

## Genome-wide analysis, annotation and expression profile analysis of VDAC genes in *Rosa chinensis*

Gol Mohammad Ashrafi Kalteh<sup>1</sup>, Mostafa Khoshhal Sarmast<sup>\*2</sup>, Jinyi Liu<sup>3</sup>

1. M.Sc. Student, Dept. of Horticultural Science and Landscape, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan, Iran. E-mail: [mohammadashrafi137@yahoo.com](mailto:mohammadashrafi137@yahoo.com)
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Horticultural Science and Landscape, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan, Iran. E-mail: [khoshhal.sarmast@gmail.com](mailto:khoshhal.sarmast@gmail.com)
3. Assistant Prof., Dept. of Horticultural Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China. E-mail: [jlyl@njau.edu.cn](mailto:jlyl@njau.edu.cn)

### Article Info

#### Article type:

Full Length Research Paper

#### Article history:

Received: 02.13.2021

Revised: 04.14.2021

Accepted: 05.03.2021

#### Keywords:

Bioinformatics,  
BLAST,  
cDNA,  
PENTER,  
PlantCare,  
RNA seq

### ABSTRACT

**Background and Objectives:** *Rosa chinensis* is an everflowering diploid plant originated from China. The diploid level of the cell in these plant facilities its breeding program. The objectives of the present work were to analyse the phylogenetic relationship, promoter analysis, prediction of protein interaction and structure. Moreover RNA seq analysis of 7 *R. chinensis* VDAC genes has also been conducted.

**Material and Methods:** VDAC homologues were detected from <https://lipm-browsers.toulouse.inra.fr/pub/RchiOBHm-V2/> via BLAST search program. Two pair of primers was design to isolate *RcVDAC1* and 2 from *R. chinensis* cDNA. The PCR amplified segments inserted into PENTER vector and cloned in *E-Coli* cell and subsequently sequenced. 1500 pb of upstream of seven *RcVDAC* genes were isolated from lipm-browsers for analyzing by PlantCare software. Phylogenetic tree was laied out by OMEGA 7.0 and all the inputs collected from NCBI and Tair websites. *RcVDACs* protein interaction predicted via STRING website. *RcVDACs* proteins structure prediction laied out via Pymole software and *R. chinensis* transcriptome analysed through RNAseq data by Mev. software.

**Results:** Isolation and sequencing results of *RcVDAC1-2* indicated that their sequence is as exact as *Rosa* data bank information. The separation of the *RcVDACs* in different cluster by phylogenetic tree suggests the formation of highly divergent paralogues in *RcVDACs*. Research results gained by PlantCare showed different light, PGR and stress responsive cis-regulatory element in different *RcVDACs* promoter region. The presence of high amount of transcription factor binding site related to *MYB* and *MYC* TF as well as having regions responsive to phytohormones such as jasmonic acid, abscisic acids, auxin, gibberellic acid and also drought and cold stress likely suggesting the regulatory role of *RcVAC* genes under abiotic stress. In fact the results gained by RNAseq data confirmed the regulatory role that *RcVDAC2* and 5 may play during biotic and abiotic stress condition.

**Conclusion:** Generally, the analysis of transcriptome by RNAseq, promoter analysis, prediction of 7 of *RcVDAC* proteins, and their

---

interacting protein and phylogenetic study shed light on the presence of different *ReVDAC* orthologes and indicates this difference on protein structure; govern their different biological function in different developmental stage and different stress condition.

---

Cite this article: Ashrafi Kalteh, Gol Mohammad, Khoshhal Sarmast, Mostafa, Liu, Jinyi. 2022. Genome-wide analysis, annotation and expression profile analysis of *VDAC* genes in *Rosa chinensis*. *Journal of Plant Production Research*, 29 (1), 111-132.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/JOPP.2021.18859.2782

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

---

## تجزیه گسترده ژنوم، تفسیر و بررسی بیان ژن‌های VDAC در گل رز چینی

گل محمد اشرفی کلت<sup>۱</sup>، مصطفی خوشحال سرمست<sup>۲\*</sup>، جین یی لیو<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: [mohammadashrafi137@yahoo.com](mailto:mohammadashrafi137@yahoo.com)
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: [khoshhal.sarmast@gmail.com](mailto:khoshhal.sarmast@gmail.com)
۳. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه کشاورزی نانجینگ، جیانگسو، چین. رایانامه: [jllyl@njau.edu.cn](mailto:jllyl@njau.edu.cn)

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: گل رز چینی با نام علمی <i>Rosa chinensis</i> جزو گیاهان همیشه گلدار، دیپلوئید و بومی چین است. دیپلوئید بودن این گونه گیاهی انجام کارهای به‌نژادی روی این گیاه را تسهیل نموده است. هدف این پژوهش ارزیابی فیلوژنی، تجزیه راه‌انداز، پیش‌بینی ساختار پروتئین، پیش‌بینی پروتئین‌های برهمکنش‌دهنده و تجزیه و تحلیل داده RNAseq در ۷ ژن VDAC در گل رز چینی است.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۳	مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا با استفاده از جستجوی BLAST، همولوگ‌های ژن VDAC از پایگاه داده مربوط به گل رز چینی دریافت شد و یک جفت آغازگر اختصاصی برای آن طراحی گردید. قطعه تکثیر شده از روی cDNA به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از حامل همسانه‌سازی PENTER، جداسازی و در باکتری <i>E-Coli</i> تکثیر و سپس توالی‌یابی شد. از همان پایگاه داده، ۱۵۰۰ جفت باز از راه‌انداز ۷ ژن VDAC گل رز چینی برای تجزیه جدا شد و شناسایی نواحی اتصال عوامل رونویسی با استفاده از تارنمای PlantCARE انجام شد. تجزیه درخت فیلوژنی به وسیله نرم‌افزار OMEGA7 انجام شد و داده‌های اولیه از NCBI و Tair حاصل شدند. برهمکنش پروتئین‌ها به کمک پایگاه داده STRING انجام شد. پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین با استفاده از نرم‌افزار Pymol و آنالیز RNA seq با استفاده از Mev انجام شد.
واژه‌های کلیدی: آنالیز RNAseq بیوانفورماتیک، BLAST cDNA PENTER PlantCARE	یافته‌ها: نتایج جداسازی و توالی‌یابی ناحیه کدکننده دو ژن <i>VDAC1</i> و <i>VDAC2</i> نشان از شباهت ۱۰۰ درصدی ژن‌های جدا شده و تطابق آن با پایگاه داده گل رز چینی دارد. بررسی‌های صورت گرفته روی ۷ ژن VDAC در گل رز چینی با دیگر ژن‌های VDAC موجود در گونه‌های تک‌لپه و دولپه با وجود تأیید محافظت شده بودن این ژن در گل رز چینی و دیگر گونه‌ها، نشان از تغییرات در توالی ژن دارد که باعث خوشه‌بندی ژن‌های گل رز چینی حتی در

---

تیره‌های دیگر شد. تجزیه راه‌انداز ۷ ژن *VDAC* نشان داد که نواحی *Cis-element* متفاوتی مانند عناصر پاسخ‌دهنده به نور، هورمون‌ها و تنش‌های غیرزیستی بر روی راه‌انداز این ژن‌ها وجود دارد. حضور نواحی زیاد مربوط به محل اتصال عوامل رونویسی *MYB* و *MYC* و همچنین نواحی پاسخ‌دهنده به هورمون‌هایی مانند اسید جاسمونیک، اسید آبسزیک، اکسین و جیبرلین و حتی سرما و خشکی تاکید بر نقش این ژن در تنش‌های غیرزیستی دارد. این موضوع به‌وسیله تجزیه ترانسکریپتوم در شرایط تنش غیرزیستی و حتی زیستی در رابطه با ژن‌های *RcVDA2* و *RcVDAC5* قابل تأیید است.

**نتیجه‌گیری:** در مجموع تجزیه داده‌های ترانسکریپتوم، آنالیز راه‌انداز، پیش‌بینی ساختار ۷ پروتئین *RcVDAC* و بررسی روابط فیلوژنتیک، شواهد آشکاری در رابطه با وجود اورتولوگ‌های مختلف *RcVDAC* در گل رز چینی با تفاوت در ساختار سه‌بعدی پروتئین و تفاوت در میزان بیان و نقش زیستی در تنش‌های مختلف محیطی دارد.

---

استناد: اشرفی کلتی، گل محمد، خوشحال سرمست، مصطفی، لیو، جین‌بی (۱۴۰۱). تجزیه گسترده ژنوم، تفسیر و بررسی بیان ژن‌های *VDAC* در گل رز چینی. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۹ (۱)، ۱۳۲-۱۱۱.

DOI: 10.22069/JOPP.2021.18859.2782



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

---

## مقدمه

ارزش جهانی گل و گیاهان زینتی به خصوص در رابطه با گل‌های بریدنی، بالغ بر ۱۴ میلیارد دلار تا سال ۲۰۲۵ برآورد می‌شود. با توجه به اهمیت صفت‌های جدید در صنعت گل و گیاهان زینتی، تلاش‌های زیادی برای استفاده از مهندسی ژنتیک در گیاهان زینتی آغاز شده است. در حال حاضر تنها میخک و رز به عنوان گیاه زینتی تراریخته در بازار به صورت تجاری وجود دارند. نظر به این‌که گل رز مهم‌ترین گل بریدنی صادراتی دنیا است و نظر به اهمیت تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، درک درست کارکرد ژن‌های کلیدی در این گیاه در پیشبرد به‌نژادی این گل بسیار دارای اهمیت است.

گل رز ملکه گل‌هاست و از لحاظ تاریخی نقوش مربوط به گل رز روی اشیای تاریخی در قاره آسیا کشف شده است (۱). گل رز متعلق به جنس *Rosa* و تیره *Rosaceae* می‌باشد که بیش از ۱۵۰ گونه با سطوح مختلف پلئیدی را شامل می‌شود که سطح پلئیدی از ۲ تا ۱۰ را در خود دارند (۲). گل رز ۳۰ درصد از بازار جهانی گل را به خود اختصاص داده است (۳). گل‌های رز جدید تتراپلوئید می‌باشند. صفاتی که در گل رز مورد گزینش قرار می‌گیرند در دیگر محصولات مورد گزینش نبوده‌اند. به عنوان مثال تمرکز ویژه‌ای در رابطه با گزینش گل رز زیبا طی ۲۵۰ سال گذشته به همراه قدرت و مقاومت به تنش‌های زیستی یا غیر زیستی مدنظر بوده است. در میان ویژگی‌های زینتی رنگ و ساختار گل، عطر و خار روی ساقه و برگ از جمله اهداف به‌نژادگران رز بوده است. در دسترس بودن یک توالی پایه ژنومی با کیفیت، کمک بزرگی به تسریع آشکار نمودن اساس ژنتیکی و درک فرآیندهای نمو و تکاملی این گل به‌وسیله تجزیه ژنتیک، ژنومیک، ترانسکریپتومیک و

اپی‌ژنتیک خواهد نمود. به تازگی توالی ژنومی با کیفیت در رز به کمک لاین‌های رز هاپلوئید مشتق شده از رقم *Old Blush* گل رز چینی که در قرن ۱۸ از چین به اروپا و آمریکای شمالی منتقل شده بود، منتشر شده است. با این پیشرفت و به کمک روش‌های ژنومیک، قادر خواهیم بود تا تنظیم‌کننده‌های صفات مهم گیاهان زینتی شامل گل‌دهی دائمی، نمو گل، خودناسازگاری و تراکم خار را شناسایی نماییم (۴).

کانال‌های آنیونی وابسته به اختلاف پتانسیل الکتریکی<sup>۱</sup> (VDACs) یکی از مهم‌ترین و پرتعدادترین کانال‌های پروتئینی در دیواره خارجی میتوکندری بسیاری از موجودات می‌باشد (۲). نقش این پروتئین در برخی از فرایندهای سلولی مانند مرگ سلولی، تنظیم انتقال متابولیت‌ها و انتقال ATP به درون سیتوپلاسم تا حدی آشکار گردیده است ولی نقش این ژن در گل رز تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. به همین دلیل در این مطالعه برهمکنش پروتئین‌های VDAC با دیگر پروتئین‌های موجود در سیتوزول و بررسی عناصر تنظیمی بالادست این ژن، ما را قادر می‌سازد تا اطلاعات جدیدی از کارکرد این ژن در گل رز چینی را آشکار نماییم که می‌تواند به مهندسی بهینه این ژن در حفظ انرژی سلول به ویژه در شرایط تنش کمک نماید. پیش‌بینی ساختار پروتئین و تجزیه تمامی ژن‌های VDAC موجود در گل رز چینی به کمک تجزیه داده‌های RNA seq، جزئیات بیشتری از پاسخ این ژن در شرایط رشدی و نمو متفاوت را آشکار خواهد نمود. شاید اولین گام برای درک بهتر ژن‌ها و پروتئین‌های یک گیاه جداسازی آن ژن از ژنوم گیاه به صورت مجزا باشد (۵). نظر به انجام نشدن این مهم، در این مطالعه سعی شده است که دو ژن *VDAC1* و *VDAC2* به عنوان نمونه

1- Voltage-dependent anion channels

### مواد و روش‌ها

مکان و زمان انجام آزمایش: قسمت اول این پژوهش که مربوط به جداسازی ژن *VDAC1* و *VDAC2* از گل رز چینی (*Rosa chinensis*) می‌شود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۸ انجام شد. قسمت دوم تحقیق مربوط به تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی بود که به کمک نرم‌افزارهای تحت وب و تحت ویندوز صورت گرفته است.

### همسانه‌سازی ژن

استخراج RNA: قلمه‌های نیمه خشبی گل رز چینی از آزمایشگاه پروفیسور وانگ (دانشگاه نانچینگ، چین) به دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ارسال شد. استخراج RNA از ۵۰ میلی‌گرم برگ به کمک کیت استخراج RNA شرکت دنا زیست (ایران) انجام شد. پس از اعمال تیمار *DNAase* و بر اساس پروتوکول شرکت سازنده کیت فرمنتاز، سنتز *cDNA* به وسیله آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و بر اساس دستورالعمل و کیت شرکت فرمنتاز ساخته شد.

طراحی آغازگرها: طراحی آغازگر بر اساس بلاست توالی *VDAC* در پایگاه داده گل رز چینی رقم *Old Blush* به آدرس زیر <https://lipm-browsers.toulouse.inra.fr/pub/RchiOBHm-V2/> انجام و بر اساس نتایج به دست آمده از بلاست، دو آغازگر برای جداسازی ژن از روی *cDNA* به صورت دستی طراحی گردید (جدول ۱). این آغازگرها برای ساخت به شرکت *genscript* چین ارسال شد.

به صورت کامل از ژنوم گیاه جداسازی و در حامل‌های همسانه‌سازی قرار گیرند. ساختار، کارکرد و نحوه تنظیم و نقش این کانال‌های آنیونی موجود در دیواره خارجی میتوکندری در حال آشکار شدن است. گزارش‌های اولیه در گندم از وجود سه ایزوفرم از این ژن خبر می‌دهد که در جریان متابولیت‌های سلولی نقش ایفا می‌کنند (۲). گزارش‌های اخیر روی گیاه مدل آرابیدوپسیس نشان می‌دهد که چهار ایزوفرم این ژن در بافت‌های مختلف این گیاه بیان متفاوتی دارند (۶). این گزارش‌ها بیانگر خاص بودن هر یک از این ایزوفرم‌ها می‌باشد ولی هیچ نقش بیولوژیکی برای این ژن‌ها بیان نشده است. نقش این پروتئین در رابطه با مرگ سلولی و نقش دفاعی آن در گیاه در حال بررسی است. مشخص شده که بیان ژن‌های *VDAC*، از ایزوفرم یک تا چهار در آرابیدوپسیس در پاسخ به پاتوژن‌ها و تنش شوری افزایش پیدا می‌کند (۷). بیش‌تر اطلاعات روی این ژن میتوکندریایی از یوکاریوت‌های مشابه و انسان به دست آمده است. همسانه‌سازی و شناخت اولیه این ژن از گل رز چینی به مطالعات تکمیلی در رابطه با خاموشی و یا بیش‌بیان این ژن کمک خواهد نمود. نظر به این‌که هیچ اطلاعاتی در رابطه با تعداد ژن *VDAC*، شباهت آن با اورتولوگ‌های دیگر، ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های آن، برهمکنش میان پروتئین *VDAC* با دیگر پروتئین‌ها و تجزیه بیان ژن‌های آن در دسترس نیست، بنابراین بررسی بیوانفورماتیکی این ژن در گل رز چینی، مسیر جدیدی از کارکرد این ژن در گل رز را آشکار خواهد نمود.

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای جداسازی ژن‌های *VDAC1* و *VDAC2*.

Table 1. Primers for isolation of *RcVDAC1* and *RcVDAC2*.

توالی Sequence	نام آغازگر Primer	دمای اتصال Annealing temperature	اندازه قطعه Fragment size
F-ATGGCCAAAGGTCCAGGTCTTTAC R-TCATGGCTTCAGAGCCAGAGC	<i>VDAC1</i>	57	831
F-ATGGTGAAGGGTCCGGGTCT R-TCATGGCTTGAGTGCCAAGGC	<i>VDAC2</i>	56	831

داده گل رز چینی رقم OldBlush به آدرس <https://lipm-browsers.toulouse.inra.fr/pub/RchiOBHm-V2/> به کمک جستجوی توالی کوچکی از ژن *VDAC* شناسایی و پس از مشخص نمودن نقطه شروع ترجمه (ATG)، حدود ۱۵۰۰ جفت باز بالا دست ۷ ژن جدا شدند و سپس نواحی اتصال عوامل رونویسی بر روی توالی سیس المنت راه‌انداز ۷ ژن *VDAC* گل رز چینی با استفاده از نرم‌افزار PlantCare (۱۰) آنالیز شد. برای مقایسه، سیس المنت‌های بر روی راه‌انداز ۷ ژن *VDAC* در گل رز چینی با سیس المنت‌های ژن *VDAC4* آراییدوپسیس مقایسه شدند. برای جداسازی راه‌انداز ژن *VDAC4* آراییدوپسیس، از تارنمای Tair به آدرس (Tair.gov) استفاده شد.

شناسایی و پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین: برای این منظور ابتدا توالی‌های کامل ۷ پروتئین مربوط به ۷ ژن *VDAC* گل رز چینی که در قسمت‌های قبل به دست آمده بود برای پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین استفاده شد، ابتدا توالی آمینواسید هر ژن در سایت <https://robetta.bakerlab.org/submit.php> مربوط به دانشگاه سیاتل، آمریکا قرار گرفت تا به کمک الگوریتم‌های پیچیده و منابع موجود پیش‌بینی اولیه صورت گیرد. سپس از ۵ مدل پیشنهادی برای هر پروتئین، بهترین آن‌ها به کمک نرم‌افزار pymol (<https://pymol.org/2/>) طراحی و ساخته شد.

همسازسازی قطعات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به کمک کیت PENTR/D-TOPO انجام و حامل pENTR/D-TOPO به کمک آغازگرهای *VDAC2* و *VDAC1* M13 برای تأیید وجود ژن‌های *VDAC1* و *VDAC2* به کمک شرکت genscript چین از سر ۵' و ۳' توالی‌یابی شد.

همردیفی ژن *VDAC*: برای این منظور توالی تمامی ژن‌ها و پروتئین‌های *VDAC* به کمک جستجوی بلاست از سایت <https://lipm-browsers.toulouse.inra.fr/pub/RchiOBHm-V2/> استخراج شدند. برای انجام همردیفی از نرم‌افزارهای Vector NTI و نرم‌افزارهای تحت وب مانند Cluster omega استفاده شد (۸).

رسم درخت فیلوژنتیک: در راستای به دست آوردن اطلاعات بیش‌تر از قرابت و نزدیکی ژن‌های *VDAC* در گل رز چینی با گونه‌های گیاهی، توالی‌های کدکننده ژن‌ها و پروتئین‌های *VDAC* از سایت NCBI به کمک گزینه BLAST و به فرمت FASTA جمع‌آوری شد. توالی‌ها وارد نرم‌افزار MEGA7.0 (۹) شدند. سپس به کمک برنامه ClustalW این نرم‌افزار، هم‌ردیفی اولیه انجام شد. در ادامه درخت فیلوژنی بر اساس شباهت و به کمک روش neighbor-joining رسم شد (۹).

تجزیه و تحلیل راه‌انداز: برای به دست آوردن توالی راه‌انداز مربوط به ۷ ژن *VDAC* در گل رز چینی از پایگاه

پروتئین‌های VDAC که از ناحیه کدکننده این ژن در گونه‌های تک‌لپه و دولپه نشان حاصل شده است، نشان می‌دهد که این ژن از لحاظ تکاملی محافظت شده می‌باشد. سه گروه مستقل پس از تجزیه حاصل شد. خوشه‌های جدا شده در شکل ۱ به کمک نرم‌افزار MEGA 7 نشان می‌دهد که پروتئین‌های VDAC گل رز چینی در خوشه مجزایی قرار گرفته است (شکل ۱). نکته جالب به دست آمده در تجزیه فیلوژنی در شکل ۱ بیانگر این است که در تمامی موارد یک ژن در دسته‌بندی در کنار دیگر گیاهان همان تیره یا جنس ممکن است قرار نگیرد. این موضوع به دو شکل قابل توجه است. مورد اول این است که تمامی پارالوگ‌های یک ژن در یک گیاه ممکن است وظیفه مشابه‌ای نداشته و تفاوت شدید در توالی ممکن است آن‌ها را از لحاظ دسته‌بندی از هم جدا نماید. مطالعات نشان می‌دهد که بین ژن‌های VDAC گیاه، با پستانداران و مخمر تفاوت عملکردی متفاوتی وجود دارد (۶). از ۵۶ اورتولوگ بررسی شده، هر ۷ پروتئین VDAC گل رز چینی در سه گروه متمایز قرار گرفتند که بیانگر این است که تکامل این ژن‌های VDAC تحت تأثیر فشار گزینش قرار می‌گیرد (۱۳). نتایج ما با نتایج Bay و همکاران (۱۴) که دو ژن همولوگ VDAC طی دسته بندی فیلوژنی در دو خوشه قرار گرفت هم‌خوانی دارد که در حقیقت نشان دهنده پارالوگ‌های بسیار متمایز است. پیش‌تر نقش این کانال‌های پورینی در انتقال مواد بین میتوکندری و سیتوزول و نقش دفاعی آن‌ها در مرگ سلولی آشکار شده بود (۱۵ و ۱۶) ولی وجود چندین پارالوگ از این ژن در موجودات مختلف پیچیدگی آن‌ها را افزایش می‌دهد (۱۷). آنالیز فیلوژنتیک صورت گرفته روی ژن‌های VDAC بر اساس rDNA پیچیدگی روابط آن‌ها را تأیید می‌نماید (۱۸). نتایج نشان می‌دهد که ۴ ژن VDAC گیاه آراییدوپسیس نیز در یک گروه قرار نگرفته و در دو گروه مجزا قرار می‌گیرند. در مجموع

برهمکنش پروتئین‌ها: برای بررسی برهمکنش ۷ پروتئین VDAC با دیگر پروتئین‌های موجود در سیتوپلاسم، از سایت STRING (۱۱) استفاده شد تا پیش‌بینی دقیقی از پروتئین‌های برهمکنش دهنده براساس مدل آراییدوپسیس صورت گیرد. به‌طور خلاصه، ابتدا ۷ پروتئین گل رز چینی با پروتئین‌های VDAC آراییدوپسیس برای یافتن بالاترین میزان شباهت (بر اساس E-value) بلاست شدند. نتیجه حاصل از بلاست اولیه، با تمامی پروتئین‌های شناسایی شده در پایگاه داده برای به دست آوردن برهمکنش اجرا شد.

**تجزیه و تحلیل داده‌های RNAseq مربوط به گل رز چینی:** داده‌های ترانسکریپتوم در این پژوهش از داده‌های منتشر شده در پایگاه داده گل رز چینی (۱۲) به دست آمد. به کمک جستجوی بلاست، ژن‌های هدف از کل داده‌ها جدا و به کمک نرم‌افزار Mev (<http://mev.tm4.org>) نرمال‌سازی داده‌ها انجام شد. سپس برای تحلیل بیش‌تر Heat map مربوط به آن به کمک نرم‌افزار Mev حاصل شد. **تحلیل داده‌ها:** تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به تعداد عناصر سیس در تجزیه راه‌انداز به کمک آزمون T.test در نرم افزار R انجام شد.

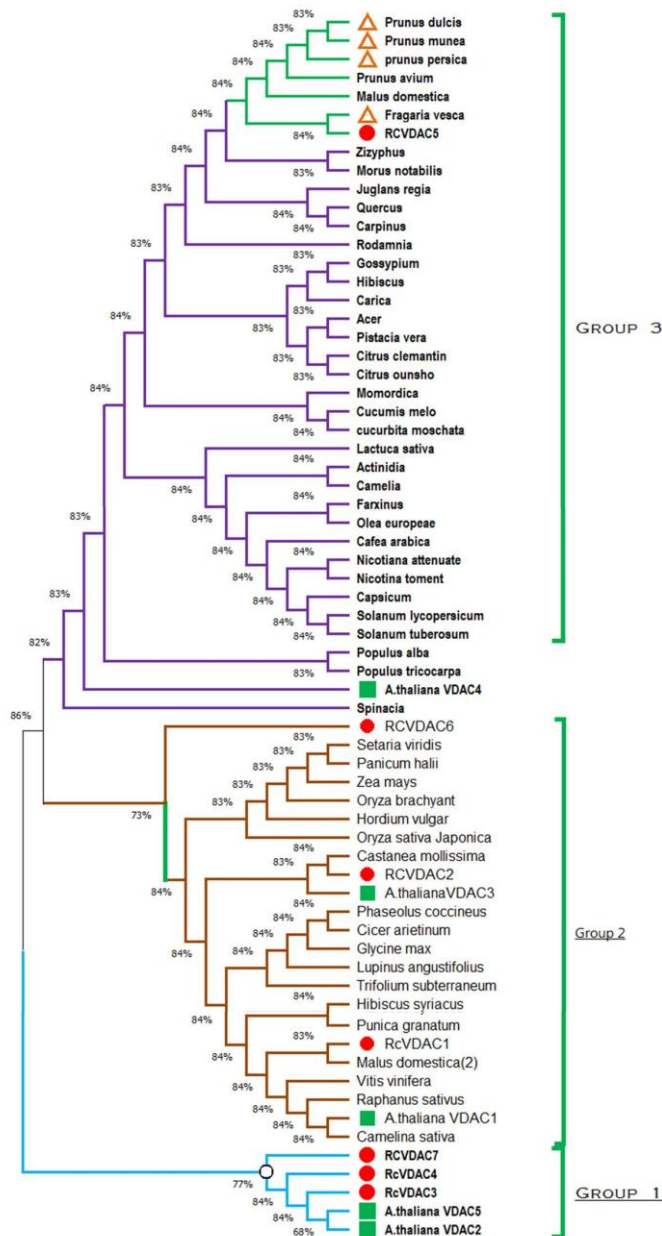
### نتایج و بحث

توالی‌یابی ناحیه کدکننده ژن‌های جدا شده VDAC1 و VDAC2 گل رز چینی کاملاً با توالی‌های به دست آمده از سایت مربوط به گل رز چینی منطبق بود. پس از تأیید این موضوع، تمامی ۷ توالی ژنی و پروتئین مربوط به VDAC با اطمینان در ادامه پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. **بررسی فیلوژنتیک پروتئین‌های VDAC گل رز چینی با دیگر پروتئین‌های VDAC موجود در پایگاه داده NCBI:** نتایج بررسی فیلوژنتیک



موضوع می‌تواند به دلیل متفاوت بودن عملکرد این ژن‌ها باشد.

نتایج نشان می‌دهد که توالی پروتئین‌های VDAC در گل رز چینی قرابت بالایی با یکدیگر ندارند و این

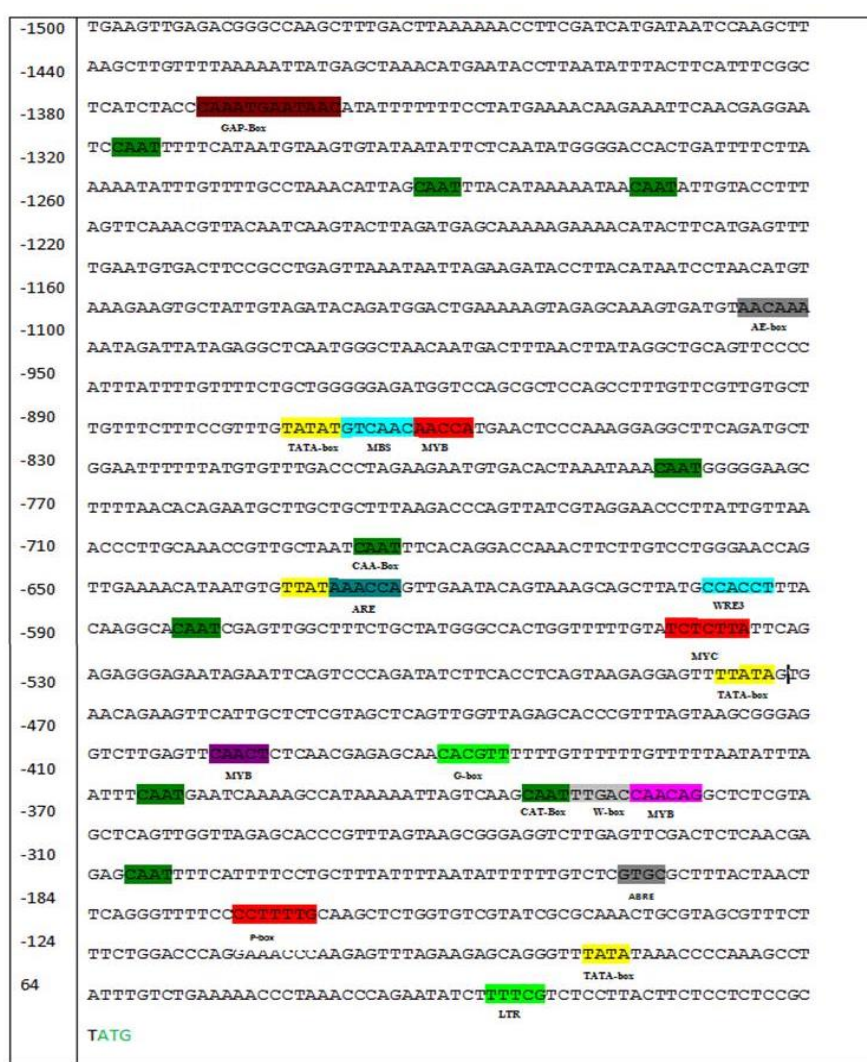


شکل ۱- درخت فیلوژنی مربوط به مقایسه پروتئین‌های VDAC گل رز چینی با دیگر پروتئین‌های VDAC موجود در پایگاه داده NCBI. دایره‌ها نشان‌دهنده پروتئین VDAC گل رز چینی و مستطیل‌ها مربوط به پارالوگ‌های آرابیدوپسیس است. درخت فیلوژنی بر اساس شباهت میان توالی‌ها می‌باشد.

Fig. 1. Phylogenetic tree for comparison of *R. chinensis* VDAC proteins with identified VDACs in NCBI data bank. Circles representing the VDAC proteins in *R. chinensis*. Rectangular representing *Arabidopsis* VDAC proteins.

ویژه‌ای است که به عناصر عملگر Cis معروف است. این نواحی به‌طور اختصاصی محل اتصال عوامل رونویسی ویژه هستند. نوع و چگونگی اتصال این عامل‌های رونویسی به این محل‌ها و برهمکنش فیزیکی آن‌ها با کمپلکس شروع رونویسی در واقع افزایش یا کاهش بیان ژن در مراحل نموی گوناگون و بافت‌های مختلف را تحت تأثیر قرار دهد (۵).

تجزیه و تحلیل راه‌انداز: نواحی تنظیمی بالادست نقطه شروع ترجمه که پیش از کدون ATG قرار دارند، در تنظیم و نحوه بیان تمامی ژن‌ها به نحو مؤثری دخیل هستند. این نواحی تنظیمی در بیش‌تر موارد نزدیک به نقطه شروع رونویسی و در بسیاری از موارد نیز بسیار دورتر و حتی بر روی کروموزوم دیگر قرار دارند (۵). چگونگی تنظیم بیان ژن‌ها، بیش‌تر مرتبط به جایگاه‌های چند نوکلئوتیدی کوچک بسیار



شکل ۲- تصویر نشانگر نواحی اتصال عوامل رونویسی روی راه‌انداز ژن *RcVDAC6* در گل رز چینی می‌باشد.

نقش آن‌ها در جدول ۲ بیان شده است. نقاط با رنگ مشابه فعالیت مشابه دارند.

Fig. 2. Representing transcriptional binding sites (TFBS) in *R. chinensis* VDAC promoter. Their function is presented in Table2. Spots with the same color have similar function.

است. به جزء *RcVDAC4* که تعداد المنت‌های مرتبط به هورمون آن ۱ می‌باشد، بقیه *RcVDAC* ها به مراتب تعداد سیس المنت‌های پاسخ‌دهنده به هورمون بالاتری از *AtVDAC4* گیاه آرابیدوپسیس دارند. به‌خصوص *RcVDAC6* که حدود ۲۹ محل اتصال عامل رونویسی مربوط به هورمون دارد که نشان از نقش اساسی این ژن در پاسخ به محیط است.

ژن‌های *RcVDAC2*، *RcVDAC5*، *RcVDAC6* و *RcVDAC7* تعداد زیادی المنت پاسخ‌دهنده به اسید جاسمونیک دارند که نشان از ارتباط تنگاتنگ اسید جاسمونیک با ژن *VDAC* دارد. پژوهش‌گران پیش‌تر به نقش هورمون اسید جاسمونیک در مرگ سلولی اشاره کرده‌اند (۱۹). بنابراین وجود المنت‌های مرتبط به این هورمون محتمل است و تعداد بسیار بالای عناصر پاسخ‌دهنده به اسید آبسزیک بر راه‌انداز ژن *VDAC6* نقش این ژن در پاسخ به تنش خشکی را بیش‌تر آشکار می‌نماید.

در راستای شناخت بهتر عملکرد ژن *VDAC* در گل رز چینی، ابتدا ۱۵۰۰ جفت باز از راه‌انداز ۷ ژن *VDAC* گل رز چینی از پایگاه داده گل رز چینی به کمک جستجوی بلاست جداسازی و به کمک نرم‌افزار *PlantCare* مورد تجزیه قرار گرفت. تجزیه و تحلیل راه‌انداز این ژن حقایق زیادی را در رابطه به نحوه عملکرد و فعالیت این ژن در گیاه آشکار نمود. نتایج اولیه حضور عناصر پاسخ‌دهنده به نور، هورمون‌های گیاهی و تنش‌های غیرزیستی به ویژه خشکی، سرما و شرایط بی‌هوای را در راه‌انداز این ژن آشکار نمود. برای مقایسه بیش‌تر از ژن فعال *VDAC4* آرابیدوپسیس به عنوان کنترل استفاده شد. در زیرشاخه مربوط به عناصر پاسخ‌دهنده به هورمون‌ها در راه‌انداز *RcVDAC* تعداد زیادی از عناصر پاسخ‌دهنده به هورمون‌های اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک، اکسین و اسید آبسزیک مشاهده می‌شود (جدول ۲). علاوه بر این بسیاری از عناصر پاسخ‌دهنده به نور نیز روی راه‌انداز قابل مشاهده

جدول ۲- شناسایی عناصر *Cis-element* موجود در ۱۵۰۰ جفت باز بالادست نقطه شروع رونویسی

ژن‌های *RcVDAC* و *AtVDAC4* با استفاده از *Plant Care*

Table 2. Cis-element prediction on 1500 bp of *AtVDAC* and *RcVDAC* promoter regions.

نام ناحیه Site name	توالی مرکزی Sequence	<i>AtVDAC4</i> *	<i>RcVDAC</i>							نقش Function
			1	2	3	4	5	6	7	
AT-rich element	ATAGAAATCAA	1	0	0	0	0	1	1	9	ناحیه اتصال مربوط به پروتئین متصل‌شونده به ناحیه AT Binding site related to AT binding protein
TATA-BOX	TATA	27	43	25	45	31	13	14	7	ناحیه راه‌انداز مرکزی Core promoter element
<u>CAAT-box</u>	CAAAT	32	23	39	41	30	48	22	24	عناصر عملگر در ناحیه راه‌انداز و تشدیدکننده Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
Box III	atCATTTTCACt	0	0	0	0	0	1	0	0	ناحیه اتصال به پروتئین Protein binding site

ادامه جدول ۲-

Continue Table 2.

نام ناحیه Site name	توالی مرکزی Sequence	AtVDAC4*	RvVDAC							نقش Function
			1	2	3	4	5	6	7	
عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element										
G-box	CACGTC	1	3	1	1	1	0	15	1	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
Gap-box	CAAATGAA (A/G)A	1	0	0	0	1	0	0	0	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
Box 4	ATTAAT	0	1	6	0	1	2	2	1	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
<u>I-box</u>	TGATAATGT	1	1	0	0	0	0	0	0	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
<u>TCT-motif</u>	TCTTAC	0	1	1	0	1	0	0	0	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
<u>TCCC-motif</u>	TCTCCCT	0	0	1	0	1	0	1	0	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
<u>Box II</u>	CCACGTGGC	0	1	0	0	0	1	1	0	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
chs-CMA2a	TCACTTGA	0	1	0	0	0	0	0	0	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
<u>LAMP-element</u>	CCTTATCCA	0	1	0	0	0	0	0	0	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
MRE	AACCTAA	1	1	0	0	0	0	0	0	ناحیه اتصال MTP مرتبط به پاسخ نوری MTP binding site as a part of a module for light response
TCT-motif	TCTTAC	0	0	0	0	0	0	0	0	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
<u>AE-box</u>	AGAAACTT	2	0	0	0	2	0	0	0	عناصر پاسخ‌دهنده به نور Light responsive element
W-box	TTGACC	0	1	0	1	2	0	0	1	-
کل المنت‌ها Sum		7	*11	9*	2	9*	3	19	3	

ادامه جدول ۲-

Continue Table 2.

نام ناحیه Site name	توالی مرکزی Sequence	AtVDAC <sup>4</sup> *	RvVDAC							نقش Function	
			1	2	3	4	5	6	7		
عناصر پاسخ‌دهنده به تنظیم‌کننده‌های رشد PGR responsive element											
ERE element	ATTTTAAA	0	2	0	0	0	0	0	0	0	-
ABRE	ACGTG	1	6	1	1	0	0	20	1	مرتب با پاسخ به ABA Abscisic acid responsiveness	
AuxRR-core	GGTCCAT	2	0	1	0	0	0	1	0	مرتب با پاسخ به اکسین Auxin responsiveness	
CGTCA-motif	CGTCA	0	0	4	2	0	6	8	6	مرتب با پاسخ به متیل‌جاسمونات MeJA acid responsiveness	
TATC-box	TATCCCA	0	0	1	0	0	0	0	0	مرتب با پاسخ به اسید جیبرلیک Involved in gibberellin-responsiveness	
P-box	CCTTTTG	0	1	0	0	1	0	0	0	مرتب با پاسخ به اسید جیبرلیک Involved in gibberellin-responsiveness	
GARE-motif	TCTGTTG	0	0	0	1	0	0	0	0	مرتب با پاسخ به اسید جیبرلیک Involved in gibberellin-responsiveness	
TGA-element	AACGAC	1	0	1	1	0	0	0	2	مرتب با پاسخ به اکسین Involved in auxin responsiveness	
کل المنت‌ها Sum		4	*10	*8	5	1	6	*22	*9		
عناصر پاسخ‌دهنده به تنش Stress responsive element											
MYB recognition site	CCGTTG	5	6	10	13	14	9	11	8	-	
MBS	CAACTG	0	0	0	1	4	1	2	0	ناحیه اتصال MYB مرتب با خشکی MYBHv1 ناحیه اتصال	
CCAAT-box	CAACGG	0	2	3	2	1	0	2	0	MYB binding site involved in drought-inducibility	
WUN-motif	AAATTACT	0	4	1	0	0	0	2	0	-	
MYC	CATTTG	4	5	3	3	4	1	2	1	-	
ARE	AAACCA	1	1	4	4	2	2	3	0	مرتب به شرایط غیر هوازی Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	
LTR	CCGAAA	0	2	0	0	1	0	2	1	مرتب با پاسخ به دمای کم Cis-acting regulatory element related to low temperature	
STRE	AGGGG	0	1	1	2	2	2	4	5	-	
WRE3	CCACCT	0	1	2	0	1	0	1	0	-	
عناصر عملگر مرتب با شرایط تنش و حالات دفاعی در گیاه Cis-acting regulatory element essential for drought stress and defense mechanism											
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	0	0	0	1	0	1	0	0	-	
DRE1	ACCGAGA	0	0	0	1	0	0	0	1	-	
ERE	ATTTTAAA	0	0	0	1	0	0	0	1	-	
کل المنت‌ها Sum		10	22*	*14	*20	*29	*16	*29	*17		

ادامه جدول ۲-

Continue Table 2.

نام ناحیه Site name	توالی مرکزی Sequence	AtVDAC*	RvVDAC							نقش Function	
			1	2	3	4	5	6	7		
عناصر متفرقه Miscellaneous element											
<u>circadian</u>	CAAAGATATC	0	2	0	0	0	0	0	0	1	مرتبط با ریتم‌های سیرکادین Involved in circadian rhythm
O2-site	GTTGACGTGA	1	1	2	2	0	0	0	0	0	مرتبط با تنظیم متابولیسم زئین Involved in zein metabolism regulation
CAT-box	GCCACT	1	0	0	1	0	0	1	0	0	مرتبط با فعال‌سازی ویژه مریستم Involved in meristem growth
<u>MSA-like</u>	TCCAACGGT	0	1	0	0	0	0	0	0	0	مرتبط با تنظیم چرخه‌های سلولی Involved in cell cycle regulation
motif-GCN4	TGAGTCA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	مرتبط با بیان آندوسپرم Involved in endosperm expression

\* بیانگر تفاوت معنی‌دار با تعداد Cis-element های مربوط به ژن *VDAC4* آرابتیدوپسیس (*AtVDAC4*) است

\* Representative of significant difference with Cis-element number of Arabidopsis *VDAC4*

دفاعی و طی تنش نیز مؤثر است (۲۳، ۲۴). وجود سیس المنت LTR روی راه انداز ژن *VDAC* در گل رز چینی ارتباط بین این ژن و دمای پایین را نشان می‌دهد. بررسی پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که تنش سرما در بافت‌های بالغ و بذور آرابتیدوپسیس منجر به تجمع رونوشت ژن‌های *VDAC* می‌گردد (۷).

هم‌چنین تعداد زیادی از نواحی اتصال برای عامل رونویسی ARE روی راه انداز ژن *VDAC* بیانگر ارتباط تنگاتنگ بین تنش غیرهوازی و ژن *VDAC* می‌باشد که البته نیاز به انجام تحقیقات آزمایشگاهی برای تأیید بیشتر دارد. نقش کلیدی *VDAC* در انتقال متابولیت‌های ضروری برای تنفس سلولی مانند پیروات پیش‌تر آشکار شده است (۱۹).

بررسی برهمکنش پروتئین‌ها: نتایج اولیه نشان می‌دهد که از هفت پروتئین بلاست شده گل رز چینی در پایگاه داده STRING، پروتئین‌های *VDAC1*، *VDAC2* و *VDAC4* دارای بیش‌ترین شباهت در

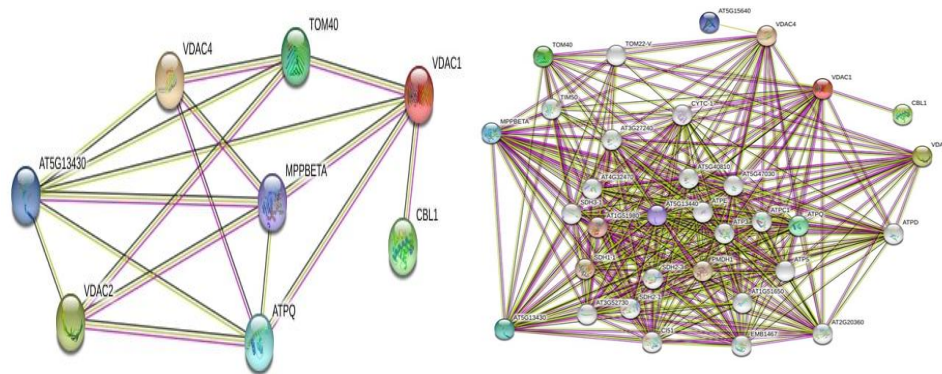
البته وجود سیس المنت MBS که ناحیه اتصال عامل رونویسی Myb می‌باشد به طور آشکاری در *RcVDAC4* نیز بالاست (جدول ۲). بیش‌ترین ژن‌های Myb در تنش‌های خشکی، شوری و سرما در برنج (۲۰) گزارش شده است. حتی نقش آن در مقاومت به خشکی ثابت شده است (۲۱) و خاموشی این ژن در پنبه منجر به کاهش محتوای پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد که به‌طور مستقیم در کاهش رادیکال‌های آزاد تولید شده طی تنش نقش داشتند (۲۱). بنابراین پیشنهاد می‌شود که پاسخ و بیان دو ژن شماره ۴ و ۶ در تنش خشکی بیش‌تر مورد بررسی قرار گیرد. وجود تعداد زیاد عناصر مرتبط با نور، تنش و هورمون نشان می‌دهد که این عوامل با تعامل و همکاری با هم در شرایط مختلف، بیان *VDAC* را متأثر می‌نمایند. ژن *RcVDAC6* دارای تعداد بالایی المنت G-box است. سیس المنت G-box علاوه بر اینکه یک عامل برهمکنش‌دهنده با فیتوکروم (PIFs) برای پاسخ به فتوپریود (۲۲) می‌باشد، در پاسخ‌های

دارد. این بیان همزمان با شدت کم‌تر در خصوص TOM40، ATOQ، MPPBETA و نیز به چشم می‌خورد. AT5G13430 زیر واحد Rieske-1 از کمپلکس سیتوکروم b-c1 می‌باشد که با نقشی که در زنجیره تنفسی دارد پتانسیل الکتروشیمیایی لازم برای اتصال به ATP سنتاز را فراهم می‌کند (۵). بر اساس پیش‌بینی، AT5G13430 با هر سه پروتئین VDAC برهمکنش فیزیکی دارد که این امر به سادگی بیانگر ارتباط تنگاتنگ این پروتئین سیتوکروم C با پروتئین‌های VDAC است.

توالی با آرآیدوپسیس بود که برای پیش‌بینی برهمکنش نهایی با بانک داده استفاده شد.

بر اساس پیش‌بینی انجام شده VDAC1 با CBL1، ATPQ، TOM40، MPPBETA و AT5G13430 برهمکنش دارد. VDAC2 با AT5G13430، TOM40، MPPBETA، ATPQ و VDAC4 برهمکنش دارد و در نهایت VDAC4 با TOM40، MPPBETA، ATPQ، AT5G13430 برهمکنش فیزیکی نشان می‌دهند (شکل ۳).

بر اساس نتایج به‌دست آمده، بیان همزمان بالای AT5G13430 و سه پروتئین VDAC وجود



شکل ۳- پیش‌بینی برهمکنش پروتئین‌های VDAC با دیگر پروتئین‌های آرآیدوپسیس موجود در پایگاه داده. تصویر با استفاده از STRING v10 حاصل شده است.

**Fig. 3. Perdition of protein interaction among VDAC with *Arabidopsis* proteins. Figure generated by STRING v10.**

در تنظیم ورود و خروج نهایی ATP به سیتوپلاسم داشته باشد. نکته جالبی که در بررسی برهمکنش این پروتئین‌ها وجود دارد برهمکنش اختصاصی VDAC1 با CBL1 است. CBL1 یک پروتئین Calcineurin B-like است که به عنوان یک سنسور کلسیمی در فرایند پیام‌رسانی طی رشد و نمو به ویژه در تنش‌های غیرزیستی مؤثر است (۵). این برهمکنش اختصاصی واقعیت دیگری از نقش ژن VDAC در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی را برملا

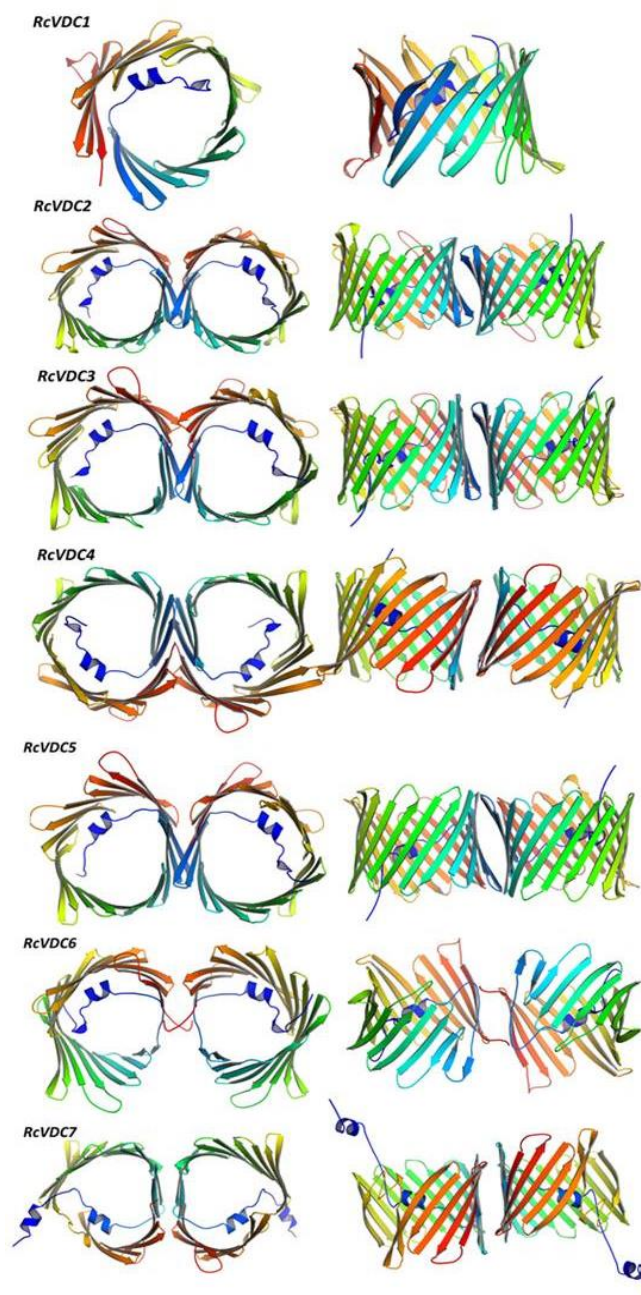
اهمیت این موضوع حتی زمانی دو چندان می‌شود که پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده، AT5G13430 را به عنوان قوی‌ترین کاندید در بیان همزمان با ۵ پروتئین دیگر معرفی می‌کند. بنابراین این بیان همزمان نشان آشکاری از این است که پروتئین VDAC با سیتوکروم C در یک مسیر متابولیکی یا یک فرایند مشترک همکاری دارند. البته پیش‌تر نقش سیتوکروم‌ها در فرایند انتقال انرژی در تنفس آشکار شده است. به نظر می‌رسد این برهمکنش نقش زیادی

با ساختار پروتئین VDAC در انسان و موجودات دیگر شباهت زیادی دارد و به صورت ساختار بشکه بتا است. اما نکات ظریفی در ساختار انواع این پروتئین‌ها آشکار شد. تمامی ساختارهای پیش‌بینی شده به جز RcVDAC1 دایمر می‌باشد (شکل ۴). به نظر می‌رسد از لحاظ ظاهر و ساختار RcVDAC1 بیش‌ترین شباهت را با دیگر پروتئین‌های VDAC دیگر موجودات دارد. RcVDAC2 دایمر بوده و از لحاظ پیش‌بینی ساختاری تا حدی نسبت به دیگر پروتئین‌های VDAC متفاوت است (شکل ۴). ناحیه سر آمینی این پروتئین‌ها در مرکز کانال پروتئینی قرار گرفته است و به صورت آلفا هلیکس می‌باشد که به احتمال بالا به عنوان یک عامل مؤثر در انتقال مواد و متابولیت‌ها به درون و بیرون میتوکندری نقش دارد. در برخی از گزارش‌ها از آن به عنوان سنسور مؤثر در درک ولتاژ الکتریکی یاد می‌شود (۱۹). دایمر بودن این پروتئین در رز تاکنون گزارش نشده است و هیچ سر نخ‌ی از دلیل این‌که چرا تنها یکی از ۷ ایزوفورم این ژن عادی بوده و بقیه به صورت دایمر است مشخص نیست. در این میان RcVDAC7 در سر آمینی خود حدود ۱۲ آمینواسید اضافی دارد (شکل ۵). با توجه به این‌که این پروتئین از بقیه ایزوفورم‌ها کوچک‌تر است به نظر می‌رسد در ساختار خود چندین حذف‌شدگی اسید آمینه نیز داشته باشد. نتایج نشان می‌دهد که RcVDAC7 دارای سر آمینی ویژه‌ای است که به احتمال به عنوان پپتید پیام‌رسان عمل نموده یا محل اتصال به پروتئین‌های برهمکنش‌دهنده دیگر است. مشخص شده است که عاملی که در حفره داخل این پروتئین در تنظیم الکتریکی باز و بسته شدن نقش دارد مربوط به سر آمینی آلفا هلیکس متحرک و بشکه بتا است (۳۰). که این موضوع نقش سر آمینی بیرون زده RcVDAC7 را پیچیده‌تر می‌سازد.

می‌کند که حتی پیش‌تر گزارش‌هایی از درگیر بودن ژن VDAC و پاسخ آن به سرما منتشر شده است. بنابراین این موضوع اهمیت مطالعه بیش‌تر ژن VDAC در تمامی تنش‌های زیستی و حتی غیر زیستی را گوشزد می‌کند. به دلیل ارتباط تنگاتنگ بین CBL1 با آنزیم‌های کینازی (۲۵) و تنش‌های غیرزیستی مانند تنش‌های اسمزی (۲۶)، شوری (۲۷) و خشکی، بنابراین به‌طور غیرمستقیم طی تنش، VDAC به نوعی در فرایند انتقال یا دریافت پیام مؤثر خواهد بود. زیر واحد ATP d آز میتوکندریایی هم پروتئین دیگر برهمکنش‌دهنده با پروتئین VDAC است. این پروتئین در شیب غلظت پروتون دو سمت غشاء به‌وسیله کمپلکس انتقال الکترون از ADP می‌تواند ATP تولید نماید. پروتئین مؤثر دیگر در این برهمکنش (mitochondrial-) MPPBETA processing peptidase subunit beta است که پردازشگر زیر واحد بتا پپتیداز میتوکندریایی (پپتیدازهای موقت) است. این پروتئین متعلق به پپتیدازهای M16 است. پروتئین TOM20 به همراه TOM40 در جایگیری، شناسایی و انتقال پروتئین‌های میتوکندریایی ساخته شده در سیتوزول به درون میتوکندری نقش دارد. بنابراین این پروتئین در تشکیل پوره‌های (حفره) میتوکندریایی نقش دارد.

**پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی تمامی پروتئین‌های VDAC در گل رز چینی چینی:** پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های VDAC در گل رز چینی اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با این پروتئین میتوکندریایی آشکار می‌کند. فقدان آلفا هلیکس در اولین پورین‌های توالی‌یابی شده منجر به این پیش‌بینی شد که این پروتئین‌ها دارای صفحات بتا هستند (۲۸). ساختار سه‌بعدی عجیب این پروتئین‌ها که دارای ۱۹ رشته بتا هستند آشکار شده است (۲۹). همان‌طور که انتظار می‌رفت نتایج نشان داد که ساختار این پروتئین





شکل ۴- پیش‌بینی ساختار پروتئین‌های VDAC در گل رز چینی. نواحی آبی سرآمینی و نواحی قرمز انتهای کربوکسیلی پروتئین را نشان می‌دهند. تصاویر سمت چپ نمای پروتئین از بالا و تصاویر سمت راست نمای پروتئین از پهلو را آشکار می‌کند.

**Fig. 4. Prediction of RcVDAC protein structure. Blue area represents amino head and red section represents carboxylic tail of the proteins. Left pictures showing protein structure from above while right structure representing proteins from the side.**

می‌باشد و از لحاظ اندازه از دیگر RcVDAC ها کوچک‌تر می‌باشد، بنابراین در قسمتی از ساختار خود دچار حذف‌شدگی آمینواسید می‌باشد (شکل B۵).

جالب‌ترین این پروتئین‌ها RcVDAC6 است. دارای ۶ آمینواسید اضافی بوده و دارای یک دم در قسمت انتهای کربوکسیلی به تعداد ۵ آمینواسید



شکل ۵- A: قسمتی از ۱۲ آمینواسید اضافه شده به قسمت سرآمینی RcVDAC7. B: اسید آمینه‌های (QMSII) اضافه شده به دم کربوکسیلی RcVDAC6.

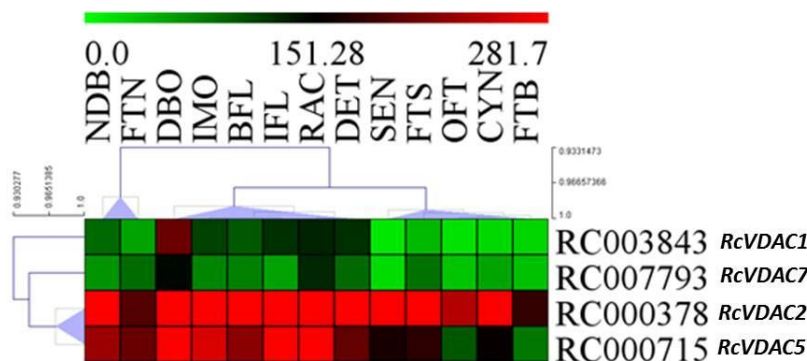
**Fig. 5. A: Representative of small part of 12 amino acid included to the amino head of RcVDAC7. B: A section of "QMSII" added to the carboxyl tail of RcVDAC6.**

پاسخی نشان نمی‌دهد در حالی که *RcVDAC2* تا حد زیادی در برابر این تنش بیش بیان نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که آلودگی با بوتریتیس در رز کیفیت پس از برداشت این گل را به شدت کاهش می‌دهد (شکل ۶). بنابراین می‌توان *RcVDAC2* را به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندید در گل رز چینی در پاسخ به تنش بوتریتیس معرفی نمود. هم‌چنین در گل‌های رز که تنش کم‌آبی دیده‌اند، ژن *RcVDAC2* با شدت بسیار بالاتری نسبت به *RcVDAC5* بیان می‌شود. این موضوع در گل‌های در حال پیری شرایط مشابهی با تنش خشکی دارد. بنابراین *RcVDAC2* تحت تنش غیر زیستی خشکی، بیماری و حتی پیری بسیار فعال‌تر از دیگر ژن‌های *VDAC* در گل رز چینی عمل نموده و دارای نقش کلیدی در تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. نتایج حاصل از RNA seq تا حد زیادی با نتایج تجزیه راه‌انداز در یک راستا می‌باشد. زیرا آنالیز راه‌انداز ژن *VDAC2* با استفاده از PlantCare نشان از داشتن تعداد زیاد عناصر

ارزیابی ژن‌های *VDAC* به کمک داده‌های **RNAseq**: نتایج بلاست انجام شده در این پژوهش تنها ۴ ژن *RcVDAC* را در کتابخانه ساخته شده آشکار نمود. نتایج نشان می‌دهد که ژن *RcVDAC1* به جزء در زمان رشد فعال مریستم رویشی جانبی که تا حدی دارای بیان است در دیگر تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گل رز چینی بیان نمی‌شود. *RcVDAC7* که بر اساس پیش‌بینی ساختار پروتئین، دارای نواحی آمینو بیرون زده و ویژه‌ای بود، به جزء در حالت رشد فعال مریستمی، بیان دیگری در شرایط تنش زیستی و غیرزیستی از خود نشان نداد. اما بیش‌ترین میزان بیان در دو ژن *RcVDAC2* و *RcVDAC5* مشاهده شد که بر اساس پیش‌بینی ساختار پروتئین، هر دو دایمر و ساختار بشکه بتا کاملی داشتند. در رابطه با پاسخ این دو ژن در شرایط تنش زیستی و غیرزیستی، تجزیه ژن‌های به‌دست آمده از داده‌های RNA seq نشان می‌دهد که *RcVDAC5* به تنش زیستی حاصل از سویه *Botrytis cinerea* LR18

اتصال عوامل رونویسی به راه‌انداز این ژن‌ها، تا حد زیادی نقش این ژن‌ها در بافت، اندامک و زمان بیان آن‌ها را توجیه می‌کند.

پاسخ‌دهنده به تنش و هورمون دارد. این بالا بودن تفاوت بیان در ۷ ژن *VDAC*، نظر به تفاوت مشاهده شده در ساختار این پروتئین‌ها و تفاوت در نواحی



شکل ۶- نمودار Heat map تولید شده از داده‌های RNA seq به دست آمده از اندام‌های مختلف گل رز چینی تحت تنش زیستی و غیرزیستی. ریشه جوان (RAC)، ساقه و برگ در حالت عادی (FTN)، برگ تحت تیمار *Botrytis cinerea* LR18 (FTB)، برگ مربوط به گل رز چینی تحت تنش کم آبیاری (FTS)، جوانه جانبی رویشی خفته (NDB)، جوانه جانبی فعال (DBO)، جوانه گل در مرحله مرستمی (IFL)، مرستم جوانه گل که حلقه‌های مختلف گل در آن تشکیل شده (IMO)، غنچه گل در حالت بسته (BFL)، بساک گل در مرحله میکروسپورزایی (DET)، گل در حالت باز (OFT)، گل در مرحله پیری (SEN)، میوه گل رز چینی جوان یا هیپ (CYN).

**Fig. 6.** Heatmap generates based on RNAseq data gained from different organ of *R. chinensis* under biotic and abiotic stress. RAC : White young roots; FTN: Young leaves and stems; FTB : Leaves infected with *Botrytis cinerea* LR18; FTS: Leaves from water stressed plants; NDB: Dormant axillary buds (vegetative meristem); DBO: Active axillary buds (vegetative meristem); IFL: Floral bud at floral meristem transition; IMO: Floral meristem and early floral organs (sepal, petal, stamens and carpels) development; BFL: closed flower; DET: Stamens at microsporogenesis and microgametogenesis stages; OFT: open flower; SEN: senescent flower; CYN: rose hip from pollination up to early pigmentation.

علت استفاده از گل رز چینی در این آزمایش این است که صفاتی مانند عطر گل، همیشه گل‌دهی و پرپری در گیاهان مدلی مانند برنج، آراییدوپسیس، توتون و ذرت قابل بررسی نبوده و گل رز چینی یک گیاه مدل ایده‌آل برای این موضوع می‌باشد. تجزیه گسترده مربوط به روابط فیلوژنی، تجزیه راه‌انداز، پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین، پروتئین‌های برهمکنش‌دهنده، و تجزیه بیان داده‌های RNA seq اطلاعات زیادی را در رابطه با ۷ پارالوگ ژن *VDAC* در گل رز چینی آشکار نمود.

در ریشه‌های جوان، جوانه‌های رویشی جانبی فعال و خفته، جوانه گل در مرحله مرستمی و تا حدی نمو یافته و حتی گل نمو یافته در مرحله غنچه، شدت بیان ژن *VDAC* ۱ و ۵، برابر و بالا است. تفاوت دیگر مشاهده شده در رابطه با میزان بیان بسیار بالاتر *RcVDAC2* در قسمت پرچم و میکروسپور نسبت به *RCVDAC5* است. بیان ژن‌های مختلف *VDAC* در آراییدوپسیس در اندام‌های جنسی به ویژه در پرچم‌ها پیش‌تر تأیید شده است (۶). به هر حال گزارشی مربوط به پاسخ ژن‌های *VDAC* در گل رز چینی در شرایط زیستی و غیر زیستی وجود ندارد.

### نتیجه‌گیری کلی

قرارگیری پارالوگ‌های پروتئین VDAC رز در خوشه‌های مختلف حقایق زیادی را در رابطه با تنوع اسیدهای آمینه آن نشان داد. پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی، تمایز ساختار این پروتئین و تا حدی نقش زیستی این پروتئین را آشکار نمود. ژن‌های *VDAC2* و *VDAC5* که دارای ساختار دایمر کامل بودند به مراتب از بیان ژنی بالاتری در شرایط نموی و تنش زیستی و غیرزیستی برخوردار بودند. تجزیه و تحلیل

راه‌انداز این ژن نیز به همراه دیگر ژن‌های *VDAC* به‌طور آشکاری نقش ژن‌های مختلف را تحت شرایط تنش غیر زیستی و پاسخ به هورمون‌های مختلف به‌ویژه اسید جاسمونیک نشان می‌دهد که با داده‌های ترانسکریپتوم مرتبط با پیری و تنش غیرزیستی و خشکی منطبق است. می‌توان *ReVDAC2* را به عنوان یکی از ژن‌های کاندید در گل رز چینی در پاسخ به تنش بوتریتیس معرفی نمود.

### منابع

1. Wang, G. 2007. A study on the history of Chinese roses from ancient works and images. *Acta Hort.* 751: 347-356.
2. Robert, N., d'Erfurth, I., Marmagne, A., Erhardt, M., Allot, M., Boivin, K., Gissot, L., Monachello, D., Michaud, M., Duchêne, A.M., Barbier-Brygoo, H., Maréchal-Drouard, L., Ephritikhine, G. and Filleur, S. 2012. Voltage-dependent-anion-channels (*VDACs*) in *Arabidopsis* have a dual localization in the cell but show a distinct role in mitochondria." *Plant molecule. Biology*, 78: 431-46.
3. Nybom, H. and Werlemark, G. 2017. Realizing the potential of health-promoting rosehips from dogroses (*Rosa* sect. *Caninae*). *Curr. Bioac. Compd.* 13: 3-17.
4. Saint-Oyant, L.H. and Ruttink, T., et al. 2018. A high-quality genome sequence of *Rosa chinensis* to elucidate ornamental traits. *Nature*, 4: 473-484.
5. Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M. and Murphy, A. 2015. *Plant physiology and development*. Sixth edition. Sinauer Associates. 761p.
6. Tateda, C., Watanabe, K., Kusano, T. and Takahashi, Y. 2011. "Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 62: 4773-85.
7. Lee, S.M., Hoang, H., Han, H.J., Kim, H.S., Lee, K., Kim, K.E., Kim, D.H., Lee S.Y. and Chung, W.S. 2009. Pathogen inducible Voltage-Dependent Anion Channel (*AtVDAC*) isoforms are localized to mitochondria membrane in *Arabidopsis*. *Mol. Cells*, 27: 321-327.
8. Sievers, F. and Higgins, D.G. 2018. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science*, 27: 135-145.
9. Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
10. Lescot, M., Dehais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., van de Peer, Y., Rouze, P. and Rombauts, S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 30: 325-327.
11. Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L.J. and von Mering, C. 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 43: 447-452. doi: 10.1093/nar/gku1003.
12. Dubois, A., Carrere, S. and Raymond, O. et al. 2012. Transcriptome database resource and gene expression atlas for the rose. *BMC Genomics*, 13: 638.

13. Xu, X., Tan, Y.P., Cheng, G., Liu, X.Q., Xia, C.J., Luo, Y.F. and Wang, C.T. 2015. Genomic survey and gene expression analysis of the VDAC gene family in rice. *Genet. Mol. Res.* 14: 15683-15696.
14. Bay, D.C., Hafez, M., Young, M.J. and Court, D.A. 2012. Phylogenetic and coevolutionary analysis of the  $\beta$ -barrel protein family comprised of mitochondrial porin (VDAC) and Tom40. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818: 1502-1519.
15. Colombini, M.A. 1979. Candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature*, 279: 643-645.
16. Kinnally, K.W., Peixoto, P.M., Ryu, S.Y. and Dejean, L.M. 2010. Is *mPTP* the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim. Biophys. Acta.* 1813: 616-622.
17. Young, M.J., Bay, D.C., Hausner, G. and Court, D.A. 2007. The evolutionary history of mitochondrial porins. *BMC Evol. Biol.* 7: 31. [https://doi.org/ 10.1186/1471-2148-7-31](https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-31)
18. Adl, S.M., Simpson, A.G., armer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J.C., Lane, E., Lewis, L., Lodge, A.J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O. and Mozley-Standridg, S.E. et al. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52: 399-451.
19. Kanwar, P., Samtani, H., Sanyal, S.K., Srivastava, A.K., Suprasanna, P. and Pandey, G.K. 2020. VDAC and its interacting partners in plant and animal systems: An overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 40: 715-732.
20. Dai, X., Xu, Y., Ma, Q., Xu, W., Wang, T., Xue, Y. and Chong, K. 2007. Overexpression of an R1R2R3 MYB Gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 143: 1739-1751.
21. Li, J., Hun, G. and Sui, N. 2019. Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding. *Plant Sig. Behav.* 14: 1613131. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1613131>
22. Menkens, A.E., Schindler, U. and Cashmore, A.R. 1995. The G-box: A ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20: 506-510.
23. Arias, J.A., Dixon, R.A. and Lamb, C.J. 1993. Dissection of the functional architecture of a plant defense gene promoter using a homologous in vitro transcription initiation system. *Plant Cell*, 5: 485-496.
24. Deng, W., Ying, H., Helliwell, C.A., Taylor, J.M. and Peacock, W.J. 2011. FLOWERING LOCUS C (*FLC*) regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108: 6680-6685.
25. Yadav, A.K., Jha, S.K., Sanyal, S.K., Luan, S. and Pandey, G.K. 2018. *Arabidopsis* Calcineurin B-like proteins differentially regulate phosphorylation activity of CBL-interacting protein kinase 9. *Biochem. J.* 475: 2621-2636.
26. Cho, J.H., Choi, M.N., Yoon, K.H. and Kim, K.N. 2018. Ectopic expression of SjCBL1, Calcineurin B-Like<sub>1</sub> gene from *Sedirea japonica*, rescues the salt and osmotic stress hypersensitivity in *Arabidopsis cbl1* Mutant. *Fron. Plant. Sci.* 1181. [10.3389/fpls.2018.01188](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01188).
27. Fang, Q., Wang, Q., Mao, H., Xu, J., Wang, Y., Hu, H., He, S., Tu, J., Cheng, C., Tian, G., Wang, X., Liu, X., Zhang, C. and Luo, K. 2018. *AtDIV2*, an R-R-type MYB transcription factor of *Arabidopsis*, negatively regulates salt stress by modulating ABA signaling. *Plant Cell Report*, 37: 1499-1511.
28. Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. 1998. Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature*, 395: 516-521.

29. Ujwal, R., Cascio, D., Colletier, J.P., Faham, S., Zhang, J., Toro, L., Ping, P. and Abramson, J. 2008. The crystal structure of mouse *VDAC1* at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 17742-17747.
30. Noskov, S.Y., Rostovtseva, T.K. and Chamberlin, A.C. 2019. Current state of theoretical and experimental studies of the voltage-dependent anion channel (*VDAC*). *Biochim Biophys Acta.* 1858: 1778-1790.