

## تأثیر تنش کم آبی بر پاسخ بیانی ژن‌های *GmNAC* و *MtNAC*، *MfNAC* گیاهچه‌های عدس (*Lens culinaris* M.)

### The effect of water stress on expression of *MfNAC*, *MtNAC* and *GmNAC* genes in lentil (*Lens culinaris* M.)

زهرا همت پورورنمد<sup>۱</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۲\*</sup>، سید محسن سهرابی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد،

ایران

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳- دانش‌آموخته دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

Hematpour Varnamad Z<sup>1</sup>, Ismaili A<sup>\*2</sup>, Sohrabi SM<sup>3</sup>

1. MSc Student, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2. Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

3. PhD, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۳)

## چکیده

ایران با بارندگی ۲۴۰ میلی‌متر در سال، جزء مناطق خشک و نیمه خشک جهان می‌باشد. عدس (*Lens culinaris* M.) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بقولات در سرتاسر جهان شناخته شده‌است. در این تحقیق، سطوح تنش کم‌آبی شامل آبیاری تا ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به مدت ۷ روز روی گیاهچه‌های عدس و در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه اعمال شد. پس از اعمال تنش، اندام هوایی و ریشه گیاهان برداشت و بیان ژن‌های *NAC* با روش qRT-PCR بررسی شد. آنالیز بیان در سه تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی صورت گرفت. مقایسه میانگین با آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری برای هر سه ژن در اندام هوایی نشان داد. در اندام ریشه ژن *GmNAC* در هر دو تیمار تنش معنی‌دار شد اما برای ژن‌های *MtNAC* و *MfNAC* فقط در تیمار تنش ۲۵٪ با شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. ژن *MfNAC* در اندام‌های هوایی و ریشه افزایش بیان داشت ولی میزان بیان اندام هوایی بیشتر از اندام ریشه بود. در اندام ریشه فقط افزایش بیان در تیمار ۲۵ درصد با شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود. در اندام هوایی ژن *MtNAC* هر دو تیمار تنش به یک نسبت افزایش بیان داشتند و در اندام ریشه فقط تیمار ۲۵ درصد با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود و افزایش بیان در اندام ریشه به نسبت اندام هوایی کمتر بود. برای ژن *GmNAC* در اندام هوایی افزایش بیان تیمار ۵۰ درصد تقریباً بیشتر از دو برابر تیمار ۲۵ درصد بود ولی افزایش بیان اندام ریشه برای هر دو تیمار تنش به یک اندازه بود. در مجموع به‌نظر می‌رسد ژن‌های *MtNAC* و *MfNAC* در اندام هوایی دارای اهمیت بیشتری باشند. این تحقیق اولین گزارش بررسی بیان ژن‌های *MfNAC*، *MtNAC* و *GmNAC* در گیاه عدس تحت تنش کم‌آبی می‌باشد.

## واژه‌های کلیدی

تنش کم‌آبی

ژن *NAC*

عدس

qRT-PCR

## مقدمه

گیاهان اغلب تحت تأثیر شرایط نامساعد محیطی همچون خشکی، شوری، سرما، دمای بالا و شدت نور زیاد قرار دارند. هر یک از این شرایط می‌توانند رشد و عملکرد گیاهان را محدود کرده و یا منجر به مرگ گیاه شوند (Xiong et al. 2002). براساس مطالعات انجام شده، بین عوامل مختلف تنش‌زا، خشکی به تنهایی عامل ۵۰٪ کاهش در عملکرد بوده است (Kumar et al. 2013; Morgil et al. 2019). از نقطه نظر کشاورزی، خشکی دوره‌ای با میانگین بارش پایین است و اغلب باعث کاهش تولید و رشد محصول می‌شود (Rollins et al. 2013). خشکسالی یکی از مهم‌ترین تهدیدات برای گیاهان است، زیرا کمبود آب بر تمامی سطوح مولکولی، سلولی و اندامی و همچنین کل گیاه اثر می‌گذارد (Li et al. 2015; Muscolo et al. 2014).

تنش‌های غیرزیستی از طریق ایجاد تغییراتی در مسیر متابولیسم کربوهیدرات‌ها بر افزایش یا کاهش سطح بیان ژن‌های مربوطه اثرگذار هستند (Gupta and Kaur 2005). گیاهان از طریق فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین سلولی و مولکولی به این تنش‌ها پاسخ داده و خود را با شرایط محیطی منطبق و یا متحمل می‌سازند (Thomashow 1999; Bray 2000; Shinozaki et al. 2003; Gehan et al. 2015).

عدس (*Lens culinaris Medic*) گیاهی است دیپلوئید، یک‌ساله با شاخ و برگ زیاد و انشعابات فراوان ساقه که به‌صورت بوته‌ای رشد می‌کند (Oweis et al. 2004). این گیاه یکی از مهم‌ترین حبوبات بوده و در بسیاری از نقاط جهان کاشت می‌شود و نقش بسزایی در تغذیه و سلامت انسان، حیوانات و خاک دارد، به طوری که دانه‌های آن سرشار از منابع پروتئینی، مواد مغذی (پتاسیم، فسفر، آهن و روی)، ویتامین‌ها و همچنین اسیدآمین‌های لوسین و تریپتوفان برای تغذیه انسان می‌باشند. در کشورهای درحال توسعه، تقریباً یک چهارم نیاز پروتئینی توسط حبوبات تأمین می‌شود و عدس با دارا بودن حدود ۲۸ درصد پروتئین نقش مهمی را در تغذیه مردم این نواحی ایفا می‌کند (Singh and Saxena 1993). این گیاه انواع خاک‌ها از جمله خاک‌هایی با حاصل‌خیزی کم را تحمل می‌کند. عوامل محدودکننده رشد باعث عدم جوانه‌زنی، توسعه آهسته برگ، ماده خشک خیلی کم،

شاخص برداشت پایین و قرارگرفتن در معرض تنش‌های زنده و غیرزنده در این گیاه می‌شود. مهم‌ترین فاکتور غیرزنده تهدیدکننده عدس تنش رطوبتی و دمایی است (Bhatty 1988; Erskine 2009).

گیاهان نمی‌توانند در شرایط محیطی خود از شرایط غیرمعارف دور شوند و باید تمام اثرات تنش‌های زنده و غیرزنده را که با آن مواجه هستند تحمل کنند. برای جلوگیری از انقراض گونه‌ها، گیاهان شبکه‌ای از سیستم‌های قوی و متصل به هم را برای درک سریع سیگنال، واکنش و سازگاری با شرایط محیطی ایجاد کرده‌اند (Smékalová et al. 2014). در این سیستم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، گیاهان از تعدادی از هورمون‌ها، فرستنده‌های ثانویه و آنزیم‌هایی جهت فعال‌سازی بسیاری از ژن‌های القاکننده تحمل به تنش استفاده می‌کنند. خانواده‌های فاکتورهای رونویسی از جمله ژن‌های تحمل به تنش‌های متعدد به‌شمار می‌آیند. فاکتورهای رونویسی (TFs) تنظیم‌کننده‌های محوری هستند که در پاسخ به تنش‌های غیرزنده مثل خشکی، شوری و سرما دخیل هستند (Fang et al. 2015; Zhang et al. 2016; Hong et al. 2016; Jin et al. 2016; He et al. 2016). فاکتورهای رونویسی به عناصر تنظیمی cis-acting خاص روی DNA متصل می‌شوند (CAREs)، که تعیین‌کننده آغاز رونویسی و یکی از مهم‌ترین ساختارهای ژنی هستند (Rombauts et al. 2003). پاسخ به تنش‌های گیاهی توسط سیستم‌های تنظیم ژن‌های پیچیده تنظیم می‌شوند که در آن عوامل رونویسی نقش مهمی در پاسخ به تنش از طریق تنظیم ژن‌های هدف آن‌ها بوسیله اتصال خاص به عناصر cis-acting در پروموتورها دارند (Liu et al. 1998; Uno et al. 2004; Tran et al. 2000). عوامل رونویسی (TFs) و عناصر cis در ناحیه پروموتور ژن‌های مرتبط با تنش‌های مختلف عمل می‌کنند و بیان بیش از حد و یا سرکوب این ژن‌ها ممکن است تحمل گیاه به هر دو نوع تنش را بهبود بخشد (Souer et al. 1996; Aida et al. 1997). خانواده فاکتورهای رونویسی NAC، NAM، ATAF1/ATAF2، CUC2 یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های فاکتور رونویسی گیاهان می‌باشد (Riechmann et al. 2000). پروتئین‌های این خانواده دارای یک دامنه متصل به DNA بسیار

<sup>1</sup> Transcription factors

بررسی میزان بیان ژن‌های *MfNAC*، *MtNAC* و *GmNAC* در مراحل رویشی گیاهچه‌های عدس تحت شرایط تنش کم آبی با استفاده از روش Real-Time PCR مهم‌ترین هدف این تحقیق می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

بذور عدس رقم گچساران؛ در گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوطی از خاک مزرعه، ماسه و کود حیوانی با نسبت ۲:۲:۱ (به ترتیب) در عمق ۲ سانتی‌متری کاشته و در محیط گلخانه نگهداری شدند. هر گلدان حاوی ۶ گیاه (به عنوان یک تکرار) بود. به مدت سه هفته، بر روی گلدان‌ها آبیاری معمولی انجام شد و برای تأمین عناصر و مواد غذایی ریزمغذی از ۳۰ لیتر محلول ۵۰ درصد هوگلند طی سه هفته آبیاری معمولی استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی، با سه تیمار و سه تکرار اجرا شد. اعمال تیمار تنش بر اساس روش ظرفیت زراعی ( $FC^1$ ) مزرعه انجام شد (Veihmeyer et al. 1931). با توجه گزارش‌های قبلی (Panahyan-e-Kivi et al. 2009; FAO 2016) در خصوص نقاط بحرانی دسترسی به آب در گیاه عدس رقم گچساران به عنوان رقم متحمل به کم آبی (Sabaghpour et al. 2007)، سطوح تنش رطوبتی متوسط (۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) و شدید (۲۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) مشخص شد. بر این اساس در این تحقیق تیمارهای آبیاری شامل: T1 (شرایط آبیاری معمولی)، T2 (شرایط رطوبتی ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) و T3 (شرایط رطوبتی ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) بودند. تیمار تنش بر روی گیاهچه‌های ۲۱ روزه اعمال و به مدت یک هفته ادامه یافت. به منظور حفظ شرایط تنش، گلدان‌ها روزانه وزن شدند و با توجه به نوع تنش مقدار آب مورد نیاز به گلدان‌ها اضافه شد.

بعد از اعمال تیمار تنش خشکی، در کلیه تیمارها اندام‌های هوایی و ریشه به صورت جداگانه و هم‌زمان در مرحله رشد رویشی (در انتهای دوره تنش) برداشت و بعد از پودر شدن با استفاده از ازن مایع درون ویال‌های پلاستیکی استریل ریخته و در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج

محافظت‌شده به نام دامنه NAC در ناحیه N-terminal هستند. در مقابل، ناحیه C-terminal پروتئین NAC، معمولاً حاوی دامنه فعال‌سازی رونویسی، در هر دو طول و توالی بسیار متنوع بوده و در فعال‌سازی رونویسی یا سرکوب فعالیت دخیل است (Olsen et al. 2005; Nuruzzaman et al. 2013; Cenci et al. 2014). سطوح بیان ژن‌های NAC در بافت‌های مختلف گیاهی در حضور محرک‌های مختلف متفاوت است. این مورد نشان دهنده نقش مهم و متنوع این عوامل در رشد، تکامل و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده می‌باشد (Fujita et al. 2004; Wang et al. 2009; Hu et al. 2010; Zhu et al. 2013). در گندم، بیان ژن *TaNAC67* بوسیله ABA و نیز تنش خشکی و شوری تغییر پیدا کرده است که نشان دهنده نقش احتمالی و مهم این ژن در پاسخ به تنش غیرزنده در مسیر انتقال پیام ABA است (Mao et al. 2014). افزایش بیان ژن‌های *TaNAC2*، *TaNAC2a* و *TaNAC69* در گندم به طور قابل توجهی تحمل به تنش غیرزنده را در گیاهان تراریخته بهبود داد (Xue et al. 2006; Xue et al. 2011; Mao et al. 2014). در برنج تراریخته، ژن‌های *OsNAC26*، *Os01g66120* و *OsNAC10*، *Os11g03300* باعث افزایش تحمل به تنش‌های خشکی و شوری شدند (Nakashima et al. 2009; Jeong et al. 2010). افزایش بیان ژن‌های *CarNAC3*، *CarNAC6* و *CarNAC4* در نخود به طور قابل توجهی تحمل به شوری و خشکی را در گیاهان تراریخته افزایش داد (Movahedi et al. 2015; Yu et al. 2016). در *Arabidopsis*، سه عضو NAC، *ANAC019*، *ANAC055* و *ANAC072* که دارای قابلیت اتصال به منطقه پروموتور ژن *ERD1* هستند برای افزایش تحمل به تنش خشکی شناسایی شده‌اند (Tran et al. 2004). گیاهان برنج تراریخته با ژن *ONAC045*، افزایش تحمل به تیمار خشکی و شوری را نشان دادند (Zheng et al. 2009). در یک مطالعه روی ۳۱ ژن NAC کامل سویا، مشخص شد که ۹ مورد از این ژن‌ها بوسیله خشکی القاء می‌شوند (Tran et al. 2009). اگرچه کارکرد تعداد زیادی از فاکتورهای رونویسی NAC در آریدوپسیس، گندم، برنج و دیگر گیاهان مشخص شده‌اند، اما عملکرد اکثر اعضای NAC در حبوبات ناشناخته است.

<sup>1</sup> Field Capacity

طراحی آغازگر از نرم‌افزار AlleleID 7.0 استفاده شد. در نهایت برای ارزیابی اختصاصی بودن، آغازگرهای طراحی شده در نرم‌افزار Primer-BLAST سایت NCBI مورد آزمون قرار گرفتند. لیست آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ نشان داده شده‌است. واکنش Real time PCR در ۴۰ چرخه و حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در دستگاه Rotor-Gene Q شرکت Qiagen صورت گرفت. چرخه دمایی و اجزای واکنش PCR و در جداول ۲ و ۳ آمده است. در این آزمایش به منظور نرمال کردن داده‌ها، از ژن خانگی اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  تغییرات بیان ژن نسبت به نمونه‌های شاهد محاسبه شد (Livak and Schmittgen 2001). تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای Excel، GenEx و SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح معنی‌داری صورت گرفت.

RNA از روش لیتیم کلراید استفاده شد. کیفیت استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز تعیین شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 28S و 18S در روی ژل نشان دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده بود. برای بررسی کمی RNA، از اسپکتروفتومتر استفاده شد. به منظور حصول RNA خالص، RNAهای استخراج شده با استفاده از آنزیم DNase I (Thermo Fisher Scientific USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورد تیمار قرار گرفتند. به منظور سنتز cDNA از کیت TaKaRa طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

برای طراحی آغازگرها، از توالی مربوط به ژن‌های مورد نظر موجود در بانک ژن پایگاه NCBI<sup>1</sup> استفاده شد. برای اطمینان بیشتر از وجود توالی‌های ذخیره شده در ژنوم گیاه عدس، با استفاده از سایت <http://knowpulse.usask.ca/portal/> توالی‌ها با ژنوم عدس BLASTn شدند و نواحی مشترک شناسایی شد. برای

<sup>1</sup> National Center for Biotechnology Information

جدول ۱- لیست آغازگرهای طراحی شده

| نام آغازگر  | توالی                   | دمای ذوب            | اندازه قطعه مورد تکثیر |
|-------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
| Primer name | Sequence(5'-3')         | T <sub>a</sub> (°C) | Amplicon size (bp)     |
| MFNAC (F)   | TTTGACTCCATACCCGAAT     | 60                  | 149                    |
| MFNAC (R)   | TGAACCTCTTCTTCCGTG      |                     |                        |
| MTNAC57 (F) | ATACTACTAACAACCTCTTATGG | 56.3                | 133                    |
| MTNAC57 (R) | TGGTAATCCTTATCGTCAT     |                     |                        |
| GMNAC (F)   | AAGCGAACCTAAGTGGAA      | 60                  | 118                    |
| GMNAC (R)   | CGGCGACATCTGATTATTG     |                     |                        |
| Actin (F)   | CTCCTGCTATGTATGTTGCTA   | 60                  | 150                    |
| Actin (R)   | AGGATTGCATGTGGAAGTG     |                     |                        |

جدول ۲- شرایط دمایی واکنش PCR کمی

| مدت      | دما (درجه سانتی گراد)   | مرحله واکنش        |
|----------|-------------------------|--------------------|
| ۲ دقیقه  | ۹۵                      | واشرشته‌سازی اولیه |
| ۱۵ ثانیه | ۹۵                      | واشرشته‌سازی       |
| ۱۵ ثانیه | T <sub>a</sub> آغازگرها | اتصال              |
| ۱۵ ثانیه | ۷۲                      | گسترش              |
| ۱۰ دقیقه | ۷۰-۹۵                   | ذوب                |

جدول ۳- اجزاء و مقادیر واکنش PCR کمی

| اجزاء واکنش           | مقادیر |
|-----------------------|--------|
| SYBR Premix Ex Taq II | 10 µl  |
| F (10 pm/µl)          | 1 µl   |
| R (10 pm/µl)          | 1 µl   |
| cDNA (1:5)            | 5 µl   |
| Water                 | 3 µl   |

## نتایج

نتایج تجزیه واریانس برای ژن‌های *MfNAC*، *GmNAC* و *MtNAC* در اندام هوایی، وجود اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در سطح یک درصد را نشان داد (جدول ۴). نتایج تجزیه واریانس اندام ریشه برای ژن *MfNAC*، عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای تنش نشان داد. برای ژن *MtNAC* اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین تیمارها مشاهده شد و در ژن *GmNAC* اختلاف بین تیمارها در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۵).

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس بیان ژن اندام‌های هوایی تحت تنش کم آبی

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات        |                         |                      |
|---------------|------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
|               |            | <i>MtNAC</i>          | <i>MfNAC</i>            | <i>GmNAC</i>         |
| تیمار         | ۲          | ۷۴,۸۲۳ <sup>***</sup> | ۱۲۱۹,۵۴۱ <sup>***</sup> | ۴,۷۹۴ <sup>***</sup> |
| خطا           | ۶          | ۲,۹۳۱                 | ۴۰,۴۲۵                  | ۰,۰۶۰                |
| ضریب تغییرات  |            | ۸,۲۷                  | ۱۹,۸                    | ۱۱,۴۴                |

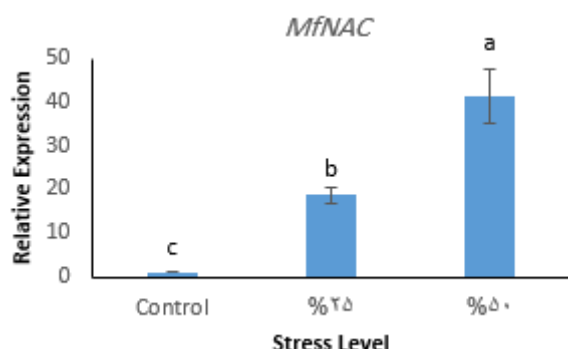
\*\*\*: معنی‌دار در سطح آماری یک درصد.

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس بیان ژن اندام ریشه تحت تنش کم آبی

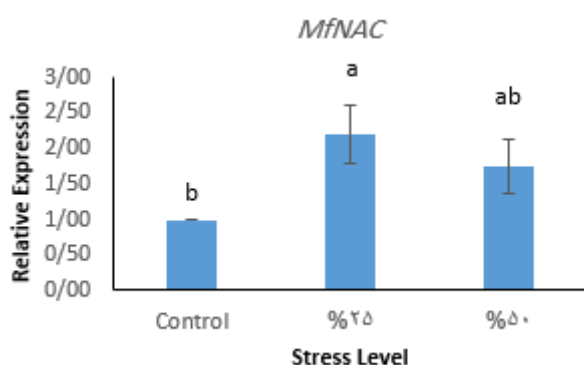
| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات       |                     |              |
|---------------|------------|----------------------|---------------------|--------------|
|               |            | <i>MtNAC</i>         | <i>MfNAC</i>        | <i>GmNAC</i> |
| تیمار         | ۲          | ۵,۸۵۶ <sup>***</sup> | ۱,۱۰۴ <sup>ns</sup> | ۱,۸۰۳*       |
| خطا           | ۶          | ۰,۱۲۱                | ۰,۳۲۴               | ۰,۲۳۴        |
| ضریب تغییرات  |            | ۱۶,۶۶                | ۱۵,۵۷               | ۱۶,۸         |

ns: \* و \*\*: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح آماری ۵ و ۱ درصد.

نتایج مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که، با افزایش سطح تنش بیان ژن *MfNAC* در اندام هوایی به میزان ۱۸/۶ برابر و ۴۱/۲ برابر به ترتیب در تیمار تنش ۲۵٪ و تیمار تنش ۵۰٪ افزایش یافت و این افزایش بیان دارای اختلاف معنی‌داری بود (شکل ۱). نتایج حاصل برای اندام ریشه نشان داد که بین سطح بیان در تیمار تنش ۲۵٪ با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت و میزان بیان در تیمار تنش ۲۵٪، ۲/۲۰ برابر شاهد بود. از طرفی با وجود افزایش در میزان بیان ۱/۷۵ برابری تنش ۵۰٪ نسبت به شاهد، بین سطح بیان تیمار تنش ۵۰٪ با شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲).



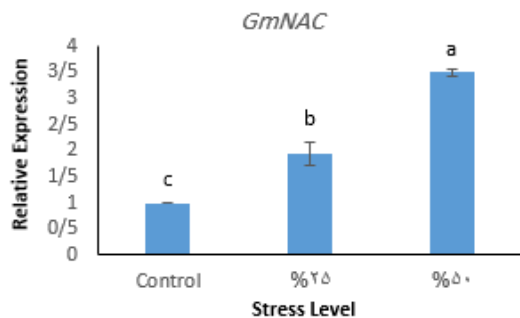
شکل ۱- بیان ژن *MfNAC* در اندام هوایی تحت تنش کم آبی. خطوط روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای معیار میانگین می‌باشد. Control: شاهد، ۲۵٪: سطح تنش شدید و ۵۰٪: سطح تنش ملایم.



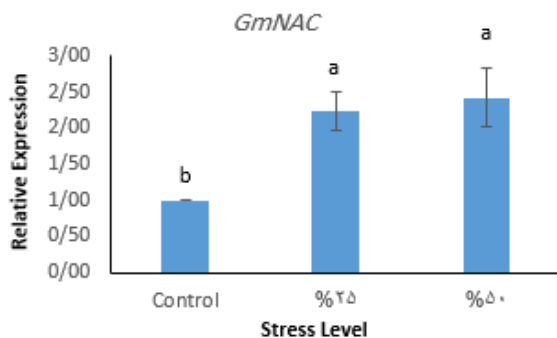
شکل ۲- بیان ژن *MfNAC* در اندام ریشه تحت تنش کم آبی. خطوط روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای معیار میانگین می‌باشد. Control: شاهد، ۲۵٪: سطح تنش شدید و ۵۰٪: سطح تنش ملایم.

نتایج مقایسه میانگین‌ها برای ژن *MtNAC* در اندام هوایی نشان داد که با افزایش تنش، میزان بیان ژن روند یکسانی نداشت و بیان در هر دو سطح تنش به نسبت شاهد افزایش یافت. میزان بیان ژن در تیمار ۲۵٪ و ۵۰٪ به ترتیب به میزان ۹ و ۱۰ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. بین سطوح مختلف تنش ۲۵٪ و ۵۰٪ اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد اما بین سطوح مختلف تنش خشکی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. تیمار تنش ۵۰٪ بیشترین میزان بیان را داشت (شکل ۳). بیان ژن *MtNAC* در اندام ریشه اختلاف معنی‌داری بین تیمار تنش ۲۵٪ با تیمار ۵۰ درصد و شاهد نشان داد. در حالی که میزان بیان ژن در تیمار ۲۵٪ و ۵۰٪ به ترتیب ۳/۵ و ۱/۵ برابر نسبت به

۵۰٪ به ترتیب ۲/۲۴ و ۲/۴۲ برابر شاهد بود. با وجود اینکه میزان بیان ژن *GmNAC* در تنش ۵۰٪ بیشتر از تنش ۲۵٪ بود ولی اختلاف آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود و هر دو تیمار تنش ۲۵٪ و ۵۰٪ تقریباً به یک میزان افزایش بیان داشتند (شکل ۶).



شکل ۵- بیان ژن *GmNAC* در اندام هوایی تحت تنش کم‌آبی. خطوط روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای معیار میانگین می‌باشد. Control: شاهد، ۲۵٪: سطح تنش شدید و ۵۰٪: سطح تنش ملایم.

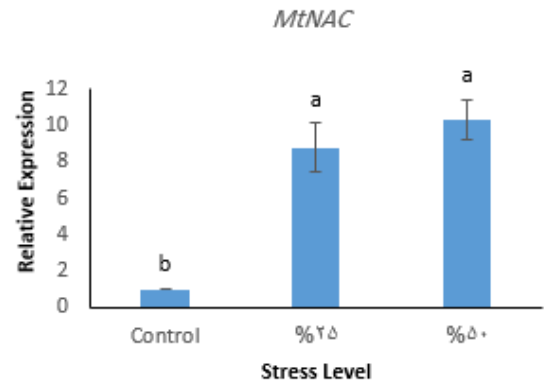


شکل ۶- بیان ژن *GmNAC* در اندام ریشه تحت تنش کم‌آبی. خطوط روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای معیار میانگین می‌باشد. Control: شاهد، ۲۵٪: سطح تنش شدید و ۵۰٪: سطح تنش ملایم.

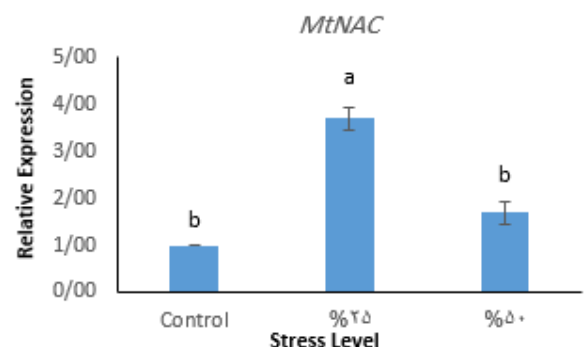
### بحث

برخلاف حیوانات، گیاهان قادر به حرکت برای دوری از تغییرات محیطی نیستند و باید با تنش‌های زنده و غیرزنده‌ی مختلف مانند سرما، گرما، خشکی، شوری و نور زیاد سازگار شوند. این تنش‌ها می‌توانند رفتارهای مولکولی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاهان را تغییر دهند (Gehan et al. 2015). مطالعات گسترده نشان داده است که گیاهان می‌توانند به موقع سیگنال‌های خارجی را درک کنند و شبکه‌های سیگنالینگ پیچیده را به‌طور مؤثر برای پاسخ دادن به تنش زیست محیطی با فعال

شاهد افزایش یافت. با وجود افزایش بیان در تیمار تنش ۵۰٪ نسبت به شاهد، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد. تیمار تنش ۲۵٪ بیشترین میزان بیان را داشت (شکل ۴).



شکل ۳- بیان ژن *MtNAC* در اندام هوایی تحت تنش کم‌آبی. خطوط روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای معیار میانگین می‌باشد. Control: شاهد، ۲۵٪: سطح تنش شدید و ۵۰٪: سطح تنش ملایم.



شکل ۴- بیان ژن *MtNAC* در اندام ریشه تحت تنش کم‌آبی. خطوط روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای معیار میانگین می‌باشد. Control: شاهد، ۲۵٪: سطح تنش شدید و ۵۰٪: سطح تنش ملایم.

نتایج مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که، بیان ژن *GmNAC* در اندام هوایی در هر دو سطح تنش اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد و روندی افزایشی نسبت به شاهد داشت. میزان بیان ژن در تیمار تنش ۲۵٪ و ۵۰٪ به ترتیب ۱/۹۳ و ۳/۵۰ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. بیشترین میزان بیان مربوط به تنش ۵۰٪ بود (شکل ۵). برای اندام ریشه بین سطوح مختلف تیمار تنش ۲۵٪ و ۵۰٪ با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت و میزان بیان ژن در تیمار تنش ۲۵٪ و

کردن فرایندهای مختلف سلولی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیکی آغاز کنند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Mehrotra et al. 2014; Osakabe et al. 2014). فاکتورهای رونویسی (TFs) تنظیم‌کننده‌های محوری هستند که در پاسخ به تنش‌های غیرزنده مثل خشکی، شوری و سرما دخیل هستند (Fang et al. 2015; Zhang et al. 2016; Hong et al. 2016; Jin et al. 2016; He et al. 2016). بسیاری از مطالعات ترانسژنیک به‌وسیله دستکاری ژن فاکتورهای رونویسی *NAC* موفق به ایجاد تحمل به تنش‌های مختلف در گیاهان شده‌اند، اما هنوز مشکلاتی وجود دارد که باید حل شود (Fujita et al. 2004; Nakashima et al. 2007; Liu et al. 2011; Hao et al. 2011). تحقیق حاضر مقایسه روند بیان دو اندام هوایی و ریشه برای ژن *MfNAC* نشان داد که میزان بیان این ژن در اندام هوایی بسیار بیشتر از اندام ریشه بود و در نتیجه نشان‌دهنده نقش کلیدی‌تر و مهم‌تر این ژن در اندام هوایی می‌باشد. همچنین در اندام هوایی تیمار تنش ۵۰٪ بیشترین میزان بیان را نسبت به تیمار ۲۵٪ داشت یعنی با افزایش شدت تنش میزان بیان ژن کاهش یافت. در اندام ریشه بیان ژن در هر دو تیمار نسبت به شاهد افزایش یافت و افزایش بیان در تیمار ۲۵٪ نسبت به شاهد معنی‌دار بود در صورتی که افزایش بیان تیمار تنش ۵۰٪ نسبت به شاهد از نظر آماری معنی‌دار نبود. در اندام ریشه با افزایش شدت تنش میزان بیان نسبت به شاهد و تیمار ۵۰٪ افزایش یافت. نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیقات قبلی همخوانی داشت و نشان داد که *MfNAC3* در پاسخ به تنش شوری، خشکی و سرما دخیل بوده است (Miao et al. 2015). در یک مطالعه بر روی یونجه گل زرد (*Medicago falcata*) افزایش یا کاهش سطح رونویسی ژن *MfNAC3* تحت تنش‌های غیرزیستی مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین سطح بیان *MfNAC3* در تیمار تنش ۱ ساعته در شرایط کم آبی مشاهده شد. بیان *MfNAC3* پس از تیمار ۱ مولار NaCl به مدت ۲ و ۸ ساعت به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. تحت تیمار سرما، سطح رونویسی در تیمار ۱ ساعته به حداکثر رسید و سپس در تیمار ۲۴-۶ ساعت پس از تنش بیشترین افزایش مشاهده شد.

مقایسه روند بیان ژن در دو اندام هوایی و ریشه برای ژن *MtNAC* نشان داد که، میزان بیان این ژن در اندام هوایی بسیار بیشتر از اندام ریشه بود و در نتیجه نشان‌دهنده نقش کلیدی و مهم‌تر این ژن در اندام هوایی می‌باشد. در اندام هوایی هر دو تیمار تنش تقریباً به یک نسبت افزایش بیان داشتند و این افزایش بیان نسبت به شاهد معنی‌دار بود ولی بین دو سطح تنش با یکدیگر از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در اندام هوایی با افزایش شدت تنش میزان بیان با کاهش ناچیزی تقریباً در سطح تنش ۵۰٪ حفظ شد. افزایش بیان در اندام ریشه برای تیمار تنش ۲۵٪ بیشتر از دو برابر تیمار ۵۰٪ بود و احتمالاً نشان‌دهنده نقش کلیدی‌تر این ژن در تنش شدیدتر برای اندام ریشه است. ژن‌های *MtNAC* مسیرهای مختلف سیگنالینگ و پاسخ‌های تنش شرکت می‌کنند. ژن *MtNAC* در عدس در هر دو تنش ۲۵٪ و ۵۰٪ در اندام هوایی و تیمار تنش ۲۵٪ در اندام ریشه بیان بالاتری نسبت به شاهد نشان داد و این نتایج مشابه نتایج به‌دست آمده در ژن *MtNAC* در *Medicago truncatula* بود (Ling et al. 2017). پژوهش Ling et al. (2017)، با استفاده از تکنیک‌های RNA-seq و qRT-PCR بیان ژن‌های مختلف از جمله *MtNAC* را در گیاه *Medicago truncatula* تحت تیمارهای مختلف تنش سرما، انجماد و خشکی بررسی شد. اکثر ژن‌ها منحصراً القاء و ژن‌های جزئی نیز سرکوب شدند. از ۴۴ ژن، ۱۷ ژن تحت تمام تیمارهای تنش بیان بالایی داشتند و یک ژن در تمام تیمارها بیان پایینی داشت. طی تنش سرما، ۶ ژن تغییری واضح نشان ندادند و ۵ ژن سرکوب شدند، در حالی که ۳۳ ژن به‌طور انحصاری القاء شدند. در تیمار تنش انجماد، ۸ ژن سرکوب شد و ۳۶ مورد القاء شدند. در شرایط خشکی، ۶ ژن تغییرات چشم‌گیری نداشتند، ۵ ژن سرکوب شدند و ۳۳ ژن به القاء شدند.

مقایسه روند بیان ژن *GmNAC* در دو اندام هوایی و ریشه، میزان بیان تقریباً مشابهی را نشان داد و در اندام هوایی بیشترین میزان بیان در تیمار ۵۰٪ مشاهده شد و با افزایش شدت تنش میزان بیان ژن در اندام هوایی کاهش یافت. در اندام ریشه با وجود معنی‌دار بودن اختلاف تیمارهای تنش با شاهد، بین تیمارهای تنش با هم اختلافی مشاهده نشد و همچنین افزایش شدت تنش تاثیری بر روند افزایش یا کاهش سطح بیان ژن *GmNAC* نداشت. در یک

که منجر به بیان ژن‌های واکنش‌دهنده به تنش در آرابیدوپسیس می‌شود (Lu et al. 2007).

در مجموع مشخص شد که میانگین تیمارهای تنش سبب افزایش در بیان ژن‌های NAC مورد مطالعه شدند و بیان ژن‌های مورد ارزیابی در اندام هوایی بیشتر تیمار تنش ۵۰٪ و در اندام ریشه تیمار تنش ۲۵٪ متأثر از تنش بودند. در تحقیق حاضر، وقتی ریشه تحت تنش شدیدتر (تنش ۲۵٪) قرار گرفت میزان بیان ژن در اندام ریشه برای تیمار ۲۵٪ بیشتر از ۵۰٪ شد. با این وجود این افزایش بیان فقط در ژن *MtNAC* معنی‌دار بود و در ژن *MfNAC* این افزایش بیان معنی‌دار نبود. افزایش بیان در ژن *GmNAC* برای هر دو تیمار تنش تقریباً به یک اندازه بود و و از نظر آماری معنی‌دار نبودند. نتایج کنونی ما نشان می‌دهد که ژن‌های *GmNAC*، *MtNAC* و *MfNAC* ممکن است نقش مهمی در مسیرهای سیگنالینگ وابسته به ABA در پاسخ به تنش کم‌آبی را با تنظیم بیان ژن پروتئین‌های عملکردی بازی کنند و مستلزم تحقیقات بیشتری است.

نتایج این مطالعه اطلاعات مفیدی در مورد نقش احتمالی ژن‌های *MtNAC*، *MfNAC* و *GmNAC* در پاسخ گیاه عدس به تنش خشکی فراهم می‌نماید. ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق، می‌توانند در جهت بهبود تحمل‌پذیری گیاهان زراعی حساس به تنش خشکی مورد بررسی تحقیقات آزمایشگاهی و مزرعه‌ای بیشتری قرار گیرند و در صورت اثبات نقش تعیین‌کننده‌ی آن‌ها، می‌توان از این ژن‌ها برای بهبود عملکرد محصول در شرایط تنش بهره برد.

### منابع

- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. The Plant Cell 9: 841-857.
- Bhatty R (1988) Composition and quality of lentil (*Lens culinaris* Medik): a review. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal 21: 144-160.
- Bray E A (2000) Responses to abiotic stresses. Biochemistry and molecular biology of plants: 1158-1203.
- Cenci A, Guignon V, Roux N, Rouard M (2014) Genomic analysis of NAC transcription factors in banana (*Musa*

تحقیق، بیان بیش از حد *GmNAC085* منجر به افزایش تحمل به خشکی شد (Le et al. 2011)، در حالی‌که بیان بیش از حد *GmNAC11* منجر به افزایش حساسیت به تنش‌های شوری و مانیتول شد. در مطالعه‌ای دیگر، ژن *GmNAC* به گیاه توتون انتقال داده شد که منجر به کاهش مقاومت گیاه به تنش خشکی، شوری و سرما شد (Hao et al. 2011). در مطالعه‌ای مشابه مشخص شد برگ گیاهان توتون تراریخت با ژن *GmNAC2*، تحت تنش‌های غیرزنده سرما، شوری و خشکی، دارای سطح مالون‌دی‌آلدئید بالاتری در مقایسه با گیاهان شاهد بود (Jin et al. 2012). در یک مطالعه نشان داده شد که ژن‌های NAC سویا در پاسخ به تنش‌های غیرزنده تنظیم می‌شوند. ژن‌های *GmNAC2*، *GmNAC3* و *GmNAC4* به‌شدت با تنش اسمزی، اما احتمالاً از طریق مسیرهای مختلف، القاء می‌شوند. در حالی که *GmNAC3* و *GmNAC4* بوسیله ABA القاء می‌شوند، به‌نظر می‌رسد القاء *GmNAC2* در طول تنش اسمزی از طریق مسیر مستقل از ABA رخ می‌دهد. علاوه بر این، *GmNAC2* و *GmNAC3*، توسط تنش شوری و جیبرلیک اسید القاء می‌شوند (Meng et al. 2007). ژن‌های *GmNAC3* و *GmNAC4* به‌وسیله ABA، خشکی و تنش شوری القاء می‌شوند و به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مثبت در پاسخ به تنش خشکی عمل کرده و سبب افزایش تحمل به خشکی در گیاهان تراریخته می‌شوند (Tran et al. 2004). ژن *GmNAC2* ممکن است به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی در سیگنال‌های تنش نقش داشته باشد، زیرا بیشترین ارتباط را با ژن *ATAF1* (*ANAC2*) دارد

- acuminata*) and definition of NAC orthologous groups for monocots and dicots. Plant molecular Biology 85: 63-80.
- Ersline W, 2009. The lentil: botany, production and uses. CABI.
- Fang Y, Liao K, Du H, Xu Y, Song H, Li X, Xiong L (2015) A stress-responsive NAC transcription factor SNAC3 confers heat and drought tolerance through modulation of reactive oxygen species in rice. Journal of experimental Botany 66: 6803-6817.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran L S P, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) A dehydration-induced NAC protein,

- RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal* 39: 863-876.
- Gehan M A, Greenham K, Mockler T C, McClung C R (2015). Transcriptional networks—crops, clocks, and abiotic stress. *Current Opinion in Plant Biology* 24: 39-46.
- Gupta A K, Kaur N (2005) Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* 30: 761-776.
- FAO; Food and Agricalcural Organization. (2013). Available at: <http://fao.org>. Accessed 1 Feb 2016.
- Sabaghpour, S. H., Sarker, A., Safikhani, M., & Erskine, W. (2007). Registration of 'Gachsaran' Lentil. *Journal of Plant Registrations*, 1:39-39.
- Hao Y J, Wei W, Song Q X, Chen H W, Zhang Y Q, Wang F, Zou H F, Lei G, Tian A G, Zhang W K (2011) Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *The Plant Journal* 6.8:313-302.
- He Q, Jones D C, Li W, Xie F, Ma J, Sun R, Wang Q, Zhu S, Zhang B (2016) Genome-wide identification of R2R3-MYB genes and expression analyses during abiotic stress in *Gossypium raimondii*. *Scientific reports* 6.
- Hong Y, Zhang H, Huang L, Li D, Song F (2016) Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene ONAC022 improves drought and salt tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science* 7.
- 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: 145.
- Jeong J S, Kim Y S, Baek K H, Jung H, Ha S-H, Do Choi Y, Kim M, Reuzeau C, Kim J-K (2010) Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiology* 153: 185-197.
- Jin C, Huang X-S, Li K-Q, Yin H, Li L-T, Yao Z-H, Zhang S-L (2016) Overexpression of a bHLH1 transcription factor of *Pyrus ussuriensis* confers enhanced Cold tolerance and increases expression of stress-responsive genes. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Kumar S, Barpete S, Kumar J, Gupta P, Sarker A (2013) Global lentil production: constraints and strategies. *SATSA Mukhapatra - Annual Technical*. 17: 1-13.
- Le D T, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-S P (2011) Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Research* 18: 263-276.
- Li X, Cai J, Liu F, Dai T, Cao W, Jiang D (2014) Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* 82: 34-43.
- Ling L, Song L, Wang Y, Guo C (2017) Genome-wide analysis and expression patterns of the NAC transcription factor family in *Medicago truncatula*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 23: 343-356.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 10:1391-1406.
- Liu X, Hong L, Li X-Y, Yao Y, Hu B, Li L (2011) Improved drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* overexpressing a NAC transcriptional factor from *Arachis hypogaea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75: 443-450.
- 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: 402-408.
- Mao X, Chen S, Li A, Zhai C, Jing R (2014) Novel NAC transcription factor TaNAC67 confers enhanced multi-abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9: e84359.
- Mehrotra R, Bhalothia P, Bansal P, Basantani M K, Bharti V, Mehrotra S (2014) Absciscic acid and abiotic stress tolerance—Different tiers of regulation. *Journal of Plant Physiology* 171: 486-496.
- 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 and Integrative Genomics*: 1-13.
- Movahedi A, Zhang J, Yin T, Zhuge Q (2015) Functional analysis of two orthologous NAC genes, CarNAC3, and CarNAC6 from *Cicer arietinum*, involved in abiotic stresses in poplar. *Plant Molecular Biology Reporter* 33: 1539-1551.
- Muscolo A, Junker A, Klukas C, Weigelt-Fischer K, Riewe D, Altmann T (2015) Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. *Journal of Experimental Botany* 66: 5467-5480.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* 149: 88-95.
- Nakashima K, Tran L S P, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal* 51: 617-630.
- Nuruzzaman M, Sharoni A M, Kikuchi S (2013) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, Skriver K (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 10: 79-87.
- Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-S P (2014) Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Oweis T, Hachum A, Pala M (2004) Lentil production under supplemental irrigation in a Mediterranean

- environment. *Agricultural Water Management* 68: 251-265.
- Panahyan-e-Kivi M, Ebadi A, Tobeh A, Jamaati-e-Somarin S (2009). Evaluation of yield and yield components of lentil genotypes under drought stress. *Research Journal of Environmental Sciences* 3: 456-460.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C-Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe O, Samaha R (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Rollins J, Habte E, Templer S, Colby T, Schmidt J, Von Korff M (2013) Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 64: 3201-3212.
- Rombauts S, Florquin K, Lescot M, Marchal K, Rouzé P, Van de Peer Y (2003) Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. *Plant Physiology* 132: 1162-1176.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221-227.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current opinion in Plant Biology* 6: 410-417.
- Singh K, Saxena M C, 1993: Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes. Wiley Chichester, UK.
- Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J (2014) Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* 32: 2-11.
- Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R (1996) The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85: 159-170.
- Thomashow M F (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 50: 571-599.
- Tran L-S P, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson S D, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell* 16: 2481-2498.
- Tran L-S P, Quach T N, Guttikonda S K, Aldrich D L, Kumar R, Neelakandan A, Valliyodan B, Nguyen H T (2009) Molecular characterization of stress-inducible GmNAC genes in soybean. *Molecular Genetics and Genomics* 281: 647-664.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 11632-11637.
- Veihmeyer F J, Hendrickson A H (1931) The moisture equivalent as a measure of the field capacity of soil. *Soil Science*, 32: 181-193.
- Wang X e, Basnayake B V S, Zhang H, Li G, Li W, Virk N, Mengiste T, Song F (2009) The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1227-1238.
- Xiong L, Schumaker K S, Zhu J-K (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell* 14: S165-S183.
- Xue G-P, Bower N I, McIntyre C L, Riding G A, Kazan K, Shorter R (2006) TaNAC69 from the NAC superfamily of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognises two consensus DNA-binding sequences. *Functional Plant Biology* 33: 43-57.
- Xue G-P, Way H M, Richardson T, Drenth J, Joyce P A, McIntyre C L (2011) Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. *Molecular Plant* 4: 697-712.
- Yu X, Liu Y, Wang S, Tao Y, Wang Z, Shu Y, Peng H, Mijiti A, Wang Z, Zhang H (2016) CarNAC4, a NAC-type chickpea transcription factor conferring enhanced drought and salt stress tolerances in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* 35: 613-627.
- Zhang L, Zhang L, Xia C, Zhao G, Jia J, Kong X (2016) The novel wheat transcription factor TaNAC47 enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 1174.
- Zheng X, Chen B, Lu G, Han B (2009) Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379: 985-989.
- Zhu M, Chen G, Zhou S, Tu Y, Wang Y, Dong T, Hu Z (2013) A New Tomato NAC (N AM/A TAF1/2/C UC2) Transcription Factor, SINAC4, Functions as a Positive Regulator of Fruit Ripening and Carotenoid Accumulation. *Plant and Cell Physiology* 55: 119-135.