

مطالعه بیوانفورماتیکی خانواده ژنی *BES1* در گستره ژنوم *Vitis vinifera* L.

علیرضا لادن مقدم\*

گروه باغبانی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۳)

Genome wide bioinformatics analysis *BES1* gene family in *Vitis vinifera* L.

Alireza Ladan Moghadam\*

Department of Horticulture, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran.

(Received: Jun. 9, 2020 - Accepted: Sep. 23, 2020)

## Abstract

Brassinosteroids (BRs) are the plant-specific steroidal hormones that regulate a broad spectrum of plant growth and developmental processes under normal conditions and various biotic, and abiotic stresses. *BES1* transcription factors regulate the expression of brassinosteroid-responsive genes. Completion of the grape genome sequencing enabled us to undertake a genome-wide identification of the gene families in this plant. Therefore, we performed a genome-wide investigation of *BES* genes in grape. The physicochemical properties, phylogeny tree, gene structure, conserved motifs, cis-acting elements, miRNA, and gene chip expression of the grape *BES1* transcription factors were analyzed using the bioinformatics tools. The results showed that the grape *BES1* transcription factors had seven members, which clustered into three subgroups according to the phylogenetic analysis. Each subgroup was well defined by the conserved motifs, implying that close genetic relationships could be identified among the members of each subgroup. According to the chromosomal locations, 1, 1, 2, 1, 1, and 1 genes were located on chromosomes 2, 4, 10, 15, 18, and 19, respectively. The analysis of cis-acting elements indicated that *BES1* genes contained response elements of hormones and abiotic stresses, as well as organ-specific elements. The miRNA target analysis indicated that *VvBES1-1*, *VvBES1-3*, and *VvBES1-5* contained miRNA target position in grape. Gene chip expression profile analysis revealed that the expression patterns of the grape *BES1* genes were different in different organs and developmental stages. The analysis of this gene family would provide some theoretical basis for understanding the evolution and function of the *BES1* genes in the grape.

**Keywords:** Brassinosteroid, Bioinformatics, Expression Profile, Transcription Factor.

## چکیده

برازینواستروئیدها (Brassinosteroids) هورمون‌های استروئیدی گیاهی هستند که کارکرد متنوعی در تنظیم طیف وسیعی از فرآیندهای رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. عوامل رونویسی *BES1* در تنظیم بیان ژن‌های واکنش‌گر به برازینواستروئید نقش حیاتی دارند. تکمیل توالی‌یابی ژنوم انگور محققان را قادر ساخته است که خانواده‌های ژنی را در گستره ژنوم انگور شناسایی و مطالعه کنند. لذا در این تحقیق ژن‌های خانواده *BES1* شناسایی و مطالعه شد. ویژگی‌های فیزیوشیمیایی، درخت فیلوژنی، ساختار ژنی، موتیف‌های حفاظت شده، عناصر تنظیمی، تنظیم بیان پس از رونویسی و پروفایل بیانی ژن‌های شناسایی شده انجام شد. نتایج نشان داد که انگور دارای هفت ژن *BES1* می‌باشد که بر اساس آنالیز فیلوژنتیکی در ۳ زیر گروه قرار می‌گیرند. هر زیرگروه موتیف‌های حفاظت شده داشته که نشان‌دهنده روابط ژنتیکی نزدیک در بین اعضای هر زیر گروه است. بر اساس جایگاه کروموزومی ۱، ۱، ۲، ۱، ۱ و ۱ ژن به ترتیب بر روی کروموزوم‌های ۲، ۴، ۱۰، ۱۵، ۱۸ و ۱۹ قرار دارند. آنالیز ناحیه پیش‌بر ژن‌های *BES1* نشان داد که این ژن‌ها دارای عناصر پاسخ به هورمون‌ها، تنش‌ها و نیز اختصاصی بافت می‌باشند. همچنین ژن‌های *VvBES1-1*، *VvBES1-3* و *VvBES1-5* دارای جایگاه اتصال مولکول‌های miRNA هستند. پروفایل بیانی این ژن‌ها بر اساس داده‌های ریزآرایه حاکی از الگوی بیانی متفاوت ژن‌های *BES1* انگور در بافت‌ها در مراحل نمو مختلف می‌باشد. مطالعه این خانواده اساس تئوریتیکال لازم برای درک تکامل و کارکرد خانواده ژنی *BES1* در انگور را مهیا می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** برازینواستروئید، بیوانفورماتیک، پروفایل بیانی، فاکتور رونویسی.

## مقدمه

گیاهان موجوداتی هستند که رشد و نمو آن‌ها به‌طور دائم تحت تأثیر محرک‌های محیطی قرار دارد (Li *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 1996). تنش‌ها به دو دسته تنش‌های غیرزیستی شامل انواع شرایط محیطی نامطلوب (خشکی، غرقابی، شوری، آلودگی فلزات سنگین، کمبود مواد مغذی، درجه حرارت کم و زیاد) و تنش‌های زیستی ناشی از حمله موجودات زنده (باکتری، ویروس، قارچ، نماتد و سایر گیاهان) تقسیم می‌شوند (Liu *et al.*, 2014). برای زنده ماندن در شرایط تنش، مکانیسم‌های پیچیده‌ای در گیاهان تکامل یافته‌اند تا محرک‌های محیطی را درک کرده و از طریق مسیرهای انتقال سیگنال، پیام‌ها را ارسال و به تنش‌های گوناگون پاسخ دهند که هر یک از آن‌ها ممکن است شامل صدها پروتئین باشد (Sharma *et al.*, 2013; Sami & Alemzadeh 2016). از جمله ترکیبات مهم و مؤثر در رشد و پاسخ گیاه به تنش هورمون‌ها هستند. هورمون‌های گیاهی عموماً به‌صورت ترکیبات پیام‌رسان فعال هستند (Peres *et al.*, 2019). هورمون‌ها به‌طور گسترده در تمام قسمت‌های گیاه توزیع شده و در گیاهان مختلف در اندام‌هایی مانند ریشه، شاخه، برگ و گل تولید می‌شوند (Jiang and Asami 2018). در حدود 40 سال پیش کلاس جدیدی از هورمون‌ها تحت عنوان برازینواستروئیدها شناسایی و کارکرد آن به‌صورت مستقل یا در ترکیب با سایر هورمون‌ها مطالعه شد (Peres *et al.*, 2019). با توسعه فن‌آوری‌های اخیر در بیوشیمی و زیست‌شناسی مولکولی و با استفاده از انواع جهش یافته‌ها پیشرفت زیادی در مطالعه انتقال پیام BR انجام شده است (Luo *et al.*, 2010). مطالعات نشان می‌دهد که جهش یافته‌های براسینواستروئیدها در بیوسنتز BR یا در مسیر انتقال پیام آن، نقص داشته و منجر به بروز یک سری فنوتیپ‌های خاص از قبیل کوتولگی، عقیمی، تاخیر

در گلدهی، پیری و تحمل به خشکی می‌گردد (Feng *et al.*, 2015; Clouse 2011).

امروزه مشخص شده است که این هورمون در تنظیم فرآیندهای نمو نظیر نمو بذر، طویل شدن ساقه، رشد لوله‌گرد، تمایز سلول‌های آوند چوبی و پیری نقش دارد. هورمون برازینواستروئید همچنین در پاسخ به تمامی تنش‌های محیطی مانند شوری، خشکی، سرما، زخم و پاتوژن دارای کارکرد می‌باشد (Song *et al.*, 2018).

فاکتورهای رونویسی پروتئین‌هایی هستند که به یک توالی نوکلئوتیدی خاص در بخش پیش‌بر ژن متصل شده و نقش مهمی در تنظیم کارکرد ژن با فعال کردن یا مهار رونویسی ژن‌های هدف ایفا می‌کنند. فاکتورهای رونویسی همچنین می‌تواند طیف گسترده‌ای از مکانیسم‌های دفاعی را در گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی فعال کند (Century *et al.*, 2008). از جمله فاکتورهای رونویسی مؤثر در مسیر پیام‌رسانی BR، ژن‌های BES1/BZR1 هستند. این دو ژن نقش مهمی در کنترل بیان صدها ژن داشته و از این طریق BR را قادر به تأثیر بر روی برنامه‌های رشدی و دفاعی گیاه می‌کند (Nolan *et al.*, 2017).

ژن BES1/BZR1 در حضور پیام‌های مربوط به BR، تحت تأثیر آنزیم PP2A سریعاً دفسفریله و فعال می‌شوند (Tang *et al.*, 2011). این عوامل فعال شده به هسته انتقال یافته و به موتیف‌های E-box (-CANNTC) و BRRE (CGTGT/CG) ژن‌های واکنش‌گر به BR متصل شده و بیان آن‌ها را متأثر می‌کنند که به‌نوبه خود موجب شروع زنجیره‌ای از پاسخ‌های وابسته به BR می‌شود (Yin *et al.*, 2005; Manoli *et al.*, 2018). در غیاب هورمون

1. Brassinazole-Resistant
2. Brassinosteroid Insensitive 1-Ems-Suppressor 1
3. Protein Phosphatase 2a

برازینواستروئید BES1/BZR1 با فعالیت آنزیم BIN2 فسفریله و غیرفعال می‌شود (Li et al., 2001).

برازینواستروئید *BZR1* همولوگ *BES1* بوده و شباهت قابل توجهی در سطح اسید آمینه (۸۸٪) و دومین انتهای آمینو (۹۷٪) با آن دارد. دمین انتهای آمینو *BES1* و *BZR1* شامل یک دمین <sup>۲</sup>bHLH متصل شونده به DNA می‌باشد (Saha et al., 2015). *BZR1* واسطه القای تولید BR و مهارکننده فیدبک<sup>۳</sup> بیوستنتز آن است (Wang et al., 2002).

فاکتورهای رونویسی *BES1* نه تنها در پیام رسانی BR بلکه در انتقال پیام مسیره‌های مربوط به آبسزیک اسید، جیبرلین، نور و تنش نیز مشارکت دارند (Yu et al., 2019). مشخص شده است که فاکتور رونویسی *BES1* از بیان ژن *ABI3*<sup>۴</sup> که در مسیر پیام‌رسانی ABA نقش دارد ممانعت می‌کند. این عدم بیان به نوبه خود بر روی فعالیت ژن *ABI5*<sup>۵</sup> تأثیر گذاشته و نمو گیاهچه متوقف می‌شود (Lopez-Molina et al., 2002). نور UV-B موجب کاهش بیان ژن *BES1* شده و بر روی فوتومورفوزن<sup>۶</sup> تأثیر می‌گذارد (Liang et al., 2018). انتقال ژن *ZmBES1* به اراییدوپسیس موجب طولیل شدن بافت و اندازه بذر می‌شود. این فاکتور رونویسی با اتصال به پروموتور ژن‌های GEACE و KRP6 آراییدوپسیس بیان این دو ژن را تنظیم و اندازه بافت‌ها را کنترل می‌کند (Zhang et al., 2020). فاکتورهای رونویسی *BES1* در پاسخ گیاه به تنش نیز مؤثر هستند. مطالعه انجام شده بر روی ژن *BES1* گیاه توس (*Betula*

## مواد و روش‌ها

### شناسایی ژن‌های *BES1* انگور

برای شناسایی اعضای خانواده ژنی *BES1* در انگور، توالی پروتئین *BES1* آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) و برنج (*Oryza sativa*) به عنوان توالی

برازینواستروئید BES1/BZR1 با فعالیت آنزیم BIN2 فسفریله و غیرفعال می‌شود (Li et al., 2001).

*BZR1* همولوگ *BES1* بوده و شباهت قابل توجهی در سطح اسید آمینه (۸۸٪) و دومین انتهای آمینو (۹۷٪) با آن دارد. دمین انتهای آمینو *BES1* و *BZR1* شامل یک دمین <sup>۲</sup>bHLH متصل شونده به DNA می‌باشد (Saha et al., 2015). *BZR1* واسطه القای تولید BR و مهارکننده فیدبک<sup>۳</sup> بیوستنتز آن است (Wang et al., 2002).

فاکتورهای رونویسی *BES1* نه تنها در پیام رسانی BR بلکه در انتقال پیام مسیره‌های مربوط به آبسزیک اسید، جیبرلین، نور و تنش نیز مشارکت دارند (Yu et al., 2019). مشخص شده است که فاکتور رونویسی *BES1* از بیان ژن *ABI3*<sup>۴</sup> که در مسیر پیام‌رسانی ABA نقش دارد ممانعت می‌کند. این عدم بیان به نوبه خود بر روی فعالیت ژن *ABI5*<sup>۵</sup> تأثیر گذاشته و نمو گیاهچه متوقف می‌شود (Lopez-Molina et al., 2002). نور UV-B موجب کاهش بیان ژن *BES1* شده و بر روی فوتومورفوزن<sup>۶</sup> تأثیر می‌گذارد (Liang et al., 2018). انتقال ژن *ZmBES1* به اراییدوپسیس موجب طولیل شدن بافت و اندازه بذر می‌شود. این فاکتور رونویسی با اتصال به پروموتور ژن‌های GEACE و KRP6 آراییدوپسیس بیان این دو ژن را تنظیم و اندازه بافت‌ها را کنترل می‌کند (Zhang et al., 2020). فاکتورهای رونویسی *BES1* در پاسخ گیاه به تنش نیز مؤثر هستند. مطالعه انجام شده بر روی ژن *BES1* گیاه توس (*Betula*

1. Brassinosteroid-Insensitive 2

2. Basic Helix-Loop-Helix

3Feedback

4. Abscisic Acid Insensitive 3

5Abscisic Acid Insensitive 5

6. Photomorphogenesis

### ساختار ژنی و موتیف‌های حفاظت شده ژن‌های *BES1* انگور

ساختار ژنی (تعداد و طول اگزون/اینترون) و فاز اسپلایسینگ خانواده ژنی *BES1* انگور با استفاده از سایت GSDS2.0 بررسی شد (Hu et al., 2015). این آنالیز از طریق مقایسه توالی DNA ژنومی و کدکننده (CDS) هر ژن انجام شد. برای شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده توالی پروتئینی *BES1* از سرور MEME استفاده شد که در آن پارامترها شامل تعداد موتیف شناسایی‌شده حداکثر ۵ عدد و طول موتیف‌های شناسایی‌شده بین ۶ تا ۵۰ اسید آمینه می‌باشد (Bailey et al., 2009).

### آنالیز پروموتور و شناسایی miRNAهای درگیر با ژن‌های *BES1* انگور

ناحیه 1500 جفت باز بالادست کدون شروع ژن‌های *BES1* انگور به‌عنوان ناحیه پروموتوری با هدف شناسایی Cis element‌های در PlantCare مورد ارزیابی قرار گرفت (Lescot et al., 2002). سپس عناصر تنظیمی شناسایی‌شده بر اساس کارکرد گروه‌بندی‌شده و فراوانی هر عنصر تنظیمی شمارش و ارائه شد. از سرور psRNATarget و امتیاز مورد انتظار (Expectation) بالای ۴ برای پیش‌بینی miRNAهایی که در تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌های *BES1* انگور استفاده شد (Dai et al., 2018). پایگاه داده psRNATarget شامل miRNAهای شناخته شده گیاهان مختلف می‌باشد که با انتخاب گیاه هدف و با ارائه توالی ژن‌های مورد مطالعه، مولکول‌های miRNA شناخته شده اختصاصی گیاه مربوطه که توانایی اتصال به آن ژن را دارند را شناسایی می‌کند.

اولیه جهت blastP با پارامترهای  $E\text{-Value} \leq 10^{-10}$ ، ماتریکس مقایسه BLUSUM62 و طول عبارت (W) سه در پایگاه داده فایتوزوم بر علیه پروتئوم انگور استفاده شد (Goodstein et al., 2012). پس از دریافت تمام توالی‌ها، توالی‌های تکراری حذف و وجود دمین کارکردی *BES1-N* با استفاده از سرور Pfam در توالی‌های پروتئینی غیر تکراری ارزیابی شد (El-Gebali et al., 2019). توالی‌های حاوی این دمین به‌عنوان ژن‌های *BES1* انگور انتخاب شدند. نامگذاری ژن‌ها بر اساس جایگاه کروموزومی آن‌ها بر روی ۱۹ کروموزوم انگور انجام شد. ویژگی‌های عمومی پروتئین‌های *BES1* مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و طول پروتئین با استفاده از ابزار ProtParam سرور Expasy دریافت (Artimo et al., 2012) و جایگاه فعالیت آنزیم‌ها در سلول با استفاده از سرور CELLO مشخص شد (Yu et al., 2006). بررسی حفاظت‌شدگی دمین *BES1\_N* از طریق هم‌ردیف‌سازی توالی پروتئین‌های *BES1* انگور با استفاده از ClustalX انجام شد (Larkin et al., 2007).

### درخت فیلوژنتیکی ژن‌های *BES1* انگور

هم‌ردیف‌سازی طول کامل توالی پروتئین *BES1* های شناسایی‌شده انگور، آرآبیدوپسیس و برنج با استفاده از ClustalX انجام شد (Larkin et al., 2007). در مرحله بعد نتیجه الاینمنت در فرمت fasta برای رسم درخت فیلوژنتیکی به نرم افزار MEGA7 ارائه شد (Kumar et al., 2016). با استفاده از الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه‌ها (NJ) درخت فیلوژنتیکی رسم شد. صحت درخت رسم شده با استفاده از آزمون بوت‌استرپ با تکرار ۱۰۰۰ ارزیابی شد.

در آنالیز مقایسه ژنومی ژن‌های *BES1* در ۱۶ گونه مختلف مشخص شد که تعداد این ژن‌ها در گیاهان عالی بسیار بیشتر از گیاهان اولیه می‌باشد. این پدیده نشان می‌دهد که افزایش ژن‌های *BES1* بعد از انشقاق گیاهان عالی و اولیه صورت گرفته است (Cao et al., 2020). علاوه بر این مشخص شده است مکانیسم افزایش تعداد اعضای خانواده ژنی *BES1* در گیاهان متنوع بوده و تعداد ژن‌های *BES1* هر گیاه با اندازه ژنومی و نیز مضاعف‌شدگی‌های احتمالی رابطه وجود دارد (Li et al., 2016; Wu et al., 2018). به‌عنوان مثال تعداد ژن‌های *BES1* در صنوبر با اندازه ژنومی ۴۲۲/۹ مگاجفت‌باز ۱۴ عدد می‌باشد، درحالی‌که در سیب (*Malus domestica*) ۲۲ ژن *BES1* شناسایی شده است زیرا اندازه ژنوم سیب 881 مگاجفت‌باز می‌باشد (Cao et al., 2020). از سوی دیگر انگور با اندازه ژنومی ۴۸۷ مگاجفت‌باز ۷ ژن *BES1* دارد. نسبت ژن‌های *BES1* به ژنوم در انگور ۰/۰۱۴ و برای صنوبر ۰/۰۳۳ می‌باشد. لذا احتمالاً در صنوبر مضاعف‌شدگی در طی تکامل تعداد ژن‌های *BES1* را افزایش داده‌اند.

انطباق چندگانه توالی پروتئین‌های فاکتور رونویسی *BES1* با استفاده از ClustalX با هدف بررسی اسیدهای آمینه حفاظت شده انجام شد. نتیجه این انطباق چندگانه نشان داد که دمین کارکردی *BES1\_N* که در انتهای آمینو تمام این توالی‌ها حضور داشته بسیار حفاظت شده بوده و بین ۷۸ تا ۱۵۰ اسیدآمینه طول دارد. دمین *BES1\_N* در پایگاه داده Pfam (El-Gebali et al., 2019) به‌عنوان دمین حفاظت‌شده فاکتورهای رونویسی *BES1\_N* با شماره دسترسی PF05687 معرفی شده است و از نظر کارکردی یک bHLH می‌باشد. این دمین توانایی اتصال به عناصر تنظیمی E-box و پاسخ به برازینواستروئید در پروموتور ژن‌های متأثر از این هورمون را دارد (Sun et al., 2010) (شکل ۱).

## پروفایل بیانی ژن‌های *BES1* انگور

پروفایل بیانی ژن‌های *BES1* انگور با استفاده از داده‌های ریزآرایه پایگاه داده efpBrowser ارزیابی شد (Waese & Provart 2016). این داده‌ها مربوط به ۵۴ بافت انگور در مراحل نموی مختلف هستند که در پلتفرم NimbleGen و در سه تکرار در این پایگاه داده ارائه شده است. بر اساس اطلاعات مربوط به این سری داده با شماره دسترسی GSE36128 در سایت GEO، این داده‌های ریزآرایه بیان ۹۳ درصد ژن‌های انگور را پوشش می‌دهد (Barrett et al., 2012). رسم نقشه حرارتی با استفاده از سرور ClustVis انجام شد (Metsalu and Vilo 2015).

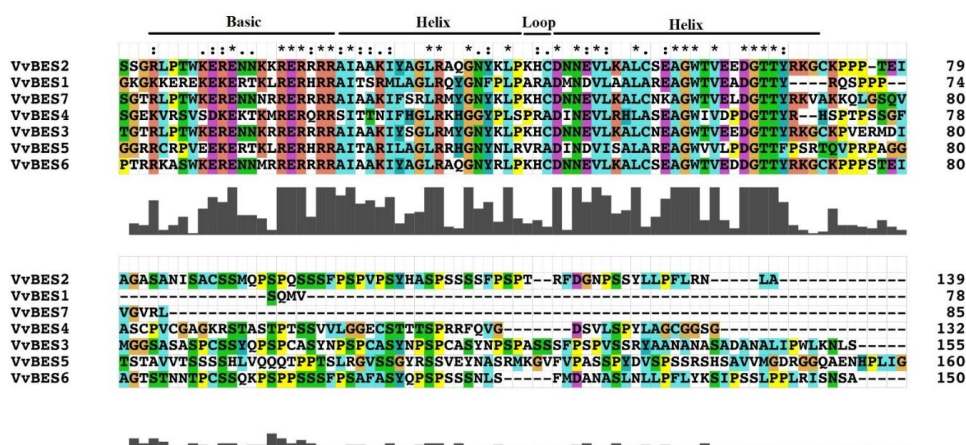
## نتایج و بحث

### مشخصات خانواده ژنی *BES1* انگور

الگوریتم blastP برای شناسایی ژن‌های *BES1* در گستره ژنوم انگور استفاده شد. نتیجه این جستجو، شناسایی هفت ژن *BES1* می‌باشد که بر اساس جایگاه کروموزومی خود از *VvBES1-1* تا *VvBES1-7* نامگذاری شدند که در آن *Vv* مربوط به اسم علمی انگور، *Vitis vinifera* می‌باشد (جدول ۱). ژن *VvBES1-1* با طول ۱۴۱ اسیدآمینه (وزن مولکولی ۱۵/۲ کیلودالتون) و *VvBES1-5* با طول 699 اسیدآمینه (وزن مولکولی 78.78 کیلودالتون) به ترتیب کوتاهترین و بلندترین فاکتورهای رونویسی خانواده *BES1* انگور هستند. دامنه pI ژن‌های این خانواده از ۵/۵۸ تا ۱۰/۴۴ می‌باشد. توزیع ژن‌های *VvBES1* بر روی کروموزوم‌های انگور یکنواخت نبوده و کروموزوم‌های ۲، ۴، ۱۵، ۱۸ و ۱۹ حاوی یک ژن و کروموزوم ۱۰ دارای دو ژن می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات عمومی ژن‌های *BES1* شناسایی شده در گستره ژنوم انگور

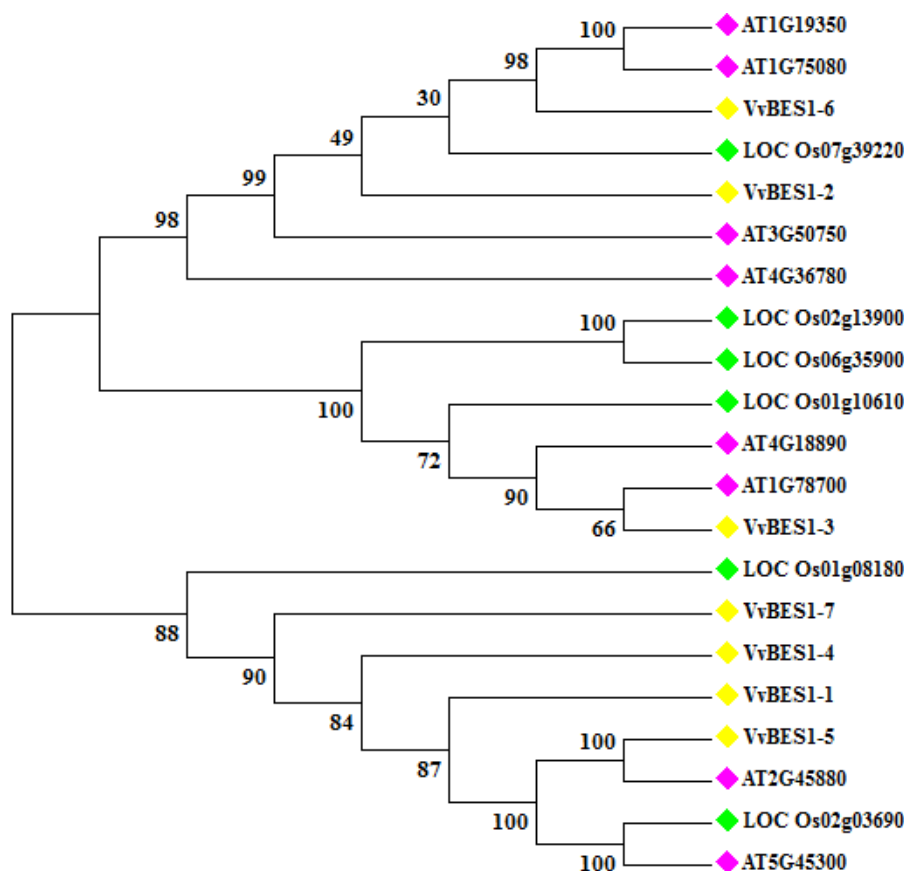
شماره دسترسی	ژن	کروموزوم	شروع ژن	انتهای ژن	طول پروتئین	وزن مولکولی	نقطه ایزوالکتریک	جایگاه سلولی
VIT_02s0087g00430	VvBES1-1	2	17760206	17760854	141	15.12	10.44	Nuclear
VIT_04s0023g01250	VvBES1-2	4	17661920	17664267	316	33.93	9.04	Nuclear
VIT_10s0003g01790	VvBES1-3	10	3247881	3251709	341	36.29	8.53	Nuclear
VIT_10s0003g04710	VvBES1-4	10	8385360	8386167	215	22.4	9.44	Nuclear
VIT_15s0046g02640	VvBES1-5	15	19389359	19399836	699	78.78	5.58	Cytoplasmic/ Nuclear
VIT_18s0001g12020	VvBES1-6	18	10237475	10239038	307	33.65	9.13	Nuclear
VIT_19s0014g00880	VvBES1-7	19	918102	921897	171	19.88	9.57	Extracellular/Mitochondrial /Nuclear



شکل ۱. هم‌رديف‌سازی دمين *BES1* انگور. دمين‌های bHLH در شکل مشخص شده است. میزان حفاظت‌شدگی اسیدهای آمینه در هر موقعیت با ستاره (\*) و ارتفاع ستون مشخص است.

با تعداد متفاوت ژن، نشان‌دهنده مسیر تکاملی متفاوت می‌باشد. از سوی دیگر بر اساس درخت فیلوژنتیکی برخی از ژن‌های *BES1* انگور دارای یک یا دو ژن اورتولوگ در آرابیدوپسیس هستند. بر اساس نتایج ژنومیکس مقایسه‌ای می‌توان کارکرد این ژن‌های انگور را بر اساس کارکرد ژن‌های همولوگ آن‌ها در آرابیدوپسیس پیش‌بینی کرد (Wu *et al.*, 2016). به‌عنوان مثال ژن *Atlg75080* در آرابیدوپسیس در رشد متأثر از برازینواستروئیدها و سرکوب بیوستنژ این هورمون بر اساس سیستم فیدبک نقش دارد (Wang *et al.*, 2002). علاوه بر این ژن *Atlg19350* در بیوستنژ گلوکوزینولات مشارکت دارد (Li, 2010). لذا می‌توان فرض کرد ژن *VvBES1-6* می‌تواند دارای کارکردهای اشاره شده در انگور باشد.

**رابطه تکاملی ژن‌های *BES1* انگور**  
 براساس درخت فیلوژنتیکی، ژن‌های *BES1* آرابیدوپسیس، برنج و انگور در سه زیر گروه مختلف قرار گرفتند (شکل ۲). گروه یک شامل ۴ ژن آرابیدوپسیس، یک ژن برنج و دو ژن انگور می‌باشد. گروه دو از سه ژن برنج، دو ژن آرابیدوپسیس و یک ژن انگور تشکیل شده است. در گروه ۳، چهار ژن انگور به همراه دو ژن برنج و دو ژن آرابیدوپسیس قرار دارند (شکل ۲).  
 در بررسی درخت تکاملی آرابیدوپسیس، کلم چینی (*Brassica rapa*) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) نیز خانواده *BES1* به سه گروه تقسیم شده‌اند (Jiang *et al.*, 2015). تفاوت تعداد ژن‌های هر زیر گروه برای این سه گیاه متفاوت است. این نتایج دلالت بر این امر دارد که حفظ ژن‌های حاصل از مضاعف‌شدگی در هر زیر گروه مربوط به این گیاهان متفاوت است، لذا ژن‌های *BES1* هر زیر گروه



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی توالی پروتئین BES1 در انگور، برنج و آرابیدوپسیس. رسم درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و بر اساس الگوریتم NJ انجام شد. ژن‌های انگور، آرابیدوپسیس و برنج به ترتیب با رنگ زرد، صورتی و سبز مشخص شده‌اند.

و ۳ می‌باشند. ژن‌های *VvBES1-1*، *VvBES1-7*، *VvBES1-4* و *VvBES1-5* تنها دارای موتیف یک هستند. ژن *VvBES1-3* دارای موتیف‌های یک، دو، سه و پنج بوده و فاقد موتیف چهارمی باشد (شکل ۳). از نظر تکاملی ژن‌های *VvBES1-1*، *VvBES1-7*، *VvBES1-4* و *VvBES1-5* در یک زیرگروه فیلوژنتیکی، ژن‌های *VvBES1-2* و *VvBES1-6* در یک زیرگروه و ژن *VvBES1-3* در زیرگروه مجزا قرار می‌گیرند. برخی از پروتئین‌های BES1 دارای ناحیه غنی از اسیدآمینو سرین هستند که تحت تأثیر BIN2 فسفریله و غیرفعال می‌شود (Yu et al., 2018). موتیف شماره ۵ که در پروتئین‌های *VvBES1-2*، *VvBES1-3* و *VvBES1-6* شناسایی شده است مربوط به ناحیه غنی از سرین می‌باشد.

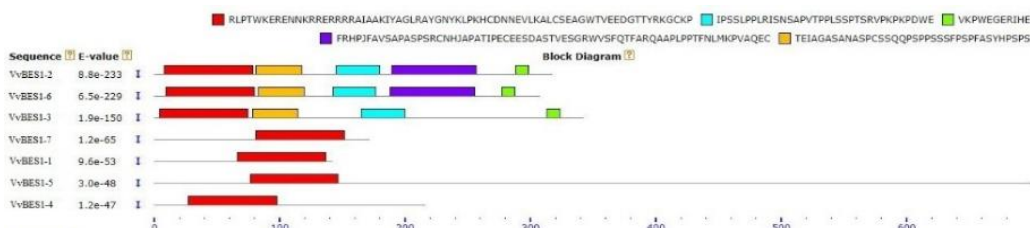
### موتیف‌های حفاظت شده و ساختار اگزون-اینترونی ژن‌های BES1 انگور

به منظور بررسی دقیق‌تر تفاوت‌های موجود در ژن‌های *VvBES1* ترکیب موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های کدشده توسط این خانواده ژنی با استفاده از سرور MEME بررسی شد. بر این اساس ۵ موتیف در توالی پروتئینی ژن‌های BES1 شناسایی شد. موتیف یک در تمامی پروتئین‌های BES1 انگور وجود دارد. مطالعه کارکردی این موتیف نشان داد که مربوط به دمین BES1-N می‌باشد (جدول ۲).

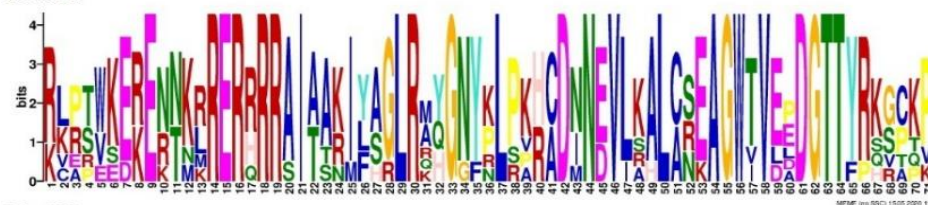
ترکیب و توزیع موتیف‌های شناسایی‌شده در هر پروتئین بر اساس گروه‌بندی فیلوژنتیکی آن‌ها مشابه می‌باشد (شکل ۳). ژن‌های *VvBES1-2* و *VvBES1-3* دارای هر پنج موتیف شده با الگوی توزیع ۱، ۵، ۲، ۴

جدول ۲. موتیف‌های شناسایی‌شده در توالی اسید آمینه BES1 انگور

موتیف	E-value	فرآوانی	طول	توالی	کارکرد
MEME1	2.20E-205	7	71	RLPTWKERENNRERRRRRAIAAKIYAGLRAYGN YKLPKHCDNNEVLKALCSEAGWTV EEDGTTYRKGCKP	BES1_N
MEME2	1.30E-08	3	35	IPSSLPLRISNSAPVTPPLSSPTSRVPKPKPDWE	
MEME3	3.40E-08	3	11	VKPWEGERIHE	
MEME4	1.50E-07	2	68	FRHPJFAVSAPASPSRCNHJAPATIPECEESDAS TVESGRWVSFQTFARQAAPLPTFNLMPVAQEC	
MEME5	1.60E-06	3	37	TEIAGASANASPCSSQQPSPPSSSFPSPFASYHPSPS	



Motif 1



Motif 2



Motif 3



Motif 4



Motif 5



شکل ۳. موتیف‌های حفاظت‌شده در پروتئین‌های BES1 انگور و جایگاه آن‌ها در هر ژن. موتیف‌های شناسایی‌شده با شماره ۱ تا ۵ مشخص شده‌اند.



*BES1* فاقد اینترون و نیز ژن‌های با ۱۸ اینترون شناسایی شده است (Cao *et al.*, 2020). در مورد فاز اسپلایسینگ نیز گزارش شده است که 84.4 درصد اینترون‌های خانواده ژنی *BES1* ذرت دارای فاز صفر می‌باشند (Yu *et al.*, 2018).

#### آنالیز پروموتور ژن‌های *BES1* انگور

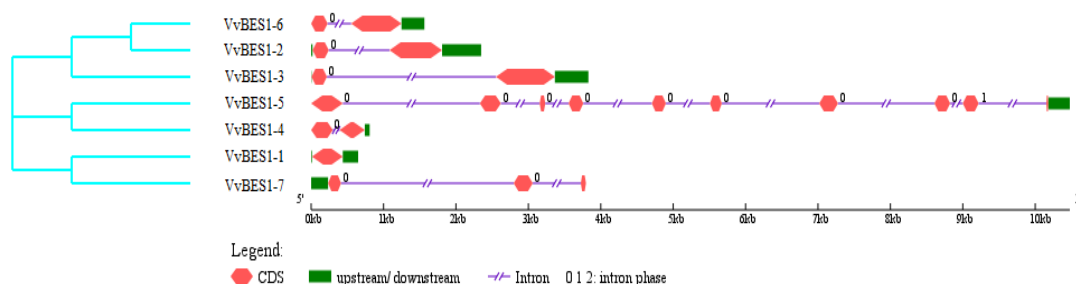
تنوع در فراوانی و توزیع عناصر تنظیمی cis در پروموتور ژن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت تنظیمی و کارکردی آن ژن‌ها باشد (Koul *et al.*, 2019)، لذا پروموتور ژن‌های *VvBES1* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عناصر تنظیمی عمومی مانند TATA-box در پروموتور همه ژن‌های این خانواده وجود دارد. علاوه بر ۳۱ نوع عنصر تنظیمی در پروموتور ژن‌های *VvBES1* شناسایی شد که مربوط به سه گروه cis عناصر تنظیمی شامل ۶ نوع عنصر تنظیمی اختصاصی بافت و مراحل نموی با فراوانی ۱۴ عدد، ۱۳ نوع عنصر تنظیمی پاسخ به تنش با فراوانی ۸۲ عدد و ۱۲ نوع عنصر تنظیمی پاسخ به هورمون‌ها با فراوانی ۷۱ عدد در پروموتور ژن‌های *VvBES1* شناسایی شد (جدول ۳). پروموتور ژن‌های *VvBES1-5* و *VvBES1-6* بیشترین عناصر تنظیمی با فراوانی ۳۲ و ۳۰ عدد را دارند. بیشترین فراوانی عناصر تنظیمی به ترتیب مربوط به MYC (۱۸ عدد)، ABRE (۱۷ عدد)، STRE (۱۶ عدد)، ARE (۱۶ عدد) و as-1 (۱۲ عدد) می‌باشد که به ترتیب در پاسخ به خشکی، ABA، تنش، شرایط بی‌هوایی، تنش اکسیداتیو و سالیسیلیک اسید نقش دارند (جدول ۳).

نگاهی به فراوانی عناصر تنظیمی هر پروموتور نشان می‌دهد که تمامی ژن‌ها دارای عناصر تنظیمی با کارکرد پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها هستند. لذا می‌توان گفت بیان این ژن‌ها از نظر زمانی و مکانی متأثر از تنش‌ها و هورمون‌ها می‌باشد. الگوی توزیع این عناصر و تفاوت فراوانی آن‌ها در هر ژن نشان‌دهنده متفاوت بودن کارکرد آن ژن نسبت به سایر اعضای خانواده ژنی می‌باشد (Zhao *et al.*, 2018).

مطالعات نشان داده است که تنوع موجود در اگزون/اینترون اعضای یک خانواده ژنی نقش مهمی در تکامل آن خانواده دارد (Roy & Penny 2007). تغییرات ساختار ژنی عموماً از طریق به‌دست‌آوردن/از دست‌دادن اگزون/اینترون،<sup>۱</sup> درج/حذف<sup>۲</sup> و exonisation/ pseudoexonisation ایجاد می‌شود (Xu *et al.*, 2012). لذا ساختار ژن و فاز اینترونی ژن‌های *BES1* انگور مطالعه شد. نتایج نشان داد که بجز ژن *VvBES1-1* که فاقد اینترون است سایر ژن‌ها حداقل یک اینترون دارند. ژن *VvBES1-5* اینترون دارد (شکل ۴).

فاز اینترونی با میزان حفاظت‌شدگی توالی در جایگاه اسپلایسینگ با تکامل اینترون‌های اسپلایزومی مرتبط است. فاز صفر بالاترین میزان حفاظت‌شدگی را دارد. اینترون فاز یک حفاظت‌شدگی بالایی دارد و کمترین حفاظت‌شدگی مربوط به اینترون‌های فاز می‌باشد (Long and Deutsch 1999). به‌استثنای اینترون آخر ژن *VvBES1-5* که دارای فاز یک است، فاز سایر اینترون‌های این خانواده ژنی صفر می‌باشد که ۹۳ درصد اینترون‌ها را شامل می‌شود (شکل ۴). این فراوانی بسیار بیشتر از میانگین آن در یوکاریوت‌ها است که ۴۵ تا ۵۷ درصد گزارش شده است (Long & Deutsch 1999). این امر نشان‌دهنده تنوع پایین ساختار ژن، تشابه الگوی اسپلایسینگ و نیز حفاظت‌شدگی بالایی کارکرد پروتئین‌های گذشته می‌باشد (Ruvinsky *et al.*, 2005). مطالعات انجام‌شده در مورد ساختار اگزون/اینترونی ژن‌های *BES1* نشان داده است که ژن‌های فاقد اینترون تا ژن‌های دارای تعداد بالایی اینترون در آن‌ها وجود دارد. به‌عنوان مثال ژن‌های *BES1* سویا و آرابیدوپسیس از ۱ تا ۱۰ اینترون دارند (Li *et al.*, 2019). همچنین در سبب ژن‌های

1 Exon/intron gain/loss  
2 Insertion/deletion



شکل ۴. ساختار اگزون-اینترونی ژن‌های *VvBES1*. اگزون، اینترون و UTRها به ترتیب با رنگ قرمز، سبز و بنفش مشخص هستند. اعداد صفر، ۱ و ۲ نشان‌دهنده فاز اسپلایسینگ می‌باشند.

جدول ۳. فراوانی و کارکرد عناصر تنظیمی سپس شناسایی‌شده در پروموتور ژن‌های *BES1* انگور

عناصر تنظیمی*	BES 1-1	BES 1-2	BES 1-3	BES 1-4	BES 1-5	BES 1-6	BES 1-7	کارکرد عنصر تنظیمی
TGA-element			2		1		2	auxin-responsive element
TCA-element		1				1		salicylic acid responsiveness
ABRE	1		5		7	2	2	abscisic acid responsiveness
AuxRR-core			1					auxin responsiveness
CGTCA-motif	1		1	2	3	2	1	MeJA-responsiveness
TGACG-motif	1		1	2	3	2	1	MeJA-responsiveness
GARE-motif					1	1	1	gibberellin-responsive element
P-box		1			1	1		gibberellin-responsive element
TGA-box						1		auxin-responsive element
as-1	1		1	4	3	2	1	oxidative stress salicylic acid activate
CARE				1	1			ABA response, GA response
ERE	2	1			2			ethylene-responsive element
TC-rich repeats	1	1		1			1	defense and stress responsiveness
LTR		1			2		1	low-temperature responsiveness
ARE	1	2	2		2	1	4	essential for the anaerobic induction
GC-motif			1					anoxic specific inducibility
MBS						1	1	drought-inducibility
MYC	3	5	1	2	3	3	1	drought response
DRE core							2	drought response
AP-1			1				1	Cd response
STRE	2	2	4	4		3	1	stress-response element
WUN-motif	4					3		wound-responsive element
box S					1	1		wounding and pathogen response
W box	1	1				1		elicitor responsive cis-element
WRE3		1	2		1	4	1	wounding
circadian	1							circadian control
MSA-like					1			cell cycle regulation
O2-site			1	2				zein metabolism regulation
CAT-box	1		1				2	related to meristem expression
GCN4_motif	1			1		1		endosperm expression
CCGTCC motif				2				cell cycle and cell proliferation response

\* رنگ‌های زرد، آبی و سبز به ترتیب مشخص‌کننده عناصر تنظیمی پاسخ به هورمون‌ها، تنش‌ها و مراحل نموی و بافتی می‌باشند.

کوچک در تنظیم رشد و نمو و فیزیولوژی گیاه و نیز پاسخ به گیاه به محرک‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (Wani *et al.*, 2020). مطالعات نشان داده است که هدف بیش از ۵۰ درصد miRNAها،

تنظیم پس از رونویسی ژن‌های *BES1* انگور مولکول‌های miRNA مولکول‌هایی با طول ۱۹ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که در تمامی گیاهان شناسایی شده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که این مولکول‌های

ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی است (Jiu et al., 2019). از این‌رو، شناسایی miRNAهای مؤثر بر روی تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌های BES1 انگور انجام شد (جدول ۴).

جدول ۴. لیست miRNAهای مؤثر بر تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌های BES1 انگور

شماره دسترسی miRNA	ژن هدف	جایگاه شروع	جایگاه پایان	نوع بازدارنگی
vvi-miR403a	<i>VvBES1-5</i>	978	998	Cleavage
vvi-miR403b	<i>VvBES1-5</i>	978	998	Cleavage
vvi-miR403c	<i>VvBES1-5</i>	978	998	Cleavage
vvi-miR403d	<i>VvBES1-5</i>	978	998	Cleavage
vvi-miR403e	<i>VvBES1-5</i>	978	998	Cleavage
vvi-miR403f	<i>VvBES1-5</i>	978	998	Cleavage
vvi-miR159c	<i>VvBES1-3</i>	294	314	Translation
vvi-miR159c	<i>VvBES1-3</i>	342	362	Translation
vvi-miR159c	<i>VvBES1-3</i>	318	338	Translation
vvi-miR482	<i>VvBES1-1</i>	175	196	Cleavage

نشان‌دهنده تنوع الگوی بیان ژن‌های این خانواده در انگور می‌باشد. با این حال در حالت کلی الگوی بیان ژن‌های *VvBES1* به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه یک شامل ژن‌های *VvBES1-1*، *VvBES1-4* و *VvBES1-7* می‌باشد. ژن‌های *VvBES1-6*، *VvBES1-5*، *VvBES1-2* و *VvBES1-3* گروه دو را بر اساس الگوی بیانی تشکیل داده‌اند (شکل ۵). نکته جالب توجه در مورد بیان ژن‌های *BES1* این است که در هر بافت و در هر مرحله نموی حداقل یک ژن دارای بیان متوسط تا بالا می‌باشد و هیچ مرحله‌ای وجود ندارد که بیان تمام ژن‌های *BES1* در آن کاهش نشان دهد (شکل ۵).

همچنین وجود همپوشانی در بیان ژن‌ها در مراحل مختلف نموی می‌تواند نشان‌دهنده همکاری این عوامل رونویسی در تغییرات بیانی ژن‌های پاسخ به هورمون برآزینواستروئید باشد. به‌عنوان مثال بیان الگوی بیان ژن‌های *VvBES1-4* و *VvBES1-7* در پریکارپ مرحله Pericarp-PHWII<sup>۱</sup> و Pericarp-PHWIII<sup>۲</sup> مشابه بوده و هر دو افزایش بیان داشته‌اند. از سوی دیگر الگوی بیان ژن‌ها حاکی از

مطالعه نشان داد که ژن *VvBES1-5* متأثر از خانواده miR403 است. این مولکول miRNA اختصاصی گیاهان دولپه بوده و در گیاهان تک‌لپه شناسایی نشده است (Sunkar & Jagadeeswaran, 2008). فرایبان miRNA403 در گوجه‌فرنگی مشخص کرده است که این مولکول در نمو گیاه نقش دارد (Zhang et al., 2015). همچنین miR159 قادر به جفت‌شدن با دو موقعیت بر روی توالی mRNA ژن *VvBES1-3* می‌باشد. miRNA159 در بسیاری از گیاهان شناسایی شده است. سرکوب این ژن در برنج موجب کاهش بیان بسیاری از ژن‌های پاسخ‌دهنده به برآزینواستروئید و کاهش وزن و اندازه بذر شده است (Zhao et al., 2017). ژن *VvBES1-1* نیز متأثر از miR482 می‌باشد. مکانیسم تنظیم بیان پس از رونویسی miR403، miR159 و miR482 به ترتیب برش، ممانعت از ترجمه و برش می‌باشد. مولکول miRNA مؤثر بر ژن‌های *VvBES1-2* و *VvBES1-4* شناسایی نشد.

#### پروفایل بیانی ژن‌های BES1 انگور

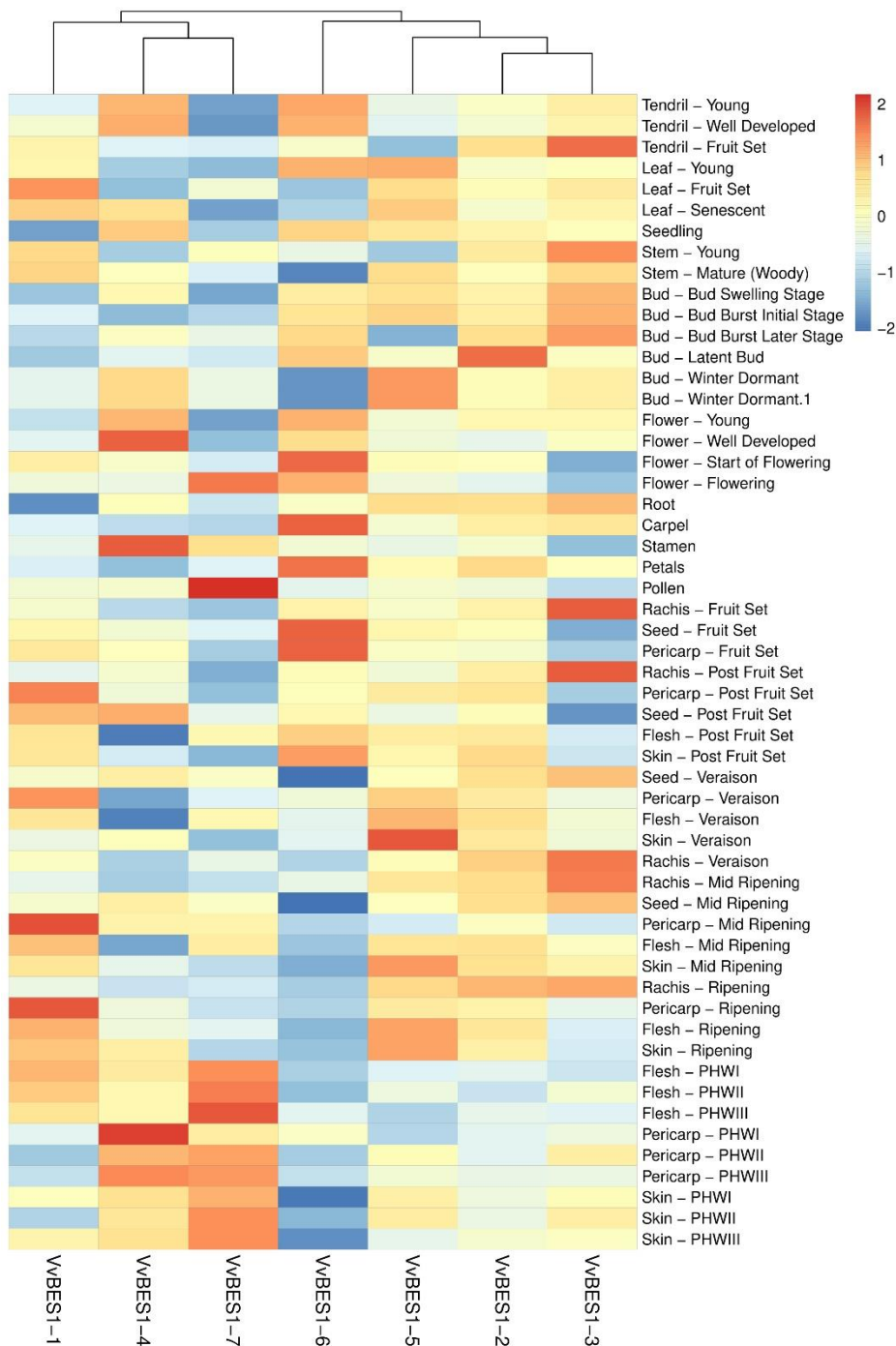
به‌منظور بررسی تغییرات زمانی و بیانی ژن‌های *VvBES1* داده‌های مربوط به ۵۴ بافت و اندام در مراحل نموی مختلف ارزیابی شد. نتایج این بررسی

1. Pericarp post-harvest withering II (2rd month)

2. Pericarp post-harvest withering III (3rd month)

*VvBES1-1* کاهش یافته است.

نقش اختصاصی این ژن‌ها دارد. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود در دو مرحله ذکر شده در بالا که بیان ژن‌های *VvBES1-4* و *VvBES1-7* افزایش یافته است الگوی بیان ژن *VvBES1-6* و



شکل ۵. پروفایل بیانی اعضای خانواده ژنی *BES1* انگور. داده‌ها مربوط به بافت‌های انگور در مراحل نمو مختلف می‌باشد.

که ژن‌های مورد مطالعه کارکردهای متنوعی در تنظیم رشد و نمو انگور ایفا می‌کنند. به‌عنوان مثال در مطالعه

تفاوت در الگوی بیان ژن‌های *VvBES1* راهنمای مهمی در مورد کارکرد این ژن‌ها بوده و نشان می‌دهد

مختلف انگور بررسی شد. نتایج نشان داد که ژن‌های *VvBES1* در سه گروه فیلوژنتیکی مجزا قرار گرفته و زمین‌های شناسایی شده برای هر زیر گروه حفاظت شده می‌باشند. همچنین فاز اسپلایسینگ ژن‌های *VvBES1* عموماً از نوع فاز صفر بوده و در طی تکامل حفظ شده‌اند. عنصر سیس ناحیه پروموتری و نیز miRNAهای مؤثر بر ژن‌های *BES1* انگور نشان‌دهنده تنوع و پیچیدگی تنظیم بیان این ژن‌ها در سطح رونویسی و پس از رونویسی می‌باشد. بررسی داده‌های ریزآرایه بیان ژن‌های *VvBES1* حاکی از کارکرد متنوع ژن‌ها از نظر زمانی و مکانی در انگور و نقش ویژه این فاکتورهای رونویسی در رشد و نمو این گیاه می‌باشد. نتایج این مطالعه می‌تواند اطلاعات پایه در مورد نقش این ژن‌ها در رشد و نمو انگور را فراهم کرده و در برنامه‌های اصلاحی با اهداف مختلف مانند افزایش کیفیت و کمیت محصول و پاسخ به تنش‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

## REFERENCES

Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, De Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*. 40 (W1): W597-W603.

Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*. 37 (suppl\_2): W202-W208.

Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M (2012) NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update. *Nucleic acids research*. 41 (D1): D991-D995.

Cao X, Khaliq A, Lu S, Xie M, Ma Z, Mao J, Chen B (2020) Genome-wide identification and characterization of the BES1 gene family in apple (*Malus*

تأثیر ۲۴-Epibrassinolide-24 و نور بر بیوسنتز آنتوسیانین و پروآنتوسیانین در انگور مشخص شد که ژن *VvBES1-4* تحت تأثیر نور و برازینواستروئید به صورت معنی‌دار القاء شده و موجب افزایش بیوسنتز آنتوسیانین می‌شود. بر این اساس ثابت شد که بین نور، مسیر پیام‌رسانی برازینواستروئید و آنتوسیانین میانکنش وجود دارد (Zhou et al., 2018). کارکرد متنوع ژن‌های *BES1* پیش‌تر در گیاهانی نظیر کلم چینی، پنبه و سویا به اثبات رسیده است (Wu et al., 2016; Liu et al., 2018; Li et al., 2019).

## نتیجه‌گیری نهایی

در این مطالعه شناسایی اعضای خانواده ژنی BES1 در گستره ژنوم انگور انجام و مشخصات عمومی، روابط فیلوژنتیکی، ساختار ژن، موتیف‌های حفاظت شده، پروموتر، تنظیم پس از رونویسی و پروفایل بیانی ژن‌های شناسایی شده در بافت‌ها و مراحل نمو

*domestica*). *Plant Biology*.  
 Century K, Reuber TL, Ratcliffe O (2008) Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. *Plant physiology*. 147 (1): 20-29.

Clouse SD (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *The Plant Cell*. 23 (4): 1219-1230.

Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic acids research*. 46 (W1): W49-W54.

El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*. 47 (D1): D427-D432.

Feng Y, Yin Y, Fei S (2015) Down-regulation of BdBRI1, a putative

- brassinosteroid receptor gene produces a dwarf phenotype with enhanced drought tolerance in *Brachypodium distachyon*. *Plant Science*. 234: 163-173.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*. 40 (D1): D1178-D1186.
- Haider MS, Jogaiah S, Pervaiz T, Yanxue Z, Khan N, Fang J (2019) Physiological and transcriptional variations inducing complex adaptive mechanisms in grapevine by salt stress. *Environmental Experimental Botany*. 162: 455-467.
- Hu B, Jin J, Guo A-Y, Zhang H, Luo J, Gao G (2015) GS2D 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*. 31 (8): 1296-1297.
- Jiang J, Zhang C, Wang X (2015) A recently evolved isoform of the transcription factor BES1 promotes brassinosteroid signaling and development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 27 (2): 361-374.
- Jiang K, Asami T (2018) Chemical regulators of plant hormones and their applications in basic research and agriculture. *Bioscience, biotechnology, biochemistry*. 82 (8): 1265-1300.
- Jiu S, Xu Y, Wang J, Wang L, Wang S, Ma C, Guan L, Abdullah M, Zhao M, Xu W (2019) Genome-wide Identification, Characterization and Transcript Analysis of the TCP Transcription Factors in *Vitis vinifera*. *Frontiers in genetics*. 10: 1276.
- Koul A, Sharma D, Kaul S, Dhar MK (2019) Identification and in silico characterization of cis-acting elements of genes involved in carotenoid biosynthesis in tomato. *3 Biotech*. 9 (7): 287.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology evolution*. 33 (7): 1870-1874.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23 (21): 2947-2948.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*. 30 (1): 325-327.
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J (1996) A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272 (5260):398-401
- Li J, Nam KH, Vafeados D, Chory J (2001) BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 127 (1): 14-22.
- Li L (2010) The mechanism and network of BES1 mediated transcriptional regulation in Brassinosteroids (BR) pathway in *Arabidopsis*. Graduate Theses and Dissertations, pp. 11326.
- Li Q, Guo L, Wang H, Zhang Y, Fan C, Shen Y (2019) In silico genome-wide identification and comprehensive characterization of the BES1 gene family in soybean. *Heliyon*. 5 (6): e01868.
- Li Y, He L, Li J, Chen J, Liu C (2018) Genome-wide identification, characterization, and expression profiling of the legume BZR transcription factor gene family. *Frontiers in plant science*. 9: 1332.
- Liang T, Mei S, Shi C, Yang Y, Peng Y, Ma L, Wang F, Li X, Huang X, Yin Y (2018) UVR8 interacts with BES1 and BIM1 to regulate transcription and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental cell*. 44 (4): 512-523.
- Liu B, Ouyang Z, Zhang Y, Li X, Hong Y, Huang L, Liu S, Zhang H, Li D, Song F (2014) Tomato NAC transcription factor SlSRN1 positively regulates defense response against

- biotic stress but negatively regulates abiotic stress response. *PLoS One*. 9 (7): e102067.
- Liu Z, Qanmber G, Lu L, Qin W, Liu J, Li J, Ma S, Yang Z, Yang Z (2018) Genome-wide analysis of BES1 genes in *Gossypium* revealed their evolutionary conserved roles in brassinosteroid signaling. *Science China Life Sciences*. 61 (12): 1566-1582.
- Long M, Deutsch M (1999) Association of intron phases with conservation at splice site sequences and evolution of spliceosomal introns. *Molecular biology evolution*. 16 (11): 1528-1534.
- Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua NH (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *The Plant Journal*. 32 (3): 317-328.
- Luo X-M, Lin W-H, Zhu S, Zhu J-Y, Sun Y, Fan X-Y, Cheng M, Hao Y, Oh E, Tian M (2010) Integration of light-and brassinosteroid-signaling pathways by a GATA transcription factor in *Arabidopsis*. *Developmental cell*. 19 (6): 872-883.
- Lv J, Li Y, Liu Z, Li X, Lei X, Gao C (2020) Response of BpBZR genes to abiotic stress and hormone treatment in *Betula platyphylla*. *Plant Physiology Biochemistry*. 151: 157-165.
- Manoli A, Trevisan S, Quaggiotti S, Varotto S (2018) Identification and characterization of the BZR transcription factor family and its expression in response to abiotic stresses in *Zea mays* L. *Plant growth regulation*. 84 (3): 423-436.
- Metsalu T, Vilo J (2015) ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic acids research*. 43 (W1): W566-W570.
- Nolan T, Chen J, Yin Y (2017) Cross-talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses. *Biochemical Journal*. 474 (16): 2641-2661.
- Peres ALG, Soares JS, Tavares RG, Righetto G, Zullo MA, Mandava NB, Menossi M (2019) Brassinosteroids, the sixth class of phytohormones: a molecular view from the discovery to hormonal interactions in plant development and stress adaptation. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (2): 331.
- Roy SW, Penny D (2007) A very high fraction of unique intron positions in the intron-rich diatom *Thalassiosira pseudonana* indicates widespread intron gain. *Molecular biology evolution*. 24 (7): 1447-1457.
- Ruvinsky A, Eskesen S, Eskesen F, Hurst L (2005) Can codon usage bias explain intron phase distributions and exon symmetry? *Journal of molecular evolution*. 60 (1): 99-104.
- Saha G, Park JI, Jung HJ, Ahmed NU, Kayum MA, Kang JG, Nou (2015) Molecular characterization of BZR transcription factor family and abiotic stress induced expression profiling in *Brassica rapa*. *Plant Physiology Biochemistry*. 92: 92-104.
- Sami Z, Alemzadeh A (2016) Isolation and molecular characterization of a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene, AINH2, from '*Aeluropus litoralis*' and comparison of AINH1 and AINH2. *Plant Omics*. 9 (3): 205.
- Sharma R, De Vleeschauwer D, Sharma MK, Ronald PC (2013) Recent advances in dissecting stress-regulatory crosstalk in rice. *Molecular Plant*. 6 (2): 250-260.
- Song X, Ma X, Li C, Hu J, Yang Q, Wang T, Wang L, Wang J, Guo D, Ge W (2018) Comprehensive analyses of the BES1 gene family in *Brassica napus* and examination of their evolutionary pattern in representative species. *BMC genomics*. 19 (1): 346.
- Sun Y, Fan X-Y, Cao D-M, Tang W, He K, Zhu J-Y, He J-X, Bai M-Y, Zhu S, Oh E (2010) Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in

- Arabidopsis. *Developmental cell*. 19 (5): 765-777.
- Sunkar R, Jagadeeswaran G (2008) In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC plant biology*. 37 (1): 8.
- Tang W, Yuan M, Wang R, Yang Y, Wang C, Osés-Prieto JA, Kim T-W, Zhou H-W, Deng Z, Gampala SS (2011) PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nature cell biology*. 13 (2): 124-131.
- Waese J, Provart NJ (2016) The Bio-Analytic Resource: Data visualization and analytic tools for multiple levels of plant biology. *Current Plant Biology*. 7: 2-5.
- Wang W, Sun Y-Q, Li G-L, Zhang S-Y (2019) Genome-wide identification, characterization, and expression patterns of the BZR transcription factor family in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *BMC plant biology*. 19 (1): 191.
- Wang Z-Y, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental cell*. 2 (4): 505-513.
- Wani SH, Kumar V, Khare T, Tripathi P, Shah T, Ramakrishna C, Aglawe S, Mangrauthia SK (2020) miRNA applications for engineering abiotic stress tolerance in plants. *Biologia*. 1-19.
- Wu P, Song X, Wang Z, Duan W, Hu R, Wang W, Li Y, Hou X (2016) Genome-wide analysis of the BES1 transcription factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Plant Growth Regulation*. 80 (3): 291-301.
- Xu G, Guo C, Shan H, Kong H (2012) Divergence of duplicate genes in exon-intron structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (4): 1187-1192.
- Yang C-J, Zhang C, Lu Y-N, Jin J-Q, Wang X-L (2011) The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development. *Molecular plant*. 4 (4): 588-600.
- Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell*. 120 (2): 249-259.
- Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK (2006) Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatic*. 64 (3): 643-651.
- Yu H, Feng W, Sun F, Zhang Y, Qu J, Liu B, Lu F, Yang L, Fu F, Li W (2018) Cloning and characterization of BES1/BZR1 transcription factor genes in maize. *Plant growth regulation*. 86 (2): 235-249.
- Yu H, Sun F, Feng W, Lu F, Li W, Fu FYc (2019) The BES1/BZR1 transcription factors regulate growth, development and stress resistance in plants. *Hereditas*. 41 (3): 206-214.
- Zhang C, Xian Z, Huang W, Li Z (2015) Evidence for the biological function of miR403 in tomato development. *Scientia Horticulturae*. 197: 619-626.
- Zhang X, Guo W, Du D, Pu L, Zhang C (2020) Overexpression of a maize BR transcription factor ZmBZR1 in Arabidopsis enlarges organ and seed size of the transgenic plants. *Plant Science*. 292: 110378.
- Zhao J, Zhai Z, Li Y, Geng S, Song G, Guan J, Jia M, Wang F, Sun G, Feng N (2018) Genome-wide identification and expression profiling of the TCP family genes in spike and grain development of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*. 9: 1282.
- Zhao Y, Wen H, Teotia S, Du Y, Zhang J, Li J, Sun H, Tang G, Peng T, Zhao Q (2017) Suppression of microRNA159 impacts multiple agronomic traits in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC plant biology*. 17 (1): 215.
- Zhou Y, Yuan C, Ruan S, Zhang Z, Meng



J, Xi Z (2018) Exogenous 24-epibrassinolide interacts with light to regulate anthocyanin and

proanthocyanidin biosynthesis in cabernet sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Molecules*. 23 (1): 93.