

ORIGINAL ARTICLE

Identification of effective key genes in establishing and maintaining heat stress memory in *Arabidopsis* seedlings using microarray data

Atena AlKian Abadi¹, Hengameh Taheri^{2*}, Ayeh Sadat Sadr³

¹M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

²Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

³Assistant Professor, South of Iran Aquaculture Research Institute (SIARI), Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.

Correspondence

Hengameh Taheri

Email: taheri@asnruk.ac.ir

How to cite

AlKian Abadi A., Taheri, H. & Sadr, A.S. (2022). Identification of effective key genes in establishing and maintaining heat stress memory in *Arabidopsis* seedlings using microarray data. *Crop Biotechnology*, 12(40), 63-82.

ABSTRACT

Plants are able to acquire thermotolerance to the subsequent lethal stress through memorizing previous heat stress (HS) (Priming). A priming effect that can be sustained for several hours, days, or even generations after reverse heat stress, is called heat stress memory. The aim of this study was to identify effective key genes in establishing and maintaining heat stress memory. To achieve this, microarray data of the expression profile of *Arabidopsis* samples were retrieved from the GEO (Gene expression omnibus) database and differentially expressed genes (DEGs) were identified based on their higher transcriptional activation following recurring stress (in P+T/P treatment comparison) and their sustained induction even 52 hours after stress relief (during memory phase). The identified genes were further analyzed by bioinformatics tools for gene ontology (GO) classification and protein-protein interaction (PPI) networks. GO terms analysis disclosed that the up-regulated DEGs were mainly associated with cellular response to heat, heat acclimation and protein folding. By clustering of PPI networks in the term related to response to heat (in P+T/P treatment comparison), several candidate genes involved in thermomemory were identified including *HSP70T-2*, *HSP91*, *AR192*, *HSP60*, *HSP70*, *BIP2*, *J2*, *CLPB4*, *HOP3*, *HSP101*, *ROF1*, *HSFA3*, *HSFA2*, *HSP70B*, *CLPB3*, *FES1A*, *MBF1C*. Also, based on the sustained differential expression of genes even 52 hours after the priming phase, it was determined that genes responsible for maintaining heat stress memory were mainly members of the small heat shock protein family (sHSPs) such as *HSP17.6*, *HSP21*, *HSP17.6II*, *HAS32*, *HSP17.4*, *HSP18.2* and *HSP22*. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome) pathway analysis revealed that the HS memory genes were mainly involved in protein processing in the endoplasmic reticulum (ER) and oxidative phosphorylation. Furthermore, the analysis of cis-regulatory elements in the promoter regions of the thermomemory genes revealed that the transcription factors families of bZIP, AP2;B3;RAV, MYB/SANT, HD-ZIP and GATA; tify had the highest binding sites in their upstream regions. In summary, these findings provide useful information about functional and regulatory analysis of genes involved in the establishment and maintenance of heat stress memory, as well as their protein network interactions. This information can be used to improve the heat tolerance capacity of plants under extreme heat stress.

KEYWORDS

Arabidopsis, Heat stress memory, Microarray, Protein interaction network, Thermopriming.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

شناسایی ژن‌های کلیدی مؤثر در استقرار و تداوم حافظه تنش گرمایی در گیاهچه‌های آراییدوپسیس با استفاده از داده‌های ریز آرایه

آتنا ال‌آبادی^۱، هنگامه طاهری^{۲*}، آیه‌سادات صدر^۳

چکیده

گیاهان قادرند از طریق به خاطر سپردن تنش گرمای قبلی (پرایمینگ)، نسبت به تنش‌های کشنده بعدی (برگشتی) تحمل گرمایی بدست آورند. اثر پرایمینگ که برای ساعت‌ها، روزها یا حتی نسل‌ها پس از تنش گرمایی برگشتی حفظ می‌شود، حافظه تنش گرمایی نامیده می‌شود. هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌های کلیدی مؤثر در استقرار و تداوم حافظه تنش گرمایی است. در این مطالعه، داده‌های ریز آرایه پروفایل بیانی نمونه‌های آراییدوپسیس از بانک داده‌های (Gene GEO expression omnibus) جمع‌آوری و ژن‌هایی با بیان افتراقی بر مبنای فعالیت بیشتر رونویسی‌شان تحت تنش برگشتی نسبت به تنش اول (مقایسه تیماری P+T/P) و همچنین القاء بیان پایدار تا ۵۲ ساعت پس از فراغت از تنش (فاز حافظه) شناسایی شدند. سپس ژن‌های شناسایی شده به وسیله ابزارهای بیوانفورماتیک جهت دسته‌بندی هستی‌شناسی (Gene Ontology) و شبکه‌های برهم‌کنش پروتئینی (Protein-protein interaction networks) مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی هستی‌شناسی عبارت‌ها نشان داد که ژن‌هایی با بیان افزایشی عمدتاً با پاسخ سلولی و خوگیری به گرما و تاخوردگی پروتئین مرتبط بودند. از طریق خوشه‌بندی شبکه برهم‌کنش پروتئینی در عبارت مربوط به "پاسخ به گرما" در مقایسه تیماری P+T/P، تعدادی از ژن‌های کلیدی مؤثر در استقرار حافظه تنش گرما نظیر *HSP90*، *HSP70T-2*، *HSP60*، *HSFA2*، *ROF1*، *HSFA3*، *HSP101*، *HOP3*، *CLPB4*، *J2*، *BIP2*، *HSP70*، *AR192*، *HSP60*، *HSP70B*، *HSP70A*، *MBF1C*، *CLPB3*، *FES1A* شناسایی شدند. همچنین بر اساس تداوم بیان افتراقی ژن‌ها تا ۵۲ ساعت پس از فراغت از تنش اول (فاز پرایمینگ) مشخص شد ژن‌هایی که در پایداری حافظه تنش گرما دخیل هستند عمدتاً متعلق به اعضای خانواده پروتئین‌های شوک گرمایی کوچک (sHSPs) نظیر *HSP17.6*، *HSP21*، *HSP17.6II*، *HAS32*، *HSP17.4*، *HSP18.2* و *HSP22* بودند. علاوه بر این، در بررسی مسیرهای زیستی از طریق پایگاه KEGG (دانشنامه ژن‌ها و ژنوم‌های کیوتو) مشخص شد که ژن‌های حافظه تنش گرما عمدتاً در مسیرهای پردازش پروتئین در شبکه اندوپلاسمی و فسفریلاسیون اکسیداتیو نقش داشتند. همچنین بررسی عناصر تنظیمی سیس در ناحیه پرموتری ژن‌های حافظه تنش نشان داد که خانواده فاکتورهای رونویسی MYB/SANT، AP2;B3;RAV، bZIP، HD-ZIP و GATA; tify دارای بیشترین جایگاه اتصال در ناحیه بالادست ژن‌های مذکور بودند. در مجموع این یافته‌ها اطلاعات مفیدی در خصوص آنالیز عملکردی و تنظیمی ژن‌های مؤثر در استقرار و تداوم حافظه تنش گرمایی و برهم‌کنش شبکه‌های پروتئینی آن‌ها ارائه داد که می‌توان از آنها در راستای بهبود ظرفیت تحمل گیاه تحت تنش شدید گرما استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

آراییدوپسیس، پرایمینگ دمایی، ریز آرایه، شبکه برهم‌کنش پروتئینی، حافظه تنش گرمایی.

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ^۲ استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران. ^۳ استادیار، پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلانی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

نویسنده مسئول:

هنگامه طاهری

رایانامه: taheri@asnruk.ac.ir

استناد به این مقاله:

ال‌آبادی، آتنا، طاهری، هنگامه و صدر، آیه‌سادات (۱۴۰۱). شناسایی ژن‌های کلیدی مؤثر در استقرار و تداوم حافظه تنش گرمایی در گیاهچه‌های آراییدوپسیس با استفاده از داده‌های ریز آرایه. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۰)، ۸۲-۶۳.

مقدمه

مزرعه به کار برد تا محصولات را نسبت به تنش مقاوم‌تر کرد، لذا شناسایی عوامل کنترل‌کننده حافظه تنش حاصل از پرایمینگ بسیار حائز اهمیت است. در سال‌های اخیر، محققان با استفاده از روش‌های شناسایی ژن‌های کاندید، روش‌های ژنتیک رو به جلو/ معکوس و داده‌های آمیکس توانسته‌اند تنظیم‌کننده‌های متعددی را برای پاسخ‌های تنش گیاهی و برهم‌کنش بین این تنظیم‌کننده‌ها شناسایی کنند. با این حال، برهم‌کنش بین این فاکتورهای تنظیمی هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است (Yamaguchi, 2021). در مطالعه حاضر جهت شناخت اجزای مؤثر در استقرار و تداوم حافظه تنش گرما، الگوهای بیان افتراقی داده‌های ریزآرایه (موجود در پایگاه NCBI) حاصل از پرایمینگ دمایی در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس در تیمارهای مختلف با هم مقایسه شدند و با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، گروه‌های عملکردی دخیل در پرایمینگ دمایی و اجزای کلیدی حافظه رونویسی تنش گرمایی جهت استفاده در برنامه‌های به‌نژادی و توسعه واریته‌های متحمل به گرما معرفی شدند.

پیشینه پژوهش

در چند سال اخیر جنبه‌های متفاوت پرایمینگ و حافظه تنش گرما به‌عنوان یک سیستم آزمایشی کارآمد مورد توجه قرار گرفته است (Lämke et al., 2016a & Bäurle and Trindade, 2020). مطالعات نشان داده است که تنظیم کروماتین از طریق نوع چینش نوکلئوزوم‌ها و تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌های هیستونی می‌تواند نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن‌ها و پاسخ گیاه به تنش‌های غیرزنده داشته باشد. تغییرات پس از ترجمه دم N-ترمینال پروتئین‌های هیستونی میزان تمایل DNA ای که به دور نوکلئوزوم پیچیده می‌شود را تغییر می‌دهد که این امر می‌تواند در تسهیل یا مسدود کردن جایگاه اتصال تنظیم‌کنندگان بیان ژن نقش داشته باشد (Sequeira-Mendes et al., 2014). مشخص شده است که تری‌متیلاسیون ریشه لایزین (K4) در موقعیت ۴ هیستون H3 (H3K4) سبب فعال شدن رونویسی در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس شده است (Zhang et al., 2009).

قبل از اعمال تنش گرما، فاکتور شوک گرمایی HSF1 به‌وسیله پروتئین‌های شوک گرما (HSP) در سیتوزول سلولی نگاه‌داشته می‌شود. ژن‌های حافظه‌ای در این حالت غیرفعال و کروماتین اطراف آن‌ها ساختارهای نوکلئوزومی بسیار فشرده‌ای

عوامل محیطی نقش مؤثری در رشد و نمو و عملکرد نهایی گیاهان برعهده دارند. گیاهان جهت مقابله با آثار سوء تنش‌های محیطی، پاسخ‌های متنوعی را جهت فعال‌سازی ژن‌های مؤثر در متابولیسم و رشد و نمو به کار می‌گیرند تا بدین ترتیب بتوانند ظرفیت تحمل خود را جهت مقابله با آثار مخرب تنش افزایش دهند (Bäurle and Trindade, 2020). مشخص شده است که گیاهان پس از یک بازه زمانی رویارویی با تنش‌های ملایم گرما قادر خواهند بود با ذخیره اطلاعات تنش قبلی، پاسخ کارآمدتری (سریع‌تر یا قدرتمندتر) به تنش‌های بعدی دهند، این فرایند که تحت عنوان پرایمینگ نامیده می‌شود (Hilker et al., 2016 & Lämke and Bäurle, 2017)، حافظه تنش سوماتیکی را در طول سیکل زندگی گیاه ایجاد می‌کند که در برخی مواقع تا نسل‌های بعد هم ادامه می‌یابد (Oberkofler et al., 2021). تاکنون تعداد کمی از ژن‌های القاء شده تحت تنش به‌عنوان ژن‌های حافظه‌ای شناسایی شده‌اند (Liu et al., 2018a)، با این حال این ژن‌ها را بر مبنای چگونگی پاسخ رونویسی‌شان به تنش به دو دسته تقسیم می‌کنند: در نوع اول، حافظه رونویسی^۱ پایداری پس از تنش اول شکل می‌گیرد به گونه‌ای که بیان این دسته از ژن‌ها بلافاصله پس از تنش اول افزایش می‌یابد و تا چند روز پس از فراغت از تنش اول (فاز حافظه) همچنان حفظ می‌شود. این نوع حافظه رونویسی اغلب بعد از یک دوره خوگیری دو مرحله‌ای به افزایش تدریجی دما ایجاد می‌شود. حال آنکه نوع دوم حافظه رونویسی الزاما تحت تنش اولیه برانگیخته نمی‌شود و القاء بیان ژن بلافاصله بعد از تنش دوم اتفاق می‌افتد (Bäurle, 2018 & Oberkofler et al., 2021). در مقایسه با ژن‌های حافظه‌ای، رفتار رونویسی ژن‌های غیرحافظه‌ای بدین ترتیب است که این ژن‌ها به‌واسطه تنش القاء می‌شوند و بلافاصله بعد از اینکه تنش فروکش کرد بیانشان به سطح قبل از تنش برمی‌گردد. از سوی دیگر پاسخ رونویسی این ژن‌ها تحت تنش اول و تنش‌های بعدی مشابه است و به یک میزان در هر دو تنش القاء می‌شوند (Bäurle and Trindade, 2020).

از آنجا که حافظه تنش القاء شده به‌وسیله پرایمینگ، به گیاهان اجازه می‌دهد تا با سرعت و شدت بیشتری به تنش‌های بعدی پاسخ دهند، از این رو می‌توان پرایمینگ را در آینده در

1. Transcriptional memory

کاربرد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به نظر می‌رسد^۱ DEGsهایی که الگوی رونویسی‌شان را در طول مرحله بازیابی (دوره زمانی فراغت از تنش گرمایی) حفظ می‌کنند، احتمالاً در تداوم حافظه استرس گرمایی نقش داشته باشند (Ling *et al.*, 2018). براساس مطالعات قبلی برخی مؤلفه‌های مؤثر در تداوم حافظه رونویسی تنش گرمایی نظیر HSF21، HSFA2 و HSA32 معرفی شدند (Charng *et al.*, 2006; Lämke *et al.*, 2016a, 2016b; Sedaghatmehr *et al.*, 2016 & Ling *et al.*, 2018). اما هنوز درخصوص اینکه چه فاکتورهای دیگری تداوم حافظه تنش را کنترل می‌کنند، ابهاماتی وجود دارد. در مطالعه‌ای، تغییرات بیان ژن‌ها ۴ و ۵۲ ساعت پس از فراغت از تنش اول (فاز حافظه) در اکوتیپ وحشی Col-0 گیاهچه‌های آرابیدوپسیس مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس گزارش شد که تعدادی از ژن‌ها، بیان افتراقی خود را در هر دو زمان مورد مطالعه (۴ و ۵۲ ساعت پس از فراغت از تنش در فاز ریکاوری) نسبت به گیاهان کنترل (غیر تنش) همچنان حفظ کرده بودند (Stief *et al.*, 2014a)، با این حال جزئیاتی از ژن‌های شناسایی شده، تغییرات بیانی و برهم‌کنش آن‌ها در شبکه‌های پروتئینی منتشر نشد و تنها تداوم الگوی افتراقی چهار عدد از ژن‌های مذکور (APX2, HSA32, HSP17.6A, HSP22) در ساعات زمانی مختلف پس از فراغت از تنش با استفاده از qRT-PCR تأیید شد. باتوجه به اینکه تداوم الگوی افتراقی ژن‌ها پس از فراغت از تنش به‌عنوان ابزار شناسایی مؤلفه‌های مؤثر در تداوم تحمل گرمایی اکتسابی شناخته شده است (Stief *et al.*, 2014b)، لذا در مطالعه حاضر از این پلتفرم جهت استخراج الگوهای تداومی بیان افتراقی ژن‌ها ۴ و ۵۲ ساعت پس از فراغت تنش استفاده شد. از سوی دیگر از آنجا که با مطالعه اثرات انفرادی این الگوهای افتراقی به‌تنهایی نمی‌توان توضیح جامعی درخصوص عملکردهای سیستماتیک مکانیسم حافظه تنش در سطح سلولی بیان داشت، لذا جهت درک بهتر مکانیسم تداوم تحمل گرمایی اکتسابی و حافظه تنش، ماهیت این ژن‌ها با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک نظیر هستی‌شناسی ژن‌ها، مسیرهای KEGG^۲ و شبکه‌های برهم‌کنش پروتئینی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

دارند و به لحاظ متیله‌گذاری H3K4 فقیر هستند. در طول تنش گرما، HSFA1 از پروتئین‌های چپرون آزاد شده و پس از انتقال به هسته باعث فعال‌سازی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش نظیر HSFA2 می‌شود. این فاکتور رونویسی ضمن اتصال به ناحیه پروموتوری ژن‌های حافظه‌ای و آغاز فرایند متیلاسیون H3K4 در آن جایگاه، نقش مهمی در کاهش فشردگی کروماتین و القای سریع‌تر بیان این ژن‌ها پس از تنش دوم برعهده دارد (Oberkofler *et al.*, 2021).

در مطالعه‌ای جهت شناسایی اجزای دخیل در حافظه رونویسی تنش گرمایی در آرابیدوپسیس، الگوهای افتراقی ژن‌های بیان شده در گیاهان تحت تنش گرمایی اول (پرایمینگ) و تنش برگشتی (تنش دوم) در مقایسه با گیاهانی که تحت شرایط نرمال حرارتی رشد یافته بودند (N)، مورد بررسی قرار گرفت (Liu *et al.*, 2018b). نتایج نشان داد که از مجموع ژن‌هایی که الگوی بیانی افتراقی را در تیمار P+T (گیاهانی که بعد از پرایمینگ اولیه دمایی، تحت تنش دوم قرار گرفته بودند) نسبت به تیمار T (گیاهانی که بدون اعمال پرایمینگ فقط تحت تنش گرما قرار گرفته بودند) حفظ کرده بودند، ۳۳ ژن بیان قوی‌تری در P+T/N نسبت به T/N نشان دادند (+/+، حال آنکه ۳۴ ژن دیگر که در مقایسه تیماری T/N بیان معنی‌داری نشان ندادند، در مقایسه تیماری P+T/N بیان آن‌ها تقویت شده بود (+/0). باتوجه به الگوی بیان افتراقی در مقایسات تیماری ذکر شده، ماهیت حافظه‌ای این ژن‌ها تأیید شد. هرچند که در مطالعه مذکور به معرفی برخی ژن‌های حافظه‌ای از طریق مقایسه تیماری P+T/T پرداخته شد، اما جهت درک دقیق‌تر عوامل مؤثر در استقرار حافظه تنش گرمایی لازم است الگوهای بیانی ژن‌ها بعد از تنش دوم نسبت به تنش اول نیز مورد ارزیابی قرار گیرند. از این‌رو در مطالعه حاضر بیان افتراقی ژن‌ها در تیمار P+T (پس از تنش دوم) نسبت به تیمار P (گیاهانی که فقط تحت تنش اول پرایمینگ دمایی قرار گرفته بودند) جهت بررسی اجزای مؤثر در استقرار تحمل گرمایی اکتسابی و آنالیز عملکردی و برهم‌کنش گروه‌های ژنی مورد بررسی قرار گرفت.

علاوه بر مطالعات پیرامون تغییرات کمی بیان ژن‌های مؤثر در استقرار حافظه تنش ناشی از پرایمینگ دمایی، درک مکانیسم‌های مولکولی تداوم حافظه تنش در مطالعات پایه و

روش‌شناسی پژوهش

و نرمال‌سازی بین نمونه‌ها به‌ترتیب با استفاده از روش‌های Loess و Quantile انجام شد. از بسته Limma برای ارزیابی ژن‌هایی با بیان افتراقی استفاده شد. در پایگاه داده DAVID به آدرس <https://david.ncifcrf.gov> ارزیابی مسیره‌های بیولوژیکی و نیز ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌ها با هدف شناسایی ژن‌های مؤثر در حافظه تنش گرمایی صورت گرفت. از نرم‌افزار STRING به آدرس <https://string-db.org> برهم‌کنش پروتئین‌ها بررسی شد. این نرم‌افزار تعامل بین ژن‌ها را با نمره ترکیبی ۰ تا ۱ تعیین می‌کند. تعاملات با نمرات ترکیبی بالاتر از ۰/۴ در این پژوهش انتخاب شدند. در ادامه برای تشخیص پروتئین‌هایی که با هم برهم‌کنش دارند از روش گسترش همسایگی در شبکه‌های وزنی در نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد. در ادامه شناسایی ژن‌های بزرگ اثر به کمک نرم‌افزار CytoNCA و تعیین کلاسترهای مربوط به هر شبکه با نرم‌افزار MCODE انجام شد. همچنین جهت آنالیز عناصر سیس ژن‌های مرتبط به حافظه تنش گرمایی، ناحیه پرموتوری بالادست ژن‌های هدف از سایت NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) شناسایی و نواحی تنظیمی با استفاده از ابزار (<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw>) PlantPAN3 مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌های پژوهش

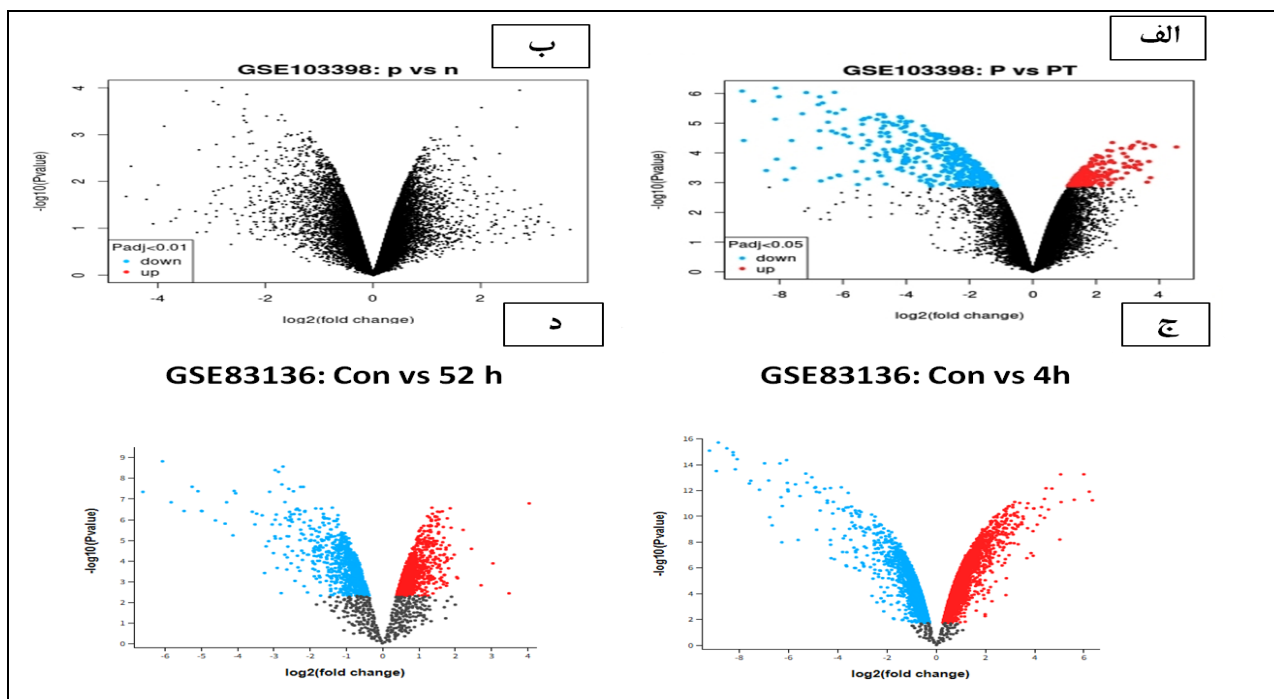
براساس آنالیزهای بیان افتراقی ژن‌ها در داده‌های مربوط به پلتفرم GSE103398، تعداد ۱۲۸۹ ژن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و $|\log_2FC| > 1$ ، تفاوت معنی‌داری در تیمار P+T نسبت به P نشان دادند که از این میان ۵۰۹ ژن افزایش و ۷۸۰ ژن کاهش بیان داشتند. حال آنکه در مقایسه پروفایل بیانی ژن‌ها در تیمار P نسبت به گیاهان شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین ژن‌هایی با بیان افتراقی در داده‌های مربوط به پلتفرم GSE83136 در دو تیمار ۴ و ۵۲ ساعت پس از پرایمینگ نسبت به گیاهان شاهد مشخص شدند. بر این اساس ۴۰۱ ژن با بیان افتراقی در تیمار ۴ ساعت پس از پرایمینگ نسبت به تیمار شاهد مشخص شد که از این میان ۱۶۹ ژن افزایش و ۲۳۲ ژن کاهش بیان نشان دادند. در تیمار ۵۲ ساعت پس از پرایمینگ نیز ۹۶ ژن با بیان افتراقی مشخص شد که از این میان، ۸۷ ژن بیان افزایشی و ۹ ژن بیان کاهشی داشتند. نمودار آتشفشانی ژن‌هایی با بیان افتراقی در تیمارهای فوق‌الذکر در شکل ۱ نشان داده شده است. از آنجا که

از آنجا که نقش پرایمینگ دمایی در وضعیت رشدی کوتیلدون‌ها و پاسخ‌های فنوتیپی سازگاری گیاهچه‌های آرابیدوپسیس در اکوتیپ‌های وحشی آرابیدوپسیس در دوره‌های زمانی متفاوت پس از فراغت از تنش اول و در رژیم‌های حرارتی متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است (Stief *et al.*, 2014a & Ling *et al.*, 2018)، لذا استفاده از پلتفرم پرایمینگ می‌تواند به‌عنوان ابزار مناسب مطالعه مکانیسم استقرار و تداوم تحمل گرمایی در مقیاس ژنومی و در سطح رونویسی الگوهای افتراقی بیان ژن مورد استفاده قرار گیرد. از این‌رو، از داده‌های ریزآرایه آرابیدوپسیس موجود در پایگاه داده GEO^۱ مربوط به پلتفرم GSE103398 به آدرس (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) استفاده شد و اندازه‌گیری میزان بیان ژن نیز با استفاده از پلتفرم Affymetrix Arabidopsis ATH1 Genome Array مورد ارزیابی قرار گرفت. بر مبنای الگوی بیانی قدرتمندتر ژن‌های حافظه‌ای پس از تنش دوم نسبت به تنش اول، پروفایل بیانی ژن‌ها در تیمار P+T نسبت به تیمار P سنجیده شد. براساس آزمایش طراحی‌شده داده‌های تیمار P مربوط به نمونه‌هایی بود که به‌مدت یک ساعت تحت تنش ملایم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند و نمونه‌گیری ۳ روز پس از اعمال تنش انجام شده بود (فاز حافظه) و داده‌های تیمار P+T مربوط به نمونه‌هایی بود که سه روز پس از فراغت از تنش اول در معرض تنش دوم (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت) قرار گرفته بودند و نمونه‌گیری بلافاصله پس از اعمال تنش دوم (تنش برگشتی) انجام شده بود. داده‌های مربوط به تیمار شاهد نیز گیاهانی بودند که در تمام طول مدت آزمایش در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفته بودند (Liu *et al.*, 2018b). از سوی دیگر باتوجه به تداوم بیان افتراقی ژن‌های حافظه تنش پس از فراغت از تنش اول در فاز حافظه (Stief *et al.*, 2014a)، داده‌های ریزآرایه گیاهچه‌های آرابیدوپسیس براساس پلتفرم GSE83136 مربوط به دو تیمار ۴ و ۵۲ ساعت پس از فراغت از تنش گرمایی اولیه نیز مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور داده‌های خام دریافت‌شده از پایگاه با استفاده از بسته Limma (Ritchie *et al.*, 2015)، نرم‌افزار R براساس روش تحلیل مؤلفه‌های اساسی^۲ ارزیابی شده و نرمال‌سازی داخل ریزآرایه‌ها

1. Gene expression omnibus
2. Principle Component Analysis (PCA)

اطلاعات مربوط به تغییرات بیان برخی از این ژن‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

القای بیان ژن‌های حافظه‌ای پس از پرایمینگ (فاز حافظه) همچنان حفظ می‌شود (Stief et al., 2014b). بر این مبنای ژن‌هایی که بیان افتراقی خود را در هر دو تیمار ۴ و ۵۲ ساعت پس از پرایمینگ همچنان حفظ کرده بودند (۳۹ ژن با بیان افزایشی و ۴ ژن با بیان کاهش‌ی)، به‌عنوان ژن‌های حافظه‌ای معرفی شدند که



شکل ۱. نمودار آنتشفسانی ژن‌هایی با بیان افتراقی در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس در تیمار P+T نسبت به تیمار P (الف)، تیمار P نسبت به N مربوط به داده‌های مربوط به پلتفرم GSE103398 (ب)، در تیمار ۴ ساعت (ج) و ۵۲ ساعت (د) پس از اعمال تنش نسبت به شرایط کنترل مربوط به داده‌های مربوط به پلتفرم GSE83136.

داد که DEG‌هایی که در استقرار حافظه تنش گرمایی نقش دارند، علاوه بر DEG‌های مرتبط با تنش گرما با سایر DEG‌های مرتبط با تنش‌های شوری، با کمبود آب و شرایط هیپوکسی ارتباط دارند. همچنین در بخش سلولی (CC) مهم‌ترین عبارت‌ها برای ژن‌های افتراقی (با بیان افزایشی) در هسته (GO:0005634)، سیتوپلاسم (سیتوزول) (GO:0005737)، غشاء پلاسمایی (GO:0005886) و استرومای کلروپلاست (GO:0009570) قرار گرفته بودند. در بخش عملکرد مولکولی (MF)، مهم‌ترین عبارت‌ها برای ژن‌هایی با بیان افتراقی افزایش یافته مربوط به فعالیت فاکتورهای رونویسی (GO:0003700)، اتصال به پروتئین (GO:0005515)، اتصال به توالی خاص DNA (GO:0043565) بودند که از این میان می‌توان به فاکتورهای شوک گرمایی *HSFA1D*, *HSFA1E*, *HSFA7A*

ارزیابی هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی در مقایسه تیماری P+T/P در پلتفرم GSE103398 در پایگاه DAVID و دسته‌بندی "عبارت‌ها" به سه دسته بیولوژیکی، سلولی، مولکولی^۳ (شکل ۲ الف) نشان داد که در فرایند بیولوژیکی (BP)، مهم‌ترین عبارت‌ها برای ژن‌های افتراقی افزایش یافته، مربوط به تنظیم رونویسی (GO:0006355)، پاسخ به آسزیک اسید (GO:0006355)، پاسخ به گرما (GO:0009408)، پاسخ به تنش شوری (GO:0009651)، ریتم شبانه‌روزی (GO:0007623)، پاسخ سلولی به هیپوکسی (GO:0071456) و پاسخ به کمبود آب (GO:0009414) بودند. این یافته‌ها نشان

1. Biological process (BP)
2. Cellular component (CC)
3. Molecular function (MF)

تاخوردگی پروتئین نقش دارد. پروتئین‌های BAG خانواده‌ای از کمک‌چپرون‌ها با عملکرد چندگانه هستند که با محافظت از بخش‌های طویل آبگریز پروتئین‌ها، به‌طور مؤثری از تجمع یا برهم‌کنش نامناسب آن‌ها جلوگیری می‌کنند. عملکردهای بیولوژیکی سیستم چپرونی که به‌واسطه BAG6 هدایت می‌شود برای سوبستراهای مختلف متفاوت بوده و از نقش آن‌ها در یکپارچگی غشا تا تخریب به‌وسیله سیستم پروتازوم متفاوت می‌باشد (Lee and Ye, 2013).

اخیرا نقش این پروتئین در پاسخ به تنش گرما در آرابیدوپسیس تأیید شده است (Arif *et al.*, 2021). پروتئین کد شده توسط ژن *GOLSI²* علاوه بر سهیم‌بودن در فرایندهای زیستی پاسخ به تنش گرما و شوری، در پاسخ به تنش اکسیداتیو (GO:0006979) نیز نقش دارد. آنزیم کد شده توسط این ژن، سنتز گالاکتینول را از UDP-گالاکتوز و میواینوزیتول در مسیر بیوسنتزی رافینوز کاتالیز می‌کند. رونویسی این ژن تحت تنش گرما به‌وسیله تنظیم‌کننده رونویسی فاکتورهای شوک گرمایی HSF3 کنترل می‌شود (Panikulangara *et al.*, 2004).

عملکرد بیولوژیکی این حفاظت‌کننده اسمزی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و زیستی تأیید شده است (dos Santos *et al.*, 2020). *EGY3³* نیز براساس آنالیز غنی‌سازی ژن‌ها در فرایندهای زیستی پاسخ به تنش گرما و شوری نقش دارد. این پروتئین کلروپلاستی یک دومین اتصال به زینک دارد که تحت شرایط تنش با پایداری آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نقش مهمی در هموستازی ترکیبات ROS و تحمل به تنش شوری دارد (Zhuang *et al.*, 2021). *HSA32* نیز براساس آنالیز غنی‌سازی ژن‌ها به پاسخ به تنش گرما و خوگیری به گرما (GO:0010286) اختصاص یافت. در بخش سلولی، بیشترین فعالیت ژن‌های با بیان افتراقی به سیتوپلاسم (GO:0005737) اختصاص یافت.

آنالیز غنی‌سازی در بخش عملکرد مولکولی (شکل ۲ ب) نشان داد که بیشترین فعالیت ژن‌های حافظه تنش به عبارت "اتصال به پروتئین‌های تانخورده" (GO:0051082) اختصاص یافت که به عملکرد ژن‌های *HSP17.4*, *ATHSP22.0*, *HSP70B*, *HSP17.6A*, *HSP70T-2*, *HSP18.2*, *HSP70B*, *HSP17.6A*,

HSFA2, *HSFB2A*, *HSFA3* اشاره کرد. علاوه بر فاکتورهای شوک گرمایی، اعضای از خانواده فاکتورهای رونویسی نظیر MYB، bZIP، Zinc finger، فاکتور پاسخ به اتیلن، فاکتور متصل‌شونده به عنصر پاسخ‌دهنده به آبسزیک اسید و AP2 در عبارت فعالیت فاکتورهای رونویسی شناسایی شدند. همچنین مشخص شد که عملکرد مولکولی ژن‌های *HSP70T-2*, *HSP70*, *BIP2*, *HSP70B* مربوط به عبارت‌های "اتصال به پروتئین‌های مؤثر در تاخوردگی پروتئین" (GO:0044183)، "اتصال به پروتئین‌های شوک گرما" (GO:0031072) و "اتصال به پروتئین‌هایی که به اشتباه تا خورده‌اند" (GO:0051787) می‌باشد. بدین ترتیب می‌توان استنباط کرد که این عوامل با تأثیر در فعالیت رونویسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به گرما، تنظیم سیستم‌های آنتی‌اکسیداتی و هموستازی پروتئین‌های واسرشت شده می‌توانند نقش مهمی در استقرار تحمل اکتسابی نسبت به تنش گرما داشته باشند.

دسته‌بندی هستی‌شناسی ژن‌های حافظه‌ای با بیان افزایشی مربوط به آزمایش تداوم الگوهای بیانی در هر دو تیمار ۴ و ۵۲ ساعت پس از اعمال پرایمینگ دمایی براساس پلتفرم GSE83136 نشان داد که بیشترین فعالیت ژن‌های حافظه‌ای در بخش فرایندهای بیولوژیکی مربوط به عبارت‌های پاسخ به گرما (GO:0009408)، تاخوردگی پروتئین (GO:0006457) و پاسخ به تنش شوری (GO:0009651) می‌باشد (شکل ۲ ب). بر این اساس، آنالیز غنی‌سازی ژن‌ها نشان داد که ژن‌های *HSP17.4*, *HSP17.6A*, *ATHSP22.0*, *HSP18.2*, *HSP17.6A* در فرایندهای زیستی (BP) مختلف نظیر پاسخ به تنش گرما (GO:0009408)، تاخوردگی پروتئین (GO:0006457)، پاسخ به تنش شوری (GO:0009651)، پاسخ سلولی به پراکسید هیدروژن (GO:0042542) و پاسخ سلولی به هیپوکسی (GO:0071456) نقش دارند. ژن‌های *HSP70T-2* و *HSP70B* در فرایندهای زیستی پاسخ به گرما (GO:0009408)، تاخوردگی پروتئین (GO:0006457)، پاسخ سلولی به پروتئین‌های تانخورده (GO:0034620)، تاخوردگی مجدد پروتئین (GO:0042026) و تاخوردگی پروتئین هدایت‌شده توسط چپرون‌ها (GO:0051085) نقش دارند. پروتئین کد شده توسط ژن *BAG6* در فرایندهای زیستی پاسخ به تنش گرما و

2. Galactinol synthase 1

3. Ethylene-dependent gravitropism-deficient and yellow-green-like 3

1. Bcl-2 associated athanogene 6

ژن‌های مذکور را به‌عنوان ژن‌های کاندید حافظه تنش گرمایی معرفی کرد. در آزمایش دیگری نقش پرایمینگ دمایی در پروفایل بیانی ژن‌ها در گیاه برنج مورد ارزیابی قرار گرفت و مشابه نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق کنونی، بیان دسته‌ای از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های شوک گرمایی نظیر *HSP70-15*، *HSP70*، میتوکندریایی، *HSP90-6* میتوکندریایی، *HSP70* کلروپلاستی و همچنین بیان برخی فاکتورهای تنش گرمایی نظیر *HSFA-9*، *HSFA-4d* در تیمار P+T نسبت به تیمار P دو تا چهار برابر افزایش نشان داد (Kushawaha et al., 2021). همچنین در آزمایش دیگری نتایج حاصل از تطبیق داده‌های RNA-Seq با نتایج qRT-PCR نشان داد مجموعه‌ای از ژن‌های تنظیم‌شده در سطح رونویسی متشکل از *HSP22*، *HSP101*، *HSP18.5*، *HSP21*، *HSP70B*، *HSP18.2* و *HSF*‌های *HSF32*، *HSFA2* و *HSFB2b* نقش مهمی در استقرار و تداوم حافظه تنش گرمایی دارند (Ling et al., 2018)

در تحقیق حاضر، مقایسه الگوی بیانی ژن‌ها در تیمار P نسبت به گیاهان شاهد نشان داد که پروفایل بیانی ژن‌ها پس از گذشت سه روز از پرایمینگ دمایی تفاوت معنی‌داری با الگوی بیانی ژن‌ها در تیمار شاهد نداشت (شکل ۱ ب). این یافته‌ها نشان داد که ژن‌های حافظه‌ای بیان مداومی در طول فاز حافظه ندارند و در حقیقت پس از گذشت سه روز از پرایمینگ دمایی، سطح بیان این ژن‌ها به سطح نرمال برگشته است، اما به نظر می‌رسد آنچه سبب القای شدید بیان این ژن‌ها پس از تنش دوم (P+T) شده است، تداوم نشانه‌گذاری اپی‌ژنتیکی در ناحیه پروموتری این ژن‌ها در فاز حافظه می‌باشد. از سوی دیگر القای قدرتمند ژن *HSFA2* در تیمار P+T نسبت به P (افزایش ۹ برابری) می‌تواند تداوم تغییرات اپی‌ژنتیکی در ناحیه پروموتری ژن‌های حافظه‌ای و استمرار بیان آن‌ها پس از تنش دوم را تضمین نماید.

HSP17.6II مربوط می‌شد. این یافته‌ها نشان داد که ژن‌های مؤثر در تداوم حافظه تنش گرمایی بیشتر مرتبط به عملکرد پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک و کمک‌چپرون‌ها می‌باشند که در فرایندهای پاسخ به تنش گرما، خوگیری به گرما، تاخوردگی پروتئین، تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها و الیگومریزاسیون پروتئین‌ها مشارکت دارند. همچنین مشخص شد که DEG‌هایی که به تنش گرمایی پاسخ می‌دهند با سایر DEG‌های مرتبط با تنش شوری، تنش اکسیداتیو، پاسخ به پراکسید هیدروژن و پاسخ به هیپوکسی نیز ارتباط متقابل دارند.

ژن‌هایی با بیان افزایشی مربوط به عبارت پاسخ به گرما برای شناسایی و ترسیم شبکه برهم‌کنش پروتئینی در داده‌های مربوط به آزمایش مقایسه تیماری P+T/P مبتنی بر داده‌های پلتفرم GSE103398 انتخاب شدند (شکل ۳ الف). همچنین اطلاعات "ژن‌های کلیدی" با بالاترین درجه ارتباط با عبارت پاسخ به گرما در داده‌های مذکور در جدول ۲ مشخص شده است. براساس تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه مشخص شد که درخصوص *HSFA1E*، *HSFA7A*، *HSFA3*، *HSFA2* و *HSFA1E*، ژن‌های P+T (پرایمینگ و به‌دنبال آن تنش برگشتی) به ترتیب ۹/۱۸، ۳/۸۶، ۴/۷۲ و ۴/۱۶ برابر نسبت به تیمار P (پرایمینگ بدون تنش برگشتی) افزایش بیان نشان دادند. همچنین درخصوص *HSP*‌ها، تغییرات بیان ژن‌های *HSP70T*، *HSP70*، *HSP70b*، *HSP91* و *HSP60* در تیمار P+T نسبت به P به ترتیب ۴/۴۵، ۵/۵۲، ۸/۱۲۲، ۳/۳۱۵ و ۲/۳۸ برابر افزایش بیان نشان دادند.

درخصوص *HSP*‌های کوچک (sHSPs) تغییرات بیان ژن‌های *HSP21* و *HSA32* در تیمار P+T نسبت به P به ترتیب ۸/۳۲ و ۲/۴۲ برابر افزایش بیان نشان داد. از آنجا که فعال شدن بیان این ژن‌ها به محض رویارویی با تنش دوم (تنش برگشتی) در سطح بالاتری نسبت به تنش اول اتفاق افتاده است، لذا الگوی بیانی این دسته از ژن‌ها با الگوی بیانی ژن‌های حافظه‌ای (Lämke et al., 2016b) مطابقت دارد. بر این اساس می‌توان

جدول ۱. ژن‌های حافظه‌ای که بیان افزایشی خود را در هر دو تیمار ۴ و ۵۲ ساعت پس از پرایمینگ نسبت به کنترل حفظ کرده‌اند (سطح معنی‌داری ۵ درصد $\log_2 FC \geq 2$).

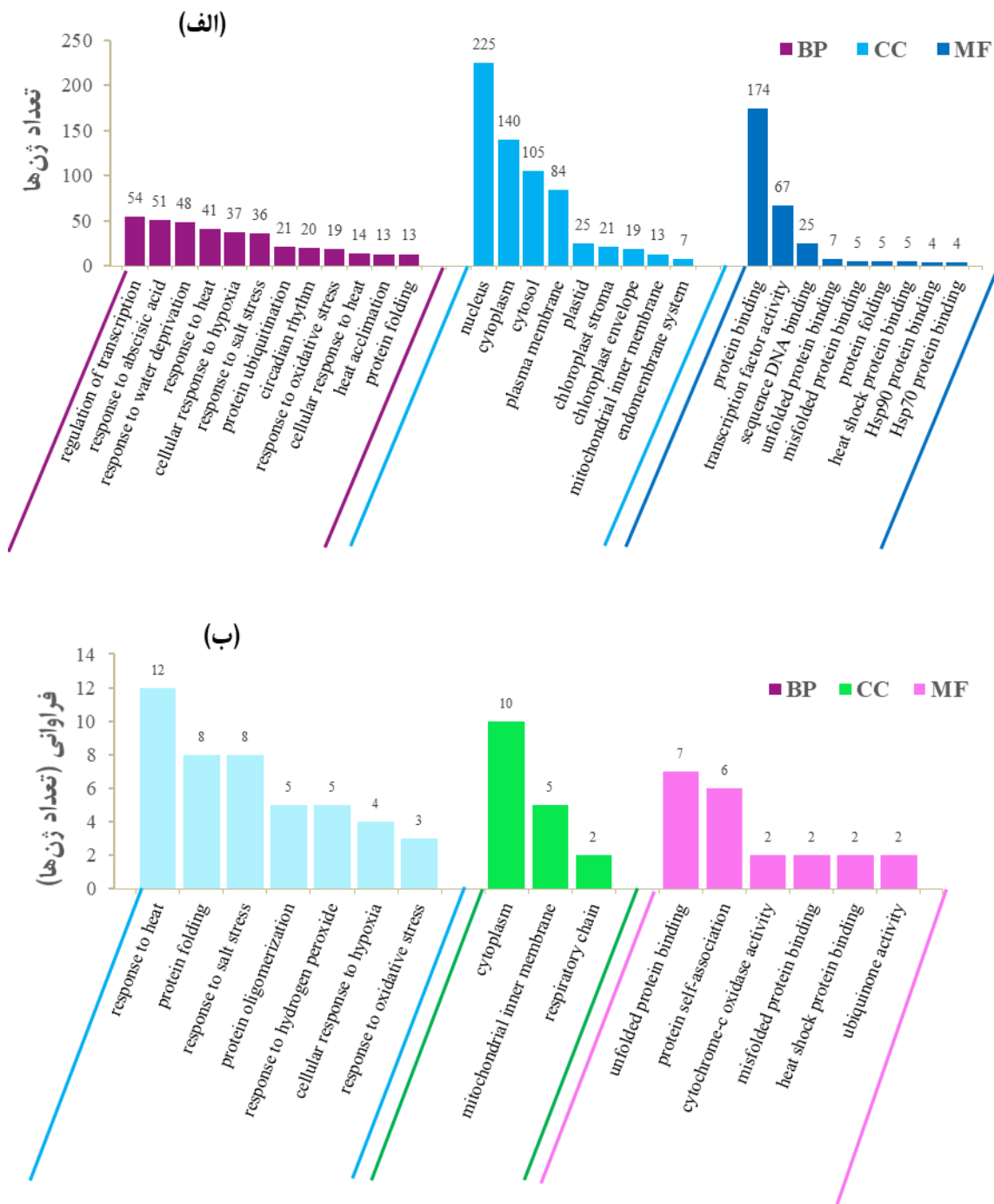
ردیف	نام ژن	Log FC (4 h after ACC)	logFC(52 h after ACC)
1	<i>HSP17.6 C</i>	9.201	5.83
2	<i>HSP17.6A</i>	8.92	6.6
3	<i>HSP17.6II</i>	8.84	4.99
4	<i>HSP18.2</i>	8.49	6.64
5	<i>HSP21</i>	8.24	4.34
6	<i>HSP22</i>	8.23	5.47
7	<i>nad6</i>	8.7	3.6
8	<i>HSP22.0</i>	8.07	5.25
9	<i>APX2</i>	7.58	5.09
10	<i>nad5</i>	7.52	3.47
11	<i>HSA32</i>	4.92	2.35
12	<i>Hsp70b</i>	6.65	3.21
13	<i>ROF2</i>	6.34	2.45
14	<i>HSP23.6-MITO</i>	6.3	2.33
15	<i>BAG6</i>	6.26	2.28
15	<i>COX1</i>	6.07	2.74
17	<i>EGY3</i>	6.04	2.6
18	<i>Gols1</i>	6.06	4.98

نگهدارنده‌هایی مانند HSPهای کوچک^۴ (sHSP) مونومرهایی با جرم مولکولی بین ۱۲ تا ۴۲ کیلو دالتون هستند که قادر به تازدن مجدد پروتئین‌های واسرشت‌شده نیستند، اما می‌توانند با اتصال انتخابی به پروتئین‌های تان شده و تسهیل تا زدن مجدد آن‌ها توسط دیگر چاپرون‌های وابسته به ATP، محافظت فوری در برابر شرایط نامطلوب ایجاد نمایند (Wang *et al.*, 2004)، همچنین این پروتئین‌ها با اتصال به بخش‌های آگریز پروتئین‌های تان‌خورده از تجمع آن‌ها جلوگیری می‌کنند (Haslbeck *et al.*, 2019) و در نهایت، جداسازهایی مانند Hsp100 از زیرخانواده ClpB پلی‌پپتیدهای انباشته‌شده را می‌شکنند و آن‌ها را از هم جدا می‌کنند (Mogk *et al.*, 2018).

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) براساس عملکردشان به انواع تاکنده/ بازکننده تاخوردگی^۱، نگهدارنده^۲ و تفکیک‌کننده^۳ تقسیم‌بندی می‌شوند. فولدازهایی مانند سیستم چاپرونین Hsp60، Hsp70 و Hsp90 در یک مکانیسم وابسته به ATP به تاخوردگی سوبسترای خود کمک می‌کنند (Hall, 2020). هنگامی که پروتئینی قابل ترمیم نباشد یا وجود آن دیگر ضروری نباشد و نیاز به از بین بردن آن وجود داشته باشد، بازکنندگان تاخوردگی پروتئین نظیر Hsp100 می‌توانند تاخوردگی پروتئین آسیب‌دیده را باز کرده و برای حذف، آن را به یک پروتئاز تحویل دهند (Sauer and Baker, 2011).

1. Foldase/Unfoldase
2. Holdase
3. Disaggregase

4. Short heat shock protein



شکل ۲. دسته‌بندی هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی با بیان افزایشی مربوط به داده‌هایی مبتنی بر پلتفرم GSE103398 (الف) و داده‌هایی با پلتفرم GSE83136 (ب)

جدول ۲. ژن‌های حافظه تنش گرمای شناسایی شده در عبارت "پاسخ به گرما، پاسخ سلولی به گرما و خوگیری به گرما" مربوط به داده‌هایی مبتنی بر پلتفرم GSE103398 (در مقایسه تیماری (P+T/P) براساس درجه، مرکزیت میانی و مرکزیت درونی

مرکزیت درونی	مرکزیت میانی	درجه ارتباط با گره‌های دیگر	نام ژن	دسته‌بندی ژن‌ها
Closeness Centrality	Betweenness Centrality	Degree	Gene Name	Genes Classification
۰/۶۱	۴۳۲/۹۶	۲۲	<i>HSFA2</i>	
۰/۵۱	۳۴/۳۳	۱۵	<i>HSFA3</i>	فاکتورهای تنش گرما
۰/۴۹	۱۱/۱۰	۱۱	<i>HSFA7A</i>	(HSFs)
۰/۴۸	۸/۷۳	۹	<i>HSFA1E</i>	
۰/۶۱	۳۱۲/۵	۲۷	<i>HSP70</i>	
۰/۶۰	۱۳۲/۷	۲۵	<i>HSP101</i>	پروتئین‌های شوک گرمایی
۰/۵۴	۶۰	۲۴	<i>HSP70T-2</i>	(HSPs)
۰/۵	۳۰	۲۱	<i>HSP70b</i>	
۰/۵	۱۵/۸۵	۱۸	<i>HSP91</i>	
۰/۵	۱۹	۱۷	<i>HSP60</i>	
۰/۴۹	۹/۷	۱۶	<i>HSP21</i>	پروتئین‌های شوک گرمایی کوچک
۰/۵۳	۵۸/۳۳	۱۴	<i>HSA32</i>	(sHSPs)

HSP70 توسط یک پروتئین القاء شده توسط تنش (HOP) که به‌عنوان پروتئین سازمان‌دهنده Hsp70-Hsp90 می‌باشد، تنظیم می‌شود (Carrigan *et al.*, 2006)، همچنین برهم‌کنش پروتئین ROF1 با پروتئین‌های شوک گرمایی مشهود است (شکل ۳ ب). مطالعات نشان داده است که در شرایط نرمال حرارتی، کمپلکس HSP90.1 و ROF1 در سیتوپلاسم حضور دارند. در شرایط تنش، پروتئین HSFA2 سبب انتقال آن‌ها به هسته می‌شود. وجود این کمپلکس در هسته سبب تقویت فعالیت HSFA2 و بیان ژن‌های پروتئین‌های شوک گرمایی در طول دوره فراغت از تنش می‌شود، لذا عملکرد HSFA2 و ROF1 در استقرار تحمل گرمایی اکتسابی طولانی‌مدت در گیاهان بسیار حائز اهمیت است (Meiri and Breiman, 2009). مشخص شده است که بیش‌بیان *rofl1* سبب بهبود حافظه تنش گرما می‌شود، حال آنکه موتانت‌های *rofl1* نقص در پاسخ‌های حافظه تنش نشان می‌دهند

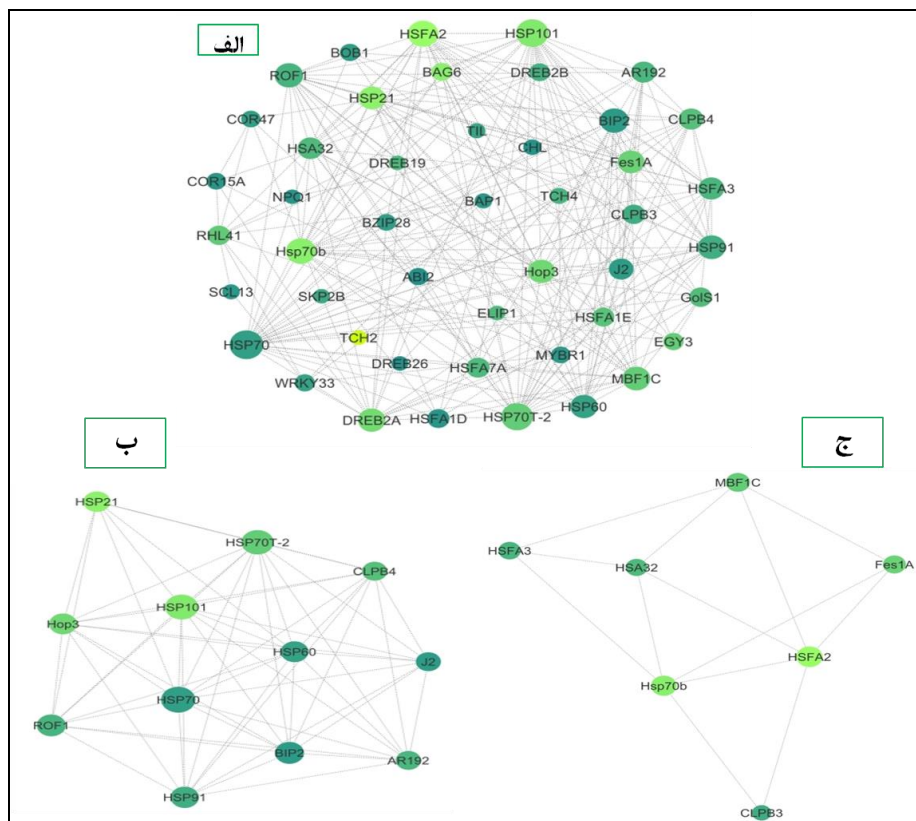
در ادامه، کلاستر بندی ژن‌های مرتبط با شبکه ژنی عبارت "پاسخ به تنش گرما"، کلاستری از برهم‌کنش پروتئین‌های BIP2, HSP70, HSP60, AR192, HSP91, HSP70T-2, HSP21, J2, HOP3, CLPB4, HSP101 و ROF1 را مشخص کرد (شکل ۳ ب). این یافته‌ها نشان داد که برهم‌کنش چپرون‌هایی مانند HSP, BIP2, HSP70, HSP60, HSP91, HSP21 و J2 و AR192، چپرون‌های نگهدارنده نظیر HSP21 و HSP91 جداکننده نظیر ClpB4 و HSP101 در استقرار حافظه رونویسی ناشی از پرایمینگ دمایی، بسیار حائز اهمیت می‌باشند. از سوی دیگر مطابق با نتایج برهم‌کنش پروتئین‌ها در این کلاستر، اثرات متقابل پروتئین HOP با HSP70، برهم‌کنش کمک‌چپرون AR192 با HSP70 و تعامل ROF1 با پروتئین‌های شوک گرمایی تأیید شد. مطالعات نشان داده است که فعالیت HSP90 و

است (Wu *et al.*, 2013). FES1A یکی دیگر از اجزای شناخته‌شده این کلاستر (شکل ۳ ج)، به عنوان یک عامل تبادل نوکلئوتیدی^۱ (NEFs) سیتوزولی، نقش مهمی در چرخه عملکرد HSP70 از طریق جداسازی ADP از آن برعهده دارد (Dragovic *et al.*, 2006). علاوه بر این، FES1 در تخریب پروتئین‌های سیتوزولی که به اشتباه تا خورده‌اند نیز نقش دارد (Gowda *et al.*, 2016). در آراییدوپسیس، خاموشی FES1A حساسیت گیاه به تنش گرمایی را افزایش می‌دهد (Zhang *et al.*, 2010). از دیگر اجزای پروتئینی شناسایی شده در کلاستر حاصل از شبکه برهم‌کنش پروتئین‌های موجود در عبارت پاسخ به تنش گرما (شکل ۳ ج) می‌توان به MBF1C اشاره کرد. مطالعات نشان داده است که القای بیان کمک فعال‌کننده رونویسی MBF1C توسط HSFA1 تنظیم می‌شود (مقاله مروری Khan *et al.*, 2022).

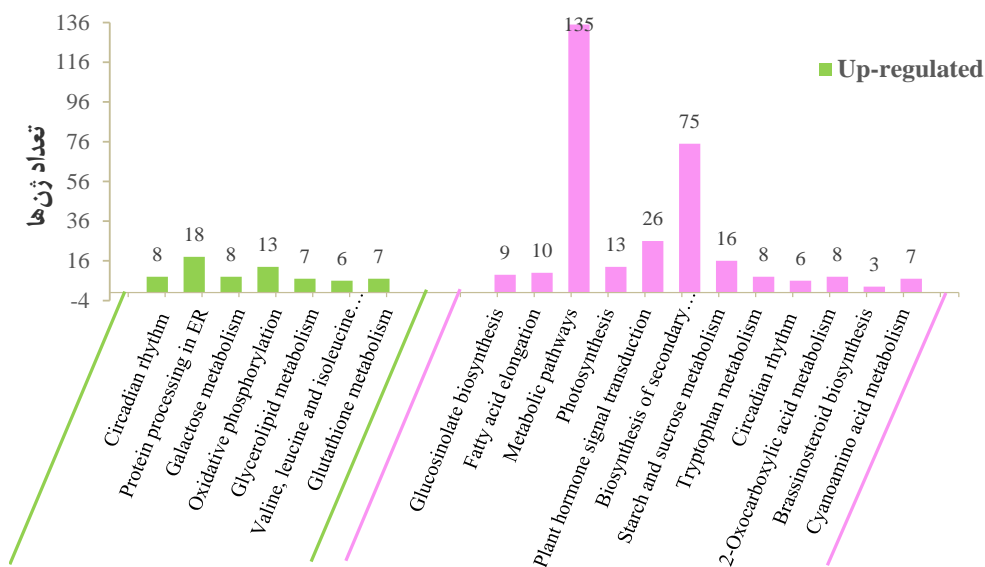
براساس بررسی مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده KEGG مربوط به داده‌هایی با بیان افزایشی در مقایسه تیماری P+T/P (شکل ۴) و داده‌های مربوط به تداوم الگوی افتراقی تا ۵۲ ساعت پس از پرایمینگ، مشخص شد که مسیرهای پردازش پروتئین در شبکه اندوپلاسمی و فسفریلاسیون اکسیداتیو نقش برجسته‌ای در مکانیسم‌های خوگیری به تنش دمایی بالا به واسطه ترموپرایمینگ برعهده دارند. در مطالعات قبلی نیز مشخص شده بود که با توجه به القای زود هنگام و شدید پروتئین‌های شوک گرمایی پس از تنش گرمایی نقش عملکردی مسیر متابولیکی پردازش پروتئین در شبکه اندوپلاسمی در دریافت و سیگنالینگ تنش دمایی بالا اهمیت دارد (Nollen and Morimoto, 2002 & Zhou *et al.*, 2022).

(Standaert *et al.*, 1990 & Meiri and Breiman, 2009). در مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهد که Hsp70 علاوه بر عملکردش در جلوگیری از تجمع پروتئین‌های دناتوره شده و کمک به تاخوردن مجدد پروتئین‌های دناتوره شده ناشی از تنش گرما (Mayer and Gierasch, 2019)، با HSFها، کمک‌چپرون‌ها و سایر پروتئین‌ها نیز برهم‌کنش دارد و بدین ترتیب شبکه سیگنالینگ پیچیده‌ای را هماهنگ می‌کند و می‌تواند نقش مهمی در بروز پاسخ‌های تنش گرمایی و حافظه رونویسی داشته باشد (Zuiderweg *et al.*, 2017).

دومین کلاستر از شبکه برهم‌کنش پروتئینی متشکل از پروتئین‌های HSA32، HSP70B، HSFA2، HSFA3، CLPB3 و FES1A (شکل ۳ ج). مطالعات قبلی نشان داده است که HSA32 نقش مهمی در تداوم حافظه تنش گرما دارد (Bäurle, 2016). این فعال‌کننده رونویسی از طریق تغییراتی که در ساختار کروماتین ایجاد می‌کند برای حفظ فعالیت ژن‌های حافظه‌ای ضروری می‌باشد (Brzezinka *et al.*, 2019). HSFA2، پروتئین شبه‌چپرون HSA32 را فعال می‌کند که این فرایند نقش مهمی در حفظ هموستازی سلول در دمای بالا دارد (Charng *et al.*, 2006 & Lin *et al.*, 2014). از سوی دیگر مشخص شده است که در آراییدوپسیس حافظه خوگیری به گرما در غیاب پروتئین HSA32 سریع‌تر از بین می‌رود، به گونه‌ای که موتانت‌های HSA32 به صورت کوتاه‌مدت قادر به حفظ تحمل حرارتی اکتسابی هستند اما در استقرار تحمل حرارتی اکتسابی طولانی‌مدت ناتوان هستند (Yeh *et al.*, 2012)، از سوی دیگر CIPB3 از اعضای خانواده ClpB/Hsp100، همولوگی از پروتئین‌های HSP101 موجود در کلروپلاست است که از طریق دخالت در تشکیل غشای داخلی تیلاکوئیدها و تمایز پلاستیدها در تحمل کلروپلاست‌ها به تنش گرما بسیار اثرگذار است (Mishra and Grover, 2016 & Parcerisa *et al.*, 2020). بررسی‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی نشان داد که HSP101 میزان ترجمه HSA32 را پس از فراغت از تنش گرما در فاز حافظه افزایش می‌دهد. در عوض HSA32 نیز تجزیه HSP101 را به تأخیر می‌اندازد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که HSA32 به تنهایی در غیاب HSP101 قادر به ایجاد تحمل گرمایی اکتسابی طولانی‌مدت نیست، بلکه حلقه بازخوردی مثبتی که بین این دو پروتئین وجود دارد در تداوم حافظه خوگیری به تنش گرما در آراییدوپسیس و سازگاری به نوسانات شدید دمایی بسیار مؤثر



شکل ۳. شبکه برهم‌کنش پروتئینی ژن‌های کلیدی (در مقایسه تیماری P+T/P) در ارتباط با عبارت پاسخ به گرما در داده‌های مربوط به پلتفرم GSE103398 در آراییدوپسیس (الف) و کلاسترهای حاصل از آن (ب و ج).

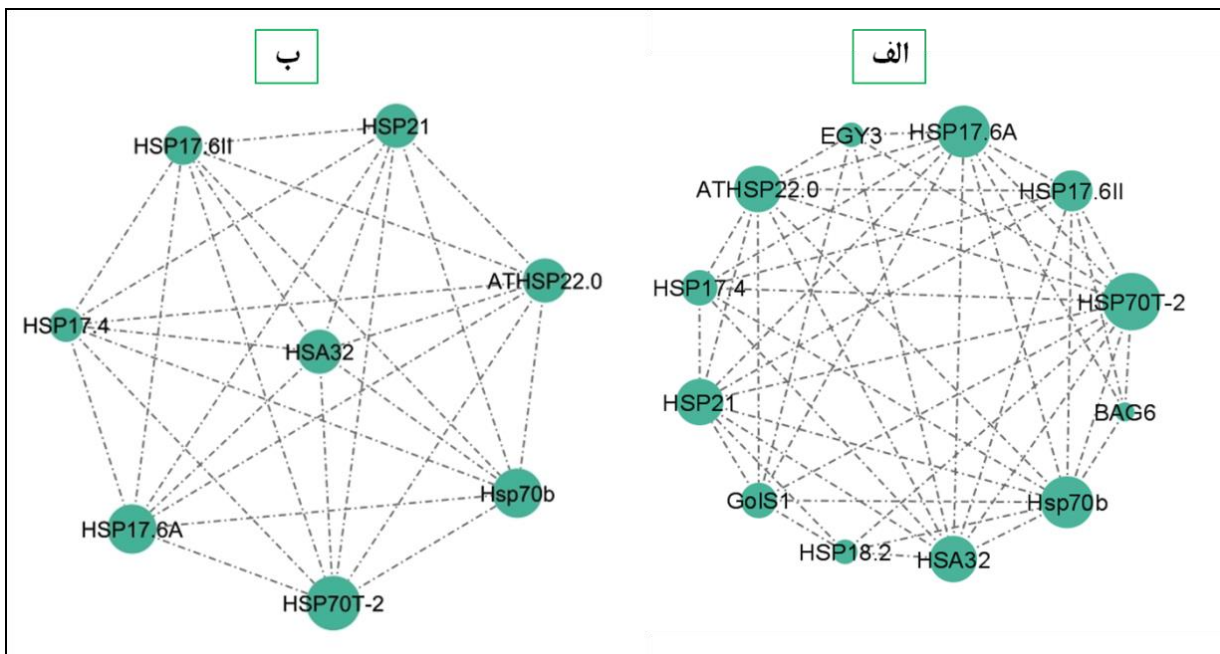


شکل ۴. بررسی مسیر KEGG ژن‌هایی با بیان افتراقی مرتبط با حافظه تنش گرمایی در آراییدوپسیس در داده‌های مربوط به پلتفرم GSE103398 (مقایسه تیماری P+T/P)

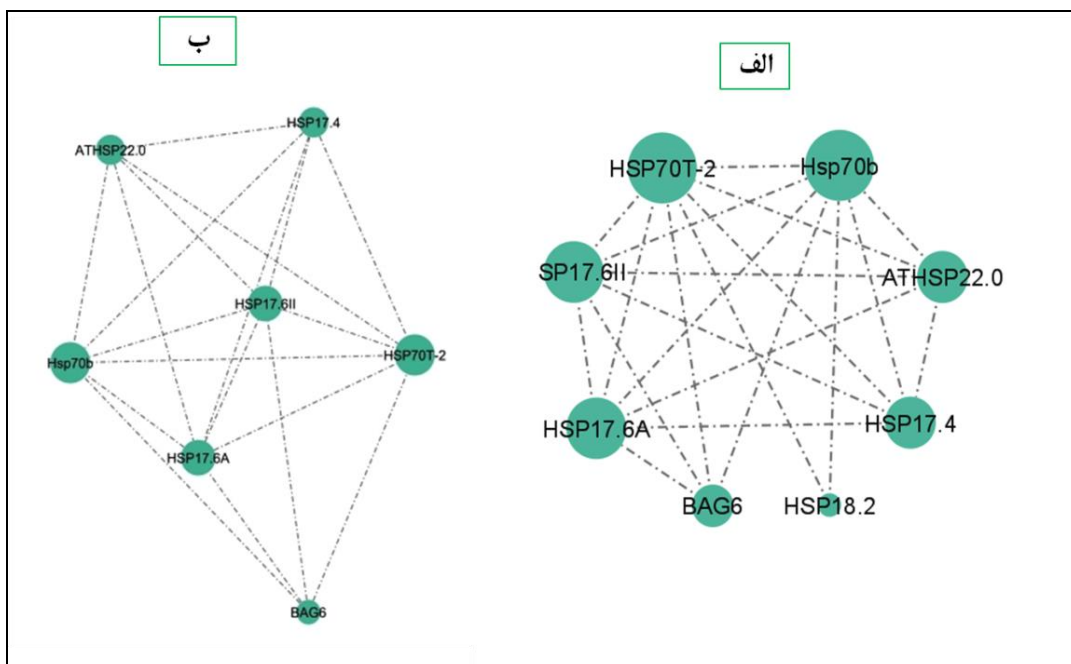
بررسی تعامل عوامل رونویسی و عناصر تنظیمی سیس^۱ (CRE) در ناحیه پرموتوری ژن‌های هم بیان، اطلاعات مفیدی در خصوص مکانیسم‌های تنظیمی بیان ژن ارائه می‌دهد (Heidari *et al.*, 2015). در مطالعه اخیر نتایج حاصل از بررسی عناصر تنظیمی بالادست ژن‌های حافظه تنش گرمایی نشان داد که که توالی‌های CRE بالادست ژن‌های کاندید حافظه تنش گرما عمدتاً با عوامل رونویسی خانواده ARR-B، MYB، MYB/SANT، MYB، MYB-related، HD-bZIP، AP2، RAV، bHLH، GATA، tify تعامل دارند. اطلاعات تکمیلی در خصوص برخی فاکتورهای رونویسی و جایگاه اتصال آن‌ها^۲ در جدول ۴ ارائه شده است. همچنین براساس اطلاعات موجود در پایگاه PlantPromoterDB (<https://ppdb.agr.gifu-u.ac.jp>) مشخص شد که موتیف ACGT که جایگاه اتصال پروتئین‌های bZIP می‌باشد و در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارد (Rolly *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020)، در ناحیه پرموتوری ژن‌های هدف وجود دارد. این فاکتورهای رونویسی که دارای یک دومین bZIP حفاظت شده متشکل از ناحیه اتصال به DNA و ناحیه Leu Zipper می‌باشند، نقش مهمی در تنظیم شبکه‌های رونویسی در یوکاریوت‌ها بر عهده دارند (Jakoby *et al.*, 2002).

در بررسی اجزای مؤثر در تداوم حافظه رونویسی درخصوص داده‌هایی با بیان افزایشی مربوط به پلتفرم GSE83136، ۱۲ ژن در عبارت پاسخ به تنش گرما و ۸ ژن در عبارت تاخوردگی پروتئین شناسایی شدند. شبکه برهم‌کنش پروتئینی و کلاستر حاصل از شبکه‌های دو عبارت پاسخ به گرما و تاخوردگی پروتئین بترتیب در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. همچنین اطلاعات "ژن‌های حافظه‌ای کلیدی" با بالاترین درجه ارتباط با عبارت پاسخ به گرما در جدول ۳ مشخص شده است. براساس الگوی بیان حافظه این دسته از ژن‌ها (تداوم بیان افزایشی ۴ و ۵۲ ساعت پس از تنش اول نسبت به شرایط کنترل) مشخص شد که عمده ژن‌های حافظه‌ای در این شبکه برهم‌کنش پروتئینی، متعلق به خانواده HSP‌های کوچک می‌باشند. مطالعات قبلی نیز نشان داد که ژن‌های sHSPs بیان پایداری را پس از توقف تنش گرمایی (فاز حافظه) نشان می‌دهند (Lämke *et al.*, 2016a)، به‌گونه‌ای که القای بیان ژن‌های HSP21، HSP22 و HSP18.2 در فاز حافظه همچنان ادامه دارد (Sedaghatmehr *et al.*, 2016).

مطالعات دیگر نیز نشان داد که HSP22، HSP18.2 و HSP17.6II با حافظه تنش مرتبط می‌باشند (مقاله مروری Khan *et al.*, 2022). همچنین مشخص شد که جهش در ژن‌هایی مانند HSP21، HSP22، HSP17.6C و HSA32 منجر به نقص در پاسخ‌های سازگاری به گرما می‌شود. در مقابل، بیش‌بیان این ژن‌ها افزایش رشد گیاه و سازگاری به گرما را در مقایسه با گیاهان نوع وحشی به همراه دارد (Lämke *et al.*, 2016a; Sedaghatmeh *et al.*, 2021 & Yamaguchi *et al.*, 2016). از سوی دیگر القای بیان sHSP‌هایی نظیر HSP21، HSP22 و HSP17.6C پس از رویارویی با تنش کشنده گرما در گیاهان پرایم‌شده نسبت به گیاهان پرایم‌نشده قوی‌تر و سریع‌تر بود (Yamaguchi *et al.*, 2021)، از این‌رو، بسیاری از sHSPها به‌عنوان ژن‌های حافظه تنش مورد توجه قرار گرفتند.



شکل ۵. شبکه برهم‌کنش پروتئینی ژن‌های حافظه تنش گرمایی مربوط به عبارت پاسخ به گرما (الف) در آرابییدوپسیس و کلاستر حاصل از آن (ب) در داده‌های مربوط به تداوم الگوی افتراقی تا ۵۲ ساعت پس از پرایمینگ مبتنی بر پلتفرم GSE83136



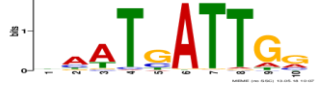

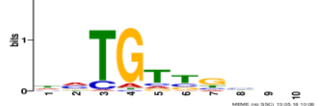


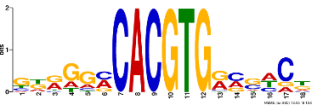



شکل ۶. شبکه برهم‌کنش پروتئینی ژن‌های حافظه تنش گرمایی مربوط به عبارت تاخوردگی پروتئین در آرابییدوپسیس (الف) و کلاستر حاصل از آن (ب) در داده‌های تداوم الگوی افتراقی تا ۵۲ ساعت پس از پرایمینگ مبتنی بر پلتفرم GSE83136

جدول ۳. ژن‌های حافظه تنش گرمایی شناسایی شده در عبارت‌های "پاسخ به گرما" و "تاخوردگی پروتئین" مربوط به داده‌های تداوم الگوی افتراقی تا ۵۲ ساعت پس از پرایمینگ مبتنی بر پلتفرم GSE83136 براساس درجه، مرکزیت میانی و مرکزیت درونی

عبارت	دسته‌بندی ژن‌ها	نام ژن	درجه ارتباط با گره‌های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
پاسخ به تنش گرما	HSPs	<i>HSP70T-2</i>	۱۱	۱۰/۰۱	۱
		<i>Hsp70b</i>	۱۰	۶/۵۵	۰/۹۱
	sHSPs	<i>HSP17.6A</i>	۱۰	۶/۵۵	۰/۹۱
		<i>HSP21</i>	۹	۲/۸۸	۰/۸۴
		<i>HSA32</i>	۹	۴/۲۸	۰/۸۴
		<i>HSP22</i>	۹	۲/۸۸	۰/۸۴
		<i>HSP17.6II</i>	۸	۲	۰/۷۸
		<i>HSP17.4</i>	۷	۰	۰/۷۳
		<i>HSP18.2</i>	۵	۰/۲۸	۰/۶۴
		تاختوردگی پروتئین	HSPs	<i>HSP70T-2</i>	۷
<i>HSP70b</i>	۷			۶	۱
sHSPs	<i>HSP17.6A</i>		۶	۱	۰/۸۷۵
	<i>HSP17.6II</i>		۶	۱	۰/۸۷۵
	<i>HSP17.4</i>		۵	۰	۰/۷۷
	<i>HSP22</i>		۵	۰	۰/۷۷
	<i>HSP18.2</i>		۲	۰	۰/۵۸

جدول ۴. لیست برخی CREها و عوامل رونویسی اتصالی در ناحیه پروموتوری ژن‌های کاندید حافظه تنش گرما

عملکرد ژن	توالی لوگو (عناصر سیسی)	خانواده فاکتور رونویسی	نام ژن (فاکتور رونویسی)
فاکتور رونویسی مؤثر در تنظیم ساعت شبانه‌روزی و فیتوکروم		MYB-related	CCA1
فعال‌کننده رونویسی، تنظیم بیان ژن‌های القاء شده تحت تنش		AP2:RAV	TEM2;RAV2
تنظیم‌کننده مثبت رونویسی، پاسخ به تنش اسمزی، شوری و کمبود آب		bZIP; Homeodomain; HD-ZIP	Homeobox 12(HB-12)
بازدارنده رونویسی، زشد و توسعه ریشه جانبی		MYB/SANT; MYB; G2-like	KAN
پاسخ سلولی به هیپوکسی، رشد ریشه‌های جانبی		AP2; B3; RAV	RAV1/EDF4

عملکرد ژن	توالی لوگو (عناصر سیس)	خانواده فاکتور رونویسی	نام ژن (فاکتور رونویسی)
بازدارنده و فعال کننده رونویسی، تنظیم فتوستت، تنظیم مورفولوژی اندام های گیاه		bHLH(Basic helix-loop-helix)	PIF3
بازدارنده رونویسی، مؤثر در پاسخ سیگنالینگ جاسمونات، پاسخ به تنش های غیر زنده		C2H2(Cys2/His2-type zinc-finger protein)	STZ;ZAT10
تنظیم کننده پاسخ، فعال کننده تنظیم کننده های پاسخ در مسیر سیگنالی سیتوکین		Myb/SANT; MYB; ARR-B	ARR14
بازدارنده رونویسی، تنظیم بیان ژن های پاسخ دهنده به نور		GATA; tify(zinc finger)	GATA12

References

- Arif, M., Li, Z., Luo, Q., Li, L., Shen, Y., & Men, S. (2021). The BAG2 and BAG6 genes are involved in multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5856.
- Bäurle, I. (2016). Plant heat adaptation: priming in response to heat stress. *F1000Research*, 5.
- Bäurle, I. (2018, November). Can't remember to forget you: chromatin-based priming of somatic stress responses. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 83, pp. 133-139). Academic Press.
- Bäurle, I. and Trindade, I. (2020). Chromatin regulation of somatic abiotic stress memory. *Journal of Experimental Botany*, 71(17): 5269-5279.
- Brzezinka, K., Altmann, S. and Bäurle, I. (2019). BRUSHY1/TONSOKU/MGOUN3 is required for heat stress memory. *Plant, Cell & Environment*, 42(3): 771-781.
- Carrigan, P.E., Sikkink, L.A., Smith, D.F. and Ramirez-Alvarado, M. (2006). Domain: domain interactions within Hop, the Hsp70/Hsp90 organizing protein, are required for protein stability and structure. *Protein Science*, 15(3): 522-532.
- Charng, Y.Y., Liu, H.C., Liu, N.Y., Hsu, F.C. and Ko, S.S. (2006). *Arabidopsis* Hsa32, a novel heat shock protein, is essential for acquired thermotolerance during long recovery after acclimation. *Plant Physiology*, 140(4):1297-1305.
- dos Santos, T.B. and Vieira, L.G.E. (2020). Involvement of the galactinol synthase gene in abiotic and biotic stress responses: A review on current knowledge. *Plant Gene*, 24: 100258.
- Dragovic, Z., Shomura, Y., Tzvetkov, N., Hartl, F.U. and Bracher, A. (2006). Fes1p acts as a nucleotide exchange factor for the ribosome-associated molecular chaperone Ssb1p. *Biological Chemistry*, 387(12): 1593-1600.
- Gowda, N.K.C., Kaimal, J.M., Masser, A.E. Kang, W., Friedländer, M.R. and Andréasson, C. (2016). Cytosolic splice isoform of Hsp70 nucleotide exchange factor Fes1 is required for the degradation of misfolded proteins in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 27(8): 1210-1219.
- Hall, D. (2020). On the nature of the optimal form of the holdase-type chaperone stress response. *FEBS Letters*, 594(1): 43-66.
- Haslbeck, M., Weinkauff, S. and Buchner J. (2019). Small heat shock proteins: simplicity meets complexity. *Journal of Biological Chemistry*, 294(6): 2121-2132.
- Heidari, P., Ahmadizadeh, M. and NajafiZarrini, H. (2015). In Silico Analysis of Cis-regulatory Elements on co-expressed genes. *Journal of Biological & Environmental Sciences*, 9(25): 1-9.
- Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Bäurle, I., Geiselhardt, S., Hinch, D.K., Kunze, R., Mueller-Roeber, B., Rillig, M.C. and Rolff, J. (2016). Priming and memory of stress responses

- in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews*, 91(4): 1118-1133.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. and Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 7: 106–111
- Khan, A., Khan, V., Pandey, K., Sopory, S.K. and Sanan-Mishra, N. (2022). Thermo-priming mediated cellular networks for abiotic stress management in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13: 866409.
- Kushawaha, A.K., Khan, A., Sopory, S.K. and Sanan-Mishra, N. (2021). Priming by high temperature stress induces microRNA regulated heat shock modules indicating their involvement in thermopriming response in rice. *Life (Basel)*, 11(4): 291.
- Lämke, J., Brzezinka, K., Altmann, S. and Bäurle, I. (2016a). A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *EMBO Journal*, 35(2): 162-175.
- Lämke, J., Brzezinka, K. and Bäurle I. (2016b). HSF2 orchestrates transcriptional dynamics after heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Transcription*, 7(4): 111–114
- Lämke, J. and Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology*, 18(1): 1-11.
- Lee, J. G. and Ye, Y. (2013). Bag6/Bat3/Scythe: A novel chaperone activity with diverse regulatory functions in protein biogenesis and degradation. *Bioessays*, 35: 377-385.
- Lin, M.Y., Chai, K.H., Ko, S.S., Kuang, L.Y., Lur, H.S. and Charng, Y.Y. (2014). A positive feedback loop between heat shock protein101 and heat stress-associated 32-kd protein modulates long-term acquired thermotolerance illustrating diverse heat stress responses in rice varieties. *Plant Physiology*, 164(4): 2045-2053.
- Ling, Y., Serrano, N., Gao, G., Atia, M., Mokhtar, M., Woo, Y.H., Bazin, J., Veluchamy, A., Benhamed, M. and Crespi, M. (2018). Thermopriming triggers splicing memory in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 69(10): 2659-2675.
- Liu, Y., Zhang, A., Yin, H., Meng, Q., Yu, X., Huang, S., Wang, J., Ahmad, R., Liu, B. and Xu, Z.Y. (2018a). Trithorax-group proteins ARABIDOPSIS TRITHORAX4 (ATX4) and ATX 5 function in abscisic acid and dehydration stress responses. *New Phytologist*, 217(4):1582-1597.
- Liu, H.C., Lämke, J., Lin, S.Y., Hung, M.J., Liu, K.M., Charng, Y.Y. and Bäurle, I. (2018b). Distinct heat shock factors and chromatin modifications mediate the organ-autonomous transcriptional memory of heat stress. *Plant Journal*, 95(3): 401-413.
- Mayer, M. P. and Gierasch, L. M. (2019). Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, 294: 2085–2097.
- Meiri, D., Breiman, A. (2009). *Arabidopsis* ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90. 1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs. *Plant Journal*, 59(3): 387-399.
- Mishra, R.C. and Grover, A. (2016). ClpB/Hsp100 proteins and heat stress tolerance in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(5): 862-874.
- Mogk, A., Bukau, B. and Kampinga, H.H. (2018). Cellular handling of protein aggregates by disaggregation machines. *Molecular Cell*, 69(2): 214-226.
- Nollen, E.A. and Morimoto, R.I. (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*, 115(14): 2809-2816.
- Oberkofler, V., Prax, L. and Bäurle, I. (2021). Epigenetic regulation of abiotic stress memory: maintaining the good things while they last. *Current Opinion in Plant Biology*, 61: 102007.
- Panikulangara, T.J., Eggers-Schumacher, G., Wunderlich, M., Stransky, H. and Schöffl, F. (2004). Galactinol synthase 1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(2):3148-3158.
- Parcerisa, I.L., Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A. (2020). Biochemical characterization of ClpB3, a chloroplastic disaggregase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 104(4): 451-465.
- Ritchie, ME., Phipson, B., Wu, D.I., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W. and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7):e47
- Rolly, N.K., Imran, Q.M., Shahid, M., Imran, M., Khan, M., Lee, S.U., Hussain, A., Lee, I.J. and Yun, B.W. (2020). Drought-induced AtbZIP62 transcription factor regulates drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156: 384–395.

- Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2011). AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annual Review of Biochemistry*, 80: 587-612.
- Sedaghatmehr, M. Mueller-Roeber, B. and Balazadeh, S. (2016). The plastid metalloprotease FtsH6 and small heat shock protein HSP21 jointly regulate thermomemory in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 7: 12439.
- Sequeira-Mendes, J., Aragüez, I., Peiró, R. Mendez-Giraldez, R., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Bastolla, U. and Gutierrez, C. (2014). The functional topography of the *Arabidopsis* genome is organized in a reduced number of linear motifs of chromatin states. *Plant Cell*, 26(6): 2351-2366.
- Standaert, R. F., Galat, A., Verdine, G. L. and Schreiber, S. L. (1990). Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP. *Nature*, 346(6285): 671-674
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K. et al. (2014a). *Arabidopsis* miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *Plant Cell*, 26(4) :1792-1807.
- Stief, A., Brzezinka, K., Lämke, J. and Bäurle, I. (2014b). Epigenetic responses to heat stress at different time scales and the involvement of small RNAs. *Plant signaling & behavior*, 9(10): e970430.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5): 244-252.
- Wu, T.Y., Juan, Y.T., Hsu, Y.H., Wu, S.H., Liao, H.T., Fung, R.W. and Charng, Y.Y. (2013). Interplay between heat shock proteins HSP101 and HSA32 prolongs heat acclimation memory posttranscriptionally in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161(4):2075–2084.
- Yamaguchi, N. (2021). Heat memory in plants: histone modifications, nucleosome positioning and miRNA accumulation alter heat memory gene expression. *Genes & Genetic Systems*, 96(5): 229-235.
- Yamaguchi, N., Matsubara, S., Yoshimizu, K., Seki, M., Hamada, K., Kamitani, M., Kurita, Y., Nomura, Y., Nagashima, K., Inagaki, S., Suzuki, T., Gan, E.S., To, T., Kakutani, T., Nagano, A.J., Satake, A. and Ito, T. (2021). H3K27me3 demethylases alter HSP22 and HSP17. 6C expression in response to recurring heat in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 12(1): 1-16.
- 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.
- Zhang, X., Bernatavichute, Y.V., Cokus, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2009). Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*, 10: 1-14.
- Zhang, J.X., Wang, C., Yang, C.Y. Wang, J.Y., Chen, L., Bao, X.M., Zhao, Y.X., Zhang, H. and Liu, J. (2010). The role of *Arabidopsis* AtFes1A in cytosolic Hsp70 stability and abiotic stress tolerance. *Plant Journal*, 62(4): 539-548.
- Zhang, B., Feng, C., Chen, L., Li, B., Zhang, X. and Yang X. (2022). Identification and functional analysis of *bZIP* genes in cotton response to drought stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 28: 23(23):14894.
- Zhou, Y., Wang, Y., Xu, F. and Song, C. (2022). Small HSPs play an important role in crosstalk between HSF-HSP and ROS pathways in heat stress response through transcriptomic analysis in lilies (*Lilium longiflorum*). *BMC Plant Biology*, 22(1): 202.
- Zhuang, Y., Wei, M., Ling, C., Liu, Y., Amin, A. K., Li, P., ... & Wang, S. (2021). EGY3 mediates chloroplastic ROS homeostasis and promotes retrograde signaling in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Cell Reports*, 36(2), 109384.
- Zuiderweg, E. R., Hightower, L. E., & Gestwicki, J. E. (2017). The remarkable multivalency of the Hsp70 chaperones. *Cell Stress and Chaperones*, 22, 173-189.