مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره بیست‌ویکم، بهار ۱۳۹۷ (۱۵-۱)

Crop Biotech.
Spring (2018) 21: 1-15.

تحلیل فیلوژنتیکی خانواده ژنی *NAC* در سورگوم دانه‌ای و بررسی الگوی بیانی اعضای دخیل در پاسخ به تنش خشکی

سپیده سنجری[۱]، رضا شیرزادیان‌خرم‌آباد[۲*]، زهراسادات شبّر[۳]، مریم شهبازی[٤]
۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳. استادیار گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
٤. استادیار گروه فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۹/۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۱۲)

Phylogenetic analysis of *NAC* gene family in grain Sorghum and expression pattern analysis of drought responsive members

Sepideh Sanjari[1], Reza Shirzadian-Khoramabad[2], Zahra-Sadat Shobbar[3], Maryam Shahbazi[4]
1. Ph.D. Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Assistant Professor, Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
(Received: Nov. 7, 2017 - Accepted: Jun. 2, 2018)

چکیده

سورگوم علی‌رغم تحمل قابل‌توجه به خشکی، در دوران قبل و بعد از گلدهی در صورت مواجهه با تنش خشکی، دچار کاهش عملکرد دانه‌ای می‌شود. عوامل رونویسی NAC، نقش کلیدی در سازگاری سورگوم به خشکی ایفا می‌کنند. در این مطالعه، اطلاعات مربوط به خانواده پروتئینی NAC از پایگاه‌های اطلاعاتی جمع‌آوری شد. سپس، مدل مخفی مارکوف دمین NAC (PF02365) بر علیه پروتئین‌های سورگوم مورد جستجو قرار گرفت. در مجموع، ۱۸۳ توالی پروتئینی کدشونده توسط ۱۳۱ مکان ژنی شناسایی شدند. درخت فیلوژنی بر اساس دمین NAC خانواده ژنی *NAC* سورگوم، به‌همراه ۱۱ توالی پروتئینی شناخته شده در سایر گیاهان، با روش نزدیک‌ترین همسایه‌ها ترسیم شد که این خانواده را به ۱۵ زیرخانواده طبقه‌بندی نمود. ۱۳ عضو از خانواده پروتئینی NAC سورگوم به زیرخانواده SNACهای سایر گیاهان پیوستند که احتمالا در تحمل به تنش‌های غیرزیستی دخیل باشند. ١٤ نوع عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش‌ها و هورمون‌ها در راه‌انداز ژن‌های زیرگروه SNAC پیش‌بینی شد. به‌منظور بررسی الگوی بیانی نسبی ژن‌های SNAC، کشت مزرعه‌ای به‌صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی اجرا شد. آبیاری در دو سطح شامل آبیاری معمولی و تنش خشکی (قطع آبیاری پس از گلدهی) و ارقام در دو سطح شامل کیمیا (متحمل) و سپیده (حساس) لحاظ گردید. با توجه به الگوی بیانی *SbSNAC*ها، انتظار می‌رود که برخی از اعضا به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رونویسی مثبت (سه عضو) و منفی (سه عضو) در پاسخ به تنش خشکی پس از گلدهی در سورگوم فعالیت کنند. همچنین، برخی در پیری برگ (دو عضو) و فرایند انتقال مجدد فلزات (دو عضو) نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: NAC، خشکی، *Sorghum bicolor* (L.) Moench، درخت فیلوژنتیکی، الگوی بیانی ژن.

Abstract

Sorghum, in spite of its great tolerance to drought stress, suffers from grain yield loss due to pre and post flowering -drought stress conditions. NAC TFs play key roles in *Sorghum* drought adaptation. In this study, NAC protein family data was collected from databases. Then, hidden Markov model profiles of NAM domain (PF02365) was obtained from Pfam database and used to find the putative NAC members against Sorghum proteins. Totally, 183 protein sequences encoded by 131 gene loci were identified. The unrooted phylogenetic tree was constructed based on NAC domains of *Sorghum* and 11 known NAC domains of other plants using the Neighbor-Joining method, which classified the family into 15 subfamilies. 13 members of the NAC protein family of *Sorghum* joined to the SNAC subfamily of other plants, which are expected to be involved in abiotic stress tolerance. 14 different stress and hormone responsive regulatory elements were predicted in promoters of SNAC subgroupgenes. To study the expression pattern of these genes, two extreme *Sorghum* cultivars including Kimia and Sepideh were planted based on Split-plot Randomized Complete Block Design with three replications in the field. Irrigation was performed in two levels including normal irrigation and drought stress (water holding from anthesis). Based on the SbSNAC expression pattern, we predict that some members are involved in response to drought stress at post-flowering stage as positive (3 members) and negative transcriptional regulators (3 members). As well, some of them play role in leaf senescence (2 members) and metal remobilization processes (2 members).

Keywords: NAC, Drought, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, phylogenetic tree, gene expression pattern.

* نویسنده مسئول: رضا شیرزادیان‌خرم‌آباد
E-mail: r.shirzadian@guilan.ac.ir

مقدمه

گیاهان غالباً در معرض تنش‌های غیرزیستی نظیر دمای پایین، شوری، خشکی، سیل، گرما، تنش اکسیداتیو و مسمومیت با فلزات سنگین قرار می‌گیرند (Tuteja, 2010). در سناریوی جهانی گرم شدن زمین، خشکی یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی محسوب می‌شود که بر رشد و نمو گیاهان موثر بوده و امنیت غذایی را به مخاطره می‌اندازد. محدودیت در دسترسی به آب توسط ریشه و یا افزایش نرخ تعرق برگ در نتیجه بالا رفتن دمای جوی، منجر به القای تنش خشکی می‌شود که در نهایت روی رشد و نمو، عملکرد گیاه تاثیر می‌گذارد و همچنین موجب کاهش محتوای رنگدانه‌ها و فعالیت فتوسنتزی، اختلال در پایداری غشاء و تغییر در تعادل اسمزی می‌شود (Lata *et al*., 2015).

تنش خشکی، ۴۰ تا ۶۰ درصد اراضی زیر کشت جهان را تحت تاثیر قرار داده است. پیش‌بینی شده است که جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ از جمعیت کنونی ۶/۶ بیلیون نفر به ۱۱/۳-۸/۷ بیلیون نفر رسیده و از طرفی، تقاضای جهانی برای تولید غلات نیز ۶۰ درصد افزایش خواهد یافت (Rosegrant, 2003). این، در حالی است که با کاهش سطح زمین‌های قابل‌کشت و آب آبیاری مواجه هستیم. این مشکلات، همراه با تغییرات اقلیمی جهان نظیر افزایش تنش‌های گرما، خشکی و سیل که روی رشد و عملکرد گیاهان تاثیرات منفی دارند، تشدید خواهد شد. توانایی گیاهان به سازگاری و تولید محصول تحت چنین شرایط محیطی سختی، در تعیین پایداری و امنیت غذایی در آینده بسیار حائز اهمیت خواهد بود (Dalal *et al*., 2012) و سورگوم یکی از گیاهان پراهمیت در این زمینه است.

سورگوم (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)، پنجمین غله مهم دنیا بعد از گندم، برنج، ذرت و جو محسوب می‌شود (FAO, 2005). سورگوم متعلق به تیره Poaceae، زیر تیره Panicoideae بوده و مانند ذرت، نیشکر و ارزن متعلق به تبار Andropogoneae می‌باشند. این تبار، بومی مناطق حاره‌ای و نیمه حاره‌ای می‌باشند که با خصوصیاتی نظیر فتوسنتز C_4، نرخ بالای تثبیت کربن، تولید بیوماس بالا، ظرفیت بالای مصرف آب و غذا، سازگاری به محیط‌های متنوع، چرخه زندگی یکساله و یا چند ساله مشخص می‌شوند. با این‌حال، بسیاری از گونه‌های این تبار، دارای سطح پلی‌پلوئیدی با پیچیدگی‌های ژنومی بالایی هستند (Dalal *et al*., 2012). سورگوم، علاوه بر مزیت‌های فوق، گیاهی دیپلوئید (2N=20)، با اندازه ژنوم۷۵۰ مگاباز است که ژنوم آن، دو برابر ژنوم برنج و شش برابر ژنوم آرابیدوپسیس است (Dicko *et al*., 2006).

سورگوم در مقایسه با سایر گیاهان C_4، به‌دلیل دارا بودن ژنوم کوچک، کولتیوارهای دیپلوئید، ژرم‌پلاسم متنوع، نقشه‌های ژنتیکی، فیزیکی و مقایسه‌ای ترسیم شده، کاندید مناسبی برای مطالعات ژنتیکی در این تبار می‌باشد (Casa *et al*., 2005; Harris *et al*., 2007) و از سوی دیگر، به‌دلیل تکامل آن در آفریقا با بارش کم و نامنظم، به‌عنوان مدل برای مطالعات مکانیسم‌های ژنتیکی و فیزیولوژی تحمل به خشکی در گونه‌های غلات نیز، محسوب می‌شود (Kapanigowda *et al*., 2012). سطح زیرکشت سورگوم در جهان و ایران به‌ترتیب حدود ۴۲/۳۴ میلیون و ۴۰ هزار هکتار است (FAO, 2011).

بیش از ۳۵٪ از محصول سورگوم به‌طور مستقیم مورد مصرف انسان و مابقی برای تغذیه دام و محصولات صنعتی استفاده می‌شود و اخیرا از سورگوم به عنوان ماده خام انرژی زیستی سلولزی نیز، استفاده می‌شود (Dicko *et al*., 2006; Paterson *et al*., 2009). سورگوم، طیف گسترده‌ای از لحاظ فنوتیپی و ژنتیکی نسبت به تنش خشکی دارد و دو پاسخ مجزا به تنش خشکی در سورگوم شناسایی شده است که شامل پاسخ به خشکی قبل از گلدهی[1] و بعد از گلدهی[2] که

1. Pre-flowering
2. Post-flowering

به‌ترتیب، قبل از گرده افشانی و در مرحله پر شدن دانه رخ می‌دهد که این دو پاسخ توسط مکانسیم‌های مختلفی کنترل می‌شود. ژنوتیپ‌هایی از سورگوم شناخته شده است که به خشکی قبل و یا بعد از گلدهی تحمل نشان می‌دهند اما، بسیاری از ژنوتیپ‌ها با سطح بالای تحمل نسبت به یک مرحله، نسبت به مرحله دیگر حساس می‌باشند (Patil *et al*., 2013). هر چند که سورگوم در مقایسه با سایر محصولات زراعی به عنوان یک گیاه متحمل به خشکی شناخته شده است اما تنش خشکی قبل و بعد از گلدهی به‌طور قابل توجهی عملکرد دانه را کاهش می‌دهد (Yi-Hong *et al*., 2013). ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی پس از گلدهی سورگوم، به‌دلیل حفظ کلروفیل خود نسبت به ژنوتیپ-های حساس، مدت زمان بیشتری قادر به فتوسنتز تحت شرایط خشکی هستند از این‌رو به تیپ سبزمانی معروف هستند (Thomas *et al*., 2000).

سازگاری به خشکی پس از گلدهی در سورگوم با فنوتیپ سبزمانی پیوسته است که با سبزماندن ساقه و برگ های بالایی تحت کمبود اب پس از گلدهی، نشان داده می‌شود (Sabadin *et al*., 2012) و یکی از خانواده‌های ژنی مرتبط با پیری برگ، خانواده ژنی *NAC* است (Wu *et al*., 2016).

ژن‌های *NAC*، خانواده بزرگی از عوامل رونویسی می‌باشند که مختص گیاهان هستند و همولوگ آن‌ها در سایر موجودات یوکاریوتی دیگر، مشاهده نشده است (Riechmann *et al*., 2000). نام NAC، برگرفته شده است از حروف اول سه ژن *NAM*[1]، *CUC2*[2] و *ATAF1/2* که دارای دمین مشترک بوده و برای اولین‌بار در این خانواده شناسایی شدند (Collinge *et al*., 2001). به‌طور معمول، عوامل رونویسی NAC دارای دمین متصل‌شونده به DNA[3] (حدود ۱۵۰ اسید آمینه) در N–ترمینال و منطقه تنظیم رونویسی[4] در C– ترمینال هستند. در برخی گیاهان، C- ترمینال دارای دمین متصل شونده به پروتئین[5] و مابقی آن‌ها، دارای موتیف فراغشایی[6] می‌باشد (Tran *et al*., 2010). عوامل رونویسی NAC، قادر به فعال‌سازی و یا سرکوب نمودن رونویسی ژن‌های مورد هدف‌شان هستند. اعضای مختلف یک خانواده، اغلب پاسخ‌های متفاوتی به محرک‌های مختلف محیطی می‌دهند. از سوی‌دیگر، برخی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش، دارای عنصر عملگر همسو[7] حفظ شده در منطقه راه‌انداز خودشان برای عامل رونویسی مشابه می‌باشند. اغلب مسیرهای انتقال پیام مانند مسیر NAC که در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی فعال می‌شوند در گیاهان برنج و آرابیدوپسیس شناسایی شده است (Nakashima *et al*., 2012). در گیاهانی که ژنوم آن‌ها تعیین توالی شده است مانند آرابیدوپسیس، برنج، انگور، صنوبر و سویا به‌ترتیب ۱۱۷، ۱۵۱، ۷۹، ۱۶۳ و ۱۵۲ عضو از خانواده NAC پیش‌بینی شده است (Fang *et al*., 2008; Hu *et al*., 2010; Singh *et al*., 2013; Wang *et al*., 2013). ژن‌های خانواده *NAC* در فرایندهای تنظیمی گوناگونی نظیر نمو بذر و جنین، تشکیل مریستم انتهایی ساقه، پیری برگ، تقسیم سلولی، تشکیل دیوار ثانویه، تشکیل ریشه‌های جانبی، انتقال پیام اکسین، رشد فیبر و همچنین، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی درگیر هستند (Koyama, 2014; Shen *et al*., 2009; Sperotto *et al*., 2009). مطالعات نشان داده است که بیان مضاعف[8] ژن‌های *NAC*، تحمل به تنش‌های غیرزیستی را در

1. No Meristem Apical
2. Cup-shaped Cotyledon

3. DNA binding domain
4. Transcriptional Regulation Region (TRR)
5. Protein-binding
6. Transmembrane (TM)
7. Cis-element
8. Overexpression

گیاهان تراریخته به‌همراه داشتند (Song *et al*., 2011; Sun *et al*., 2015). با توجه بر این امر که مرحله پر شدن دانه سورگوم با خشکی پایان فصل زراعی در ایران مواجه است، هدف از این مطالعه، شناسایی اعضا کاندیدی از این خانواده می‌باشد که در تحمل به تنش خشکی پس از گل‌دهی سورگوم دخیل هستند. امید بخش‌ترین ژن‌های کاندید شناخته‌شده در این تحقیق پس از مطالعات تکمیلی‌تر، برای بررسی عملکردی (به‌منظور افزایش تحمل به تنش خشکی) به گیاه آرابیدوپسیس و یا برنج انتقال ژن خواهد یافت.

مواد و روش‌ها

شناسایی و جمع آوری اعضا خانواده ژنی *NAC* سورگوم

اطلاعات مربوط به خانواده ژنی NAC در سورگوم از پایگاه اطلاعاتی TFDB (Jin *et al*., 2017)[1]، MOROKOSHI (http://sorghum.riken.jp/morokoshi/Home.html) Makita *et al*., 2015)، Phytozome (Goodstein *et al*., 2012) (http://www.phytozome.net)، GrassTFDB (http://grassius.org/grasstfdb.php) Yilmaz *et al*., 2009) جمع‌آوری شد. همچنین، پروفایل مدل مخفی مارکوف[2] مربوط به دمین NAC از بانک اطلاعاتی Pfam (شماره دسترسی: PF02365) دریافت شد (Finn *et al*., 2016) و از آن برای جستجو، بر علیه تمام توالی‌های پروتئینی سورگوم به‌دست آمده از پایگاه ensemble (http://plants.ensembl.org/info/website/ftp/index.html) با استفاده از برنامه HMMER (تحت Linux) استفاده شد. به‌منظور شناسایی اعضا خانواده ژنی NAC سورگوم، توالی‌های تکراری به‌دست آمده از پایگاه‌های مذکور، حذف و سپس توالی‌های پروتئینی جهت بررسی حضور دمین NAC در پایگاه اطلاعاتی PFAM (http://pfam.xfam.org) و SMART (http://smart.embl-heidelberg.de) (Letunic *et al*., 2015) مورد جستجو قرار گرفتند.

هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی

توالی دمین NAC مربوط به پروتئین‌های خانواده ژنی NAC سورگوم (بلندترین رونوشت از هرعضو) به‌همراه یازده عضو پاسخ‌دهنده به تنش خشکی و یا پیری برگ شناخته شده در گندم، ذرت، آرابیدوپسیس و برنج با برنامه ClustalX2 (Larkin *et al*., 2007) همردیف شدند. درخت فیلوژنی با روش اتصال همسایه ها[3] و آزمون خودراه‌اندازی[4] با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم‌افزار Mega7 (Kumar *et al*., 2006) ترسیم شد.

آنالیز راه‌انداز ژن های گروه SNAC

۱۰۰۰ نوکلئوتید بالادست توالی cDNA و 5'UTR ژن‌های گروه SNAC در سورگوم از پایگاه Phytozome (Goodstein *et al*., 2012) دریافت و شناسایی عناصر تنظیمی همسو[5] در راه‌انداز، با استفاده از پایگاه PlantCare صورت گرفت (Magali *et al*., 2002).

طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های SNAC

۱۳ ژن از خانواده ژنی *NAC*، در پاسخ به تنش‌های محیطی بر اساس گروه‌بندی درخت فیلوژنتیکی شناسایی شدند و آغازگر اختصاصی رو به جلو و برگشتی برای هر یک از اعضا گروه SNAC جهت بررسی بیان ژن آن‌ها با استفاده از نسخه هفتم نرم‌افزار Oligo طراحی شد (جدول ۱) (Wojciech, 2010).

1. Plant Transcription Factor Database
2. Hidden Morkov Model (HMM)
3. Neighbor-joining
4. Bootstrap
5. Cis element

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژن‌های گروه SNAC با استفاده از نرم افزار Oligo

نام آغازگر	شماره دستیابی		توالی	دمای ذوب	GC درصد [%]
SbNAC005	Sobic.001G040200	Forward	CGAACCTGAACCCGACTCTG	64	60
		Reverse	AGAATGAGCCTCGCCAACACT	64	52
SbNAC014	Sobic.001G385800	Forward	ACGACGTTCCAAATAGGCAAC3	62	48
		Reverse	AGATCCCGATGTTCAAATCACAA	64	40
SbNAC021	Sobic.002G080100	Forward	TCTTCTGAGATCCTCTGCGACT	66	50
		Reverse	ACTGCTACTTCTGCACTACACC	66	50
SbNAC034	Sobic.002G342100	Forward	AGCCTACTACATACCTACAGAG	64	46
		Reverse	CCTATACATGGCGACAATGACA	64	46
SbNAC035	Sobic.002G420700	Forward	GCCTCAACCATCACATGCTTC	64	52
		Reverse	GATGGCGTCGTATGCATGGAA	64	52
SbNAC037	Sobic.003G001701	Forward	TTCTCCATATCCGACGACACC	64	52
		Reverse	AACGAACATAGAGCGCCTCC	62	55
SbNAC041	Sobic.003G105800	Forward	CACTCGCTGCTAAATTAGGG	60	50
		Reverse	GTTGAATTCCTTCCGCATCG	60	50
SbNAC050	Sobic.003G334600	Forward	AGACAATCCTGCCACCGTTC	62	55
		Reverse	ACGTTACAAGCCTACAGCAAC	62	47
SbNAC052	Sobic.003G379700	Forward	TGCTAAATCTGAACATGGCAC	60	42
		Reverse	GAACTGCCTTGCTATAGGTCT	60	47
SbNAC066	Sobic.005G018500	Forward	TATCTGGCCTGTTTCGAACGC	64	52
		Reverse	TCTCAGTTTCGAACACGGGAA	62	47
SbNAC073	Sobic.005G064600	Forward	CTGTGCCGGATCTACAACAAG	64	52
		Reverse	ACCGTACTCCGGGAACTCCA	64	60
SbNAC104	Sobic.008G021800	Forward	CAGCAATCCGTTCTTGAGCCA	64	52
		Reverse	GAGAGGTTCTTCAGATCCGTC	64	52
SbNAC116	Sobic.009G142200	Forward	ATTGCCGCTACTGCTACGAGA	64	52
		Reverse	AAATTCCAGCACCAAATGTCCA	62	40
PP2A	Sobic.006G126100	Forward	AACCCGCAAAACCCCAGACTA	62	52
		Reverse	TACAGGTCGGGCTCATGGAAC	62	57

مواد گیاهی و سنجش محتوای نسبی آب برگ

کشت سورگوم در مزرعه مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر–کرج به مدت یک سال زراعی (سال ۹۴) به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد و تیمار آبیاری به عنوان عامل اصلی (A) و ارقام به عنوان عامل فرعی (B) در نظر گرفته شد. آبیاری در دو سطح شامل آبیاری معمولی (آبیاری بعد از ۶۰ میلی‌متر تبخیر از سطح تشتک تبخیر) و تنش شدید (قطع آبیاری پس از ۵۰ درصد از گلدهی) و ارقام شامل کیمیا و سپیده (بذور این ارقام از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شدند) بودند. به‌منظور اندازه گیری محتوای نسبی آب برگ، وزن تازه، وزن آماسیده و وزن خشک برگ اندازه گیری شدند. درصد محتوای نسبی آب برگ با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید (Pask *et al*., 2012):

محتوای نسبی آب برگ (٪) =

وزن تازه برگ – وزن خشک/ وزن آماسیده -وزن خشک × ۱۰۰

استخراج RNA، ساخت cDNA و بررسی بیان ژن‌های گروه SNAC

نمونه‌برداری از برگ پرچم هر دو رقم (کیمیا، سپیده)، پس از سپری شدن سه هفته از قطع آبیاری کامل از کرت‌های تحت تنش شدید و آبیاری معمولی انجام گرفت. استخراج RNA کل[1] با استفاده از محلول ترایزول[2] (شرکت Invitrogen) انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA توسط دستگاه پیکودراپ (شرکت picodrop مدلpicopet 01) و همچنین الکتروفورز ژلی بررسی شد. جهت حذف آلودگی DNA در محلول استخراج RNA کل، از آنزیم DNase (شرکت Geneall) استفاده شد. سپس ساخت cDNA توسط کیتiScript cDNA synthesis (شرکت BioRad) مطابق با دستورالعمل آن صورت پذیرفت. الگوی بیانی ژن‌های کاندید در تحمل به تنش خشکی

1. Total RNA
2. Trizol reagent

سورگوم توسط PCR کمی[1] با استفاده از کیت SYBR Green SuperMix (شرکت Quanta) و دستگاه Real-time PCR (شرکت Bio-ad) مطالعه شد. ژن *PP2A*[2] (شماره دستیابی: XM_002453490) به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد (Sudhakar *et al.*, 2016) و میزان بیان ژن با روش 2 -ΔΔCt محاسبه گردید و در نهایت، میزان تغییرات بیان این ژن‌ها تحت تنش خشکی نسبت به شاهدشان (آبیاری معمولی) سنجیده شدند.

نتایج و بحث

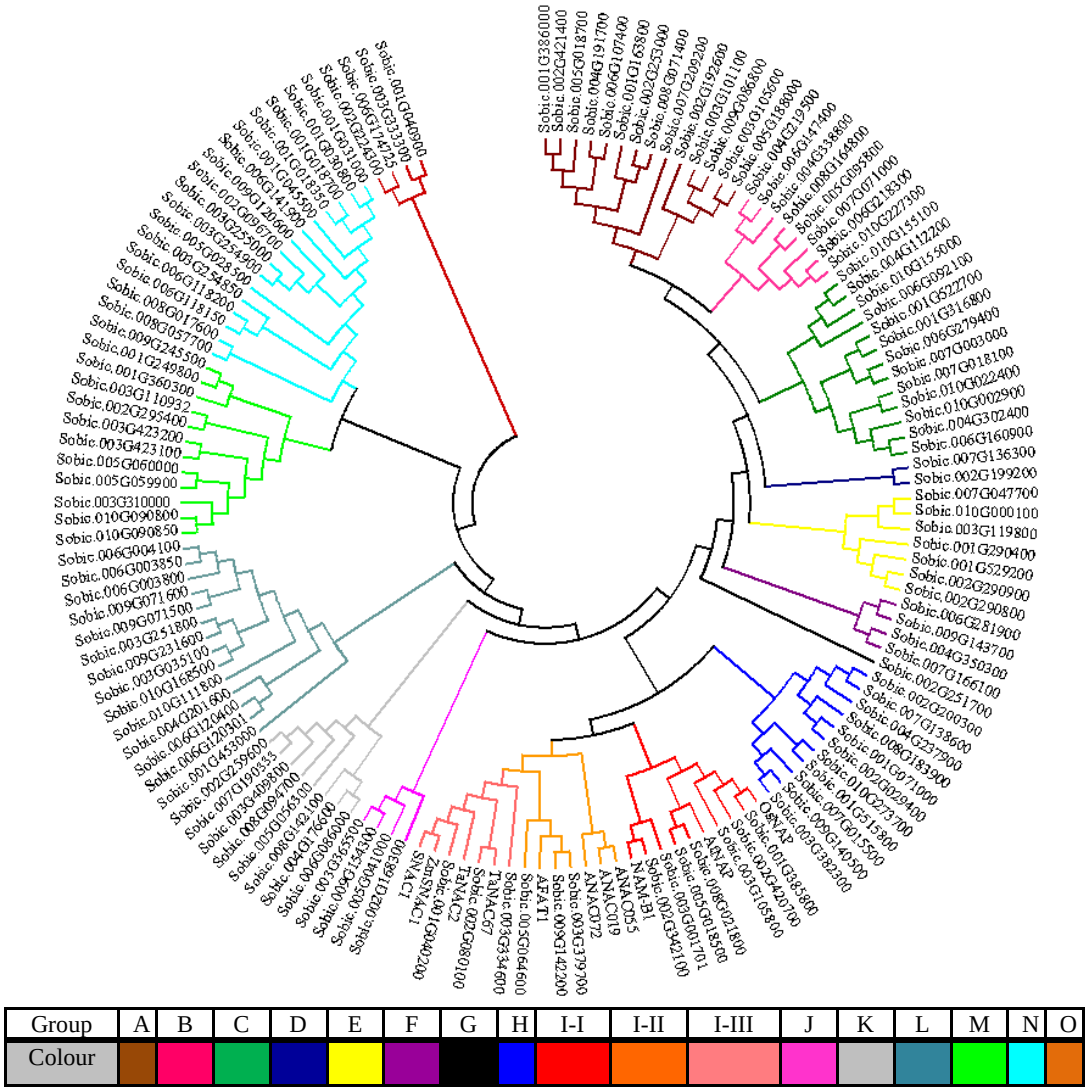
اعضای خانواده ژنی NAC در سورگوم

تعداد ۱۴۱، ۱۷۷، ۱۶۵، ۱۲۳ و ۱۲۰ رونوشت پروتئینی به‌ترتیب از پایگاه‌های اطلاعاتی TFDB، MOROKOSH، Phytozome، Grass و با استفاده از مدل مخفی مارکوف جمع آوری و سپس توالی‌های تکراری حذف شدند. در نهایت، تعداد ۱۸۳ توالی پروتئینی حاصل از ۱۳۱ مکان ژنی NAC در سورگوم شناسایی شد. توالی رونوشت‌های پروتئینی به جزء رونوشت‌های Sobic.002G224300.2 و Sobic.009G142200.3 دارای دمین NAC بودند و همچنین دو دمین NAC برای Sobic.006G141900.1 توسط پایگاه اطلاعاتی SMART شناسایی شد.

گروه‌بندی خانواده ژنی NAC بر اساس روابط خویشاوندی

به‌منظور شناسایی اعضا خانواده ژنی *NAC* دخیل در تحمل به تنش خشکی در سورگوم، درخت روابط خویشاوندی بر پایه دمین NAC خانواده ژنی NAC سورگوم به‌همراه پنج، دو، سه و یک عضو یک عضو SNAC و یا دخیل در پیری برگ که به ترتیب در آرابیدوپسیس، برنج، گندم و ذرت شناسایی شده بودند، ترسیم شد. درخت فیلوژنی، عوامل رونویسی NAC سورگوم را به پانزده زیرخانواده طبقه‌بندی نمود که گروه N و گروه G به ترتیب بیشترین (۱۶) و کمترین عضو (۱) را به خود اختصاص داد (شکل ۱). به‌طور خلاصه، عوامل رونویسی NAC در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های محیطی فعالیت دارند. ژن‌ها با روابط خویشاوندی نزدیک، عموماً عملکردهای مشابهی نشان می‌دهند. آنالیز فیلوژنتیک، می‌تواند برای پیش‌بینی عملکرد ژن‌ها مورد استفاده قرار بگیرد و یک روش موثر برای پیش‌بینی ژن‌های عملکردی مرتبط با تنش محسوب می‌شود (Wang *et al.*, 2016). بر اساس مطالعات قبلی بررسی روابط فیلوژنی، اکثر NACهای پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گروه SNAC قرار می‌گیرند (Fang *et al.*, 2008). هدف از این مطالعه، شناسایی اعضا NAC پاسخ‌دهنده به تنش خشکی است. درخت فیلوژنتیکی سورگورم نشان داد که ژن‌های شناخته شده در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و یا پیری در سایر گیاهان به همراه ۱۳ عضو از خانواده ژنی سورگوم (ده درصد از تمامی NACهای سورگوم) در یک گروه قرار می‌گیرند. در نتیجه، این گروه نیز مانند مطالعات پیشین، گروه SNAC (گروه I) در سورگوم نام‌گذاری شد و پیش‌بینی می‌شود که در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی دخیل باشند. بر اساس جایگاه کروموزومی، ژن‌های *NAC* سورگوم به‌ترتیب از *SbNAC001* تا *SbNAC0131* نام‌گذاری شدند. گروه SNAC را می‌توان به سه زیرگروه I-(NAP) I، I-II (ATAF) و I-III (OsNAC3) به ترتیب بر اساس حضور ژن‌های *AtNAP*، *AFAT1* و SNAC1 طبقه‌بندی نمود.

1. Quantitative Polymerase Chain Reaction
2. Serine/threonine-Protein Phosphatase 2A



شکل ۱. درخت فیلوژنی خانواده ژنی NAC سورگوم (۱۳۱ عضو) و ۱۱ پروتئین NAC شناخته شده در گندم، آرابیدوپسیس، برنج و ذرت بر پایه دمین حفاظت شده NAC با استفاده از نرم‌افزار Mega 7

آنالیز راه‌انداز ژن‌های گروه SNAC

بخش اعظم تنظیم ژن‌های گیاهی در ۱۰۰۰ جفت باز بالاتر از منطقه شروع رونویسی ژن‌ها قرار دارد که عموماً به ناحیه راه‌انداز ژن معروف می‌باشد. منطقه راه‌انداز شامل توالی‌های DNA خاص و عناصری هستند که توسط عوامل پروتئینی به‌کار گرفته می‌شوند و رونویسی منطقه کدشونده پروتئینی یک ژن را تسهیل می‌نماید. این عناصر تنظیمی که با ناحیه کدشونده پروتئین در یک رشته قرار می‌گیرند، عوامل همسو[1] و یا ناحیه اتصال به عوامل رونویسی[2] نامیده می‌شوند که بیان ژن را از لحاظ مکانی و زمانی تعیین می‌کنند. اثرمتقابل اختصاصی بین عوامل رونویسی و ناحیه اتصال آن‌ها ، نقش مهمی را در تنظیم فرآیندهای مختلف زیستی مانند رشد و نمو، تقسیم سلولی و پاسخ به محرک‌های محیطی ایفا می‌کنند (Ibraheem *et al.*, 2010). بنابراین شناسایی توالی‌های تنظیمی می‌تواند گامی موثر در

1. Cis-acting regulatory elements
2. Transcription Factor Binding sites (TFBs)

درک بیان ژن‌ها و تنظیم آن‌ها باشد. بدین‌منظور، برای پیش‌بینی عناصر همسوی پاسخ‌دهنده به تنش، توالی‌های ناحیه راه‌انداز (۱۰۰۰ جفت باز بالادست cDNA و 5'UTR) ژن‌های *SbSNAC* در پایگاه Plant care مورد جستجو قرار گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده، در مجموع ۹ نوع از عناصر پاسخ‌دهنده به تنش شامل MBS[1] (ناحیه اتصال MYB القاء شونده توسط خشکی)، DRE[2] (عناصر پاسخ‌دهنده به دهیدراسیون)، LTR[3] (عناصر پاسخ‌دهنده به دمای پایین)، HSE[4] (عناصر شوک حرارتی)، TC-rich repeats (عناصر دفاعی و پاسخ‌دهنده به تنش)، CCAAT (جایگاه اتصال به MYBHv1)، ARE[5] (عناصر تنظیمی ضروری برای القای anaerobic) و عناصر پاسخ‌دهنده به تنش بی‌هوازی نظیر GC-motif و CGT-motif پیش‌بینی شد. همچنین، عناصر پاسخ‌دهنده به هورمون‌ها نظیر ABA، جیبرلین، اکسین، متیل‌جاسمونات و سالسیلیک‌اسید در این توالی‌ها نیز، مشاهده شد (جدول ۲). عناصر پاسخ‌دهنده به متیل‌جاسمونات، ABA، کمبود اکسیژن، تنش خشکی و تنش دمایی به‌ترتیب ۳۳، ۲۴/۷، ۱۰، ۹/۲ و ۶/۷ درصد از کل جایگاه‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌ها و هورمون‌ها (۲۳۹ جایگاه) را به‌خود اختصاص دادند. جایگاه های پاسخ‌دهنده به تنش و هورمون در این اعضا، بین ۸ تا ۲۸ عدد متغییر بود و همچنین، همه اعضا این خانواده دارای جایگاه پاسخ‌دهنده به ABA، MeJA بودند. بیشترین جایگاه پاسخ‌دهنده به MBS و MeJA با فراوانی ۵ و ۱۰ متعلق به *SbNAC052* بود و دو عضو *SbNAC066* و *SbNAC104* بیشترین جایگاه پاسخ‌دهنده به ABA (۹ عدد) را دارا بودند (شکل ۴). در تنش خشکی، عوامل رونویسی NAC، در مسیر انتقال پیام وابسته و مستقل از ABA، نقش دارند. به نظر می‌رسد که عوامل رونویسی گروه SNAC پاسخ‌دهنده به JA نیز، هم در پاسخ به تنش زیستی و هم غیرزیستی نقش دارند.

سنجش محتوای نسبی آب برگ

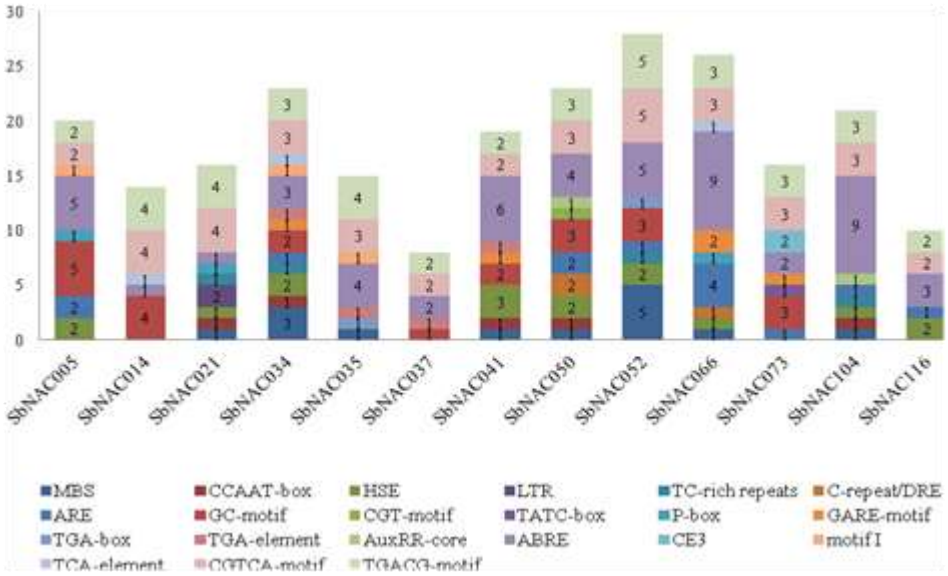
محتوای نسبی آب برگ میزان کمبود آب را نشان می‌دهند و به‌عنوان یک شاخص برای نشان دادن شدت تنش خشکی لحاظ می‌شود (Pask *et al*., 2012). کاهش محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش خشکی، در اکثر مطالعات گزارش شده است (Sairam *et al*., 2002; Reddy *et al*., 2003; Eppel *et al*., 2013). از این‌رو، ژنوتیپ‌هایی با محتوای نسبی آب برگ بالاتر با نگهداری فشار ترگر در برگ‌ها در شرایط تنش خشکی موجب می‌شوندکه فرایندهای مرتبط با ترگر مانند رشد، فعالیت روزنه به منظور حفاظت و نگهداری از فتوسیستم ادامه یابد. در نتیجه، این ژنوتیپ‌ها مطلوب‌تر خواهند بود (Sairam *et al*., 2002; Pask *et al*., 2012).

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار آبی و ژنوتیپ بر محتوای نسبی آب برگ در رقم سپیده و کیمیا، در سطوح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار بود.. میزان محتوای نسبی آب برگ در رقم حساس سپیده و رقم متحمل کیمیا در تیمار تنش خشکی شدید به‌ترتیب ۵۵/۹۱ و ۷۵/۹۰ درصد است (شکل ۴). تیمار تنش خشکی شدید موجب کاهش محتوای آب نسبی برگ نسبت به تیمار کنترل در هر دو رقم شده است اما درصد کاهش محتوای نسبی آب برگ رقم کیمیا و سپیده در تیمار تنش خشکی به نسبت تیمار کنترل به‌ترتیب ۱۱ و ۲۸ درصد است. از این‌رو رقم کیمیا توانسته است درصد محتوای نسبی آب برگ خود را در شرایط تنش شدید (سه هفته پس از قطع آبیاری) به نسبت رقم سپیده بیشتر حفظ کند و بهتر با خشکی مقابله کند.

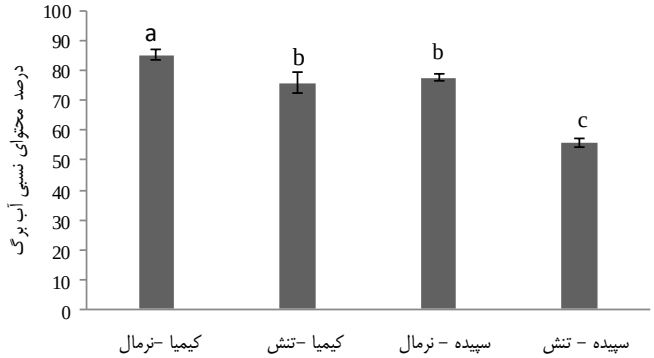
1. MYB Binding Site involved in drought-indelibility
2. Dehydration-Responsive Element
3. Low Temperature-Responsive element
4. Heat Shock Element
5. Antioxidant Responsive Element

جدول ۲. فراوانی و کارکرد عناصر تنظیمی شناسایی شده در راه‌انداز ژن‌های گروه SbSNAC

کارکرد	فراوانی	عنصر تنظیمی	کارکرد	فراوانی	عنصر تنظیمی
عنصر پاسخ به شوک حرارتی	16	HSE	عنصر پاسخ‌دهنده به آبسیزیک اسید	54	ABRE
عنصر پاسخ به دمای پایین	2	LTR	عنصر پاسخ‌دهنده به تنش Anaerobic	13	ARE
عنصر پاسخ به خشکی	14	MBS	ناحیه متصل شونده به MYBHv1	5	CCAAT-box
عنصر پاسخ به آبسیزیک اسید	3	motif IIb	موتیف پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات	39	CGTCA-motif
عنصر پاسخ به سالیسیلیک اسید	3	TCA-element	موتیف پاسخ‌دهنده به جبرلین	5	GARE-motif
عنصر پاسخ‌دهنده به تنش‌ها و دفاعی	4	TC-rich repeats	عنصر درگیر در پاسخ‌دهی ABA و VP1	2	CE3
عنصر پاسخ به اکسین	2	TGA-box	عنصر پاسخ به اکسین	4	TGA-element
عنصر پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات	40	TGACG-motif	عنصر پاسخ‌دهنده به اکسین	2	AuxRR-core
عنصر پاسخ‌دهنده به جبرلین	1	TATC-box	عنصر پاسخ‌دهنده به سرما و پسابیدگی	3	C-repeat/DRE
عنصر پاسخ‌دهنده به کمبود اکسیژن	1	CGT-motif	عنصر پاسخ‌دهنده به کمبود اکسیژن	23	GC-motif
			عنصر پاسخ‌دهنده به جبرلین	3	P-box



شکل ۴. عناصر تنظیمی شناسایی شده در ناحیه راه‌انداز و 5'UTR ژن‌های گروه SbSNAC و فراوانی آن‌ها در هریک از اعضا بر اساس پایگاه PlantCARE

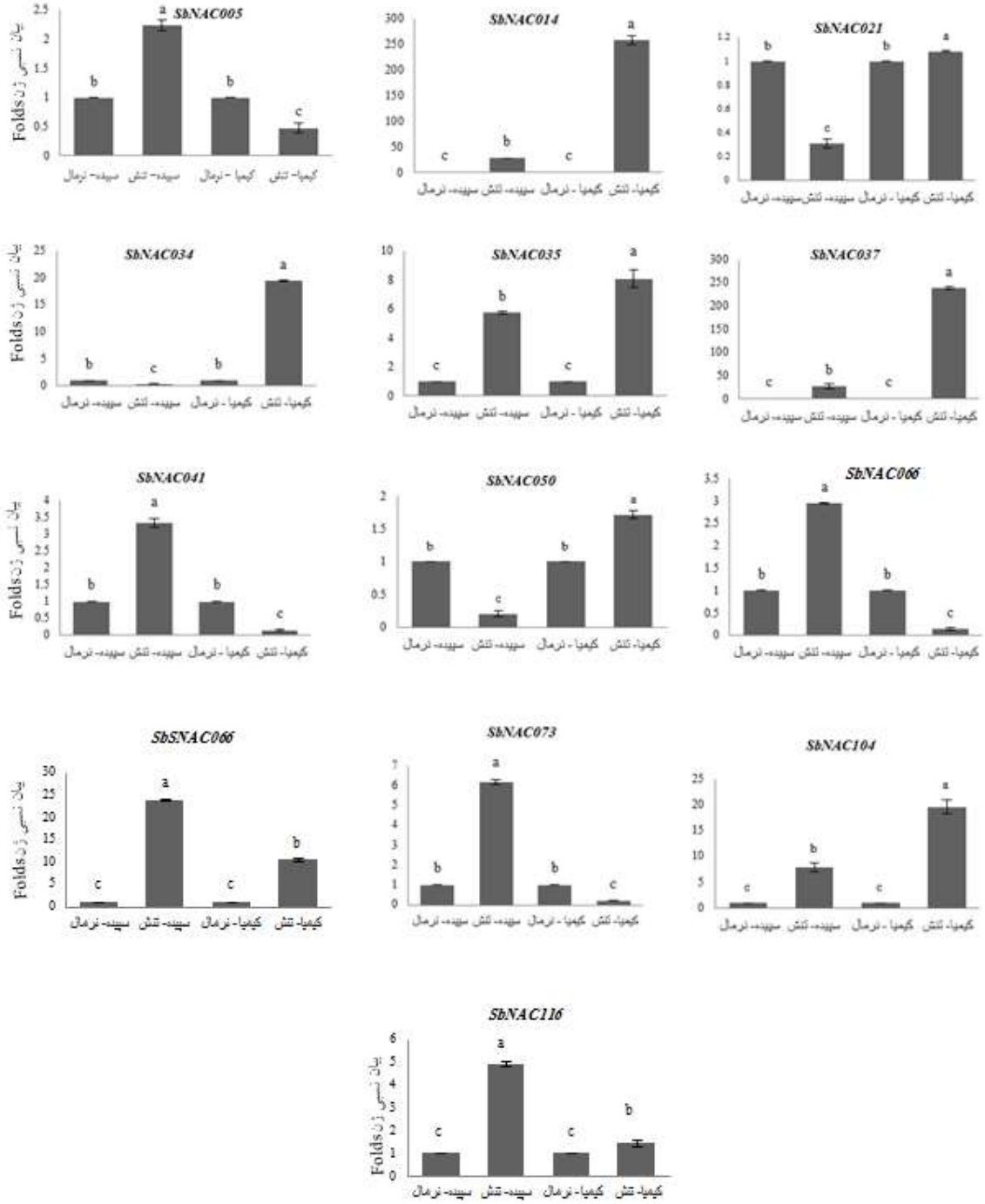


شکل ۵. محتوای نسبی آب برگ ژنوتیپ‌های سورگوم در شرایط کنترل و تنش خشکی شدید
(مقایسه میانگین به روش دانکن و حروف متفاوت باهم اختلاف معنی دار در سطح یک درصد دارند)

بررسی بیان نسبی ژن‌های کاندید خانواده ژنی NAC در سورگوم

گروه I-I (NAP) شامل *AtNAP* آرابیدوپسیس (شماره دستیابی: AJ222713)، *OsNAP* برنج (شماره دستیابی: Os03g0327800)، *NAM-B1* گندم (شماره دستیابی: DQ869673) به همراه ۷ عضو از زیرگروه SNAC سورگوم است. ژن‌های زیرگروه NAP در گیاهان گندم، برنج و آرابیدوپسیس با فرایند پیری مرتبط هستند. ژن *AtNAP*، فرایند پیری را به‌واسطه فعال و یا سرکوب نمودن ژن‌های درگیر در پیری کنترل می‌کند (Ibraheem *et al*., 2010). همولوگ این ژن، *OsNAP* (شماره دستیابی: Os03g0327800) در برنج نیز، فعالیت مشابهی در ارتباط با پیری برگ دارد. بیان مضاعف *OsNAP* در زمان گلدهی برنج، منجر به کاهش از دست دادن آب، تحمل به تنش خشکی و در نهایت بهبود عملکرد در برنج می‌شود. در واقع، *OsNAP*، یک فعال‌کننده رونویسی محسوب می‌شود که با تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده مرتبط با ABA، نقش مهمی را در تحمل به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند (Ibraheem *et al*., 2010). ژن *NAM*-B1 گندم نیز، در فرایند پیری دخیل می‌باشد و همچنین موجب افزایش انتقال مجدد آهن، روی، نیتروژن از برگ‌ها به دانه‌های در حال پر شدن می‌شود. خاموشی این ژن منجر به تاخیر در فرایند پیری، کاهش پروتئین، غلظت آهن و روی در دانه و همچنین، افزایش غلظت نیتروژن باقی مانده، آهن و روی در برگ پرچم شده است (Ricachenevsky *et al*., 2013; Uauy *et al*., 2006)، ژن‌های *SbNAC014*، *SbNAC035*، *SbNAC041* سورگوم در درخت فیلوژنی، به OsNAP برنج پیوسته اند. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، بیان این ژن‌ها در رقم حساس و متحمل تحت تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش بیان نشان دادند اما میزان بیان در رقم متحمل به‌طور قابل توجهی نسبت به رقم حساس افزایش یافت. بنابراین احتمالا این ژن‌ها مانند OsNAP فعال کننده رونویسی باشند که در رقم متحمل با افزایش بیان بیشتر و از طریق تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی وابسته به ABA توانسته اند در رقم کیمیا تحمل به تنش خشکی پس از گلدهی ایجاد نمایند (شکل ۵). *SbNAC066* و *SbNAC104* به *AtNAP* در درخت فیلوژنی پیوسته است و باتوجه به افزایش بیان این ژن‌ها در رقم حساس سپیده تحت تنش خشکی نسبت به شاهد خود، احتمالاً این ژن‌ها موجب تسریع فرایند پیری در رقم حساس شده در حالی‌که در رقم متحمل تحت تنش خشکی نسبت به شاهد خود، کاهش بیان دیده شد و در نتیجه، روند پیری در رقم متحمل نسبت به حساس به تاخیر افتاده است. همچنین، با توجه به پیوستن *SbNAC037* و *SbNAC034* به *NAM*-B1 گندم در درخت فیلوژنی و افزایش بیان آن‌ها در برگ پرچم رقم کیمیا به نسبت رقم حساس سپیده، احتمالا این ژن‌ها در انتقال مجدد مواد غذایی از برگ پرچم به دانه‌های در حال پر شدن درگیر هستند.

زیرگروه I-II (ATAF) شامل ژن‌های ATAF آرابیدوپسیس نظیر *ANAC055* (شماره دستیابی: NM_112418)، *ANAC019* (شماره دستیابی: NM_104167)، *ANAC072* (شماره دستیابی: NM_118875)، *ATAF1* (شماره دستیابی: X74755) به‌همراه سه عضو از گروه SNAC در سورگوم است. گروه ATAF می‌تواند به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی و یا مثبت در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی ایفای نقش نمایند. ATAF1، تنظیم‌کننده منفی مسیر انتقال پیام وابسته به ABA در تنش خشکی است و بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در موتانت‌های *ataf1*، بالا رفته و موجب تحمل به تنش خشکی شده است (Christianson *et al*., 2010; Lu *et al*., 2007).



شکل ۵. بررسی بیان نسبی ژن‌های *NAC* کاندید ایجاد تحمل به تنش خشکی در سورگوم
(حروف متفاوت باهم اختلاف معنی دار در سطح یک درصد دارند)

SbNAC052، *SbNAC073* و *SbNAC116* سورگوم در درخت فیلوژنی به ATAF1 پیوستند و الگوی بیانی ژن‌های *SbNAC052* و *SbNAC073* روند کاهشی در رقم متحمل و افزایشی در رقم حساس را تحت تنش خشکی نشان دادند. همچنین، الگوی بیانی *SbNAC116* در هر دو رقم افزایشی بوده است، اما سطح بیان در رقم حساس سپیده و متحمل کیمیا در شرایط تنش به‌ترتیب ۴/۸ و ۱/۴

برابر سطح بیان آن‌ها در شرایط نرمال آبیاری بود. در نتیجه پیش‌بینی می‌شود این سه ژن مانند ATAF1 در تنش خشکی، تنظیم‌کننده منفی محسوب می‌شوند و از طریق افزایش بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش در کیمیا موجب تحمل به تنش خشکی شده‌اند.

زیرگروه سوم گروه SNAC به‌نام I-III (OsNAC3) شامل SNAC1 برنج (شماره دستیابی: Os03g60080)، *ZmSNAC1* ذرت (شماره دستیابی: JQ217429.1)، *TaNAC02* (شماره دستیابی: AY625683.1) و *TaNAC067* (شماره دستیابی: KF646593.1) گندم به همراه *SbNAC005*، *SbNAC021* و *SbNAC050* سورگوم است. بیان مضاعف ژن‌های *TaNAC067*، *TaNAC02*، *ZmSNAC1* و *SbNAC005* در آرابیدوپسیس موجب تحمل به تنش خشکی از طریق افزایش بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای گیاهان تراریخته شدند. بیان مضاعف SNAC1 در برنج تراریخته موجب افزایش تحمل به تنش شدید خشکی از طریق بسته شدن روزنه‌ها در فاز رویشی و زایشی برنج شده و همچنین گلدهی زود هنگام را در برنج های تراریخته در پی داشت. با توجه به‌این امر که بیان مضاعف *SbNAC005* در مرحله گیاهچه‌ای گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس موجب افزایش تحمل به تنش خشکی شده است و در مطالعه حاضر میزان بیان آن در رقم متحمل کاهش و در رقم حساس، افزایش یافته است. از سوی دیگر، رونوشت‌های *SbNAC021* و *SbNAC050* در کیمیا و سپیده به‌ترتیب افزایش و کاهش بیان جزئی اما معنی‌دار نشان دادند. این امکان وجود دارد که تنظیم بیان در سطح ترجمه و یا فعالیت پروتئین قابل توجه‌تر بوده و یا شاید این زیرگروه در سایر بافت‌های گیاه نقش مهمتری ایفا کنند. با توجه به نتایج بررسی الگوی بیانی ژن‌های گروه SNAC، پیش‌بینی می‌شود زیرگروه‌های NAP و ATAF از جمله ژن‌های کاندید در پاسخ به تنش خشکی پس از گلدهی در سورگوم می‌باشند و پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی‌تر نظیر بررسی بیان ژن‌های کاندید در بافت‌های دیگر نظیر ریشه، ساقه و یا انتقال ژن‌های کاندید به سایر گیاهان زراعی نظیر برنج و یا گیاه آرابیدوپسیس صورت پذیرد.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به‌دلیل فراهم آوردن امکانات مالی و اجرایی پروژه ۹۳۱۲۲-۰۳۰۵- ۰۳-۳، و همچنین از جناب آقای دکتر بهزاد سرخی به‌جهت همکاری صمیمانه در راستای تحقق پروژه، از آقای دکتر عظیم خزایی و مهندس مجتبی جوکار برای همکاری‌شان در کشت مزرعه‌ای، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Casa AM, Mitchell S E, Hamblin MT, Sun H, Bowers J E, Paterson AH, Kresovich S (2005) Diversity and selection in sorghum: Simultaneous analyses using simple sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics. 111(1): 23–30.

Christianson JA, Dennis ES, Llewellyn DJ, Wilson IW (2010) ATAF NAC transcription factors: Regulators of plant stress signaling. Plant Signaling & Behavior. 5(4): 428–432.

Collinge M, Boller T (2001) Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by Phytophthora infestans and to wounding. Plant Molecular Biology. 46(5): 521–529.

Dalal M, Mayandi K, Chinnusamy V (2012) Sorghum: Improvement of Abiotic Stress Tolerance. Improving Crop Resistance to Abiotic Stress 2: 923–950.

Dicko MH, Gruppen H, Traoré AS,

Voragen AGJ, Van Berkel WJ H (2006) Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. African Journal of Biotechnology. 5(5): 384–395.

Eppel A, Keren N, Salomon E, Volis S, Rachmilevitch S (2013) The response of Hordeum spontaneum desert ecotype to drought and excessive light intensity is characterized by induction of O2 dependent photochemical activity and anthocyanin accumulation. Plant Science. 201: 74-80.

Fang Y, You J, Xie K, Xie W, Xiong L (2008) Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. Molecular Genetics and Genomics. 280(6): 547–563.

Finn RD, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Bateman A (2016) The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. Nucleic Acids Research. 44(D1): 279–285.

Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Rokhsar DS (2012) Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. Nucleic Acids Research. 40(D1): 1178–1186.

Harris K, Subudhi PK, Borrell A, Jordan D, Rosenow D, Nguyen H, Mullet J (2007) Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence. Journal of Experimental Botany. 58(2): 327–338.

Hu R, Qi G, Kong Y, Kong D, Gao Q, Zhou G (2010) Comprehensive Analysis of NAC Domain Transcription Factor Gene Family in Populus trichocarpa. BMC Plant Biology. 10(1): 145-149.

Ibraheem O, Botha CEJ, Bradley G (2010) In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5′ regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and Arabidopsis thaliana. Computational Biology and Chemistry. 34(5–6): 268–283.

Jin J, Tian, F, Yang DC, Meng YQ, Kong L, Luo J, Gao G (2017) PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. Nucleic Acids Research. 45(D1): 1040–1045.

Kapanigowda MH, Payne WA, Rooney LW, Mullet JE (2012) Transpiration Ratio in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] for Increased Water-use Efficiency and Drought Tolerance. Journal of Arid Land Studies. 21(2):175–178.

Koyama T (2014) The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence. Frontiers in Plant Science. 5: 1–8.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2006) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief Bioinformatics. 88(4): 559–566.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23(21): 2947–2948.

Lata C, Muthamilarasan M, Prasad M (2015) Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants. Springer-Verlag New York.

Letunic I, Doerks T, Bork P (2015) SMART: Recent updates, new developments and status in 2015. Nucleic Acids Research 43(D1): 257–260.

Lu PL, Chen NZ, An R, Su Z, Qi BS, Ren F, Wang, X. C (2007) A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in Arabidopsis. Plant Molecular Biology. 63 (2): 289–305.

Makita Y, Shimada S, Kawashima M,

Kondou-Kuriyama T, Toyoda T, Matsui M (2015) MOROKOSHI: Transcriptome database in sorghum bicolor. Plant and Cell Physiology. 56 (1): e6.

Magali L, Patrice D, Gert T, Kathleen M, Yves M, Yves V, Pierre R, Stephane R (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Research. 30 (1):325-327.

Nakashima, K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms. 1819 (2): 97–103.

Pask, AJD, Pietragalla J, Mullan DM, Reynolds MP (2012) Physiological breeding II: a field guide to wheat phenotyping. CIMMYT.

Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Rokhsar DS (2009) The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. Nature, 457(7229): 551–556.

Patil JV, Rakshit S, Khot K B (2013) Genetics of post-flowering drought tolerance traits in post-rainy sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. 73 (1): 44–50.

Reddy TY, Reddy VR, Anbumozhi V (2003) Physiological responses of groundnut (Arachis hypogea L.) to drought stress and its amelioration: a critical review. Plant growth regulation. 41 (1): 75-88.

Ricachenevsky FK, Menguer PK, Sperotto RA (2013) kNACking on heaven's door: how important are NAC transcription factors for leaf senescence and Fe/Zn remobilization to seeds? Frontiers in Plant Science, 4: 1–7.

Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L ZC, Jiang L, Yu G (2000). Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. Science. 290 (5499): 2105–2110.

Rosegrant MW (2003) Global Food Security: Challenges and Policies. Science. 302(5652): 1917–1919.

Sabadin PK, Malosetti M, Boer MP, Tardin FD, Santos FG, Guimarães CT, Magalhaes JV (2012) Studying the genetic basis of drought tolerance in sorghum by managed stress trials and adjustments for phenological and plant height differences. Theoretical and Applied Genetics. 124 (8): 1389–1402.

Sairam RK, Srivastava GC (2002) Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Science. 162 (6): 897-904.

Shen H, Yin Y, Chen F, Xu Y, Dixon RA (2009) A bioinformatic analysis of NAC genes for plant cell wall development in relation to lignocellulosic bioenergy production. Bioenergy Research. 2(4): 217–232.

Singh A, Sharma V, Pal A (2013) Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (Solanum tuberosum L.). Dna (May): 403–423

Song SY, Chen Y, Chen J, Dai XY, Zhang WH (2011) Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. Planta. 234 (2): 331–345.

Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Duarte GL, Boff T, Lopes KL, Sperb ER, Fett JP (2009) Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. Planta. 230 (5): 985–1002.

Sudhakar Reddy P, Srinivas Reddy D, Sivasakthi K, Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Sharma KK (2016) Evaluation of Sorghum [Sorghum bicolor (L.)] Reference Genes in

Various Tissues and under Abiotic Stress Conditions for Quantitative Real-Time PCR Data Normalization. Frontiers in Plant Science. 7: 1–14.

Sun L, Huang L, Hong Y, Zhang H, Song F, Li D (2015) Comprehensive analysis suggests overlapping expression of rice onac transcription factors in abiotic and biotic stress responses. International Journal of Molecular Sciences. 16(2): 4306–4326.

Thomas H, Howarth C J (2000) Five ways to stay green. Journal of Experimental Botany. 51: 329–337.

Tran LSP, Nishiyama R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2010) Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. GM Crops. 1(1): 32–39.

Tuteja N (2010) Cold, Salinity, and Drought Stress. Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology. 444: 137–159.

Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J (2006) A NAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat. Science. 314(5803): 1298–1301.

Wang N, Zheng Y, Xin H, Fang L, Li S (2013) Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in Vitis vinifera. Plant Cell Reports. 32 (1): 61–75.

Wang YX, Liu ZW, Wu Z J, Li H, Zhuang J (2016) Transcriptome-wide identification and expression analysis of the NAC gene family in tea plant [camellia sinensis (L.) O. Kuntze]. PLoS ONE. 11(11): 1–26.

Wojciech R (2010) Primer analysis software OLIGO Version 7, *402*, 209. Methods in Molecular Biology. 402: 35-59.

Wu XY, Hu WJ, Luo H, Xia Y, Zhao Y, Wang LD, Jing HC (2016) Transcriptome profiling of developmental leaf senescence in sorghum (Sorghum bicolor). Plant Molecular Biology. 92 (4–5): 555–580.

Yi-Hong W, Aniruddha A, Millie B, Robert RK, Patricia EK, Karl HH (2013) Mapping and candidate genes associated with saccharification yield in sorghum. Canadian Journal of Genetics and Cytology. 56 (11): 659-665.

Yilmaz A, Nishiyama MY, Fuentes BG, Souza GM, Janies D, Gray J, Grotewold E (2009) GRASSIUS: a platform for comparative regulatory genomics across the grasses. Plant Physiology. 149 (1): 171–80.