

**ORIGINAL ARTICLE**

# The Effect of Thermopriming on Transcriptional Response of Heat Stress Memory in Rapeseed

Navid Taherifar<sup>1</sup>, Hengameh Taheri<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

**Correspondence**

Hengameh Taheri

Email: [taheri@asnrukh.ac.ir](mailto:taheri@asnrukh.ac.ir)

## ABSTRACT

Heat stress has detrimental effects on the growth and performance of plants through biochemical, physiological, morphological, and molecular changes. Plants have developed complex mechanisms to balance growth and tolerance to stress, allowing them to effectively defend against more severe stresses by remembering mild stress and forming heat stress memory, known as thermopriming. To investigate the role of thermopriming in inducing the transcription response of *HSFA2*, *HSFA1b* and *MIPS2* genes, the changes in the transcriptional level of the genes were studied at different times after priming and return stress in canola seedlings using the qRT-PCR technique. The results showed that the expression of these genes was not stable during the recovery period after the initial mild stress (memory phase), while their transcription level immediately after facing the second severe stress was induced at a much higher level in primed plants (P+T treatment) compared to non-primed plants (T treatment) which continued until 48 hours after return stress. Also, morphological analysis of seedlings at 7 and 14 days after release from the second stress showed that thermopriming increase the growth indices and heat tolerance in these plants through strengthening the expression of stress memory genes. Since the *HSFA1b*, *HSFA2* and *MIPS2* genes have maintained their expression level until days after the return stress, these genes can be the key components of the transcriptional memory of heat stress and be used in breeding programs and the development of heat tolerant varieties.

## KEYWORDS

Acquired heat tolerance, Thermopriming, Recurring stress, Heat stress memory genes, Rapeseed.

**How to cite**

Taherifar, N., & Taheri, H. (2024). The Effect of Thermopriming on Transcriptional Response of Heat Stress Memory in Rapeseed. *Crop Biotechnology*, 13(45), 1-14.

نشریه علمی

## زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

# اثر پرایمینگ دمایی در پاسخ به رونویسی ژن‌های حافظه‌ای تنش گرما در گیاهچه‌های کلزا

نوید طاهری فر<sup>۱</sup>، هنگامه طاهری<sup>۱\*</sup>

### چکیده

تنش گرمایی از طریق تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و مولکولی اثرات مضر بر رشد و عملکرد گیاهان دارد. گیاهان مکانیسم‌های پیچیده‌ای را برای متعادل کردن رشد و تحمل به تنش ایجاد کرده‌اند که به آن‌ها این امکان را می‌دهد که با به خاطر سپردن تنش‌های ملایم و شکل‌گیری حافظه‌ی تنش گرمایی که تحت عنوان پرایمینگ دمایی نامیده می‌شود، دفاع مؤثرتری در برابر تنش‌های شدیدتر داشته باشند. جهت بررسی نقش پرایمینگ دمایی در القاء پاسخ رونویسی ژن‌های *HSFA1b*، *HSFA2* و *MIPS2*، تغییرات در سطح رونویسی این ژن‌ها در ساعات زمانی مختلف پس از پرایمینگ و تنش برگشتی در گیاهچه‌های کلزا با استفاده از تکنیک qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان این ژن‌ها در طول دوره‌ی بازیابی پس از فراغت از تنش ملایم اول (فاز حافظه) پایدار نیست، حال آن‌که سطح رونویسی آن‌ها بلافاصله پس از مواجهه با تنش شدید دوم در سطح بسیار بالاتری در گیاهان پرایم‌شده (تیمار P+T) نسبت به گیاهان پرایم‌نشده (تیمار T) القاء شد که تا ۴۸ ساعت بعد از تنش برگشتی نیز ادامه داشت. همچنین بررسی نتایج مورفولوژیکی گیاهچه‌ها ۷ و ۱۴ روز پس از فراغت از تنش دوم نشان داد که پرایمینگ دمایی می‌تواند از طریق تقویت بیان ژن‌های حافظه‌ی تنش باعث افزایش شاخص‌های رشدی و القاء تحمل گرمایی در این گیاهان شود. از آن‌جا که ژن‌های *HSFA1b*، *HSFA2* و *MIPS2* سطح بیان خود را تا روزها پس از تنش برگشتی حفظ کرده‌اند، لذا می‌توان این ژن‌ها را به عنوان جزء کلیدی حافظه‌ی رونویسی تنش گرمایی در نظر گرفت و از آن در برنامه‌های به‌نژادی و توسعه‌ی وارسته‌های متحمل به گرما استفاده کرد.

### واژه‌های کلیدی

پرایمینگ دمایی، تحمل گرمایی اکتسابی، تنش برگشتی، ژن‌های حافظه‌ای تنش گرمایی، کلزا.

<sup>۱</sup>گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران..

نویسنده مسئول:

هنگامه طاهری

ایمانامه: taheri@asnrukh.ac.ir

استناد به این مقاله:

طاهری فر، نوید و طاهری، هنگامه (۱۴۰۳). اثر پرایمینگ دمایی در پاسخ رونویسی ژن‌های حافظه‌ای تنش گرما در گیاهچه‌های کلزا. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی،

۱۳(۴۵)، ۱-۱۴.

## مقدمه

گیاهان به صورت مداوم با تغییر در شرایط زیستی و غیرزیستی روبرو هستند. این تغییرات اغلب تنش‌هایی را ایجاد می‌کنند که گاه‌تکرار شونده بوده و ممکن است با گذر زمان به شدت افزایش یابند (Hilker *et al.*, 2016; Balazadeh, 2022). یکی از این تنش‌ها، افزایش دما در سطحی بالاتر از محدوده بهینه است که معمولاً به دلیل اثرات آسیب‌رسان به سلول، مانند تغییر عملکرد آنزیم‌ها، تجمع پروتئین‌های تاخورد نادرست و/یا تولید گونه‌های اکسیژن فعال، رشد و نمو گیاهان را مختل می‌کند. از سوی دیگر تنش گرما به یکپارچگی ساختاری دستگاه فتوسنتزی آسیب می‌رساند و در نتیجه تثبیت دی‌اکسید کربن را محدود می‌کند (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2020; Moore *et al.*, 2021). مطالعات نشان داده است که به دنبال افزایش انتشار گازهای گلخانه‌ای و ادامه سیر صعودی گرمایش جهانی، تغییرات طولانی مدت دما بر بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاه اثر خواهد گذاشت و تهدیدی جدی در امنیت غذایی و تامین سوخت بر جای می‌گذارد (Moore *et al.*, 2021). گزارش جدید<sup>۱</sup> IPCC نشان می‌دهد که افزایش گرمایش جهانی به بیش از ۱/۵ درجه سانتی‌گراد بالاتر از سطح قبل از انقلاب صنعتی، تأثیرات گسترده‌ای بر بازده محصولات کشاورزی خواهد داشت (Masson-Delmotte *et al.*, 2022). از این رو، تنش دمایی به عنوان یک چالش مهم در در زمینه محیط زیست و کشاورزی مطرح می‌باشد و نیاز به راهکارهای کاهش این تأثیرات در جهت افزایش بهره‌وری تولیدات کشاورزی ضروری است.

گیاهان به منظور مقابله با تنش گرما از دو استراتژی تحمل ذاتی<sup>۲</sup> و اکتسابی<sup>۳</sup> بهره‌مند می‌شوند. برخلاف تحمل ذاتی که در آن گیاه ظرفیت طبیعی برای مقابله با تنش گرما دارد، در تحمل اکتسابی که تحت عناوین خوگیری یا پرایمینگ دمایی<sup>۴</sup> نیز نامیده می‌شود گیاهان قادر خواهند بود پس از اینکه طی دوره کوتاهی تحت تنش ملایم گرما قرار گرفتند (پرایمینگ)، تحمل بالایی به سطوح کشنده گرما در تنش‌های بعدی نشان دهند (Yeh *et al.*, 2012). ارتقاء قابلیت گیاهان زراعی برای آماده شدن (پرایمینگ) در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌تواند تحمل به تنش را افزایش داده و در صورت تغییر شرایط آب و هوایی، عملکرد

محصول را تضمین نماید (Bita & Gerats, 2013). در سطح مولکولی، آماده شدن در برابر تنش گرما (پرایمینگ دمایی) با دو نوع حافظه رونویسی همراه است: (۱) بیان پایدار ژن‌های القاء شده تحت تنش گرما که بیش از چند روز پس از تنش گرمایی اولیه ادامه می‌یابد و (۲) افزایش مجدد بیان ژن‌ها پس از تنش گرمای برگشتی<sup>۵</sup> (Lämke *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). هر چند که مشخص شده است که حافظه رونویسی با برخی از تغییرات هیستونی به ویژه دی-آتری متیلاسیون لیزین<sup>۶</sup> ۴ هیستون H3 همراه است (Jaskiewicz *et al.*, 2011)، با این حال اساس مولکولی حافظه رونویسی از بسیاری جوانب نا شناخته باقی مانده است. در آرآبیدوپسیس، چندین فاکتور موثر در حافظه رونویسی تنش گرمایی (نوع ۱ و ۲) شناسایی و تعیین خصوصیت شده‌اند. از جمله این فاکتورها، پروتئین FGT1 (FORGETTER1) می‌باشد که نقش حیاتی در حافظه رونویسی نوع یک ایفا می‌کند. FGT1 با پروتئین‌های بازسازی کروماتین کلاس SWI/SNF و ISWI در هسته برهم‌کنش دارد و در تمام طول دوره حافظه، فشردگی نوکلئوزوم را کاهش و رونویسی را فعال نگه می‌دارد (Brzezinka *et al.*, 2016). همچنین دو فاکتور رونویسی شوک حرارتی<sup>۷</sup> (HSF)، HSF2 و HSF3 برای القاء پایدار بیان حافظه رونویسی پس از تنش گرما (نوع یک) ضروری هستند (Friedrich *et al.*, 2021). پروتئین‌های HSF به تکرارهای گسترده‌ای از توالی nGAAn که عناصر شوک حرارتی (HSEs) نامیده می‌شوند، متصل می‌شوند (Nover *et al.*, 2001; Anckar & Sistonen, 2011). حافظه تنش گرما نیازمند فاکتور شوک گرمایی HSF2 می‌باشد (Charng *et al.*, 2007) که یکی از ۲۱ نوع فاکتور شوک حرارتی است که در آرآبیدوپسیس عملکرد اختصاصی در حافظه تنش گرما دارد (Ohama *et al.*, 2017). HSF2 مستقیماً توسط HSF1 القاء می‌شود. سه تا از ایزوفرم‌های HSF1 یعنی A1A، A1B و A1D به عنوان تنظیم‌کنندگان اصلی پاسخ فوری به تنش گرما مطرح هستند (Yoshida *et al.*, 2011; Yeh *et al.*, 2012). این فاکتورها به طور پیوسته بیان می‌شوند و به واسطه اتصال به پروتئین‌های شوک حرارتی<sup>۸</sup> (که تحت عنوان چپرون<sup>۸</sup> نامیده می‌شوند) به حالت غیرفعال نگه داشته می‌شوند. به محض بروز تنش گرمایی،

5Recurring stress

6Heat shock transcription factor

7Heat shock proteins (HSPs)

8Chaperone

1Intergovernmental Panel on Climate Change

2Basal heat tolerance

3Acquired heat tolerance

4Thermopriming

به دست آوردن تحمل حرارتی آماده می‌کند و امکان بقای گیاه در شرایط شدیدتر تنش گرمایی را تسهیل می‌کند. تحمل گرمایی اکتسابی به طور فعال در طی چند روز حفظ می‌شود (حافظه تنش) و با القای پایدار ژن‌های مرتبط با حافظه تنش همراه است (Friedrich *et al.*, 2021). با این حال، همه ژن‌های القاکننده تنش گرمایی حافظه رونویسی را نشان نمی‌دهند و تمایز بین ژن‌های حافظه‌ای و غیرحافظه‌ای نامشخص است. در مطالعه قبلی ژن‌های کلیدی موثر در استقرار و پایداری حافظه تنش گرما در گیاهچه‌های آراییدوپسیس با استفاده از روش‌های *In silico* مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات جامعی در خصوص برهم‌کنش ژن‌های موثر در حافظه رونویسی (نوع یک و دو) و مکانیسم‌های تنظیمی بیان آن‌ها بدست آمد (Alkian *et al.*, 2023). در مطالعه دیگری جهت ارزیابی اینکه آیا ژن‌هایی با حافظه رونویسی القا شده در اثر تنش گرما، وابسته به عملکرد HSFA2 هستند یا خیر، ترانسکریپتوم گیاهان پرایم شده و پرایم نشده در اکوتیپ‌های فرم وحشی و موتانت *hsfa2* مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در اکوتیپ موتانت *hsfa2* الگوی بیان ژن‌های حافظه‌ای مشاهده نشد که نشان‌دهنده نقش مثبت این فاکتور در القاء بیان ژن‌های حافظه تنش گرما می‌باشد. جهت تأیید نتایج ریزآرایه، بیان تعدادی از ژن‌های حافظه رونویسی در دو اکوتیپ وحشی و موتانت *hsfa2* با استفاده از qRT-PCR نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در اکوتیپ وحشی، الگوی بیانی این ژن‌ها در گیاهان پرایم شده نسبت به گیاهان پرایم نشده افزایش یافته بود، حال آنکه در اکوتیپ موتانت *hsfa2* این افزایش بیان مشاهده نشد. از سوی دیگر جهت مطالعه نقش ایزوفرم‌های HSFA1 در القاء بیان ژن‌های حافظه‌ای، الگوی بیان این ژن‌ها در اکوتیپ‌های موتانت سه گانه *hsfa1a*، *hsfa1b* و *hsfa1d* و اکوتیپ وحشی در گیاهان پرایم شده نسبت به گیاهان پرایم نشده مورد بررسی قرار گرفت. این یافته‌ها نشان داد که در اکوتیپ موتانت، حافظه رونویسی در ارتباط با ژن‌های مورد آزمایش نظیر *APX2*، *MIPS2* و *HSFA1E* مشاهده نشد. از سوی دیگر در این آزمایش مشخص شد که بیش بیان *HSFA2* به تنهایی قادر نخواهد بود سبب بروز پاسخ‌های حافظه‌ای در موتانت‌های *hsfa1* شود و بدین ترتیب می‌توان استنباط کرد که گرچه *HSFA2* به عنوان جزء ضروری حافظه رونویسی ژن‌های القا شده تحت تنش مطرح است اما به تنهایی کافی نیست و این فاکتور تنظیمی به همراه ایزوفرم‌های *HSFA1* در حافظه رونویسی بسیاری از جایگاه‌های ژنی موثر است. از این رو یک فرضیه این است که ایزوفرم‌های *HSFA1* جهت عملکردشان نیاز دارند که بصورت هترومیک با *HSFA2* تشکیل کمپلکس دهند. فرضیه دیگر این

چپرون‌ها به پروتئین‌های دیگر متصل می‌شوند و در نتیجه ایزوفرم‌های *HSFA1* فعال می‌شوند و رونویسی ژن‌های چپرون را تا زمانی که دوباره توسط آن‌ها غیرفعال شوند، القاء می‌کنند (مدل تیتراسیون چپرون) (Kappel *et al.*, 2023). به طور خلاصه مدل ارائه شده برای حافظه رونویسی به این صورت است که *HSFA2* با استفاده از متیلاسیون H3K4، فعالیت رونویسی ژن‌های خاص را برای چند روز پس از پایان یک تنش گرمایی کوتاه مدت حفظ می‌کند (حافظه رونویسی نوع یک). پس از کاهش رونویسی، نوع دوم حافظه رونویسی در زیر مجموعه‌ای از ژن‌ها فعال باقی می‌ماند و باعث افزایش القای مجدد رونویسی به محض رویارویی با تنش برگشتی شدید بعدی می‌شود که معمولاً تا چند روز بعد از پرایمینگ هم ادامه می‌یابد (Liu *et al.*, 2018). *HSFA2* برای هر دو نوع حافظه رونویسی بعد از تنش گرمایی مورد نیاز است (Lämke *et al.*, 2016)، با این حال اساس چگونگی ارتقای حافظه تنش گرمایی توسط *HSFA2* هنوز به خوبی شناخته نشده است.

از آنجا که قرار گرفتن در معرض تنش‌های گذرا و ملایم گرما به گیاهان کمک می‌کند تا حافظه دمایی را برای تحمل به تنش‌های بعدی به دست آورند، از این رو در سال‌های اخیر تحقیقات در خصوص جنبه‌های مولکولی پرایمینگ دمایی در گیاه آراییدوپسیس توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده است (Ling *et al.*, 2018; Friedrich *et al.*, 2021; Kappel *et al.*, 2023) و مکانیسم‌های سلولی متنوعی در زمینه افزایش حافظه تنش شناسایی شده است (Balazadeh, 2022)، با این حال مکانیسم‌های مولکولی پرایمینگ دمایی و حافظه تنش گرمایی در بسیاری از گیاهان از جمله کلزا ناشناخته باقی مانده است. با توجه به اهمیت کشت گیاه کلزا به عنوان یک محصول استراتژیک کشاورزی و مورد استفاده در صنایع تولید روغن خوراکی و خوراک دام و با توجه به روند رو به رشد دمای جهانی، آشنایی با نحوه اثر ژن‌های حافظه تنش گرما و ایجاد مقاومت گرمایی در گیاه کلزار از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا در تحقیق اخیر اثر پرایمینگ دمایی بر میزان رونویسی برخی ژن‌های حافظه تنش نظیر *HSFA2*، *HSFA1b* و *MIPS2* در فواصل زمانی مشخصی پس از تنش دوم با استفاده از تکنیک qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

### پیشینه پژوهش

سازگاری به تغییرات محیطی یک عنصر کلیدی استراتژی‌های بقای گیاهان می‌باشد به این ترتیب که تنش ملایم گرما، گیاه را برای

یک دوم خاک مزرعه استریل و یک دوم پیت ماس در ۳ تکرار بیولوژیکی انتقال داده شدند. سینی‌های کشت و گلدان‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی، دمای  $25 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد در روز و در شب در دمای  $18 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰٪ گلخانه قرار داده شدند و آبیاری گلدان‌ها بصورت روزانه انجام شد. در نهایت گیاهچه‌هایی با ۴-۵ برگ حقیقی و با اندازه‌های یکنواخت جهت اعمال تیمار انتخاب شدند.

اعمال تیمارها مطابق با دیاگرام شکل ۱ به ترتیب زیر انجام شد: در تیمار اول، گیاهچه‌ها به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (پرایمینگ دمایی) و پس از گذشت چهار روز در وضعیت بازایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (فاز حافظه)، تنش گرمایی ۴۴ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ دقیقه اعمال شد (تیمار گیاهان پرایم شده + تنش گرمایی P+T). در تیمار دوم گیاهچه‌های چهار برگی بدون آن که تحت پرایمینگ دمایی قرار بگیرند تحت تنش گرمایی ۴۴ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند (تیمار تنش گرمایی T). در تیمار سوم گیاهچه‌ها فقط تحت پرایمینگ دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت قرار گرفتند (تیمار گیاهان پرایم شده P) و در تیمار شاهد نیز گیاهچه‌ها در تمام طول دوره آزمایش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد کردند (تیمار شاهد C). در تمامی تیمارها نمونه‌برداری ۱، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از بازگشت گیاهچه‌ها به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد از برگ‌های کاملاً رشد یافته صورت گرفت. بلافاصله پس از نمونه‌گیری، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی قرار گرفته و پس از قرار گرفتن در ایزت مایع در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

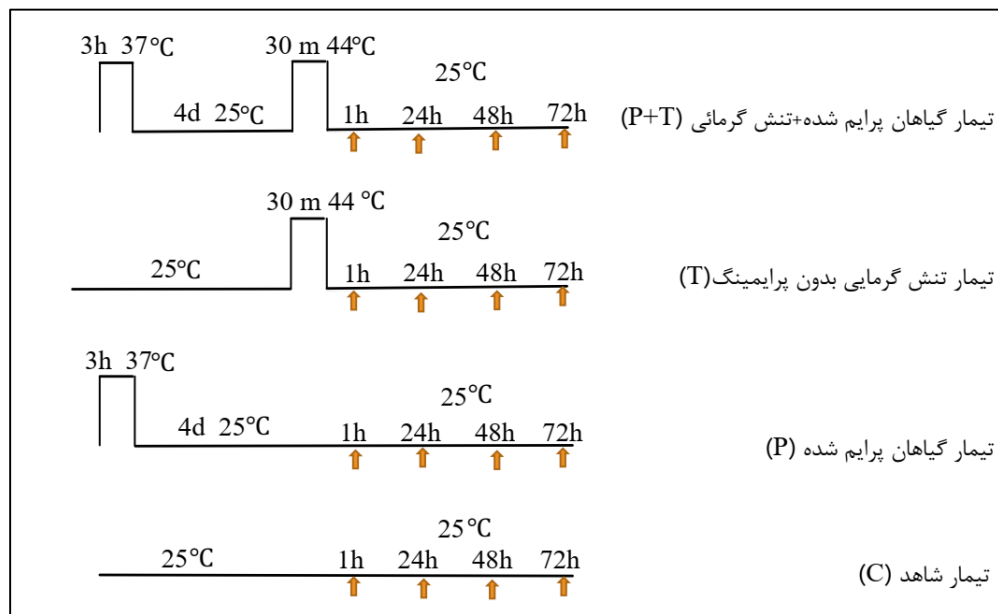
استخراج RNA کل با روش تریزول (شرکت سیناکلون) طبق پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت. برای بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ مدل (Thermo scientific, NanoDrop, 2000C, USA) استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis (شرکت سیناکلون) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *HSFA1b*، *HSFA2* و *MIPS2* بر اساس توالی‌های EST و توالی‌های رمزکننده پروتئین (CDS) ثبت شده در پایگاه اینترنتی NCBI با استفاده از برنامه Primer Quest موجود در سایت IDT (Integrated DNA Technologies) طراحی شدند (جدول ۱).

است که ایزوفرم‌های HSFA1 قادرند فاکتوری را القاء کنند که می‌تواند با HSFA2 در القاء بیان ژن‌های حافظه رونویسی عمل کند. همچنین جهت ارزیابی بیان سریع‌تر و قوی‌تر ژن‌های حافظه‌ای در اثر پرایمینگ دمایی، بیان تعدادی تا از ژن‌های حافظه نظیر *APX2* و *MIPS2* بلافاصله پس از تنش گرمایی در فواصل زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه پس از اعمال تنش گرمایی و در فواصل زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه بعد از بازگشت به دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در گیاهان پرایم شده و پرایم نشده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در گیاهان پرایم شده افزایش بیان این ژن‌ها از ۱۵ دقیقه بعد از اعمال تنش شروع شده و تا یک ساعت بعد از اعمال تنش در دوره بازایی نیز ادامه پیدا خواهد کرد حال آنکه در تیمار بدون پرایمینگ، به‌طور معنی‌داری بیان این ژن‌ها آهسته‌تر و ضعیف‌تر خواهد بود (Liu et al., 2018).

در آزمایش دیگری میزان نسبی ژن‌های حافظه‌ی تنش گرما در گیاه آرابیدوپسیس در بازه‌های زمانی مختلف بازایی بعد از تنش‌های ۵ و ۴۵ دقیقه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هنگامی که گیاهان به مدت ۴۵ دقیقه در معرض تنش گرما قرار گرفتند، میزان رونوشت ژن‌های *HsfA2*، *Hsp22*، *Hsp70*، *Hsp90* و *Hsp101* به مدت ۳۰ دقیقه یا ۱ ساعت پس از اعمال تنش همچنان در سطح بالا پایدار باقی ماند و در ساعات بعدی بازایی به تدریج کاهش یافت حال آن که در ارتباط با گیاهانی که به مدت ۵ دقیقه در معرض تنش گرما قرار گرفتند، سطح رونوشت ژن‌های حافظه‌ی تنش ۳۰ دقیقه تا یک ساعت پس از تنش به حداکثر رسید و سه ساعت پس از بازایی، میزان رونوشت ژن‌های مورد مطالعه به طور ناگهانی کاهش یافت. این یافته‌ها نشان داد که حافظه تنش بسته به مدت زمان تنش می‌تواند به طور متفاوتی تنظیم شود و حتی تنش ۵ دقیقه‌ای قادر است پاسخ‌های سازگاری به گرما را در زمان‌های متفاوت پس از بازایی تنظیم نماید (Oyoshi et al., 2020).

### روش‌شناسی پژوهش

این آزمایش روی بذور کلزا (هیبرید هایولا ۵۰) انجام گرفت. بذور از مرکز تحقیقات صفی آباد دزفول تهیه و پس از استریل سطحی با اتانول ۷۰٪ به مدت ۲-۳ دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل جهت جوانه‌زنی در سینی کشت حاوی خاک و پیت ماس کشت گردید و آبیاری بصورت روزانه انجام گرفت. گیاهچه‌ها در مرحله ۲-۳ برگی به گلدان پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر حاوی



شکل ۱. تیمارهای اعمال شده جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌های کاندید حافظه تنش گرما در گیاهچه‌های کلزا

گیاهان پس از طی یک دوره بازیابی ۴ روزه، تحت تنش دوم قرار گرفته‌ند و نمونه‌گیری ۷ و ۱۴ روز پس از اعمال تنش گرمایی دوم صورت گرفت. به منظور اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی و ریشه، نمونه‌های مربوط به هر تیمار به صورت جداگانه در پاکت‌های کاغذی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند و سپس توزین انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و سه تکرار برای اندازه‌گیری صفات رشدی گیاه انجام شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS مورد آنالیز قرار گرفت. جهت مقایسه‌ی میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد استفاده شد.

### یافته‌های پژوهش

#### بررسی بیان ژن‌های کاندید حافظه تنش گرمایی در کلزا

جهت ارزیابی الگوی بیانی ژن‌های کاندید حافظه تنش، بیان نسبی ژن‌های *HSFA1b*، *HSFA2* و *MIPS2* در ساعات زمانی مختلف پس از اعمال تنش دوم در تیمارهای T (گیاهان پرایم‌نشده)، P (گیاهانی که فقط تحت پرایمینگ قرار گرفته بودند) و تیمار P+T (گیاهانی که پس از پرایمینگ تحت تنش دوم قرار گرفته بودند) نسبت به تیمار شاهد (C) با استفاده از تکنیک qRT-PCR سنجیده شد.

برای اطمینان از طراحی صحیح و عملکرد اختصاصی آغازگرها و همچنین پیدا کردن بهترین دمای اتصال به cDNA سنتز شده، واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad بصورت شیب دمایی انجام شد. واکنش qRT-PCR بر روی دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR System (شرکت ABI) و با استفاده از مسترمیکس 2X Real-time PCR (Master Mix (SYBR Green) ساخت شرکت سیناکلون انجام شد. برای هر ژن سه تکرار بیولوژیکی (از سه گیاه متفاوت) و دو تکرار تکنیکی (دو تکرار برای هر cDNA) در نظر گرفته شد. میکروتیوپ‌های مخصوص واکنش Real-time PCR نیز از شرکت GUNSTER BIOTECH تهیه شدند. برای آنالیز داده‌های به دست آمده از روش اختلاف در تغییرات درجه آستانه ( $\Delta\Delta CT$ ) استفاده شد (Livak & Schmittgen, 2001) که ابتدا چرخه آستانه برای نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع، نرمال‌سازی شد و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده از نرم‌افزار REST محاسبه گردید (Pfaffl et al., 2002). در این روش، همه‌ی داده‌ها با ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی، نرمال شدند و سپس میزان تغییرات بیان ژن‌ها در پاسخ به محرک‌های مورد استفاده نسبت به شرایط کنترل و همچنین در گیاهان پرایم شده نسبت به گیاهان بدون پرایمینگ دمایی سنجیده شد.

جهت اندازه‌گیری پارامترهای رشدی از گیاهچه‌های کلزا با ۴-۵ برگ کاملاً رشد یافته استفاده شد. بدین ترتیب که

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده در واکنش qRT-PCR

ژن مورد نظر	توالی پرایمر (5'-3')	دمای اتصال آغازگر در IDT سایت (°C)	طول قطعه تکثیر شده (bp)
<i>Actin</i>	F: TCTGGTGATGGTGTGTCTC R: ATCAGGGAATCAGTGAGGTC	۵۶	۱۰۷
<i>HSFA1b</i>	F: TCCAAGTCCAAGCCAAGGA R: AACACACTCCATCACCTGTC	۵۹	۹۲
<i>MIPS2</i>	F: AAGGTGGATAAAGGTTGTGGT R: AGCATAAAGCGTGAAGGAG	۵۶	۱۴۴
<i>HSFA2</i>	F: TCAGGTATGTCTTGTGTGGAAG R: ACAAAGTTTGGATTGTTCAAGG	۵۸	۲۲۷

**ژن HSFA2**

گرمائی در تیمار P+T ۱۱/۶ برابر نسبت به گیاهان شاهد گزارش شد (معنی‌داری در سطح یک درصد)، در صورتی که در تیمارهای P و T تغییر معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد، مشاهده نشد. مقایسه میزان بیان در تیمار P+T نسبت به تیمار T، افزایش بیان معنی‌دار در سطح یک درصد به میزان ۱۲/۲ برابر را نشان داد (شکل ۳ الف). در زمان ۲۴ ساعت، در هر سه تیمار P+T و T، P میزان بیان ژن نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۹/۴، ۱۰/۶ و ۳۸/۸ برابر افزایش یافت (معنی‌داری در سطح یک درصد) و بررسی الگوی بیانی مقایسه تیماری P+T/T افزایش ۳/۶ برابری را نشان داد (شکل ۳ ب). در زمان ۴۸ ساعت، بیان این ژن در هر سه تیمار روند کاهشی پیدا کرد و در تیمارهای P و T به سطح گیاهان شاهد رسید. اما در تیمار P+T روند کاهشی شدیدتر بوده و کاهش ۳۰ برابری میزان بیان نسبت به گیاهان شاهد گزارش شد. مقایسه میزان بیان ژن در تیمار P+T نسبت به تیمار T، کاهش ۲۷/۸ برابری را نشان داد (معنی‌داری در سطح یک درصد) (شکل ۳ ج). در زمان ۷۲ ساعت، روند کاهشی در میزان بیان ژن همچنان مشاهده شد اما در مقایسه تیماری P+T/T این تغییرات بیان معنی‌دار نبود (شکل ۳ د).

**ژن MIPS2**

در زمان یک ساعت پس از فراغت از تنش گرمایی دوم، افزایش بیان ژن در تیمار P+T به میزان ۱۰/۱ برابر نسبت به گیاهان شاهد گزارش شد (معنی‌داری در سطح یک درصد). در صورتی که تغییرات بیانی در تیمارهای P و T نسبت به شاهد معنی‌دار نبود. در مقایسه سطح بیان ژن در تیمار P+T نسبت به تیمار T افزایش ۲۵/۶ برابری گزارش شد (معنی‌داری در سطح یک درصد) (شکل ۴ الف). در زمان ۲۴ ساعت، میزان بیان در تیمار P+T روند افزایشی خود را حفظ کرد و به ۶۸/۴

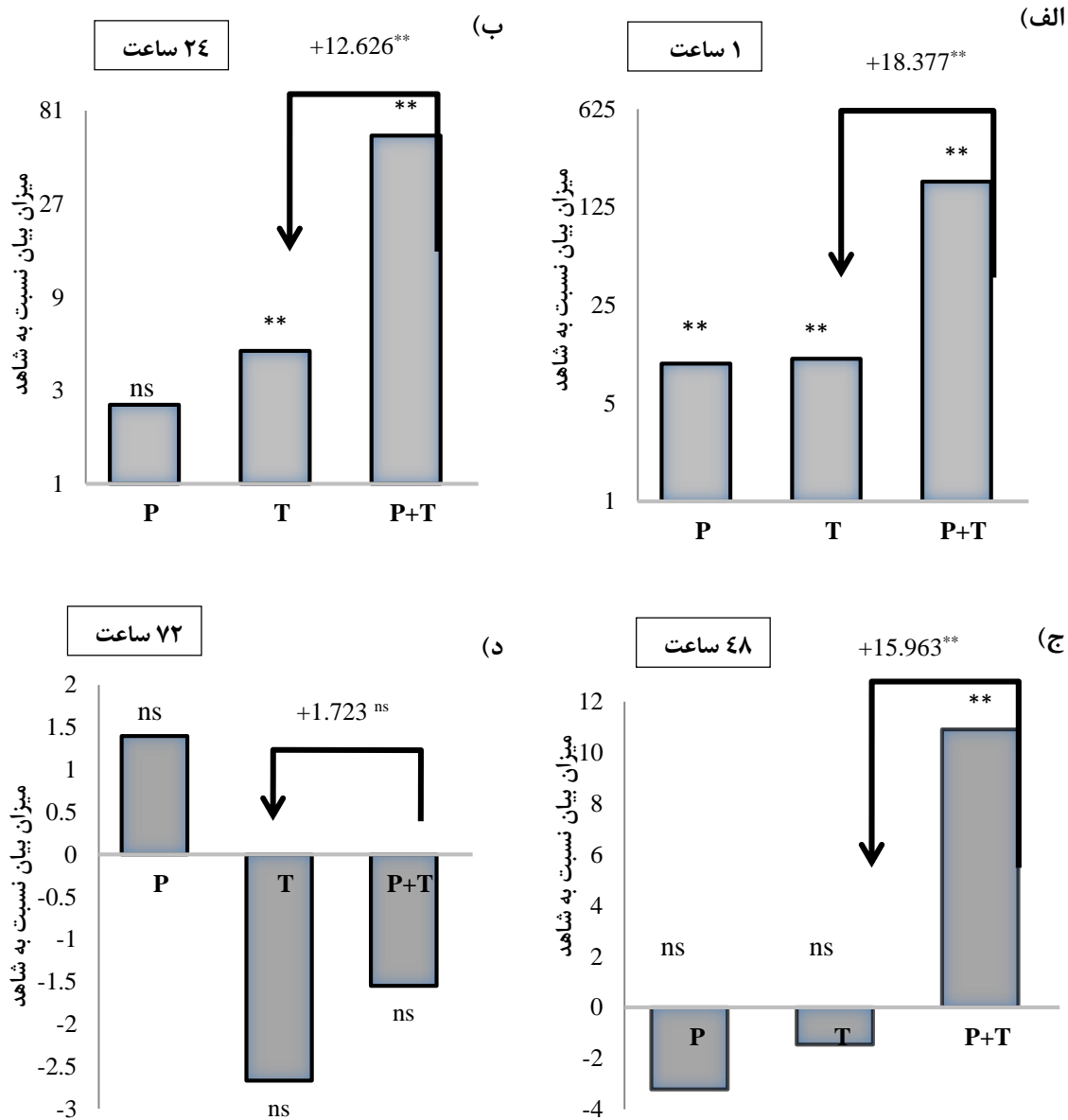
میزان بیان ژن *HSFA2* یک ساعت پس از اعمال تنش گرمایی دوم (تنش برگشتی) در تیمارهای P، T و P+T به ترتیب ۹/۶، ۱۰/۳ و ۱۹۰/۲ برابر افزایش نسبت به گیاهان شاهد (در سطح معنی‌داری یک درصد) نشان داد. مقایسه الگوی بیانی این ژن در گیاهان پرایم شده (تیمار P+T) نسبت به گیاهان پرایم نشده (تیمار T) به میزان ۱۸/۳ برابر افزایش (در سطح معنی‌داری یک درصد) گزارش شد (شکل ۲ الف). این روند افزایشی ۲۴ ساعت پس از فراغت از تنش نیز مشاهده شد به گونه‌ای که میزان تجمع رونوشت‌ها در تیمار T و P+T به ترتیب ۴/۷ و ۶۰/۲ برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌دار (در سطح یک درصد) نشان داد. تغییرات بیانی در مقایسه تیماری P+T/T نیز افزایشی و ۱۲/۶ برابر (در سطح معنی‌داری یک درصد) گزارش شد. با این حال میزان رونوشت‌ها در تیمار P تغییر معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد (شکل ۲ ب). ۴۸ ساعت پس از فراغت از تنش، نرخ رونویسی در تیمار T تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد و در تیمار P نیز تغییرات بیانی مثبت گزارش نشد. اما در تیمار P+T روند افزایشی رونویسی همچنان حفظ شده بود و به ۱۰/۹ برابر نسبت به گیاهان شاهد (در سطح معنی‌داری یک درصد) رسید. تغییرات بیانی در مقایسه تیماری P+T/T نیز افزایشی و ۱۵/۹ برابر (در سطح معنی‌داری یک درصد) گزارش شد (شکل ۲ ج). با این حال روند تغییرات سطح رونویسی ۷۲ ساعت پس از فراغت از تنش در همه تیمارهای مطالعه شده نسبت به گیاهان شاهد معنی‌دار گزارش نشد و به سطح پایه رسید. تغییرات بیانی در مقایسه تیماری P+T/T نیز در این ساعت معنی‌دار گزارش نشد (شکل ۲ د).

**ژن HSFA1b**

میزان بیان ژن *HSFA1b* در یک ساعت پس از فراغت از تنش

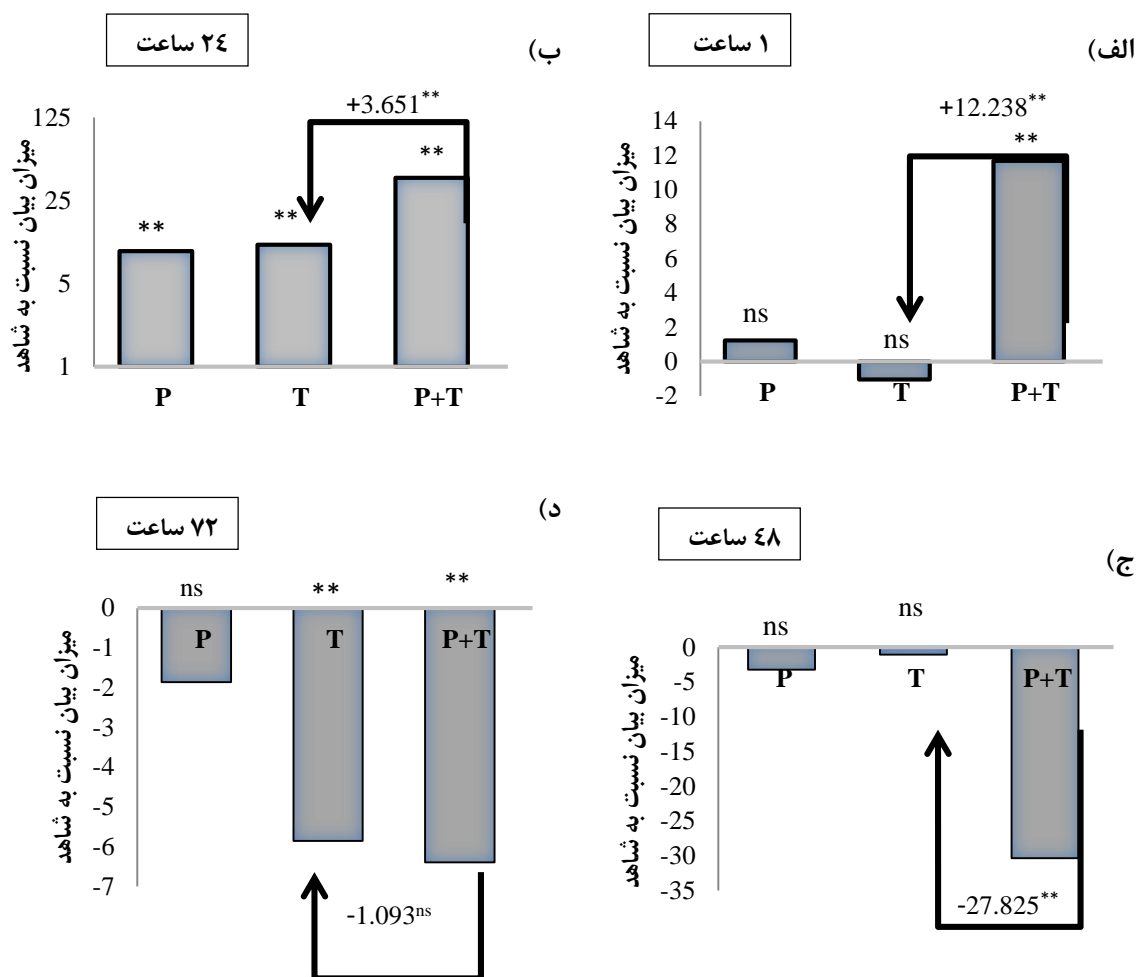
گزارش شد. مقایسه تیماری P+T نسبت به T، بالاتر بودن سطح بیان را به میزان ۳/۳ برابر نشان داد (معنی داری در سطح پنج درصد) (شکل ۴ ج). در زمان ۷۲ ساعت سطح بیان ژن در هر سه تیمار به سطح گیاهان شاهد بازگشت و اختلاف معنی داری ثبت نشد. تغییرات الگوی بیانی P+T/T نیز معنی دار گزارش نشد (شکل ۴ د).

برابر نسبت به گیاهان شاهد رسید (معنی داری در سطح یک درصد)، در حالی که در تیمارهای P و T تغییرات بیانی ژن نسبت به گیاهان شاهد معنی دار نبود. در مقایسه تیماری P+T/T افزایش بیان معنی داری به میزان ۳۷/۶ برابر مشاهده شد (شکل ۴ ب). در زمان ۴۸ ساعت، سطح بیان ژن در تیمارهای P و P+T به سطح گیاهان شاهد رسید، در حالی که در تیمار T سطح بیان ژن نسبت به تیمار شاهد ۱۲ برابر کمتر



**شکل ۲.** میزان بیان ژن *HSFA2* نسبت به تیمار شاهد (C) در بازه‌های زمانی مختلف پس از اعمال تیمارهای مختلف (P- پرایمینگ، T- تنش دوم بدون پرایمینگ) و (P+T- پرایمینگ+تنش دوم). پیکان بکار رفته در نمودار مقایسه تیماری P+T/T را نشان می‌دهد. (\*\* معنی داری در سطح یک درصد، \* معنی داری در سطح پنج درصد، ns عدم معنی دار بودن)





**شکل ۳.** میزان بیان ژن *HSF1b* نسبت به تیمار شاهد (C) در بازه‌های زمانی مختلف پس از اعمال تیمارهای مختلف (P- پرایمینگ، T- تنش دوم بدون پرایمینگ) و (P+T- پرایمینگ+تنش دوم). پیکان بکار رفته در نمودار مقایسه تیماری P+T/T را نشان می‌دهد. (\*\* معنی داری در سطح یک درصد، \* معنی داری در سطح پنج درصد، ns عدم معنی دار بودن)

تنش برگشتی (تنش دوم) در مقایسه با گیاهانی که تحت شرایط نرمال حرارتی رشد یافته بودند (C)، مورد بررسی قرار گرفتند (Liu *et al.*, 2018). نتایج نشان داد که پس از گذشت سه روز از پرایمینگ دمایی، سطح بیان این ژن‌ها به حالت نرمال برگشته است که حاکی از این حقیقت است که ژن‌های حافظه تنش گرمایی بیان مداومی در طول دوره بازیابی (فاز پرایمینگ یا فاز حافظه) ندارند و تنظیم دوباره بیان ژن‌های حافظه‌ای و مولکول‌های سیگنالی در طول دوره بازیابی جهت ابقاء تحمل گرمایی لازم و ضروری است. در مطالعه ما نیز بررسی روند تغییرات بیانی ژن‌های مورد مطالعه پس از گذشت ۴ روز از تنش اول در ساعات زمانی ذکر شده (تیمار P) نشان داد که این ژن‌ها بیان مداومی در طول فاز حافظه ندارند. از سوی دیگر نتایج حاصل از بیان افتراقی این ژن‌ها در تیمار P+T (پرایمینگ همراه با تنش

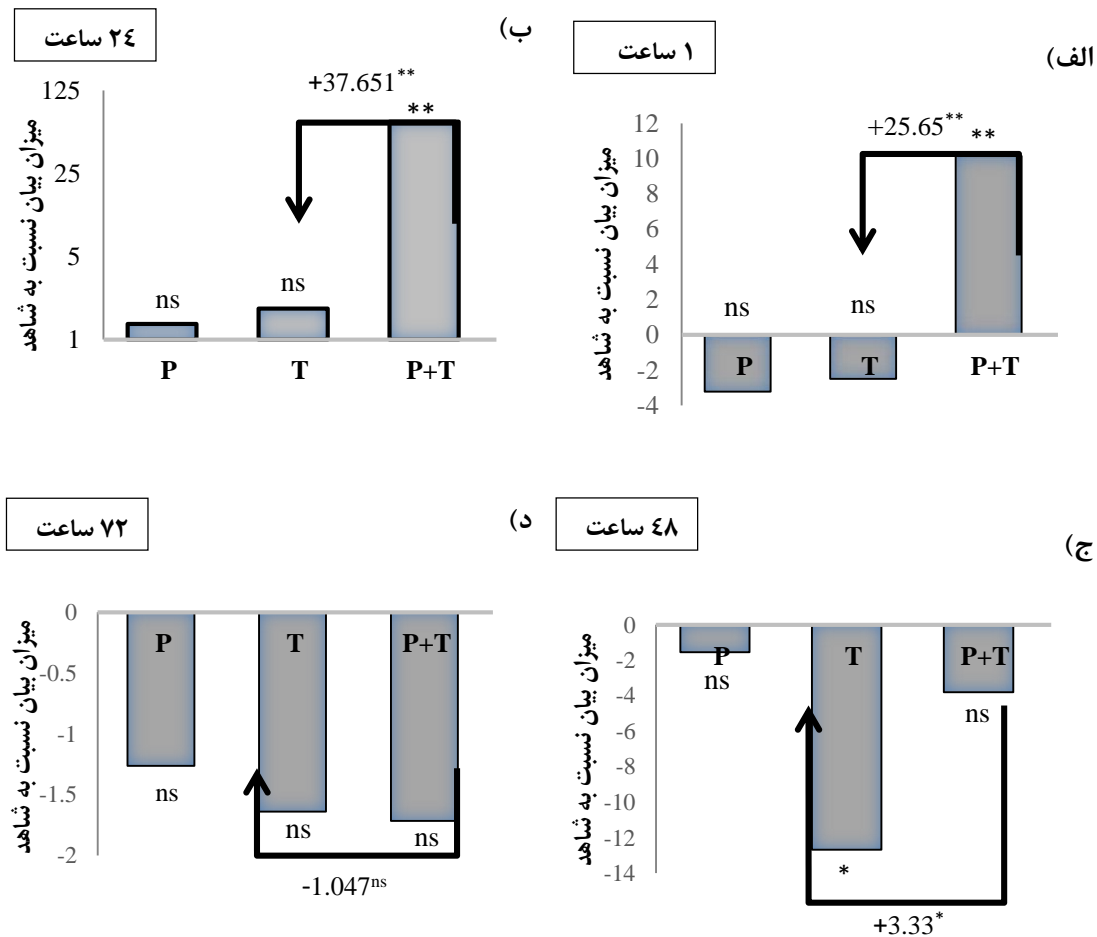
مطالعات قبلی نشان داده است که پرایمینگ با تاثیر در میزان رونوشت ژن‌ها، پروتئین‌ها و متابولیت‌ها، عملکرد در محیط‌های تنش‌زا را افزایش می‌دهد اما از طرف دیگر گیاهان منابع گسترده‌ای از انرژی و نیازهای متابولیکی را جهت بروز پاسخ‌های تحمل به تنش تخصیص می‌دهند. از این رو لازم است اکثر تغییرات ناشی از تنش پس از کاهش یا رفع تنش به سطح قبل از تنش بازگردانده می‌شوند تا امکان هدایت مجدد مواد مغذی و کربن تثبیت شده برای بازیابی رشد و نمو گیاه فراهم شود (Crisp *et al.*, 2016, 2017). این تنظیم مجدد منابع در طول بازیابی پس از تنش (مرحله حافظه) به گیاهان اجازه می‌دهد تا پاسخ‌های دفاعی خود را دوباره تنظیم کنند (Hemme *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای الگوهای افتراقی ژن‌های بیان شده در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تحت تنش گرمایی اول (پرایمینگ) و

مهم *HSFA2* در تنظیم تحمل حرارتی اکتسابی است (Fragkostefanakis *et al.*, 2016). در آزمایش دیگری مشخص شد که *HSFA2* یکی از مولفه‌هایی است که با تنظیم مثبت بیان حداقل برخی ژن‌های *HSP* در افزایش مدت زمان تحمل گرمایی اکتسابی در آراییدوپسیس نقش دارد (Charng *et al.*, 2007).

### ارزیابی شاخص‌های رشدی

به منظور بررسی اثر پرایمینگ دمایی بر رشد گیاهچه‌های کلزا، شاخص‌های رشدی ۷ و ۱۴ روز پس از اعمال تنش برگشتی در گیاهچه‌هایی که به مدت ۴ روز تحت بازیابی (طول دوره حافظه تنش) قرار گرفته بودند در تیمارهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج تجزیه واریانس صفات ارزیابی شده در جداول ۲ و ۳ ارائه شده است.

دوم) نسبت به تیمار T (گیاهانی که بدون اعمال پرایمینگ فقط تحت تنش گرما قرار گرفته بودند) نشان داد که القا بیان این ژن‌ها از یک ساعت پس از تنش برگشتی تا ۴۸ ساعت پس از آن، در مقایسه تیماری P+T/C نسبت به T/C بسیار قوی‌تر بوده است (+++). مطالعات قبلی نیز نشان داده بودند بیان ژن‌های حافظه‌ای نظیر *MIPS2* و *HSFA1* پس از تنش دوم (تیمار P+T) به میزان قابل توجهی نسبت به تیمار T در اکتویپ وحشی آراییدوپسیس افزایش یافت حال آن که در اکتویپ جهش یافته *hsfa2* این تغییرات معنی‌دار نبود که نشان‌دهنده نقش موثر فاکتور *HSFA2* در تقویت بیان ژن‌های حافظه‌ای پس از تنش برگشتی دوم می‌باشد (Friedrich *et al.*, 2021). در مطالعه دیگری مشخص شد که تجمع مداوم پروتئین *HSFA2* در نتیجه‌ی تنش ملایم گرما، ظرفیت گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی را جهت مقابله با تنش گرمای شدید بعدی افزایش می‌دهد که نشان‌دهنده نقش



**شکل ۴.** میزان بیان ژن *MIPS2* نسبت به تیمار شاهد (C) در بازه‌های زمانی مختلف پس از اعمال تیمارهای مختلف (P- پرایمینگ، T- تنش دوم (بدون پرایمینگ) و P+T- پرایمینگ+تنش دوم). پیکان بکار رفته در نمودار مقایسه تیماری P+T/T را نشان می‌دهد. (\*\* معنی داری در سطح یک درصد، \* معنی داری در سطح پنج درصد، ns عدم معنی دار بودن)

منفی تنش گرما بر وزن اندام هوایی است حال آن‌که پرایمینگ دمایی (تیمار P+T) میزان این شاخص رشدی را به طور معنی داری در مقایسه با گیاهان پرایم نشده (تیمار T) ۷ روز پس از تنش برگشتی افزایش داد که حاکی از اثر مثبت پرایمینگ دمایی بر وزن اندام هوایی گیاه است (شکل ۵).

اندازه‌گیری وزن تر اندام هوایی گیاهچه‌های کلزا در تیمارهای مختلف ۷ و ۱۴ روز پس از اعمال تنش برگشتی با طول دوره بازبازی (فاز پرایمینگ) ۴ روزه نشان داد تنش گرما بدون اعمال پرایمینگ دمایی (تیمار T) سبب کاهش معنی‌دار این شاخص نسبت به گیاهان شاهد شد که نشان‌دهنده اثر

**جدول ۲.** تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی در تیمارهای مورد مطالعه ۷ روز پس از اعمال تنش برگشتی در گیاهچه‌های کلزا با ۴ روز طول دوره بازبازی (فاز پرایمینگ)

منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
تیمار	۳	۶/۶۷**	۰/۱۷**	۰/۰۴*	۰/۰۰۹**
خطای آزمایشی	۸	۰/۷۷	۰/۰۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۷
ضریب تغییرات (%)	-	۱۰/۸۲	۷/۹۶	۱۰/۹۸	۱۰/۹۳

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

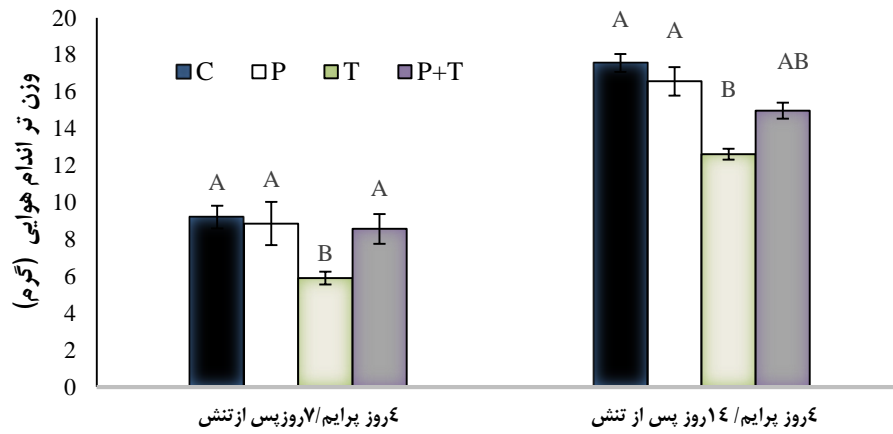
**جدول ۳.** تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی در تیمارهای مورد مطالعه ۱۴ روز پس از اعمال تنش برگشتی در گیاهچه‌های کلزا با ۴ روز طول دوره بازبازی (فاز پرایمینگ)

منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
تیمار	۳	۱۳/۹۱**	۰/۵**	۰/۰۶*	۰/۰۳*
خطای آزمایشی	۸	۰/۸۲	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۰۴
ضریب تغییرات (%)	-	۵/۸۸	۸/۵۰	۸/۸۲	۱۰/۲۹

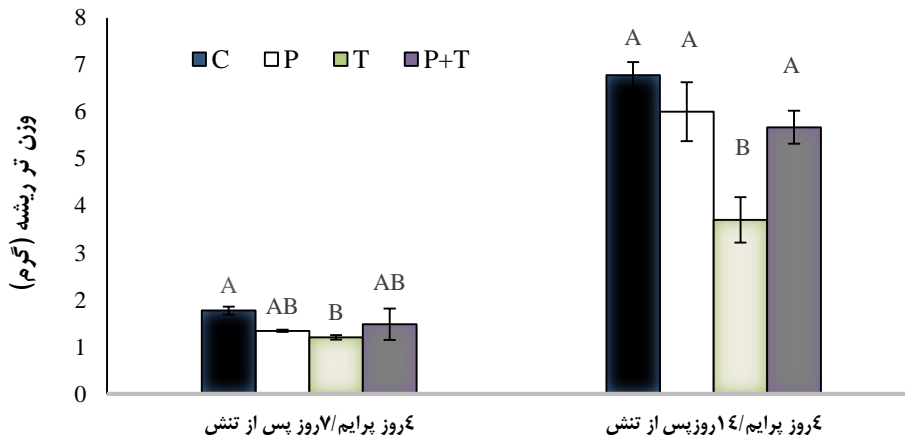
\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

بررسی وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه در تیمارهای مختلف ۷ و ۱۴ روز پس از تنش برگشتی نشان داد طول دوره بازبازی ۴ روزه نتوانست افزایش معنی‌داری در تیمار P+T نسبت به بقیه تیمارها داشته باشد (شکل ۷ و ۸). برر سی شاخص‌های رشدی در آزمایش کنونی نشان داد که پرایمینگ دمایی می‌تواند نقش موثری در تقویت برخی شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های کلزا و استقرار تحمل گرمایی اکتسابی نسبت به گیاهانی که بدون پرایمینگ دمایی تحت تنش شدید قرار گرفته بودند، داشته است.

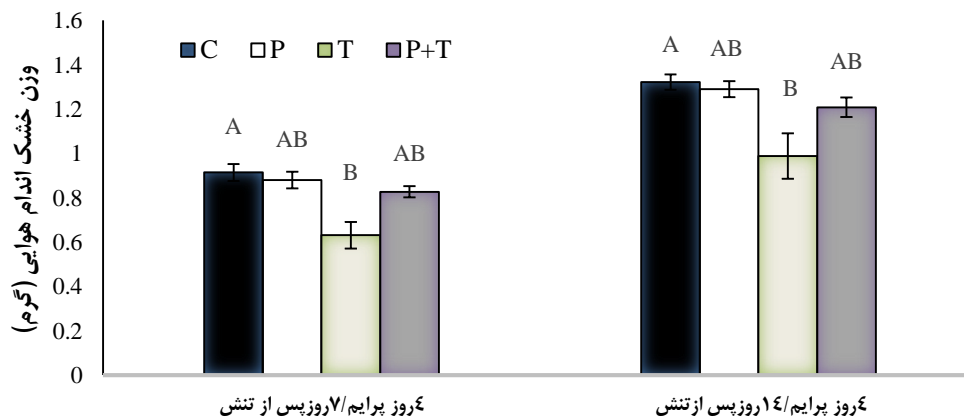
اندازه‌گیری وزن تر ریشه در تیمارهای مختلف ۷ روز پس از تنش برگشتی نشان داد طول دوره بازبازی ۴ روزه نتوانست افزایش معنی‌داری در تیمار P+T نسبت به بقیه تیمارها داشته باشد. با این حال، ارزیابی این شاخص ۱۴ روز بعد از اعمال تنش گرمایی در گیاهانی با طول دوره بازبازی ۴ روزه در تیمار P+T نسبت به گیاهانی که بدون پرایمینگ دمایی تحت تنش گرمایی شدید قرار گرفته بودند، به میزان قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۶). همچنین ارزیابی طول اندام هوایی و طول ریشه نیز حاکی از اثر مثبت پرایمینگ دمایی در تقویت این پارمترها بوده است که اطلاعات آن در این‌جا نشان داده نشده است.



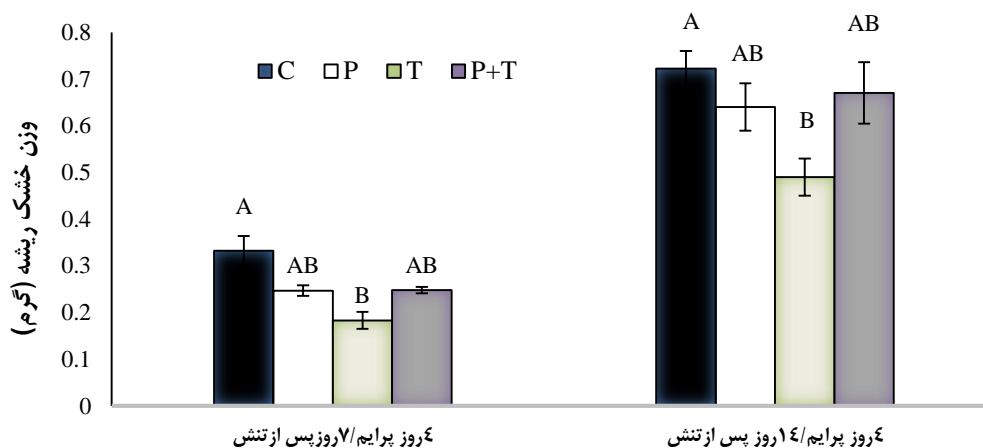
شکل ۵. ارزیابی وزن تر اندام هوایی در تیمارهای مورد مطالعه ۷ و ۱۴ روز پس از اعمال تنش برگشتی در گیاهچه‌های کلزا



شکل ۶. ارزیابی وزن تر ریشه در تیمارهای مورد مطالعه ۷ و ۱۴ روز پس از اعمال تنش برگشتی در گیاهچه‌های کلزا



شکل ۷. ارزیابی وزن خشک اندام هوایی در تیمارهای مورد مطالعه ۷ و ۱۴ روز پس از اعمال تنش برگشتی در گیاهچه‌های کلزا



شکل ۸. ارزیابی وزن خشک ریشه در تیمارهای مورد مطالعه ۷ و ۱۴ روز پس از اعمال تنش برگشتی در گیاهچه‌های کلزا

تنش دوم نشان داد که پرایمینگ دمایی می‌تواند از طریق افزایش بیان ژن‌های حافظه تنش باعث افزایش برخی شاخص‌های رشدی و القاء تحمل گرمایی در این گیاهان شود. هر چند که نقش ژن‌های مطالعه شده در این پژوهش در القاء تحمل اکتسابی و حافظه تنش گرمایی در گیاه مدل آرآی‌دی‌ویسیس به خوبی مطالعه شده است اما برای اولین بار است که ماهیت حافظه‌ای این ژن‌ها در گیاهچه‌های کلزا تایید شد. از این رو می‌توان با کاربرد پرایمینگ دمایی و القاء بیان ژن‌های حافظه رونویسی تنش گرمایی در کلزا جهت توسعه برنامه‌های به‌نژادی و بهبود ظرفیت تحمل گیاهان در مقابله با تنش گرما بهره جست.

### نتیجه‌گیری و پیشنهادها

درک مکانیسم‌های حافظه تنش گرمایی و شناسایی عوامل کنترل‌کننده حافظه تنش حاصل از پرایمینگ می‌تواند به توسعه استراتژی‌های جدید برای بهبود عملکرد و مقاومت محصولات کشاورزی در برابر تغییرات اقلیمی کمک کند. در مطالعه کنونی با توجه به روند تغییرات بیانی ژن‌های *HSFA2*، *HSFA1b* و *MIPS2* در ساعات زمانی مختلف پس از تنش برگشتی (تیمار P+T) و مقایسه الگوی بیانی آن‌ها با گیاهان پرایم نشده (تیمار T)، ماهیت حافظه‌ای این ژن‌ها مشخص شد. همچنین بررسی نتایج شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها ۷ و ۱۴ روز پس از فراغت از

### References

- AlKian Abadi, A., Taheri, H., & Sadr, A. S. (2023). Identification of key genes involved in the establishment and maintenance of heat stress memory in *Arabidopsis* seedlings using microarray data. *Crop Biotechnology*, 12(40), 63-81.
- Anckar, J., & Sistonen, L. (2011). Regulation of HSF1 function in the heat stress response, implications in aging and disease. *Annual review of biochemistry*, 80, 1089-1115.
- Balazadeh, S. (2022). A 'hot' cocktail, The multiple layers of thermomemory in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 65, 102147.
- Bitá, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment, scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science*, 4, 273.
- Brzezinka, K., Altmann, S., Czesnick, H., Nicolas, P., Gorka, M., Benke, E., ..., & Bäurle, I. (2016). *Arabidopsis* FORGETTER1 mediates stress-induced chromatin memory through nucleosome remodeling. *elife*, 5, e17061.
- Chang, Y. Y., Liu, H. C., Liu, N. Y., Chi, W. T., Wang, C. N., Chang, S. H., & Wang, T. T. (2007). A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 143(1), 251-262.
- Crisp, P. A., Ganguly, D. R., Smith, A. B., Murray, K. D., Estavillo, G. M., Searle, I., ..., & Pogson, B. J. (2017). Rapid recovery gene downregulation during excess-light stress and recovery in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 29(8), 1836-1863.
- Crisp, P. A., Ganguly, D., Eichten, S. R., Borevitz, J. O., & Pogson, B. J. (2016). Reconsidering plant memory, Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science advances*, 2(2), e1501340.
- Fragkostefanakis, S., Mesihovic, A., Simm, S., Paupière, M. J., Hu, Y., Paul, P., ..., & Scharf, K.

- D. (2016). HsfA2 controls the activity of developmentally and stress-regulated heat stress protection mechanisms in tomato male reproductive tissues. *Plant physiology*, 170(4), 2461-2477.
- Friedrich, T., Oberkofler, V., Trindade, I., Altmann, S., Brzezinka, K., Lämke, J., ..., & Bäurle, I. (2021). Heteromeric HSFA2/HSFA3 complexes drive transcriptional memory after heat stress in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 12(1), 3426.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9643-9684.
- Hemme, D., Veyel, D., Mühlhaus, T., Sommer, F., Jüppner, J., Unger, A. K., ... and Schroda, M. (2014). Systems-wide analysis of acclimation responses to long-term heat stress and recovery in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 26(11), 4270-4297.
- Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Bäurle, I., Geiselhardt, S., ..., & Kopka, J. (2016). Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews*, 91(4), 1118-1133.
- Hu, S., Ding, Y., & Zhu, C. (2020). Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 375.
- Jaskiewicz, M., Conrath, U., & Peterhänsel, C. (2011). Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO reports*, 12(1), 50-55.
- 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), 1-23.
- Lämke, J., Brzezinka, K., Altmann, S., & Bäurle, I. (2016). A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *The EMBO journal*, 35(2), 162-175.
- Ling, Y., Serrano, N., Gao, G., Atia, M., Mokhtar, M., Woo, Y.H., Bazin, J., Veluchamy, A., Benhamed, M., & Crespi, M. (2018). Thermopriming triggers splicing memory in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 69(10), 2659-2675.
- Liu, H.C., Lämke, J., Lin, S.Y., Hung, M.J., Liu, K.M., Charng, Y.Y., & Bäurle, I. (2018). Distinct heat shock factors and chromatin modifications mediate the organ-autonomous transcriptional memory of heat stress. *Plant Journal*, 95(3), 401-413.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pörtner, H. O., Roberts, D., Skea, J., & Shukla, P. R. (2022). Global Warming of 1.5 C, IPCC special report on impacts of global warming of 1.5 C above pre-industrial levels in context of strengthening response to climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. Cambridge University Press.
- Moore, C. E., Meacham-Hensold, K., Lemonnier, P., Slattery, R. A., Benjamin, C., Bernacchi, C. J., ..., & Cavanagh, A. P. (2021). The effect of increasing temperature on crop photosynthesis, from enzymes to ecosystems. *Journal of Experimental Botany*, 72(8), 2822-2844.
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S. K., Ganguli, A., & Scharf, K. D. (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world, how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell stress & chaperones*, 6(3), 177.
- Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in plant science*, 22(1), 53-65.
- Oyoshi, K., Katano, K., Yunose, M., & Suzuki, N. (2020). Memory of 5-min heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 15(8), 1778919.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
- Yeh, C. H., Kaplinsky, N. J., Hu, C., & Charng, Y. Y. (2012). Some like it hot, some like it warm, phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Science*, 195, 10-23.
- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics*, 286, 321-332.