

Identification of Auxin Response Factor (ARF) gene family in *Echium plantagineum* by Genome-wide analysis

Leila NejadSadeghi^{1*}, Somayeh Shams²

1. Corresponding author, Assist. Prof. Dept. Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran. Email: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir
2. Researcher, Dept. vegetables and irrigated pulse crop research, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, I.R. Iran

Received: 06.08.2023

Accepted: 16.03.2024

Abstract

Background and objectives:

Auxin response transcription factors (ARFs) are involved in auxin-mediated responses and play a key role in regulating the growth and development of plant nutrition, such as roots, stems, leaves, and reproductive organs, such as flowers and fruits. A genome-wide analysis of ARFs can improve the understanding of their regulatory role in the growth and development of our knowledge. Although the ARF gene family has been studied in some plant species, its structural features, molecular evolution, and expression profiling in *Echium plantagineum* are still unknown. This study aims to better understand distinctive structural and functional features among ARF proteins in *E. plantagineum*.

Methodology:

In this study, a comprehensive genome-wide analysis was carried out to find All members of the ARF family in *E. plantagineum* based on two methods: 1) Hidden Markov Model (HMM) profiles of ARF gene family members and 2) Alignment with Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) ARF genes sequence. ARF proteins were performed. The conserved motifs of ARF genes were identified, the chromosomal map and location of ARF genes were analyzed using a map chart, phylogenetic relationships using FastTree, and their protein characteristics were analyzed using the Expasy-ProtParam online server. To investigate the phylogenetic relationships of *E. plantagineum* ARF proteins, a phylogenetic tree was drawn using the alignment of *E. plantagineum* protein sequences.

Functional annotation and Gene Ontology classification were determined using the g: Profiler web server. The integrated network was predicted to identify co-expressed genes using the GeneMANIA web server.

Results:

Based on genome-wide analysis, 28 ARF genes were identified, widely distributed in multiple chromosomes of *E. plantagineum*. These genes have a transcription regulatory activity, and depending on the nature of the sequence, they have an activating or repressing role. Subcellular location prediction showed that the ARF proteins are most present in the nucleus. Phylogenetic analysis of the 28 ARF proteins forms ten main classes; each class is specialized in function and provides insights into different orthologous relationships. The present study identifies the ARF gene family of *E. plantagineum* and its evolutionary relationship with the members of this family in Arabidopsis species. This issue can help identify ARF genes and reveal their function. Analysis of conserved motifs and domain search in ARF protein sequences showed that ARF proteins have DNA binding domains such as B3 and Auxin_resp domain in their structure. Chromosomal localization analysis showed that ARF members are widely distributed in chromosomes. The



analysis of gene ontology terms (GO terms) in the biological process category showed that cellular process regulation, metabolic process regulation, stimulus-response, signaling, and biological regulation are the most significant GO terms.

Conclusion:

The results of this study provide a basis for identifying ARF genes and clarifying their function in *E. plantagineum*, which will be helpful for future research to discover and confirm the function of these genes.

Keywords: Expression, ARF transcription factors, *Echium plantagineum*, Gene ontology.

شناسایی خانواده ژنی فاکتور پاسخ‌گو به اکسین (ARF) در گل گاوزبان (*Echium plantagineum*)

با استفاده از تجزیه و تحلیل ژنومی

لیلا نژادصادقی*^۱ و سمیه شمس^۲

*^۱ - نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

پست الکترونیک: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir

^۲ - کارشناس بخش تحقیقات سبزی، صیفی و حبوبات آبی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶

چکیده

سابقه و هدف:

فاکتورهای رونویسی پاسخ‌گو به اکسین (ARF) نقش کلیدی در تنظیم رشد و نمو اندام‌های گیاهی مانند ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها و اندام‌های تولیدمثلی مانند گل‌ها و میوه‌ها دارند. تجزیه و تحلیل ژنومی ARF می‌تواند درک نقش تنظیمی آنها را در رشد و توسعه دانش ما بهبود ببخشد. اگرچه خانواده ژن ARF در برخی از گونه‌های گیاهی مطالعه شده است، اما ویژگی‌های ساختاری، تکامل مولکولی و پروفایل بیانی آنها در گل گاوزبان هنوز مشخص نیست. هدف این مطالعه به دست آوردن بینش بهتر در مورد ویژگی‌های ساختاری و عملکردی متمایز در بین پروتئین‌های ARF در گل گاوزبان پلانتاگینیوم (*Echium plantagineum*) است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه یک تجزیه و تحلیل جامع در کل ژنوم برای یافتن تمام اعضای خانواده ARF در گل گاوزبان پلانتاگینیوم بر پایه دو روش (۱) پروفایل‌های مخفی مدل مارکوف (HMM) اعضای خانواده ژنی ARF و (۲) هم‌ردیفی در برابر توالی‌های پروتئینی ARF آرابییدوبسیس (*Arabidopsis thaliana*) انجام شد. موتیف‌های حفاظت‌شده ژن‌های ARF شناسایی شد. نقشه کروموزومی و جایگاه ژن‌های ARF با استفاده از mapchart، روابط فیلوژنتیکی با استفاده از FastTree و ویژگی‌های پروتئینی آنها با استفاده از سرور آنالین Expasy-ProtParam بررسی گردید. برای بررسی روابط فیلوژنتیکی پروتئین‌های ARF گل گاوزبان، درخت فیلوژنتیک با استفاده از هم‌ترازی توالی‌های پروتئینی گل گاوزبان رسم شد. تفسیر کارکردی و طبقه‌بندی هستی‌شناسی ژن‌ها با استفاده از وب سرور g:Profiler تعیین شد. شبکه تعاملی به منظور شناسایی ژن‌های با بیان مشترک با استفاده از وب سرور GeneMANIA پیش‌بینی شد.

نتایج

بر اساس تجزیه و تحلیل گسترده ژنوم، در مجموع ۲۸ ژن ARF شناسایی شد که به طور گسترده در کروموزوم‌های گیاه گل گاوزبان توزیع شده‌اند. این ژن‌ها فعالیت تنظیم‌کننده رونویسی دارند و با توجه به ماهیت توالی نقش فعال‌کننده یا سرکوب‌کنندگی دارند. پیش‌بینی مکان درون سلولی نشان داد که پروتئین‌های ARF گل گاوزبان در هسته بیشترین حضور را دارند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی پروتئین‌های خانواده ژنی ARF منجر به تشکیل چهار کلاس اصلی شد که هر گروه از نظر کارکرد اختصاصی است و بینش‌هایی را در مورد روابط ارتولوگ مختلف ارائه می‌دهد. این مطالعه خانواده ژن ARF

گل گاوزبان و ارتباط تکاملی آن با اعضای این خانواده را در گونه آراییدوبسیس مشخص می‌کند. این موضوع می‌تواند در شناسایی ژن‌های ARF و عملکرد آنها کمک کند. تجزیه و تحلیل موتیف‌های حفاظت شده و جستجوی دمین در توالی‌های پروتئینی ARF نشان داد که پروتئین‌های ARF دارای دمین‌های اتصال DNA مانند B3 و دمین Auxin_resp در ساختار خود هستند. تجزیه و تحلیل ترم‌های هستی‌شناسی ژن (GO term) در دسته فرایند بیولوژیکی نشان داد که تنظیم فرایند سلولی، تنظیم فرایند متابولیک، پاسخ به محرک، سیگنالینگ و تنظیم بیولوژیکی معنی‌دارترین GO ترم‌ها را به خود اختصاص داده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه بستری را برای شناسایی ژن‌های ARF و روشن شدن عملکرد آنها در گاوزبان *E plantagineum* فراهم می‌کند که برای تحقیقات آینده در جهت کشف و تأیید عملکرد بیشتر این ژن‌ها مفید خواهد بود. واژه‌های کلیدی: بیان، عوامل رونویسی ARF، گل گاوزبان، هستی‌شناسی ژن.

(al., 2023).

مقدمه

خانواده ژنی ARF با وجود صدها میلیون سال تکامل، به صورت حفاظت‌شده باقی مانده‌اند (Ellis et al., 2005). اعضای ARF شامل سه دمین محافظت شده هستند: یک دمین مرتبط با اتصال DNA در پایانه B3 (DBD) N، یک عامل پاسخ اکسین منطقه میانی (MR) و یک دمین واکنش متقابل پروتئین-پروتئین پایانه C (PB1) (Wright and Nemhauser, 2015). دمین DBD می‌تواند عناصر مختلف را در پروموتور ژن‌های پاسخ دهنده اکسین تشخیص دهد (Wright and Nemhauser, 2015).

در دسترس بودن توالی گسترده ژنومی گیاه مدل آراییدوبسیس امکان بازیابی اطلاعات توالی را برای طیف وسیعی از خانواده‌های ژنی کشف نشده فراهم می‌کند (Kaul et al., 2000). به عنوان نمونه، بررسی گسترده ژنومی در آراییدوبسیس، منجر به شناسایی ۲۲ توالی کامل ژن ARF در این گیاه شده است (Okushima et al., 2005). علاوه بر این، رویکردهای بیوشیمیایی و ژنتیکی عملکرد ژن‌های ARF در رشد و نمو گیاه آراییدوبسیس نیز مشخص گردیده است (Guilfoyle and Hagen, 2007). در بین اعضای خانواده ARF، *AtARF1* و *AtARF2* می‌توانند ریزش گل، پیری برگ و اندازه دانه را تنظیم کند (Ellis et al., 2005) و کاهش بیان *AtARF3* باعث ظهور غیرطبیعی میستم‌های گل و اندام‌های

اکسین یکی از هورمون‌های گیاهی حیاتی است که نقشی اساسی در کنترل سازوکارهای رشد و نمو گیاهان دارد. این هورمون بسیاری از فرایندهای تکاملی، از قبیل تشکیل بافت آوندی، ایجاد ریشه‌های جانبی، غالبیت رأسی و رشد گل و میوه را تنظیم می‌کند (Fleming, 2006) و بر فرایندهای سلولی مانند تقسیم سلول، بزرگ شدن و تمایز تأثیر می‌گذارد (Hagen and Guilfoyle, 2002). در گیاهان گروه زیادی از ژن‌ها به تغییرات سطح اکسین واکنش نشان می‌دهند، از آن جمله می‌توان به چندین دسته اصلی از ژن‌های حساس به اکسین، از جمله اکسین/ایندول-۳-استیک اسید (Aux/IAA)، فاکتور پاسخ‌گو به اکسین (ARF)، RNA تنظیم نشده کوچک اکسین^۱ و خانواده حساس به اکسین^۲ مانند GH3 (Gretchen Hagen) اشاره کرد (Guilfoyle and Hagen, 2007). در این گروه اعضای خانواده ژنی ARF به عنوان یک فاکتور رونویسی مهم با اتصال مستقیم به عناصر پاسخ اکسین (AuxREs: TGTCNN) در پروموتورهای ژن‌های هدف، سطح رونویسی ژن‌های هدف را فعال یا سرکوب می‌کنند (Yu et al., 2022; Rienstra et al., 2022).

¹ Small auxin-up RNAs (SAURs)

² Auxin-Responsive Gene Families

(Piri, 2014) و ضدقارچی برای این گیاه گزارش شده است (Mohammadi *et al.*, 2019). همچنین گل گاوزبان ایرانی منبع غنی از رزمارینیک اسید است. این گیاه منبع غنی از اسیدهای چرب ضروری (EFA) و گروه اسیدهای امگا یا اسید گاما لینولنیک (GLA) می باشد (El Hafid *et al.*, 2002). اثر هیپولیپدیمیک فلاونوئیدهای موجود در گل گاوزبان و قابلیت از بین بردن رادیکال‌های آزاد و خواص آنتی‌اکسیدانی نیز طی مطالعات مختلف نشان داده شده است. ترکیبات قلبیایی، گلیکوزید پیرولیزیدین و لیپیدهای مفید موجود در بخش‌های مختلف گل گاوزبان دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، حفاظت‌کننده مخاط معده، کاهش دهنده قند خون و خواص تعدیل‌کننده عوارض قلبی-عروقی هستند (Ranjbar *et al.*, 2006). مطالعات نشان داده که رزمارینیک اسید موجود در گل گاوزبان سبب اثرهای ضد دیابتی شده و قادر است قند خون را کاهش دهد. بنابراین این گیاه با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از طریق مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از هیپرگلیسمی دیابتی، می‌تواند در بهبود این بیماری مؤثر باشد (Fioeoen, 2000).

با توجه به اهمیت این گیاه و لزوم کشت آن در سطح وسیع، به نظر می‌رسد که دستیابی به اطلاعات دقیق‌تر و کامل‌تر اعضای خانواده ژنی ARF یکی از عوامل کلیدی مؤثر در رشد و نمو گیاهان باشد. وجود توالی ژنوم گل گاوزبان و استفاده از آن در تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی برای جداسازی خانواده‌های ژنی ARF به ما اجازه می‌دهد تا این خانواده ژنی را در سطح ژنوم مورد مطالعه قرار دهیم و به افزایش درک ما از فرایندهای رشد و پاسخ‌های سلولی به اکسین در گاوزبان کمک می‌کند.

با توجه به اینکه در ایران مطالعه جامعی در مورد ژن‌های ARF گیاه دارویی گاوزبان به عنوان گروه بزرگی از گیاهان دارویی و خوراکی وجود ندارد، هدف از این مطالعه بررسی ساختار ژن، محل کروموزومی، بیان کلی و نقش بالقوه ژن‌های ARF گل گاوزبان و از سویی تجزیه و تحلیل همولوگ بین ژن‌های ARF در آرآیدوبسیس می‌باشد تا بتوان به دانش بالاتری در مورد ویژگی‌های ساختاری و

تولیدمثلی می‌شود (Finet *et al.*, 2010). علاوه بر این، *AtARF7* و *AtARF19* در جوانه‌زنی و توسعه (Korasick *et al.*, 2014) و *AtARF10*، *AtARF16* و *AtARF17* در تنظیم منفی جوانه‌زنی بذر و بعد از جوانه‌زنی نقش ایفا می‌کنند (Liu *et al.*, 2007). در گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) ژن‌های ARF ممکن است بر رشد گل و میوه تأثیر بگذارند (Kumar *et al.*, 2011). همچنین این خانواده ژنی در پاسخ به تنش زیستی و غیرزیستی (Wang *et al.*, 2011) و تنظیم مسیره‌های بیوستزی ترکیبات ثانویه (Shams *et al.*, 2023) نیز شرکت می‌کنند.

با توجه به نقش کلیدی و مهم اعضای خانواده ژنی ARF در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی و رشدی و استفاده بیشتر از آنها در آینده برای تولید محصولات بهتر، به تازگی این خانواده ژنی در چند گیاه مبتنی بر یافته‌های اخیر از ژنوم پرتقال، ذرت و گوجه فرنگی با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی بررسی شده‌اند (Kumar *et al.*, 2011). از این رو دانش و آگاهی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای برای تعیین کردن محصول نهایی در مقیاس وسیع برخوردار باشد. اگرچه ژن‌های ARF به‌طور گسترده-ای در بسیاری از گونه‌ها گیاهی مانند *Oryza sativa*، *Solanum lycopersicum*، *Brassica rapa*، *Vitis*، *Eucalyptus grandis*، *Musa acuminata*، *vinifera*، *Citrus*، *Populus trichocarpa*، *Medicunc truncatula* و *Gossypium raimondii* و *sinensis* شناسایی شده‌اند. با این حال، هیچگونه مطالعه‌ای از اعضای خانواده فاکتور رونویسی ARF در گیاه دارویی گل گاوزبان (*Echium plantagineum*)، (یکی از مهمترین گیاهان دارویی ایران) انجام نشده است.

گیاه گل گاوزبان از مهمترین گیاهان دارویی در طب سنتی ایران به‌شمار می‌رود (Amir *et al.*, 2000). گلبرگ‌های گیاه گاوزبان دارای مقادیر مختلفی از فلاونوئیدها، ساپونین، ترکیبات پلی فنولی، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، موسیلاژ و مقادیر جزئی آلکالوئید از نوع پیرولیزیدین است. اثرهای آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی (Mohammadi and

مریم‌گلی (گیاه هم خانواده آن) انجام شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از وب سرور ETE3 3.1.2 (<https://www.genome.jp/tools/ete/>) براساس الگوریتم Clustal W با در نظر گرفتن پارامترهای پیش‌فرض انجام گردید (Huerta-Cepas *et al.*, 2016) و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار FastTree براساس روش اتصال همسایه (neighbor-joining) و با مقادیر بوت‌استرپ ۵۰۰ تکرار ترسیم شد (Price *et al.*, 2010). در ادامه تجزیه نواحی حفاظت شده روی توالی‌های پروتئینی ARF گاوزبان با استفاده از BLAST پایگاه داده دمین محافظت شده (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) تجزیه و تحلیل شد. در نهایت دمین‌های تمام ARF‌های بدست آمده، برای پیش-بینی نقطه ایزوالکتریکی نظری (pI) و وزن مولکولی (Mw) هر پروتئین ARF گل گاوزبان با استفاده از ابزارهای موجود در سرور Expasy-ProtParam انجام شد.

تجزیه و تحلیل موتیف‌های حفاظت شده و مکان درون سلولی

تجزیه و تحلیل موتیف با استفاده از مجموعه نرم‌افزاری MEME با پارامترهای توزیع مکانی صفر یا ۱ وقوع در هر توالی، تعداد موتیف، و اندازه موتیف ۱۰ تا ۲۰۰ باقیمانده اسید آمینه (<http://meme-suite.org/tools/meme>) انجام شد. پیش‌بینی مکان درون سلولی پروتئین‌ها از طریق سرور WoLF PSORT انجام شد (<https://wolfpsort.hgc.jp/>).

جایگاه کروموزومی ژن‌های *EpARF*

جایگاه هر ژن بر روی ۸ گروه لینکازی (LG) شناخته شده گاوزبان با استفاده از توالی‌های ژنی به دست آمده از ORF و بلاست نوکلئوتید در ژنوم گاوزبان مشخص گردید و نقشه کروموزومی و جایگاه ژن‌های ARF با استفاده از نرم‌افزار MapChart رسم شد (Voorrips, 2002). برای بررسی ژن‌های مضاعف یک فرایند دو مرحله‌ای انجام شد. در مرحله اول، توالی نوکلئوتید هر پروتئین هم‌ردیف شدند و ژن‌هایی که حداقل (مساوی و بیشتر) از ۷۵ درصد با طولانی‌ترین ژن هم‌پوشانی نشان دادند، به عنوان ژن‌های

عملکردی در بین پروتئین‌های ARF در گل گاوزبان *E. plantagineum* دست یافت.

مواد و روش‌ها

شناسایی خانواده ژنی ARF در گاوزبان *E. plantagineum* به منظور شناسایی ژن‌های خانواده ARF، ژنوم و مجموع توالی‌های پروتئینی گیاه گل گاوزبان *Echium plantagineum* (GCA_003412495.2) از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت گردید. در این تحقیق از دو روش برای شناسایی توالی‌های پروتئینی ARF استفاده شد. در روش اول از پروفایل‌های مدل مخفی مارکوف (HMM) اعضای خانواده ژنی ARF شامل (Pfam02362) B3-DBD، AUX_RESP (MR:Pfam06507) و اعضای خانواده AUX/IAA (PB1:Pfam02309) برای شناسایی ژن‌های ARF بر پایه ژنوم گاوزبان با استفاده از HMMER 3.0 (پارامترهای پیش‌فرض) با E-value کمتر از 10^{-5} استفاده شد. در نهایت از پایگاه داده Pfam برای بررسی حضور دمین در توالی‌های انتخاب شده استفاده گردید و توالی‌های فاقد دمین‌های مرتبط با ژن ARF، از ادامه بررسی حذف شد. در روش دوم کلیه توالی‌های پروتئین‌های ARF شناخته شده آرآبیدوبسیس از پایگاه اطلاعاتی TAIR (<http://www.Arabidopsis.org>) دریافت شد. با استفاده از روش هم‌ردیفی و با جستجوی الگوریتم BLASTP توالی‌های پروتئینی ARF (P-value=0.001) گاوزبان در برابر توالی‌های پروتئینی ARF آرآبیدوبسیس انتخاب شد. نام‌گذاری خانواده ژنی ARF در گاوزبان *E. plantagineum* به صورت *EPARF* و شماره بر مبنای همولوژی با گیاه آرآبیدوبسیس انجام شد.

هم ترازوی چندگانه و رسم درخت فیلوژنتیکی خانواده ژنی *EpARF*

توالی‌های پروتئینی ژن‌های خانواده ARF در مریم‌گلی و آرآبیدوبسیس از طریق پایگاه داده PlantTFDB دریافت شد (<http://planttfdb.gao-lab.org/>). هم‌ردیفی بین اعضای خانواده ARF گیاه گاوزبان، آرآبیدوبسیس و

گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران در گلدان‌های ۳۰×۳۰ سانتی‌متری کشت شدند. میزان آبیاری براساس نیاز گیاه و به میزان کافی انجام شد. برای تیمار اکسین، گیاهچه‌ها در سه نوبت ۰/۵ ساعت، ۱ ساعت و ۳ ساعت با استفاده از محلول ۲۰ میکرومولار IAA محلول‌پاشی شدند. نمونه‌گیری از برگ برای تحلیل ترانسکریپتوم پروفایل گیاه دارویی گاوزبان *E. plantagineum* انجام شد.

استخراج RNA و آنالیزها با qRT-PCR

بر روی تمامی نمونه‌ها استخراج RNA انجام شد. پس از نمونه‌برداری، بافت مورد نظر در نیتروژن مایع انتقال و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد تا زمان استخراج RNA نگهداری گردید. استخراج RNA کل طبق روش Shams و Norouzi (۲۰۱۹) انجام شد و برای حذف آلودگی DNA از کیت DNaseI شرکت پارس توس استفاده شد. RNA کل استخراج شده برای تعیین کیفیت از ژل آگارز ۱ درصد و غلظت آن با دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد.

از روش qRT-PCR برای تجزیه و تحلیل بیان رونوشت‌های منتخب گاوزبان استفاده شد. سنتز cDNA و qRT-PCR براساس مطالعات قبلی با استفاده از TaKaRa SYBR® Green Permixon ExTaq™ II انجام شد. داده‌ها با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Ct) تجزیه و تحلیل شدند. ژن eEF به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی qRT-PCR استفاده شد. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer premier6 طراحی شدند (جدول ۱).

مضاعف کاندید شدند (Bostancioglu et al., 2018). سپس هر گره از درخت فیلوژنتیک به عنوان یک تکرار سگمنتال، پشت سر هم یا پراکنده طبقه‌بندی شد که از انتهای ترین گره‌ها در نظر گرفته شد. طبقه‌بندی گره‌ها براساس وقوع و موقعیت جایگاه‌ها در بخش‌های کروموزومی تکراری همولوگ ارزیابی گردید (Tombuloglu, 2019).

تفسیر کارکردی و طبقه‌بندی هستی‌شناسی ژن‌های *EpARF* هستی‌شناسی (Gene ontology) ژن‌های ARF با استفاده از وب سرور g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler>) با در نظر گرفتن حد آستانه FDR کمتر از ۰/۰۱ انجام گردید (Reimand et al., 2016).

تجزیه و تحلیل بیان اعضای خانواده *EpARF*

با توجه به عدم وجود داده بیانی در بررسی اعضای خانواده ژنی ARF در گیاه گاوزبان *E. plantagineum* و گیاه مدل آرآبیدوبسیس، از داده‌های ترانسکریپتوم گیاه هم خانواده آن (مریم گلی) استفاده شد. سطح بیان ژن براساس مقدار بیان نرمال شده ($\log^2\text{FPKM}^1$) بافت‌های مختلف برگ، گل و ریشه در نظر گرفته شد. نتایج حاصل به صورت نمودار نقشه حرارتی (Heatmap) توسط وب سرور Heatmapper ترسیم شد (<http://heatmapper.ca/>) تهیه نشاء و اعمال تنش گیاه گل گاوزبان

نشاء گیاه گل گاوزبان از شرکت گیاهان دارویی زرین گیاه تهیه شد. گیاهان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط تحت کنترل دمای 25 ± 1 درجه سانتیگراد در

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در تجزیه و تحلیل qRT-PCR.

Table 1- Characteristics of primers used in qRT-PCR analysis.

Primer name*	Forward primer (3' to 5')	Reverse primer (3' to 5')
ARF2.3	GCGAGTGAGCAAGAGAATCAA	GAGAGCAGTTCATCGTAGTTGT
ARF4	TGTCAAGTGTACCACAGTCA	TCTACCATCAGGCATCTCCATT
ARF5	CGTGTGAGGTGAAGCAGATG	CCAGGTTAGGAGTGAGCAATG
ARF8.2	TTGCTCAGATGTTCGGACTTG	ATCGTCGCCAAGAAGAAGAAC
ARF16.2	CTGTAGATGTGCCTGAACTTC	ACTTCCTTCGCCAAGACCTTA
eEF	AAGCCAATGGTCGTGGAGAC	GCAGCAGCCTTAGTCACCTT

* Fragments per Kilobase of Transcript per Million Mapped Reads

نتایج

شناسایی اعضای خانواده عوامل رونویسی *ARF* در گیاه

E. plantagineum گاوزبان

در این مطالعه با حذف توالی‌های تکراری، ۳۸ توالی *ARF* در ژنوم گاوزبان *E. plantagineum* شناسایی شد. برای اطمینان از وجود دمین *ARF*، توالی‌های شناسایی شده

از طریق پایگاه Pfam ارزیابی شده و توالی‌های فاقد دمین - های مرتبط با ژن *ARF* حذف گردید. در مجموع، ۲۸ ژن به عنوان ژن قابل قبول به عنوان اعضای خانواده *ARF* در گیاه گاوزبان *E. plantagineum* شناسایی شد. ژن‌های پیش‌بینی شده در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- خصوصیات خانواده ژنی *ARF* در گاوزبان *E. plantagineum*

Table 2. Characterization of *ARF* gene family in *Echium plantagineum*

Gene Name	Query Sequence	Blasted Sequence	Protein Length (AA)	Molecular Weight (kDa)	Isoelectric Point (pI)	Cell Location
ARF1.1	DN27272_c0_g1_i1	AT1G59750.3	811	90809	5.2043	nucl: 12, cyto: 1, cysk: 1
ARF1.2	DN23636_c0_g1_i1	AT1G59750.4	665	74289.8	6.295	nucl: 11, chlo: 1, cyto: 1, vacu: 1
ARF2.1	DN28688_c0_g1_i23	AT5G62000.3	833	92564	6.344	nucl: 14
ARF2.2	DN31239_c0_g1_i1	AT5G62000.3	1634	182137	7.4965	cyto: 8, nucl: 5, chlo: 1
ARF2.3	DN27550_c0_g1_i3	AT5G62000.3	835	93446.7	6.4393	nucl: 14
ARF2.4	DN28688_c0_g1_i1	AT5G62000.3	845	94280.8	6.5516	nucl: 13, vacu: 1
ARF4	DN27567_c0_g2_i1	AT5G60450.1	846	93703.7	6.9828	nucl: 4, mito: 4, chlo: 3, cysk: 2, cyto: 1
ARF5	DN27820_c7_g1_i2	AT1G19850.1	1062	117688	5.9219	nucl: 14
ARF6.1	DN28238_c3_g7_i1	AT1G30330.1	929	103160	6.2718	nucl: 10, chlo: 3, E.R.: 1
ARF6.2	DN29500_c2_g2_i2	AT1G30330.1	1432	156459	6.3042	nucl: 9, cysk: 3, cyto: 2
ARF6.3	DN28238_c3_g6_i1	AT1G30330.1	830	91717.1	6.6501	nucl: 9, chlo: 3, plas: 1, E.R.: 1
ARF8.1	DN29249_c1_g6_i1	AT5G37020.1	670	74347.5	6.2022	nucl: 9, chlo: 3, cyto: 1, cysk: 1
ARF8.2	DN31321_c0_g3_i6	AT5G37020.2	901	98922.6	6.3734	nucl: 8, cyto: 4, chlo: 1, vacu: 1
ARF8.3	DN31321_c0_g3_i4	AT5G37020.2	903	99149.8	6.4422	nucl: 9, cyto: 4, vacu: 1
ARF8.4	DN30736_c2_g2_i3	AT5G37020.1	845	94574.2	6.4774	nucl: 12, cyto: 1, cysk: 1
ARF8.5	DN30736_c2_g1_i6	AT5G37020.1	837	93094.5	6.4822	nucl: 14
ARF8.6	DN30736_c2_g5_i1	AT5G37020.1	741	82654.7	6.6399	nucl: 12, chlo: 1, vacu: 1
ARF9	DN25788_c1_g2_i2	AT4G23980.1	1340	147041	7.1246	nucl: 11, chlo: 1, plas: 1, cysk: 1
ARF9.1	DN25663_c1_g2_i9	AT4G23980.1	629	70395.6	6.3745	nucl: 9, chlo: 2, mito: 1, E.R.: 1, pero: 1
ARF9.2	DN30148_c0_g1_i1	AT4G23980.2	698	77673.4	6.7352	nucl: 12, chlo: 1, pero: 1
ARF9.3	DN28141_c1_g1_i1	AT4G23980.1	696	77524	6.9435	nucl: 13, vacu: 1
ARF15	DN30424_c0_g1_i1	AT1G35520.1	596	67670	7.2508	cyto: 8, nucl: 4, chlo: 2
ARF16.1	DN27633_c0_g1_i1	AT4G30080.1	698	76989.4	7.2277	nucl: 13, plas: 1
ARF16.2	DN29889_c1_g1_i1	AT4G30080.1	741	81025.8	8.176	nucl: 10, chlo: 3, pero: 1
ARF19.1	DN30945_c0_g1_i1	AT1G19220.1	1105	122172	6.587	nucl: 13, cysk: 1
ARF19.2	DN28391_c0_g1_i1	AT1G19220.1	1078	120204	6.6282	nucl: 10, cyto: 2, vacu: 1, cysk: 1
ARF19.3	DN37168_c0_g1_i1	AT1G19220.1	1437	157167	6.8146	vacu: 4, chlo: 3, nucl: 2, plas: 2, mito: 1, extr: 1, E.R.: 1
ARF19.4	DN23028_c0_g1_i7	AT1G19220.1	643	72395.5	8.6169	nucl: 12, cyto: 2

chlo; chloroplast, cysk; cytoskeleton, cyto; cytoplasm, extr; extracellular, E.R; endoplasmic reticulum, mito; mitochondria, nucl; nucleus, pero; peroxide, plas; plasma membrane, vacu; vacuole.

محل قرارگیری این ژن‌ها روی کروموزوم‌های گل گاوزبان نشان داد که اعضاء این خانواده روی کلیه کروموزوم‌های گاوزبان حضور دارند. محل قرارگیری هر ژن در کروموزوم‌ها بسیار متناوب می‌باشد. بیشترین تعداد ژن ARF روی کروموزوم LG8 و کمترین تعداد ژن ARF روی کروموزوم LG3 قرار گرفته است (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی وجود ژن‌های مضاعف در این توالی‌ها نشان داد که رونوشت‌های مختلف یک گروه ژنی بیش از ۸۵ درصد مشابه بودند. از سویی در چهار گروه ژنی مانند *EpARF6.2*, *EpARF6.3*, *EpARF8.1* و *EpARF8.4* و دو گروه *EpARF5* و *EpARF19.3* با وجود قرارگیری بر روی کروموزوم‌های مختلف بالای ۹۰ درصد تشابه و توالی یکسان مشاهده شد که می‌تواند برای کاندید مضاعف‌شدگی سیگمنتال بین این دو گروه ژنی معرفی شوند (شکل ۱ و ۲).

ترسیم درخت فیلوژنتیک

به منظور تجزیه و تحلیل تکاملی خانواده ARF در گاوزبان *E. plantagineum* یک درخت فیلوژنتیک از توالی‌های پروتئینی کامل ARF گاوزبان *E. plantagineum* با استفاده از وب سرور ETE3 3.1.2 با روش نزدیکترین همسایگی با تکرار بوت استرپ ۵۰۰ بر روی توالی‌های پروتئینی هم‌تراز شده ARF گاوزبان ترسیم شد (شکل ۲). درخت فیلوژنتیک نشان داد که ۲۸ پروتئین ARF در چهار کلاس اصلی طبقه‌بندی شدند که مشابه مطالعات قبلی گیاه مریم‌گلی می‌باشد. همچنین به منظور درک بهتر روابط تکاملی اعضای خانواده ARF گاوزبان *E. plantagineum* درخت فیلوژنتیک با در نظر گرفتن اعضای خانواده ARF مریم‌گلی و آراییدوبسیس نیز ترسیم شد (شکل ۳). روابط فیلوژنتیکی به دست آمده نشان داد که برخی از ژن‌های خانواده ARF آراییدوبسیس (برای نمونه ژن‌های *AtARF8*) بیش از یک کپی با همولوژی بالا در ژنوم گاوزبان دارد، از سویی، برخی دیگر از ژن‌های ARF در آراییدوبسیس مانند *AtARF3* و *AtARF7* فاقد ژن‌های همولوگ متناظر در گاوزبان هستند.

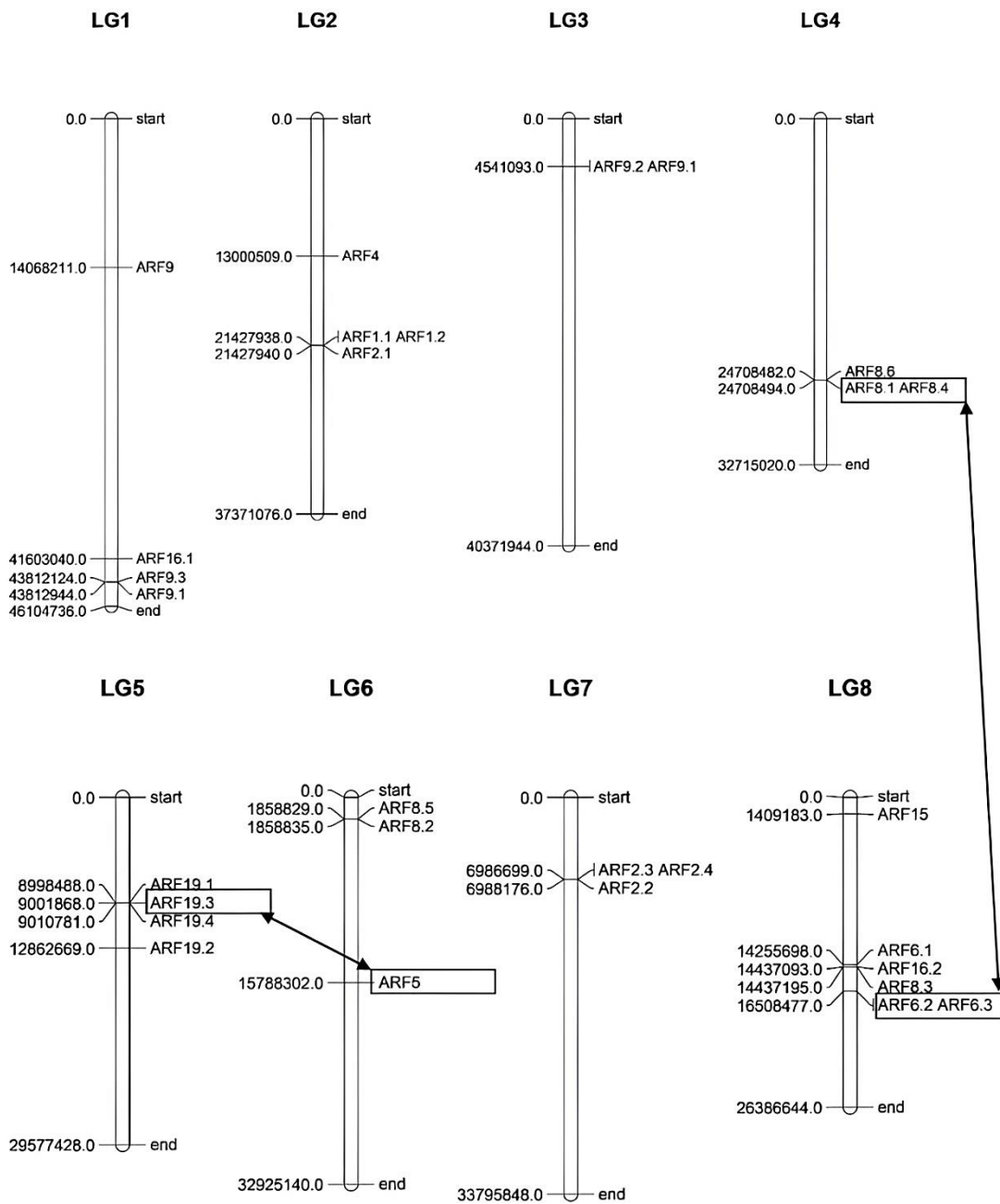
شناسایی خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌ها

مطالعات فیزیکی و شیمیایی خانواده ژنی ARF با استفاده از سرور آنلاین Expasy-ProtParam نشان داد که این ژن‌ها از نظر تعداد آمینواسید، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک باهم متفاوت هستند. طول پروتئین‌های این خانواده از ۵۹۶ تا ۱۶۳۴ اسیدآمینو و وزن مولکولی آنها نیز از ۶۷/۶۷۰ تا ۱۸۲/۱۳۷ کیلو دالتون متغیر بود. دامنه نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها از ۵/۲۰ در *ARF1* تا ۸/۶۱ در *ARF19* متغیر بود. پیش‌بینی مکان‌یابی پروتئین‌های ARF در بخش‌های سلولی نشان داد که جایگاه اکثریت در هسته سلولی است (جدول ۲).

مکان‌یابی کروموزومی خانواده ARF در گل گاوزبان

با استفاده از برنامه Mapchat، همه ۲۸ ژن ARF گاوزبان *E. plantagineum* (EpARF) به هشت کروموزوم مختلف به صورت شماتیک با اندازه مگاباز بشرح زیر نگاشته شدند (شکل ۱).

۴ ژن بر روی کروموزوم یک (*EpARF9*, *EpARF16.1*, *EpARF9.1* و *EpARF9.3*)
 ۴ ژن بر روی کروموزوم دو (*EpARF4*, *EpARF1.1*, *EpARF1.2* و *EpARF2.1*)
 ۲ ژن بر روی کروموزوم سه (*EpARF9.1* و *EpARF9.2*)
 ۳ ژن بر روی کروموزوم چهار (*EpARF8.1*, *EpARF8.6* و *EpARF8.4*)
 ۴ ژن بر روی کروموزوم پنج (*EpARF19.1*, *EpARF19.2*, *EpARF19.3* و *EpARF19.4*)
 ۳ ژن بر روی کروموزوم شش (*EpARF5*, *EpARF8.5* و *EpARF8.2*)
 ۳ ژن بر روی کروموزوم هفت (*EpARF2.3*, *EpARF2.4* و *EpARF2.2*)
 ۶ ژن بر روی کروموزوم هشت (*EpARF15*, *EpARF6.1*, *EpARF6.2*, *EpARF6.3*, *EpARF8.3* و *EpARF16.2*)
 مکان‌یابی شدند.

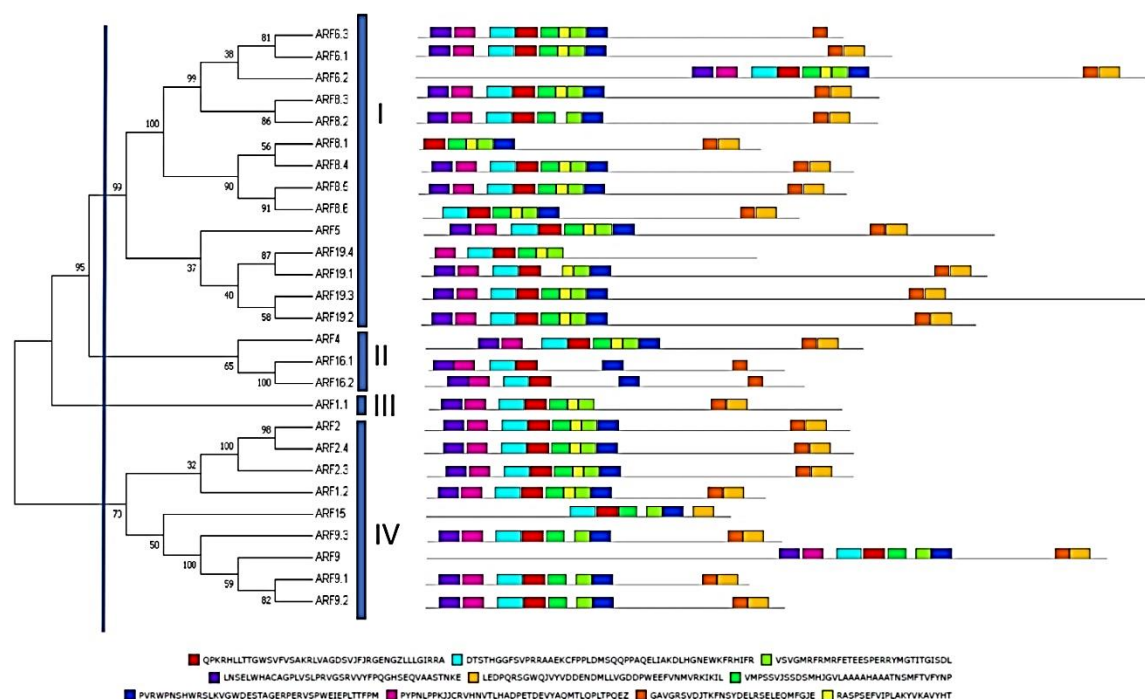


شکل ۱- نقشه توزیع کروموزومی ژن‌های ARF در گاو زبان *E. plantagineum*

اعداد هر کروموزوم در بالای هر نوار نشان داده شده است، در حالی که اندازه کروموزوم با طول نسبی آن نشان داده شده است. واحد مقیاس سمت چپ Mb است و خط کوتاه موقعیت تقریبی ژن‌های ARF را بر روی کروموزوم مربوط نشان می‌دهد. مستطیل‌ها مناطق مستعد مضاعف‌شدگی سگمنتال را نشان می‌دهد.

Figure 1. Chromosomal distribution map of ARF genes in *Echium plantagineum*.

The chromosome numbers are shown at the top of each bar while the size of a chromosome is indicated by its relative length. The unit of the left scale is Mb, and the short line indicates the approximate position of the ARF gene on the corresponding chromosome. Rectangles show susceptible regions prone to segmental duplication.



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک بین پروتئین‌های خانواده ARF در گل گاوزبان *E. plantagineum*

همردیفی توالی‌های پروتئینی با استفاده از ClustalW انجام و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از FastTree با پارامترهای پیش فرض ترسیم شد. مقادیر بوت استرپ در گره‌های داخلی نشان داده شده است. توزیع موتیف حفاظت شده در خانواده ژنی ARF گل گاوزبان *E. plantagineum* با استفاده از وب سرور MEME بررسی شد. موتیف‌های مختلف با رنگ‌های مختلف مشخص شده است.

Figure 2. Phylogenetic tree of ARF family proteins in *Echium plantagineum*.

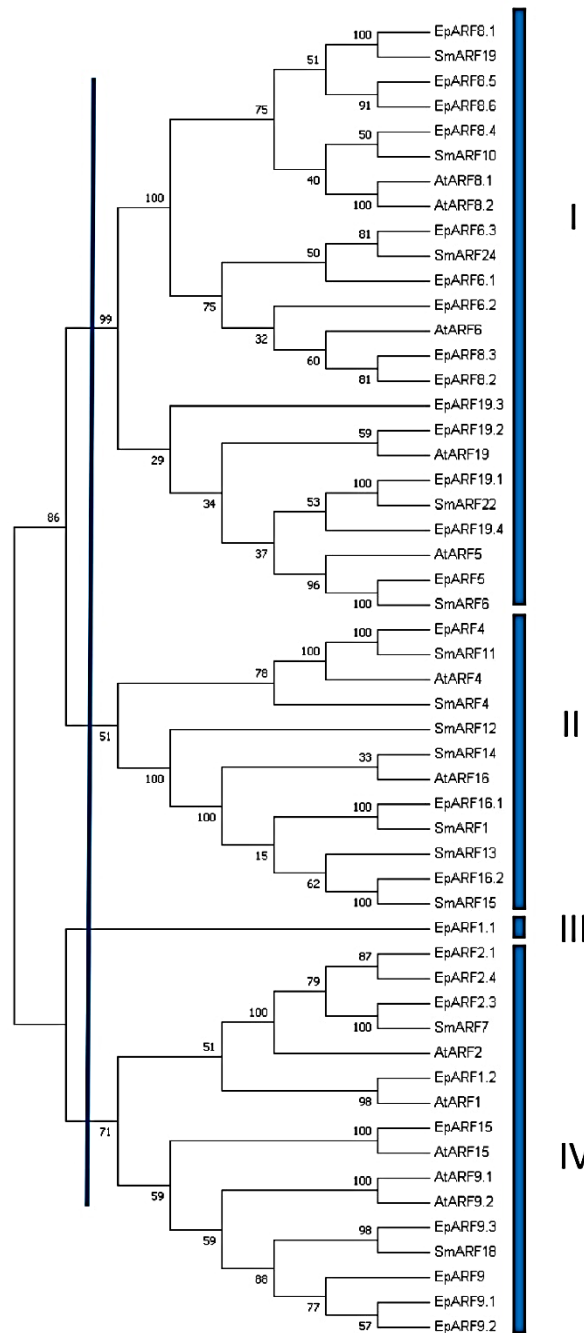
Alignment of protein sequences was carried out using ClustalW and the phylogenetic tree was produced using the FastTree with default parameters. Bootstrap values are shown on the internal node. Conserved motif distribution of the *E. plantagineum* ARF gene family was investigated using the MEME web. Different motifs were shown in different colors.

شد. در مجموع ۱۰ موتیف حفاظت شده از ۲۸ عضو خانواده ARF شناسایی شد. ترتیب و تعداد موتیف در یک ARF در شکل ۴ نشان داده شده است. تعداد موتیف موجود در ARFها به‌طور کلی از ۶ تا ۱۰ متغیر بود. با توجه به نتایج، توزیع و موقعیت موتیف در بین اعضای داخلی هر کلاس نسبتاً محافظت شده بود.

تجزیه و تحلیل دمین‌ها در پروتئین‌های ARF گل گاوزبان

E. plantagineum

نتایج حاصل از بررسی دمین‌های ۲۸ پروتئین مورد نظر نشان داد که این پروتئین‌ها دارای سه دمین یادشده هستند که ترتیب قرارگیری و طول این دمین‌ها در همه پروتئین‌های مورد مطالعه مشابه است. نرم‌افزار تشخیص موتیف MEME برای انجام تحلیل موتیف توالی‌های پروتئین ARF استفاده



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی بین پروتئین‌های خانواده ARF در گاوزبان *E. plantagineum*، مریم‌گلی و آرابیدوپسیس. هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی با استفاده از ClustalW انجام و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از FastTree با پارامترهای پیش فرض ترسیم شد. مقادیر بوت استرپ در گره‌های داخلی نشان داده شده است.

Figure 3. Phylogenetic tree of ARF family proteins in *Echium plantagineum*, *Salvia* and *Arabidopsis*. Alignment of protein sequences was carried out using ClustalW and the phylogenetic tree was produced using the FastTree with default parameters. Bootstrap values are shown on the internal nodes.



شکل ۴- لوگوی موتیف پروتئین (LOGOS یک ابزار تجسم برای موتیف‌هاست)

ارتفاع یک حرف نشان‌دهنده بسامد نسبی آن در موقعیت داده شده (محور X) در موتیف است.

Figure 4. LOGO of protein motif. LOGOS are a visualization tool for motifs.

The height of a letter indicates its relative frequency at the given position (x-axis) in the motif.

تجزیه و تحلیل نشان داد که بیشتر پروتئین‌های ARF در تنظیم رونویسی، یعنی الگوی DNA نقش دارند. به عنوان یک رویکرد تکمیلی برای تجزیه و تحلیل GO، نمودار پراکندگی تجزیه و تحلیل غنی‌سازی GO ساخته شد (شکل ۵). غنی‌ترین اصطلاحات در دسته فرایند بیولوژیکی شامل تنظیم فرایند سلولی^۶ (GO:0050794)، تنظیم فرایند متابولیک^۷ (GO:0019222)، پاسخ به محرک^۸ (GO:0050896)، سیگنالینگ^۹ (GO:0023052) و تنظیم بیولوژیکی^{۱۰} (GO:0065007) است (شکل ۵).

تفسیر کارکردی و طبقه‌بندی هستی‌شناسی ژن‌ها

ترم‌های هستی‌شناسی ژن (GO term) به رونوشت‌های سرهم‌بندی شده اختصاص یافت. در مجموع، رونوشت‌های مربوط به ۲۸ پروتئین ARF در سه دسته هستی‌شناسی ژن (فرایند بیولوژیکی^۲، عملکرد مولکولی^۴ و ترکیبات سلولی^۵) طبقه‌بندی شدند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ARF نشان داد که در دسته فرایند زیستی «فرایند متابولیکی» نسبت به سایر گروه‌ها بیشترین ژن‌های شناسایی شده را به خود اختصاص داد. در دسته عملکرد مولکولی، گروه «اتصال» بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. نتایج حاشیه‌نویسی در ۶۶ ترم هستی‌شناسی ژن توصیف شد.

۶ Regulation of cellular process

۷ Regulation of metabolic process

۸ Response to stimulus

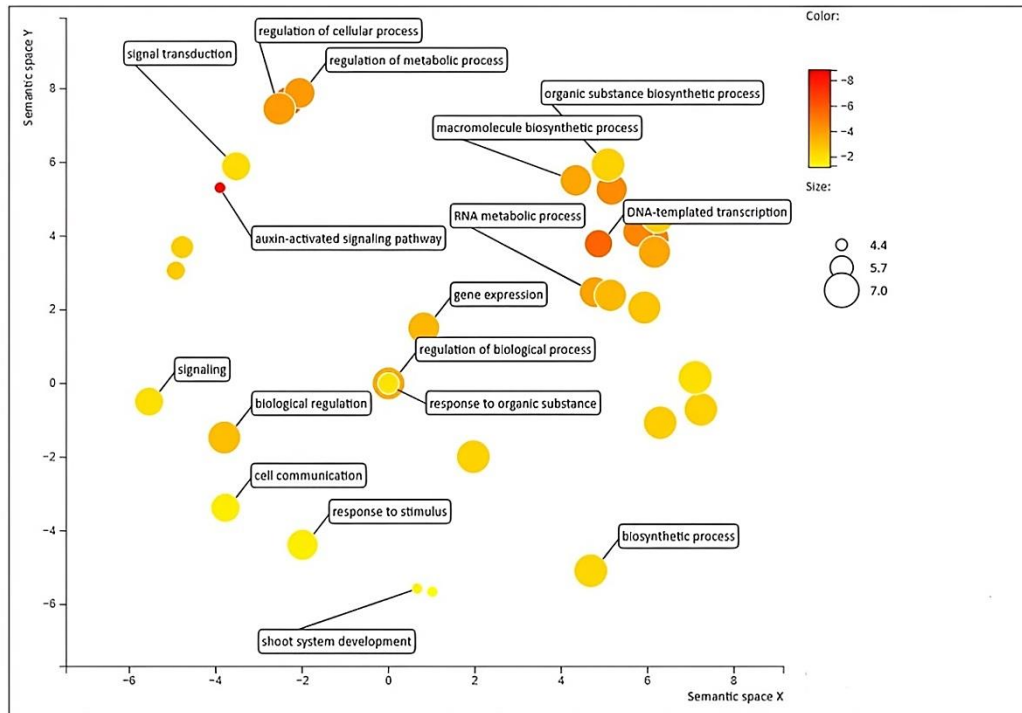
۹ Signaling

۱۰ Biological regulation

۲ Biological process

۴ Molecular Function

۵ Cellular component



شکل ۵- نمودار پراکندگی حاصل از آنالیز غنی‌سازی دسته GO مربوط به پروتئین‌های ARF گاوزبان *E. plantagineum*

دایره‌هایی که با رنگ پر شده به تصویر کشیده شده‌اند، اصطلاحات GO معنی‌دار با $\log_{10} p\text{-value} < 0.05$ را نشان می‌دهند. رنگ حباب‌ها مقدار P و اندازه حباب‌ها فراوانی عبارت GO را در پایگاه داده GOA نشان می‌دهد.

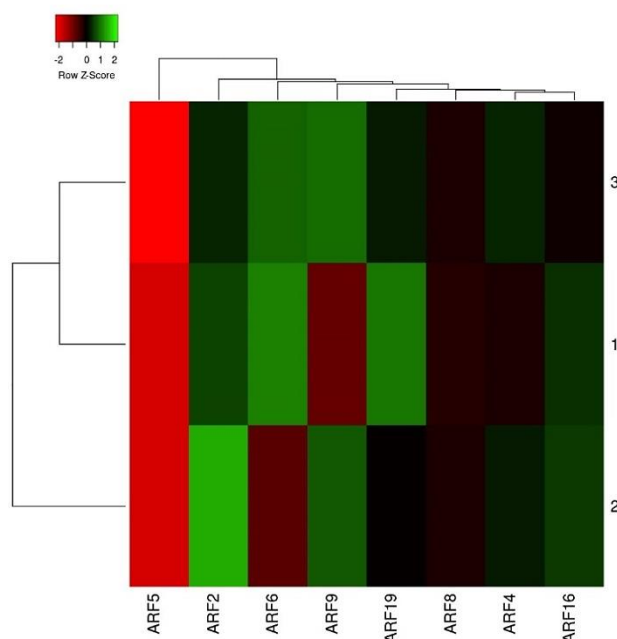
Figure 5. The scatterplot of GO category enrichment analysis of genes related to *Echium plantagineum* ARF proteins. Circles depicted by filled color show significantly enriched GO terms with $\log_{10} p\text{-value} < 0.05$. The color of the bubbles shows the P-value and the size of the bubbles shows the frequency of the GO term in the underlying GOA database.

را نشان داد، در حالی که ژن *EPARF6* و *EPARF9* بیان بالایی در ریشه، ژن *EPARF6* و *EPARF19* بیان بالایی در گل و *EPARF2* بیان بالایی در برگ نشان دادند. بعضی ژن‌ها مانند *EPARF8* بیان قابل توجهی نداشتند. در مجموع بیشتر ژن‌های ARF بیان بسیار متغیر را نشان می‌دهند (شکل ۶).

تجزیه و تحلیل بیان اعضای خانواده ژنی ARF در گل

گاوزبان *E. plantagineum*

براساس نتایج وب سرور heatmap، پروفایل بیانی اعضای خانواده ژنی ARF در گاوزبان *E. plantagineum* در شکل ۶ نشان داده شده است. *EPARF5*، *EPARF8* و *EPARF16* در هر سه بافت ریشه، برگ و گل بیان یکسانی



شکل ۶- نقشه حرارتی بیان ژنهای ARF در بافت برگ، گل و ریشه

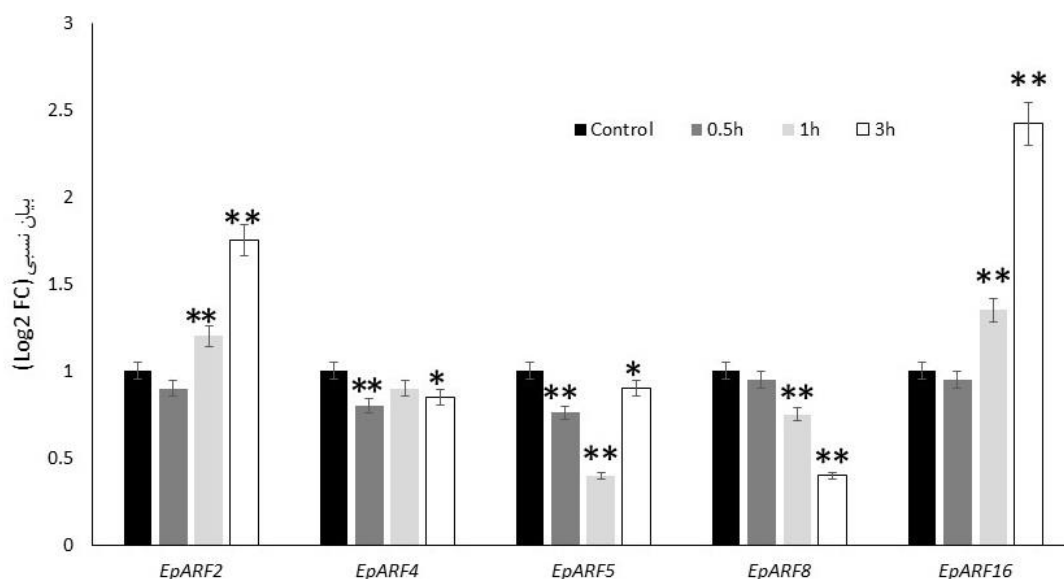
نمونه‌های بافت در سمت راست شکل به صورت شماره ۱ بافت گل، شماره ۲ بافت برگ و شماره ۳ بافت ریشه نام‌گذاری شده‌اند و نام ژن‌ها پایین شکل نشان داده شده است. مقادیر بیان ژن دارای کد رنگی هستند که از قرمز روشن (سطح بیان کم) تا سبز روشن (سطح بیان بالا) متغیر است.

Figure 6. Heat map of ARF gene expression within leaf, flower and root. The tissue samples from the right of the figure are named flower tissue number 1, leaf tissue number 2 and root tissue number 3, and the names of the genes are shown in the bottom figure. Gene expression values are color-coded, ranging from bright red (low expression levels) to bright green (high expression levels).

الگوی بیان ژنی مشابه بین زمان‌های مختلف داشت، در حالی که سایر ژن‌ها تفاوت‌های واضحی را نشان دادند. *EpARF5* در ۰/۵ و ۱ ساعت و *EpARF8* در ۳ ساعت پس از تیمار کاهش بیان معنی‌داری را نشان دادند. *EpARF2* و *EpARF16* به‌طور معنی‌داری پس از تیمار IAA (بیش از دو برابر) افزایش بیان داشتند (شکل ۷).

الگوی بیان ژنهای *EpARF*

از qRT-PCR برای درک بهتر پروفایل بیان پنج ژن ARF در بافت برگ گاوزبان *E. plantagineum* استفاده شد. همانطور که انتظار می‌رفت، بیشتر ژنهای *EpARF* به‌طور قابل توجهی به اکسین حساس بودند. الگوی بیان اعضای خانواده *EpARF* بسیار متفاوت بود، ژن *EpARF4*



شکل ۷- بیان ژن‌های EpARF در پاسخ به تیمار با محلول ۲۰ میکرومولار IAA برای ۰/۵، ۱ و ۳ ساعت Control، برگ‌های تیمار نشده گل گاوزبان

* و ** = به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

Figure 7. The expression of EpARF genes in response to treatment with 20 μ M IAA solution for 0.5, 1 and 3 h. Control, the untreated leaves of *E. plantagineum*,

* and ** = significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

بحث

رونویسی، ARF به‌طور کلی در هسته نقش دارد (Diao *et al.*, 2020)

در این مطالعه پیش‌بینی مکان‌یابی پروتئین‌های EPARF در بخش‌های سلولی نشان داد که جایگاه اکثریت آنها در هسته سلولی است که با نتایج حاصل از بررسی سایر محققان در گونه‌های دیگر همخوانی دارد (Xu *et al.*, 2016). با توجه به محل قرارگیری این ژن‌ها روی کروموزوم‌ها، توالی‌های کدکننده EPARF به‌طور نابرابر روی هشت کروموزوم توزیع شده‌اند و دمین‌های بسیار مشابهی دارند.

درخت فیلوژنتیکی و رابطه فیلوژنتیکی بین EPARF و

AtARF

تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیکی براساس تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای ممکن است در انتخاب ARF کاندید با عملکردهای بیولوژیکی خاص در گل گاوزبان کمک کند. تجزیه و تحلیل دمین پروتئین‌ها اطلاعات مفیدی را برای پیش‌بینی عملکردهای بیولوژیکی ARF ارائه می‌کند که در

شناسایی خانواده ژنی EpARF

فاکتور رونویسی ARF‌ها در مسیرهای سیگنال مربوط به پاسخ اکسین شرکت و رشد و نمو گیاهان را تنظیم می‌کنند (Li *et al.*, 2016). در این تحقیق، در مجموع ۲۸ توالی ژن به عنوان اعضای خانواده EpARF از ژنوم گیاه گل گاوزبان *E. plantagineum* شناسایی شدند که این تعداد نسبتاً مشابه با سایر گیاهان مدل مانند آراییدوبسیس (۲۳ ژن)، برنج (۲۵ ژن) و گیاه هم‌خانواده مریم‌گلی (۲۵ ژن) بود. طول پروتئین‌های این خانواده در گل گاوزبان از ۵۹۶ تا ۱۶۳۴ اسید آمینه و وزن مولکولی آنها نیز از ۶۷/۶۷۰ تا ۱۸۲/۱۳۷ کیلو دالتون متغیر بود. در بررسی Xu و همکاران (۲۰۱۶) نیز طول پروتئین‌های خانواده ژنی ARF در مریم‌گلی از ۳۴۵ تا ۱۱۰۵ اسید آمینه و وزن مولکولی آنها نیز از ۳۸/۷۸ تا ۱۲۲/۱۷ کیلو دالتون متغیر بود. دامنه نقطه ایزوالکتریک آنها نیز از ۵/۲۹ تا ۱۲/۸ متغیر بود. به عنوان یک فاکتور

گاوزبان ایفا کرده است. گسترش اعضای خانواده ARF از طریق مضاعف‌شدگی ژن ممکن است باعث ایجاد عملکرد جدید شود، این موضوع می‌تواند منجر به تغییر ژنتیکی سازوکار سلولی به دلیل ARF شود (Tombuloglu, 2019). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که پیرایش جایگزین¹¹ به‌طور گسترده در خانواده ARF عمل می‌کند و عملکرد پروتئین‌های ARF را افزایش می‌دهد. بر این اساس، چهار عضو از خانواده ARF شامل ARF3، ARF13، ARF17 و ARF23 در سطح ژنومی در آراییدوبسیس کوتاه شده‌اند و دمین‌های III و IV را کد نمی‌کنند (Guilfoyle and Hagen, 2002). از سویی، با توجه به اینکه تفاوت‌های ژنتیکی بین ژنوم مرجع و توالی‌های خوانش‌شده ممکن است در طی نقشه‌برداری، هم‌ترازی‌های نادرستی ایجاد کند و در نهایت، این خطاها می‌تواند منجر به شناسایی نادرست و بازسازی مغرضانه درخت فیلوژنتیکی شود. به منظور جلوگیری از سوگیری‌های ناشی از هم‌ترازی ژنوم رفرنس، هم‌ترازی بر روی توالی‌های آراییدوبسیس و مریم‌گلی نیز انجام گردید. در برخی موارد، تغییرات در درخت فیلوژنتیک می‌تواند به استنتاج‌های نادرست منجر شود. از این رو، استفاده از ژنوم‌های مرجع مختلف ممکن است برای ارزیابی سوگیری‌های بالقوه نقشه‌برداری پیشنهاد شود (Valiente-Mullor et al., 2021).

تجزیه و تحلیل دمین و موتیف‌های *EpARF*

بیشتر پروتئین‌های ARF دارای سه دمین هستند، یک ناحیه DBD در انتهای آمینی، یک ناحیه میانی متغیر به عنوان دومین محرک یا سرکوب رونویسی و یک ناحیه حفاظت دیمر در انتهای کربوکسی که در واکنش متقابل پروتئین - ژن توسط پروتئین‌های خانواده auxin/indole-3-پروتئین (Aux/IAA) و بین ARF نقش دارد (Mei et al., 2022).

توالی اسید آمینه دمین MR برای هر ARF متفاوت است

درجه اول به ویژگی‌های MR، DBD، و PB1 آنها بستگی دارد (Cancé et al., 2022).

مشابه نتایج مطالعات قبلی، مانند آراییدوبسیس (Okushima et al., 2005)، برنج (Wang et al., 2007) و مریم‌گلی (Xu et al., 2016) همه پروتئین‌های ARF در زیرخانواده‌های I-IV گروه‌بندی شدند. بیشترین تعداد اعضا به ترتیب مربوط به کلاس I با ۱۴ عضو، پس از آن کلاس IV (۱۰ عضو)، کلاس II (۳ عضو) و کلاس III (۱ عضو) بود. درخت فیلوژنتیک نشان داد که ژن‌های *EpARF* در کلاس II با *AtARF4* خوشه می‌شوند. با توجه به اینکه در آراییدوبسیس، عملکرد بیشتر اعضای خانواده ARF مورد مطالعه قرار گرفته است، بنابراین حدس زده می‌شود که بیشتر ژن‌های کلاس II ممکن است به مریستم گل و اندام‌های تولیدمثلی مرتبط باشند (Pei et al., 2021).

بر اساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، سازماندهی پروتئین‌های ARF گل گاوزبان بسیار شبیه به پروتئین‌های ARF در گیاه مدل آراییدوبسیس بود. ژن‌های ARF درون یک کلاس دارای سازمان یافتگی موتیف مشابهی هستند که نشان‌دهنده حفظ ساختارهای ARF در کلاس است. بیشتر موتیف ARF بین ۸ تا ۱۰ متمرکز شده‌اند که حفاظت تکاملی ARF را در میان گونه‌های گیاهی نشان می‌دهد. با این حال، تقریباً همه اعضای کلاس IV یک موتیف را از دست دادند که احتمالاً به دلیل تأثیر فشار انتخاب در فرایند تکامل باشد (Wang et al., 2007).

روابط فیلوژنتیکی به‌دست آمده نشان داد که برخی از ژن‌های خانواده ARF آراییدوبسیس بیش از یک کپی با همولوژی بالا در ژنوم گل گاوزبان دارد، این موضوع نشان می‌دهد احتمالاً رویداد دو برابر شدن نیز در ژنوم گاوزبان رخ داده باشد. از سویی، برخی دیگر از ژن‌های ARF در آراییدوبسیس فاقد ژن‌های همولوگ متناظر در گل گاوزبان هستند. این موضوع می‌تواند ناشی از دست دادن ژن در طی مراحل تکامل باشد (Finet et al., 2013). نتایج بررسی مضاعف‌شدگی بین ژن‌ها نشان داد که مضاعف‌شدگی سگمنتال نقش مهمی در گسترش خانواده ژن ARF در

¹¹ alternative splicing

تجزیه و تحلیل بیان اعضای خانواده ژنی *EpARF*

تجزیه و تحلیل بیان می‌تواند به ما در درک عملکردهای بالقوه متمایز *EpARF* کمک کند. در مجموع بیشتر ژن‌های ARF بیان بسیار متغیر را نشان می‌دهند و این الگوی بیان نشان‌دهنده واگرایی عملکردی آنهاست. این نتیجه با گزارش‌های قبلی در مورد واگرایی عملکردی ژن‌های پارالوگ مطابقت دارد (Soria et al., 2014). پروفایل بیانی اعضای خانواده ژنی ARF در گاوزبان *E. plantagineum* نشان داد که بعضی از اعضای خانواده ARF در هر سه بافت ریشه، برگ و گل بیان یکسانی دارند. این موضوع ممکن است نشان‌دهنده آن باشد که این ژن‌ها تحت شرایط خاص بیان می‌شوند. در برنج، اعضای خانواده ژنی *OsARF* تفاوت معنی‌دار زیادی در سطح رونویسی نداشت که نشان می‌دهد ARF به‌طور اساسی در برنج بیان می‌شود (Wang et al., 2007). در طول جوانه‌زنی بذر ذرت، سطح بیان هشت عضو از اعضای خانواده *ZmARF* در جنین‌های بالغ بیشتر از جنین‌های نابالغ بود (Xing et al., 2011). در گیلاس شیرین، *PavARF8/10* در ساقه‌ها به شدت بیان می‌شود، در حالی که *PavARF15* اندکی بیان می‌گردد. به‌طور مشابه، در سویا، *GmARF12* بیشترین بیان را در ساقه داشت، در حالی که *GmARF19* کمترین بیان را نشان داد (Van et al., 2013). در گندم سیاه تارتاری، میزان بیان چهار عضو از خانواده *FtARF* شامل *FtARF3/4/8/10* در بافت گل بیشتر از سایر گروه‌ها بود و در اندام‌های تولیدمثلی همگی سطح بیان بالاتری نشان دادند (Liu et al., 2018). در بافت گل گیلاس شیرین شش عضو از اعضای خانواده *PavARF* شامل *PavARF3/4/7/8/10/14* تفاوت بیان بیشتری نشان داد (Varaud et al., 2015). در آراییدوبسیس *ARF6* و *ARF8* نقش حفظ شده در کنترل رشد و توسعه اندام‌های رویشی و گل دارند و کاهش بیان آنها منجر به توقف باز شدن گل‌ها می‌شود (Tabata et al., 2010).

خانواده ژنی ARF نقش مهمی در مراحل نمو و رشد گیاه دارد. این خانواده ژنی در گیاهان مختلف مانند

و تعیین‌کننده نوع فعالیت به عنوان فعال‌کننده یا سرکوب‌کننده رونویسی می‌باشد (Li et al., 2016; Powers and Strader, 2020). در مورد پروتئین‌های *ARF5*، *ARF6*، *ARF8* و *ARF19* دمین MR آنها غنی از اسیدهای آمینه مانند گلوتامین، سرین و لوسین است که به این معنی است که آنها به فعال‌کننده‌ها تعلق دارند (Tiwari et al., 2003; Guilfoyle and Hagen, 2007). این مورد در آراییدوبسیس (Tiwari et al., 2003)، برنج (Shen et al., 2010) و گوجه فرنگی (Zouine et al., 2014) نیز مشابه بوده است. در مورد پروتئین‌های *ARF1-ARF4*، *ARF9-ARF18* و *ARF20-ARF22* دمین MR آنها غنی از سرین، پرولین، لوسین و گلیسین بوده که به این معنی است که آنها به سرکوب‌کننده‌ها تعلق دارند (Guilfoyle and Hagen, 2007). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل اسیدهای آمینه در ناحیه میانی *EpARF* این مطالعه نشان داد که چهارده ژن *EpARF* دارای فعالیت فعال‌سازی رونویسی و بقیه دارای فعالیت سرکوب‌کننده رونویسی هستند. در آراییدوبسیس، ژن‌های *AtARF5* تا *AtARF8* و *AtARF19* دارای فعالیت فعال‌سازی رونویسی و بقیه سرکوب‌کننده‌های رونویسی هستند (Wen et al., 2019).

تجزیه و تحلیل دمین، نشان داد که بیشتر *EpARF* دارای دمین‌های B3 و *auxin-resp* هستند. فقدان دمین B3 به این معنی است که این ژن نمی‌تواند عنصر پاسخ اکسین را در پروموتور ژن هدف تشخیص دهد و به آن متصل شود، اما دمین CTD آن ممکن است با *AUX/IAA* یا *ARF* ترکیب شود (Xia et al., 2019).

موتیف لیزین و شبه موتیف OPCA که در دمین PB1 ترمینال C در بیشتر ARFها قرار دارد، فقط در خانواده ARF یافت می‌شود، بنابراین حفاظت تکاملی عملکرد ARF را نشان می‌دهد (Korasick et al., 2014). براساس تجزیه و تحلیل تکاملی، اعضای خانواده ژنی ARF ممکن است از چندین ژن اجداد مشترک مشتق شده و شروع به تمایز کرده باشند (Mutte et al., 2017).

- abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 132, 4563-4574.
- Finet, C., Berne-Dedieu, A., Scutt, C.P. and Marlétaz, F., 2013. Evolution of the ARF gene family in land plants: old domains, new tricks. *Molecular Biology and Evolution*, 30(1), 45-56.
- Finet, C., Fourquin, C., Vinauger, M., Berne-Dedieu, A., Chambrier, P., Paindavoine, S., and Scutt, C. P., 2010. Parallel structural evolution of auxin response factors in the angiosperms. *The Plant Journal* 63, 952-959.
- Fioeoen, E., 2000. Medicinal plants in China contain pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie* 55, 10.
- Fleming, A. J. 2006. Plant signalling: the inexorable rise of auxin. *Trends in cell biology* 16, 397-402.
- Guilfoyle, T. J., and Hagen, G. 2007. Auxin response factors. *Current opinion in plant biology* 10, 453-460.
- Hagen, G., and Guilfoyle, T. 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant molecular biology* 49, 373-385.
- Huerta-Cepas, J., Serra, F., & Bork, P. 2016. ETE 3: reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data. *Molecular biology and evolution*, 33(6), 1635-1638.
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., Feldblyum, T., Nierman, W., Benito, M. I., and Lin, X. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796-815.
- Korasick, D. A., Westfall, C. S., Lee, S. G., Nanao, M. H., Dumas, R., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Jez, J. M., and Strader, L. C., 2014. Molecular basis for Auxin response factor protein interaction and the control of auxin response repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 5427-5432.
- Kumar, R., Tyagi, A. K., and Sharma, A. K., 2011. Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. *Molecular Genetics and Genomics*, 2(85), 245-260.
- Li, S.B., Xie, Z.Z., Hu, C.G. and Zhang, J.Z., 2016. A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in plant science* 7, 47.
- Liu M., Ma Z., Wang A., Zheng T., Huang L., Sun W., Zhang Y., Jin W., Zhan J., Cai Y., 2018. Genome-Wide Investigation of the Auxin Response Factor Gene Family in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *International Journal of Molecular Sciences*, 19:3526. doi: 10.3390/ijms19113526.

آراییدوبسیس، گوجه‌فرنگی و ذرت به صورت گسترده و دقیق مطالعه شده است. با این حال مطالعه این ژن‌ها در گل گاوزبان به شکل دقیق انجام نشده است. در مجموع، در این مطالعه یک تجزیه و تحلیل جامع از خانواده ژنی ARF در گیاه دارویی گاوزبان *E. plantagineum* انجام شد. نتایج این تحقیق می‌تواند برای تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای و عملکردی خانواده ژنی ARF در سایر اعضای این خانواده مؤثر واقع شود.

سیاسگزار

این پژوهش با حمایت مالی گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است و بدینوسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را اعلام نمایند.

References

- Amir, G. Z., Azadbakht, M., and Keshavarzi, F., 2000. *Echium amoenum* stimulates of lymphocyte proliferation and inhibit of humoral antibody synthesis. 119-124.
- Bostancioglu, S.M., Tombuloglu, G., Tombuloglu, H., 2018. Genome-wide identification of barley MCs (metacaspases) and their possible roles in boron-induced programmed cell death. *Molecular Biology Reports*, 45, 211-225.
- Cancé, C., Martin-Arevalillo, R., Boubekeur, K., & Dumas, R., 2022. Auxin response factors are keys to the many auxin doors. *New Phytologist*, 235(2), 402-419.
- Diao, D., Hu, X., Guan, D., Wang, W., Yang, H. and Liu, Y., 2020. Genome-wide identification of the ARF (auxin response factor) gene family in peach and their expression analysis. *Molecular Biology Reports* 47, 4331-4344.
- El Hafid, R., Blade, S., and Hoyano, Y. 2002. Seeding date and nitrogen fertilization effects on the performance of borage (*Borago officinalis* L.). *Industrial Crops and Products*, 16, 193-199.
- Ellis, C. M., Nagpal, P., Young, J. C., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., and Reed, J. W., 2005. AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ

- Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists. *Nucleic acids research* 44(W1), W83-W89.
- Rienstra, J., Hernández-García, J., Weijers D. 2023. To bind or not to bind: how auxin response factors select their target genes. *Journal of Experimental Botany* 74(22), 6922-6932.
- Shams, S., Ismaili, A., Firouzabadi, F.N., Mumivand, H. and Sorkheh, K. 2023. Comparative transcriptome analysis to identify putative genes involved in carvacrol biosynthesis pathway in two species of *Satureja*, endemic medicinal herbs of Iran. *Plos one* 18(7), p.e0281351.
- Shams, S., Norouzi, M. 2019. RNA extraction process (ribonucleic acid) from *Satureja* medicinal herb. <http://ipm.ssaa.ir/Search-Result?page=1&DecNo=139750140003003617&RN=97885>.
- Shen, C., Wang, S., Bai, Y., Wu, Y., Zhang, S., Chen, M., Guilfoyle, T.J., Wu, P. and Qi, Y., 2010. Functional analysis of the structural domain of ARF proteins in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of experimental botany*, 61(14), pp.3971-3981.
- Soria, P.S., McGary, K.L. and Rokas, A., 2014. Functional divergence for every paralog. *Molecular biology and evolution* 31(4), 984-992.
- Tabata R, Ikezaki M, Fujibe T, Aida M, Tian CE, Ueno Y, Yamamoto KT, Machida Y, Nakamura K, Ishiguro S. 2010. *Arabidopsis* auxin response factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 *KNOX* genes. *Plant Cell Physiol* 51, 164–175.
- Tiwari, S.B., Hagen, G. and Guilfoyle, T. 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell* 15(2): 533-543.
- Tombuloglu, H. 2019. Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 28(1), 14-24.
- Valiente-Mullor, C., Beamud, B., Ansari, I., Francés-Cuesta, C., García-González, N., Mejía, L., Ruiz-Hueso, P., González-Candelas, F. 2021. One is not enough: On the effects of reference genome for the mapping and subsequent analyses of short-reads. *PLOS Computational Biology* 17(1):e1008678. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008678. PMID: 33503026; PMCID: PMC7870062.
- Varaud E., Brioudes F., Szécsi J., Leroux J., Brown S., Bendahmane M., Varaud E., Brioudes F., Leroux J., Brown S. 2015. Auxin response factor8
- Liu, P. P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H., and Carrington, J. C. 2007., Repression of auxin response factor 10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal*, 52, 133-146.
- Mei, M., Ai, W., Liu, L., Xu, X., & Lu, X., 2022. Genome-wide identification of the auxin response factor (ARF) gene family in *Magnolia sieboldii* and functional analysis of MsARF5. *Frontiers in Plant Science*, 13, 958816.
- Mohammadi, S., Khosro, P., and Dinarvand, M., 2019. Antioxidant and Antibacterial Effects of Some Medicinal Plants of Iran. *International Journal of Secondary Metabolite*, 6, 62-78.
- Mohammadi, S., and Piri, K., 2014. Antifungal effects of two medicinal plants native to Iran. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2, 2712-2715.
- Mutte S.K., Kato H., Rothfels C., Melkonian M., Wong G.K.S., Weijers D., 2017. Origin and Evolution of the Nuclear Auxin Response System. *bioRxiv* 1–25. Doi: 10.1101/220731.
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., Hughes, B., Lui, A., and Nguyen, D., 2005. Functional genomic analysis of the Auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell*, 17, 444-463.
- Pei, Q., Li, N., Yang, Q., Wu, T., Feng, S., Feng, X., Jing, Z., Zhou, R., Gong, K., Yu, T. and Wang, Z., 2021. Genome-wide identification and comparative analysis of ARF family genes in three Apiaceae species. *Frontiers in genetics*, 11, p.1653.
- Powers, S.K. and Strader, L.C., 2020. Regulation of auxin transcriptional responses. *Developmental Dynamics* 249 (4), 483-495.
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P., 2010. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one*, 5(3), e9490.
- Ranjbar, A., Khorami, S., Safarabadi, M., Shahmoradi, A., Malekiran, A. A., Vakilian, K., Mandegary, A., and Abdollahi, M. 2006. Antioxidant activity of Iranian *Echium amoenum* Fisch & CA Mey flower decoction in humans: a cross-sectional before/after clinical trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 3(4): 469–473.
- Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H. and Vilo, J., 2016. g:

- members in medicinal model plant *Salvia miltiorrhiza*. *Biology Open* 5(6), 848-857.
- Xia, F., Sun, T., Yang, S., Wang, X., Chao, J., Li, X., Hu, J., Cui, M., Liu, G., Wang, D. and Sun, Y. 2019. Insight into the B3Transcription factor superfamily and expression profiling of B3 genes in axillary buds after topping in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Genes* 10(2),164.
 - Xing H., Pudake R.N., Guo G., Xing G., Hu Z., Zhang Y., Sun Q., Ni Z. 2011.Genome-Wide Identification and Expression Profiling of Auxin Response Factor (ARF) Gene Family in Maize. *BMC Genome* 12:1-13. doi: 10.1186/1471-2164-12-178.
 - Yu, H., Soler, M., Mila, I., San Clemente, H., Savelli, B., Dunand, C., Paiva, J. A., Myburg, A. A., Bouzayen, M., and Grima-Pettenati, J. 2014. Genome-wide characterization and expression profiling of the Auxin response factor (ARF) gene family in *Eucalyptus grandis*. *PloS one* 9, e108906.
 - Yu, Z., Zhang, F., Friml, J., Ding, Z. 2022. Auxin signaling: research advances over the past 30 years. *Journal of Integrative Plant Biology* 64, 371-392. doi: 10.1111/jipb.13225.
 - Zouine, M., Fu, Y., Chateigner-Boutin, A.L., Mila, I., Frasse, P., Wang, H., Audran, C., Roustan, J.P. and Bouzayen, M., 2014. Characterization of the tomato ARF gene family uncovers a multi-level post-transcriptional regulation including alternative splicing. *PloS one* 9(1), e84203.
 - regulates *Arabidopsis* petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. *Plant Cell* 23:973-983.
 - Van Ha C., Le D.T., Nishiyama R., Watanabe Y., Sulieman S., Tran U.T., Mochida K., Van Dong N., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L.S. 2013. The Auxin Response Factor Transcription Factor Family in Soybean: Genome-Wide Identification and Expression Analyses during Development and Water Stress. *DNA Research* 20:511-524.
 - Voorrips, R. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* 93(1),77-78.
 - Wang, D., Pei, K., Fu, Y., Sun, Z., Li, S., Liu, H., Tang, K., Han, B. and Tao, Y., 2007. Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene* 394(1-2), 13-24.
 - Wang, L., Hua, D., He, J., Duan, Y., Chen, Z., Hong, X. and Gong, Z. 2011. Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene HB33 mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *PLoS genetics* 7(7), p.e1002172.
 - Wen, J., Guo, P., Ke, Y., Liu, M., Li, P., Wu, Y., Ran, F., Wang, M., Li, J. and Du, H. 2019. The auxin response factor gene family in allopolyploid *Brassica napus*. *PloS one* 14(4), p.e0214885.
 - Wright, R. C., and Nemhauser, J. L. 2015. New tangles in the auxin signaling web. *F1000prime Reports* 7, 19.
 - Xu, Z., Ji, A., Song, J. and Chen, S., 2016. Genome-wide analysis of auxin response factor gene family