Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Co-expression network analysis of mRNA-lncRNA in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under salt stress

Setareh Mirzavand

Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail: mirzavandsetareh@gmail.com

Ahmad Ismaili

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail: ismaili.a@lu.ac.ir

Seyed Sajad Sohrabi

Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail: sohrabi.s@lu.ac.ir

Abstract

Objective

Salinity stress, as one of the most important environmental stresses, has a widespread negative impact on the growth, productivity, and overall yield of most crops, including common bean (*Phaseolus vulgaris*). However, plants respond to salinity through a wide range of molecular mechanisms, including the regulation of gene expression at multiple levels. Although the mode of action and molecular characteristics of long non-coding RNAs (lncRNAs) remain unknown in many plant species, their role as one of the most influential genetic factors in regulating gene expression in response to various abiotic stresses has been well established. In the present study, lncRNAs were identified in common bean, and an mRNA–lncRNA co-expression network was constructed to investigate the potential regulatory roles of these elements in the salinity stress response.

Materials and methods

RNA-seq data from common bean under salinity stress were used to identify lncRNAs and perform bioinformatic analyses of the co-expression network. After data processing and mapping of clean reads to the bean genome, unmapped reads were used for lncRNA identification. In addition, the relative expression changes of selected identified sequences were validated by qRT-PCR. Salinity stress (150 mM) was applied to bean seedlings at the first trifoliate stage in two

groups (control and stress-treated), and leaf samples were collected 72 hours after stress application.

Results

A total of 2,640 sequences were identified as lncRNAs in bean leaves under salinity stress, of which 195 were recorded in three plant lncRNA databases. Among them, three lncRNAs showed significant differential expression. Co-expression network analysis revealed that these lncRNAs were co-expressed with 581 genes, with nine genes being direct targets. Functional analysis of these genes confirmed their roles in pathways such as flavonoid biosynthesis, ribosome, lipid metabolism, and photosynthesis.

Conclusions

Overall, this study is the first report on the identification of lncRNAs in common bean under salinity stress. The findings contribute to a deeper understanding of regulatory mechanisms associated with salinity tolerance in common bean and provide new insights for future research in this field.

Keywords: gene expression, non-coding sequences, regulatory sequence, stress-responsive genes

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mirzavand, S., Ismaili, A., & Sohrabi, S.S. (2025). Co-expression network analysis of mRNA-lncRNA in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under salt stress. *Agricultural Biotechnology Journal,* 17(4), 99-122.

Agricultural Biotechnology Journal, 17(4), 99-122. DOI: 10.22103/jab.2025.25045.1683

Received: June 23, 2025. Received in revised form: September 03, 2025.

Accepted: September 04, 2025. Published online: November 30, 2025.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

Introduction

Due to climate change, plants frequently encounter biotic and abiotic stresses such as salinity, which is one of the most significant limiting factors for crop growth and productivity. Salinity stress, as a major environmental challenge, widely affects the growth, productivity, and overall yield of many crops, including common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), through the accumulation of Na^+ and Cl^- ions, causing toxicity, nutrient deficiency, and reduced photosynthesis. However, plants respond to salinity stress by employing a broad range of molecular mechanisms, including the regulation of gene expression at various levels. Gene expression regulation is influenced by

epigenetic mechanisms such as DNA methylation, histone modifications, and non-coding RNAs, particularly long non-coding RNAs (lncRNAs). lncRNAs, which are transcripts longer than 200 nucleotides and lack protein-coding potential, play crucial roles in regulating stress-responsive genes. These molecules are categorized based on their genomic location into intergenic, intronic, and antisense lncRNAs and were historically considered "transcriptional noise." Although the molecular mechanisms and characteristics of plant lncRNAs remain largely unknown, their role as effective genetic regulators in gene expression responses to various abiotic stresses has been demonstrated. In this study, lncRNAs were identified in common bean, and an mRNA–lncRNA co-expression network was constructed to investigate the potential regulatory roles of these elements in response to salinity stress.

Materials and methods

RNA sequencing data from common bean under salinity stress were used for lncRNA identification and subsequent bioinformatic co-expression network analyses. Low-quality, short, or adapter-containing reads were removed, and cleaned data were mapped to the PhaVulg1_0 reference genome with a minimum of 90% identity and 50% overlap. After processing and mapping, unmapped reads were used to identify lncRNAs. Initial filtering included CPM > 1 and transcript length > 200 nucleotides. Coding potential was evaluated using CPC2, and tRNA and rRNA sequences were excluded using tRNAscan-SE and Barrnap. Further stringent identification was performed with the PLncPRO package, and sequences homologous to known proteins or RNAs were filtered out via BLASTx/n against NR, Pfam, UniProt, and Rfam databases. Sequence conservation was assessed with GreeNC, CANTATAdb, lncRNAdb, and PLncDB databases. Target genes were predicted using LncTar, and functional enrichment and metabolic pathway analysis were performed with g:Profiler. Differential expression of genes and lncRNAs were identified using DESeq2 (FDR < 0.01, $|\log2FC| \geq 1$). The mRNA–lncRNA co-expression network was constructed with the psych package in R and visualized by Cytoscape. For experimental validation, common bean seeds were grown in a research greenhouse. Salinity stress (150 mM NaCl) was applied to three-leaf-stage seedlings in control and treatment groups, and leaf samples were collected 72 hours post-treatment. RNA was extracted using the Dena Zist kit, quality was confirmed, and cDNA synthesized using the Pars Toos kit. Relative expression changes of selected sequences were quantified by qRT-PCR using primers designed with AlleleID and ACT11 as an internal control. Reactions were performed with SYBR Green Real-time PCR (Pars Toos, Iran), and relative expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Results

Out of 193,403 initial transcripts, a total of 2,640 lncRNA sequences were identified in the leaves of common bean under salinity stress. Among these, 518 sequences were registered in similar plant databases, and 195 were found in all three plant lncRNA databases, of which three lncRNAs showed significant differential expression. Co-expression network analysis revealed that a total of 581 differentially expressed genes (DEGs) were co-expressed with the three selected lncRNA sequences. Additionally, nine genes were identified as direct targets of the three lncRNAs. Functional annotation of these genes confirmed their involvement in pathways such as flavonoid biosynthesis, ribosome function, lipid metabolism, and photosynthesis. qRT-PCR results validated the expression patterns of lncRNAs and target genes, confirming the accuracy of bioinformatics analyses. These findings highlight the critical regulatory roles of lncRNAs in common bean response to salinity stress.

Conclusions

Salinity stress exerts extensive effects on the growth and metabolism of common bean, leading to significant alterations in gene expression. Our findings demonstrate that lncRNAs play a crucial role in regulating the molecular response to salinity stress. Key pathways, including flavonoid biosynthesis and photosynthesis, are activated in response to salinity, consistent with reports from other plant species. Additionally, lipid metabolism and ABA signaling pathways contribute to salt tolerance, significantly enhancing the plant's adaptive mechanisms. Target genes such as LEA proteins and PYR1, involved in cellular protection and stress signal transduction, are of high importance. These results suggest that lncRNAs could serve as promising targets for molecular breeding aimed at developing salt-resistant cultivars that can thrive under harsh environmental conditions. Future studies may further elucidate the precise roles and regulatory mechanisms of these lncRNAs, providing deeper insights into plant stress biology. This foundational knowledge supports the development of molecular breeding strategies and enhances the potential to improve abiotic stress tolerance in crop plants, especially in regions affected by soil salinity. Overall, this study is the first comprehensive report on the identification of lncRNAs in common bean under salinity stress. The findings contribute to a deeper understanding of regulatory mechanisms associated with salinity tolerance in common bean and provide new insights for future research in this important field. By integrating large-scale transcriptomic data with network analysis and experimental validation, the study offers a comprehensive framework for exploring the functional roles of lncRNAs in legume stress responses and paves the way for innovative approaches to improve agricultural productivity.

Author Contributions

Investigation, data analysis, data interpretation, and manuscript drafting: Setareh Mirzavand; Conceptualization, supervision and manuscript revision: Ahmad Ismaili; Consultation, data analysis and manuscript revision: Seyed Sajad Sohrabi. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Data Availability Statement

The data supporting the findings of this study are openly available in the NCBI database, SRA section, with accession number GSE156113.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Faculty of Agriculture at Lorestan University for providing essential laboratory and greenhouse facilities.

Ethical Considerations

This investigation did not involve human or animal subjects; thus, ethical approval was not needed. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was funded by Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

تجزیه و تحلیل شبکه هم بیانی mRNA- lncRNA در لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش شوری

ستاره میرزاوند

دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران. رایانامه: mirzavandsetareh@gmail.com

احمد اسماعیلی

*نویسنده مسئول: استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران. رایانامه: ismaili.a@lu.ac.ir

سید سجاد سهرابی

استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران. رایانامه: sohrabi.s@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۰۲ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۳

چکیده

هدف: تنش شوری به عنوان یکی از مهمترین تنش‌های محیطی، به‌طور گسترده بر رشد و بهره‌وری و در مجموع بر عملکرد اغلب محصولات زراعی از جمله لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) تأثیر منفی دارد. با این حال، گیاهان با استفاده از طیف وسیعی از مکانیسم‌های مولکولی، از جمله تنظیم بیان ژن‌ها در سطوح مختلف به تنش شوری پاسخ می‌دهند. هر چند مکانیسم عمل و خصوصیات مولکولی RNAهای بلند غیرکدکننده (lncRNAs) در بسیاری از گیاهان ناشناخته باقی مانده است؛ با این حال نقش این عناصر به عنوان یکی از مؤثرترین عوامل ژنتیکی در تنظیم بیان ژن‌ها در پاسخ به انواع مختلفی از تنش‌های غیرزیستی اثبات شده است. در پژوهش حاضر با شناسایی LncRNAها در گیاه لوبیا و ترسیم شبکه هم بیانی LncRNA–mRNA به بررسی نقش احتمالی این عناصر تنظیمی در پاسخ به تنش شوری پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA گیاه لوبیا تحت تنش شوری برای شناسایی lncRNAها و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی مربوط به شبکه هم‌بیانی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از پردازش داده‌ها و نقشه‌یابی خوانش‌های تمیز شده علیه ژنوم لوبیا از خوانش‌های نقشه‌یابی نشده برای شناسایی lncRNA استفاده شد. علاوه بر این تغییرات بیان نسبی برخی از

توالی‌های شناسایی شده نیز از طریق واکنش qRT-PCR سنجش شد. برای اعمال تنش شوری از گیاهچه‌های سه‌برگی در دو گروه شاهد و تیمار تنش شوری (۱۵۰ میلی مولار) استفاده شد و نمونه‌برداری از برگ گیاهان ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش صورت گرفت.

نتایج: در مجموع ۲۶۴۰ توالی به‌عنوان lncRNA در برگ لوبیا تحت تنش شوری شناسایی شد که ۱۹۵ مورد از آن‌ها در سه پایگاه lncRNA گیاهی ثبت شده بودند. از میان آن‌ها سه lncRNA دارای بیان افتراقی معنی‌دار بودند. تحلیل شبکه هم‌بیانی نشان داد که این lncRNAها با ۵۸۱ ژن هم‌بیان بوده و ۹ ژن به‌طور مستقیم هدف آن‌ها بودند. بررسی عملکردی این ژن‌ها نقش آن‌ها را در مسیرهایی چون بیوسنتز فلاونوئیدها، ریبوزوم، لیپید و فتوسنتز تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی پژوهش حاضر اولین گزارش از شناسایی lncRNAها در لوبیا تحت تنش شوری محسوب می‌شود. این پژوهش به درک عمیق‌تری از مکانیسم‌های تنظیمی مرتبط با تحمل شوری در گیاه لوبیا کمک می‌کند و دیدگاه‌های جدیدی برای تحقیقات آینده در این حوزه فراهم می‌آورد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، توالی تنظیمی، توالی‌های غیر کد کننده، ژن‌های پاسخگو به تنش

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: میرزاوند ستاره، اسماعیلی احمد، سهرابی سید سجاد (۱۴۰۴) تجزیه و تحلیل شبکه هم بیانی mRNA- lncRNA در لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش شوری. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۴)، ۹۹-۱۲۲.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

مقدمه

امروزه با توجه به تغییرات اقلیم جهانی، گیاهان به‌طور مکرر با تهدیدات مختلفی به شکل تنش‌های زیستی (باکتریایی، قارچی و سایر عوامل بیماری‌زا) و غیرزیستی (شوری، درجه حرارت بالا و پایین، خشکسالی طولانی‌مدت یا سیلاب، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین، کمبود مواد مغذی و غیره) مواجه می‌شوند (Sandalio, 2022). شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که بر بهره‌وری کشاورزی در مقیاس جهانی تأثیر منفی می‌گذارد و هر ساله منجربه از دست رفتن ۱/۵ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی می‌شود (Garcia et al., 2019). خاک شور به‌طور کلی به خاکی گفته می‌شود که در آن رسانایی الکتریکی (EC) عصاره اشباع (ECe) در ناحیه ریشه بیش از ۴ دسی‌زیمنس بر متر (تقریباً ۴۰ میلی‌مولار NaCl) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد باشد (Shrivastava & Kumar, 2015). در تنش شوری، یون‌های Na^+ و Cl^- در سلول‌های گیاهی تجمع می‌یابند که این امر باعث ایجاد سمیت در گیاهان می‌شود و جذب عناصر را کاهش می‌دهد (El-Beltagi et al., 2023). شوری

همچنین باعث کمبود یا عدم تعادل مواد مغذی از طریق رقابت بین یون‌های Na^+ و Cl^-با یون‌های مهمی مانند K^+، Ca^{2+} و NO^3 می‌شود (Wekesa et al., 2022). این تنش محیطی تقریباً بر تمام جنبه‌های رشد گیاه از جمله جوانه‌زنی، رشد رویشی و زایشی تأثیر می‌گذارد. همچنین شوری از طریق کاهش سطح برگ، محتوای کلروفیل، محتوای کربوهیدرات و پروتئین، هدایت روزنه‌ای و به میزان کمتری با کاهش کارایی فتوسیستم II بر فتوسنتز تأثیر منفی می‌گذارد (Netondo et al., 2004). علاوه‌بر این، شوری از طریق تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) می‌تواند در گیاهان تنش ثانویه (اسمزی و یونی) ایجاد کند (Huang et al., 2019). با این حال، گیاهان با ایجاد مکانیسم‌های مختلف برای بقا و به حداقل رساندن آسیب‌های تنش شوری به آن پاسخ می‌دهند (Raza et al., 2023). پاسخ گیاهان به تنش شوری با سنجش میزان Na^+ و سپس القاء پیام‌رسانی اولیه آغاز می‌شود که به‌طور متوالی ورود یون Na^+، سطوح بیان چندین ژن پاسخ‌دهنده به شوری و عوامل رونویسی (TFs) را کاهش می‌دهد (Van Zelm et al., 2020). پیش‌تر ثابت شده است که ژن‌های کدکننده پروتئین (PCGs) بازیگران مهمی در مسیرهای مختلف پاسخ به تنش شوری هستند. اپی‌ژنوم که شامل مکانیسم‌های مختلفی مانند متیلاسیون DNA، بازسازی کروماتین، تغییرات دم هیستون، میکروRNAها و RNAهای غیرکدکننده بلند است، با عوامل محیطی نظیر تغذیه، عوامل بیماری‌زا و آب‌وهوا تعامل می‌کند تا پروفایل‌های بیان ژن و ظهور فنوتیپ‌های خاص را تحت تأثیر قرار دهد (Mohammadabadi et al., 2023). این تعاملات پیچیده هستند و در سطوح متعددی رخ می‌دهند، شامل گفت‌وگوی پویا بین ژنوم، اپی‌ژنوم و محرک‌های محیطی (Amiri Roudbar et al., 2020) شواهد رو به افزایش نشان می‌دهد که تنوع اپی‌ژنومی نقش مهمی در تعیین نتایج سلامتی و ویژگی‌های تولیدی ایفا می‌کند (Alavi et al., 2022) بیان ژن‌های یوکاریوتی به‌صورت زمانی و مکانی از طریق مکانیسم‌های کنترلی چندبعدی تنظیم می‌شود (Hajalizadeh et al., 2021). تنها زیرمجموعه محدودی از کل ژنوم در هر نوع بافت به‌صورت فعال بیان می‌شود و بیان ژن به مراحل رشد وابسته است (Heidarpour et al., 2011). در نتیجه، الگوهای بیان ژن در یوکاریوت‌ها مختص بافت هستند (Mohammadabadi et al., 2024). علاوه بر این، سطوح محصولات ژنی سنتز شده در یک بافت معین، و همچنین آن‌هایی که توسط بافت‌های دیگر تأمین می‌شوند، به‌طور جمعی بیان ژن را تنظیم می‌کنند (Mohammadabadi & Asadollahpour Nanaei, 2021). تغییرات اپی‌ژنتیکی به‌عنوان مکانیسمی حیاتی عمل می‌کنند که از طریق آن عوامل محیطی اثری ماندگار بر ژنوم به جا می‌گذارند (Mohammadabadi et al., 2022). این تغییرات می‌توانند ارثی باشند و بر نسل‌های بعدی بدون تغییر در توالی DNA تأثیر بگذارند (Mohammadabadi et al., 2025). یکی از جنبه‌های اساسی تحقیقات ژنتیکی شامل بررسی ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با ویژگی‌های خاص است که در سطوح سلولی و کروموزومی بررسی می‌شوند (Khabiri et al., 2023). پیشرفت در درک این فرآیندهای تنظیمی پتانسیل قابل‌توجهی برای بهبود بینش‌های بیولوژیکی و کاربردهای عملی در سلامت و تولید دارد (Arabpour et al., 2021). برخی مطالعات نقش حیاتی RNAهای غیر کدکننده (ncRNAs) در پاسخ به تنش‌های محیطی را اثبات کرده‌اند (Das et al., 2023). lncRNA (RNAهای بلند غیر کدکننده) یکی از مهم ترین عناصر ژنتیکی متعلق به

گروه RNAهای غیر کدکننده به شمار می‌روند که نقش آن‌ها در تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌گو به انواع مختلف تنش‌های زیستی و غیرزیستی اثبات شده است (Chand Jha et al., 2021). lncRNAها، مولکول‌های RNA با طولی بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که توانایی کدگذاری پروتئین و چارچوب خوانش‌باز (ORF) را ندارند (Liu et al., 2015). این گروه از عناصر ژنتیکی عمدتاً بر اساس منشاء ژنومی و مکانیسم عمل طبقه‌بندی می‌شوند (Hou et al., 2019). نسل جدید فناوری‌های توالی‌یابی (Next generation sequencing: NGS) این امکان را فراهم آورده تا این عناصر ژنتیکی مهم در موجودات مختلف از جمله گیاهان با سرعت بیشتری شناسایی شوند. با این حال، در زمینه توزیع فراوانی این عناصر ژنتیکی مهم در ژنوم گیاهان مختلف از جمله آرابیدوپسیس، کلزا، سیب‌زمینی، ذرت، گوجه فرنگی و برنج گزارش‌های متفاوتی وجود دارد (Sanchita et al., 2020). هر چند این گروه از عناصر تنظیمی از نظر مکانیسم عمل چندان شناخته نشده‌اند، با این حال بر اساس مکان‌ژنی، این گروه از توالی‌های غیرکدکننده را می‌توان در سه گروه بین‌ژنی، اینترونی و آنتی‌سنس دسته‌بندی نمود (Ma et al., 2013). در ابتدا تصور می‌شد که lncRNAها اهمیت عملکردی کمی در ژنوم‌های یوکاریوتی دارند، بنابراین به‌عنوان "نویز رونویسی" یا "junk regions" نامیده می‌شدند (Samarfard et al., 2022). با این حال امروزه مشخص شده است که این عناصر با تنظیم بیان ژن‌ها، نقش مؤثری در رشد گیاه و پاسخ به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند (Di Marsico et al., 2022). در مطالعات مختلف نقش این عناصر تنظیمی در تنظیم ژن‌های پاسخ‌گو به تنش شوری در گیاهان مختلف از جمله نخود (Kumar et al., 2021)، یونجه بخارا (*Melilotus albus*) (Zong et al., 2021)، پنبه (Deng et al., 2018) و ذرت (Liu et al., 2022) به اثبات رسیده است.

لوبیا معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) از گونه مهم جنس *Phaseolus* است که با توجه به اینکه منبع غنی از لیزین، لوسین و همچنین اسید آمینه‌های غیرضروری گلوتامیک اسید، آرژنین و پرولین است، نقش مهمی در رژیم غذایی میلیون‌ها نفر در سراسر جهان دارد (Wekesa et al., 2022). علاوه‌بر این لوبیای معمولی، مانند سایر حبوبات می‌تواند نقش حفاظتی مهمی در پیشگیری و درمان بیماری‌های وابسته به رژیم غذایی داشته باشد (Carbas et al., 2020). با این حال، لوبیا به شدت به شوری حساس است (El-Beltagi et al., 2023) و در شوری خاک بیشتر از $۲dSm^{-1}$ محتمل افت عملکرد شدید می‌باشد (Wekesa et al., 2022). با وجود مطالعات انجام شده در گونه‌های دیگر، تاکنون هیچ مطالعه‌ای درباره تأثیر تنش شوری بر lncRNAها در گیاه لوبیا معمولی گزارش نشده است. از این رو در مطالعه حاضر، پس از شناسایی lncRNAها در لوبیا به بررسی نقش آن‌ها در مکانیسم پاسخ به تنش شوری می‌پردازیم. همچنین یافته‌های این پژوهش شواهد جدیدی را برای مکانیسم احتمالی تحمل شوری در گیاه لوبیا از منظر شبکه هم‌بیانی mRNA-lncRNA ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و ویرایش داده‌ها و سرهم‌بندی ترنسکریپتوم برگ لوبیا: داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA گیاه لوبیا تحت تنش شوری و شاهد با شماره دسترسی GSE156113 از پایگاه داده NCBI بخش SRA دانلود شدند. برای بررسی کیفیت داده‌های خام، از ابزار *quality control* در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (۲۰ نسخه) استفاده شد. شاخص‌های کیفیت نظیر نمره Phred، میزان محتوای GC، حضور توالی‌های آداپتور و طول خوانش‌ها بررسی گردید. در مرحله پیش‌پردازش، خوانش‌های با کیفیت پایین (Phred score < 30)، خوانش‌های بسیار کوتاه (کمتر از ۵۰ نوکلئوتید) و توالی‌های دارای آداپتور یا محتوای نامناسب با استفاده از تنظیمات پیش‌فرض نرم‌افزار حذف شدند. در ادامه، خوانش‌های پاک‌سازی‌شده با استفاده از همان نرم‌افزار به ژنوم مرجع لوبیا (*PhaVulg1_0*) نقشه‌یابی شدند. در این مرحله، پارامترهای نقشه‌یابی شامل درصد تطابق حداقل ۹۰ درصد و حداقل طول تطابق۵۰ درصد در نظر گرفته شد. برخی از رونوشت‌ها ممکن است در ژنوم مرجع حاشیه‌نویسی (annotated) نشده باشند یا به دلایل فنی مثل جهش‌ها، نواحی پیچیده یا ساختارهای خاص (RNA) نتوانند به خوبی مپ شوند. بنابراین خوانش‌های unmapped می‌توانند شامل اطلاعاتی از lncRNAها، ایزوفرم‌های جدید یا ژن‌های ناشناخته باشند که فقط از طریق سرهم‌بندی *de novo* قابل شناسایی‌اند. از خوانش‌های نقشه‌یابی نشده به منظور شناسایی ترنسکریپت‌های جدید و احتمالی از جمله lncRNAها که در ژنوم مرجع به درستی ثبت نشده‌اند، استفاده شده است (Conesa et al., 2016).

شناسایی lncRNAها: نخستین پالایه‌های اعمال شده به‌منظور شناسایی توالی lncRNAها در نظر گرفتن حد آستانه تعداد رونوشت در میلیون (Counts per million; CPM) بیشتر از ۱ و طول توالی بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید بود. با استفاده از ابزار تحت وب CPC2 (http://cpc2.cbi.pku.edu.cn) پتانسیل کدگذاری lncRNAهای پیش‌بینی شده مورد ارزیابی قرار گرفت (Kang et al., 2017). به‌منظور حذف tRNAها و rRNAها از ابزار tRNAscan-SE (نسخه ۲) و Barrnap (نسخه ۹) استفاده شد (Lowe & Chan, 2016). به‌منظور شناسایی دقیق‌تر lncRNAها 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 (Singh et al., 2017). علاوه‌بر این، جستجو با استفاده از ابزار BLASTx برای پایگاه‌های داده پروتئینی (UniProt، Pfam، NR) و ابزار BLASTn برای پایگاه‌های RNA مانند (Rfam) به منظور حذف توالی‌های دارای پتانسیل کدگذاری یا مشابهت با RNAهای ساختاری انجام شد. حفاظت‌شدگی توالی‌های شناسایی شده، با بلاست علیه مجموعه lncRNAهای گیاهی موجود در پایگاه‌های GreeNC (Paytuví Gallart et al., 2016)، CANTATAdb v2.0 (نسخه ۲) (Szcześniak et al., 2019) lncRNAdb v2.0 (نسخه ۲) (Quek et al., 2015) و PLncDB (نسخه ۲) (Jin et al., 2021) مورد ارزیابی نهایی قرار گرفت.

پیش‌بینی، مستندسازی عملکردی و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن‌های هدف: در این مطالعه، برای شناسایی ژن‌های هدف lncRNA از ابزار LncTar استفاده شد (Li et al., 2015). برای این منظور، ژن‌های و lncRNA به‌عنوان ورودی به LncTar معرفی شدند و با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض ژن‌های هدف ترانس شناسایی شدند. به‌منظور هستی شناسی (Gene Ontology) و تعیین مسیرهای متابولیکی (KEGG) که ژن‌های هدف در آن درگیر می‌باشند از ابزار تحت وب g:Profiler (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler) استفاده شد.

شناسایی ژن‌ها و lncRNAها با بیان افتراقی: برای تجزیه و تحلیل بیان و شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی (Differentially Expressed Genes: DEGs) و همچنین lncRNAهای با بیان افتراقی (DE-lncRNA) از نرم‌افزار DESeq2 (Love et al., 2014) با در نظر گرفتن حدود آستانه FDR <0.01، |log2 (FC)| ≥ 1 و CPM ≥ 1 استفاده شد.

ترسیم شبکه هم‌بیانی lncRNA-mRNA: به‌منظور بررسی شبکه هم‌بیانی mRNA و lncRNAهای منتخب، از بسته نرم‌افزاری psych در محیط R استفاده شد (Revelle & 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 ابزار تحت وب g:Profiler (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost) استفاده شد (Chin et al., 2014).

مواد گیاهی و اعمال تنش شوری: پس از تهیه بذور از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، رقم مورد استفاده دارای شماره دستیابی IBRC P1012285 از گونه *Phaseolus vulgaris* L. و متعلق به استان گیلان بوده است. بذور مستقیماً در گلدان‌های (۱۲ × ۱۴ سانتی‌متر) پرشده با ماسه (شسته شده) و پرلیت استریل شده به نسبت مساوی (۱:۱، حجم/ حجم) در محل گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان کاشته شدند. بذور کشت شده در شرایط گلخانه با متوسط دمای روزانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شرایط نوری طبیعی ۱۲/۱۲ ساعت و رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار گرفتند. چهار روز پس از کشت بذور، جوانه زنی صورت گرفت و گیاهچه‌های کوچک با محلول غذایی هوگلند (pH 5.9) به‌صورت روزانه آبیاری (۴۰ میلی‌لیتر برای هر گلدان) شدند. ده روز پس از جوانه زنی (مرحله سه‌برگی) گلدان‌ها به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم شدند. در هر گروه سه تکرار و در هر تکرار ۵ گلدان وجود داشت. به‌منظور جلوگیری از شوک اسمزی، سطح سدیم کلرید به‌تدریج و به میزان روزانه ۵۰ میلی‌مولار تا رسیدن به غلظت نهایی۱۵۰ میلی مولار افزایش داده شد. ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار شوری نمونه‌برداری از برگ گیاهان تیمار و شاهد انجام شد. بافت برگ گیاهان تحت تنش و شاهد برداشت و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و سپس تا زمان استخراج RNA در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: به‌منظور استخراج RNA کل از بافت‌های نمونه‌برداری شده از کیت استخراج RNA (شرکت دنا زیست آسیا) استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانودراپ (Eppendorf

BioPhotometer D30) سنجش شد. همچنین یکپارچگی RNA با استفاده از الکتروفروز ژل (یک درصد) مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأیید کیفیت RNA استخراجی و تیمار با آنزیم DNase I به‌منظور سنتز cDNA از کیت استاندارد سنتز cDNA (Easy cDNA Synthesis Kit، شرکت پارس توس زیست فن‌آور) استفاده شد.

واکنش qRT_PCR: به‌منظور اعتبارسنجی بیان توالی‌های شناسایی شده از واکنش qRT_PCR استفاده شد. بدین منظور آغازگرهایی برای توالی‌های منتخب با استفاده از نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶) طراحی شد و همچنین به‌منظور نرمال‌سازی داده‌های بیان از ژن اکتین (ACT11) به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد (جدول ۱). واکنش qRT-PCR با سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی انجام شد. واکنش با استفاده از کیت Real-time PCR SYBR Green (شرکت پارس توس، ایران) انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر آب، ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از جفت آغازگرها، ۲ میکرولیتر نمونه cDNA، و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. چرخه دمایی و زمانی واکنش شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۱۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل: واسرشته‌سازی ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه، اتصال ۳۰ ثانیه در دمای اتصال برای هر جفت‌آغازگر (جدول ۱) و طویل‌سازی ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه بود. کارایی واکنش با استفاده از نرم افزار LinReg و داده های حال از بیان ژن‌ها بررسی شد و اطمینان حاصل گردید که در محدوده قابل قبول (۹۰–۱۱۰٪) قرار دارد. تجزیه و تحلیل بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد (Livak & Schmittgen, 2001).

جدول ۱. خصوصیات آغازگرهای استفاده شده برای واکنش qRT-PCR

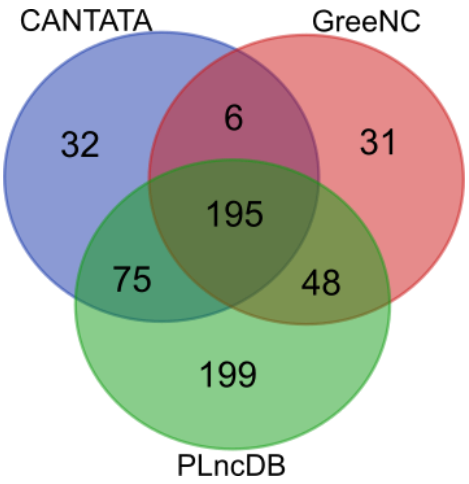
Table 1. Characteristics of the primers used for qRT-PCR reaction

نام توالی Sequence ID	توالی رفت آغازگر Forward primer sequence (5`-3`)	توالی برگشت آغازگر Reverse primer sequence (5`-3`)	دمای اتصال Annealing temperature (°C)	اندازه محصول Product size (bp)
L_LNCRNA 1	ATGATAGTAGTATG GCGTAGG	AAACCACCACCAACT TCC	55.3	186
L_LNCRNA 2	CCACACACCGCCAA CACCTATAC	TCTTTGGGTCAGGAGG AGGGAAC	55.6	94
L_LNCRNA 3	CCCAAGCACCCATA CACG	GACTGGAGGAGGAGG AGAG	55.5	102
PHAVU_008 G011000g: ACT11	TGCATACGTTGGTG ATGAGG	AGCCTTGGGGTTAAG AGGAG	53.5	190

نتایج و بحث

پس از پالایش اولیه از مجموع ۱۹۳۴۰۳رونوشت به‌دست آمده، ۳۷۲۸۲ توالی به عنوان lncRNA بالقوه شناخته شدند. پس از اســتفاده از نرم‌افزار PLncPRO و BLASTx این توالی‌ها در مقابل پایگاه‌های NR، UniProt، Pfam و Rfam تعداد lncRNAها به ۲۶۴۰ مورد تقلیل یافت. برای اطمینان بیشــتر توالی‌های lncRNA پیش‌بینی شــده با اســتفاده از ۳ پایگاه داده

lncRNA گیاهی (GreeNC، PLncDB و CANTATA) مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج نشان داد ۵۱۸ توالی حداقل در یکی از پایگاه‌های مورد بررسی دارای رکورد مشابهی می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که ۱۹۵ توالی به‌طور مشترک در هر سه پایگاه داده مشترک می‌باشند و سایر توالی‌ها نیز برای اولین‌بار در لوبیا شناسایی شده‌اند. کمینه و بیشینه طول توالی‌های شناسایی شده به‌ترتیب ۳۰۱ و ۷۸۲ نوکلئوتید محاسبه شد. همچنین نتایج بلاست نشان داد که گیاهان خانواده حبوبات در میان برترین گیاهان از نظر میزان شباهت با توالی‌های شناسایی شده بودند، که از میان آن‌ها گیاه ماش (*Vigna radiata*) بیشترین قرابت را با لوبیا نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج بلاست lncRNAهای شناسایی شده در لوبیا تحت تنش شوری علیه پایگاه lncRNA گیاهی مختلف

Figure 1. Results of BLAST analysis of identified lncRNAs in common bean under salt stress against various plant lncRNA databases

بیان افتراقی ژن‌ها و توالی‌های lncRNA شناسایی شده: به‌منظور بررسی بیان ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) و همچنین ارزیابی بیان توالی‌های lncRNA شناسایی شده، نمونه‌های تحت تنش شوری در مقابل نمونه‌های شاهد مقایسه شدند. نتایج نشان داد که ۱۳۰۶ ژن تحت تنش شوری داری افتراق بیان معنی‌داری بودند که از آن میان ۵۷۸ ژن افزایش بیان و ۷۲۸ ژن کاهش بیان نشان دادند. همچنین نتایج بررسی بیان توالی lncRNA شناسایی شده نیز نشان داد که از کل lncRNA شناسایی شده تنها سه توالی دارای بیان افتراقی معنی‌داری بودند. دو توالی تحت عناوین L_ lncRNA1 و L_ lncRNA2 به ترتیب با $Log2_{FC}$= 2.29765 و $Log2_{FC}$= -4.27789 کاهش بیان و توالی L_ lncRNA3 با $Log2_{FC}$= 6.848957 افزایش بیان نشان دادند.

شبکه هم‌بیانی mRNA-lncRNA: نتایج تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی mRNA-lncRNA نشان داد که در مجموع ۵۸۱ ژن (DEGs) با سه توالی lncRNA منتخب هم‌بیان هستند (شکل ۲). علاوه‌بر این نتایج نشان داد که ۹ ژن به‌طور مستقیم

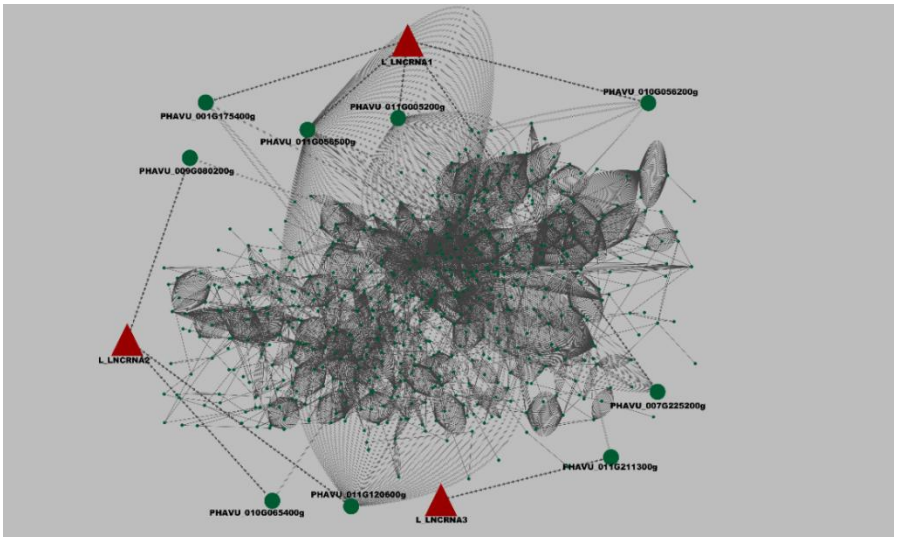
هدف سه توالی شناسایی شده می‌باشند که این انتخاب به‌صورت هدفمند از بین ژن‌های هم‌بیان انجام شده است (جدول ۲). با تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی و تعیین مسیرهای متابولیکی برای این مجموعه ژن نشان داد که این گروه از ژن‌ها به‌طور معنی‌داری در مسیرهای متابولیکی شامل بیوژنز ریبوزوم، بیوسنتز فلاونوئید، بیوسنتز تری‌ترپنوئید و سسکویی‌ترپنوئید، بیوسنتز آلکالوئید تروپان، پیپریدین و پیریدین و فرآیند فتوسنتز (شامل پروتئین‌های آنتن یا کمپلکس‌های برداشت‌کننده نور) نقش دارند. تجزیه و تحلیل مستندسازی عملکردی این مجموعه ژن نیز نشان داد که در بخش عملکرد مولکولی فعالیت کاتالیزوری، فعالیت UDP–گلیکوزیل ترانسفراز و فعالیت هگزوزیل ترانسفراز بیشترین نمود را داشته، در بخش فرآیندهای زیستی، باز شدن DNA، فرآیند متابولیک لیپید و فرآیند بیوسنتزی لیپید دارای نقش موثرتری بوده و در نهایت در حوزه جایگاه سلولی کمپلکس MCM، کمپلکس THO و اندامک هسته بیشترین اثر معنی‌دار را از خود نشان‌می‌دهند.

جدول ۲. مشخصات ژن‌های هدف lncRNAهای شناسایی شده در ترنسکریپتوم برگ لوبیا تحت تنش شوری

Table 2. Characteristics of target genes for the identified lncRNAs in the transcriptome of bean leaves under salt stress

بلندغیرکدکننده RNA LncRNA	نام توالی هدف Target name	طول توالی هدف Target Length	نزدیک‌ترین ژن پایین دست ndG	هم‌ساخت با آرابیدوپسیس Ortholog in Arabidopsis	توضیحات Description
L_LNCRNA1	PHAVU_007G225200g	2042	-0.1523	AT3G53040	LEA protein
	PHAVU_010G056200g	2909	-0.1565	N/A	N/A
	PHAVU_011G005200g	1417	-0.1581	AT5G62360	Plant invertase
	PHAVU_011G056500g	6049	-0.1621	AT3G45140	Lipoxygenase 2
	PHAVU_001G175400g	1794	-0.1602	AT2G37100	Protamine P1
L_LNCRNA2	PHAVU_009G080200g	746	-0.3113	N/A	N/A
	PHAVU_010G065400g	620	-0.1568	AT2G38310	PYR1-like 4
	PHAVU_011G120600g	669	-0.2004	N/A	N/A
L_LNCRNA3	PHAVU_011G211300g	2403	-0.275	N/A	N/A

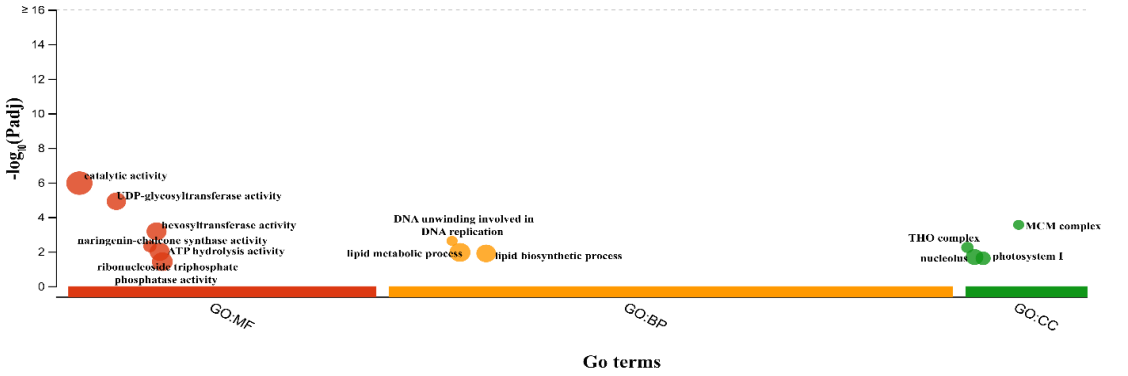
اعتبارسنجی بیانlncRNA های شناسایی شده: سنجش بیان توالی‌های منتخب با استفاده از روش qRT-PCR نشان داد که L_lncRNA3 و L_lncRNA2 به‌ترتیب بیشترین و کم‌ترین میزان بیان نسبی را به خود اختصاص دادند. همچنین مقایسه بیان نسبی این توالی‌ها در دو روش qRT-PCR و RNA-seq نشان داد که روند تغییرات در این دو روش دارای همبستگی ۰/۹۹۷ بود؛ از این رو با توجه به مقایسه صورت گرفته می‌توان صحت بیان نسبی این توالی‌ها را مورد تأیید قرار داد (شکل ۴).



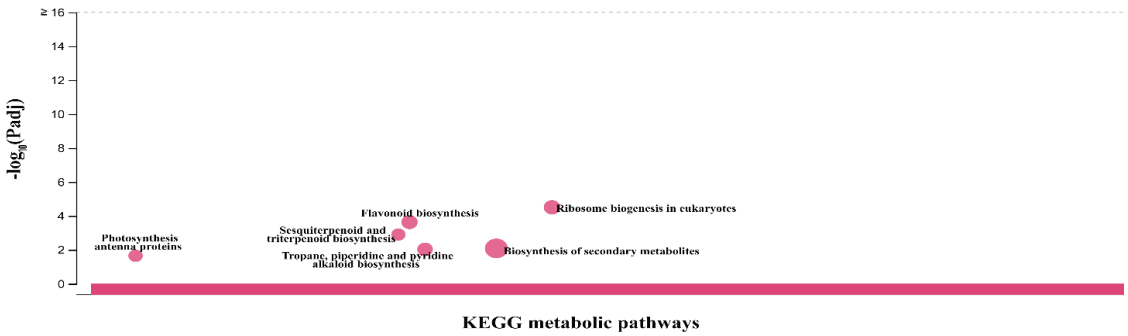
شکل ۲. شبکه هم‌بیانی میان ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) و سه lncRNA منتخب در برگ لوبیا تحت تنش شوری. گره‌های مثلثی قرمز: lncRNAهای منتخب، گره‌های دایره‌ای سبز: ژن‌های هدف (mRNAs)، لبه‌ها: روابط هم‌بیانی معنادار بین ژن‌ها و lncRNA ها بر اساس همبستگی بیان

Figure 2. Co-expression network among differentially expressed genes (DEGs) and three selected lncRNAs in bean leaves under salt stress. Red triangular nodes: selected lncRNAs, Green circular nodes: target genes (mRNAs). Edges: significant co-expression relationships between genes and lncRNAs based on expression correlation

الف(A)

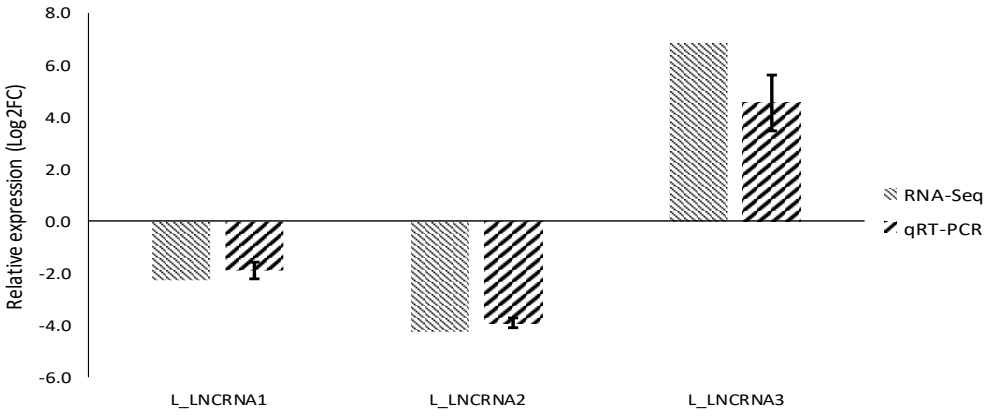


ب(B)



شکل ۳. مستندسازی عملکردی مجموعه ژن‌های mRNA-lncRNA در *Phaseolus vulgaris* تحت تنش شوری. الف) هستی شناسی ژن، ب) مسیرهای متابولیکی

Figure 3. Functional annotation of the mRNA-lncRNA gene set in *Phaseolus vulgaris* under salt stress. A) Gene ontology, B) Metabolic pathways



شکل ٤. مقایسه بیان نسبی lncRNA شناسایی شده در برگ لوبیا تحت تنش شوری با استفاده از دو روش RNA-seq و qRT-PCR

Figure 4. Comparison of the relative expression levels of the identified lncRNAs in bean leaves under salt stress using RNA-seq and qRT-PCR methods

سازوکار تحمل شوری در گیاهان دارای پیچیدگی‌های مولکولی، سلولی، متابولیکی و فیزیولوژیکی است (Hernández, 2019; Parida & Das, 2005). به‌طور کلی تنش شوری از طریق متوقف نمودن رشد برگ، کاهش وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ، عدم جوانه‌زنی یا تاخیر در جوانه‌زنی، کاهش ارتفاع بوته و همچنین اختلال در متابولیسم گیاه منجر به افت شدید عملکرد در گیاهان مختلف می‌شود (El-Beltagi et al., 2023; Van Zelm et al., 2020; Zong et al., 2021). گیاه لوبیا به عنوان یک گیاه حساس به تنش شوری، دارای چندین مکانیسم پیچیده برای درک این عامل آسیب‌رسان محیطی است که شامل ایجاد مسیرهای پیام‌رسانی مناسب و پاسخ مناسب با برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌های متعدد در سطح رونویسی، پس از رونویسی، و اپی‌ژنتیک می‌باشد (Zong et al., 2021). همراه با ابداع روش‌های توالی‌یابی نسل جدید و پیشرفت در فناوری‌های اُمیکس، برنامه‌های به‌نژادی گیاهان با هدف تولید ارقام متحمل به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی نیز دچار تحول شده‌اند (Mahajan et al., 2017; Okay et al., 2024). موفقیت روش‌های نوین به‌نژادی گیاهی مستلزم درک بیشتر و بهتر سازوکار مولکولی تحمل به تنش‌های محیطی است. نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهند که تغییر بیان ژن‌ها می‌توانند اطلاعات مفیدی را برای روشن شدن مکانیسم‌های پیچیده مولکولی و ژنتیکی دخیل در واکنش تحمل به شوری ارائه دهند (Niron et al., 2020; Xi Sun et al., 2020; Yu et al., 2023) . پرواضح است که شناخت عناصر ژنتیکی درگیر در مکانیسم‌های مولکولی از جمله عناصر دخیل در تنظیم بیان ژن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یکی از عناصر ژنتیکی که اخیراً نقش آن در تنظیم بیان ژن‌ها

به‌خصوص در هنگام تنش‌های محیطی برجسته شده است، lncRNAها هستند. lncRNAها کلاس جدیدی از RNAها هستند که توانایی کدگذاری پروتئین را ندارند؛ با این حال، مطالعات متعدد نشان داده‌اند که lncRNAها در تنظیم بیان ژن و حفظ پایایی ژنوم نقش کلیدی ایفا می‌کنند (Gong et al., 2021). نتایج برخی مطالعات نشان داده‌اند که lncRNAها می‌توانند متابولیسم فیزیولوژیکی و همچنین رشد و توسعه گیاهان را از طریق تنظیم تغییرات هیستونی، تغییرات ساختاری اسید نوکلئیک، متیلاسیون و تعاملات RNA–RNA را مدیریت کنند (Jannesar et al., 2024; Mehralizade et al., 2024; X Sun et al., 2020; Yang et al., 2023). نتایج مطالعه‌ای که با هدف شناسایی و پیش‌بینی عملکردی lncRNAها مرتبط با تنش شوری در نخود انجام شده بود منجر به شناسایی ۳۴۵۲ lncRNA جدید شد که از نظر مکانی در تمام کروموزوم‌های نخود توزیع شده بودند (Kumar et al., 2021). علاوه‌بر این گزارش‌های متعددی از شناسایی و تعیین نقش lncRNAها در گیاهان مختلف از جمله اسفناج (Mehralizade et al., 2024)، برنج (Jiang et al., 2024)، یونجه (Yu et al., 2023)، پسته (Jannesar et al., 2024) منتشر شده است؛ اما شناسایی lncRNAها و بررسی نقش آن‌ها در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. این مطالعه اولین گزارش جامع از شناسایی و تحلیل lncRNAها در لوبیا تحت تنش شوری است. مطالعه حاضر منجر به شناسایی ۲۶۴۰ توالی lncRNA در لوبیا شد، که از این میان ۵۱۸ توالی قبلا در سایر گیاهان و مابقی توالی‌ها برای اولین بار در لوبیا شناسایی شدند. بررسی منابع نشان می‌دهد که توزیع و فراوانی lncRNAهای شناسایی شده به روش‌های بیوانفورماتیکی در گیاهان مختلف بسیار متفاوت می‌باشد، هر چند در اغلب موارد تایید آزمایشگاهی برای همه توالی‌های شناسایی شده وجود ندارد. در مطالعه حاضر سه توالی lncRNA تحت عناوین L_lncRNA1، L_lncRNA2 و L_lncRNA3 به‌عنوان lncRNAهای دارای بیان افتراقی شناسایی شدند. مطالعات هستی‌شناسی ژن‌های هم‌بیان با سه lncRNA مذکور نشان داد که lncRNAها و ژن‌های هم‌بیان مربوطه در مسیرهای متابولیکی مهم سلولی از جمله بیوسنتز فلاونوئید و فرآیند فتوسنتز نقش دارند. به‌طور کلی نتایج ما نشان داد مسیرهای «بیوسنتز فلاونوئید» و «فتوسنتز» در پاسخ لوبیا به تنش شوری فعال هستند، با یافته‌های مشابه در گونه‌های دیگر هم‌راستا است. برای نمونه، در یونجه (*Medicago sativa*)، تحلیل‌های ترنسکریپتومی و متابولومیک نشان دادند که ژن‌های کلیدی مسیر فلاونوئید مانند CHS، FLS و DFR تحت تنش شوری به‌طور معناداری افزایش بیان داشتند که منجر به تجمع فلاونوئیدها و بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه شد (Wang et al., 2023)، همچنین در مطالعه‌ای در گیاه توت، مسیرهای بیوسنتز فلاونوئید و بیوسنتز فنیل پروپانوئید به‌عنوان مسیرهای برجسته شناسایی شدند که نقش کلیدی در تحمل شوری را دارند (Wang et al., 2025). در زمینه فتوسنتز، بررسی‌ها نشان داده‌اند که تنش شوری منجر به کاهش بیان ژن‌های مرتبط با فتوسنتز، کاهش کلروفیل و آسیب به ساختار کلروپلاست می‌شود، به‌ویژه از طریق محدودیت‌های استوماتالی و تأثیر بر مسیر انتقال نور؛ این نتایج نیز با گزارش‌هایی در سایر گیاهان زراعی مطابقت دارد؛ برای مثال در گونه *Brassica rapa*، تنش شوری باعث سرکوب مسیر انتقال نور و افت فتوسنتز شد (Jia et al., 2025). علاوه‌بر این، در گیاهانی مانند یونجه و ماش، نتایج نشان می‌دهد که علاوه بر مسیر فلاونوئید و فتوسنتز، مسیرهای دیگری از

جمله متابولیسم لیپید، سیگنال ABA و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD, CAT) نیز در واکنش به شوری دخیل هستند (Bouzroud et al., 2023). در مجموع، بررسی مطالعات اخیر نشان می‌دهد که علاوه‌بر مسیر فلاونوئید و فتوسنتز، مسیرهای دیگری نیز در واکنش به تنش شوری فعال می‌شوند. برای مثال در بررسی جامعی بر روی حبوبات زراعی، مشخص شد مسیرهای مرتبط با متابولیسم لیپیدها، سیگنالینگ ABA و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و CAT نیز در واکنش به شوری اهمیت دارند (Bouzroud et al., 2023). بنابراین یافته‌های حاضر در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، شامل مسیرهای فلاونوئید و فتوسنتز همراه با متابولیسم لیپید، در چارچوب گسترده‌تر پاسخ گیاهان به تنش شوری قابل تبیین هستند و با گزارش‌های اخیر در گونه‌های مختلف تطابق دارند. در طی تکامل و در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی گیاهان از یک سازوکار آنتی‌اکسیدانی پیشرفته برخوردار شده‌اند، به‌طوری که در این فرآیند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (گلوتاتیون پراکسیداز و مالون دی آلدئید) و فلاونوئیدها برای کاهش اثرات سمی رادیکال‌های اکسیژن آزاد (ROSs) تولید می‌شوند (Jan et al., 2021). گزارش شده است که مولکول‌های فلاونوئید با از بین بردن رادیکال‌های آزاد، اثرات تنش اکسیداتیو را کاهش داده و تحمل به تنش شوری را افزایش می‌دهند (Chandran et al., 2019). همچنین بررسی منابع نشان می‌دهد که تنش شوری با تأثیر منفی بر عملکرد و متابولیسم کلروپلاست و آناتومی برگ پیامدهای بسیار مخربی بر فرآیند فتوسنتزی و هدایت روزنه‌ای نشان می‌دهد. از این رو درک عملکرد کلروپلاست و مهندسی مولکولی ژن‌های فتوسنتزی تحت تنش شوری راه را برای توسعه ژرم‌پلاسم متحمل به تنش شوری در گیاهان مختلف از جمله لوبیا هموار می‌سازد (Zahra et al., 2022). با توجه به مکانیسم پیچیده و تعداد زیاد ژن‌های دخیل در تحمل به تنش شوری، مستندسازی عملکردی ژن‌ها و عوامل تنظیمی که تحت تأثیر این شرایط محیطی قرار می‌گیرند به درک بهتر این فرآیند کمک می‌کند. متابولیسم لیپیدها از جمله فرآیندهای زیستی بود که در تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن‌ها در مطالعه حاضر برجسته شده بود. با تجمع یون‌های Na^+ کاهش محتوای لیپید از طریق پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ROSها تحت تنش شوری صورت می‌گیرد؛ از این رو متابولیسم لیپیدها برای حفظ هموستازی غشایی در گیاهان تحت تنش شوری ضروری است (Pan et al., 2023). هر چند ژن‌های زیادی به صورت هم بیان با lncRNAهای شناسایی شدند اما برخی از این ژن‌ها با برهم‌کنش فیزیکی توسط این توالی‌ها کنترل می‌شوند. از مهم‌ترین ژن‌های شناسایی شده می‌توان به پروتئین LEA اشاره نمود. پروتئین‌های LEA گروهی از پروتئین‌های با عملکرد چندگانه و آبدوست هستند که به‌خاطر نقش ضد تنش اکسیداتیو خود به‌عنوان "سپر مولکولی" شناخته می‌شوند (Bhardwaj et al., 2013). بر اساس ترکیب اسیدآمینه، پروتئین‌های LEA به هفت گروه تقسیم می‌شوند که از این میان، پروتئین‌های گروه ۲ LEA به نام «دهیدرین‌ها» در قلمرو گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Athar et al., 2022). ویژگی‌های نهفته و منحصر به فرد این گروه از پروتئین‌ها در رفع اثرات منفی تنش شوری اثبات شده است و درک نقش مولکولی آن‌ها در گیاهان، می‌تواند به توسعه روش‌های اصلاح گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک و انتقال ژن کمک نماید (Bhardwaj et al., 2013). از دیگر ژن‌های هدف lncRNAهای شناسایی شده در پژوهش حاضر می‌توان به PYR1 (PYRABACTIN RESISTANCE1) اشاره نمود. در تنش شوری میزان آبسزیک اسید (ABA) به عنوان یک

عامل پیام‌رسان تنش افزایش می‌یابد، در این شرایط پروتیین‌های PYR به‌عنوان یکی از گیرنده‌های ABA نقش بسیار مهمی در درک تنش و راه‌اندازی آبشار پیام‌رسانی و در نهایت تنظیم مجدد بیان ژن‌ها در مواجه با انواع مختلفی از تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش شوری ایفا می‌کند (Zhao et al., 2021). به‌طور کلی ژن‌های هدف lncRNA می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای برنامه‌های اصلاحی مولکولی به‌منظور تولید ارقام متحمل به تنش شوری محسوب شوند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نخستین گزارش جامع در زمینه شناسایی و تحلیل عملکردی lncRNAها در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) تحت تنش شوری است. شناسایی ۲۶۴۰ lncRNA، از جمله ۱۹۵ توالی مشترک با پایگاه‌های معتبر و شناسایی توالی‌های جدید، گامی مهم در توسعه بانک‌های اطلاعاتی ژنتیکی این گونه به شمار می‌رود. یافته‌ها نشان داد که lncRNAها می‌توانند به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم بیان ژن تحت تنش‌های غیرزیستی عمل کرده و از طریق تعامل با ژن‌های هدف در فرآیندهای زیستی حیاتی مانند فتوسنتز، متابولیسم فلاونوئید و بیوسنتز لیپیدها ایفای نقش کنند. تحلیل عملکردی ژن‌های هدف همچنین نشان داد که این ژن‌ها در مسیرهای کلیدی زیستی مرتبط با مقاومت به شوری فعال هستند. شناسایی lncRNA های دارای بیان افتراقی و ژن‌های هدف مرتبط با آن‌ها، پتانسیل بالایی برای استفاده در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی و تولید ارقام مقاوم به شوری دارد. با توجه به پیچیدگی سازوکارهای تحمل به شوری، داده‌های حاصل از این پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات مولکولی و ژنتیکی پیشرفته‌تر در زمینه زیست‌فناوری گیاهی و مهندسی ژنتیک در لوبیا و سایر گیاهان حساس به شوری باشد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه لرستان که به خاطر پشتیبانی مالی و تجهیزاتی ما را در اجرای هرچه بهتر پژوهش حاضر یاری کردند، سپاسگزاری می‌شود.

References

Alavi, M., Mozafari, M., Ghaemi, S., Ashengroph, M., Hasanzadeh Davarani, F., & Mohammadabadi, M. (2022). Interaction of epigallocatechin gallate and quercetin with spike glycoprotein (S-glycoprotein) of SARS-CoV-2: In silico study. *Biomedicines*, *10*(12), 3074. https://doi.org/10.3390/biomedicines10123074

Amiri Roudbar, M., Mohammadabadi, M. R., Ayatollahi Mehrgardi, A., Abdollahi-Arpanahi, R., Momen, M., Morota, G., Brito Lopes, F., Gianola, D., & Rosa, G. J. (2020). Integration of single nucleotide variants and whole-genome DNA methylation profiles for classification of rheumatoid arthritis cases from controls. *Heredity*, *124*(5), 658-674. https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41437-020-0301-4

Arabpour, Z., Mohammadabadi, M., & Khezri, A. (2021). The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. *Agricultural Biotechnology Journal*, *13*(4), 183-200. https://doi.org/10.22103/jab.2022.18782.1371

Athar, H. U. R., Zulfiqar, F., Moosa, A., Ashraf, M., Zafar, Z. U., Zhang, L., Ahmed, N., Kalaji, H. M., Nafees, M., Hossain, M. A., Islam, M. S., El Sabagh, A., & Siddique, K. H. M. (2022). Salt stress proteins in plants: An overview [Review]. *Front Plant Sci*, *13*. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.999058

Bhardwaj, R., Sharma, I., Kanwar, M., Sharma, R., Handa, N., Kaur, H., Kapoor, D., & Poonam. (2013). LEA Proteins in Salt Stress Tolerance. In P. Ahmad, M. M. Azooz, & M. N. V. Prasad (Eds.), Salt Stress in Plants: Signalling, Omics and Adaptations. *Springer New York,* 79-112. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6108-1_5

Bouzroud, S., Henkrar, F., Fahr, M., & Smouni, A. (2023). Salt stress responses and alleviation strategies in legumes: a review of the current knowledge. *3 Biotech*, *13*(8), 287. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13205-023-03643-7

Carbas, B., Machado, N., Oppolzer, D., Ferreira, L., Queiroz, M., Brites, C., Rosa, E. A., & Barros, A. I. (2020). Nutrients, antinutrients, phenolic composition, and antioxidant activity of common bean cultivars and their potential for food applications. *Antioxidants*, *9*(2), 186. https://doi.org/10.3390/antiox9020186

Chand Jha, U., Nayyar, H., Mantri, N., & Siddique, K. H. (2021). Non-coding RNAs in legumes: their emerging roles in regulating biotic/abiotic stress responses and plant growth and development. *Cells*, *10*(7), 1674. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells10071674

Chandran, A. K. N., Kim, J. W., Yoo, Y. H., Park, H. L., Kim, Y. J., Cho, M. H., & Jung, K. H. (2019). Transcriptome analysis of rice-seedling roots under soil–salt stress using RNA-Seq method. *Plant Biotechnology Reports*, *13*(6), 567-578. https://doi.org/10.1007/s11816-019-00550-3

Chin, C. H., Chen, S. H., Wu, H. H., Ho, C. W., Ko, M. T., & Lin, C. Y. (2014). cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*, *8*, 1-7. https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S4-S11

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szcześniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., & Zhang, X. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, *17*(1), 13. https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8

Das, P., Agarwala, N., Gill, S. S., & Varshney, R. K. (2023). Emerging role of plant long non coding RNAs (lncRNAs) in salinity stress response. *Plant Stress*, 100-265. https://doi.org/10.1016/j.plst.2023.100265

Deng, F., Zhang, X., Wang, W., Yuan, R., & Shen, F. (2018). Identification of Gossypium hirsutum long non-coding RNAs (lncRNAs) under salt stress. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 23. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1238-0

Di Marsico, M., Paytuvi Gallart, A., Sanseverino, W., & Aiese Cigliano, R. (2022). GreeNC 2.0: a comprehensive database of plant long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D1442-D1447. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/gkab1170

El-Beltagi, H. S., Al-Otaibi, H. H., Parmar, A., Ramadan, K. M., Lobato, A. K. D. S., & El-Mogy, M. M. (2023). Application of potassium humate and salicylic acid to mitigate salinity stress of common bean. *Life*, *13*(2), 448. https://doi.org/10.3390/life13020448

Garcia, C. L., Dattamudi, S., Chanda, S., & Jayachandran, K. (2019). Effect of salinity stress and microbial inoculations on glomalin production and plant growth parameters of snap bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomy*, *9*(9), 545. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/agronomy9090545

Gong, H., You, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhao, F., Cui, X., & Zhang, Y. (2021). Genome-wide identification and functional analysis of long non-coding RNAs in sesame response to salt stress. *Journal of Plant Biology*, *64*(6), 555-565. https://doi.org/10.1007/s12374-021-09324-3

Hajalizadeh, Z., Dayani, O., Khezri, A., Tahmasbi, R., Mohammadabadi, M., Solodka, T., Kalashnyk, O., Afanasenko, V., & Babenko, O. (2021). Expression of calpastatin gene in

Kermani sheep using real-time PCR. *Journal of Livestock Science and Technologies*, *9*(2), 57-51. https://doi.org/10.22103/jlst.2021.18165.1381

Heidarpour, F., Mohammadabadi, M., Zaidul, I., Maherani, B., Saari, N., Hamid, A., Abas, F., Manap, M., & Mozafari, M. (2011). Use of prebiotics in oral delivery of bioactive compounds: a nanotechnology perspective. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, *66*(5), 319-324. https://doi.org/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21699064

Hernández, J. A. (2019). Salinity tolerance in plants: trends and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2408. https://doi.org/10.3390/ijms20102408

Hou, J., Lu, D., Mason, A. S., Li, B., Xiao, M., An, S., & Fu, D. (2019). Non-coding RNAs and transposable elements in plant genomes: emergence, regulatory mechanisms and roles in plant development and stress responses. *Planta*, *250*, 23-40. https://doi.org/10.1007/s00425-019-03110-y

Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 800. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800

Jan, R., Kim, N., Lee, S. H., Khan, M. A., Asaf, S., Lubna, Park, J. R., Asif, S., Lee, I. J., & Kim, K. M. (2021). Enhanced Flavonoid Accumulation Reduces Combined Salt and Heat Stress Through Regulation of Transcriptional and Hormonal Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 12:796956. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.796956

Jannesar, M., Seyedi, S. M., & Botanga, C. (2024). Crosstalk between long non-coding RNAs and miRNAs regulates transferase activities in response to salt stress in Pistachio (Pistacia vera L.). *Plant Stress*, *12*, 100474. https://doi.org/10.1016/j.plst.2023.100474

Jia, J., Wang, F., Yuan, M., Wang, Z., Qin, Z., Zhang, X., Shao, Y., & Pei, H. (2025). Transcriptomic Analysis Reveals That the Photosynthesis and Carotenoid Metabolism Pathway Is Involved in the Salinity Stress Response in Brassica rapa L. ssp. Pekinensis. *Plants*, *14*(4), 566. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants14040566

Jiang, C., Wang, Y., He, Y., Peng, Y., Xie, L., Li, Y., Sun, W., Zhou, J., Zheng, C., & Xie, X. (2024). Identification and Characterization of miRNAs and lncRNAs Associated with Salinity Stress in Rice Panicles. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(15), 8247. https://doi.org/10.3390/ijms25158247

Jin, J., Lu, P., Xu, Y., Li, Z., Yu, S., Liu, J., Wang, H., Chua, N. H., & Cao, P. (2021). PLncDB V2. 0: a comprehensive encyclopedia of plant long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D1489-D1495. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa910

Kang, Y. J., Yang, D. C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y. Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W12-W16. https://doi.org/10.1093/nar/gkx428

Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S. E. (2023). Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, *14*(4), 221. https://doi.org/10.30466/vrf.2022.548152.3373

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. (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*, 2605-2619. https://doi.org/10.1007/s12298-021-00996-9

Li, J., Ma, W., Zeng, P., Wang, J., Geng, B., Yang, J., & Cui, Q. (2015). LncTar: a tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. *Briefings in bioinformatics*, *16*(5), 806-812. https://doi.org/10.1093/bib/bbu048

Liu, J., Wang, H., & Chua, N. H. (2015). Long noncoding RNA transcriptome of plants. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(3), 319-328. https://doi.org/10.1111/pbi.12229

Liu, P., Zhang, Y., Zou, C., Yang, C., Pan, G., Ma, L., & Shen, Y. (2022). Integrated analysis of long non-coding RNAs and mRNAs reveals the regulatory network of maize seedling root responding to salt stress. *BMC Genomics*, *23*, 1-16. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08520-0

Livak, K. J., & 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

Lowe, T. M., & Chan, P. P. (2016). tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W54-W57. https://doi.org/10.1093/nar/gkw413

Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, *10*(6), 924-933. https://doi.org/10.4161/rna.24604

Mahajan, R., Nazir, M., Sayeed, N., Rai, V., Mushtaq, R., Masoodi, K. Z., Wani, S. A., Urwat, U., Rasool, S., Salgotra, R. K., & Zargar, S. M. (2017). Unraveling the abiotic stress tolerance in common bean through omics. In *Plant OMICS and Crop Breeding* (pp. 311-365). https://doi.org/10.1201/9781315365930

Mehralizade, Z., Soorni, A., & Meratian Esfahani, S. (2024). Regulatory Network of Spinach Under Salt Stress: An Integrated Study of Long Non-coding RNAs and mRNAs. *Journal of Plant Growth Regulation*, *44*, 1-17. https://doi.org/10.1007/s00344-024-11546-x

Mohammadabadi, M., & Asadollahpour Nanaei, H. (2021). Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal*, *13*(1), 197-214. https://doi.org/10.22103/jab.2021.17334.1305

Mohammadabadi, M., Afsharmanesh, M., Khezri, A., Kheyrodin, H., Babenko Ivanivna, O., Borshch, O., Kalashnyk, O., Nechyporenko, O., Afanasenko, V., & Slynko, V. (2025). Effect of mealworm on GBP4L gene expression in the spleen tissue of Ross broiler chickens. *Agricultural Biotechnology Journal*, *17*(2), 343-360. https://doi.org/https://doi.org/10.22103/jab.2025.25277.1714

Mohammadabadi, M., Babenko, I. O., Borshch, O., Kalashnyk, O., Ievstafiieva, Y., & Buchkovska, V. (2024). Measuring the relative expression pattern of the UCP2 gene in different tissues of the Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, *16*(3), 317-332. https://doi.org/10.22103/jab.2024.24337.1627

Mohammadabadi, M., Golkar, A., & Askari Hesni, M. (2023). The effect of fennel (Foeniculum vulgare) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agricultural Biotechnology Journal*, *15*, 239-256. https://doi.org/10.22103/jab.2023.22647.1530

Mohammadabadi, M., Kheyrodin, H., Latifi, A., & Babenko Ivanivna, O. (2022). mRNA expression profile of DNAH1 gene in testis tissue of Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, *14*(3), 243-256. https://doi.org/10.22103/jab.2022.20199.1428

Netondo, G. W., Onyango, J. C., & Beck, E. (2004). Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Science*, *44*(3), 806-811. https://doi.org/10.2135/cropsci2004.8060

Niron, H., Barlas, N., Salih, B., & Türet, M. (2020). Comparative transcriptome, metabolome, and ionome analysis of two contrasting common bean genotypes in saline conditions. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 599501. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.599501

Okay, A., Kırlıoğlu, T., Durdu, Y. Ş., Akdeniz, S. Ş., Büyük, İ., & Aras, E. (2024). Omics approaches to understand the MADS-box gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) against drought stress. *Protoplasma*, *261*(4), 709-724. https://doi.org/10.1007/s00709-024-01928-z

Pan, L., Hu, X., Liao, L., Xu, T., Sun, Q., Tang, M., Chen, Z., & Wang, Z. (2023). Lipid metabolism and antioxidant system contribute to salinity tolerance in halophytic grass seashore paspalum in a tissue-specific manner. *BMC Plant Biology*, *23*(1), 337. https://doi.org/10.1186/s12870-023-04358-w

Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *60*(3), 324-349. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010

Paytuví Gallart, A., Hermoso Pulido, A., Anzar Martínez de Lagrán, I., Sanseverino, W., & Aiese Cigliano, R. (2016). GREENC: a Wiki-based database of plant lncRNAs. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D1161-D1166. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1215

Quek, X. C., Thomson, D. W., Maag, J. L., Bartonicek, N., Signal, B., Clark, M. B., Gloss, B. S., & Dinger, M. E. (2015). lncRNAdb v2. 0: expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D168-D173. https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2093695

Raza, A., Tabassum, J., Fakhar, A. Z., Sharif, R., Chen, H., Zhang, C., Ju, L., Fotopoulos, V., Siddique, K. H., & Singh, R. K. (2023). Smart reprograming of plants against salinity stress using modern biotechnological tools. *Critical Reviews in Biotechnology*, *43*(7), 1035-1062. https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2093695

Revelle, W., & Revelle, M. W. (2015). Package 'psych'. *The Comprehensive R Archive Network*, *337*(338). https://doi.org/10.5281/zenodo.34069

Samarfard, S., Ghorbani, A., Karbanowicz, T. P., Lim, Z. X., Saedi, M., Fariborzi, N., McTaggart, A. R., & Izadpanah, K. (2022). Regulatory non-coding RNA: The core defense mechanism against plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, *359*, 82-94. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.04.003

Sanchita, Trivedi, P. K., & Asif, M. H. (2020). Updates on plant long non-coding RNAs (lncRNAs): the regulatory components. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *140*(2), 259-269. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01726-z

Sandalio, L. M. (2022). Insights in plant abiotic stress. *Frontiers Media SA*, *13*, 1085150. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1085150

Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *22*(2), 123-131. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001

Singh, U., Khemka, N., Rajkumar, M. S., Garg, R., & 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), e183-e183. https://doi.org/10.1093/nar/gkx780

Sun, X., Zheng, H., Li, J., Liu, L., Zhang, X., & Sui, N. (2020). Comparative transcriptome analysis reveals new lncRNAs responding to salt stress in sweet sorghum. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 331. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00331

Szcześniak, M. W., Bryzghalov, O., Ciomborowska-Basheer, J., & Makałowska, I. (2019). CANTATAdb 2.0: expanding the collection of plant long noncoding RNAs. In *Plant* Long non-coding RNAs: methods and protocols. *Springer,* 415-429. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8976-8_25

Van Zelm, E., Zhang, Y., & Testerink, C. (2020). Salt tolerance mechanisms of plants. *Annual Review of Plant Biology*, *71*(1), 403-433. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100005

Wang, D., Wu, H., Yu, L., Lu, Z., Pan, L., & Xin, Y. (2025). Identification and functional characterization of lncRNAs and mRNAs in response to salt stress in mulberry. *Forestry Research*, *5*(1). https://doi.org/https://doi.org/10.48130/forres-0025-0006

Wang, X., Yin, J., Wang, J., & Li, J. (2023). Integrative analysis of transcriptome and metabolome revealed the mechanisms by which flavonoids and phytohormones regulated the adaptation of alfalfa roots to NaCl stress. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1117868. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.153123

Wekesa, C., Asudi, G. O., Okoth, P., Reichelt, M., Muoma, J. O., Furch, A. C., & Oelmüller, R. (2022). Rhizobia contribute to salinity tolerance in Common Beans (Phaseolus vulgaris L.). *Cells*, *11*(22), 3628. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells11223628

Yang, H., Cui, Y., Feng, Y., Hu, Y., Liu, L., & Duan, L. (2023). Long non-coding RNAs of Plants in response to abiotic stresses and their regulating roles in promoting environmental adaption. *Cells*, *12*(5), 729. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells12050729

Yu, R., Li, Z., Rong, M., Yang, G., Xu, X., Wang, G., Xu, Z., Du, X., & Zhang, Q. (2023). Comparative physiology and transcriptome analysis to identify the important coding and non-coding RNAs imparting tolerance to salinity stress in alfalfa (Medicago sativa L). *Research Square*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2500111/v1

Zahra, N., Al Hinai, M. S., Hafeez, M. B., Rehman, A., Wahid, A., Siddique, K. H. M., & Farooq, M. (2022). Regulation of photosynthesis under salt stress and associated tolerance mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, *178*, 55-69. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.03.003

Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C., & 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., & 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