

## شناسایی، طبقه‌بندی و آنالیز بیان بیوانفورماتیکی خانواده ژنی عوامل نسخه‌برداری *NAC* در ژنوم *Hordeum vulgare* cv. Morex

سارا دژستان<sup>۱\*</sup>، مهدی بهنامیان<sup>۲</sup>، سحر فتحی‌اجیرلو<sup>۳</sup>، محمدعلی ابراهیمی<sup>۴</sup>، بنیامین یزدانی<sup>۵</sup>

۱. دانشیار گروه زراعت و اصلاح‌نیات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور، تهران

۴. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران

۵. دانش‌آموخته دکتری ژنتیک مولکولی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۲۸)

### Identification, classification and bioinformatics expression analysis of *NAC* transcription factor gene family in *Hordeum vulgare* cv. Morex genome

Sara Dezhsetan<sup>1\*</sup>, Mahdi Behnamian<sup>2</sup>, Sahar Fathi Ajirlou<sup>3</sup>, Mohammad Ali Ebrahimi<sup>4</sup>, Benjamin Yazdani<sup>5</sup>

1. Associate Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

3. Former M. Sc. student of Biotechnology, Department of Agriculture, Karaj Payam Noor University, Alborz, Iran

4. Associate Professor, Payame Noor University, Tehran, Iran.

5. Former Ph. D. student of Molecular Genetics, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

(Received: Jan. 31, 2018 -Accepted: Jun, 19, 2018)

#### Abstract

*NAC* gene family is one large family of plant-specific transcription factor that plays various roles in plant developmental stages and stress responses. The possibility of bioinformatics studies on *NAC* gene family in barley was provided with completion of the genome sequencing of *Hordeum vulgare* cv. Morex project. In this research using genome scanning, 73 non-redundant *NAC*-encoding genes in total were identified from the genomic sequences of *Hordeum vulgare* cv. Morex. A composite phylogenetic tree was constructed with *HvNAC* protein sequences and a number of known rice and Arabidopsis *NAC* protein sequences and tree was classified into 15 distinct subgroups. It is revealed the uneven distribution of the *HvNAC* genes on barley chromosomes. Most members of *NAC* genes were not located in groups (singletons) and few members of this family were located in groups with two or three genes. Most detected *cis* elements in upstream and downstream of *HvNAC* genes were involved in response to light, response to abiotic stresses and relatively low in response to biotic stresses. *In silico* gene expression analysis revealed that *HvNAC* genes were expressed in a wide range of tissues and is not highly expressed in developmental stages. Also, the *HvNAC* genes partly is expressed in stress conditions, especially in abiotic stresses and relatively less expressed in biotic stresses. This bioinformatics information provide a framework for genomics and functional studies of this gene family in barley.

**Keywords:** Affymetrix barley1 gene chip, Bioinformatics expression analysis, genome scanning, *Hordeum vulgare*, Transcription factor.

#### چکیده

خانواده ژنی *NAC* یک خانواده بزرگ عوامل نسخه‌برداری اختصاصی گیاهی است که نقش‌های متنوعی در مراحل نمو گیاهی و پاسخ به تنش‌ها ایفا می‌کند. با تکمیل پروژه توالی‌یابی ژنوم *Hordeum vulgare* cv. Morex امکان مطالعات بیوانفورماتیکی خانواده ژنی *NAC* در جو فراهم گردید. در این پژوهش با استفاده از پایش ژنومی، در کل ۷۳ ژن غیرتکراری رمزکننده *NAC* در توالی‌های ژنومی *Hordeum vulgare* cv. Morex شناسایی شد. یک درخت تبارشناسی مرکب با توالی‌های پروتئینی *HvNAC* و تعدادی از توالی‌های پروتئینی *NAC* شناخته‌شده برنج و آرابیدوپسیس ترسیم شد و آنها به ۱۵ زیرگروه مشخص طبقه‌بندی شدند. مشخص شد که پراکنش ژن‌های *HvNAC* روی کروموزوم‌های جو غیریکنواخت است. بیشتر ژن‌های *NAC* به صورت انفرادی قرار گرفته‌اند و معدودی از آنها با دو یا سه ژن خوشه‌بندی شده‌اند. بیشتر عناصر *cis* ردیابی شده در نواحی بالادست و پایین دست ژن‌های *HvNAC* در پاسخ به نور، پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و به مقدار نسبتاً اندک در پاسخ به تنش‌های زیستی دخیل هستند. در آنالیز *in silico* بیان ژن، ژن‌های *HvNAC* در دامنه گسترده‌ای از بافت‌های مختلف بیان شدند و در مراحل نمو به طور عمده بیان نشدند، همچنین، ژن‌های *HvNAC* در شرایط تنش غیرزیستی تا حدودی و به مقدار نسبتاً کمتر در تنش‌های زیستی بیان شدند. این اطلاعات بیوانفورماتیکی چارچوبی برای مطالعات ژنومی و عملکردی این خانواده ژنی در جو فراهم می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** آنالیز بیان بیوانفورماتیکی، پایش ژنوم، تراشه ژنی

Affymetrix barley1، عوامل نسخه‌برداری، *Hordeum vulgare*

Yamaguchi *et al.*, 2010; Puranik *et al.*, 2011).

عوامل نسخه برداری NAC در تعدادی از فرآیندهای زیستی مانند کنترل تقسیم سلولی میانجی-گری شده به وسیله پیام رسانی سیتوکینین (Kim *et al.*, 2006)، تنظیم رشد سلول های گیاهی (Kato *et al.*, 2010)، نمو ریشه های جانبی (Quach *et al.*, 2014) و پیری برگ (Yang *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2013)، بیوسنتز فیتوالکسین (Saga *et al.*, 2012)، تشکیل دیواره های ثانویه (Mitsuda *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2007)، تشکیل گل (Hendelman *et al.*, 2013)، پاسخ به آلودگی عوامل بیماریزا (Voitsik *et al.*, 2013; Yokotani *et al.*, 2014)، نمو دانه (Park *et al.*, 2011) و نمو فیبر (Zhao *et al.*, 2014) نقش ایفا می کنند. همچنین، پروتئین هایی که حاوی دامنه NAC هستند، در فرایندهای تنظیمی مانند میانجی گری تشکیل ریشه جانبی و پیام رسانی اکسین (Xie *et al.*, 2000)، برش mRNA با میانجی گری ریز mRNAها (miRNA) و تجزیه پروتئین وابسته به یوبی کوئیتین (Xie *et al.*, 2004; Mallory *et al.*, 2002) نقش دارند. حرکت مواد غذایی از برگ ها به دانه های در حال توسعه (Uauy *et al.*, 2006) و تعداد پنجه (Mao *et al.*, 2007) را کنترل می کنند. علاوه بر این، آنها همچنین ترکیب دیواره سلولی گیاهان در طی تشکیل آوند چوبی (xylogenesis)، نمو فیبر و تشکیل چوب در گیاهان آوندی را کنترل می کنند (Demura and Fukuda, 2007; Zhong and Ye, 2007; Zhong *et al.*, 2008).

همچنین، بسیاری از اعضای خانواده ژنی عوامل نسخه برداری NAC می توانند پاسخ به تنش های غیرزیستی را هماهنگ کنند. در برنج، بیان *OsNAC5*، *OsNAP*، *OsNAC6* و *SNAC1* به وسیله تنش خشکی، سرما و شوری بالا القا می شوند.

## مقدمه

عوامل نسخه برداری گروهی از پروتئین ها هستند که فرآیندهای سلولی را به وسیله تنظیم بیان ژن های هدف پایین دست کنترل می کنند. بخش بزرگی از پروتئین های اختصاصی گیاهی عوامل نسخه برداری هستند که معرف اهمیت این پروتئین ها در تکامل گونه های گیاهی هستند (Olsen *et al.*, 2005). ساختار پروتئینی یک عامل نسخه برداری دارای دو دامنه می باشد که شامل دامنه اتصال به DNA که مسئول اتصال به عناصر *cis* اختصاصی DNA در ناحیه راه انداز ژن های هدف است و دامنه تنظیمی که مسئول تنظیم نسخه برداری ژن های هدف می باشد (Riechmann *et al.*, 2000). پروتئین های خانواده ژنی NAC یکی از بزرگترین خانواده های عوامل نسخه برداری اختصاصی گیاهان هستند (Olsen *et al.*, 2005). اولین پروتئین های NAC تعیین خصوصیت شده NAM (no apical meristem) گل اطلسی (Souer *et al.*, 1996)، ATAF (*Arabidopsis* transcription activation factor) و CUC (cup-shaped cotyledon) آراییدوپسیس بودند (Aida *et al.*, 1997) که نام NAC از اول حرف این سه پروتئین گرفته شده است. به طور معمول، خانواده عامل نسخه برداری NAC شامل یک دامنه کاملاً حفاظت شده NAC در انتهای آمینی و یک ناحیه متغیر تنظیمی نسخه برداری (transcription regulatory: TR) در انتهای کربوکسیل است (Olsen *et al.*, 2005). دامنه حفاظت شده NAC در انتهای آمینی مسئول اتصال به DNA و تشکیل همودیمرها و هترودیمرها می باشد. این دامنه تقریباً دارای ۱۵۰ اسید آمینه بوده و به زیردامنه های A-E طبقه بندی شده است (Olsen *et al.*, 2005). در مقابل، ناحیه انتهای کربوکسیل متنوع است و می تواند به عنوان یک فعال کننده یا خاموش کننده نسخه برداری عمل کند

تعداد اندکی ژن‌های *NAC* تعیین خصوصیت شده‌اند و عملکردهای بیشتر آنها نیاز به ارزیابی دارد. در این پژوهش، ژن‌های خانواده *NAC* در جو بر اساس مطالعات بیوانفورماتیکی به‌وسیله پایش ژنومی شناسایی شدند و ژن‌های *NAC* جو بر اساس ژن‌های گزارش شده و روابط خویشاوندی طبقه‌بندی گردیدند. جایگاه ژنومی مشخص و به‌صورت شماتیک ترسیم شد. توالی‌های بالادست و پایین دست ژن‌های *NAC* آنالیز شدند. همچنین، آنالیزهای بیان *in silico* انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### شناسایی ژن‌های رمزکننده دامنه *NAC*

پروتئین‌های پیش‌بینی شده ژنوم *Hordeum vulgare* که از سایت Gramene (<http://www.gramene.org>) دانلود شده بودند با استفاده از نرم‌افزار HMMER V.3 (Finn et al., 2011) بر اساس مدل مخفی مارکوف (HMM) برای دامنه حفاظت شده *NAC* (PF02365) در پایگاه اطلاعاتی Pfam (<http://pfam.xfam.org>) بررسی شدند. آنالیزها با استفاده از دامنه *NAC* خام HMM منجر به شناسایی پروتئین‌هایی با E-value کمتر از  $10^{-5}$  گردید. از پروتئین‌هایی با E-value کمتر از  $10^{-5}$  استفاده گردید تا HMM *NAC* اختصاصی *Hordeum vulgare* cv. Morex بر اساس مدل hmmbuild با استفاده از نرم‌افزار MEME در The MEME Suite (<http://meme-suite.org>) ساخته شوند (Jupe et al., 2012; Lozano et al., 2012). با HMM *NAC* اختصاصی *Hordeum vulgare* cv. Morex با استفاده از نرم‌افزار MAST در The MEME Suite پروتئین‌های کاندیدای *NAC* در این ژنوم با E-value کمتر از  $10^{-5}$  شناسایی شدند. همچنین توالی‌های تکراری نسخه‌های یک پروتئین و توالی‌های ناقص به‌صورت دستی حذف شدند.

فرایبان این ۴ ژن در برنج تراریخته تحمل به شوری بالا و آب‌کشیدگی (dehydration) را بهبود بخشیدند. گیاهان گندم بیان‌کننده ژن *SNAC1* تحمل فزاینده‌ای به خشکی و شوری نشان دادند (Nakashima et al., 2007; Takasaki et al., 2010; Saad et al., 2014; Chen et al., 2013). به‌طور مشابه، برنج تراریخته فرایبان‌کننده *OsNAC045* مقاومت فزاینده‌ای به هر دو تنش شوری و خشکی نشان داد (Zheng et al., 2009). فرایبان ژن‌های *OsNAC9* و *OsNAC10* اختصاصی ریشه منجر به طویل شدن ریشه‌ها گردید و تحمل به خشکی در گیاهان برنج تراریخته را افزایش داد که منجر به افزایش معنی‌دار عملکرد دانه تحت شرایط خشکی مزرعه گردید (Jeong et al., 2010; Redillas et al., 2012). همچنین، نقش دو ژن عامل رونویسی *NAC* (*TaNAC4* و *TaNAC8*) در آلودگی عامل بیماریزای زنگ نواری (stripe rust) و تنش‌های غیرزیستی مشخص شده است (Xia et al., 2010b). (a)

خانواده‌های عوامل نسخه‌برداری در گیاهان نسبت به جانوران در سطوح بسیار بالاتری وجود دارند و همچنین میزان بیان بیشتری دارند. در گیاهان، بیش از ۵۰ خانواده عوامل نسخه‌برداری متفاوت به‌وسیله آنالیز توالی گونه‌های مدل مانند برنج شناسایی شده‌اند (Xiong et al., 2005). در ژنوم برنج ۱۵۱ ژن *NAC* و در آراییدوپسیس ۱۱۷ ژن *NAC* (Nuruzzaman et al., 2010)، در ژنوم *Cucumis melo* L. ۸۲ ژن *NAC* (Wei et al., 2016)، در ژنوم sugarcane ۸۵ ژن *NAC* (Ramaswamy et al., 2017)، شناسایی شده است.

تکمیل توالی‌یابی ژنوم جو با کیفیت بالا (<http://www.gramene.org>)، یک فرصت عالی برای آنالیز پایش ژنومی تمام ژن‌های متعلق به خانواده‌های ژنی اختصاصی فراهم می‌کند. در جو، فقط

Ensemblplants cv. Morex از پایگاه اطلاعاتی  
(<http://plants.ensembl.org/index.html>)  
استفاده گردید و با استفاده از نرم‌افزار  
(Kozik et al., 2002) Genomepixelizer  
ژن‌های NAC روی ۷ کروموزوم جو ترسیم شدند.

### آنالیز بیان ژن *in silico*

برای دستیابی به دیدگاهی در رابطه با الگوی بیان  
خانواده ژنی NAC و دست یافتن به ژن‌هایی با  
اختلاف بیانی معنی‌دار، آنالیز داده‌ها بر اساس ریزآرایه-  
های پاسخ به تنش‌های زیستی، غیرزیستی و مراحل  
نموی (GSE6325، GSE6990، GSE15970،  
GSE17669، GSE10329، GSE10332،  
GSE27821، GSE27822، GSE23896،  
GSE10328، GSE10330، GSE14521،  
GSE15295، GSE18758، GSE16754،  
GSE12584، GSE17238، GSE17240،  
GSE20279، GSE33398، GSE33405،  
GSE34102، GSE8712، GSE9365،  
GSE11182، GSE20034، GSE23595،  
GSE33397، GSE33413 و GSE33842) انجام  
گردید. ابتدا داده‌های  
بیان ریزآرایه که با 22 K Affymetrix gene chip  
برای تنش‌های زیستی و غیرزیستی و  
مراحل نموی آزمایش شده بودند از بخش GEO  
پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت شدند  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

همچنین فایل اطلاعات ژن‌های شناسایی شده جو و  
شماره دسترسی آنها بعد از عضویت در پایگاه اطلاعاتی  
Affymetrix دریافت شد. با استفاده از نرم‌افزار  
Expression Console v1.3.1.187 داده‌های بیانی  
خام با پسوند CEL. نرمال‌سازی شدند. از روش RAM

برای تایید مجدد حضور دامنه (های) NAC در توالی‌ها  
از پایگاه اطلاعاتی SMART ([smart.embl-](http://smart.embl-heidelberg.de)  
[heidelberg.de](http://smart.embl-heidelberg.de)) استفاده گردید. همچنین، اطلاعات  
جایگاه درون سلولی پروتئین‌های خانواده عوامل  
رونویسی NAC با استفاده از سایت Plant-mPLOC  
([http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-](http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi)  
multi) مشخص شد.

### آنالیز توالی‌های بالادست و پایین‌دست ژن‌های NAC

۱۰۰۰ نوکلئوتید بالادست جایگاه شروع رونویسی  
(TSS)<sup>۱</sup> و پایین‌دست جایگاه پایان رونویسی ژن‌های  
خانواده NAC از پایگاه اطلاعاتی  
EnsemblePlants مورد آنالیز قرار گرفتند. برای  
شناسایی عوامل تنظیمی cis، شامل جایگاه اتصال  
عوامل رونویسی (TFBS)<sup>۲</sup> از پایگاه اطلاعاتی<sup>۳</sup>  
Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>)  
استفاده شد.

### همردیفی چندگانه و آنالیز درخت خویشاوندی

همردیفی توالی‌های پروتئینی NAC شناسایی شده جو  
به همراه یک توالی پروتئینی از زیرگروه‌های شناخته-  
شده خانواده عوامل رونویسی NAC گیاه برنج و  
آرابیدوپسیس انجام شد. درخت خویشاوندی بر اساس  
روش اتصال همسایه<sup>۴</sup> و ۱۰۰۰ پستوانه تکرار<sup>۵</sup> توسط  
نرم‌افزار MEGA 6 (Tamura et al., 2013) ترسیم  
شد.

### ترسیم جایگاه کروموزومی ژن‌های NAC روی ژنوم جو

برای تعیین محدوده کروموزومی ژن‌های کاندیدای  
رمزکننده خانواده NAC ژنوم *Hordeum vulgare*

4. Neighbor-joining  
5. Bootstrapping

1. Transcription Start Site  
2. Transcription binding site  
3. Cis-Acting Regulatory Element

برای توضیح روابط خویشاوندی در میان ژن‌های *HvNAC* و استنتاج تاریخچه تکاملی این خانواده ژنی، یک درخت خویشاوندی ترکیبی با استفاده از هم‌ردیفی کل توالی پروتئینی *HvNAC* و برخی از توالی‌های شناخته‌شده *NAC* در برنج و آراییدوپسیس ترسیم شد. بررسی درخت خویشاوندی آشکار کرد که خانواده *HvNAC* در دو گروه عمده قرار می‌گیرند. گروهی که شباهت بالایی با پروتئین‌های *NAC* شناخته‌شده داشتند و با آنها طبقه‌بندی شدند و گروهی که شامل پروتئین‌های *NAC* شناخته‌شده نیستند و اعضای آن با پروتئین‌های *NAC* برنج و آراییدوپسیس در یک گروه قرار نگرفتند.

برخی از پروتئین‌های *HvNAC* در ۱۰۰۰ بار تکرار خودراه‌اندازی در ۱۰۰٪ موارد با هم خوشه‌بندی شدند که به‌عنوان پروتئین‌های همولوگ<sup>۳</sup> شناسایی شدند و برخی از پروتئین‌های *HvNAC* در ۱۰۰۰ بار تکرار خودراه‌اندازی در ۱۰۰٪ موارد با پروتئین‌های *NAC* برنج و آراییدوپسیس طبقه‌بندی شدند که به‌عنوان پروتئین‌های اورتولوگ<sup>۴</sup> شناخته شدند.

### مکان‌یابی کروموزومی *NAC*

برای بررسی پراکنش ژنومی ژن‌های *HvNAC* روی کروموزوم‌ها، جایگاه کروموزومی بر اساس جستجو در پایگاه داده Ensemblplants شناسایی شد. جایگاه کروموزومی و طول هر ژن در جدول ۱ نشان داده شده است.

استفاده گردید تا ارزش‌های حاصل از کاوشگرهای چندگانه یک مجموعه کاوشگر به یک ارزش بیانی منفرد با دقت بیشتر تبدیل شود و اختلالات پس‌زمینه کاهش یابد (بر اساس کاوشگرهای با انطباق عالی درحالی‌که از کاوشگرهایی با عدم انطباق چشم‌پوشی می‌شود) و سپس با استفاده از *sketch quantile normalization* نرمال‌سازی انجام گرفت. سپس داده‌های نرمال‌شده ریزآرایه بر اساس آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار *Flexarray software version 1.6.1* آنالیز شدند. چنانچه  $P\text{-value} < 0.01$  و  $\text{Log}_2$  *Fold Change* بالاتر از ۱ یا کمتر از -۱ باشند، افزایش یا کاهش بیان معنی‌دار در نظر گرفته شد. نقشه خوشه‌های مرتبه‌ای با روش اقلیدسی برای ردیابی ژن-هایی با بیان متفاوت با استفاده از نرم‌افزار *TM4* (<http://www.tm4.org/mev.html>) *microarray* ترسیم شد. خوشه‌بندی به روش *HCL*<sup>۲</sup> (بر اساس پیش‌فرض‌های *Average* و *Pearson correlation* و *linkage clustering*) انجام شد.

### نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی عوامل رونویسی *NAC* در کل، ۷۳ ژن *NAC* با توالی کامل در ژنوم *Hordeum vulgare cv. Morex* شناسایی شدند (جدول ۱) و ۷ ژن دارای توالی ناقص به‌صورت دستی حذف شدند.

### رسم درخت خویشاوندی عوامل رونویسی *NAC*

جدول ۱. نام ژن، جایگاه کروموزومی، جهت ژن روی رشته DNA، نام گروه و جایگاه سلولی ژن‌های منتخب *NAC* روی ژنوم *Hordeum vulgare cv. Morex*

Name	Chromosome No: Region (direction)	Groups	Cellular location
MLOC_58950	1: 125689887-125692608 (-)	NAC2	Extracellular
MLOC_6901	1: 155312778-155315307 (-)	Special barley	Extracellular
MLOC_63743	1: 342272435-342274734 (+)	ATAF	Nuclear
MLOC_69621	1: 362063067-362065484 (-)	Special barley	Extracellular
MLOC_7757	1: 410900812-410902367 (+)	TERN	Nuclear
MLOC_60079	2: 17551186-17556091 (+)	Special barley	Nuclear
MLOC_8116	2: 388621632-388623157 (-)	NAP	Nuclear
MLOC_65400	2: 47014225-47016545 (+)	CUC	Nuclear

3. Homologous

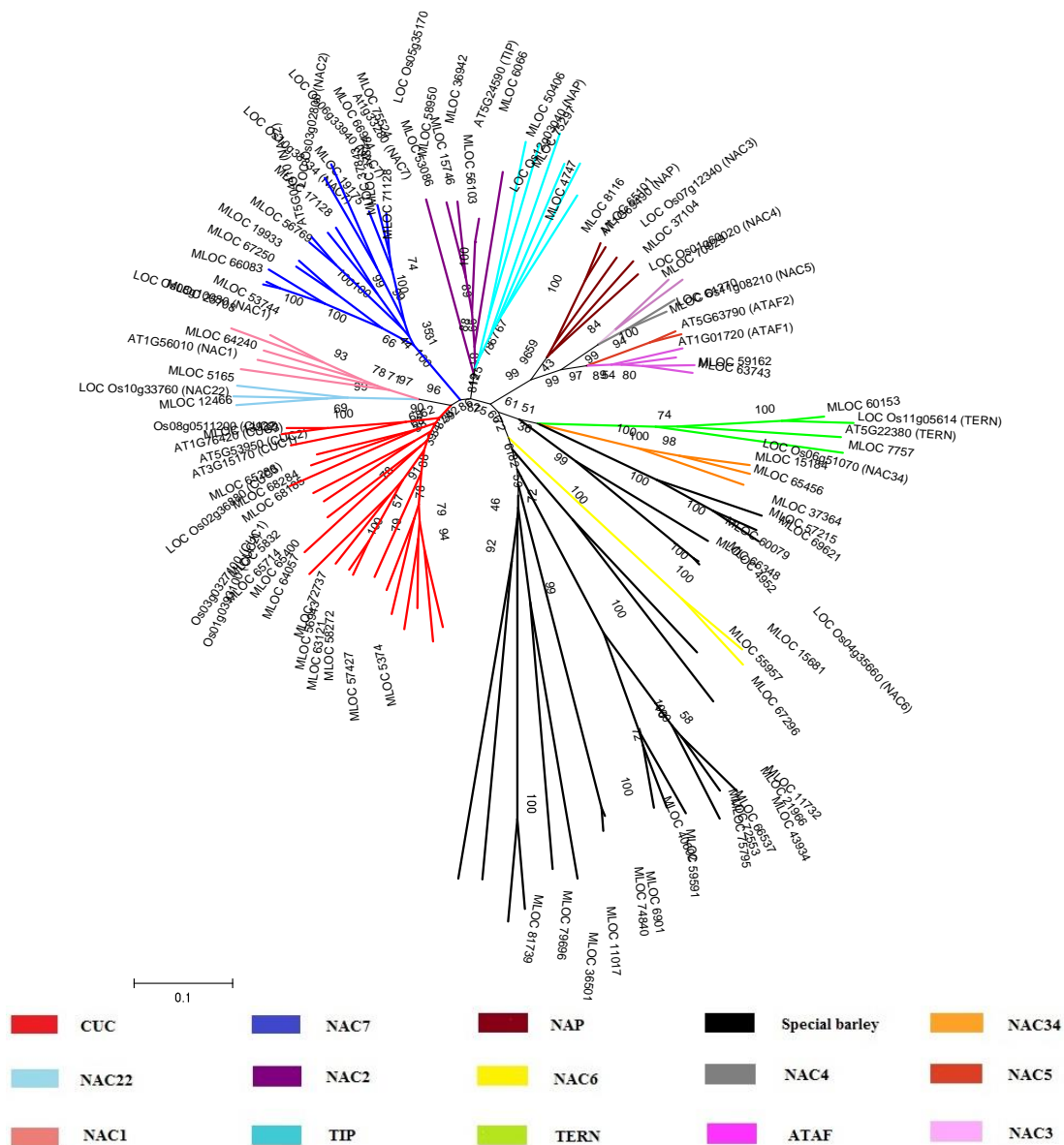
4. Orthologous

1. Euclidean method

2. Hierarchical clustering

MLOC_11017	2: 509266928-509267926 (+)	Special barley	Extracellular
MLOC_19175	2: 521776688-521778532 (+)	NAC7	Nuclear
MLOC_15681	2: 527340088-527341305 (+)	NAC6	Nuclear
MLOC_11732	2: 542429489-542434348 (+)	Special barley	Nuclear
MLOC_36501	2: 542601994-542603727 (-)	Special barley	Extracellular
MLOC_12466	2: 548528158-548530426 (+)	NAC22	Nuclear
MLOC_43934	2: 551777309-551782928 (-)	Special barley	Extracellular
MLOC_15746	2: 552636713-552638528 (-)	NAC7	Nuclear
MLOC_67250	2: 623734216-623736051 (-)	NAC7	Nuclear
MLOC_66083	2: 624147213-624149867 (-)	NAC7	Nuclear
MLOC_36942	2: 625430360-625433979 (-)	TIP	Extracellular
MLOC_21966	2HL: 1267937-1270098 (-)	Special barley	Nuclear
MLOC_65714	2HS: 809115-810344 (-)	CUC	Nuclear
MLOC_63121	3: 27533592-27534937 (-)	CUC	Nuclear
MLOC_6066	3: 353055762-353060427 (-)	TIP	Nuclear
MLOC_74840	3: 419832907-419835463 (-)	Special barley	Extracellular
MLOC_70929	3: 468147952-468149608 (+)	NAC4	Nuclear
MLOC_66537	3: 479157711-479161316 (+)	Special barley	Nuclear
MLOC_57215	3: 507718704-507721302 (-)	Special barley	Extracellular
MLOC_75795	3: 50825766-50831630 (-)	Special barley	Nuclear
MLOC_59162	3: 509106587-509108844 (+)	ATAF	Nuclear
MLOC_81739	3HL: 3325158-3326078 (+)	Special barley	Extracellular
MLOC_72737	3HS: 778109-779086 (+)	CUC	Nuclear
MLOC_61270	4: 134643717-134646193 (-)	NAC5	Nuclear
MLOC_64057	4: 243692949-243694787 (+)	CUC	Nuclear
MLOC_65101	4: 243961733-243964197 (+)	NAP	Nuclear
MLOC_68284	4: 251124512-251126601 (-)	CUC	Nuclear
MLOC_65456	4: 519946083-519947449 (+)	NAC34	Extracellular
MLOC_56769	4: 523895650-523902866 (-)	NAC7	Nuclear
MLOC_71128	4: 532866311-532868605 (+)	NAC2	Nuclear
MLOC_57427	4: 536327434-536329018 (-)	CUC	Nuclear
MLOC_5832	5: 130036968-130038817 (+)	CUC	Nuclear
MLOC_55957	5: 289790342-289792006 (-)	Special barley	Nuclear
MLOC_68185	5: 443875935-443878451 (-)	CUC	Nuclear
MLOC_64240	5: 46097559-46102301 (+)	NAC1	Nuclear
MLOC_66348	5: 506578760-506580961 (-)	Special barley	Nuclear
MLOC_4952	5: 506659835-506661693 (+)	Special barley	Nuclear
MLOC_37104	5: 532180436-532182278 (+)	NAC3	Nuclear
MLOC_60153	5: 80255630-80256700 (+)	TERN	Nuclear
MLOC_4747	5: 83059763-83061537 (+)	NAP	Nuclear
MLOC_37843	5HL: 109778-113485 (+)	NAC2	Nuclear
MLOC_37844	5HL: 114413-117268 (+)	NAC2	Nuclear
MLOC_56103	6: 373542125-373546822 (-)	NAC7	Nuclear
MLOC_79696	6: 471322478-471323473 (+)	Special barley	Extracellular
MLOC_5165	6: 524082694-524085842 (-)	NAC22	Nuclear
MLOC_40602	7: 123252123-123252985 (+)	Special barley	Extracellular
MLOC_5374	7: 145232320-145233851 (-)	CUC	Nuclear
MLOC_75524	7: 16480061-16482557 (-)	NAC7	Nuclear
MLOC_53086	7: 2016492-2022883 (+)	NAC7	Nuclear
MLOC_75297	7: 2088391-2089265 (-)	TIP	Nuclear
MLOC_13932	7: 227833421-227835858 (-)	CUC	Nuclear
MLOC_59591	7: 228075402-228078094 (+)	Special barley	Extracellular
MLOC_50406	7: 256768212-256772511 (+)	TIP	Extracellular
MLOC_67296	7: 310159755-310163663 (+)	Special barley	Nuclear
MLOC_37364	7: 312421569-312424622 (-)	Special barley	Extracellular
MLOC_66924	7: 315947529-315949900 (-)	NAC7	Nuclear
MLOC_19933	7: 420085707-420087512 (-)	NAC7	Nuclear
MLOC_72553	7: 466653156-466656377 (-)	Special barley	Nuclear
MLOC_53744	7: 564646925-564651351 (-)	NAC1	Nuclear
MLOC_25708	7: 565570615-565574354 (+)	NAC1	Nuclear
MLOC_56943	7: 599936747-599938808 (-)	CUC	Nuclear
MLOC_15184	7: 600384793-600386399 (+)	NAC34	Nuclear
MLOC_58272	7: 67509069-67510545 (-)	CUC	Nuclear
MLOC_17128	7HL: 2243668-2246010 (-)	NAC7	Nuclear
MLOC_65286	7HL: 513895-516632 (-)	CUC	Nuclear

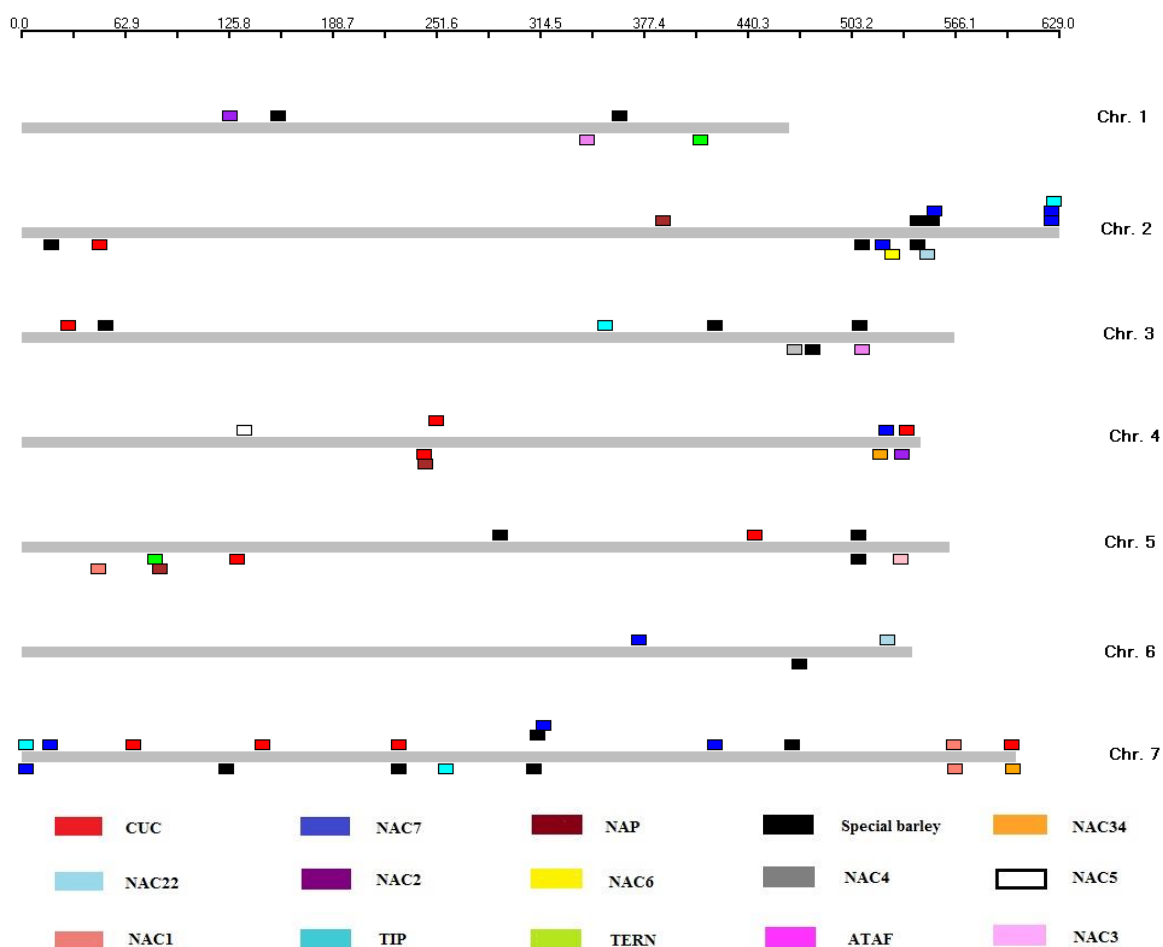
جهت forward با علامت + و جهت reverse با علامت - نمایش داده شده است.



شکل ۱. درخت خویشاوندی بر اساس توالی‌های پروتئین‌های  $HvNAC$  و پروتئین‌های NAC شناخته‌شده برنج و آراییدوپسیس ترسیم شد. زیرگروه‌های NAC با رنگ‌های مشخص نشان داده شده‌اند (به راهنمای جدول مراجعه گردد) و بر اساس نام پروتئین(های) شناخته‌شده از آراییدوپسیس و برنج نام‌گذاری شده‌اند.

ژن  $NAC$  هستند. بنابراین کروموزوم ۷ دارای بیشترین تعداد ژن  $NAC$  است و کروموزوم ۲ بعد از آن قرار دارد. در مقابل، فقط ۳ ژن روی کروموزوم ۶ یافت شده است. همچنین، ۷ ژن  $NAC$  در کروموزوم‌های مختلف نزدیک ناحیه تلومری قرار گرفته‌اند، علاوه بر این ژن‌های  $NAC$  مضاعف‌شدگی نشان ندادند. در کل، هیچکدام از کروموزوم‌ها دارای کلیه زیرگروه‌ها نبودند.

در کل از ۷۳ ژن  $NAC$ ، ۶۵ ژن دارای جایگاه کروموزومی مشخص روی ۷ کروموزوم جو بودند (شکل ۲). پراکنش کروموزومی ژن‌های  $HvNAC$  روی ژنوم جو کاملاً غیریکنواخت است. بیشتر ژن‌های  $NAC$  به‌صورت انفرادی قرار گرفته‌اند و معدودی از آنها در خوشه‌های ژنی مکان‌یابی شده‌اند. کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ به‌ترتیب دارای ۵، ۱۴، ۸، ۸، ۹، ۳ و ۱۸



شکل ۲. پراکنش ژنومی ژن‌های *HvNAC* روی ۷ کروموزوم جو

اسید سالیسیلیک (TCA-element) در درجه بعدی قرار داشتند ولی تعداد TCA-element به طور قابل ملاحظه‌ای از عناصر تنظیم‌کننده *cis* دخیل در پاسخ به متیل جاسمونات و اسید آبسزیک کمتر بود. همچنین، جایگاه اتصال MYB القاء‌شده در تنش خشکی (MBS)، عنصر تنظیم‌کننده *cis* دخیل در کنترل فعالیت‌های شبانه‌روزی گیاه (circadian) و عنصر تنظیم‌کننده *cis* ضروری برای القاء بی‌هوازی (ARE) فراوانی بالایی داشتند. Box-W1 (عنصر پاسخ‌دهنده به ایسیتورهای قارچی)، -CCGTCC box (عنصر تنظیم‌کننده *cis* مربوط به فعال‌سازی اختصاصی مرستم)، CCAAT-box (جایگاه اتصال MYBHv1 که یک عامل نسخه‌برداری MYB

### آنالیز توالی‌های بالادست و پایین‌دست ژن‌های *NAC*

آنالیز توالی‌های بالادست و پایین‌دست ژن *NAC* در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین فراوانی در نواحی بالادست و پایین‌دست مربوط به TATA-box و سپس CAAT-box بود. G-box و Sp1 که در پاسخ به نور دخیل هستند در رده بعدی فراوانی قرار داشتند (البته موتیف‌های متعددی شناسایی شدند که در پاسخ به نور دخیل بودند). فراوانی بعدی مربوط به Skn-1\_motif عنصر تنظیم‌کننده *cis* موردنیاز برای بیان ژن آندوسپرم بود. پس از آن، بیشترین فراوانی مربوط به عنصر تنظیم‌کننده *cis* دخیل در پاسخ به اسید آبسزیک بود (ABRE)، متیل جاسمونات (TGACG-motif و CGTCA-motif) و همچنین



TATC-box (عنصر تنظیم‌کننده *cis* دخیل در پاسخ به جیبرلین)، AuxRR-core (عنصر تنظیم‌کننده *cis* دخیل در پاسخ به اکسین) و RY-element (عنصر تنظیم‌کننده *cis* دخیل در تنظیم اختصاصی بذر) نیز مشاهده شدند. تنها یک موتیف MSA-like (عنصر تنظیم‌کننده *cis* دخیل در تنظیم چرخه سلولی) در بالادست و یک موتیف در پایین‌دست ژن‌های NAC مشاهده شد. MRE، MBSII، MBSI، CCAAT-box و MBS جایگاه اتصال MYB هستند که ۹۹ موتیف در بالادست و ۹۸ موتیف در پایین‌دست ژن‌های NAC مشاهده شد.

تنظیم‌شده به‌وسیله اسید جیبرلیک در گیاه جو است که در دانه‌های جو ردیابی شده و نقش مهمی در تنظیم ژن در طی توسعه آندوسپرم و جوانه‌زنی ایفا می‌کند (Gubler *et al.*, 1995, 1999)، GARE-motif و P-box (عنصر پاسخ‌دهنده به جیبرلین)، TGA-element (عنصر پاسخ‌دهنده به اکسین)، LTR (عنصر تنظیم‌کننده *cis* دخیل در پاسخ به دمای پایین)، HSE (عنصر تنظیم‌کننده *cis* دخیل در پاسخ به تنش گرما) فراوانی نسبتاً بالایی داشتند. لازم به ذکر است که موتیف‌های C-repeat/DRE (پاسخ به سرما و آب‌کشیدگی)،

جدول ۲. آنالیز توالی‌های بالادست و پایین‌دست ژن *HvNAC*

Name of motifs	Upstream	Downstream	Function
3-AF3 binding site	0	2	part of a conserved DNA module array (CMA3)
E2Fb	0	2	-
ELI-box3	0	2	elicitor-responsive element
F-box	0	2	-
motif I	0	1	cis-acting regulatory element root specific
Pc-CMA2c	0	2	part of a light responsive element
Y-box	0	3	-
4cl-CMA2b	1	0	light responsive element
AAAC-motif	1	0	light responsive element
AACA_motif	1	2	involved in endosperm-specific negative expression
CG-motif	1	1	part of a light responsive element
chs-CMA2a	1	6	part of a light responsive element
chs-Unit 1 m1	1	3	part of a light responsive element
GATT-motif	1	1	part of a light responsive element
H-box	1	1	-
MBSI	1	1	MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation
MBSII	1	1	MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation
MSA-like	1	1	cis-acting element involved in cell cycle regulation
OCT	1	1	cis-acting regulatory element related to meristem specific activation
ATCC-motif	2	1	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
ATC-motif	2	4	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
AT-rich sequence	2	1	element for maximal elicitor-mediated activation (2copies)
chs-CMA1a	2	3	part of a light responsive element
C-repeat/DRE	2	3	regulatory element involved in cold- and dehydration-responsiveness
EIRE	2	7	elicitor-responsive element
GC-repeat	2	1	-
HD-Zip 1	2	2	element involved in differentiation of the palisade mesophyll cells
JERE	2	2	-

ادامه جدول ۲. آنالیز توالی‌های بالادست و پایین‌دست ژن *HvNAC*

Name of motifs	Upstream	Downstream	Function
OBP-1 site	2	1	cis-acting regulatory element
plant_AP-2-like	2	2	-
as1	3	1	cis-acting regulatory element involved in the root-specific expression
AT-rich element	3	1	binding site of AT-rich DNA binding protein (ATBP-1)
chs-CMA2b	3	1	part of a light responsive element
dOCT	3	2	cis-acting regulatory element related to meristem specific activation
Gap-box	3	4	part of a light responsive element
GTGGC-motif	3	2	part of a light responsive element
HD-Zip 2	3	2	element involved in the control of leaf morphology development
TGA-box	3	1	part of an auxin-responsive element
WUN-motif	3	7	wound-responsive element
AT1-motif	4	3	part of a light responsive module
box E	4	3	-
Box III	4	5	protein binding site
C-box	4	2	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
CE3	4	1	cis-acting element involved in ABA and VP1 responsiveness
E2Fa	4	2	-
LAMP-element	4	5	part of a light responsive element
MRE	4	10	MYB binding site involved in light responsiveness
TGG-motif	4	1	part of a light responsive element
TATC-box	5	5	cis-acting element involved in gibberellin-responsiveness
TA-rich region	6	7	enhancer
AC-I	7	4	-
CTAG-motif	7	7	-
motif IIb	7	4	abscisic acid responsive element
rbcS-CMA7a	7	2	part of a light responsive element
box II	8	2	part of a light responsive element
L-box	8	0	part of a light responsive element
3-AF1 binding site	9	7	light responsive element
AC-II	9	4	-
ERE	9	14	ethylene-responsive element
ATGCAAAT motif	10	4	cis-acting regulatory element associated to the TGAGTCA motif
AuxRR-core	10	8	cis-acting regulatory element involved in auxin responsiveness
box S	10	5	-
ATCT-motif	11	13	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
TCCACCT-motif	11	16	-
GA-motif	12	14	part of a light responsive element
as-2-box	13	6	involved in shoot-specific expression and light responsiveness
RY-element	15	16	cis-acting regulatory element involved in seed-specific regulation
AE-box	16	33	part of a module for light response
GCC box	16	5	-
TATCCAT/C-motif	16	15	-
TCCC-motif	17	10	part of a light responsive element
CCAAT-box	20	21	MYBHv1 binding site
GATA-motif	20	21	part of a light responsive element
TGA-element	20	30	auxin-responsive element

ادامه جدول ۲. آنالیز توالی‌های بالادست و پایین‌دست ژن *HvNAC*

Name of motifs	Upstream	Downstream	Function
GCN4_motif	21	38	cis-regulatory element involved in endosperm expression
MNF1	21	16	light responsive element
Box I	23	38	light responsive element
Box-W1	23	25	fungal elicitor responsive element
TCT-motif	23	25	part of a light responsive element
W box	23	27	-
HSE	24	28	cis-acting element involved in heat stress responsiveness
CATT-motif	25	29	part of a light responsive element
GARE-motif	25	27	gibberellin-responsive element
P-box	25	19	gibberellin-responsive element
AAGAA-motif	27	39	-
CAT-box	28	34	cis-acting regulatory element related to meristem expression
O2-site	29	30	cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation
TCA-element	30	43	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
CCGTCC-box	36	31	cis-acting regulatory element related to meristem specific activation
TC-rich repeats	37	28	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
A-box	39	35	cis-acting regulatory element
GC-motif	39	29	enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
I-box	39	43	part of a light responsive element
ACE	40	30	cis-acting element involved in light responsiveness
Box 4	42	41	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
GT1-motif	42	32	light responsive element
LTR	42	16	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness
5UTR Py-rich stretch	45	26	cis-acting element conferring high transcription levels
GAG-motif	49	41	part of a light responsive element
ARE	50	68	cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
circadian	53	70	cis-acting regulatory element involved in circadian control
MBS	70	63	MYB binding site involved in drought-inducibility
CGTCA-motif	101	71	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGACG-motif	101	70	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
ABRE	126	60	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
Skn-1_motif	134	132	cis-acting regulatory element required for endosperm expression
Sp1	200	169	light responsive element
G-Box	323	193	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
CAAT-box	992	1137	common cis-acting element in promoter and enhancer regions
TATA-box	1405	1660	core promoter element around -30 of transcription start

تنش زیستی (شکل ۴) و مراحل نموی (شکل ۵) نشان داده شده است. طیف رنگ قرمز افزایش بیان ژن و طیف رنگ سبز کاهش بیان ژن را نشان می‌دهد. اعداد

آنالیز بیان ژن‌های *HvNAC* نقشه خوشه‌بندی سلسله مراتبی بیان ژن‌های *HvNAC* در آزمایشات تنش غیرزیستی (شکل ۳)،

زیر صفر نسبت به کنترل افزایش بیان نشان داد. ژن MLOC\_64057 (CUC) در آزمایش سازگاری به سرما در ژنوتیپ‌های Albina f-17 (GSE10332\_2)، Xantha b-12 (GSE10332\_4) و Xantha s-46 (GSE10332\_5) نسبت به کنترل خود افزایش بیان نشان داد. ژن MLOC\_59162 (ATAF) و ژن MLOC\_37104 (NAC3) در آزمایش سازگاری به سرما (GSE10332\_1)، GSE10332\_2، GSE10332\_4 و GSE10332\_5 در ژنوتیپ‌های Albina e-16، Xantha s-46 و Xantha b-12، نسبت به کنترل خود افزایش بیان نشان دادند. ژن MLOC\_37104 (NAC3) در آزمایش GSE27821\_3 در سرمادهی کوتاه نسبت به حالت ورنالیزه‌نشده افزایش بیان نشان داد. ژن MLOC\_37104 (NAC3) و MLOC\_64240 (NAC1) در آنالیز بساک جو (GSE10330) در بررسی اثر تیمار مانیتول روی جنین‌زایی میکروسپور، ۳ روز بعد از اعمال تیمار مانیتول نسبت به قبل از اعمال تیمار مانیتول کاهش بیان نشان دادند. در بررسی تأثیر سمیت HgCl<sub>2</sub> در ریشه‌های جو (GSE15295)، ژن MLOC\_37104 (NAC3) نسبت به کنترل افزایش بیان و ژن MLOC\_64240 (NAC1) نسبت به کنترل کاهش بیان نشان داد.

نقشه خوشه‌بندی سلسله مراتبی آزمایش‌های تنش زیستی جو برای HvNAC در شکل ۴ نشان داده شده است، ژن MLOC\_59162 (ATAF) در تنش زیستی شته در ژنوتیپ 28-4 کاهش بیان (GSE12584\_1) و ژن MLOC\_64240 (NAC1) در ژنوتیپ lina افزایش بیان (GSE12584\_2) نشان داد.

در آزمایش GSE33398 از ژنوتیپ Morex که به بیماری فوزاریوم (*Fusarium graminearum*) حساس است استفاده شد. ژن MLOC\_37104

Log2 Fold Change بالاتر از ۱ افزایش بیان معنی‌دار و کمتر از -۱ کاهش بیان معنی‌دار در نظر گرفته شدند. بر اساس ریزآرایه‌های پاسخ به تنش‌های غیرزیستی با 22 K Affymetrix gene chip بخش GEO پایگاه اطلاعاتی NCBI نقشه خوشه‌بندی سلسله مراتبی بیان ژن‌های HvNAC ترسیم شدند.

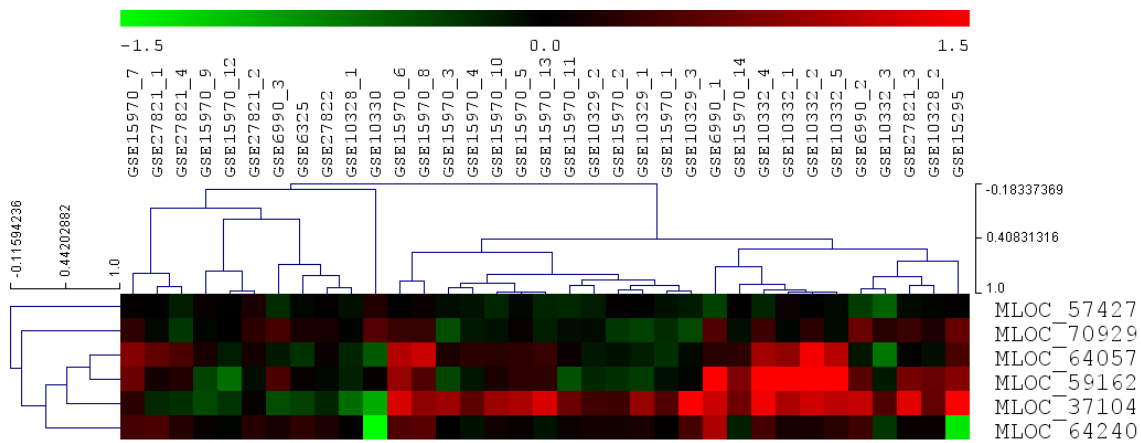
نقشه خوشه‌بندی سلسله مراتبی آزمایش‌های تنش غیرزیستی جو برای HvNAC در شکل ۳ نشان داده شده است. ژن‌های MLOC\_59162 (ATAF)، MLOC\_64240 (NAC3) و MLOC\_37104 (NAC1) در آزمایش تنش خشکی زمانی که محتوی آب خاک به ۷٪ رسید (GSE6990\_1) نسبت به کنترل افزایش بیان نشان دادند. همچنین، ژن MLOC\_37104 (NAC3) در آزمایش تنش خشکی زمانی که محتوی آب خاک به ۱۹٪ رسید (GSE6990\_2) نسبت به کنترل افزایش بیان نشان داد.

ژن MLOC\_37104 (NAC3) در آزمایش تنش خشکی در ژنوتیپ HS41-1 مقاوم به خشکی در روز ۵ اعمال تنش خشکی (GSE15970\_3) و در ژنوتیپ Martin مقاوم به خشکی در روز ۳ اعمال تنش خشکی (GSE15970\_6) نسبت به کنترل افزایش بیان نشان داد. جالب است که ژن MLOC\_37104 (NAC3) در ژنوتیپ Moroc9-75 حساس به خشکی در روز اول اعمال تنش خشکی (GSE15970\_10) نسبت به کنترل و در روز ۵ اعمال تنش خشکی نسبت به کنترل (GSE15970\_13) افزایش بیان نشان داد. همچنین، ژن MLOC\_64057 (CUC) در ژنوتیپ Martin مقاوم به خشکی در روز ۳ اعمال تنش خشکی (GSE15970\_6) و ۵ روز بعد از اعمال تنش خشکی (GSE15970\_8) نسبت به کنترل افزایش بیان نشان داد.

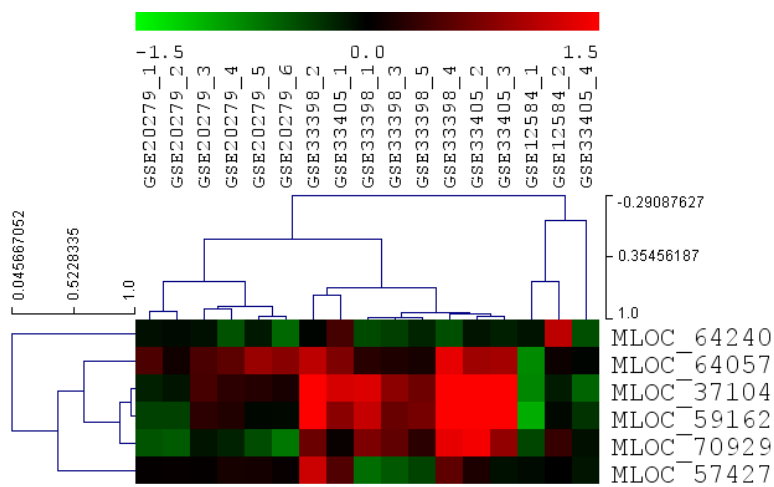
ژن MLOC\_37104 (NAC3) در آزمایش GSE10329\_3 در ژنوتیپ Dicktoo در دمای

بیان ژن (NAC3) MLOC\_37104 در آلودگی سنبله گیاه جو ژنوتیپ Morex، ۴۸ ساعت بعد از آلودگی با سویه وحشی قارچ Z3639 در برابر تیمار با آب مشاهده شد (GSE33398\_3). همچنین، افزایش بیان ژن‌های (CUC) MLOC\_64057، MLOC\_37104 (ATAF) ژن MLOC\_59162 (ATAF) و MLOC\_70929 (NAC4) در آلودگی سنبله گیاه جو ژنوتیپ Morex، ۹۶ ساعت بعد از آلودگی با سویه وحشی قارچ Z3639 در برابر تیمار با آب نیز مشاهده شد (GSE33398\_4).

(NAC3) و MLOC\_59162 (ATAF) در آلودگی سنبله گیاه جو ژنوتیپ Morex، ۹۶ ساعت بعد از آلودگی با سویه جهش‌یافته قارچ GZT40 در برابر تیمار با آب افزایش بیان نشان دادند (GSE33398\_1). ژن MLOC\_37104 (CUC)، MLOC\_64057 (CUC) و MLOC\_57427 (NAC3) در آلودگی سنبله گیاه جو ژنوتیپ Morex، ۹۶ ساعت بعد از آلودگی با سویه وحشی قارچ GZT40 در برابر سویه جهش‌یافته قارچ GZT40 افزایش بیان نشان دادند (GSE33398\_2).



شکل ۳. نقشه خوشه‌بندی سلسله مراتبی آزمایش‌های تنش‌های غیرزیستی برای HvNAC



شکل ۴. نقشه خوشه‌بندی سلسله مراتبی آزمایش‌های تنش‌های زیستی برای HvNAC

گله‌ی در آندوسپرم نسبت به ۴ روز بعد از گله‌ی، در آندوسپرم ۲۵ (GSE9365\_15) روز بعد از گله‌ی نسبت به ۴ روز بعد از گله‌ی افزایش بیان نشان داد. همچنین، این ژن در مرحله جوانه‌زنی بذر، در گیاهچه‌ها ۷۲ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت پس از جوانه‌زنی (GSE9365\_4) و در آندوسپرم ۷۲ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت پس از جوانه‌زنی (GSE9365\_9) و ۷۲ ساعت نسبت به ۴۸ ساعت پس از جوانه‌زنی (GSE9365\_10) کاهش بیان نشان داد. ژن (NAC3) MLOC\_37104 در آزمایش نمو دانه، در گیاهچه‌های دانه ۲۵ روز بعد از گله‌ی نسبت به ۱۶ روز بعد از گله‌ی (GSE9365\_11) و در پریکارپ ۸ روز بعد از گله‌ی نسبت به ۴ روز بعد از گله‌ی (GSE9365\_17) افزایش بیان نشان داد و همین ژن در آزمایش جوانه‌زنی بذر در گیاهچه ۲۴ ساعته (GSE9365\_1)، ۴۸ ساعته (GSE9365\_2) و ۷۲ ساعته (GSE9365\_3) نسبت به حالت کنترل، در آندوسپرم ۲۴ ساعت (GSE9365\_5)، ۴۸ ساعت (GSE9365\_6) و ۷۲ ساعت (GSE9365\_8) پس از جوانه‌زنی نسبت به حالت کنترل و در آندوسپرم ۷۲ ساعت پس از جوانه‌زنی نسبت به ۲۴ ساعت پس از جوانه‌زنی (GSE9365\_9) کاهش بیان نشان داد. ژن (NAC4) MLOC\_70929 در آزمایش در جوانه‌زنی بذر، در گیاهچه ۲۴ ساعته نسبت به حالت کنترل (GSE9365\_1) و در آندوسپرم ۲۴ ساعت (GSE9365\_5) پس از جوانه‌زنی نسبت به حالت کنترل افزایش بیان داشت و در گیاهچه‌ها ۷۲ ساعت پس از جوانه‌زنی نسبت به ۲۴ ساعت (GSE9365\_4) کاهش بیان نشان داد. ژن (CUC) MLOC\_57427 در نمو دانه جو در ۸ (GSE9365\_12) و ۱۶ (GSE9365\_13) روز بعد از گله‌ی در آندوسپرم نسبت به ۴ روز بعد از گله‌ی، همچنین ۱۶ (GSE9365\_14) روز بعد از گله‌ی در آندوسپرم نسبت به ۸ روز بعد از گله‌ی افزایش بیان نشان داد. این ژن ۲۵ روز بعد از گله‌ی نسبت به ۴ (GSE9365\_15)، ۸

ژن‌های (CUC) MLOC\_64057، (NAC3) MLOC\_37104 و (ATAF) MLOC\_59162 تنش ایجادشده با trichothecene mycotoxin با deoxynivalenol در گلچه گیاه جو ژنوتیپ Morex، ۱ ساعت (GSE33405\_1)، ۱۲ ساعت (GSE33405\_2) و ۲۴ ساعت (GSE33405\_3) بعد از آلودگی در برابر کنترل افزایش بیان نشان دادند و ژن (NAC4) MLOC\_70929، ۱۲ ساعت (GSE33405\_2) و ۲۴ ساعت (GSE33405\_3) بعد از آلودگی در برابر کنترل افزایش بیان نشان دادند. نقشه خوشه‌بندی سلسله مراتبی آزمایش‌های مراحل نمو جو برای HvNAC در شکل ۵ نشان داده شده است. در بررسی اثر معرف Yariv بر پیام‌رسانی اسید جیبرلیک سلول‌های آلورون در جو، ژن (NAC1) MLOC\_64240 با استفاده از تیمار جیبرلین به‌همراه معرف Yariv در برابر کنترل (GSE8712\_1) و ژن‌های (ATAF) MLOC\_37104 (NAC3) و MLOC\_59162 در تیمار جیبرلین به‌همراه معرف Yariv در برابر جیبرلین (GSE8712\_2) افزایش بیان نشان دادند. ژن (CUC) MLOC\_64057 در تیمار جیبرلین در برابر کنترل (GSE8712\_3) افزایش بیان و ژن (NAC3) MLOC\_37104 کاهش بیان نشان دادند.

ژن (CUC) MLOC\_64057 در آزمایش جوانه‌زنی بذر، ۷۲ ساعت بعد از جوانه‌زنی در آندوسپرم نسبت به حالت کنترل (GSE9365\_8) و نسبت به ۲۴ ساعت اولیه (GSE9365\_9) افزایش بیان نشان داد. ژن (ATAF) MLOC\_59162 در آزمایش جوانه‌زنی بذر در گیاهچه ۲۴ ساعته نسبت به حالت کنترل (GSE9365\_1) و ۲۴ ساعت پس از جوانه‌زنی نسبت به حالت کنترل در آندوسپرم (GSE9365\_5)، در گیاهچه‌های دانه ۲۵ روز بعد از گله‌ی نسبت به ۱۶ روز بعد از گله‌ی (GSE9365\_11)، در نمو دانه جو در ۸ (GSE9365\_12) و ۱۶ (GSE9365\_13) روز بعد از

زمستانه 88Ab536 و Morex، ۳ روز بعد از جوانه‌زنی کاهش نشان دادند (GSE33842\_1 و GSE33842\_2).

ژن (CUC) MLOC\_64057 در مرحله پر شدن دانه در ریشک نسبت پالئا (GSE16754\_2)، در دانه نسبت به ریشک (GSE16754\_4)، در دانه نسبت به لما (GSE16754\_5) و در دانه نسبت به پالئا (GSE16754\_6) کاهش بیان نشان داد. ژن (ATAF) MLOC\_59162 در ریشک نسبت پالئا (GSE16754\_2) کاهش بیان نشان داد. ژن (NAC4) MLOC\_70929 و (NAC3) MLOC\_37104 در دانه نسبت به ریشک (GSE16754\_4)، در دانه نسبت به لما (GSE16754\_5) و در دانه نسبت به پالئا (GSE16754\_6) کاهش بیان نشان دادند و ژن‌های (CUC) MLOC\_57427 و (NAC1) MLOC\_64240 در دانه نسبت به ریشک (GSE16754\_4)، در دانه نسبت به لما (GSE16754\_5) و در دانه نسبت به پالئا (GSE16754\_6) افزایش بیان نشان دادند.

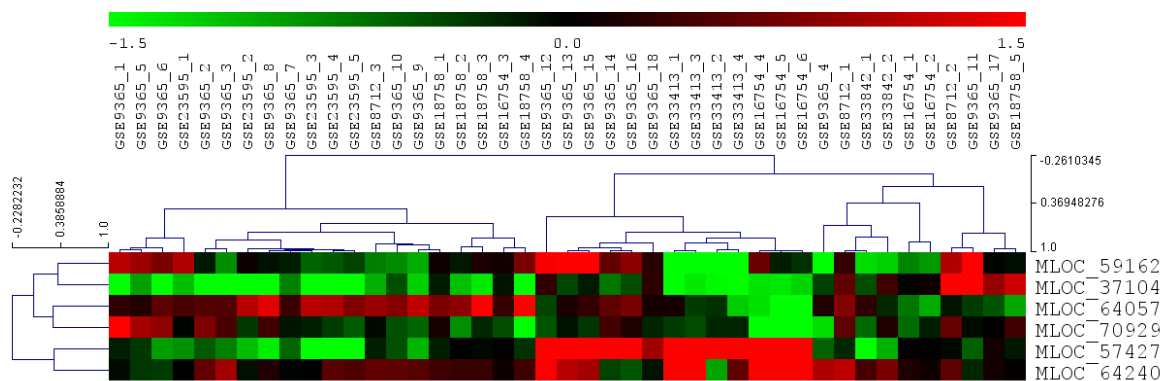
ژن (CUC) MLOC\_64057 در تأثیر اسید جیبرلیک و اسید آبسزیک نسبت به اسید آبسزیک در آلورون دانه (GSE18758\_2)، در تأثیر اسید جیبرلیک نسبت به کنترل در آلورون دانه (GSE18758\_3) و در جهش‌یافته *sln1* بدون تیمار هورمونی نسبت به کنترل در آلورون دانه (GSE18758\_4) افزایش بیان نشان داد و در تأثیر اسید جیبرلیک و اسید آبسزیک نسبت به اسید جیبرلیک در آلورون دانه (GSE18758\_5) کاهش بیان نشان داد، درحالی‌که در ژن (NAC3) MLOC\_37104 نتایج معکوس مشاهده شد. همچنین برای ژن (NAC4) MLOC\_70929 در جهش‌یافته *sln1* بدون تیمار هورمونی نسبت به کنترل در آلورون دانه (GSE18758\_4) کاهش بیان مشاهده شد.

(GSE9365\_16) و (GSE9365\_18) روز بعد از گلدهی در آندوسپرم افزایش بیان نشان داد. این ژن در آندوسپرم ۴۸ ساعت (GSE9365\_6) پس از جوانه‌زنی نسبت به حالت کنترل، در آندوسپرم ۷۲ ساعت پس از جوانه‌زنی نسبت به کنترل (GSE9365\_8) و ۲۴ ساعت پس از جوانه‌زنی (GSE9365\_9) کاهش بیان نشان داد. ژن (NAC1) MLOC\_64240 در جوانه‌زنی بذر در گیاهچه ۷۲ ساعت (GSE9365\_3) نسبت به حالت کنترل و در گیاهچه‌ها ۷۲ ساعت پس از جوانه‌زنی نسبت به ۲۴ ساعت (GSE9365\_4) پس از جوانه‌زنی افزایش بیان نشان دادند. همچنین، در نمو دانه جو در آندوسپرم در ۸ (GSE9365\_6) و ۱۶ (GSE9365\_7) روز بعد از گلدهی نسبت به ۴ روز بعد از گلدهی افزایش بیان داشت.

ژن (CUC) MLOC\_64057 در مرحله سوم، چهارم و پنجم جوانه‌زنی نسبت به کنترل افزایش بیان داشت (GSE23595\_2، GSE23595\_3 و GSE23595\_4). ژن (ATAF) MLOC\_59162 در مرحله دوم جوانه‌زنی نسبت به کنترل افزایش بیان داشت (GSE23595\_1). ژن‌های (NAC3) MLOC\_37104 و (CUC) MLOC\_57427 در کلیه مراحل جوانه‌زنی نسبت به کنترل کاهش بیان داشتند.

ژن (ATAF) MLOC\_59162 و (NAC3) MLOC\_37104، ۱۴ و ۲۱ روز پس از گرده‌افشانی در ژنوتیپ Karl و ژنوتیپ 10-11 در دانه نسبت به برگ کاهش بیان نشان دادند و ژن (CUC) MLOC\_57427 افزایش بیان نشان داد (GSE33413\_1، GSE33413\_2، GSE33413\_3 و GSE33413\_4). همچنین ژن (NAC1) MLOC\_64240 ۱۴ روز پس از گرده‌افشانی در ژنوتیپ Karl و ژنوتیپ 10-11 در دانه نسبت به برگ افزایش بیان نشان داد (GSE33413\_1 و GSE33413\_3).

ژن (ATAF) MLOC\_59162 و ژن (CUC) MLOC\_57427 در جو مالت در دو ژنوتیپ



شکل ۵. نقشه خوشه‌بندی سلسله مراتبی آزمایش‌های مراحل نموی برای HvNAC

به منظور استفاده از ژن‌ها در دست‌ورزی‌های ژنتیکی و انتقال ژن، باید ابتدا کلیه داده‌های بیوانفورماتیکی در مورد ژن‌ها جمع‌آوری، تجزیه و تحلیل، تفسیر و تلفیق گردد و سپس باید ارزیابی دقیق مطالعات کمیت‌سنجی RNA با استفاده از فن Real time PCR انجام گیرد تا بتوان ژن(های) منتخب برای یک پروژه اصلاحی را معرفی نمود.

در آنالیز بیان ژن، ژن‌های HvNAC در دامنه گسترده‌ای از بافت‌های مختلف، همچنین در شرایط تنش غیرزیستی و به مقدار نسبتاً کمتری در تنش زیستی بیان شدند. البته باید به این نکته توجه کرد که نتیجه‌گیری بر اساس مطالعات انجام‌شده توسط دیگر محققین می‌باشد و مطالعات عملکردی کافی روی تمام ژن‌های HvNAC انجام نشده است.

## REFERENCES

- 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. *Plant Cell Online*. 9: 841–857.
- Chen X, Wang Y, Lv B, Li J, Luo L, Lu S, Zhang X, Ma H, Ming F (2014) The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway. *Plant Cell Physiol* 55: 604–619.
- Demura T, Fukuda H (2007) Transcriptional regulation in wood formation. *Trends Plant Sci*. 12:64–70.
- Finn RD, Clements J, Eddy SR (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res*. 39: 29–37.
- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl [alpha]-amylase gene promoter. *Plant Cell Online* 7: 1879–1891.
- Gubler F, Raventos D, Keys M, Watts R, Mundy J, Jacobsen JV (1999) Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant J*. 17: 1–9.
- Hendelman A, Stav R, Zemach H, Arazi T (2013) The tomato NAC transcription factor SINAM2 is involved in flower-boundary morphogenesis. *J. Exp. Bot*. 64: 5497–5507.
- Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, Do Choi Y, Kim M, Reuzeau C, Kim JK (2010) Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiol*. 153: 185–197.



- Jupe F, Pritchard L, Etherington GJ, MacKenzie K, Cock PJA, Wright F, Sharma SK, Bolser D, Bryan GJ, Jones JDJ, Hein I (2012) Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome. *BMC Genomics* 13:75.
- Kato H, Motomura T, Komeda Y, Saito T, Kato A (2010) Overexpression of the NAC transcription factor family gene ANAC036 results in a dwarf phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 167: 571–577.
- Kim YS, Kim SG, Park JE, Park HY, Lim MH, Chua NH, Park CM (2006) A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 18: 3132–3144.
- Kozik A, Kochetkova E, Micheltore R (2002) GenomePixelizer--a visualization program for comparative genomics within and between species. *Bioinformatics* 18: 335–336.
- Lozano R, Ponce O, Ramirez M, Mostajo N, Orjeda G (2012) Genome-wide identification and mapping of NBS-encoding resistance genes in *Solanum tuberosum* group Phureja. *PLoS One* 7:e34775.
- Mallory AC, Dugas D V, Bartel DP, Bartel B (2004) MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr. Biol.* 14: 1035–1046.
- Mao C, Ding W, Wu Y, Yu J, He X, Shou H, Wu P (2007) Overexpression of a NAC-domain protein promotes shoot branching in rice. *New Phytol.* 176:288–298.
- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, *et al* (2007) NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 19:270–280.
- Nakashima K, Tran LSP, 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. *Plant J.* 51: 617–30.
- Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S (2010) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene.* 465: 30–44.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci.* 10: 79–87.
- Park J, Kim YS, Kim SG, Jung JH, Woo JC, Park CM (2011) Integration of auxin and salt signals by the NAC transcription factor NTM2 during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156: 537–549.
- Puranik S, Bahadur RP, Srivastava PS, Prasad M (2011) Molecular cloning and characterization of a membrane associated NAC family gene, SiNAC from foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]. *Mol. Biotechnol.* 49: 138–150.
- Quach TN, Tran LSP, Valliyodan B, Nguyen HT, Kumar R, Neelakandan AK, Guttikonda SK, Sharp RE, Nguyen HT (2014) Functional analysis of water stress-responsive soybean GmNAC003 and GmNAC004 transcription factors in lateral root development in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9:e84886.
- Ramaswamy M, Narayanan J, Manickavachagam G, Athiappan S, Arun M, Gomathi R, Ram B (2017) Genome wide analysis of NAC gene family “sequences” in sugarcane and its comparative phylogenetic relationship with rice, sorghum, maize and *Arabidopsis* for prediction of stress associated NAC genes. *Agri Gene* 3: 1–11.

- Redillas MC, Jeong JS, Kim YS, Jung H, Bang SW, Choi YD, Ha SH, Reuzeau C, Kim JK (2012) The overexpression of OsNAC9 alters the root architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 10: 792–805.
- Riechmann J, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105–2110.
- Saad ASI, Li X, Li HP, Huang T, Gao CS, Guo MW, Cheng W, Zhao GY, Liao YC (2013) A rice stress-responsive NAC gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses. *Plant Sci.* 203–204: 33–40.
- Saga H, Ogawa T, Kai K, Suzuki H, Ogata Y, Sakurai N, Shibata D, Ohta D (2012) Identification and characterization of ANAC042, a transcription factor family gene involved in the regulation of camalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25: 684–696.
- Shah ST, Pang C, Fan S, Song M, Arain S, Yu S (2013) Isolation and expression profiling of GhNAC transcription factor genes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) during leaf senescence and in response to stresses. *Gene* 531: 220–234.
- 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.
- Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol. Genet. Genomics* 284: 173–183.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- 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: 1298–1301.
- Voitsik A-M, Muench S, Deising HB, Voll LM (2013) Two recently duplicated maize NAC transcription factor paralogs are induced in response to *Colletotrichum graminicola* infection. *BMC Plant Biol.* 13:85.
- Wei S, Gao L, Zhang Y, Zhang F, Yang X, Huang D (2016) Genome-wide investigation of the NAC transcription factor family in melon (*Cucumis melo* L.) and their expression analysis under salt stress. *Plant Cell Rep.* 35: 1827–1839.
- Xia N, Zhang G, Liu XY, Deng L, Cai GL, Zhang Y, Wang XJ, Zhao J, Huang LL, Kang ZS (2010a) Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.* 37: 3703–3712.
- Xia N, Zhang G, Sun YF, Zhu L, Xu LS, Chen XM, Liu B, Yu YT, Wang XJ, Huang LL, Kang ZS (2010b) TaNAC8, a novel NAC transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiol Mol. Plant Pathol.* 74: 394–402.
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua N (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.*

- 14: 3024–3036.
- Xie Q, Guo H., Dallman G, Fang S, Weissman AM, Chua NH (2002) SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* 419: 167–170.
- Xiong Y, Liu T, Tian C, Sun S, Li J, Chen M (2005) Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Mol. Biol.* 59: 191–203.
- Yamaguchi M, Ohtani M, Mitsuda N, Kubo M, Ohme-Takagi M, Fukuda H, Demura T (2010) VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 1249–1263.
- Yang SD, Seo PJ, Yoon HK, Park CM (2011) The *Arabidopsis* NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR / RD genes. *Plant Cell* 23: 2155–2168.
- Yokotani N, Tsuchida-Mayama T, Ichikawa H, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Kaku H, Minami E, Nishizawa Y (2014) OsNAC111, a blast disease-responsive transcription factor in rice, positively regulates the expression of defense-related genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27: 1027–1034.
- Zhao Q, Gallego-Giraldo L, Wang H, Zeng Y, Ding SY, Chen F, Dixon RA (2010) An NAC transcription factor orchestrates multiple features of cell wall development in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 63: 100–114.
- Zhao Y, Sun J, Xu P, Zhang R, Li L (2014) Intron-mediated alternative splicing of WOOD-ASSOCIATED NAC TRANSCRIPTION FACTOR1B regulates cell wall thickening during fiber development in *Populus* species. *Plant Physiol.* 164: 765–776.
- Zheng X, Chen B, Lu G, Han B (2009) Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 985–989.
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye ZH (2008) A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 20: 2763–2782.
- Zhong R, Ye ZH (2007) Regulation of cell wall biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 564–572.