

## **Expression analysis of some long non-coding RNAs in sugarcane variety cp73-21 in response to cold stress**

### **Fatemeh Sadonni**

MSc degree of Plant Breeding, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail address: fatemehsadooni76@gmail.com

### **Leila Nejadi Sadeghi**

\*Corresponding author. Assistant Professor, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail address: L.nejadi Sadeghi@scu.ac.ir

### **Karim Sorkheh**

Associate Professor, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail address: k.sorkheh@scu.ac.ir

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

Sugarcane is one of the most important industrial plants used in sugar production, as well as in the generation of biofuels such as bioethanol and electricity. This plant is native to tropical regions, and cold stress is considered the most significant environmental factor limiting sugarcane growth. According to available information, some long non-coding RNAs (lncRNAs) play a significant role in adapting to environmental stresses, including cold stress.

#### **Materials and Methods**

In this research, after obtaining the sugarcane reference genome from the NCBI database and aligning the sequences, gene frequency was estimated using RSEM software. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using the edgeR software package. Subsequently, BLAST2GO was employed to perform gene ontology analysis and classify genes into cellular, molecular, and biological categories.

#### **Results**

Based on bioinformatics analysis, 170 genes showed differential expression under stress

conditions, and 64 lncRNAs were identified using four parameters: sequence length, CNCI, CPC2, and ORF. Since their target genes are linked to cold stress, the expression changes of five lncRNAs were evaluated for the CP73-21 variety. For this purpose, leaves from 8-week-old sugarcane seedlings treated at 4°C for 0, 12, 24, and 48 hours in three biological replicates were used. To confirm the effect of cold stress on the seedlings, the physiological damage indices ELI and MDA were measured. Both ELI and MDA indices increased over time. According to bioinformatics analysis conducted with edgeR, the expression of lncRNAs coded as numbers 1, 3, and 5 increased during cold stress, whereas the expression of lncRNAs coded as numbers 2 and 4 decreased. Examining the relative expression levels of the target genes coding for Cpn60, Zipper family gene, WRKY, SAT1, and CBF revealed an increase in expression for all five genes, generally following an upward trend over time.

### Conclusions

Based on the present study, the increased expression of these genes and their associated lncRNAs compared to the control plant suggests enhanced plant tolerance to temperature stresses, including cold stress.

**Keywords:** cold stress, lncRNA, sugarcane

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Sadonni F, NejadSadeghi L, Sorkheh K (2024) Expression analysis of some long non-coding RNAs in sugarcane variety cp73-21 in response to cold stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 17 (1), 97-120.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 17 (1), 97-120.

DOI: 10.22103/jab.2025.24157.1624

Received: November 21, 2024.

Received in revised form: January 15, 2025.

Accepted: January 16, 2025.

Published online: January 30, 2025.

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



© the authors

## تجزیه و تحلیل بیان برخی از RNAهای طولانی غیرکدکننده در نیشکر رقم CP73-21 در

### پاسخ به تنش سرما

فاطمه سعدونی

دانش اموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز،

اهواز، ایران. رایانامه: fatemehsadooni76@gmail.com

لیلا نژادصادقی 

\*نویسنده مسئول: استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

رایانامه: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir

کریم سرخه

دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه:

k.sorkkeh@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۷

### چکیده

**هدف:** نیشکر از جمله مهمترین گیاهان صنعتی مورد استفاده در تولید شکر است که برای تولید ساخت سوخت‌های زیستی از جمله بیواتانول و برق نیز کاربرد دارد. این گیاه بومی مناطق گرمسیری است و تنش سرما جدی‌ترین تنش محیطی برای رشد نیشکر محسوب می‌شود. بر اساس اطلاعات موجود، برخی از RNAهای طولانی غیررمزکننده (RNA طولانی غیرکدکننده) در ایجاد سازگاری نسبت به تنش‌های محیطی و از جمله سرما نقش به‌سزایی دارند.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش پس از دریافت ژنوم مرجع نیشکر از پایگاه داده‌ی NCBI و هم‌ردیفی توالی‌ها، فراوانی ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار RSEM، تخمین زده شد. سپس به منظور به‌دست آوردن ژن‌های افتراقی از بسته‌ی نرم‌افزاری edgeR استفاده شد. در ادامه با استفاده از BLAST 2go هستی‌شناسی و طبقه‌بندی ژن‌ها به دسته‌های سلولی، مولکولی و بیولوژیکی انجام شد.

**نتایج:** بر اساس آنالیزهای بیوانفورماتیک تعداد ۱۷۰ ژن در شرایط تنش، بیان افتراقی (DEG) نشان دادند این ژن‌ها با بهره‌گرفتن از چهار شاخص طول توالی، CNCI، CPC2، ORF و تعداد ۶۴ RNA طولانی غیرکد کننده شناسایی شدند و با در نظر گرفتن مرتبط بودن ژن هدف آن‌ها با تنش سرما، ارزیابی تغییرات بیان پنج RNA طولانی غیرکد کننده برای رقم CP73-21 صورت گرفت. برای این منظور برگ گیاهچه‌های هشت هفته‌ای نیشکر تیمار شده در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ ساعت در ۳ تکرار زیستی استفاده و برای اطمینان از تأثیر تنش سرما بر گیاهچه‌ها، شاخص خسارت فیزیولوژیکی ELI و MDA نیز اندازه‌گیری شد. میزان به‌دست آمده هر دو شاخص ELI و MDA در طول زمان روند افزایشی داشت. بر اساس آنالیزهای بیوانفورماتیکی صورت گرفته با edgeR بیان RNA طولانی غیرکد کننده‌های رمزگذاری شده با اعداد یک، سه و پنج در طی تنش سرما افزایشی و بیان RNA طولانی غیرکد کننده کد چهار و دو کاهشی بود. بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های هدف RNA طولانی غیرکد کننده‌ها به ترتیب کدگذاری *Cpn60*، *WRKY Zipper family gene*، *SAT1* و *CBF* برای هر ۵ ژن افزایش نشان داد و به‌طور کلی افزایش مشاهده شده در طی زمان، روند صعودی در پی داشت.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که بالا رفتن میزان بیان این ژن‌ها و RNA طولانی غیرکد کننده مرتبط با آن‌ها نسبت به گیاه شاهد، می‌تواند بیانگر افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌های دمایی و از جمله تنش سرما باشد.

**کلیدواژه‌ها:** اران‌ای‌های طولانی غیر رمز کننده، تنش سرما، نیشکر

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** سعدونی فاطمه، نژادصادقی لیلا، سرخه کریم (۱۴۰۳) تجزیه و تحلیل بیان برخی از RNAهای طولانی غیرکدکننده در نیشکر رقم CP73-21 در پاسخ به تنش سرما. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۱)، ۹۷-۱۲۰.

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



© the authors

## مقدمه

نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان تجاری جهان است که علاوه بر تامین ۷۰ درصد شکر مصرفی جهان (Neisi et al. 2022)، فراورده‌های جانبی آن مثل باگاس، سرشاخه، ملاس و فیلتر کیک در صنایع مختلفی از قبیل تولید کاغذ، سوخت زیستی، نئوپان، خمیرمایه، الکل، سرکه، باگاس، خوراک دام و غیره کاربرد دارند (Clauser et al. 2016; Pandey et al. 2000). شرایط آب و هوایی در رشد و عملکرد گیاه نیشکر بسیار حائز اهمیت است و دمای پایین باعث کاهش این دو صفت می‌شود (Neisi et al. 2022; Zhang et al. 2022). مناسب‌ترین شرایط دمایی برای رشد نیشکر دماهای ۲۷ تا

۳۸ درجه سلسیوس است، در دمای ۲۱ درجه سلسیوس با کاهش رشد و در دمای کمتر از ۱۱ درجه سلسیوس با توقف رشد مواجه می‌شود (Huang et al. 2022; Li & Yang 2015; Yang et al. 2016; Zhang et al. 2015). اولین اثر تنش سرما بر فرایند فتوسنتز و رنگدانه‌های فتوسنتزی است، مطالعات قبلی بر روی ارقام حساس و متحمل نیشکر نشان داده است که کاهش دما موجب کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی در همه‌ی ارقام نیشکر می‌شود اما این کاهش در ارقام حساس بیش‌تر است، همچنین در ارقام حساس میزان نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید با تغییر دما از ۲۵ به ۴- درجه سلسیوس به میزان بیشتری افزایش داشته است. محتوای پرولین و کل کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC) برگ در شرایط تنش سرما به‌ویژه در رقم متحمل افزایش معنی‌داری نشان داد. تحت تنش سرما، فعالیت کاتالاز نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت و با محتوای پرولین هم‌بستگی منفی نشان داد، از سوی دیگر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در تمامی ارقام به‌ویژه در ارقام متحمل بیش‌تر از نمونه شاهد بود (Neisi et al. 2022). مالون دی‌آلدئید یک اسیدچرب غیراشباع است و زمانی که گیاه در معرض تنش سرما قرار می‌گیرد، مالون دی‌آلدئید تولید می‌شود. بنابراین مالون دی‌آلدئید به‌عنوان یک نشانگر جهت مشخص کردن شدت آسیب‌های اکسیداتیو به لیپیدها به‌کار می‌رود (Queiroz et al. 2011). محتوای مالون دی‌آلدئید می‌تواند درجه پراکسیداسیون چربی غشای سلولی و میزان آسیب در سلول را نشان دهد، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء منجر به خسارت به غشاهای سلولی و افزایش نفوذپذیری غشاء و کاهش شاخص پایداری غشاء می‌گردد. با کاهش در توان آنتی‌اکسیدانی گیاه تخریب غشاهای فسفولیپیدی افزایش یافته و میزان غلظت مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخصی از تخریب غشاء نیز افزایش می‌یابد (Kim et al. 2001). علاوه‌براین، اپی‌ژنوم شامل مکانیسم‌های مختلفی است، به‌عنوان مثال متیلاسیون DNA، بازسازی مجدد، اصلاحات دم هیستون، microRNAهای کروماتین و RNAهای بلند غیر کدکننده، با عوامل محیطی مانند تغذیه، عوامل بیماری‌زا، و آب و هوا برای تأثیر بر مشخصات بیان ژن‌ها و ظهور فنوتیپ‌های خاص در تعامل هستند (Barazandeh et al. 2016). تعاملات چند سطحی بین ژنوم، اپی‌ژنوم و عوامل محیطی ممکن است رخ دهد. همچنین، شواهد متعددی حاکی از تأثیر تنوع اپی‌ژنوم بر سلامت و تولید است (Mohammadinejad et al. 2024). مطالعات و بررسی‌های به‌عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند. بیان ژن‌های یوکاریوتی به‌طور موقت و چند بعدی کنترل می‌شود. تنها مجموعه نسبتاً کوچکی از کل ژنوم در هر نوع بافت بیان می‌شود و بیان ژن‌ها به مرحله رشد بستگی دارد (Khabiri et al. 2023; Jafari Ahmadabadi et al. 2023). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت خاص است (Mohammadabadi et al. 2023). همچنین میزان فرآورده‌های ژنی که در همان بافت و همچنین سایر بافت‌های سازنده آن محصول ساخته می‌شود، بیان آن ژن را تنظیم می‌کند. تولید متابولیت‌ها تحت کنترل ژنتیکی است ولی عوامل محیطی بویژه شرایط تنش‌زا نقش عمده‌ای در کمیت و کیفیت این مواد به‌عهده دارند (Mohammadinejad et al. 2022; Mohammadabadi et al. 2023). یکی از اقدامات اساسی در به‌نژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها، پروتئین‌های و متابولیت‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Shahsavari

(et al. 2023; Shokri et al. 2023). بنابراین، در دسترس بودن ابزارهای ژنومی می‌تواند اصلاح نژاد را در زمان کوتاه‌تر تا حد زیادی افزایش دهد. این ابزارها از جمله آنالیز بیان ژن برای تسهیل شناسایی ژن‌های مقاوم در حال توسعه هستند و بررسی الگوی بیان ژن‌ها و مشخص کردن ژن‌های مقاوم به خشکی، شوری، سرما، گرما، یسماری‌ها و بسیاری از ناملايمات ديگر در این راستا انجام می‌گیرد (Mohammadabadi et al. 2024). از دیدگاه مولکولی چاپرون‌ها در ایجاد تاخوردگی صحیح پروتئین و تصحیح آن نقش دارند (Maguire et al. 2002; Peng et al. 2011)، بیان بالای ژن سنتز کننده چاپرون‌ها در گیاهچه‌های آراییدوپسیس با افزایش بیان ژن Cpn60 در نهایت منجر به متحمل شدن آن‌ها نسبت به تنش سرما می‌شود (Melencion et al. 2017). این ژن در کلروپلاست و کلروفیل گیاه حضور دارد، همان‌گونه که اشاره شد اولین اثر تنش دمایی بر فرایند فتوسنتز و رنگدانه‌های فتوسنتزی است، از این‌رو افزایش بیان ژن Cpn60 در اثر تنش‌های دمایی به علت تأثیر مثبت بر عملکرد فرایند فتوسنتز و تعدیل اثرات زیان‌بار تنش، در نهایت گیاه را نسبت به تنش‌های دمایی متحمل خواهد ساخت (Jiang et al. 2014; Maguire et al. 2002). علاوه بر ژن‌های کلیدی، فاکتورهای رونویسی چون فاکتور رونویسی C-repeat-binding factors (CBFs) از عوامل تأثیرگذار در تحمل گیاهان نسبت به تنش سرماست، به‌گونه‌ای که با افزایش بیان ژن Cold on regulated (COR) نقش کلیدی در متحمل بودن گیاه به تنش سرما ایفا می‌کند (Wang et al. 2019; B.-Q. Zhang et al. 2022). از طرفی RNAهای طولانی غیرکدکننده (RNA طولانی غیرکدکننده) نوعی RNA با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که فرایند بیان ژن را در سطح رونویسی، پس از رونویسی و در سطح اپی‌ژنتیک تنظیم می‌کنند و در فرایندهای بیولوژیکی چون همانندسازی، بازسازی کروماتین، آغاز رونویسی و فعال‌سازی آن، تداخل در رونویسی و مختل ساختن چرخه سلولی نقشی مهم دارند (Sun et al. 2018; Wang et al. 2023). این گروه از RNAها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند و بر اساس گزارش‌های موجود در ایجاد مقاومت به خشکی، مقاومت به نمک، مقاومت در برابر بیماری‌ها و ایمنی گیاهان موثر می‌باشند (Sun et al. 2018). بسیاری از RNA طولانی غیرکدکننده‌ها در شرایط پاسخ گیاه به تنش سرما، شناسایی شده‌اند و مطالعه روی آن‌ها به عنوان یکی از راهکاری اصلاحی گیاهان مطرح است (Li et al. 2022). به‌عنوان مثال برای بررسی نظریه نقش RNA طولانی غیرکدکننده‌ها در تنش سرما در پنبه، ده RNA طولانی غیرکدکننده به‌عنوان کاندید انتخاب شدند و به‌صورت جداگانه بیان آن‌ها خاموش شد و دو RNA طولانی غیرکدکننده به‌عنوان عامل ایجاد کننده تحمل نسبت به سرما و دیگری به‌عنوان RNA طولانی غیرکدکننده حساسیت‌زا نسبت به تنش سرما معرفی شد (Cao et al. 2021) که از اطلاعات حاصل از آن می‌توان در دست‌یافتن به گیاه تراریخت متحمل نسبت به این تنش استفاده کرد. رقم CP73-21 رقمی زودرس، با درصد قند بالا و عملکرد خوب می‌باشد که نسبت به سرما تحمل نسبی دارد، بر اساس گزارش‌های موجود این رقم نسبت به بیماری سیاهک ساقه مقاوم، نسبت به بیماری موزاییک نیشکر و آفت ساقه‌خواران نیشکر (سزامیا) نسبتاً مقاوم و نسبت به بیماری کوتولگی راتون نیشکر نیمه‌حساس می‌باشد. بررسی گیاهچه‌های سه رقم حساس، نیمه‌حساس و مقاوم (CP73-21) نیشکر نسبت به بیماری سیاهک نشان داد با وجود ژنوم

قارچ در تمامی قسمت‌های گیاهچه‌های مایه‌زنی شده در هر سه رقم مورد مطالعه و نیز حضور علائم بیماری در دو رقم حساس و نیمه حساس، در رقم مقاوم CP73-21 هیچ‌گونه علائمی از بیماری سیاهک مشاهده نشد. ارزیابی سه رقم خیلی‌زودرس (CP57-614)، زودرس (CP73-21) و میان‌رس نیشکر (CP69-1062) از نظر تأثیر تاریخ کشت بر استقرار گیاهچه‌های نیشکر و عملکرد نشان داد که رقم CP73-21 سریع‌ترین شروع، تکمیل و سرعت سبز شدن را دارد و در تمام تاریخ‌های کاشت نسبت به سایر ارقام ثبات و یکنواختی رفتار بیشتری را دارا بود، هرچند این رقم از نظر سطح سبز تولید شده نتیجه مناسبی را بدست نیاورد و رقم-CP69-1062 به علت دارا بودن تعداد برگ و متوسط سطح تک برگ بیشتر، توانست بیشترین سطح سبز را تولید کند. در اختیار داشتن ژرم‌پلاسمی که دربردارنده‌ی منابع مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، میزان بالای ساکارز در بافت ساقه برای داشتن بالاترین درصد شکر تولیدی و یا بیومس و ترکیبات لیگنوسلولزی و فیبر بالا در جهت تولید اتانول لیگنوسلولزی بسیار حائز اهمیت است، بررسی ارقام نیشکر خوزستان حاکی از این بود که ارقامی چون CP73-21، CP75-1353 و CP81-1254 دارای مقادیر بالایی از عملکرد بریکس و شکر بودند (Shadmehr et al. 2017). بر اساس مطالعات صورت گرفته و ارایه شده در به نظر می‌رسد که رقم CP73-21 علاوه بر داشتن مقاومت نسبی نسبت به تنش سرما که چالش اصلی صنعت نیشکر خوزستان است، توانسته عملکرد قابل قبول و تحمل بالا نسبت به بسیاری از آفات و بیماری‌های مطرح برای این گیاه، داشته باشد از این‌رو با توجه به مشکلات ناشی از سرمازدگی در کشت نیشکر در شرایط آب و هوایی خوزستان، در راستای افزایش اطلاعات در زمینه مولکولی و پاسخ گیاه به تنش سرما، برای بررسی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با تنش سرما در رقم CP73-21 (که رقمی با تحمل نسبی نسبت به تنش سرما می‌باشد)، مطالعه‌ی حاضر به بررسی تغییرات بیان RNA طولانی غیرکد کننده مرتبط با تنش سرما و ژن‌های هدف آن‌ها در رقم CP73-21 پرداخته است.

## مواد و روش‌ها

**آنالیزهای بیوانفورماتیک:** داده‌های RNA- Sequencing نیشکر تحت تنش سرما با هدف یافتن RNA طولانی غیرکد کننده، از پایگاه داده SRA سایت NCBI دریافت گردید (جدول ۱). ارزیابی کیفیت توالی‌ها با استفاده نرم افزار FastQC (ver. 0.11.20) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) تحت سیستم عامل لینوکس (Andrews 2010) و ویرایش توالی‌ها با هدف حذف آداپتورها، حذف نوکلئوتیدها و خوانش‌های با کیفیت پایین و نیز بررسی کیفیت بازها در انتهای ۳' و ۵' با کمک نرم‌افزار Trimmomatic (version 0.36) انجام شد (Bolger et al. 2014). پس از دریافت ژنوم مرجع نیشکر از پایگاه داده‌ی NCBI، هم‌ردیفی توالی‌ها با ژنوم مرجع با استفاده از نرم‌افزار Bowtie2 صورت گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار RSEM فراوانی ژن‌ها، تخمین زده شد (Li & Dewey 2011) و برای نرمال‌سازی و بدست آوردن تفاوت

بیان از بسته‌ی نرم‌افزاری edgeR<sup>۱</sup> استفاده شد. در ادامه با استفاده از BLAST 2go هستی‌شناسی<sup>۲</sup> و طبقه‌بندی ژن‌ها به دسته‌های سلولی، مولکولی و بیولوژیکی انجام شد. برای اطمینان از RNA طولانی غیرکد کننده شناسایی شده، ویژگی‌هایی چون چهارچوب قرائت خوانش (ORF)، طول RNA طولانی غیرکد کننده، شاخص رونوشت‌های کدکننده بالقوه (CPC) و شاخص غیرکدشونده (CNCI) بررسی گردید.

#### جدول ۱. اطلاعات توالی‌های دریافت شده از پایگاه داده SRA

Table 1. Sequence information obtained from SRA database

Accession Number	شماره دسترسی	Cultivar	رقم
SRR7630464_1.fastq.gz		GT08-	1108
SRR7630471_1.fastq.gz		GT08-	1108
SRR7631905_2.fastq.gz		GT08-	1108
SRR7641179_1.fastq.gz		ROC22	
SRR7641424_2.fastq.gz		ROC22	
SRR7641466_1.fastq.gz		ROC22	
SRR7641605_2.fastq.gz		ROC22	

در مبحث مستندسازی RNA طولانی غیرکد کننده طول توالی ORF کمتر از ۳۰۰ و بیش‌تر از ۲۰۰ باز قابل قبول است و برای شناسایی ORF از نرم‌افزار TransDecoder (version 5.5.0) تحت محیط لینوکس است استفاده شد. CPC یک ابزار محاسبه پتانسیل رمزکننده پروتئین است ([www.cpc2.cbi.pku.edu.cn](http://www.cpc2.cbi.pku.edu.cn)) که بر اساس هم‌ترازی توالی با پایگاه‌های داده پروتئین شناخته شده و ویژگی‌های توالی بیولوژیکی رونوشت‌ها است و زمانی که کمتر از ۱ باشد RNA غیرکدکننده است. CNCI روشی برای تشخیص رونوشت‌های غیر کد کننده از رونوشت‌های کد کننده هست که می‌تواند به‌طور موثر رونوشت‌های ناقص و رونوشت‌های آنتی سنس را پیش‌بینی کند. رونوشت‌ها زمانی که امتیاز کمتر مساوی از صفر داشته باشند غیر کد کننده محسوب می‌شوند. برای بررسی CNCI از نرم‌افزار TransDecoder (version 5.5.0) استفاده شد. پس از غربال کردن توالی‌ها و انتخاب توالی‌های دارای مشخصات RNA طولانی غیرکد کننده نمودار توالی‌ها به‌صورت آنلاین تحت وب با آدرس <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn> رسم شد و توالی‌های مشترک دارای ویژگی‌های RNA طولانی غیرکد کننده انتخاب شدند. سپس برای شناسایی ژن هدف این توالی‌ها از PsRNATarget ([www.zhaolab.org/psRNATarget](http://www.zhaolab.org/psRNATarget)) استفاده شد. در ادامه شبکه پروتئینی برای نشان دادن برهمکنش پروتئین‌ها با هم و

<sup>1</sup> Bioconductor edgeR

<sup>2</sup> Gene Ontology (GO)



رابطه متقابل آن‌ها در پایگاه ارتباطی پروتئین (www.string-db.org) STRING protein interaction database ترسیم شد. همچنین برای اندازه‌گیری درصد انرژی و ترسیم ساختار ثانویه توالی‌ها از وب سایت RNA Folding Form (www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php) و فرمت FASTA استفاده شد. به منظور تأیید صحت نتایج طراحی آغازگر برای ۵ ژن انتخاب شده و ژن کنترل داخلی اکتین با استفاده از وب سایت Primer3Plus (www.primer3plus.com/index.html) انجام و برای کیفیت‌سنجی آن‌ها از وب سایت Beacon Designer (www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1) استفاده شد (جدول ۲).

#### جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در تجزیه و تحلیل qRT-PCR.

**Table 1. Characteristics of the primers used in qRT-PCR analysis.**

نام ژن و آغازگر Gene and primer names	توالی رفت آغازگر Primer sequence (3' to 5')	توالی برگشت آغازگر Primer sequence	دمای اتصال Annealing temperature
AT5G56500 (TCP-1/cpn60)	ATGGCATCGACATTCCTGC	ACTCCTTGGCTGCACATACT	57
AT2G34710 (zipper family)	TCACCAAGATGCCATCCTGT	ACAGATAGCCTTACGACCCG	57
AT3G62340 (WRKY family)	AAGCGTTTGGGATTTCCGAG	TCTGACGGTGGAGCTTGAAT	57
AT1G55920 (serine acetyltransferase (SAT1))	CTTTTAGACCATGCGACGGG	ACTCCCAGCTCCAATCAACA	57
AT4G25470 (C-repeat-binding factors (CBFs))	TTTCAAACCGCTGAGATGGC	GTCGTCGCATCACACATCTC	57
Actin	GCTGGTTTTGCTGGTGATGA	CAATCGGGTACTTGAGCGTG	57

**کشت و تیمار:** آزمایش حاضر در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ در آزمایشگاه فیزیولوژی مولکولی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد. در این راستا گیاهچه‌های نیشکر رقم CP73-21 (رقم نسبتاً متحمل به سرما) از مرکز تحقیقات و آموزش نیشکر خوزستان تهیه شد و برای سازگاری در محیط جدید به مدت هشت هفته در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. خاک گلدان‌ها حاوی خاک مزرعه، ماسه و خاک برگ به نسبت مساوی بود. پس از گذشت مرحله سازگاری تنش سرما (۴ درجه سلسیوس) اعمال (Yang et al. 2017) و نمونه‌برداری از برگ نیشکر در سطوح زمانی ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش، در سه تکرار زیستی (سه گیاهچه برای هر یک از تیمارهای زمانی) صورت گرفت. برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون غشا با نشانگر مالون دی‌آلدئید (برحسب میکرومول در هر گرم وزن تر گیاه) به ۰/۵ گرم نمونه برگ تازه‌ی پودر شده، ۵ میلی‌لیتر بافر

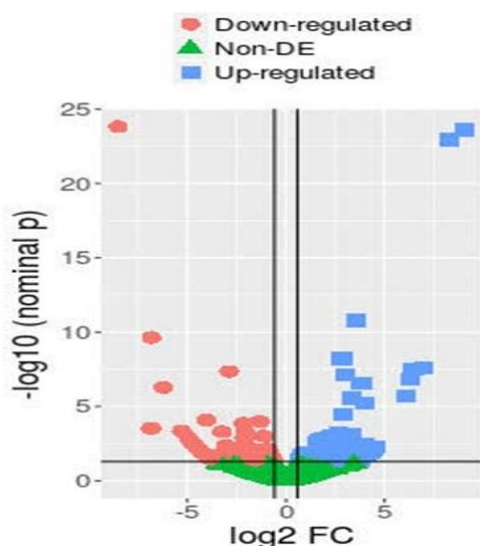
پتاسیم فسفات (۵۰ میلی‌مولار) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با ۱۴۰۰۰ دور انجام شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از فاز رویی برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد اسید تیوباریتوریک (وزنی/حجمی) (حاوی اسید تری کلرواستیک ۲۰ درصد (وزنی/حجمی) افزوده گردید. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت و بلافاصله ۳۰ دقیقه نیز در حمام یخ نگهداری شد. سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور صورت گرفت، فاز رویی برداشته شد و میزان جذب نوری در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. B عرض کوت و معادل یک سانتیمتر و  $\Delta A$  برابر با تفاضل جذب‌ها می‌باشد. برای اندازه‌گیری شاخص نشت الکترولیت، به ۸۰ میلی‌گرم بافت برگ ۱۰ سی‌سی آب مقطر افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفت، پس از سپری شدن این مدت میزان EC نمونه‌ها قرائت شد. پس از برگرداندن نمونه‌ی قرائت شده به میکروتیوب حاوی برگ، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد و مجدد EC نمونه قرائت گردید، در پایان مقدار شاخص خسارت بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (Campos et al. 2009; Popova et al. 2003) و آنالیز داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در نرم‌افزار R صورت گرفت. به منظور ارزیابی تغییرات الگوی بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه، در اولین مرحله استخراج RNA کل از برگ‌های نیشکر برای هر سطح تیمار زمانی بر اساس دستورکار شرکت سازنده (Anazol- Trizol- RNXPLUS شرکت Anacell) صورت گرفت. سپس با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین کمی و کیفیت نمونه‌های RNA انجام شد. برای حذف ژنوم احتمالی استخراج شده در نمونه‌های RNA، از آنزیم DNaseI (شرکت SinaClon با شماره دسترسی MO5401) بر اساس دستورکار شرکت سازنده استفاده شد. در ادامه رشته اول cDNA با آغازگر الگو dt از ۱۰۰۰ نانوگرم نمونه‌ی RNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر طبق دستورکار شرکت سازنده (شرکت Anacell با شماره Lot n: CS0025) سنتز گردید و برای انجام مراحل بعدی آزمایش به فریزر -۲۰ درجه سلسیوس انتقال یافت. برای بررسی میزان بیان نسبی نمونه‌ها، واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت سایبرگرین High ROX (شرکت Ampliqon به شماره دسترسی ID No. 5000830) و دستگاه Step one (شرکت ABI، امریکا) در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی انجام شد. در ادامه تجزیه و تحلیل نتایج Real-time PCR با استفاده از نرم‌افزار REST<sup>®</sup> و روش  $\Delta\Delta CT$  (Livak & Schmittgen 2001) صورت گرفت و میزان بیان نسبی هر نمونه بر اساس بیان ژن مرجع محاسبه شد.

## نتایج و بحث

**تجزیه و تحلیل بخش بیوانفورماتیک:** آنالیز کنترل کیفیت توالی‌های دانلود شده‌ی نیشکر، میانگین درصد محتوای GC بین ۴۵ الی ۵۵ درصد، N50<sup>3</sup> با طول تقریبی ۱۱۵۵ جفت باز و ۸۳۸۴۱۵ ژن را ارایه کرد که با اطلاعات موجود در

N50<sup>3</sup> مربوط به میانه متوسط طول مجموعه ای از توالی‌ها است. مقدار آن نشان‌دهنده طول کوتاه‌ترین خوانش در گروه طولانی‌ترین توالی‌ها است که با هم ۵۰ درصد از نوکلئوتیدهای مجموعه توالی‌ها را نشان می‌دهند.

سایر گزارش‌ها هم‌خوانی نشان داد (Dharshini et al. 2016; Zhao et al. 2023; Zhou et al. 2022). پس از هم‌ردیفی توالی با ژنوم مرجع و تعیین تعداد ژن‌ها با کمک نرم‌افزارهای Bowtie و RSEM با استفاده از نرم‌افزار EdgeR تعداد ۱۷۰ ژن با بیان افتراقی شناسایی شد که در این بین ۸۸ ژن افزایش و ۸۲ ژن کاهش بیان را نشان دادند (شکل ۱).

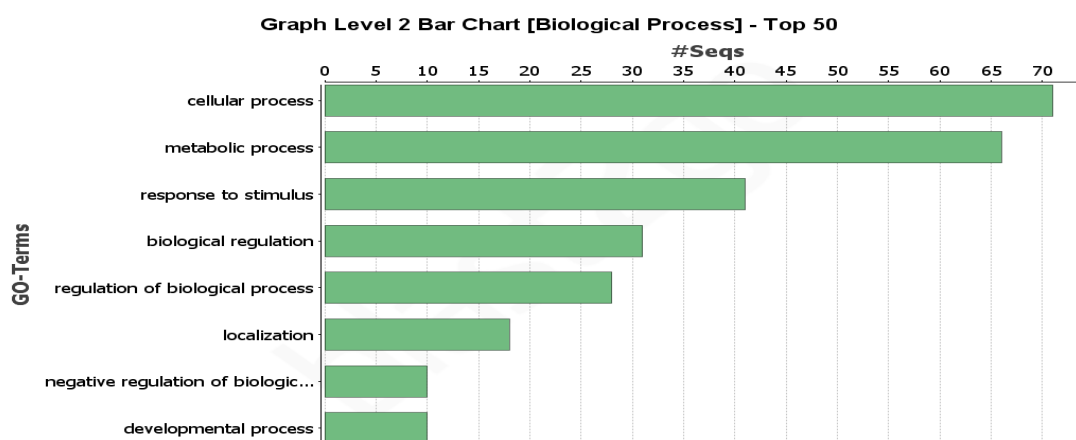


شکل ۱. نمودار ژن‌های افتراقی EdgeR. محور X مقادیر  $\log_2 FC$  را نشان می‌دهد، در حالی که  $-\log_{10}$  در محور Y نشان داده شده است. نقاط آبی مربوط به ژن‌های افزایش بیان هستند. نقاط قرمز مربوط به ژن‌های با کاهش بیان هستند. نقاط سبز مربوط به ژن‌های بدون تغییر بیان هستند

**Figure 1.** plots for DEGs from EdgeR. X axis represents  $\log_2 FC$  values, while the  $-\log_{10}$  is depicted on the Y axis. Blue dots correspond to up-regulated genes. Red dots correspond to down-regulated genes. Green dots correspond to non-DEGs

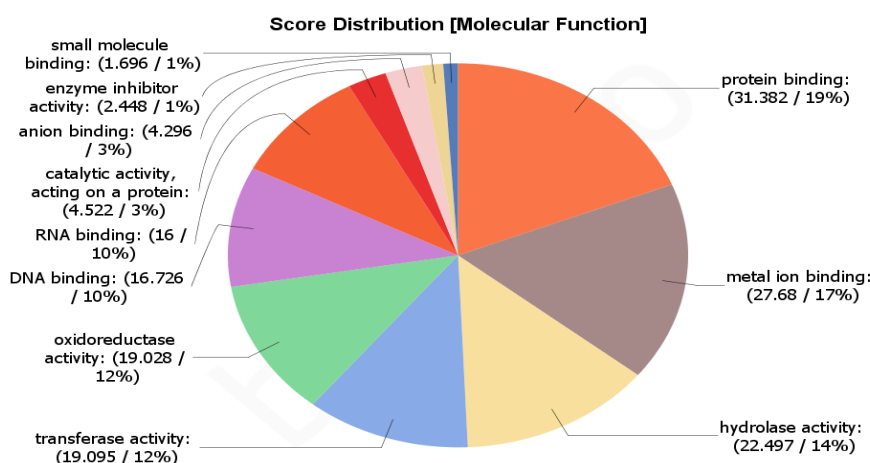
در ادامه هستی‌شناسی ژن با استفاده از نرم‌افزار BLAST 2go ژن‌ها را در سه دسته‌ی فرایندهای بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و موقعیت سلولی جای داد. در دسته‌ی فرایندهای زیستی، فرایندهای سلولی و فرایندهای نموی به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد را به خود اختصاص دادند (شکل ۲). همچنین اتصال پروتئین و اتصال مولکول‌های کوچک نیز به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین ژن‌ها را در فرایندهای مولکولی را نشان داد (شکل ۳). در بخش آنتولوژی اجزا سلولی نیز نوکلئازها بیش‌ترین و ریبونوکلئوپروتئین‌ها کم‌ترین ژن‌ها را داشتند (شکل ۴). بر اساس نتایج به دست آمده از ۴ پارامتر طول توالی، CNCI، CPC2 و ORF از میان ۱۷۰ ژن مورد ارزیابی ۱۴۱ ژن دارای طول بیش از ۲۰۰ جفت باز، ۱۰۰ ژن دارای CPC2 کمتر از ۱، ۱۳۵ ژن دارای شاخص CNCI صفرمی باشد. هم‌چنین نتایج به دست آمده از TransDecoder (version 5.5.0) برای شناسایی طول ORF توالی‌ها نشان داد که ۱۳۹ توالی دارای ORF‌های با طول کمتر از ۳۰۰ جفت باز می‌باشند. با توجه به نتایج ۴ پارامتر و

شناسایی توالی‌های دارای مشخصات RNA طولانی غیرکد کننده نمودار ون برای شناسایی توالی‌های مشترک رسم شد (شکل ۵)، در این نمودار ۶۴ ژن بین ۴ شاخص مشترک بودند.



شکل ۲. نمودار آنتولوژی فرآیندهای بیولوژیکی توالی‌های مورد مطالعه نیشکر

Figure 2. Ontology diagram of the biological processes of sugarcane studied sequences

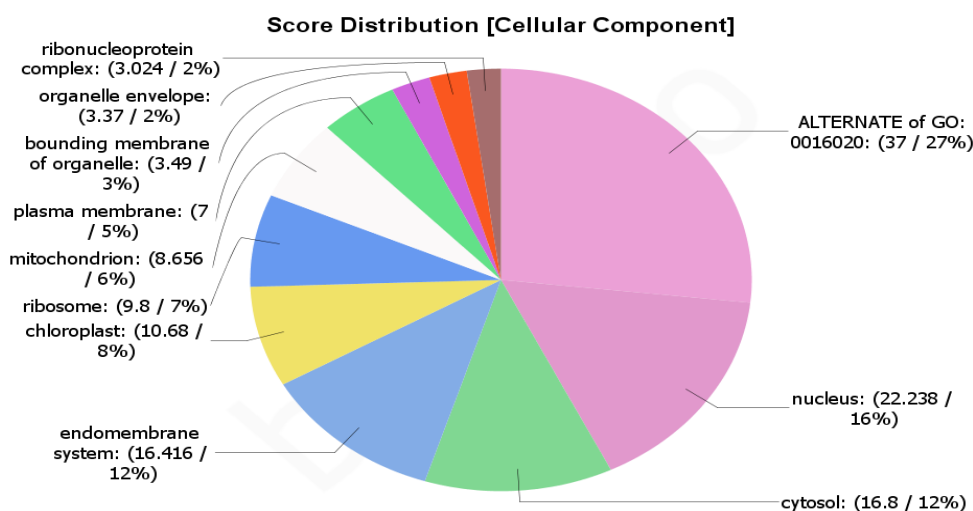


شکل ۳. نمودار آنتولوژی عملکرد مولکولی توالی‌های مورد مطالعه نیشکر

Figure 3. Ontology diagram of the molecular function of sugarcane studied sequences

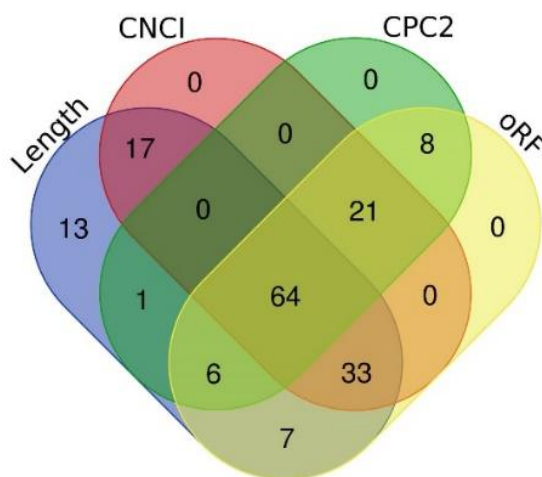
شناسایی ژن‌های تقلیدی با استفاده از PsRNAtarget، منجر به مشخص شدن ۱۱۰۹ miRNA برای ۶۴ ژن مورد مطالعه گردید و بعد از شناسایی miRNA جایگاه هدف آن‌ها نیز مشخص گردید. در این مطالعه ۱۳۷۹۸۵ جایگاه هدف برای miRNAها مشخص شد که با توجه به جایگاه و هدف miRAN و نتایج عملکرد بیولوژیکی و مولکولی BLAST2go توالی‌های مورد مطالعه، ۵ ژن برای مطالعه و بررسی بیان آن‌ها به عنوان RNA طولانی غیرکد کننده انتخاب شد. با توجه به نتایج

لوکوس‌ها ژن‌های هدف منتخب، مرتبط با پروتئین‌های چاپرون، پروتئین‌های خانواده Zipper، خانواده WRKY، C-repeat و آنزیم سرین استیل ترانسفراز می‌باشند که بر اساس گزارش‌های موجود همگی در پاسخ گیاه نسبت به تنش سرما نقش ایفا می‌کنند.



شکل ۴. نمودار آنتولوژی اجزا سلولی توالی‌های مورد مطالعه نیشکر

Figure 4. Ontology diagram of cellular components of sugarcane studied sequences



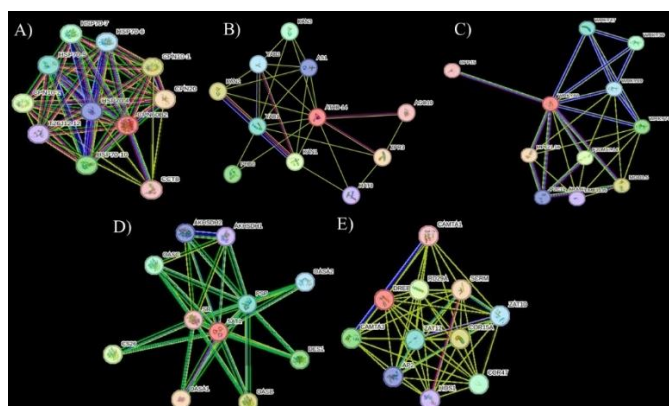
شکل ۵. نمودار ون<sup>۴</sup> برای توالی‌های مشترک بین ۴ پارامتر طول توالی، CNCI، CPC2 و ORF

Figure 5. Venn diagram for shared sequences between 4 sequence length parameters, CPC2, CNCI and ORF

در ادامه شبکه پروتئینی برای نشان دادن برهمکنش پروتئین‌ها با هم و رابطه متقابل آن‌ها در پایگاه ارتباطی پروتئین STRING ترسیم و تجزیه و تحلیل شبکه تعامل پروتئینی برای هر ۵ ژن مورد مطالعه با سایر ژن‌های *Arabidopsis thaliana* انجام گرفت (شکل ۶)، این شبکه‌ها نشان دهنده تعامل متنوع پروتئین‌های مورد مطالعه با سایر پروتئین‌های مرتبط

<sup>۴</sup> نمودار ون تصویری است که از دایره‌های همپوشانی برای نشان دادن رابطه منطقی بین دو یا چند مجموعه از آیتم‌ها استفاده می‌کند. حلقه‌هایی که همپوشانی دارند یک اشتراک دارند، در حالی که حلقه‌هایی که همپوشانی ندارند هیچ یک از حلقه‌های دیگر مشترک را ندارند.

با تنش سرما و سایر تنش‌ها و عملکردهای بیولوژیکی دیگر می‌باشد و نشان می‌دهد که پروتئین‌ها فعل و انفعالات بیشتری بین خود دارند و حداقل تا حدی از نظر زیستی به عنوان یک گروه به هم متصل هستند.



شکل ۶. تجزیه و تحلیل شبکه تعاملی ژن‌های TFs شناسایی شده در *A. thaliana* با استفاده از STRING. A) TCP-1/cpn60 chaperonin family protein (A)، zipper family protein (B)، WRKY family (C)، zipper family protein (B)، TCP-1/cpn60 chaperonin family protein (A) و SAT1 (E) و C-repeat gene. رنگ خط به نوع تعامل مربوط می‌شود. خط سبز همسایگی ژن را نشان می‌دهد، خط صورتی به معنای آزمایشی تعیین شده، خط سیاه به معنای هم بیانی، خط آبی تیره به معنای هم وقوعی ژن و خط آبی به معنای همسانی پروتئین است

**Figure 6. Interaction network analysis of TFs genes identified in *A. thaliana* using STRING. A) TCP-1/cpn60 chaperonin family protein, B) zipper family protein, C) WRKY family, D) SAT1 and E) C-repeat gene. The color of the line corresponds to the type of interaction. The green line indicates the gene neighborhood, the pink line means the determined experiment, the black line means the co-expression, the dark blue line means the gene co-occurrence and the blue line means the protein homology**

**بخش آزمایشگاهی:** بر اساس نتایج تجزیه واریانس صورت گرفته برای صفات میزان نشت الکترولیت و مالون دی‌آلدئید

اعمال تنش سرما بر گیاه نیشکر رقم CP73-21 در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۳). تغییرات میزان مالون دی‌آلدئید در رقم CP73-21 در طول زمان روند افزایشی داشت به گونه‌ای که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان این ماده را به ترتیب در تیمار زمانی ۴۸ ساعت پس از قرار گرفتن در تنش سرما و تیمار شاهد (عدم قرار گرفتن در تنش سرما) به خود اختصاص دادند. همچنین بررسی تغییرات نشت الکترولیت در این رقم در نگاهی کلی روندی افزایشی داشت، هرچند در مدت زمان کوتاه (۱۲ ساعت) ممانعت از نشت الکترولیت اتفاق افتاد اما با بیش‌تر شدن مدت زمان قرار گرفتن در تنش سرما، به سلول‌های گیاه صدمه وارد شد و میزان نشت الکترولیت در آن‌ها در مقایسه با شاهد افزایش یافت (شکل ۷). بر اساس نتایج بیوانفورماتیکی صورت گرفته بیان هر پنج RNA طولانی غیرکد کننده شناسایی شده در تنش سرما که با کد یک (RNA طولانی غیرکد کننده مرتبط با ژن Cpn60)، سه RNA طولانی غیرکد کننده مرتبط با ژن WRKY) و پنج RNA طولانی غیرکد کننده مرتبط با ژن CBF

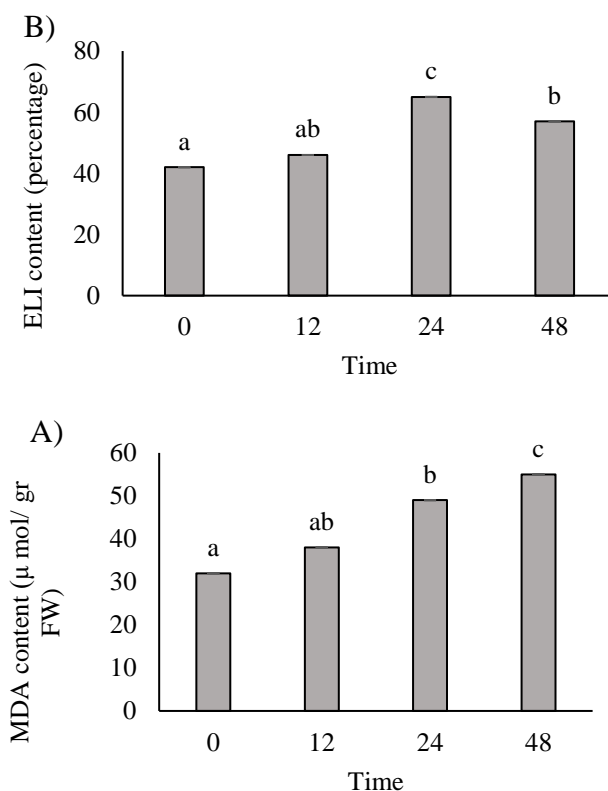
نام‌گذاری شدند، افزایشی و روند الگوی بیان‌شان در طول زمان صعودی بود. اما بیان دو RNA طولانی غیرکد کننده (مرتبط با ژن Zipper family gene) و چهار RNA طولانی غیرکد کننده (مرتبط با ژن SAT1) کاهش بیان را نشان داد. در ادامه بررسی تغییرات الگوی بیان نسبی ژن‌های Cpn60 chaperonin، Zipper family gene، WRKY، SAT1 و CBF، تحت تنش سرمای ۴ درجه سلسیوس در طول زمان انجام شد (جدول ۴).

جدول ۳. تجزیه واریانس دو صفت میزان ELI و MDA در اثر تنش سرما در بافت برگ رقم CP73-21 گیاه نیشکر

Table 4. Variance analysis of ELI and MDA index due to cold stress in leaf tissue of CP73-21 sugarcane plant

مالون دی آلدئید MDA	نشت الکترولیت ELI	درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of Variation
321.111**	337.417**	3	تیمار (تنش سرما) treatment
0.583	0.583	8	خطا error
		12	کل total

\*\*indicates significance at the 1% probability level.



شکل ۷. A) محتوای MDA و B) شاخص ELI در برگ نیشکر تحت تنش سرما در بازه زمانی (+، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت)

Figure 7. A) MDA content and B) ELI index in the leaves of sugarcane under Cold stress in the time period (0, 12, 24 and 48 hours), respectively

جدول ۴. میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در اثر تنش سرما در بافت برگ رقم CP73-21 گیاه نیشکر

**Table 5. The relative expression level of studied genes due to cold stress in sugarcane variety CP73-21 leaf tissue**

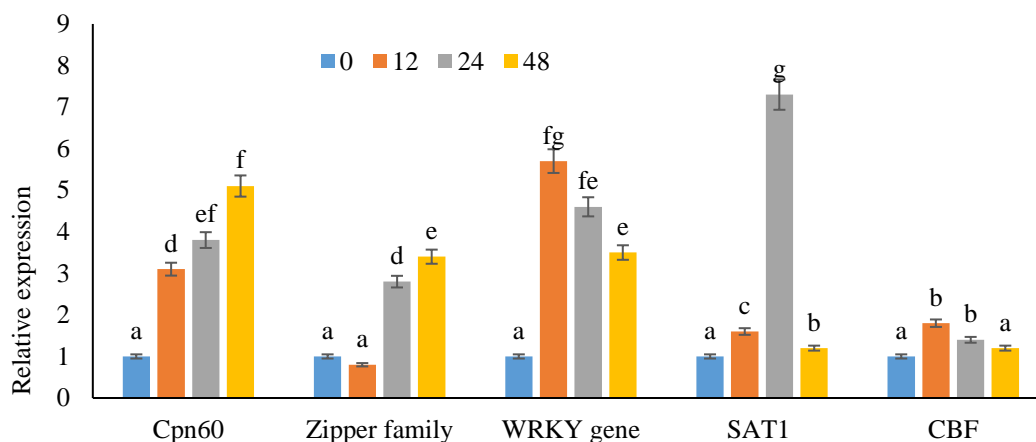
نام ژن	Gene name	تیمار سرما		
		Cold treatment	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت
کنترل	control	۱	۱	۱
		۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
		12 hours	24 hours	48 hours
	TCP-1/cpn60	3.1**↑	3.8**↑	5.1**↑
	zipper family	0.7**↓	2.8**↑	3.4**↑
	WRKY family	5.7**↑	4.6**↑	3.5**↑
	SAT1	1.6**↑	7.3**↑	1.2**↑
	C-repeat (CBFs)	1.8**↑	1.4**↑	1.2**↑

بیان نسبی ژن Cpn60 در شرایط تنش سرما در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد و افزایش مشاهده شده در طول زمان روند صعودی داشت، به گونه‌ای که بیش‌ترین میزان بیان نسبی در تیمار زمانی ۴۸ ساعت تنش سرما به میزان ۵/۱ به دست آمد. بررسی تغییرات بیان نسبی ژن Zipper family مشابه ژن Cpn60 افزایش یافت و افزایش حاصل در طول زمان روند صعودی داشت، بیش‌ترین میزان بیان (۳/۴) در تیمار زمانی ۴۸ ساعت تنش سرما حاصل شد. در اثر تنش سرما الگوی بیان فاکتور رونویسی WRKY نیز افزایش یافت اما روند افزایش بیان نسبی، نزولی بود، به گونه‌ای که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان بیان را به ترتیب دو تیمار زمانی ۱۲ و ۴۸ ساعت با عدد بیان ۵/۷ و ۳/۵ داشتند. در ارزیابی تغییرات بیان نسبی ژن SAT1 بیش‌ترین میزان بیان در تیمار زمانی ۲۴ ساعت پس از تنش سرما (۷/۳) به دست آمد و تیمارهای زمانی ۱۲ و ۴۸ ساعت در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار نداشتند. ژن CBF نیز در اثر تنش سرما با افزایش بیان مواجه شد اما میزان بیان آن نسبت به شاهد افزایش چندانی نداشت و در بیش‌ترین میزان بیان نسبی در تیمار ۱۲ ساعت به عدد ۱/۸ رسید (شکل ۸).

با توجه به اهمیت گیاه نیشکر به عنوان یکی از محصولات استراتژیک کشور که حدود ۵۰ درصد شکر و قند تولیدی کشور را تامین می‌کند، بهینه‌سازی شرایط کشت و مدیریت تنش‌های زیستی و غیر زیستی آن حائز اهمیت بسیاری است. تنش‌ها و از جمله تنش‌های محیطی بر رشد و عملکرد گیاه تأثیرگذار هستند و با اختلال در پایداری و نفوذپذیری گیاه، اختلال در سوخت و ساز سلول‌ها، ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال و غیره در نهایت موجب کندی رشد، کاهش عملکرد و یا از بین رفتن گیاه می‌شوند. درک مکانیسم‌های تحمل به تنش گیاهی کلید انتخاب موفق محصولات متحمل در مناطق رشدی است که تحت تأثیر انواع تنش‌ها هستند (Zagorchev et al. 2013). تنش سرما یکی از مهم‌ترین چالش‌های کشت نیشکر در استان خوزستان است و به طبع



بررسی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط در پاسخ به آن و افزایش اطلاعات در این رابطه، در شناخت و یافتن راه حل‌های احتمالی مقابله با این تنش راه‌گشا خواهد بود.



شکل ۸. الگوهای بیان سه ژن پاسخگو به سرما تحت تنش سرما در بازه زمانی (۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) از طریق تجزیه و تحلیل qRT-PCR. الف-س به ترتیب الگوهای بیان چپرونین Cpn60، ژن خانواده Zipper، WRKY، SAT1 و CBF.  $p < 0.01$ ،  $**$ . پروفایل بیان ژنی با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ارزیابی شد

**Figure 8. Expression patterns of three cold-responsive genes under cold stress in the time period (0, 12, 24 and 48 hours) through qRT-PCR analysis. A–E expression patterns of chaperonin Cpn60, Zipper family gene, WRKY, SAT1, and CBF respectively.  $**$ ,  $p < 0.01$ . Gene expression profiles were evaluated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method**

در مبحث بیان ژن علاوه بر تغییرات بیان ژن‌های هدف و فاکتورهای رونویسی، RNAهای غیرکدکننده مرتبط با بیان ژن‌های مذکور نیز در ایجاد پاسخ‌های سلولی نقش ایفا می‌کنند (Cui 2023; Yang et al. 2022). از این رو ارزیابی نتایج تغییرات بیان پنج RNA طولانی غیرکدکننده و ژن‌های هدف آن‌ها در مواجهه با تنش صورت گرفت. میزان مالون دی‌آلدئید و نشت الکترولیت به عنوان دو شاخصه وارد آمدن تنش بر گیاه همواره مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرند، در واقع محتوای مالون دی‌آلدئید نشانگری برای مشخص شدن شدت آسیب اکسیداتیو به لیپیدهای غشای سلولی است (Queiroz et al. 2011)، بر اساس گزارش‌های موجود قرار گرفتن گیاهان و از جمله نیشکر در تنش سرما موجب افزایش میزان مالون دی‌آلدئید می‌شود (Huang et al. 2010; Kim & Tai 2011; Valizadeh-Kamran et al. 2018)، هرچند مطالعات دیگر چنین بیان داشتند که نظر به می‌رسد نیشکر قادر است سطحی از کاهش دما را تحمل کند و میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشایی و به طبع محتوای مالون دی‌آلدئید آن، افزایش

نیابد اما با کاهش بیش تر دما و یا افزایش مدت زمان قرارگیری در دمای پایین، از تحمل نیشکر کاسته شده و میزان مالون دی‌آلدئید سلول افزایش خواهد داشت (Huang et al. 2010). بر اساس نتایج پژوهش حاضر محتوای مالون دی‌آلدئید در زمان ۱۲ ساعت پس تنش دمای ۴ درجه سلسیوس، کم‌ترین میزان را داشت و پس از آن روند صعودی را به دنبال گرفت که با یافته‌های پیشین همسو و مورد تأیید است. این نتایج با نتایج مربوط به اندازه‌گیری نشت الکترولیت مطابقت داشت و در این بخش نیز نیشکر رقم CP73-21 برای کوتاه مدت (زمان ۱۲ ساعت، تنش دمای ۴ درجه سلسیوس) توانست از نشت الکترولیت ممانعت نماید اما با افزایش مدت زمان قرار گرفتن در تنش سرما بر میزان نشت الکترولیت افزوده شد. در زمان برخورد گیاه با تنش سرما به‌طور موقت ساختار غشا و نفوذپذیری آن تغییر می‌یابد و بر میزان پراکسیداسیون لیپیدها افزوده می‌شود، پراکسیداسیون لیپیدها منجر به تخریب غشاءهای بیولوژیکی می‌شود و به دنبال آن محتویات سلولی به بیرون نشت کرده و نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد (Wahid 2007). در اثر اعمال تنش سرما تغییرات الگوی بیان نسبی پنج ژن هدف RNA طولانی غیر کد کننده مرتبط با سرما (Cpn60, Zipper family gene, WRKY, SAT1 و CBF) در نیشکر در رقم CP73-21 با افزایش بیان مواجه شد. چاپرون‌های Cpn60 در کلروپلاست وجود دارند در میانجی‌گری تاخوردگی پروتئین‌های تازه سنتز شده و رساندن پروتئین به تاخوردگی‌های صحیح آن و داناتوره شده در زمان تنش نقش دارند (Maguire et al. 2002; Peng et al. 2011). به این سبب دور از انتظار نیست که در زمان برخورد گیاه با تنش و تغییر ساختار پروتئین‌ها از فرم طبیعی، برای افزایش تحمل گیاه در برابر تنش و کمک به بازآرایی ساختار پروتئین‌ها، بیان پروتئین‌های گروه چاپرون‌ها افزایش یابد. افزایش بیان RNA ژن کد کننده چاپرون‌ها در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تراویخت منجر به متحمل شدن آن‌ها نسبت به سرما شد (Melencion et al. 2017). از آنجا که پروتئین Cpn60 در کلروپلاست و کلروفیل گیاه نقش ایفا می‌کند، افزایش بیان آن در زمان تنش‌های دمایی به علت تأثیر مثبت بر فرایند فتوسنتز در نهایت گیاه را نسبت به تنش‌های دمایی (سرما و گرما) متحمل خواهد ساخت (Maguire et al. 2002; Jiang et al. 2014; Q. Ji et al. 2014). فاکتورهای رونویسی مربوط به خانواده ژنی Zipper از جمله فاکتورهای رونویسی مختص گیاهان می‌باشند که با تنظیم ژن‌های هدف پایین دست و مسیرهای تنظیمی هورمون‌ها، فرایندهای رشد، نمو و پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی (مانند خشکی، شوری، دمای پایین و فلزات مضر) را کنترل می‌کنند (Li et al. 2022; Yu et al. 2020). بررسی نقش فاکتورهای رونویسی bZIP در گیاه *Brassica rapa* نشان داد که شش ژن از این خانواده در پاسخ به تنش سرما نقش دارند و در اثر اعمال این تیمار بیان آن‌ها در مقایسه با تیمار شاهد افزایش می‌یابد (Hwang et al. 2014). ارزیابی پروفایل بیانی گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما برای اعضای خانواده‌ی ژنی Zipper (HD-Zip) مشخص کرد که تمامی ژن‌های مورد مطالعه در پاسخ تنش‌های غیرزیستی و به ویژه تنش سرمایی نقش دارند، در این بین ۱۳ ژن افزایش بیان نشان دادند، روند بیان برای ۱۱ ژن در طی زمان صعودی بود و به تدریج با افزایش بیان مواجه شدند، بیان ۹ ژن نیز روند کاهش داشت (Zhang et al. 2014). پروتئین‌های WRKY خانواده بزرگی از تنظیم‌کننده‌ها هستند که در فرایندهای مختلف رشدی و فیزیولوژیکی، به‌ویژه در مقابله با استرس‌های زیستی و غیرزیستی مختلف

نقش دارند (Y. Jiang et al. 2014). بر اساس گزارش‌های موجود فاکتور رونویسی WRKY در تنش غیرزیستی سرما نیز نقش قابل توجهی را ایفا می‌کند (Huang et al. 2022; Wang et al. 2020). مطالعات صورت گرفته در زمینه‌ی تنش سرما بیان می‌دارد که خانواده‌ی فاکتور رونویسی AP2/ERF یکی از مهم‌ترین خانواده‌های فاکتور رونویسی مرتبط با تنش سرما است که همراه با سایر خانواده‌های فاکتور رونویسی مانند WRKY، bZIP، bHLH، MYB، NAC و C2H2 در افزایش تحمل نسبت به تنش سرما و ایجاد سازگاری گیاهان مرتبط هستند (Ritonga et al. 2021). بیش‌بیان خانواده‌ی WRKY در گیاه دارویی *Dendrobium catenatum* با هدف افزایش تحمل آن نسبت به تنش‌های غیرزنده‌ای چون سرما، گرما، خشکی و شوری نشان داد که هر یک از اعضای این خانواده از راه‌های متفاوتی چون مسیر ABA یا SA در نهایت سازگاری نسبت به تنش‌های یاد شده را موجب می‌شود (Zhang et al. 2022). مقایسه توالی‌یابی RNA دو وارپته‌ی ROC22 و GT42 در برخورد با تنش سرما تفاوت در بیان برخی فاکتورهای رونویسی از جمله NAC، WRKY و ERF را نشان داد، در این مطالعه از ۵ فاکتور رونویسی شناسایی شده دو فاکتور به خانواده‌ی WRKY (Sspon.003C0035890 و Sspon.007A0013201) تعلق داشت و مشخص شد که بیان نسبی هر دو فاکتور WRKY ذکر شده، در اثر تنش سرما افزایش یافته است (Huang et al. 2022). سرین استیل ترانسفرازها (SATs) از جمله مهم‌ترین آنزیم‌های گیاهی موجود در مسیر بیوسنتزی سیستئین هستند که در همه‌ی بخش‌های سلول از جمله سیتوزول، کلروپلاست و میتوکندری حضور دارند، عدم انتقال سیستئین از غشاهای اندامک‌های مذکور می‌تواند دلیل اصلی وجود آنزیم‌های بیوسنتزی سیستئین و از جمله سرین استیل ترانسفرازها در این اندامک‌ها باشد (Błaszczuk et al. 1999; Liu et al. 2006). بسیاری از تنش‌ها و از جمله تنش‌های دمایی افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و در واقع ایجاد تنش اکسیداتیو را در سلول باعث می‌شوند، بر اساس شواهد موجود مشخص شده است که تعدادی از تیول‌های غیر پروتئینی و پروتئینی، همراه با شبکه‌ای از مولکول‌های حاوی گوگرد و ترکیبات مرتبط، اساساً به تحمل تنش گیاهی کمک می‌کنند (Zagorchev et al. 2013)، گلوکاتیون یک آنتی‌اکسیدان کلیدی محلول در آب است و نقش اصلی را در مهار ROS از طریق مسیر GSH-آسکوربات و به عنوان یک اهدا کننده الکترون به گلوکاتیون پراکسیداز (GPx) ایفا می‌کند. این شکل ذخیره‌سازی و انتقال با استفاده از گوگرد احیا شده، در سم‌زدایی و در تنظیم چرخه سلولی نقش دارد، یکی از پر نقش‌ترین مولکول‌ها در این بین سیستئین است (Zagorchev et al. 2013) و در واقع حضور سیستئین موجب افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌هایی چون تنش‌های دمایی می‌شود (Błaszczuk et al. 1999; Liu et al. 2006). با در نظر گرفتن این نکته که رقم CP73-21 به عنوان رقمی متحمل نسبت به تنش سرمایی شناخته می‌شود، دور از انتظار نیست که تغییرات افزایشی بیان ژن سنتزکننده آنزیم سرین استیل ترانسفراز از جمله دلایل مقاومت آن‌ها در برخورد با سرما باشد. فاکتور رونویسی CBF زیرخانواده‌ی فاکتورهای رونویسی AP2/ERF هستند که در پاسخ گیاه نسبت به تنش‌های غیرزنده به ویژه تنش دمای پایین و کم آبی فعالیت دارند (Linh et al. 2019; Rehman et al. 2021). بر اساس مطالعه‌ی دیگر در زمان وقوع تنش‌ها و به ویژه تنش سرما محتوای اسمولیت‌های سلول و از جمله پرولین افزایش می‌یابد، از آنجا که تولید پرولین مرتبط با افزایش بیان ژن‌های P5CS و CBF(DREB1) دانسته شده است این گروه به

بررسی الگوی بیان ژن‌های P5CS و CBF(DREB1) در دو ژنوتیپ مقاوم (MCC426) و حساس (MCC505) نخود (*Cicer arietinum L.*) پرداختند و به عنوان نتیجه‌ی کلی عنوان کردند که بیان هر دو ژن در ژنوتیپ مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ حساس در سطح معنی‌داری ۰/۵، بیش‌تر بود و یکی از دلایل مقاومت ژنوتیپ MCC426 نسبت به دمای پایین، بیان بیش‌تر ژن‌های P5CS و CBF(DREB1) در برخورد به تنش سرما است. همچنین بررسی الگوی تغییرات بیان فاکتور رونویسی CBF در سه رقم انگور (*Vitis vinifera.*)، با وجود تفاوت در زمان و عدد بیان در ارقام، به‌طور کلی افزایش بیان ژن CBF را در اثر اعمال تنش سرما در هر سه رقم نشان. آنالیز داده‌های ثبت شده مرتبط با RNA نیشکر در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که در کولتیوار ROC22 از مجموع ۵۶۴۹ ژن دارای افزایش بیان معنی‌دار و ۳۲۸۹ ژن دارای کاهش بیان معنی‌دار در اثر تنش سرما، فاکتورهای رونویسی به ترتیب ۹۶۳ ژن و ۲۹۳ ژن را به خود اختصاص دادند. در کولتیوار GT08-1108 نیز ۹۷۴ و ۲۸۳ فاکتور رونویسی به ترتیب افزایش بیان و کاهش بیان داشتند. بیش‌ترین گروه فاکتورهای رونویسی در این آنالیز به پروتئین‌های متصل شونده، فاکتورهای رونویسی متصل شونده و اتصال اختصاصی به نواحی DNA بودند، در این گزارش آمده است که CBFها که از جمله فاکتورهای رونویسی متصل شونده هستند یکی از تأثیرگذارترین فاکتورهای رونویسی شناسایی شده می‌باشند. همچنین گروه نویسندگان بیان داشتند که فاکتورهای رونویسی چون WRKY، NAC، MYB، ERF، AP2/ERF پرکاربردترین فاکتورهای رونویسی در تنش‌های زنده و غیرزنده هستند که از در مسیرهای سیگنالی پاسخ سلول فعالیت دارند (Rehman et al. 2021). با در نظر گرفتن نقش فاکتور رونویسی CBF در پاسخ گیاهان نسبت به تنش سرمایی و البته فراهم کردن شرایط سازگاری آن‌ها، دور از انتظار نیست که در رقم نیشکر مورد ارزیابی نیز بیان نسبی فاکتور رونویسی CBF روند افزایشی داشته باشد. افزایش بیان به‌دست آمده برای ژن‌های مورد بررسی در اثر اعمال تنش سرما در پژوهش حاضر در سایر گزارش‌های ارزیابی بیان نسبی این ژن نیز ارائه شده است و هم‌سو و تأیید کننده یکدیگر می‌باشند و احتمال می‌رود بیش‌تر بودن میزان بیان این ژن‌ها و RNA طولانی غیرکد کننده مرتبط با آن‌ها نسبت به گیاهان شاهد، افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌های دمایی و از جمله تنش سرما باشد.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج حاصل میزان مالون‌دی‌آلدئید و میزان نشت الکترولیت در گیاه نیشکر در رقم CP73-21 پس

از ۴۸ ساعت قرارگیری در معرض سرما، روند افزایشی نشان داد. در بررسی‌های بیوانفورماتیکی صورت گرفته بیان RNA طولانی غیرکد کننده ۱، ۳ و ۵ در طی تنش سرما افزایشی و بیان RNA طولانی غیرکد کننده کد ۴ و ۲ کاهش‌ی بود. ارزیابی میزان بیان نسبی ژن‌های Cpn60، Zipper family gene، WRKY، SAT1 و CBF در طی زمان افزایش نشان داد و افزایش مشاهده شده روند صعودی داشت. در مقایسه تغییرات بیان RNA طولانی غیرکد کننده با ژن‌های هدف‌شان تغییرات بیان برای سه ژن SAT1، Cpn60 و CBF با WRKY با RNA طولانی غیرکد کننده مرتبط با آن، هم‌سو و افزایشی بود اما تغییرات بیان برای ژن SAT1 و Zipper (افزایشی) و RNA طولانی غیرکد کننده (کاهش) ناهم‌سو بود.

سیاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر

سیاسگزاری می‌شود.

## References

- Afzal S, Saleem M, Yasmin R, et al. (2010) Pre and post cloning characterization of a beta-1, 4-endoglucanase from *Bacillus* sp. *Mol Biol Res* 37, 23-1717.
- Álvarez-Machancoses Ó, DeAndres Galiana EJ, Cernea A, et al. (2020) On the role of artificial intelligence in genomics to enhance precision medicine. *Pharmgenomics Pers Med* 13, 105-119.
- Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, et al. (2016) 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.
- Blaszczyk A, Brodzik R, Sirko A (1999) Increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants overexpressing bacterial serine acetyltransferase. *Plant J* 20(2), 237-243.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15), 2114-2120.
- Campos PS, Quartin V, Ramalho J, et al. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea sp.* plants. *J Plant Physiol* 160(3), 283-292.
- Cao Z, Zhao T, Wang L, Han J, et al. (2021) The lincRNA XH123 is involved in cotton cold-stress regulation. *Plant Mol Biol* 106, 521-531.
- Clauser NM, Gutierrez S, Area MC, et al. (2016) Small-sized biorefineries as strategy to add value to sugarcane bagasse. *Chem Eng Res Des* 107, 137-146.
- Cui J (2023) Lnc RNA in plants: function, mechanisms and applications. *Front Plant Sci* 14, e1238185.
- Dharshini S, Chakravarthi M, Manoj V, et al. (2016) De novo sequencing and transcriptome analysis of a low temperature tolerant *Saccharum spontaneum* clone IND 00-1037. *J Biotechnol* 231, 280-294.
- Huang SQ, Xiang AL, Che LL, et al. (2010) A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulphate deficiency and cadmium stress. *Plant Biotechnol J* 8(8), 887-899.
- Huang X, Liang Y, Zhang B, et al. (2022) Comparative transcriptome analysis reveals potential gene modules associated with cold tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *J Plant Growth Regul* 41(7), 2614-2628.
- Hwang I, Jung HJ, Park JI, et al. (2014) Transcriptome analysis of newly classified bZIP transcription factors of *Brassica rapa* in cold stress response. *Genome* 104(3), 194-202.
- 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.

- Jiang Q, Mei J, Gong XD, et al. (2014) Importance of the rice TCD9 encoding  $\alpha$  subunit of chaperonin protein 60 (Cpn60 $\alpha$ ) for the chloroplast development during the early leaf stage. *Plant Sci* 215, 172-179.
- Jiang Y, Duan Y, Yin J, et al. (2014) Genome-wide identification and characterization of the Populus WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses. *J Exp Bot* 65(22), 6629-6644.
- Khabiri A, Toroghi R, Mohammadabadi M, et al. (2023) Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1) isolated in Iran. *Vet Res Forum* 14(4), 221-228.
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, et al. (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J* 25(3), 247-259.
- Kim SI, Tai TH (2011) Evaluation of seedling cold tolerance in rice cultivars: a comparison of visual ratings and quantitative indicators of physiological changes. *Euphytica* 178, 437-447.
- Li B, Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinform* 12(1), 1-16.
- Li S, Cheng Z, Dong S, et al. (2022) Global identification of full-length cassava lncRNAs unveils the role of cold-responsive intergenic lncRNA1 in cold stress response. *Plant Cell Environ* 45(2), 412-426.
- Li Y, Yang Z, Zhang Y, et al. (2022) The roles of HD-ZIP proteins in plant abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci* 13, e1027071.
- Li YR, Yang LT (2015) Sugarcane agriculture and sugar industry in China. *Sugar Technol* 17(1), 1-8.
- Linh NT, Ly LH, Duong NT, et al. (2019) Isolation and characterization of a C-repeat binding factor gene from tevang-1 maize cultivar. *Acad J Biol* 41(3), e13782.
- Liu F, Yoo BC, Lee JY, et al. (2006) Calcium-regulated Phosphorylation of Soybean Serine Acetyltransferase in Response to Oxidative Stress. *J Biol Chem* 281(37), 27405-27415.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>  $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4), 402-408.
- Maguire M, Coates AR, Henderson B (2002) Chaperonin 60 unfolds its secrets of cellular communication. *Cell Stress Chaperones* 7(4), 317-329.
- Melencion SMB, Chi YH, Pham TT, et al. (2017) RNA chaperone function of a universal stress protein in Arabidopsis confers enhanced cold stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci* 18(12), e2546.
- Mohammadabadi M, Babenko Ivanivna O, Borshch O, et al. (2024) Measuring the relative expression pattern of the UCP2 gene in different tissues of the Raini Cashmere goat. *Agric Biotechnol J* 16(3), 317-332.
- Mohammadabadi M, Golkar A, Askari Hesni M, et al. (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.

- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, et al. (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), e3471.
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, et al. (2024) Analysis of liver transcriptome data to identify the genes affecting lipid metabolism during the embryonic and hatching periods in ROSS breeder broilers. *J Livest Sci Technol* 12(2), 61-67.
- Neisi M, Fakheri B, Ebrahimie E, et al. (2022) Evaluation of the effect of cold stress on physiological and biochemical traits of commercial sugarcane cultivar CP69-1062 with *Saccharum spontaneum* species in seedling stage. *Env Stresses Crop Sci* 15(3), 765-779.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, et al. (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 74(1), 69-80.
- Peng L, Fukao Y, Myouga F, et al. (2011) A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *PLoS Biol* 9(4), e1001040.
- Popova T, Marinova P, Vasileva V, et al. (2009) Oxidative changes in lipids and proteins in beef during storage. *Archiva Zootechnica* 12(3), 30-38.
- Queiroz RJB, Santos DMMd, Ferraudo AS, et al. (2011) Biochemical and physiological responses of sugarcane cultivars to soil water deficiencies. *Sci Agric* 68, 469-476.
- Rehman S, Muhammad K, Novaes E, et al. (2021) Expression analysis of transcription factors in sugarcane during cold stress. *Braz J Biol* 83, e242603.
- Ritonga FN, Ngatia JN, Wang Y, et al. (2021) AP2/ERF, an important cold stress-related transcription factor family in plants: A review. *Physiol Mol Biol Plant* 27, 1953-1968.
- Shadmehr A, Ramshini H, Zeinalabedini M, et al. (2017) Phenotypic variability assessment of sugarcane germplasm (*Saccharum officinarum* L.) and extraction of an applied mini-core collection. *Agriculture* 7(7), e55.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2023) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. *Anim Biotechnol* 34(4), 882-892.
- Shokri S, Khezri, A, Mohammadabadi M, et al. (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.
- Sun X, Zheng H, Sui N (2018) Regulation mechanism of long non-coding RNA in plant response to stress. *Biochem Biophys Res Commun* 503(2), 402-407.
- Valizadeh-Kamran R, Toorchi M, Mogadam M, et al. (2018) Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. *J Plant Nutr* 41(1), 102-111.
- Wahid A (2007) Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *J Plant Res* 120, 219-228.
- Wang D, Wang L, Su W, et al. (2020) A class III WRKY transcription factor in sugarcane was involved in biotic and abiotic stress responses. *Sci Rep* 10(1), e20964.

- Wang X, Ding Y, Li Z, et al. (2019) PUB25 and PUB26 promote plant freezing tolerance by degrading the cold signaling negative regulator MYB15. *Dev Cell* 51(2), 222-235.
- Wang X, Fan H, Wan, B, Yuan, F. (2023) Research progress on the roles of lncRNA s in plant development and stress responses. *Front Plant Sci* 14, e1138901.
- Yang X, Liu C, Niu X, et al. (2022) Research on lncRNA l related to drought resistance of Shanlan upland rice. *BMC Genomics* 23(1), e336.
- Yang Y, Zhang X, Chen Y, et al. (2016) Selection of reference genes for normalization of microRNA expression by RT-qPCR in sugarcane buds under cold stress. *Front Plant Sci* 7, e86.
- Yang Y, Zhang X, Su Y, et al. (2017) miRNA alteration is an important mechanism in sugarcane response to low-temperature environment. *BMC Genomics* 18(1), e833.
- Yu Y, Qian Y, Jiang M, et al. (2020) Regulation mechanisms of plant basic leucine zippers to various abiotic stresses. *Front Plant Sci* 11, e1258.
- Zagorchev L, Seal CE, Kranter I, Odjakova M (2013) A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *Int J Mol Sci* 14(4), 7405-7432.
- Zhang BQ, Huang YX, Zhou ZF, et al. (2022) Cold-Induced physiological and biochemical alternations and proteomic insight into the response of *Saccharum spontaneum* to low temperature. *Int J Mol Sci* 23(22), e14244.
- Zhang BQ, Yang LT, Li YR (2015) Physiological and biochemical characteristics related to cold resistance in sugarcane. *Sugar Techol* 17, 49-58.
- Zhang L, Xiang Y, Chen S, et al. (2022) Mechanisms of microRNA biogenesis and stability control in plants. *Front. Plant Sci* 13, e844149.
- Zhang Z, Chen X, Guan X, et al. (2014) A genome-wide survey of homeodomain-leucine zipper genes and analysis of cold-responsive HD-Zip I members' expression in tomato. *Biosci Biotechnol Biochem* 78(8), 1337-1349.
- Zhao J, Li S, Xu Y, et al. (2023) The subgenome *Saccharum spontaneum* contributes to sugar accumulation in sugarcane as revealed by full-length transcriptomic analysis. *J Adv Res* 54, 1-13.
- Zhou D, Liu Y, Yao J, et al. (2022) Characterization and phylogenetic analyses of the complete mitochondrial genome of sugarcane (*Saccharum spp.* Hybrids) line A1. *Diversity* 14(5), e333.