

شناسایی و پیش‌بینی عملکرد RNAهای بلند غیرکدکننده پاسخگو به تنش خشکی در عدس (*Lens culinaris* L.)

راضیه خدیور^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، سید سجاد سهرابی^۳ و حسن ترابی پوده^۴

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 تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۴- دانشیار، گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵)

چکیده

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی است که بر رشد و بهره‌وری 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 تنش‌های غیرزیستی به‌وجود آمده است. در مطالعه حاضر، پس از شناسایی lncRNAها در پروفایل بیانی عدس، از داده‌های RNA-seq و واکنش Real-time PCR برای بررسی الگوی بیان برخی از lncRNAهای شناسایی شده تحت تنش خشکی استفاده شد. همچنین شبکه هم‌بیانی lncRNAs-DEGs با استفاده از بسته نرم‌افزاری psych ترسیم شد. در مجموع طی این مطالعه، ۳۵۹۰ توالی lncRNA در عدس شناسایی شد. تعداد زیادی از lncRNAها با ژن‌های مرتبط با تنظیم ریتم شبانه‌روزی، پاسخ به یون روی، واکنش نوری فتوسنتزی و هموستازی یونی هم‌بیان بودند. همچنین نتایج نشان داد که سه توالی LCUL_evglLocus_104392، LCUL_evglLocus_99066 و LCUL_evglLocus_61876 دارای بیشترین تغییر بیان در پاسخ به تنش خشکی بودند. بررسی هم‌بیانی 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 توالی‌های lncRNA را در عدس شناسایی نمود و گامی مفید در شناخت مکانیسم عملکرد lncRNA در چگونگی تحمل گیاهان به تنش خشکی می‌باشد. شبکه‌ها هم‌بیان این توالی‌ها و ژن‌های دارای بیان افتراقی می‌تواند سبب درک بهتر مکانیسم‌های پاسخ به خشکی در عدس شود.

واژگان کلیدی: تنش خشکی، عدس، lncRNA، PLncPRO

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

مقدمه

گیاهان به‌عنوان موجوداتی بی‌تحرک، در طول چرخه زندگی خود اغلب با انواع مختلفی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی روبرو می‌شوند (Zhang et al., 2019). در طی تکامل، مکانیسم‌های پیچیده‌ای برای شناسایی عوامل مختلف تنش‌زا برای ایجاد مسیرهای پیام‌رسانی و پاسخ فوری یا با تأخیر در گیاهان ایجاد شده است (He et al., 2018). در مکانیسم تحمل یا مقاومت به تنش‌ها، گیاهان با تنظیم و برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌ها در سطوح مختلف، چه در رونویسی، پس از رونویسی و چه در سطح ترجمه و بعد از آن، با شرایط آسیب‌رسان محیطی خود می‌گیرند (Rafeie et al., 2020; 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 Sadati et al., 2021; Jha et al., 2020). یکی از مهم‌ترین عناصر تنظیم‌کننده بیان ژن‌ها که در طیف وسیعی از فرآیندهای زیستی از جمله: مکانیسم رونویسی، تنظیم پردازش mRNA، مقابله با انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی، گلدی و نرغیمی و همچنین تغییرات اپی-ژنتیک نقش مهمی دارند، lncRNAها (long non-coding RNAs) هستند. این کلاس از مولکول‌های تنظیم‌کننده در طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها از جمله گیاهان و حیوانات شناسایی شده‌اند (Jha et al., 2020).

lncRNAها، توالی‌هایی با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که در خانواده RNAهای غیرکدکننده قرار می‌گیرند (Waseem et al., 2021). در سال‌های اخیر، ظهور فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS) منجر به شناسایی بیشتر lncRNAها در موجودات مختلف شده است. در خانواده‌های مختلف گیاهی نیز تعداد زیادی از lncRNAها شناسایی شده است، با این حال تعداد lncRNAها شناسایی شده در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله *Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Populus trichocarpa*, *Setaria italica* و *Brassica rapa* متفاوت است (Trivedi and Asif, 2020).

در حیوانات lncRNAها توسط RNAپلیمراز II رونویسی می‌شوند در حالی‌که شواهدی از نقش RNA پلیمراز IV در رونویسی این عناصر در گیاهان نیز وجود دارد (Chen and Carmichael, 2010). همچنین بررسی منابع نشان می‌دهد که اغلب lncRNAها با مشارکت siRNAها در خاموشی ژن‌ها نقش دارند (Waseem et al., 2021). طبقه‌بندی lncRNAها فرآیندی 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 lncRNAها 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 می‌توان در سه گروه الف: بین‌ژنی، ب: ایترونی و ج: lncRNAهای موجود در توالی آنتی‌سنس دسته‌بندی نمود (Ma et al., 2013).

شواهد نشان می‌دهد که فعالیت lncRNAها 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) ۵۴ lncRNA که دارای نقش مؤثری در پاسخ به تنش گرما در گندم بودند با استفاده از توالی‌یابی Solexa و ریزآرایه مبتنی بر پلتفرم Affymetrix شناسایی شدند (Xin et al., 2011). در مطالعه ویدونگ و همکاران (Weidong et al., 2020)، lncRNAهای تنظیم‌کننده ژن‌های پاسخ‌گو 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 ۲۰ lncRNA پاسخگو به تنش خشکی در سورگوم شناسایی شد (Qi et al., 2013)، که از این بین تنها یک lncRNA پاسخ‌گو به خشکی دارای همولوژی بالایی با lncRNA ارزن دمرابه‌ای بود که نشان دهنده

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

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و سرهم‌بندی ترنسکرپتوم عدس: در گام نخست، کتابخانه داده‌های توالی‌یابی شده ترنسکرپتوم 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. پس از تعیین کیفیت داده‌ها توسط نرم‌افزار FastQC، داده‌های کم کیفیت در فرآیند تریم توسط نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه ۰/۲۷)، حذف و در نهایت پس از ادغام کتابخانه‌های مختلف توسط نرم‌افزار CLC genomics workbench (نسخه ۲۱)، سرهم‌بندی ترنسکرپتوم گیاه عدس انجام شد. مستندسازی توالی رونوشت‌های به‌دست‌آمده با بلاست آن‌ها توسط ابزار BLASTx علیه پایگاه پروتئین‌های غیرتکراری (Non redundant protein database: NR) انجام شد. پس از نقشه‌یابی خوانش‌ها با اسمبلی ایجاد شده، رونوشت‌های با بیان افتراقی (Differentially expressed genes: DEGs) با استفاده از بسته نرم‌افزاری edgeR با در نظر گرفتن آستانه $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ و $\text{FDR} \leq 0.01$ مشخص شدند.

شناسایی lncRNAها: به‌منظور شناسایی lncRNAها در ترنسکرپتوم عدس از بسته نرم‌افزاری (PLncPRO) استفاده شد (Singh et al., 2017). در این بسته نرم‌افزاری ابتدا با استفاده از مدل گیاهان دولپه و ویژگی‌های ثبت شده lncRNAها در این مدل به شناسایی توالی‌های احتمالی lncRNA پرداخته می‌شود. پس از تشخیص توالی‌های احتمالی با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض نرم‌افزار، به جداسازی توالی‌هایی که به احتمال بالاتری به‌عنوان lncRNA شناخته شدند، اقدام شد (Singh et al., 2017).

حفاظت‌شدگی کم lncRNAها است (Qi et al., 2013). به‌طور کلی شواهد در حال ظهور نشان می‌دهند که lncRNAها با تنظیم رونویسی ژن‌های مختلف پاسخ‌گو به تنش یا با فراخوانی مکانیسم‌های پیچیده‌ای همچون تغییر در وضعیت پیچیدگی کروماتین بر پاسخ‌ها به خشکی تأثیر می‌گذارند (Liu et al., 2013).

عدس زراعی (*Lens culinaris* Medikus) گیاهی خودگردۀ افشان و دیپلوئید ($2n = 2x = 14$) است که با اندازه ژنومی معادل ۴ گیگا باز (Arumuganathan and Earle, 1991)، یکی از اصلی‌ترین اعضای خانواده حبوبات دانه‌ای به‌شمار می‌رود (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 به‌طور کامل برخوردار 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 خشکی می‌باشد (Kumar et al., 2013).

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

(Hosseini et al., 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- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و ساخت کتابخانه cDNA: استخراج RNA از ۱۰۰ mg از بافت برگ پودر شده با استفاده از کیت RNA 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 تیمار با آنزیم DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA) استفاده شد. همچنین به منظور ساخت کتابخانه cDNA از RNA استخراج شده، از کیت First Strand cDNA Synthesis Kit (شرکت فرمتاز، Fermentas, Thermo Fisher Scientific, US) استفاده شد.

واکنش qRT-PCR: ابتدا به منظور 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 (https://knowpulse.usask.ca/Lens) BLASTn شدند. برای طراحی آغازگر از نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶) استفاده شد. فهرست آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ ارائه شده است.

در مرحله نهایی پس از مستندسازی توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی متعدد پروتئینی از جمله NR، Pfam، Swisprot و CCD، تنها توالی‌هایی به‌عنوان lncRNA 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 lncRNA که بیشترین تغییر بیان را در تیمار مورد نظر نشان دادند، انتخاب و بیان آن‌ها در شرایط مذکور با استفاده واکنش Real-time PCR سنجیده شد.

بررسی شبکه هم‌بیانی lncRNAs-DEGs: به منظور بررسی شبکه هم‌بیانی mRNA و lncRNAهای منتخب از بسته نرم‌افزاری psych در محیط R استفاده شد (Revelle and Revelle, 2015). پس از به‌دست آوردن ماتریس همبستگی DEGs و lncRNAهای منتخب، از نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳/۹) برای ترسیم شبکه هم‌بیانی استفاده شد. در نهایت به منظور مستندسازی عملکردی از افزونه ClueGO (Bindea et al., 2009) و جهت شناسایی ژن‌های هم‌بیان‌کننده از افزونه cytoHubba در محیط نرم‌افزاری Cytoscape استفاده شد (Chin et al., 2014).

کشت و اعمال تنش: بذور عدس (رقم گچساران، رقم عدس معرفی شده برای مناطق گرمسیر) در گلدان‌های حاوی پیت‌ماس، ورمی‌کولیت و ماسه با نسبت (۱:۱:۱) کشت شدند. گلدان‌ها به اتاق رشد با متوسط دمای روزانه ۲۳ °C تحت چرخه‌های تاریکی/روشنایی، ۸/۱۶ ساعت منتقل شدند. اعمال تنش کم‌آبایی، بر روی گیاهچه‌های ۲۱ روزه مطابق با شرایط اعمال شده در مطالعه قبل (PEG 20% به مدت ۷۲ ساعت) صورت گرفت.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده برای واکنش qRT-PCR

Table 1. Primer sequences used for qRT-PCR reaction

مشخصه توالی Sequence ID	توالی آغازگر پیشرو Forward primer sequence	توالی آغازگر پسرو Reverse primer sequence	دمای اتصال (°C) Tm (°C)	اندازه محصول (جفت‌باز) Product size (bp)
LCUL_evglLocus_104392	5'-CAAAGAGTTTGATATTTAGTTTC-3'	5'-AGTTCIGAATGAAATGTTCTTAGG-3'	50.4	115
LCUL_evglLocus_61876	5'-ATGCTATCCCAACACATCAATG-3'	5'-GCCATACTCAGAAGATACAGAGG-3'	52.9	112
LCUL_evglLocus_99066	5'-TATGCGGCTGTTTTGGAATGTAAG-3'	5'-TGAAGATACCTCAAGAATTAGACG-3'	51	142

رونوشت سرهم‌بندی شده و N50 به‌ترتیب ۲۰۶۲۳ و ۱۵۳۹ محاسبه شد. تمام یونی‌ژن‌ها با استفاده از BLASTx ($\text{cutoff E-value} < 10^{-5}$) علیه پایگاه پروتئین‌های غیرتکراری (NR) بلاست شدند. در مجموع ۴۶۳۹۰ یونی ژن توسط پایگاه داده NR (۸۶/۲۴ درصد) مستندسازی شدند.

شناسایی توالی‌های lncRNA در پروفایل بیانی عدس: از مجموع رونوشت‌های به‌دست آمده (۵۳۷۹۱)، ۱۶۴۷۳ توالی با استفاده از مدل PLncPRO به‌عنوان LncRNA پیش‌بینی شدند. پس از فرآیند حاشیه‌نویسی توالی‌ها با استفاده از پایگاه داده Pfam تعداد توالی‌های LncRNA باقی‌مانده (غیرکدکننده) به ۶۰۰۳ مورد تقلیل یافت. علاوه بر این برای تأیید نهایی توالی‌های LncRNA از مدل CPC و الگوریتم LncRNA2 نیز استفاده شد. پس از فیلتر سخت‌گیرانه ذکر شده تعداد توالی‌های LncRNA باقی‌مانده به ۳۵۹۰ رسید. برای اطمینان بیشتر توالی LncRNA‌های پیش‌بینی شده با استفاده از ۴ پایگاه داده LncRNA گیاهی (CANTATA، PNRD، PLncDB و GreeNC) مورد کنکاش قرار گرفتند. نتایج جستجوی علیه چهار پایگاه مذکور، توالی‌های شناسایی شده را در چهار گروه قرار داد، به‌طوری که ۱۱ توالی پیش‌بینی شده توسط هر چهار پایگاه داده تأیید 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 ۴ پایگاه داده نشان داد که ده گیاه برتر از نظر میزان شباهت با توالی‌های شناسایی شده اغلب متعلق به خانواده حبوبات بوده و قرابت بسیار بالایی با عدس دارند. در بین گیاهان با قرابت بالا، نخودفرنگی (*Pisum sativum*)، شبدر قرمز (*Trifolium pratense*) و یونجه سربریده (*Medicago truncatula*) به‌ترتیب بیشترین میزان شباهت را با توالی‌های LncRNA پیش‌بینی شده در عدس نشان دادند (شکل ۱).

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 شرکت TaKaRa برای انجام واکنش qRT-PCR استفاده گردید. قبل از انجام واکنش qRT-PCR تمامی نمونه‌ها به نسبت ۱:۵ رقیق شدند. واکنش qRT-PCR در دو تکرار فنی و سه تکرار بیولوژیکی انجام گرفت. مراحل تکثیر عبارت‌اند از: واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه، سپس ۴۰ 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 در نهایت بلند سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Livak and Schmittgen, 2001).

نتایج و بحث

سرهم‌بندی نوپدید، پیرایش و پالایش داده‌ها: ۱۹۴۴۶۰۸۱۸ خوانش خام از پایگاه داده به‌دست آمد. پس از فرآیند پیرایش و پالایش داده‌ها، حذف خوانش‌های با کیفیت پایین و توالی‌های آداپتور از خوانش‌های خام، ۱۸۰۹۵۶۰۹۶ خوانش با کیفیت باقی ماند (جدول ۲). سرهم‌بندی نوپدید ترنسکریپتوم برگ عدس با استفاده از خوانش‌های تمیز شده از طریق نرم‌افزار Trinity انجام و از بسته نرم‌افزاری EvidentialGene pipeline برای زدودن توالی‌های تکراری استفاده شد. پس از زدودن توالی‌های تکراری، ۵۳۷۹۱ یونی ژن به‌دست آمد. طول بلندترین

جدول ۲- ویژگی‌های سرهم‌بندی ترنسکرپتوم عدس تحت تنش خشکی

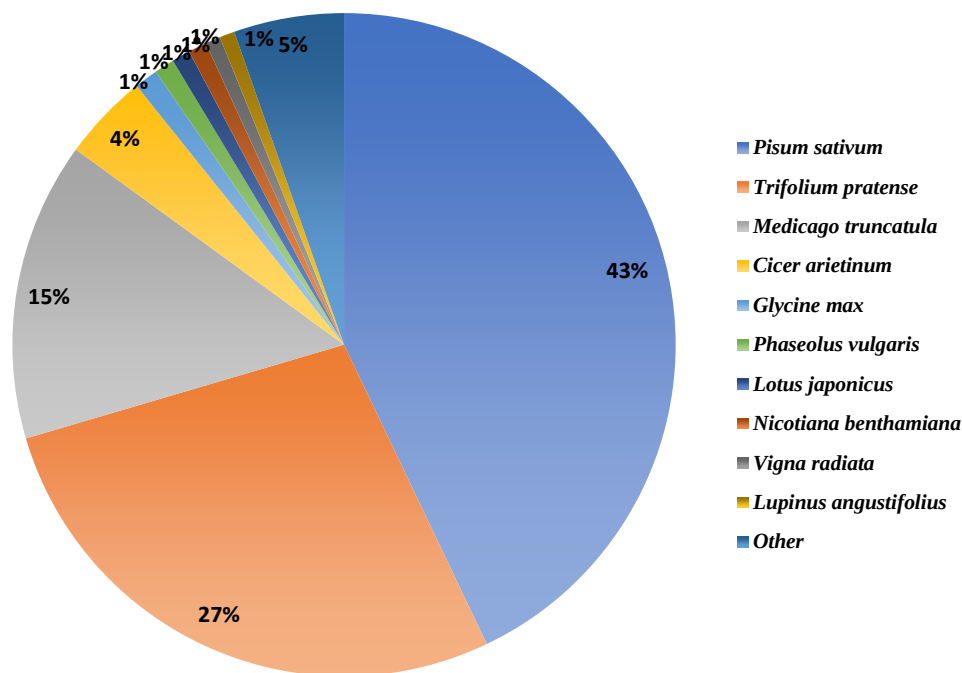
Table 2. Characteristics of transcriptome assembly of lentil under drought stress

ویژگی‌ها Attributes	مقدار Value
تعداد خوانش‌های خام Number of raw reads	194460818
تعداد خوانش‌های تمیز شده Number of cleaned reads	180956096
تعداد رونوشت Number of transcripts	53791
کوتاه‌ترین طول رونوشت (نوکلئوتید) Shortest transcript length (NT)	200
بلندترین طول رونوشت (نوکلئوتید) longest transcript length (NT)	20623
تعداد نوکلئوتید Number of nucleotides	62724167
میانگین طول رونوشت (نوکلئوتید) Mean length of transcript (NT)	1166.072
تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱ کیلو نوکلئوتید The number of transcripts with a length of more than 1 Kb	23269
تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱۰ کیلو نوکلئوتید 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 ۳- نتایج حاشیه‌نویسی LncRNA های شناسایی شده علیه چهار پایگاه داده شامل PNRD, CANTATA, PLncDB و GreeNC

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

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



شکل ۱- توزیع فراوانی خانواده‌های گیاهی که با توالی‌های lncRNA شناسایی شده قرابت دارند

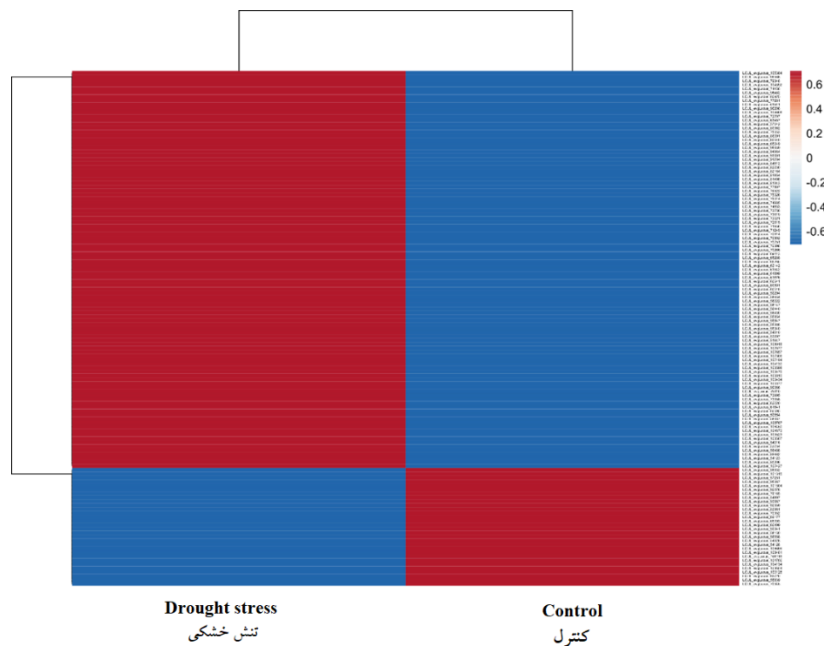
Figure 1. Distribution of plant families related to identified lncRNA sequences

نرمال شده این مجموعه داده در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که ۱۸ DEGs با LCUL_evglLocus_61876 هم‌بیان است. همچنین نتایج نشان داد که از ۴۸ DEG که با LCUL_evglLocus_104392 هم‌بیان هستند، ۳۸ ژن به‌طور مشترک با LCUL_evglLocus_99066 هم‌بیان بوده و ده ژن به‌طور اختصاصی با LCUL_evglLocus_104392 هم‌بیان می‌باشند. در مقابل از ۴۳ DEG که با LCUL_evglLocus_99066 هم‌بیان بودند تنها ۵ DEG به‌صورت اختصاصی و سایر DEGs به‌صورت مشترک با LCUL_evglLocus_104392 هم‌بیان 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 DEGs به‌دست آمده به مشخصه ژن‌های آرآبیدوپسیس، گروه‌های کارکردی در سه حوزه فرایندهای زیستی (Biological Processes: BP)، عملکرد مولکولی (Molecular Function: MF) و جایگاه سلولی (Cellular Components: CC) تعیین شدند (شکل ۴ الف، ب و ج).

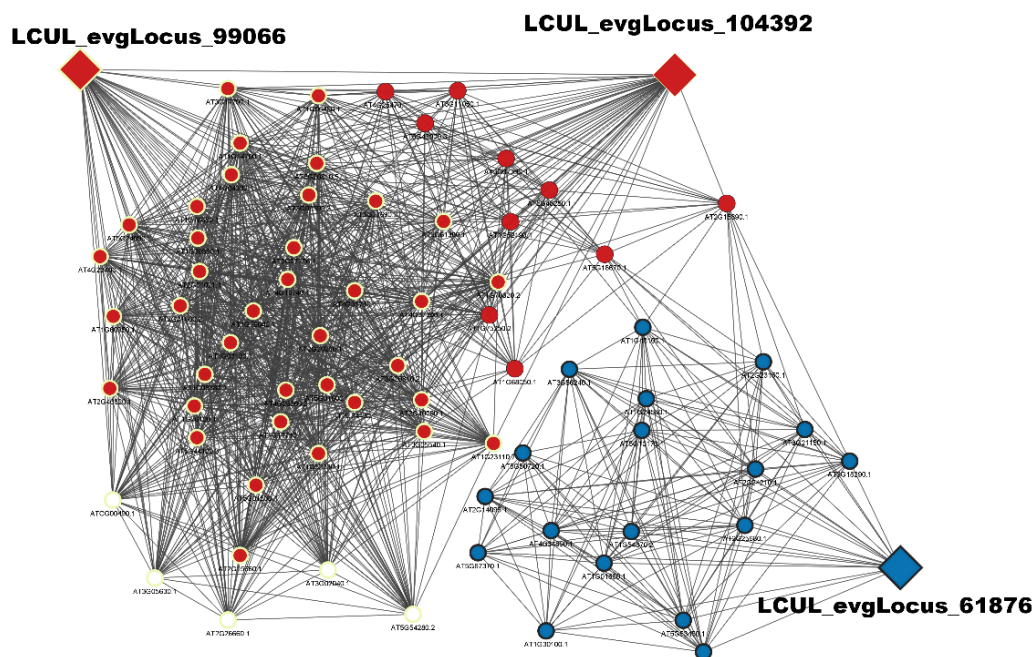
بررسی بیان توالی‌های lncRNA شناسایی شده در پروفایل بیانی عدس تحت تنش خشکی با در نظر گرفتن $TPM > 5$ (Transcripts per million) انجام شد. نتایج نشان داد که از ۳۵۹۰ توالی شناسایی شده تنها ۱۳۱ مورد دارای TPM بالای ۵ بودند. گروه‌بندی (مبتنی بر بیان) توالی‌های پیش‌بینی شده بر اساس مقادیر $Log_{10}(TPM+1)$ و روش UPGMA نشان داد که lncRNAها در دو گروه کاملاً مجزا قرار می‌گیرند. گروه کوچک‌تر ۳۰ عضو داشته و بیان این lncRNAها در شرایط تنش خشکی با کاهش مواجه می‌شوند و در مقابل در گروه بزرگ‌تر که ۱۰۱ مورد از lncRNAها را به خود اختصاص داده است، بیان در شرایط تنش خشکی افزایش یافت (شکل ۲).

شبکه هم‌بیانی lncRNAها و DEGsهای شناسایی شده: به‌منظور شناسایی شبکه هم‌بیانی بین lncRNAهای پیش‌بینی شده و DEGsهای شناسایی شده تحت تنش خشکی در عدس از ۲۰۵ ژن با افتراق بیان معنی‌دار و دارای $TPM > 5$ به‌همراه ۳ lncRNA (LCUL_evglLocus_104392، LCUL_evglLocus_99066 و LCUL_evglLocus_61876) دارای بیان افتراقی و $TPM > 5$ استفاده شد. شبکه هم‌بیانی ایجاد شده با استفاده از ماتریس همبستگی مبتنی بر مقادیر بیان



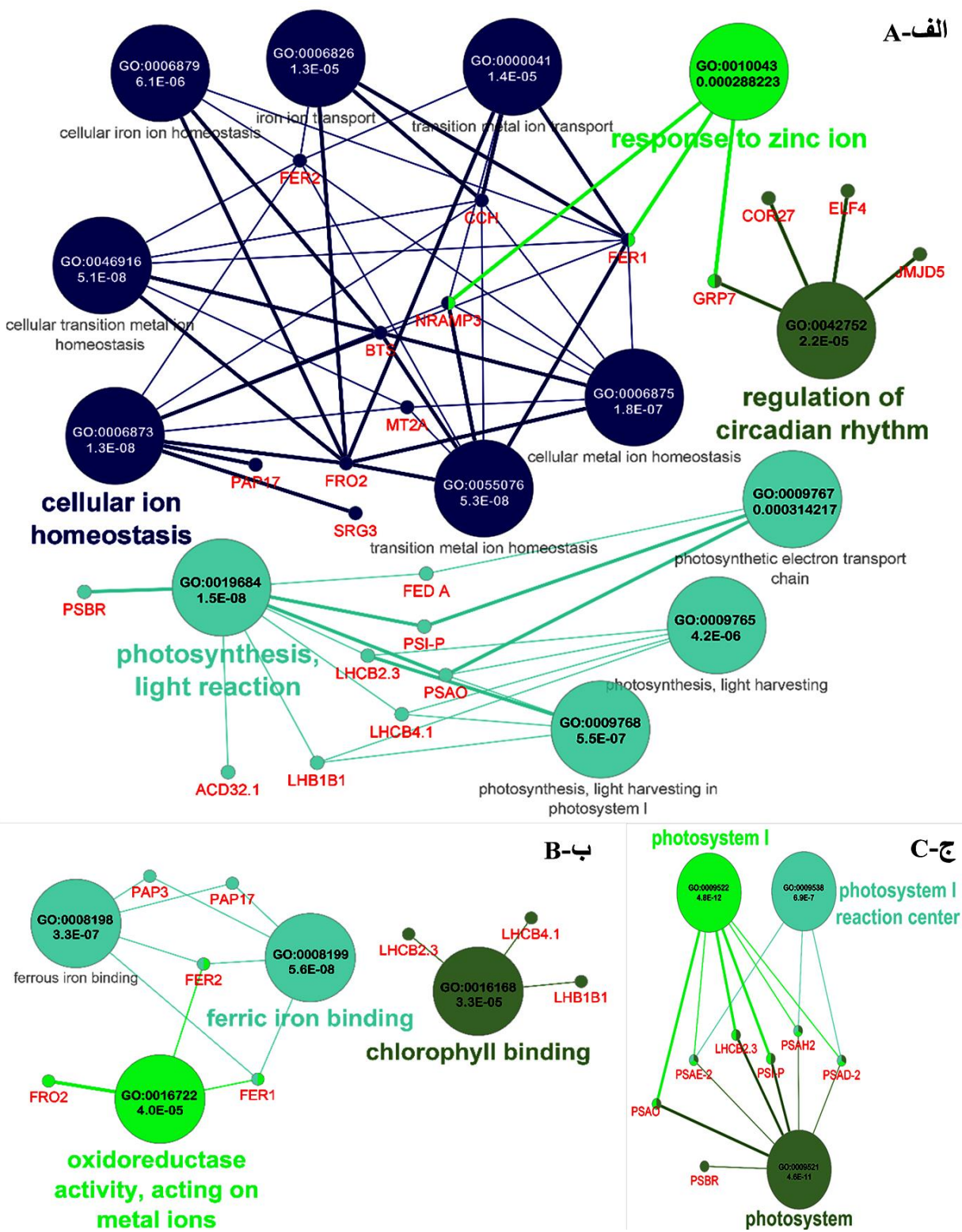
شکل ۲- نقشه حرارتی پروفایل بیانی lncRNA های شناسایی شده در ترنسکرپتوم عدس تحت تنش خشکی. رنگ قرمز و آبی به ترتیب نشان دهنده سطح بیان بالا و پایین است.

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 هم‌بیانی lncRNAs-DEGs عدس تحت تنش خشکی. عناصر مربع و دایره‌ای شکل به ترتیب lncRNA ها و DEGs را نشان می‌دهند. رنگ آبی، قرمز و حاشیه بیرونی زرد به ترتیب عناصر هم‌بیان با LCUL_evglLocus_61876، LCUL_evglLocus_104392 و LCUL_evglLocus_99066 می‌باشند. عناصر دارای دو رنگ، به صورت مشترک با دو lncRNA هم‌بیان 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_evglLocus_61876, LCUL_evglLocus_104392, and LCUL_evglLocus_99066, respectively. Elements with two colors are co-expressed with two lncRNAs.

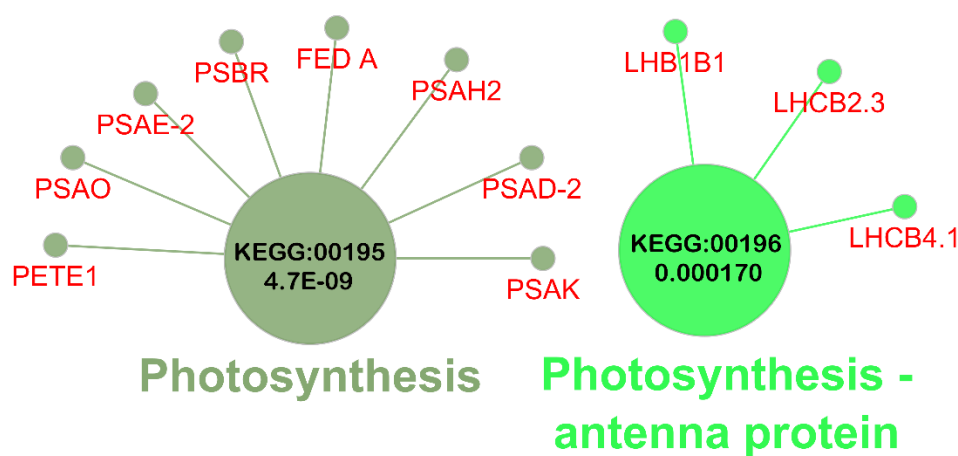


شکل ۴- مستندسازی عملکردی شبکه همبستگی LncRNA-DEGs عدس تحت تنش خشکی بر اساس (الف) فرآیندهای زیستی، (ب) عملکرد مولکولی و (ج) جایگاه سلولی

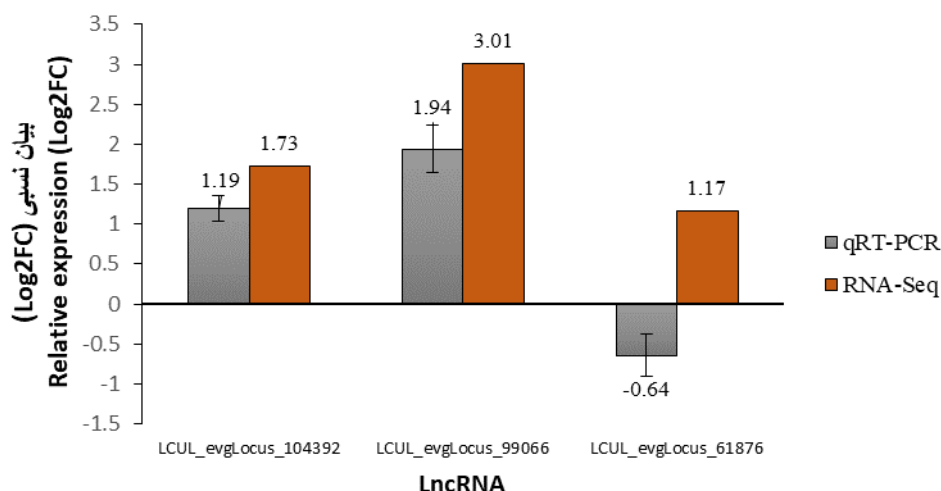
Figure 4. Functional annotation of LncRNA-DEGs co-expression network of lentil under drought stress based on (a) biological processes, (b) molecular functions and (c) cellular component.

اعتبارسنجی بیان LncRNAهای شناسایی شده: به‌منظور اعتبار سنجی بیان محاسبه شده با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA، سه توالی LncRNA منتخب (LCUL_evglLocus_104392، LCUL_evglLocus_61876 و LCUL_evglLocus_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 qRT-PCR نشان داد که از سه توالی مورد نظر دو توالی (LCUL_evglLocus_99066 و LCUL_evglLocus_104392) دارای بیانی تقریباً مشابه در دو حالت سنجش می‌باشند. با این حال بیان توالی LCUL_evglLocus_61876 در دو حالت سنجش اختلاف داشتند. بر اساس نتایج qRT-PCR توالی LCUL_evglLocus_99066 با بیان نسبی (Fold Change) معادل ۱/۹۴ بیشترین میزان تغییرات مثبت را نشان داد که در مقایسه با روش RNA-seq نیز همین توالی بیشترین میزان بیان را ($\text{Log2FC} = 3/01$) را نشان داد. بررسی میزان بیان LCUL_evglLocus_61876 با استفاده از روش qRT-PCR نشان داد که این توالی تحت تنش خشکی با کاهش بیان روبرو می‌گردد، به‌طوری که میزان بیان نسبی آن معادل ۰/۶۴- به‌دست آمد. این در حالی است که بیان این توالی در روش RNA-seq مثبت و معادل ۱/۱۷ بود.

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 هم‌بیان بودند. در این حوزه عملکردی ۲۱ ژن هم‌بیان دخیل بود که از میان آن‌ها بر اساس معیار درجه (Degree)، سه ژن *FER1*، *FER2* و *FRO2* جزء مهم‌ترین ژن‌ها به‌شمار می‌روند. در حوزه عملکرد مولکولی (MF) چهار زیرگروه شامل اتصال کلروفیل، فعالیت اکسیدووردوکناز و اثر بر یون‌های فلزی، اتصال ترکیبات آهن-ferrous و اتصال ترکیبات آهن-ferric، دارای بیشترین تعداد ژن هم‌بیان بودند. در این حوزه عملکردی ۸ ژن هم‌بیان دخیل بود که از میان آن‌ها چهار ژن بر اساس معیار درجه (Degree)، *FER1*، *FER2*، *PAP17* و *PAP3* جزء 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 هم‌بیان بودند. در این حوزه عملکردی ۷ ژن هم‌بیان شامل *PSAE-2*، *PSAD-2*، *PSAH2*، *PSAO*، *PSI-P*، *LHCB2.3* و *PSBR* دخیل بودند. علاوه بر این نتایج بررسی مسیرهای متابولیکی که ژن‌های هم‌بیان در آن دخیل بودند (شکل ۵) نشان داد که مسیرهای فتوسنتز و فتوسنتز - پروتئین‌های آنتن گیرنده نور توسط ژن‌های هم‌بیان شناسایی شده به‌طور معنی‌داری غنی‌سازی شده‌اند. مجموعه ژن‌های شناسایی شده در مسیرهای غنی‌سازی شده شامل ژن‌های *PSAO*، *PSAK*، *PSAH2*، *PSAE-2*، *PSAD-2*، *PETE1*، *FEDA*، *LHCB1B1*، *LHCB2.3* و *LHCB4.1* بود.



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



شکل ۶- اعتبار سنجی داده‌های بیانی lncRNAهای 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 lncRNAها 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 ثبت شده است (Nejat and Mantri, 2018; Patra *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2018). تاکنون مطالعاتی که به شناسایی lncRNAها، مکانیسم‌های مولکولی تنظیمی پیچیده آن‌ها یا حاشیه‌نویسی عملکردی در گیاه عدس منجر شود، انجام نگرفته است. در این مطالعه شناسایی و پیش‌بینی عملکرد RNAهای بلند غیرکدکننده در عدس تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت که منجر به شناسایی ۳۵۹۰ توالی lncRNA برای اولین بار در گیاه عدس شد.

در تحقیقی توسط فوکودا و همکاران (Fukuda *et al.*, 2019) که در آن به بررسی تعداد lncRNA 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 (Jha *et al.*, 2020; Waseem *et al.*, 2020). شناسایی RNAهای

۶۰ lncRNA با بیان متفاوت شناسایی شد. همچنین در مطالعه‌ای مشابه، کومار و همکاران (Kumar et al., 2022) بود بر روی گیاه ارزن مروارید (*Pennisetum glaucum*) تحت شرایط تنش خشکی پرداختند. نتایج این مطالعه حاکی از نقش حیاتی RNAهای بلند غیرکدکننده (lncRNAs) در فرایندهای بیولوژیکی مختلفی دخیل در پاسخ به تنش خشکی بود (Kumar et al., 2022). در مجموع ۸۷۹ lncRNAs در گیاه ارزن شناسایی شد که از این تعداد، ۱۹۸ از lncRNAs در ریشه و برگ گیاهان تحت تنش خشکی فعالیت داشتند. به‌طور کلی تعداد قابل‌توجهی از RNAهای بلند غیرکدکننده در شرایط تنش خشکی در گیاهان همچون گوجه‌فرنگی، پنبه، موز، کلزا، برنج و چغندر قند شناسایی شده است که می‌تواند 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).

در مطالعه حاضر سه lncRNA تحت عناوین LCUL_evglLocus_104392، LCUL_evglLocus_61876 و LCUL_evglLocus_99066 به‌عنوان lncRNAهای دارای بیان افتراقی با $TPM > 5$ شناسایی شدند. مطالعات هستی‌شناسی ژن‌های هم‌بیان با سه lncRNA مذکور نشان داد که lncRNAs های مربوطه در مکانیسم‌های مهم سلولی از جمله فرآیند زیستی، عملکردهای مولکولی و تجمع در مکان‌های خاصی از سلول دخیل هستند و همچنین 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 مکانیسم پاسخ به تنش ایفا می‌کنند. در مطالعه مشابه با نتایج این مطالعه، تأثیر یک lncRNAs 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 میانجی‌گر در پاسخ به خشکی بود (Dong et al., 2022).

همچنین مطالعه توسط کین و همکاران (Qin et al., 2017) نشان داد که lncRNAهای دخیل در پاسخ به تنش خشکی در *Arabidopsis* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده 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 lncRNAهای به‌عنوان یک عامل میانجی‌گر در تنظیم بیان ژن‌های پاسخ به تنش نقش ایفا می‌کنند. نتایج مطالعات مذکور نقش احتمالی سه lncRNA شناسایی شده در مطالعه حاضر به‌عنوان میانجی‌گر در تنش خشکی را تأیید می‌کنند. با جمع‌بندی نتایج حاصل از این تحقیق و سایر نتایج ذکر شده از محققین دیگر باید به این نکته اشاره نمود که lncRNAها می‌توانند با به‌کارگیری مکانیسم‌های پیچیده مبتنی بر eTM (endogenous target mimic)، تنظیم با واسطه رونویسی، تنظیم کروماتین، یا تنظیم مستقیم رونویسی ژن‌های مختلف در مسیر پاسخ به خشکی به این تنش واکنش 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).

با توجه به مکانیسم پیچیده و تعداد زیاد ژن‌های دخیل در تحمل به تنش‌های خشکی، به مطالعاتی با جزئیات بیشتر برای درک بهتر این فرآیند نیاز است. در این مطالعه، تجزیه و تحلیل توالی‌های حاصل از RNA-seq، سه lncRNA 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 lncRNAها نشان می‌دهد و اعتبار سنجی عملکردی با استفاده از qRT-PCR در پاسخ به تنش‌های خشکی نیاز است؛ بنابراین در این مطالعه سه تا از مهم‌ترین lncRNA 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 رونوشت LCUL_evglLocus_99066 با بیانی نسبی (Log2FC) معادل ۱/۹۴ بیشترین میزان تغییرات را به خود اختصاص داد در مقابل LCUL_evglLocus_61876 با تغییر بیان معادل ۰/۶۴- و Log2FC کمترین میزان را نشان داد.

با مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با سایر مطالعات می‌توان به این نتیجه دست پیدا کرد که مراحل مختلف رشد گیاه، گونه و نوع بافت می‌تواند تأثیر متفاوتی در میزان بیان lncRNA داشته باشد. lncRNAها با تأثیر در مکانیسم‌های مولکولی پیچیده و مسیرهای متابولیتی همچون متابولیسم فیتوهورمون، ساکارز و نشاسته می‌توانند در سازگاری گیاهان با محیط‌های چالش‌برانگیز نقش داشته و به گیاه برای تحمل تنش‌های غیرزیستی مختلف از جمله تنش خشکی کمک کند.

به‌طور کلی در مطالعه حاضر برای اولین بار به شناسایی و تعیین نقش lncRNAها در گیاه عدس تحت شرایط تنش خشکی با استفاده از فناوری توالی‌یابی RNA پرداخته شد. در مجموع طی این مطالعه، ۳۵۹۰ lncRNA در عدس شناسایی شد. تعداد زیادی از lncRNAها با ژن‌های مرتبط با تنظیم ریتم شبانه‌روزی، پاسخ به یون روی، واکنش نوری فتوسنتزی و هموستازی یون سلولی هم‌بیان بودند. یافته‌های ما نشان داد که lncRNAهای 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 می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای برای تحقیقات آتی lncRNA باشد و گامی در جهت بینش بهتر در مورد عملکرد lncRNA در توسعه و اصلاح ارقام متحمل به تنش خشکی ارائه دهد. در نهایت می‌توان از ژن‌های مورد بررسی به‌عنوان ژن‌های نامزد در بهبود ژنتیکی تحمل به خشکی در عدس بهره برد.

تغییرات بیان lncRNAهای LCUL_evglLocus_104392 و LCUL_evglLocus_99066 در پاسخ به تنش در نتایج RNA-seq و qRT-PCR روابط مثبتی نشان دادند که این امر نشان دهنده اعتبار داده‌های حاصل از RNA-seq بود. اگرچه lncRNAها پروتئینی را کد نمی‌کنند، اما اغلب می‌توانند مولکول‌های RNA را تولید کنند که نقش‌های عملکردی دارند. lncRNAها بیان ژن را در حالت سیس یا ترانس در هسته کنترل می‌کنند (Urquiaga et al., 2020). cis-Acting lncRNAها و trans-acting به ترتیب بیان ژن را در مکان‌های نزدیک و دور تنظیم می‌کنند. با وجود اینکه هیچ پایگاه داده‌ای با حاشیه‌نویسی مستقیم برای lncRNAها وجود ندارد، اما آن‌ها اغلب با ژن‌های کد کننده پروتئین هدف خود بیان می‌شوند؛ عملکردهای بیولوژیکی فرضی lncRNAها اغلب با انجام هم‌بیان و مکان‌یابی و با تجزیه و تحلیل عملکردی ژن‌های هدف آن‌ها حدس زده می‌شود. در مطالعه‌ای بر روی گیاه گوجه‌فرنگی تحت شرایط تنش خشکی به ساختارهای تولیدمثلی پرداخته شد که نتایج حاصل از این مطالعه ضمن تأیید نقش lncRNAها در تنظیم بیان ژن‌ها در طول دوره رشد، تولیدمثل و پاسخ به شرایط تنش در این مرحله را تأیید می‌کند. در این مطالعه، ۲۸۱۷ lncRNA به‌طور خاص در بافت بساک بیان شدند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که ۸۹/۴ درصد از lncRNAهای بیان شده در این مطالعه هم‌به‌عنوان lncRNAهای سیس و هم ترانس عمل می‌کنند که بر پیچیدگی عملکرد مولکولی lncRNAها می‌افزاید و تفاوت بیان در lncRNA در زمان تنش می‌تواند 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., Albeshar, N. and Xiong, 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 stress-responsive 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_evglLocus_104392, LCUL_evglLocus_99066 and LCUL_evglLocus_61876 sequences were differentially expressed in response to drought stress. Examining the co-expression of these sequences with 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

* Corresponding Author, E-mail: ismaili.a@lu.ac.ir