



T.C.

ŞIRNAK ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

TUZ STRESİNE MARUZ BIRAKILAN

Amaranthus hypochondriacus GENOTİPİNİN

EPIGENETİK BAKIMINDAN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İbrahim MUNİS

ŞIRNAK, 2025

T.C.
ŞIRNAK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

TUZ STRESİNE MARUZ BIRAKILAN
Amaranthus hypochondriacus GENOTİPİNİN
EPIGENETİK BAKIMINDAN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İbrahim MUNİS

Danışman: Doç. Dr. Murtaza HACIZADE

ŞIRNAK, 2025

T.C.
ŞIRNAK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

TUZ STRESİNE MARUZ BIRAKILAN
Amaranthus hypochondriacus **GENOTİPİNİN**
EPIGENETİK BAKIMINDAN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İbrahim MUNİS

Danışman: Doç. Dr. Murtaza HACİZADE

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tez çalışmasının Şırnak Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlandığını, bu tez çalışmasında yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bahse konu bu kural ve ilkelerin gerektirdiği üzere, bu çalışmada özgün olmayan tüm bilimsel içerikleri kurallara uygun biçimde alıntılıyıp kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Beyanımınla çelişen herhangi bir delil bulunduğu takdirde tüm sorumluluğu üstleneceğimi kabul ederim.

İbrahim MUNİS

İmza:

TEZ YAZIM KILAVUZUNA UYGUNLUK

“Tuz Stresine Maruz Bırakılan *Amaranthus hypochondriacus* Genotipinin Epigenetik Bakımından İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Şırnak Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu’na uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Danışman

İbrahim MUNİS

Doç. Dr. Murtaza HACIZADE

Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Celal YÜCEL

KABUL VE ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Murtaza HACIZADE danışmanlığında **İbrahim MUNİS** tarafından hazırlanan “**Tuz Stresine Maruz Bırakılan *Amaranthus hypochondriacus* Genotipinin Epigenetik Bakımından İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Şırnak Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tarla Bitkileri** Ana Bilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi	Unvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Jüri Başkanı	Prof. Dr. Behçet İNAL	[online]
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Uğur SESİZ	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Murtaza HACIZADE	

Savunma Tarihi: 26 / 03 / 2025

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/.... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.



**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Müdürü**

Doç. Dr. İbrahim HÜSEYİNİ

ÖN SÖZ/TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın konusunun belirlenmesinden araştırma süreçlerinin yürütülmesi ve raporlanmasına kadar uzanan tüm aşamalarda, bilgi ve birikimlerinden büyük ölçüde yararlandığım; yüksek lisans süresince her türlü konuda desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Murtaza HACIZADE'ye içtenlikle teşekkür ederim. Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Başkanlığı'na, derslerimde yol gösteren tüm hocalarıma ve tez savunmamda sundukları bilimsel perspektif ve yapıcı geri bildirimlerle çalışmamın gelişimine katkıda bulunan saygıdeğer jüri üyeleri Prof. Dr. Behçet İNAL ve Doç. Dr. Uğur SESİZ'e şükranlarımı sunarım.

Bu tez yolculuğunda en büyük gücüm ailem oldu. Hayatımın her döneminde yanımda olan; varlığıyla bana güç ve yön veren, sabrıyla, özverisiyle ve emeğiyle bugünlere gelmem için tüm maddi ve manevi imkânlarını seferber eden canım babam Yüksek Ziraat Mühendisi Mehmet Mürşid MUNİS'e ve sevgisi, anlayışı ve sessizce verdiği desteğiyle yanımda olan canım annem Meryem MUNİS'e gönülden teşekkür ederim. Her zaman yanımda olduklarını hissettiren, desteğini ve sevgisini hiç eksik etmeyen kıymetli kardeşim İhsan MUNİS'e ve neşesiyle en yorgun anlarımı bile hafifleten, varlığıyla bu süreci güzelleştiren tatlı kardeşim Abdulhakim MUNİS'e kalpten teşekkür ederim.

Son olarak, tez hazırlama sürecinde tecrübeleriyle yanımda olan kıymetli Sayın Dr. Şahabettin DAĞHAN Bey'e sunduğu katkı ve destekleri için ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
TABLOLAR LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
GİRİŞ.....	1
Stres Faktörü ve Tuz Stresi.....	2
Bitki Stres Toleransında Epigenetik Yaklaşımlar	3
1. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2. MATERYAL VE METOT	26
2.1. Bitki Materyali	26
2.2 Kültür ve Tuz Stresi Ortamlarının Hazırlanması	26
2.3. Sterilizasyon Koşulları	26
2.4. Tohumların Sterilizasyonu.....	26
2.5. Tohumların <i>İn Vitro</i> Koşullarda Kültüre Alınması ve Bitki Rejenerasyonu....	26
2.6. Bitkilere Tuz Stresi Uygulanması.....	26
2.7. Bitkisel Örneklerin Hasat Edilmesi ve Muhafazası.....	27
2.8. DNA İzolasyonları.....	27
2.8.1. DNA'nın saflaştırılması	28
2.9. Restriksiyon Endonükleazlar ile DNA'nın Kesilmesi.....	28
2.10. CRED-iPBS Amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesi.....	29
2.10.1 iPBS Markörlerle Belirli Bölgelerin Çoğaltılması	29
2.11. Sonuçların Değerlendirilmesi	30
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	32
3.1. <i>İn Vitro</i> Koşullarda Bitki Rejenerasyonu ve Tuz Stresi Uygulanması	32
3.2. CRED-iPBS Amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesi.....	32
3.3. CRED-iPBS Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi, Polimorfizm Yüzdesi ve Genomik Kalıp Stabilitesi (GKS%)	35
3.4. Kök ve Yaprakta Metilasyon Sınıflarının Dağılımı ve Toplam Metilasyon Oranları	41
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
KAYNAKÇA.....	47

ÖZET

TUZ STRESİNE MARUZ BIRAKILAN *Amaranthus hypochondriacus* GENOTİPİNİN EPİGENETİK BAKIMINDAN İNCELENMESİ

MUNİS, İbrahim

Yüksek Lisans, Tarla Bitkileri Bölümü

Danışman: Doç. Dr. Murtaza HACIZADE

Mart 2025, 60 sayfa

Tahıl amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*), yüksek protein, karbonhidrat ve besin elementleri gibi özellikleri nedeniyle yalancı tahıl (pseudocereal) olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca çeşitli çevresel stres koşullarına karşı gösterdiği yüksek tolerans, onu sürdürülebilir tarımsal uygulamalar açısından önemli kılmaktadır. Bununla birlikte, *A. hypochondriacus* da dâhil olmak üzere tüm bitkiler, yaşamları boyunca tuz stresi gibi çeşitli abiyotik stres faktörlerine maruz kalmakta ve bu durum büyüme ve gelişmelerini olumsuz etkileyerek verim kayıplarına yol açmaktadır. Bu durum karşısında bitkiler, bu tür stres koşullarına karşı genomlarında çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan epigenetik değişimler, transkripsiyon düzeyinde gen ekspresyonunu düzenleyerek, bitkilerde tolerans geliştirmektedir. Bu çalışmada ise, epigenetik çalışmaları kapsamında, tuz stresine maruz kalan *A. hypochondriacus* bitkisinde DNA metilasyon olaylarının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, bitkiler *in vitro* koşullarında ve MS besin ortamında dört hafta boyunca yetiştirildikten sonra 200 mM NaCl içeren besi ortamlarında 3, 6 ve 9 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılmıştır. Daha sonra kök ve yaprak dokularından DNA izolasyonları gerçekleştirilerek metilasyon kalıplarındaki değişimleri belirlemek amacıyla CRED-iPBS yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 3., 6. ve 9. günlerde yaprak dokusunda ortalama polimorfizm oranları sırasıyla %38,33, %44,42 ve %54,16; kök dokusunda ise %40,50, %53,85 ve %58,33 bulunmuştur. Sınıf dağılımlarının analizine göre, bant bazlı toplam metilasyon oranı (TMO) kökte strese bağlı olarak %68,4'ten %64,3'e gerilemiş (hafif hipometilasyon), yaprakta ise anlamlı bir azalma göstermemiş ve metilasyon korunumu sergilemiştir. Dolayısıyla kökte metilasyon kaybı, yaprakta ise nispi metilasyon korunumu gözlenmiştir. Bu bulgular, epigenetik yanıtların kök ve yaprak dokularında farklı profiller sergilediğini ayrıca stresin süresine bağlı olarak bu yanıtların derecesinde anlamlı değişimler ortaya çıktığını göstermiştir. Çalışmada, DNA metilasyonundaki farklılıkların tuz stresine verilen yanıtla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Elde edilen verilerin, benzer çalışmalara ışık tutacağı ve ilgili epigenetik süreçlerin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Amaranthus hypochondriacus*, tuz stresi, DNA metilasyonu, CRED-iPBS, polimorfizm.

ABSTRACT

EPIGENETIC INVESTIGATION OF THE *Amaranthus hypochondriacus* GENOTYPE EXPOSED TO SALT STRESS

MUNİS, İbrahim

Master of Science in Department of Field Crops

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murtaza HACIZADE

March 2025, 60 pages

Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is classified as a pseudocereal due to presence of high amount of protein, carbohydrates, and essential minerals. It is also significant for sustainable agricultural production owing to its remarkable tolerance to various environmental stresses like salt stress, throughout its life cycle, negatively impacting growth and development, with yield losses. Plants, have evolved various genomic defense mechanisms against these stresses. Among these mechanisms, epigenetic modifications regulate gene expression at the transcriptional level, enhancing stress tolerance. The study aimed to investigate DNA methylation based changes in salt-stressed *A. hypochondriacus* plants within the scope of epigenetic studies. The experimental plants were initially grown under in vitro conditions on Murashige & Skoog (MS) medium for four weeks. It was followed by their exposure to 200 mM NaCl for durations of 3, 6, and 9 days. Subsequently, DNA was isolated from root and leaf tissues, and the CRED-iPBS method was applied to determine alterations in DNA methylation patterns. According to the results, average polymorphism percentage in leaf tissues was 38.33%, 44.42%, and 54.16% after 3, 6, and 9 days respectively, while corresponding percentages in root tissues were 40.50%, 53.85%, and 58.33%. Class-based methylation analysis revealed that total methylation rates (TMO) in roots decreased from 68.4% to 64.3%, indicating slight hypomethylation, whereas leaves maintained methylation levels without significant decline. Thus, a loss of methylation in roots and relative methylation maintenance in leaves was observed. These findings demonstrate that epigenetic responses exhibit different profiles in root and leaf tissues and display significant variations depending on the duration of stress. The study indicates that differences in DNA methylation are associated with responses to salt stress. It is anticipated that the obtained data will provide insights for similar studies and contribute to a deeper understanding of the related epigenetic processes.

Keywords: *Amaranthus hypochondriacus*, salt stress, DNA methylation, CRED-iPBS, polymorphism.

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan kesim enzimlerin muamele koşulları	28
Tablo 2. CRED-iPBS'de kullanılan reaktif primerler ve bunların bağlanma (T_a) sıcaklığı	29
Tablo 3. PCR karışımlarının bileşenleri.....	30
Tablo 4. Çalışmada kullanılan PCR koşulları.....	30
Tablo 5. <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> enzimlerinin kesim durumunu göstermektedir (Zhang vd. 2016)	31
Tablo 6. <i>Amaranthus hypochondriacus</i> kök ve yaprak dokularında tuz uygulamalarının CRED-iPBS bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri.....	36
Tablo 7. <i>Amaranthus hypochondriacus</i> kök ve yaprak dokularında (tuz stresi uygulamaları) CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve % HMO, FMO ve TMO değerleri	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. CRED iPBS-2075 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	33
Şekil 2. CRED iPBS-2276 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	33
Şekil 3. CRED iPBS-2377 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri,	34
Şekil 4. CRED iPBS-2400 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	34
Şekil 5. CRED iPBS-2415 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri	34

SİMGELER LİSTESİ

Simge	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
dH ₂ O	Distile Su
dS/m	Decisiemens/metre
dk.	Dakika
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
kPa	Kilopaskal
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
NaCl	Sodyum Klorür
v/v	Hacim/Hacim
∞	Sonsuzluk İşareti

KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Adenin
C	: Sitozin
CMT3	: Kromometilaz 3
CpG	: Sitozin-Fosfat-Guanin
CRED-iPBS	: Çift Restriksiyon Enzim Kesimi - Primer Bağlanma Bölgesi (Coupled Restriction Enzyme Digestion - inter-Primer Binding Site)
CRED-RA	: Çift Restriksiyon Enzim Kesimi - Rastgele Çoğaltım (Coupled Restriction Enzyme Digestion and Random Amplification)
CTAB	: Cetyltrimethylammonium bromide
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DME	: Demeter
DML2	: Demeter Benzeri 2
DML 3	: Demeter Benzeri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNMT2	: Hidrojen Peroksit
DRM	: Yeniden Düzenlenmiş Metilaz Alanları (Domains Rearranged Methylase)
EC	: Elektriksel İletkenlik (Electrical Conductivity)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
FMO	: % Tam Metilasyon Oranı
G	: Guanin
GKS	: Genomik Kalıp Stabilitesi
HMO	: % Yarı Metilasyon Oranı
HpaII	: DNA'da metillenmemiş sitozinleri tanıyan restriksiyon enzimi

HPLC	: Yüksek Performans Basınç Sıvı Kromatografisi (High-Performance Liquid Chromatography)
iPBS	: Primerler arası bağlanma bölgesi amplifikasyonu (Inter-primer binding site amplification)
K	: Potasyum
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA
LTR	: Uzun Terminal Tekrarlayan Dizi (Long Terminal Repeat)
MET1	: Metiltransferaz 1
MS	: Murashige ve Skoog Besin Ortamı
MSAP	: Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (Methylation-sensitive amplified polymorphism)
MspI	: DNA'da metillenmiş sitozinleri tanıyan restriksiyon enzimi
Na	: Sodyum
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
P	: Fosfat
PEG	: Polietilen Glikol
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real-Time PCR)
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
ROS1	: Transkripsiyonel Susturmanın Baskılayıcısı 1
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
siRNA	: Küçük Parçalayıcı RNA
T	: Timin

Ta : Optimal Bağlanma Sıcaklığı
Taq Pol. : Taq DNA Polimeraz
TMO : % Toplam Metilasyon Oranı
Tm : Erime Sıcaklığı



GİRİŞ

Amaranthus cinsi (Caryophyllales: Amaranthaceae), yaklaşık 70 yetmiş türe sahip, kısa ömürlü, tek veya çok yıllık, çift çenekli, C4 fotosentez yoluna sahip otsu ve kozmopolit bitkilerden oluşmaktadır (Pratt vd., 1999; Mosyakin ve Robertson, 2003; Dorling, 2008). Dünya çapında çoğunlukla sıcak, ılıman ve tropikal bölgelerde yayılış göstermekte olup, günümüzde Orta ve Güney Amerika, Afrika, Çin ve Hindistan dahil olmak üzere birçok bölgede yaygın olarak bulunmaktadır (Saunders vd., 1983). Amaranth türleri, çoğu zaman agresif yabancı ot olarak tarım alanlarını olumsuz etkilerken; bazı türleri egzotik çiçek yapıları nedeniyle süs bitkisi, bazıları ise yapraklarındaki besleyici özellikler nedeniyle sebze olarak yetiştirilmektedir. Ayrıca, az sayıda tür tohumlarındaki yüksek besin değeri nedeniyle tahıl olarak değerlendirilmektedir. (Chaney vd., 2016). Tahıl amarantları arasında yer alan *Amaranthus hypochondriacus* L., *A. cruentus* L. ve *A. caudatus* L.'nin tarihî kayıtları Meksika'daki Aztek uygarlığına kadar uzanmakta olup, bu türlerin binlerce yıllık bir geçmişe sahip olduğu bilinmektedir. (Sauer, 1967).

Tahıl amarant türlerinin tarımı, yüzyıllar boyunca dini görüşler nedeniyle yalnızca Amerika kıtasıyla sınırlı kalmış; ancak zamanla, özellikle Avrupa başta olmak üzere diğer kıtalara da yayılmıştır. Son yıllarda en fazla tarımı Hindistan'da yapılmaktadır (Pérez Torres vd., 2011; Santra vd., 2024). Tahıl amarant tohumları, zengin besin içerikleri nedeniyle, tahıl olarak değerlendirilmekte ve bu nedenle yalancı tahıl olarak adlandırılmaktadır (Berghofer ve Schoenlechner, 2002; O' Brien ve Price, 2008; Bekkering ve Tian, 2019). Tohumlarında yüksek oranda protein, karbonhidrat, mineral, yağ ve lif içeriğinden dolayı, insan ve hayvan beslenmesinde alternatif besin kaynağı olarak tercih edilmektedir (Manyelo vd., 2022). Bunların yanı sıra, yetiştirme sezonlarındaki yüksek kuraklık, tuzluluk, sıcaklık ve birçok tarımsal üretimi sınırlayan çevresel faktörlere karşı gösterdikleri tolerans nedeniyle tarımsal üretim için uygun iyi bir alternatif ürün olarak öne çıkmaktadır (Riggins ve Mumm, 2021). Söz konusu toleranslığın temelinde; su tüketim verimliliği, bitki büyümesinde genetik ifadenin düzenlenmesi, fotosentez için C4 karbon fiksasyon kullanımı, su taşınımını kolaylaştıran küçük moleküllerin birikimi ve reaktif oksijen türlerinin yok edilmesi, protein stabilitesi ve kazık ile geniş yan kök sistemleri gibi çok sayıda

fizyolojik ve moleküler özellik yer almaktadır (Miller vd., 1984, Jiayi vd., 1989; Johnson ve Henderson, 2002; Omami vd., 2007; Huerta-Ocampo vd., 2009; Aguilar-Hernández vd., 2011; Huerta-Ocampo vd., 2011; González-Rodríguez vd., 2019). Ancak günümüze kadar kuraklık, tuzluluk ve sıcaklık dâhil olmak üzere birçok stres faktörüne tolerans gösteren *Amaranthus hypochondriacus* bitkisinde özellikle moleküler düzeyde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Stres Faktörü ve Tuz Stresi

Stres faktörü, bitkinin optimal büyümesini ve gelişmesini engelleyen, ayrıca tarımsal verim ve üretimi önemli ölçüde kısıtlayan her türlü olumsuz çevresel koşulu ifade etmektedir (Nevo ve Chen, 2010; Poonam-Ahmad, 2017). Söz konusu stres faktörleri, çevresel etkenlere bağlı olarak biyotik ve abiyotik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. En önemli abiyotik stres faktörleri; tuzluluk, kuraklık, besin eksikliği, soğuk, toprak ve atmosfer kirliliği ve aşırı sıcaklıklar olarak izlenilebilmektedir (Lawlor ve Cornic, 2002). Bunların arasından tuz stresi, doğada en yaygın karşılaşılan çevresel faktörlerden biri olup, tarımsal üretimi ve verimliliği en çok sınırlayan etmenler arasında yer almaktadır (Rengasamy, 2010). İklim değişikliğiyle birlikte, dünya genelinde yaklaşık 1,4 milyar hektar tarım arazisi tuzluluk nedeniyle olumsuz etkilenmekte ve bu durum her yıl artarak devam etmektedir (FAO, 2024). Ayrıca, kurak ve yarı kurak bölgelerde veya aşırı sulanan arazilerde tuzluluk sorunu daha belirgin bir şekilde görülmektedir (Hanson vd., 1999; Tuteja, 2007). Buna ilave olarak tuzluluk, toprağın kalitesini düşürerek geniş çapta verimli arazilerin bozulmasına ve tarım dışı kalmasına sebep olmakta; bu durum, gıda güvenliğini tehdit etmekte ve sürdürülebilir büyüme için sağlıklı, verimli topraklara dayanan yerel ekosistemleri bozmaktadır (Ladeiro, 2012).

Tuz stresi, erken evrede bitkilerde osmotik stres olarak ortaya çıkmakta ve bu durum hücrel su kaybına bağlı olarak dehidrasyona neden olmaktadır. Bununla birlikte, tuz stresinin uzun süre devam etmesi durumunda iyonik stres oluşmakta ve bunun sonucunda iyonik denge bozukluğuna neden olabilmektedir. Bu durum, bitkide besin dengesizliklerine yol açmakta ve fotosentez mekanizmasının bozulmasına neden olmaktadır. Artan iyonik kuvvet, hücre zarlarının geçirgenliğini artırarak pasif iyon taşınımını kolaylaştırmakta ve hücre içi ortamda iyon toksisitesine yol açarak enzimatik aktivitelerin inhibisyonuna

neden olabilmektedir (Munns ve Tester, 2008). Ayrıca, oksidatif stres hücre membranına zarar veren ve hücre fonksiyonları bozan lipid peroksidasyonuna yol açmakta; bu süreç, süperoksitler, singlet oksijen ve hidroksi radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olmaktadır (Foyer ve Noctor, 2005). Bu olumsuz etkiler, stresin şiddetine ve süresine bağlı olarak bitkinin büyümesini ve gelişimini yavaşlatarak, verimin ve tarımsal üretimin azalmasına sebep olmaktadır (Horie vd., 2011; Liang vd., 2018; Van Zelm vd., 2020; Zhu, 2001; Chinnusamy vd., 2006). Ancak, bitkiler söz konusu olumsuz koşullara karşın, özellikle moleküler düzeyde çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Söz konusu savunma mekanizmaları arasında, transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde stresle ilişkili gen ekspresyonlarının düzenlenmesi, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, sinyal iletimi, proteinlerin sentezi ve epigenetik düzenlemeler gibi karmaşık süreçler yer almaktadır (Golldack vd., 2011). Söz konusu mekanizmaların sonucunda, fizyolojik ve moleküler düzeyde adaptasyon sağlanabilmektedir (Valliyodan ve Nguyen, 2006).

Bitki Stres Toleransında Epigenetik Yaklaşımlar

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, genetik bilginin ifadesini düzenleyen epigenetik modifikasyon mekanizmalarının bitkisel adaptasyonda önemli bir rol üstlendiğini ortaya koymuştur. Bu mekanizmalar, genotip ve fenotip arasındaki ilişkiyi, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın genlerin farklı şekillerde ifade edilebileceğini ve bunun beraberinde bitkilerin çevresel stres koşullarına karşı geliştirdiği adaptasyon mekanizmalarının anlaşılması açısından önem arz etmektedir (Waddington, 1942; Griffith ve Mahler, 1969).

Bu kapsamda epigenetik, genlerin aktivitesini kontrol eden bir dizi geri dönüşümlü kimyasal süreçler olarak tanımlanmıştır. Bu süreçler, genetik materyale kalıcı hasar vermeden gen ifadesini değiştirebilmektedir (Grant-Downton ve Dickinson, 2005). Söz konusu mekanizmanın temelinde, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi süreçlerin, genetik bilginin okunmasını düzenleyerek bitkilerin abiyotik streslere karşı yanıt geliştirmesinde önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Akhter vd., 2021; Abdurraheem vd., 2024). Söz konusu epigenetik mekanizma, nesiller arasında bilgi aktarımını sağlayarak organizmaların çevresel değişimlere uyum sağlamada yardımcı olabilmektedir (Bond vd., 2007; Grativol vd., 2012).

Epigenetik değişimler kapsamında DNA metilasyonu, bitkilerin büyüme süreçlerini ve çevresel faktörlere karşı verdikleri tepkileri yönlendiren, nesilden nesile aktarılabilen bir kimyasal değişiklik olup, bitkilerde en yaygın mekanizma olarak kabul edilmektedir (H. Zhang vd., 2018; Gallego-Bartolomé, 2020). DNA metilasyonu ilk kez 1963 yılında, bakterilerin DNA'sında belirli bölgelerin metil gruplarıyla işaretlendiği ve hedef genlerin ifade düzeylerinde regülasyonların meydana geldiği gözlemlenmiştir (Gold vd., 1963). Daha sonra benzeri durumun birçok organizmada bitkiler dâhil olmak üzere organizmada da tanımlandığı bildirilmiştir. Bitki genomunda ise metilasyon temelli ortaya çıkan değişiklikler, dokuya, türe veya organelle özgü olarak şekillenebilmektedir (Bhutani vd., 2011). Örnek çalışmada, arpa bitkisinde (*Hordeum vulgare*) kök dokularına kıyasla yaprak dokularında DNA metilasyonunun arttığı gözlemlenmiş ve abiyotik stres kaynaklı metilasyonun organa özgü olabileceği öne sürülmüştür (Konate vd., 2018). Başka bir çalışmada ise, *Glycine max* (soya fasulyesi) köklerinde stres altında belirli gen bölgelerinde metilasyon gerçekleştiği, ancak bu bölgelerin kontrol grubuna kıyasla daha düşük metilasyon düzeyi sergilediği ifade edilmiştir (Chen vd., 2019). Aynı çalışmada, çevresel strese maruz kalan gen bölgelerinin DNA metilasyonu ile hedef alındığı, bu bölgelerde metilasyon seviyesinin arttığı ve stres yanıtı veren söz konusu bölgelerin metilasyon için öncelikli hedef haline geldiği belirtilmiştir.

DNA metilasyonu, adenin bazlarının 6' konumuna (N6-metiladenin veya 6mA) veya sitozin bazlarının 5' konumuna (5-metilsitozin veya 5mC) bir metil grubunun eklenmesiyle gerçekleşmektedir (Dunn ve Smith, 1958; Vanyushin vd., 1968; Ratel vd., 2006; H. Zhang vd., 2018). Genomun yaklaşık %6 ile %25'i metillenmiş sitozin bazları içermekte ve bu oran, gelişim evresi, çevresel koşullar ve stres gibi faktörlere göre değişkenlik göstermektedir (Sahu vd., 2013). Arabidopsis bitkisinde gerçekleştirilen kapsamlı bir çalışmada, genlerin yaklaşık %20-33'ünün metillendiği belirlenmiştir (Penterman vd., 2007). Metilasyon, metiltransferaz adı verilen enzimler tarafından gerçekleştirilmekte ve genellikle genlerin susturulmasına yol açmaktadır (Sahu vd., 2013). Bitkilerde metilasyon, CpG dizilerinin yanı sıra CpNpG ve CpNpN (N, herhangi bir nükleotit) gibi çeşitli dizilerde gerçekleşmekte olup, bu dizilerden CpG ve CpNpG bölgeleri simetrik ve CpNpN bölgesi asimetrik olarak sınıflandırılmaktadır (Miura vd., 2001; Bartels

vd., 2018). Simetrik metilasyon, çoğunlukla CpG ve CpNpG dizilerinde yoğunlaşarak genlerin promotör bölgelerinde birikmekte ve gen susturulmasında rol oynamaktadır. Buna karşılık, asimetric metilasyon ise CpNpN dizilerinde daha yaygın görülmekte olup, *Arabidopsis thaliana* gibi model organizmalarda transpozon hareketlerinin kontrolünde rol oynayarak genomun stabilitesini korumaya yardımcı olmaktadır (Chan, 2005; Kinoshita ve Seki, 2014; Voigt vd., 2015; Banerjee vd., 2017). Bitkilerde asimetric metilasyon, simetric metilasyona göre daha düşük sıklıkta görülmektedir (Vanyushin, 2006). Yüksek bitkilerde DNA metilasyon seviyesini düzenleyen üç temel mekanizma mevcuttur. Bu mekanizmalar, metilasyon bölgelerinin oluşturulması (de novo metilasyon), var olan metilasyon desenlerinin korunması ve metilasyonun ortadan kaldırılması (demetilasyon) olarak sıralanabilmektedir (Wang vd., 2016; Bartels vd., 2018; Yu vd., 2021). Bitkilerde DNA metilasyonunu, özel enzimler aracılığıyla gerçekleştirilmekte olup; bunların başlıcaları MET1 (metiltransferaz1), CMT3 (kromometilaz3) ve DRM (domains rearranged methylase) olarak bilinmektedir. Bu enzimler DNA'nın belirli bölgelerine metil grupları ekleyerek genlerin etkinliğini düzenlemektedir. MET1, genellikle genlerin aktif olmamasını sağlayan bölgelerde (sentromerik bölgeler, transpozonlar) görev yaparken, CMT3 ve DRM sırasıyla CpNpG ve CpNpNp DNA dizilerini hedef almaktadır (Lindroth vd., 2001; Tompa vd., 2002; Yadav vd., 2018).

Günümüzde DNA metilasyonunun belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmakta olup, özellikle belirli bölgelerdeki metilasyon durumunun analizinde CRED (Coupled Restriction Enzyme Digestion) yöntemi yaygın olarak tercih edilmektedir (Wagner ve Capesius, 1981; Hajkova vd., 2002; Lu vd., 2008; Chen vd., 2013). CRED tekniği, DNA metilasyonunu tespit etmeye yönelik olup, iki farklı izoşizomer restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak DNA'nın belirli bölgelerden kesilmesi esasına dayanmaktadır. Burada kullanılan restriksiyon enzimleri, aynı DNA bölgesini tanımakta; ancak metilasyon durumuna göre farklı şekilde kesim yapmaktadır. Enzimlerden biri, iç sitozin (C) metillenmiş olan (CpG) bölgelerini tanıyarak bu bölgeden kesim yaparken, diğeri yalnızca metillenmemiş CCGG dizisini tanımakta ve bu bölgeden kesim gerçekleştirmektedir (Waalwijk ve Flavell, 1978). PCR'da DNA'nın belirli bir primer bölgesinin çoğaltılmasının ardından, bu iki enzimle gerçekleştirilen kesim

işleminin jel elektroforezinde oluşturduğu bant profilleri, polimorfik desenler üzerinden epigenetik düzenlemelerin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Çalışmada, *Amaranthus hypochondriacus* genotipinin tuz stres koşullarındaki epigenetik tepkilerinin belirlenmesi; bitki genomunun çevresel sinyallere verdiği dinamik yanıtları şekillendirmede oynadığı rolün aydınlatılması ile literatürdeki önemli bir boşluğun doldurulmasına ve bitkilerin çevresel streslere verdiği yanıtları daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada “Tuz Stresine Maruz Bırakılan *Amaranthus hypochondriacus* Genotipinin Epigenetik Bakımından Değerlendirilmesi” amaçlanmıştır.



1. KAYNAK ÖZETLERİ

Bir gıda ürününün alternatif tahıl olarak değerlendirilebilmesi için birtakım özelliklere sahip olması gerekir. Bu özelliklerden bazıları deneme yanılma veya günlük tecrübelerle elde edilmekte iken bazıları bir dizi bilimsel çalışma sonucu ortaya çıkmaktadır. Gıda veya yem olarak değerlendirilebilecek bir bitkinin her şeyden önce kolay ulaşılabilir / yetiştirilebilir, besinsel açıdan zengin, olumsuz nitelikler bakımından kabul edilebilir, çevresel koşullara dayanıklı, alternatif ürünlere kıyasla cazip, ulusal ve uluslararası standartlara uygun nitelikte olması gerekir. Son yıllarda gıda maddeleri konusunda artan birtakım sorunlardan dolayı (besinsel içerik, toksik etkiler, ekonomi, üretim süreci, muhafaza şartları vb.) alternatif ürün arayışlarına gidilmiş ve birtakım bitkilerin bu açıkların giderilmesinde önemli rol oynayabileceği değerlendirilmiştir. Bu bitkilerden biri de dünyada bazı bölgelerde yüzyıllardır tarımı yapılan ancak arpa, buğday kadar ilgi görmeyen Amaranth bitkisidir. Amaranth bitkisi ile söz konusu sorunlarla başa çıkılabilmesi yolunda ilerleme sağlanabilmesi için elverişli Amaranth türlerinin birtakım stres koşullarında epigenetik tepkilerinin tespit edilebilmesi gereklidir. Bu amaçla araştırmacılar tarafından *Amaranthus hypochondriacus* türü üzerine birçok araştırmalar yapılmış ve yapılmaktadır.

Tahıl amaranth, özellikle karbonhidrat içeriği bakımından zengin bir yapıya sahip olup, bu karbonhidratların büyük bölümünü nişasta oluşturmaktadır. Literatürde nişasta içeriğinin %57,6 ile %62 arasında değiştiği ifade edilir (Paredes-Lo'pez vd., 1990; Alvarez-Jubete vd., 2010). Nişastanın yanı sıra, amarant tanesinde daha düşük miktarlarda sakaroz, rafinoz, glikoz, fruktoz, stakuyoz, maltoz ve inositol gibi çeşitli şekerler de bulunmaktadır (Saunders ve Becker, 1983).

Dodok vd., (1997) çalışmasına göre, *A. hypochondriacus* bitkisinin lizin içeriği, buğday ununa kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur. Spesifik olarak, *A. hypochondriacus* 16 gram azot başına düşen lizin miktarı 5.95 gram iken, buğday unu için bu değer 2.90 gram olarak belirtilmiştir.

Amaranth tanesinin protein içeriği ve kalitesi FAO/WHO tarafından önerilen protein tamamlayıcılığı standartlarına oldukça yakın bir seviyede olduğu bildirilmektedir (O'Brien ve Price, 2008).

Rivelli vd. (2008) tarafından gerçekleştirilen araştırmada, *Amaranthus* cinsine ait on bir farklı genotipin incelendiği çalışmada, *Amaranthus hypochondriacus* türünün bir bitkiden elde edilen tohum verimi açısından en yüksek tohum verimine (55.4 g) sahip olduğu belirtilmektedir.

MLakar vd. (2009) yaptıkları çalışmaya göre, *A. hypochondriacus* tohumları protein, esansiyel amino asitler (lizin, triptofan, metiyonin), yağ, karbonhidrat ve lif gibi besin öğelerinin zengin bir kaynağı olduğu bildirilmiştir. İlgili bitkinin protein içeriği %15,00-16,60 arasında değişirken (buğdaya kıyasla 2-5 kat), lizin (5,95 g/100 g protein), metiyonin (0,6 g/100 g protein) ve triptofan (1,80 g/100 g protein) gibi vücut tarafından sentezlenemeyen ve besinlerle alınması gereken temel amino asitler açısından da oldukça zengin olduğu belirtilmiştir. Bu tahılın yağ ve karbonhidrat içeriği sırasıyla %6,10-7,30 ve %62,00-67,90 aralığındadır. Ayrıca, amarantın lif içeriği %4,90-5,00 seviyelerinde bulunmaktadır.

Venskutonis ve Kraujalis (2013) tarafından yapılan çalışmada, *Amaranthus hypochondriacus* bitkisinin %3,6 oranında tüm steroidler için önemli bir öncü olan skualen içerdiği belirtilmektedir. Diğer *Amaranthus* türlerindeki skualen oranları ise şu şekilde rapor edilmektedir: *Amaranthus cruentus*'un beş çeşidinde %2,26-5,67, *Amaranthus tricolor*'da %6,1 ve *Amaranthus caudatus*'un çeşitlerinde %2,2 ile %7,5 arasında değişen oranlarda skualen bulunduğu belirtilmektedir. Söz konusu bileşiğin, kanser hücrelerinin gelişimini engelleme (Rao ve Newmark, 1998) ve hiperkolesterolemi gibi rahatsızlıklarda koruyucu etki gösterme (Miettinen ve Vanhanen, 1994; Smith, 2000) potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir.

Amaranth, glutensiz bir sahte tahıl olarak sınıflandırılması ve besin değeri açısından zengin profili nedeniyle sıklıkla 'süper gıda' olarak adlandırılır. Bitkisel proteinin yanı sıra, insan vücudu için gerekli olan tüm esansiyel amino asitleri dengeli bir şekilde içermesi, kalsiyum, diyet lifi, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri, çeşitli vitaminler, mineraller ve antioksidanlar gibi önemli besin öğelerinin zengin

bir kaynağı olması, amaranth'ı beslenme açısından oldukça değerli kılmaktadır (Soriano-Garcia ve Aguirre- Díaz, 2019)

Oteri vd. (2021) tarafından yürütülen çalışmada, dört farklı *Amaranthus hypochondriacus* varyetesinde yağ içeriğinin %5 ile %7 arasında seyrettiği belirlenmiştir. Bu bulgu, literatürdeki diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Örneğin, Petkova ve vd. (2019) farklı coğrafyalardan (Hindistan ve Türkiye) elde edilen amaranth tohumlarında yakın sonuçlar bildirmişlerdir. Rutkowska (2006) ile de la Rosa vd. (2009) tarafından yapılan çalışmalarda ise yağ içeriğinin biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Gresta ve vd. (2020) tarafından gerçekleştirilen araştırmada, yakın tür olan *Amaranthus cruentus* tohumlarında da benzer yağ içeriği değerleri elde edilmiştir.

Zhao vd. (2022) *Amaranthus hypochondriacus* bitkisinin sap ve yaprakları, besin değeri bakımından oldukça zengin olduğunu belirtmişlerdir. Bu bitkisel materyalde, kuru madde bazında %16-23 oranında değişen yüksek miktarda ham protein varlığı bildirilmektedir. Protein içeriğinin yanı sıra, lizin, metiyonin gibi temel amino asitler açısından da zengin olduğu, özellikle lizin içeriği yaklaşık %1 civarında oldukça yüksek bulunmuştur.

Süregelen nüfus artışı, gıda talebini sürekli yükseltmekte ve bu durum tarımsal sistemler üzerindeki baskıyı artırmaktadır. Bu bağlamda, tarımın karşı karşıya olduğu en önemli sorunlardan biri olarak toprak tuzluluğu öne çıkmaktadır. Ladeiro (2012), Kumari vd. (2019) ile Hussain vd. (2019) gibi araştırmacılar, tuzluluğun mahsul verimlerini önemli ölçüde azaltabildiğini vurgulamaktadır. Tuzluluk stresine maruz kalan bitkiler, su alımında zorluk yaşamaktadır ve bu durum iyon dengesizlikleri, oksidatif stres ve hormonal bozukluklar gibi çeşitli fizyolojik sorunlara yol açmaktadır. Bu durum, nihayetinde fotosentez aktivitesinde düşüşe ve bitki büyümesinde azalmaya yol açmaktadır (Hussain vd., 2019). Bu da, gıda güvenliği açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

Toprakta yüksek miktarlarda bulunan tuzlar, özellikle sodyum klorür (NaCl), bitkisel yaşam için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Zhu (2001) tarafından yapılan çalışmada da belirtildiği üzere, aşırı tuzluluk koşulları bitkilerde çeşitli fizyolojik bozukluklara neden olarak büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde

etkilemektedir. Bu durum, bitki hücrelerinde ozmotik dengenin bozulması, mineral beslenmesindeki aksamalar ve toksik iyonların birikimi gibi mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir.

Bitki genotiplerinin tuzluluk stresine karşı gösterdikleri tepkilerin, bitkinin gelişim evresiyle yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Zeng vd. (2002) pirinç üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada da bu durumun doğrulandığı görülmüştür. Araştırmacılar, farklı büyüme dönemlerindeki pirinç genotiplerinin tuz toleransı özelliklerinde önemli farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir.

Tarımsal alanlarda yüksek tuz konsantrasyonu, bitki büyümesi ve gelişmesini olumsuz etkileyerek verim ve kalitede düşüslere yol açmaktadır. Sodyum (Na⁺) ve potasyum (K⁺) gibi mineraller, toprakta doğal olarak bulunan ve bitkiler tarafından alınan önemli besin elementleridir. Ancak, bu elementlerin aşırı birikimi, toprak yapısını bozarak bitki köklerinin su ve besin maddelerini alımını zorlaştırmakta, bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde inhibisyon etkileri gösterebilmektedir (Rodríguez-Rosales vd., 2009).

Amaranthus hypochondriacus, yaygın olarak prens tüyü olarak bilinen bu amarant türü, kökenini Meksika ve Orta Amerika'ya dayandırır. Hem besin değeri açısından zengin olması hem de tuzluluk ve kuraklık gibi zorlu koşullarda adaptasyon yeteneği göstermesi nedeniyle, *Amaranthus hypochondriacus*, özellikle geleneksel tarım yöntemlerinin yetersiz kaldığı bölgelerde sürdürülebilir tarım sistemleri için umut vaat eden alternatif bir bitki türü olarak değerlendirilmektedir. de la Rosa vd. (2009) tarafından yapılan çalışmalar, bu bitkinin bu potansiyeli destekler niteliktedir.

Caines ve Shennan (1999), tuzluluk stresine maruz kalındığında bitkilerde kök büyümesinin sürgün büyümesine göre daha duyarlı olduğunu; Evers vd. (1998) ise *Solanum tuberosum* L. üzerinde yüksek tuz konsantrasyonlarının hem kök hem de sürgün gelişimini sınırladığını belirtmiştir. Tuna vd. (2007) tarafından domates üzerinde yapılan araştırmada da, yüksek tuz konsantrasyonlarının yabancı tip domates (Ailsa Craig) ve ABA eksikliği mutantında (notabilis) yaprak alanının daralmasına ve kök/sürgün oranında artışa yol açtığı ifade edilmektedir. Hasan vd. (2017) ise 15 dS m⁻¹ tuzluluk düzeyinin, farklı buğday çeşitlerinin verimini ciddi şekilde azalttığını saptamıştır.

Amaranth türleri arasındaki tuz dayanıklılığına ilişkin çalışmalar, bu bitkinin stresli koşullara adaptasyon kapasitesi hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. **Omamt vd. (2006)** tarafından yapılan bir çalışmada, *A. tricolor*, *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* ve '83 Accession' olarak adlandırılan dört farklı Amaranth türü ve çeşidi değerlendirdikleri bir çalışmada, tuz stresi altında tüm örneklerin büyümesinin azaldığını, ancak *A. hypochondriacus*'un diğer türlere göre daha yüksek tuz toleransı sergilediğini rapor etmiştir. Omami (2007) ise yine amaranth türlerinde tuzluluk etkilerini araştırarak, farklı türlerin tuz stresine farklı düzeylerde tepki verdiğini aktarmıştır.

Estrada vd. (2021) tarafından yürütülen çalışmada, amaranth bitkisinin (özellikle yüksek tuzlu ortamlara dayanıklı olduğu bilinen türlerin) fizyolojik, anatomik ve moleküler mekanizmaları incelenmiş; su kaybını önleyen düşük stomal sayısı, yapraklardaki stomal açıklık derecesi ve Na⁺ homeostazisinden sorumlu genlerin ekspresyon seviyesi gibi faktörlerin, yüksek tuz koşullarıyla başa çıkabilmekte etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, *A. hypochondriacus*'un brüt enerji içeriği açısından mısırla benzerlik gösterdiği ve tuzluluk-kuraklık gibi zorlu şartlara görece dayanıklı bir C4 bitkisi olduğu, de la Rosa vd. (2009) ve Xia vd. (2021) tarafından da ifade edilmektedir.

Ramani vd. (2023) ise 2019–2020 yıllarında üç farklı amaranth türüne ait on genotip üzerinde yaptıkları deneylerle artan tuzluluk düzeyinin tüm genotiplerde olumsuz sonuçlar doğurduğunu, ancak her genotipin aynı ölçüde etkilenmediğini belirlemiştir. Özellikle GA-5 genotipi, tüm genotipler arasında tuzluluk koşullarında en iyi büyüme performansı sergilemiştir. Türler bazında incelendiğinde ise, *A. hypochondriacus* türünün sürgün ve kök kuru ağırlığındaki azalma oranının diğer iki türe (*A. cruentus* ve *A. caudatus*) göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, *A. hypochondriacus* türünün tuzluluk stresine karşı daha dayanıklı olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir.

Luyckx vd. (2023) tarafından yürütülen çalışmada, *Amaranthus cruentus* L. türüne ait toplam sekiz farklı çeşit tuz stresi toleransı açısından karşılaştırılmıştır. Çalışma, artan toprak tuzluluğunun tarım alanlarında giderek büyüyen bir sorun olduğu göz önüne alınarak, bu çeşitlerin 0, 50 ve 100 mM NaCl altında yetiştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Araştırmada, birçok parametre

incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, 100 mM NaCl'nin tüm çeşitlerde biyokütle üretimini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir.

Bitki türlerinin genetik çeşitliliği, olumsuz çevre koşulları altında gelişim ve stres toleransında önemli bir rol oynamaktadır. Polimorfizm analizleri, bu çeşitliliğin saptanmasında önemli bir araçtır. Terlets kaya vd. (2023) tarafından içerisinde *A. hypochondriacus*'un da bulunduğu 6 farklı Amaranthaceae türünde genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla genetik polimorfizm analizi yoluyla yapılan çalışma kapsamında Amaranthaceae türlerinde yüksek seviyede genetik çeşitlilik tespit edilmiştir. Tespit edilen yüksek düzeydeki genetik çeşitliliğin Amaranthaceae türlerinin olumsuz çevre koşullarına karşı toleranslarının artmasına katkıda bulunabileceği belirtilmiştir.

Bitkilerin abiyotik stres faktörleri gibi çevresel streslere maruz kalması sonucunda DNA metilasyonunda ve histon modifikasyonlarında da değişimler meydana gelebilmektedir (Czajka vd., 2021). Epigenetik gen düzenlemesini yöneten mekanizmaların işleyişi stres koşullarında genetik modilasyonuna dair bilgiler sunarken; bununla birlikte çevresel olumsuz koşullara karşı bitki direncinin artırmasında genetik teknik bilgilerin kullanılması için de bir umut vermektedir (Sahu vd., 2013). Birçok bitki türünde tuz ve kuraklık stresi koşullarında epigenetik tepkilerin belirlenmesi maksadıyla çalışmalar yapılmıştır. Ancak amaranthus cinsine ait bitkilerde her ne kadar abiyotik stres koşullarına dirençli olduklarına dair fizyolojik, biyokimyasal ve genetik tepkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmışsa da epigenetik tepkilere dair çalışmalar konusunda oldukça yetersizdir. Bu bakımdan amaranthus türlerinde yapılan kısmi çalışmaların yanında diğer bitkilerde yapılan benzer çalışmaların irdelenmesi de yapılacak çalışmalara ışık tutmaktadır.

Bitkiler, stres koşullarıyla başa çıkmak ve hayatta kalma olasılıklarını arttırmak amacıyla son yıllarda keşfedilen ve dış streslere verdikleri tepkileri düzenleyen epigenetik mekanizmalardan yararlanabilmektedir (Thakur ve Prasad, 2024). Epigenetik mekanizmalar, stres altındaki bitkilerde mahsul ıslahı için potansiyel bir yetiştirme yöntemi olarak değerlendirilebilmekte ve abiyotik stresler sonucunda çeşitli epigenetik değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, gen ifadesindeki önemli rollerinden ötürü en yaygın bilinen epigenetik süreçler arasında gösterilmektedir (Liu ve He, 2020;

Gupta ve Garg 2023). Nitekim Akhter vd. (2021), DNA metilasyonunun stres koşulları altındaki bitkilerde gen ekspresyonunu düzenleyerek fenotipik değişiklikleri tetikleyebilen birincil epigenetik varyasyon mekanizması olduğunu rapor etmişlerdir. Gupta ve Garg (2023) ise tuz stresi uygulanan hassas ve toleranslı nohut genotiplerinin metilasyon seviyelerini karşılaştırdıkları çalışmada, hassas genotipin toleranslı genotipe göre daha fazla hipermetilasyon sergilediğini belirlemişlerdir. Öte yandan, Wang vd., (2014) tarafından yürütülen farklı bir araştırmada, tuz stresine maruz bırakılan buğdayda tuza duyarlı genlerin promotör bölgelerinde hipometilasyonun ortaya çıktığı ve bunun tuzluluk toleransını artırdığı rapor edilmiştir.

Amaranthus hypochondriacus, *A. cruentus* ve *A. caudatus* gibi amaranth türleri, yalancı tahıl kategorisinde yer alıp yüksek besin değerleri ve çevresel stres koşullarına dayanıklılıkları ile tanınmaktadır (Coelho vd., 2018; Lancíková vd., 2020; Pulvento vd., 2022). Ancak, amaranth bitkilerinin bu güçlü stres toleransının altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle, Amaranth'ta epigenetik düzenlemelerin rolü hakkındaki bilgilerimiz oldukça sınırlıdır.

Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri, yalnızca metabolik süreçleri bozmakla kalmayıp, genetik yapılarını da dolaylı yoldan etkilediği günümüzde daha iyi anlaşılmaktadır. Literatürdeki çalışmalar, tuzluluğun, bitkinin genetik materyalindeki nükleotit sırasını değiştirmeden, genlerin aktiflik düzeylerini etkileyen epigenetik mekanizmalar yoluyla da fizyolojisini değiştirebilmektedir (Apse vd., 1999; Chinnusamy vd., 2006; Bej ve Basak, 2017; Singroha vd., 2022).

Zhong vd. (2009) tarafından buğdayda yapılan bir araştırma, iki farklı kültüvarda (Dekang-961 ve Lumai-15) tuzun yol açtığı DNA metilasyon değişikliklerini göstermiştir. Her iki çeşit de CCGG bölgelerinde hem demetilasyon hem de hipermetilasyon yaşarken, genel düzeyde hipometilasyon görüldüğü rapor edilmiş ve bu değişimlerin doz bağımlı bir etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır. Benzer şekilde, Tan (2010) mısırdaki yapraklarda köklere kıyasla daha yüksek metilasyon kaydedildiğini ve bunun tuz toleransında destekleyici bir faktör olduğunu ileri sürmüştür. Pirinçte de (Feng vd., 2012) dayanıklı varyantlarda metilasyon seviyesi yükselirken, hassas varyantlarda azaldığı görülmektedir.

Karan vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada, tuza tolerans gösteren 4 farklı çeltik çeşidinde DNA metilasyonu, boyutunu ve profillerine olan etkisi araştırılmıştır. Buna göre metilasyon ve demetilasyon desenlerinin çeşit ve dokuya göre değiştiği, ek olarak; bu değişikliklerin tuz stresinde gen ekspresyonunu düzenlemesinde etkili olacağı ifade edilmiştir.

Mastan vd. (2012), *Jatropha curcas* bitkisinde farklı tuzluluk seviyelerinin DNA metilasyonu üzerindeki etkilerini Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) yöntemiyle incelemiştir. Çalışmada, 21 günlük bitkiler, NaCl konsantrasyonları (0, 25, 50, 75 ve 100 mM) ile 24 saatlik bir süre boyunca stres altına alınmış ve kök ile yaprak dokularında DNA metilasyon desenleri analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, kök dokusunda DNA metilasyon seviyelerinin %70,06, yaprak dokusunda ise %57,89 olduğunu göstermiştir. Ayrıca, metilasyon polimorfizmi kök dokusunda %67,22, yaprak dokusunda ise %71,21 olarak kaydedilmiştir. Tuz stresi, kök ve yaprak dokularında hem hipermetilasyon hem de hipometilasyon desenlerine yol açmış ve bu değişikliklerin tuz konsantrasyonuna bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Örneğin, köklerde en yüksek metilasyon oranı %30,32 ile 75 mM NaCl uygulamasında gözlenirken, yapraklarda bu oran %27,98 ile 100 mM NaCl uygulamasında en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

Wang vd. (2014) tarafından yapılan bir başka çalışmada, tuz stresine maruz bırakılan buğdayda strese yanıt olarak tuzluluk duyarlılık genlerinin promotör bölgelerinde hipometilasyonun gözlemlendiğini ve bu durumun tuzluluk toleransını artırdığını rapor etmişlerdir.

Temel (2014) tarafından yürütülen çalışma, farklı tuzluluk seviyelerinin iki arpa çeşidi (Bornova-92 ve Hilal) üzerindeki *in vitro* etkilerini karşılaştırmalı olarak incelemiştir. Çalışmada, Murashige ve Skoog (MS) ortamında farklı NaCl konsantrasyonlarına (0, 50 ve 100 mM) maruz bırakılan örneklerde hem kök hem de sürgün gelişiminde farklı sonuçlarla karşılaşırken DNA metilasyon profillerinin çeşide özgü değişiklikler gösterdiğini kaydetmiştir.

Wang vd. (2015), tuza toleranslı (IL177-103) ve duyarlı (IR64) pirinç çeşitlerini karşılaştırarak yaptıkları çalışmada, her iki çeşidin de tuz stresine maruz bırakıldığında yapraklarındaki DNA metilasyon seviyelerinde küçük

değişiklikler gözlemlenmesine rağmen, köklerde özellikle IR64 çeşidinde önemli ölçüde DNA metilasyonunda değişiklikler olduğunu tespit etmişlerdir.

Garg vd. (2015), farklı stres koşullarına (kuraklık ve tuzluluk) karşı tepki veren üç farklı pirinç çeşidinde (IR64, Pokkali, Nagina 22) DNA metilasyon profillerini bisülfid dizileme yöntemi ile incelemiştir. Çalışma, genetik ve epigenetik mekanizmalar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla, DNA metilasyonunun farklı bağlamlardaki (CG, CHG, CHH) dağılımını ve seviyelerini analiz etmiştir. Sonuçlar, Nagina 22 çeşidinde DNA metilasyon seviyelerinin diğer çeşitlere göre daha yüksek olduğunu ve bu durumun genetik yapıya bağlı olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, gen bölgelerinde metilasyon seviyelerinin azaldığı, ancak transpozon elemanları gibi tekrarlayan dizilerde artış gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle, CG bağlamındaki metilasyon seviyelerinin CHG ve CHH bağlamlarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, stres koşullarına maruz bırakılan çeşitlerde hipermetilasyonun genellikle gen ekspresyonunun baskılanmasıyla ilişkili olduğu, hipometilasyonun ise gen aktivasyonuna yol açabileceği belirtilmiştir.

Arıkan (2016), *Arabidopsis thaliana* üzerinde yapılan bir çalışmada, NaCl uygulamasının genomik DNA metilasyon düzeyine etkileri bitki ve kallus kültürlerinde araştırılmıştır. HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) yöntemi ile gerçekleştirilen analizler sonucunda, NaCl uygulamasının ise hem bitki hem de kallus dokularında hipometilasyona neden olduğu tespit edilmiştir.

Fei vd. (2017) gerçekleştirdiği çalışmada, tuzluluk ve kuraklık stresine maruz kalan iki farklı buğday genotipinde (Changwu134 ve Zhengyin1) belirli genlerin promotör bölgelerindeki DNA metilasyon düzeyleri incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, Changwu134 genotipinde CG ve CHG bağlamlarındaki metilasyon seviyeleri azalırken (demetilasyon), Zhengyin1 genotipinde ise genel olarak sitozin metilasyonu artış göstermiştir. Özellikle CG bağlamında metilasyon düzeyi sabit kalırken, CHG ve CHH bağlamlarında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Tuz stresine maruz kalan bitkilerde görülen DNA metilasyon değişimleri, yalnızca türden türe değil, aynı türde farklı dokular ve gelişim evreleri arasında da çeşitlilik gösterebilmektedir (Wang vd., 2011)

Kumar vd. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada, tuz stresine maruz bırakılan tuza toleranslı (Kharchia-65) ile tuza duyarlı (HD-2329) buğday çeşitlerinin DNA metilasyonundaki değişimler karşılaştırmışlardır. Tuz stresine adaptasyon sağlayan DNA metilasyon seviyelerinde önemli farklılıklar gözlemlediklerini; edindikleri bulgulara göre tuz stresi, HD-2329'un sürgününde CG ve CHH bağlamlarında 5-mC seviyesinde bir artışa neden olurken, köklerde ise bu seviyelerde bir düşüşe yol açtığını tespit etmişlerdir. Buna karşın, Kharchia-65'te tuz stresinin etkisi, CG bağlamında 5-mC seviyesinde bir artış ve CHG bağlamında tüm sitozinlerin metillenmesi şeklinde olduğunu gözlemlediklerini ifade etmektedirler. Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda; epigenetik olarak DNA metilasyonunun tuz stresine toleransı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Konate vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada, tuz stresine maruz bırakılan arpa bitkilerinde DNA metilasyon düzeylerinin incelenmesi sonucunda, yaprak dokusunda köklere göre daha yüksek metilasyon oranları tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma, DNA metilasyonunun bitki organları arasında farklılık gösterebileceğini ve tuz stresine karşı verilen yanıtta önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Başka bir deyişle, araştırmacılar, tuz stresinin etkisi altında DNA metilasyon düzeyinin yaprak ve kök gibi farklı organlarda farklı şekilde düzenlendiğini göstererek, metilasyonun organa özgü bir süreç olduğu belgelenmiştir. Sun vd. (2018) de mısır fidelerinde, 100 ve 200 mmol L⁻¹ NaCl uygulamaları altında hipometilasyonla ilişkili farklı metillenmiş bölgeleri rapor etmiştir.

Chen vd. (2019) tarafından yürütülen çalışmada, *Glycine max* (soya fasulyesi) köklerinde tuz stresine maruz kalan bitkilerde, kontrol grubuna kıyasla DNA metilasyonunda belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Özellikle, CG, CHG ve CHH motiflerindeki metilasyon seviyelerinin sırasıyla %61,2, %39,7 ve %3,2 oranında azaldığı gözlemlenmiştir.

Awana vd. (2019), *Cajanus cajan* (güvercin bezelyesi) üzerinde yaptıkları çalışmada, tuz stresinin epigenetik ve biyokimyasal düzenlemeleri nasıl etkilediğini incelemiştirler. Araştırmada, 161 genotip taranmış ve bu genotiplerden tuza karşı en hassas (ICP1071) ve en toleranslı (ICP7) genotipler belirlenmiştir. Üç haftalık fideler 250 mM NaCl konsantrasyonu ile 7 gün

boyunca stres altına alınmış ve ardından kök ve sürgün dokularında DNA metilasyon desenleri ve biyokimyasal parametreler analiz edilmiştir. Sonuçlar, tuza dayanıklı ICP7 genotipinde, tuz stresi altında global DNA metilasyon seviyelerinde sürgün dokusunda %36'lık ve kök dokusunda %50'nin üzerinde bir azalma olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, tuza hassas ICP1071 genotipinde, köklerde DNA metilasyonunda %16'lık bir artış tespit edilirken, sürgünlerde metilasyon seviyeleri %26 oranında azalmıştır. Metilasyon seviyelerindeki bu değişimlerin, genotiplerin tuz stresine yanıt verme kapasiteleriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Bitkilerde DNA metilasyonu, genetik materyalin işleyişinde önemli bir rol oynayan epigenetik bir modifikasyondur. Bu süreçte, DNA molekülündeki belirli bazlar, metil grupları ile işaretlenir. Bitki genomlarında en sık görülen metillenme türleri, N6-metiladenin (6mA) ve 5-metilsitozin (5mC) olarak bilinir (Zhang vd., 2018). 5mC metilasyonu, genellikle CG, CHG ve CHH gibi farklı nükleotid dizileri üzerinde gerçekleşir (Kumar vd., 2018). Bu metilasyon desenleri, bitkilerin çevresel koşullara adaptasyonunda önemli bir rol oynar. Örneğin, tuzluluk stresine maruz kalan bitkilerde, 6mA metilasyonu genellikle inaktif hale gelirken, 5mC metilasyonunun daha aktif olduğu gözlemlenmiştir (Singroha vd., 2022).

Amaranthus hypochondriacus türünün haploid genom büyüklüğü, yaklaşık 466 megabaz (Mb) olarak belirlenmiştir. Bu değer, model bitki olarak sıkça kullanılan *Arabidopsis thaliana*'ya kıyasla yaklaşık 3,6 kat daha büyük bir genom boyutuna karşılık gelmektedir. Benzer şekilde, pirinç ve mısır gibi önemli tahıl bitkilerinin genomları ile karşılaştırıldığında da *A. hypochondriacus*'un genomu sırasıyla yaklaşık 1,1 ve 0,2 kat daha büyüktür. Genomunda tahmini olarak 23.059 protein kodlayan gen bulunmaktadır (Royal Botanic Gardens, Kew, n.d.) Genomun yaklaşık %48'lik bir kısmını oluşturan tekrarlayan DNA dizileri, özellikle kopya-benzeri retrotranspozonlar, genom büyüklüğündeki bu farklılaşmada önemli bir rol oynamaktadır. Diploid bir tür olan *A. hypochondriacus*, $2n=32$ kromozom sayısına sahiptir. Yüksek bitkilerde gen sayısının genel olarak 25.000 ile 43.000 arasında değişmektedir. Bu karşılık, *A. hypochondriacus*'un gen sayısı bu aralığın alt sınırına yakın bir değer taşımaktadır (Clouse, 2015).

Gupta ve Garg (2023) tarafından yürütülen çalışmada, tuz stresine karşı hassas ve toleranslı nohut genotiplerinde metilasyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, hassas genotiplerde hipermetilasyon oranının daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Guangyuan vd. (2007), *Brassica napus* üzerinde yaptığı çalışmada, 10–1.000 mmol/L NaCl altında bitki büyümesi, genetik modifikasyonlar ve DNA metilasyon profilleri arasındaki ilişkiyi ele almıştır. 50 mmol/L NaCl'nin büyümeyi teşvik edebildiğini, ancak 200 mmol/L ve üzerindeki konsantrasyonların ciddi engellere yol açtığını gözlemlemiştir. Çalışmada AFLP analizi sonucunda, 0-1.000 mmol/L NaCl konsantrasyonlarında tuz stresine maruz kalan bitkilerde DNA dizilerindeki genetik değişimlerin doza bağımlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. 200 mmol/L üzerindeki konsantrasyonlarda, DNA'daki genetik modifikasyonlar önemli ölçüde artmış ve bant desenlerinde rastgele kaybolmalar veya yeni bantların ortaya çıkması gözlemlenmiştir. Ayrıca, tuz konsantrasyonlarının artışıyla genetik mesafenin de arttığı, ancak en yüksek genetik değişimlerin 500 mmol/L NaCl'de gerçekleştiği ve bu seviyenin üzerinde genetik değişimlerin azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, aşırı tuz seviyelerinin bitkiyi öldürmeden önce yeterli DNA modifikasyonuna yol açacak kadar uzun süre etki edememesinden kaynaklanmaktadır.

Aynı çalışmanın devamında MSAP analizi sonuçlarına göre, 10–200 mmol/L NaCl konsantrasyonlarındaki tuz stresinin DNA metilasyonu üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. Çalışma, kontrol koşullarında DNA'daki CCGG dizilerinin %26,6'sının sitozin metilasyonuna uğradığını, ancak 200 mmol/L NaCl altında bu oranın %44,2'ye yükseldiğini göstermiştir. Metilasyon değişiklikleri, hem hipometilasyon hem de hipermetilasyon olaylarını içermiştir; ancak, hipermetilasyonun daha yaygın olduğu görülmüştür. Özellikle, 50 mmol/L NaCl'de metilasyon seviyelerinde %38,6'ya ulaşan bir artış kaydedilirken, 100 mmol/L'de %42,6'ya ve 150 mmol/L'de %44,2'ye kadar yükselmiştir. Metilasyon profilleri, farklı tipte bantların (Tip I, Tip II, Tip III) oluşumuyla ilişkilendirilmiştir. Kontrol koşullarında Tip I bantları toplamın %63,2'sini oluştururken, Tip III bantları %20,5 oranında gözlenmiştir. Ancak, 200 mmol/L NaCl uygulaması altında Tip III bantlarının oranı önemli ölçüde artmıştır.

Li vd. (2009), *Gossypium hirsutum* (pamuk) üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, tuz stresinin genom çapında DNA metilasyon seviyelerine etkisini MSAP yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Çalışma, pamuk bitkileri Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında yetiştirilmesi ve farklı NaCl konsantrasyonlarına (100, 150 ve 200 mmol/L) maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında genetik ve epigenetik değişikliklerin meydana geldiği tespit edilmiş ve artan tuz konsantrasyonunun hem genel hem de tam DNA metilasyon oranlarında azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu değişimlerin özellikle kök dokusunda daha belirgin olduğu belirtilmiş ve 200 mmol/L NaCl uygulaması altında tam metilasyon oranının %31,4'ten %29,5'e düştüğü rapor edilmiştir. Çalışma ayrıca, belirli DNA bölgelerinde ortaya çıkan hipometilasyonun ve buna bağlı gen ekspresyon değişimlerinin, tuz stresine adaptasyon sürecinde potansiyel bir düzenleyici mekanizma olarak işlev görebileceğini öne sürmüştür.

Song vd. (2012), *Glycine max* (soya fasulyesi) üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında, tuz stresinin DNA metilasyonu üzerindeki etkilerini analiz etmişlerdir. Araştırmada, 14 günlük soya fasulyesi fideleri, 150 mM NaCl konsantrasyonu altında 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle strese maruz bırakılmıştır. DNA metilasyonu üzerindeki etkiler, bisülfid dizileme ve Methylation-Sensitive DNA Gel Blot yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Sonuçlar, tuz stresinin bazı tuza duyarlı transkripsiyon faktörlerinin promotör bölgelerinde DNA metilasyon seviyelerini azalttığını ortaya koymuştur. Promotörlerde CG, CNG ve CNN metilasyon bağlamalarının her birinde, stres uygulamasının süresine bağlı olarak belirgin demetilasyon gözlenmiştir. DNA metilasyonunda meydana gelen bu değişikliklerin, stres koşullarına yanıt olarak gen düzenlemeleriyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.

Demirkıran vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, arpa bitkisinde (*Hordeum vulgare* L. cv. Tokak) tuz stresinin DNA metilasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Söz konusu araştırmada bitkiler, 50 ve 100 mM NaCl içeren koşullarda yetiştirilmiştir. Kullanılan CRED-RA yöntemi ile yapılan analizler sonucunda, özellikle 100 mM NaCl uygulanan bitkilerde metilasyon düzeylerinde belirgin bir artış (hipermetilasyon) saptanmıştır. Enzim kesim desenleri, 5'CCGG3' dizilimindeki her iki sitozin bazının da metillendiğini doğrulamıştır.

Marconi vd. (2013) tarafından yürütülen bir çalışmada, tuz stresinin DNA metilasyonu üzerindeki etkilerini tuza dayanıklı (Exagone) ve tuza duyarlı (Toccata) *Brassica napus* (kanola) çeşitlerinde MSAP yöntemi kullanarak incelemiştir. Çalışma, tuz stresi uygulamasının DNA metilasyon desenlerini hem kontrol hem de stres sonrası iyileşme koşullarında değerlendirmiştir. Sonuçlar, tuza dayanıklı Exagone çeşidinde tuz stresi altında DNA metilasyon seviyelerinin azaldığını (%46,58'den %38,27'ye), buna karşılık tuza duyarlı Toccata çeşidinde DNA metilasyon seviyelerinin arttığını (%41,02'den %48,66'ya) göstermiştir. Ayrıca, Exagone çeşidinde metilasyonda azalma genellikle tamamen metillenmiş bölgelerden demetillenmemiş bölgelere doğru bir dönüşümle ilişkilendirilmiştir. İyileşme süreci boyunca, Exagone çeşidinde metilasyon seviyelerinin stres öncesi düzeylere geri döndüğü tespit edilirken, Toccata çeşidinde stres sonrası metilasyon seviyeleri stres altındaki düzeylerle benzer kalmıştır.

Altunkaynak vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, *Lycopersicon esculentum* (domates) bitkisinde NaCl ve PEG streslerine maruz bırakılan DNA metilasyon seviyeleri CRED-RA tekniği ile belirlenmiştir. Çalışmada, CRED-RA tekniği kullanılarak 0, 6, 9, 12 ve 24 saatlik zaman dilimlerinde 100 mM NaCl ve Polietilen glikol (PEG) uygulanan domates bitkilerinde DNA metilasyon değişiklikleri tespit edilmiştir. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) analizi ile elde edilen DNA bant değişiklikleri 12 saatlik stres uygulamasının demetilasyon/hipometilasyon açısından kritik bir zaman dilimi olduğunu göstermiştir. CRED-RA analizi sonuçlarına göre, PEG uygulamasının NaCl uygulamasına oranla daha fazla DNA metilasyon değişikliğine yol açtığı belirlenmiştir. Her iki stres koşulunda da toplam metilasyon seviyesindeki maksimum düşüşün 9 saatlik uygulamada olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, CRED-RA tekniğinin kuraklık ve tuz gibi abiyotik stres koşullarına maruz kalan bitkilerde DNA metilasyon seviyelerinin belirlenmesinde etkili bir yöntem olduğu sonucuna varıldığı ifade edilmektedir.

Al-Lawati vd. (2016), *Medicago sativa* (yonca) bitkisinde tuz stresinin DNA metilasyonu üzerindeki etkilerini MSAP yöntemiyle incelemiştir. Çalışmada, 11 yerel genotip ve bir tuza dayanıklı kontrol çeşidi, farklı NaCl konsantrasyonlarına (8, 12 ve 20 dS/m) maruz bırakılmış ve kök dokularındaki

DNA metilasyon desenleri analiz edilmiştir. Sonuçlar, yüksek tuz konsantrasyonlarının DNA metilasyon seviyelerinde artışa neden olduğunu ve global DNA metilasyon seviyelerinin 20 dS/m NaCl uygulamasında kontrol grubuna göre %26 oranında yükseldiğini ortaya koymuştur. MSAP analizi, metilasyon desenlerindeki değişikliklerin genotipler arasında epigenetik çeşitlilik meydana getirdiğini ve yüksek tuzluluk seviyelerinde metilasyonun daha belirgin hale geldiğini göstermiştir. Özellikle, metilasyon seviyelerindeki artışa paralel olarak hemimetilasyonun azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, DNA metilasyonunun, genotiplerin tuz stresine adaptasyonunda önemli bir epigenetik düzenleyici mekanizma olabileceğini işaret etmektedir.

Yaish vd. (2018), *Medicago truncatula*'da tuz stresinin DNA metilasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve genom çapında bir metilasyon haritası oluşturmuşlardır. Çalışmada, NaCl (%20 dS/m, 204 mM) uygulamasıyla kontrol ve tuz stresi koşullarında kök dokusundan DNA örnekleri elde edilmiş ve Whole-Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) yöntemi kullanılmıştır. Araştırma, toplamda yaklaşık 50 milyon farklı metillenmiş bölge tespit etmiş ve bunların %7'sinde tuz stresine yanıt olarak anlamlı değişiklikler ($p < 0,05$) gözlemlenmiştir. Analizler, metillenmiş bölgelerin %77'sinin mCHH bağlamında, %9,1'inin mCG ve %13,9'unun mCHG bağlamında yer aldığını göstermiştir. Tuz stresi altında tüm metilasyon bağlamlarında (mCG, mCHG, mCHH) metilasyon seviyelerinde %3,8 ile %10,2 arasında bir artış olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, gen bölgelerinde genel metilasyon düzeylerinin azaldığı ancak genomun diğer bölgelerinde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Shi vd. (2018), klonal bir istilacı bitki türü olan *Alternanthera philoxeroides*'in (su mercimeği) tuzluluk stresine karşı verdiği epigenetik yanıtları MSAP yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmada, farklı genotipler genç ve olgun bitkiler olarak sınıflandırılmış ve NaCl çözeltisi ile 7 ve 30 günlük tuzluluk uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Tuz stresi, DNA metilasyon profillerinde değişikliklere neden olmuş ve genotipler arasında farklılık gösteren epigenetik çeşitlilik artışı gözlemlenmiştir. Sonuçlar, tuzluluk stresinin genotipler içindeki epigenetik çeşitliliği önemli ölçüde artırdığını ve bu etkinin stres süresi uzadıkça daha belirgin hale geldiğini ortaya koymuştur. Özellikle olgun bitkilerde, genç bitkilere kıyasla daha yüksek seviyede epigenetik çeşitlilik gözlemlenmiştir. Bunun

yanı sıra, epigenetik değişikliklerin genotipler arasında rastgele dağılım gösterdiği ve belirli lokuslarda sabit değişiklikler olmadığı rapor edilmiştir. Epigenetik değişikliklerin, klonal bitkilerin genetik çeşitlilik eksikliğini telafi ederek çevresel streslere adaptasyon potansiyelini artırdığı öne sürülmüştür.

Ghaffarian ve Sara (2020) tarafından yürütölen çalışmada, farklı tuz toleransına sahip iki arpa (tuza toleranslı Sahara3771 ve tuza duyarlı Clipper) çeşidinde DNA metilasyon düzeyleri araştırılmıştır. CRED-RA tekniği ile yapılan analizlerde, tuz stresinin arpa çeşitlerinin hem kök hem de sürgün kısımlarında metilasyon düzeylerinde önemli değişiklikler gözlemlenmiştir. Özellikle köklerde metilasyon seviyesi oldukça arttığını ifade etmişlerdir. Tuza duyarlı olan Clipper çeşidinde ise hem gövde hem de köklerde metilasyon seviyesinde artış gözlemlenmiştir, ancak bu artış Sahara3771'e göre daha düşük olduğu belirtilmiştir.

Yapılan birtakım çalışmalarda, primer bağlanma bölgesi (iPBS) işaretçilerinin genetik çeşitliliği ve popölasyon yapısını belirlemede kullanıldığı gösterilmiştir (Karık vd., 2019; Karagoz vd., 2020). iPBS yöntemi, transpoz elementlerin LTR bölgelerinin dizi bilgisine ihtiyaç duyulması sorununu çözmek için geliştirilmiştir (Kalendar vd., 2010). Bu yöntem, LTR transpozonları tarafından paylaşılan intergenik DNA bölgelerini hedef alan primerler ile birbirine yakın iki iPBS'nin PCR ile çoğaltılmasına dayanmaktadır. Bu primerler CRED ile birlikte hareket ederek iki farklı izoşizomer restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak DNA'nın kesimini sağlamaktadır. Her iki enzim de aynı restriksiyon dizisini (5'-CCGG-3') tanısa da, DNA metilasyonuna farklı duyarlılık göstermektedirler. Bir enzim CpG bölgelerindeki metillenmiş sitozinleri (C) tanıyıp keserken, diğer enzim sadece metillenmemiş 5'-CCGG-3' dizisini tanır ve bu bölgeden kesim yapmaktadır (Waalwijk ve Flavell, 1978). PCR'da DNA'nın bir primerinin çoğaltılmasının ardından bu iki enzim ile fragmentlarının jelde yürütölmesi sonucunda polimorfik bantlar oluşmakta ve bu bantların epigenetik düzenleme ile ilişkisi incelenmektedir. Bu yöntem, özellikle bitkilerin çevresel streslere karşı geliştirdiği epigenetik değişikliklerin incelenmesinde büyük bir öneme sahiptir.

Pour vd. (2019) tarafından yürütölen çalışmada, Haymana 79, Kılçksız ve Bezostaja buğday çeşitlerinde farklı seviyelerde Al toksisitesine maruz kalan

bitkilerde DNA metilasyonu seviyeleri CRED-iPBS yöntemi ile incelemiştir. Çalışmalarında, özellikle yüksek dozda alüminyuma maruz kalan buğdayların DNA metilasyon seviyesinde önemli ölçüde artış meydana geldiğini gözlemlemiştir. Bu ve benzer çalışmalar, CRED-iPBS'nin tuz, kuraklık, ağır metal gibi çeşitli stres faktörlerinde de güvenilir sonuçlar sunduğunu doğrulamaktadır (Demirel vd., 2023; Türkoğlu vd., 2023a, 2023b).

Bitki epigenetiği alanında yapılan araştırmalar, DNA metilasyonunun bitki gelişimi, stres tepkileri ve genetik çeşitlilik üzerindeki etkilerini anlamak için çeşitli sınıflandırma yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir. Zhang vd. (2016), DNA metilasyon sınıflandırmaları ve bu sınıflandırmaların bitki epigenetik araştırmalarındaki uygulamaları üzerine bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmalarında, buğday (*Triticum aestivum* L.) kök uçlarında Ca^{2+} eksikliğinin hücre döngüsü ve DNA metilasyonu üzerindeki etkilerini incelemiştir. DNA metilasyon değişimlerini değerlendirmek için izoşizomer enzimleri *HpaII* ve *MspI* kullanılmış ve CRED-RA (Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplified Polymorphic DNA) tekniğine dayalı olarak DNA metilasyonunu dört farklı sınıfa ayırmışlardır: Sınıf I-II-III-IV. Bu sınıflandırma, DNA metilasyonunun farklı türlerini (tam metilasyon, yarı metilasyon ve metilasyon olmayan durumlar) ayırt etmekte ve epigenetik modifikasyonların mekanizmalarını anlamaya olanak tanımaktadır. Ayrıca, Wang vd. (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışma, DNA metilasyon sınıflandırma yöntemlerinin geçerliliğini ve uygulanabilirliğini desteklemiş, bu yöntemlerin farklı bitki türlerinde ve çeşitli stres koşullarında DNA metilasyon analizlerinde etkili bir araç olduğunu göstermiştir.

Orhan vd. (2020), *Brassica oleracea* L. cv. Yalova-F1 genotipinde NaCl (tuz stresi) ve putresin (Put) uygulamalarının epigenetik düzeydeki etkilerini incelemiştir. Çalışmada, DNA metilasyon değişikliklerini değerlendirmek için *MspI* ve *HpaII* enzimlerine dayalı CRED-RA tekniği kullanılmıştır. Araştırmada, tam metilasyon (FMO), yarı metilasyon (HMO) ve toplam metilasyon (TMO) oranları hesaplanmış ve stres koşullarının DNA metilasyonu üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, toplam metilasyon oranlarının %59,0 ile %71,8 arasında değiştiğini göstermiştir. En yüksek toplam metilasyon oranı (%71,8), 50 mM NaCl ve 0,01 mM Put kombinasyonunda kaydedilmiştir. Tam

metilasyon oranlarının (FMO), tüm uygulamalarda yarı metilasyon oranlarından (HMO) daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Pathak vd. (2021), pirinç (*Oryza sativa*) üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında, tuz stresinin genom çapında metilasyon profillerinde önemli değişikliklere yol açtığını ve özellikle belirli genomik bölgelerde hem hipermetilasyon hem de hipometilasyon meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Skorupa vd. (2021), *Beta vulgaris* ve halofitik akrabası *Beta vulgaris* ssp. maritima üzerinde yaptıkları araştırmayla, tuz stresine ya da ani tuz şokuna maruz kalındığında promotör bölgelerin hipermetilasyon ve hipometilasyon arasında gidip gelebileceğini göstermiştir. Bu da, farklı alt türlerin çeşitli tuz koşullarına karşı değişken metilasyon tepkileri verebileceğini ortaya koymaktadır.

HpaII enzimi, *Hemophilus parainfluenzae* kökenli olup, CmCGG dizilerini tanımakta ancak metilasyon varlığında ilgili bölgeyi kesememektedir. *MspI* ise *Moraxella* cinsi bakterilerden elde edilen, 5'CmCGG3 bölgesini hedefleyen ve iç sitozin bazının metillenme durumuna daha duyarlı bir endonükleazdır (New England Biolabs, b.t.). Bu enzimlerin farklı metilasyon hassasiyetleri, epigenetik profillerin karşılaştırmalı analizinde büyük kolaylık sağlamaktadır (Bird vd., 1985; Deaton ve Bird, 2011; Angeloni ve Bogdanovic, 2021).

Hosseinpour vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada, CRED-iPBS tekniği ile buğday bitkisinde tuz stresine bağlı DNA metilasyon değişimlerini incelemişlerdir. *HpaII* ve *MspI* restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan analizler, tuz stresinin ve farklı uygulamaların sitozin metilasyon seviyelerini etkilediğini göstermişlerdir. Çalışma sonucunda edinilen bulgular, tuz stresinin buğday genomunda hipometilasyona neden olduğunu ve bazı uygulamaların bu etkiyi azaltabileceğini ifade etmişlerdir.

A. hypochondriacus özelinde epigenetik düzeyde (özellikle DNA metilasyonu gibi) veri sunan çalışmalar son derece sınırlı kalmaktadır. Oysa ki, pirinç, buğday, arpa ve *Arabidopsis* gibi pek çok model türde, DNA metilasyonu başta olmak üzere epigenetik süreçlerin tuz stresi adaptasyonunda temel rol oynadığı bilinmektedir.

Bu kapsamda, *in vitro* koşullarda *A. hypochondriacus* bitkilerine tuz stresi uygulayarak DNA metilasyon değişimlerini incelemek, hem literatürdeki bu boşluğu kapatmaya hem de tuz stresine karşı olası epigenetik düzenlemeleri aydınlatmaya yönelik önemli bir adım olacaktır. Böyle bir yaklaşım, *A. hypochondriacus*'un epigenetik düzeydeki stres yanıtlarını ortaya koyarken, ıslah ve genetik mühendisliği çalışmaları için de değerli ipuçları sunabilecektir. *İn vitro* sistemlerde çevresel faktörlerin denetiminin daha kolay olması sayesinde, farklı tuzluluk seviyelerinin DNA metilasyon düzeyini ve dağılımını nasıl etkilediği çok daha detaylı biçimde araştırılabilir. Bu tez çalışmasının temel hedefi, *A. hypochondriacus*'ta DNA metilasyon profilini değerlendirip, türün tuz stresine adaptasyon potansiyelinde epigenetik mekanizmaların rolünü aydınlatmak ve aynı zamanda genel bitki epigenetiği literatüründe mevcut bilgileri daha da zenginleştirmektir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada, bitki materyali olarak Şırnak Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden temin edilen *Amaranthus hypochondriacus* tohumları kullanılmıştır. Bu tez çalışması, Şırnak Üniversitesi Ziraat Fakültesi bünyesinde bulunan laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir.

2.2 Kültür ve Tuz Stresi Ortamlarının Hazırlanması

Bitki rejenerasyonu ortamı, 4,4 g Murashige ve Skoog (MS) besin ortamı, %3 sukroz ve katılaştırmak amacıyla %0,6 agar kullanılarak hazırlanmıştır. Tuz stresi uygulaması ise, aynı ortama ek olarak 200 mM tuz (NaCl) ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan farklı MS ortamlarının pH seviyeleri, 5,8 olarak ayarlanmıştır.

2.3. Sterilizasyon Koşulları

Hazırlanmış olan besin ortamı, saf su, kültür kapları, pens ve diğer ekipmanlar, otoklav cihazında 118 kPa basınç altında, 121 °C'de, 15 dk. boyunca inkübe edilerek sterilizasyonu sağlanmıştır.

2.4. Tohumların Sterilizasyonu

Bitki materyali olarak kullanılan tohumların sterilizasyonu, %10'luk NaOCl çözeltisinde ve 15 dakika süreyle, karıştırıcıda döndürülerek gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, sterilize edilen tohumlar 3 kez ve 5'er dakika süreyle steril saf suda (dH₂O) durulama işlemine tabi tutulmuştur.

2.5. Tohumların *In Vitro* Koşullarda Kültüre Alınması ve Bitki Rejenerasyonu

Sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar, her steril magenta'da 5'er tohum olmak üzere MS ortamında 4 hafta boyunca kültüre alınmıştır. Ancak, tüm kültürlerde çıkış sonrası homojen ve sağlıklı gelişen bitkiler baz alınarak, her magenta'da 3'er bitki kalacak şekilde seyreltilmiştir. Tüm kültürler, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda inkübe edilmiştir.

2.6. Bitkilere Tuz Stresi Uygulanması

Dört hafta boyunca yetişen ve gelişen bitkiler, 200 mM NaCl içeren MS ortamına aktarılarak tuz stresi uygulamasına tabi tutulmuştur. Tuz stresi

uygulaması, 3, 6 ve 9 gün olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kontrol bitki grubunda ise, tuz ilavesiz MS besi ortamı kullanılmıştır. Tüm kültürler, 24 °C’de ve 16 saat ışık ile 8 saat karanlık iklim koşullarına tabi tutulmuştur.

2.7. Bitkisel Örneklerin Hasat Edilmesi ve Muhafazası

İnkübasyon sürelerinin (kontrol, 3, 6 ve 9 gün) NaCl uygulanması sonunda, kök ve yaprak ayrı olacak şekilde sıvı azotla dondurularak hasat edilmiştir. Hasat edilen bitki örnekleri; K (ikinci harf olarak): kontrol grubu, 3, 6, 9: tuz uygulama günleri, son harf olarak K: kök, Y: yaprak dokusu olmak üzere kodlanmıştır. Tüm bitki örnekleri, -80 °C’de, DNA izolasyonu ve laboratuvar analizleri yapılana kadar muhafaza edilmiştir.

2.8. DNA İzolasyonları

Bitkisel DNA'nın izolasyonu, Shagai-Marroof vd. (1984) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) tabanlı protokolü uyarınca gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, kök ve yaprak dokuları ayrı ayrı porselen havanlarda ve sıvı azot eşliğinde iyice öğütüldükten sonra, 0,5 g alınarak 1,0 mL CTAB içeren tüplere aktarılmıştır. Ardından örnekler 60-80 dakika boyunca 60-65°C’de inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca, örnekler her 15 dakikada bir karıştırılmıştır. İnkübasyonun ardından, örneklerin her birine 600 µL kloroform: izoamilalkol (24:1, v/v) karışımı eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Örnekler, 10 dakika boyunca 5700 rpm’de santrifüj edilerek fazlara ayrılmıştır. Oluşan fazlardan en üstteki faz (süpernatant), pipet yardımıyla hassas bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır. Ardından, her tüp için 600 uL, -20°C’de bekletilmiş soğuk izopropanol eklenerek hafifçe karıştırılmış ve tüpler 10-15 dakika boyunca -20°C’de inkübe edilmiş, ardından 10 dakika boyunca 5700 rpm’de santrifüj edilmiştir. Sonra, sıvı faz uzaklaştırılmış ve tüpler iyice kuruyana kadar oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra, her tüp için 500 µL %70’lik etanol eklenmiş ve tüpler ters düz yapılarak pelletin hareket etmesi sağlanmış ve 8 dakika boyunca 5700 devirde santrifüj edilmiştir. Ardından, etanol tamamen tüplerden uzaklaşana kadar tüpler kurutma kâğıdı üzerinde ters çevrilerek 20-30 dakika kadar bekletilip kuruması sağlanmıştır. Son olarak, tüplere 300 µL TE tamponu (Tris-EDTA tamponu) eklenerek bir gece boyunca 4 °C’de bekletilerek DNA’nın çözünmesi sağlanmıştır.

2.8.1. DNA'nın saflaştırılması

Daha önce DNA izolasyonları gerçekleşen örnekler, 5700 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çökelti elde edilmiştir. Sonra, her bir numune tüpüne 200 µL 5 M sodyum klorür çözeltisi ve eşit hacimde %100 saf etanol eklenerek karıştırılmış ve 6000 rpm'de 5 dakikalık ikinci bir santrifüj işlemi ile çökelti (pellet) elde edilmiştir. Bununla birlikte, süpernatant uzaklaştırılmış ve numunelerin kuruması sağlanmıştır. Son olarak, pellet, 200 µL saf suda çözdürülmüş, +4 °C'de bir gece bekletilmiş ve ardından -20 °C'de uzun süreli saklama için dondurulmuştur.

Elde edilen DNA numunelerinin konsantrasyonları, Thermo Scientific Multiskan GO spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, 168 Third Avenue Waltham, MA, USA) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen ölçümler sonucunda, her bir numunenin DNA konsantrasyonu, deney protokollerine uygun olarak 30 ng/µL olacak şekilde ayarlanmış ve deneyler için hazır hale getirilmiştir.

2.9. Restriksiyon Endonükleazlar ile DNA'nın Kesilmesi

DNA metilasyon profilini belirlemek amacıyla, tüm bitki (kontrol, 3, 6 ve 9 gün) gruplarına ait DNA örnekleri, *HpaII* ve *MspI* restriksiyon endonükleazları ile 37 °C'de, 45 dakika süreyle inkübe edilmiştir. DNA örnekleri, bu süreçte, *HpaII* enzimi CCGG dizisini tanıyarak ve *MspI* enzimi ise aynı dizide sitozinin 5-metil sitozinin varlığında DNA moleküllerini spesifik bölgelerden keserek metilasyon durumuna göre farklı uzunlukta DNA parçalarına (fragmanlara) ayrılmıştır. Enzimatik reaksiyonlar, 20 dakika süre ile 80 °C'de inkübe edilerek sonlandırılmıştır. Kesilen DNA örnekleri, daha sonraki aşamada DNA metilasyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan kesim enzimlerin muamele koşulları

Kesim Enzim Karışımının Hazırlanması	
Kalıp DNA (0,5 µg/ µL)	2,0 µL
1X CutSmart® Buffer	2,5 µL
Kesim Enzimi	1,0 µL
Ultra Saf Su	14,5 µL
TOPLAM	20,0 µL

2.10. CRED-iPBS Amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesi

Çalışmada, 5 farklı iPBS primeri kullanılmıştır. Primerlerin, hedef DNA bölgelerini etkili bir şekilde amplifiye edebilmesi için, primerlerin GC oranı ve erime sıcaklığı dikkate alınmıştır.

Tablo 2’de, çalışmada kullanılan primerlerin isimleri, baz dizilimleri, erime sıcaklıkları (T_m , °C), GC oranları (%) ve optimal bağlanma sıcaklıkları (T_a , °C) sunulmaktadır.

Tablo 2. CRED-iPBS’de kullanılan reaktif primerler ve bunların bağlanma (T_a) sıcaklığı

No	Primer Adı	Sekans (5’→ 3’)	Erime Sıcaklığı (T_m , °C)	GC (%)	Optimal Bağlanma Sıcaklığı (T_a , °C)
1	2075	CTCATGATGCCA	42,1	50,0	51,2
2	2276	GCTCCGATGCCA	50,4	66,7	59,2
3	2377	ACGAAGGGACCA	47,2	58,3	53,0
4	2400	CCCCTCCTTCTAGCGCCA	61,6	66,7	51,0
5	2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA	62,5	66,7	61,0

2.10.1 iPBS Markörlerle Belirli Bölgelerin çoğaltılması

Her bir iPBS primeri için PCR amplifikasyonları ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, daha önce restriksiyon enzimleri uygulanarak elde edilen DNA fragmanları, PCR amplifikasyonları için kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyon karışımında kullanılan bileşenler, Tablo 3’te; uygulanan PCR koşulları ise Tablo 4’te detaylı şekilde sunulmuştur.

PCR ile çoğaltılan DNA fragmanları, %1,8 (w/v) agaroz jel elektroforezi kullanılarak yaklaşık 2 saat süreyle yürütülmüş ve fraksiyonlara ayrılmıştır. Son olarak, elde edilen bantlar, Bio-Rad ChemiDoc MP jel görüntüleme sistemi ile görselleştirilmiş ve dijital ortamda kaydedilmiştir.

Tablo 3. PCR karışımlarının bileşenleri

PCR Karışımları		Reaksiyon Koşulları	
Bileşen	Hacim (µL)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)
DNA	1,5	95	5
Buffer	2,0	94	1
MgCl ₂	2,0	50	1
Primer	1,0	72	1
dNTP	0,5	72	10
Taq Pol.	0,3	4	∞
dH ₂ O	12,7		
Toplam	20,0		

Tablo 4. Çalışmada kullanılan PCR koşulları

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Ön Denatürasyon	95	5
Denatürasyon	94	1
Bağlanma (Annealing)	50	1
Uzatma (Extension)	72	1
Final Uzatma	72	10
Saklama (Tutma)	+4	∞

2.11. Sonuçların Değerlendirilmesi

iPBS primerleriyle gerçekleştirilen PCR ampifikasyonları ve elektroforez analizleri sonucunda her primer için bant profilleri elde edilmiştir. Bant profillerinin niteliksel analizi, TotalLab programı ile gerçekleştirilmiş ve bant varlığı (1) ve yokluğu (0) şeklinde değerlendirilmiştir. Kontrol ve uygulama bitki gruplarının kıyaslanması sonucunda ortaya çıkan bant farklılıkları polimorfizm yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Ayrıca DNA metilasyon sınıflandırmaları, Zhang vd. (2016) tarafından tanımlanan yöntemle değerlendirilmiş; söz konusu sınıflar ile metilasyon durumlarına ilişkin detaylar Tablo 5’te sunulmuştur. Ayrıca yarı metilasyon yüzdesi (HMO), Tüm metilasyon yüzdesi (FMO) ve toplam metilasyon yüzdesi (TMO), oranları Fulneček ve Kovařík (2014) ile Orhan vd. (2020)’de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

Tablo 5. *HpaII* ve *MspI* enzimlerinin kesim durumunu göstermektedir (Zhang vd. 2016)

Tipler	Metilasyon durumları	Restriksiyon enzimlerinin kesme durumları			
		<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>Sınıf 1</i>	CCGG C <u>CGG</u> GGCC GGCC	Aktif	Aktif	0	0
<i>Sınıf 2</i>	<u>CCGG</u> GGCC	Aktif	İnaktif	0	1
<i>Sınıf 3</i>	CC <u>GG</u> GG <u>CC</u>	İnaktif	Aktif	1	0
<i>Sınıf 4</i>	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	İnaktif	İnaktif	1	1

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda tuz stresine maruz bırakılan *A. hypochondriacus* bitkisinin kök ve yaprak dokularında meydana gelen epigenetik değişimler incelenmiştir.

3.1. *In Vitro* Koşullarda Bitki Rejenerasyonu ve Tuz Stresi Uygulanması

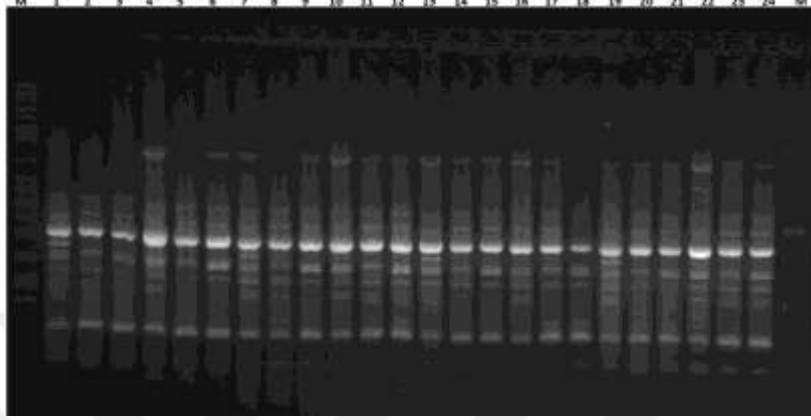
Çalışmada *A. hypochondriacus* genotipine ait tohumlar bitki materyali olarak kullanılmıştır. Tohumlar %10'luk Sodyum Hipoklorid (NaOCl) çözeltisinde 15 dakika süreyle ve ardından 3 x 5 dk steril saf su ile durularak sterilizasyonları sağlanmıştır. Steril tohumların rejenerasyonları, *in vitro* koşullarda ve Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında 4 hafta boyunca 24 °C ±1 ve 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyoduna inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Rejenerasyon sırasında kültür yoğunluğu daha sağlıklı ve homojen bitkilerin seçimi bakımından kontrol altında tutulmuş ve her magenta kabında yalnızca en iyi gelişim gösteren üç bitki kalacak şekilde seyreltilmiştir. Süre bitiminde, sağlıklı ve homojen gelişim gösteren bitkiler, 3., 6. ve 9'uncu gün süreyle 200 mM NaCl içeren MS ortamında kültüre alınarak tuz stresine maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu bitkiler ise yalnızca MS ortamında kültüre alınmıştır. Uygulamalar 24 °C ±1 ve 16 saat ışık ile 8 saat karanlık fotoperiyodunda inkübe edilmiştir. Daha sonra bitki örnekleri hasat edilmiş ve bir sonraki aşamaya kadar – 80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde, uygulama sürelerinin artışına bağlı olarak, özellikle 9 gün uygulamasında fenotipik ve gelişim düzeyinde hafif sararma gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda ise farklı bitki türlerinde yüksek tuzluluk altında yaprak sararması, kök-yaprak deformasyonları ve büyüme oranında düşüş gibi belirtilere rastlandıklarını rapor etmişlerdir (Caines ve Shennan, 1999; Hasanuzzaman vd., 2017; Ramani vd., 2023).

3.2. CRED-iPBS Amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesi

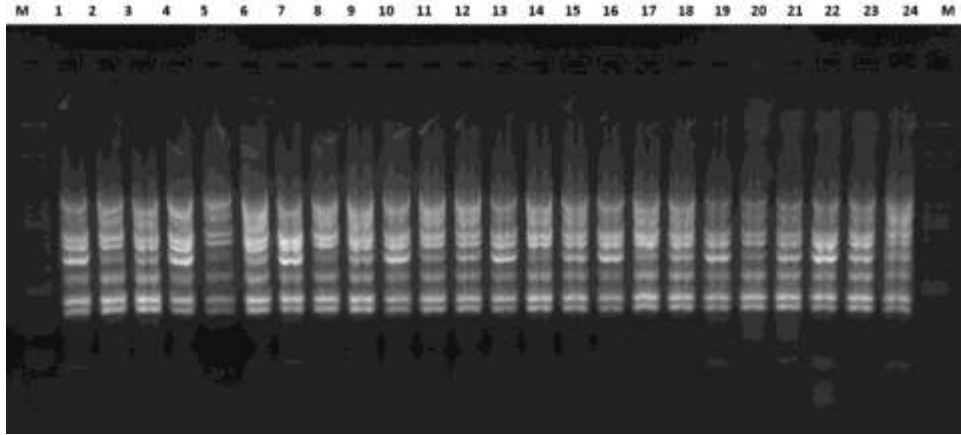
Daha önce hasat edilen ve – 80 °C'de muhafaza edilen bitki örneklerinde yaprak ve kök ayrı olarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA ölçümleri sonucunda, her bir numunenin DNA konsantrasyonu, deney protokollerine uygun olarak 30 ng/µL olacak şekilde ayarlanmış ve deneyler için hazır hale getirilmiştir (Sambrook ve Russell, 2001). Ardından *MspI* ve *HpaII*

endonükleazlar ile DNA örneklerinin kesimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, iPBS-2075, iPBS-2276, iPBS-2377, iPBS-2400 ve iPBS-2415 olmak üzere beş farklı iPBS primeri eşliğinde PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılmış ve görüntüler elde edilmiştir (Şekil 1-5).



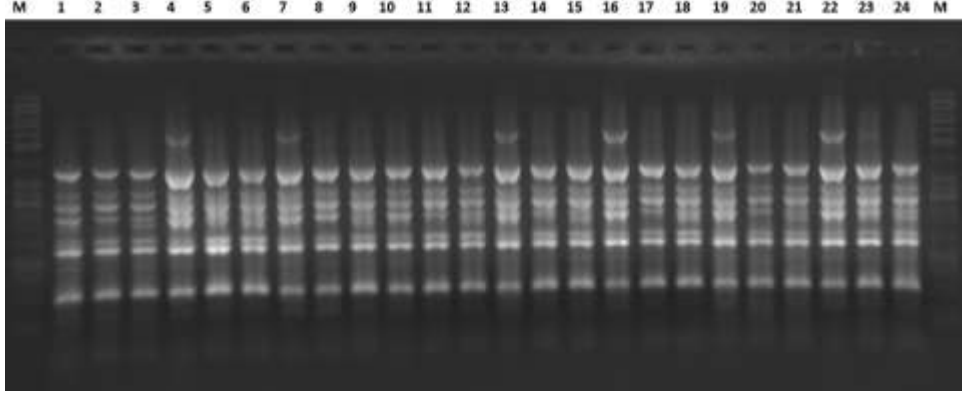
Şekil 1. CRED iPBS-2075 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(M: Ladder, 1: KK-1 (Kontrol-Kök), 2: *MspI*, 3: *HpaII*, 4: KY-1 (Kontrol-Yaprak), 5: *MspI*, 6: *HpaII*, 7: 3K-1 (3 günlük tuz uygulaması-Kök), 8: *MspI*, 9: *HpaII*, 10: 3Y-1 (3 günlük tuz uygulaması-Yaprak), 11: *MspI*, 12: *HpaII*, 13: 6K (6 günlük tuz uygulaması-Kök), 14: *MspI*, 15: *HpaII*, 16: 6Y (6 günlük tuz uygulaması-Yaprak), 17: *MspI*, 18: *HpaII*, 19: 9K (9 günlük tuz uygulaması-Kök) 20: *MspI*, 21: *HpaII*, 22: 9Y-2 (9 günlük tuz uygulaması-Yaprak), 23: *MspI*, 24: *HpaII*, M: Ladder)



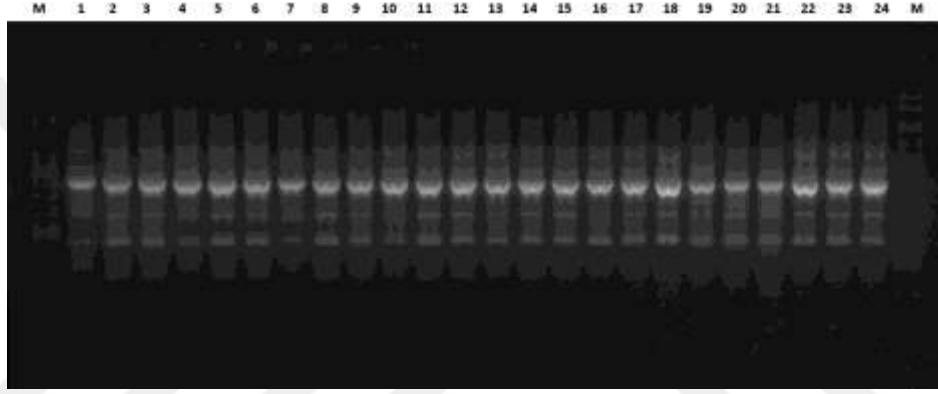
Şekil 2. CRED iPBS-2276 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(M: Ladder, 1: KK-1, 2: *MspI*, 3: *HpaII*, 4: KY-1, 5: *MspI*, 6: *HpaII*, 7: 3K-1, 8: *MspI*, 9: *HpaII*, 10: 3Y-1, 11: *MspI*, 12: *HpaII*, 13: 6K, 14: *MspI*, 15: *HpaII*, 16: 6Y, 17: *MspI*, 18: *HpaII*, 19: 9K, 20: *MspI*, 21: *HpaII*, 22: 9Y-2, 23: *MspI*, 24: *HpaII*, M: Ladder)



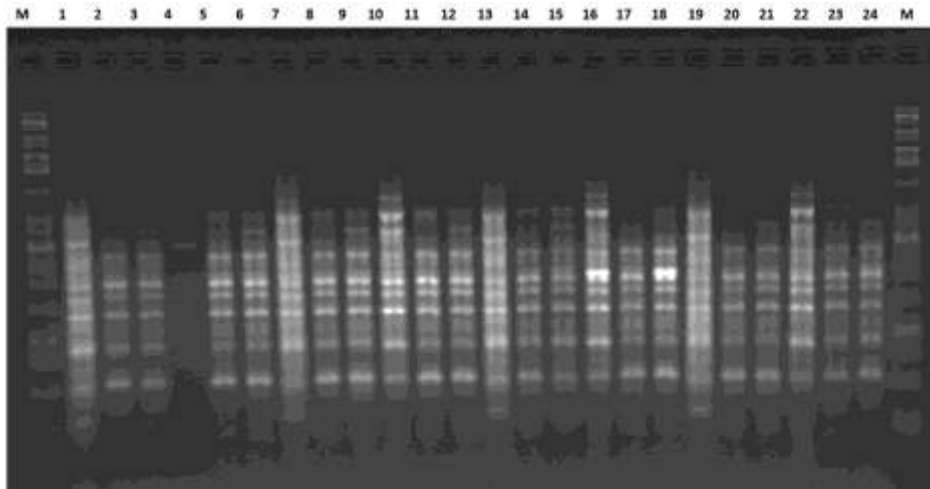
Şekil 3. CRED iPBS-2377 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri,

(M: Ladder, 1: KK-1, 2: *MspI*, 3: *HpaII*, 4: KY-1, 5: *MspI*, 6: *HpaII*, 7: 3K-1, 8: *MspI*, 9: *HpaII*, 10: 3Y-1, 11: *MspI*, 12: *HpaII*, 13: 6K, 14: *MspI*, 15: *HpaII*, 16: 6Y, 17: *MspI*, 18: *HpaII*, 19: 9K, 20: *MspI*, 21: *HpaII*, 22: 9Y-2, 23: *MspI*, 24: *HpaII*, M: Ladder)



Şekil 4. CRED iPBS-2400 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(M: Ladder, 1: KK-1, 2: *MspI*, 3: *HpaII*, 4: KY-1, 5: *MspI*, 6: *HpaII*, 7: 3K-1, 8: *MspI*, 9: *HpaII*, 10: 3Y-1, 11: *MspI*, 12: *HpaII*, 13: 6K, 14: *MspI*, 15: *HpaII*, 16: 6Y, 17: *MspI*, 18: *HpaII*, 19: 9K, 20: *MspI*, 21: *HpaII*, 22: 9Y-2, 23: *MspI*, 24: *HpaII*, M: Ladder)



Şekil 5. CRED iPBS-2415 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri

(M: Ladder, 1: KK-1, 2: *MspI*, 3: *HpaII*, 4: KY-1, 5: *MspI*, 6: *HpaII*, 7: 3K-1, 8: *MspI*, 9: *HpaII*, 10: 3Y-1, 11: *MspI*, 12: *HpaII*, 13: 6K, 14: *MspI*, 15: *HpaII*, 16: 6Y, 17: *MspI*, 18: *HpaII*, 19: 9K, 20: *MspI*, 21: *HpaII*, 22: 9Y-2, 23: *MspI*, 24: *HpaII*, M: Ladder)

3.3. CRED-iPBS Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi, Polimorfizm Yüzdesi ve Genomik Kalıp Stabilitesi (GKS%)

CRED-iPBS (Coupled Restriction Enzyme Digestion - Inter Primer Binding Site) tekniği bitki genomundaki metilasyon seviyelerini ortaya çıkarmasında kullanılan önemli yöntemler arasında yer almaktadır (Kalendar vd., 2010). Bu yöntemde, metilasyon profillerine bağlı olarak *HpaII* ve *MspI* restriksiyon enzimleri aracılığıyla DNA'nın fragmanlara ayrılması sağlanmaktadır. Daha sonra, iPBS primerleri kullanılarak polimorfik bant desenlerin ortaya çıkartılması ile DNA metilasyon seviyelerinin belirlenmesi mümkün olmaktadır. Böylece sözkonusu yöntem sayesinde, bitkilerde, çevresel stres faktörlerine karşı oluşan epigenetik değişimlerin, incelenmesine olanak tanımaktadır (Thiebaut vd., 2019).

Bu çalışmada, tuz stresine maruz kalan *A. hypochondriacus* genotipinde ortaya çıkan epigenetik değişimlerin incelenmesi, CRED analiz yöntemiyle ve beş farklı iPBS primeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda 3, 6 ve 9 gün boyunca strese maruz bırakılan bitkilerde metilasyona dayalı polimorfizm yüzdeleri kontrol bitkilerine kıyasla hesaplanmıştır. Bu hususta $100 \times a / n$ formülü referans alınarak ortalama polimorfizm değerleri elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, kontrol ve farklı sürelerde strese maruz bırakılan bitki grupları arasında polimorfizm farklılıkları gözlenmiş ve veriler Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. *Amaranthus hypochondriacus* kök ve yaprak dokularında tuz uygulamalarının CRED-iPBS bant sayıları ve polimorfizm yüzdeleri

KÖK																				
PRİMER ADI	Kontrol toplam bant sayısı		Mspl toplam bant sayısı			HpaII toplam bant sayısı			Toplam Polimorfik Bant sayısı						Polimorfizm Yüzdesi					
	Mspl	HpaII	3G	6G	9G	3G	6G	9G	Mspl	3G	6G	9G	HpaII	3G	6G	9G	Mspl	3G	6G	9G
iPBS-2075	8	11	8	10	10	10	10	11	8	6	10	13	11	12	100	60	100	100	100	100,0
iPBS-2276	8	8	8	8	8	8	8	8	2	2	2	0	4	4	25	25	25	0	50	50
iPBS-2377	7	9	8	7	8	8	8	10	1	6	7	1	5	5	12,5	85,71	87,5	12,5	62,5	50
iPBS-2400	7	6	8	7	8	6	6	7	2	2	1	0	2	1	25	28,57	12,5	0	33,33	14,29
iPBS-2415	11	12	10	10	9	12	12	12	4	7	6	10	12	10	40	70	66,66	83,33	100	83,33
ortalama	8,2	9,2	8,4	8,4	8,6	8,8	8,8	9,6	3,4	4,6	5,2	4,8	6,8	6,4	40,5	53,85	58,33	39,16	69,16	59,52
YAPRAK																				
PRİMER ADI	Kontrol toplam bant sayısı		Mspl toplam bant sayısı			HpaII toplam bant sayısı			Toplam Polimorfik Bant sayısı						Polimorfizm Yüzdesi					
	Mspl	HpaII	3G	6G	9G	3G	6G	9G	Mspl	3G	6G	9G	HpaII	3G	6G	9G	Mspl	3G	6G	9G
iPBS-2075	8	9	8	10	11	9	6	10	4	8	13	5	11	10	50	80	100	55,55	100	100
iPBS-2276	8	8	8	8	8	8	8	8	2	2	2	4	4	4	25	25	25	50	50	50
iPBS-2377	7	7	7	7	8	9	8	9	4	4	7	6	5	6	57,14	57,14	87,5	66,66	62,5	66,67
iPBS-2400	5	6	6	5	5	6	5	5	1	0	0	0	1	1	16,66	0	0	0	20	20
iPBS-2415	12	12	14	10	12	13	11	11	6	6	7	7	11	10	42,85	60	58,33	53,84	100	90,91
ortalama	8	8,4	8,6	8	8,8	9	7,6	8,6	3,4	4	5,8	4,4	6,4	6,2	38,33	44,42	54,16	45,21	66,5	65,52

Elde edilen bulgulara göre, tuz stresine maruz bırakılan tüm bitki gruplarında polimorfizm oranlarında belirgin değişiklikler gözlemlenmiş, buna karşın kontrol grubunda bu oranın sabit kaldığı tespit edilmiştir. Özellikle kök dokusunda ortalama polimorfizm oranları, 3. günde %40,5, 6. günde %53,9 ve 9. günde %58,3 ile artış gösterdiği ve bununla birlikte yaprak dokusunda ise aynı günlerde sırasıyla %38,3, %44,4 ve %54,2 oranlarında artış gözlenmiştir (Tablo 6). Her iki dokuda da polimorfizm oranlarında artış belirgin olmakla birlikte, kök dokusunda artışın daha erken ve güçlü bir şekilde ortaya çıkması, buna karşın, yaprak dokusunun bu süreci daha düzenli ve kontrollü bir şekilde yönettiği değerlendirilmiştir.

CRED-iPBS tekniği kapsamında Primer bazlı yapılan değerlendirmelerde, iPBS-2075 primeriyle kök dokusunda *MspI* enzim kesiminde 3. ve 9. günlerde %100, 6. günde ise %60 polimorfizm oranı tespit edilmiştir. Ayrıca *HpaII* kesim enzimi açısından, uygulama sürelerinin tamamında %100 polimorfizm elde edilmiştir.

iPBS-2276 primeriyle kök dokusunda *MspI* kesimlerinde 3., 6. ve 9. günlerin tamamında %25 oranında sabit bir polimorfizm değeri elde edilir iken *HpaII* kesim enzimi sonucunda 3. günde herhangi bir polimorfik bant izlenmezken, 6. ve 9. günlerde %50 oranında polimorfizm elde edilmiştir. Yaprak dokusunda aynı primerin, *MspI* kesimlerinde her üç uygulama süresinde %25 polimorfizm değeri izlenir iken, *HpaII* kesimlerinde ise yine her üç uygulama süresinde %50 polimorfizm gözlenmiştir.

iPBS-2377 primeri ve *MspI* kesiminde, kök dokusunda 3. günde, %12,5 6. günde %85,71 ve 9. günde ise %87,5 polimorfizm gözlenmiş; aynı örneklerde *HpaII* enzimi ile kesimde sırasıyla %12,5, %62,5 ve %50 polimorfizm elde edilmiştir. Yaprak dokusunda aynı primerin *MspI* kesimlerinde 3. ve 6. günlerde %57,14 ayrıca 9. günde ise %87,5 polimorfizm oranı izlenirken *HpaII* kesimlerinde 3, 6 ve 9. günlerde sırasıyla %66,66, %62,5 ve %66,67 oranlarında dengeli bir polimorfizm profilin sergilendiği izlenmiştir. Yaprak dokusundaki bu değerler, kök dokusuyla karşılaştırıldığında hem *MspI* hem *HpaII* açısından daha yüksek ve daha dengeli bir varyasyon profili oluşturduğu görülmüştür.

iPBS-2400 primeri ve *MspI* kesim enzimi ile gerçekleşen CRED-iPBS analiz sonuçlarına göre kök dokusunda stresin 3. ve 6. gününde polimorfizm oranları sırasıyla %25 ve %28,57 oranında ayrıca 9. günde %12,5 olarak izlenir iken Yaprak dokusunda, ise 3. gün stres uygulanmasında %16,66 oranında sınırlı bir polimorfizm gözlenmiş, 6. ve 9. günlerde ise herhangi bir polimorfizm yüzdesi söz konusu olmamıştır. Aynı primerin, *HpaII* kesim enzimi ve yaprak dokularındaki CRED analizi sonuçlarına göre 3, 6 ve 9. Gün stres uygulamasında polimorfizm oranları sırasıyla %0, %33,33 ve %14,29 oranlarında olduğu tespit edilmiş iken , yaprak dokusunda 3. günde polimorfizm tespit edilmemiş (%0), 6. ve 9. günlerde ise %20 oranında polimorfizm elde edilmiştir. Genel olarak, iPBS-2400 primeriyle elde edilen bulgular, kök dokusunda epigenetik yanıtın dalgalı bir seyir izlediğini; yaprak dokusunda ise düşük düzeyde, bir yanıtın ortaya çıktığını göstermiştir.

iPBS-2415 primeri ve *MspI* kesimlerinde, kök dokusunda 3., 6. ve 9. günlerde sırasıyla %40, %70 ve %66,67 oranlarında polimorfizm elde edilmiştir. Aynı örneklerde, *HpaII* kesiminde ise sırasıyla %83,33, %100 ve %83,33 polimorfizm oranları tespit edilmiştir. Yaprak dokusunda ise *MspI* kesimlerinde 3., 6. ve 9. günlerde sırasıyla %42,85, %60, %58,33 oranlarında polimorfizm tespit edilmiştir. *HpaII* kesimlerine ait oranlar ise sırasıyla %53,84, %100 ve %90,91 olarak izlenilmiştir. Böylece, kök ve yaprak dokusunda heriki *MspI* ve *HpaII* kesimlerinde polimorfizm değerlerinin birbirine yakın seyrettiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalara bakıldığında, bitkilerde meydana gelen epigenetik değişimlerin farklı tür, genotipine ayrıca stres tipine ve süresine bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. (Zhong vd., 2009; Wang vd., 2011; Ghaffarian ve Sara, 2020; Yung vd., 2023).

Marconi vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, domates bitkisine 250 mM tuz stresi uygulanmış ve ardından metilasyon değişimlerini izlemek üzere CRED-RA analizi gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre polimorfizm oranı %51 olarak tespit edilmiştir (Hosseinpour vd. 2020). Yapılan başka bir çalışmada, kolza (rapeseed) bitkisine ait Exagone (tuza toleranslı) ve Toccata (tuza hassas) çeşitlerinde uygulanan tuz stresinin DNA metilasyonu üzerindeki etkileri, MSAP yöntemiyle analiz edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre kontrol

grubları ile kıyasen metilasyon düzeylerinde farklılıklar ortaya çıktığını ayrıca Exagone çeşitinde metilasyon oranları azılır iken Toccata'da arttığı izlenilmiştir. Çalışma bulguları, tuz stresinin gen ifadesi ve DNA metilasyonu üzerinde anlamlı etkiler yarattığını ortaya koymuştur (Marconi vd. 2013).

Ferreira vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, tuz stresine maruz kalan çeltik bitkisinin kök ve gövde kısımlarında farklı metilasyon düzeyleri tespit edilmiştir. Mousavi vd. (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Zeytin ağaçlarında uygulanan tuz stresinin DNA metilasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre tuz stresi metilasyon seviyelerinde artışına neden olduğunu ve söz konusu artışın tuza toleranslı çeşitlerde daha belirgin olduğu rapor edilmiştir.

Gao vd. (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Chloris virgata* tohumlarının farklı tuz çözeltileri (NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ ve Na₂CO₃) ile 5 günlük tuz stresine maruz bırakılmasının ardından epigenetik düzeydeki değişimler MSAP tekniği kullanılarak incelenmiştir. Bulgular, yapraklardaki toplam metilasyon seviyesinin köklere kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Uygulanan tuzların etkisine bakıldığında; NaCl uygulamasının yapraklardaki metilasyon düzeyinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı, ancak özellikle Na₂CO₃ uygulamasının bu dokuda metilasyon seviyesinde bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Köklerde ise farklı bir patern izlenmiş; NaCl ve Na₂SO₄ uygulamaları metilasyon düzeyini düşürürken, Na₂CO₃ uygulaması anlamlı bir artışa yol açmıştır. Ek olarak, tüm tuz stres koşulları altında hem yaprak hem de köklerde hipermetilasyon ve hipometilasyon değişimleri gözlemlenmekle birlikte, tespit edilen değişimlerin büyük bir kısmının hipometilasyon yönünde olduğu belirtilmiştir.

Altunkaynak vd. (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, domates bitkisinde (*Lycopersicon esculentum* L.) tuz (NaCl) ve kuraklık (PEG) stres koşullarının DNA metilasyonu üzerindeki etkileri CRED-RA yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu araştırma kapsamında, 100 mM konsantrasyonundaki NaCl ve PEG çözeltileri bitkilere 0 ile 24 saat arasında değişen farklı sürelerde uygulanmıştır. Yapılan detaylı incelemeler sonucunda, en belirgin hipometilasyonun uygulamanın 9. saatinde meydana geldiği ve PEG

kaynaklı stresin, NaCl stresine kıyasla DNA metilasyonunda daha fazla değişikliğe yol açtığı tespit edilmiştir.

Gutiérrez-Velázquez vd. (2024) tarafından *Rorippa nasturtium-aquaticum* (su teresi) bitkisinde uygulanan tuz stresi sonrası DNA düzeyinde metilasyon seviyelerini MSAP yöntemi kullanılarak incelenmişlerdir. Araştırma kapsamında, bitkiler 0, 60, 80 ve 100 mM düzeylerinde sodyum klorür (NaCl) uygulamasına tabi tutulmuş ve sonrasında metilasyon profilleri analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, kontrol koşullarındaki bitkilerde %12,16 olarak belirlenen metilasyon oranının, 100 mM NaCl uygulamasında %21,84 olarak önemli ölçüde yükseldiğini ortaya koymuşlardır. Söz konusu artışın, tuz stresinden kaynaklı olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte, bant profillerinde çeşitli hipermetilasyon, hemimetilasyon ve demetilasyon olaylarının mevcudiyetini izlemişlerdir.

Demirkıran vd. (2013) tarafından yürütülen çalışmada, arpa bitkisinde (*Hordeum vulgare* L. cv. Tokak) farklı dozlarda (50 ve 100 mM NaCl) uygulamasından sonra DNA metilasyon seviyelerini değerlendirmişlerdir. Bu kapsamda, CRED-RA yöntemi kullanılmış ve 100 mM NaCl uygulamasında metilasyon düzeylerinde belirgin bir artış (hipermetilasyon) saptanmıştır.

Al-Lawati vd. (2016), yonca (*Medicago spp.*) bitkisinde tuz stresine bağlı DNA metilasyon değişimlerini incelemiş ve yüksek tuzluluk (özellikle 20 dS/m NaCl) koşullarında DNA metilasyon düzeyinin belirgin şekilde arttığını gösterilmiştir. Bulgular, MSAP analizi sonucuna göre metillenmiş bölgelerin sayısı artarken, hemimetillenmiş ve metillenmemiş bölgelerin azaldığını izlemişlerdir. Ayrıca, DNA metilasyon oranında %26'lık artışın gözlemlendiğini ve metiltransferaz genlerinin ekspresyon düzeylerinde de yükselme olduğunu tespit etmişlerdir.

Genomik Kalıp Stabilitesi (GKS %), stres koşullarında yetişen bitkilerde DNA'nın yapısal bütünlüğünü ne derece koruduğunu dolaylı olarak yansıtan bir ölçüt olarak öne çıkmaktadır (Atienzar ve Jha, 2000). Bu bağlamda, GKS değerleri, polimorfizm oranlarıyla birlikte ele alındığında, özellikle metilasyon desenlerindeki değişimlerin kapsamı ve yönü hakkında daha bütüncül bir değerlendirme yapılmasına olanak tanımaktadır. Bu çerçevede polimorfizm ve

GKS oranları, metilasyona bağılı epigenetik yanıtların dokuya ve zamana bağılı farklılıkları üzerine değerlendirilebilmektedir.

Çalışma kapsamında, farklı sürelerde uygulanan tuz stresi sonucunda yüksek polimorfizm oranlarının ortaya çıkması DNA metilasyon kalıplarında değişiklere yol açmış ve bu da GKS (%) değerlerinin düşmesine yorumlanmaktadır. Bunun tersine, ortalama polimorfizm oranlarının sınırlı olduğu durumlarda ise metilasyon profillerinde değişimlerin azaldığı, bu da GKS oranının yüksek kalmasına ve yalnızca sınırlı bölgelerde gerçekteştiiğine yorumlanabilmektedir.

Çalışma bulgularına göre, farklı sürelerde (3, 6 ve 9) uygulanan tuz stresi sonucunda, kök ve yaprak dokularında *MspI* kesimleriyle artan süreye bağılı olarak polimorfizm oranlarında yükseliş izlenmiş, bu durum da GKS (%) oranının azalmasına ayrıca en düşük GKS oranının 9. günde olabildiğı düşünölmüştür. Ayrıca, *HpaII* kesimlerine polimorfizm oranlarına bakıldığında, her iki dokuda da 6. gün ve 9. günde tuz stresi uygulaması 3. güne nazaran artış ancak 9. gün sürede 6. güne nazaran azalış izlenmiş, bu da GKS oranının en yüksek 3. gün uygulamasında ve en düşük GKS oranı ise 6. gün uygulamasında izlenilmiştir. Böylece, görölen değişimlerden yola çıkarak epigenetik yanıtların stres süresine ve dokuya, ayrıca kullanılan kesim enzimine bağılı olarak farklılık göstermiştir.

Pour vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada, üç farklı buğday çeşidinde (Haymana 79, Kılçiksız ve Bezostaja 1) farklı 7,5; 15; 22,5 ve 30 mM dozlarında alüminyum (Al) uygulanmış ve epigenetik düzeydeki değişimleri CRED-iPBS yöntemiyle belirlemişlerdir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, uygulanan Al dozunun artmasıyla birlikte polimorfizm oranlarının yükseldiiğı, buna karşılık genomik kalıp stabilitesinin (GKS) azaldiiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, epigenetik temelli farklı hipometilasyon ve hipermetilasyon profillerinin olduğunu tespit etmişlerdir.

3.4. Kök ve Yaprakta Metilasyon Sınıflarının Dağılımı ve Toplam Metilasyon Oranları

Epigenetik düzenlemelerinin niteliğini ortaya koymak amacıyla, Zhang vd. (2016) metodu baz alınarak metilasyon sınıfları (Sınıf I, II, III ve IV) değerlendirilmiş ve dağılımları belirlenmiştir. Bununla birlikte, Toplam

Metilasyon Oranı (TMO), Tam Metilasyon (FMO) ve Yarı Metilasyon (HMO) seviyeleri belirlenmiştir. Bu kapsamda, Fulneček ve Kovařík (2014) ve Orhan vd. (2020) tarafından belirlenen metod baz alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kök ve yaprak dokularındaki metilasyon tiplerinin sayısal dağılımı ve FMO, HMO, TMO değerlerin yüzdesel gösteren veriler Tablo 7'de sunulmuştur.

Tablo 7. *Amaranthus hypochondriacus* kök ve yaprak dokularında (tuz stresi uygulamaları) CRED-iPBS sınıf türlerinin oluşumları ve % HMO, FMO ve TMO değerleri

	KÖK				YAPRAK			
	KONTROL	3G	6G	9G	KONTROL	3G	6G	9G
<i>Sınıf I</i>	24	26	28	26	30	27	31	28
<i>Sınıf II</i>	11	11	7	9	6	6	5	4
<i>Sınıf III</i>	6	6	5	1	4	4	7	5
<i>Sınıf IV</i>	35	33	36	40	36	39	33	39
<i>Toplam</i>	76	76	76	76	76	76	76	76
<i>%HMO</i>	14,47	14,47	9,21	11,84	7,89	7,89	6,58	5,26
<i>%FMO</i>	53,95	51,32	53,95	53,95	52,63	56,58	52,63	57,89
<i>%TMO</i>	68,42	65,79	63,16	65,79	60,53	64,47	59,21	63,16

Sınıf I, her iki kesim enzimine (*MspI*, *HpaII*) ait bandın olmadığını belirtir ve bu durum metilenmenin gerçekleşmediğini veya yalnızca tek bir DNA zincirinde metilasyonun gerçekleştiğini temsil etmektedir.

Sınıf II, *HpaII* enzime ait bandın olmadığını fakat *MspI* enzime ait bandın varlığını ifade etmekte ayrıca metilasyonun sadece DNA'nın tek zincirinin dış sitozinine bağlandığını göstermektedir.

Sınıf III, *MspI* enzime ait bandın olmadığını fakat *HpaII* enzime ait bandın izlendiğini, bununla birlikte her iki DNA zincirinin iç sitozinine yönelik metilasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

Sınıf IV, her iki enzime ait (*MspI*, *HpaII*) bant durumunun varlığı ayrıca her iki DNA zincirinin dış sitozinine bağlı metilasyon durumunu ifade etmektedir (Yang vd., 2011).

Elde edilen sonuçlara göre, 3, 6 ve 9 gün süreyle uygulanan tuz stresinde ve kök dokularında, Sınıf III metilasyon tipinin kontrol ve uygulama gruplarında diğer sınıflara kıyasla en düşük düzeyde seyrettiği izlenilmiş ve aynı sınıfa ait bant sayısı en yüksek 6 adet ile kontrol ve 3. gün stres uygulama gruplarında gözlemlenmiş ve en düşük ise 1 adet ile 9. gün uygulamasında olduğu izlenmiştir. Sınıf IV metilasyon tipinin kontrol ve uygulama gruplarında diğer sınıflara kıyasla

en fazla bant sayısına sahip olduğu gözlemlenmiş ve aynı sınıfa ait bant sayısı en fazla 40 adet ile 9. gün uygulamasında ve en düşük ise 33 adet ile 3. gün uygulamasında tespit edilmiştir (Tablo 7).

Bununla birlikte, Sınıf I metilasyon tipinde en fazla 28 adet ile 6. gün uygulamasında bant sayısı gözlemlenmiş ve en az Sınıf I tipi bant sayısı 24 adet ile kontrol grubunda tespit edilmiştir. Sınıf II metilasyon bant tipi en fazla kontrol ve 3. gün uygulamalarında 11 adet ile ve en düşük 6. günde 7 adet ile izlenilmiştir.

Yaprak dokularında elde edilen sonuçlara göre, kök dokusuyla benzer bir profil göstermiş ve Sınıf III metilasyon bant tipinin kontrol ve uygulama gruplarında diğer sınıflara kıyasla en düşük düzeyde olduğu izlenilmiştir. Aynı metilasyon tipinde en yüksek bant sayısı 6. günde 7 adet, en az ise kontrol ve 3. gün uygulama grubunda 4 adet olarak belirlenmiştir. Sınıf IV metilasyon tipi diğer sınıflara kıyasla en fazla bant sayısına sahip olduğu gözlemlenmiş ve aynı metilasyon tipinde en fazla bant sayısı 3. ve 9. gün uygulama gruplarında 39 adet ile ayrıca en düşük bant sayısı ise 6. gün uygulama grubunda 33 adet ile tespit edilmiştir (Tablo 7).

Bununla birlikte, Sınıf I metilasyon bant tipine bakıldığında en fazla bant sayısı 31 adet ile 6. gün uygulama grubunda ve en az bant sayısı 27 adet ile 3. gün uygulamasında izlenilmiştir. Sınıf II metilasyonun bant tipinde ise kontrol ve 3.gün uygulamasında diğer gruplara kıyasla daha fazla bant sayısına sahip olduğu ve en düşük bant sayısı ise 9. günde 4 adet olduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca, DNA metilasyon sınıfları Yarı Metilasyon Oranı (%HMO), Toplam Metilasyon Oranı (%TMO) ve Tam Metilasyon Oranı (%FMO) olarak değerlendirilmiş ve Tablo 7’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, kök dokusunda HMO oranları %9,21 ile %14,47, FMO oranları %51,32 ile %53,95 ve TMO oranları ise %63,16 ile %68,42 olarak değişim göstermiştir. Yaprak dokusunda ise, HMO oranları %5,26 ile %7,89, FMO oranları %52,63 ile %57,89, TMO oranları ise %59,21 ile %64,47 olarak değişim gösterdiği izlenilmiştir.

Aydinyurt vd. (2025) tarafından fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinde (Serra ve Elkoca-05) CRED-iPBS yöntemiyle yürütülen çalışmada, tuz ve kuraklık stresi koşulları altında melatonin uygulamasının DNA metilasyon

sınıfları üzerindeki etkilerini incelemiştir. Sadece tuz (150 mM NaCl) uygulamasında Serra çeşidinin kök dokusunda HMO, FMO ve TMO oranları sırasıyla; %7,59, %74,48 ve %82,07 olarak belirlenmiştir. Aynı çeşidin yaprak dokusunda oranlar sırasıyla; %8,51, %70,21 ve %78,72 olarak gözlenmiştir. Elkoca-05 çeşidinin kök dokusunda sadece tuz uygulamalarında HMO, FMO ve TMO oranları sırasıyla; %14,6, %58,39 ve TMO %72,99 olarak belirlenmiştir. Aynı çeşidin yaprak dokusunda oranlar sırasıyla; %10,71, %67,14 ve %77,86 olarak gözlenmiştir.



SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *Amaranthus hypochondriacus* bitkisinin *in vitro* koşullarda tuz stresine karşı geliştirdiği epigenetik yanıtlar CRED-iPBS yöntemiyle değerlendirilmiş; özellikle kök ve yaprak dokularından elde edilen polimorfizm oranları, GKS% değerleri ve metilasyon sınıflarının dağılımları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, tuz stresinin bu türün genomunda kayda değer epigenetik yeniden düzenlemelere yol açtığını ve bu düzenlemelerin hem doku tipi (kök-yaprak) hem de uygulama süresi (3, 6 ve 9 gün) bakımından farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle kök ve yaprak dokularında ve 6. gün uygulama süresinde en yüksek polimorfizm oranı elde edilmiştir. Ayrıca, bant profillerindeki kayıplar ya da yeni bantların ortaya çıkışı ise stres koşullarına karşı gelişen epigenetik yanıtların bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Söz konusu epigenetik değişimler bitkilerin olumsuz koşullara karşı adaptasyon sağlamasında önemli rol üstlendiğini ve farklı bitki türlerinin genetik altyapısında bulunduğu anlaşılabilmektedir. Bu bulgular yalnızca *A. hypochondriacus*'un stres koşullarına verdiği epigenetik yanıtları anlamamıza katkı sunmakla kalmamış, aynı zamanda tarımsal açıdan önemli yeni yaklaşımlara da zemin hazırlamıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların ortaya koyduğu genel çıkarımlar ve konunun taşıdığı önemiyet dikkate alındığında, artan dünya nüfusu ve iklim değişikliğiyle birlikte yaygınlaşan tuzlu topraklar, gıda güvenliği açısından dayanıklı bitki türlerinin anlaşılmasını ve geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu çalışma, tuzluluğun sorun oluşturduğu topraklarda daha iyi yetişebilecek genotiplerin ıslahında yol gösterici ipuçları sunmaktadır.

Gelecekte yürütülecek çalışmalarda, CRED-iPBS tekniğiyle belirlenen genel metilasyon değişimlerini tamamlayıcı nitelikte bisülfid dizileme ya da yüksek çözünürlüklü metilasyon profilleme yöntemleri kullanılarak hangi gen veya gen bölgelerinde değişiklik yaşandığı daha tespit edilebilir. Bu sayede, DNA metilasyonundaki dalgalanmaların hangi genlerin ifadesini etkilediği ve bunun bitkinin fizyolojik tepkileri (iyon birikimi, ozmotik düzenleme ya da fotosentetik performans vb.) ile nasıl ilişkili olduğu ortaya konarak epigenetik mekanizmaların işlevsel önemi netleştirilebilir. Ayrıca, farklı tuz konsantrasyonları ve daha uzun stres süreleri altında epigenetik yanıtın şiddet ve süreye bağlı gelişimi incelenebilir; çiçek, tohum veya genç sürgün gibi başka doku tiplerinin de

metilasyon dinamikleri incelenebilir. *A. hypochondriacus* içerisinde farklı ekotiplerin veya yakın akraba türlerin epigenetik tepkilerini kıyaslamak ise, tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin epigenetik düzeydeki yansımalarını anlamak açısından yararlı olacaktır. Benzer biçimde, stres koşullarının ortadan kalkmasıyla epigenetik profillerin ne kadar sürede ve ne ölçüde eski hâline döndüğü, ayrıca değişimlerin sonraki nesillere (transgenerasyonel) aktarılma potansiyeli de daha uzun vadeli çalışmalarla aydınlatılabilir.

Bu doğrultuda yürütülecek ileri çalışmalar, *A. hypochondriacus*'un abiyotik stres koşullarındaki epigenetik düzenlemelerini daha net kavramamızı sağlayacak olup, diğer bitki türlerine yönelik karşılaştırmalı araştırmalara da yeni ufuklar açması düşünülmektedir. Böylelikle elde edilen veriler, hem temel bilimsel araştırmalar hem de bitki ıslahı ve biyoteknolojik uygulamalar açısından değerli bir rehber niteliği taşıyacaktır.

KAYNAKÇA

- Abdulraheem, M. I., Xiong, Y., Moshood, A. Y., Cadenas-Pliego, G., Zhang, H., & Hu, J. (2024). Mechanisms of plant epigenetic regulation in response to plant stress: Recent discoveries and implications. *Plants*, *13*(2), 163.
- Aguilar-Hernández, H. S., Santos, L., León-Galván, F., Barrera-Pacheco, A., Espitia-Rangel, E., De León-Rodríguez, A., ... & de la Rosa, A. P. B. (2011). Identification of calcium stress induced genes in amaranth leaves through suppression subtractive hybridization. *Journal of plant physiology*, *168*(17), 2102-2109.
- Akhter, Z., Bi, Z., Ali, K., Sun, C., Fiaz, S., Haider, F. U., & Bai, J. (2021). In response to abiotic stress, DNA methylation confers epigenetic changes in plants. *Plants*, *10*(6), 1096.
- Al-Lawati, A., Al-Bahry, S., Victor, R., Al-Lawati, A. H., & Yaish, M. W. (2016). Salt stress alters DNA methylation levels in alfalfa (*Medicago spp*). *Genet Mol Res*, *15*(1), 15018299.
- Altunkaynak, E., Büyük, I., Aydın, S. S., & Aras, S. (2016). New insight into evaluation of DNA methylation levels with CRED-RA technique in the genome of *Lycopersicon esculentum* subjected to NaCl and PEG. *Biol Divers Conserv*, *9*, 163-171.
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(2), 106-113.
- Angeloni, A., & Bogdanovic, O. (2021). Sequence determinants, function, and evolution of CpG islands. *Biochemical Society Transactions*, *49*(3), 1109-1119.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, *285*(5431), 1256-1258.
- Arikan, B. (2016). *Arabidopsis thaliana* abiyotik stres koşullarında genomik DNA metilasyonu analizleri [Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Atienzar, F. A., Cordi, B., Donkin, M. E., Evenden, A. J., Jha, A. N., & Depledge, M. H. (2000). Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquatic toxicology*, *50*(1-2), 1-12.
- Awana, M., Yadav, K., Rani, K., Gaikwad, K., Praveen, S., Kumar, S., & Singh, A. (2019). Insights into salt stress-induced biochemical, molecular and epigenetic regulation of spatial responses in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, *38*, 1545-1561.
- Aydinyurt, R., Yağcı, S., Yaprak, E., Kasapoğlu, A. G., Muslu, S., Uçar, S., ... & Aydın, M. (2025). Epigenetic Evaluation of Melatonin Application in Bean

- (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes Under Drought and Salt Stress Conditions. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1-19.
- Banerjee, A., Wani, S. H., & Roychoudhury, A. (2017). Epigenetic control of plant cold responses. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1643.
- Bartels, A., Han, Q., Nair, P., Stacey, L., Gaynier, H., Mosley, M., & Xiao, W. (2018). Dynamic DNA methylation in plant growth and development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2144.
- Bej, S., & Basak, J. (2017). Abiotic stress induced epigenetic modifications in plants: How much do we know?. *Plant epigenetics*, 493-512.
- Bekkering, C. S., & Tian, L. (2019). Thinking outside of the cereal box: Breeding underutilized (pseudo)cereals for improved human nutrition. *Frontiers in Genetics*, 10, 1289.
- Berghofer, E., & Schoenlechner, R. (2002). Grain amaranth. In *Pseudocereals and less common cereals* (pp. 219–251). Springer.
- Bhutani, N., Burns, D. M., & Blau, H. M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell*, 146(6), 866–872.
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J., & Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, 40(1), 91–99.
- Bond, D. M., & Finnegan, E. J. (2007). Passing the message on: Inheritance of epigenetic traits. *Trends in Plant Science*, 12(5), 211–216.
- Boyko, A., Blevins, T., Yao, Y., Golubov, A., Bilichak, A., Ilnytsky, Y., & Kovalchuk, I. (2010). Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins. *PLOS ONE*, 5(3), e9514.
- Caines, A. M., & Shennan, C. (1999). Interactive effects of Ca²⁺ and NaCl salinity on the growth of two tomato genotypes differing in Ca²⁺ use efficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(7–8), 569–576.
- Chan, S. W. L., Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 351–360.
- Chaney, L., Mangelson, R., Ramaraj, T., Jellen, E. N., & Maughan, P. J. (2016). The complete chloroplast genome sequences for four *Amaranthus* species (Amaranthaceae). *Applications in Plant Sciences*, 4(9), 1600063.
- Chen, Q., Tao, S., Bi, X., Xu, X., Wang, L., & Li, X. (2013). Research of total levels on DNA methylation in plant based on HPLC analysis. *Analytical Methods*, 5(4), 1039–1046.
- Chen, R., Li, M., Zhang, H., Duan, L., Sun, X., Jiang, Q., & Hu, Z. (2019). Continuous salt stress-induced long non-coding RNAs and DNA methylation patterns in soybean roots. *BMC Genomics*, 20, 730.

- Chinnusamy, V., & Zhu, J. K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 133–139.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. In *Genetic engineering: Principles and methods* (Vol. 27, pp. 141–177). Springer.
- Clouse, J. W. (2015). *The Amaranth (Amaranthus hypochondriacus) Genome: Genome, transcriptome and physical map assembly* [Doctoral dissertation, Brigham Young University].
- Coelho, L. M., Silva, P. M., Martins, J. T., Pinheiro, A. C., & Vicente, A. A. (2018). Emerging opportunities in exploring the nutritional/functional value of amaranth. *Food & Function*, 9(11), 5499–5512.
- Czajka, K., Mehes-Smith, M., & Nkongolo, K. (2021). DNA methylation and histone modifications induced by abiotic stressors in plants. *Genes & Genomics*, 43(1), 1–19.
- de la Rosa, A. B., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., & De León-Rodríguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, 49(1), 117–121.
- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010–1022.
- Demirel, F., Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Eren, B., Özkan, G., Uysal, P., & Bocianowski, J. (2023). Mammalian sex hormones as steroid-structured compounds in wheat seedling: Template of the cytosine methylation alteration and retrotransposon polymorphisms with iPBS and CRED-iBPS techniques. *Applied Sciences*, 13(17), 9538.
- Demirkiran, A., Marakli, S., Temel, A., & Gozukirmizi, N. (2013). Genetic and epigenetic effects of salinity on in vitro growth of barley. *Genetics and Molecular Biology*, 36(4), 566–570.
- Dodok, L., Modhir, A. A., Buchtova, V., Halasova, G., & Poláček, I. (1997). Importance and utilization of amaranth in food industry. Part 2. Composition of amino acids and fatty acids. *Food/Nahrung*, 41(2), 108–110.
- Dorling, K. (2008). *RHS AZ Encyclopedia of garden plants*. Dorling Kindersley.
- Dunn, D. B., & Smith, J. D. (1958). The occurrence of 6-methylaminopurine in deoxyribonucleic acids. *Biochemical Journal*, 68(4), 627.
- Estrada, Y., Fernández-Ojeda, A., Morales, B., Egea-Fernández, J. M., Flores, F. B., Bolarín, M. C., & Egea, I. (2021). Unraveling the strategies used by the underexploited amaranth species to confront salt stress: Similarities and differences with quinoa species. *Frontiers in Plant Science*, 12, 604481.

- Evers, D., Hemmer, K., & Hausman, J. F. (1998). Salt stress induced biometric and physiological changes in *Solanum tuberosum* L. cv. Bintje grown in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, 20(3), 3–7.
- Fei, Y., Xue, Y., Du, P., Yang, S., & Deng, X. (2017). Expression analysis and promoter methylation under osmotic and salinity stress of TaGAPC1 in wheat (*Triticum aestivum* L). *Protoplasma*, 254(2), 987–996.
- Feng, Q., Yang, C., Lin, X., Wang, J., Ou, X., Zhang, C., & Liu, B. (2012). Salt and alkaline stress induced transgenerational alteration in DNA methylation of rice (*Oryza sativa*). *Australian Journal of Crop Science*, 6(5), 877–883.
- Ferreira, L. J., Azevedo, V., Maroco, J., Oliveira, M. M., & Santos, A. P. (2015). Salt tolerant and sensitive rice varieties display differential methylome flexibility under salt stress. *PLOS ONE*, 10(5), e0124060.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). *Global status of salt-affected soils*.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866–1875.
- Fulneček, J., & Kovařík, A. (2014). How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics*, 15(1), 1–9.
- Gallego-Bartolomé, J. (2020). DNA methylation in plants: Mechanisms and tools for targeted manipulation. *New Phytologist*, 227(1), 38–44.
- Gao, X., Cao, D., Liu, J., Wang, X., Geng, S., Liu, B., & Shi, D. (2013). Tissue-specific and cation/anion-specific DNA methylation variations occurred in *C. virgata* in response to salinity stress. *PLoS One*, 8(11), e78426.
- Garg, R., Narayana Chevala, V. V. S., Shankar, R., & Jain, M. (2015). Divergent DNA methylation patterns associated with gene expression in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response. *Scientific Reports*, 5(1), 14922.
- Ghaffarian, S., Mohammadi, S. A., Hamian, S., Moghadam Vahed, M., Toorchi, M., & Bandehagh, A. (2020). DNA methylation Pattern in shoot and root of barley under salinity stress. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 33(2), 432–444.
- Gold, M., Hurwitz, J., & Anders, M. (1963). The enzymatic methylation of RNA and DNA, II. On the species specificity of the methylation enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 50(1), 164–169.
- Golldack, D., Lüking, I., & Yang, O. (2011). Plant tolerance to drought and salinity: Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, 30(8), 1383–1391.
- González-Rodríguez, T., Cisneros-Hernández, I., Acosta Bayona, J., Ramírez-Chavez, E., Martínez-Gallardo, N., Mellado-Mojica, E., & Délano-Frier, J.

- (2019). Identification of factors linked to higher water-deficit stress tolerance in *Amaranthus hypochondriacus* compared to other grain amaranths and *A. hybridus*, their shared ancestor. *Plants*, 8(7), 239.
- Grant-Downton, R., & Dickinson, H. G. (2005). Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany*, 96(7), 1143–1164.
- Grativol, C., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2012). Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 176–185.
- Gresta, F., Meineri, G., Oteri, M., Santonoceto, C., Lo Presti, V., Costale, A., & Chiofalo, B. (2020). Productive and qualitative traits of *Amaranthus cruentus* L.: An unconventional healthy ingredient in animal feed. *Animals*, 10(8), 1428.
- Griffith, J. S., & Mahler, H. R. (1969). DNA ticketing theory of memory. *Nature*, 223(5206), 580–582.
- Guangyuan, L., Xiaoming, W., Biyun, C., Gao, G., & Kun, X. (2007). Evaluation of genetic and epigenetic modification in rapeseed (*Brassica napus*) induced by salt stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(11), 1599–1607.
- Gupta, K., & Garg, R. (2023). Unravelling differential DNA methylation patterns in genotype dependent manner under salinity stress response in chickpea. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1863.
- Gutiérrez-Velázquez, M. V., Almaraz-Abarca, N., Ávila-Reyes, J. A., Delgado-Alvarado, E. A., González-Valdez, L. S., Torres-Ricario, R., ... & Vasavilbazo-Saucedo, A. (2024). Effect of salinity on DNA methylation and antioxidant phenolic compounds of wild watercress (*Rorippa nasturtium aquaticum*). *Plant Science Today*, 11, 196-205.
- Hajkova, P., El-Maarri, O., Engemann, S., Oswald, J., Olek, A., & Walter, J. (2002). DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method. In *DNA methylation protocols* (pp. 143–154). Springer.
- Hanson, B., Grattan, S.R., & Fulton, A. (1999). *Agricultural salinity and drainage*. University of California Irrigation Program.
- Hasan, M. M., Baque, M. A., Habib, M. A., Yeasmin, M., & Hakim, M. A. (2017). Screening of salt tolerance capability of wheat genotypes under salt stress condition. *Universal Journal of Agricultural Research*, 5(4), 235–249.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Anee, T. I., Alam, M. U., Bhuiyan, T. F., & Fujita, M. (2017). Approaches to enhance salt stress tolerance in wheat. In *Wheat improvement, management and utilization* (pp. 151–187). IntechOpen.
- Horie, T., Kaneko, T., Sugimoto, G., Sasano, S., Panda, S. K., Shibasaka, M., & Katsuhara, M. (2011). Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Plant and Cell Physiology*, 52(4), 663–675.

- Hosseinpour, A., Haliloglu, K., Tolga Cinisli, K., Ozkan, G., Ozturk, H. I., Pour-Aboughadareh, A., & Poczai, P. (2020). Application of zinc oxide nanoparticles and plant growth promoting bacteria reduces genetic impairment under salt stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L. 'Linda'). *Agriculture*, *10*(11), 521.
- Hosseinpour, A., Ilhan, E., Özkan, G., Öztürk, H. İ., Haliloglu, K., & Cinisli, K. T. (2022). Plant growth-promoting bacteria (PGPBs) and copper (II) oxide (CuO) nanoparticle ameliorates DNA damage and DNA Methylation in wheat (*Triticum aestivum* L.) exposed to NaCl stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *31*(4), 751–764.
- Huerta-Ocampo, J. A., Briones-Cerecero, E. P., Mendoza-Hernandez, G., De Leon-Rodriguez, A., & Barba de la Rosa, A. P. (2009). Proteomic analysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves under drought stress. *International Journal of Plant Sciences*, *170*(8), 990–998.
- Huerta-Ocampo, J. A., León-Galván, M. F., Ortega-Cruz, L. B., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., Mendoza-Hernández, G., & Barba de la Rosa, A. P. (2011). Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Plant Biology*, *13*(3), 472–482.
- Hussain, S., Shaukat, M., Ashraf, M., Zhu, C., Jin, Q., & Zhang, J. (2019). Salinity stress in arid and semi-arid climates: Effects and management in field crops. In *Climate change and agriculture*. IntechOpen.
- Jiayi, L., WS, L., & LX, G. (1989). An observation of the root system growth of grain amaranth and its drought resistance. *Agricultural Research in the Arid Areas*, *3*, 34–41.
- Johnson, B. L., & Henderson, T. L. (2002). Water use patterns of grain amaranth in the northern Great Plains. *Agronomy Journal*, *94*(6), 1437–1443.
- Julkowska, M. M., Hoefsloot, H. C., Mol, S., Feron, R., de Boer, G. J., Haring, M. A., & Testerink, C. (2014). Capturing *Arabidopsis* root architecture dynamics with ROOT-FIT reveals diversity in responses to salinity. *Plant Physiology*, *166*(3), 1387–1402.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P., & Schulman, A. H. (2010). iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, *121*(8), 1419–1430.
- Karagoz, H., Cakmakci, R., Hosseinpour, A., Ozkan, G., & Haliloglu, K. (2020). Analysis of genetic variation and population structure among of oregano (*Origanum acutidens* L.) accessions revealed by agro-morphological traits, oil constituents and retrotransposon-based inter-primer binding sites (iPBS) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *67*, 1367-1384.
- Karan, R., DeLeon, T., Biradar, H., & 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*(6), e40203.

- Karık, Ü., Nadeem, M. A., Habyarimana, E., Ercişli, S., Yildiz, M., Yılmaz, A., ... & Baloch, F. S. (2019). Exploring the genetic diversity and population structure of Turkish laurel germplasm by the iPBS-retrotransposon marker system. *Agronomy*, 9(10), 647.
- Kinoshita, T., & Seki, M. (2014). Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant and Cell Physiology*, 55(11), 1859–1863.
- Konate, M., Wilkinson, M. J., Mayne, B. T., Pederson, S. M., Scott, E. S., Berger, B., & Rodriguez Lopez, C. M. (2018). Salt stress induces non-CG methylation in coding regions of barley seedlings (*Hordeum vulgare*). *Epigenomes*, 2(2), 12.
- Kumar, S., Beena, A. S., Awana, M., & Singh, A. (2017). Salt-induced tissue-specific cytosine methylation downregulates expression of HKT genes in contrasting wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *DNA and Cell Biology*, 36(4), 283–294.
- Kumar, S., Chinnusamy, V., & Mohapatra, T. (2018). Epigenetics of modified DNA bases: 5-methylcytosine and beyond. *Frontiers in Genetics*, 9, 640.
- Kumari, P., Kumari, R., Sharma, B., Prasad, S. K., & Singh, R. K. (2019). Abiotic stress response of field crops: Recent approach. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(4), 1761–1769.
- Ladeiro, B. (2012). Saline agriculture in the 21st century: Using salt contaminated resources to cope food requirements. *Journal of Botany*, 2012, 310705.
- Lancíková, V., Tomka, M., Žiarovská, J., Gažo, J., & Hricová, A. (2020). Morphological responses and gene expression of grain Amaranth (*Amaranthus* spp.) growing under Cd. *Plants*, 9(5), 572.
- Lawlor, D. W., & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 275–294.
- Li, X., Lin, Z., Nie, Y., Guo, X., & Zhang, X. (2009). MSAP analysis of epigenetic changes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under salt stress. *Acta Agronomica Sinica*, 35(4), 588–596.
- Liang, Z., Shen, L., Cui, X., Bao, S., Geng, Y., Yu, G., & Yu, H. (2018). DNA N6-adenine methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell*, 45(3), 406–416.
- Lindroth, A. M., Cao, X., Jackson, J. P., Zilberman, D., McCallum, C. M., Henikoff, S., & Jacobsen, S. E. (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 292(5524), 2077–2080.
- Liu, J., & He, Z. (2020). Small DNA methylation, big player in plant abiotic stress responses and memory. *Frontiers in Plant Science*, 11, 595603.
- Lu, Y., Rong, T., & Cao, M. (2008). Analysis of DNA methylation in different maize tissues. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(1), 41–48.

- Luyckx, A., Lutts, S., & Quinet, M. (2023). Comparison of salt stress tolerance among two leaf and six grain cultivars of *Amaranthus cruentus* L. *Plants*, *12*(18), 3310.
- Manyelo, T. G., Sebola, N. A., Hassan, Z. M., Ng'ambi, J. W., Weeks, W. J., & Mabelebele, M. (2022). Chemical composition and metabolomic analysis of *Amaranthus cruentus* grains harvested at different stages. *Molecules*, *27*(3), 623.
- Marconi, G., Pace, R., Traini, A., Raggi, L., Lutts, S., Chiusano, M., & Albertini, E. (2013). Use of MSAP markers to analyse the effects of salt stress on DNA methylation in rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera*). *PLOS ONE*, *8*(9), e75597.
- Mastan, S. G., Rathore, M. S., Bhatt, V. D., Yadav, P., & Chikara, J. (2012). Assessment of changes in DNA methylation by methylation-sensitive amplification polymorphism in *Jatropha curcas* L. subjected to salinity stress. *Gene*, *508*(1), 125–129.
- Miettinen, T. A., & Vanhanen, H. (1994). Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *59*(2), 356–363.
- Miller, T. E., Wing, J. S., & Huete, A. R. (1984). The agricultural potential of selected C4 plants in arid environments. *Journal of Arid Environments*, *7*(3), 275–286.
- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H., & Kakutani, T. (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*, *411*(6834), 212–214.
- Mlakar, S. G., Turinek, M., Jakop, M., Bavec, M., & Bavec, F. (2009). Nutrition value and use of grain amaranth: Potential future application in bread making. *Agricultura*, *6*(4), 43–53.
- Mosyakin, S. L., Robertson, K. R., & Flora of North America Editorial Committee. (2003). *Amaranthus*. *Flora of North America North of Mexico*, *4*, 410-435.
- Mousavi, S., Regni, L., Bocchini, M., Mariotti, R., Cultrera, N. G., Mancuso, S., & Proietti, P. (2019). Physiological, epigenetic and genetic regulation in some olive cultivars under salt stress. *Scientific Reports*, *9*(1), 1093.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 651–681.
- Nevo, E., & Chen, G. (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell & Environment*, *33*(4), 670–685.
- New England Biolabs. (n.d.). MspI. Erişim: <https://www.neb.com/en/products/r0106-mspi>
- O'Brien, G. K., & Price, M. L. (2008). Amaranth Grain and Vegetable Types. *Echo Technical Note*.

- Omami, E. N. (2007). *Responses of Amaranth to salinity stress* [Doctoral dissertation, University of Pretoria].
- Omamt, E. N., Hammes, P. S., & Robbertse, P. J. (2006). Differences in salinity tolerance for growth and water-use efficiency in some amaranth (*Amaranthus* spp.) genotypes. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *34*(1), 11–22.
- Orhan, E., Uzundumlu, F., Yiğider, E., & Aydin, M. (2020). The effect of putrescine on DNA methylation on cabbage plant under salt stress conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *44*(3), 301–311.
- Oteri, M., Gresta, F., Costale, A., Lo Presti, V., Meineri, G., & Chiofalo, B. (2021). *Amaranthus hypochondriacus* L. as a sustainable source of nutrients and bioactive compounds for animal feeding. *Antioxidants*, *10*(6), 876.
- Paredes-López, O., Barba De La Rosa, A. P., & Cárabez-Trejo, A. (1990). Enzymatic production of high-protein amaranth flour and carbohydrate rich fraction. *Journal of Food Science*, *55*(4), 1157–1161.
- Pathak, H., Kumar, M., Molla, K. A., & Chakraborty, K. (2021). Abiotic stresses in rice production: Impacts and management. *Crop Design*, *1*(1), 100002.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J. H., Ballinger, T., Henikoff, S., & Fischer, R. L. (2007). DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(16), 6752–6757.
- Pérez Torres, B. C., Aragón García, A., Pérez Avilés, R., Hernández, L. R., & López Olguín, J. F. (2011). Estudio entomofaunístico del cultivo de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) en Puebla México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *2*(3), 359–371.
- Petkova, Z. Y., Antova, G. A., Angelova-Romova, M. I., & Vaseva, I. C. (2019). A comparative study on chemical and lipid composition of amaranth seeds with different origin. *Bulgarian Chemical Communications*, *51*, 262–267.
- Poonam, Ahmad, S., Kumar, N., Chakraborty, P., & Kothari, R. (2017). Plant growth under stress conditions: Boon or bane. In *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment* (pp. 291–313). Springer.
- Pour, A. H., Özkan, G., NALCI, Ö., & Haliloğlu, K. (2019). Estimation of genomic instability and DNA methylation due to aluminum (Al) stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) using iPBS and CRED-iPBS analyses. *Turkish Journal of Botany*, *43*(1), 27–37.
- Pratt, D. B., Owen, M. D., Clark, L. G., & Gardner, A. (1999). *Identification of the weedy pigweeds and waterhemp of Iowa*. Iowa State University Extension.
- Pulvento, C., Sellami, M. H., & Lavini, A. (2022). Yield and quality of *Amaranthus hypochondriacus* grain amaranth under drought and salinity at various phenological stages in southern Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *102*(12), 5022–5033.

- Ramani, D. H., Singh, A. K., Prajapati, N. N., Tiwari, K. K., & Bhadauria, H. S. (2023). Genotypic difference in growth and physiological indices of grain amaranth species under salinity stress. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*, 14(2), 268–278.
- Rao, C. V., Newmark, H. L., & Reddy, B. S. (1998). Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, 19(2), 287–290.
- Ratel, D., Ravanat, J. L., Berger, F., & Wion, D. (2006). N6-methyladenine: The other methylated base of DNA. *BioEssays*, 28(3), 309–315.
- Rengasamy, P. (2010). Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology*, 37(7), 613–620.
- Riggins, C. W., & Mumm, R. H. (2021). Amaranths. *Current Biology*, 31(13), R834–R835.
- Rivelli, A. R., Gherbin, P., De Maria, S., & Pizza, S. (2008). Field evaluation of *Amaranthus* species for seed and biomass yields in southern Italy. *Italian Journal of Agronomy*, 3(3), 225–229.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Gálvez, F. J., Huertas, R., Aranda, M. N., Baghour, M., Cagnac, O., & Venema, K. (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signaling & Behavior*, 4(4), 265–276.
- Rutkowska, J. (2006). Amaranthus—roślina przyjazna człowiekowi. *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, 54(1), 6–10.
- Sahu, P. P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports*, 32(8), 1151–1159.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santra, D. K., Schoenlechner, R., & Brenner, D. M. (2024). Sustainability, processing, applications, and international trade of amaranth grain. In *Sustainable Protein Sources* (pp. 399–412). Academic Press.
- Sauer, J. D. (1967). The grain amaranths and their relatives: A revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 54(2), 103–137.
- Saunders, R. M., & Becker, R. (1983). *Amaranthus: A potential food and feed resource*. Springer.
- Shi, W., Hu, X., Chen, X., Ou, X., Yang, J., & Geng, Y. (2018). Increased population epigenetic diversity of the clonal invasive species *Alternanthera philoxeroides* in response to salinity stress. *Genes & Genetic Systems*, 93(6), 259–269.

- Singroha, G., Kumar, S., Gupta, O. P., Singh, G. P., & Sharma, P. (2022). Uncovering the epigenetic marks involved in mediating salt stress tolerance in plants. *Frontiers in Genetics, 13*, 811732.
- Skorupa, M., Szczepanek, J., Mazur, J., Domagalski, K., Tretyn, A., & Tyburski, J. (2021). Salt stress and salt shock differently affect DNA methylation in salt-responsive genes in sugar beet and its wild, halophytic ancestor. *PLOS ONE, 16*(5), e0251675.
- Smith, T. J. (2000). Squalene: Potential chemopreventive agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs, 9*(8), 1841–1848.
- Song, Y., Ji, D., Li, S., Wang, P., Li, Q., & Xiang, F. (2012). The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. *PLOS ONE, 7*(7), e41274.
- Soriano-García, M., & Aguirre-Díaz, I. S. (2019). Nutritional functional value and therapeutic utilization of Amaranth. In *Nutritional value of amaranth*. IntechOpen.
- Sun, L., Miao, X., Cui, J., Deng, J., Wang, X., Wang, Y., & Yang, K. (2018). Genome-wide high-resolution mapping of DNA methylation identifies epigenetic variation across different salt stress in maize (*Zea mays* L.). *BMC Genomics, 19*(1), 1–16.
- Tan, M. P. (2010). Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiology and Biochemistry, 48*(1), 21–26.
- Temel, A. (2014). Comparison of salinity-induced changes in two cultivars of barley. *European Journal of Biology, 73*(2), 9–16.
- Terletskaia, N. V., Khapilina, O. N., Turzhanova, A. S., Erbay, M., Magzumova, S., & Mamirova, A. (2023). Genetic polymorphism in the Amaranthaceae species in the context of stress tolerance. *Plants, 12*(19), 3470.
- Thakur, R., & Prasad, P. (2024). Epigenetic regulation of abiotic stress responses in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1868*(5), 130661.
- Thiebaut, F., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2019). A role for epigenetic regulation in the adaptation and stress responses of non-model plants. *Frontiers in Plant Science, 10*, 246.
- Tompa, R., McCallum, C. M., Delrow, J., Henikoff, J. G., van Steensel, B., & Henikoff, S. (2002). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Current Biology, 12*(1), 65–68.
- Tuna, A. L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., & Yagmur, B. (2007). The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany, 59*(2), 173–178.

- Tuteja, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology*, 428, 419–438.
- Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Tosun, M., Bujak, H., Eren, B., Demirel, F., & Niedbała, G. (2023a). Ethyl methanesulfonate (EMS) mutagen toxicity-induced DNA damage, cytosine methylation alteration, and iPBS-retrotransposon polymorphisms in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, 13(7), 1767.
- Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Tosun, M., Szulc, P., Demirel, F., Eren, B., & Niedbała, G. (2023b). Sodium azide as a chemical mutagen in wheat (*Triticum aestivum* L.): Patterns of the genetic and epigenetic effects with iPBS and CRED-iPBS techniques. *Agriculture*, 13(6), 1242.
- Valliyodan, B., & Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2), 189–195.
- Van Zelm, E., Zhang, Y., & Testerink, C. (2020). Salt tolerance mechanisms of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 71(1), 403–433.
- Vanyushin, B. F. (2006). DNA methylation in plants. In *DNA methylation: Basic mechanisms* (pp. 67–122). Springer.
- Vanyushin, B. F., Belozersky, A. N., Kokurina, N. A., & Kadirova, D. X. (1968). 5-methylcytosine and 6-methylaminopurine in bacterial DNA. *Nature*, 218(5146), 1066–1067.
- Venskutonis, P. R., & Kraujalis, P. (2013). Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: A review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 381–412.
- Voigt, A., Ribot, J., Sabater, A. G., Palou, A., Bonet, M. L., & Klaus, S. (2015). Identification of Mest/Peg1 gene expression as a predictive biomarker of adipose tissue expansion sensitive to dietary anti-obesity interventions. *Genes & Nutrition*, 10(6), 1–12.
- Waalwijk, C., & Flavell, R. A. (1978). MspI, an isoschizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites. *Nucleic Acids Research*, 5(9), 3231–3236.
- Waddington, C. H. (2012). The epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10–13. (Original work published 1942).
- Wagner, I., & Capesius, I. (1981). Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 654(1), 52–56.
- Wang, M., Qin, L., Xie, C., Li, W., Yuan, J., Kong, L., & Liu, S. (2014). Induced and constitutive DNA methylation in a salinity-tolerant wheat introgression line. *Plant and Cell Physiology*, 55(7), 1354–1365.
- Wang, P., Gao, C., Bian, X., Zhao, S., Zhao, C., Xia, H., & Wang, X. (2016). Genome-wide identification and comparative analysis of cytosine-5 DNA

methyltransferase and demethylase families in wild and cultivated peanut. *Frontiers in Plant Science*, 7, 7.

- Wang, W., Huang, F., Qin, Q., Zhao, X., Li, Z., & Fu, B. (2015). Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress and subsequent recovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(4), 790–796.
- Wang, W., Zhao, X., Pan, Y., Zhu, L., Fu, B., & Li, Z. (2011). DNA methylation changes detected by methylation-sensitive amplified polymorphism in two contrasting rice genotypes under salt stress. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(9), 419–424.
- Xia, J., Chen, L., Huang, P., Mou, Q., Yang, Y., Li, J., & Yin, Y. (2021). Effects of *Amaranthus hypochondriacus* supplementation during gestation and lactation on the apparent total tract digestibility of nutrients, lactational feed intake, and litter performance in sows. *Veterinary Medicine and Science*, 7(5), 1860–1866.
- Yadav, C. B., Pandey, G., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2018). Epigenetics and epigenomics of plants. In *Plant Genetics and Molecular Biology* (pp. 237–261). Springer.
- Yaish, M. W., Al-Lawati, A., Al-Harrasi, I., & Patankar, H. V. (2018). Genome-wide DNA Methylation analysis in response to salinity in the model plant caliph medic (*Medicago truncatula*). *BMC Genomics*, 19(1), 1–17.
- Yang, C., Zhang, M., Niu, W., Yang, R., Zhang, Y., Qiu, Z., ... & Zhao, Z. (2011). Analysis of DNA methylation in various swine tissues. *Plos one*, 6(1), e16229.
- Yu, Z., Zhang, G., Teixeira da Silva, J. A., Li, M., Zhao, C., He, C., & Duan, J. (2021). Genome-wide identification and analysis of DNA methyltransferase and demethylase gene families in *Dendrobium officinale* reveal their potential functions in polysaccharide accumulation. *BMC Plant Biology*, 21(1), 1–17.
- Yung, W. S., Huang, C., Li, M. W., & Lam, H. M. (2023). Changes in epigenetic features in legumes under abiotic stresses. *The Plant Genome*, 16(4), e20237.
- Zeng, L., Shannon, M. C., & Grieve, C. M. (2002). Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by multiple agronomic parameters. *Euphytica*, 127(2), 235–245.
- Zhang, C., Shi, W., Ma, K., Li, H., & Zhang, F. (2016). EGTA, a calcium chelator, affects cell cycle and increases DNA methylation in root tips of *Triticum aestivum* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 85(3), 1–10.
- Zhang, H., Lang, Z., & Zhu, J. K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8), 489–506.
- Zhao, S., Zhou, S., Zhao, Y., Yang, J., Lv, L., Zheng, Z., & Ren, Y. (2022). Comparative study of the nutritional value and degradation characteristics of

amaranth hay in the rumen of goats at different growth stages. *Animals*, 13(1), 25.

Zhong, L., Xu, Y. H., & Wang, J. B. (2009). DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. *African Journal of Biotechnology*, 8(22), 6201–6207.

Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(2), 66–71.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı: İbrahim MUNİS

Uyruğu: T.C.

E-posta:

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Ankara Üniversitesi	01.10.2020

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
18.08.2022	Gravel Gıda Pazarlama Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi	Pazarlama Uzmanı
12.09.2022 - Devam	Özel Cizre El Cezeri Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni

YABANCI DİL

İngilizce: A1

Almanca: A1

YAYINLAR