مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۱۱۵-۱۰۵

DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

# شناسایی رونوشت‌های حلقوی سویا در پاسخ به تنش‌های کمبود نیتروژن و فسفر

# Identification of soybean circular RNAs in response to low nitrogen and phosphorus stresses

سعید بابائی، اسماعیل ابراهیمی*، علی نیازی، مهناز نظامیوند چگینی

Saeid Babaei, Esmaeil Ebrahimie*, Ali Niazi, Mahnaz Nezamivand Chegini

پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ebrahimie@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۲ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۲۰)

## چکیده

**سویا که به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع روغن و پروتئین در جهان شناخته می‌شود، مانند دیگر گونه‌های گیاهی در معرض تنش‌های غیرزیستی متنوعی مانند تنش‌های کمبود فسفر و نیتروژن که از جمله تنش‌های محدودکننده رشد و میزان تولید محصول هستند قرار دارد. رونوشت‌های حلقوی که به‌عنوان رونوشت‌های جدید غیر رمزکننده شناخته می‌شوند، نقش مهمی را در پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی برعهده دارند. بااین‌حال، چگونگی بیان رونوشت‌های حلقوی در پاسخ به تنش کمبود فسفر و نیتروژن هنوز به طور دقیق مشخص نشده است. در این مطالعه بذرهای سویا تحت تنش‌های مختلف کمبود فسفر و نیتروژن کشت شد و نمونه‌برداری از ریشه گیاهان جهت استخراج ترانسکریپتوم انجام شد. پس از استخراج ترانسکریپتوم از نمونه‌ها و اطمینان از کمیت و کیفیت آن‌ها، آزمایش توالی‌یابی با استفاده از نسل جدید توالی‌یابی انجام شد. پس از دریافت نتایج حاصل از توالی‌یابی، کیفیت داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و رونوشت‌های حلقوی با استفاده از پنج روش مختلف شناسایی شدند. در نهایت نحوه و الگوی بیان رونوشت‌های حلقوی و نیز عملکرد ژن‌های رمز کننده آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از توالی‌یابی بیش از ۳۶۰ میلیون خوانش تولید کرد و در مجموع ۲۰۳۳ رونوشت حلقوی در همه تیمارها شناسایی شد. با وجود اینکه برخی از رونوشت‌های حلقوی به طور همزمان در دو یا چند تیمار بیان شدند، اکثر آن‌ها الگوی بیان وابسته به نوع تیمار تنش داشتند. نتایج نشان داد که رونوشت‌های حلقوی احتمالا از طریق اتصال به مولکول‌های هدف، نقش خود را ایفا می‌کنند. نتایج به دست آمده در این مطالعه نقش احتمالی رونوشت‌های حلقوی در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن و فسفر را پیشنهاد می‌کند.**

**واژه‌های کلیدی**

تنش،
رونوشت حلقوی،
سویا،
فسفر،
نیتروژن



[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8 ]

## مقدمه

سویا با نام علمی *Glycine max* گیاهی یک‌ساله، از خانواده بقولات (Fabaceae) و بومی شرق آسیا است و مهم‌ترین منبع روغن و پروتئین گیاهی در سراسر جهان به شمار می‌رود (Sedivy et al. 2017; Liu et al. 2020). میزان برداشت و کیفیت روغن و پروتئین دانه‌های سویا تحت تاثیر تنش‌های محیطی متنوعی نظیر تغییرات دمایی، دسترسی به مواد مغذی، میزان آب و شرایط نوری قرار می‌گیرد. یکی از تنش‌هایی که گیاهان در موارد بسیاری با آن مواجه می‌شوند، تنش مواد غذایی و از جمله کمبود فسفر و نیتروژن است. فسفر و نیتروژن از عناصر اصلی برای رشد و نمو گیاهان هستند و بنابراین نقش مهمی در بهره‌وری گیاهان و میزان تولید محصول دارند (Raghothama 1999; Frink et al. 1999; Good et al. 2004; Malhotra et al. 2018). سویا به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات غذایی و روغنی، به فسفر و نیتروژن بالایی برای رشد و تولید دانه باکیفیت احتیاج دارد. کمبود این عناصر، نمو و فیزیولوژی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث کاهش زیست توده گیاه و کاهش سطح برگ می‌شود (Fredeen et al. 1990; Kant et al. 2010; Masclaux-Daubresse et al. 2010).

رونوشت‌های غیر رمزکننده (Non-coding RNAs) یا به عبارت ساده‌تر رونوشت‌هایی که به پروتئین ترجمه نمی‌شوند، نقش‌های تنظیمی بسیار مهمی در نمو موجودات پیچیده ایفا می‌کنند. رونوشت‌های حلقوی (Circular RNA or circRNA) که به تازگی به‌عنوان نوع جدیدی از رونوشت‌های غیر رمزکننده شناخته شده‌اند، یک ساختار حلقوی بسته با پیوند کووالانسی دارند و برخلاف رونوشت‌های خطی، قطبیت ´۳ و ´۵ ندارند. تعداد بسیار زیادی از رونوشت‌های حلقوی به‌صورت حفاظت شده و پایدار در سلول‌های موجودات گوناگون وجود دارند و به‌طور کلی از طریق نوع خاصی از پردازش (splicing) که به backsplicing معروف است از mRNA اولیه ساخته می‌شوند. از خصوصیات رونوشت‌های حلقوی می‌توان به مواردی همچون: ساختار حلقه بسته، حساسیت کم به اگزونوکلئازها، تنوع پردازش (Alternative splicing) از یک مکان ژنی، حضور در سرتاسر درخت تکاملی، بیان مختص بافت یا مرحله نموی خاص و حفاظت شدگی در بین گونه‌های مختلف را نام برد (Memczak et al. 2013; Qu et al. 2015).

نتایج مطالعات نشان داده است که سویا دامنه گسترده‌ای از راهکارهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و مولکولی را برای سازگاری در مواجه با انواع تنش‌ها به کار می‌گیرد (Chiou & Lin 2011). در تنش خشکی، نوک ریشه‌های اولیه اهمیت بالایی دارند زیرا نواحی اصلی در جذب آب هستند و نقش مهمی در دریافت و انتقال علامت کمبود آب دارند. در این زمینه، در آزمایشی که با هدف تعیین پروفایل رونوشت‌های کوچک (small RNAs) در نوک ریشه‌های اولیه سویا در تنش خشکی انجام شد، مشخص شد که ۱۲ خانواده حفاظت‌شده از miRNAها به طور متفاوتی نسبت به تیمار شاهد بیان می‌شوند، به صورتی که شش خانواده از miRNAها دارای افزایش بیان بودند و شش خانواده دیگر کاهش بیان را نشان دادند (Zheng et al, 2016). در مورد تنش کمبود مواد غذایی، در مطالعه‌ای که برای تعیین پروفایل رونوشت‌ها در پاسخ به کمبود پتاسیم روی ۱٤ رقم سویا و در بافت‌های مختلف گیاه انجام شد، نتایج نشان داد که در کل ٥٤٤۰ ژن در مسیرهای مختلف سوخت‌وساز سلولی در ارقام مختلف افزایش یا کاهش بیان دارند که از این تعداد ۱۵ ژن به‌صورت تصادفی انتخاب شد و بیان آن‌ها با استفاده از Real-Time PCR تایید شد. نتایج این مطالعه اطلاعات زیادی را درمورد سازوکار مولکولی جذب و انتقال پتاسیم در بافت‌های مختلف تحت شرایط کمبود پتاسیم ارائه کرد و همچنین ژن‌های بالقوه تنظیم‌کننده پتاسیم در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی را معرفی نمود (Wang et al. 2012). در آزمایشی که به‌منظور شناسایی QTLهای (Quantitative Trait Loci) تنظیم‌کننده تحمل به کمبود فسفر روی پنج صفت شامل ارتفاع بخش هوایی، وزن خشک بخش‌های هوایی، محتوای فسفر، کارایی جذب فسفر و کارایی استفاده از فسفر در تمام بافت‌های گیاه سویا انجام شد، نتایج نشان داد که سیزده SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) به طور معنی‌داری با هر پنج صفت ارتباط داشتند. همچنین سه SNP که با بیش از یک صفت ارتباط داشتند روی کروموزوم سه شناسایی شدند (Ning et al. 2016). همچنین زمانی که عناصر سیس (*cis*-elements) و





[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8 ]

miRNAها در سویا در پاسخ به کمبود فسفر مورد مطالعه قرار گرفتند، مشخص شد که مجموعه‌ای از این عناصر به طور هم‌زمان به کمبود فسفر پاسخ می‌دهند و می‌توان از آن‌ها برای شناخت مسیرهای پاسخ سویا به کمبود فسفر استفاده کرد (Zeng et al. 2010). سویا به مقادیر بسیار زیادی نیتروژن برای انباشت پروتئین در دانه احتیاج دارد. محتوای پروتئینی دانه‌های سویا به طور مستقیم به‌وسیله کارایی استفاده از نیتروژن در گیاه تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Hao et al. 2011). در آزمایشی که پروفایل بیانی دو واریته سویای متحمل و حساس به کمبود نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که ۳۲۳۱ ژن در ۲۲ مسیر متابولیکی و سیگنالی بین دو واریته افزایش یا کاهش بیان دارند. از این میان تعداد ۲٤ ژن به طور تصادفی انتخاب شد و با استفاده از Real-Time PCR الگوی بیان آن‌ها مورد تأیید قرار گرفت و درنهایت پیشنهاد شد که ژن‌های شناخته‌شده در این آزمایش می‌توانند به‌عنوان کاندیداهایی جهت اصلاح ارقام سویا در برابر تنش کمبود نیتروژن استفاده شوند (Hao et al. 2011).

به‌تازگی مطالعاتی که نشان می‌دهند رونوشت‌های حلقوی در پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی نقش دارند در حال افزایش چشم‌گیری است (Litholdo & Fonseca 2018; Pan et al. 2018; Ren et al. 2018; Wang et al. 2019). به‌عنوان مثال بیان رونوشت‌های حلقوی در گندم در پاسخ به تنش خشکی (Wang et al. 2017)، در آرابیدوپسیس در مواجه با تنش گرما (Pan et al. 2018) و در گوجه‌فرنگی در معرض تنش سرما (Zuo et al. 2016) به اثبات رسیده است. همچنین در مطالعه‌ای که روی دو رقم سویای مقاوم و حساس به کمبود فسفر انجام شد، مشخص شد که بیان رونوشت‌های حلقوی در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس است و همچنین رونوشت‌های حلقوی بیان شده نیز از منشأ ژن‌های سازوکار دفاعی گیاه هستند (Lv et al. 2020). اما با وجود مطالعات انجام شده، فرایندهای فیزیولوژیک و مولکولی در گیاهان تحت شرایط تنش بسیار پیچیده است؛ بنابراین مطالعه گسترده بیان ژن‌ها و انواع رونوشت‌ها برای فهم شبکه‌های بیان ژنی مرتبط با جذب عناصر، انتقال، بازیابی، نمو ریشه و مسیر انتقال علامت ضروری است (Zeng et al. 2010). پیشرفت‌ها در فناوری توالی‌یابی همراه با در دسترس قرار گرفتن ژنوم و ترانسکریپتوم سویا، این امکان را به وجود آورده است که با دقت بیشتری بتوان ژن‌های با بیان متفاوت را در انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی شناسایی کرد (Lambirth et al. 2015). هدف از این مطالعه شناسایی و بررسی الگوی بیانی رونوشت‌های حلقوی سویا در پاسخ به تنش کمبود فسفر و نیتروژن بود.

## مواد و روش‌ها

**کشت گیاهان و اعمال تیمارها:** در این مطالعه بذرهای سویا (*Glycine max* var. Williams 82) ابتدا با آب شسته و سپس به مدت ۱۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد و ۱۰ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند (Shan et al. 2012). درنهایت برای حذف باقیمانده هیپوکلریت سدیم، بذرها سه بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند. در مرحله بعد، بذرها در گلدان‌های یک لیتری استریل و حاوی ماسه اتوکلاو شده کشت و تحت چهار تیمار مختلف (جدول ۱)، رشد داده شدند. گلدان‌ها در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز و تحت شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی، هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۸ درجه سلسیوس روز و ۲۲ درجه سلسیوس شب، نگهداری شدند (Wang et al. 2016). برای اعمال تیمارهای کمبود فسفر و نیتروژن، محلول غذایی هوگلند (Hoagland) تغییر داده شد (Wang et al. 2013; Wang et al. 2016) و گلدان‌ها به‌صورت یک‌درمیان با این محلول آبیاری شدند (جدول ۱). گلدان‌ها در صورت نیاز به آبیاری مجدد با آب مقطر اتوکلاو شده آبیاری شدند. برای این آزمایش هشت گلدان برای هر تیمار در نظر گرفته‌شد و در هر گلدان چهار گیاه کشت شد. در نهایت برای انجام آزمایش توالی‌یابی، سه گلدان از هر تیمار و دو گیاه از هر گلدان مورداستفاده قرار گرفت. ریشه‌های گیاهان شاهد و تیمار ۱۰ روز بعد از کشت برداشت شدند (Wang et al. 2016) و پس از حذف بقایای ماسه، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند و جهت آزمایش‌های بعدی در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.


[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8 ]

جدول ۱- مشخصات تیمارهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Treatments in this study

| تیمارها | مقدار نیتروژن ($NH_4NO_3$) mM | مقدار فسفر ($KH_2PO_4$) mM |
|---|---|---|
| نیتروژن کافی + فسفر کافی (شاهد) | 7.5 | 1 |
| نیتروژن ناکافی + فسفر ناکافی | 0.75 | 0.01 |
| نیتروژن ناکافی + فسفر کافی | 0.75 | 1 |
| نیتروژن کافی + فسفر ناکافی | 7.5 | 0.01 |

**استخراج و توالی‌یابی RNA**: جهت استخراج RNA کل از ترایزول (Trizol Sigma-Aldrich) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تایید و کمیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. در نهایت نمونه‌ها جهت توالی‌یابی با استفاده از پلتفرم Illumina به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

**شناسایی و تجزیه و تحلیل الگوی بیان رونوشت‌های حلقوی:** پس از دریافت داده‌های حاصل از توالی‌یابی، کیفیت داده‌های خام با استفاده از برنامه RNA-SeQC (DeLuca et al. 2012) مورد بررسی قرار گرفت و توالی‌های آغازگرها و آداپتورها با استفاده از برنامه Trimmomatic (Bolger et al. 2014) حذف شدند. توالی ژنوم سویا *Glycine max* v2.1 Williams 82 و مشخصات ژن‌های (Gene annotation) آن از پایگاه داده Plant Ensembl (https://plants.ensembl.org/Glycine_max/Info/Index) دانلود شدند. برای شناسایی رونوشت‌های حلقوی از برنامه‌ها و نرم‌افزارهای مبتنی بر خط دستوری سیستم عامل لینوکس استفاده شد. به‌این‌صورت که ابتدا داده‌های حاصل از توالی‌یابی در برابر ژنوم سویا با استفاده از برنامه STAR (Dobin et al. 2013) هم‌ردیف شدند و توالی‌هایی که قادر به هم‌ردیفی با ژنوم نبودند از کل توالی‌ها جدا سازی شدند. در نهایت با استفاده از توالی‌های همردیف نشده و با پنج روش مختلف شامل CIRCExplorer2 (Zhang et al. 2016)، find_circ (Memczak et al., 2013)، ACFS (You et al., 2015)، CIRI2 (Gao et al. 2018) و DCC (Cheng et al., 2016) رونوشت‌های حلقوی شناسایی شدند. پس از شناسایی رونوشت‌های حلقوی، نرمال‌سازی میزان بیان آن‌ها با استفاده از روش TMM (Trimmed Mean of M values) (Robinson and Oshlack 2010) انجام شد و تجزیه و تحلیل الگوی بیان آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار NoiSeq (Tarazona et al. 2011) که برنامه‌ای مبتنی بر نرم‌افزار R است بررسی شد. الگوی بیانی ژن‌های رمز کننده رونوشت‌های حلقوی در پاسخ به تیمارهای تنش در مقایسه با تیمار کنترل با $P\text{-value} < 0.05$ محاسبه شد.

**تجزیه و تحلیل GO (Gene Ontology) و KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)**: تجزیه و تحلیل بررسی عملکرد ژن‌های رمزکننده رونوشت‌های حلقوی یا GO با استفاده از پایگاه داده AgriGO (/http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO) (Tian et al. 2017) انجام شد. جهت غنی‌سازی آماری ژن‌های رونوشت‌های حلقوی در مسیرهای متابولیکی KEGG از نرم‌افزار KOBAS (Xie et al. 2011) استفاده شد.

## نتایج و بحث

**شناسایی رونوشت‌های حلقوی در پاسخ به تنش نیتروژن و فسفر:** اگرچه مطالعات زیادی نقش رونوشت‌های حلقوی را در گونه‌های مختلف گیاهی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نشان داده است( Wang et al. 2017; Litholdo and Fonseca 2018; Pan et al. 2018; Zhou et al. 2018)، اما مطالعات اندکی درباره نقش این رونوشت‌ها در سویا وجود دارد (Lv et al. 2020). در این مطالعه به‌منظور شناسایی نقش رونوشت‌های حلقوی سویا در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن و فسفر، از نمونه‌های ریشه گیاهچه‌های سویای رشدیافته تحت غلظت‌های مختلف جدول یک استفاده شد. در نهایت ریشه‌های سالم و عاری از هرگونه آلودگی یا همزیستی جهت استخراج ترانسکریپتوم و توالی‌یابی مورداستفاده قرار گرفت. توالی‌یابی ترانسکریپتوم به‌صورت paired-end و با طول خوانش ۱۰۱ جفت باز بود و در مجموع در تمام تیمارها بیش از ۳۶۰ میلیون خوانش



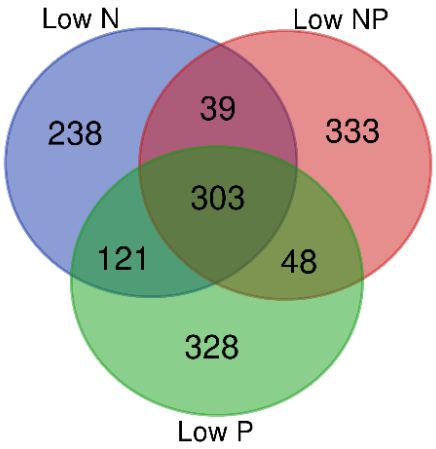


[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8 ]

(Read) تولید کرد که بیشترین خوانش مربوط به تیمار کنترل یعنی تیمار فسفر و نیتروژن کافی و کمترین میزان خوانش مربوط به تیمار تنش کمبود فسفر و نیتروژن بود.

با استفاده از پنج برنامه مختلف و ترکیب کردن نتایج حاصل از آن‌ها که باعث شناسایی قابل اعتمادترین رونوشت‌های حلقوی (Hansen et al. 2016) می‌شود، در کل تعداد ۲۰۳۳ رونوشت حلقوی در تمام تیمارها شناسایی شد. رونوشت‌های حلقوی در دسته رونوشت‌های غیر رمزکننده با بیان کم قرار دارند و در گذشته به‌عنوان رونوشت‌های جانبی فرایند پردازش حذف می‌شدند (Meng et al. 2017)، اما با پیشرفت‌ها در زمینه توالی‌یابی و افزایش قدرت این فناوری (Goodwin et al. 2016; Levy and Myers 2016) و همچنین پیشرفت‌ها در زمینه تولید نرم‌افزارهایی برای شناسایی این رونوشت‌ها (Hansen et al. 2016; Zeng et al. 2017; Jakobi and Dieterich 2019) ، بیان پایین رونوشت‌های حلقوی دوباره مورد توجه قرار گرفت و مشخص شد که این رونوشت‌ها هرچند به میزان کم در تمام موجودات و در تمام بافت‌ها بیان می‌شوند و دارای عملکردهای منحصربه‌فردی هستند (Hsiao et al. 2017; Li et al. 2018; Kristensen et al. 2019). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که رونوشت‌های حلقوی دارای الگوی بیان اختصاصی در بافت‌ها یا در پاسخ به تنش‌های مختلف هستند. به‌عنوان مثال، در پژوهشی دیگر مشخص شده است که ۷۷۶ رونوشت حلقوی در برگ‌های سویا، ۳۱۷۱ رونوشت حلقوی در ریشه‌های سویا و ۲۱۶۵ رونوشت حلقوی در ساقه‌های سویا به طور اختصاصی بیان می‌شوند (Zhao et al. 2017). نتایج مشابهی نیز نشان داد که در گیاه خیار و در پاسخ به تنش شوری ۸۲۷ رونوشت حلقوی در برگ‌ها و ۲۴۲۰ رونوشت حلقوی در ریشه‌ها بیان می‌شوند (Zhu et al. 2019)؛ بنابراین، تعداد رونوشت‌های حلقوی شناسایی شده در این مطالعه مطابق با نتایج پژوهش‌های گذشته است.

**بیان رونوشت‌های حلقوی به طور اختصاصی در تیمارهای مختلف:** در پژوهش‌های متعددی مشخص شده است که بیان رونوشت‌های حلقوی وابسته به بافت و شرایط محیطی مختلف است (Xiang et al. 2018، Pan et al. 2018). نتایج تجزیه و تحلیل تفرق بیان (Differential expression analysis) به‌صورت مقایسه هر تیمار تنش با تیمار کنترل روی ۲۰۳۳ رونوشت‌های حلقوی شناسایی شده، نشان داد که در مجموع ۱۴۱۰ رونوشت حلقوی در تیمارهای تنش فسفر و نیتروژن دارای الگوی بیان متفاوتی نسبت به تیمار شاهد هستند و تیمارها باعث افزایش یا کاهش بیان رونوشت‌های حلقوی می‌شوند. با تجزیه و تحلیل venn diagram روی نتایج حاصل از تفرق بیان ژن در تیمارها، مشخص شد که رونوشت‌های حلقوی دارای الگوی بیان وابسته به نوع تیمار تنش هستند (شکل ۱). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هرچند برخی از رونوشت‌های حلقوی به طور مشترک در دو یا چند تیمار مختلف بیان می‌شوند ولی بیان اکثر رونوشت‌های حلقوی وابسته به تیمارهای تنش فسفر و نیتروژن است. بررسی بیان رونوشت‌های حلقوی در برنج، گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس نیز نشان داده است که رونوشت‌های حلقوی الگوی بیان وابسته به مرحله نموی و پاسخ دهنده به تنش غیرزیستی دارند (Ye et al. 2015; Zou et al. 2016)؛ بنابراین، نتایج پژوهش حاضر می‌تواند نشان دهنده اهمیت رونوشت‌های حلقوی در پاسخ گیاه سویا به تنش‌های فسفر و نیتروژن باشد.




شکل ۱- تعداد رونوشت‌های حلقوی دارای الگوی بیان متفاوت که از نظر آماری به‌صورت معنی‌دار در پاسخ به تیمارهای مختلف تنش فسفر و نیتروژن در ریشه گیاه سویا بیان شدند.

Fig 1. Number of significant expressed circular RNAs in response to different low phosphorus and nitrogen treatments in soybean roots.

سویا گیاهی دانه روغنی با ارزش غذایی بسیار بالا است و کیفیت روغن دانه به میزان زیادی تحت تاثیر تنش‌های محیطی مختلف قرار می‌گیرد؛ بنابراین، تنش کمبود مواد غذایی و به ویژه نیتروژن و فسفر می تواند کیفیت محصول را با چالش شدیدی مواجه کند. شناسایی نحوه عمل ژن‌های درگیر در پاسخ به این تنش‌ها می‌تواند در تولید ارقام بهبودیافته سویا مورداستفاده قرار گیرد. به دلیل اینکه رونوشت‌های حلقوی پایانه‌های ´۵ و ´۳ ندارند، پایداری درونی نسبتا بالایی دارند و بنابراین کاندیدایی قوی برای حفظ هموستازی در مواجه با تنش‌های محیطی محسوب می‌شوند (Fischer and Leung 2017). با تجزیه و تحلیل تفرق بیان ژن‌های رمز کننده رونوشت‌های حلقوی و شناسایی ژن‌هایی که با اعمال تیمارها دارای افزایش یا کاهش بیان می‌شوند، می‌توان ژن‌های درگیر در مسیر پاسخ به تنش‌ها را شناسایی کرد. در مقایسه‌ای که بین تیمارهای مختلف تنش با تیمار شاهد انجام شد، نتایج نشان داد که در تیمار تنش کمبود فسفر در مقایسه با تیمار شاهد ۳۷۷ ژن دارای افزایش بیان و ٤۲۳ ژن دارای کاهش بیان شدند. همچنین در مقایسه بین تنش کمبود نیتروژن با تیمار شاهد، مشخص شد که ۲۸۱ ژن دارای افزایش بیان و ٤۲۰ ژن دارای کاهش بیان شدند. در مقایسه بیان ژن‌ها بین تنش کمبود نیتروژن و فسفر با تیمار شاهد نیز مشخص شد که ۳٦۹ ژن دارای افزایش بیان و ۳٦٤ ژن دارای کاهش بیان هستند. شکل دو الگوی بیان رونوشت‌های حلقوی بیان شده در ریشه سویا در تیمارهای مختلف فسفر و نیتروژن و در مقایسه با گیاه شاهد نشان می دهد. همچنین در جدول دو نیز ژن‌های کلیدی که با احتمال بیش از ۹۹ درصد در تیمارهای کمبود فسفر و نیتروژن تغییر بیان داشتند و همچنین نوع تنظیم آن‌ها آورده شده است (جدول ۲).

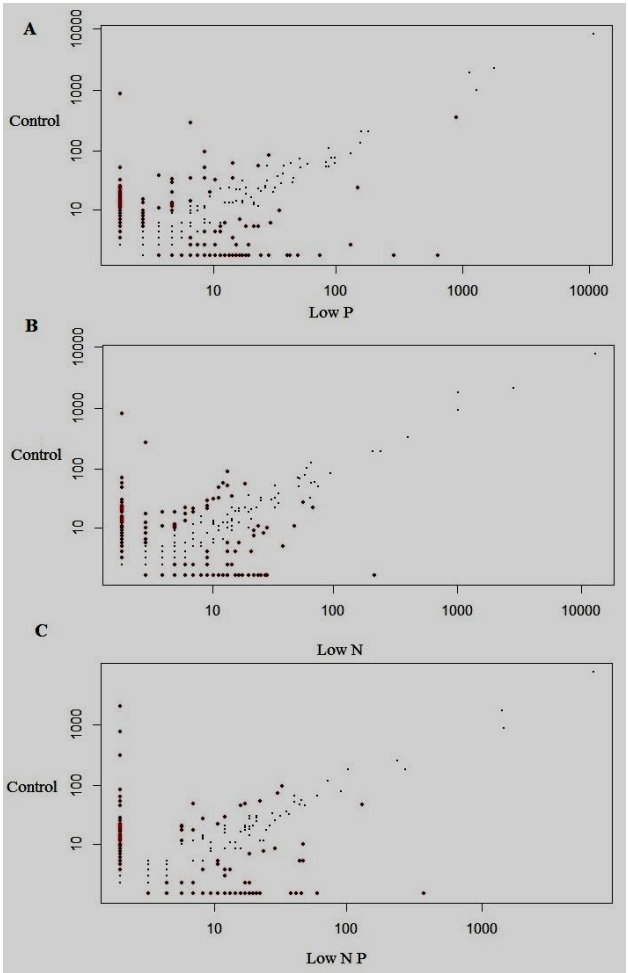
**نقش احتمالی رونوشت‌های حلقوی شناسایی شده:** تا به امروز نحوه عمل رونوشت‌های حلقوی در سلول‌ها به طور کامل شناخته نشده است اما پژوهش‌های گذشته نشان داده است که رونوشت‌های حلقوی ممکن است نسخه‌برداری ژن‌ها را به صورت بعد از رونویسی تنظیم کنند، به این صورت که رونوشت‌های حلقوی با اتصال به miRNAها و پروتئین‌ها در تنظیم بیان ژن‌ها عمل می‌کنند (Liang and Wilusz 2014). رونوشت های حلقوی در آرابیدوپسیس از طریق تنظیم ژن‌های والدی خود در گلدهی و نمو اندام‌های زایشی نقش مهمی دارند (Conn et al. 2017). همچنین رونوشت‌های حلقوی می‌توانند از طریق اتصال به DNA رونویسی و میزان بیان ژن‌ها را تنظیم کنند (Conn et al. 2017). برای بررسی عملکرد احتمالی رونوشت‌های حلقوی شناسایی شده در ریشه سویا در پاسخ به تنش‌های فسفر و نیتروژن، تجزیه و تحلیل GO انجام شد و نتایج نشان داد که بیشتر رونوشت‌های حلقوی شناسایی شده عملکرد خود را با اتصال به مولکول‌های هدف اعمال می‌کنند به‌طوری که درمورد عملکرد مولکولی، بیشترین GOهای غنی شده شامل اتصال به ATP و اتصال به نوکلئوتیدها بود (جدول ۳).

تجزیه و تحلیل مسیرهای متابولیکی KEGG جهت شناسایی و فهم بهتر عملکرد سیستم‌های بیولوژیکی در سطح مولکولی مورداستفاده قرار می گیرد (Kanehisa and Goto 2000). در این مطالعه نتایج تجزیه و تحلیل مسیرهای متابولیکی KEGG در رونوشت‌های حلقوی معنی‌دار شناسایی شده در تیمارهای مختلف تنش در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد که بیشتر ژن‌های تولیدکننده رونوشت‌های حلقوی در مسیرهای سوخت‌وساز کربن، بیوسنتز اسیدهای آمینه، چرخه سیترات، گلیکولیز و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه فعال هستند (جدول ٤). مطالعات زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد افزایش یا کاهش سوخت‌وساز کربن در گیاهان در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی اتفاق می افتد. به‌عنوان مثال در پاسخ به تنش خشکی غلظت برخی مونوساکاریدها و دی‌ساکاریدها در برگ‌ها افزایش می‌یابد (Rivas-Ubach et al. 2012; Ullah et al. 2017; Shahbazy et al. 2020). همچنین پژوهش‌ها نشان داده است که برخی از قندها مانند سوربیتول و مانیتول مولکول‌هایی هستند که می‌توانند از سلول‌های گیاهی در برابر اسمولیت‌ها که در تنش‌ها تولید می‌شوند محافظت کنند (Bianco et al. 2000, Chaves et al. 2003). اسیدهای آمینه نیز نقش‌های مهمی در گیاهان در پاسخ به تنش‌ها دارند. به‌عنوان مثال بیوسنتز و تجزیه اسیدآمینه پرولین تحت تاثیر تنش‌های مختلف محیطی تغییر می‌کند. علاوه براین، پرولین یکی از مهم‌ترین مولکول‌های حمله‌کننده به گونه‌های فعال اکسیژن در پاسخ به تنش شوری است (Hildebrandt et al. 2015).





[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8 ]




شکل ۲- الگوی بیان رونوشت‌های حلقوی شناسایی شده در تیمارهای مختلف تنش فسفر و نیتروژن (A: کمبود فسفر، B: کمبود نیتروژن، C: کمبود نیتروژن و فسفر) در ریشه سویا در مقایسه با تیمار شاهد. P: فسفر، N: نیتروژن، NP: نیتروژن و فسفر، Control: تیمار شاهد

Fig 2. Expression pattern of circular RNAs in different phosphorus and nitrogen stress treatments (A: phosphorus deficiency, B: nitrogen deficiency, C: nitrogen and phosphorus deficiency) in the soybean roots in comparison to control treatment. P: phosphorus, N: nitrogen, NP: nitrogen and phosphorus

**جدول ۲- ژن‌های کلیدی در مسیر پاسخ به تنش نیتروژن و فسفر در سویا**

Table 2. key genes in response to low nitrogen and phosphorus stresses in soybean

| نام رونوشت حلقوی | نام ژن | موقعیت | تیمار | نوع تنظیم | درصد احتمال |
|---|---|---|---|---|---|
| circ_038 | glyma_01g012500 | (chr1) 1207065-1207551 | Low N | Down | 0.999 |
| circ_049 | glyma_08g204300 | (chr8) 16559490-16560020 | Low N | Up | 0.998 |
| circ_276 | glyma_20g244900 | (chr20) 47545645-47545922 | Low N | Up | 0.998 |
| circ_045 | glyma_18g067000 | (chr18) 6194357-6195950 | Low N | Up | 0.998 |
| circ_153 | glyma_02g119000 | (chr2) 11728068-11730835 | Low N | Up | 0.998 |
| circ_229 | glyma_07g009600 | (chr7) 719350-719872 | Low N | Up | 0.998 |
| circ_286 | glyma_07g126400 | (chr7) 15081569-15081866 | Low N | Up | 0.998 |
| circ_151 | glyma_20g249400 | (chr20) 47825332-47825709 | Low N | Down | 0.997 |
| circ_030 | glyma_15g084400 | (chr15) 6477677-6480049 | Low NP | Up | 1 |
| circ_095 | glyma_03g202700 | (chr3) 41119531-41119947 | Low NP | Down | 1 |
| circ_141 | glyma_12g180600 | (chr12) 34109307-34109817 | Low NP | Up | 1 |
| circ_242 | glyma_13g276400 | (chr13) 37789838-37790458 | Low NP | Up | 1 |
| circ_250 | glyma_06g115200 | (chr6) 9378826-9379122 | Low NP | Up | 1 |
| circ_339 | glyma_11g232200 | (chr11) 32763070-32763486 | Low NP | Down | 1 |
| circ_407 | glyma_09g267100 | (chr9) 48491515-48492098 | Low NP | Up | 1 |
| circ_093 | glyma_20g189500 | (chr20) 42809681-42810843 | Low NP | Up | 0.999 |
| circ_091 | glyma_09g253700 | (chr9) 47339861-47340371 | Low P | Up | 1 |
| circ_110 | glyma_15g019300 | (chr15) 1491351-1492176 | Low P | Up | 1 |
| circ_310 | glyma_18g265200 | (chr18) 55005655-55006144 | Low P | Up | 1 |
| circ_031 | glyma_19g228600 | (chr19) 48001887-48002041 | Low P | Up | 0.999 |
| circ_157 | glyma_01g000900 | (chr1) 177307-177840 | Low P | Up | 0.999 |
| circ_332 | glyma_08g081500 | (chr8) 6159215-6159420 | Low P | Up | 0.999 |
| circ_380 | glyma_12g228600 | (chr12) 38855145-38855610 | Low P | Up | 0.999 |
| circ_447 | glyma_09g063200 | (chr9) 6057802-6058832 | Low P | Up | 0.999 |

جدول ۳- بررسی عملکرد ژن‌های رونوشت‌های حلقوی در ریشه سویا با استفاده از پایگاه داده AgriGO

Table 3. Functional categories of circular RNA genes in soybean root using AgriGO database.

| شناسه GO | طبقه‌بندی بر اساس عملکرد | تعداد ژن‌ها | *P-value* |
|---|---|---|---|
| GO:0005524 | ATP binding | 68 | 0.00012 |
| GO:0000166 | nucleotide binding | 86 | 0.00018 |
| GO:0030554 | adenyl nucleotide binding | 76 | 0.0003 |
| GO:0001883 | purine nucleoside binding | 76 | 0.0003 |
| GO:0001882 | nucleoside binding | 76 | 0.0003 |
| GO:0003676 | nucleic acid binding | 66 | 0.00037 |
| GO:0017076 | purine nucleotide binding | 79 | 0.00097 |
| GO:0005488 | binding | 218 | 0.0014 |
| GO:0008234 | cysteine-type peptidase activity | 7 | 0.0021 |
| GO:0032559 | adenyl ribonucleotide binding | 68 | 0.0022 |
| GO:0003774 | motor activity | 7 | 0.0052 |
| GO:0016853 | isomerase activity | 8 | 0.0054 |
| GO:0032555 | purine ribonucleotide binding | 71 | 0.0056 |
| GO:0032553 | ribonucleotide binding | 71 | 0.0056 |
| GO:0003777 | microtubule motor activity | 6 | 0.0081 |
| GO:0050662 | coenzyme binding | 14 | 0.013 |
| GO:0008194 | UDP-glycosyltransferase activity | 6 | 0.016 |
| GO:0016462 | pyrophosphatase activity | 25 | 0.016 |
| GO:0008092 | cytoskeletal protein binding | 7 | 0.017 |
| GO:0050660 | FAD binding | 7 | 0.017 |

جدول ٤- غنی‌سازی مسیرهای متابولیکی ژن‌های مربوط به رونوشت‌های حلقوی در سویا

Table 4. KEGG pathway enrichment of circRNA genes in soybean

| شناسه | تشریح | تعداد ژن | *P-Value* |
|---|---|---|---|
| gmx01200 | Carbon metabolism | 48 | 6.04782E-12 |
| gmx01100 | Metabolic pathways | 177 | 3.68733E-11 |
| gmx01110 | Biosynthesis of secondary metabolites | 116 | 6.97464E-11 |
| gmx01230 | Biosynthesis of amino acids | 38 | 1.28731E-08 |
| gmx00010 | Glycolysis / Gluconeogenesis | 25 | 6.10491E-07 |
| gmx00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms | 17 | 1.14549E-06 |
| gmx00020 | Citrate cycle (TCA cycle) | 14 | 7.92802E-06 |
| gmx00620 | Pyruvate metabolism | 16 | 0.000190308 |
| gmx01210 | 2-Oxocarboxylic acid metabolism | 11 | 0.00022403 |
| gmx04141 | Protein processing in endoplasmic reticulum | 25 | 0.000278851 |
| gmx00350 | Tyrosine metabolism | 10 | 0.000410823 |
| gmx00941 | Flavonoid biosynthesis | 10 | 0.00044694 |
| gmx00030 | Pentose phosphate pathway | 11 | 0.000993024 |
| gmx02010 | ABC transporters | 7 | 0.001795426 |
| gmx03013 | RNA transport | 18 | 0.00201432 |
| gmx00360 | Phenylalanine metabolism | 8 | 0.00211745 |
| gmx03060 | Protein export | 9 | 0.00238657 |
| gmx04626 | Plant-pathogen interaction | 20 | 0.002610559 |
| gmx03018 | RNA degradation | 14 | 0.002820773 |
| gmx00950 | Isoquinoline alkaloid biosynthesis | 6 | 0.003665508 |
| gmx00970 | Aminoacyl-tRNA biosynthesis | 11 | 0.004402306 |
| gmx00051 | Fructose and mannose metabolism | 10 | 0.007032996 |
| gmx03015 | mRNA surveillance pathway | 14 | 0.007087112 |
| gmx00052 | Galactose metabolism | 9 | 0.00792265 |
| gmx00640 | Propanoate metabolism | 6 | 0.008697459 |
| gmx00510 | N-Glycan biosynthesis | 7 | 0.008748851 |
| gmx00250 | Alanine, aspartate and glutamate metabolism | 8 | 0.009789797 |

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه، فراوانی و ویژگی‌های رونوشت‌های حلقوی ریشه گیاه سویا در پاسخ به تنش‌های کمبود فسفر و نیتروژن با استفاده از فناوری توالی‌یابی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه در مجموع در همه تیمارهای تنش فسفر و نیتروژن و تیمار شاهد ۲۰۳۳ رونوشت حلقوی را شناسایی کرد که از این تعداد ۱٤۱۰ رونوشت حلقوی دارای الگوی بیان متفاوتی نسبت تیمار شاهد بودند. نتایج این پژوهش بیان اختصاصی رونوشت‌های حلقوی را در تیمارهای مختلف تنش





[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8 ]

تایید کرد و اطلاعات مفیدی را در زمینه بیان رونوشت‌های حلقوی در سویا در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی فراهم آورد. بااین‌وجود آزمایش‌های بیشتری در آینده موردنیاز است تا سازوکار عمل رونوشت‌های حلقوی در گیاهان و به‌ویژه سویا شناسایی شود.

## منابع

**A Bianco RL, Rieger M, Sung SJS (2000).** Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. Physiol Plant 108, 71–78.

**Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014)**. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30, 2114-2120.

**Chaves MM, Maroco J, Pereira J, Chaves MM (2003)**. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. Funct Plant Boil 30, 239-264.

**Cheng, J., Metge, F., & Dieterich, C. (2016).** Specific identification and quantification of circular RNAs from sequencing data. Bioinformatics, 32(7), 1094-1096.

**Chiou TJ, Lin SI (2011)**. Signaling network in sensing phosphate availability in plants. Annu Rev Plant Biol 62, 185-206.

**Chu Q, Bai P, Zhu X (2020).** Characteristics of plant circular RNAs. Brief Bioinformatics 21, 135-143.

**Conn VM, Hugouvieux V, Nayak A (2017).** A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. Nat Plants 3, 1-5.

**DeLuca DS, Levin JZ, Sivachenko H (2012).** RNA-SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization. Bioinformatics 28, 1530-1532.

**Dobin A, Davis CA, Schlesinger F (2013).** STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29, 15-21.

**Fischer JW, Leung AK (2017).** CircRNAs: a regulator of cellular stress. Crit Rev Biochem Mol Biol, 52, 220-233.

**Fredeen AL, Raab TK, Rao IM, Terry N (1990).** Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glycine max* (L.) Merr. Planta 18, 399-405.

**Frink CR, Waggoner PE, Ausubel JH (1999).** Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. PNAS 96, 1175-1180.

**Gao Y, Zhang J, & Zhao F (2018).** Circular RNA identification based on multiple seed matching. Briefings in bioinformatics, 19(5), 803-810.

**Good AG, Shrawat AK, Muench DG (2004)**. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? Trends Plant Sci 9, 597-605.

**Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016).** Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat Rev Genet 17, p. 333.

**Hansen TB, Veno MT, Damgaard CK, Kjems J (2016).** Comparison of circular RNA prediction tools. Nucleic Acids Res 44, e58.

**Hao QN, Zhou XA, Ai HS et al. (2011).** Identification of genes associated with nitrogen-use efficiency by genome-wide transcriptional analysis of two soybean genotypes. BMC Genomics 12, p. 525.

**Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araujo WL, Braun HP (2015).** Amino acid catabolism in plants. Mol Plant 8,1563-79.

**Hsiao KY, Sun HS, Tsai SJ (2017).** Circular RNA–new member of noncoding RNA with novel functions. Exp Biol Med 242, 1136-1141.

**Jakobi T, Dieterich C (2019).** Computational approaches for circular RNA analysis. Wiley Interdiscip Rev RNA 10, e1528.

**Kanehisa M, Goto S (2000).** KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res 28, 27-30.

**Kant S, Bi YM, Rothstein SJ (2010).** Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. J Exp Bot 62, 1499-1509.

**Kristensen, LS, Andersen MS, Stagsted LV et al. (2019).** The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. Nat Rev Genet 20, 675-691.

**Lambirth KC, Whaley AM, Blakley IC et al. (2015).** A Comparison of transgenic and wild type soybean seeds: analysis of transcriptome profiles using RNA-Seq. BMC Biotechnol 15, p. 89.

**Levy SE, Myers RM (2016).** Advancements in next-generation sequencing. Annu Rev Genom Hum G 17, 95-115.

**Li X, Yang L, Chen LL (2018).** The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs. Mol Cell 71, 428-442.

**Liang D, Wilusz JE (2014).** Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. Genes Dev 28, 2233–2247.

**Litholdo CG, Fonseca GC (2018).** Circular RNAs and plant stress responses. Circular RNAs, Springer, Singapore, pp. 345-353.

**Liu S, Zhang M, Feng F, Tian Z (2020).** Toward a 'Green Revolution' for Soybean. Mol Plant 13, 688-697.

**Lv L, Yu K, Lu H et al. (2020).** Transcriptome-wide identification of novel circular RNAs in soybean in response to low-phosphorus stress. PloS one 15, e0227243.

**Malhotra H, Sharma S, Pandey R (2018).** Phosphorus nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. In Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance (pp. 171-190). Springer, Singapore.

**Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J et al. (2010).** Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in

plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Ann Bot 105, 1141-1157.

**Memczak S, Jens M, Elefsinioti A et al. (2013).** Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. Nature 495, 333-338.

**Meng X, Li X, Zhang P et al. (2017).** Circular RNA: an emerging key player in RNA world. Brief Bioinformatics 18, 547-557.

**Ning L, Kan G, Du W et al. (2016).** Association analysis for detecting significant single nucleotide polymorphisms for phosphorus-deficiency tolerance at the seedling stage in soybean [*Glycine max* (L) Merr.]. Breed Sci 66, 191-203.

**Pan T, Sun X, Liu Y et al. (2018).** Heat stress alters genome-wide profiles of circular RNAs in Arabidopsis. Plant Mol Biol 96, 217-229.

**Qu S, Yang X, Li X et al. (2015).** Circular RNA: a new star of noncoding RNAs. Cancer Lett 365, 141-148.

**Raghothama KG (1999).** Phosphate acquisition. Annu Rev Plant Biol 50, 665-693.

**Ren Y, Yue H, Li L et al. (2018).** Identification and characterization of circRNAs involved in the regulation of low nitrogen-promoted root growth in hexaploid wheat. Biol Res 51, p. 43.

**Rivas-Ubach A, Sardans J, Perez-Trujillo M et al. (2012).** Strong relationship between elemental sotichiometry and metabolome in plants. Proc Nat Acad Sci 109, 4181-4186.

**Robinson, M. D., Oshlack, A. (2010).** A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. Genome biology, 11(3), 1-9.

**Sedivy EJ, Wu F, Hanzawa Y (2017).** Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases. New phytol 214, 539-553.

**Shahbazy M, Moradi P, Ertaylan G et al. (2020).** FTICR mass spectrometry-based multivariate analysis to explore distinctive metabolites and metabolic pathways: A comprehensive bioanalytical strategy toward time-course metabolic profiling of Thymus vulgaris plants responding to drought stress. Plant Sci 290, p. 110257.

**Shan Z, Li S, Liu Y, Yang Z, Yang C, Sha A, Zhou XA (2012).** First report of Phomopsis seed decay of soybean caused by Phomopsis longicolla in South China. Plant disease, 96(11), 1693-1693.

**Tarazona S, Garcia F, Ferrer A et al. (2011).** NOIseq: a RNA-seq differential expression method robust for sequencing depth biases. EMBnet J 17, 18-19.

**Tian T, Liu Y, Yan H et al. (2017).** agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community. Nucleic Acids Res 45, 122-129.

**Ullah N, Yüce M, Gökçe ZNO, Budak H (2017).** Comparative metabolite profiling of drought stress in roots and leaves of seven *Triticeae* species. BMC Genomics 18, p. 969.

**Wang C, Chen H, Hao Q et al. (2012).** Transcript profile of the response of two soybean genotypes to potassium deficiency. PLoS One 7, e39856.

**Wang K, Wang C, Guo (2019).** CropCircDB: a comprehensive circular RNA resource for crops in response to abiotic stress. Database, 2019.

**Wang Q, Wang J, Yang Y, Du W, Zhang D, Yu D, Cheng H (2016).** A genome-wide expression profile analysis reveals active genes and pathways coping with phosphate starvation in soybean. BMC Genomics, 17(1), 192.

**Wang Y, Yang M, Wei S (2017).** Identification of circular RNAs and their targets in leaves of *Triticum aestivum* L. under dehydration stress. Front Plant Sci 7, p. 2024.

**Wang Y, Zhang C, Hao Q, Sha A, Zhou R, Zhou X, Yuan L (2013).** Elucidation of miRNAs-mediated responses to low nitrogen stress by deep sequencing of two soybean genotypes. *PLoS One*, *8*(7), e67423.

**Xiang L, Cai C, Cheng J (2018).** Identification of circularRNAs and their targets in Gossypium under Verticillium wilt stress based on RNA-seq. PeerJ, 6, e4500.

**Xie C, Mao X, Huang J (2011).** KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. Nucleic Acids Res 39, 316-322.

**Ye CY, Chen L, Liu C (2015).** Widespread noncoding circular RNAs in plants. New Phytol 208, 88-95.

**You X, Conrad TO (2016).** Acfs: accurate circRNA identification and quantification from RNA-Seq data. Scientific Reports, 6(1), 1-11.

**Zeng HQ, Zhu YY, Huang SQ, Yang ZM (2010).** Analysis of phosphorus-deficient responsive miRNAs and cis-elements from soybean (*Glycine max* L.). J Plant Physiol 167, 1289-1297.

**Zeng X, Lin W, Guo M, Zou Q (2017).** A comprehensive overview and evaluation of circular RNA detection tools. Plos Comput Biol 13, e1005420.

**Zhang XO, Dong R, Zhang Y (2016).** Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. Genome Res 26, 1277-1287.

**Zhao W, Cheng Y, Zhang C, You Q, Shen X, Guo W, Jiao Y (2017).** Genome-wide identification and characterization of circular RNAs by high throughput sequencing in soybean. Scientific Reports, 7(1), 1-11.

**Zheng Y, Hivrale V, Zhang X et al. (2016).** Small RNA profiles in soybean primary root tips under water deficit. BMC Syst Biol 10, 126.

**Zhou R, Zhu Y, Zhao J (2018).** Transcriptome-wide identification and characterization of potato circular RNAs in response to *Pectobacterium carotovorum* subspecies brasiliense infection. Int J Mol Sci 19, p. 71.

**Zhu, YX, Jia JH, Yang L, Xia YC, Zhang HL, Jia JB, Liu LC (2019).** Identification of cucumber circular RNAs responsive to salt stress. BMC Plant Biology, 19(1), 164.

**Zuo J, Wang Q, Zhu B (2016).** Deciphering the roles of circRNAs on chilling injury in tomato. Biochem Biophys Res Commun 479, 132-138.



[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8 ]

**Genetic Engineering and Biosafety Journal**
**Volume 9, Number 2**
**2021**

# Identification of soybean circular RNAs in response to low nitrogen and phosphorus stresses

Saeid Babaei, Esmaeil Ebrahimie*, Ali Niazi, Mahnaz Nezamivand Chegini

Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran
*Corresponding Author, Email: ebrahimie@shirazu.ac.ir

## Abstract

Soybean, one of the most important sources of edible oil and protein in the world, is exposed to various environmental biotic and abiotic stresses. These stresses can negatively impact the quality and quantity of soybean production. This study aimed to identify genes that express circular RNAs in response to low phosphorus and nitrogen stresses in soybean roots. Soybean seeds were grown under different low phosphorus and nitrogen treatments, and sampling was done from the root tissues for total RNA isolation. After measuring the quality and quantity of the isolated RNA, samples were sequenced using next-generation sequencing. After obtaining the sequencing data, the quality of RNA-seq data measured, and then circular RNAs were identified and characterized using five different programs. Finally, to identify the expression pattern and putative function of circular RNAs, differential expression analysis and functional analysis of circular RNAs' parent genes was done using bioinformatics approaches. RNA-seq experiment produced more than 360 million reads, and in total, 2033 circular RNAs were identified in all treatments. Although some circular RNAs were co-expressed in two or more treatments, most of the circular RNAs had a stress-responsive expression. Our results were revealed that circular RNAs may play their roles by binding to their target molecules. Identified genes can be used in plant breeding programs for producing tolerant soybean cultivars to low phosphorus and nitrogen stresses.

**Keywords**: Circular RNA, Nitrogen, Phosphorus, Soybean, Stress



[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8 ]