

Identification, functional prediction, and verification of Key lncRNAs involved in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization under nitrogen deficiency stress

Aminollah Chalavi¹, Farhad Nazarian-Firouzabadi² , Seyed Sajad Sohrabi³, Aboozar Soorni⁴

1. Ph. D. Candidate, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

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

3. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

4. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Correspondence:
Farhad Nazarian-Firouzabadi
Email: nazarian.f@lu.ac.ir

Received: 16, Oct. 2024

Accepted: 29, Jan. 2025

How to cite:

Chalavi, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Sohrabi, S.S., & Soorni, A. (2025). Identification, functional prediction, and verification of Key lncRNAs involved in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization under nitrogen deficiency stress. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 43-56.
(DOI: [10.30473/cb.2025.72513.1985](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72513.1985))

ABSTRACT

Nitrogen (N) is one of the most important nutrients needed for the growth and development of potato (*Solanum tuberosum* L.). In the course of evolution, long non-coding RNA molecules (lncRNAs) have played a role in causing significant changes in plant's responses to abiotic stresses. Given the limited information available on the mechanisms of action and the role of such important regulatory elements during potato tuber developmental stages, this study was conducted to identify and investigate the expression and function of lncRNAs, as well as their target genes, in response to nitrogen treatment. The results of the present study revealed that a total of 211 differentially expressed lncRNA molecules were detected under nitrogen treatment. Of these, four intergenic lncRNA sequences were differentially expressed under nitrogen treatment, and their target genes were associated with ion homeostasis, signal transduction, and protein degradation. The metabolic pathways most frequently associated with the target genes involved the biosynthesis of secondary metabolites, fatty acid metabolism, and fatty acid degradation. This study identified lncRNAs in potatoes under nitrogen treatment for the first time, marking a significant step towards understanding the function of lncRNA in plant's responses to nitrogen. Identifying the location and function of these lncRNAs, along with the activity of differentially expressed genes, will provide valuable insights into the mechanisms underlying the plant's response to nitrogen.

KEY WORDS

Stress-related genes, non-coding RNA, Gene expression.



«مقاله پژوهشی»

شناسایی، پیش‌بینی عملکرد و اعتبارسنجی LncRNAs کلیدی در گیر در غده‌زایی سیب‌زمینی تحت تنش کمبود ازت

امین‌اله چلوی^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۲ , سید سجاد سهرابی^۳، ابودر سورنی^۴

چکیده

نیترژن (N) یکی از مهمترین مواد غذایی برای رشد و نمو سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) است. در جریان تکامل، تغییرات ژنتیکی حیاتی به‌وسیله مولکول‌های RNAهای بلند غیرکدکننده (Long non coding RNAs: LncRNAs) در پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی به‌وجود آمده است. با توجه به اینکه اطلاعات اندکی از مکانیسم عمل و نقش این عناصر مهم تنظیمی در مرحله نمو غده سیب‌زمینی در دسترس است؛ پژوهش حاضر با هدف شناسایی، بررسی بیان و کارکرد LncRNAها و همچنین ژن‌های هدف آن‌ها در پاسخ به تیمار ازت انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در مجموع تعداد ۲۱۱ مولکول LncRNA با بیان متفاوت تحت تیمار ازت شناسایی شدند. از این تعداد ۴ توالی LncRNA بین‌ژنی تحت تیمار ازت بیان متفاوت داشتند که ژن‌های هدف آن‌ها با رونوشت ژن‌های مرتبط با هموستازی یونی، انتقال پیام و تخریب پروتئین همولوژی داشتند. مسیرهای متابولیکی با بیشترین فراوانی ژن‌های هدف شامل بیوستز متابولیت‌های ثانویه، متابولیسم اسیدهای چرب و تخریب اسیدهای چرب بودند. این مطالعه برای اولین بار توالی LncRNA را در سیب‌زمینی تحت تیمار ازت شناسایی نمود و به نظر می‌رسد گامی مفید در شناخت عملکرد LncRNA در چگونگی پاسخ گیاهان به تیمار ازت باشد. مکان‌یابی و عملکرد این LncRNA و فعالیت ژن‌هایی با بیان افتراقی، سبب درک بهتر مکانیسم‌های پاسخ به تیمار ازت می‌شود.

واژه‌های کلیدی

ژن‌های مرتبط با تنش، RNA غیرکدکننده، بیان ژن.

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۲. استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۳. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۴. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

نویسنده مسئول:

فرهاد نظریان فیروزآبادی

رایانامه: nazarian.f@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

استناد به این مقاله:

چلوی، امین‌اله؛ نظریان فیروزآبادی، فرهاد؛ سهرابی، سید سجاد و سورنی، ابودر (۱۴۰۴). شناسایی، پیش‌بینی عملکرد و اعتبارسنجی LncRNAs کلیدی در گیر در غده‌زایی سیب‌زمینی تحت تنش کمبود ازت، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۵۶-۴۳.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72513.1985](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72513.1985))

مقدمه

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) سومین محصول غذایی مهم جهان به شمار می رود. سیب زمینی معمولاً دارای یک سیستم ریشه‌ای کم عمق و ظریف است، به همین دلیل در جریان رشد و نمو، کمبود عناصر ضروری از جمله ازت و همچنین آب، منجر به افت عملکرد محصول آن خواهد داشت (Birch et al., 2012). نیتروژن یا ازت (N) به عنوان یک عنصر درشت مغذی در مزارعی با مواد آلی محدود، تأثیر مثبتی بر زیست توده، عملکرد و کیفیت غده سیب زمینی دارد (Westermann, 2005)؛ با این حال، مصرف بیش از حد ازت می تواند دو اثر نامطلوب شامل کاهش کیفیت غده ها (Long et al., 2004) و شسته شدن نیترات در سیستم های تأمین آب و انتشار اکسید نیتروژن را به همراه داشته باشد (Zebarth & Rosen, 2007)؛ بنابراین، اهداف طولانی مدت در تولید سیب زمینی شامل افزایش کارایی استفاده از نیتروژن و همچنین توسعه سیستم های مدیریت پایدار نیتروژن برای بهینه سازی مکمل های نیتروژن است تا مقدار مورد نیاز برای حفظ رشد گیاه و دستیابی به عملکرد تأمین گردد (Birch et al., 2012; Westermann, 2005).

تجزیه و تحلیل مولکولی و بررسی روند تغییرات پروفایل بیانی اندام ها و بافت های مختلف ارقام سیب زمینی در شرایط تنش های غیرزیستی مختلف از جمله تنش کمبود ازت منجر به شناسایی برخی از عوامل و مکانیسم های مختلف ژنتیکی دخیل در پاسخ به این شرایط نامطلوب شده است (Gong et al., 2015). تاکنون، چندین مکان ژنی کنترل کننده صفات کمی ادر محصولات مختلف زراعی در ارتباط با کارایی مصرف نیتروژن گزارش شده است (Hawkesford & Griffiths, 2019). پیشرفت ها در رویکردهای ژنومیک عملکردی، منجر به شناسایی چندین ژن تنظیم کننده و ژن های کنترل کننده کارایی مصرف N در گیاهان زراعی شده است (Curci et al., 2017). با این حال، هنوز

مکانیسم های مولکولی چگونگی جذب نیتروژن در گیاهان مشخص نیستند (Simons et al., 2014).

نتایج برخی مطالعات نشان می دهند که مولکول های RNA طویل غیر کدکننده از مهمترین عناصر تنظیم کننده بیان ژن ها هستند که در تنظیم طیف وسیعی از فرآیندهای زیستی از جمله مکانیسم رونویسی، تنظیم پردازش mRNA، مقابله با انواع تنش های زیستی و غیرزیستی، گلدهی، نرغیمی و همچنین تغییرات اپی ژنتیک دخالت دارند. این گروه از مولکول های تنظیم کننده در طیف وسیعی از موجودات زنده از جمله گیاهان و حیوانات شناسایی شده اند (Jha et al., 2020). مطالعات نشان می دهند که طول مولکول های RNA طویل غیر کدکننده به بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید می رسد (Waseem et al., 2020). فناوری های توالی یابی نسل جدید این امکان را فراهم آورده اند تا گروه های مهمی از مولکول های RNA طویل غیر کدکننده در موجودات مختلف از جمله خانواده های مختلف گیاهی شناسایی شوند. با این حال، تعداد مولکول های RNA طویل غیر کدکننده که در گونه های مختلف گیاهی از جمله *Brassica rapa*، *Solanum tuberosum*، *Arabidopsis thaliana*، *Populus trichocarpa*، *Setaria italica*، *Zea mays*، *Oryza sativa* و *Solanum lycopersicum* شناسایی شده متفاوت است (Sanchita Trivedi et al., 2020). هر چند شناسایی و تفسیر عملکرد این گروه از عناصر تنظیمی در آغاز راه خود قرار دارد، با این حال بر اساس مکان ژنی، این گروه از توالی های غیر کدکننده را می توان در سه گروه بین ژنی، اینترونی و آنتی سنس دسته بندی نمود (Ma et al., 2013). بر اساس مطالعات مشخص شده است که مولکول های RNA طویل غیر کدکننده که از نواحی بین ژنی منشأ می گیرند دارای بیان خاص بافتی با پیرایش ضعیف می باشند که از نظر ساختاری پلی آدنیله هستند و عملکرد تنظیمی ترانس دارند. با توجه به اهمیت نیتروژن به عنوان یک ماده مغذی ضروری برای رشد و نمو گیاهان و نقش آن در سنتز اسیدهای آمینه، ATP در

داده‌های خام دریافت شده شامل دو نمونه‌برداری به فاصله ۱۵ روز از اوایل غده‌زایی (۴۸ نمونه) بود. در ابتدا داده‌های خام با استفاده از ابزار FastQC کیفیت‌سنجی و سپس با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic v0.30 (Bolger et al., 2014) خوانش‌های با کیفیت پایین و توالی‌های آداپتور حذف شدند (Bolger et al., 2014). پس از پردازش داده‌های خام، خوانش‌های تمیز شده از هر کتابخانه با ژنوم مرجع سبب‌زمینی با استفاده از ابزار HISAT2 نقشه‌یابی شدند. برای استخراج رونوشت‌های مستندسازی نشده، از ابزار StringTie v2.0.6 (Pertea et al., 2015) استفاده شد، سپس از StringTie merge برای ترکیب، سرهم‌گذاری و ایجاد مجموعه‌ای منحصر به فرد از رونوشت‌ها استفاده شد. برای طبقه‌بندی رونوشت‌ها در گروه‌های مختلف، فایل خروجی StringTie با فایل مستندسازی ژنوم مرجع (GTF) با استفاده از نرم‌افزار gffcompare مقایسه شد. در نهایت، از نرم‌افزار BEDTools v2.29.2 (Quinlan & Hall, 2010) برای استخراج توالی‌ها از ژنوم مرجع سبب‌زمینی استفاده شد.

برای شناسایی lncRNAهای بالقوه، ابتدا رونوشت‌های مستندسازی نشده با در نظر گرفتن حد‌آستانه تعداد رونوشت در میلیون کمتر از ۱ و طول توالی کمتر از ۲۰۰ نوکلئوتید، حذف شدند. در گام بعد، از ابزار FEELnc v2.0 (Wucher et al., 2017) با کاربرد مدل m “shuffle” برای استنتاج lncRNAهای بالقوه از رونوشت‌های مستندسازی نشده استفاده شد. در گام سوم، پتانسیل کدگذاری lncRNAهای پیش‌بینی شده با استفاده از نرم‌افزار محاسبه کننده پتانسیل کدگذاری مورد ارزیابی قرار گرفت (Kang et al., 2017). در گام بعد از ابزار tRNAscan-SE v2.0 و Barrnap v0.9 برای فیلتر کردن tRNAها و rRNAها استفاده شد (Lowe & Chan, 2016). در گام پنجم، توالی رونوشت‌های باقی‌مانده برای افزایش اختصاصی بودن و دقت پیش‌بینی و رتبه‌بندی با استفاده از ابزار CREMA مورد ارزیابی قرار

گیاخان مکانیسم مولکولی سنتز و عملکرد آن در برخی از گیاخان مورد توجه محققین قرار گرفته است (Hawkesford & Griffiths, 2019). تاکنون چندین مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده درگیر در پاسخ به کمبود نیتروژن در گیاخان مختلف مانند برنج، ذرت و صنوبر شناسایی شده‌اند (Chen et al., 2016; Lv et al., 2016; Shin et al., 2018). برای نمونه، شین و همکاران (Shin et al., 2018) در برنج مکانیسم عملکرد مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده cis-NATAMT 1.1 و 1.2 را بررسی و نشان دادند که برهم‌کنش ژن AMT1 و مولکول RNA طویل غیرکدکننده متناظر با آن در در هموستازی N مؤثر می‌باشد (Shin et al., 2018). مطالعه بر روی مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده در ژنوم آرابیدوپسیس نیز تحت انواع مختلف شرایط کمبود مواد مغذی نقش trans-acting siRNA3 را به‌عنوان یک مولکول RNA طویل غیرکدکننده مهم برجسته کرده است (Fukuda et al., 2019). با توجه به این‌که تنش‌های غیرزیستی منجر به تغییر در بیان ژن‌ها و عوامل تنظیمی متعددی در بافت‌ها و دوره‌های نموی مختلف می‌شوند؛ از این‌رو، انتظار می‌رود که با تحلیل مجموع رونوشت‌ها، بتوان ژن‌ها و عوامل تنظیمی از جمله مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده درگیر در پاسخ به تنش‌ها از جمله تنش کمبود ازت را شناسایی نمود؛ بنابراین، هدف از پژوهش حاضر شناسایی و بررسی بیان مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده پاسخگو به تنش کمبود نیتروژن و شناسایی ژن‌های هدف آن‌ها در در جریان غده‌زایی سبب‌زمینی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شناسایی LncRNAs

در گام نخست، کتابخانه داده‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکرپتوم سبب‌زمینی تحت تیمار کمبود ازت و شاهد از پایگاه داده NCBI دانلود شدند (Gálvez et al., 2016).

دارای بیان افتراقی و مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده که بیان افتراقی نشان دادند به‌عنوان ورودی به LncTar معرفی شدند و با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض ژن‌های هدف ترانس‌شناسایی شدند.

شناسایی ژن‌ها و LncRNAs با بیان افتراقی
برای تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن‌های هدف و همچنین LncRNAها از نرم‌افزار DESeq2 (Love et al., 2014) با در نظر گرفتن حدود آستانه $FDR < 0.05$ ، $|\log_2(FC)| \geq 2$ و $CPM \geq 1$ استفاده شد.

کشت و اعمال تیمار

آزمایش گلخانه‌ای در ۱۹ اسفند ۱۴۰۱ در گلدان‌های ۸ لیتری انجام شد. مقدار ۷۰۰ گرم شن برای زهکشی و ۶ کیلوگرم خاک در هر گلدان ریخته شد. نتیجه آزمون خاک کشت گلدانی نشان داد که $pH = 7/6$ ، درصد کربن آلی ۱/۰۹، وزن مخصوص ظاهری ۱/۵۹، بافت خاک رسی، درصد نیتروژن ۰/۱۱۲، فسفر ۱۱/۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و پتاسیم ۴۰۳ پی‌پی‌ام بود. تیمارهای مورد نظر شامل دو میزان کود نیتروژن (۰ و ۰/۳ گرم نیتروژن در گلدان) بود که در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. کود N در هنگام کاشت به‌عنوان نترات آمونیوم (۰-۰-۴۶) با حجم کامل خاک گلدان مخلوط شد. همچنین در تمام گلدان‌ها مقدار ۰/۳ گرم P_2O_5 چهل و شش درصد و K_2O پنجاه و پنج درصد به‌صورت مخلوط با خاک گلدان در هنگام کاشت استفاده شد. سپس یک عدد سیب‌زمینی ۵۰ گرمی بذری وارسته‌شپودی در هر گلدان کاشته شد. گیاهان در گلدان تحت شرایط گلخانه (۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۶/۸ ساعت روز/تاریکی) رشد کردند. نمونه‌برداری در اوایل مرحله غده‌زایی انجام شد. در هر نمونه‌برداری، برگچه آپیکال آخرین برگ کاملاً منبسط شده (معمولاً چهارمین برگ از بالای گیاه) در هر گلدان نمونه‌برداری شد و بلافاصله در ازت مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (شکل ۱).

گرفتند (Simopoulos et al., 2018). جستجو با استفاده از ابزار BLAST علیه پایگاه‌های داده پروتئینی UniProt ، Pfam و Rfam انجام شد. در نهایت از ابزار PlancPro (Negri et al., 2019) برای بررسی و ارزیابی مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده شناسایی شده استفاده شد. برای ارزیابی حفاظت‌شدگی توالی‌های شناسایی شده و معتبرتر کردن این مجموعه، مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده شناسایی شده در این مطالعه با مجموعه LncRNAهای گیاهی موجود در پایگاه GreeNC (Paytuví Gallart et al., 2016)، CANTATAdb v2.0 (Szcześniak et al., 2019) و LncRNAdb v2.0 (Quek et al., 2015) و PLncDB v2.0 (Jin et al., 2021) بلاست شدند.

پیش‌بینی، مستندسازی عملکردی و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن‌های هدف

در این مطالعه، کار مستندسازی عملکردی ژن‌های واقع در ۱۰۰ Kbp بالادست و پایین دست مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده شناسایی شده، به‌عنوان ژن‌های هدف بالقوه‌ای که با فعالیت عناصر سیس تنظیم می‌شوند از طریق تجزیه و تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن^۱ و مسیرهای متبویکی^۲ با استفاده از String Analysis انجام شد (Szkłarczyk et al., 2023). در پایگاه <https://spudb.uga.edu> از نظر عملکردی و بیولوژیکی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape v3.10 شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین ترسیم و با استفاده از افزونه cyto-hubba ژن‌های هاب مشخص شدند. علاوه بر این برای شناسایی ژن‌های هدف ترانس‌برهم‌کنش بین مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده با بیان افتراقی^۳ و ژن‌های دارای بیان افتراقی^۴ با استفاده از ابزار LncTa بررسی شد (Li et al., 2015). برای این منظور، ژن‌های

^۱ Gene ontology: GO

^۲ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: KEGG

^۳ Differential expression long non-coding RNA: DE-lncRNA

^۴ Differential expression gene: DEG

بررسی تغییرات بیان نسبی LncRNA های

شناسایی شده با استفاده از qRT-PCR

به منظور بررسی و تأیید روند تغییرات بیان LncRNA های شناسایی شده، سطح بیان برخی از مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده از طریق واکنش qRT-PCR در نمونه کنترل و تحت تنش کمبود ازت سنجش شد. بدین منظور، RNA کل با استفاده از کیت استخراج ستونی DENAzist RNA طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده استخراج شد. پس از بررسی و تأیید کیفیت و کمیت RNA استخراجی از طریق نانودراپ و ژل-الکتروفورز، cDNA با استفاده از مقادیر برابر از

نمونه‌ها، با استفاده از کیت Sinnaclon Reverse (First Strand cDNA Synthesis Kit) شرکت سیناکلون طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده سنتز شد. در نهایت واکنش qRT-PCR با استفاده از cDNA سنتز شده به عنوان الگو، آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و مسترمیکس سایبرگرین (Sina SYBR Blue No) (ROX) شرکت سیناکلون در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی با استفاده از دستگاه Q gene Real-time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش از ژن خانه‌دار *elf1-α* جهت نرمال‌سازی داده‌های بیانی با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_t}$ استفاده شد.



شکل ۱. تأثیر کمبود نیتروژن بر رشد سیب‌زمینی. گلدان سمت چپ: کمبود نیتروژن و گلدان سمت راست: تیمار شده با ۰/۳ گرم نیترا ت آمونیوم

Figure 1. Effect of nitrogen deficiency on potato growth. Left pot: nitrogen deficiency and right pot: treated with 0.3 grams of ammonium nitrate

جدول ۱. ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش qRT-PCR

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

Sequence name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon length (bp)
StlncRNA-161_F	TCTATCTCCATCACTTGTTGTATG	60	147
StlncRNA-161_R	CAATAACGCAAGCAATTAGGTAC	59	
StlncRNA-162_F	TGCAGAATTGCAAATTAGAGATCAG	61	152
StlncRNA-162_R	TCTTCTATGAGTTGGTTCAGGTATT	61	
StlncRNA-63_F	ATCTTTCCATCCATACTAACCATC	60	169
StlncRNA-63_R	5'ATCCAACAGCCACCTTCTC3'	57	
StlncRNA-75_F	AGAGAAATACACGCACTAAGAGAC	62	161
StlncRNA-75_R	CATCTACAAACACGGCTACAATC	61	
<i>elf1-α</i> _F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	57	160
<i>elf1-α</i> _R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	61	

نتایج

شناسایی توالی‌های lncRNA در پروفایل بیانی

سیب‌زمینی

در مجموع، پس از تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA seq سیب‌زمینی تعداد ۱۰۳۶ رونوشت به‌عنوان lncRNA شناسایی شد. از این تعداد، ۲۱۱ رونوشت به‌عنوان مولکول‌های RNA طولی غیرکدکننده دارای بیان افتراقی شناسایی شدند (جدول ۲). چهار رونوشت با بیان متفاوت در نمونه‌برداری اول و ۳ رونوشت

با بیان متفاوت از نمونه‌برداری دوم به‌عنوان مولکول‌های RNA طولی غیرکدکننده دارای بیان افتراقی بین‌ژنی شناسایی شدند که ۳ رونوشت StlncRNA-161، StlncRNA-162 و StlncRNA-75 در بین دو مرحله نمونه برداری مشترک بودند. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بیان نسبی این ۳ رونوشت تحت تیمار ازت در هر دو مرحله نمونه‌برداری افزایش یافت. این در حالی بود که بیان نسبی StlncRNA-63 در نمونه برداری اول کاهش و در نمونه برداری دوم تغییر نکرد (جدول ۳).

جدول ۲. نام و موقعیت کروموزومی lncRNAهای شناسایی شده در سیب‌زمینی تحت تنش کمبود نیتروژن

Table 2. Names and chromosomal location of LncRNAs identified in potato under nitrogen deficiency stress

Putative l name	Chromosome position	Contractual name	Chromosome position
StlncRNA-1	chr01:13964104-13965507	StlncRNA-107	chr01:8739041-8740307
StlncRNA-2	chr01:21526475-21527732	StlncRNA-108	chr01:9460818-9461380
StlncRNA-3	chr01:21529207-21529784	StlncRNA-109	chr02:18101953-18103716
StlncRNA-4	chr01:28166081-28167741	StlncRNA-110	chr02:18871211-18872102
StlncRNA-5	chr01:31297785-31299166	StlncRNA-111	chr02:20097382-20100259
StlncRNA-6	chr01:33643651-33646864	StlncRNA-112	chr02:22969938-22971875
StlncRNA-7	chr01:3570218-3572360	StlncRNA-113	chr02:26915902-26917304
StlncRNA-8	chr01:47521639-47523742	StlncRNA-114	chr02:30674462-30677192
StlncRNA-9	chr01:5358910-5359451	StlncRNA-115	chr02:32005455-32006057
StlncRNA-10	chr01:53751745-53752326	StlncRNA-116	chr02:33801300-33801528
StlncRNA-11	chr01:53752893-53753533	StlncRNA-117	chr02:38967466-38971167
StlncRNA-12	chr01:53755049-53755418	StlncRNA-118	chr02:40315273-40316759
StlncRNA-13	chr01:53755958-53760263	StlncRNA-119	chr02:43564117-43567893
StlncRNA-14	chr01:55307727-55310110	StlncRNA-120	chr02:44806346-44807191
StlncRNA-15	chr01:58532012-58534171	StlncRNA-121	chr02:7842505-7843670
StlncRNA-16	chr01:62396333-62398604	StlncRNA-122	chr02:8710395-8711023
StlncRNA-17	chr01:63911906-63912970	StlncRNA-123	chr03:18700345-18703311
StlncRNA-18	chr01:63918281-63919077	StlncRNA-124	chr03:25511542-25512020
StlncRNA-19	chr01:64740091-64742193	StlncRNA-125	chr03:25900482-25901285
StlncRNA-20	chr01:67182608-67183722	StlncRNA-126	chr03:32560521-32562636
StlncRNA-21	chr01:68671900-68673843	StlncRNA-127	chr03:32566699-32569085
StlncRNA-22	chr01:69080239-69082111	StlncRNA-128	chr03:34762900-34764275
StlncRNA-23	chr01:7299440-7301832	StlncRNA-129	chr03:38429897-38431958
StlncRNA-24	chr01:86079170-86080540	StlncRNA-130	chr03:40882970-40884362
StlncRNA-25	chr03:43727240-43729380	StlncRNA-131	chr03:41312872-41313468
StlncRNA-26	chr03:51020807-51022072	StlncRNA-132	chr05:525800-528977
StlncRNA-27	chr03:59724948-59727739	StlncRNA-133	chr05:8546915-8548721
StlncRNA-28	chr03:60035981-60037739	StlncRNA-134	chr05:8824775-8825047
StlncRNA-29	chr04:1715669-1717289	StlncRNA-135	chr06:17204994-17205315
StlncRNA-30	chr04:1733518-1735026	StlncRNA-136	chr06:22318413-22319692
StlncRNA-31	chr04:18208376-18208861	StlncRNA-137	chr06:23181005-23182484
StlncRNA-32	chr04:20747321-20749150	StlncRNA-138	chr06:23183372-23183833
StlncRNA-33	chr04:22388940-22392095	StlncRNA-139	chr06:3090836-3092214
StlncRNA-34	chr04:29127288-29129514	StlncRNA-140	chr06:39437920-39439403
StlncRNA-35	chr04:38316029-38316493	StlncRNA-141	chr06:43007658-43009141
StlncRNA-36	chr04:46125856-46127432	StlncRNA-142	chr06:46519267-46520734
StlncRNA-37	chr04:51640111-51640680	StlncRNA-143	chr06:48412873-48413235
StlncRNA-38	chr04:5340445-5343265	StlncRNA-144	chr06:49779585-49781818
StlncRNA-39	chr04:5436490-5436984	StlncRNA-145	chr06:55989928-55992728
StlncRNA-40	chr04:58307895-58310072	StlncRNA-146	chr06:58439197-58439562
StlncRNA-41	chr04:597630-601541	StlncRNA-147	chr06:8004796-8005678
StlncRNA-42	chr04:59939297-59941596	StlncRNA-148	chr07:15616831-15618483
StlncRNA-43	chr04:606282-606730	StlncRNA-149	chr07:18960877-18964687
StlncRNA-44	chr04:65867011-65868126	StlncRNA-150	chr07:21089784-21093308
StlncRNA-45	chr04:65875795-65876606	StlncRNA-151	chr07:31094448-31099259
StlncRNA-46	chr04:9328117-9329863	StlncRNA-152	chr07:31431329-31435104

ادامه جدول ۲. نام و موقعیت کروموزومی LncRNAهای شناسایی شده در سیب‌زمینی تحت تنش کمبود نیتروژن

Continued table 2. Names and chromosomal location of LncRNAs identified in potato under nitrogen deficiency stress

Putative l name	Chromosome position	Contractual name	Chromosome position
StlncRNA-47	chr04:9443270-9443605	StlncRNA-153	chr07:33464371-33464950
StlncRNA-48	chr05:40640284-40642343	StlncRNA-154	chr07:35229006-35230701
StlncRNA-49	chr05:47627768-47629887	StlncRNA-155	chr07:35233805-35234214
StlncRNA-50	chr09:11471221-11473097	StlncRNA-156	chr07:35473390-35473742
StlncRNA-51	chr09:14904636-14906659	StlncRNA-157	chr07:36677705-3668106
StlncRNA-52	chr09:18590690-18590915	StlncRNA-158	chr07:3668726-3669574
StlncRNA-53	chr09:24989203-24993001	StlncRNA-159	chr07:43200038-43206413
StlncRNA-54	chr09:25082311-25083427	StlncRNA-160	chr07:44427965-44428860
StlncRNA-55	chr09:35689139-35689498	StlncRNA-161	chr07:48191773-48192231
StlncRNA-56	chr09:38933484-38934678	StlncRNA-162	chr07:48192552-48193268
StlncRNA-57	chr09:40195971-40199700	StlncRNA-163	chr07:5158368-5160315
StlncRNA-58	chr09:40903708-40904315	StlncRNA-164	chr07:7309460-7309761
StlncRNA-59	chr09:4372957-4373713	StlncRNA-165	chr07:8767606-8770053
StlncRNA-60	chr09:45568098-45569418	StlncRNA-166	chr08:31727651-31731251
StlncRNA-61	chr09:52994949-52997094	StlncRNA-167	chr08:32024536-32028707
StlncRNA-62	chr09:56426509-56427939	StlncRNA-168	chr08:32030687-32030940
StlncRNA-63	chr09:58631381-58632701	StlncRNA-169	chr08:32626040-32627389
StlncRNA-64	chr09:63758136-63759902	StlncRNA-170	chr08:33460989-33463874
StlncRNA-65	chr09:7741610-7742294	StlncRNA-171	chr08:33497510-33497969
StlncRNA-66	chr09:9865021-9867573	StlncRNA-172	chr08:46194421-46196996
StlncRNA-67	chr10:25255783-25257221	StlncRNA-173	chr08:47953634-47956275
StlncRNA-68	chr10:2856208-2858759	StlncRNA-174	chr08:59188180-59189737
StlncRNA-69	chr10:3356200-3357967	StlncRNA-175	chr08:6215718-6217682
StlncRNA-70	chr10:38064936-38066354	StlncRNA-176	chr08:6736456-6737120
StlncRNA-71	chr10:39029637-39031385	StlncRNA-177	chr08:6742754-6745540
StlncRNA-72	chr10:39710699-39713542	StlncRNA-178	chr08:6757529-6758260
StlncRNA-73	chr10:41570148-41572059	StlncRNA-179	chr08:6758838-6759192
StlncRNA-74	chr10:42603962-42605703	StlncRNA-180	chr09:11047553-11048337
StlncRNA-75	chr10:43339868-43340625	StlncRNA-181	chr09:1139297-1140265
StlncRNA-76	chr10:44107459-44110265	StlncRNA-182	chr12:26077197-26080957
StlncRNA-77	chr10:45895315-45897777	StlncRNA-183	chr12:3011161-3011651
StlncRNA-78	chr10:49419803-49420130	StlncRNA-184	chr12:37518131-37520198
StlncRNA-79	chr10:50689839-50690914	StlncRNA-185	chr12:3975685-3978083
StlncRNA-80	chr10:50696484-50697019	StlncRNA-186	chr12:39906490-39907743
StlncRNA-81	chr10:52409789-52411593	StlncRNA-187	chr12:51210904-51212354
StlncRNA-82	chr10:52927694-52929208	StlncRNA-188	chr12:52011304-52011850
StlncRNA-83	chr10:59498505-59500016	StlncRNA-189	chr12:54058803-54061580
StlncRNA-84	chr10:5956402-5959050	StlncRNA-190	chr12:57383390-57385962
StlncRNA-85	chr10:7665652-7667355	StlncRNA-191	chr12:58579911-58581307
StlncRNA-86	chr11:15027306-15029335	StlncRNA-192	chr12:58583204-58583819
StlncRNA-87	chr11:18914259-18916463	StlncRNA-193	chr12:6096949-6101002
StlncRNA-88	chr11:21749461-21751129	StlncRNA-194	chr12:9511877-9514063
StlncRNA-89	chr11:28764242-28764938	StlncRNA-195	chr01:2265164-2267013
StlncRNA-90	chr11:33635647-33641461	StlncRNA-196	chr01:28590893-28591495
StlncRNA-91	chr11:35782768-35783347	StlncRNA-197	chr01:37487326-37490236
StlncRNA-92	chr11:38795650-38796150	StlncRNA-198	chr01:76969151-76972730
StlncRNA-93	chr11:41752200-41753075	StlncRNA-199	chr04:16859631-16860381
StlncRNA-94	chr11:46464639-46469217	StlncRNA-200	chr04:47746824-47747304
StlncRNA-95	chr11:46474113-46476801	StlncRNA-201	chr04:7731586-7732128
StlncRNA-96	chr11:8694111-8695917	StlncRNA-202	chr05:2910245-2912011
StlncRNA-97	chr11:924189-925642	StlncRNA-203	chr06:49063329-49066002
StlncRNA-98	chr12:15623126-15624983	StlncRNA-204	chr07:17615864-17616536
StlncRNA-99	chr12:16316837-16319806	StlncRNA-205	chr07:25657895-25658245
StlncRNA-100	chr09:1268028-1268817	StlncRNA-206	chr07:27564929-27565557
StlncRNA-101	chr09:61123545-61125295	StlncRNA-207	chr07:46817620-46819511
StlncRNA-102	chr10:56210491-56210988	StlncRNA-208	chr07:54860143-54860557
StlncRNA-103	chr11:37600035-37601983	StlncRNA-209	chr07:9561849-9562274
StlncRNA-104	chr11:46531263-46531660	StlncRNA-210	chr08:6208797-6209187
StlncRNA-105	chr12:11354258-11354722	StlncRNA-211	chr08:7315153-7317735
StlncRNA-106	chr12:9404039-9405109		

داد که پروتئین‌های هدف در سه حوزه فرایندهای زیستی^۱، عملکرد مولکولی^۲ و جایگاه سلولی^۳ و همچنین مسیرهای متابولیکی دخالت داشتند (شکل ۳). همان‌طور که در شکل ۳ آمده است در حوزه جایگاه سلولی، "آناتومیک سلولی" با ۸۵ پروتئین هدف دارای بیشترین فراوانی بود، به دنبال آن، "فرآیندهای اسیدهای چرب" با ۱۵ پروتئین، "بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه" با ۱۰ پروتئین، "تخریب و متابولیسم اسیدهای چرب"، هر یک با ۳ پروتئین در مرتبه بعدی قرار داشتند.

اعتبارسنجی بیان LncRNA های شناسایی شده
به منظور بررسی تغییرات بیان و همچنین اعتبارسنجی بیان توالی مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده شناسایی شده، چهار توالی مولکول RNA طویل غیرکدکننده منتخب در این مطالعه با استفاده از واکنش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مقایسه بیان نسبی این چهار توالی در دو حالت RNA-Seq و qRT-PCR نشان داد که بیان توالی‌های شناسایی شده در روش RNA-seq و qRT-PCR، همبستگی مثبت و معنی‌داری ($r = 0.95$, $P < 0.01$) بین دو حالت سنجش وجود داشت (شکل ۴).

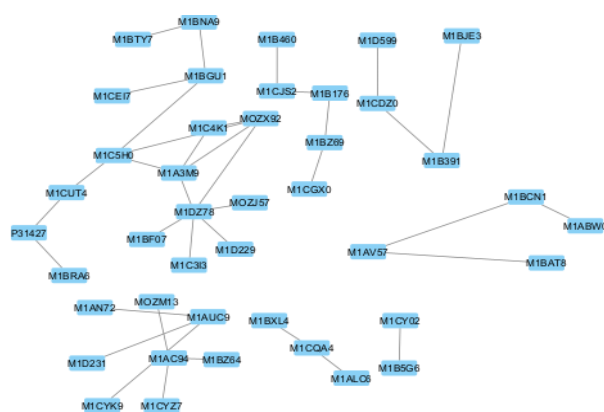
شبکه پروتئین‌های هدف LncRNAs

برای بررسی شبکه برهم‌کنشی پروتئین‌های هدف مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده با بیان افتراقی از پایگاه داده Strings استفاده شد. نتایج نشان داد که پروتئین‌های بالادست و پایین دست DE-lncRNAs، یک شبکه تنظیمی رونویسی پیچیده را تشکیل می‌دهند (شکل ۲). در کل تعداد ۹۳ پروتئین هدف شناسایی شد که از آن بین ۴۳ پروتئین در تشکیل شبکه دخالت داشتند (شکل ۲). پس از بررسی‌های تکمیلی، پنج پروتئین هاب شناسایی شد که براساس اطلاعات موجود در پایگاه داده Spud DB پروتئین‌های M0ZX92 و m1a3m9 از خانواده ایزومرازاها (دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که برای کاتالیز کردن مرحله اولیه در هر چرخه اکسیداسیون اسید چرب β در میتوکندری سلول‌ها عمل می‌کنند) در این بین قرار داشتند. پروتئین M1C4K1 یک پروتئین حاوی دمین اتصال (NAD) نیکوتین آمیدآدنین دی‌نوکلئوتید و (NADP) نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات است. همچنین پروتئین M1DZ78 یک پروتئین ریبوزومی است که در فرآیند انتقال سلولی نقش دارد.

مستندسازی عملکردی و شناسایی مسیرهای

متابولیکی پروتئین‌های هدف

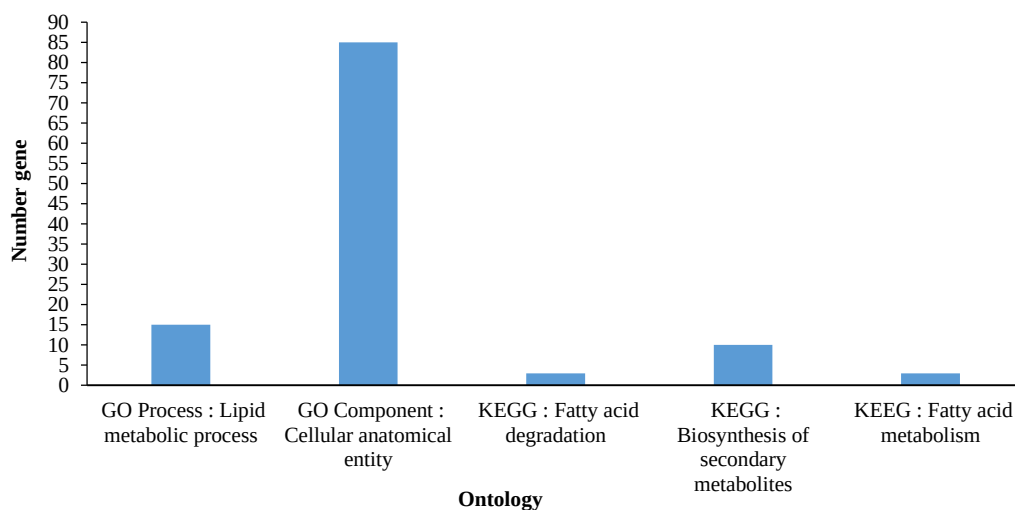
نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن‌های هدف نشان



شکل ۲. شبکه برهم‌کنش ژن‌های هدف تنظیم‌شده توسط RNAهای طویل غیرکدکننده شناسایی شده در ترنسکریپتوم سیب‌زمینی تحت تنش کمبود نیتروژن

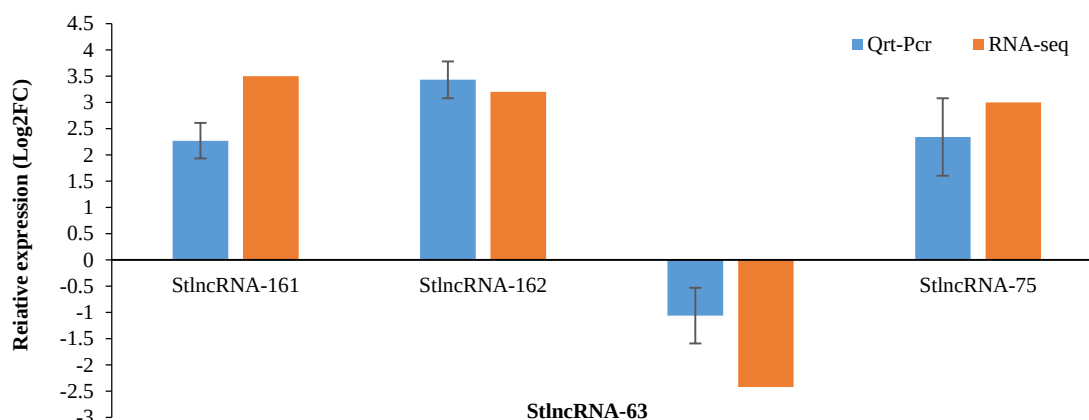
Figure 2. Interaction network of target genes regulated by long non-coding RNAs identified in potato transcriptome under nitrogen deficiency stress

1. Biological process: BP
2. Molecular function: MF
3. Cellular component: CC



شکل ۳. آنالیز عملکردی ژن‌های هدف DE-lncRNA شناسایی شده در ترنسکریپتوم سیب‌زمینی تحت تیمار تنش کمبود نیتروژن

Figure 3. Functional analysis of target genes of DE-lncRNA identified in potato transcriptome under nitrogen deficiency stress treatment



شکل ۴. اعتبارسنجی داده‌های بیان lncRNAهای منتخب دخیل در تنش کمبود نیتروژن با روش RNA-seq با استفاده از qRT-PCR مقادیر بیان نسبی برای سه تکرار زیستی ارائه شده است. میله‌ها نشان‌دهنده مقادیر انحراف معیار هستند.

Figure 4. Validation of expression data of selected lncRNAs involved in nitrogen deficiency stress by RNA-seq method using qRT-PCR. Relative expression values for three biological replicates are presented. The bars represent the standard deviation values

مولکول‌های RNA طولیل غیرکدکننده دارای بیان افتراقی شناسایی شدند. (جدول ۵). بررسی‌های تکمیلی نشان داد که دو LncRNA (StlncRNA-161 و StlncRNA-162) و سه پروتئین هدف احتمالی آن‌ها در اثر تیمار ازت افزایش بیان نشان می‌دهند و LncRNA دیگر (StlncRNA-63) در اثر تیمار ازت، بیان کمی داشت و پروتئین هدف احتمالی آن افزایش بیان نشان داد.

برهم‌کنش DE-lncRNA و ژن‌های هدف

شناسایی شده با استفاده از LncTar

مولکول‌های lncRNA می‌توانند مستقیماً با رونوشت‌های mRNA مکمل خود با جفت شدن بازها تعامل کنند (Hirose *et al.*, 2014). برای بررسی اینکه آیا ژن‌های هدفی با بیان افتراقی (DEGs) توسط LncRNAهای مربوطه به‌صورت ترانس تنظیم می‌شوند یا خیر؟ در مطالعه حاضر با استفاده از الگوریتم موجود در پایگاه LncTar

جدول ۵. ارزیابی برهمکنش بین DE-lncRNA و DEGs با استفاده از LncTar

Table 5. Evaluation of interaction between DE-lncRNA and DEGs using LncTar

Sequence name	Target protein	Activity
StlncRNA-162	Solt.DM.07G008820.1	Involved in phosphate deficiency, phosphate transport and homeostasis
StlncRNA-161	Soltu.DM.10G017580.1	Involved in the ubiquitination of proteins involved in the cell cycle
StlncRNA-161	Soltu.DM.08G011960.1	responsible for the isomerization of 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone (also called chalcone)
StlncRNA-63	Soltu.DM.01G051440.1	Involved in the binding of the phosphate group to other amino acids such as serine and threonine, the phosphorylation of proteins for signal transduction in the cell cycle.

بحث

(Sotub05g028860) که در دوره گلدهی سیبزمینی دخالت دارد، احتمالاً در کنترل غده‌زایی نیز نقش داشته باشد. این ژن در گیاهان با اعمال تیمار ازت بیان نمی‌شود که این موضوع خود نشان می‌دهد که افزایش ازت کافی می‌تواند بلوغ را به تأخیر بیندازد (Navarro *et al.*, 2011). پروتئین Sotub05g012720 در شروع گره‌زایی دخالت دارد که شبیه به عامل رونویسی آراییدوپسیس NIN-like (Sotub01g049920) و Nodulin است. به نظر می‌رسد که پروتئین Sotub05g012720 یک عامل رونویسی پاسخ‌گو به نیترا ت باشد (Konishi & Yanagisawa, 2013) این در حالی است که پروتئین Sotub01g049920 در تشکیل گره در حبوبات و در انتقال اسید آمینه در گیاهان غیر لگوم شرکت می‌کند.

تاکنون مطالعاتی در خصوص شناسایی lncRNAs و مکانیسم‌های مولکولی تنظیمی پیچیده آن‌ها در گیاه سیبزمینی انجام نگرفته است. در این مطالعه، چهار توالی lncRNA شناسایی شد که به‌طور متفاوت تحت تنش کمبود ازت در مرحله اوایل غده‌زایی سیبزمینی بیان شدند. به‌عنوان مثال، میزان بیان StlncRNA-162 در شرایط تیمار ازت نسبت به کنترل افزایش یافت. پروتئین هدف احتمالی این lncRNA، پروتئینی به شماره دسترسی Soltu.DM.10G017580.1 است که تحلیل عملکردی آن نشان داد که در یوبی کوتینه کردن پروتئین‌های دخیل در چرخه سلولی درگیر است. در مقابل، بیان StlncRNA-63 تحت تیمار ازت نسبت به کنترل کاهش یافت. پروتئین هدف احتمالی این مولکول، پروتئین Soltu.DM.01G051440.1 است که نقش فسفریله نمودن اسیدهای آمینه‌ای مانند سرین و ترونین را دارد. فسفوریلاسیون پروتئین‌ها برای انتقال پیام در چرخه

تأثیر نیتروژن بر رشد و عملکرد سیبزمینی موضوع مطالعات متعددی بوده است. برای مثال، مطالعاتی بر روی اثرات فوتوتیپی کمبود N صورت گرفته است (Zebarth *et al.*, 2004; *al.*, 2002). همچنین برخی مطالعات، اثرات N را بر بیان زیر مجموعه کوچکی از ژن‌ها نشان داده‌اند (Li *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011; Zebarth *et al.*, 2011). با این حال، فناوری RNA-seq روش جدیدی را برای مقایسه کل رونوشت گیاه سیبزمینی تحت تیمار N ارائه می‌دهد. آزمایش گالوز و همکاران یکی از اولین آزمایش‌هایی است که از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA برای یافتن عناصر تنظیمی ژنتیکی و ژن‌های هدف با بیان متفاوت آن‌ها تحت تیمار N استفاده کرده است. نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش عملکرد غده، همراه با جذب بیشتر نیتروژن و زیست‌توده خشک و همچنین محتوای کلروفیل برگ بود (Gálvez *et al.*, 2016).

مطالعه شلپ و همکاران نشان داد که آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های پاسخ‌گو به N به حمل و نقل غشایی مرتبط می‌شوند. این ژن‌ها در انتقال سولفات، نیترا ت، اسیدهای آمینه و پپتیدها نقش دارند که با بیان افتراقی مشاهده شده در ژن‌های متابولیسم اسید آمینه و سولفات مطابقت دارد. همچنین کاهش میزان بیان یک انتقال دهنده کاتیونی و افزایش بیان یک تنظیم‌کننده حمل و نقل کاتیونی نشان می‌دهد که حرکت پروتون ممکن است در پاسخ به میزان N دخیل باشد. انتقال کاتیون می‌تواند بر فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز موثر باشد که توسط pH و Ca^{2+} -calmodulin کنترل می‌شود (Shelp *et al.*, 1999). ژن کدکننده پروتئین T

سلولی ضروری است. در کل LncRNAs ممکن است ژن‌ها را از طریق تعاملات متقابل سیس و ترانس تنظیم کنند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مولکول‌های LncRNA شناسایی شده می‌توانند مستقیماً با رونوشت‌های mRNA مکمل خود با جفت شدن فیزیکی تعامل کنند و هم از طریق عناصر داربست و توالی راهنما که با پروتئین و DNA واکنش دهند و از این روش‌ها بیان ژن‌ها را تحت تیمار ازت تنظیم کنند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی GO ژن‌های هدف DE-LncRNA نشان داد که ژن‌ها هدف در حوزه‌های عملکردی مرتبط با پاسخ به تنش غنی شده‌اند. یافته‌های پژوهش حاضر دیدگاه فعلی را در مورد LncRNAs به عنوان تنظیم‌کننده‌های عمومی در سیب‌زمینی تحت تنش ازت تغییر می‌دهند.

نتیجه‌گیری کلی

تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq ترنسکرپتوم سیب‌زمینی تحت تیمار ازت، منجر به شناسایی ۱۰۳۶ LncRNA شد که تعداد ۲۱۱ عدد از آن‌ها بیان افتراقی

داشتند. بررسی هستی‌شناسی ژن‌های هدف این LncRNA‌ها نشان داد که ژن‌های مربوطه در یوبی کوئیتیناسیون پروتئین‌های درگیر در چرخه سلولی و فرآیند انتقال گروه‌های فسفات به اسیدهای آمینه‌هایی مانند سرین و ترئونین نقش دارند. علاوه بر این نقش احتمالی آن‌ها در مسیرهای متابولیکی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، متابولیسم اسیدهای چرب، تخریب اسیدهای چرب نیز مشخص شد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بیان LncRNA‌ها در پاسخ به تیمار ازت در سیب‌زمینی القا می‌شود و از این مسیر با ایفای نقش تنظیمی خود سبب افزایش یا کاهش بیان ژن‌های هدفشان می‌شوند. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند گامی مهم در جهت درک بهتر نقش LncRNA‌ها و عملکرد آن‌ها در توسعه و اصلاح ارقام متحمل به کمبود ازت در سیب‌زمینی و شاید سایر گیاهان زراعی باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

- Birch, P. R., Bryan, G., Fenton, B., Gilroy, E. M., Hein, I., Jones, J. T., Prashar, A., Taylor, M. A., Torrance, L., & Toth, L. K. (2012). Crops that feed the world 8: potato: are the trends of increased global production sustainable? *Food Security*, 4, 477-508.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Chen, M., Wang, C., Bao, H., Chen, H., & Wang, Y. (2016). Genome-wide identification and characterization of novel lncRNAs in *Populus* under nitrogen deficiency. *Molecular Genetics and Genomics*, 291, 1663-1680.
- Curci, P. L., Aiese Cigliano, R., Zuluaga, D. L., Janni, M., Sanseverino, W., & Sonnante, G. (2017). Transcriptomic response of durum wheat to nitrogen starvation. *Scientific Reports*, 7(1), 1176.
- Fukuda, M., Nishida, S., Kakei, Y., Shimada, Y., & Fujiwara, T. (2019). Genome-wide analysis of long intergenic noncoding RNAs responding to low-nutrient conditions in *Arabidopsis thaliana*: possible involvement of trans-acting siRNA3 in response to low nitrogen. *Plant and Cell Physiology*, 60(9), 1961-1973.
- Gálvez, J. H., Tai, H. H., Lagüe, M., Zebarth, B. J., & Strömvik, M. V. (2016). The nitrogen responsive transcriptome in potato (*Solanum tuberosum* L.) reveals significant gene regulatory motifs. *Scientific Reports*, 6(1), 26090.
- Gong, L., Zhang, H., Gan, X., Zhang, L., Chen, Y., Nie, F., Shi, L., Li, M., Guo, Z., Zhang, G., & Song, Y. (2015). Transcriptome profiling of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant under drought stress and water-stimulus conditions. *PLoS One*, 10(5), e0128041.
- Hawkesford, M. J., & Griffiths, S. (2019). Exploiting genetic variation in nitrogen use efficiency for cereal crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 49, 35-42.
- Hirose, T., Mishima, Y., & Tomari, Y. (2014). Elements and machinery of non-coding RNA s: toward their taxonomy. *EMBO Reports*, 15(5), 489-507.
- Jha, U. C., Nayyar, H., Jha, R., Khurshid, M., Zhou, M., Mantri, N., & Siddique, K. H. (2020). Long non-coding RNAs: emerging players regulating plant abiotic stress response and adaptation. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-20.

- Jin, J., Lu, P., Xu, Y., Li, Z., Yu, S., Liu, J., Wang, H., Chua, N. H., & Cao, P. (2021). PLncDB V2. 0: a comprehensive encyclopedia of plant long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1489-D1495.
- Kang, Y. J., Yang, D.-C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y. Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W12-W16.
- Konishi, M., & Yanagisawa, S. (2013). Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nature Communications*, 4(1), 1617.
- Li, J., Ma, W., Zeng, P., Wang, J., Geng, B., Yang, J., & Cui, Q. (2015). LncTar: a tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. *Briefings in Bioinformatics*, 16(5), 806-812.
- Li, X. Q., Sveshnikov, D., Zebarth, B. J., Tai, H., De Koeyer, D., Millard, P., Haroon, M., & Singh, M. (2010). Detection of nitrogen sufficiency in potato plants using gene expression markers. *American Journal of Potato Research*, 87, 50-59.
- Long, C. M., Snapp, S. S., Douches, D. S., & Chase, R. W. (2004). Tuber yield, storability, and quality of Michigan cultivars in response to nitrogen management and seedpiece spacing. *American Journal of Potato Research*, 81, 347-357.
- Lowe, T. M., & Chan, P. P. (2016). tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W54-W57.
- Luo, S., Tai, H., Zebarth, B., Li, X. Q., Millard, P., De Koeyer, D., & Xiong, X. (2011). Sample collection protocol effects on quantification of gene expression in potato leaf tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 369-378.
- Lv, Y., Liang, Z., Ge, M., Qi, W., Zhang, T., Lin, F., Peng, Z., & Zhao, H. (2016). Genome-wide identification and functional prediction of nitrogen-responsive intergenic and intronic long non-coding RNAs in maize (*Zea mays* L.). *BMC Genomics*, 17(1), 1-15.
- Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 10(6), 924-933.
- Navarro, C., Abellenda, J. A., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C. A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K., & Prat, S. (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*, 478(7367), 119-122.
- Negri, T. d. C., Alves, W. A. L., Bugatti, P. H., Saito, P. T. M., Domingues, D. S., & Paschoal, A. R. (2019). Pattern recognition analysis on long noncoding RNAs: a tool for prediction in plants. *Briefings in Bioinformatics*, 20(2), 682-689.
- Paytuví Gallart, A., Hermoso Pulido, A., Anzar Martínez de Lagrán, I., Sanseverino, W., & Aiese Cigliano, R. (2016). GREENC: a Wiki-based database of plant lncRNAs. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1161-D1166.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290-295.
- Quek, X. C., Thomson, D. W., Maag, J. L., Bartonicek, N., Signal, B., Clark, M. B., Gloss, B. S., & Dinger, M. E. (2015). lncRNAdb v2. 0: expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D168-D173.
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841-842.
- Sanchita Trivedi, P.K., & Asif, M.H. (2020). Updates on plant long non-coding RNAs (lncRNAs): the regulatory components. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140, 259-269.
- Shelp, B. J., Bown, A. W., & McLean, M. D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science*, 4(11), 446-452.
- Shin, S. Y., Jeong, J. S., Lim, J. Y., Kim, T., Park, J. H., Kim, J. K., & Shin, C. (2018). Transcriptomic analyses of rice (*Oryza sativa*) genes and non-coding RNAs under nitrogen starvation using multiple omics technologies. *BMC Genomics*, 19, 1-20.
- Simons, M., Saha, R., Guillard, L., Clément, G., Armengaud, P., Cañas, R., Maranas, C. D., Lea, P. J., & Hirel, B. (2014). Nitrogen-use efficiency in maize (*Zea mays* L.): from 'omics' studies to metabolic modelling. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5657-5671.
- Simopoulos, C. M., Weretilnyk, E. A., & Golding, G. B. (2018). Prediction of plant lncRNA by ensemble machine learning classifiers. *BMC Genomics*, 19, 1-11.
- Szczęśniak, M.W., Bryzghalov, O., Ciomborowska-Basheer, J., & Makalowska, I. (2019). CANTATAdb 2.0: expanding the collection of plant long noncoding RNAs. *Plant Long Non-Coding RNAs: Methods and Protocols*, 415-429.
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. V. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638-D646.

- Waseem, M., Liu, Y., & Xia, R. (2020). Long non-coding RNAs, the dark matter: an emerging regulatory component in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 86.
- Westermann, D.T. (2005). Nutritional requirements of potatoes. *American journal of Potato Research*, 82, 301-307.
- Wu, H., Yang, L., & Chen, L. L. (2017). The diversity of long noncoding RNAs and their generation. *Trends in Genetics*, 33(8), 540-552.
- Wucher, V., Legeai, F., Hédan, B., Rizk, G., Lagoutte, L., Leeb, T., Jagannathan, V., Cadieu, E., David, A., Lohi, H., Cirera, S., Fredholm, M., Botherel, N., Peegwater, P. A. J., Béguet, C. L., Fieten, H., Johnson, J., Alföldi, J., André, C., Lindblad-Toh, K., Hitte, C., & Derrien, T. (2017). FEELnc: a tool for long non-coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Research*, 45(8), e57-e57.
- Zebarth, B., Rees, H., Tremblay, N., Fournier, P., & Leblon, B. (2002). *Mapping spatial variation in potato nitrogen status using the N Sensor*. Paper presented at the XXVI International Horticultural Congress: Toward Ecologically Sound Fertilization Strategies for Field Vegetable Production. *ISHS Acta Horticulturae*, 627.
- Zebarth, B., & Rosen, C. (2007). Research perspective on nitrogen BMP development for potato. *American Journal of Potato Research*, 84, 3-18.
- Zebarth, B., Tai, G., Tam, R. D., De Jong, H., & Milburn, P. (2004). Nitrogen use efficiency characteristics of commercial potato cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(2), 589-598.
- Zebarth, B. J., Tai, H., Luo, S., Millard, P., De Koeijer, D., Li, X.-Q., & Xiong, X. (2011). Differential gene expression as an indicator of nitrogen sufficiency in field-grown potato plants. *Plant and Soil*, 345, 387-400.