



Shahid Bahonar
University of Kerman



Iranian
Biotechnology Society

Identifying and Predicting the Function of Long non-coding RNAs in the Expression Profile of PVY Infected Potato

Elham Mahmoodi 

Ph.D. Student, Department of Plant Pathology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: elhammahmodi55@yahoo.com

Saeed Nasrollahnejad 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: s.nasrollahnejad@gau.ac.ir

Seyed Esmaeel Razavi 

Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: razavi@gau.ac.ir

Rahim Ahmadvand 

Associate Professor, Department of Vegetable and Irrigated Pulse Crops Research, Agricultural Engineering, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran. E-mail address: ahmadvandra@gmail.com

Masoud Tohidfar 

Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail address: gtohidfar@yahoo.com

Mahdi Alizadeh 

Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: mahdializadeh@gau.ac.ir

Abstract

Objective

Potato Virus Y is one of the most important damaging and limiting factors of potato cultivation. Plants cope with harmful conditions by regulating the expressions of genes at different levels including transcription, post-transcription and translation, using stress tolerance or resistance mechanisms. Therefore, regulatory factors play a very important role in gene expression regulation under stress conditions. Long non-coding RNAs are one of the most important regulatory elements of genes. The present study was conducted with the aim of identifying lncRNAs and investigation of their expression changes in PVY infected potato plants.

Materials and methods

In this research CLC Genomic Workbench software was used for data analysis. After identifying lncRNAs, the genes affected by them were also analyzed. Then, Gene Ontology enrichment and KEGG pathway analysis were performed using STRING analysis and finally, the interactions between the identified lncRNAs and potato miRNAs were investigated.

Results

According to the obtained results, a total of 3742 sequences were identified as novel lncRNAs in PVY infected potato transcriptome, of which 769 were differentially expressed. So that 310 lncRNAs were down-regulated and 459 were up-regulated in potato in response to PVY infection. Gene Ontology analysis of co-expressed genes with identified lncRNAs show the vital role of these genes in various biological processes, biosynthesis of cellular components, protein complex formation and signal transduction. Also, genes involved in biological processes related to creating defense response against stress, hypersensitive reaction, trehalose metabolism, antiviral responses related to RNA silencing and signaling pathways to induce systemic resistance, were co-expressed with identified lncRNAs in this study. The results of co-expression network between lncRNAs and miRNAs showed interactions between 56 lncRNAs and 5 miRNAs. The most interaction was observed between lncRNAs with stumiR6024-3p.

Conclusions

Considering the interactions between examined lncRNAs and the genes involved in defense responses against stress, it is concluded that the expression changes of these lncRNAs are an important part of the response mechanism to viral disease. The obtained results can be a step towards a better understanding of lncRNAs and their function in the development of PVY tolerance and resistance cultivars.

Keywords: Transcriptome, RNA sequencing, long non-coding RNA.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mahmoodi E, Nasrollahnejad S, Razavi S E, Ahmadvand R, Tohidfar M, Alizadeh M (2024) Identifying and Predicting the Function of Long non-coding RNAs in the Expression Profile of PVY Infected Potato. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (2), 109-130.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (2), 109-130.

DOI: 10.22103/jab.2024.22490.1527

Received: February 06, 2024.

Received in revised form: March 31, 2024.

Accepted: April 02, 2024.


Published online: May 31, 2024.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors


شناسایی و پیش بینی عملکرد RNAهای بلند غیر کد کننده در پرو فایل بیانی سیب زمینی آلوده به ویروس PVY

الهام محمودی 


دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه:
elhammahmodi55@yahoo.com

سعید نصراله نژاد 


*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه گیاهپزشکی دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: s.nasrollahnejad@gau.ac.ir

سید اسماعیل رضوی 

استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه:
razavi@gau.ac.ir

رحیم احمدوند 

دانشیار مهندسی کشاورزی بخش تحقیقات سبزی، صیفی و حبوبات آبی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران.
رایانامه: ahmadvandra@gmail.com

مسعود توحیدفر 

استاد گروه سلولی و مولکولی دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه:
gtohidfar@yahoo.com

مهدی علیزاده 

دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه:
mahdializadeh@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۷ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۴

چکیده

هدف: ویروس Y سیب زمینی یکی از مهم ترین عوامل خسارتزا و محدود کننده کشت سیب زمینی می باشد. گیاهان با استفاده از مکانیسم های تحمل یا مقاومت به تنش، از طریق تنظیم بیان ژن ها در سطوح مختلف رونویسی، پس از رونویسی و ترجمه، با شرایط آسیب رسان مقابله می کنند. بنابراین عوامل تنظیمی، در کنترل بیان ژن ها تحت انواع تنش ها نقش بسیار مهمی دارند. یکی از مهم ترین

عناصر تنظیم کننده ژن‌ها RNAهای بلند غیرکدکننده می‌باشند. پژوهش حاضر با هدف شناسایی lncRNAها و بررسی تغییرات بیان آن‌ها در گیاهچه‌های سیب‌زمینی آلوده به PVY انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از نرم افزار CLC Genomic Workbench به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. پس از شناسایی lncRNAها، ژن‌های تحت تاثیر آن‌ها نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سپس تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن و مسیرهای KEGG با استفاده از String analysis انجام شد و در نهایت برهمکنش بین lncRNAهای شناسایی شده و miRNAهای سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: طبق نتایج به دست آمده در مجموع ۳۷۴۲ توالی به‌عنوان lncRNA در ترنسکرپتوم سیب‌زمینی آلوده به ویروس PVY شناسایی شد که از بین آن‌ها ۷۶۹ عدد دارای بیان افتراقی بودند. به طوری که ۳۱۰ lncRNA در شرایط آلودگی سیب‌زمینی به PVY کاهش بیان و ۴۵۹ عدد افزایش بیان نشان دادند. بررسی هستی‌شناسی ژن‌های هم‌بیان با lncRNAهای شناسایی شده نشان‌دهنده نقش حیاتی این ژن‌ها در فرآیندهای زیستی مختلف، بیوسنتز ترکیبات سلولی، تشکیل کمپلکس‌های پروتئینی و انتقال سیگنال‌ها می‌باشد. همچنین ژن‌های دخیل در فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با ایجاد پاسخ‌های دفاعی در برابر تنش، ایجاد واکنش فوق حساسیت، متابولیسم ترهالوز، پاسخ‌های ضدویروسی مرتبط با خاموشی RNA و مسیرهای پیام‌دهی به منظور القای مقاومت سیستمیک، با lncRNAهای شناسایی شده در تحقیق حاضر هم‌بیان بودند. نتایج بررسی شبکه هم‌بیانی lncRNAها با miRNAها نشان‌دهنده برهمکنش ۵۶ lncRNA با ۵ miRNA بود. بیشترین برهمکنش بین lncRNAها با stumiR6024-3p مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به برهمکنش بین lncRNAهای بررسی شده با ژن‌های دخیل در ایجاد پاسخ‌های دفاعی در برابر تنش، استنباط می‌شود که تغییرات بیان این lncRNAها بخش مهمی از مکانیسم پاسخ به بیماری ویروسی باشد. نتایج حاصل می‌تواند گامی در جهت درک بهتر lncRNAها و عملکرد آن‌ها در توسعه ارقام متحمل و مقاوم به PVY باشد.

کلیدواژه‌ها: ترنسکرپتوم، توالی‌یابی RNA، RNAهای بلند غیرکدکننده.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: محمودی الهم، نصراله نژاد سعید، رضوی سید اسماعیل، احمدوند رحیم، توحیدفر مسعود، علیزاده مهدی (۱۴۰۳) شناسایی و پیش‌بینی عملکرد RNAهای بلند غیرکدکننده در پروفایل بیانی سیب‌زمینی آلوده به ویروس PVY. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۲)، ۱۰۹-۱۳۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات از نظر میزان کشت و تولید در کشور ما به شمار می‌رود (FAO 2020). بیماری‌های ویروسی کاهش قابل توجهی در کیفیت بذر و عملکرد این محصول ایجاد می‌کنند (Dupuis et al. 2023). ویروس‌ها نه تنها به دلیل آلودگی‌های اولیه، بلکه به دلیل انتقال توسط غده، تهدیدی جدی برای تولید سیب‌زمینی هستند (Solomon-Blackburn and Barker 2001). ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا و محدودکننده کشت سیب‌زمینی است که موجب کاهش ۱۰ تا ۸۰ درصد عملکرد محصول و همچنین تاثیر مستقیم بر کیفیت و بازارپسندی غده‌های سیب‌زمینی می‌شود (Ospankulova et al. 2022). نوترکیبی بین سویه‌های PVY^O و PVY^N، منجر به ایجاد سویه‌های جدید، از جمله PVY^{N-Wi} و PVY^{NTN} شده است که در حال حاضر رایج‌ترین و از نظر اقتصادی مخرب‌ترین سویه‌ها در سطح جهانی به شمار می‌روند (Karasev and Gray 2013). مقاومت میزبان یکی از بهترین راهبردها برای کنترل آلودگی‌های ویروسی در گونه‌های گیاهی است (Hashimoto et al. 2016). در گیاهان مکانیسم‌های پیچیده بسیاری در برابر تنش‌های زیستی، برای سرکوب بیماری و به حداقل رساندن آسیب به سایر بافت‌ها، تکامل یافته است. در مکانیسم‌های تحمل یا مقاومت به تنش‌ها، گیاهان با تنظیم بیان ژن‌ها در سطوح مختلف رونویسی، پس از رونویسی و ترجمه، با شرایط آسیب‌رسان مقابله می‌کنند (Rafeie et al. 2019; Zhang et al. 2018). بنابراین عوامل تنظیمی، در کنترل بیان ژن‌ها تحت انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش بسیار مهمی دارند (Raeesi Sadati et al. 2021). یکی از مهم‌ترین عناصر تنظیم‌کننده بیان ژن‌ها که در طیف وسیعی از فرآیندهای زیستی از جمله مقابله با انواع تنش‌ها نقش مهمی دارند lncRNAها هستند که امروزه در بسیاری از موجودات از جمله گیاهان شناسایی شده‌اند. (Jha et al. 2020). این نوع RNAهای غیرکدکننده بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید طول دارند و قادر به تنظیم بیان ژن در سطوح اپی‌ژنتیک، رونویسی و پس از رونویسی می‌باشند. همچنین در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی و مکانیسم‌های پاسخ دفاعی گیاهان در شرایط ایجاد تنش، نقش کلیدی دارند (Waseem et al. 2021). در سال‌های اخیر مطالعه و پژوهش در مورد بخش‌های غیرکدکننده در ژنوم موجودات افزایش یافته است (Wang et al. 2014). ظهور فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید با توان عملیاتی بالا، مانند NGS، منجر به شناسایی بیشتر lncRNAها در موجودات مختلف، از جمله برخی گیاهان شامل *Arabidopsis thaliana*، *Solanum lycopersicum*، *S. tuberosum*، *Zea mays*، *Oryza sativa*، *Triticum aestivum* و *Brassica rapa* شده است (Trivedi and Asif 2019). در پژوهشی با هدف بررسی ترنسکرپتوم سیب‌زمینی در پاسخ به PVY، تعدادی lncRNA جدید شامل RNAهای آنتی‌سنس و RNAهایی با جایگاه اتصال miRNA، شناسایی نمودند که در پاسخ به ویروس PVY و نیز تنش گرمایی بیان افتراقی داشتند (Glushkevich et al. 2022). همچنین در بررسی lncRNAهای مرتبط با مقاومت سیب‌زمینی نسبت به *Phytophthora*

infestans افزایش بیان StLNC0004 در گیاه *Nicotiana benthamiana* و در نتیجه تنظیم بیان ژن هدف آن (NbEXT)، به طور معنی داری موجب ممانعت از رشد و توسعه قارچ در گیاه آلوده نسبت به شاهد شد (Cao et al. 2021). رونویسی lncRNAها توسط RNA پلی مرز II صورت می گیرد، هر چند شواهد نشان دهنده نقش RNA پلی مرز IV در رونویسی lncRNAها در گیاهان نیز می باشد (Chen and Carmichael 2010). همچنین بررسی ها نشان می دهد که اغلب lncRNAها با مشارکت siRNAها در خاموشی ژن ها نقش دارند (Yang et al. 2019). چندین lncRNA پاسخ گو به تنش در گونه های مختلف گیاهی یافت شده است که به عنوان پیش سازهای miRNA عمل می کنند. در اصلاح محصولات زراعی، siRNAهای مشتق شده از lncRNAها چشم انداز زیادی برای توسعه ارقام گیاهی با تحمل بیشتر به تنش ها را دارند (Cho et al. 2018).

در مطالعات اخیر، کاربرد lncRNAها در تغییرات مولکولی با اهداف دفاعی، در رابطه با بیماری های گیاهی از جمله ویروس ها آشکار شده است. در واقع در سطح مولکولی، خاموشی RNA، ایمنی ذاتی، تغییر یا تخریب پروتئین ها و مکانیسم های سرکوب ترجمه به منظور دفاع گیاه در برابر ویروس مورد توجه می باشند (Wu et al. 2019). امروزه برای درک بیشتر نقش lncRNAها در مکانیسم های دفاعی گیاهان در برابر ویروس ها، بررسی های زیادی انجام شده است. به عنوان مثال در مطالعه ای با انجام توالی یابی RNA از نمونه های برگ، گیاهان گوجه فرنگی سالم و آلوده به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) را مورد مقایسه قرار دادند. نام بردگان در این مطالعه به طور کلی ۱۵۶۵ عدد lncRNA مختلف پیش بینی نمودند. همچنین نقش lncRNAها را در ایجاد خاموشی ژن پس از آلودگی ویروس، تأیید کردند (Wang et al. 2015). بررسی lncRNAها از نظر عملکردی، نشان دهنده ضرورت برهمکنش آن ها با سایر مولکول ها به منظور انجام عملکرد شان می باشد. در مطالعه مذکور، به منظور انتخاب گیاه جهش یافته مقاوم به ویروس TYLCV، بذره های گوجه فرنگی در معرض نوترن و سپس آلودگی با TYLCV قرار گرفتند. به دلیل تاثیر جهش بر lncRNAهایی با طول کوتاه تر، تعداد کمتری lncRNA در این بررسی گزارش شد (Wang et al. 2015). در مقایسه گیاهان گوجه فرنگی آلوده به TYLCV نسبت به نمونه های سالم، مشخص شد که ۱۹ عدد lncRNA افزایش بیان و ۱۱ عدد کاهش بیان داشتند (Zhou et al. 2019). در پژوهشی، با مقایسه ترنسکرپتوم گیاهان برنج سالم و آلوده به ویروس کوتولگی رگه سیاه برنج (RBSDV)، نشان دادند که ۱۳۴۲ عدد mRNA و ۲۲ عدد lncRNA در گیاهان آلوده، دارای بیان افتراقی بودند، که از بین آن ها، بیشتر رونوشت های با بیان متفاوت، در مسیرهای مرتبط با تعامل گیاه و بیمارگر نقش داشتند. تحلیل شبکه mRNA و lncRNAهای با بیان متفاوت، یک الگوی هم بیانی بین ۵۶ mRNA و ۲۰ lncRNA نشان داد که نشان دهنده اهمیت نقش آن ها در ایجاد ایمنی ذاتی برنج نسبت به ویروس RBSDV می باشد (Zhang et al. 2020b). همچنین در بررسی نقش lncRNAها در آلودگی توتون (*Nicotiana benthamiana*) به ویروس موزائیک چینی گندم (CWMV) با استفاده از توالی یابی RNA، ۱۱۷۵ عدد lncRNA در گیاهان آلوده به ویروس

گزارش شد، که ۶۵ عدد از آن‌ها را مورد ارزیابی GO و KEGG pathway قرار دادند. این بررسی‌ها نشان داد IncRNAهای گزارش شده در انتقال سیگنال هورمون‌های گیاهی مشارکت دارند (Zheng et al. 2021).

پژوهش‌های متعددی نشان‌دهنده نقش IncRNAها در فرآیندهای مختلف زیستی و پاسخ به انواع تنش‌ها در گیاهان، از طریق بازسازی کروماتین، اصلاح هیستون، پیرایش متناوب و عمل به‌عنوان شبیه‌ساز هدف بوده است (Patra et al. 2023).

به‌علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرآیندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Barazandeh et al. 2016a; Safaei et al. 2022). ماده ژنتیکی^۲ یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به‌طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Barazandeh et al. 2016b). محیطی که موجود در آن رشد می‌کند مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود (Bordbar et al. 2022; Jafari Ahmadabadi et al. 2023). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Mohamadipoor et al. 2021; Masoudzadeh et al. 2020).

ژن‌های یوکاریوتی بیان‌شان تحت کنترل موقت و چندبعدی است. در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Masoudzadeh et al. 2020; Mohammadabadi et al. 2023). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2023; Shokri et al. 2021). یکی از اقدامات اساسی در به‌نژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadinejad et al. 2022; Shahsavari et al. 2022). با وجود افزایش حجم داده‌ها در مورد رونوشت‌های غیر کدکننده، همچنان اطلاعات کمی در مورد انواع مختلف RNAهای طویل غیر کدکننده، عملکرد و اهمیت بیولوژیکی آن‌ها در بیمای‌های گیاهی وجود دارد. بنابراین، در تحقیق حاضر به شناسایی IncRNAها و بررسی تغییرات بیان آن‌ها در گیاهچه‌های سیب‌زمینی آلوده به PVY پرداخته شد. همچنین ژن‌های تحت تاثیر این RNAهای غیر کدکننده، از نظر عملکردی مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و ویرایش داده‌ها و سرهم‌بندی ترنسکریپتوم سیب‌زمینی: ابتدا کتابخانه داده‌های توالی‌یابی شده ترنسکریپتوم سیب‌زمینی آلوده به ویروس PVY و شاهد، که در پژوهش راس و همکاران (Ross et al. 2022) با استفاده از

^۱ DNA

تکنیک RNA-Seq به دست آمده بودند، از پایگاه داده SRA موجود در سایت NCBI به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra> با شماره پروژه PRJNA768797 دانلود شد. پس از تعیین کیفیت داده‌ها توسط نرم افزار FastQC، ویرایش داده‌های کم کیفیت و حذف آداپتور داده‌های خام، و در نهایت سرهم‌بندی ترنسکرپتوم گیاه سیب‌زمینی با استفاده از نرم افزار CLC Genomic Workbench (نسخه ۲۰) صورت گرفت. از پلاگین Transcript Discovery نرم افزار CLC برای شناسایی lncRNAها در ژنوم سیب‌زمینی استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل و نقشه‌یابی رونوشت‌ها، ژنوم مرجع سیب‌زمینی ورژن ۶ (<http://spuddb.uga.edu/>) از پایگاه داده Spud DB به آدرس <http://spuddb.uga.edu/> دانلود شد. رونوشت‌ها در برابر ژنوم مرجع سیب‌زمینی با استفاده از معیارهای سخت‌گیرانه نقشه‌یابی شدند. مقدارهای insertion mismatch و deletion به ترتیب روی اعداد ۲، ۳ و ۳ تنظیم گردید. همچنین length fraction و similarity fraction، هر دو ۰/۸ و minimum contig length، ۲۵۰ در نظر گرفته شدند (Tarifeno-Saldivia et al. 2017).

مستند سازی توالی رونوشت‌های به دست آمده با بلاست آن‌ها توسط ابزار BLASTx علیه پایگاه پروتئین‌های غیر تکراری (Non redundant protein database: NR) انجام شد. پس از نقشه‌یابی خوانش‌ها با سرهم‌بندی ایجاد شده، رونوشت‌های با بیان افتراقی (Differentially expressed genes: DEGs) با استفاده از آنالیز RNA-Seq و با در نظر گرفتن \log_2 fold change ≥ 2 برای افزایش بیان و \log_2 fold change ≤ -2 برای کاهش بیان و $FDR\ p\text{-value} \leq 0.01$ مشخص شدند.

شناسایی lncRNAها و بررسی بیان آن‌ها: شناسایی رونوشت‌های طویل غیرکدکننده بر اساس حذف توالی‌های کدکننده پروتئین صورت گرفت. رونوشت‌های کدکننده پروتئین، دارای چهارچوب خوانش (ORF) و نیز دومین‌های حفاظت شده، با نقشه‌یابی در برابر ژنوم مرجع سیب‌زمینی، از ترنسکرپتوم سرهم‌بندی شده حذف شدند. پس از تشخیص توالی‌های احتمالی، جداسازی توالی‌هایی که با احتمال بالاتری به‌عنوان lncRNA شناخته شدند، صورت گرفت (Singh et al. 2017). lncRNAهای پیش‌بینی شده در این مرحله، با مجموعه داده‌های قبلی به دست آمده برای سیب‌زمینی هم‌ردیف‌سازی شدند. سپس برای مطابقت با هر ایزوفرم کدکننده پروتئین BLASTx علیه پایگاه‌های اطلاعاتی متعدد شامل NR، Uniprot، Pfam و CCD انجام شد. در مرحله بعد، نواحی باقی‌مانده کدکننده پروتئین با استفاده از ابزار Coding Potential Calculator (CPC2)، شناسایی و حذف شدند (Kang et al. 2017). بدین ترتیب رونوشت‌هایی که با ایزوفرم‌های کدکننده پروتئین مطابقت داشتند حذف شده و تنها توالی‌های باقی‌مانده که در هیچ‌کدام از پایگاه‌های داده مذکور رکورد مشابهی نداشتند، به‌عنوان lncRNA مورد تجزیه و تحلیل در مراحل بعدی قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از داده‌های بیانی حاصل از تجزیه و تحلیل RNA-Seq میزان بیان هر یک از توالی‌های پیش‌بینی شده به‌عنوان lncRNA مشخص گردید.

بررسی برهمکنش lncRNA ها و mRNA ها: به منظور بررسی برهمکنش lncRNA ها و mRNA ها در پروفایل ترنسکرپتوم سیبزمینی آلوده به PVY، نقشه‌یابی lncRNA ها روی ژنوم مرجع سیبزمینی با استفاده از تجزیه و تحلیل RNA-Seq انجام شد. با استفاده از نتایج حاصل از نقشه‌یابی، عدد کروموزومی و ناحیه جفت شدن lncRNA و ترنسکرپتوم سیبزمینی به دست آمد. در ادامه همبستگی lncRNA ها با ژن‌های موجود در ناحیه ۱۰۰۰۰ جفت باز پایین دست نسبت به lncRNA مربوطه مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور String ID های مربوطه با استفاده از BioMart ensemble plant به دست آمد و برای ترسیم شبکه همبستگی lncRNA ها مورد استفاده قرار گرفت. همچنین تجزیه و تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن^۳ (GO) و مسیرهای KEGG برای lncRNA های شناسایی شده با استفاده از String analysis انجام شد (Szklaarczyk et al. 2023). توالی‌های مربوط به ژن‌های کدکننده پروتئین که با استفاده از تجزیه و تحلیل GO به دست آمدند، در پایگاه داده Uniprot (<http://www.uniprot.org>) بلاست شده و از نظر عملکردی و بیولوژیکی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

بررسی شبکه همبستگی lncRNA-miRNA: به منظور بررسی برهمکنش بین lncRNA های پیش‌بینی شده با miRNA های شناسایی شده در گیاه سیبزمینی در شرایط آلودگی به ویروس PVY، ۱۰۱ عدد miRNA متعلق به سیبزمینی از طریق پایگاه داده <http://mirbase.org> دانلود شد (Kozomara et al. 2019). سپس برهمکنش‌های بین lncRNA های شناسایی شده و miRNA ها با استفاده از سرور تحت وب psRNATarget به دست آمد (Dai et al. 2017). شبکه برهمکنش آنها نیز با استفاده از نرم افزار Cytoscape (ورژن ۳/۱۰/۱) ترسیم و lncRNA های که بیشترین برهمکنش را با miRNA ها داشتند با استفاده از الگوریتم cytohubba تعیین گردید (Shannon et al. 2003).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از ویرایش داده‌های خام و سرهم‌بندی نوپدید (de-novo assembly): بر اساس نتایج به دست

آمده از تحقیق حاضر، از تعداد ۱۷۰۵۹۸۱۲۶ خوانش خام که از پایگاه داده به دست آمد، پس از پیرایش داده‌ها و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین و همچنین حذف توالی‌های آداپتور، تعداد ۱۶۲۸۹۷۷۵۴ خوانش با کیفیت باقی ماند. خوانش‌های تمیز شده روی بخش‌های مختلف حاشیه‌نویسی شده از ژنوم مرجع سیبزمینی نقشه‌یابی شدند و در هر مرحله خوانش‌های به دست آمده از نتیجه نقشه‌یابی که روی ژنوم مرجع نقشه‌یابی نشده بودند، برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت تعداد ۱۹۷۵۴۳۰۶ خوانش نقشه‌یابی نشده باقی ماند و در سرهم‌بندی نوپدید مورد استفاده قرار گرفت. پس از حذف توالی‌های با طول کم‌تر از ۲۵۰ نوکلئوتید، تعداد ۱۸۲۳۹ رونوشت به دست آمد. طبق نتایج طول بلندترین رونوشت سرهم‌بندی شده و N50 به ترتیب ۳۱۵۰ و ۳۹۴ و مقدار بازهای GC، ۴۰ درصد به دست آمد (جدول ۱).

۱. Gene Ontology enrichment analysis

جدول ۱. نتایج حاصل از سرهم‌بندی و ویژگی‌های ترنسکرپتوم سیب‌زمینی آلوده به ویروس PVY
Table 1. The results of transcriptome assembly and characteristics in potato infected with PVY

Attributes	ویژگی‌ها	Value	مقدار
Number of raw reads	تعداد خوانش‌های خام	170598126	
Number of cleaned reads	تعداد خوانش‌های تمیز شده	162897754	
Number of transcripts	تعداد رونوشت‌ها	18239	
Shortest transcript length (Nt)	کوتاه‌ترین طول رونوشت (نوکلئوتید)	250	
Longest transcript length (Nt)	بلندترین طول رونوشت (نوکلئوتید)	3150	
Mean length of transcripts (Nt)	میانگین طول رونوشت‌ها (نوکلئوتید)	404	
	N75 (Nt)	319	
	N50 (Nt)	394	
	N25 (Nt)	541	
	GC%	40	

نتایج شناسایی توالی‌های lncRNA و بررسی بیان آن‌ها: مجموع رونوشت‌های به‌دست آمده، از نظر وجود

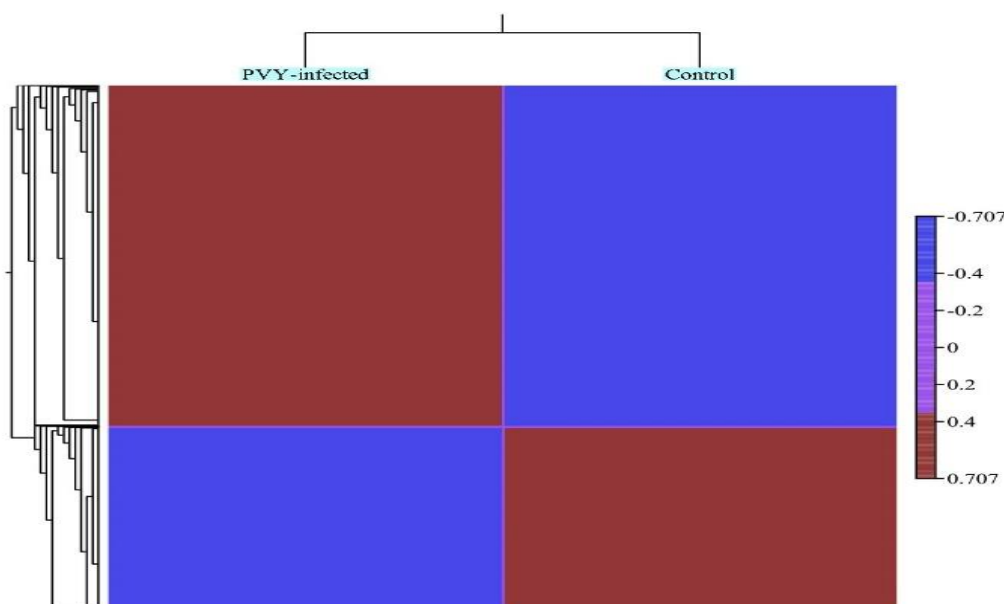
توالی‌های کدکننده با استفاده از ابزار CPC2 مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتایج به‌دست آمده، تعداد ۶۲ رونوشت کدکننده پروتئین شناسایی و حذف شدند. پس از فرآیند حاشیه‌نویسی توالی‌ها با استفاده از پایگاه داده Pfam تعداد توالی‌های غیرکدکننده باقی‌مانده به ۵۹۲۵ مورد تقلیل یافت. در مرحله بعد توالی‌های باقی‌مانده با استفاده از BLASTx در مقابل پایگاه‌های داده مرجع توالی‌های پروتئینی^۴ بلاست شدند. در مجموع ۳۷۷۸ توالی باقی‌مانده و به‌عنوان lncRNAهای پیش‌بینی شده در نظر گرفته شدند. برای اطمینان بیشتر توالی‌های lncRNAهای پیش‌بینی شده با پایگاه داده CANTATAdb مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتایج این بررسی ۳۶ توالی پیش‌بینی شده به‌عنوان lncRNA، توسط این پایگاه داده در گیاه سیب‌زمینی تأیید شد و سایر توالی‌ها به‌عنوان novel lncRNAs در نظر گرفته شدند.

بررسی بیان توالی‌های lncRNA شناسایی شده در پروفایل بیانی سیب‌زمینی آلوده به ویروس PVY با در نظر گرفتن

$TPM (Transcripts\ per\ million) > 5$ انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که از ۳۷۴۲ توالی شناسایی شده، ۷۶۹ توالی دارای بیان افتراقی (DEG lncRNA) و TPM بالای ۵ بودند. گروه‌بندی مبتنی بر بیان lncRNAهای پیش‌بینی شده با استفاده از تجزیه و تحلیل آماری Empirical analysis of DEGs و آزمون EDGE در سطح ۱ درصد، آن‌ها را در دو گروه مجزا قرار داد. با توجه به مقدار \log_2 fold change، گروه اول شامل ۳۱۰ عدد lncRNA که بیان آن‌ها تحت تنش آلودگی به PVY کاهش یافته بود (Down-regulated lncRNA) و گروه دوم شامل ۴۵۹ عدد lncRNA که در نمونه‌های آلوده به ویروس در

۱. Protein Ref-seq

مقایسه با کنترل افزایش بیان (Up-regulated lncRNA) نشان دادند (شکل ۱). از بین lncRNAهای دارای بیان افتراقی، ۵ عدد با بیشترین افزایش بیان و ۵ عدد با کمترین افزایش بیان در جدول ۲ ارائه شده است (جدول ۲).



شکل ۱. نقشه حرارتی پروفایل بیانی lncRNAهای شناسایی شده در ترنسکرپتوم سیبزمینی آلوده به ویروس PVY. رنگ قرمز و آبی به ترتیب نشان‌دهنده سطح بیان بالا و پایین است

Figure 1. Heatmap expression profile for lncRNAs identified in PVY infected potato transcriptome. Red and blue colors indicate high and low expression levels, respectively

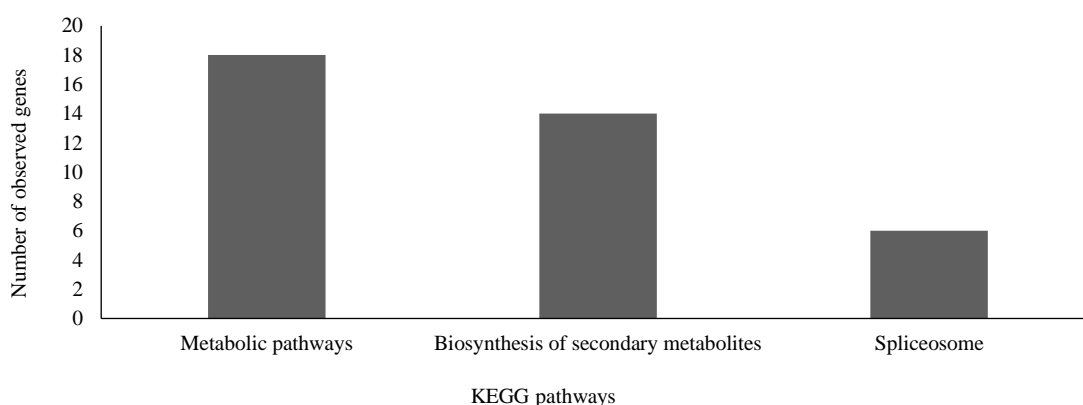
جدول ۲. نتایج به دست آمده از شناسایی lncRNAهای دارای بیشترین و کمترین بیان معنی دار در سیبزمینی آلوده به PVY

Table 2. The results of lncRNAs identification with the highest and lowest significant expression in PVY infected potato

Up-regulated lncRNAs	Log2 fold change	FDR p-value	Down-regulated lncRNAs	Log2 fold change	FDR p-value
Stu_ylnc14958	2525/277	1/34E-94	Stu_ylnc26525	-489/136	5/02E-07
Stu_ylnc28844	369/3871	4/49E-16	Stu_ylnc28231	-139/533	2/46E-05
Stu_ylnc25819	358/1566	3/45E-15	Stu_ylnc17151	-117/137	0/000439
Stu_ylnc28816	270/3379	1/93E-12	Stu_ylnc9417	-106/059	0/001718
Stu_ylnc14075	221/9646	1/34E-08	Stu_ylnc16565	-82/9835	0/004807

نتایج بررسی مسیرهای متابولیکی که ژن‌های هم‌بیان در آن دخیل بودند، نشان داد که مسیرهای متابولیک، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و Spliceosome، توسط ژن‌های تحت تاثیر lncRNAها به طور معنی‌داری غنی‌سازی شده‌اند (شکل ۲). مجموعه پروتئین‌های دخیل در مسیرهای غنی‌سازی شده شامل پروتئین‌های M1AWS8, M1A1K1, M1A0G4, M1CPZ1 و M1C059, M1B731, M1D1P2, K7WU45, M1C340, M1BQB1, M1BNV1 بود. بر اساس

اطلاعات موجود در پایگاه داده uniprot، پروتئین‌های مذکور دارای نقش‌های آنزیمی مانند ترنس‌فراز، کیناز، ایزومراز و هیدرولاز هستند و در فرآیندهای بیولوژیکی از جمله بیوسنتز آمینواسیدها، لیپیدها، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پردازش و پیرایش mRNA و siRNA دخیل می‌باشند. همچنین یکی از اجزاء سلولی حاصل از این پروتئین‌ها U1 snRNP می‌باشد که بر اساس پژوهش‌های انجام شده، در مقاومت گیاه در برابر تنش و همچنین در مسیر آبسزیک اسید نقش دارد (Amorim et al. 2018). طبق یافته‌ها گیاهان جهش یافته آراییدوپسیز که در فرآیند پیرایش دچار اختلال بودند، حساسیت بالایی نسبت به تنش و هورمون آبسزیک اسید نشان دادند. این موضوع بیانگر اهمیت پیرایش RNA در مقاومت گیاه نسبت به تنش‌ها می‌باشد (Zhan et al. 2017).

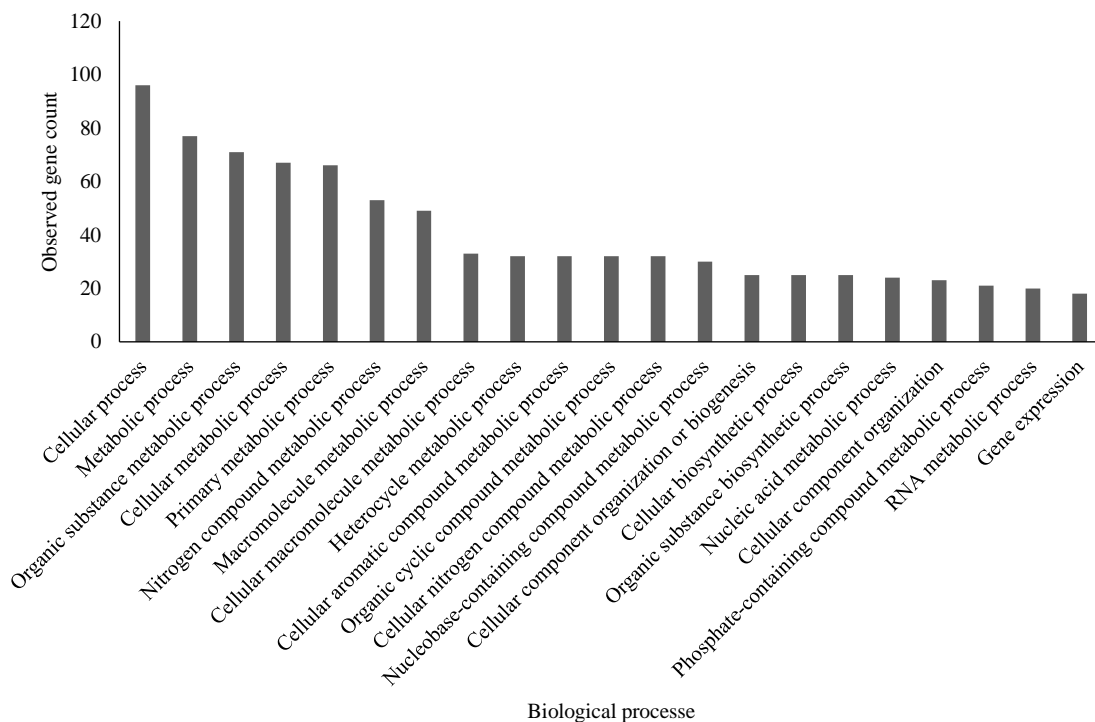


شکل ۲. مسیرهای حاصل از نتایج تجزیه و تحلیل KEGG pathway با بیشترین ژن‌های هم‌بیان با lncRNAها در سیب‌زمینی آلوده به PVY

Figure 2. Pathways from the results of KEGG pathway analysis with the most co-expressed genes with lncRNAs in PVY infected potato

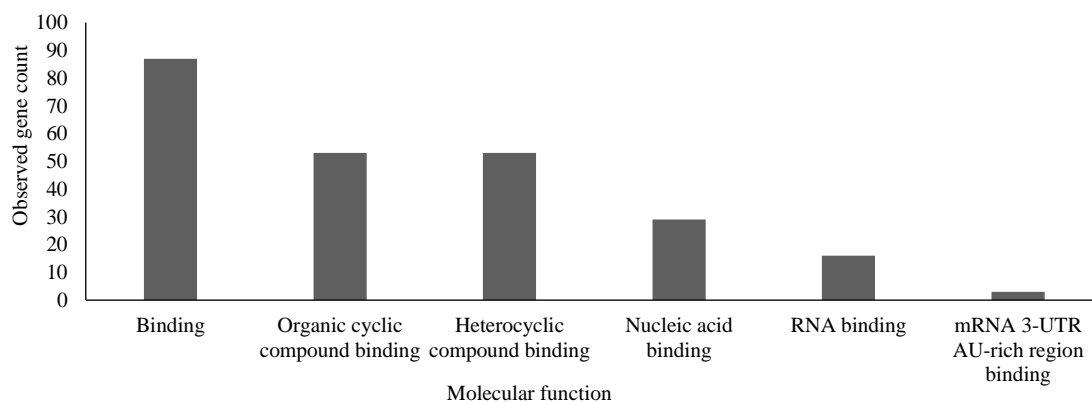
با توجه به نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (Gene Ontology analysis)، گروه‌های کارکردی در سه حوزه فرآیندهای زیستی (Biological processes)، عملکرد مولکولی (Molecular function) و ترکیبات سلولی (Cellular components) تعیین شدند. همچنین ارزیابی‌ها نشان داد در حوزه فرآیندهای زیستی، فرآیندهای سلولی و متابولیسمی مختلف و همچنین بیوسنتز ترکیبات سلولی دارای بیشترین تعداد ژن هم‌بیان بودند (شکل ۳). طبق نتایج این بررسی، تعداد زیادی از ژن‌های هم‌بیان با lncRNAهای پیش‌بینی شده در فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با ایجاد پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان در برابر تنش نقش داشتند. از جمله این فرآیندها شامل پاسخ به عوامل ایجاد کننده تنش، ایجاد پاسخ فوق حساسیت در گیاه، پاسخ به تنش از طریق متابولیسم ترهالوز، پاسخ‌های ضدویروسی مرتبط با خاموشی RNA به واسطه RNAi، ایجاد پاسخ‌های دفاعی با رسوب کالوز در دیواره سلولی و همچنین ژن‌های مربوط به ایجاد مسیرهای پیام‌دهی به منظور القای مقاومت سیستمیک از طریق جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید می‌باشند. همچنین طبق نتایج حاصل از ژن‌های هم‌بیان در حوزه عملکرد مولکولی، بیشترین ژن‌ها در اتصال ترکیبات مختلف، نوکلئیک اسیدها و RNA نقش داشتند (شکل ۴). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل در حوزه

ترکیبات سلولی نیز نشان‌دهنده بیشترین تعداد ژن هم‌بیان در گروه‌های مربوط به آناتومیک سلولی، اندامک‌های داخل سلولی و کمپلکس‌های پروتئینی بود (شکل ۵).



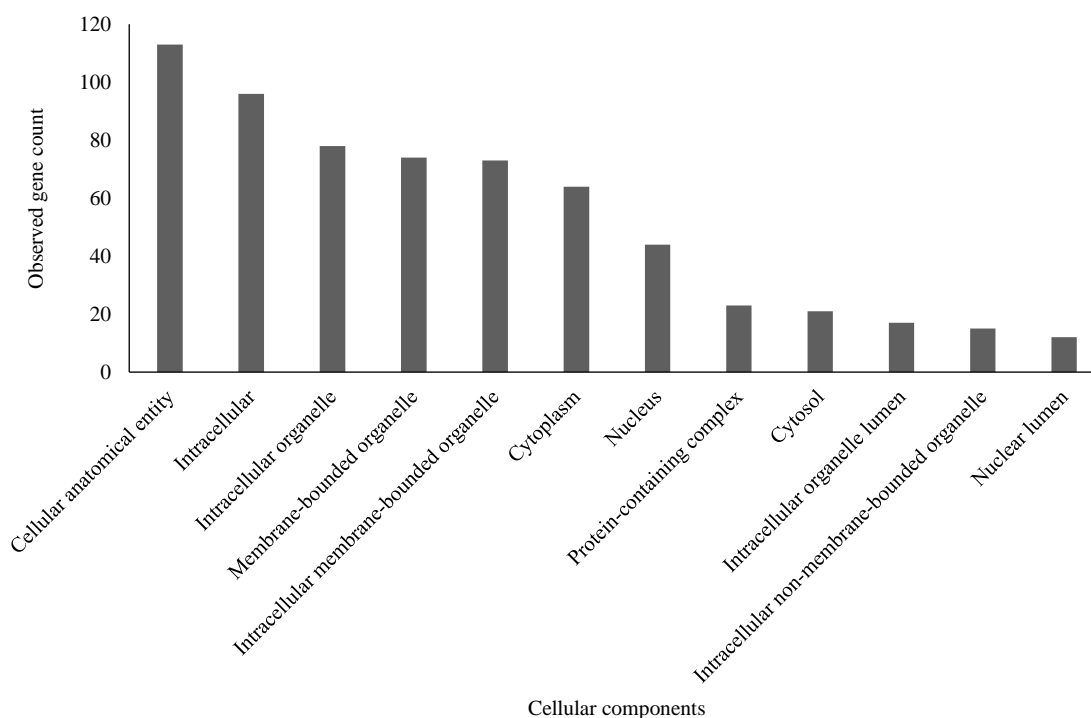
شکل ۳. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با بیشترین تعداد ژن‌های هم‌بیان با lncRNAها در سیب‌زمینی آلوده به PVY

Figure 3. The results of analysis of biological processes related to the largest number of co-expressed genes with lncRNAs in PVY infected potato



شکل ۴. نتایج نشان‌دهنده عملکردهای مولکولی مرتبط با بیشترین تعداد ژن‌های هم‌بیان با lncRNAها در سیب‌زمینی آلوده به PVY

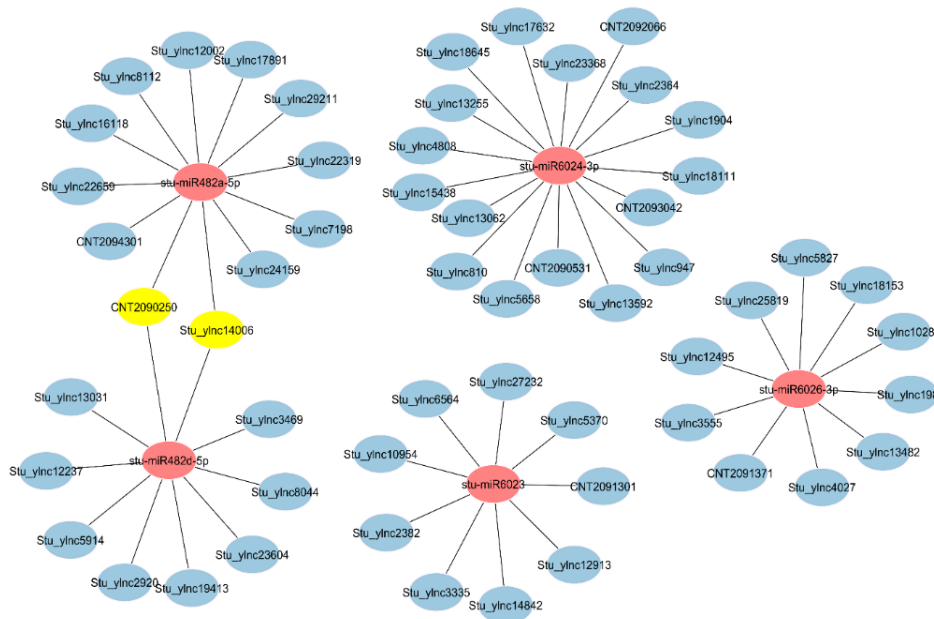
Figure 4. The results of molecular functions related to the largest number of co-expressed genes with lncRNAs in PVY infected potato



شکل ۵. نتایج بررسی اجزاء سلولی مرتبط با بیشترین تعداد ژن‌های هم‌بیان با lncRNAها در سیب‌زمینی آلوده به PVY

Figure 5. The results of cellular component related to the largest number of co-expressed genes with lncRNAs in PVY infected potato

شبکه برهمکنش lncRNAهای شناسایی شده و microRNAها: به منظور بررسی برهمکنش بین lncRNAهای پیش‌بینی شده با miRNAهای شناسایی شده در گیاه سیب‌زمینی در شرایط آلودگی به ویروس PVY، ۱۰۱ عدد miRNA متعلق به سیب‌زمینی از طریق پایگاه داده <http://mirbase.org> دانلود شد. سپس برهمکنش‌های بین lncRNAهای شناسایی شده و miRNAها با استفاده از سرور تحت وب psRNATarget به‌دست آمد. شبکه ایجاد شده با استفاده از نرم افزار Cytoscape (ورژن ۳/۱۰/۱) در شکل ۵ ارائه شده است. نتایج نشان داد که ۱۷ lncRNA با stu-miR6024-3p برهمکنش دارند. همچنین از ۱۲ lncRNA که با stu-miR482a-5p برهمکنش دارند، ۲ lncRNA به‌طور مشترک با stu-miR482d-5p هم‌بیان هستند. همچنین stu-miR6023 و stu-miR6026-3p به ترتیب با تعداد ۱۰ و ۹ lncRNA برهمکنش داشتند.



شکل ۶. نتایج حاصل از رسم شبکه برهمکنش IncRNA-miRNA در سیب‌زمینی آلوده به ویروس PVY. رنگ آبی و قرمز به ترتیب IncRNAها و miRNAها را نشان می‌دهند. رنگ زرد، نشان‌دهنده IncRNAهای دارای برهمکنش مشترک با دو miRNA است

Figure 6. The results of IncRNA-miRNA interaction network in PVY infected potato. Blue and red colors indicate lncRNAs and miRNAs, respectively. Yellow color indicates lncRNAs interact with two miRNAs

تا کنون IncRNAهای مختلفی در گیاهان همراه با پاسخ‌های دفاعی مرتبط با ایمنی گیاه و سازگاری با شرایط محیطی شناسایی شده است. بسیاری از IncRNAها با استفاده از تجزیه و تحلیل *in silico*، توالی‌یابی کل ژنوم و توالی‌یابی RNA در گیاهان مختلف از جمله آرابیدوپسیز، گندم، برنج، ذرت و غیره شناسایی و مستندسازی شده‌اند (Liu et al. 2012; Li et al. 2017; Zhang et al. 2014b; Sharma et al. 2014). اولین IncRNA شناسایی شده گیاهی، با استفاده از توالی‌یابی RNA و تجزیه و تحلیل مبتنی بر روش‌های آزمایشگاهی، GmENOD90 از گیاه سویا بود (Zhang et al. 2020a). بیشتر IncRNAهای شناسایی شده، در پاسخ به شرایط تنش نقش دارند (Shafiq et al. 2015). سلول‌های گیاهی با راه‌اندازی شبکه‌های پیام‌رسانی پایین‌دست در سطح مولکولی، نسبت به حمله بیمارگرها پاسخ می‌دهند (Nejat and Mantri 2017). به‌طور کلی، تشخیص بیمارگر توسط گیاه میزبان، موجب فعال شدن آشناسازی از مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شود. در سال‌های اخیر شناسایی و بررسی عملکرد IncRNAهای مرتبط با تنش‌های زیستی مهم شامل بیمارگرهای قارچی، باکتریایی و ویروسی، در گیاهان مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که برخی IncRNAها با اتصال به miRNAها، به‌صورت رقابتی از برهمکنش بین miRNAها و mRNAهای هدف برای تغییر بیان ژن، جلوگیری می‌کنند (Dinger et al. 2009). آن‌ها همچنین می‌توانند به‌عنوان پیش‌سازهای miRNA و siRNA در گیاهان عمل کنند (Hirsch

(et al. 2006; Amor et al. 2009). به عنوان مثال TalncRNA5، TapmlnRNA8 و TapmlnRNA19 به عنوان پیش‌سازهای miRNA، پس از آلودگی ارقام مقاوم و حساس گندم به کپک پودری، دارای افزایش بیان بودند. در واقع افزایش بیان این lncRNAها در پاسخ به آلودگی قارچی القا شد (Xin et al. 2011). همچنین چندین lncRNA پاسخ‌گو به تنش خشکی در ذرت شناسایی شد که به عنوان پیش‌سازهای miRNA و siRNA عمل می‌کنند (Zhang et al. 2014a). در گوجه فرنگی نیز lncRNAها به عنوان شبیه‌ساز هدف miRNAها، در پاسخ به آلودگی ویروسی گزارش شده‌اند (Wang et al. 2015). این یافته‌ها حاکی از نقش حیاتی lncRNAها در تولید miRNA و siRNA در گیاهان و در نتیجه تنظیم پاسخ‌های دفاعی در برابر تنش‌ها، می‌باشد. در مطالعه حاضر تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq منجر به شناسایی ۳۷۴۲ lncRNA در ترنسکرپتوم سیب‌زمینی آلوده به ویروس PVY شد. از بین این تعداد، ۷۶۹ عدد دارای بیان افتراقی ($TPM > 5$) بودند که ۳۱۰ lncRNA کاهش بیان و ۴۵۹ عدد افزایش بیان داشتند. بررسی هستی‌شناسی ژن‌های هم‌بیان با این lncRNAها نشان داد که ژن‌های مربوطه در فرآیندهای زیستی و متابولیکی مختلف، بیوسنتز ترکیبات سلولی، تشکیل کمپلکس‌های پروتئینی و انتقال سیگنال‌ها دارای نقش حیاتی به منظور پاسخ به تنش می‌باشند. همچنین بسیاری از این ژن‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با ایجاد پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان در برابر تنش نقش داشتند. به عنوان مثال ژن‌های دخیل در ایجاد پاسخ به عوامل تنش‌زا، ایجاد پاسخ فوق حساسیت در گیاه، پاسخ به تنش از طریق متابولیسم ترهالوز، پاسخ‌های ضدویروسی مرتبط با خاموشی RNA به واسطه RNAi، پاسخ‌های دفاعی با استفاده از رسوب کالوز در دیواره سلولی که در محدود کردن حرکت ویروس در گیاه نقش دارد، و همچنین ژن‌های مربوط به ایجاد مسیرهای پیام‌دهی به منظور القای مقاومت سیستمیک از طریق جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید دارای هم‌بیانی با lncRNAهای پیش‌بینی شده در این بررسی بودند. همچنین نتایج بررسی برهمکنش lncRNAهای شناسایی شده با miRNAها نشان داد ۵۶ عدد از lncRNAها با ۵ miRNA برهمکنش داشتند. بیشترین برهمکنش با stumiR6024-3p بود و CNT2090250 و stu_ylnC14006 با miRNAهای مشترک برهمکنش نشان دادند. این روابط هم‌بیانی بین RNAها در پاسخ به آلودگی سیب‌زمینی به PVY القا شده است. در مطالعه‌ای مشابه، تجزیه و تحلیل بیان lncRNAها نشان داد که چندین lncRNA مختلف از جمله lincRNA و lincNAT، تنظیم بیان متفاوتی در پاسخ به آلودگی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) در رقم مقاوم این گیاه (CLN2777) داشتند (Wang et al. 2015; Kumar and Chakraborty 2021). برخی از این lncRNAها افزایش بیان و برخی دیگر کاهش بیان نشان دادند. جالب توجه است که بیان lincRNA و miRNA همبستگی منفی داشت، در حالی که بیان lincRNA و ژن‌های هدف miRNA مربوطه در گیاه گوجه فرنگی همبستگی مثبت نشان داد. به عنوان مثال افزایش بیان slylnc0195 در توتون، بیان ۵ ژن هدف miR166 متناظر را به طور قابل توجهی افزایش داد، در حالی که miR166 کاهش بیان داشت (Nejat and Mantri 2017). بر اساس مطالعات، امکان ارتباط پیچیده تنظیم ژن بین mRNA و lncRNA وجود دارد. بررسی پروفایل بیانی گیاهان

برنج آلوده به ویروس کوتولگی نواری سیاه برنج (RBSDV) در مجموع ۱۳۴۲ mRNA و ۲۲ lncRNA با بیان افتراقی (DE) را مشخص کرد (Zhang et al. 2020b). تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی این RNAهای دارای بیان افتراقی، احتمال وجود یک شبکه تنظیم‌کننده ژن را در مسیرهای برهمکنش گیاه-بیمارگر نشان داد. همچنین در این پژوهش مشخص نمودند که آلودگی به RBSDV موجب بیان بسیاری از lncRNAها می‌شود که بیان چندین ژن مفید در مکانیسم دفاعی گیاه و بیماریزایی ویروس را تنظیم می‌کنند. نتایج حاصل از این مطالعه نقش lncRNAها را در تنظیم بیان ژن و پاسخ به شرایط تنش تأیید می‌کند.

تا کنون مکانیسم مولکولی تعداد کمی از lncRNAها در پاسخ به ویروس‌ها درک شده است. شواهد نشان می‌دهد علاوه بر مکانیسم خاموشی ژن پس از ترجمه (PTGS)، برخی lncRNAها به‌عنوان endogenous target mimics (eTM) برای miRNAها در گیاهان عمل می‌کنند. به‌عنوان مثال، خاموشی slylnc0195 از طریق مکانیسم خاموشی ژن القا شده ویروس (VIGS)، منجر به تجمع ویروس در گیاهان توتون، که miR166 را به‌عنوان اهداف احتمالی خود نشان می‌دهند، شده است (Wang et al. 2015). همچنین lncRNALNC_1495 به‌عنوان مقلد miRNA MIR4995-p5_Iss19GC عمل کرده و بیان ژن NAC (Cla010201) را در آلودگی به ویروس موزائیک ماتل سبز خیار (CGMMV) تنظیم می‌کند (Sun et al. 2020). در مطالعه حاضر شناسایی و بررسی عملکرد lncRNAها و برهمکنش آن‌ها با miRNAها انجام و منجر به شناسایی ۳۷۴۲ توالی lncRNA برای اولین بار در ایران در گیاه سیب‌زمینی شد. با مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با سایر مطالعات می‌توان به این نتایج دست یافت که گونه گیاه، مراحل مختلف رشد آن، نوع بافت و شرایط محیطی می‌تواند تأثیر متفاوتی در میزان بیان lncRNAها داشته باشد. یافته‌های ما نشان داد که lncRNAهای شناسایی شده در پاسخ به ویروس Y سیب‌زمینی ممکن است ژن‌های هدف خود را با افزایش یا کاهش بیان تنظیم کنند. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند گامی در جهت درک بهتر lncRNAها و عملکرد آن‌ها در توسعه و اصلاح ارقام متحمل و مقاوم به PVY و همچنین پایه‌ای برای تحقیقات آینده باشد.

نتیجه‌گیری: تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq مربوط به ترنسکرپتوم سیب‌زمینی آلوده به ویروس PVY، منجر به شناسایی ۳۷۴۲ lncRNA شد. از بین این تعداد، ۳۱۰ lncRNA در برابر آلودگی به ویروس، کاهش بیان و ۴۵۹ عدد افزایش بیان نشان دادند. بررسی هستی‌شناسی ژن‌های هم‌بیان با این lncRNAها نشان داد که ژن‌های مربوطه در بيو سنتز ترکیبات سلولی، تشکیل کمپلکس‌های پروتئینی و انتقال سیگنال‌ها دارای نقش حیاتی می‌باشند. همچنین بسیاری از این ژن‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با ایجاد پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان در برابر تنش نقش داشتند. همچنین ژن‌های مربوط به ایجاد مسیرهای پیام‌دهی به منظور القای مقاومت سیستمیک از طریق جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید دارای هم‌بیانی با lncRNAهای پیش‌بینی شده در این بررسی بودند. این روابط هم‌بیانی بین RNAها در پاسخ به آلودگی سیب‌زمینی به PVY القا شده است. بنابراین lncRNAهای شناسایی شده در پاسخ به ویروس Y سیب‌زمینی ممکن است ژن‌های هدف خود را با افزایش یا کاهش بیان تنظیم کنند. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند گامی در جهت درک بهتر lncRNAها و عملکرد آن‌ها در توسعه و اصلاح ارقام متحمل و مقاوم به PVY و همچنین پایه‌ای برای تحقیقات آینده باشد.

سپاسگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از داوران محترم به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری نمایند. همچنین از آقای دکتر ابوذر قربانی به دلیل حمایت‌های معنوی در انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع

- جعفری احمدآبادی سید علی اصغر، عسکری همت حشمت‌اله، محمدآبادی محمدرضا (۱۴۰۲) تاثیر شاهدانه بر بیان ژن DLK1 در بافت قلب بره‌های کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۱)، ۲۱۷-۲۳۴.
- رافعی مهرنوش، عامریان محمدرضا، سرخی بهزاد، حیدری پرویز، اصغری حمیدرضا (۱۳۹۸) اثر براسینواسترئوئید بر عملکرد دانه، برخی از صفات فیزیولوژیکی و بیان ژن‌های مرتبط با مسیر سیگنالینگ این هورمون در گندم تحت تنش خشکی. مجله پژوهش‌های ژنتیک گیاهی، ۶(۲)، ۱۵۷-۱۷۲.
- رئیزی ساداتی سیده یلدا، جهانبخش گده‌کهریز سدابه، عبادی علی، صدقی محمد (۱۳۹۹) مطالعه الگوی بیان برخی عوامل رونویسی در گندم تحت تنش خشکی و تاثیر نانوذره روی. مجله پژوهش‌های ژنتیک گیاهی، ۷(۲)، ۱۳۵-۱۴۴.
- شکری سمیرا، خضری امین، محمدآبادی محمدرضا، خیرالدین حمید (۱۴۰۲) بررسی بیان ژن MYH7 در بافت‌های ران، دست و راسته بره‌های پرواری نژاد کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۲)، ۲۱۷-۲۳۶.
- محمدآبادی محمدرضا، گلکار افروز، عسکری حصنی مجید (۱۴۰۲) اثر رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر بیان ژن فاکتور ۱ رشد شبه انسولین در بافت شکمبه گوسفند کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۴)، ۲۳۹-۲۵۶.

References

- Amor BB, Wirth S, Merchan F, et al. (2009) Novel long non-protein coding RNAs involved in Arabidopsis differentiation and stress responses. *Genome Res* 19, 57-69.
- Amorim MF, Willing EM, Szabo EX, et al. (2018) The *U1* snRNP subunit *LUC7* modulates plant development and stress responses via regulation of alternative splicing. *The Plant Cell* 30, 2838-2854.
- Barzandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016a) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. *Iran J Appl Anim Sci* 6 (3), 571-579 .
- Barzandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016b) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech J Anim Sci* 61, 487.
- Bordbar F, Mohammadabadi M, Jensen J, et al. (2022) Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing. *Animals* 12 (9), e1103.

- Cao W, Gan L, Wang C, et al. (2021) Genome-wide identification and characterization of potato long non-coding RNAs associated with *Phytophthora infestans* resistance. *Front Plant Sci* 12, 619062.
- Chen LL, Carmichael GG (2010) Decoding the function of nuclear long noncoding RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 22, 357-364.
- Cho J (2018) Transposon-derived non-coding RNAs and their function in plants. *Front Plant Sci* 9, 600.
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2017) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res* 46, 49-54.
- Dinger ME, Pang KC, Mercer TR, et al. (2009) NRED: a database of long noncoding RNA expression. *Nucleic Acids Res* 37, 123-126.
- Dupuis B, Nkuriyigoma P, Ballmer T (2023) Economic impact of Potato Virus Y (PVY) in Europe. *Potato Res* 1-18.
- FAO (2020) Statistical databases: agricultural data. <http://faostat.fao.org>.
- Glushkevich A, Spechenkova N, Fesenko I, et al. (2022) Transcriptomic reprogramming, alternative splicing and RNA methylation in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants in response to Potato Virus Y infection. *Plants* 11 (5), 635.
- Hashimoto M, Neriya Y, Yamaji Y, Namba S (2016) Recessive resistance to plant viruses: potential resistance genes beyond translation initiation factors. *Front Microbiol* 7, 1695.
- Hirsch J, Lefort V, Vankersschaver M, et al. (2006) Characterization of 43 non-protein-coding mRNA genes in Arabidopsis, including the *MIR162a*-derived transcripts. *J Plant Physiol* 140, 1192-1204.
- Jafari Ahmadabadi SAA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, et al. (2023) The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 15 (1), 217-234 (In Persian).
- Jha UC, Nayyar H, Jha R, et al. (2020) Long non-coding RNAs: emerging players regulating plant abiotic stress response and adaptation. *BMC Plant Biol* 20, 466.
- Kang YJ, Yang DC, Kong L, et al. (2017) CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res* 45, 12-16.
- Karasev AV, Gray SM (2013) Continuous and emerging challenges of *Potato virus Y* in potato. *Annu Rev Phytopathol* 51, 571-586.
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRbase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 8:47, 155-162.
- Kumar K, Chakraborty S (2021) Roles of long non-coding RNAs in plant virus interactions. *J Plant Biochem Biotechnol* 30, 684-697.

- Li L, Eichten SR, Shimizu R, et al. (2014) Genome-wide discovery and characterization of maize long non-coding RNAs. *Genome Biol* 15, 1-15.
- Liu J, Jung C, Xu J, et al. (2012) Genome-wide analysis uncovers regulation of long noncoding RNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24, 4333-4345.
- Masoudzadeh, S.H., Mohammadabadi, M.R., Khezri, A., et al. (2020) Dlk1 gene expression in different Tissues of lamb. *Iran J Appl Anim Sci* 10, 669-677.
- Mohamadipoor L, Mohammadabadi M, Amiri Z, et al. (2021) Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. *BMC Vet Res* 17 (1), 1-9.
- 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. *Agric Biotechnol J* 15 (4), 239-256 (In Persian).
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542 .
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, Sadkowski T (2022) Identification of Key Genes and Biological Pathways Associated with Skeletal Muscle Maturation and Hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries*, and *Sus scrofa*. *Animals* 12 (24), 3471.
- Nejat N, Mantri N (2017) Emerging role of long non-coding RNAs in plant response to biotic and abiotic stresses. *Crit Rev Biotechnol* 38, 93-105.
- Ospankulova G, Khassanov V, Kamanova S et al. (2022) Effect of infection of potato plants by Potato virus Y (PVY), Potato virus S (PVS), and Potato virus M (PVM) on content and physicochemical properties of tuber starch. *Food Sci Nutr* 11, 4002-4009.
- Patra GK, Gupta D, Rout GR, Panda SK (2023) Role of long non coding RNA in plants under abiotic stresses. *Plant Physiol Biochem* 194, 96-110.
- Raeesi Sadati SY, Jahanbakhsh Godehkahriz S, Ebadi A, Sedghi M (2021) Study of expression pattern of some transcription factors in wheat under drought stress and zinc nanoparticles. *Plant Genet Res* 7 (2), 135-144. (in Persian).
- Rafeie M, Amerian MR, Sorkhi B, et al. (2019) 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 Genet Res* 6, 157-172. (in Persian).
- Ross BT, Zidack N, McDonald R, Flenniken ML (2022) Transcriptome and small RNA profiling of *Potato virus Y* infected potato cultivars, including systematically infected Russet Burbank. *J Viruses* 14, 523.

- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13 (1), e14.
- Shafiq S, Li J, Sun Q (2015) Functions of plant long non-coding RNAs. *Biochim Biophys Acta* 1867, 165957.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2022) Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. *Gene Express* 21 (2), 21-26.
- Sharma S, Taneja M, Tyagi S, et al. (2017) Survey of high throughput RNA-Seq data reveals potential roles for lncRNAs during development and stress response in bread wheat. *Front Plant Sci* 8, 1019.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O et al. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13 (11), 2498-2504.
- Shokri S, Khezri A, Mohammadabadi M, Kheyroodin H (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. *Agric Biotechnol J* 15 (2), 217-236 (In Persian).
- Singh U, Khemka N, Rajkumar MS, et al. (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 Res* 45, 22.
- Solomon-Blackburn RM, Barker H (2001) A review of host major-gene resistance to *potato viruses X, Y, A and V* in potato: gene, genetics and mapped location. *J Hered* 86, 8-16.
- Sun Y, Zhang H, Fan M, et al. (2020) Genome-wide identification of long non-coding RNAs and circular RNAs reveal their ceRNA networks in response to *cucumber green mottle mosaic virus* infection in watermelon. *Arch Virol* 165, 1177-1190.
- Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. (2023) The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res* 51, 638-646.
- Tarifeno-Saldivia E, Valenzuela-Miranda D, Gallardo-Escarate C (2017) In the shadow: the emerging role of long non-coding RNAs in the immune response of Atlantic salmon. *Dev Comp Immunol* 73, 193-205.
- Trivedi PK, Asif MH (2019) Updates on plant long non-coding RNAs (lncRNAs): the regulatory components. *PCTOC* 140, 259-269.
- Wang Y, Wang X, Deng W, et al. (2014) Genome features and regulatory roles of intermediate-sized non-coding RNAs in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 7, 514-527.

- Wang J, Yu W, Yang Y, et al. (2015) Genome-wide analysis of tomato long non-coding RNAs and identification as endogenous target mimic for microRNA in response to TYLCV infection. *Sci Rep* 5, 16946.
- Waseem M, Liu Y, Xia R (2021) Long non-coding RNAs, the dark matter: an emerging regulatory component in plants. *Int J Mol Sci* 22, 86.
- Wu X, Valli A, Antonio Garcia J, et al. (2019) The tug-of-war between plants and viruses: great progress and many remaining questions. *J Viruses* 11, 203.
- Xin M, Wang Y, Yao Y, et al. (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 Biol* 11, 61.
- Yang Y, Liu T, Shen D, et al. (2019) *Tomato yellow leaf curl virus* intergenic siRNAs target a host long noncoding RNA to modulate disease symptoms. *PLOS Pathog* 15, 1.
- Zhan X, Qian B, Cao F, et al. (2017) An Arabidopsis *PWI* and *RRM* motif-containing protein is critical for pre-mRNA splicing and ABA responses. *Nat Commun* 6, 8139.
- Zhang C, Tang G, Peng X, et al. (2018) Long non-coding RNAs of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) in multiple dehydration stresses. *BMC Plant Biol* 18, 79.
- Zhang H, Guo H, Hu W, Ji W (2020a) The emerging role of long non-coding RNAs in plant defense against fungal stress. *Int J Mol Sci* 21, 2659.
- Zhang T, Liang Q, Li C, et al. (2020b) Transcriptome analysis of rice reveals the lncRNA-mRNA regulatory network in response to *Rice Black-Streaked Dwarf Virus* infection. *J Viruses* 12, 951.
- Zhang W, Han Z, Guo Q, et al. (2014a) Identification of maize long non-coding RNAs responsive to drought stress. *PLOS ONE* 9, 6.
- Zhang YC, Liao JY, Li ZY, et al. (2014b) Genome-wide screening and functional analysis identify a large number of long noncoding RNAs involved in the sexual reproduction of rice. *Genome Biol* 15, e512.
- Zheng W, Hu H, Lu Q, et al. (2021) Genome-wide identification and characterization of long noncoding RNAs involved in *Chinese Wheat Mosaic Virus* infection of *Nicotiana benthamiana*. *J Biol* 10, e232.
- Zhou Y, Cho WK, Byun HS, et al. (2019) Genome-wide identification of long non-coding RNAs in tomato plants irradiated by neutrons followed by infection with *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*. *Peer J* 28, e7.