مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 online الکترونیکی
دوره ۱٤، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱٤۰٤
صفحه ۲٥٦-۲٤۸

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2026
Volume 14, Number 2, Pages: 248-256

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61882/gebsj.14.2.10

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: *Corresponding Author, Email
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

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
URL: http://gebsj.ir/article-1-545-fa.html

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.10]

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 Pyrroline-5-carboxylate synthetase 1) در پاسخ به تنش‌های مکرر کم‌آبی در *آرابیدوپسیس تالیانا* (*Arabidopsis thaliana*) بررسی شد. لاین تراریخته حامل ژن گزارشگر *GUS* تحت کنترل پروموتر P5CS1 در معرض دو سیکل تنش کم‌آبی (٤ ساعت) و آبیاری مجدد (٤ 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

Introduction

مقدمه

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، ژن هایی که در اثر تنش القاء می شوند، در مواجه 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.10]

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 مریستمی نوک ریشه و برگ ضروری است (Koenigshofer & Loeppert, 2019). آنزیم کلیدی P5CS1 در بیوسنتز پرولین در گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا (Arabidopsis thaliana)* نقش دارد (Yoshiba, Nanjo, Miura, Yamaguchi-Shinozaki, & Shinozaki, 1999). *P5CS1* که ژن کدکننده آنزیم دلتا-پیرولین-۵-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 آرابیدوپسیس، آنزیم‌های P5CS1 و P5CS2 با استفاده از گلوتامات، NADPH وATP ، گاما-سمی‌آلدئید پیرولین (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, & Schönemann, 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 *آرابیدوپسیس* 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 پروموتر ژن *P5CS1* به ژن‌کد کننده 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.

مواد و روش‌ها
Materials and Methods

ایجاد لاین‌های تراریخته: توالی پروموتر در فاصله ۸۵۸- تا ۱۲۲- جفت باز در بالادست کدون شروع ژن P5CS1 (AT2G39800) از DNA ژنومی *آرابیدوپسیس تالیانا*(Col-0) با استفاده از پرایمرهای 5'-GCATAAGCTTgtatgatacacatctaggc و 5'-GCATGGATCCgatcaccaaggaagatatg تکثیر شد. این پرایمرها حاوی جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های *Hind*III و *BamH*I 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 ٤ دقیقه (دناتوراسیون اولیه)؛ ۵ سیکل ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون)، ٦۰-٦۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (کاهش ۱ درجه سانتی‌گراد در هر سیکل)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (گسترش)؛ سپس ۳۰ سیکل ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٦۰ 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.

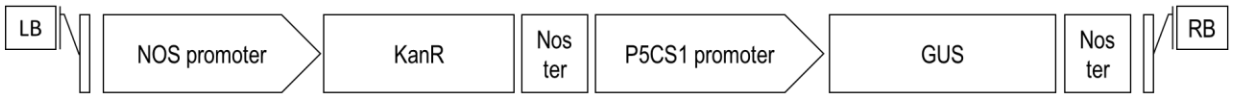
قطعات تکثیر شده با آنزیم‌های *Hind*III و *BamH*I هضم شدند. واکنش هضم (۵۰ میکرولیتر) شامل: ۳۰ میکرولیتر محصولPCR، ۱۰ میکرولیتر بافر هضم Tango Buffer 10X(Thermo Fisher)، ۱ میکرولیتر *BamH*I (۱۰ واحد بر میکرولیتر، Thermo Fisher)، ۱ میکرولیتر

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.10]

*Hind*III (۱۰ واحد بر میکرولیتر، Thermo Fisher) و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه بود. وکتور pBI121 با آنزیم‌های *Hind*III و *BamH*I 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 *BamH*I (۱۰ واحدواحد بر میکرولیتر، Thermo Fisher)، ۱ میکرولیتر *Hind*III (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) کمّی‌سازی شدند.

برای ساخت وکتور بیانی که در آن پروموتر P5CS1 بیان ژن گزارشگرβ-گلوکورونیداز (GUS) را هدایت می‌کند، پروموتر 35S در وکتور باینری pBI121 با پروموتر 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 T_4 Ligase Buffer10X، ۱ میکرولیتر T4 Ligase(۵ واحد بر میکرولیتر، Thermo Fisher) ، و۰/۲ میکرولیتر ATP (۵۰ میلی مولار) بود. برای تأیید درج صحیح پروموتر P5CS1 در وکتور، colony PCR و هضم آنزیمی پلاسمید انجام شد. شرایط PCR مشابه تکثیر پروموتر P5CS1 بود. سازه pBI121-P5CS1Pro::GUS-NOSt با آنزیم‌های *Hind*III و *BamH*I 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*-NOSt (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 بازشده 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 بازنشده کاملا 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. پشتوانه پلاسمید مقاومت به کانامایسین را کد می‌کند و ناحیه T-DNA مقاومت به هر دو کانامایسین و نئومایسین را کد می‌کند.

Fig 1. Structure of the pBI121-P5CS1Pro::*GUS*-NOSt 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 ضدعفونی 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 ٤ ساعت در پلیت‌های پلاستیکی (سه گیاه در هر پلیت) بدون درپوش در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ٪٤۰ زیر نور کم با شدت (0.6 $mmol m^{-2} s^{-1}$) در اتاقک رشد (Conviron 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)، ٤ ساعت پس از اولین کم‌آبی(S1) ، ٤ ساعت پس از اولین آبیاری مجدد(R1) ، ٤ ساعت پس از دومین کم‌آبی (S2)و ٤ ساعت پس از دومین آبیاری مجدد (R2) جمع‌آوری شدند. این طرح آزمایشی بر اساس پروتکل‌های ثبت‌شده برای مطالعه حافظه تنش انجام شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.10]

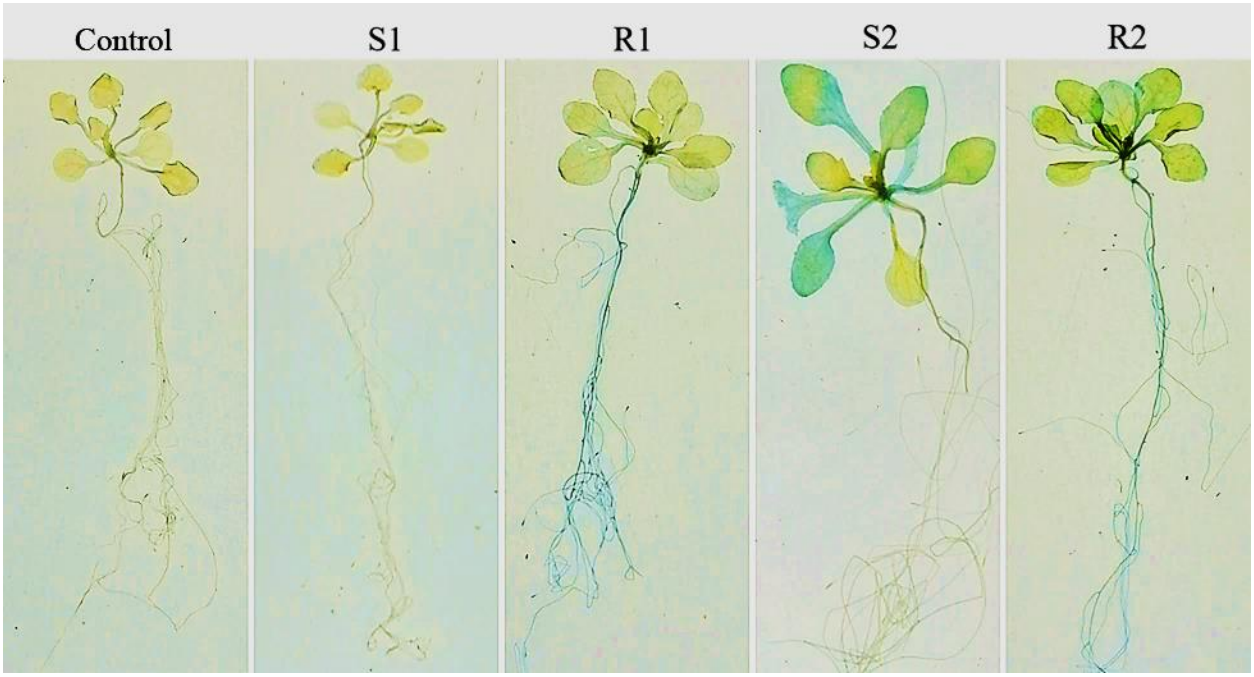
آزمون هیستوشیمیاییGUS : رنگ‌آمیزی GUS بر اساس مطالعات گذشته انجام گردید (Jefferson, Kavanagh, & Bevan, 1987). نمونه‌های تیمار شده در بافر رنگ‌آمیزی هیستوشیمیاییGUS – ۰/۱ میلی‌مولار($NaPO_4$ (pH 7/0 ، ۱۰ میلی‌مولار($EDTA\text{-}Na_2$ (pH 8/0 ، ۰/۱٪ تریتون-X 100، ۱ میلی‌مولار $K_3Fe(CN)_6$ و ۲ میلی‌مولار X-Gluc – غوطه‌ور شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. پس از رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها با اتانول ۷۵٪ رنگ‌بری شدند. فعالیت GUS بر اساس وجود رنگ آبی ارزیابی شد. آزمون‌های رنگ‌آمیزی 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 کم‌آبی/آبیاری مجدد بودند. هر تیمار دو تکرار داشته و نمونه‌های هر پلیت به عنوان یک تکرار زیستی در نظر گرفته‌شده شده‌اند. میزان پرولین آزاد با استفاده از روش نین هیدرین در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین گردید (Bates, Waldren, Teare, & soil, 1973).

نتایج و بحث Results and Discussion

فعالیت *GUS* در طی سیکل‌های تنش و بازیابی

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

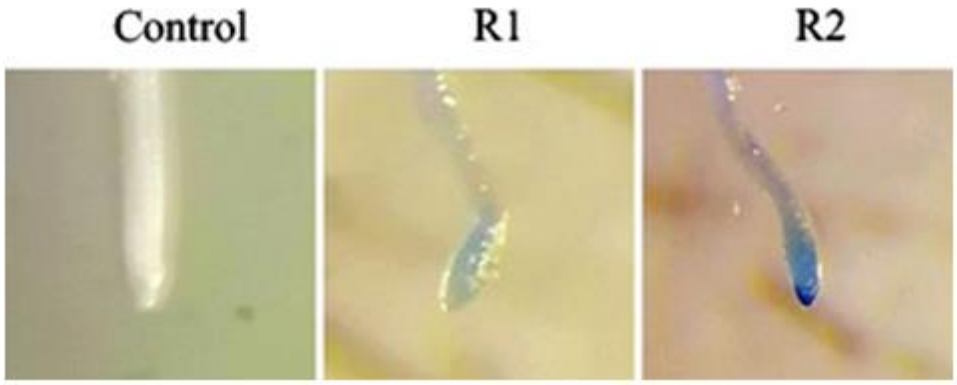


شکل ۲- آزمون‌های هیستوشیمیایی GUS در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس دارای قطعه P5CS1Pro::*GUS*-NOSt که الگوی بیان ژن گزارشگر *GUS* را نشان می‌دهد. گیاهان تحت تاثیر تیمار تنش ٤ ساعته و به دنبال آن تحت تاثیر تیمار دوره بهبودی ٤ ساعته قرار گرفتند. فعالیت *GUS* ١٤ روز پس از جوانه‌زنی ارزیابی شد. افزایش تدریجی رنگ‌آمیزی 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.10]

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 پروموتر 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 ۱٤ 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

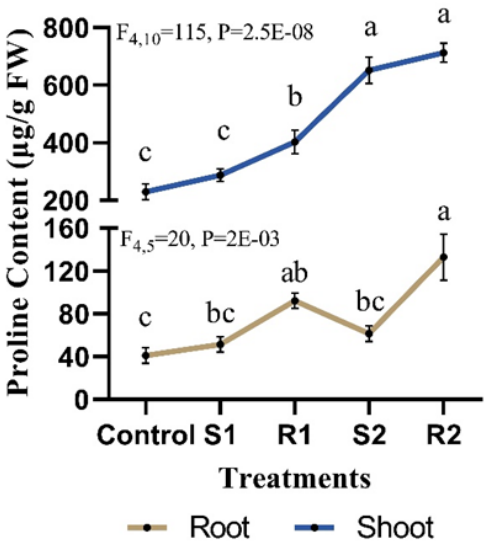
میزان پرولین در آرابیدوپسیس تراریخته دارای قطعه P5CS1Pro::*GUS*-NOSt تحت تیمارهای مختلف کم‌آبی/آبیاری مجدد اندازه‌گیری شد (شکل ٤). سطوح پرولین در S2 نسبت به S1 و در R2 نسبت به R1 در ریشه و اندام هوایی به طور معنی‌داری بالاتر بود. در اندام هوایی تحت تاثیر تیمار کم‌آبی، میزان پرولین نسبت به شاهد به ترتیب ٪۲۵ (S1) و ٪۱۸۵ (S2) و تحت تاثیر تیمار ریکاوری نسبت به شاهد به ترتیب ٪۷۵ (R1) و ٪۲۱۰ (R2) افزایش یافت (شکل ٤). در ریشه‌ها تحت تاثیر تیمار کم‌آبی، میزان پرولین نسبت به شاهد به ترتیب ٪۲٤ (S1) و ٪٤۸ (S2) و تحت تاثیر تیمار ریکاوری نسبت به شاهد به ترتیب ٪۱۲٤ (R1) و ٪۲۲۱ (R2) افزایش یافت (شکل ٤). افزایش تدریجی میزان پرولین، به ویژه افزایش چشمگیر ٪۲۲۱–۲۱۰ پس از دومین آبیاری مجدد، با الگوی مشاهده شده بیان *GUS* ارتباط داشته و نشان می‌دهد که انباشت پرولین نیز تحت تأثیر 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 ٤).

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 به‌عنوان 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 پروموتر 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 ٤). این ارتباط با نقش تثبیت شده *P5CS1* به عنوان آنزیم محدودکننده سرعت در بیوسنتز پرولین ناشی از تنش سازگار است (Yoshiba et al., 1999) . میزان افزایش پرولین (٪۲۲۱–۱۸۵ پس از سیکل دوم) به طور قابل توجهی بیشتر از پس

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.10]

از سیکل اول (۷۵٪-۲٤) است، که نشان‌دهنده یک حالت آماده‌سازی یا «حافظه» است که پاسخ متابولیکی قوی‌تری را در مواجهه با تنش مکرر امکان‌پذیر می‌کند.



شکل ٤- میزان پرولین در طی تنش کم‌آبی. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت‌های آماری معنی‌دار است (آزمونTukey HSD، $p \leq 0.05$) . Error barها نشان‌دهنده انحراف معیار میانگین (n=5) هستند. Control؛ شاهد (بدون تنش)؛S1 ؛ اولین تنش کم‌آبی (٤ ساعت)،R1 ؛ اولین آبیاری مجدد (٤ ساعت)،S2 ؛ دومین تنش کم‌آبی (٤ ساعت)، R2 ؛ دومین آبیاری مجدد (٤ 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 پروموتر 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 P5CS1Pro::GUS-NOSt 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 ٤).

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 تنش‌آبی 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.10]

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.

منابع

References

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.10]

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

Virlouvet, 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 A rabidopsis thaliana. *The Plant Journal, 79*(1), 150-161. https://doi.org/10.1111/tpj.12548

Yoshiba, Y., Nanjo, T., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Stress-responsive and developmental regulation of Δ1-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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.10]