

مطالعه فیلوژنتیکی، ساختاری و بیانی ژن‌های عوامل تنظیم‌کننده رشد (GRF) در گندم *in silico* بر مبنای روش‌های (*Triticum aestivum* L.)

ناصر محمدیان روشن*

استادیار گروه زراعت، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۵)

Phylogenetic, structure and expression analysis of growth regulatory factors (GRF) genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) using *in silico* methods

Naser Mohammadian Roshan*

Assistant Professor, Department of Agriculture, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

(Received: Aug. 21, 2020 - Accepted: Dec. 15, 2020)

Abstract

Growth regulating factors (Growth Regulatory Factors) are plant-specific transcription factors which contain two conserved domains, QLQ and WRC. Members of this family are involved in diverse biological and physiological processes, such as growth, development and stress and hormone responses. In this study, wheat GRF genes were identified and analysis by bioinformatics methods. GRF genes identification was performed by blastP. Then evolutionary relationships, gene structure, promoter, miRNA, gene ontology and expression of identified genes were analyzed. 30 *TaGRFs* (*TaGRF1-30*) distributed on 12 chromosomes were identified by searching wheat genome database and were clustered into six subgroups according to their phylogenetic relationships. *TaGRFs* belonging to the same subgroup shared a similar motif composition and gene structure. They all contain two conserved motifs (QLQ and WRC) and have 2-5 exons. Due to the identification of stresses, hormones and tissue specific *cis* elements in the *TaGRFs* promoter, these genes are involved in many biological processes of wheat. MiR396 target analysis indicated that 26 *GRFs* mRNA contained miRNA396 target position in wheat. RNA-seq data from the expVip database showed that *TaGRF1*, *TaGRF4* and *TaGRF7* were strongly expressed in root, shoot, leave, spike and grain in vegetative and reproductive stages. This data also indicated that all *TaGRF* genes except *TaGRF16* were expressed in vegetative stage of spike. The results of this study provide the evolutionary and functional information needed for Design of functional studies of this gene family.

Keywords: Bioinformatics, Database, Gene Expression, Gene Family, Phylogenetic.

چکیده

عوامل تنظیم‌کننده رشد (Growth Regulatory Factor, GRF) از فاکتورهای رونویسی اختصاصی در گیاهان هستند دارای دو دمن حفظ شده QLQ و WRC می‌باشند. اعضاء این خانواده ژنی در فرآیندهای مختلف زیستی مانند رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی و هورمون نقش دارند. در این مطالعه ژن‌های خانواده *GRF* گندم شناسایی و به صورت بیوانفورماتیکی بررسی شدند. شناسایی ژن‌های *GRF* با استفاده از BlastP انجام و در ادامه روابط تکاملی، موتیف‌های حفاظت شده، پیش‌بر، miRNA هستی‌شناسی و بیان ژن‌های شناسایی شده مطالعه شد. در این مطالعه ۳۰ ژن *TaGRF* (*TaGRF1-30*) بر اساس جستجوی پایگاه داده ژنوم گندم شناسایی شدند که بر روی ۱۲ کروموزوم قرار داشتند و بر اساس روابط فیلوژنتیکی در ۶ زیرگروه دسته‌بندی شدند. ژن‌های *TaGRF* هر زیرگروه از نظر ساختار ژنی مشابه و تمامی آن‌ها دارای دو موتیف حفاظت شده (WRC و QLQ) و ۲ تا ۵ اگزون بودند. با توجه به شناسایی عناصر تنظیمی پاسخ در تنش‌ها، هورمون‌ها و مراحل رشد و نمو در ناحیه پیش‌بر، این ژن‌ها در بسیاری از فرآیندهای زیستی گندم نقش دارند. همچنین ۲۶ ژن *TaGRF* دارای جایگاه هدف برای miRNA396 بودند. اطلاعات RNA-seq پایگاه داده expVIP نشان داد که ژن‌های *TaGRF1*، *TaGRF4* و *TaGRF7* تظاهر بالایی در مراحل رویشی و زایشی در بافت‌های ریشه، ساقه، برگ، سنبله و دانه داشتند. همچنین این داده‌ها نشان داد که تمامی ژن‌های *GRF* گندم به جز *TaGRF16* در مرحله زایشی سنبله تظاهر داشتند. نتایج این مطالعه اطلاعات تکاملی و کارکردی مورد نیاز برای طراحی مطالعات کارکردی این خانواده ژنی را فراهم می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، بیوانفورماتیک، پایگاه داده، خانواده ژنی، فیلوژنتیک.

مقدمه

عوامل رونویسی بسیار متنوع بوده و کارکردهای متفاوتی در موجودات زنده بر عهده دارند. این عوامل به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی بیان ژن، به‌صورت اختصاصی به عناصر تنظیمی سیس ناحیه پیش‌بری ژن‌های یوکاریوتی متصل شده و از این طریق موجب فعال شدن یا ممانعت از فرآیند رونویسی می‌شوند (Zhao *et al.*, 2019). بیش از ۶۰ نوع خانواده ژنی مربوط به فاکتورهای رونویسی در گیاهان شناسایی و مطالعه شده است (Jin *et al.*, 2016). تخمین زده می‌شود که ۴ تا ۷ درصد ژن‌های یوکاریوتی ژن‌های کدکننده TFها باشند. در حالت کلی تعداد TFها با میزان پیچیدگی موجود زنده دارای همبستگی است (Hughes, 2011). تا به امروز بسیاری از خانواده‌های TF مانند GRAS، bZIP، ERF، CBF، NAC، WRKY، SBP-box و ... در بسیاری از گیاهان بررسی شده‌اند (Shan *et al.*, 2020; Mirzaei *et al.*, 2020; Mathur *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2019; Sanjari *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2020).

عوامل تنظیم‌کننده رشد (GRF)^۱ عوامل رونویسی اختصاصی گیاهی هستند که نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاهان دارند. اولین عضو این خانواده در برنج (*Oryza sativa*) شناسایی شده است که در طول شدن ساقه به‌واسطه جیبرلین نقش دارد (van der Knaap *et al.*, 2000). پروتئین‌های GRF دارای دو ناحیه حفاظت شده QLQ و WRC می‌باشند. دمین QLQ از حدود ۳۰ اسیدآمینه تشکیل شده و دارای اسیدآمینه‌های حفاظت‌شده گلوتامین-لوسین-گلوتامین با الگوی OX₃LX₂Q است (Omidbakhshfard *et al.*, 2015).

دارای تشابه با بخش انتهایی آمینو پروتئین SWI/SNF مخمر است. دمین QLQ در این پروتئین با جز دیگر کمپلکس SWI/SNF chromatin remodeling ATPase میانکنش دارد لذا فرض گرفته شد که دمین QLQ در پروتئین‌های GRF نیز رابط میانکنش در گیاهان است. مطالعات نشان دادند که QLQ نقش فعال‌کنندگی رونویسی خود را از طریق میانکنش پروتئین-پروتئین با عوامل فعال‌کننده GRF (GIF) ایفا می‌کند (Kim and Tsukaya 2015; Choi *et al.*, 2004).

دمین WRC دارای حدود ۴۴ اسیدآمینه بوده و دو ویژگی مشخص دارد. این دمین دارای موتیف CH₃ (انگشت روی) با الگوی CX₉CX₁₀CX₂H است که اسیدآمینه‌های سیستئین و هیستیدین آن حفاظت شده می‌باشند. همچنین سایر اسیدآمینه‌های این دمین بازی (آرژنین و لیزین) می‌باشند. دمین WRC یک دمین اختصاصی گیاهی بوده و توانایی اتصال به DNA را دارد که این عمل به‌واسطه موتیف CH₃ انجام می‌شود (Kim and Tsukaya 2015).

مطالعات اولیه صورت گرفته در مورد کارکرد GRFها نشان‌دهنده نقش مثبت این فاکتورهای رونویسی در نمو ساقه و برگ است. باین‌حال بعدها مشخص گردید که GRFها در سایر جنبه‌های زیستی گیاه مانند گل‌دهی، نمو بذر و ریشه و کنترل رشد گیاه در شرایط تنش محیطی نقش دارند (Hewezi *et al.*, 2012; Omidbakhshfard *et al.*, 2015). در حالت کلی ژن‌های GRF بیان بالایی در بافت‌های فعال از نظر رشد و نمو مانند غنچه گل، برگ‌های نابالغ و نوک شاخساره دارند (Kim *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2014).

استفاده می‌شود (Amberg, 2013). گندم به‌عنوان یکی از گیاهان زراعی بسیار مهم شناخته می‌شود که ۱۷ درصد زمین‌های زراعی را به خود اختصاص داده است. مطابق گزارش FAO، کل تولید غلات دنیا در سال ۲۰۱۸ معادل ۲,۵۹ میلیارد تن بوده است که ۷۲۲,۴ میلیون تن آن مربوط به گندم است (Xiao et al., 2019). از نظر ژنتیکی گندم یک آلوهگزاپلوئید ($2n=6x=42$, AABBDD) با تاریخچه تکاملی پیچیده است. نتیجه این سطح پلوئیدی و روابط تکاملی، اندازه بزرگ ژنوم این گیاه است که حدود ۱۷ گیگا جفت باز است. علی‌رغم این حجم ژنوم، اخیراً توالی‌یابی ژنوم گندم انجام گرفته و فرصت با ارزش در اختیار متخصصان و محققان علوم زیستی قرار داده است (Wang et al., 2016). با توجه به نقش ژن‌های GRF در رشد و نمو گیاهان، شناسایی این خانواده ژنی در گندم می‌تواند برای استفاده در اهداف اصلاحی و یا زیست‌فناوری^۲ مفید باشد. در این مطالعه خانواده ژنی GRF بر اساس روش‌های بیوانفورماتیکی در گندم شناسایی شده و مشخصات عمومی، روابط تکاملی، ساختار ژنی، موتیف‌های حفاظت شده، عناصر تنظیمی ناحیه پیش‌بر و miRNAهای مؤثر بر بیان این ژن‌ها مطالعه گردید. همچنین بیان ژن‌های GRF گندم در بافت‌ها و مراحل نمو مختلف بر اساس داده‌های RNA-seq موجود در بانک‌های اطلاعاتی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جستجوی ژنوم گندم برای شناسایی ژن‌های GRF داده‌های ژنومی مربوط به گندم (نسخه IWGSC RefSeq v1.1) در پایگاه داده Ensembl Plants

استفاده از روش‌های انتقال ژن و فرایان ژن‌های GRF تأیید کننده این کارکرد است. فرایان ژن *AtGRF1* موجب افزایش وزن گل و اندازه بذر گردید (Van Daele et al., 2012). انتقال ژن *GRF8* کلم به آرابیدوپسیس تأثیر مثبتی بر اندازه برگ‌ها و سایر اندام‌ها داشته است (Wang et al., 2014). گرچه مطالعات نشان‌دهنده نقش مثبت این ژن‌ها در رشد گیاهان بود با این حال، فرایان ژن *GRF10* ذرت موجب کاهش اندازه برگ و ارتفاع گیاه شده است (Wu et al., 2014). مکانیسم ارائه شده در مورد تنظیم تکثیر سلولی به‌وسیله GRF نشان می‌دهد که این ژن‌ها از طریق سرکوب بیان ژن *KNOX* که بازدارنده GA است نقش خود را ایفا می‌کنند (Kuijt et al., 2014). ژن *KNOX* با سرکوب ژن کلیدی *GA20* اکسیداز در سیکل S-آدنوزیل متیونین (SAM) و با کنترل سطح بیان *GA2* اکسیداز ۱ (تخریب‌کننده GA) نقش خود را ایفا می‌کنند (Rosin, Bolduc and Hake 2009; et al., 2003).

در سال‌های اخیر با توالی‌یابی ژنوم گیاهان، خانواده GRF در بسیاری از گونه‌ها مانند آرابیدوپسیس، برنج، انگور، صنوبر (Cao et al., 2016)، کلم (Wang et al., 2014)، توتون (Zhang et al., 2018)، خیار (Zhou et al., 2018)، گوجه‌فرنگی (Khatun et al., 2017)، بادام‌زمینی (Zhao et al., 2019)، پرتقال (Liu et al., 2016)، کلزا (Ma et al., 2017)، سویا (Chen et al., 2019) و چای (Wu et al., 2017) مطالعه شده است. این مطالعات عموماً بر مبنای روش‌های *in silico* می‌باشند لذا از روش‌ها و آنالیزهای بر مبنای کامپیوتر و روش‌های محاسباتی

نرم‌افزار MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) و رسم درخت فیلوژنتیکی بر اساس الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه‌ها انجام شد. صحت درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس ارزیابی توپولوژی درخت رسم شده و نیز آزمون بوت‌استرپ^۱ انجام گرفت. ساختار ژنی (تعداد و طول اگزون/اینترون) و فاز اسپلایسینگ خانواده ژنی GRF گندم با استفاده از سایت GS2.0 (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/) بررسی شد. این سرور توالی DNA ژنومی و توالی ناحیه کد کننده هر ژن را بررسی و اطلاعات موردنظر را ارائه می‌کند.

آنالیز پیش‌بر و شناسایی miRNAهای درگیر با ژن‌های GRF

به‌منظور شناسایی عناصر سیس پیش‌بر ژن‌های GRF، بالادست کدون شروع ژن‌های GRF گندم به طول ۱.۵ کیلو جفت باز به‌عنوان پیش‌بر تعریف و شناسایی عناصر سیس در PlantCare (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) انجام شد. پیش‌بینی miRNAهایی که در تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌های GRF دخیل هستند با استفاده از پایگاه داده psRNATarget (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/home) انجام شد.

بیان ژن‌های GRF در مراحل نمو بر اساس داده‌های RNA-seq و آنالیز هستی‌شناسی (Gene Ontology)

بررسی پروفایل بیانی ژن‌های GRF گندم در بافت‌های مختلف با استفاده از داده‌های

(http://plants.ensembl.org/index.html) جهت شناسایی پروتئین‌های GRF استفاده شد. جهت این کار از توالی پروتئین GRF آرآیدوپسیس (AtGRF1-AtGRF9) و برنج (OsGRF1-OsGRF12) به‌عنوان توالی اولیه جهت blastP با $E. Value \leq e^{-10}$ در پایگاه داده مذکور استفاده شد. پس از دریافت تمام توالی‌ها، توالی‌های تکراری حذف شدند. در ادامه توالی‌های پروتئینی از لحاظ وجود دومین‌های QLQ (PF08880) و WRC (PF08879) با استفاده از پایگاه داده Pfam (https://pfam.xfam.org/) ارزیابی شدند. تنها توالی‌های حاوی هر دو دمین QLQ و WRC به‌عنوان اعضاء خانواده ژنی GRF گندم در نظر گرفته شدند. جایگاه فعالیت این عوامل رونویسی در سلول با استفاده از سرور Deeploc (http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc) پیش‌بینی شد. ابزار ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/) برای بررسی ویژگی‌های عمومی پروتئین‌های GRF مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، و طول پروتئین استفاده شد. جهت بررسی میزان حفاظت‌شدگی دمین‌های QLQ و WRC، ابتدا با استفاده از ClustalW هم‌ردیف‌سازی توالی پروتئین‌های GRF گندم انجام شد (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw) و در ادامه برای ارزیابی اسیدهای آمینه حفاظت شده از نرم‌افزار Bioedit استفاده شد.

درخت تکاملی و ساختار ژنی

هم‌ردیف‌سازی توالی پروتئین GRFهای شناسایی‌شده گندم با توالی‌های GRF برنج، آرآیدوپسیس و سویا با استفاده از ClustalW (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw) انجام شد. رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از

1. Bootstrap

GRF شناسایی شده در گندم دارای pI کمتر از ۷ می‌باشد، لذا می‌توانند از نظر کارکردی نسبت به سایر ژن‌های *GRF* گندم متفاوت باشند (Zhao *et al.*, 2019). ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی پروتئین‌های گندم تا حدود زیادی مشابه به خصوصیات پروتئین‌های *GRF* در سایر گیاهان است.

به‌عنوان مثال طول پروتئین‌های *GRF* در توتون ۲۱۴ تا ۶۱۰ کلم ۲۴۷ تا ۵۳۸، کلزا ۴۳۲ تا ۵۳۸ و بادام‌زمینی ۲۶۸ تا ۶۳۰ اسیدآمینو است. همچنین pI توتون ۵/۹۶ تا ۱۰/۳۱، کلم ۶/۴۴ تا ۹/۳۲، کلزا ۶/۴۵ تا ۹/۵۲ و بادام‌زمینی ۶/۶۱ تا ۹/۹۴ است. وزن مولکولی این پروتئین‌ها در دامنه ۲۰ تا ۶۰ کیلو دالتون است (Wang *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019). بررسی جایگاه کروموزومی این ژن‌ها حاکی از آن است که در ژنوم A، ۱۲ ژن؛ ژنوم B، ۸ ژن و در ژنوم D، ۱۰ ژن *GRF* وجود دارند. همچنین در هر سه ژنوم A، B و D کروموزوم‌های ۲، ۴، ۶ و ۷ دارای ژن‌های *GRF* بودند. نام‌گذاری ژن‌های *GRF* شناسایی شده بر اساس جایگاه کروموزومی آن‌ها انجام و بر این اساس از *TaGRF1* تا *TaGRF30* نام‌گذاری شدند که در آن Ta مربوط به نام علمی گندم (*Triticum aestivum*) است (جدول ۱؛ شکل ۲). مضاعف‌شدگی قطعه‌ای و تاندوم از جمله عوامل تأثیرگذار در ایجاد خانواده‌های ژنی و تکامل ژنوم محسوب می‌شود (Moore and Purugganan, 2003). تفاوت مشاهده‌شده می‌تواند به علت حادث شدن مضاعف‌شدگی در ژن‌های *GRF* در طی تکامل گیاهان باشد و لذا تعداد ژن‌های *GRF* گیاهان با ژنوم کوچک‌تر افزایش یافته باشد. به‌عنوان مثال در آرابیدوپسیس و هلو به ترتیب ۴ و ۸ ژن در ناحیه مضاعف‌شدگی قرار دارد (Cao *et al.*, 2016).

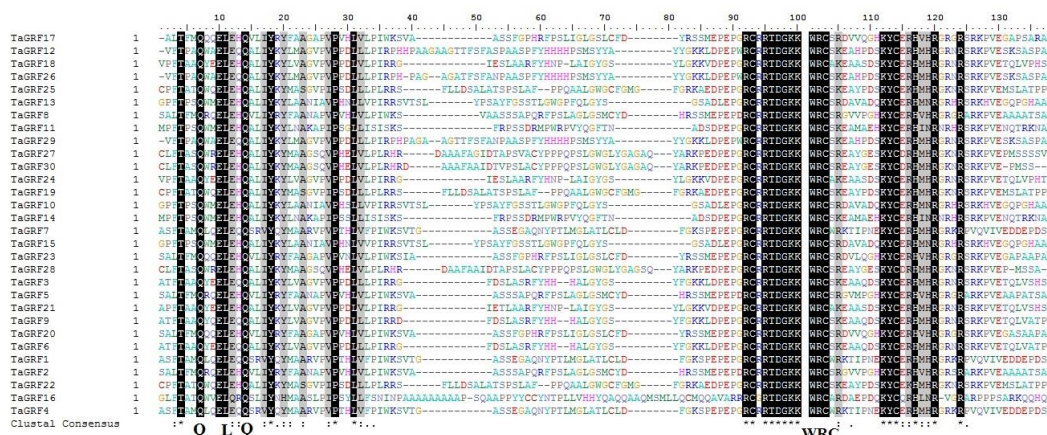
RNA-seq پایگاه داده expVIP انجام شد (<http://www.wheat-expression.com/>).

داده‌ها به‌صورت لگاریتم بر مبنای دو TPM (رونوشت در هر میلیون) مربوط به بافت‌های ریشه در مراحل گیاهچه‌ای، رویشی و زایشی، ساقه/برگ در مراحل گیاهچه‌ای، رویشی و زایشی، سنبله در مراحل رویشی و زایشی و بذر در مرحله زایشی است. رسم نقشه حرارتی با استفاده از بسته gplots نرم‌افزار R انجام شد. آنالیز هستی‌شناسی (GO) ژن‌های *GRF* گندم با استفاده از نرم‌افزار TBtools و بر اساس عبارت‌های هستی‌شناسی گندم موجود در پایگاه داده Ensembl Plants انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی ژن‌های *GRF* گندم و ویژگی‌های آن‌ها توالی پروتئین ژن‌های *GRF* آرابیدوپسیس (۹ ژن) و برنج (۱۲ ژن) (Cao *et al.*, 2016) از طریق الگوریتم BlastP برای شناسایی *GRF*‌های گندم در پایگاه داده Plant ensemble استفاده شد. پس از حذف نتایج تکراری، بررسی توالی‌ها با هدف شناسایی پروتئین‌های *GRF* دارای دمین‌های حفاظت شده WRC و QLQ و مشخص کرد که ۳۰ توالی دارای هر دو دمین مذکور بوده و لذا به‌عنوان ژن‌های *GRF* گندم در نظر گرفته شدند (شکل ۱). پروتئین‌های کدشده به‌وسیله ژن‌های *GRF* گندم از نظر اندازه و ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی متفاوت بودند (جدول ۱).

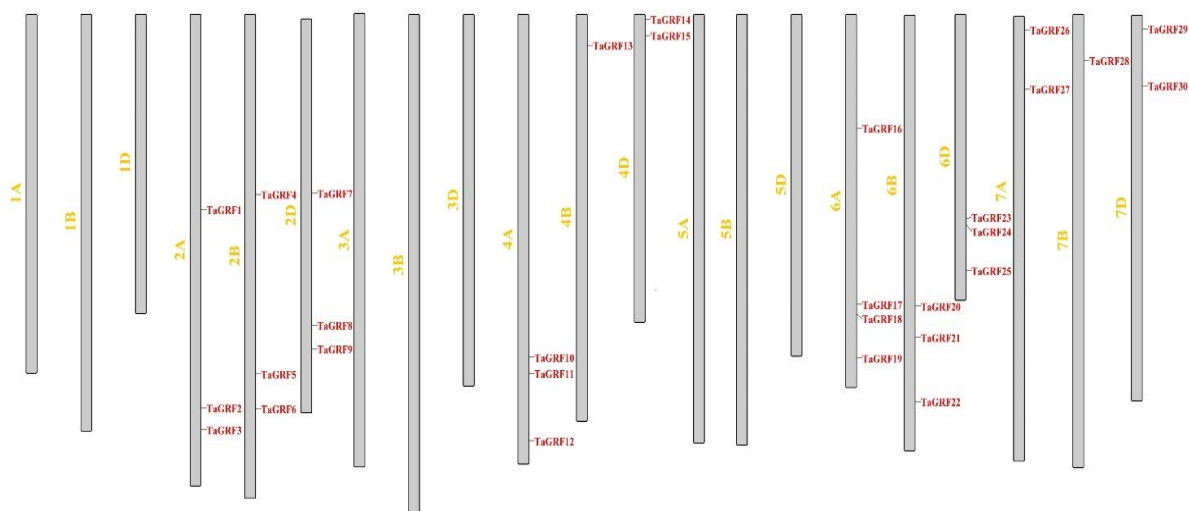
طول پروتئین‌های این خانواده در دامنه ۲۱۱ تا ۶۱۱ اسیدآمینو متغیر می‌باشند. علاوه بر این نقطه ایزوالکتریک (۴/۷۲ تا ۹/۹) و وزن مولکولی (۲۲/۳۴ تا ۶۴/۴۲ کیلو دالتون) آن‌ها نیز بسیار متنوع است. ۷ ژن



شکل ۱. هم‌ردیف‌سازی دمین‌های QLQ و WRC در پروتئین‌های GRF گندم. اسیدهای آمینه حفاظت‌شده و نیمه‌حفاظت‌شده مشخص شده‌اند. تصویر بر اساس نرم‌افزار Bioedit است.

جدول ۱. مشخصات ژنومی و پروتئینی ژن‌های GRF شناسایی شده در گندم.

Accession Number	Gene Name	Chromosome	Gene Start	Gene End	Protein Length	Molecular Weight (kD)	Isoelectric Point	Localization
TraesCS2A02G238700	TaGRF1	2A	323528641	323530709	319	34.68	4.89	Nuclear
TraesCS2A02G398300	TaGRF2	2A	651752444	651753590	225	23.82	9.82	Nuclear
TraesCS2A02G435100	TaGRF3	2A	687048698	687052485	384	42.32	6.76	Nuclear
TraesCS2B02G256600	TaGRF4	2B	298324714	298327379	263	28.16	4.72	Nuclear
TraesCS2B02G416300	TaGRF5	2B	594982278	594983776	227	24.07	9.82	Nuclear
TraesCS2B02G458400	TaGRF6	2B	653016354	653019980	387	42.45	7.01	Nuclear
TraesCS2D02G246600	TaGRF7	2D	288225741	288228187	264	28.18	4.76	Nuclear
TraesCS2D02G395900	TaGRF8	2D	506941472	506942539	229	24.22	9.57	Nuclear
TraesCS2D02G435200	TaGRF9	2D	546208318	546212200	391	42.78	7.04	Nuclear
TraesCS4A02G255000	TaGRF10	4A	567181384	567185511	607	63.95	6.87	Nuclear
TraesCS4A02G291500	TaGRF11	4A	594532829	594535533	408	45.32	9	Nuclear
TraesCS4A02G434900	TaGRF12	4A	705509912	705513259	371	39.94	8.5	Nuclear
TraesCS4B02G060000	TaGRF13	4B	51679625	51683720	611	64.42	6.72	Nuclear
TraesCS4D02G020300	TaGRF14	4D	8777205	8779937	415	45.99	8.82	Nuclear
TraesCS4D02G059600	TaGRF15	4D	35476875	35481038	578	61.16	6.58	Nuclear
TraesCS6A02G174800	TaGRF16	6A	188250927	188252018	315	33.6	8.12	Nuclear
TraesCS6A02G257600	TaGRF17	6A	479833651	479834702	212	22.59	9.54	Nuclear
TraesCS6A02G269600	TaGRF18	6A	496010434	496017229	408	43.45	7.65	Nuclear
TraesCS6A02G335900	TaGRF19	6A	568515906	568517951	409	44.78	7.22	Nuclear
TraesCS6B02G267500	TaGRF20	6B	481089083	481090143	211	22.34	9.64	Nuclear
TraesCS6B02G296900	TaGRF21	6B	532899954	532903804	406	43.43	8.46	Nuclear
TraesCS6B02G366700	TaGRF22	6B	639532839	639534932	410	44.72	7.21	Nuclear
TraesCS6D02G238900	TaGRF23	6D	339389350	339390413	215	22.75	9.9	Nuclear
TraesCS6D02G245300	TaGRF24	6D	347433246	347436961	409	43.62	8.16	Nuclear
TraesCS6D02G315700	TaGRF25	6D	423814859	423816885	414	45.26	7.24	Nuclear
TraesCS7A02G049100	TaGRF26	7A	22937762	22943978	370	40.16	8.78	Nuclear
TraesCS7A02G165600	TaGRF27	7A	121056090	121057606	309	34.21	8.55	Nuclear
TraesCS7B02G070200	TaGRF28	7B	76903837	76905287	316	34.88	8.55	Nuclear
TraesCS7D02G044200	TaGRF29	7D	22586526	22589173	368	39.89	8.57	Nuclear
TraesCS7D02G166400	TaGRF30	7D	117132680	117134270	320	35.4	8.26	Nuclear



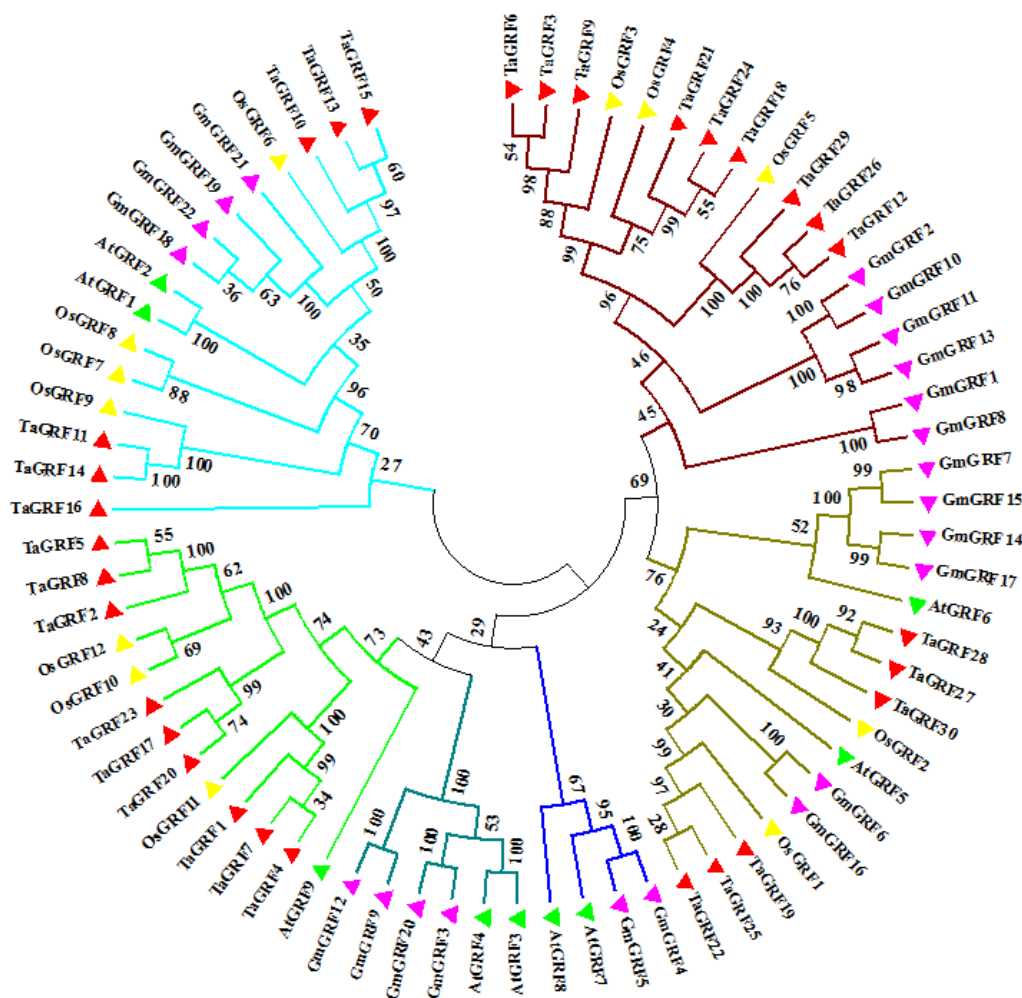
شکل ۲. الگوی توزیع ژن‌های *TaGRT* بر روی کروموزوم‌های گندم

نکته دیگر که باید به آن توجه کرد رابطه سطح پلوئیدی و تعداد ژن *GRF* است. گندم، توتون، بادام‌زمینی و کلزا پلی‌پلوئیدی بوده و بیشترین ژن‌های *GRF* را دارند بر این اساس می‌توان گفت پلی‌پلوئیدی و مضاعف شدگی‌های احتمالی عامل اصلی تفاوت در تعداد ژن‌های *GRF* در گیاهان با اندازه ژنوم متفاوت است.

فیلوژنتیک و ساختار ژنی

مطالعه رابطه تکاملی ژن‌های خانواده *GRF* گندم با استفاده از رسم درخت فیلوژنتیکی توالی پروتئینی خانواده *GRF* گندم، آرابیدوپسیس (۹ ژن)، برنج (۹ ژن) و سویا (۲۲ ژن) رسم شد. بر این اساس ۷۳ توالی *GRF* گیاهان تک‌لپه و دولپه به ۶ زیر گروه تقسیم شدند (شکل ۳). زیر گروه یک با ۱۶ ژن بزرگ‌ترین و زیر گروه سه با داشتن ۴ ژن کوچک‌ترین زیر گروه است. زیر گروه‌های ۲ و ۶ شامل ژن‌هایی از گندم، آرابیدوپسیس، برنج و سویا است. زیر گروه ۲ شامل دو ژن از برنج، دو ژن از آرابیدوپسیس، ۶ ژن سویا و ۶ ژن گندم تشکیل شده است. گروه سه و چهار اختصاصی گیاهان دولپه‌ای بوده و تنها حاوی ژن‌های سویا و آرابیدوپسیس است. زیر گروه ۳ دارای دو ژن از هر کدام از گیاهان آرابیدوپسیس و سویا است در حالی که دو ژن آرابیدوپسیس و چهار ژن سویا گروه چهار را ایجاد کرده‌اند (شکل ۳).

گروه یک اگرچه شامل ژن‌های *GRF* گیاهان تک‌لپه و دولپه است با این حال فاقد ژن‌های *GRF* آرابیدوپسیس بوده و از ۸ ژن گندم، ۲ ژن برنج و ۶ ژن سویا ایجاد شده است. گروه پنج بر خلاف زیر گروه یک فاقد ژن‌های سویا بوده و شامل ۹ ژن گندم، ۳ ژن برنج و تنها یک ژن آرابیدوپسیس (*AtGRF9*) است (شکل ۳). زیر گروه‌های *GRF* اختصاصی گیاهان تک‌لپه و دولپه در سایر مطالعات مربوط به ژن‌های *GRF* در خیار، بادام‌زمینی و پرتقال اشاره شده است (Liu et al., 2016; Zhou et al., 2018; Zhao et al., 2019). از نظر تکاملی وجود زیر گروه‌های اختصاصی تک‌لپه یا دولپه حاکی از این امر است که پس از انشقاق حادث شده مسیر تکاملی متفاوتی برای ژن‌های *GRF* در گیاهان تک‌لپه و دولپه طی شده است و احتمالاً تعدادی ژن در گیاهان حذف یا بر اثر مضاعف شدگی اضافه شده‌اند (Cao et al., 2020).



شکل ۳. درخت تکاملی پروتئین GRF گندم، سویا، برنج و آرابیدوپسیس. الاینمنت توالی‌ها با ابزار ClustalW انجام و سپس درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار MEGA7 رسم شد.

صفر، یک و دو به ترتیب به درج یک اینترون بین دو کدون متوالی، بین باز اول و دوم کدوم و بین باز دوم و سوم یک کدون اشاره دارد (Kaur et al., 2016). نوع فاز اینترونی رابطه مستقیمی با میزان حفاظت شدگی توالی در جایگاه اسپلایسینگ دارد. بیشترین میزان حفاظت شدگی به ترتیب برای فاز صفر، یک و دو است (Yan et al., 2019). در مورد خانواده ژنی *TaGRF* اگرچه در هر گروه تعداد اگزون و اینترون و فاز اینترونی تا حدود زیادی مشابه است با این حال تفاوت‌هایی نیز وجود دارد (شکل ۴). به‌عنوان مثال ژن‌های *TaGRF6*، *TaGRF3*، *TaGRF4*

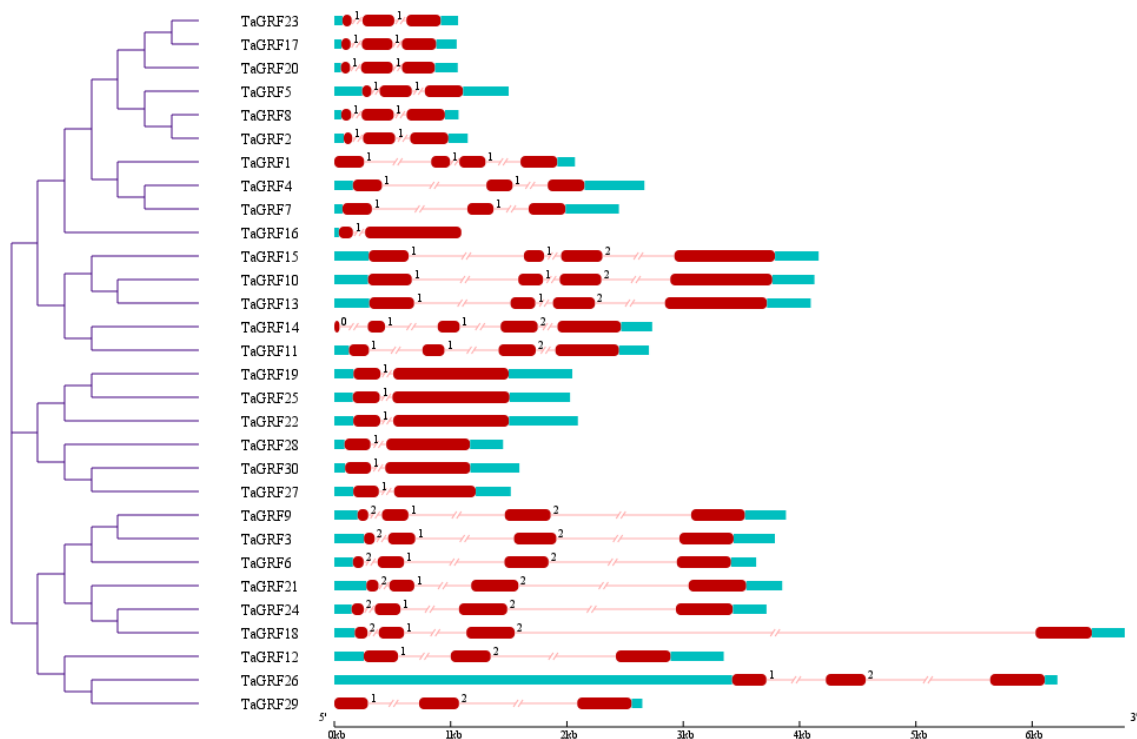
به‌منظور دستیابی به تفاوت‌های ساختاری ژن‌های *TaGRF*، الگوی اگزون-اینترون ژن‌ها از طریق مقایسه توالی کد کننده (CDS) نسبت به توالی DNA ژنومی هر ژن رسم شد. بر این اساس مشخص شد که ژن‌های مذکور ۲ تا ۵ اگزون دارند (شکل ۴). بیشترین طول ژن مربوط به ژن *TaGRF12* است. همچنین هر سه فاز اینترونی صفر، یک و دو در این خانواده ژنی قابل‌مشاهده است. اینترون‌های فاز یک ۶۸ درصد، فاز دو ۳۰ درصد و فاز دو ۲ درصد اینترون‌های خانواده ژنی *TaGRF* را تشکیل داده‌اند (شکل ۴). فاز اینترونی

مهمی در کنترل بیان ژن‌ها در طی رشد و نمو و نیز پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌های مختلف دارند (Koul *et al.*, 2019). به‌منظور شناسایی عناصر تنظیمی در پیش‌بر ژن‌های *TaGRF*، ۱۵۰۰ جفت باز بالادست کدون شروع هر یک از ژن‌های مذکور در سرور PlantCare ارزیابی شد. صرف‌نظر از عناصر تنظیمی عمومی مانند CAAT-box و TATA-box و نیز عناصر تنظیمی پاسخ به نور، سپس المنت‌های درگیر در پاسخ به هورمون‌ها، تنش‌ها و فرآیندهای نموی در پیش‌بر ژن‌های *GRF* گندم شناسایی شد. این عناصر در پاسخ به خشکی، سرما، زخم، الیستور، جیبرلین، آبسازیک اسید، اکسین، اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جازمونات و نیز بیان اختصاصی در مریستم، آوند چوبی، بذر و ... نقش دارند (جدول ۲).

TaGRF21، *TaGRF24* و *TaGRF18* دارای چهار اگزون و الگوی فاز اینترونی ۲۱۲ می‌باشند. این در حالی است که سه ژن *TaGRF26*، *TaGRF12* و *TaGRF24* از سه اگزون با فاز اینترونی ۱۲ تشکیل شده‌اند. به نظر می‌رسد برای این سه ژن در طی تکامل حذف اینترون حادث شده است و طی آن اینترون شماره یک با فاز اسپلاسینگ دو حذف و اگزون یک و دو باهم ترکیب شده‌اند. لذا علاوه بر تفاوت در تعداد اگزون‌ها و فاز اینترونی، طول اگزون یک این سه ژن از طول اگزون یک سایر ژن‌های این کلاستر فیلوژنتیکی بیشتر است (شکل ۴).

عناصر تنظیمی و تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌های *TaGRF*

بیان و کارکرد ژن بر اساس عناصر تنظیمی سپس ناحیه پیش‌بری آن تعیین می‌شود و لذا این عناصر نقش



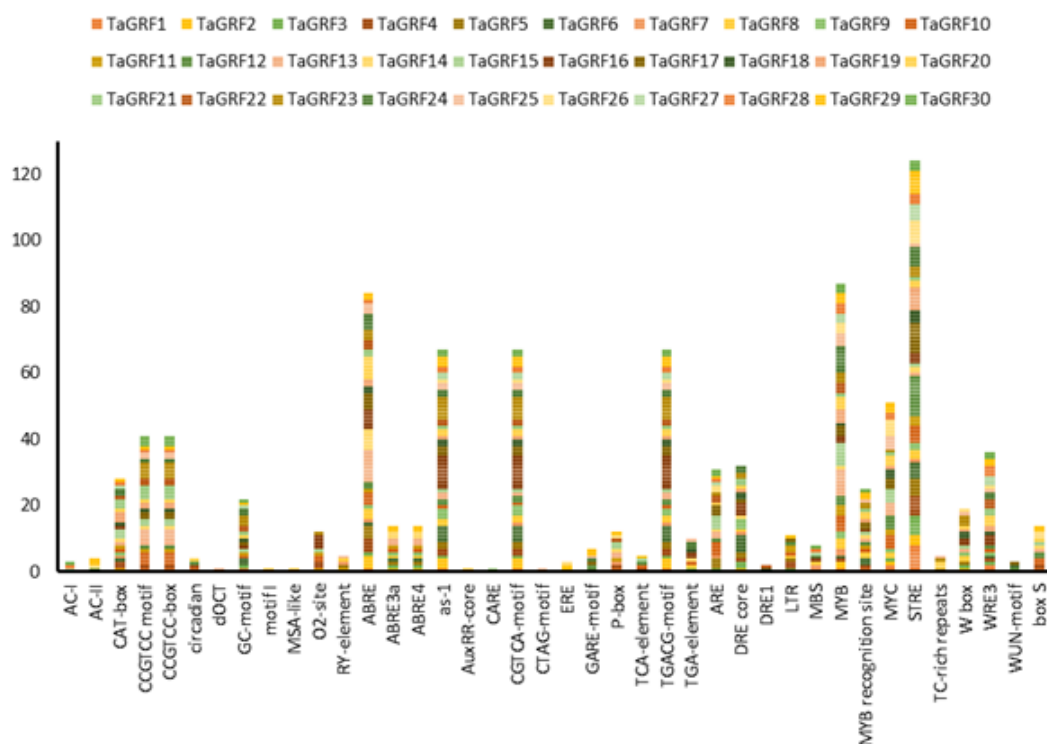
شکل ۴. ساختار ژنی مربوط به *GRF* گندم. ساختار ژن در سه بخش بالادست/پایین‌دست، اگزون‌ها و اینترون و به ترتیب با جعبه آبی، جعبه قرمز و خط صورتی نشان داده شده‌اند. اعداد روی هر ژن نشان دهنده فاز اینترونی است.

جدول ۲. عناصر سیس ناحیه پیش‌بر ژن‌های *GRF* گندم و کارکرد ارائه‌شده برای آن‌ها

عناصر سیس	کارکرد	عناصر سیس	کارکرد
AC-I	xylem specific expression	ERE	ethylene-responsive element
AC-II	xylem specific expression	GARE-motif	gibberellin-responsive element
CAT-box	element related to meristem expression	P-box	gibberellin-responsive element
CCGTCC motif	cell cycle and cell proliferation response	TCA-element	involved in salicylic acid responsiveness
CCGTCC-box	growth and development responsive	TGACG-motif	involved in the MeJA-responsiveness
circadian	element involved in circadian control	TGA-element	auxin-responsive element
dOCT	related to meristem specific activation	ARE	essential for the anaerobic induction
GC-motif	involved in anoxic specific inducibility	DRE core	drought response
motif I	cis-acting regulatory element root specific	DRE1	drought response
MSA-like	involved in cell cycle regulation	LTR	involved in low-temperature responsiveness
O2-site	involved in zein metabolism regulation	MBS	involved in drought-inducibility
RY-element	involved in seed-specific regulation	MYB	water response, drought response
ABRE	involved in the abscisic acid responsiveness	MYB recognition site	Water deficit, ABA
ABRE3a	involved in the abscisic acid responsiveness	MYC	drought response
ABRE4	involved in the abscisic acid responsiveness	STRE	stress-response element
as-1	salicylic acid and oxidative stress-responsive	TC-rich repeats	involved in defense and stress responsiveness
AuxRR-core	involved in auxin responsiveness	W box	elicitor responsive cis-element
CARE	ABA response, GA response	WRE3	wounding
CGTCA-motif	involved in the MeJA-responsiveness	WUN-motif	wound-responsive element
CTAG-motif	involved in the MeJA-responsiveness	box S	wounding and pathogen response

در مطالعه‌ای که بر روی ژن‌های *GRF* پرتقال انجام گرفت مشخص شد که علی‌رغم وجود سیس المنت‌های اشاره‌شده، تیمار GA تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های *GRF* ندارد. از سوی دیگر ژن‌های *GRF* که در پیش‌بر خود فاقد المنت‌های P-box و GARE-motif هستند در اثر تیمار GA القاء می‌شوند. بر این اساس به نظر می‌رسد علاوه بر وجود این عناصر و سایر عناصر تنظیمی و تعداد آن‌ها، جایگاه هر عنصر تنظیمی بر روی پیش‌بر و نیز عوامل ناشناخته بر روی بیان ژن‌ها مؤثر است (Sun and Gubler 2004; Li *et al.*, 2015). مطالعه پیش‌بر خانواده ژنی *GRF* در خیار، گوجه‌فرنگی و توتون نیز نشان دهنده وجود عناصر تنظیمی با فراوانی و کارکردهای متفاوت است که حاکی از نقش و عملکرد متفاوت ژن‌های *GRF* در این گیاهان و گندم در شرایط مختلف محیطی و نموی در بافت‌ها است (Khatun *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

سیس المنت STRE با فراوانی ۱۲۴ عدد، بیشترین فراوانی را در بین عناصر تنظیمی داشته و یک عنصر پاسخ به تنش است. همچنین MYB دومین المنت با فراوانی ۸۷ عدد است که در تنش خشکی نقش دارد (شکل ۵). سیس المنت‌های ABRA، as-1، CGTCA-motif و TGACG-motif به ترتیب با فراوانی ۸۴، ۶۷، ۶۷ و ۶۷ بیشترین فراوانی را در بین سیس المنت‌های پاسخ به هورمون‌ها دارند (شکل ۵). از بین عناصر تنظیمی اختصاصی بافت و نمو، سیس المنت CCGTCC-motif (CCGTCC-box) که در رشد و نمو و تکثیر سلول نقش دارد با فراوانی ۴۱ عدد اشاره کرد که با توجه به کارکرد عمومی و شناخته‌شده ژن‌های *GRF* می‌تواند قابل توجه باشد. علاوه بر عناصر تنظیمی اشاره‌شده، دو سیس المنت P-box با فراوانی ۱۲ عدد و GARE-motif با فراوانی ۷ عدد در پاسخ به هورمون جیبرلین نقش دارند (شکل ۵).



شکل ۵. فراوانی عناصر تنظیمی سیس شناسایی شده در ناحیه پیش‌بری ژن‌های *GRF* گندم. بیشترین فراوانی به ترتیب برای *STRE*، *MYB* و *ABRE* است.

miRNA396 با توالی‌های 5'-UCCACAGGCUUUCUUGAACUG-3' و 5'-UUCCACAGCUUUCUUGAACUU-3' شناسایی شده است (Wang et al., 2018). این *miRNA396*‌های شناسایی شده قادر به تنظیم بیان پس از رونویسی ۲۶ ژن از مجموع ۳۰ ژن *GRF* گندم هستند. *miRNA396* توانایی جفت شدن با ژن‌های *TaGRF1*، *TaGRF4*، *TaGRF7* و *TaGRF16* را نداشته و لذا نقش تنظیمی خود را بر روی این چهار ژن نمی‌تواند اعمال کند. مطالعات انجام گرفته در سایر گیاهان نشان دهنده تأثیر این *miRNA* در رشد و نمو گیاه است. مشخص شده است که از ۹ ژن *GRF* آرایی‌دوپسیس ۷ ژن تحت تأثیر *miRNA396* هستند (Kim and Tsukaya, 2015). همچنین فرایان این *miRNA* موجب کاهش سطح بیان ژن‌های *GRF* توتون شده است

مولکول‌های RNA کوچک غیر کدکننده به‌عنوان عوامل مهم تنظیم بیان ژن در سطح رونویسی و پس از رونویسی شناخته می‌شوند (Wang et al., 2018). مولکول‌های *miRNA* مهم‌ترین گروه RNAهای غیر کدکننده هستند که توانایی تنظیم بیان ژن پس از رونویسی از طریق برش mRNA و یا ممانعت از ترجمه را دارند (Nair et al., 2020). مولکول *miRNA396* از جمله عوامل مؤثر در تنظیم کارکرد ژن‌های *GRF* از طریق کنترل بیان پس از رونویسی است. بررسی ژن‌های *GRF* گندم در پایگاه داده psRNATarget نشان داد که *miRNA396* مربوط به گندم در این پایگاه داده توانایی جفت شدن با ژن‌های *TaGRF* را نداشته و قادر بر اثرگذاری بر روی بیان و کارکرد این ژن‌ها نیست. با این حال در مطالعات مربوط به مولکول‌های *miRNA* گندم نوع دیگری از

TaGRF14، *TaGRF11*، *TaGRF25* و *TaGRF26* دارای الگوی بیان کم تا متوسط هستند (شکل ۶-الف). برای برخی از ژن‌ها به‌استثنای مرحله رشد خوشه بیانی مشاهده نشد. به نظر می‌رسد این ژن‌ها در بافت‌های اختصاصی دیگر یا شرایط ویژه مانند تنش‌های زیستی و غیر زیستی بیان می‌شوند (Yu et al., 2019). در حالت کلی می‌توان گفت الگوی بیان مشاهده‌شده می‌تواند تأییدی بر کارکرد متنوع ژن‌های *GRF* گندم در تنظیم رشد و نمو هر یک از بافت‌های این گیاه و نیز همکاری مشترک این ژن‌ها در فرآیندهای نمو گندم است.

آنالیز هستی‌شناسی (GO) ژن‌های *TaGRF* با هدف درک بیشتر کارکردهای مربوط به این خانواده ژنی در سه گروه فرآیند بیولوژیکی^۲، کارکردهای مولکولی^۳ و اجزای سلولی^۴ انجام شد (شکل ۶-ب). بر این اساس در گروه فرآیند بیولوژیکی ۴۸ عبارت هستی‌شناسی معنی‌دار شد که از جمله آن می‌توان به فرآیند بیوسنتز RNA و تنظیم رونویسی و بیان ژن اشاره کرد. در گروه کارکردهای مولکولی ۱۷ و گروه اجزای سلولی ۶ عبارت هستی‌شناسی معنی‌دار شدند (شکل ۶-ب). از این عبارتها در مورد کارکردهای مولکولی می‌توان به اتصال به نوکلئوتید و از عبارت-های اجزای سلولی می‌توان به هسته اشاره کرد. نتایج حاصل از این آنالیز به‌خوبی با کارکرد تعریف‌شده برای فاکتورهای رونویسی هماهنگ است زیرا در حالت کلی نتایج GO نشان دهنده توانایی این ژن‌ها در اتصال به نوکلئوتیدها و تنظیم فرآیند رونویسی است.

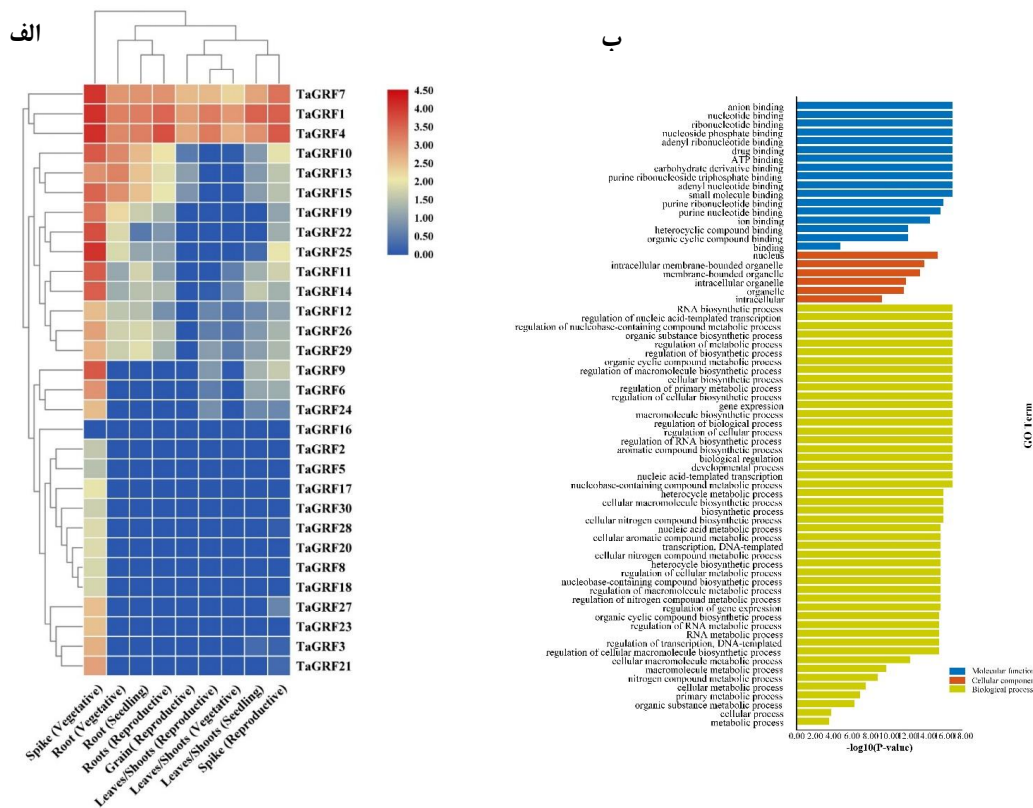
(Yang et al., 2009). در آفتابگردان ۱۴ ژن *GRF* از کل ۱۷ ژن این خانواده متأثر از *miRNA396* است (Bing et al., 2019).

بیان ژن‌های *TaGRF* در بافت‌ها و مراحل نمو و بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها

مطالعات نشان داده است که الگوی بیان یک ژن با کارکرد آن در ارتباط است. لذا بیان ژن‌های *GRF* در بافت‌ها و مراحل نمو گندم بررسی شد (شکل ۶). در صورتی که TPM برابر صفر باشد بیان ژن غیرقابل تشخیص است. همچنین TPM بین صفر و دو برای بیان کم، بین دو و چهار برای بیان متوسط، بین چهار و شش برای بیان بالا در نظر گرفته شد (Zhao et al., 2019a). بر این اساس مشخص شد که تمامی ژن‌های *TaGRF* به‌استثناء *TaGRF16* در مرحله رشد خوشه دارای بیان کم تا بالا می‌باشند که می‌تواند حاکی از نقش‌های اختصاصی و مهم این ژن‌ها در سنبله باشد. سه ژن *TaGRF1*، *TaGRF4* و *TaGRF7* در تمامی بافت‌ها و مراحل نمو بیان متوسط تا بالایی را نشان داده‌اند (شکل ۶-الف).

نکته جالب‌توجه در مورد این سه ژن عدم توانایی *miRNA396* در کنترل و تنظیم بیان پس از رونویسی این ژن‌ها است. با توجه به الگوی بیان این سه ژن و نیز عدم تأثیر *miRNA396* بر بیان آن‌ها می‌توان احتمال داد که نقش این ژن‌ها متفاوت از سایر ژن‌های *GRF* گندم بوده و نقش مهمی در فرآیندهای بیولوژیکی به‌ویژه نمو بافت‌های گندم بر عهده دارند. برخلاف سایر بافت‌ها که عموماً بیان *TaGRF1*، *TaGRF4* و *TaGRF7* بالا است، در مراحل نمو مختلف ریشه ژن‌های بیشتری درگیر هستند و ژن‌های *TaGRF10*، *TaGRF13* و *TaGRF15*، *TaGRF19* و *TaGRF22*

^۲ Biological Process
^۳ Molecular Function
^۴ Cellular Component



شکل ۶. پروفایل بیانی (الف) و هستی‌شناسی (ب) ژن‌های GRF گندم در بافت‌ها. الف) مقیاس رنگ نشان دهنده لگاریتم بر مبنای دو رونوشت بر میلیون (log₂TPM) است. رنگ قرمز و آبی به ترتیب بیان بالا و پایین را نشان می‌دهد.

اساس داده‌های RNA-seq نشان داد که این ژن‌ها نقش ویژه‌ای در مرحله رویشی سنبله دارند. همچنین سه ژن *TaGRF1*، *TaGRF4* و *TaGRF7* در تمام بافت‌های گندم در تمامی مراحل نمو در همه بافت‌ها دارای بیان بالایی می‌باشند. نتایج هستی‌شناسی ژن‌ها با کارکرد تعریف‌شده برای فاکتورهای رونویسی در تنظیم بیان ژن‌ها کاملاً هماهنگ است. این مطالعه می‌تواند اطلاعات با ارزشی از نظر ویژگی‌های تکاملی، ساختاری و کارکردی جهت مطالعات آتی در مورد نقش ویژه هر یک از این ژن‌ها در رشد و نمو گندم در شرایط عادی و تنش و در نهایت بهبود ویژگی‌های ارقام برای ضعف در ساختار مرتبط ارائه دهد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ۳۰ ژن *GRF* در ژنوم گندم شناسایی شد که تمام آن‌ها دارای دمین‌های حفاظت شده *WRC* و *QLQ* بودند. از نظر تکاملی ژن‌های *GRF* گندم و برنج در چهار زیر گروه مختلف قرار گرفتند و دو گروه اختصاصی مربوط به گیاهان دولپه است. در هر زیرگروه ساختار ژنی تا حدود زیادی حفاظت شده است. همچنین وجود تنوع عناصر تنظیمی ناحیه پیش‌بری از نظر فراوانی و کارکردی و نیز تنظیم بیشتر ژن‌های *GRF* گندم به وسیله *miRNA396* حاکی از پیچیدگی تنظیم بیان این ژن‌ها در شرایط مختلف رشدی گندم است. الگوی بیان *TaGRF* بر

REFERENCES

- Amberg A. (2013) *In Silico* Methods. In: Vogel HG, Maas J, Hock FJ, Mayer D. (eds) Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bing J, Xiao E, Li C, Wang Z (2019) Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Growth-Regulating Factor Family Genes in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Preprints:2019120151.
- Bolduc N, Hake S (2009) The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*. The Plant Cell 21 (6):1647-1658.
- Cao JF, Huang JQ, Liu, X, Huang, CC, Zheng, ZS, Zhang, XF, Shangguan, XX, Wang LJ, Zhang YG, Wendel JF, Grover, CE. (2020). Genome-wide characterization of the GRF family and their roles in response to salt stress in *Gossypium*. BMC genomics.21(1):1-16.
- Cao Y, Han Y, Jin Q, Lin Y, Cai Y (2016) Comparative genomic analysis of the GRF genes in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd), poplar (*Populus*), grape (*Vitis vinifera*), Arabidopsis and rice (*Oryza sativa*). Frontiers in plant science. 7: 1750.
- Chen F, Yang Y, Luo X, Zhou W, Dai Y, Zheng C, Liu W, Yang W, Shu K (2019) Genome-wide identification of GRF transcription factors in soybean and expression analysis of GmGRF family under shade stress. BMC plant biology. 19 (1): 269.
- Choi D, Kim JH, Kende H (2004) Whole genome analysis of the OsGRF gene family encoding plant-specific putative transcription activators in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Physiology. 45 (7): 897-904.
- Hewezi T, Maier TR, Nettleton D, Baum TJ (2012) The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. Plant physiology. 159 (1): 321-335.
- Hu Z, Ban Q, Hao J, Zhu X, Cheng Y, Mao J, Lin M, Xia E, Li Y. (2020). Genome-wide characterization of the C-repeat binding factor (CBF) gene family involved in the response to abiotic stresses in tea plant (*Camellia sinensis*). Frontiers in plant science. 11: 921.
- Hughes TR (2011) A handbook of transcription factors, vol 52. Springer Science & Business Media,
- Jin J, Tian F, Yang D-C, Meng Y-Q, Kong L, Luo J, Gao G (2016) PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. Nucleic acids research. gkw982.
- Kaur S, Dhugga KS, Gill K, Singh J (2016) Novel structural and functional motifs in cellulose synthase (CesA) genes of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). PLoS One. 11 (1).
- Khatun K, Robin AHK, Park J-I, Nath UK, Kim CK, Lim KB, Nou IS, Chung M-Y (2017) Molecular characterization and expression profiling of tomato GRF transcription factor family genes in response to abiotic stresses and phytohormones. International journal of molecular sciences. 18 (5): 1056.
- Kim JH, Choi D, Kende H (2003) The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. The Plant Journal. 36 (1): 94-104.
- Kim JH, Tsukaya H (2015) Regulation of plant growth and development by the GROWTH-REGULATING FACTOR and GRF-INTERACTING FACTOR duo. Journal of experimental botany

- 66 (20): 6093-6107.
- 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.
- Kuijt SJ, Greco R, Agalou A, Shao J, CJ't Hoen C, Övernäs E, Osnato M, Curiale S, Meynard D, van Gulik R (2014) Interaction between the growth-regulating factor and knotted1-like homeobox families of transcription factors. Plant Physiology. 164 (4): 1952-1966.
- 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.
- Li S-B, OuYang W-Z, Hou X-J, Xie L-L, Hu C-G, Zhang J-Z (2015) Genome-wide identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). Frontiers in Plant Science. 6: 119.
- Liu X, Guo L-X, Jin L-F, Liu Y-Z, Liu T, Fan Y-H, Peng S-A (2016) Identification and transcript profiles of citrus growth-regulating factor genes involved in the regulation of leaf and fruit development. Molecular biology reports. 43 (10): 1059-1067.
- Ma JQ, Jian H-J, Yang B, Lu K, Zhang A-X, Liu P, Li J-N (2017) Genome-wide analysis and expression profiling of the GRF gene family in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Gene. 620: 36-45.
- Mathur S, Priyadarshini SS, Singh V, Vashisht I, Jung KH, Sharma R, Sharma MK. (2020). Comprehensive phylogenomic analysis of ERF genes in sorghum provides clues to the evolution of gene functions and redundancy among gene family members. 3 Biotech. 10 (3): 1-16.
- Mirzaei K, Bahramnejad B, Fatemi S. (2020). Genome-wide identification and characterization of the bZIP gene family in potato (*Solanum tuberosum*). Plant Gene, p.100257.
- Moore RC, Purugganan MD (2003) The early stages of duplicate gene evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100 (26): 15682-15687.
- Nair MM, Krishna T, Alagu M (2020) Bioinformatics insights into microRNA mediated gene regulation in *Triticum aestivum* during multiple fungal diseases. Plant Gene. 21: 100219.
- Omidbakhshfard MA, Proost S, Fujikura U, Mueller-Roeber B (2015) Growth-regulating factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. Molecular plant. 8 (7): 998-1010.
- Rosin FM, Hart JK, Horner HT, Davies PJ, Hannapel D (2003) Overexpression of a knotted-like homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation. Plant Physiology. 132 (1): 106-117.
- Sanjari S, Shirzadian-Khorramabad R, Shobbar ZS, Shahbazi M. (2019). Systematic analysis of NAC transcription factors' gene family and identification of post-flowering drought stress responsive members in sorghum. Plant cell reports. 38 (3): 361-376.
- Sun T-P, Gubler F (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. Annu Rev Plant Biol. 55: 197-223.
- Van Daele I, Gonzalez N, Vercauteren I, de Smet L, Inzé D, Roldán-Ruiz I, Vuylsteke M (2012) A comparative study of seed yield parameters in *Arabidopsis thaliana* mutants and transgenics. Plant biotechnology journal. 10 (4): 488-500.
- van der Knaap E, Kim JH, Kende H (2000) A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. Plant physiology. 122 (3): 695-704.

- Wang D, Ling L, Zhang W, Bai Y, Shu Y, Guo C (2018) Uncovering key small RNAs associated with gametocidal action in wheat. *Journal of experimental botany*. 69 (20): 4739-4756.
- Wang F, Qiu N, Ding Q, Li J, Zhang Y, Li H, Gao J (2014) Genome-wide identification and analysis of the growth-regulating factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *BMC genomics*. 15 (1): 807.
- Wang M, Yue H, Feng K, Deng P, Song W, Nie X (2016) Genome-wide identification, phylogeny and expressional profiles of mitogen activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genomics*. 17 (1): 668.
- Wu L, Zhang D, Xue M, Qian J, He Y, Wang S (2014) Overexpression of the maize GRF10, an endogenous truncated growth-regulating factor protein, leads to reduction in leaf size and plant height. *Journal of integrative plant biology*. 56 (11): 1053-1063.
- Wu Z-J, Wang W-L, Zhuang J-F, genomics i (2017) Developmental processes and responses to hormonal stimuli in tea plant (*Camellia sinensis*) leaves are controlled by GRF and GIF gene families. *Functional integrative genomics*. 17 (5): 503-512.
- Xiao J, Hu R, Gu T, Han J, Qiu D, Su P, Feng J, Chang J, Yang G, He G (2019) Genome-wide identification and expression profiling of trihelix gene family under abiotic stresses in wheat. *BMC genomics*. 20 (1): 287.
- Yan F, Zhou H, Yue M, Yang G, Li H, Zhang S, Zhao P (2019) Genome-wide identification and transcriptional expression profiles of the f-box gene family in common walnut (*Juglans regia* L.). *Forests*. 10 (3): 275.
- Yang F, Liang G, Liu D, Yu D (2009) *Arabidopsis* miR396 mediates the development of leaves and flowers in transgenic tobacco. *Journal of Plant Biology*. 52 (5): 475-481.
- Yu X, Han J, Wang E, Xiao J, Hu R, Yang G, He G (2019) Genome-wide identification and homoeologous expression analysis of PP2C genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in genetics*. 10: 561.
- Zhang D, Han Z, Li J, Qin H, Zhou L, Wang Y, Zhu X, Ma Y, Fang W. (2020). Genome-wide analysis of the SBP-box gene family transcription factors and their responses to abiotic stresses in tea (*Camellia sinensis*). *Genomics*. 112 (3): 2194-2202.
- Zhang J, Li Z, Jin J, Xie X, Zhang H, Chen Q, Luo Z, Yang J (2018) Genome-wide identification and analysis of the growth-regulating factor family in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Gene*. 639: 117-127.
- Zhao J, Zhang X, Wan W, Zhang H, Liu J, Li M, Wang H, Xiao J, Wang X (2019a) Identification and characterization of the EXO70 gene family in polyploid wheat and related species. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (1): 60.
- Zhao K, Li K, Ning L, He J, Ma X, Li Z, Zhang X, Yin D (2019b) Genome-Wide Analysis of the Growth-Regulating Factor Family in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *International journal of molecular sciences*. 20 (17): 4120.
- Zheng J, Liu F, Zhu C, Li X, Dai X, Yang B, Zou X, Ma Y. (2019). Identification, expression, alternative splicing and functional analysis of pepper WRKY gene family in response to biotic and abiotic stresses. *PloS one*. 14 (7): p.e0219775.
- Zhou Y, Ge L, Li G, Jiang L, Yang YJ (2018) Characterization and expression analysis of growth regulating factor (GRF) family genes in cucumber. *Archives of Biological Sciences*. 70 (4): 629-637.