

# Sorgum (*Sorghum bicolor* L.)’da sülfat taşıyıcı (SULTR) genlerin kuraklık stresi altında ifadelerinin belirlenmesi

## Expression profiles of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) SULTR genes under drought stress

M. Aydın AKBUDAK

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya

Sorumlu yazar (Corresponding author): M. A. Akbudak, e-posta (e-mail): akbudak@akdeniz.edu.tr

### MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 09 Şubat 2018  
Düzeltilme tarihi 07 Mart 2018  
Kabul tarihi 07 Mart 2018

#### Anahtar Kelimeler:

Sorgum  
Kuraklık  
Sülfat  
SULTR genleri  
Gen ifadesi

### ÖZ

Küresel ısınmadan kaynaklanan iklim değişiklikleri nedeniyle kuraklık, özellikle son 20 yılda tarımsal üretimi kısıtlayan en önemli problem haline gelmiştir. Bitkilerin su yetersizliği şartlarına uyum sağlamalarına imkân sağlayacak mekanizmaların anlaşılması, kuraklık nedeniyle meydana gelen verim kayıplarına çözüm bulunması için oldukça önemlidir. Kükürt ve kükürt içeren bileşikler, bitkilerin kuraklık dâhil pek çok stres koşuluyla mücadele etmesinde çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. *Arabidopsis thaliana*’da 12 adet sülfat (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) taşıyıcı (SULTR) gen tanımlanmış olup, bu genler kodladıkları proteinlerin aminoasit dizilerindeki benzerlikler göz önüne alınarak dört gruba ayrılmışlardır. SULTR proteinleri bitkilerde sülfatın topraktan alınmasında ve bitki içerisinde taşınmasında çeşitli görevler üstlenmektedirler. Bu çalışmada sorgum (*Sorghum bicolor* L.) SULTR genlerinin (*SbSULTR*) kuraklık şartlarındaki ifadeleri incelenmiştir. Yapılan gen ifade analizleri, kuraklık stresi altında yapraklarda beş, köklerde ise altı *SbSULTR* geninin ifadesindeki artışa karşın, yapraklarda üç, köklerde ise iki *SbSULTR* geninin ifadesinin azaldığını göstermiştir. *SbSULTR4* geninin yapraklardaki ifadesinde yaklaşık yedi katlık bir artış tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kuraklık koşulları altında *SbSULTR* genlerinin ifadesinin büyük çoğunlukla arttığına ve sülfür içeren bileşiklerin sorgumun kuraklık ile mücadelesinde görev aldığına işaret etmektedir.

### ARTICLE INFO

Received 09 February 2018  
Received in revised form 07 March 2018  
Accepted 07 March 2018

#### Keywords:

Sorghum  
Drought  
Sulfate  
SULTR genes  
Gene expression

### ABSTRACT

Due to climate changes arising from global warming, drought has become a major problem restricting agricultural production for the last 20 years. Understanding mechanisms that help plants to get adjusted water deficiency is important to come up with yield loss on account of drought. Sulfur and sulfur-containing compounds have significant roles in plants to fight with several stress conditions including drought. Twelve sulfate transporter (SULTR) genes were initially identified in *Arabidopsis thaliana* and subdivided into four groups based on their protein sequence similarities. SULTR proteins have various functions in plants including sulfate uptake from soil and transportation of sulfate in plants. Expression profiles of *SbSULTR* genes in sorghum under drought condition were investigated in this study. Gene expression analyses showed that five *SbSULTR* genes in leaves and six in roots were up-regulated while three *SbSULTR* genes in leaves and two genes in roots were down-regulated. Approximately, seven fold up-regulation was detected in *SbSULTR4* in leaves. Consequently, results revealed that SULTR genes were mainly up-regulated under drought conditions, and sulfur containing compounds got employed in sorghum to battle drought.

## 1. Giriş

Kuraklık tarımsal üretimi etkileyen en önemli abiyotik strestir. Küresel ısınmadaki artışa paralel olarak daha da sık bir şekilde meydana gelmesi beklenen iklim değişiklikleri nedeniyle, sürdürülebilir tarımın önünde acil olarak çözülmesi gereken bir sorun olarak durmaktadır. Kuraklık kaynaklı ürün kayıplarıyla mücadele edebilmek için bitkilerin su sıkıntısına

uyum sağlamalarına imkân veren mekanizmaların anlaşılması büyük bir önem arz etmektedir.

Elementel kükürt (S) ve kükürt içeren bileşikler (hidrojen sülfid, glutatyon, fitoşelatin vb.) bitkilerin kuraklık kaynaklı stres koşullarıyla mücadele etmesinde çeşitli görevler almaktadırlar. Kükürt bitkiler tarafından topraktan sülfat

(SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) formunda alınmakta olup, önce sülfide (S<sup>-2</sup>) indirgenmekte daha sonra OASTL genleri aracılığıyla sisteine (Cys) dönüştürülmektedir. Çocuklar, yaşlılar ve bazı metabolik rahatsızlıkları olan bireyler için esansiyel bir aminoasit olan sistein ise bitkilerde proteinlerin, vitaminlerin, etilen ve bazı ko-faktörlerin yapısına girmektedir (Capaldi ve ark. 2015). Bitki hormonları, değişen çevre şartları ve stres koşullarına karşı bitkilerin adaptasyonu için hayati fonksiyonlara sahip olup, görev aldıkları iletim yollarını, su ve besin maddelerinin etkin kullanımını, bitkinin gelişim aşamalarını ve metabolizmasını kontrol etmektedirler (Peleg ve Blumwald 2011; Fatma ve ark. 2013). Bitki hormonları ve sülfat asimilasyonu arasında güçlü ve önemli bir ilişki mevcuttur (Maruyama-Nakashita ve ark. 2004; 2005; Kopriva 2006).

Yapılan çalışmalar kuraklık durumunda stoma iletkenliğini kontrol eden ana düzenleyici olan absisik asit (ABA) ile sülfatın yakın ilişkisi olduğunu göstermektedir (Wilkinson ve Davies 2002). Ernst ve ark. (2010) ABA'nın stomalara ulaşarak buharlaşmayı önleyici etkisini göstermesinde sülfatın ana sinyal olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Çevresel stres koşulları, bitkilerde neden oldukları reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimindeki artış ve sonucunda meydana gelen oksidatif stres nedeniyle genellikle bitki gelişimini olumsuz etkilemektedirler (Boaretto 2014). Artan bu reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyon yoluyla hücreye zarar vermesinin önlenmesi ve bozulan redoks dengesinin kurulması için stres koşulları altında bitki savunma sisteminde yer alan glutatyon, kükürtlü aminoasitler (sistein ve metionin), kükürtçe zengin proteinler, hidrojen sülfid (H<sub>2</sub>S), metallothioneinler ve fitoşelatinler gibi kükürtlü bileşiklerin fonksiyonları ve miktarlarında artış görülmektedir (Noctor 2006; Choudhury ve ark. 2013).

Sülfatın bitkiler tarafından topraktan alınması, bitki içerisinde dağıtılması ya da vakuolden sülfatın dışarı çıkarılmasında görev alan SULTR genlerinin saptanması ve tanımlanmasına yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur (Buchner ve ark. 2004). Bitkilerde bugüne kadar yaklaşık 12-16 adet SULTR kodlayan gen tanımlanmış olup, SULTR proteinlerinin amino asit dizi benzerlikleri göz önünde bulundurularak bu genler dört gruba ayrılmıştır (SULTR 1-4) (Davidian ve Kopriva 2010; Cao ve ark. 2013). Bu taşıyıcılardan köklerde sentezlenen, SULTR1;1 ve SULTR1;2'nin sülfata ilgisi yüksek olup, topraktaki S miktarının azalması durumunda sülfatı bitki köklerine taşımakta ve alımını sağlamaktadırlar (Takahashi ve ark. 2012). SULTR 2;1 ve SULTR2;2 ise sülfatın köklerden sürgünlere taşınmasında görev almaktadır. SULTR1 grubuna ait olan, SULTR1;3 floemde lokalize olmuştur ve yine sülfatın sürgünlerden köklere taşınmasında görev alır. SULTR3;1, SULTR3;2 ve SULTR3;3 yapraklarda sentezlenmekte olup sülfür asimilasyonunda görev almaktadır. Sülfatın bitki hücrelerindeki ana depolanma bölgesi vakuoldür. SULTR4;1 ve SULTR4;2 tonoplastların zarlarında lokalizedir ve hücre içerisinde kullanılmak üzere sülfatın vakuolden sitoplazmaya geçişinde rol almaktadır (Cao ve ark. 2013).

Sülfat taşıyıcıların abiyotik streslerle mücadeledeki görevleri konusunda yapılan çalışmalar oldukça yeni ve sınırlı sayıda olup (Cao ve ark. 2013; Tombuloglu ve ark. 2017; Akbudak ve ark. 2018) bu konuda yapılacak yeni çalışmalar sülfür ve sülfür içeren bileşiklerin stres koşulları altında bitki savunma mekanizmasındaki görevlerinin aydınlatılmasında faydalı olacaktır. Bu çalışmada *Sorghum bicolor*'da tanımlanmış 9 adet SULTR geninin (Akbudak ve ark. 2018) kuraklık stresi altında ifade profilleri ortaya konulmuştur.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Bitki materyali ve büyüme koşulları

Çalışmada kullanılan Öğretmenoğlu 77 çeşidine ait sorgum (*S. bicolor* L.) tohumları Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tohumlar 10 cm<sup>2</sup> büyüklüğünde torf içeren kaplara ekildikten sonra bitki büyüme kabininde büyütülmüşlerdir. Bitki büyüme kabinindeki sıcaklık 28 °C ve ışık rejimi 12 saat gece, 12 saat gündüz olacak şekilde ayarlanmıştır. Bitkiler 30 ml şebeke suyu ile günün aşırı sulanmıştır. Ekimden 14 gün sonra kontrol bitkileri sulanmaya devam edilirken, deneme bitkilerine su verilmemiştir. Fenotipik gözlemler hem kontrol hem de deneme bitkileri için günlük olarak yapılmıştır. Deneme bitkilerinde su stresi ile ilgili fenotipik değişikliklerin görülmeye başlamasını müteakip (sulama kesildikten 10 gün sonra) tüm bitkilerin yaprakları ve kökleri hasat edilerek RNA izolasyonunda kullanılmıştır.

### 2.2. RNA izolasyonu ve gen ifade analizleri

RNA izolasyonu her bitkinin kök ve yapraklarından RNA Plant Mini Kit (Qiagen) yardımıyla üreticinin protokolü takip edilerek yapılmıştır. Örneklerdeki RNA miktarı Biodrop µLİTE (Biodrop, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. DNA bulaşıklığını gidermek için örnekler RQ1 RNase-Free DNase (Promega, ABD) ile muamele edilmiştir. RNA örneklerinin kalitesini ve DNA bulaşıklığının devam edip etmediğini görmek üzere 500 ng RNA örneği % 1'lik agaroz jel üzerinde elektroforez yöntemiyle yürütülmüştür. Real Time-quantitative PCR (RT-qPCR) analizleri Light Cycler 96 (Roche) ile yapılmıştır. SULTR genlerinin ifadeleri DNase muamelesi görmüş 10 ng RNA ile SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) kullanılarak ölçülmüştür. RT-qPCR analizlerinde kullanılan primerler Primer 3 Input programı (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) yardımıyla tasarlanmış ve Macrogen (Amsterdam, Hollanda) tarafından sentezlenmiştir (Tablo 1).

Gen ifade analizlerinde  $\Delta\Delta C_T$  metodu (Livak ve Schmittgen 2001) kullanılmıştır. Serin/threonin – protein fofstafaz (PP2A) geni analizlerde referans gen olarak kullanılmıştır (Reddy 2016). Gen ifade analizleri için referans genin (PP2A)  $C_T$  değerleri hedef genlerin (SULTR)  $C_T$  değerlerinden çıkarılarak değerler normalize edilmiştir. Örneğin;

$$\Delta C_T = C_T (\text{SULTR}) - C_T (\text{PP2A})$$

$\Delta\Delta C_T$  değerleri ise kuraklık stresi uygulanmış bitkilerin  $\Delta C_T$  değerlerinin kontrol bitkilerinin  $\Delta C_T$  değerlerinden çıkarılmasıyla elde edilmiştir. .

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Kuraklık uygulanmış bitki}) - \Delta C_T (\text{Kontrol})$$

Her bir bitki için gen ifadesinin kaç kat arttığı ya da azaldığı ise aşağıda verilen eşitlik kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Değişim} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

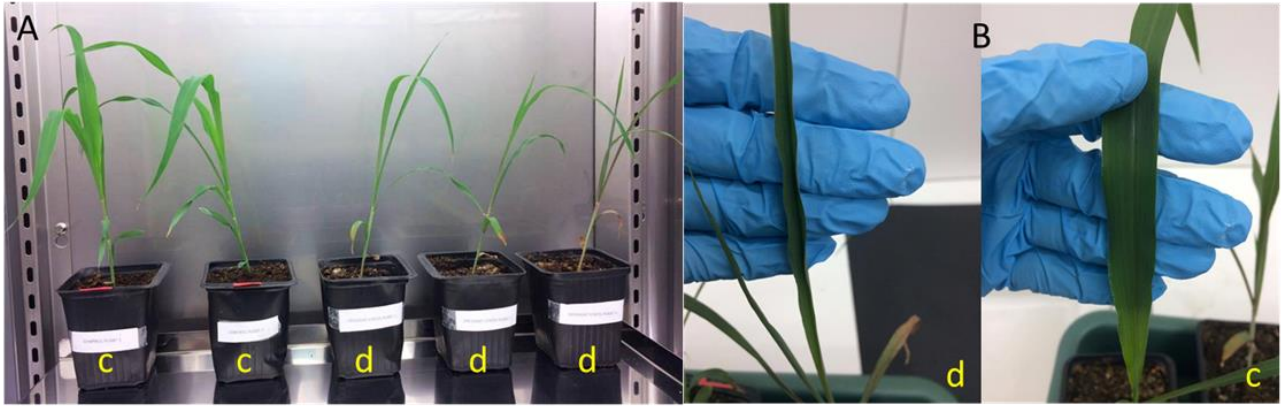
Kök ve yaprakların ortalama  $C_T$  değerleri her bir gen için en az üç teknik ve üç biyolojik tekrarlı verilerden elde edilmiştir.

## 3. Sonuçlar ve Tartışma

Kuraklık stresine maruz bırakılmış bitkilerde yapılan morfolojik gözlemlerde bitki büyümesinde gerileme, bitki gövdesinde ve yapraklarda inceleme gözlemlenmiştir (Şekil 1). Bu gerilemeler, kuraklık stresine maruz kalan bitkilerin

**Tablo 1.** SULTR genlerinin RT-qPCR analizleri için kullanılan primerler.**Table 1.** Primers used for RT-qPCR analysis of SULTR genes.

Genler	Forward primer sekansları	Reverse primer sekansları	PCR ürünü (bp)
<i>SbSULTR1;3</i>	5'-AAGGGTGACTTCATCGCTGG-3'	5'-TGTAICTAAGCGGGTGTGTC-3'	244
<i>SbSULTR2;1</i>	5'-TCTCCAGAACGGCAGTGAAC-3'	5'-CCAATCTCCACCGACCCAAA-3'	268
<i>SbSULTR2;2</i>	5'-GGATGGCAGGTGATCCACAA-3'	5'-TTCGCCAACCGTCAGAAAGA-3'	81
<i>SbSULTR3;1</i>	5'-CAGGCTGGGGACATTCAAGT-3'	5'-AGTCCACGATGAACCCCAAC-3'	344
<i>SbSULTR3;2</i>	5'-CTTGATAGGTGCTGGGTGGT-3'	5'-GTAGTCCCGTGCCTCCATA-3'	207
<i>SbSULTR3;3</i>	5'-TCATAGGGGAGGAGTGGGTG-3'	5'-AAAAGATCTCTGTAGCGCGT-3'	77
<i>SbSULTR3;4</i>	5'-TGGCACTGACTGTGATGGTC-3'	5'-GCCAAGATCAAGAACCCCGGA-3'	364
<i>SbSULTR3;5</i>	5'-ATCATGAGCCAGATGAGGCG-3'	5'-GGTCCTGCCCAATCAAAGA-3'	257
<i>SbSULTR4</i>	5'-GTGGAAATCCCCAGCATCA-3'	5'-AAGGTGAGCATGTTCCGCTGA-3'	78
<i>SbPP2A</i>	5'-AACCCGCAAACCCAGACTA-3'	5'TACAGGTCGGGCTCATGGAAC-3'	138

**Şekil 1.** On günlük kuraklık stresinin sorgum bitkilerindeki etkisi. (A) Kuraklığa maruz kalmış bitkilerde bitki gelişimi gerilemiş, su kaybını azaltmak için yapraklar dikleşmiş ve yaprak sayısı azalmıştır. (B) Kuraklığa maruz kalmış bitkilerde yaprak alanı küçülmüştür. d: Kuraklık, c: Kontrol.**Figure 1.** Effect of 10-day drought stress in sorghum plants. (A) Plant development is retarded, leaves are erected, and leaf numbers are reduced in drought-stressed plants. (B) Leaf area is reduced in drought-stressed plants. d: Drought-stressed plants, c: Control.

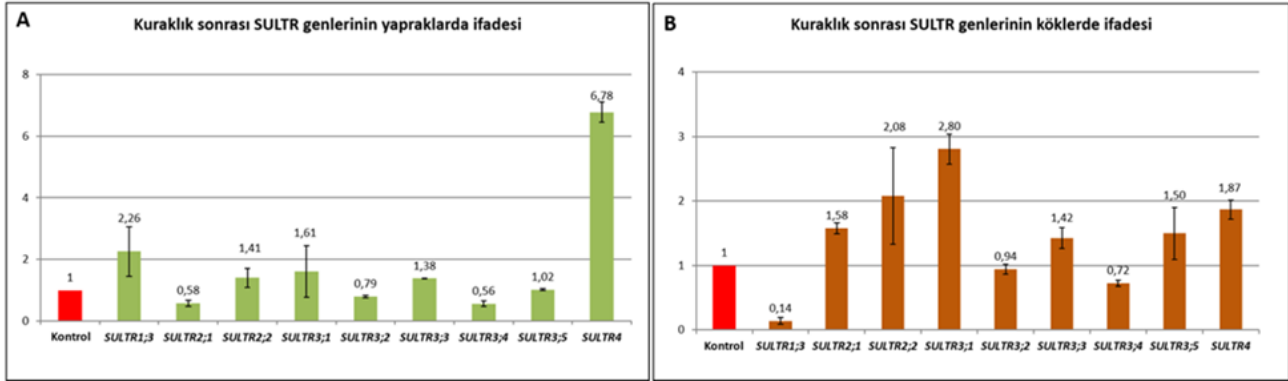
hücrelerinde turgor basıncındaki düşüş, enzim aktivitelerindeki bozulma ve enerji miktarındaki düşüşten kaynaklanabilir. Kuraklık stresine maruz kalmış bitkilerde benzer belirtiler daha önce yapılmış çalışmalarda da rapor edilmiştir (Bosabalidis ve Kofidis 2002; Farooq ve ark. 2010; Taiz ve Zeiger 2010).

SULTR genlerinin fonksiyonlarını araştırmak için, Akbulak ve ark. (2018) tarafından tanımlanmış dokuz adet *SbSULTR* geninin ifadesi 10 gün kuraklığa maruz bırakılmış sorgum bitkilerinde RT-qPCR kullanılarak incelenmiştir. Bu genlerden *SULTR1;3*, *SULTR2;2*, *SULTR3;1*, *SULTR3;3*, *SULTR4*'ün yapraklarda ifadesinin arttığı (up-regulated), *SULTR2;1*, *SULTR3;2*, *SULTR3;4*'ün ifadesinin azaldığı (down-regulated), *SULTR3;5*'in ifadesinde herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 2A). Köklerde ise *SULTR2;1*, *SULTR2;2*, *SULTR3;1*, *SULTR3;3*, *SULTR3;5* ve *SULTR4* genlerinin ifadesinin arttığı, *SULTR1;3* ve *SULTR3;4* genlerinin ifadesinin azaldığı *SULTR3;2*'nin ifadesinin kontrol bitkilerine kıyasla değişmediği görülmüştür (Şekil 2B). *SULTR2* grubuna ait genlerin ifadelerinin köklerdeki ifade seviyelerinin yapraklardaki ifade seviyelerinden 2 – 3 kat daha fazla olması kuraklık stresi altında köklerden sürgünlere sülfat taşınması için köklerde *SULTR2* grubu proteinlere daha fazla ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

*SULTR3* grubuna ait genlerin abiyotik streslerde ifadesinin arttığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Gallardo ve ark. (2014) *Medicago truncatula* da yaptıkları çalışmada *SULTR3;1* ve *SULTR3;5*'in sırasıyla tuzluluk ve kuraklık stresi altında bitki

köklerinde yüksek miktarda ifade edildiğini bildirmişlerdir. Tombuloglu ve ark. (2017) ise *Brachypodium distachyon*'da *BdSULTR3;1* geninin ifadesinin kuraklık stresi altında arttığını göstermişlerdir. Cao ve ark. (2013) *Arabidopsis*'te *AtSULTR3;1*'in ABA'nın hücre tarafından sentezlenmesinde görev alan sisteine sülfat sağlayarak bitkilerin çevresel streslerle mücadelesinde görev aldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalarla paralel olarak bizim çalışmamızda da incelenen *SULTR3* grubuna dahil beş gen içerisinde en fazla aktive olan genin *SbSULTR3;1* olduğu, köklerde ve yapraklarda ifadesinin diğer *SULTR3* grubu genlere göre yaklaşık 2 – 3 kat daha fazla olduğu görülmüştür.

Tüm *SbSULTR* genleri içerisinde kuraklık stresi altında ifadesi en yüksek genin kontrol genine göre yapraklarda 7 kat daha fazla ifade edilen *SULTR4* geni olduğu görülmektedir. *SULTR4* geni köklerde de kontrol bitkilerine göre yaklaşık 2 kat daha fazla ifade edilmektedir. *SULTR4* geninin yapraklardaki ifadesindeki bu dramatik artış kuraklık stresi altında bitkinin bu stresle mücadelede etmesini sağlayan ABA ve glutatyon gibi kükürt içeren bileşiklere ihtiyacının artmış olabileceğine, bu nedenle *SULTR4* genleri yardımıyla vakuollerden sitoplazmaya yüksek miktarda sülfat taşındığına işaret etmektedir. Ayrıca gen ifade verileri, *SULTR* geninin dâhil olduğu grubun ve doku tipinin *SULTR* genlerinin ifade seviyelerini etkilediğini de ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak; sorgum bitkisinde kuraklık stres koşulları altında, *SULTR* genlerinin mücadelede aktif olarak rol aldığı görülmüştür.



**Şekil 2.** 10 gün kuraklık stresi uygulanmış sorgum bitkilerinde SULTR genlerinin yapraklarda (A) ve köklerde (B) ifade analizi. SULTR ifade verileri *SbPP2A* geni ifadesine göre normalize edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

**Figure 2.** The expression analyses of sorghum SULTR (*SbSULTR*) genes in response to 10-day drought exposure in leaves (A) and roots (B). The expressions were normalized using *SbPP2A* gene. Error bar shows the standard deviation in relative expressions of three replicates.

## Teşekkür

Teknik yardımlarından dolayı Kübra Kontbay'a teşekkür ederim.

## Kaynaklar

- Akbulak M, Filiz E, Kontbay K (2018) Genome-wide identification and cadmium induced expression profiling of sulfate transporter (SULTR) genes in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Biometals* 31: 91-105 doi: 10.1007/s10534-017-0071-5.
- Boaretto L, Carvalho G, Borgo L, Creste S, Landell M, Mazzafera P, Azevedo R (2014) Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes *Plant Physiology and Biochemistry* 74: 165-175 doi: 10.1016/j.plaphy.2013.11.016.
- Bosabalidis A, Kofidis G (2002) Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars *Plant Science* 163: 375-379 doi: 10.1016/S0168-9452(02)00135-8.
- Buchner P, Takahashi H, Hawkesford M (2004) Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport *Journal of Experimental Botany* 55: 1765-1773 doi: 10.1093/jxb/erh206.
- Cao M, Wang Z, Wirtz M, Hell R, Oliver D, Xiang C (2013) SULTR3;1 is a chloroplast-localized sulfate transporter in *Arabidopsis thaliana* *Plant Journal* 73: 607-616 doi: 10.1111/tbj.12059.
- Capaldi F, Gratao P, Reis A, Lima L, Azevedo R (2015) Sulfur Metabolism and Stress Defense Responses in Plants *Tropical Plant Biology* 8: 60-73 doi: 10.1007/s12042-015-9152-1.
- Choudhury S, Panda P, Sahoo L, Panda SK (2013) Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress *Plant Signal Behav* 8: e23681 doi: 10.4161/psb.23681.
- Davidian J, Kopriva S (2010) Regulation of Sulfate Uptake and Assimilation-the Same or Not the Same? *Molecular Plant* 3: 314-325 doi: 10.1093/mp/ssq001.
- Ernst L, Goodger JQ, Alvarez S, Marsh EL, Berla B, Lockhart E, Jung J, Li P, Bohnert HJ, Schachtman DP (2010) Sulphate as a xylem-borne chemical signal precedes the expression of ABA biosynthetic genes in maize roots *Journal of Experimental Botany* 61: 3395-3405 doi: 10.1093/jxb/erq160.
- Farooq M, Kobayashi N, Ito O, Wahid A, Serraj R (2010) Broader leaves result in better performance of indica rice under drought stress *Journal of Plant Physiology* 167: 1066-1075 doi: 10.1016/j.jplph.2010.03.003.
- Fatma M, Khan MIR, Masood A, Khan NA (2013) Coordinate changes in assimilatory sulfate reduction are correlated to salt tolerance: Involvement of phytohormones *Annual Review & Research in Biology*. 3. 267-295.

Gallardo K, Courty P, Le Signor C, Wipf D, Vernoud V (2014) Sulfate transporters in the plant's response to drought and salinity: regulation and possible functions *Frontiers in Plant Science* 5 doi: 10.3389/fpls.2014.00580.

Kopriva S (2006) Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Ann Bot* 97: 479-495 doi.org/10.1093/aob/mcl006.

Livak K, Schmittgen T (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C) method *Methods* 25: 402-408 doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H (2004) Induction of SULTR1;1 sulfate transporter in *Arabidopsis* roots involves protein phosphorylation/dephosphorylation circuit for transcriptional regulation *Plant and Cell Physiology* 45: 340-345 doi: 10.1093/pcp/pch029.

Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H (2005) Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots *Plant Journal* 42: 305-314 doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02363.x.

Noctor G (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples *Plant Cell and Environment* 29: 409-425 doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01476.x.

Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants *Current Opinion in Plant Biology* 14: 290-295 doi: 10.1016/j.pbi.2011.02.001.

Reddy PS, Reddy DS, 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. *Front Plant Sci* 7 doi.org/10.3389/fpls.2016.00529.

Taiz L, Zeiger E (2010) *Plant Physiology*. 5th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

Takahashi H, Buchner P, Yoshimoto N, Hawkesford M, Shiu S (2012) Evolutionary relationships and functional diversity of plant sulfate transporters *Frontiers in Plant Science* 2 doi: 10.3389/fpls.2011.00119.

Tombuloglu H, Filiz E, Aydin M, Koc I (2017) Genome-wide identification and expression analysis of sulphate transporter (SULTR) genes under sulfur deficiency in *Brachypodium distachyon* *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 26: 263-273 doi: 10.1007/s13562-016-0388-0.

Wilkinson S, Davies W (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants *Plant Cell and Environment* 25: 195-210 doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00824.x.