouzabadi, F. and Eisvand, H.R. (2024). Transcriptomic analysis of salt-stress-responsive genes in lentil roots and leaves. *Plant Biotechnology Reports*, 18(7): 907-925. <https://doi.org/10.1007/s11816-024-00937-x>
- Haghi Asl, N., Darvishzadeh, R., Alipour, H., Fatanatvash, S. and Arzhang, S. (2025). Genomic selection for grain yield in maize (*Zea mays* L.) under normal and salinity stress conditions. *Plant Genetic Research*, 12(1): 1-20. (In Persian). <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2062236.1000>
- Hossain, M.S., Hasanuzzaman, M., Rahman, A., Nahar, K., Mahmud, J.A. and Fujita, M. (2019). Heat shock-induced salt stress tolerance in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Russian Journal of Plant Physiology*, 66(3): 450-460. <https://doi.org/10.1134/S1021443719030075>
- Ismaili, A., Sohrabi, S.S., Hosseini, S.Z., Namdarian, R. and Godarzi, D. (2016). Genotypic correlation and path analysis of some traits related to oil yield and grain yield in canola (*Brassica napus* L.) under non-stress and water deficit stress conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 4(4): 646-664 (In Persian). <https://doi.org/10.22067/gsc.v14i4.41019>
- Khadivar, R., Ismaili, A., Sohrabi, S.S. and Torabi Poteh, H. (2023). identification and functional prediction of long non-coding RNAs Responsive to drought stress in *Lens culinaris* L. *Plant Genetic Research*. 9(2): 55-70 (In Persian). <http://doi.org/10.22034/pgr.9.2.5>
- Kumar, N., Bharadwaj, C., Sahu, S., Shiv, A., Shrivastava, A.K., Reddy, S.P.P., Soren, K.R., Patil, B.S., Pal, M., Soni, A., Roorkiwal, M. and Varshney, R.K. (2021). Genome-wide identification and functional prediction of

- salt- stress related long non-coding RNAs (lncRNAs) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(11): 2605-2619. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01093-0>
- Li, J., He, H., Li, Y., Wang, A. and He, L.F. (2022). Role of long non-coding RNA in plant responses to abiotic stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(5): 54. <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03387-6>
- Li, X. and Zhang, N. (2025). Methionine as a key player in salt stress adaptation in plants. *Plant Physiology*, 198(1): kiaf169. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaf169>
- Li, Z., Zhou, H., Xu, G., Zhang, P., Zhai, N., Zheng, Q., Liu, P., Jin, L., Bai, G. and Zhang, H. (2023). Genome-wide analysis of long noncoding RNAs in response to salt stress in *Nicotiana tabacum*. *BMC Plant Biology*, 23(1): 646. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04659-0>
- 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(4): 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mahajan, M., Poor, P., Kaur, H., Aher, R.R., Palakolanu, S.R. and Khan, M.I.R. (2025a). Salt stress tolerance and abscisic acid in plants: associating role of plant growth regulators and transcription factors. *Plant Physiology and Biochemistry*, 228: 110303. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.110303>
- Mahdavian, K. (2023). Effect of calcium chloride and salicylic acid on antioxidative responses of lentils (*Lens culinaris* Medik.) under salt stress. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 13(2): 4541-4554. <https://doi.org/10.30495/ijpp.2023.704670>
- Paul, A., Mondal, S., Pal, A., Biswas, S., Chakraborty, K., Mazumder, A., Biswas, A.K. and Kundu, R. (2023). Seed priming with NaCl helps to improve tissue tolerance, potassium retention ability of plants, and protects the photosynthetic ability in two different legumes, chickpea and lentil, under salt stress. *Planta*, 257(6): 111. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04150-y>
- Saha, C., Saha, S. and Bhattacharyya, N.P. (2025). LncRNAOmics: a comprehensive review of long non-coding RNAs in plants. *Genes*, 16(7): 765. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/genes16070765>
- Shi, B., Li, K., Xu, R., Zhang, F., Yu, Z., Ding, Z. and Tian, H. (2025). Methionine-mediated trade-off between plant growth and salt tolerance. *Plant Physiology*, 197(3): kiaf074. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaf074>
- Sun, X., Tian, R., Zhao, M. and Zhang, W.H. (2026). The lncRNA MtCIR2 suppresses seed germination by PRC1-dependent H2A ubiquitination in *Medicago truncatula* under salt stress. *Plant Journal*, 125(1): e70682. <https://doi.org/10.1111/tpj.70682>
- Tiwari, A., Joshi, S., Joshi, R. and Bohra, A. (2024). Omics advancements in plant abiotic stress. In *Current Omics Advancement in Plant Abiotic Stress Biology: a volume in Developments in Applied Microbiology and Biotechnology* (pp. 23-37). <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-21625-1.00002-6>
- Tiwari, V., Kumar, A. and Singh, P. (2021). Effects of Salt Stress on Physiology of Crop Plants: At Cellular Level. In *Physiology of Salt Stress in Plants: Perception, Signalling, Omics and Tolerance Mechanism* (pp. 16-37). <https://doi.org/10.1002/9781119700517.ch2>
- Tripathi, A., Singh, D., Bhati, J., Singh, D., Taunk, J., Alkahtani, J., Al-Hashimi, A. and Singh, M.P. (2025). Genome wide identification of MATE and ALMT gene family in lentil (*Lens culinaris* Medikus) and expression profiling under Al stress condition. *BMC Plant Biology*, 25(1): 88. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06086-9>
- Wang, T.Z., Liu, M., Zhao, M.G., Chen, R. and Zhang, W.H. (2015). Identification and characterization of long non-coding RNAs involved in osmotic and salt stress in *Medicago truncatula* using genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Plant Biology*, 15: 131. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0530-5>
- Xifang, Z., Wang, S., Han, Y., Zhao, Q., Xu, P., Yan, Q., Wu, F. and Zhang, J. (2021). Genome-wide profiling of the potential regulatory network of lncRNA and mRNA in *Melilotus albus* under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 189: 104548. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104548>

- Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C. and Wang, P. (2021). Regulation of plant responses to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9): 4609. <https://doi.org/10.3390/ijms22094609>
- Zong, X., Wang, S., Han, Y., Zhao, Q., Xu, P., Yan, Q., Wu, F. and Zhang, J. (2021). Genome-wide profiling of the potential regulatory network of lncRNA and mRNA in *Melilotus albus* under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 189: 104548. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104548>
- Zulfiqar, F. and Ashraf, M. (2023). Proline Alleviates Abiotic Stress Induced Oxidative Stress in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(8): 4629-4651. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10839-3>