

## «مقاله پژوهشی»

## شناسایی و بررسی الگوی بیان برخی از ژن‌های HSF، تحت تنش کم‌آبی در عدس (*Lens culinaris* L.)

سمیه ابراهیمی<sup>۱</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۲\*</sup>، سید سجاد سهرابی<sup>۳</sup>، حسن ترابی پوده<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، 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. دکتری تخصصی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۴. دانشیار، گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲۷)

## Identification and expression pattern analysis of some HSF genes in lentil (*Lens culinaris* L.), under water deficit condition

Somayeh Ebrahimi<sup>1</sup>, Ahmad Ismaili<sup>2\*</sup>, Seyed Sajad Sohrabi<sup>3</sup>, Hasan Torabi Podeh<sup>4</sup>

1. M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

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

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

4. Associate Professor, Department of Water Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

(Received: Feb. 14, 2022 - Accepted: Jun. 17, 2022)

### Abstract

Abiotic stresses, including drought in plants, lead to physiological and biochemical changes that are controlled by regulating gene expression. Transcription factors are considered as the most key molecular elements for regulating genes in response to biotic or abiotic stresses. The role of Heat shock transcription factors (HSFs) in the molecular mechanism of response to various abiotic stresses has been confirmed; therefore, this study used the analysis of RNA sequencing data to identify, classify and evaluate changes in HSF expression in lentil under water-deficit stress, and finally, the expression of some transcripts were examined using qRT-PCR. From the total assembled transcripts of lentil, 35 transcripts belonging to three HSF classes were identified. Also, according to the results, the expression of 14.28% of the identified transcripts, which often belonged to class A, is altered in lentil under water-deficit stress. The expression of 14.28% of the identified transcripts, most of which belonged to class A, is altered in lentil under water-deficit stress. In general, the results show that changes in the expression of some transcripts of one HSF gene take precedence over those of other transcripts of that gene in response to drought stress; therefore, it is of particular importance to study alternative splicing in response to this environmental factor in lentil. The HSF genes identified in this study can be used in future experiments to understand better the molecular mechanism of water-deficit stress tolerance in lentil.

**Keywords:** HSFs, Lentil, qRT-PCR, RNA-seq, Water-deficit

### چکیده

تنش‌های غیرزیستی از جمله کم‌آبی در گیاهان منجر به تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شوند. گیاهان مانند سایر موجودات زنده با تنظیم بیان ژن به تغییرات محیطی پاسخ می‌دهند. عوامل رونویسی، کلیدی‌ترین عناصر مولکولی برای تنظیم بیان ژن‌ها به‌شمار می‌روند. نقش عوامل رونویسی شوک حرارتی (HSFs) در مکانیسم مولکولی پاسخ به انواع تنش‌های غیرزیستی مورد تأیید قرار گرفته است، از این رو، در مطالعه حاضر برای شناسایی، طبقه‌بندی و بررسی تغییرات بیان HSFها در عدس تحت تنش کم‌آبی از تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی شده RNA استفاده شد و در نهایت بیان برخی از رونوشت‌ها با استفاده از روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع رونوشت‌های سرهم‌بندی شده عدس، ۳۵ رونوشت متعلق به سه کلاس HSF شناسایی شد. همچنین نتایج نشان داد که در شرایط کم‌آبی از میان HSFهای شناسایی شده، بیان چهار رونوشت شامل HSF A9 و HSF A2 افزایش و در مقابل بیان HSF A6B و HSF B4 کاهش یافته است. علاوه بر این یافته‌های ما نشان داد که در پاسخ به تنش خشکی تغییری در بیان رونوشت‌های HSF کلاس C دیده نمی‌شود. به‌طور کلی، یافته‌های این پژوهش بینشی در مورد ژن‌های HSF عدس و نقش احتمالی آن‌ها در پاسخ به تنش کم‌آبی ایجاد نموده است که می‌توان از آن به‌عنوان پایه‌ای در آزمایش‌های آتی برای درک بهتر مکانیسم مولکولی تحمل عدس به تنش کم‌آبی استفاده نمود.

**واژه‌های کلیدی:** تنش کم‌آبی، عوامل رونویسی شوک حرارتی، عدس، RNA-seq, qRT-PCR

### مقدمه

عدس (*Lens culinaris* L.) گیاهی دیپلوئید ( $2n = 2x = 14$ )، خود‌گرده‌افشان و با اندازه ژنومی معادل ۴ گیگا باز (Arumuganathan and Earle, 1991)، سومین گیاه مهم از گروه حبوبات دانه‌ای سردسیر محسوب می‌شود (Khazaei et al., 2016; Kumar et al., 2013; Srivastava and Vasishtha, 2012; Sohrabi et al., 2022). میزان تولید عدس نیز مانند اغلب محصولات گیاهی به دلیل رخ داد انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی در مناطق کشت، پایین‌تر از میانگین جهانی می‌باشد (Sultana et al., 2014; Hosseini et al., 2021). ایران نیز با داشتن اقلیم خشک و نیمه‌خشک و همچنین دامنه نوسانات دمایی بالا، از شرایط کاملاً مطلوب و بهینه جهت کشت عدس برخوردار نبوده و میانگین عملکرد این محصول در مناطق کشت آن که غالباً دیم می‌باشند، پایین‌تر از میانگین جهانی است (Sabaghpour et al., 2013). مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد که ۲۸ درصد از افت عملکرد عدس در مناطق کشت آن در سرتاسر جهان، به علت تنش‌های غیرزیستی به‌ویژه تنش کم‌آبی می‌باشد. در چنین شرایطی استفاده از ارقام جدید متحمل به تنش کم‌آبی می‌تواند راهکار مناسبی برای حفظ پایداری عملکرد در عدس باشد (Kumar et al., 2013; Sohrabi et al., 2022).

برنامه‌های اصلاحی برای بهبود عملکرد کمی و کیفی عدس، به دلیل کمبود محتوای ژنتیکی با چالش‌های زیادی مواجه می‌باشد (Sultana et al., 2014; Ramtekey et al., 2021). تاکنون روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات در عدس، صرفاً در بهبود برخی از صفات تک‌ژنی مؤثر بوده ولی استفاده از این رویکرد در اصلاح اغلب صفات کمی نظیر تحمل به تنش‌های محیطی، وقت‌گیر، پرهزینه و از دقت کمی برخوردار می‌باشد (Sohrabi et al., 2022)؛ از این رو استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و

زیست‌فناوری به‌منظور بهبود روش‌های کلاسیک، افزایش کارایی و دقت در نوترکیبی حاصل از آمیزش‌ها و افزایش دامنه خزانۀ ژنی عدس امری ضروری است (Kumar et al., 2014; Suri et al., 2022).

اغلب تنش‌های غیرزیستی در گیاهان باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شوند که با تنظیم بیان ژن کنترل می‌شوند. از این رو با تحلیل ترنسکرپتوم (Transcriptome)، می‌توان ژن‌هایی که تحت تنش تغییر بیان داده را شناسایی نموده و مجموعه‌ای از اطلاعات را به‌منظور درک اساس مولکولی تحمل به تنش فراهم نمود (Rizhsky et al., 2004). عوامل رونویسی (Transcription factors, TFs) کلیدی‌ترین عناصر مولکولی برای تنظیم بیان ژن در پاسخ به محرک‌های زنده یا غیرزنده به‌شمار می‌روند (Manna et al., 2021). در میان خانواده‌های مختلف TF، نقش عوامل رونویسی شوک حرارتی (Heat shock factors, HSFs) در مکانیسم مولکولی پاسخ به انواع تنش‌های غیرزیستی مورد تأیید قرار گرفته است (Wang et al., 2012; Swindell et al., 2007; Manna et al., 2021; Tan et al., 2021).

به‌طور کلی، در شرایط بهینه، ژن‌های HSF در وضعیت غیرفعال می‌باشند و با Hsp90 / Hsp70 کمپلکس‌های سیتوپلاسمی را تشکیل می‌دهند (Lin et al., 2014). با رخ داد تنش‌های غیرزیستی به‌ویژه تنش گرما، HSFها از حالت مونومریک در سیتوپلاسم خارج‌شده و به‌حالت تریمریک در هسته تغییر یافته و از مجتمع‌های چاپرونی رها می‌شوند و فرصت مناسبی برای اتصال HSFها به موتیف حفاظت شده‌ی متصل‌شونده به عناصر شوک حرارتی (Heat shock elements, HSEs) ( $5'$ -AGAAnnTTCT-3') در پروموتور ژن‌های پاسخگو به تنش را فراهم می‌سازند (Scharf et al., 2012; Kmiecik and Mayer, 2022). Hsfها با تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به تنش از جمله پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat shock protein, Hsp)

(*Arabidopsis thaliana*) و گندم می‌شود (Bi et al., 2020).

بنابراین با توجه به عملکرد مهم ژن‌های HSF در تنش‌های غیر زیستی، هدف این مطالعه شناسایی رونوشت‌های خانواده ژنی HSF در عدس برای اولین بار می‌باشد. علاوه بر این تغییرات بیان ژن‌های HSF منتخب در شرایط تنش خشکی با استفاده از qRT-PCR نیز سنجیده شد.

### مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری، پردازش و سرهم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم**  
در این مطالعه از مجموعه داده‌های RNA-seq عدس تحت شرایط کم‌آبی، موجود در پایگاه داده NCBI (با کد دسترسی PRJNA379217) (Hosseini et al., 2021)، برای شناسایی ژن‌های HSF و بررسی بیان آن‌ها استفاده شد (جدول ۱). از مطالعه حسینی و همکاران (Hosseini et al., 2021)، نمونه‌های توالی‌یابی RNA مربوط به تنش خشکی (PEG بیست درصد)، شامل نمونه‌های کنترل و تنش هر کدام با دو تکرار انتخاب شدند. کیفیت داده‌های خام قبل و پس از پردازش با استفاده نرم‌افزار (نسخه ۰/۱۱/۶) FASTQC مورد ارزیابی قرار گرفت. برای از بین بردن خطای احتمالی موجود در خوانش‌های خام از نرم‌افزار RCorrector (Song and Florea, 2015) و سپس برای حذف توالی آداپتور باقی‌مانده در خوانش‌های خام از نرم‌افزار (نسخه ۰/۹/۵) Cutadapt (Martin, 2011) استفاده شد. برای حذف توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phred score کمتر از ۳۰)، توالی‌های با میزان بالای نوکلئوتیدهای خوانش نشده (N) و توالی‌های با اندازه کمتر از ۱۰۰ (nt) از نرم‌افزار (نسخه ۰/۲۷) Trimmomatic (Bolger et al., 2014) استفاده شد. سرهم‌بندی نوپدید (*de novo assembly*) خوانش‌های تمیز شده (clean reads) با استفاده از نرم‌افزار (نسخه ۲/۴/۰) Trinity طبق پارامترهای پیش فرض انجام شد.

(HSPs)، نقش مهمی در بهبود تحمل در برابر تنش‌های غیر زیستی به‌ویژه تنش گرما دارند (Ohama et al., 2016). علاوه بر القاء بیان HSPها، Hsfها می‌توانند بر بیان ژن‌هایی که محصولاتشان نقش مهمی در سم‌زدایی گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species, ROS) دارند، تأثیر معنی‌داری بگذارند (Driedonks et al., 2015; Tiwari et al., 2022). مرور منابع نشان می‌دهد که بر اساس خصوصیات ساختاری از جمله وجود الحاق کننده (Linker)، دمین اتصال به DNA و جایگاه الیگومریزاسیون (HR-A/B region)، خانواده ژنی HSF در گیاهان به ۳ گروه شامل کلاس‌های A، B و C تقسیم‌بندی می‌شوند (Nover et al., 2001; Kmiecik and Mayer, 2022).  
باین حال تنها در برخی از گیاهان مدل، این خانواده ژنی مهم، شناسایی و گروه‌بندی شده‌اند و در مورد سایر گیاهان از جمله عدس اطلاعاتی از آن‌ها در دسترس نیست. علاوه بر این گرچه عملکرد ژن‌های HSF برای اولین بار به‌عنوان ژن‌های پاسخ به تنش گرما توصیف شده است، با این حال در بسیاری از مطالعات پیامدهای بیان آن‌ها در پاسخ به سایر تنش‌های غیرزیستی مانند کم‌آبی در گیاهان مختلف از جمله گندم (*Triticum aestivum*) (Bi et al., 2020)، جو (*Hordeum vulgare*) (Mishra et al., 2020)، کاساوا (*Manihot esculenta*) (Zeng et al., 2020) و علف بوری (*Agrostis stolonifera*) (Sun et al., 2021) مورد تأیید قرار گرفته است. نتایج مطالعه Wang et al. (2020) نشان داد که بیان برخی از ژن‌های HSF در شرایط خشکی، فرآیند پیام‌رسانی آبسزیک اسید (Abscisic acid, ABA) را فعال نموده که این امر آبخاری از تغییرات در بیان ژن‌های پاسخگو به تنش خشکی را ایجاد می‌کند. همچنین مطالعه نشان داد که بیان بیش از حد ژن TaHsfA6f منجر به بهبود تحمل خشکی، شوری و همچنین افزایش تجمع ABA در آرابیدوپسیس

گروه‌بندی رونوشت‌های شناسایی شده کدکننده HSF با به‌کارگیری مقادیر FPKM (Fragments Per Kilobase of sequence per Million mapped reads) استفاده شد. نمودار آتش‌فشانی نیز برای بررسی و مقایسه بیان رونوشت‌های کدکننده HSF مورد استفاده قرار گرفت.

#### تحلیل عملکردی اعضای خانواده ژنی HSF

تحلیل هستی‌شناسی گروه‌های ژنی (Gene Ontology, GO) با استفاده از نرم‌افزار Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) انجام و برای تعیین گروه‌های غنی‌شده از آزمون دقیق فیشر (Rivals *et al.*, 2007) با  $FDR < 0.05$  استفاده شد.

#### اعمال تنش

بدور عدس (رقم گچساران) (Sabaghpour *et al.*, 2007) در گلدان‌های حاوی پیت ماس، ورمی‌کولیت و ماسه با نسبت (۱:۱:۱) در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان طی سال ۱۳۹۹ کشت شدند. سپس گلدان‌ها به اتاق رشد با متوسط دمای روزانه  $23^{\circ}\text{C}$  تحت چرخه‌های تاریکی / روشنایی، ۸/۱۶ ساعت انتقال داده شدند. گروه تیمار و کنترل شامل سه تکرار (پنج گلدان در هر تکرار) بود. اعمال تنش بر روی گیاهچه‌های ۲۱ روزه مطابق با شرایط اعمال شده در مطالعه قبل (آبیاری با محلول نیم‌هوگلند حاوی پلی‌اتیلن‌گلایکول ۲۰ درصد به مدت سه روز (Hosseini *et al.*, 2021) انجام شد. گروه کنترل در شرایط مشابه ولی آبیاری بهینه تا پایان آزمایش مورد مراقبت قرار گرفت.

#### استخراج RNA

بعد از اعمال تنش، از بافت برگ گیاهچه‌های موجود در

فرآیند حذف افزونگی با استفاده از EvidentialGene pipeline صورت گرفت.

#### شناسایی و بررسی بیان ژن‌های HSF

برای شناسایی همولوگ‌های HSF در عدس، ابتدا قاب‌های خوانش باز (Open Reading Frame, ORF) برای همه رونوشت‌ها با استفاده از بسته نرم‌افزاری (نسخه ۵/۵/۰) Transdecoder تعیین شد. ORF‌های مشابه با پروتئین‌های HSFs توسط BLAST علیه پایگاه داده توالی‌های پروتئین غیرتکراری (NCBI Non-Redundant proteins, NR) با حد آستانه  $e\text{-value} < 10^{-5}$  شناسایی شدند. علاوه بر این پس از دریافت پروفایل (Hidden Markov Model, HMM) تمامی کلاس‌های HSF از پایگاه داده‌های پروتئینی Pfam (PF00447)، مدل مخفی مارک HMM برای شناسایی ژن‌های کاندید HSF عدس نیز به کار برده شد (Finn *et al.*, 2016). علاوه بر این برای شناسایی زمین حفاظت‌شده توالی‌های کاندید از پایگاه‌های داده ProDom, PROSITE, PRINTS, Pfam, CDD, SMART و PANTHER استفاده شد (Quevillon *et al.*, 2005). کلاس‌بندی توالی‌های HSF شناسایی‌شده با استفاده از نتایج حاصل از بلاست، تعیین زمین و توالی حفاظت شده در ساختار توالی‌ها و همچنین همترازی علیه توالی HSF‌های آرآیدوپسیس صورت گرفت.

به‌منظور تعیین میزان بیان ژن‌های منتخب، نقشه‌برداری و کمی‌سازی بیان ژن با استفاده از بسته نرم‌افزاری RSEM انجام گرفت. با به‌کارگیری بسته نرم‌افزاری edgeR ژن‌های دارای افتراق بیان معنی‌دار از نظر آماری بین گروه کنترل و گروه تیمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از  $FDR < 0.01$  و  $|\log_2 FC| \geq 1$  به‌عنوان حد آستانه برای تعیین معنی‌داری تغییرات بیان ژن استفاده شد. از تحلیل خوشه‌ای برای

گلدان‌های هر تکرار در هر گروه آزمایشی نمونه‌برداری صورت گرفته و سپس ادغام شدند. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار داده شدند و تا زمان استخراج RNA در یخچال با دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت از ۳ تکرار ادغام‌شده در هر گروه برای استخراج RNA استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از محلول تریزول (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) از  $100\text{ mg}$  از بافت‌های برداشت‌شده، طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. سنجش کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. کمیت و خلوص RNA نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ارزیابی و نمونه‌هایی که دارای کیفیت و کمیت مناسبی بودند، برای سنتز cDNA انتخاب شدند. علاوه بر این با استفاده از واکنش PCR با الگوی RNA تیمار شده با DNase، از حذف کامل DNA ژنومی اطمینان حاصل شد.

**ساخت کتابخانه cDNA**

برای ساخت کتابخانه cDNA از نمونه‌های RNA استخراج‌شده، از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Cat. K1621) استفاده شد. برای تمام نمونه‌ها، مقدار RNA یکسان و معادل  $600$  نانوگرم به کار برده شد. برای هر واکنش مقادیر موجود در جدول ۱ درون ویال ریخته و با هم مخلوط شدند. در مرحله بعد مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و ۵ ثانیه در دمای  $85^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

### واکنش Real-Time PCR

پس از استخراج توالی‌های مورد نظر از فایل اسمبلی نهایی، آغازگرهای اختصاصی هر ژن با استفاده از نرم‌افزار AlleleID v6.0 طراحی شد (جدول ۲). بررسی بیان نسبی ژن‌های HSF انتخاب‌شده با استفاده از روش

جدول ۱. مقادیر و اجزای واکنش برای ساخت cDNA

مقدار	اجزا واکنش
2 $\mu\text{l}$	5X Reaction Buffer
0.5 $\mu\text{l}$	RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ $\mu\text{L}$ )
0.5 $\mu\text{l}$	Oligo (dT) Primer (50 $\mu\text{M}$ )
1 $\mu\text{l}$	10 mM dNTP Mix
0.5 $\mu\text{l}$	RevertAid M-MuLV RT (200 U/ $\mu\text{L}$ )
0.5 $\mu\text{l}$	Random 6 mers (100 $\mu\text{M}$ )
600 ng	RNA
to 10 $\mu\text{l}$	Water, nuclease-free

جدول ۲. فهرست آغازگرهای طراحی شده

ردیف	نام آغازگر	توالی (3'-5')	دمای ذوب (سانتی‌گراد)	طول قطعه مورد تکثیر (جفت‌باز)
1	HSFA2 (F)	TCTCTTCTCAACCTCTCAATCTC	51	89
	HSFA2 (R)	TCACCGACTACGCAACAAG		
2	HSFA9 (F)	GTTGCTGATACTCTCGGTTC	53	196
	HSFA9 (R)	GACAATCCTGCTCTAACTGC		
3	HSFA6B (F)	TGTGTTGAAGTTGGTCGTTATGG	53.7	171
	HSFA6B (R)	CTGTTGCTGCTTAATCTCTGTCC		
4	HSFB4 (F)	CCGAGGACAACCAAGACTAAG	52.2	183
	HSFB4 (R)	CTGATGAATCCAACCAACAAGC		
ژن کنترل داخلی	GAPDH (F)	TTGGTTACTGAAGACGATG	53.3	177
	GAPDH (R)	TGGCAATGTGAACAATGAGG		

جدول ۴. پارامترهای سرهم‌بندی ترنسکرپتوم عدس

ویژگی‌ها	مقدار
تعداد خوانش ای خام	194460818
تعداد خوانش‌های تمیز شده	180956096
تعداد رونوشت	53791
کوتاه‌ترین طول رونوشت (نوکلئوتید)	200
بلندترین طول رونوشت (نوکلئوتید)	20623
تعداد نوکلئوتید	62724167
میانگین طول (نوکلئوتید)	1166.072
تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱ کیلو نوکلئوتید	23269
تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱۰ کیلونوکلئوتید	17
تعداد رونوشت‌های دارای قاب خوانش باز	44128
N90 (nt)	556
N70 (nt)	1042
N50 (nt)	1584
N30 (nt)	2244
N10 (nt)	3596
GC%	41.92

### شناسایی و گروه‌بندی ژن‌های HSF عدس

از مجموع رونوشت‌های به‌دست‌آمده (۵۳۷۹۱ یونی‌ژن)، پس از فرآیند بلاست، تشخیص دمین‌ها و مقایسه توالی‌ها و دمین‌ها با پایگاه‌های داده پروتئینی مختلف، ۳۵ رونوشت کدکننده HSF در ترنسکرپتوم عدس شناسایی شد، کلاس‌بندی ژن‌های HSF شناسایی‌شده در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بیش‌ترین تعداد رونوشت متعلق به کلاس A (۲۰ یونی‌ژن) و کم‌ترین تعداد متعلق به کلاس C (۳ یونی‌ژن) بود. مقایسه تعداد اعضای شناسایی‌شده هر کدام از خانواده HSF در عدس با فراوانی آن‌ها در برخی از گیاهان (جدول ۵) نشان داد که از نظر

جدول ۳. اجزای واکنش qRT-PCR

اجزا واکنش	مقادیر
SYBR Premix Ex Taq II	10 µl
F (10 pm/µl)	1 µl
R (10 pm/µl)	1 µl
cDNA (60ng/µl) (1:5)	5 µl
Water	to 20 µl

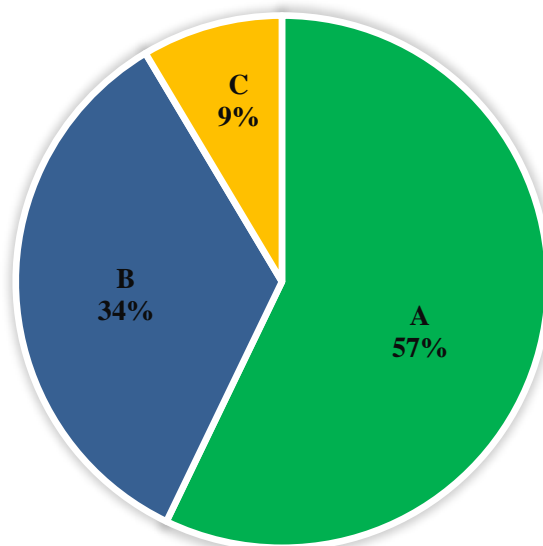
### نتایج

#### سرهم‌بندی نوپدید و پردازش داده‌ها

مجموع داده‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکرپتوم عدس تحت تنش خشکی شامل ۱۹۴۴۶۰۸۱۸ خوانش خام بود. پس از پردازش و پالایش داده‌ها و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین و توالی‌های آداپتور، ۱۸۰۹۵۶۰۹۶ خوانش تمیز شده باقی‌ماند (جدول ۴). سرهم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم عدس با استفاده از خوانش ای تمیز شده از طریق نرم‌افزار Trinity (Grabherr *et al.*, 2011) انجام شد. از بسته نرم‌افزاری EvidentialGene pipeline برای کاهش افزونگی کانتینگ استفاده شد. پس از زدودن توالی‌های تکراری، ۵۳۷۹۱ یونی‌ژن به‌دست آمد. در نهایت، طول بلندترین رونوشت سرهم‌بندی و N50 به ترتیب ۲۰۶۲۳ و ۱۵۳۹ به‌دست آمد (جدول ۴). تمام یونی‌ژن‌ها با استفاده از BLASTx (cutoff E-value < ۱۰<sup>-۵</sup>) علیه پایگاه داده پروتئین‌های غیر تکراری (NR) بلاست شدند. در مجموع ۴۶۳۹۰ یونی‌ژن توسط پایگاه داده NR (۸۶/۲۴ درصد) مستندسازی شدند.

نتایج تحلیل خوشه‌ای به‌روش همسایه نزدیک با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۱) نشان داد که توالی‌های شناسایی شده در سه گروه مجزا قرار گرفتند (شکل ۲). سه گروه شکل گرفته تطابق بسیار بالایی با کلاس‌های HSF موجود نشان داد به طوری که گروهی که سه توالی را در خود جای داده را می‌توان به‌عنوان توالی‌های کلاس C در نظر گرفت و در مورد دو گروه دیگر نیز به ترتیب کلاس‌های A و B قابل تشخیص می‌باشند.

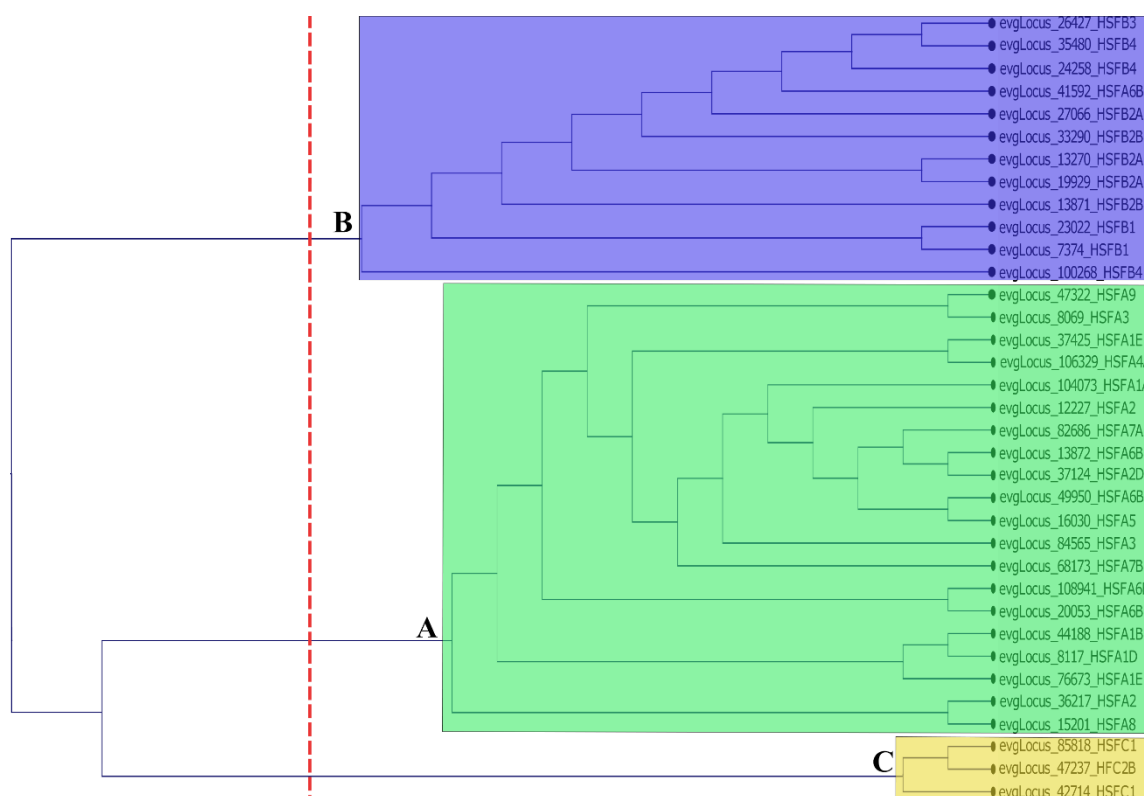
درصد اختصاص یافته به کلاس‌های مختلف HSF شناسایی شده تطابق مطلوبی بین عدس و سایر گیاهان وجود دارد. از میان ۱۰ گیاه بررسی شده، *Populus trichocarpa* با ۳۱ عضو بیشترین تعداد HSF را نشان داد و در مقابل *Arabidopsis thaliana* با ۲۱ عضو کمترین میزان فراوانی HSF را به خود اختصاص داد. علاوه بر این نتایج بررسی فراوانی خانواده HSF در گیاهان ده‌گانه (جدول ۵) نشان داد که در همه موارد فراوانی تعداد عضو کلاس‌های HSF به صورت  $A > B > C$  می‌باشد.



شکل ۱. کلاس بندی اعضای خانواده HSF

جدول ۵. توزیع فراوانی اعضای خانواده HSF شناسایی شده در گیاهان مختلف

ردیف	گیاه	کلاس HSF			منبع
		A	B	C	
1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15	5	1	(Guo <i>et al.</i> , 2008)
2	<i>Oryza sativa</i>	13	8	4	(Shim <i>et al.</i> , 2009)
3	<i>Zea mays</i>	15	7	3	(Lin <i>et al.</i> , 2011)
4	<i>Brachypodium distachyon</i>	13	7	4	(Wen <i>et al.</i> , 2017)
5	<i>Sorghum bicolor</i>	12	7	4	(Nagaraju <i>et al.</i> , 2015)
6	<i>Fagopyrum tataricum</i>	17	10	2	(Liu <i>et al.</i> , 2019)
7	<i>Dianthus caryophyllus</i>	9	7	1	(Li <i>et al.</i> , 2019)
8	<i>Populus trichocarpa</i>	18	12	1	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
9	<i>Capsicum annuum L.</i>	17	7	1	(Guo <i>et al.</i> , 2015)
10	<i>Solanum lycopersicum</i>	16	8	1	(Giorno <i>et al.</i> , 2010)



شکل ۲. گروه‌بندی توالی‌های HSF شناسایی شده در ترنسکریپتوم عدس. گروه‌ها با هایلایت زرد (کلاس C)، سبز (کلاس A) و آبی (کلاس B) متمایز شده‌اند.

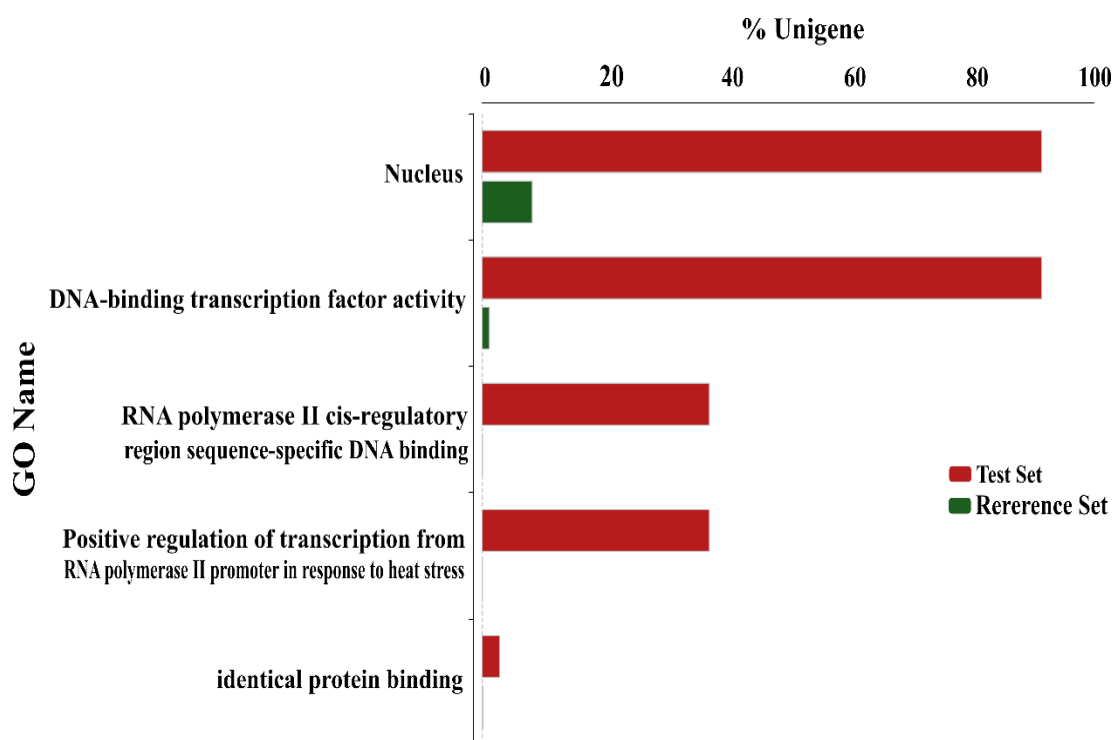
آستانه  $-1 \leq \text{Log}_2\text{FC} \leq 2$  و  $\text{Log}_{10}(\text{FDR}) < 2$  برای تشخیص رونوشت‌های با بیان متفاوت استفاده شد. نتایج نشان داد که تعداد رونوشت‌های کدکننده HSF شناسایی شده با افزایش بیان در تنش خشکی (۲ یونی ژن) با یونی ژن‌های کاهش بیان یافته برابر بود. همچنین نتایج نشان داد که اغلب ژن‌های شناسایی شده تحت تنش خشکی تغییر بیان معنی‌داری نشان نمی‌دهند.

در نهایت، ۴ رونوشت با بالاترین و پایین‌ترین میزان تغییرات بیان بر اساس نمودار آتش‌فشانی مشخص شدند. دو عضو از کلاس A (HSFA2 و HSFA9) به‌عنوان رونوشت‌های با بیش‌ترین میزان بیان مثبت تحت تنش خشکی شناسایی شدند. در مقابل یک عضو از کلاس B (HSFB4) و پس‌از آن یک عضو از کلاس A (HSFA6B) کمترین میزان بیان تحت تنش خشکی را به خود اختصاص دادند. هیچ‌کدام از اعضای کلاس C تغییر بیان معنی‌داری تحت تنش خشکی نشان ندادند (شکل ۴).

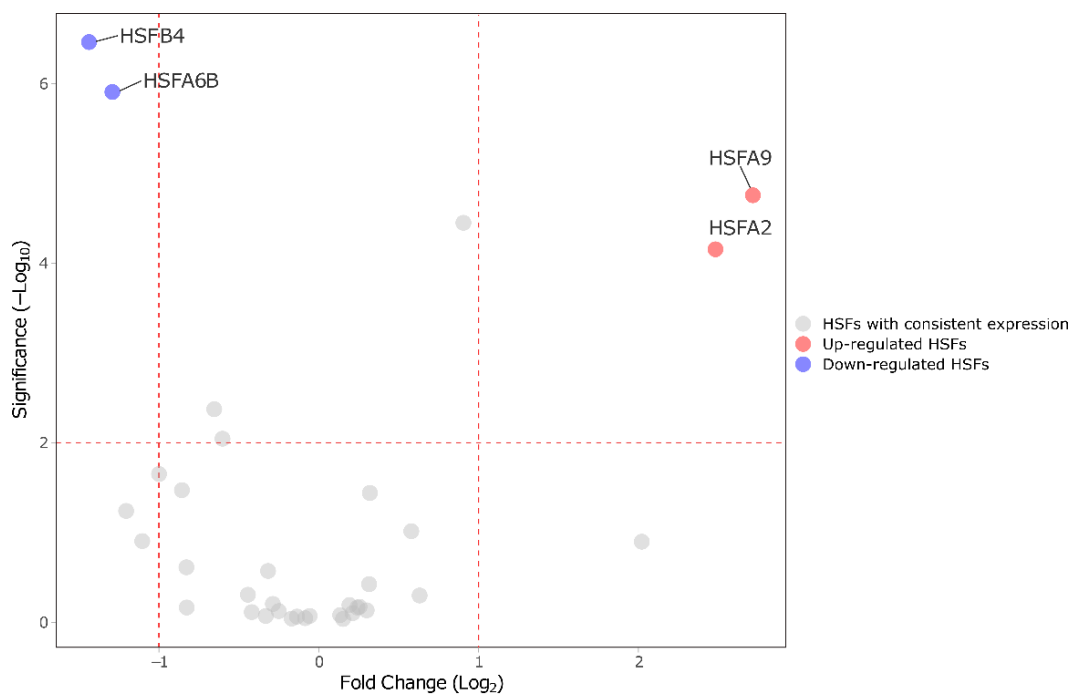
همچنین نتایج تحلیل غنی‌سازی GO نشان داد که پنج اصطلاح GO توسط ۳۵ رونوشت کدکننده HSF نمود بیشتری داشته‌اند (شکل ۳). علاوه بر این نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت این گروه از ژن‌ها در اندامک هسته می‌باشد و مهم‌ترین فرآیند زیستی (Biological Process, BP) که در آن دخیل می‌باشد شامل تنظیم مثبت رونویسی در شرایط تنش گرمایی است. همچنین مهم‌ترین عملکرد مولکولی (Molecular Function, MF) این گروه از ژن‌ها همان‌طور که انتظار می‌رود مرتبط با مبحث تنظیم بیان ژن از طریق اتصال به توالی‌های تنظیمی DNA می‌باشد (شکل ۳).

**شناسایی ژن‌های HSF با بیان متفاوت (DE-HSF)** از ترسیم نمودار آتش‌فشانی برای بررسی تغییرات بیان معنی‌دار HSF‌های شناسایی شده تحت تیمار خشکی استفاده شد (شکل ۴). در این نمودار از حد





شکل ۳. تحلیل غنی‌سازی عملکردی برای رونوشت‌های HSF شناسایی‌شده در عدس. ستون‌های سبز و قرمز رنگ به ترتیب نشان‌دهنده GO ترم‌های غنی‌شده گروه مرجع ترنسکرپتومی و ژن‌های HSF شناسایی‌شده در پژوهش حاضر می‌باشند.

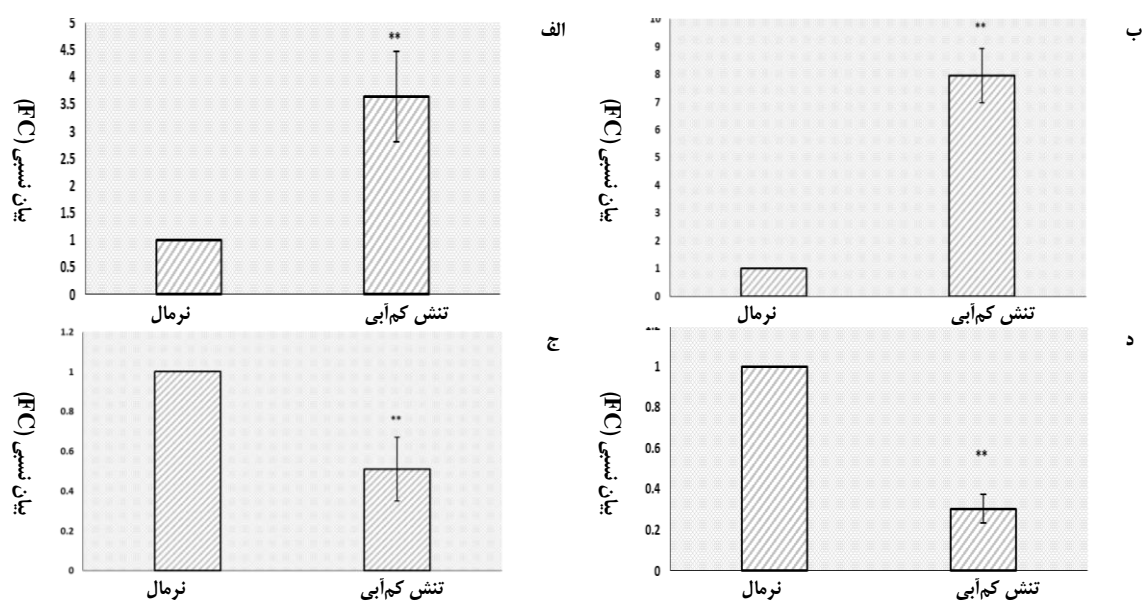


شکل ۴. نمودار آتشفشانی بیان ژن‌های HSF شناسایی‌شده در عدس تحت تنش کم‌آبی. دایره‌های خاکستری، آبی و قرمز به ترتیب ژن‌های بدون تغییر بیان، ژن‌های کاهش بیان داشته و ژن‌های افزایش بیان یافته تحت تنش کم‌آبی را نشان می‌دهند.

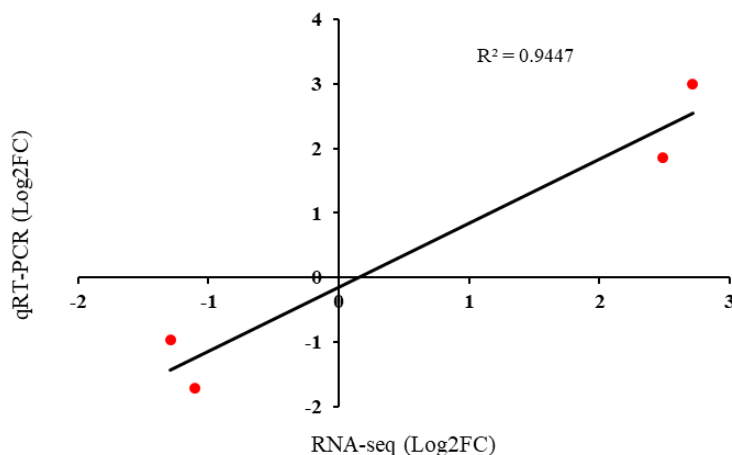
## اعتبارسنجی ژن‌های DE-HSF

نتایج بررسی بیان رونوشت‌های منتخب تحت تنش خشکی با استفاده از واکنش qRT-PCR نشان داد (شکل ۵) که HSFA9 با بیان نسبی معادل ۷/۹۴ (FC) (شکل ۵-ب) بیشترین میزان تغییرات را به خود اختصاص داد و در مقابل HSFB4 با تغییر بیان معادل ۰/۳۰ (FC) کمترین میزان بیان را نشان داد (شکل ۵-د). علاوه بر این نتایج بررسی بیان ژن‌های HSFA2 و HSFA6B،

به ترتیب افزایش و کاهش بیان معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) برای این دو ژن تحت تنش خشکی نشان داد (شکل ۵-الف و ج). همچنین نتایج بررسی روند تغییرات ژن‌های منتخب در دو حالت qRT-PCR و RNA-seq (شکل ۶) نشان داد که بیان این گروه از ژن‌ها هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری ( $r = 0.97^{**}$  و  $R^2 = 0.9447$ ) در دو حالت مذکور دارند و از این رو اعتبار میزان بیان این ژن‌ها و سایر ژن‌های مورد مطالعه مورد تأیید قرار می‌گیرد.



شکل ۵. بیان نسبی رونوشت‌های الف (HSFA2؛ ب) HSFA9؛ ج) HSFA6B و د) HSFB4 تحت تنش کم‌آبی در عدس. \*\*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (آزمون t-student) بیان ژن در شرایط تنش نسبت به نرمال در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد. نوار خطی روی ستون‌ها، خطای استاندارد را نشان می‌دهد.



شکل ۶. بررسی روند تغییرات ژن‌های HSF منتخب در دو حالت qRT-PCR و RNA-seq.

## بحث

تحمل به خشکی صفتی پیچیده است که مکانیسم‌های مولکولی مربوط به بسیاری از ژن‌ها در آن دخیل می‌باشد؛ از این رو برای درک بهتر این ویژگی در گیاهان نیاز به مطالعاتی با جزئیات بیشتر است (Morgil *et al.*, 2019). مطالعات متعدد نشان می‌دهند که تنش خشکی، تنظیم رونویسی بسیاری از ژن‌ها در بافت‌های مختلف عدس را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Kumar *et al.*, 2015; Janmohammadi *et al.*, 2014; Morgil *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2016; Stoddard *et al.*, 2006). بررسی تغییر بیان ژن‌ها در پاسخ به عوامل محیطی، شناخت مکانیسم مولکولی برای افزایش تحمل به این عوامل را تسهیل می‌سازد (Kumar *et al.*, 2015; Sultana *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر، پس از تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA نمونه‌های عدس تحت شرایط کم‌آبی و کنترل، پروفایل بیانی عدس تهیه شد. با توجه به عدم وجود ژنوم مرجع کاملاً مستندسازی شده برای عدس، پروفایل بیانی تهیه‌شده عدس، که از نظر اغلب پارامترهای کمی و کیفی دارای شرایط مطلوبی نیز می‌باشد، گامی مؤثر در افزایش اطلاعات ژنتیکی این گیاه در پاسخ به تنش خشکی خواهد بود.

افزون بر این در مطالعه حاضر به منظور شناسایی و بررسی بیان ژن‌های HSF تحت تنش خشکی، پروفایل بیانی عدس مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه عملکرد ژن‌های HSF برای اولین بار به عنوان ژن‌های پاسخ به تنش گرما توصیف شده است، با این حال در بسیاری از مطالعات پیامدهای بیان آن‌ها در پاسخ به سایر تنش‌های غیرزیستی مانند تنش خشکی در گیاهان مختلف مورد تأیید قرار گرفته است (Swindell *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2009; Chauhan *et al.*, 2011). در این پژوهش برای اولین بار رونوشت‌های کدکننده عوامل تنظیم‌کننده

رونویسی خانواده HSF در عدس تحت تنش خشکی شناسایی شد. نتایج نشان داد که در عدس نیز مانند سایر گیاهان، فراوانی ژن‌های HSF کلاس A بیشتر از دو کلاس دیگر (B و C) بود. شواهد نشان می‌دهد که اغلب ژن‌های گروه‌های A و B در تنظیم رونویسی ژن‌های دیگر نقش دارند و تعداد کمی از آن‌ها به طور مستقیم در پاسخ به گرما و سایر تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش خشکی دخیل هستند (Dossa *et al.*, 2016). در همین راستا نتایج سایر مطالعات بر این نکته تأکید دارند که ژن‌های HSF با برهمکنش با سایر ژن‌ها به ویژه Hspها نقش کلیدی در تحمل تنش‌های مختلف دارند (Swindell *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2009). مکانیسم تنظیم بیان ژن‌های Hsp توسط HSF در عدس هنوز به صورت کامل مستندسازی نشده است؛ بنابراین تمرکز مطالعات آینده بر روی این موضوع می‌تواند در آشکارسازی مکانیسم‌های تنظیمی و همچنین تعامل احتمالی HSFها با سایر عوامل رونویسی مانند DREB2A را مشخص نماید.

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مجموع رونوشت‌های یافت شده (۳۵ یونی ژن) بیشتر از سایر مطالعات مورد بررسی بود که پیرایش متناوب می‌تواند از جمله عوامل ایجاد اختلاف و افزایش میزان فراوانی این خانواده ژنی در عدس باشد؛ که با توجه به در دسترس نبودن ژنوم مرجع عدس بررسی پیرایش متناوب ژن‌های HSF در این مطالعه امکان‌پذیر نبود. علاوه بر این تاریخچه تکاملی متفاوت گیاهان و حفاظت بیشتر از برخی از خانواده‌های ژنی نیز می‌تواند دلیلی بر تغییر فراوانی ژن‌های HSF در گیاهان مختلف محسوب شود. این مشاهدات با مطالعات Lin *et al.* (2014) سازگار است که نشان داد اغلب تکرارهای ژن HSF برآمده از رویداد مضاعف شدگی کل ژنوم به جای مضاعف شدگی پشت سر هم می‌باشد و از این رو تفاوت‌های قابل توجهی در حفظ ژن از

تیمارهای تنش خشکی، شوری و تنش حرارتی افزایش یافته و بیان بیش از حد آن نیز نه تنها تحمل به گرما را بلکه تحمل به خشکی و تنش شوری را نیز در پی دارد (Huang *et al.*, 2016). همچنین بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، بیان ژن HsFA6b در آرآیدوپسیس تحت تنش شوری و سرما به صورت افزایشی گزارش شده بود (Huang *et al.*, 2016) که دلایل این اختلاف را می‌توان به وابستگی بیان ژن به گونه گیاهی، نوع و سطح تنش و ترجیه برخی از روش‌های ژن بر برخی دیگر در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مرتبط دانست. مطالعه و بررسی بیان ژن‌های HSF در گیاه لوبیا با استفاده از روش qRT-PCR نشان داد که اغلب ژن‌های شناسایی شده به طور متفاوتی تحت تنش سرما، گرما، شوری و فلزات سنگین بیان می‌شوند که این موضوع نشان می‌دهد ژن‌های HSF در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مختلف، عملکرد متفاوتی نشان می‌دهند (Zhang *et al.*, 2022).

نتایج نشان داد در پژوهش حاضر، برخلاف کلاس A-Hsfs و کلاس B-Hsfs، اعضای کلاس C دچار تغییر بیان نشدند. برای بررسی نقش این ژن‌ها در تحمل به خشکی در عدس، آزمایش‌های بیشتری مورد نیاز است. در سایر گیاهان نیز تعداد اعضای این گروه از HSF (C) نسبت به دو گروه دیگر (A و B) کمتر گزارش شده است؛ با این حال افزایش بیان ژن‌های کلاس C-Hsfs در پاسخ به برخی از تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما و گرما گزارش شده است (Wang *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2014). همچنین می‌توان گفت ژن‌های HSF تغییر بیان نیافته ممکن است در مسیرهای تنظیم تنش‌های غیرزیستی دیگر عمل کنند (Victor and Benecke, 1998). با این حال، بیان ژن یک فرآیند بیولوژیکی پیچیده است و مطالعات دقیق‌تری برای رمزگشایی مکانیسم‌های تنظیمی بین HSF و ژن‌های هم بیان شده آن‌ها نه تنها تحت تنش خشکی بلکه در ترکیب با تنش‌های دیگر مورد نیاز است.

گونه‌ای به گونه دیگر وجود دارد. قرار گرفتن توالی‌های کدکننده هر کلاس از HSF در یک گروه مجزا در تحلیل خوشه‌ای، شناسایی و دسته‌بندی صحیح این رونوشت‌ها در عدس را تأیید نمود.

تعداد ژن‌های HSF شناسایی شده، که تحت تنش خشکی در عدس تغییر بیان نشان داده‌اند (۱۱/۴۲ درصد)، نسبت به تعداد ژن‌های HSF تغییر بیان یافته در برخی از گیاهان زراعی کمتر بود (Hwang *et al.*, 2014; Bechtold *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016) که این موضوع را می‌توان به تحمل ذاتی عدس به تنش خشکی (Ladizinsky and Abbo, 2015) یا ضعیف بودن سطح تنش خشکی اعمال شده (Hosseini *et al.*, 2021) در این مطالعه مرتبط دانست. در مطالعات مشابه نیز شواهدی از تغییرات کم بیان ژن‌های HSF در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی در برخی از گیاهان به‌ویژه سویا گزارش شده است (Li *et al.*, 2014). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان چنین اظهار نمود که نوع گونه گیاهی، نوع تنش و سطح تنش در عملکرد اعضای HSF جهت تنظیم بیان ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش مؤثر می‌باشد (Bharti *et al.*, 2004).

شواهدی از افزایش بیان ژن HsFA2 و نقش مؤثر آن در پاسخ به بیماری کپک خاکستری در خیار نیز توسط (Kharisma *et al.*, 2022) گزارش شده است که با توجه به آن می‌توان چنین اظهار نمود که احتمالاً نقش تنظیمی این گروه از عوامل رونویسی فراتر از پاسخ به تنش‌های غیرزیستی می‌باشد. در مطالعه‌ای بیش بیان ژن‌های Hsf از کلاس A باعث مقاومت به تنش خشکی در آرآیدوپسیس شد (Bechtold *et al.*, 2013). همچنین مطالعه (Huang *et al.*, 2016) نشان داد که HsfA6a در پاسخ به تنش خشکی در آرآیدوپسیس نقش دارد. نقش ژن HvHsfB2c در پاسخ به تنش خشکی در جو نیز طی مطالعه (Reddy *et al.*, 2014) تایید شده است. در آرآیدوپسیس، بیان HsfA6b در پاسخ به

## نتیجه‌گیری

بر این، نتایج نشان داد که بیان ۱۱/۴۲ درصد از رونوشت‌های HSF که اغلب متعلق به کلاس A بودند، در عدس تحت تنش کم‌آبی تغییر می‌یابد. به‌طور کلی، یافته‌های ما نشان می‌دهد که در پاسخ به تنش خشکی تغییرات بیان برخی از رونوشت‌های یک ژن HSF به‌بیان سایر رونوشت‌های آن ژن ارجحیت دارد؛ از این‌رو بررسی پیرایش متناوب در پاسخ به این عامل محیطی در عدس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان از ژن‌های HSF شناسایی شده منتخب در این پژوهش در آزمایش‌های آتی برای درک بهتر مکانیسم مولکولی تحمل عدس به تنش کم‌آبی استفاده نمود.

پروتئین‌های HSF یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های تنظیمی هستند که می‌توانند به گیاهان در مقابله با شرایط نامطلوب ناشی از تنش‌های غیرزیستی کمک کنند؛ بنابراین، شناسایی HSF های کلیدی می‌تواند به ارائه بینشی جامع در مورد مکانیسم‌های مولکولی پاسخ به تنش‌های غیرزیستی کمک کند. در مطالعه حاضر، مروری بر خانواده HSF و تغییرات بیان آن‌ها تحت تنش کم‌آبی در عدس ارائه کردیم. یافته‌های ما نشان داد که کلاس‌بندی ژن‌های HSF در عدس مشابه با اغلب گیاهان زراعی بود؛ هرچند فراوانی رونوشت‌های HSF در این مطالعه بیشتر از سایر مطالعات پیشین بود. علاوه

## REFERENCES

- Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208-218. doi: 10.1007/BF02672069
- Bechtold, U., Albihlal, W. S., Lawson, T., Fryer, M. J., Sparrow, P. A. C., Richard, F., & Mullineaux, P. M. (2013). Arabidopsis HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR1b overexpression enhances water productivity, resistance to drought, and infection. *Journal of Experimental Botany*, 64(11), 3467-3481. doi: 10.1093/jxb/ert185
- Bharti, K., von Koskull-Döring, P., Bharti, S., Kumar, P., Tintschl-Körbitzer, A., Treuter, E., & Nover, L. (2004). Tomato Heat Stress Transcription Factor HsfB1 Represents a Novel Type of General Transcription Coactivator with a Histone-Like Motif Interacting with the Plant CREB Binding Protein Ortholog HAC1[W]. *The Plant Cell*, 16(6), 1521-1535. doi: 10.1105/tpc.019927
- Bi, H., Zhao, Y., Li, H., & Liu, W. (2020). Wheat heat shock factor tahsfa6f increases aba levels and enhances tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic plants. [Article]. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). doi: 10.3390/ijms21093121
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Chauhan, H., Khurana, N., Agarwal, P., & Khurana, P. (2011). Heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.): genome-wide expression analysis during reproductive development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 286(2), 171. doi: 10.1007/s00438-011-0638-8
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610
- Dossa, K., Diouf, D., & Cissé, N. (2016). Genome-Wide Investigation of Hsf

- Genes in Sesame Reveals Their Segmental Duplication Expansion and Their Active Role in Drought Stress Response. [Original Research]. *Frontiers in Plant Science*, 7(1522). doi: 10.3389/fpls.2016.01522
- Driedonks, N., Xu, J., Peters, J. L., Park, S., & Rieu, I. (2015). Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00999
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., & Bateman, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D279-D285. doi: 10.1093/nar/gkv1344
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Grillo, S., Scharf, K.-D., Vriezen, W. H., & Mariani, C. J. (2010). Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *61*(2), 453-462.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., & Regev, A. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644-652. doi: 10.1038/nbt.1883
- Guo, J., Wu, J., Ji, Q., Wang, C., Luo, L., Yuan, Y., & Wang, J. (2008). Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis. *Genet Genomics*, 35(2), 105-118. doi: 10.1016/s1673-8527(08)60016-8
- Guo, M., Lu, J.-P., Zhai, Y.-F., Chai, W.-G., Gong, Z.-H., & Lu, M.-H. (2015). Genome-wide analysis, expression profile of heat shock factor gene family (CaHsfs) and characterisation of CaHsfA2 in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genet Genomics*, 15(1), 1-20.
- Hosseini, S. Z., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Fallahi, H., Rezaei Nejad, A., & Sohrabi, S. S. (2021). Dissecting the molecular responses of lentil to individual and combined drought and heat stresses by comparative transcriptomic analysis. *Genomics*, 113(2), 693-705. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.12.038>
- Hu, W., Hu, G., & Han, B. (2009). Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. *Plant Science*, 176(4), 583-590. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.01.016>
- Huang, Y.-C., Niu, C.-Y., Yang, C.-R., & Jinn, T.-L. (2016). The Heat Stress Factor HSFA6b Connects ABA Signaling and ABA-Mediated Heat Responses *Plant Physiology*, 172(2), 1182-1199. doi: 10.1104/pp.16.00860
- Hwang, S. M., Kim, D. W., Woo, M. S., Jeong, H. S., Son, Y. S., Akhter, S., & Bahk, J. D. (2014). Functional characterization of Arabidopsis HsfA6a as a heat-shock transcription factor under high salinity and dehydration conditions. *Plant, Cell & Environment*, 37(5), 1202-1222. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.12228>
- Janmohammadi, M., Mostafavi, H., & Sabaghnia, N. (2014). Effects of enzymatic biofertiliser on growth and yield of lentil genotypes under deficit irrigation. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences (Latvia)*, 68, 174-179.
- Kharisma, A. D., Arofathullah, N. A., Yamane, K., Tanabata, S., & Sato, T. (2022). Regulation of defense responses via heat shock transcription factors in *Cucumis sativus* L. against

- Botrytis cinerea. *Journal of General Plant Pathology*, 88(1), 17-28.  
doi: 10.1007/s10327-021-01041-6
- Khazaei, H., Caron, C. T., Fedoruk, M., Diapari, M., Vandenberg, A., Coyne, C. J., & Bett, K. E. (2016). Genetic Diversity of Cultivated Lentil (*Lens culinaris* Medik.) and Its Relation to the World's Agro-ecological Zones. [Original Research]. *Frontiers in Plant Science*, 7(1093).  
doi: 10.3389/fpls.2016.01093
- Kmiecik, S. W., & Mayer, M. P. (2022). Molecular mechanisms of heat shock factor 1 regulation. [Review]. *Trends in Biochemical Sciences*, 47(3), 218-234.  
doi: 10.1016/j.tibs.2021.10.004
- Kumar, S., Barpete, S., Kumar, J., Gupta, P., & Sarker, A. (2013). Global lentil production: constraints and strategies. *SATSA Mukhapatra-Annual Technical*, 17, 1-13.
- Kumar, S., Hamwih, A., Manickavelu, A., Kumar, J., Sharma, T. R., & Baum, M. (2014). Advances in lentil genomics. *Legumes in the Omic Era*, 111-130.
- Kumar, S., Rajendran, K., Kumar, J., Hamwih, A., & Baum, M. (2015). Current knowledge in lentil genomics and its application for crop improvement. [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 6(78), 1-15.  
doi: 10.3389/fpls.2015.00078
- Ladizinsky, G., & Abbo, S. (2015). *The Search for Wild relatives of Cool Season Legumes*: Springer.
- Li, P.-S., Yu, T.-F., He, G.-H., Chen, M., Zhou, Y.-B., Chai, S.-C., & Ma, Y.-Z. (2014). Genome-wide analysis of the Hsf family in soybean and functional identification of GmHsf-34 involvement in drought and heat stresses. *BMC Genomics*, 15(1), 1009.  
doi: 10.1186/1471-2164-15-1009
- Li, W., Wan, X.-L., Yu, J.-Y., Wang, K.-L., & Zhang, J. (2019). Genome-wide identification, classification, and expression analysis of the Hsf gene family in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5233.
- Lin, Y.-X., Jiang, H.-Y., Chu, Z.-X., Tang, X.-L., Zhu, S.-W., & Cheng, B. (2011). Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize. *BMC Genomics*, 12(1), 1-14.
- Lin, Y., Cheng, Y., Jin, J., Jin, X., Jiang, H., Yan, H., & Cheng, B. (2014). Genome duplication and gene loss affect the evolution of heat shock transcription factor genes in legumes. *PloS One*, 9(7), e102825.
- Liu, M., Huang, Q., Sun, W., Ma, Z., Huang, L., Wu, Q., & Chen, H. J. B. g. (2019). Genome-wide investigation of the heat shock transcription factor (Hsf) gene family in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). 20(1), 1-17.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402-408.  
doi: https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
- Manna, M., Thakur, T., Chirom, O., Mandlik, R., Deshmukh, R., & Salvi, P. (2021). Transcription factors as key molecular target to strengthen the drought stress tolerance in plants. [Article]. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 847-868.  
doi: 10.1111/ppl.13268
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. [next generation sequencing; small RNA; microRNA; adapter removal]. *Bioinformatics in Action*, 17(1), 3.  
doi: 10.14806/ej.17.1.200
- Mishra, S. K., Poonia, A. K., Chaudhary, R., Baranwal, V. K., Arora, D., Kumar, R., & Chauhan, H. (2020). Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of HSF gene family

- in barley during abiotic stress response and reproductive development. *Plant Gene*, 23, doi: 10.1016/j.plgene.2020.100231
- Morgil, H., Tardu, M., Cevahir, G., & Kavakli, İ. H. (2019). Comparative RNA-seq analysis of the drought-sensitive lentil (*Lens culinaris*) root and leaf under short- and long-term water deficits. *Functional & Integrative Genomics*, 19(5), 715-727. doi: 10.1007/s10142-019-00675-2
- Nagaraju, M., Reddy, P. S., Kumar, S. A., Srivastava, R. K., Kishor, P. B., & Rao, D. M. (2015). Genome-wide Scanning and Characterization of Sorghum bicolor L. Heat Shock Transcription Factors. *Curr Genomics*, 16(4), 279-291. doi: 10.2174/1389202916666150313230812
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S. K., Ganguli, A., & Scharf, K. D. (2001). Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 177-189. doi: 10.1379/1466-1268(2001)006<0177:athst>2.0.co;2
- Ohama, N., Kusakabe, K., Mizoi, J., Zhao, H., Kidokoro, S., Koizumi, S., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2016). The Transcriptional Cascade in the Heat Stress Response of Arabidopsis Is Strictly Regulated at the Level of Transcription Factor Expression. *The Plant Cell*, 28(1), 181-201. doi: 10.1105/tpc.15.00435
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic acids research*, 33(suppl\_2), W116-W120.
- Ramtekey, V., Bansal, R., Aski, M. S., Kothari, D., Singh, A., Pandey, R., & Dikshit, H. K. (2021). Genetic variation for traits related to phosphorus use efficiency in lentil species at the seedling stage. [Article]. *Plants*, 10(12). doi: 10.3390/plants10122711
- Reddy, P. S., Kavi Kishor, P. B., Seiler, C., Kuhlmann, M., Eschen-Lippold, L., Lee, J., & Sreenivasulu, N. (2014). Unraveling regulation of the small heat shock proteins by the heat shock factor HvHsfB2c in barley: its implications in drought stress response and seed development. *PLoS One*, 9(3), e89125.
- Rivals, I., Personnaz, L., Taing, L., & Potier, M.-C. (2007). Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? *Bioinformatics*, 23(4), 401-407. doi: 10.1093/bioinformatics/btl633
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., & Mittler, R. (2004). When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology*, 134(4), 1683-1696. doi: 10.1104/pp.103.033431
- Sabaghpour, S., Sarker, A., Safikhani, M., & Erskine, W. J. (2007). Registration of 'Gachsaran' Lentil. *Journal of Plant Registrations*, 1(1), 39-39.
- Sabaghpour, S. H., Seyedi, F., Mahmoodi, A. A., Safikhani, M., Pezeshkpour, P., Rostemi, B., & Jahangiri, A. (2013). Cultivar release: Kimiya, a new high yielding lentil cultivar for moderate cold and semi warm climate of IRAN. *Seed And Plant Improvement Journal*, 29-1(2), 1-15.
- Scharf, K.-D., Berberich, T., Ebersberger, I., & Nover, L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 104-119. doi: https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.002
- Shim, D., Hwang, J.-U., Lee, J., Lee, S., Choi, Y., An, G., & Lee, Y. (2009).



- Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice. *The Plant cell*, 21(12), 4031-4043.  
doi: 10.1105/tpc.109.066902
- Singh, D., Singh, C. K., Taunk, J., & Tomar, R. S. S. (2016). Genetic analysis and molecular mapping of seedling survival drought tolerance gene in lentil (*Lens culinaris Medikus*). *Molecular Breeding*, 36(5), 58.  
doi: 10.1007/s11032-016-0474-y
- Sohrabi, S. S., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Fallahi, H., & Hosseini, S. Z. (2022). Identification of key genes and molecular mechanisms associated with temperature stress in lentil. *Gene*, 807, 145952.  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145952>
- Song, L., & Florea, L. (2015). Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *GigaScience*, 4(1), s13742-13015-10089-y.  
doi: 10.1186/s13742-015-0089-y
- Srivastava, R., & Vasishtha, H. (2012). Saponins and lectins of Indian chickpeas (*Cicer arietinum*) and lentils (*Lens culinaris*). *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 25(1), 44-47.
- Stoddard, F. L., Balko, C., Erskine, W., Khan, H. R., Link, W., & Sarker, A. (2006). Screening techniques and sources of resistance to abiotic stresses in cool-season food legumes. *Euphytica*, 147(1), 167-186.  
doi: 10.1007/s10681-006-4723-8
- Sultana, R., Choudhary, A., Pal, A., Saxena, K., Prasad, B., & Singh, R. (2014). Abiotic stresses in major pulses: Current status and strategies *Approaches to Plant Stress and Their Management* (pp. 173-190): Springer.
- Sun, X., Huang, N., Li, X., Zhu, J., Bian, X., Li, H., & Luo, H. (2021). A chloroplast heat shock protein modulates growth and abiotic stress response in creeping bentgrass. [Article]. *Plant Cell and Environment*, 44(6), 1769-1787.  
doi: 10.1111/pce.14031
- Suri, G. K., Braich, S., Noy, D. M., Rosewarne, G. M., Cogan, N. O. I., & Kaur, S. (2022). Advances in lentil production through heterosis: Evaluating generations and breeding systems. *PLoS One*, 17(2 February).  
doi: 10.1371/journal.pone.0262857
- Swindell, W. R., Huebner, M., & Weber, A. P. (2007). Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 8(1), 125.  
doi: 10.1186/1471-2164-8-125
- Tan, B., Yan, L., Li, H., Lian, X., Cheng, J., Wang, W., & Feng, J. (2021). Genome-wide identification of HSF family in peach and functional analysis of PpHSF5 involvement in root and aerial organ development. [Article]. *PeerJ*, 9.  
doi: 10.7717/peerj.10961
- Tiwari, M., Kumar, R., Min, D., & Jagadish, S. V. K. (2022). Genetic and molecular mechanisms underlying root architecture and function under heat stress—A hidden story. [Review]. *Plant Cell and Environment*.  
doi: 10.1111/pce.14266
- Victor, M., & Benecke, B.-J. (1998). Expression levels of heat shock factors are not functionally coupled to the rate of expression of heat shock genes. *Molecular Biology Reports*, 25(3), 135-141.  
doi: 10.1023/A:1006801205904
- Wang, F., Dong, Q., Jiang, H., Zhu, S., Chen, B., & Xiang, Y. (2012). Genome-wide analysis of the heat shock transcription factors in *Populus trichocarpa* and *Medicago truncatula*. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 1877-1886.

- Wang, Y., Dai, Y., Tao, X., Wang, J.-Z., Cheng, H.-Y., Yang, H., & Ma, X.-R. (2016). Heat shock factor genes of tall fescue and perennial ryegrass in response to temperature stress by RNA-Seq analysis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1226.
- Wen, F., Wu, X., Li, T., Jia, M., Liu, X., Li, P., & Yue, X. J. P. (2017). Genome-wide survey of heat shock factors and heat shock protein 70s and their regulatory network under abiotic stresses in *Brachypodium distachyon*. *PloS One*, 12(7), e0180352.
- Xue, G. P., Sadat, S., Drenth, J., & McIntyre, C. L. (2014). The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 539-557.
- Zeng, J., Wu, C., Wang, C., Liao, F., Mo, J., Ding, Z., Hu, W. (2020). Genomic analyses of heat stress transcription factors (HSFs) in simulated drought stress response and storage root deterioration after harvest in cassava. [Article]. *Molecular Biology Reports*, 47(8), 5997-6007.  
doi: 10.1007/s11033-020-05673-3
- Zhang, Q., Geng, J., Du, Y., Zhao, Q., Zhang, W., Fang, Q., Du, J. (2022). Heat shock transcription factor (Hsf) gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris*): genome-wide identification, phylogeny, evolutionary expansion and expression analyses at the sprout stage under abiotic stress. *BMC Plant Biology*, 22(1), 33.  
doi: 10.1186/s12870-021-03417-4