

الگوی متیله شدن DNA در ریشه و ساقه جو تحت تنش شوری

سارا غفاریان^۱، سید ابوالقاسم محمدی^۲، سمیرا هامیان^۲، محمد مقدم^۳، محمود تورچی^۲ و علی بنده‌حق^۲

^۱ ایران، تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی

^۳ ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، قطب علمی اصلاح مولکولی غلات

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۴

چکیده

شوری یکی از عوامل اصلی محدود کننده تولید محصولات کشاورزی محسوب می‌شود. مطالعات مختلف نشان دهنده تغییر بیان ژن‌ها در نتیجه تغییرات فراژنتیکی تحت تنش‌های غیر زیستی است. در این مطالعه، از تکنیک CRED-RA برای بررسی تغییرات الگوی متیله شدن توالی‌های CCGG در ساقه و ریشه درقم جو Sahara3771 (متحمل به تنش شوری) و Clipper (حساس به تنش شوری) تحت دو تیمار صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl استفاده شد. نمونه‌های برگ و ریشه جهت استخراج DNA، ۲۴ ساعت، سه هفته و پنج هفته پس از اعمال شوری برداشت شد. تحت تیمار شوری در بخش هوایی Sahara3771 در مقایسه با تیمار شاهد، ۲۶/۲٪ جایگاه‌ها متیله و ۱۵/۸۶٪ آن‌ها متیل‌زدایی شدند. در ریشه آن نیز ۷/۷۴٪ و ۹/۳۸٪ از جایگاه‌ها به ترتیب افزایش و کاهش سطح متیله شدن تحت تیمار شوری در مقایسه با شاهد داشتند. در بخش هوایی Clipper ۱۷/۰۲٪ و ۱۱/۷۴٪ جایگاه‌ها تحت تیمار شوری به ترتیب افزایش و کاهش سطح متیله شدن در مقایسه با تیمار شاهد داشتند. در ریشه این ژنوتیپ نیز مقادیر افزایش و کاهش سطح متیله شدن تحت تیمار شوری به ترتیب ۱۰/۶۷٪ و ۷/۷۵٪ بود. در مجموع تعداد جایگاه‌های بدون تغییر در بخش هوایی بیشتر از ریشه بود. همچنین تعداد جایگاه بدون تغییر در بخش هوایی Clipper بیشتر از Sahara3771 بود. نتایج نشان دادند که تغییرات الگوی متیله شدن می‌تواند یکی از فاکتورهای کلیدی دخیل در تحمل بیشتر به شوری در جو باشد.

واژه‌های کلیدی: جو، تنش شوری، الگوی متیله شدن، CRED-RA

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۳۱۱۴۳۳۵، پست الکترونیکی: Mohammadi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

اسمزی، سمیت یونی حاصل تجمع نمک و تنش ثانویه ناشی از شوری سه آسیب مهم وارده به گیاهان تحت تنش شوری هستند (۲۶). برای تضمین عملکرد پایدار محصول و زیر کشت بردن زمین‌هایی که به دلایل مختلف مثل شوری خاک قابل کشت نیستند، جهت تامین غذای مورد نیاز جمعیت رو به رشد جهان لازم است ارقامی با قدرت تحمل تنش‌های محیطی تولید شوند. اولین قدم برای

جو از خانواده‌ی Poaceae یکی از مهم‌ترین غلات است که رتبه پنجم تولید ماده خشک در دنیا و رتبه‌ی دوم سطح زیر کشت در ایران را دارد (۴). جو به دلیل خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و ژنتیکی مناسب به عنوان گیاه مدل در آزمایش‌های مختلف استفاده می‌شود (۹).

شوری خاک از تنش‌های مهم غیر زیستی بویژه در مناطق خشک و نیمه خشک است (۲۷). بیش از شش درصد از کل زمین‌های دنیا تحت تأثیر شوری قرار دارند. تنش

دستیابی به چنین هدفی درک کامل ساز و کارهای پاسخ گیاهان به تنش‌های غیر زیستی مانند شوری می‌باشد.

در نتیجه حضور نمک در غلظت‌های بالا در حوزه ریشه تغییرات مورفولوژیکی، سلولی، بیوشیمیایی و مولکولی بسیاری در گیاه رخ می‌دهد (۱۸). مطالعات نشان داده است این تغییرات می‌تواند ناشی از عوامل ژنتیکی، فراژنتیکی (Epigenetics factors) و محیطی باشد. هر تغییری که بدون تغییر در ساختار DNA منجر به تغییر در اثر ژن یا فنوتیپ شود به تغییر فراژنتیک است (۳۴). تغییرات فراژنتیکی می‌تواند در طول زمان، در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی (۲۴) و بین افراد و جمعیت‌ها متفاوت باشند (۱۰). تغییر در بیان ژن، توانایی پاسخ سریع به محیط در حال تغییر و در نتیجه تطبیق فنوتیپ با شرایط محیطی جدید از نتایج تغییرات فراژنتیکی هستند (۳۰).

تغییرات اپی‌ژنتیک شامل متیله‌شدن نوکلئوتیدها خصوصاً سیتوزین و همچنین تغییرات هیستونی می‌باشد (۱). متیله شدن DNA از مهم‌ترین تغییرات فراژنتیکی است که در آن یک گروه متیل (-CH₃) از مولکول S-آدنوزیل متیونین با فعالیت آنزیم S-آدنوزیل متیل ترانسفراز به نوکلئوتیدها به ویژه سیتوزین در موقعیت شماره ۵ آن انتقال می‌یابد (۸). متیله شدن سیتوزین معمولاً بر روی کربن شماره ۵ سیتوزینی که به دنبال آن یک گوانین قرار داشته باشد اتفاق می‌افتد (توالی‌های CpG). این توالی‌ها در ناحیه تنظیمی ژن‌ها رایج‌تر هستند (۲). مولکول DNA علاوه بر نواحی مورد رونویسی در راه‌اندازها نیز متیله می‌شود. با متیله شدن DNA در ناحیه پرموتوری ممکن است ژن به شکل غیرفعال شده درآید. بنابراین، کاهش در میزان متیله شدن اغلب منجر به افزایش در بیان ژن خواهد شد (۵). اما مواردی خلاف این قاعده نیز گزارش شده است. در گیاهان بخش قابل توجهی از نوکلئوتیدهای متیله شده می‌تواند بطور پایدار از والدین به نتاج منتقل شود (۱۲). مثال‌های

بسیاری از اپی‌الل‌های متیله شده با فنوتیپ متمایز وجود دارد (۱۳ و ۳۱).

متیل‌زدایی به دو روش فعال و غیر فعال روی می‌دهد. متیل‌زدایی غیر فعال DNA ممکن است به دلیل محدود شدن متیله شدن جدید یا ناتوانی در حفظ ویژگی‌های والدین بعد از همانندسازی DNA رخ دهد (۱۴). متیل‌زدایی فعال با فعالیت گلیکوزیلازها با حذف گروه متیل از سیتوزین‌ها اتفاق افتد (۲۵). این امر ممکن است نقش مهمی در جلوگیری از شکل‌گیری متیله شدن‌های شدید پایدار در ژنوم‌های گیاهی داشته باشد (۲۸).

برای ارزیابی متیله شدن DNA روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. یکی از ساده‌ترین روش‌ها، CRED-RA (Coupled Restriction Enzyme Digestion and Random Amplification) است که در آن DNA پس از تکثیر توسط آغازگرهای تصادفی، جداگانه توسط آنزیم‌های *HpaII* و *MspI* که دارای جایگاه شناسایی یکسان با حساسیت متفاوت به متیله شدن DNA هستند برش داده می‌شود. چند شکلی بین محصولات برشی تفاوت در الگوی متیله شدن را نشان می‌دهد (۲۳). تکنیک CRED-RA به علت ساده، آسان و کم هزینه بودن نسبت به سایر روش‌ها، برای بررسی اولیه متیله‌شدن DNA مناسب است (۲۹). در این مطالعه الگوی متیله شدن DNA در ریشه و بخش هوایی ارقام جو Sahara3771 و Clipper با حساسیت متفاوت به تنش شوری تحت تنش شوری با استفاده از روش CRED-RA مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی مورد مطالعه شامل ارقام جو Clipper و Sahara3771 بود. Clipper یک رقم تجاری استرالیایی، بهاره، دو ردیفه و حساس به شوری و Sahara3771 بومی آفریقایی شمالی با منشا الجزایر، زمستانه، شش ردیفه و متحمل به شوری است. ارقام Sahara3771 و Clipper از

جدول ۲- اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

مقادیر (μl)	اجزای واکنش
۴	Master Mix 2X (Amplicon)
۴	آب دیونیزه استریل
۱	آغازگر RAPD
۲	DNA ژنومی (۲۵ng/μl)
۰/۲	MgCl2

چرخه‌های حرارتی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت پنج دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشت سازی در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۷۲°C به مدت یک و نیم دقیقه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت یک و نیم دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ۵ میکرولیتر از محصولات تکثیری جداگانه با هر یک از آنزیم‌های برشی ایزوشیزومراز *HpaII* و *MspI* به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C تیمار شدند. برش محصولات PCR با استفاده از آنزیم‌های ایزوشیزومراز *HpaII* و *MspI* در حجم ۱۶ میکرولیتر و با اجزای جدول ۳ انجام شد.

علاوه براین، پنج میکروگرم DNA ژنومی از هر رقم و سطح تنش و در هر مرحله به طور جداگانه با یک واحد از آنزیم‌های برشی ایزوشیزومراز *HpaII* و *MspI* به طور جداگانه به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷°C تیمار داده شدند. برش DNA ژنومی به کمک دو آنزیم ایزوشیزومراز *HpaII* و *MspI* در حجم ۲۰ میکرولیتر با اجزای جدول ۴ انجام شد. بعد از تایید برش DNA توسط آنزیم‌ها با استفاده از ژل آگارز، دو میکرولیتر از محصولات برشی DNA ژنومی به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از همان آغازگرهای تصادفی استفاده شد (جدول ۲). در این بررسی از ۱۰ آغازگر تصادفی استفاده شد که اسامی و توالی آن‌ها در جدول ۵ ذکر شده است. دمای اتصال اختصاصی آغازگرهای مورد استفاده ۳۴°C بود.

دانشگاه استرالیای غربی تهیه شد. به منظور بررسی تغییرات متیله شدن DNA تحت تنش شوری، ارقام Sahara3771 و Clipper به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار با دو سطح شاهد و شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl در گلخانه کشت شدند. پس از استقرار گیاهچه‌ها، تنش شوری در مرحله سه برگچه‌ای اعمال شد. بر اساس مطالعات انجام یافته این مرحله حساس‌ترین مرحله رشدی جو به تنش شوری است (۶). گلدان‌ها در شرایط کاملاً کنترل شده گلخانه تحت شرایط دمایی ۲۸°C در روز و ۱۸°C در شب، با فتوپریود ۱۸ساعت روز به ۶ ساعت شب و در رطوبت نسبی ۷۰ درصد رشد داده شدند. نمونه برداری در سه مرحله ۲۴ ساعت، سه هفته و پنج هفته پس از اعمال تنش انجام شد. به منظور ارزیابی تغییرات متیله شدن DNA در ریشه و ساقه جو تحت تنش شوری از روش CRED-RA استفاده شد. استخراج DNA به روش لودهی و همکاران (۱۹) انجام و کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین گردید. به منظور بررسی تغییرات متیله شدن DNA، ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای تصادفی به طول ۱۰ نوکلئوتید انجام شد. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- ترکیبات و غلظت اجزای تشکیل دهنده محلول هوگلند

غلظت (g/l)	ترکیبات مورد استفاده
۰/۱۴	Kh2Po4
۰/۵۱	KNO3
۱/۲۱	Ca(NO3)2
۰/۵	MgSO4.7H2O
۰/۰۰۵	ZnSO4.7H2O
۰/۰۰۷	H3BO3
۰/۰۰۲	MnCl2.2H2O
۰/۰۰۱	CuSO4.5 H2O
۰/۰۰۰۶	H2MoO4
۰/۰۳	Fe-EDTA

تکثیر با استفاده از DNA برش یافته با آنزیم *MspI* نشان دهنده الگوی متیله شدن نوع سوم در جایگاه تشخیص آنزیم است. تکثیر فقط با استفاده از DNA ژنومی، بیانگر آن است که یا در قطعه تکثیری جایگاه تشخیص آنزیم وجود ندارد و یا جایگاه تشخیص آنزیم متیله نشده و یا فقط سیتوزین دوم در یک رشته متیله شده است. بنابراین، هردو آنزیم جایگاه تشخیص را شناسایی و DNA را برش دادند (نوع اول). برای اطمینان از وجود و عدم وجود جایگاه تشخیص آنزیم در قطعه تکثیری با DNA ژنومی، قطعات تکثیری نیز با آنزیم‌های *HpaII* و *MspI* برش داده شدند. اگر قطعات تکثیری با آنزیم‌ها برش داده شوند، جایگاه تشخیص وجود دارد ولی عدم برش قطعه تکثیری با آنزیم‌ها نشانگر عدم وجود جایگاه تشخیص آنزیم در قطعه تکثیری می‌باشد.

جدول ۵- مشخصات آغازگرهای تصادفی مورد استفاده در روش

CRED-RA

نام آغازگر	توالی آغازگر
MT5	CTCACCGTCC
MT21	CCCGCCGTTG
MT25	CCGTCTCTTT
۴۲۸	GGCTGCGGTA
۴۵۴	GCTTACGGCA
۴۶۵	GGTCAGGGCT
۵۴۱	GCCCCTTTAC
۶۳۰	CACTTAACCG
۶۶۳	CGTATAGCCG
۶۹۸	CTAGACGTTG

جدول ۶- واکنش آنزیم‌های *MspI* و *HpaII* به متیله شدن سیتوزین در جایگاه تشخیص آنزیم

نوع	الگوی متیله شدن	<i>Msp I</i>	<i>HpaII</i>
اول	<u>CCGG</u> GGCC	فعال	فعال
دوم	<u>CCGG</u> GGCC	غیرفعال	فعال
سوم	<u>CCGG</u> GGCC	فعال	غیرفعال
چهارم	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	غیرفعال	غیرفعال

جدول ۳- اجزای واکنش برش محصولات PCR با استفاده از آنزیم-

های *MspI* و *HpaII*

اجزای واکنش	مقدار در هر نمونه (μl)
آب دیونیزه استریل	۹
محصولات PCR	۵
بافر (۱۰X) Tango	۱
هر کدام از آنزیم‌های <i>MspI</i> یا <i>HpaII</i>	۱

جدول ۴- اجزای واکنش برش DNA ژنومی با استفاده از آنزیم

MspI و *HpaII*

اجزای واکنش	مقدار در هر نمونه (μl)
آب دیونیزه استریل	۱۶
DNA ژنومی	۲
بافر (۱۰X) Tango	۲
هر کدام از آنزیم‌های <i>MspI</i> یا <i>HpaII</i>	۱

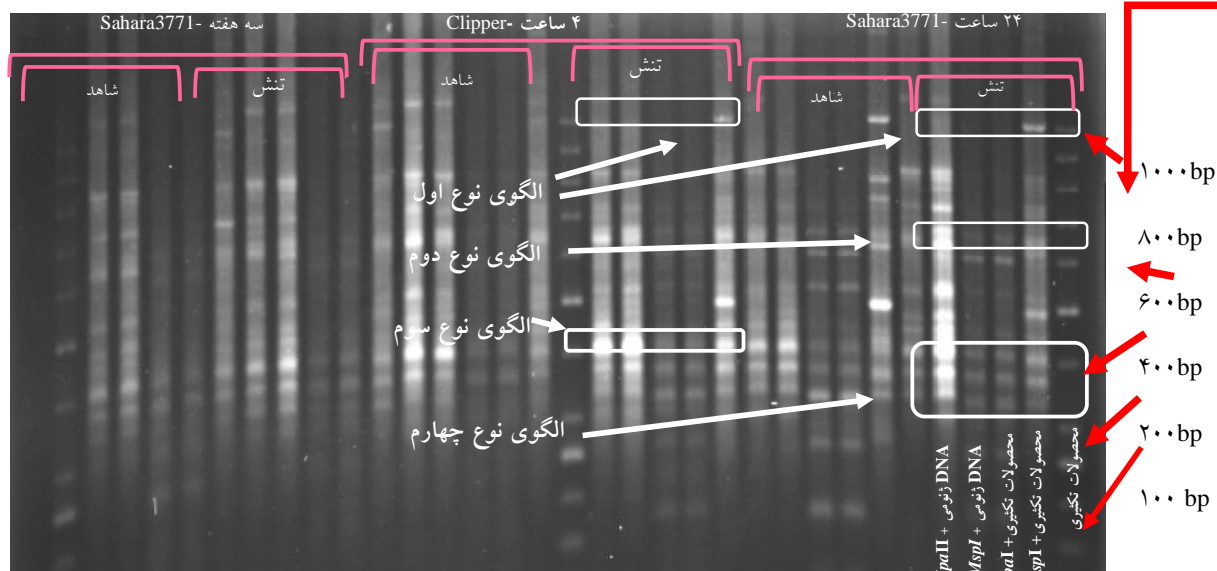
تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد و آشکارسازی جایگاه‌ها بر اساس رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید انجام شد. برای تعیین اندازه قطعات تکثیری از نشانگر وزن مولکولی با اندازه قطعات ۳۰۰۰ - ۱۰۰ جفت باز (Fermentase, #SM0321) در سه قسمت ژل استفاده شد.

با استفاده از روش CRED-RA بر مبنای آنزیم‌های ایزوشیزومراز *HpaII* و *MspI* چهار نوع الگوی نواری چند شکل علاوه بر جایگاه‌های تک شکل حاصل شد (جدول ۶). وجود نوار در تکثیر با استفاده از DNA ژنومی و نیز DNA ژنومی برش یافته با استفاده از هر دو آنزیم برشی، نشان دهنده متیله شدن سیتوزین اول جایگاه تشخیص آنزیم در هر دو رشته است و در این حالت هیچ کدام از آنزیم‌ها قادر به برش DNA در جایگاه برش نمی‌باشند (الگوی متیله شدن نوع چهارم). تکثیر نوار با استفاده از DNA ژنومی و DNA برش یافته با آنزیم *MspI* و عدم تکثیر با استفاده از DNA برش یافته با آنزیم *HpaII* نشان دهنده الگوی متیله شدن نوع دوم و تکثیر با استفاده از DNA ژنومی و DNA برش یافته با آنزیم *HpaII* و عدم

نتایج

در بخش هوایی Sahara3771 و تحت تنش شوری در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور متوسط ۲۶/۲٪ جایگاه‌ها افزایش و ۱۵/۸۶٪ جایگاه‌ها کاهش سطح متیله شدن نشان دادند و در هر سه مرحله نمونه برداری تحت تنش شوری درصد جایگاه‌های متیله شده بیشتر از جایگاه‌های متیل زدایی شده بود. اما ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری، در مقایسه با تیمار شاهد در ریشه این رقم تعداد جایگاه‌های متیله شده و سه هفته بعد از آن تعداد جایگاه‌های متیل زدایی شده درصد بیشتری از تغییرات متیله شدنی را تشکیل می‌دادند. در پنج هفته پس از اعمال شوری درصد جایگاه‌های متیله و متیل زدایی شده مقادیر مشابهی را تشکیل می‌دادند. در مجموع بیشترین میزان تغییرات متیله شدنی در مقایسه با شاهد در مرحله ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری حاصل شد. در بخش هوایی Sahara3771 بیشترین و کمترین تغییرات متیله شدن DNA در بخش هوایی Sahara3771 تحت تنش شوری در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب ۲۴ ساعت و پنج هفته پس از اعمال شوری مشاهده شد.

محصولات برش DNA استخراج شده از برگ و ریشه ارقام Sahara3771 و Clipper تحت تیمارهای شاهد و ۱۰۰ میلی مولار NaCl، توسط آنزیم‌های *HpaII* و *MspI* توسط ۱۰ آغازگر تصادفی به طول ۱۰ نوکلئوتید در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر شدند و انواع مختلفی از تغییرات الگوی متیله شدن مشاهده شد (شکل ۱). الگوی متیله شدن DNA ارقام Sahara3771 و Clipper در سه مرحله رشدی نشان دهنده افزایش میزان متیله شدن و متیل‌زدایی تحت تیمارهای شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl در مقایسه با تیمار شاهد بود. متوسط تعداد جایگاه‌های تغییرنیافته در بخش هوایی Sahara3771 و Clipper به ترتیب ۵۷/۹۳ و ۷۲/۴۱ بود. تعداد جایگاه‌های تغییرنیافته در ریشه Sahara3771 و در ریشه Clipper ۵۵/۹۵٪ بود. جدول‌های ۷ و ۸ تعداد جایگاه‌های بدون تغییر در وضعیت متیله شدن، متیله شده و متیل‌زدایی شده در جایگاه برش را به ترتیب در بخش هوایی و ریشه Sahara3771 و Clipper تحت تنش شوری در مقایسه با تیمار شاهد در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان می‌دهند.



شکل ۱- الگوی نواری ریشه Sahara3771 و Clipper تحت دو تیمار صفر و ۱۰۰ میلی مولار NaCl بر مبنای آغازگر شماره ۶۲۵

جدول ۸- تغییرات الکتری میله شدن بخش هورایی و ریشه Clipper تحت تنش شوری در مقایسه با تیمار شاهد.

ریشه	ساقه						کل	ساقه						کل		
	سه هفته	۲۴ ساعت	سه هفته	۲۴ ساعت	سه هفته	۲۴ ساعت		سه هفته	۲۴ ساعت	سه هفته	۲۴ ساعت	سه هفته	۲۴ ساعت			
۴۲	۲	۳	۸	۱	۲	۱۱	۹	۳	۹	۲	۹	۳	۱	۳	۸	۶۵
۴۵	۳	۱	۱۰	۲	۰	۱۳	۱۲	۲	۱۸	۰	۲۰	۱	۰	۱۸	۶۳۰	
۵۱	۲	۶	۹	۱	۱	۱۵	۱۱	۲	۱۱	۱	۱۱	۳	۲	۸	۶۶۳	
۳۹	۰	۷	۶	۱	۰	۱۲	۱۲	۴	۱۰	۳	۱۰	۰	۰	۱۴	۵۴۱	
۴۲	۲	۲	۱۱	۰	۳	۱۵	۱۶	۰	۱۴	۰	۱۴	۰	۱	۱۴	۲۵۲	
۴۲	۱	۳	۱۹	۱	۰	۱۳	۹	۲	۹	۱	۲	۸	۱	۵	۲۳۸	
۳۶	۴	۳	۵	۱	۱	۱۱	۱۰	۰	۱۲	۰	۱۱	۲	۱	۹	۶۹۸	
۴۲	۳	۴	۷	۵	۲	۷	۱۳	۱	۱۱	۰	۱۱	۰	۰	۱۲	MT25	
۴۲	۰	۵	۹	۱	۲	۱۱	۱۱	۱	۸	۰	۲	۱۱	۰	۵	MT5	
۴۲	۴	۲	۸	۱	۲	۱۱	۶	۴	۱۴	۳	۱۴	۲	۵	۱۱	MT21	
۴۳	۲۱	۳۶	۸۲	۱۴	۱۳	۱۱۲	۱۰۳	۱۲	۱۱۶	۱۰	۱۱۹	۱۰	۲۲	۱۰۸	کل	
۱۵/۱۰	۲۵/۸۹	۵۸/۹۹	۱۰۰/۸۷	۹/۳۵	۸۰/۵۷	۱۰۰/۸۷	۱۵/۸۲	۸/۵	۸۲/۵۵	۷/۱۰	۸۵/۱۰۰	۷/۱۰	۱۵/۷۱	۷/۱۲		

از اعمال تیمار شوری همانند Sahara3771، تعداد جایگاه‌های متیله شده بیشتر از تعداد جایگاه‌های متیله زادی شده بود. سه و پنج هفته پس از اعمال شوری این دو گروه تغییرات در وضعیت متیله شدن مقادیر مشابهی داشتند. تحت تنش شوری درصد جایگاه‌های بدون تغییر الگوی متیله شدن در ریشه Sahara3771 متحمل به شوری بیشتر از بخش هوایی آن بود. درصد جایگاه‌های فاقد تغییر در الگوی متیله شدن در مراحل ۲۴ ساعت و سه هفته پس از اعمال شوری و در ریشه و بخش هوایی Clipper حساس به شوری مقادیر نزدیکی داشتند اما در مرحله پنج هفته پس از اعمال تنش تعداد جایگاه‌های بدون تغییر در الگوی متیله شدن در ریشه بطور قابل توجهی بیشتر از بخش هوایی بود. در مجموع تعداد جایگاه‌های بدون تغییر در بخش هوایی Clipper بیشتر از Sahara3771 بود. وقوع تغییرات متیله شدن می‌تواند یکی از فاکتورهای دخیل در تحمل بیشتر این رقم به شوری در مقایسه با Clipper باشد.

همچنین میزان متیلاسیون جایگاه‌ها در بخش هوایی و ریشه در نمونه‌های شاهد بین زمان‌های ۲۴ ساعت، سه هفته و ۵ هفته مقایسه شد. نتایج در جدول ۹ نشان داده شده است. بر این اساس در مرحله ۳ هفته در مقایسه با ۲۴ ساعت تعداد جایگاه‌های بدون تغییر ساقه در هر دو ژنوتیپ Sahara3771 و Clipper بیشتر از ریشه بود. در مقایسه مرحله ۳ هفته و ۵ هفته با ۲۴ ساعت در هر دو ژنوتیپ تعداد جایگاه‌های دارای افزایش سطح متیلاسیون در ریشه بیشتر از ساقه بود. تعداد جایگاه دارای افزایش سطح متیلاسیون در مرحله ۳ هفته بیشتر از ۵ هفته بود.

بحث و نتیجه گیری

تنش‌های محیطی می‌توانند موجب تغییر در الگوی متیله شدن DNA گیاهان شوند. گونه‌های فعال اکسیژن که در نتیجه تنش شوری تولید می‌شوند، اثرهای مخربی بر روی مولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئوتیک دارند (۲۱).

در بخش هوایی Clipper تحت تنش شوری و در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور متوسط ۱۷/۰۲٪ جایگاه‌ها افزایش و ۱۱/۷۴٪ آنها کاهش در سطح متیله شدن نشان دادند. همانند آنچه در Sahara3771 مشاهده شد تحت تیمار شوری تعداد جایگاه‌های دارای افزایش متیله شدن بیشتر از جایگاه متیل زادی شده بود. بیشترین تغییرات متیله شدن در بخش هوایی Clipper پنج هفته پس از اعمال شوری مشاهده شد. ۲۴ ساعت و پنج هفته پس از اعمال شوری در بخش هوایی Clipper تعداد جایگاه‌های متیله شده بیشتر از تعداد جایگاه‌های متیل زادی شده بود. در مرحله نمونه برداری سه هفته پس از اعمال شوری جایگاه‌های متیله شده و دی متیله مقادیر مشابهی داشتند. پنج هفته پس از اعمال تیمار شوری در بخش هوایی Clipper حساس به شوری در مقایسه با Sahara3771 متحمل به شوری تغییرات متیله شدن بیشتری در مقایسه با مرحله ۲۴ ساعت مشاهده شد.

مطالعه وضعیت متیله شدن ریشه نشان دهنده تعداد بیشتر جایگاه‌های بدون تغییر در پاسخ به تنش شوری در مقایسه با بخش هوایی بود. به نظر می‌رسد با اینکه ریشه اولین اندام دریافت کننده تنش شوری است تغییر وضعیت متیله شدن در پاسخ به آن عموماً در بخش هوایی رخ می‌دهد. متوسط تعداد جایگاه‌های دارای افزایش و کاهش سطح متیله شدن در ریشه Sahara3771 به ترتیب ۷/۷۴٪ و ۹/۳۸٪ بود. در Sahara3771 متحمل به شوری ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش متیله شدن و سه هفته پس از تیمار متیل زادی مقادیر بیشتری از تغییرات متیله شدن را به خود اختصاص دادند. پنج هفته پس از اعمال شوری این دو گروه تغییرات متیله شدن مقادیر مشابهی داشتند.

مطالعه الگوی متیله شدن در ریشه Clipper نشان داد ۱۰/۶۷٪ جایگاه‌ها دارای افزایش و ۷/۵٪ آنها دارای کاهش سطح متیله شدن تحت تیمار شوری در مقایسه با شاهد بودند. در Clipper حساس به شوری ۲۴ ساعت پس

جدول ۹- تغییرات الگوی متیله شدن بخش هوایی و ریشه Sahara3771 و Clipper در نمونه‌های شاهد بین زمان‌های ۳ هفته در مقایسه با ۲۴ ساعت، ۵ هفته در مقایسه با ۲۴ ساعت و ۳ هفته در مقایسه با ۵ هفته

۳ هفته در مقایسه با ۲۴ ساعت			۵ هفته در مقایسه با ۲۴ ساعت			۳ هفته در مقایسه با ۵ هفته		
کاهش سطح متیله شدن	افزایش سطح متیله شدن	بدون تغییر	کاهش سطح متیله شدن	افزایش سطح متیله شدن	بدون تغییر	کاهش سطح متیله شدن	افزایش سطح متیله شدن	بدون تغییر
۲۹	۲۱	۹۳	۲۲	۳۲	۹۱	۱۳	۲۶	۱۰۶
۲۱	۲۲	۱۰۲	۳۰	۲۷	۸۸	۱۳	۹	۱۲۳
۳۶	۲۸	۷۶	۲۲	۶۶	۵۲	۸	۵۱	۸۱
۱۶	۲۹	۹۴	۱۵	۶۲	۶۰	۱۵	۱۰۲	۷۲

استفاده قرار می‌گیرد. در هر سه مرحله نمونه برداری تعداد جایگاه‌های بدون تغییر در ریشه Sahara3771 بیشتر از بخش هوایی بود. در Clipper هم در هر سه مرحله نمونه برداری تعداد جایگاه‌های بدون تغییر در ریشه بیشتر از بخش هوایی بود. اما در Clipper حساس به شوری اختلاف تعداد جایگاه‌های بدون تغییر بین ریشه و ساقه کمتر از Sahara3771 بود. همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده تعداد بیشتر جایگاه‌های متیله و متیل زدایی شده بخش هوایی Sahara3771 در پاسخ به تنش شوری در مقایسه با Clipper حساس به شوری بود. به نظر می‌رسد یکی از فاکتورهای دخیل در تحمل بیشتر Sahara3771 به شوری توانایی پاسخ به تنش در نتیجه تغییر الگوی متیله شدن است. سازگاری سریع به شوری حاصل تنظیم بیان ژن به واسطه متیله شدن سیتوزین است (۲۰). ژائو و همکاران (۳۵) تغییرات الگوی متیله شدن سیتوزین را در پنبه تحت تنش شوری با روش MSAP بررسی کردند. بر این اساس تعداد جایگاه‌های سیتوزین متیله و متیل زدایی شده در لاین‌های متحمل بیشتر از لاین-های حساس بود. زونگ و همکاران (۳۶) نیز نشان دادند که در شرایط شوری سطح متیله شدن توالی‌های CCGG در رقم متحمل گندم بیشتر از رقم حساس است.

خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو بر DNA می‌تواند الگوی متیله شدن آن را تحت تاثیر قرار دهد و گزارشات متعددی از آسیب DNA در نتیجه شوری وجود دارد. برای مثال ROS های حاصل از تنش مستقیماً بر الگوی متیله شدن تاثیر می‌گذارند (۱۶). تغییرات متیله شدن DNA تحت تنش شوری شامل کاهش و افزایش سطح متیله شدن ژن‌ها است. اما در مجموع تعداد جایگاه‌های متیله شده ژنوم تحت این تنش بیشتر از جایگاه‌های متیل زدایی شده است (۷). متیله شدن نوکلئوتیدهای سیتوزین اصولاً با خاموشی ژن همراه است (۲۲). اما مواردی مبنی بر نقض این قاعده موجود هستند. برای مثال بیان ژن FLC که یکی از ژن‌های عامل بازدارندگی گلدهی می‌باشد با کاهش سطح متیله شدن آن بازداشته شده و منجر به گلدهی زودهنگام می‌شود. این امر در ارتباط با کاهش سطح متیله شدن هیستون‌های H3 و کاهش سطح متیله و استیله شدن هیستون‌های H4 و نه DNA است (۱۱). می‌توان نتیجه گرفت همیشه متیله شدن به معنی خاموشی ژن نیست. گیاهان سطوح نسبتاً بالایی از ۵-متیل سیتوزین دارند (۸). این مقدار از ۲۵-۶ درصد کل سیتوزین‌ها را بسته به گونه دربرمی‌گیرد (۲۹). تکنیک CRED-RA برای بررسی تغییرات الگوی متیله شدن در توالی‌های CCGG مورد

مولار بر با استفاده از روش CRED-R نشان دهنده افزایش میزان متیله شدن DNA تحت تیمارهای بر در مقایسه با شاهد بود.

شواهد زیادی نشان دهنده نقش متیلاسیون DNA در تنظیم بیان ژن‌ها در طول رشد و نمو گیاهان است (۴، ۲۴، ۳۹). همچنین بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند DNA گیاهان در بافت‌های بزرگسال در مقایسه با بافت‌های جوان در سطوح بالاتری متیله شده است (۱۰، ۱۵، ۲۸، ۴۴، ۴۵، ۴۸). اما برخی گزارش‌ها حاکی از سطوح پایین‌تر متیلاسیون را در گیاهان بزرگسال در مقایسه با گیاهان جوان بوده است (۱)، ۱۳، ۳۱، ۳۲، ۳۴). گو و همکاران (۲۰۱۱) و یوان و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که با افزایش سن گیاه مجموع DNA متیله شده گیاهان بامبو بطور قابل توجهی افزایش پیدا کرد. مجموع شواهد بیان‌کننده این مطلب است که وضعیت متیلاسیون DNA ژنومی در طول افزایش سن گیاه و پیری متفاوت باشد که منجر به تغییرات در بیان ژن‌های مرتبط با سن گیاه شود. سطح و الگوی متیلاسیون سیتوزین توسط دو سیستم متیلاسیون و متیل زدایی تعیین می‌شوند.

سپاسگزاری

از قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز برای فراهم کردن هزینه و امکانات آزمایشگاهی این تحقیق قدردانی می‌شود.

با وجود اختلاف قابل توجه تعداد جایگاه‌های دارای تغییر الگوی متیله شدن در بخش هوایی بین Sahara3771 و Clipper، مطالعه حاضر نشان دهنده نبود تفاوت چشم‌گیر بین دو ژنوتیپ از نظر تعداد جایگاه دارای تغییر در الگوی متیله شدن در ریشه بود. با توجه به نتایج بالا و تحمل بیشتر Sahara3771 به شوری احتمالاً نقش ساقه در تحمل شوری بیشتر از ریشه است. بنابراین تمرکز بر صفات و ژن‌های ریشه در بهبود تحمل به شوری نتایج بهتری به دنبال خواهد داشت. مقایسه الگوی نواری MSAP در ریشه و بخش هوایی چهار ژنوتیپ برنج تحت شرایط عادی و تنش شوری نشان دهنده درصد بیشتر جایگاه‌های متیله و متیل‌زدایی شده تحت تنش شوری در ساقه در مقایسه ریشه بود (۱۵).

تعداد جایگاه‌های متیله شده تحت تنش شوری در ساقه Sahara3771 بیشتر از ریشه بود. در هر دو اندام حداکثر تعداد جایگاه متیله شده در مقایسه با شاهد ۲۴ ساعت پس از اعمال شوری مشاهده شد. اما در Clipper حساس به شوری تعداد جایگاه‌های متیله شده تحت تنش در ریشه بیشتر از ساقه بود. بیشترین تعداد جایگاه‌های متیله شده در ریشه و ساقه Clipper به ترتیب ۲۴ ساعت و پنج هفته پس از اعمال شوری مشاهده شد. در مطالعه وانگ و همکاران (۳۳) متیله شدن سیتوزین‌ها با سازگاری به خشکی پیوستگی نشان داد. خشکی هم‌چنین منجر به متیله شدن شدید سیتوزین (CCGG) در ژنوم نخود شد (۱۷). مطالعه ارتورک و همکاران (۳) بر روی تغییرات متیله شدن DNA در ذرت تحت غلظت‌های صفر، پنج، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی

منابع

- 1- Baurens, F.C., Nicolleau, J., Legavre, T., Verdeil, J.L., Monteuis, O. 2004. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiol.*, **24**: 401-407.
- 2- Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhatar, R. and Shilatifard, A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.*, **23**: 781-783.
- 3- Bossdorf, O., Richards, C.L. and Pigliucci, M. 2008. Epigenetics for ecologists. *Ecol. Letters*, **11**: 106-115.
- 4- Ding, H., Gao, J., Qin, C., Ma, H., Huang, H., Song, P., Luo, X., Lin, H., Shen, Y., Pan, G., Zhang, Z. 2014. The dynamics of DNA methylation in maize roots under Pb stress. - *Int. J. mol. Sci.*, **15**: 23537-23554.

- 5- Erturk, F.A., Guleray, A., Gokce, N., Esra, A. and Burcu, S. 2013. Epigenetic effects of boron (b) pollution on *Zea mays* seedling. J. Selcuk Uni. Nat. Appl. Sci. 2: 757-762.
- 6- FAO. 2014. Faostat. FAO, Rome. www.faostat.fao.org.
- 7- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. 1998. DNA methylation in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49: 223-247.
- 8- Greenway, H. 1965. Plant response to saline substrates. Growth and ion uptake throughout plant development in two varieties of *Hordeum vulgare*. Aust. J. Biol. Sci., 18: 763-779.
- 9- Guangyuan, L., Xiaoming, W., Biyun, C., Gao, G. and Kun, X. 2007. Evaluation of genetic and epigenetic modification in rape-seed (*Brassica napus*) induced by salt stress. J. Integr. Plant Biol., 49: 1599-1607.
- 10- Guo, G.P., Gu, X.P., Yuan, J.L., Wu, X.L. 2011. Research on the features of DNA methylation in leaves of different chronological ages of *Phyllostachys heterocykla* var. *pubescens* based on the method of MSAP. Hereditas, 33: 794-800.
- 11- Hafiz, I.A., Abbasi, N.A., Hussain, A., Waheed A. and Naqvi. S.M.S. 2006. The methylation sensitive amplification polymorphism in juvenile and adult phase crab apple (*Malus micromalus*). Pak. J. Bot., 38: 1149-1157.
- 12- Harlan, J.R. and Zohary, D. 1966. Distribution of wild wheats and barley. Science, 153: 1074-1080.
- 13- Hasbún, R., Valledor, L., Berdasco, M., Santamaria, E., Cañal, M.J., Rodriguez, R., Rios, D., Sánchez, M. 2005. *In vitro* proliferation and genome DNA methylation in adult chestnuts. Acta Horticult., 693: 333-340.
- 14- Herrera, C.M. and Bazaga, P. 2010. Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. New Phytol., 187: 867-876.
- 15- Huang, L.C., Hsiao, L.J., Pu, S.Y., Kuo, C.I., Huang, B.L., Tseng, T.C., Huang, H.J., Chen, Y.T. 2012. DNA methylation and genome rearrangement characteristics of phase change in cultured shoots of *Sequoia sempervirens*. Physiol. Plant., 145: 360-368.
- 16- Jean Finnegan, E., Kovac, K.A., Jaligot, E., Sheldon, C.C., James Peacock, W. and Dennis, E.S. 2005. The downregulation of FLOWERING LOCUS C (FLC) expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms. Plant J., 44: 420-432.
- 17- Johannes, F., Porcher, E., Teixeira, F.K., Saliba-Colombani, V., Simon, M., Agier, N., Bulski, A., Albuisson, J., Heredia, F., Audigier, P., Bouchez, D., Dillmann, C., Guerche, P., Hospital, F. and Colot, V. 2009. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. Plos Genet., 5: 1-11.
- 18- Kalisz, S. and Purugganan, M.D. 2004. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. Trends Ecol. Evol., 19: 309-314.
- 19- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L. and Richards, E.J. 2003. Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. Genetics, 163: 1109-1122.
- 20- Karan, R., DeLeon, T., Biradar, H. and Subudhi, P.K. 2012. Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. PLoS ONE, 7: 1-10.
- 21- Katsuhara, M. and Kawasaki, T. 1996. Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley. Plant Cell Physiol., 37: 169-173.
- 22- Labra, M., Ghiani, A., Citterio, S., Sgorbati, S., Sala, F., Tannini, C., Ruffini-Castiglione, M. and Bracale, M. 2002. Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips. Plant Biol., 4: 694-699.
- 23- Lima, M.D.B. and Bull, L.T. 2008. Produção de cebola em solo salinizado. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 12: 231-235.
- 24- Liu, J.Z., Feng, L.L., Li, J.M., He, Z.H. 2015. Genetic and epigenetic control of plant heat responses. Front. Plant Sci., 6: 1-21.
- 25- Lodhi, M.A., Guang-Ning, Y., Weeden, F.N. and Reisch, B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. Plant Mol. Biol. Rep., 12: 6-13.
- 26- Lukens, L.N. and Zhan, S.H. 2007. The plant genome's methylation status and response to stress: Implications for plant improvement. Curr. Opin. Plant Biol., 10: 317-322.

- 27- Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Arch. Biochem. Biophys., 444: 139-158.
- 28- Mankessi, F., Saya, A.R., Favreau, B., Doubeau, S., Conéjéro, G., Lartaud, M., Verdeil, J.L., Monteuis, O. 2011. Variations of DNA methylation in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot tips and apical meristems of different physiological ages. Physiol. Plant, 143: 178-187.
- 29- Martienssen, R.A. and Colt, V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. Science, 293: 1070-1074.
- 30- McClelland, M., Nelson, M. and Raschke, E. 1994. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. Nucleic Acids Res., 22: 3640-3659.
- 31- Meng, F.R., Li, Y.C., Yin, J., Liu, H., Chen, X.J., Ni, Z.F., Sun, Q.X. 2012. Analysis of DNA methylation during the germination of wheat seeds. Biol. Plant, 56: 269-275.
- 32- Michalak, M., Plitta-Michalak, B.P., Naskret-Barciszewska, M., Barciszewski, J., Bujarska-Borkowska, B., Chmielarz, P. 2015. Global 5-methylcytosine alterations in DNA during ageing of *Quercus robur* seeds. Ann. Bot., 116: 369-376.
- 33- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C. and Hohn, B. 2006. Transgeneration memory of stress in plants. Nature, 442: 1046-1049.
- 34- Monteuis, O., Baurens, F.C., Goh, D.K.S., Quimado, M., Doubeau, S., Verdeil, J.L. 2009. DNA methylation in *Acacia mangium* *in vitro* and *ex vitro* buds, in relation to their within-shoot position, age and leaf morphology of the shoots. - Silvae Genet., 58: 287-292.
- 35- Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A.P., Ponferrada-Marin, M.I., Martinez-Macias, M.I., Ariza, R.R. and Roldan-Arjona, T. 2006. Demeter and Repressor of silencing 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 6853-6858.
- 36- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Plant Biol. J., 59: 651-681.
- 37- Parvaiz, A. and Satyawati, S. 2008. Salt stress and phyto biochemical responses of plants. Plant Soil, 54: 89-99.
- 38- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S. and Fischer, R.L. 2007. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104: 6752-6757.
- 39- Plitta, B.P., Michalak, M., Bujarska-Borkowska, B., Barciszewska, M.Z., Barciszewski, J., Chmielarz, P. 2014. Effect of desiccation on the dynamics of genome-wide DNA methylation in orthodox seeds of *Acer platanoides* L. Plant Physiol. Biochem., 85: 71-77.
- 40- Prakash, A.P. and Kumar, P.P. 1997. Inhibition of shoot induction by 5- azacytidine and 5-aza-2-deoxycytidine in *Petunia* involves hypomethylation. Plant Cell Rep., 16: 719-724.
- 41- Rando O.J. and Verstrepen, K.J. 2007. Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance. Cell, 128: 655-668.
- 42- Richards, E.J. 2006. Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. Nat. Rev. Genet., 7: 395-401.
- 43- Steward, N., Ito, M., Yamachuchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. J. Biol. Chem., 277: 37741-37746.
- 44- Sun, L.F., Liu, T.J., Shan, X.H., Su, S.-Z., Li, S.P., Yuan, Y.P., Zhang, J. 2015. Analysis of DNA cytosine methylation patterns in maize hybrids and their parents. Biol. Plant., 59: 266-272.
- 45- Valledor, L., Mejjón, M., Hasbún, R., Cañal, M.J., Rodríguez, R. 2010. Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. J. Plant Physiol., 167: 351-357.
- 46- Wang X, Li Y, Ji W, Bai X, Cai H, Zhu D, Sun XL, Chen LJ, Zhu YM. 2011. A novel Glycine soja tonoplast intrinsic protein gene responds to abiotic stress and depresses salt and dehydration tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Physiol., 168: 1241-1248.
- 47- Whitelaw, N.C. and Whitelaw, E. 2006. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. Hum. Mol. Genet., 15: 131-137.
- 48- Yuan, J.L., Sun, H.M., Guo, G.P., Yue, J.J., Gu, X.P. 2014. Correlation between DNA methylation and chronological age of moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*). Bot. Stud., 55: 1-7.
- 49- Zhao, Y.L., Yu, S.X., Ye, W.W., Wang, H.M., Wang, J.J. and Fang, B.X. 2010. Study on DNA cytosine methylation of cotton (*Gossypium*

- hirsutum* L.) genome and its implication for salt tolerance. *Agr. Sci. China*, 9: 783-791.
- 50- Zhong, L., Yan-hao Xu, Y.H. and Wang, J.B. 2009. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. *Afr. J. Biotechnol.*, 8: 6201-6207.

Pattern of DNA methylation in shoot and root of barley under salinity stress

Ghaffarian S.,^{1,2} Mohammadi S.A.,^{2,3} Hamian S.,² Moghaddam M.,^{2,3} Toorchi M.² and Bandehagh A.²

¹Dept. of Biology, Faculty of Natural Science, Azerbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran.

²Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran.

³Center of Excellence in Cereal Molecular Breeding, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran.

Abstract

Salinity is one of the most crucial factors, which inhibits crop production. A large number of evidence revealed that epigenetic mechanisms modulate the gene expression in plants under abiotic stresses. In this study, CRED-RA technique was used to assess the changes in methylation pattern of CCGG sequence in shoot and root of two barley cultivars, Sahara3771 (salt tolerant) and Clipper (salt susceptible) under 0 and 100 mM NaCl treatment. Leaf and root samples were harvested for DNA extraction 24 hours, 3 weeks, and 5 weeks after salt treatment. Under salinity treatment in shoot of Sahara3771, 26.20% and 15.86% of sites were hypermethylated and demethylated, respectively, compared with the control. Average number of hyper and demethylated sites in root of Sahara3771 were 74.7% and 38.9%, respectively. In shoot of Clipper 17.02% of sites were hypermethylated and 11.74% of them were demethylated. Average number of hyper and demethylated sites in root of Clipper were 67.10% and 5.7%, respectively. In total, number of methyl-changed sites in shoots were higher than that of roots in the both cultivars. In addition, number of methyl-unchanged sites in shoot of Sahara3771 were higher than that of Clipper. The results revealed that the changes in DNA methylation pattern could be a key factor in adaptation and tolerance barley to salinity.

Key words: Barley, Salinity stress, Methylation pattern, CRED-RA