



بررسی الگوی بیان ژن *P5CS1* در القای حافظه رونویسی تنش
خشکی در *Arabidopsis thaliana*

Analysis of *P5CS1* Gene Expression Pattern in the
Induction of Drought Stress Transcriptional Memory in
Arabidopsis thaliana

هومن رضایی نیک، علیرضا رامندی، سید حسن مرعشی، علیرضا سیفی

Hooman Rezaie Nik, Alireza Ramandi, Seyed Hassan Marashi, Alireza Seifi

گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi
University of Mashhad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arseifi@um.ac.ir

arseifi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۲/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۴/۱ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۴/۱)

Received: 2026/05/18 | Accepted: 2026/06/22 | Published: 2026/06/22

Abstract

Plants frequently encounter repeated episodes of water deficit in their natural environment. Some plants can acquire an enhanced stress response upon re-exposure to the same stress, a phenomenon termed “stress memory”. This study investigates whether *Pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1)*, a key gene in proline biosynthesis, exhibits transcriptional memory in response to repeated dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. A transgenic line expressing the β -glucuronidase (GUS) reporter gene under the control of the *P5CS1* promoter was subjected to two cycles of dehydration (4 h) and rehydration (4 h). Histochemical GUS staining revealed minimal expression after the first dehydration (S1), but strong expression after the first rehydration (R1) and significantly enhanced expression after the second dehydration (S2) and rehydration (R2). The proline content increased in each cycle; this increase was observed in the shoot after S2 and in the roots after R2 compared to the control. These results demonstrate that *P5CS1* is a dehydration stress memory gene, with both its expression and proline accumulation being potentiated upon repeated exposure to water deficit. This work provides a functional link between proline metabolism and transcriptional memory in plant adaptation to recurring dehydration.

Keywords: *P5CS1*, proline, dehydration stress, stress memory, transcriptional memory

چکیده

رفرانس دهی این مقاله Citation

Rezaie-Nik H, Ramandi A, Marashi S H, Seifi A. (2026). Analysis of *P5CS1* Gene Expression Pattern in the Induction of Drought Stress Transcriptional Memory in *Arabidopsis thaliana*. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (2): 248-256. Doi: [10.61882/gebsj.14.2.10](https://doi.org/10.61882/gebsj.14.2.10)
URL: <http://gebsj.ir/article-1-545-fa.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal Volume 14, Number 2, 2026

خلاصه

گیاهان در محیط طبیعی خود به طور مکرر با دوره‌های کمبود آب مواجه می‌شوند. برخی گیاهان پس از مواجهه مجدد با تنش مشابه، پاسخ تشدیدشده‌ای از خود نشان می‌دهند که «حافظه تنش» نامیده می‌شود. در این پژوهش، نقش حافظه رونویسی ژن *P5CS1* (آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز پرولین 1 (Pyrroline-5-carboxylate synthetase 1) در پاسخ به تنش‌های مکرر کم‌آبی در *Arabidopsis thaliana*) بررسی شد. لاین تراریخته حامل ژن گزارشگر *GUS* تحت کنترل پروموتور *P5CS1* در معرض دو سیکل تنش کم‌آبی (۴ ساعت) و آبیاری مجدد (۴ ساعت) قرار گرفت. رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی *GUS* بیان اندک این ژن در اولین تنش کم‌آبی (S1)، بیان قابل توجه در اولین آبیاری مجدد (R1) و بیان تشدیدشده در تنش کم‌آبی دوم (S2) و آبیاری مجدد دوم (R2) را نشان داد. میزان پرولین در هر سیکل افزایش یافت؛ این افزایش به طور معنادار در اندام هوایی پس از S2؛ و در ریشه‌ها پس از R2؛ نسبت به شاهد مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد *P5CS1* ژنی مربوط به حافظه تنش کم‌آبی است و بیان آن همراه با انباشت پرولین در مواجهه مکرر با تنش کم‌آبی تقویت می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *P5CS1*، پرولین، تنش کم‌آبی، حافظه تنش، حافظه رونویسی

مقدمه

Introduction

تغییرات اقلیمی در حال افزایش میزان مواجهه گیاهان، انسان‌ها و همچنین جانوران با تنش‌های غیرزیستی در بخش وسیعی از جهان است. مهم‌ترین پیامد این تغییرات؛ افزایش دما و شدت گرفتن گرما و خشکسالی می‌باشد. دو تنش عمده و به‌هم‌پیوسته که رشد، بهره‌وری و ایمنی غذایی محصولات زراعی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، دماهای بالا و کمبود آب هستند (Eckardt et al., 2023). تنش‌های شدید مانند تنش خشکی تقریباً تمام مراحل رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. علاوه بر این تنش خشکی موجب کاهش رشد برگ، اختلال در فعالیت‌های مختلف آنزیمی و کاهش جذب یون‌ها می‌شود که در نهایت به افت عملکرد محصول منجر می‌گردد (Ilyas et al., 2021). همچنین، تنش شدید خشکی به‌طور قابل‌توجهی هدایت روزنه‌ای، روابط آبی گیاه و تثبیت دی‌اکسید کربن را محدود می‌کند که این امر به کاهش بهره‌وری گیاه منجر خواهد شد (Chaudhry & Sidhu, 2022). در میان تنش‌های غیرزیستی، خشکسالی عامل محدودکننده اصلی در کشاورزی به‌شمار می‌رود (Farooq, Hussain, Wahid, & Siddique, 2012; Umezawa, Fujita, Fujita, Yamaguchi-Shinozaki, & Shinozaki, 2006). از سوی دیگر تولید زیست‌توده در گیاهان اغلب به‌شدت تحت تأثیر شرایط نامساعد اقلیمی آسیب می‌بیند. در نتیجه، گیاهان باید در زمان مناسب و با سرعت کافی برای بقا، به شرایط نامساعد از طریق شاخص‌های زیستی مختلف واکنش نشان دهند (Takahashi, Kuromori, & Urano, Yamaguchi-Shinozaki, & Shinozaki, 2020).

گیاهانی که در معرض تنش قرار گرفته‌اند ممکن است برخی ویژگی‌های زیستی خود، مانند سطح رونویسی ژن‌ها را تغییر دهند و نسبت به تنش‌های آینده مقاوم‌تر شوند (Friedrich et al., 2021; Kappel et al., 2023; Liu, Fromm, & Avramova, 2014). این تغییرات منجر به شکل‌گیری مفهومی موسوم به «حافظه تنش» شده است که نشان می‌دهد در صورت مواجهه مکرر با شرایط تنش‌زا، گیاهان ممکن است پاسخ‌های قوی‌تری نسبت به تنش اولیه از خود نشان دهند (Virlouvet, Ding, Fujii, Avramova, & Fromm, 2014). در شرایط تنش کم-آبی، ژن‌هایی که در اثر تنش القاء می‌شوند، در مواجهه بعدی با تنش بیان بیشتری دارند و این پدیده الگویی برای حافظه تنش در نظر گرفته می‌شود که **حافظه مثبت** نام دارد (Avramova, 2015). زمانی که گیاهان برای نخستین بار در معرض تنش کم‌آبی قرار می‌گیرند، سطح نسبی

رونویسی برخی ژن‌ها ممکن است تغییر کند. اگر سطح رونویسی ژن‌های خاص در شرایط تنش جدید نسبت به تنش قبلی بیشتر باشد، این ژن‌ها، **ژن‌های حافظه** محسوب می‌شوند و این نوع حافظه، **حافظه رونویسی** نامیده می‌شود (Ding et al., 2013).

پرولین (Proline) به عنوان یک اسمولیت در گیاهانی که در معرض تنش کمبود آب قرار می‌گیرند، اثر مهمی دارد و برای محافظت از مناطق مرستمی نوک ریشه و برگ ضروری است (Koenigshofer & Loeppert, 2019). آنزیم کلیدی P5CS1 در بیوسنتز پرولین در گیاه *Arabidopsis thaliana* نقش دارد (Yoshiba, Nanjo, Miura, Yamaguchi-Shinozaki, & Shinozaki, 1999). P5CS1 که ژن کدکننده آنزیم دلتا-پیرولین-5-کربوکسیلات سنتتاز است؛ آنزیم مرحله تعیین‌کننده سرعت سنتز پرولین از گلوتامات محسوب می‌شود و نقش قابل توجهی در افزایش تحمل به شوری و تحریک گلدهی تحت تنش خشکی ایفا می‌کند (Mattioli et al., 2009). قرار گرفتن در معرض تنش‌های غیرزیستی مکرر می‌تواند نحوه پاسخ گیاه به همان تنش خاص را تغییر دهد و به‌طور بالقوه توانایی آن را برای تحمل تنش‌های مشابه افزایش دهد. این پدیده می‌تواند مربوط به الگو حافظه تنش باشد (Ding et al., 2013).

در گیاه *Arabidopsis*، آنزیم‌های P5CS1 و P5CS2 با استفاده از گلوتامات، NADPH و ATP، گاما-سمی‌آلدئید پرولین (GSA) را تولید می‌کنند. پس از آن آنزیم P5CR، GSA را به پرولین تبدیل می‌کند (Funck, Eckard, & Müller, 2010). P5CS1 نقش مهمی در تجمع پرولین دارد، در حالی که P5CS2 برای رشد طبیعی دانه و رشد ریشه در شرایط بدون تنش مورد نیاز است (Funck, Baumgarten, Stift, & Von Wirén, 2020). آنزیم P5CS1 علاوه بر مسیر گلوتامات، می‌تواند از طریق مسیر اورنیتین نیز تحت شرایط تنش سنتز شود (Anwar et al., 2021). در محتوای آبی پایین، ژن P5CS1 در بخش هوایی *Arabidopsis* به شدت القا می‌شود (Sharma, Villamor, & Verslues, 2011).

در این مطالعه، هدف بررسی الگوی حافظه رونویسی ژن P5CS1 است که در بیوسنتز و تجمع پرولین نقش دارد و این بررسی نشان خواهد داد که آیا الگوی بیان حافظه رونویسی این ژن می‌تواند باعث افزایش پرولین طی سیکل‌های مکرر تنش کم‌آبی شود یا خیر. در این آزمایش توالی پروموتور ژن P5CS1 به ژن کدکننده پروتئین GUS متصل شده و سطح بیان P5CS1 تحت تاثیر تنش‌های مکرر کم‌آبی بررسی شد. علاوه بر این، محتوای پرولین گیاه نیز تحت تاثیر تنش‌های مکرر کمبود آب اندازه‌گیری شد.

Materials and Methods

مواد و روش‌ها

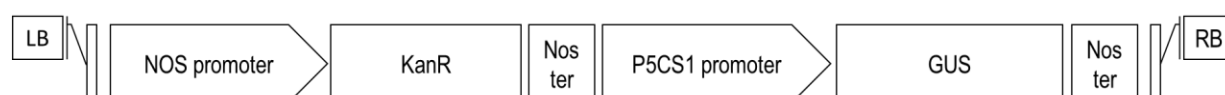
ایجاد لاین‌های تراریخته: توالی پروموتور در فاصله ۸۵۸- تا ۱۲۲- جفت باز در بالادست کدون شروع ژن P5CS1 (AT2G39800) از DNA ژنومی *Arabidopsis thaliana* (Col-0) با استفاده از پرایمرهای 5'-GCATAAGCTTgtatgatacacatctagc و 5'-GCATGGATCCgatccaaggaagatatg تکثیر شد. این پرایمرها حاوی جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های *HindIII* و *BamHI* برای همسانه‌سازی جهت‌دار بودند. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس *Taq polymerase* (محصول شرکت Ampliqon دانمارک)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (استوک ۱۰ میکرومولار)، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰۰ نانوگرم/میکرولیتر) و ۷ میکرولیتر آب دیونیزه بود. شرایط حرارتی PCR بدین صورت می‌باشد؛ ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه (دناتوراسیون اولیه)؛ ۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون)، ۶۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (کاهش ۱ درجه سانتی‌گراد در هر سیکل)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (گسترش)؛ سپس ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

قطعات تکثیر شده با آنزیم‌های *HindIII* و *BamHI* هضم شدند. واکنش هضم (۵۰ میکرولیتر) شامل: ۳۰ میکرولیتر محصول PCR، ۱۰ میکرولیتر بافر هضم Tango Buffer 10X (Thermo Fisher)، ۱ میکرولیتر *BamHI* (۱۰ واحد بر میکرولیتر، Thermo Fisher)، ۱ میکرولیتر

HindIII (۱۰ واحد بر میکرولیتر، Thermo Fisher) و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه بود. وکتور pBI121 با آنزیم‌های *HindIII* و *BamHI* هضم شد. واکنش هضم (۶۰ میکرولیتر) شامل؛ ۳۰ میکرولیتر پلاسمید pBI121 (۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۱۲ میکرولیتر بافر Tango Buffer 10X (Thermo Fisher)، ۱ میکرولیتر *BamHI* (۱۰ واحد واحد بر میکرولیتر، Thermo Fisher)، ۱ میکرولیتر *HindIII* (۱۰ واحد بر میکرولیتر، Thermo Fisher) و ۱۶ میکرولیتر آب دیونیزه بود. پس از هضم، محصول PCR و پلاسمید pBI121 روی ژل آگارز ۱٪ حاوی SYBR Green در بافر TAE به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شده و سپس با استفاده از روش مبتنی بر سیلیکا از ژل خالص‌سازی و توسط نانودراپ (Thermo Fisher) کمی‌سازی شدند.

برای ساخت وکتور بیانی که در آن پروموتور P5CS1 بیان ژن گزارشگر β -گلوکورونیداز (GUS) را هدایت می‌کند، پروموتور 35S در وکتور باینری pBI121 با پروموتور P5CS1 جایگزین شد. مخلوط واکنش لیگاسیون شامل ۵/۸ میکرولیتر محصول PCR با غلظت ۷/۳ نانوگرم بر میکرولیتر، ۲ میکرولیتر پلاسمید pBI121 با غلظت ۸۶ نانوگرم بر میکرولیتر، ۱ میکرولیتر T4 Ligase Buffer 10X، ۱ میکرولیتر T4 Ligase (۵) واحد بر میکرولیتر، Thermo Fisher)، ۰/۲ میکرولیتر ATP (۵۰ میلی مولار) بود. برای تأیید درج صحیح پروموتور P5CS1 در وکتور، colony PCR و هضم آنزیمی پلاسمید انجام شد. شرایط PCR مشابه تکثیر پروموتور P5CS1 بود. سازه pBI121-P5CS1Pro::GUS-NOS^t با آنزیم‌های *HindIII* و *BamHI* هضم شد. محصول PCR و پلاسمیدهای هضم شده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. قطعات ۷۵۶ جفت بازی مورد انتظار برای محصول PCR و هضم آنزیمی پلاسمید مشاهده شد.

سازه P5CS1Pro::GUS-NOS^t (شکل ۱) به *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 منتقل شده و سپس با استفاده از روش غوطه‌وری گل‌آذین به آرابیدوپسیس منتقل شد (Zhang, Henriques, Lin, Niu, & Chua, 2006). در این روش برای ترانسفورماسیون گیاه ابتدا غلاف‌ها و گل‌های باز شده حذف خواهند شد و گیاهان به صورت وارونه در سوسپانسیون آگروباکتریوم حاوی ساکارز با غلظت ۵ درصد و Silwet L-77 با غلظت ۰/۲ درصد قرار خواهند گرفت بطوریکه گل‌های باز نشده کاملاً در سوسپانسیون غوطه‌ور شوند. پس از ترانسفورماسیون بذرهای گیاهان تراریخته نسل T1 آرابیدوپسیس در محیط MS حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/لیتر جوانه‌دار شدند. گیاهان T2 برای درج تک‌نسخه‌ای T-DNA ارزیابی شدند. سپس لاین‌های هموزیگوس T3 حاوی یک نسخه از تراژن برای آنالیزهای بعدی استفاده شدند.



شکل ۱- ساختار pBI121-P5CS1Pro::GUS-NOS. پشته‌واره پلاسمید مقاومت به کانامایسین را کد می‌کند و ناحیه T-DNA مقاومت به هر دو کانامایسین و نتومایسین را کد می‌کند.

Fig 1. Structure of the pBI121-P5CS1Pro::GUS-NOS^t construct. The plasmid backbone encodes kanamycin resistance, and the T-DNA region confers resistance to both kanamycin and neomycin.

تیمارهای کم‌آبی و آبیاری مجدد: بذرهای آرابیدوپسیس (Col-0) و لاین تراریخته ضد عفونی شده و در محیط پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) جوانه‌دار شدند (Ramandi, Nourashrafeddin, Marashi, & Seifi, 2023). پس از ۱۵ روز از جوانه‌زنی، گیاهان از محیط خارج شده و به مدت ۴ ساعت در پلیت‌های پلاستیکی (سه گیاه در هر پلیت) بدون درپوش در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰٪ زیر نور کم با شدت $(0.6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1})$ در اتاقک رشد (Convicon TC16, Canada) تیمار شدند. برای آبیاری مجدد، ۱۵ میلی‌لیتر آب استریل به هر پلیت اضافه شده و گیاهان در اتاقک رشد تحت شرایط مشابه نگهداری شدند. نمونه‌های گیاهی شامل اندام هوایی و ریشه‌ها قبل از تیمار کم‌آبی (شاهد)، ۴ ساعت پس از اولین کم‌آبی (S1)، ۴ ساعت پس از اولین آبیاری مجدد (R1)، ۴ ساعت پس از دومین کم‌آبی (S2) و ۴ ساعت پس از دومین آبیاری مجدد (R2) جمع‌آوری شدند. این طرح آزمایشی بر اساس پروتکل‌های ثبت شده برای مطالعه حافظه تنش انجام شد.

آزمون هیستوشیمیایی GUS : رنگ آمیزی GUS بر اساس مطالعات گذشته انجام گردید (Jefferson, Kavanagh, & Bevan, 1987). نمونه‌های تیمار شده در بافر رنگ آمیزی هیستوشیمیایی GUS - ۰/۱ میلی مولار (pH 7/0) NaPO_4 ، ۱۰ میلی مولار (pH 8/0) EDTA-Na_2 ، ۰/۱٪ تریتون-X-100، ۱ میلی مولار $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ و ۲ میلی مولار X-Gluc - غوطه‌ور شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. پس از رنگ آمیزی، نمونه‌ها با اتانول ۷۵٪ رنگ‌بری شدند. فعالیت GUS بر اساس وجود رنگ آبی ارزیابی شد. آزمون‌های رنگ آمیزی GUS نمایانگر نتایج حاصل از یک لاین تراریخته مستقل می‌باشد.

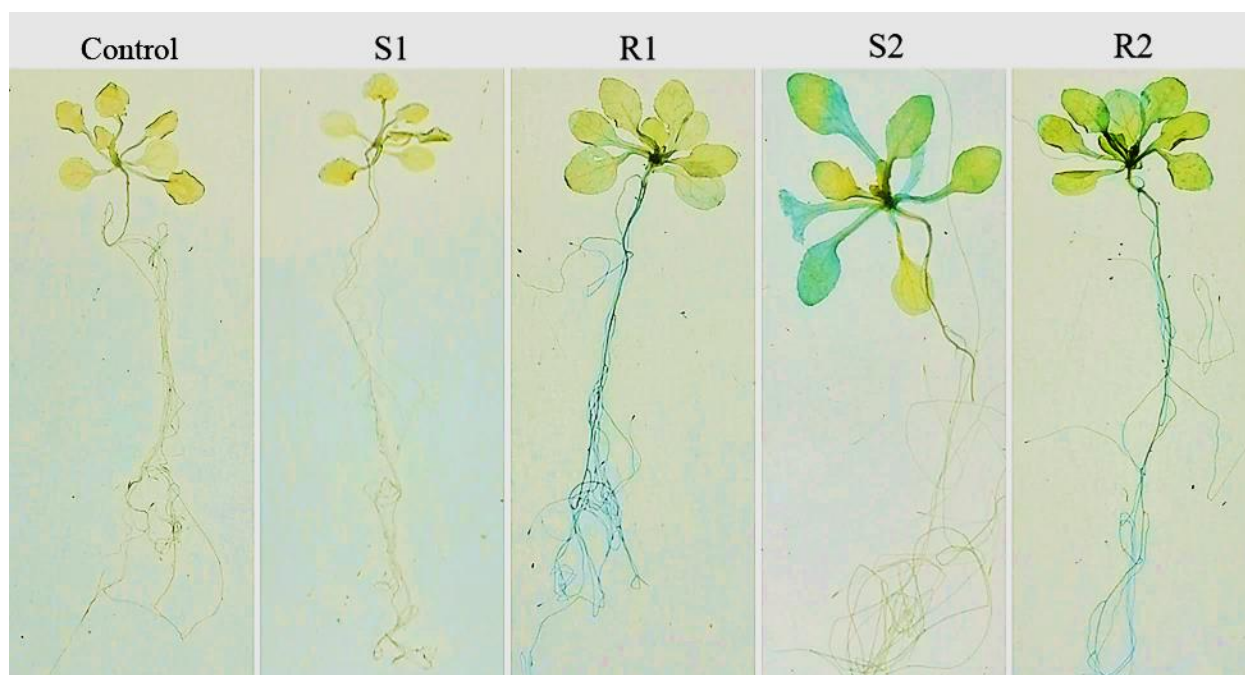
اندازه‌گیری میزان پرولین: نمونه‌های تازه برای اندازه‌گیری پرولین همان نمونه‌های مورد استفاده برای آنالیز تیمار کم آبی/آبیاری مجدد بودند. هر تیمار دو تکرار داشته و نمونه‌های هر پلیت به عنوان یک تکرار زیستی در نظر گرفته شده شده‌اند. میزان پرولین آزاد با استفاده از روش نین هیدرین در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین گردید (Bates, Waldren, Teare, & soil, 1973).

Results and Discussion

نتایج و بحث

فعالیت GUS در طی سیکل‌های تنش و بازیابی

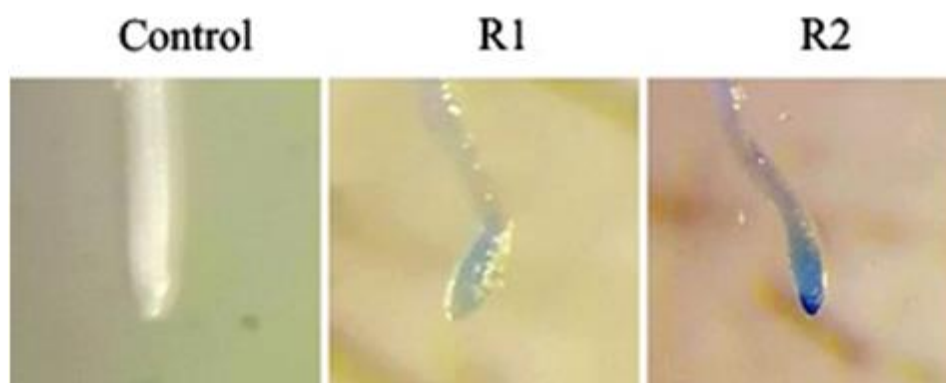
بررسی فعالیت GUS در پاسخ به تیمارهای تنش و بازیابی نشان داد که پس از دومین کم آبی (S2)، بیان GUS در برگ‌ها بیشتر از اولین کم آبی (S1) بود (شکل ۲).



شکل ۲- آزمون‌های هیستوشیمیایی GUS در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس دارای قطعه P5CS1Pro::GUS-NOST که الگوی بیان ژن گزارشگر GUS را نشان می‌دهد. گیاهان تحت تاثیر تیمار تنش ۴ ساعته و به دنبال آن تحت تاثیر تیمار دوره بهبودی ۴ ساعته قرار گرفتند. فعالیت GUS ۱۴ روز پس از جوانه‌زنی ارزیابی شد. افزایش تدریجی رنگ آمیزی GUS از S1 به S2 و از R1 به R2 قابل توجه است.

Fig 2. Histochemical GUS assays in transgenic Arabidopsis plants carrying the P5CS1Pro::GUS-NOST construct, showing the expression pattern of the GUS reporter gene. The plants were subjected to a 4-hour stress treatment followed by a 4-hour recovery period. GUS activity was evaluated 14 days after germination. A gradual increase in GUS staining from S1 to S2 and from R1 to R2 is noteworthy.

بیان ناچیزی از *GUS* در ریشه‌ها در طی تیمارهای کم‌آبی تشخیص داده شد. قابل توجه است که دومین آبیاری مجدد (R2) بالاترین سطح بیان *GUS* را در میان تمام تیمارها نشان داد و با تجمع قابل توجه ژن *GUS* در برگ‌ها و ریشه همراه بود (شکل ۲ و شکل ۳). اولین بیان قابل تشخیص *GUS* در طی R1 ظاهر شد، که نشان می‌دهد رونویسی ژن *P5CS1* در طی دوره ریکاوری بعد از تنش فعال می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت پروموتور *P5CS1* به تدریج در طی سیکل‌های مکرر تنش کم‌آبی و آبیاری مجدد تقویت می‌شود که با فنوتیپ حافظه رونویسی مطابقت دارد.



شکل ۳- آزمون‌های هیستوشیمیایی *GUS* در تیمارهای ریکاوری. با هر بار ریکاوری، بیان ژن *GUS* افزایش یافت به طوری که در R2، سطح بیان در ریشه بیشتر از R1 بود. مشاهدات ۱۴ روز پس از جوانه‌زنی ثبت شدند.

Fig 3. Histochemical *GUS* assays in recovery treatments. With each recovery step, *GUS* gene expression increased, such that in R2, the expression level in the roots was higher than in R1. Observations were recorded 14 days after germination.

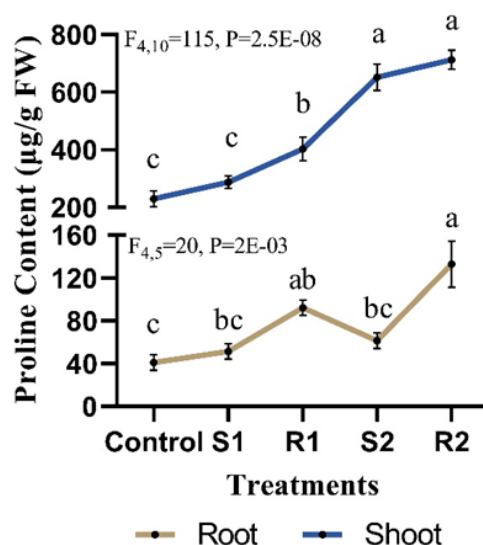
میزان تجمع پرولین طی سیکل‌های تنش و بازیابی

میزان پرولین در آرابیدوپسیس تراریخته دارای قطعه *P5CS1Pro::GUS-NOST* تحت تیمارهای مختلف کم‌آبی/آبیاری مجدد اندازه‌گیری شد (شکل ۴). سطوح پرولین در S2 نسبت به S1 و در R2 نسبت به R1 در ریشه و اندام هوایی به طور معنی‌داری بالاتر بود. در اندام هوایی تحت تاثیر تیمار کم‌آبی، میزان پرولین نسبت به شاهد به ترتیب ۲۵٪ (S1) و ۱۸۵٪ (S2) و تحت تاثیر تیمار ریکاوری نسبت به شاهد به ترتیب ۷۵٪ (R1) و ۲۱۰٪ (R2) افزایش یافت (شکل ۴). در ریشه‌ها تحت تاثیر تیمار کم‌آبی، میزان پرولین نسبت به شاهد به ترتیب ۲۴٪ (S1) و ۴۸٪ (S2) و تحت تاثیر تیمار ریکاوری نسبت به شاهد به ترتیب ۱۲۴٪ (R1) و ۲۲۱٪ (R2) افزایش یافت (شکل ۴). افزایش تدریجی میزان پرولین، به ویژه افزایش چشمگیر ۲۱۰-۲۲۱٪ پس از دومین آبیاری مجدد، با الگوی مشاهده شده بیان *GUS* ارتباط داشته و نشان می‌دهد که انباشت پرولین نیز تحت تاثیر اثرات حافظه تنش قرار دارد. آنالیز آماری تفاوت‌های معنی‌داری ($p \leq 0.05$) بین نمونه‌های شاهد و تیمار و همچنین بین S1 و S2 و همچنین R1 و R2 نشان داد (شکل ۴).

هدف ما در این مطالعه، بررسی الگوی حافظه تنش ژن *P5CS1* تحت تاثیر تیمارهای مکرر تنش کم‌آبی بود. در این پژوهش، داده‌هایی ارائه می‌کنیم که تأیید می‌کنند *P5CS1* یک ژن حافظه است. فرض منطقی ما این است که اگر بیان ژن در S2 نسبت به S1 و یا در R2 نسبت به R1 افزایش یابد، آن ژن به عنوان یک ژن حافظه با تنظیم افزایشی در نظر گرفته می‌شود.

تغییرات در میزان پرولین با این الگوی خاص احتمالاً به رفتار حافظه تنش *P5CS1* مرتبط است. ارتباط واضحی بین فعالیت *GUS* منعکس‌کننده فعالیت پروموتور *P5CS1* و سطوح پرولین مشاهده شد. همانطور که بیان *GUS* در R2 افزایش یافت (شکل ۳)، میزان پرولین نیز به طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۴). این ارتباط با نقش تثبیت شده *P5CS1* به عنوان آنزیم محدودکننده سرعت در بیوسنتز پرولین ناشی از تنش سازگار است (Yoshida et al., 1999). میزان افزایش پرولین (۱۸۵-۲۲۱٪) پس از سیکل دوم) به طور قابل توجهی بیشتر از پس

از سیکل اول (۷۵-۲۴) است، که نشان‌دهنده یک حالت آماده‌سازی یا «حافظه» است که پاسخ متابولیکی قوی‌تری را در مواجهه با تنش مکرر امکان‌پذیر می‌کند.



شکل ۴- میزان پرولین در طی تنش کم‌آبی. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت‌های آماری معنی‌دار است (آزمون Tukey HSD, $p \leq 0.05$). Error bar ها نشان‌دهنده انحراف معیار میانگین ($n=5$) هستند. Control؛ شاهد (بدون تنش)؛ S1؛ اولین تنش کم‌آبی (۴ ساعت)؛ R1؛ اولین آبیاری مجدد (۴ ساعت)؛ S2؛ دومین تنش کم‌آبی (۴ ساعت)؛ R2؛ دومین آبیاری مجدد (۴ ساعت).

Fig 4. Proline content during dehydration stress. Different letters indicate statistically significant differences (Tukey's HSD test, $p \leq 0.05$). Error bars represent the standard deviation of the mean ($n=5$). Control, no stress; S1, first dehydration stress (4 h); R1, first rehydration (4 h); S2, second dehydration stress (4 h); R2, second rehydration (4 h).

داده‌های ارائه‌شده نشان می‌دهند که *P5CS1* در اثر تنش کمبود آب القا می‌شود. چرخه‌های مکرر تنش تنش کم‌آبی و ریکاوری موجب القای بیان *GUS* شده که تحت کنترل پروموتور *P5CS1* قرار داشته‌اند. فرض بر این است که تیمارهای کم‌آبی بیان *P5CS1* را در S1 و S2 القا کرده‌اند. نخستین بیان معنی‌دار *GUS* در R1 مشاهده شد. رنگ آبی در رگبرگ‌های برگ و نوک ریشه‌ها نشان می‌دهد که *P5CS1* در این نواحی در حال بیان است. آزمون هیستوشیمیایی *GUS* assay در گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس *GUS-NOS::P5CS1Pro::GUS* افزایش بیان (upregulating expression) را در R2 نسبت به R1 نشان داده‌اند (شکل ۲ و ۳) و این نتایج نشان می‌دهد که *P5CS1* می‌تواند تحت تنش کمبود آب به‌عنوان یک ژن حافظه تنش عمل کند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که *P5CS1* در تنش مکرر کمبود آب و همچنین در تنش شوری دارای حافظه رونویسی است (Ding, Fromm, & Avramova, 2012; Feng et al., 2016). نتایج ما همچنین نشان داد که تحت تنش کمبود آب (Sharma et al., 2011)، *P5CS1* در نزدیک راس ریشه به‌طور بالایی بیان می‌شود، در حالی که برخی مطالعات بیان بالای این ژن را در بخش‌های هوایی آرابیدوپسیس تحت تنش شوری یا در شرایط پتانسیل پایین آب گزارش کرده‌اند (Feng et al., 2016). تغییرات در محتوای پرولین با این الگوی خاص احتمالاً با رفتار حافظه تنش ژن *P5CS1* مرتبط است. به نظر می‌رسد بین فعالیت *GUS* و سطح پرولین ارتباط وجود دارد؛ به‌طوری‌که با افزایش بیان *GUS* در R2 (شکل ۳)، مقدار پرولین نیز افزایش یافته است (شکل ۴).

از دیدگاه کشاورزی، درک مکانیسم‌های حافظه تنش پیامدهای عملی برای بهبود محصول دارد. گیاهانی که می‌توانند مواجهه‌های قبلی با تنش را به خاطر بسپارند و به طور مؤثرتری به تنش‌های بعدی پاسخ دهند، ممکن است برای محیط‌های نوسانی که مشخصه تغییرات اقلیمی است، مناسب‌تر باشند. در مجموع، یافته‌های ما نشان می‌دهد که *P5CS1* را می‌توان به عنوان یک ژن حافظه تنش آبی طبقه‌بندی کرد، زیرا سطح بیان آن و محصول متابولیکی آن (پرولین) هر دو در مواجهه‌های مکرر با تنش کم‌آبی تقویت می‌شوند. این مطالعه یک پیوند عملکردی بین

متابولیسم پرولین و حافظه رونویسی فراهم می‌کند و P5CS1 را به لیست رو به رشد ژن‌های حافظه تنش در آرابیدوپسیس اضافه می‌کند. مطالعات آینده باید بر مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک زیربنای این حافظه، بیان اختصاصی بافتی P5CS1 متمرکز شود.

References

منابع

- Anwar, A., Wang, K., Wang, J., Shi, L., Du, L., & Ye, X. J. P. c. r. (2021). Expression of Arabidopsis Ornithine Aminotransferase (AtOAT) encoded gene enhances multiple abiotic stress tolerances in wheat. *Plant Cell Reports*, 40(7), 1155-1170. <https://doi.org/10.1007/>
- Avramova, Z.(2015). Transcriptional 'memory' of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *The Plant Journal*, 83(1), 149-159. <https://doi.org/10.1111/tpj.12832>
- Bates, L. S., Waldren, R. a., Teare, I., & soil. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Chaudhry, S., & Sidhu, G. P. S. (2022). Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review. *Plant Cell Reports*, 41(1), 1-31. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02759-5>
- Ding, Y., Fromm, M., & Avramova, Z. J. N. c. (2012). Multiple exposures to drought'train'transcriptional responses in Arabidopsis. *Nature communications*, 3(1), 740. <https://doi.org/10.1038/ncomms1732>
- Ding, Y., Liu, N., Virlouvet, L., Riethoven, J.-J., Fromm, M., & Avramova, Z. (2013). Four distinct types of dehydration stress memory genes in Arabidopsis thaliana. *BMC plant biology*, 13, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-229>
- Eckardt, N. A., Cutler, S., Juenger, T. E., Marshall-Colon, A., Udvardi, M., & Verslues, P. E. J. T. P. C. (2023). Focus on climate change and plant abiotic stress biology. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac329>
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., & Siddique, K. (2012). Drought stress in plants: an overview. *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_1
- Feng, X. J., Li, J. R., Qi, S. L., Lin, Q. F., Jin, J. B., & Hua, X. J. (2016). Light affects salt stress-induced transcriptional memory of P5CS1 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, E8335-E8343. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610670114>
- Friedrich, T., Oberkofler, V., Trindade, I., Altmann, S., Brzezinka, K., Lämke, J., . . . Skirycz, A. (2021). Heteromeric HSFA2/HSFA3 complexes drive transcriptional memory after heat stress in Arabidopsis. *Nature communications*, 12(1), 3426. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23786-6>
- Funck, D., Baumgarten, L., Stift, M., Von Wirén, N., & Schönemann, L. (2020). Differential contribution of P5CS isoforms to stress tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 11, 565134. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.565134>
- Funck, D., Eckard, S., & Müller, G. (2010). Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in Arabidopsis. *BMC plant biology*, 10, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-70>
- Ilyas, M., Nisar, M., Khan, N., Hazrat, A., Khan, A. H., Hayat, K., . . . Ullah, A. (2021). Drought tolerance strategies in plants: a mechanistic approach. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 926-944. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10174-5>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. J. T. E. j. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. 6(13), 3901-3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>
- Kappel, C., Friedrich, T., Oberkofler, V., Jiang, L., Crawford, T., Lenhard, M., & Bäurle, I. (2023). Genomic and epigenomic determinants of heat stress-induced transcriptional memory in Arabidopsis. *Genome Biology*, 24(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02970-5>
- Koenigshofer, H., & Loeppert, H.-G. (2019). The up-regulation of proline synthesis in the meristematic tissues of wheat seedlings upon short-term exposure to osmotic stress. *Journal of plant physiology*, 237, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.03.010>
- Liu, N., Fromm, M., & Avramova, Z. (2014). H3K27me3 and H3K4me3 chromatin environment at super-induced dehydration stress memory genes of Arabidopsis thaliana. *Molecular plant*, 7(3), 502-513. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23786-6>
- Mattioli, R., Falasca, G., Sabatini, S., Altamura, M. M., Costantino, P., & Trovato, M. (2009). The proline biosynthetic genes P5CS1 and P5CS2 play overlapping roles in Arabidopsis flower transition but not in embryo development. *Physiologia Plantarum*, 137(1), 72-85. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01261.x>
- Ramandi, A., Nourashrafeddin, S. M., Marashi, S. H., & Seifi, A. (2023). Microbiome contributes to phenotypic

- plasticity in saffron crocus. *World Journal of Microbiology*, 39(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03450-x>
- Sharma, S., Villamor, J. G., & Verslues, P. E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant physiology*, 157(1), 292-304. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183210>
- Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2020). Drought stress responses and resistance in plants: From cellular responses to long-distance intercellular communication. *Frontiers in plant science*, 11, 556972. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556972>
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current opinion in biotechnology*, 17(2), 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.002>
- Virilouvet, L., Ding, Y., Fujii, H., Avramova, Z., & Fromm, M. (2014). ABA signaling is necessary but not sufficient for RD 29 B transcriptional memory during successive dehydration stresses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 79(1), 150-161. <https://doi.org/10.1111/tpj.12548>
- Yoshida, Y., Nanjo, T., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Stress-responsive and developmental regulation of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 261(3), 766-772. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1112>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., & Chua, N.-H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols*, 1(2), 641-646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>