



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DOMATESTE (*Solanum lycopersicum*)  $Na^+/H^+$  ANTİPORTER (NHX)  
GENLERİNİN TANIMLANMASI VE TUZ ŞOKU STRESİ ALTINDA  
GEN İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ERMAN ÇAVUŞOĞLU**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. İskender TİRYAKİ**

**ÇANAKKALE – 2022**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOMATESTE (*Solanum lycopersicum*)  $Na^+/H^+$  ANTİPORTER (NHX)  
GENLERİNİN TANIMLANMASI VE TUZ ŞOKU STRESİ ALTINDA GEN  
İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERMAN ÇAVUŞOĞLU

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

ÇANAKKALE – 2022



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Erman ÇAVUŞOĞLU tarafından Prof. Dr. İskender TİRYAKİ yönetiminde hazırlanan ve **28/07/2022** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Domateste (*Solanum lycopersicum*)  $Na^+/H^+$  Antiporter (NHX) Genlerinin Tanımlanması ve Tuz Şoku Stresi Altında Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

.....

Doç. Dr. Musa KAVAS

.....

Dr. Öğr. Üyesi Uğur SARI

.....

Tez No : .....

Tez Savunma Tarihi : 28/07/2022

.....  
İSİM SOYİSMİ

Enstitü Müdürü

.././2022



## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Erman ÇAVUŞOĞLU

28/07/2022

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma konusunun belirlenmesi ile birlikte tezin her aşamasını yönlendiren, deneylerin gerçekleştirilmesinde yol gösteren, bilgilerini ve yardımlarını eksik etmeyen, sabır ve anlayış gösteren, değerli tecrübelerini paylaşarak akademik kariyerime yön veren saygı değer danışman hocam Prof. Dr. İskender TİRYAKİ'ye ve saygı değer hocam Dr. Öğr. Üyesi Uğur SARI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tanıdığım günden itibaren maddi ve manevi olarak beni her zaman destekleyen, çalışma boyunca zamanımı ve emeklerini hiç esirgemedi sunan değerli arkadaşım Selçuk ÇETİN'e teşekkür ederim.

Değerli üniversite arkadaşlarım Muhammed Ashequr Rahman SAYKAT ve Beste CELEP'e yardımları, tavsiyeleri, hatırlatmaları, motive edici düşünceleri ve samimi arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

Değerli çalışma arkadaşlarım Enes Gökhan YILMAZ ve Nur TOPTAŞ'a yardımları için teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini bir an olsun benden esirgemeyen ve varlıklarıyla her zaman yanımda olduklarını bildiğim, başarımda en büyük pay sahibi olan değerli ailem annem Canan ÇAVUŞOĞLU, babam Nejdet ÇAVUŞOĞLU, kardeşim Özge ÇAVUŞOĞLU'na ve ailem gibi gördüğüm dostlarım Ramazan ERCAN, Mert YILMAZ, Emre ASLAN, Nedim ŞAHİN, Deniz ŞEH ve Tolga ŞENTÜRK' e saygılarımı, en içten sevgilerimi sunarım ve çok teşekkür ederim.

Erman ÇAVUŞOĞLU  
Çanakkale, Temmuz 2022

## ÖZET

# DOMATESTE (*Solanum lycopersicum*) $Na^+/H^+$ ANTİPORTER (*NHX*) GENLERİNİN TANIMLANMASI VE TUZ ŞOKU STRESİ ALTINDA GEN İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Erman ÇAVUŞOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

28/07/2022, 103

Dünya çapında artmaya devam eden tuzluluk sorunu, tarımsal verimliliği sınırlayan en önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir.  $Na^+/H^+$  antiporter genleri,  $Na^+$  ve  $H^+$  iyonlarının vakuolar zar boyunca değişimini katalize edebilen ve bitkilerde hücrel pH ve  $Na^+$  iyonu dengesini kontrol edebilen bir transmembran proteindir. Bu çalışma, biyoinformatik araçlar kullanılarak domates (*Solanum lycopersicum*) genomundaki (SL4.0 ve ITAG4.0) hedef  $Na^+/H^+$  antiporter (*NHX*) genlerinin tanımlanması, farklı türler arasındaki korunmuşluğu, diğer türler ile arasındaki filogenetik ilişkilerinin incelenmesi, kromozomal lokalizasyonları, protein-protein etkileşimleri (PPI), korunmuş motifler ile üç boyutlu protein yapılarının analiz edilmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada aynı zamanda *SINHX* genlerinin, 240 mM NaCl şoku stresi altında zamana bağlı olarak (0, 6, 12 ve 24. saatlerde) açık çiçek dokularında meydana getirdiği gen ifade seviyelerindeki değişiklikler tespit edilmiştir. Biyoinformatik analiz sonuçları *SINHX* genlerinin domates genomunun, 1, 4, 6 ve 10 numaralı kromozomlar üzerinde lokalize olduğunu göstermiştir. Filogenetik analiz sonuçları, bu genlerin *SINHX1*, -2, -3 ve -4 vakuol membranlar (Vac sınıfı) üzerinde, *SINHX6* endozomal bölge (Endo sınıfı) üzerinde ve *SINHX7*, -8 plazma membranı (PM sınıfı) üzerinde üç farklı gruba ayrıldığını ortaya koymuştur. *SINHX1*, -2, 3-, -4, -6 proteinlerinin, transmembran sarmal alanında bulunan ve  $Na^+/H^+$  antiporter aktivitesinin bir inhibitörü ve vakuol sınıfı NHX proteinlerinin karakteristik özelliği olarak bilinen amilorid bağlanma bölgesine [FFIYLLPPI] sahip olduğu belirlenmiştir. *SINHX* genlerinin açık çiçek dokularına ait göreceli ifade seviyeleri özellikle *SINHX6*, *SINHX7* ve

*SINHX8* olmak üzere tüm *SINHX* genlerinin tuz stresi tarafından önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *NHX*, Domates, Tuz stresi, Biyoinformatik, Gen ifade analizi



## ABSTRACT

### IDENTIFICATION OF $Na^+/H^+$ ANTIPORTER (*NHX*) GENES IN TOMATO (*Solanum lycopersicum*) AND DETERMINATION OF GENE EXPRESSION LEVELS UNDER SALT SHOCK STRESS

Erman ÇAVUŞOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

28/07/2022, 103

Salinity which is spreading throughout the world is one of the most important abiotic stress factors limiting agricultural productivity. The  $Na^+/H^+$  antiporter genes are transmembrane proteins that are able to catalyze the exchange of  $Na^+$  and  $H^+$  ions across the vacuolar membrane and control cellular pH and  $Na^+$  ion balance in plants. This investigation was conducted in order to perform a genome-wide analysis of *NHX* genes including phylogenetic relationships, gene structures, motif analysis, three-dimensional protein structures, protein-protein interaction, and chromosome location, using SL4.0 version and ITAG4.0 version of the tomato genome. The gene expression levels of *SINHX* members in tomato mature flower tissues at 0<sup>th</sup> (control), 6<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, and 24<sup>th</sup> hours under 240 mM NaCl shock stress were also evaluated. Genome-wide analysis of *NHX* genes showed that *SINHX* genes are localized on chromosomes 1, 4, 6, and 10 of the tomato genome. Phylogenetic analysis results revealed that these genes are divided into three different groups *SINHX1*, -2, -3, and -4 on vacuole membranes (Vac class), and *SINHX6* on the endosomal (Endo class), and *SINHX7*, -8 on plasma membrane (PM class). It has been determined that *SINHX1*, -2, 3-, -4, and -6 proteins have an amiloride binding site [FFIYLLPPI] located in the transmembrane helix domain, which is known as an inhibitor of  $Na^+/H^+$  antiporter activity and a characteristic feature of vacuole class *NHX* proteins. Relative expression levels of *SINHX* genes in open flower tissues showed that all *SINHX* genes, particularly *SINHX6*, *SINHX7*, and *SINHX8*, were significantly up-regulated by salt stress.

**Keywords:** *NHX*, Tomato, Salt stress, Salt Stress, Bioinformatics, Gene Expression Analysis

## İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI .....	i
ETİK BEYAN .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii

### BİRİNCİ BÖLÜM

#### GİRİŞ

1

1.1. Domates Bitkisinin Morfolojik Özellikleri .....	2
1.2. Domatesin Besin Değeri Açısından Önemi .....	3
1.3. Ülkemizde ve Dünya’da Domates Üretimi .....	4
1.4. Bitkilerde Abiyotik Stres Kavramı.....	5
1.4.1. Tuz Stresinin Bitkiler Üzerindeki Etkileri .....	6
1.4.2. Bitkilerin Tuz Stresine Karşı Geliştirdikleri Adaptasyon Mekanizmaları..	7
Biyokimyasal Mekanizmalar.....	7
Moleküler Mekanizmalar ve Bitkilerde $Na^+/H^+$ <i>Antiporter</i> ( <i>NHX</i> ) Gen Ailesinin Etkisi.....	8
1.5. Biyoinformatik .....	11
1.5.1. Biyolojik Veri Tabanları ve Biyoinformatik Analizlerde Kullanılan Yaygın Araçlar.....	11

### İKİNCİ BÖLÜM

#### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

17

2.1. Tuz Stresinin Domates Bitkileri Üzerindeki Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri .....	17
---	----

2.2. Bitkilerde $Na^+/H^+$ Antiporter Genlerinin Genom Çapında Tanımlanması ve Tuz Stresi Altındaki Gen İfade Seviyelerinin Tespiti ile İlgili Çalışmalar .....	21
---	----

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL YÖNTEM .....	25
-----------------------	----

3.1. Materyal .....	25
---------------------	----

3.2. Yöntem .....	25
-------------------	----

3.2.1. Biyoinformatik Analizler .....	25
---------------------------------------	----

Domates Genomunda <i>NHX</i> Genlerinin Belirlenmesi ve Karakterizasyon	25
---	----

Dizilerin Hizalanması ve Filogenetik Analiz .....	25
---	----

<i>SINHX</i> Genlerinin Kromozom Dağılımı.....	25
--	----

Korunan Motif ve Gen Yapı Analizi .....	25
---	----

<i>SINHX</i> Proteinlerinin Üç Boyutlu Yapısal Analizi.....	25
---	----

<i>SINHX</i> Proteinlerinin Protein-Protein Etkileşim Tahmini .....	25
---	----

3.2.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Tuz Şokunun Uygulanması .....	25
---	----

3.2.3. Doku Örneklerinin Alınması.....	31
--	----

3.2.4. Moleküler Analizler .....	33
----------------------------------	----

Total RNA İzolasyonu.....	33
---------------------------	----

Agaroz Jel Elektroforezi .....	33
--------------------------------	----

Genomik DNA İzolasyonu .....	33
------------------------------	----

Total RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi .....	33
---	----

Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	33
--------------------------------------	----

Domateste <i>SINHX</i> Genlerine Ait Spesifik Primer Dizaynı .....	41
--	----

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	42
---	----

Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (RT-qPCR) Reaksiyonu .....	43
--	----

3.2.5. Verilerin Analizi .....	45
--------------------------------	----

<b>DÖRDÜNCÜ BÖLÜM</b>	
<b>ARAŞTIRMA BULGULARI</b>	
	46
4.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları .....	46
4.1.1. <i>SINHX</i> Genlerinin Tanımlanması ve Sınıflandırılması.....	46
4.1.2. Filogenetik Analiz.....	55
4.1.3. <i>SINHX</i> Genlerinin Domates Kromozomlarına Dağılımı.....	56
4.1.4. <i>SINHX</i> Genlerinin Yapısal Analiz Sonuçları .....	56
4.1.5. <i>SINHX</i> Genlerinin Korunan Motif Analizi.....	57
4.1.6. <i>SINHX</i> Proteinlerinin Protein-Protein Etkileşim Tahmin Sonuçları .....	59
4.1.7. <i>SINHX</i> Proteinlerinin Üç Boyutlu (3D) Yapı Tahmini .....	59
4.2. Moleküler Analizler .....	61
4.2.1. <i>EXPRESSED</i> ve <i>SINHX</i> Genlerinin PCR Testleri .....	61
Genomik DNA Testi .....	61
Total RNA Testi.....	61
cDNA Testi .....	61
4.2.2. Total RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	62
4.2.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (RT-qPCR) ile Gen İfade Analizleri .....	63
Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Reaksiyonlarına Ait Amplifikasyon ve Erime Eğrileri.....	63
<i>SINHX</i> Genlerinin Göreceli İfade Seviyesi .....	75
<b>BEŞİNCİ BÖLÜM</b>	
<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	
	82
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>85</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde oranı
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
Kg	Kilogram
g	Gram
µg	Mikrogram
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
Ct	Eşik döngüsü
da	Dekar
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DEPC	Dietil pirokarbonat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EtBr	Etidyum bromür
EC	Elektrik iletkenliği
FAO	Uluslararası Gıda ve Tarım Örgütü
Ha	Hektar
Kg	Kilogram
kDa	Kilodalton
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
mS	Milisiemens
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Asitlik-bazlık

ITAG	The International Tomato Annotation Group
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Geri
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Dakikada devir sayısı
RT	Ters transkriptaz
sn	Saniye
Ta	Bağlanma sıcaklığı
TBE	Tris-Borate-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
UV	Ultraviyole

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1 Domates meyvesinde vitamin içeriği	4
Tablo 2 2010 ve 2019 yıllarında Dünya çapında domates üretimi	5
Tablo 3 Dizi analizleri için kullanılan yaygın araçlar	12
Tablo 4 Filogenetik analizler için kullanılan bazı araçlar	13
Tablo 5 Biyoinformatik analizler için kullanılan veri tabanları	15
Tablo 6 DNA ekstraksiyon tamponu için gerekli bileşenler	35
Tablo 7 cDNA sentezinin ilk adımı için gerekli bileşenler	39
Tablo 8 cDNA sentezinin ikinci adımı için gerekli bileşenler	40
Tablo 9 <i>SINHX</i> ve <i>EXPRESSED</i> genlerine ait primerler	41
Tablo 10 PCR reaksiyonu için gerekli bileşenler	42
Tablo 11 Thermal Cycler cihazına ait reaksiyon aşamaları	43
Tablo 12 RT-qPCR reaksiyonu için gerekli bileşenler	43
Tablo 13 RT-qPCR reaksiyon aşamaları	44
Tablo 14 <i>SINHX</i> genlerinin sekans özellikleri	47
Tablo 15 <i>SINHX</i> ve <i>AtNHX</i> genlerine ait yüzde benzerlik matrisi	48
Tablo 16 Çiçek dokularına ait total RNA'ların absorbans saflık oranları	62

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Farklı renk, şekil ve büyüklüğe sahip domates meyveleri	3
Şekil 2 Çimlenmeye bırakılan domates tohumlarına ait görüntü	27
Şekil 3 Çimlenmiş tohumlara ait genel görüntü	27
Şekil 4 Bitkiciklerin saksılara transfer edilmesine ilişkin görüntü	28
Şekil 5 Tomurcuklanma ve çiçeklenme başlangıç dönemlerine ait görsel	28
Şekil 6 Çiçeklenme dönemindeki domates bitkilerinin genel görüntüsü	29
Şekil 7 Domates bitkilerine yapılan sıvı gübre uygulamasına ait görüntü	29
Şekil 8 Domates bitkilerinin drene edilmesine ilişkin görüntü	30
Şekil 9 Domates saksılarının yaş ağırlıklarının tartılmasına ilişkin görüntü	30
Şekil 10 240 mM NaCl'nin hazırlanmasına ilişkin görsel	31
Şekil 11 Açık çiçek doku örneklerinin alınması	32
Şekil 12 Açık çiçek dokularının homojenize edilmesine ilişkin görüntü	33
Şekil 13 Açık çiçek dokularına ait Total RNA'ların agaroz jel görüntüsü	36
Şekil 14 Açık çiçek dokularının homojenize edilmesi	38
Şekil 15 <i>SINHX</i> genlerine ait PCR ürünlerinin %2.5'lik agaroz jel görüntüsü	39
Şekil 16 <i>EXPRESSED</i> ve <i>SINHX</i> genlerinin %2.5'lik agaroz jel <i>in silico</i> analizi	51
Şekil 17 <i>SINHX3</i> genine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri	51
Şekil 18 Total RNA absorbans saflık oranlarının ve konsantrasyonlarının ölçülmesi	52
Şekil 19 Komplementer DNA sentezi için gerekli bileşenlerin tüplere aktarılması	52
Şekil 20 <i>EXPRESSED</i> genine ait PCR ürünlerinin %2.5'lik agaroz jel görüntüsü	53
Şekil 21 <i>SINHX1</i> üyesinin gen yapısı	53
Şekil 22 <i>SINHX2</i> üyesinin gen yapısı	54
Şekil 23 <i>SINHX3</i> üyesinin gen yapısı	52
Şekil 24 <i>SINHX4</i> üyesinin gen yapısı	56
Şekil 25 <i>SINHX6</i> üyesinin gen yapısı	59
Şekil 26 <i>SINHX7</i> üyesinin gen yapısı	60
Şekil 27 <i>SINHX8</i> üyesinin gen yapısı	54
Şekil 28 Farklı türlere ait <i>NHX</i> üyeleri arasındaki ilişkileri temsil eden filogenetik ağaç	55
Şekil 29 <i>SINHX</i> genlerinin domates kromozomlarına dağılımları ve konumları	56
Şekil 30 <i>Solanum lycopersicum</i> 'da tanımlanan <i>NHX</i> ailesi üyelerinin gen yapısı	57
Şekil 31 <i>SINHX</i> genlerine ait amino asit sekanslarının korunmuş motiflerin analizi	57
Şekil 32 <i>SINHX</i> ailesi üyelerinin protein-protein etkileşim (PPI) ağı	59

Şekil 33 SINHX proteinlerinin tahmini 3D yapıları	60
Şekil 34 <i>SINHX1</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	63
Şekil 35 <i>SINHX1</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	63
Şekil 36 <i>SINHX1</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait erime eğrileri	64
Şekil 37 <i>SINHX1</i> genine ait erime eğrileri	64
Şekil 38 <i>SINHX2</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	65
Şekil 39 <i>SINHX2</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	65
Şekil 40 <i>SINHX2</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait erime eğrileri	66
Şekil 41 <i>SINHX2</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	66
Şekil 42 <i>SINHX4</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	67
Şekil 43 <i>SINHX4</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	67
Şekil 44 <i>SINHX4</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait erime eğrileri	68
Şekil 45 <i>SINHX4</i> genine ait erime eğrileri	68
Şekil 46 <i>SINHX6</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	69
Şekil 47 <i>SINHX6</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	69
Şekil 48 <i>SINHX6</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait erime eğrileri	70
Şekil 49 <i>SINHX6</i> genine ait erime eğrileri	70
Şekil 50 <i>SINHX7</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	71
Şekil 51 <i>SINHX7</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	71
Şekil 52 <i>SINHX7</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait erime eğrileri	72
Şekil 53 <i>SINHX7</i> genine ait erime eğrileri	72
Şekil 54 <i>SINHX8</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	73
Şekil 55 <i>SINHX8</i> genine ait amplifikasyon eğrileri	73
Şekil 56 <i>SINHX8</i> geni için <i>EXPRESSED</i> genine ait erime eğrileri	74
Şekil 57 <i>SINHX8</i> genine ait erime eğrileri	74
Şekil 58 <i>SINHX1</i> geninin göreceli ifade seviyeleri	76
Şekil 59 <i>SINHX2</i> geninin göreceli ifade seviyeleri	76
Şekil 60 <i>SINHX4</i> geninin göreceli ifade seviyeleri	77
Şekil 61 <i>SINHX6</i> geninin göreceli ifade seviyeleri	78
Şekil 62 <i>SINHX7</i> geninin göreceli ifade seviyeleri	78
Şekil 63 <i>SINHX8</i> geninin göreceli ifade seviyeleri	79
Şekil 64 <i>SINHX</i> gen ailesi üyelerinin gen ifade profilleri	79

## BİRİNCİ BÖLÜM GİRİŞ

Dünya nüfusunun her geçen gün hızlı bir şekilde artmasıyla yeterli beslenme sorunları ortaya çıkmakta ve bu durum insan hayatını olumsuz yönde etkilemektedir. Buna karşın azalan tarım alanları dikkate alındığında bitkisel üretimden elde edilen ürünlerin yeterli olmaması durumunda insanların temel besin ihtiyaçlarını dengeli bir şekilde karşılayamaması sorununu ortaya çıkarmaktadır. Diğer taraftan tarımsal üretimde oluşabilecek ürün kayıpları ekonomik kayıpları da beraberinde getirmektedir. Bu sorunlar göz önüne alındığında tarımsal üretimde üretimin artırılması, biyotik ve abiyotik stres şartlarına tolerant yeni bitki çeşitlerinin geliştirilmesi ve böylelikle birim alandan elde edilecek verimin artırılması her geçen gün daha da önem kazanmaktadır.

*Solanaceae* familyasına ait olan domates, dünya çapında yetiştiriciliği yapılan en önemli kültür bitkilerinden birini oluşturmaktadır (Díez ve Nuez, 2008). Diploid kromozom ( $2n=24$ ) yapısına sahip bir bitki olan domates, Miller (1754) tarafından *Lycopersicon esculentum* olarak adlandırılırken, Child (1990), Peralta ve Spooner (2005) tarafından *Solanum lycopersicum* olarak yeniden adlandırılmıştır. *Solanaceae* ailesinin moleküler ve morfolojik karakterlere dayanan filogenetik çalışmalarından elde edilen kanıtlar, domatesin *Solanum*'da yer aldığını açıkça ortaya koymaktadır (Peralta ve Spooner, 2001; Bohs, 2005).

Farklı domates türleri zaman içerisinde Güney Amerika'nın batı kıyılarında, Orta Ekvador'dan Kuzey Şili'ye ve Galapagos Adaları'nda farklı derecelerde evrimleşmiştir (Taylor, 1986). Domates türlerinin gen merkezi olarak, Kolombiya, Ekvador, Peru, Bolivya ve Şili'nin bazı kısımlarını içeren Andean (And) bölgesi gösterilmektedir (Rick, 1973; Taylor, 1986).

Yabani domates türlerinin doğal dağılımı bu bölgeler ile sınırlı olsa da, ilk kültüre alınma yerleri bakımından iki alternatif hipotez öne sürülmüştür (Labate, vd., 2007). Domates İtalya'da *Mala peruviana* veya *Pomi del Perú* isimleriyle tanıtıldığı için kültüre alınmanın ilk Peru'da gerçekleştiği iddia edilmektedir (Candolle, 1883; Luckwill, 1943). Ancak, İnka İmparatorluğu'nda çok nadir olarak tüketildiği ve diğer bitki kalıntılarının bulunduğu Andean bölgesindeki arkeolojik alanlarda domates kalıntısına rastlanılmaması bu hipotezi net bir şekilde desteklememekte (Díez ve Nuez, 2008) ve olası kültüre alınma

yerinin Orta Amerika olduğunun daha olası olduğunu göstermektedir (Esquinas-Alcázar ve Nuez, 1995). Nitekim kültürel, dilsel ve tarihi kayıtlarla birlikte genetik kanıtlar, domatesin ilk olarak Orta Amerika'da kültüre alınmasının daha olası olduğuna işaret etmektedir (Rick, 1995; Cox, 2000).

Domates, İspanyollar aracılığıyla Orta Amerika ve Meksika'dan Karayipler ve Filipinlere sonrasında Filipinler'den Güneydoğu Asya'ya ve nihayetinde Asya'nın geri kalanına yayılmıştır (Smith, 1994). Avrupa'da domatese ilk defa bir İtalyan bitki uzmanı Petrus Andreas Matthiolus (1544) tarafından yazılan bir belgede değinilmiştir (Labate, vd., 2007). Matthiolus, domatesleri pomi d'oro (altın elma) olarak tanımlamıştır ve Avrupalılar tarafından tüketilen ilk domateslerin sarı meyveli olduğunu rapor etmiştir (Labate, vd., 2007). Kırmızı domatesler, birkaç yıl sonra iki rahip tarafından İtalya'ya tanıtılmıştır ve Matthiolus tarafından bu durum belgelenmiştir (McCue, 1952). Domatesin Akdeniz bölgesi ve Yakın Doğu'ya yayılmasında Türk tüccarlar önemli rol oynamıştır (Villareal, 1980; Esquinas-Alcázar ve Nuez, 1995). ABD'de ilk domates yetiştiriciliği, 1781'de Monticello'da Thomas Jefferson tarafından yapılmıştır (Gould, 1983). Daha sonra 1798'de Philadelphia, 1802'de Massachusetts ve devamında ülkenin diğer bölgelerine tanıtılmıştır (Labate, vd., 2007).

### **1.1. Domates Bitkisinin Morfolojik Özellikleri**

Domates tohumları genellikle açık kahverengi olmakla birlikte kahverengi tonlarında değişiklik gösterebilmektedir. Tohumların üstü tüylüdür ve bu özelliği ile domates tohumları *Solanaceae* familyasındaki diğer türlerden ayrışır (McCormack, 2004). Meyve başına genellikle 150 ila 300 tohum bulundurmaktadır (McCormack, 2004). Domates tohumunun optimum çimlenme sıcaklık aralığı 16 °C ila 29 °C iken optimum tohum çimlenmesi 29 °C'de gerçekleşmektedir (McCormack, 2004). Çoğu ticari domates çeşitleri büyük oranda kendi kendine tozlaşmaktadır fakat rüzgar ve böcek popülasyon durumuna göre yabancı tozlanma da olabilmektedir. Yabancı tozlanmada bombus arılarının oldukça etkin olduğu rapor edilmiştir (Ho ve Hewitt, 1986).

Salkım çiçek yapısına sahip olan domateste çoğunlukla bir salkım kümesindeki çiçek sayısı 4 ila 5 arasında değişmektedir (McCormack, 2004).

Domates meyveleri şekil, renk ve boyut bakımından büyük bir varyasyon göstermektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Farklı renk, şekil ve büyüklüğe sahip domates meyveleri (Anonim, 2021).

Çiçeklerde döllenme gerçekleştikten sonra, meyvedeki hücre sayısı 2-3 hafta içerisinde önemli ölçüde artar ve sonrasında büyüme neredeyse tamamen hücre genişlemesiyle gerçekleşir. Meyve şekli ve büyüklüğü yüksek oranda genetik olarak kontrol edilir fakat yetiştirme ve çevre şartları da bu duruma etki edebilmektedir (Hobson ve Grierson, 1993). Güçlü bir kazık kök sistemine sahip olan bitkide fideleme sırasında ana kök yapısı zarar görmekte ve bitki lifli bir kök sistemi geliştirebilmektedir (McCormack, 2004). Ana kök yapısından dallanan yanal kökler, toprak yüzeyinin 5 ila 25 cm altında gelişme gösterebilmektedir (McCormack, 2004).

## 1.2. Domatesin Besin Değeri Açısından Önemi

Geçen yüzyılda popüler hale gelen domatesin günümüzde hemen hemen dünyanın her yerinde yetiştiriciliği yapılmaktadır (Robertson ve Labate, 2007). Domates, tek başına taze meyve olarak, yemeklerde veya salatalarda bileşen olarak, salça, meyve suyu ve çorba olarak birçok çeşitli şekilde insan tüketiminde değerlendirilmektedir (Labate, vd., 2007). Besin ve kalori bakımından zengin olan domates aynı zamanda vitamin ve mineral



kaynağıdır (Tablo 1) (Sainju, vd., 2003). Yetişkinler için tavsiye edilen günlük C vitamini miktarının yaklaşık %60'ını çocuklar için ise %85'ini karşılamak için günlük 230 gram domates tüketimi yeterli olabilmektedir (Varis ve George, 1985). Bazı kanser türlerini ve kalp krizi riskini azaltmasından dolayı önemli tüketim özelliklerine sahip olan likopen, kırmızı domates meyvesinde bulunan en bol karotendir ve toplam karotenoid miktarının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır (Dorgan, vd., 1998; Díez ve Nuez, 2008).

Likopen,  $\beta$ -karoten, ve C vitamini gibi bileşenleri içeren domates ve ürünleri hem insan beslenmesi açısından hem de sağlık açısından büyük öneme sahiptir (Clinton, 2005).

Tablo 1  
Domates meyvesinde vitamin içeriği (Adalid, vd., 2004).

Vitamin	İçerik ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )
Askorbik asit (C vitamini)	25000 - 30000
$\beta$ -karoten (provitamin A)	900 - 1271
Tokoferol (E vitamini)	40 - 1200
Nikotinik asit (niasin)	500 - 700
Pantotenik asit (B3 vitamini)	50 - 750
Piridoksin (B6 vitamini)	80 - 110
Tiamin (B1 vitamini)	50 - 60
Riboflavin (B2 vitamini)	20 - 50
Folik asit	6,4 - 20
Biyotin	1,2 - 4

### 1.3. Ülkemizde ve Dünya’da Domates Üretimi

Günümüzde dünya çapında yaygın olarak yetiştirilen domatesin, her geçen yıl üretimi ve tüketimi artmaya devam etmektedir (Gerszberg, vd., 2015). Türkiye’nin hemen hemen tüm bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan domates en fazla Akdeniz, Ege, Doğu Marmara bölgelerinde üretimi yapılmakta ve bu üç bölge toplam ülke üretiminin %69'unu oluşturmaktadır (Güvenç, 2019). Türkiye’de domates üretimi 2010 yılında 10 milyon tondan 2019 yılında yaklaşık 13 milyon tona çıkarken Dünya’da 2010 yılında 153 milyon tondan 2019 yılında 180 milyon tona çıkmıştır (Tablo 2) (FAO, 2019).

Tablo 2

2010 ve 2019 yıllarında Dünya çapında domates üretimi (FAO, 2019).

Bölge	<u>2010</u>	<u>2010</u>	<u>2010</u>	<u>2019</u>	<u>2019</u>	<u>2019</u>
	Alan (ha × 10 <sup>3</sup> )	Verim (ton ha <sup>-1</sup> )	Üretim (ton × 10 <sup>3</sup> )	Alan (ha × 10 <sup>3</sup> )	Verim (ton ha <sup>-1</sup> )	Üretim (ton × 10 <sup>3</sup> )
<b>Dünya</b>	4429	34.6	153288	5030	35.9	180766
Afrika	991	18.4	18329	1612	13.4	21664
Amerika	474	53.7	25496	385	61.7	23786
Asya	2400	36.3	87130	2603	43	112104
Avrupa	555	39.2	21767	423	53.9	22803
<b>Üretimde Öncü</b>						
<b>Ülkeler</b>						
Çin	951	49.2	46876	1086	57.8	62869
ABD	158	88.9	14053	110	98.7	10858
Türkiye	179	56.1	10052	181	70.9	12841
Hindistan	634	19.6	12433	781	24.3	19007
Mısır	216	39.5	8544	173	39	6751
İtalya	118	51	6024	91	57.7	5252

#### 1.4. Bitkilerde Abiyotik Stres Kavramı

Stres, fotosentez hızını sınırlayan ve bir bitkide güneş enerjisini fotosentez yoluyla doğrudan biyokütleyle dönüştürme yeteneğini azaltan herhangi bir dış biyotik veya abiyotik kısıtlama olarak tanımlanır (Grime, 1977). Dünya çapında bitkisel ürünlere duyulan talep artmaya devam ederken, biyotik ve abiyotik stres faktörleri tarımsal üretim için büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Zhao, vd., 2017). Biyotik stres faktörleri olarak mantarlar, bakteriler, nematodlar ve çeşitli patojenlerin neden olduğu zararlar belirtilirken, abiyotik stres faktörleri olarak kuraklık, tuzluluk, yüksek ve düşük sıcaklık gibi cansız etkenler ifade edilmektedir (Gull, vd., 2019). Küresel ısınmanın etkileri göz önünde bulundurulduğunda özellikle kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik çevresel faktörler, bitki gelişimi üzerinde büyük etkisi olan ve dolayısıyla ciddi tarımsal verim kayıplarına neden olan önemli stres etkenleridir (Golldack, vd., 2014). Tuzluluk özellikle kurak alanlarda, sıcaklığın artması, buharlaşmanın

fazla olması ve yağış miktarının azalması sonucunda tuzun yıkanamayarak üst toprakta birikmesiyle tuz birikimi oluşmakta ve tarımsal üretimi önemli ölçüde kısıtlamaktadır (Parida ve Das, 2005). Tuzluluk stresi, dünyadaki bitkisel üretim verimliliğini sınırlayan en önemli abiyotik faktörlerinden birisidir (Deinlein, vd., 2014). Tuzluluğun, dünya çapında mevcut tarım arazilerinin %6'sından fazlasını ve sulanan arazilerin ise yaklaşık %20'sini etkilediği düşünülmektedir (Munns ve Tester, 2008). Ülkemizde, sulanabilir tarım alanlarının yaklaşık 1,5 milyon hektara denk gelen %32,5'lik kısmı tuzluluk ve alkalilik sorunuyla karşı karşıyadır (Kanber, vd., 2005). Tuzluluk, meydana gelme durumlarına göre primer (doğal) ve sekonder (insan kaynaklı uygulamalar) tuzluluk olarak ikiye gruba ayrılabilir (Smedema ve Shiati, 2002). Primer tuzluluğun oluşmasında ana kayaların su veya rüzgar yoluyla ayrışması, tuz deposu okyanuslar ve iklimsel etmenler etkili olurken, sekonder tuzluluğun oluşumuna yoğun gübre uygulaması ile birlikte düşük kaliteli sulama suyunun yaygın kullanımı etkili olmaktadır (Munns ve Tester, 2008; Metternicht ve Zinck, 2008; Barbouchi, vd., 2014).

#### **1.4.1. Tuz Stresinin Bitkiler Üzerindeki Etkileri**

Bitkilerde tuz stresinin olumsuz etkileri çimlenme, fide ve vejetatif dönem dahil tüm bitki gelişim evrelerinde ortaya çıkabilir (Chandna, vd., 2013). Dolayısıyla tuz stresi çimlenme, büyüme, fotosentez, su ilişkisi, besin dengesizliği, oksidatif stres ve verim gibi bitki yaşantısındaki tüm süreçleri etkileyebilir (Parihar, vd., 2015). Tuz stresinin bitkiler üzerindeki birincil etkisi osmotik ve iyon stresine neden olurken, ikincil etkisi ise bu etkenler sonucunda bitkide meydana gelen yapısal bozulmalara ve toksik bileşiklerin sentezlenmesine neden olmaktadır (Haq, vd., 2010; Çulha ve Çakırlar, 2011). Bitkinin büyüme evrelerindeki en temel aşamalardan biri olan tohum çimlenmesi, verimi belirleyen en önemli kriterlerden birisidir (Parihar, vd., 2015). Çimlenme aşamasındaki tohumların aşırı tuzluluğa maruz kalmasıyla, tohumdaki besi dokunun etkinliği azalır (Othman, vd., 2006), tohumların su emilimi değişir (Khan ve Weber, 2008), enzimlerin aktiviteleri değişir (Gomes-Filho, vd., 2008), hormonal denge bozulur (Khan ve Rizvi, 1994) ve protein metabolizması değişir (Dantas, vd., 2007). Topraktaki tuzluluk ilk olarak yaprak ve kök büyümesini azaltarak daha yavaş büyümeye neden olur ve sonrasında yoğun tuz konsantrasyonları bitki hücrelerinde toksik etki yaratarak fizyolojik bozukluklara yol açar ve hücre ölümlerine neden olur (Munns, 1993; Parihar, vd., 2015). Tuz stresi altındaki bitkilerin kloroplastlarında yüksek konsantrasyonlarda  $Na^+$  ve  $Cl^-$  iyonları birikir, bitkilerin

temel biyokimyasal işlevlerinden biri olan fotosentezin aktivitesi engellenir ve klorofil miktarlarında azalmalar meydana gelir (Zhang, vd., 2005; Chutipajit, vd., 2011). Bu azalmaya ek olarak, çoğunlukla bitkilerde klorofil a içeriği, klorofil b içeriğinden sayıca fazladır fakat tuz yoğunluğu arttıkça bu miktarlar birbirine yaklaşır (Mane, vd., 2010). Bitki köklerinin bulunduğu ortamda tuzluluğun artması, yapraklardaki su miktarını azaltır ve bu durum birçok biyolojik aktivitenin olumsuz etkilenmesine neden olur (Romero-Aranda, vd., 2001). Yapılan birçok araştırma, tuz stresinin bitkilerde besin alımını ve besin birikimini azalttığını göstermiştir (Rogers, vd., 2003; Hu ve Schmidhalter, 2005). Buna ek olarak, tuzluluk, bitki türlerine ve tuzluluk seviyelerine bağlı olarak bitkilerdeki mikro besin içeriklerini farklı şekillerde etkiler (Oertli, 1991). Mikrobesein eksikliği yüksek pH'dan dolayı tuz stresi altında oldukça yaygındır (Zhu, vd., 2004). Kök ortamındaki yüksek tuz (NaCl) seviyeleri, potasyum, kalsiyum ve magnezyumda iyon dengesizliklerine neden olarak özellikle potasyum ve kalsiyumun besin asimilasyonunu azaltır (Keutgen ve Pawelzik, 2009). Sonuç olarak, tuz stresinin bitkiler üzerinde oluşturduğu olumsuz etkileri göz önünde bulundurulduğunda, tarımsal üretimde oluşturduğu en önemli sorun, verimde büyük kayıplara neden olmasıdır (Parihar, vd., 2015).

#### **1.4.2. Bitkilerin Tuz Stresine Karşı Geliştirdikleri Adaptasyon Mekanizmaları Biyokimyasal Mekanizmalar**

Tuz stresi altındaki bitkilerin köklerinde su emme kapasitesi azalmakta ve devamında yaprakların su kaybetmesiyle birlikte dokularda tuz birikimi oluşmakta ve bunun sonucunda bitkide ozmotik stres meydana gelmektedir (Mushtaq, vd., 2020). Tuz stresi altındaki bitkiler, ozmotik düzenleme mekanizması ile yüksek miktarlarda glisin betain veya prolin gibi yüksek oranda çözünür ve düşük moleküler ağırlığa sahip organik maddeleri biriktirerek strese karşı bir savunma cevabı oluşturabilirler (Zhang, vd., 2002). Bitkiler, prolin birikimi aracılığıyla hücre içinde stres sonucu oluşan serbest radikalleri hücreden uzaklaştırabilir ve hücre altı yapıları stabilize ederek stresin olumsuz etkilerinden korunmaya çalışır (Hare ve Cress, 1997). Örneğin, makarnalık buğdayda (*Triticum durum*) prolin seviyesi ile ozmotik potansiyel arasında pozitif bir korelasyon gözlemlenmiş ve tuzluluk stresi altında ozmotik düzenlemede prolinin önemli bir ozmolit olduğu sonucuna varılmıştır (Poustini, vd., 2007). Aynı zamanda ozmotik düzenleme ile bitkiler, Na<sup>+</sup> iyonlarının akışını kısıtlayarak veya vakuol içine ekstrüzyon yoluyla sitoplazma içerisindeki iyonların toksik konsantrasyonlarını düşürerek stres şartlarına uyum sağlayabilirler (Gagneul, vd., 2007). Tuz stresinin olumsuz

etkilerinden kaçınmak için bitkilerin gösterdiği savunma mekanizmalarından bir diğeri olan hormonal düzenlemede sitokininler, absisik asit, oksin, jasmonik asit, gibberellin ve etilen gibi hormonlar önemli rollere sahiptir (Mushtaq, vd., 2020). Tuz stresine maruz kalan bitkilerde sitokininler stomaların kapanmasını sağlayarak dokularda su kaybının azaltılmasına yardımcı olurlar (Pospisilova, vd., 2005). Absisik asit, tuzluluk veya diğere çevresel stresler altındaki bitkilerin stres yanıtı oluşturmalarını sağlayan sinyal molekülleri olarak bilinmektedir (Raghavendra, vd., 2010). Tuz stresine karşı dayanıklılık gösteren bitkilerin hassas olan bitkilere kıyasla daha yüksek seviyelerde jasmonik asit biriktirdiği gözlemlenmiştir ve dolayısıyla bu durum artan jasmonik asit konsantrasyonlarının bitkiler üzerinde tuzluluğa dayalı olumsuz etkilerin iyileştirilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduğuna işaret etmektedir (Kang, vd., 2005).

### **Moleküler Mekanizmalar ve Bitkilerde $Na^+/H^+$ Antiporter (NHX) Gen Ailesinin Etkisi**

Stres koşulları altında hücre içi iyon konsantrasyonlarının homeostazı, hücre yoğunluğunun düzenlenmesi, membran aktivitelerinin korunması ve metabolik enzimlerin düzenlenmesi için oldukça önemlidir (Hasegawa, 2013). Bitkiler, sitozolde  $Na^+$  ve  $K^+$  iyonlarının dengesini sağlamak amacıyla taşıma yoluyla sitozolden fazlalık tuz iyonlarını elemine ederek hücreleri iyon toksitesinden korurlar (Farooq, vd., 2015). Bu iyonlar, plazma membran  $H^+$ -ATPase, Vakuolar  $H^+$ -ATPase ve  $Ca^{2+}$  ATPase gibi taşıyıcılar aracılığıyla hücre vakuolünde bölümlere ayrılır (Mushtaq, vd., 2020). Bitki hücrelerinde birçok sitozolik enzimin etkinliğini gösterebilmesi için belirli bir  $Na^+/K^+$  oranının dengelenmesi gerekir (Mahajan, vd., 2008). Dış ortamda  $Na^+$  miktarının artmasıyla hücreye  $Na^+$  iyonunun girişi artarken,  $K^+$  iyonunun hücreye alınımı azalır, buna bağlı olarak da  $Na^+/K^+$  dengesi bozulur. Bunun sebebi  $Na^+$ 'nın,  $K^+$  iyonunun bağlanacağı alanlar için  $K^+$  ile rekabet haline girmesidir (Tester ve Davenport, 2003).  $K^+$  iyonu, protein sentezinin stabilizasyonunda, enzim aktivasyonunda ve proteinler üzerindeki negatif yüklerin nötralizasyonunda doğrudan görev aldığı için hücreler yüksek konsantrasyonlarda  $K^+$  iyonuna ihtiyaç duyarlar (Pandolfi, vd., 2012; Marschner, 1995; Perrenoud, 1990). Buna ek olarak, bazı bitkilerde  $K^+$  içeriği ile verim arasında pozitif korelasyon olduğu rapor edilmiştir (Rameeh, 2013; Bandeh-Hagh, vd., 2008; Ashraf ve McNeilly, 2004).

Bitkiler yaşamları boyunca bitki beslemesi, gelişmesi, büyümesi ve sinyal iletimlerinde ihtiyaç duyduğu katyonların alınımı ve translokasyonunu sağlayan plazma ve

organel zarlarında lokalize çok sayıda katyon taşıyıcısı bulundurulur (Maser, vd., 2001; Pardo, 2006; Sze, vd., 2004). Şimdiye kadar birçok iyon taşıyıcısının tuz stresi varlığında bitkilerde pH ve iyon homeostazının korunmasında önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Pardo, vd., 2006, Ward, vd., 2009, Yamaguchi, vd., 2013, Hamamoto, vd., 2015). Bunlar arasında *Katyon/Proton Antiporter (Cation/Proton Antiporter)* gen süper ailesi üyelerinin bitkilerde katyon değişiminden sorumlu olduğu ve bitkilerde çeşitli fizyolojik süreçleri düzenlediği düşünülmektedir (Evans, vd., 2012). *Katyon/Proton Antiporter (CPA)* gen süper ailesi, bitki genomlarında *CPA1* ve *CPA2* olmak üzere iki alt aile şeklinde sınıflandırılmıştır. *CPA1* gen ailesinde,  $Na^+/H^+$  antiporter (*NHX*) bulunurken, *CPA2* gen ailesinde  $K^+$  efflux (*KEA*) ve *Cation/H<sup>+</sup> exchanger (CHX)* gen aileleri bulunmaktadır (Brett, vd., 2005; Punta, vd., 2012). *CPA2* gen ailesinin 34 üyesi *Arabidopsis thaliana* genomunda tanımlanmış ve bunların 6 tanesi *KEA* ailesinde yer alırken, 28 üyesi *CHX* gen ailesinde bulunmaktadır (Mäser, vd., 2001). Filogenetik analizler, *Arabidopsis* *KEA* proteinlerinin, *AtKEA1*, *AtKEA2*, *AtKEA3* ve *AtKEA4*, *AtKEA5*, *AtKEA6* şeklinde iki ayrı gruba ayrıldığını göstermiştir (Zheng, vd., 2013). *AtKEA2* geninin doğrudan  $Na^+$  iyonu taşınmasında merkezi bir görevi olmadığı,  $K^+$  ve pH homeostazının korunmasında ise öncelikli olarak rol aldığı bildirilmiştir (Aranda-Sicilia, vd., 2012). Bakteri, mantar ve bitkilerde bulunan *CHX* gen ailesinde, diğer *CPA* alt gen ailelerinden farklı olarak gen çeşitliliği analizleri için bir modeli temsil eden birden fazla *CHX* geni bulunur (Chanroj, vd., 2012; Jia, vd., 2018). *Arabidopsis* genomunda 28, *Oryza sativa*'da 17 ve *Glycine soja*'da 34 *CHX* üyesi bulunmaktadır (Jia, vd., 2017). Bitki *CHX* genlerine ait hidrofobik C-terminal domainlerinin, *Saccharomyces cerevisiae* mayasında bulunan *KHA1* proteinine oldukça benzer olduğu, bu genlerin  $K^+$  homeostazında potansiyel rollerinin olduğuna işaret etmektedir (Jia, vd., 2018). *CHX* ailesiyle alakalı yapılan çalışmaların çoğu, bu genlerin  $K^+$  ve pH homeostazında rol aldıklarını ortaya koymuştur (Cellier, vd., 2004, Padmanaban, vd., 2007, Zhao, vd., 2008, Chanroj, vd., 2011, Mottaleb, vd., 2013). Buna ek olarak *Arabidopsis*'teki *CHX* genlerinin döllenme ve tohum oluşum aşamalarında da önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Jia, vd., 2018). Filogenetik analizler, *CHX* gen ailesi üyelerinin beş alt gruba ayrıldığını göstermiştir (Sze, vd., 2004). Bu gruplar arasında sekiz üyeden (*AtCHX15-21* ve *AtCHX23*) oluşan ve en büyük alt grubu oluşturan Grup IV şu ana kadar en iyi karakterize edilen grubu oluşturmaktadır. *AtCHX17*, *AtCHX20*, *AtCHX21* ve *AtCHX23* genlerinin tuz stresine karşı savunma tepkilerinde rol alma potansiyellerinin olduğu düşünülmektedir (Jia, vd., 2018). *AtCHX21* geni susturulmuş (knockout) mutant genotiplerinde, tuz stresi altında yavaş kök uzaması görülmüş ve mutant

olmayan kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında yaprak özsuyu ve ksilemdeki Na<sup>+</sup> iyonu birikiminin daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Hall, vd., 2006).

Tuzluluğa karşı en önemli savunma cevaplarından biri, tuza karşı aşırı hassas olan ve Na<sup>+</sup> iyonunun kökten sürgünlere ksilem yoluyla taşınmasını sağlayan tuza aşırı duyarlı (Salt Overly Sensitive-SOS) sinyal yolağıdır (Bahmani, vd., 2015; Zhu, 2003; Shi, vd., 2000). SOS sinyal yolağı, SOS1 (Salt Overly Sensitive 1), SOS2/CIPK24 (Calcineurin B-like interacting Serine/Threonine-protein kinase 24) ve SOS3/CBL4 (Calcineurin B-like)'den oluşan üç birincil proteinden meydana gelmektedir (Shi, vd., 2000; Zhu 2003). Tuz stresi altındaki bitkilerde Na<sup>+</sup> iyonlarının yüksek konsantrasyonlarda birikmesi sonucu hücre içi Ca<sup>2+</sup> seviyelerinde artış meydana gelirken, Ca<sup>2+</sup> bağlayıcı protein SOS3/CBL4 proteini tarafından algılanmaktadır. SOS3/CBL4, Ca<sup>2+</sup>'a bağlandıktan sonra yapısını değiştirerek SOS2/CIPK24 ile fiziksel etkileşime girmekte ve SOS2'nin C terminal bölgesindeki 21 amino asit uzunluğundaki motif, SOS3 ile etkileşime girmesi için gerekli olmaktadır (Mahajan, vd., 2008). *SOS3/CBL4* ile *SOS2/CIPK24* genleri arasındaki bu etkileşim sonucu *SOS1*'in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter aktivitesi uyarılarak aktive edilir ve hücrel homeostazi yeniden oluşturulur (Ji, vd., 2013; Tian, vd., 2011; Mahajan, vd., 2008; Qui, vd., 2002; Guo, vd., 2004). Yapılan genetik analizler, *SOS1*, *SOS2* ve *SOS3* genlerinin tuz toleransının kontrol edilmesinde beraber rol aldıklarını ve ortak bir sinyal iletim ağına sahip olduklarını göstermiştir (Rodríguez, vd., 2005). *SOS1* geni, Na<sup>+</sup> iyonu sensörünü içeren geniş sitozolik alana sahip olup her dokuda ifade edilirken kök ucunu çevreleyen epidermal hücrelerde en fazla olmaktadır (Bahmani, vd., 2015).

*SOS* sinyal yolu ile aktive edilen plazma ve vakuolar membrandaki Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter'leri (*NHX*), aktif olarak aşırı Na<sup>+</sup> iyonunu sitozolden uzaklaştırabilir veya Na<sup>+</sup> toksisitesini gidermek için tonoplastta bölümlendirebilir (Apse, vd., 1999; Hasegawa, vd., 2000; Shi, vd., 2002). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter genleri, Na<sup>+</sup> ve H<sup>+</sup> iyonlarının vakuolar zar boyunca değişimini katalize edebilen ve bitkilerde hücrel pH ve Na<sup>+</sup> iyonu dengesini kontrol edebilen bir transmembran proteinidir (Apse, vd., 1999; Shi ve Zhu, 2002). Hücreler arası lokalizasyonlarına göre *NHX*'ler üç ana sınıfa ayrılır: Plazma membran (PM) sınıfı, Endozomal (Endo) sınıfı ve Vakuol (Vac) sınıfı (Yokoi, vd., 2002). *Arabidopsis thaliana*'da *NHX* gen ailesi hücre içi lokalizasyonlarına göre sekiz üyeden oluşan üç ana sınıfa ayrıştırılmıştır (Brett, vd., 2005). *AtNHX1*, -2, -3 ve -4, vakuol membranlar üzerinde yer alan Vac sınıfı *NHX*'ler olarak adlandırılırken (Aharon, vd., 2003), *AtNHX5* ve *AtNHX6* genleri

endozomal bölge üzerinde lokalize olmakta (Bassil, vd., 2011) ve Endo sınıfı *NHX*'ler olarak adlandırılmaktadır. Üçüncü grubu oluşturan *AtNHX7* ve *AtNHX8* genleri ise plazma membranlarında lokalize olmakta ve PM sınıfı olarak isimlendirilmektedir (Shi, vd., 2000).  $\text{Na}^+$  iyonlarının yoğunluğu arttığında, PM sınıfı *NHX* aktif olarak  $\text{Na}^+$  iyonunu hücre dışına çıkarmakta ve Vac sınıfı *NHX*,  $\text{Na}^+$  iyonunun vakuole ayrılmasını sağlamaktadır (Apse ve Blumwald, 2007; Pardo, vd., 2006; Shi, vd., 2002).

Tuz stresi varlığında, *NHX* gen ailesi üyelerinin bitki dokularında ifade edilmesi, iyon homeostazını ve ozmotik düzenlemeyi iyileştirebilir. Dahası, hücre membranında meydana gelebilecek hasarları azaltarak, fotosentetik kapasiteyi artırarak bitkinin tuz stresine karşı savunma cevabı oluşturmasında önemli roller oynayabilirler (Luo, vd., 2021).

## **1.5. Biyoinformatik**

Biyoinformatik, araştırmacılar tarafından elde edilen biyolojik verileri almak, aktarmak, depolamak ve analiz etmek için bilgisayar bilimi, istatistik, matematik ve biyoloji gibi alanlardan yararlanan multidisipliner bir alan olarak tanımlanır (Mount, 2004). Sistem biyoloğu olan Paulien Hogeweg, 1970 yılında Ben Hesper ile birlikte biyolojik sistemleri incelemek için bilgi teknolojisinin kullanımına atıfta bulunarak "Biyoinformatik" terimini kullanan ilk kişi olmuştur (Hesper ve Hogeweg, 1970; Hogeweg, 2011). İlerleyen yıllarda, SWISS-MODEL sunucusunun ortaya çıkmasıyla birlikte otomatik modellemelerin araştırmacıların hizmetine sunulması, biyoinformatik alanındaki ilerlemelere önemli derecede hız kazandırmıştır (Peitsch, 1996; Mehmood, vd., 2014). Günümüzde, genlerin karakterizasyonu, proteinlerin yapısal ve fizyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, filogenetik analizler ve hücrelerde biyomoleküllerin nasıl etkileşime girdiğinin tespit edilmesi için çeşitli biyoinformatik araçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu araçlar laboratuvarlarda gerçekleştirilen maliyetli ve zaman alıcı deneyler kadar doğrudan güvenilir bilgiler üretmesinde bu kapsamda yapılan *in silico* analizler laboratuvarlarda yapılacak kompleks deneyler için ön bilgilerin üretilmesinde ve araştırmacıların daha tutarlı kararlar vermesine yardımcı olmaktadır (Mehmood, vd., 2014).

### **1.5.1. Biyolojik Veri Tabanları ve Biyoinformatik Analizlerde Kullanılan Yaygın Araçlar**

Dizi analizleri, nükleik asit veya protein gibi moleküllerin sahip oldukları benzersiz fonksiyonlara ait özelliklerin anlaşılmasına olanak sağlar. Öncelikle, üzerinde çalışılan moleküllere ait sekans bilgileri, veri tabanlarından alınır ve sonrasında yapılacak analizlere



bağlı olarak seçilecek biyoinformatik araçlarla ilgili moleküllerin işlevleri, yapıları, evrimsel geçmişleri veya homologlarının tanımlanması gibi analizlerin yapılmasında kullanılır (Mehmood, vd., 2014). Dizi analizlerinde yaygın olarak kullanılan araçlardan bazıları Tablo 3’de verilmiştir. Örneğin, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ve ClustalW gibi araçlar, farklı bitki türlerine ait gen veya protein dizilerinin birbirleri arasındaki evrimsel geçmişlerini ve kökenlerini incelemek için karşılaştırılmasına olanak sağlar (Thompson, vd., 1994; Altschul, vd., 1997). Bu analizler, basit uygulamaları ile ilgili gen veya proteinler hakkında oldukça zengin biyolojik bilgi üretme ve depolama kapasitelerinden dolayı araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılan dizi analizleri özellikle, gen ve gen ailelerinin ekspresyon düzenlemelerinde yer alan promotör veya terminatör bölgelerinin tanımlanması, intron/ekzon yapılarının açığa çıkarılmasında kullanılan ve imza dizi olarak tanımlanan sekans dizi bölgelerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Mehmood, vd., 2014).

Tablo 3

Dizi analizleri için kullanılan yaygın araçlar (Mehmood, vd., 2014).

Araçlar	Tanımlama	Kaynak
BLAST	Benzerliğe (identity) dayalı DNA veya protein dizi araması için kullanılan bir arama aracıdır.	Altschul, vd., 1990
HMMER	Homolog protein dizileri, bu araç kullanılarak ilgili veri tabanlarından aranabilir.	Finn, vd., 2011
Clustal Omega	Bu program kullanılarak çoklu dizi hizalamaları gerçekleştirilebilir.	Sievers, vd., 2011
ORF Finder	Varsayılan genler, Açık Okuma Çerçevesini (ORF) bulmak için bu araca tabi tutulabilir.	NCBI
Genscan	Genomik dizilerdeki ekson-intron bölgelerini tahmin etmek için kullanılır.	Burge ve Karlin, 1997

Filogenetik analizler, canlı organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri yeniden yapılandırmak, fonksiyonları bilinmeyen moleküler yapıların belirli özelliklerini tahmin etmek ve canlılar arasındaki genetik akrabalığı belirlemek için kullanılan biyoinformatik araçlardan biridir (Khan, vd., 2014). Bu analizin temel amacı, canlı organizmaların birbirleri arasındaki benzerlik derecelerine göre gruplandırılmasını ve tüm bu bilgilerin bir soy ağacı

üzerinde temsil edilmesini sağlamaktır. Farklı türlerin birbirleri arasındaki benzerlikleri karşılaştırmalı olarak analiz etmek amacıyla moleküler genetik çalışmalarında filogenetik uygulamalar sıklıkla kullanılmaktadır (Freckleton, vd., 2002). Günümüzde filogenetik analizler için kullanılan bazı popüler araçlar Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4  
Filogenetik analizler için kullanılan bazı popüler araçlar (Mehmood, vd., 2014).

Araçlar	Tanımlama	Kaynak
MEGA	Evrimsel yakınlığı incelemek için filogenetik ağaçlar oluşturur.	Kumar, vd., 1994
iTOL	Filogenetik ve diğer ağaçların görüntülenmesi, açıklanması ve yönetimi için çevrimiçi bir araçtır.	iTOL
MOLPHY	Maksimum olabilirlik yöntemine dayalı moleküler filogenetik analiz aracıdır.	Adachi ve Hasegawa, 1992
PHYLIP	Evrimsel ağaçlarının çıkarımını yapmak için ücretsiz bir hesaplamalı filogenetik program paketidir.	Felsenstein, 1993
Jalview	Bu bir hizalama düzenleyicisidir ve hizalamayı iyileştirmek için kullanılır.	Waterhouse, vd., 2009

Biyoinformatik yaklaşımlarda önemli yere sahip olan dizi veri tabanları, araştırmacılara nükleik asitler ve proteinler gibi moleküller hakkında geniş bir bilgi kaynağı sunarken bu veri tabanlarında tanımlanan her molekül özel bir kimlik ile ifade edilir. Günümüzde yeni nesil sekanslama tekniklerinin gelişmesiyle birlikte genom boyutlarında dizi verileri üretilmektedir. Bu bilgilerin veri tabanlarında saklanması ve araştırmacılara sunulması için küresel boyutta çeşitli veri tabanları geliştirilmiştir (Mehmood, vd., 2014).

NCBI (National Center for Biotechnology Information) tarafından oluşturulan GenBank, 250.000’den fazla türe ait sekans bilgilerini içeren geniş bir nükleotid dizi veri tabanıdır (Benson, vd., 2008). GenBank veri tabanı genlere ait kodlama bölgeleri, promotörler, terminatör bölgeleri, eksonlar, intronlar ve tekrar bölgeleri hakkında bilgiler taşırlar ve burada depolanan dizi bilgileri hem büyük ölçekli genom dizileme projelerinden hem de bireysel laboratuvarlar tarafından üretilerek sisteme yüklenmektedir (Mehmood, vd., 2014).

Araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılan önemli protein dizisi veri tabanları arasında ise SWISS-PROT [Swiss Protein] Databank (Chou ve Elrod, 1999), UniProt [Universal Protein Resource] (UniProt Consortium, 2014), PIR [Protein Information Resource] (Wu, vd., 2003) ve wwPDB [worldwide Protein DataBank] yer almaktadır. Bu veri tabanları arasında SWISS-PROT hem deneysel hem de hesaplamalı çalışmalar hakkında bilgi sağlamasından dolayı en kapsamlı protein dizisi veri tabanlarından birini oluşturmaktadır (Mehmood, vd., 2014).

Bir protein molekülünün ikincil yapısını tahmin etmek için kullanılan en önemli biyoinformatik araçlardan birisi ise İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü (Swiss Institute of Bioinformatics) tarafından desteklenen ExPASy (Expert Protein Analysis System) veri tabanıdır (Gasteiger, vd., 2003). Araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bazı biyoinformatik araçlar Tablo 5’de sunulmuştur.

Tablo 5

Biyoinformatik analizler için kullanılan bazı popüler veri tabanları (Mehmood, vd., 2014).

Araçlar	Tanımlama	Kaynak
<b><i>Nükleotid Veri tabanları</i></b>		
DNA Data Bank of Japan	International Nucleotide Sequence Databases (INSD) üyesidir ve nükleotid dizileri için en büyük kaynaklardan biridir.	Miyazaki, vd., 2003
European Nucleotide Archive	Nükleotid dizilimine dayanan deneysel iş akışlarıyla ilgili bilgileri yakalar ve sunar.	Leinonen, vd., 2011
GenBank	International Nucleotide Sequence Databases (INSD) üyesidir ve bir nükleotid dizi kaynağıdır.	Benson, vd., 2012
<b><i>Protein Veri tabanları</i></b>		
Uniprot	Protein dizilerinin en büyük koleksiyonlarından biridir.	UniProt Consortium, 2008
Protein Data Bank	Nükleik asitlerin ve proteinlerin deneysel olarak belirlenmiş yapıları hakkında bilgi içeren bir kaynaktır.	Berman, vd., 2000
Pfam	Pfam veritabanı, protein ailelerinin geniş bir koleksiyonudur.	Finn, vd., 2014
<b><i>Genom Veri tabanları</i></b>		
Ensembl	Bitki, insan, fare ve diğer omurgalılar dahil olmak üzere açıklamalı ökaryot genomlarını içeren bir veri tabanıdır.	Flicek, vd., 2012
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource (TAIR), <i>Arabidopsis thaliana</i> model bitkisi için genetik ve moleküler verilerin kaynağıdır.	<a href="https://www.arabidopsis.org/">https://www.arabidopsis.org/</a>

Bu çalışma, biyoinformatik araçlar kullanılarak domates genomundaki hedef  $Na^+/H^+$  antiporter (*SINHX*) genlerinin tanımlanması, *NHX* genlerinin farklı bitki türleri arasındaki korunmuşluğunun tespit edilmesi, diğer türler ile arasındaki filogenetik ilişkilerinin incelenmesi, *SINHX* genlerinin domates genomundaki kromozomal lokalizasyonlarının tespit edilmesi ve bu genlerin korunmuş motifler ile üç boyutlu protein yapılarının analiz

edilmesi amacıyla yürütülmüştür. Bu alıma aynı zamanda tanımlanan *SINHX* genlerinin domateste 240 mM NaCl ŗoku stresine verdikleri tepkinin açık iek dokularında farklı zaman aralıklarında (0. saat (kontrol), 6. saat, 12. saat ve 24. saat) meydana getirdiği gen ifade seviyelerinin tespit edilmesi amacıyla yürütülmüştür.



## İKİNCİ BÖLÜM ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Tuz Stresinin Domates Bitkileri Üzerindeki Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri

Domates bitkisinde, tuz stres tepkilerinin daha iyi anlaşılması için yürütülen bir çalışmada, kontrollü iklim kabininde, hidroponik kültür sistemi kullanılarak yetiştirilen domates fidelerine, 14 gün boyunca 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl stresi uygulanmıştır. Araştırmacılar, tuz stresine maruz bırakılan domates bitkilerinde, taze ve kuru ağırlık miktarlarında ve fotosentetik pigment (klorofil a ve b) içeriklerinde önemli ölçüde azalmalar olduğunu rapor etmişlerdir. Bunlara ek olarak, artan tuz konsantrasyonları ile orantılı olarak hem yaprak ve kök dokularında prolin birikim seviyelerinde hem de tuzluluğun neden olduğu membran hasarının bir nedeni olarak kabul edilen nispi elektrolit sızıntısında önemli artışlar olduğu bildirmişlerdir. Ayrıca, bitkilerin köklerinden izole edilen proteinler, iki boyutlu jel elektroforezi (2-DGE) ile ayrıştırıldığında tuz stresine maruz bırakılmış bitki köklerinde, çeşitli fizyolojik süreçlerde rol aldığı bilinen birkaç proteinin yukarı ve aşağı regülasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Manaa, vd., 2011).

Domates yapraklarında, IAA ve ABA'nın endojen içeriğiyle birlikte yaprak ve olgun meyvelerdeki prolin ile mineral ( $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$ ) içeriklerinin incelendiği bir çalışmada, domates tohumlarına ekimden hemen sonra 25, 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl 90 gün boyunca sulama suyuyla verilmiştir. Araştırma sonuçları, artan tuz stresıyla birlikte yaprak alanı ve kuru madde içeriklerinin azaldığını, ancak endojen IAA, ABA ve prolin içeriklerinin tuz uygulamasının artmasıyla orantılı olarak arttığını göstermiştir. Buna ek olarak, tuz uygulaması sodyum ( $\text{Na}^+$ ) içeriğinde artışa neden olurken potasyum ( $\text{K}^+$ ) içeriği ve potasyum/sodyum oranında azalmalara neden olmuştur. Ayrıca prolin ve  $\text{Na}^+$  içeriklerindeki artış miktarlarının meyvelere kıyasla yapraklarda daha çok olması, tuz stresine karşı yaprakların meyvelerden daha hassas olabileceği şeklinde rapor edilmiştir (Babu, vd., 2012).

Üç farklı domates çeşidinde (Hazera, Dalli Tokat ve Argy), tuz stresinin pigment ve toplam çözünür protein içeriği üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada, domates fidelerine 25, 50, 100, 125, 150 ve 200 mM NaCl stresi 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca uygulanmıştır. Araştırmacılar, tuz stresi varlığında domates çeşitlerinin hepsinde pigment ve

toplam çözümlü protein içeriğinin zaman aralıklarına ve tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir (Doganlar, vd., 2010).

Hidroponik kültürde yetiştirilen domates bitkilerine tuz stresi uygulanarak, meyve büyüme hızı, su durumu ve meyvelerin kütükül geçirgenliği parametrelerinin araştırıldığı bir çalışmada elektriksel iletkenliği (EC) 8 mS/cm olan tuz çözeltisi ( $\text{CaCl}_2$ ) domates çiçeklerinin tam açıldığı ilk zamanda uygulanmış ve sonuçlar kontrol bitkileri ile karşılaştırılmıştır. Araştırma sonuçları, tuz stresi uygulanmış bitkilerde meyve hacmi ve büyüme hızı açısından önemli bir farkın olmadığını, doku su potansiyeli ve ozmotik potansiyelin, kontrol bitkilerine göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, kontrol meyvelerinin ortalama kütükül geçirgenliği, tuz stresine maruz kalan meyvelerden önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Hossain ve Nonami, 2012).

Domates bitkisinin tuz stresi varlığında protein üretimi durumlarının incelendiği başka bir çalışmada ise Shirazy domates çeşidi tohumları agar ortamında çimlendirilmiş ve sonrasında çimlenen tohumlar fide aşamasına geldiğinde 0, 40, 80, 120 ve 160 mM NaCl içeren Murashige ve Skoog besin ortamına aktarılmıştır. 24 gün geçtikten sonra protein ekstraksiyonu ve sürgün kuru ağırlığı ölçümü için yaprak ve köklerden örnekler toplanmıştır. Araştırma bulguları, artan tuz konsantrasyonu ile sürgün kuru ağırlığının azaldığını göstermiştir. Buna ek olarak, SDS-PAGE analizleri köklerde 30, 62, 75 kDa ve yapraklarda 38 ile 46 kDa mol ağırlıklarına sahip en az beş proteinin varlığını göstermiştir. Ayrıca, kontrol grubuna ait yaprak örneklerinde sentezlendikleri tespit edilen dört farklı proteinin, yaprak dokularında tuz stresi tarafından sentezlerinin engellendiği rapor edilmiştir (Amini, vd., 2007).

NaCl stresine (100 mM) maruz bırakılan domates bitkilerinde, erken hücre yaşlanması, yapraklarda sodyum birikimi ve fotosistem II verimliliğinin azaldığı rapor edilmiştir (Ghanem, vd., 2012). Tuza duyarlı olduğu bilinen domates çeşidiyle yapılan bir çalışmada büyüme parametrelerinde, klorofil içeriği ile karotenoid miktarında azalma buna karşın MDA (malondialdehit) miktarında artışlar olduğu tespit edilmiştir (Çekiç, 2004).

Tuz stresinin domates bitkisinde çimlenme ve büyüme parametreleri üzerindeki etkisi ile birlikte kalsiyumun ( $\text{Ca}^{2+}$ ) etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, domates tohumlarına ve fidelerine 100 mM NaCl ve 5 ve 10 mM kalsiyum uygulanmıştır. Araştırma sonucunda, 100 mM tuz uygulamasının kontrole kıyasla, çimlenme süresini %27,6

geciktirdiği, fide boyunu ve fide canlılığını %24,33 ve çimlenme stres toleransını %27,6 azalttığı rapor edilmiştir. Buna ek olarak, büyüme ve çimlenmenin hem kalsiyumun tek başına hem de NaCl ile beraber uygulanması durumunda bitkilerde önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Tanveer, vd., 2020).

Beş farklı domates genotipine 150 mM NaCl stresi uygulanmış ve sonuç olarak antioksidant enzim aktivitelerinin toleranslı genotiplerde arttığı, hassas genotiplerde ise azaldığı görölmüştür (Doğan, 2012). Domateste yapılan tuz uygulamaları sonucunda kök ağırlığı ve uzunluğu değerlerinin tuzluluktan en fazla etkilenen ve azalan parametreler olduğu bildirilmiştir (Caines ve Shennan, 1999).

Farklı konsantrasyonlarda (50, 100 ve 150 mM) NaCl uygulanan, tuz stresinin dört farklı domates çeşidinin tohum çimlenmesi, bitki gelişimi,  $K^+/Na^+$  oranı ve fotosentez hızı üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, tüm domates çeşitlerinde bitki gelişiminin azaldığı, 150 mM NaCl varlığında sadece bir çeşidin %50 oranında çimlenme gösterdiği, test edilen dört çeşit arasında  $K^+/Na^+$  oranında önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, artan NaCl konsantrasyonları ile birlikte incelenen tüm domates çeşitlerinde fotosentez hızının azaldığı belirlenmiştir (Sholi, 2012).

Tuz stresi uygulanmış domates tohumlarında, prolin ve askorbik asidin fizyolojik parametrelere olan etkisinin incelendiği bir çalışmada tohumlara 25, 50 ve 75 mM NaCl stresi ile birlikte 5 mM prolin ile 1 mM ve 4 mM askorbik asit uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, artan tuz konsantrasyonlarının hem tohum çimlenmesini hem de tohum canlılığını azalttığı ve prolin ile askorbik asit uygulamalarının tüm tuz konsantrasyonlarında, çimlenme oranı, fide uzunluğu, fide biyokütlesi ve çimlenme hızı parametrelerini kontrole göre arttırdığı rapor edilmiştir (Kaur ve Gupta, 2018).

MicroTom (*Solanum lycopersicum* L. cv. Microtom) domates çeşidinin tuz stresine karşı tepkilerinin daha anlaşılır hale gelmesi için yürütölen çalışmada, domates yapraklarının su kullanım etkinliği, yaprak alanı, toplam klorofil ve fenol içeriği gibi morfo-fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri incelenmiştir. Domates fideleri 6 yapraklı evreye geldiklerinde 50, 100 ve 150 mM NaCl stresi, 14 gün boyunca uygulanmış ve kontrol bitkileri sadece yağmur suyu ile sulanmıştır. Domates yaprak örnekleri, tuz stresi uygulamasından 7 ve 14 gün sonra olacak şekilde iki farklı zamanda toplanmıştır. Araştırmacılar, tuz stresinin yaprak alanı ve stoma iletkenliğini azalttığını ve bitkilerin terleme yoluyla su kaybını en aza



indirerek tuz stresine karşı farklı adaptasyon mekanizmaları oluşturduklarını bildirmişlerdir. Özellikle, 14 gün sonra toplanan ve 150 mM NaCl stresine maruz bırakılan doku örneklerinde, fotosentez oranı ve klorofil içeriğinde en büyük azalmaların meydana geldiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar bunlara ek olarak, Microtom domates çeşidinin, su tasarrufu açısından bitkiler için oldukça önemli olan su kullanım etkinliğini artırma yeteneğine sahip olduğunu ve savunma mekanizması olarak yapraklarında fenol birikiminin uyarıldığını rapor etmişlerdir (Bacha, vd., 2017).

Topraksız kültür ortamında yetiştirilen domates fidelerine 50, 100, 200 ve 400 mM NaCl stresi bir hafta boyunca uygulanmıştır. Çalışma sonuçları, tuz stres seviyelerinin artmasıyla bitkilerde domates fidelerinde yaralanmaların arttığını ve plazma zarı geçirgenliği ile prolin içeriklerinin artarken, klorofil içeriğinin azaldığını ortaya koymuştur. Buna ek olarak, MDA (malondialdehit) içeriğinin önce arttığı sonra azaldığı tespit edilmiştir (Chunyan, 2007).

Beş farklı domates çeşidinin (Roma Rio Super, Roma V.F., Chinese 87-5, Rio Grande ve Super Blocky) tuz stresine karşı tolerantlık seviyelerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada çeşitlerin biyokimyasal ve fizyolojik tepkileri araştırılmıştır. Tohum ekiminden bir hafta sonra 75 mM NaCl dört günde bir olacak şekilde 80 gün boyunca uygulanmıştır. Analiz sonuçları, tuz stresi varlığında Super Blocky çeşidinde taze ve kuru ağırlığın arttığını, diğer çeşitlerde ise azaldığını göstermiştir. Buna ek olarak, stres sonucu sodyum ( $Na^+$ ) alınımı artarken, potasyum ( $K^+$ ) birikiminin azaldığı ve sonuç olarak stresli bitkilerde kontrole kıyasla daha yüksek  $Na^+/K^+$  oranı tespit edilmiştir. Ayrıca, ortalama prolin içeriklerinde en büyük artışın %57,3 ve %49,3'lük oranlarla sırasıyla Super Blocky'de ve Rio Grande çeşitlerinde var olduğu tespit edilmiştir (Ali, vd., 2011).

## 2.2. Bitkilerde $Na^+/H^+$ Antiporter Genlerinin Genom Çapında Tanımlanması ve Tuz Stresi Altındaki Gen İfade Seviyelerinin Tespiti ile İlgili Çalışmalar

Şimdiye kadar farklı bitki türlerine ait vakuolar  $Na^+/H^+$  antiporter genleri (*NHX*), *Helianthus annuus* (Ballesteros, vd., 2006), *Arabidopsis thaliana* (Apse, vd., 1999), *Hordeum vulgare* (Fukuda, vd., 2004a), *Atriplex gmelili* (Hamada, vd., 2001), *Thellungiella halophila* (Wu, vd., 2009), *Brassica napus* (Wang, vd., 2003), *Beta vulgaris* (Xia, vd., 2002), *Gossypium hirsutum* (Wu, vd., 2004), *Oryza sativa* (Fukuda, vd., 2004b), ve *Medicago sativa*'da (Yang, vd., 2005) karakterize edilerek tanımlandı. Bu genlerin analizi ve karşılaştırılması yapıldığında, benzer yapısal özellikler ve korunmuş bölgeler ile oldukça homolog oldukları ve tuz toleransı karakterini kazandıran fonksiyonları birçok bitkide transgenik çalışmalarla birlikte ortaya konulmuştur (Apse, vd., 1999; Zhang ve Blumwald, 2001; Zhang, vd., 2001; Ohta, vd., 2002; Wu, vd., 2004, 2005; Xue, vd., 2004; Chen, vd., 2007, 2008; Zhao, vd., 2007).

Farklı NaCl konsantrasyonları (50, 100, 200, ve 300 mM) uygulanarak tuz stresine maruz bırakılan şeker pancarının, bu stres altında ekspresyon modellerini araştırmak ve  $Na^+/H^+$  antiporter (*NHX*) genlerini tanımlamak amacıyla yürütülen bu çalışmada toplamda beş tane *NHX* geni tanımlanmış ve bu genlerin dört kromozom üzerinde dağıldığı tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizler *BvNHX* genlerinin, Vac (*BvNHX1*, -2 ve -3), Endo (*BvNHX4*) ve PM (*BvNHX5*) sınıflarına ayrıldığını ve her bir sınıf içinde ekzon/intron yapılarının korunduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, Protein-protein etkileşimi (PPI) tahmini, sadece *BvNHX5*'in CIPK24 (Calcineurin B-like interacting Serine/Threonine-protein kinase 24) ve CBL4 (Calcineurin B-like) proteinleri ile varsayımsal olarak etkileşime girdiği gösterilmiştir. Kök ve yapraklardaki bütün *BvNHX* genlerinin, tuzla önemli ölçüde yukarı regüle edildiği ve yüksek tuzluluk altındaki transkripsiyon seviyelerinin, düşük veya orta tuzluluktakilerden önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Wu, vd., 2019).

Domates bitkisinde *LeNHX2* ve *SISOS2*'nin ortak aşırı ekspresyonu, tuz stresi altındaki bitkilerde büyüme ve su durumunu iyileştirdiği,  $K^+$  ve  $Na^+$  homeostazisini etkilediğini ve domates bitkilerinin meyve verimini arttırdığı rapor edilmiştir (Baghour, vd., 2019). *Reaumuria trigyna*'da *RtNHX1*'in aşırı ifadesi, transgenik *Arabidopsis*'te kontrol bitkilerine kıyasla daha fazla  $K^+$  ve daha az  $Na^+$  birikimine neden olduğu bildirilmiştir (Li, vd., 2017).

Soya fasulyesinde  $K^+$  efflux antiporter (KEA) ve  $Na^+/H^+$  antiporter (NHX) genlerini tanımlamak, analiz etmek ve abiyotik stres altındaki rollerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, soya fasulyesi genomunda 12 *GmKEA* geni ve 10 *GmNHX* geni tanımlanmıştır. *NHX* geni *Glyma09g02130*, tuz stresine maruz kaldıktan sonra kök içinde 48 saate kadar yüksek seviyede ekspresyon göstermiştir (Chen, vd., 2015).

*Arabidopsis thaliana*'da tanımlanan ve karakterize edilen sekiz *NHX* geni (*NHX1* ile *NHX8*) ile yapılan biyoinformatik analizler sonucunda *Medicago truncatula*'da 6 *NHX* geni (*MtNHX1*, *MtNHX2*, *MtNHX3*, *MtNHX4*, *MtNHX6* ve *MtNHX7*) tanımlanmış ve bunların beş tanesinde on iki transmembran alan ile amilorid bağlanma alanı korunmuştur. Filogenetik analizler, *MtNHX* üyelerini Sınıf I: *MtNHX1*, -2, -3, -4, Sınıf II: *MtNHX6* ve Sınıf III: *MtNHX7* olarak üç farklı sınıfa ayırmıştır (Sandhu, vd., 2018).

Yonca (*Medicago sativa*) genomunda bulunan vakuolar  $Na^+/H^+$  antiporter geni *MsNHX1* izole edilerek *Arabidopsis*'e aktarılmış ve tuz stresi altındaki rolü incelenmiştir. *MsNHX1* eksprese eden transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin tuz stresine karşı dayanıklılıklarının arttığı ve *MsNHX1*'in tuz toleransında önemli bir fonksiyona sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca dizi analizi, *MsNHX1*'in diğer vakuolar  $Na^+/H^+$  antiporter genleri ile yüksek bir homolojiye sahip olduğunu göstermiştir (Bao-Yan, vd., 2008).

Nar (*Punica granatum*) genomunda  $Na^+/H^+$  antiporter (*NHX*) gen ailesini tanımlamak için korunmuş alan, gen yapısı, filogenetik ilişkiler ve protein-protein etkileşim ağı analizleri ile birlikte *PgNHX* genlerinin farklı NaCl stresi konsantrasyonları altında ekspresyon durumlarının araştırıldığı bir çalışmada toplamda 10 tane *PgNHX* geni tanımlanmıştır. Filogenetik analizlere göre, *PgNHX* genlerinin üç ayrı sınıfa (clades I, II, III) ayrıldığı ve üçüncü sınıf (clade III) üyeleri dışında diğer *PgNHX* genlerinin çoğunda amilorid bağlama bölgesinin (FFI/LY/FLLPPI) (domaini) olduğu belirlenmiştir. Gen yapısı analizleri, *PgNHX09*, *PgNHX07*, *PgNHX03* ve *PgNHX10*'un sırasıyla 13, 22, 21 ve 23 ekzon içerdiğini, diğer 6 *PgNHX* geninin ise 14 ekzon içerdiği ortaya konmuştur. Ayrıca, protein-protein etkileşim analizleri, *PgNHX*'lerin hücrelerde sodyum ( $Na^+$ ) dengesinin korunmasında önemli roller oynayabileceğini öne sürmüştür. 100, 200 ve 300 mM NaCl uygulanan, tuz stresinden 18 gün sonra alınan yaprak ve kök örneklerinde yapılan RT-qPCR analiz sonuçları, *PgNHX* genlerinin çoğunda, özellikle *PgNHX01* olmak üzere kontrol ile karşılaştırıldığında köklerde aşağı regülasyon gösterdiğini ve 200 mM NaCl stresi altında *PgNHX02* ve *PgNHX08* hariç, nispi ekspresyon seviyelerinin yapraklarda sürekli olarak

arttığını ortaya koymuştur. Buna ek olarak, 300 mM NaCl stresi altında *PgNHX* genlerinin yapraklarda ekspresyon seviyelerinin artmaya devam ettiği ve köklerde *PgNHX04*'ün ekspresyon seviyesinin ise en yüksek düzeyde gerçekleştiği rapor edilmiştir (Dong, vd., 2021).

Çeltik (*Oryza sativa* subsp. *indica*) genomunda *NHX* genlerinin genom çapında *in silico* karakterizasyonu ve dijital gen ekspresyon analizlerinin yapıldığı bu çalışmada,  $Na^+/H^+$  antiporter olduğu doğrulanmış 16 *OsNHX* geni tanımlanmıştır. Bu genlerin çeltikte dokuz kromozoma dağıldığı ve tahmini protein lokalizasyon bölgelerinin hücre zarları veya vakuoller olduğu rapor edilmiştir. Filogenetik analizler, *OsNHX* üyelerinin, Grup-I *OsNHX7*, *OsNHX8*, *OsNHX16*, Grup-II *OsNHX15* ve geri kalan tüm *OsNHX*'lerin Grup-III'de toplandığını göstermiştir. Amilorid bağlama bölgesinin (FFIYLLPPI), on altı *OsNHX* arasında sadece *OsNHX7-8* ile *OsNHX15-16* peptidlerinde korunduğu tespit edilmiştir. *In silico* gen ekspresyon analizleri, *OsNHX*'lerin ekspresyon seviyelerinin büyüme ve gelişme aşamaları arasında ve tuzluluk koşulları altında değiştiğini göstermiştir (Khare, vd., 2021).

Soya (*Glycine max*) bitkisinde yapılan genom çapında *in silico* analizler sonucunda toplamda dokuz tane  $Na^+/H^+$  antiporter geni tanımlanmıştır. Filogenetik analizler, toplamda beş alt grubun oluştuğunu ve *GmNHX* üyelerinin bunlardan üçüne dağıldığını göstermiştir. Buna ek olarak, *GmNHX1*, -5, -7, -8, -9 genleri Grup IV'de toplanırken, *GmNHX2*, -4, -6 üyeleri Grup I'e dağılmıştır. Grup III'te sadece *GmNHX3* geni yer almıştır. Hücre lokalizasyon tahminleri, tüm *GmNHX*'lerin vakuolar membran üzerine lokalize olduğunu göstermiştir. İki farklı soya (Gujosoya-2 hassas ve MAUS-47 dayanıklı) çeşidinde bitkiler üç yapraklı (21 gün) aşamaya geldiklerinde, 100 ve 200 mM NaCl uygulanan tuz stresinin gen ekspresyon analiz sonuçları, tuz stresinin hem tuza dayanıklı (MAUS-47) hem de hassas (Gujosoya-2) soya çeşitlerinin tüm dokularında *GmNHX* genlerinin konsantrasyona bağlı olarak uyarıldığını ortaya koymuştur. Buna ek olarak, dokular arasında en yüksek gen ifade artışının ilk olarak köklerde sonrasında yapraklarda ortaya çıktığını göstermiştir (Joshi, vd., 2021).

Asma (*Vitis vinifera*) genomunda *NHX* gen ailesinin tanımlanması için yürütülen bir çalışmada, toplamda altı tane *VvNHX* geni karakterize edilmiştir. Filogenetik analiz, *VvNHX* genlerinin Grup I vakuolar *VvNHX1*, -2, -3, -4, -5 ve Grup II endozomal *VvNHX6* olmak üzere iki farklı sınıfa ayrıldığını ortaya koymuştur. Gen yapı analizleri, *VvNHX* genlerinin

sırasıyla 14 ve 23 ekzondan oluşan *VvNHX3* ve *VvNHX6* genleri dışında diğer üyelerin 15 ekzondan oluştuğunu göstermiştir (Ayadi, vd., 2020).

Biber (*Capsicum annuum*) genomunda *NHX* genlerinin genom seviyesinde biyoinformatik analizlerinin ve bu genlerin tuz stresi altında tepkilerini analiz etmek için gerçekleştirilen çalışmada, toplamda dokuz *CaNHX* geni tanımlanmıştır. Filogenetik analiz sonuçları, *CaNHX* üyelerinin, Grup I *CaNHX9*, Grup II *CaNHX2*, -4, -5, -8 ve Grup III *CaNHX1*, -3, -6, -7 şeklinde üç farklı gruba ayrıldığını göstermiştir. Gen yapı analizleri, *CaNHX* genlerinde genel olarak ekzon sayılarının 8 ila 24 arasında değiştiğini ortaya koymuştur. Buna ek olarak, amilorid bağlama bölgesinin, *CaNHX2*, -3, -4, -5 genlerinde bulunduğu rapor edilmiştir. Tuz stresi, biber fideleri altı yapraklı aşamaya geldiklerinde tek doz olarak 100 mM NaCl uygulanmış ve örnek dokuları köklerden 3, 6, 12, 24 ve 72. saatlerde toplanmıştır. RT-qPCR analiz sonuçları, NaCl stresi varlığında *CaNHX1*, *CaNHX2*, *CaNHX6*, *CaNHX9* genlerinin artan bir şekilde yukarı doğru arttığını, *CaNHX3*, *CaNHX4*, *CaNHX5* ve *CaNHX8* genlerinin diğerlerine kıyasla daha az regülasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Araştırmacılar, biber bitkisinin çevredeki değişikliklere kendisini adapte edebilmek için *CaNHX1* ve *CaNHX9* genlerinin tuz stresi altında ekspresyonlarını yukarı doğru artırarak kendi iyon dengelerini ayarlayabildiğini rapor etmişlerdir (Luo, vd., 2021).

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Materyal

Çalışmada deneme materyali olarak *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom çeşidi kullanılmıştır.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Biyoinformatik Analizler

##### Domates Genomunda *NHX* Genlerinin Belirlenmesi ve Karakterizasyonu

Domatesteki aday *SINHX* genlerini belirlemek için, ilk olarak  $Na^+/H^+$  antiporter (*NHX*) gen ailesine ait Pfam ID (PF00999) numarası ile Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) veri tabanında taratılmıştır. Daha sonra Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) veri tabanında *NHX* genleri ile ilgili anahtar kelimeler (*sodium/hydrogen exchanger*,  $Na^+/H^+$  antiporter, *NHX*) kullanılarak tarama yapılmıştır. Bu iki veri tabanından elde edilen aday *SINHX* genleri listelenmiş ve aday genlerin sekans bilgileri Sol Genomics Network (SL4.0/ITAG4.0 version) veri tabanından indirilmiştir. Devamında, aday genlerin amino asit sekanslarında,  $Na^+/H^+$  antiporter domaini varlığı Hidden Markov Model (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) kullanılarak doğrulanmıştır.

Aday *SINHX* genlerinin amino asit sekansları, *Arabidopsis thaliana*'da bulunan *AtNHX* genlerinin amino asit sekansları ile ikili dizi hizalaması (EMBOSS Matcher-Pairwise Sequence Alignment) yapılmış ve aday genlerin *AtNHX* genleri ile olan benzerlikleri (% identity) belirlenmiştir. *SINHX* genleri, *AtNHX* genleri ile olan en yüksek benzerlik değerine göre sıralanmıştır.

*SINHX* genlerinin izoelektrik noktası (pI) ve moleküler ağırlığı (MW) ExpASy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) aracı ile hesaplanmıştır. *SINHX* genlerinin hücre içi lokalizasyonu Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) sunucusu ile tahmin edilmiştir. Transmembran sarmal alanlarını doğrulamak için *SINHX* genlerinin amino asit sekansları TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) programı ile taranmıştır.

## **Dizilerin Hizalanması ve Filogenetik Analiz**

*SINHX* ve  $Na^+/H^+$  *antiporter* genlerinin tanımlandığı bazı bitki türlerinin amino asit sekansları MUSCLE alignment kullanılarak çoklu dizi hizalaması yapılmış ve filogenetik ağaç MEGA-X programında neighbor-joining yöntemi ile oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç, iTOL (<https://itol.embl.de/>) programı kullanılarak görselleştirilmiştir.

## ***SINHX* Genlerinin Kromozom Dağılımı**

*SINHX* genlerinin kromozomlar üzerindeki lokasyonlarını belirlemek için Sol Genomics Network Genome (<https://solgenomics.net/>) aracılığıyla genlerin genomdaki konum bilgileri elde edilmiş ve Sol Genomics Network veri tabanı kullanılarak genlerin kromozomlar üzerindeki dağılımı tespit edilmiştir.

## **Korunan Motif ve Gen Yapı Analizi**

*SINHX* amino asit sekanslarında korunan motiflerin analizi Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) aracı ile gerçekleştirilmiştir. *SINHX* genlerinin gen yapı analizi Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/index.php>) aracı kullanılarak yapılmıştır.

## ***SINHX* Proteinlerinin Üç Boyutlu Yapısal Analizi**

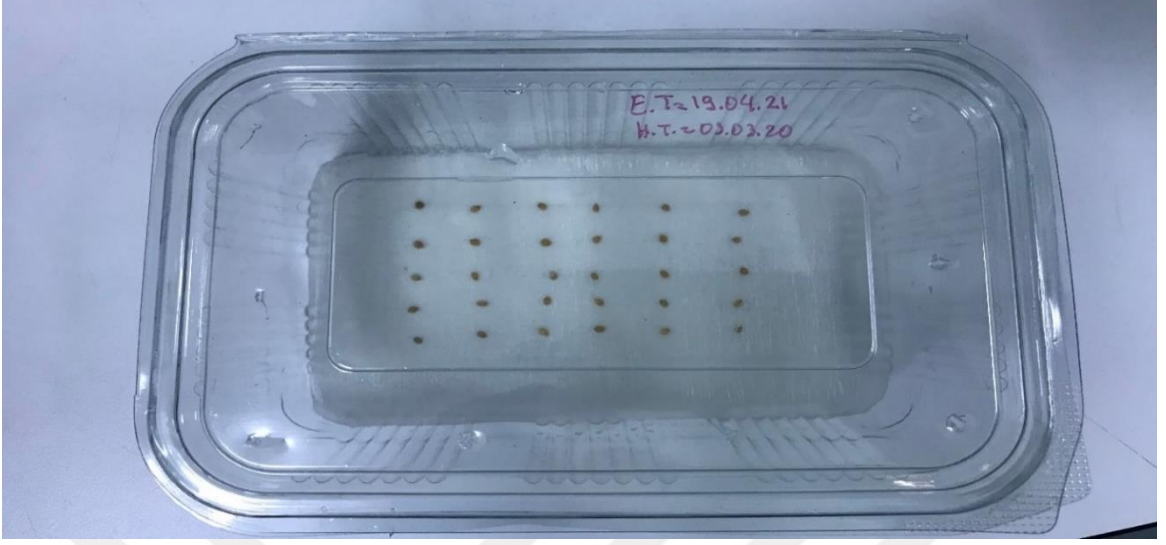
*SINHX* proteinlerinin üç boyutlu yapısı ePlant-BAR (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>) aracı kullanılarak oluşturulmuştur.

## ***SINHX* Proteinlerinin Protein-Protein Etkileşim Tahmini**

*SINHX* proteinlerinin protein-protein etkileşim tahmini STRING (<https://string-db.org/>) veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Tuz Şokunun Uygulanması**

Domates tohumları, üzerinde çift katlı kurutma kağıdı bulunan ve 15 ml distile su ( $dH_2O$ ) ilave edilen plastik kaplar içerisine Şekil 2'deki gibi yerleştirilmiştir. Tohumlar,  $25 \pm 0,5$  °C sıcaklık,  $65 \pm 5$  nem ve 18 saat aydınlık ( $350 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ ), 6 saat karanlık ortama sahip iklimlendirme odasında karanlık ortamda çimlendirmeye bırakılmıştır (Şekil 3). Çimlenen tohumlar, 3:1 oranında torf ve perlit karışımı bulunan plastik saksılara transfer edilmiştir (Şekil 4).

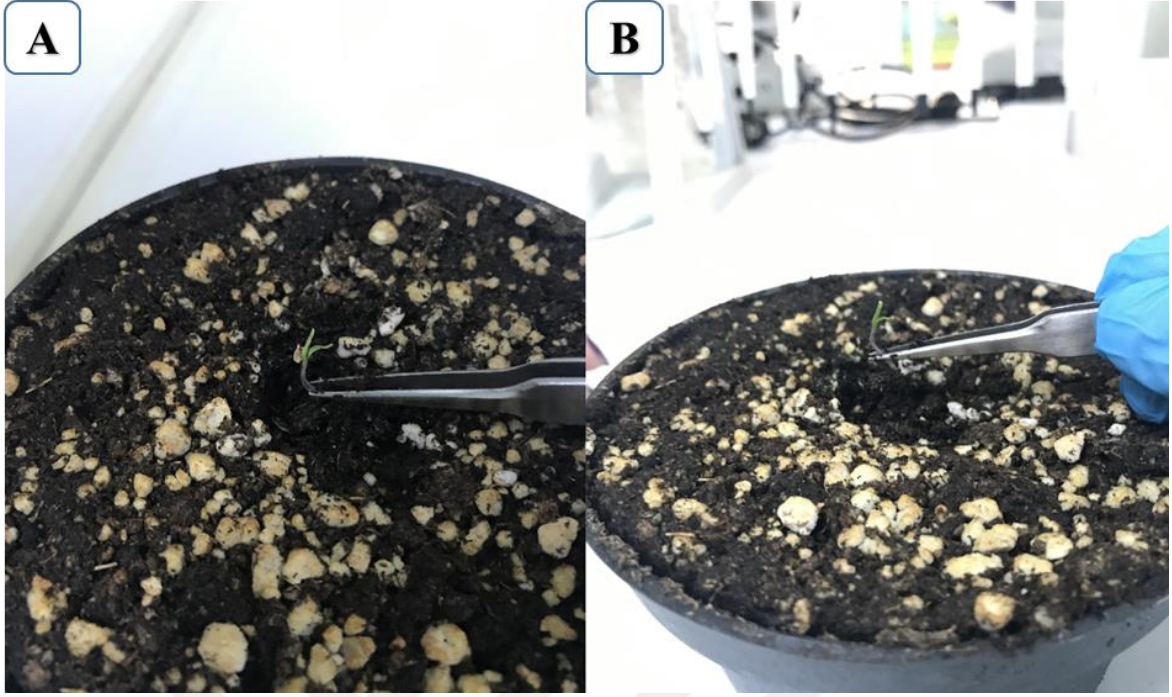


Şekil 2. Çift kurutma kağıdı üzerinde çimlenmeye bırakılan domates tohumlarına ait görüntü.



Şekil 3. Çimlenmiş tohumlara ait genel görüntü.

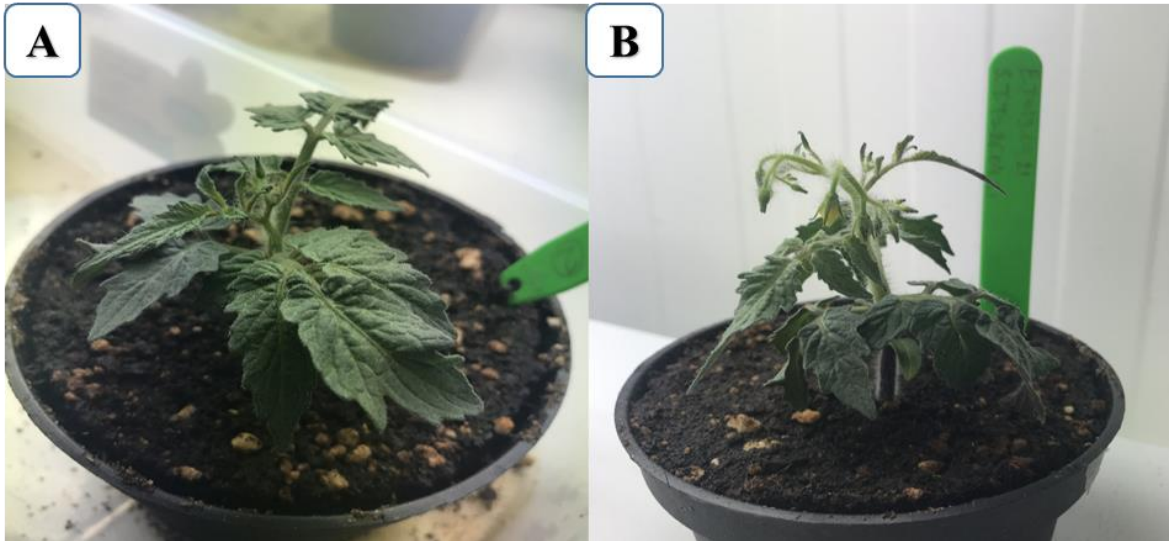




Şekil 4. Bitkiciklerin saksılara transfer edilmesine ilişkin görüntü. A-B: Forseps yardımıyla transfer işleminin gerçekleştirilmesi.

Saksılara transfer edilen domates bitkileri çiçeklenme dönemine kadar iklimlendirme odasında, düzenli kontroller ve distile su ile sulamalar yapılarak büyütülmüştür.

Bitkilerin gelişim evrelerine ait örnek görseller Şekil 5-8'de sunulmuştur.



Şekil 5. Domates bitkilerinde tomurcuklanma ve çiçeklenme başlangıç dönemlerine ait görsel. A: Tomurcuklanma evresi. B: Çiçeklenme dönemi.



Şekil 6. A-B: Çiçeklenme dönemindeki domates bitkilerinin genel görüntüsü.

Sulamayla birlikte, belirli zaman aralıklarında domates bitkilerine ticari sıvı gübre (Black Diamond) uygulanmıştır. İlk sıvı gübre uygulaması tohum ekiminden 21 gün sonra yapılırken, son sıvı gübre uygulaması NaCl şoku uygulamasından 1 hafta önce yapılmıştır. Toplamda 4 kez yapılan sıvı gübre uygulamasının ilki 5 lt/20 ml dozunda saksı başına 100 ml uygulanırken, diğerleri 5 lt/20 ml dozunda, saksı başına 50 ml olacak şekilde uygulanmıştır (Şekil 7).



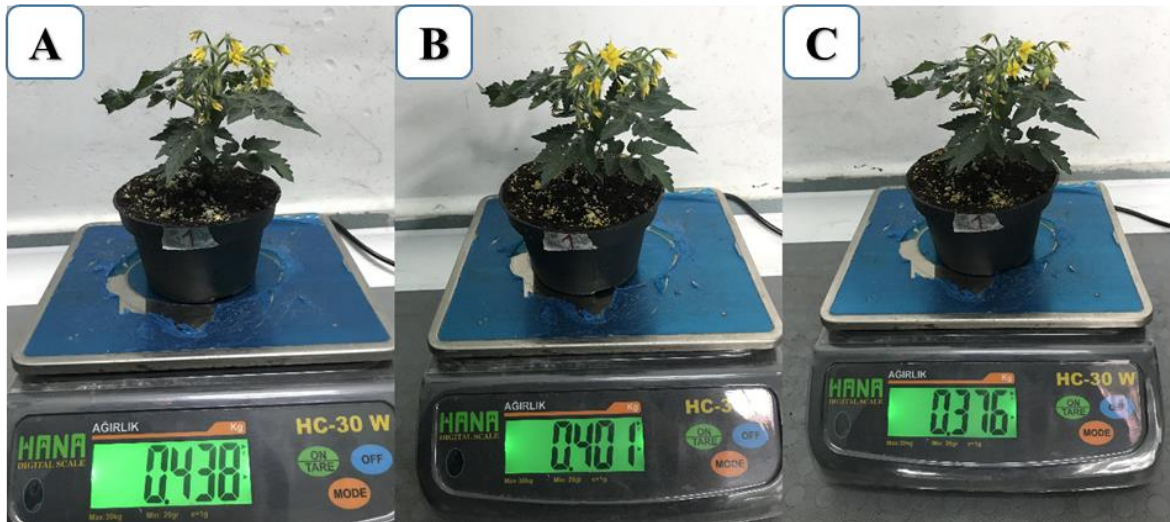
Şekil 7. A: Domates bitkilerine sıvı gübre uygulanması. B: Domates bitkilerine uygulanan ticari Black Diamond sıvı gübresi.



NaCl şoku uygulamasından önce bitkiler tarla kapasitesine kadar sulanmış ve yaklaşık 3 saat drene işlemi (Şekil 8) yapıldıktan sonra saksıların yaş ağırlıkları dijital terazi ile tartılmış (Şekil 9) ve kayıt altına alınmıştır.

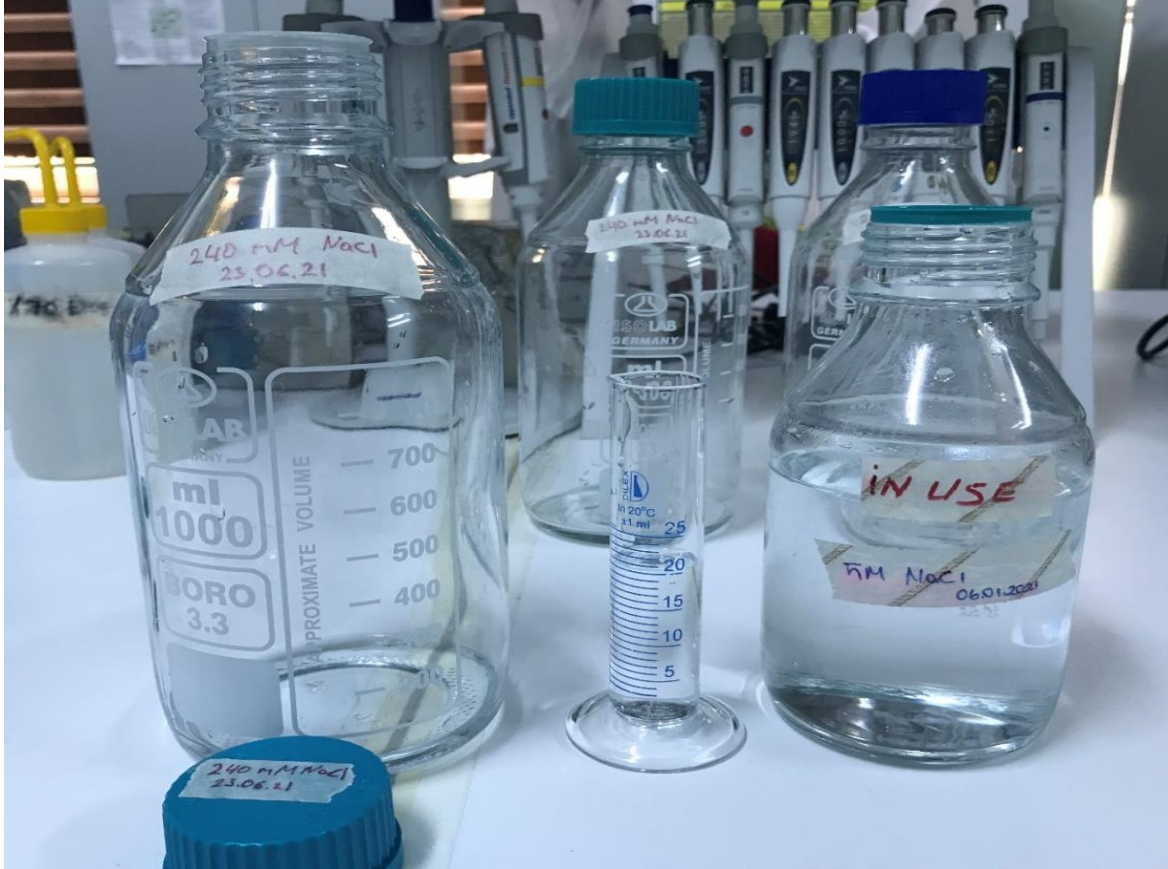


Şekil 8. Tarla kapasitesine getirilen domates bitkilerinin drene edilmesine ilişkin görüntü.



Şekil 9. Domates saksılarının 24 saat aralıklarla yaş ağırlıklarının tartılmasına ilişkin görüntü. A: Tarla kapasitesine getirilen saksıların drene edildikten sonra yapılan ilk tartımları (1. gün). B: İlk tartımın üzerinden 24 saat geçtikten sonra yapılan ikinci tartım (2. gün). C: İkinci tartımın üzerinden 24 saat geçtikten sonra yapılan üçüncü tartım (3. gün).

Çiçeklenme dönemindeki domates bitkilerine, tarla kapasitesine kadar yapılan sulama işleminden sonra saksı başına tutulan su miktarının %60'ı kaybedildiğinde 240 mM NaCl şoku tek seferde uygulanmıştır. Çalışmada, 5M NaCl stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanan 240 mM NaCl tek doz tarafımızca yapılan ön denemeler sonucunda belirlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. 240 mM NaCl'nin hazırlanmasına ilişkin görsel.

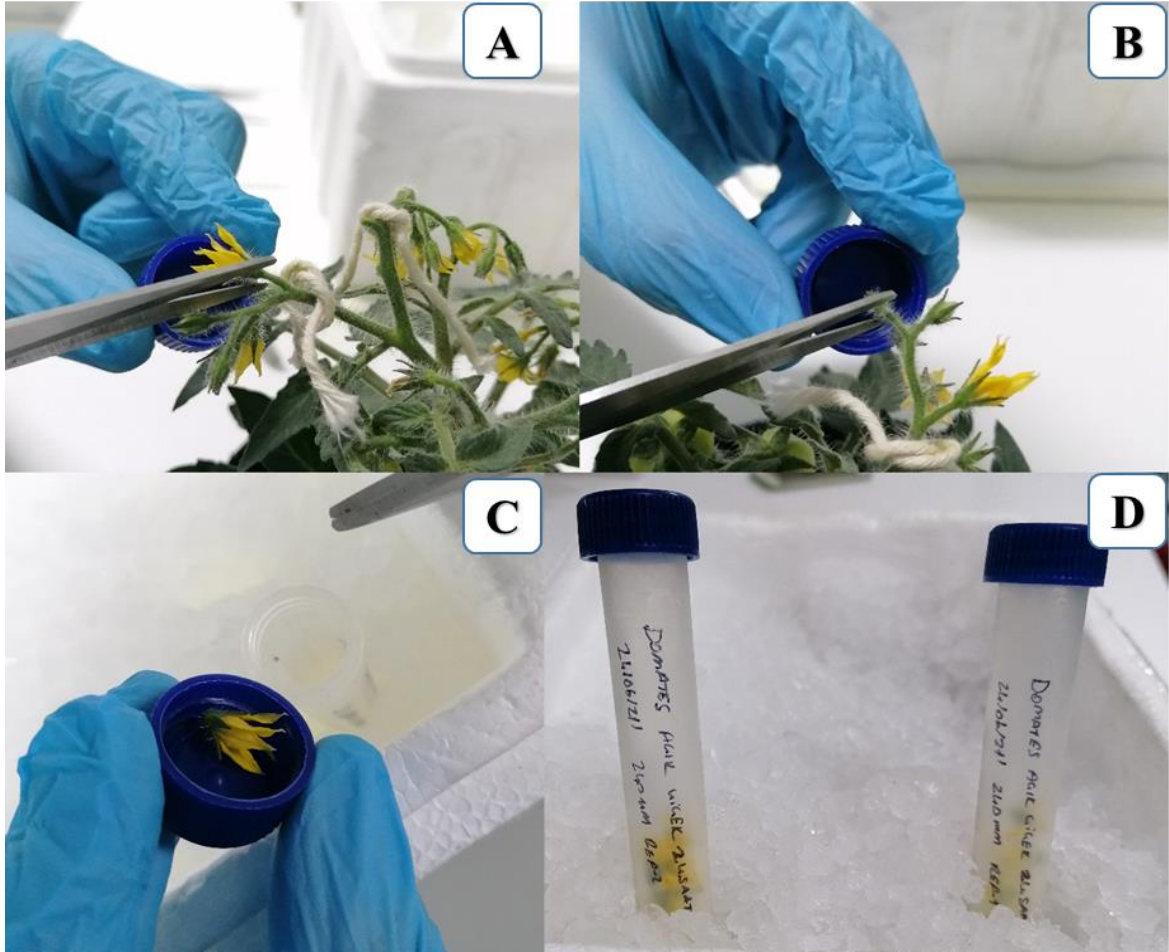
### 3.2.3. Doku Örneklerinin Alınması

Domates bitkilerine NaCl şoku uygulanmadan 0. saat (kontrol) ve uygulamadan sonraki 6. saat, 12. saat ve 24. saat zaman aralıklarında açık çiçek örnekleri alınmıştır (Şekil 11). Domates açık çiçek dokuları 3 biyolojik tekrarlı olarak toplanmıştır. Örnek alma işleminden önce, dokuların muhafaza edileceği tüpler üzerinde, tarih, doku adı ve alındığı zaman aralığı gibi gerekli bilgileri içeren etiketlemeler yapılmıştır. Ayrıca, NaCl şoku uygulamasından önce, morfolojik olarak yarı kapalı veya buruşuk çiçeklerin mevcudiyetinden dolayı, tuz stresi uygulandıktan sonra aynı morfolojik belirtileri sergileyebilecek çiçeklerin birbiriyle karışmaması amacıyla, tam açık çiçekler beyaz iplerle



işaretlenmiştir (Şekil 11A-B). Açık çiçek dokuları alınırken sadece beyaz iple işaretli olanlar dikkate alınmıştır (Şekil 11A).

Doku alımlarının yapıldığı esnada, olası doku zararlarını en aza indirmek için dokular mümkün olan en kısa süre içerisinde makas yardımıyla alınarak buz aküsü içerisinde bekletilen etiketli tüplerde toplanmış ve sonrasında -80 °C'ye transfer edilerek muhafaza edilmiştir (Şekil 11C-D).



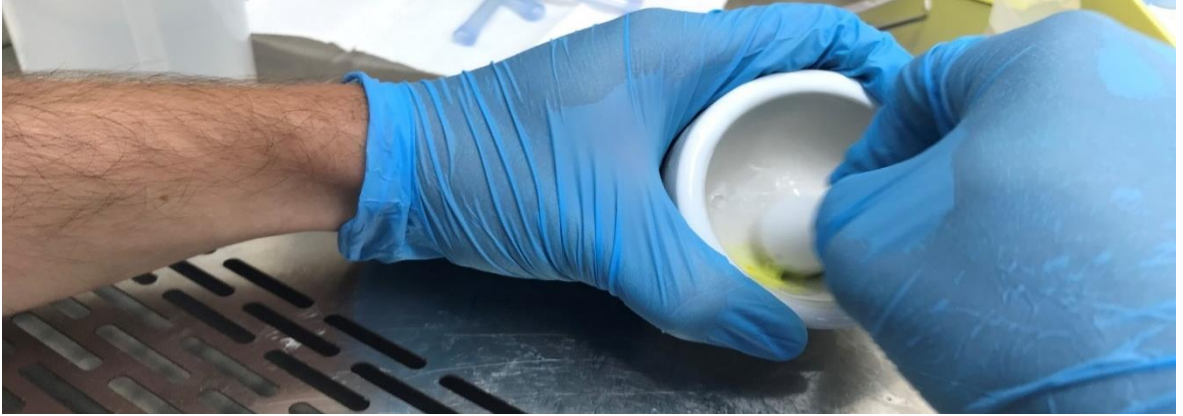
Şekil 11. NaCl şoku uygulamasından sonra açık çiçek doku örneklerinin alınması. A-B: Açık çiçek dokularının makas yardımıyla alınması. C-D: Doku örneklerinin buz aküsü içindeki tüplere aktarılması.

### 3.2.4. Moleküler Analizler

#### Total RNA İzolasyonu

Domates açık çiçek dokularından Total RNA'yı izole etmek için ticari GF-1 Vivantis Total RNA Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır.

Total RNA izolasyonu için -80 °C'de muhafaza edilen açık çiçek dokuları (her örnek için yaklaşık 20 mg) önceden soğutulmuş havanlar kullanarak sıvı nitrojen yardımıyla öğütülmüş ve ince toz haline getirilmiştir. Havan içerisinde öğütülen dokuların üzerine 400 µl Tampon TR ve 5 µl 2-mercaptoethanol eklenerek homojenize edilmiş (Şekil 12) ve örnekler 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.

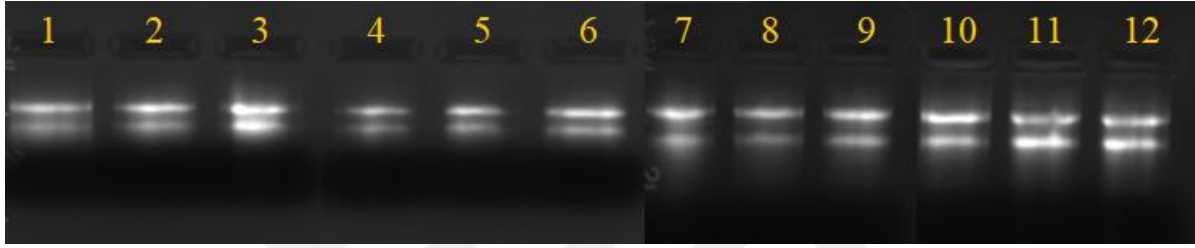


Şekil 12. Total RNA izolasyonu için açık çiçek dokularının homojenize edilmesine ilişkin görüntü.

Sonrasında, örnekler üç dakika boyunca 13.000 RPM'de santrifüjlenmiş ve elde edilen lizatlar homojenizasyon kolonuna aktarılmıştır. Örnekler iki dakika boyunca 13.000 RPM'de santrifüj edilmiş ve homojenizasyon kolonunda toplanan sıvı üzerine 350 µl %80 etanol eklenerek pipetleme yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Devamında örnekler RNA bağlama kolon tüpüne aktarılarak 1 dakika boyunca 10.000 RPM'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpündeki akışkan sıvılar atılmıştır. Örnek başına 500 µl Wash Buffer eklenerek 1 dakika boyunca 14.000 RPM'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpündeki akışkan sıvılar atılmıştır. RNA bağlama kolonuna 70 µl DNase I Digestion (DNase I 7µl, Digestion Buffer 56 µl, Digestion Enhancer 7 µl) karışımı eklenmiş ve örnekler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında, örneklere 500 µl Inhibitör Removal Buffer eklenerek 1 dakika boyunca 14.000 RPM'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpündeki akışkan sıvılar atılmıştır. Örneklere 500 µl Wash Buffer eklenerek 1 dakika boyunca 10.000 RPM'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpündeki akışkan sıvılar atılmıştır. Örneklere tekrardan 500 µl Wash Buffer eklenerek 1 dakika boyunca 10.000 RPM'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpündeki akışkan

sıvı atılmıştır. Örnekler tekrardan 1 dakika boyunca 10.000 RPM’de santrifüj edilmiştir. Sonrasında, RNA bağlama kolunu yeni mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve örneklerle 50µl saf su eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir. Devamında örnekler 1 dakika boyunca 10.000 RPM’de santrifüj edilmiştir. Açık çiçek dokularından izole edilen Total RNA örnekleri -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Açık çiçek dokularından izole edilen Total RNA’lar 50 ml 1X Dietil pirokarbonat (DEPC) Water ile hazırlanan %2’lik agaroz jelde 75 voltluk bir gerilim uygulanarak 30 dakika boyunca koşturulmuştur. Total RNA örnekleri, UV Transilluminator cihazı kullanılarak görselleştirilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. Açık çiçek dokularından izole edilen Total RNA’ların %2’lik agaroz jelde koşturulduktan sonra elde edilen jel görüntüsü. 1: Kontrol 1. tekrar, 2: Kontrol 2. tekrar, 3: Kontrol 3. tekrar, 4: 6. saat 1. tekrar, 5: 6. saat 2. tekrar, 6: 6. saat 3. tekrar, 7: 12. saat 1. tekrar, 8: 12. saat 2. tekrar, 9: 12. saat 3. tekrar, 10: 24. saat 1. tekrar, 11: 24. saat 2. tekrar, 12: 24. saat 3. tekrar.

### **Agaroz Jel Elektroforezi**

Domates açık çiçek dokularından izole edilen total RNA örnekleri %2’lik agaroz jelde koşturulması için 1 gram agaroz, 50 ml 1X Dietil pirokarbonat (DEPC) Water içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak homojen şekilde eritilmiştir (Sambrook, vd., 1989). Daha sonra agaroz çözeltisine 1 µl Etidyum Bromür (EtBr) eklenerek iyice karıştırılmış ve devamında taraklı bir jel küveti içerisine agaroz çözeltisi (jel) dökülmüştür. Jel, katılaşmanın sağlanması için oda sıcaklığında 25 dakika boyunca bekletilmiştir. Sonrasında tarak dikkatlice çıkarılmış ve katılaşan jel, 1X DEPC Water içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Kuyucuklara, her örnek için 5 µl yükleme boyası ve 5 µl total RNA örneği yüklenmiştir. Jel, 75 voltluk sabit gerilim altında yaklaşık 30 dakika boyunca koşturulmuştur. Total RNA örnekleri, UV Transilluminator cihazı kullanılarak görselleştirilmiştir (Şekil 13).

## Genomik DNA İzolasyonu

*SINHX* genleri için tasarlanan primerlerin genom boyutunda özgünlüğünü ve bağlanma sıcaklığını test etmek için açık çiçek dokularından izole edilen genomik DNA örnekleri şablon olarak kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonu CTAB DNA ekstraksiyon protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Doyle ve Doyle, 1987; Doyle, 1991).

Tablo 6

DNA ekstraksiyon tamponu için gerekli bileşenler ve hacimleri.

Bileşen	Hacim
1,4 M NaCl	28 ml
20 mM Na <sub>2</sub> EDTA	4 ml
100 mM Tris pH 8.0	10 ml
%3 w/v CTAB	50 ml
Steril H <sub>2</sub> O	8 ml
<b>Toplam hacim</b>	<b>100 ml</b>

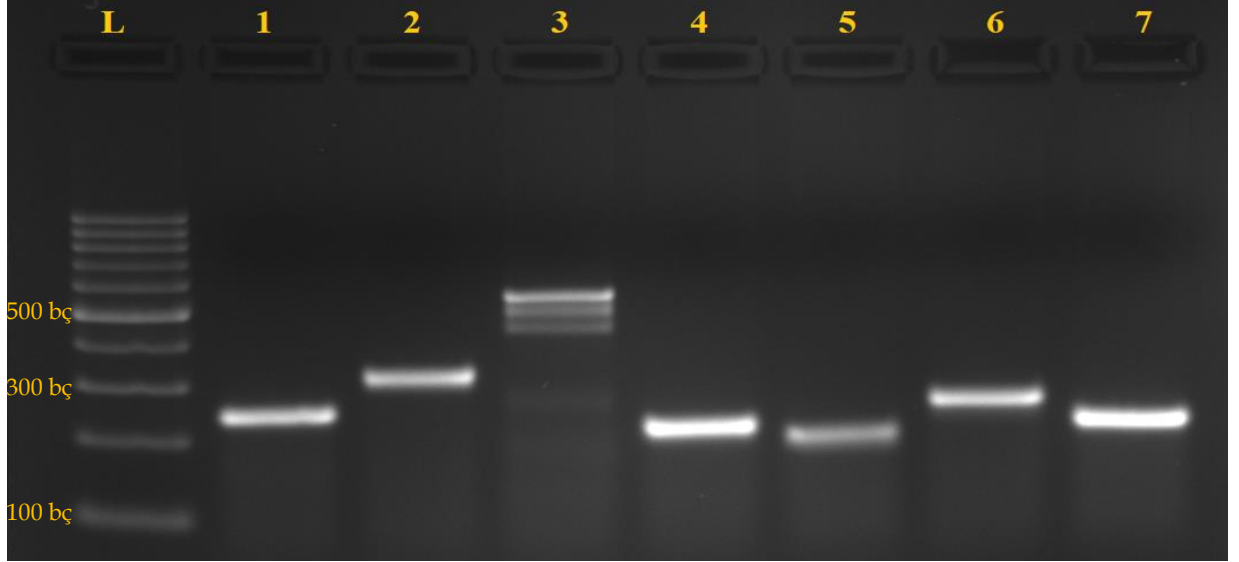
Domates açık çiçek dokularından (her örnek için yaklaşık 20 mg) genomik DNA izolasyonu için örnek başına 250 µl DNA ekstraksiyon tamponu (Tablo 6) eklendi ve dokular havan içerisinde öğütülerek homojenize edilmiştir (Şekil 14). Sonrasında, örnekler 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır ve kısaca vorteks yapıldıktan sonra 20 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Devamında, örnek başına 250 µl kloroform/izoamil alkol (24/1, v/v) eklenerek pipetleme yardımıyla iyice karıştırılmış ve 13.00 RPM'de 12 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüplerdeki üst faz uzaklaştırılmış ve örnek başına 140 µl isopropanol eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında, örnekler 13.000 RPM'de 7 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve tekrardan üst faz uzaklaştırılmıştır. Devamında, örnek başına 1 ml etanol (%70) eklenmiş ve 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz uzaklaştırılmış ve örnekler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Sonrasında, örnek başına 100 µl TE (10 mM Tris-Ha, 1 mM EDTA) eklenerek 55 °C'de 5 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Son olarak, örnekler 13.000 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve devamında genomik DNA'lar gerekli etiketlemeler yapıldıktan sonra -80 °C'de depolanmıştır.





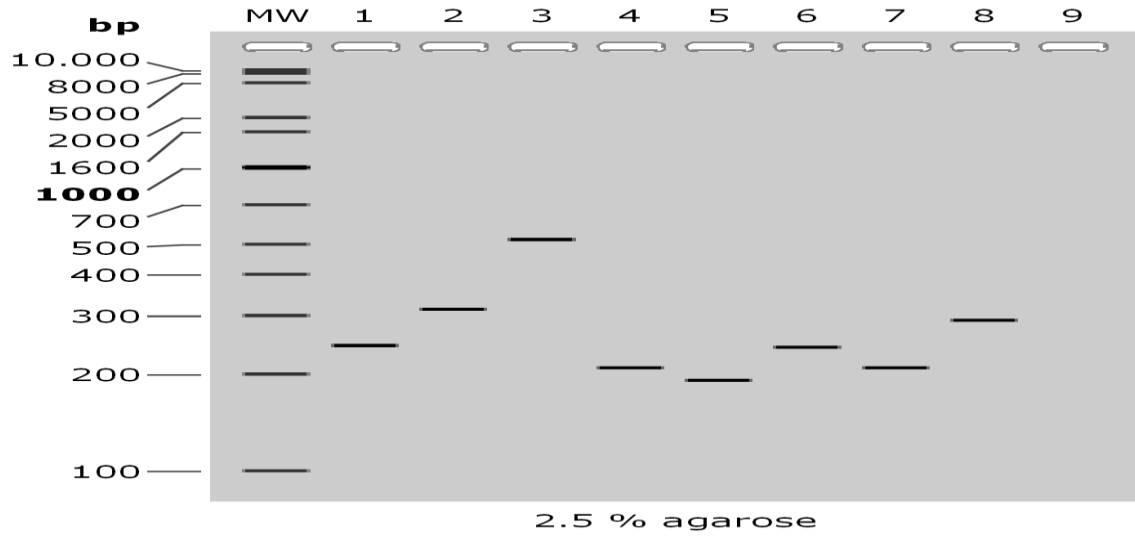
Şekil 14. Domates açık çiçek dokularının, DNA ekstraksiyon tamponu ile homojenize edilmesine ilişkin görüntü.

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu elde edilen ürünler, 50 ml Tris-borate-EDTA (TBE) buffer ile hazırlanan %2.5'lik agaroz jelde 75 voltluk bir gerilim uygulanarak 45 dakika boyunca elektroforez yapılmıştır. Devamında, gDNA moleküllerinin agaroz jel üzerinde görselleştirilmesi için UV Transilluminator cihazı kullanılmıştır (Şekil 15).



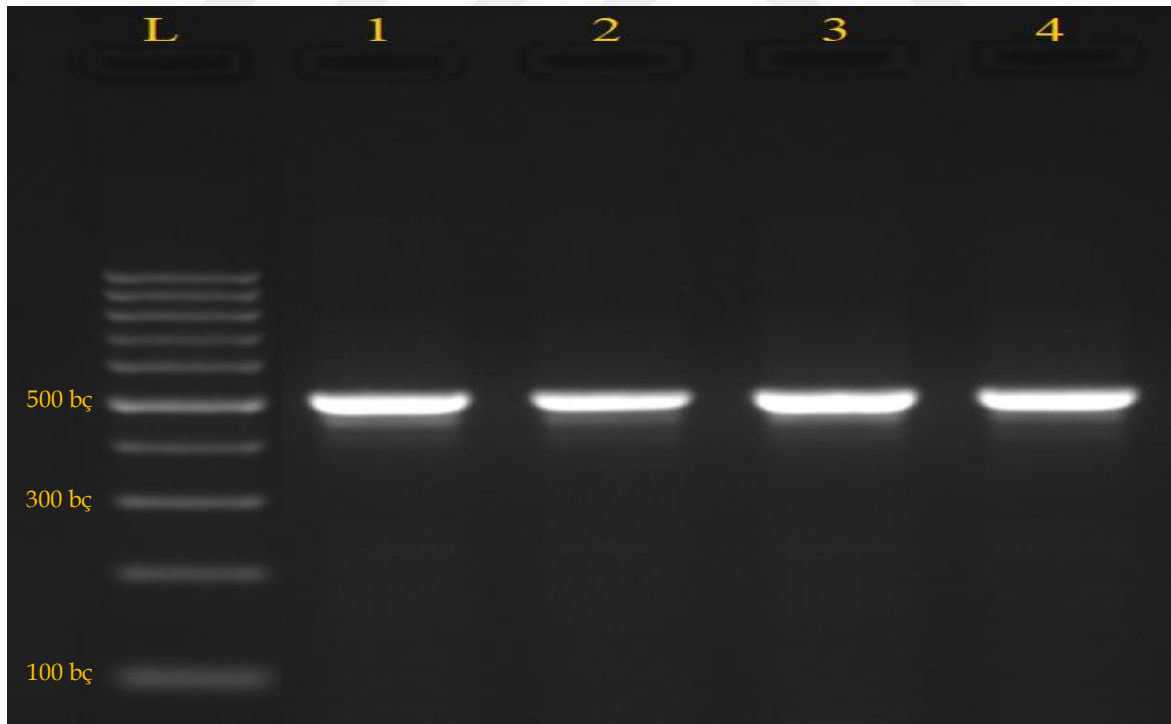
Şekil 15. *SINHX* genlerine ait PCR ürünlerinin %2.5'lik agaroz jelde koşturulması sonucunda elde edilen jel görüntüsü. L: DNA Ladder (1000 bç), 1: *SINHX1* gDNA 224 bç, 2: *SINHX2* gDNA 314 bç, 3: *SINHX3* gDNA 522 bç, 4: *SINHX4* gDNA 209 bç, 5: *SINHX6* gDNA 192 bç, 6: *SINHX7* gDNA 242 bç, 7: *SINHX8* gDNA 209 bç.

SnapGene programı aracılığıyla *EXPRESSED* ve *SINHX* genlerinin gDNA sekansları kullanılarak %2.5'lik agaroz jelde *in silico* analizi de gerçekleştirilmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. *EXPRESSED* ve *SINHX* genlerinin %2.5'lik agaroz jelde *in silico* analizi. MW: Moleküler ağırlık, 1: *SINHX1*, 2: *SINHX2*, 3: *SINHX3*, 4: *SINHX4*, 5: *SINHX6*, 6: *SINHX7*, 7: *SINHX8*, 8: *EXPRESSED*.

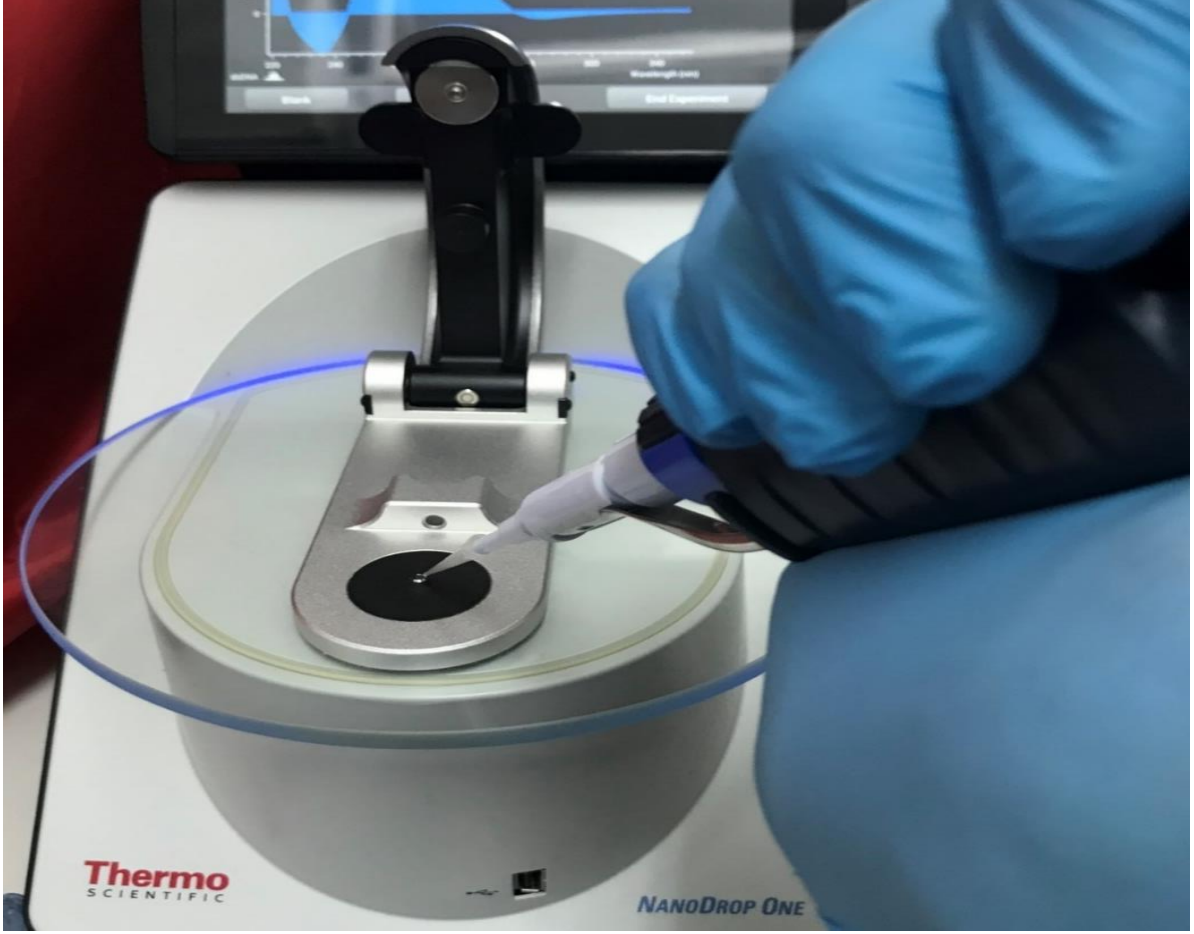
*SINHX3* genine ait ileri ve geri primerlerin bağlanma sıcaklığı ( $T_a$ ), Gradient PCR kullanılarak yeniden optimize edilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. *SINHX3* (gDNA ürün boyutu 522 bç) genine ait primerlerin Gradient PCR ile farklı bağlanma sıcaklıklarındaki ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri. Şablon olarak gDNA kullanılmıştır. L: DNA Ladder (1000 bç), 1: *SINHX3* 56 °C  $T_a$ , 2: *SINHX3* 57 °C  $T_a$ , 3: *SINHX3* 58 °C  $T_a$ , 4: *SINHX3* 59 °C  $T_a$ .

## Total RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Domates açık çiçek dokularından izole edilen total RNA'ların konsantrasyonlarını belirlemek için "Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers" cihazı kullanılmıştır (Şekil 18). Açık çiçek dokularına ait total RNA'larda  $A_{260}/A_{280}$  ile  $A_{260}/A_{230}$  absorbans değerlerinin saflık oranlarını ve konsantrasyonlarını (ng/ $\mu$ l) belirlemek için örnek başına 2  $\mu$ l total RNA kullanılmıştır.



Şekil 18. Total RNA örneklerinin NanoDrop One cihazı ile absorbans saflık oranlarının ve konsantrasyonlarının ölçülmesi.

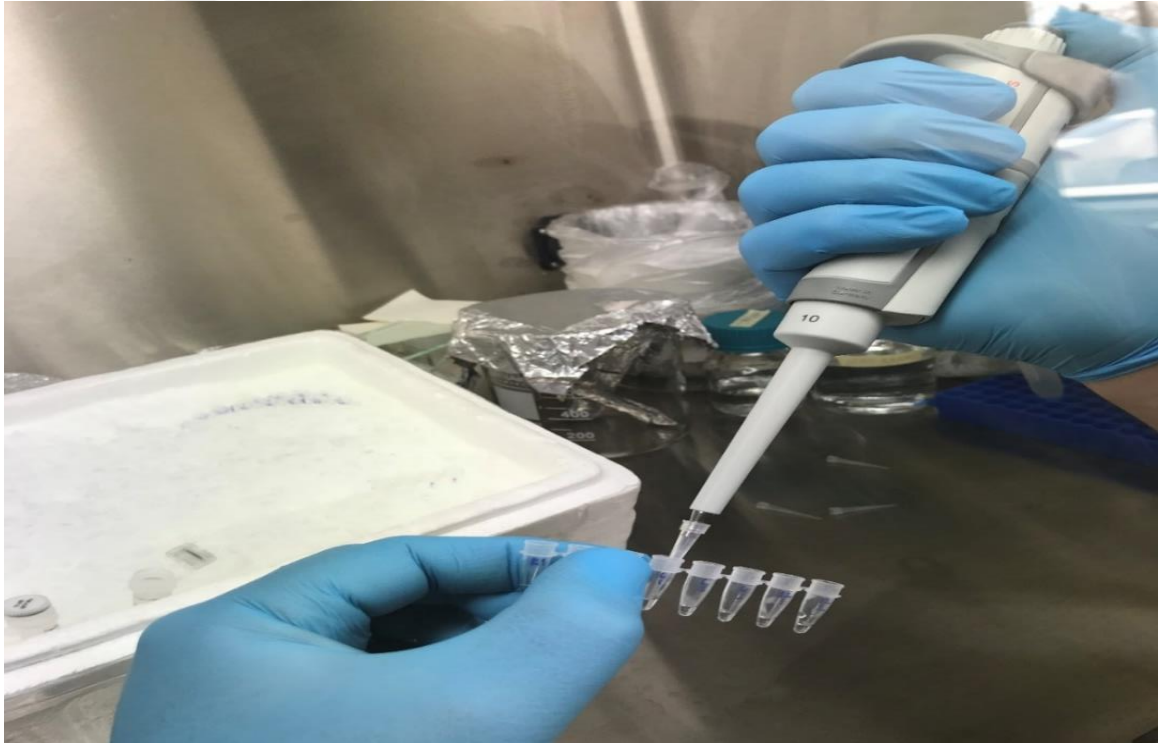
## Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Domates açık çiçek dokularından izole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi için aşağıdaki Tablo 7'de belirtilen hacimlerdeki bileşenler her örnek için steril tüplere aktarılmıştır (Şekil 19).

Tablo 7  
cDNA sentezinin ilk adımı için gerekli bileşenler ve kullanılan hacimler.

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim</b>
Total RNA	1000 ng
Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer	1 µl
Steril H <sub>2</sub> O	12 µl hacime kadar
<b>Toplam hacim</b>	<b>12 µl</b>

Tablo 7’de belirtilen şekilde hazırlanan örnekler kısaca vorteks ve santrifüj işleminden sonra 65°C’de 5 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemin ardından aşağıdaki Tablo 8’de belirtilen hacimlerdeki bileşenler toplam hacmi 12 µl olan örneklerin bulunduğu tüplere eklenmiştir.



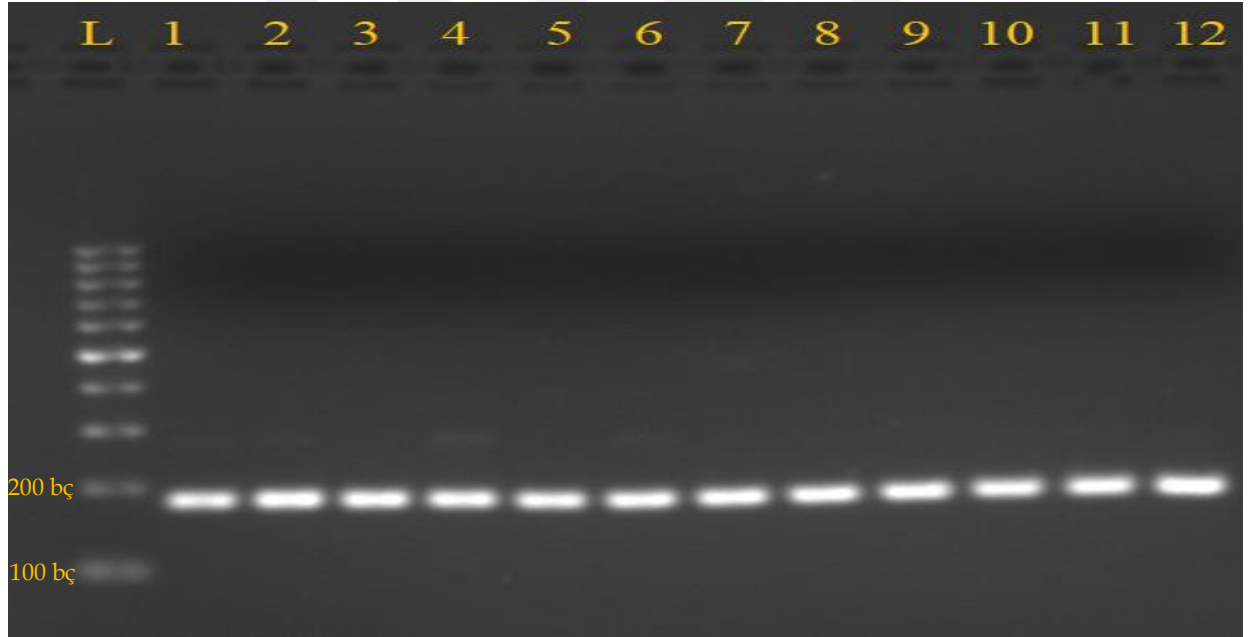
Şekil 19. Komplementer DNA sentezi için gerekli bileşenlerin tüplere aktarılması.

Tablo 8’de belirtilen şekilde hazırlanan örnekler kısaca vorteks ve santrifüj işleminden sonra 42°C’de 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Son olarak örnekler 72°C’de 5 dakika boyunca inkübasyona bırakılarak cDNA sentez reaksiyonu sonlandırıldı ve elde edilen cDNA’lar yapılacak diğer analizler için -80°C’de depolandı.

Tablo 8  
cDNA sentezinin ikinci adımı için gerekli bileşenler ve hacimleri.

Bileşen	Hacim
5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase inhibitör (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 µl (12 µl + 8 µl)</b>

*EXPRESSED* kontrol genine ait ileri ve geri primerlar kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında oluşan ürünler 100 ml TBE buffer ile hazırlanan %2.5'lik agaroz jelde 75 voltluk bir gerilim uygulanarak 45 dakika boyunca koşturulmuştur. Devamında, agaroz jeldeki cDNA örnekleri, UV Transilluminator cihazı kullanılarak görselleştirilmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. *EXPRESSED* genine ait PCR ürünlerinin %2.5'lik agaroz jel görüntüsü. L: DNA Ladder (1000 bç), 1: Kontrol 1. tekrar, 2: Kontrol 2. tekrar, 3: Kontrol 3. tekrar, 4: 6. saat 1. tekrar, 5: 6. saat 2. tekrar, 6: 6. saat 3. tekrar, 7: 12. saat 1. tekrar, 8: 12. saat 2. tekrar, 9: 12. saat 3. tekrar, 10: 24. saat 1. tekrar, 11: 24. saat 2. tekrar, 12: 24. saat 3. tekrar.

## Domateste *SINHX* Genlerine Ait Spesifik Primer Dizaynı

Çalışmada tanımlanan ve karakterize edilen *SINHX* gen ailesi üyelerine ilişkin spesifik ileri (forward) ve geri (reverse) primerler MacVector yazılımı kullanılarak dizayn edilmiştir (Tablo 9). Kontrol geni (housekeeping) olarak *EXPRESSED* geni kullanılmıştır (Choi, vd., 2018).

Tablo 9

Gen ifade analizlerinde kullanılan *SINHX* ve *EXPRESSED* genlerine ait ileri (Forward) ve geri (Reverse) primerlerine ait diziler, ürün boyutları ve bağlanma sıcaklıkları (Ta).

Gene Adı	İleri (F) ve Geri (R) Primer Sekansı	Ürün Boyutu (bp)	Ta (°C)
<i>SINHX1</i>	(F) GGCTTACCTATCTTACATGCTTGC (R) AGCTCTCAGTCACATTATGCC	gDNA 244 cDNA 113	55
<i>SINHX2</i>	(F) TCCTCTTCCTCTATGTGGGCA (R) AAACAAAAGCAGCTCTCCCCA	gDNA 314 cDNA 135	55
<i>SINHX3</i>	(F) CTCAGTGGGATTTTGACCGTC (R) CAATGTCCAACGCATCCATCC	gDNA 522 cDNA 169	56
<i>SINHX4</i>	(F) ACTGATCGTGAAGTTGCTCTC (R) TGCCAGGTATAGTGTGACATG	gDNA 209 cDNA 128	55
<i>SINHX6</i>	(F) TCTTGTACGACCTCCACACC (R) GGACTGACTGCAAAGCAAGG	gDNA 192 cDNA 107	55
<i>SINHX7</i>	(F) CCTGGCGTGCTTATTTCCAC (R) CCCAATTTCTTGCTGGCACC	gDNA 242 cDNA 167	55
<i>SINHX8</i>	(F) CTTTTGCTTGCTGGACCTGG (R) ACAGCCACAGGATCAGTAGC	gDNA 209 cDNA 140	55
<i>EXPRESSED</i>	(F) GCTAAGAACGCTGGACCTAATG (R) TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	gDNA 291 cDNA 183	55

## Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Domates bitkilerine NaCl şoku stresi uygulandıktan sonraki 6. saat, 12. saat ve 24. saatlerdeki açık çiçek dokularına ait RT-qPCR analizleri öncesinde gDNA/cDNA örnekleri kullanılarak *SINHX* ve *EXPRESSED* genlerinin özgünlüğü ve moleküler büyüklükleri Tablo 10'da sunulan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) protokolü kullanılarak test edilmiştir.

Tablo 10

PCR reaksiyonu için gerekli bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
PCR-Grade H <sub>2</sub> O	22 µl
5X Reaksiyon tamponu	10 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
10 mM dNTP	1 µl
10 mM İleri primer	1 µl
10 mM Geri primer	1 µl
5 U/µL Taq DNA Polimeraz	0.125 µl
gDNA/cDNA	1 µl
<b>Total hacim</b>	<b>39,125 µl</b>

*SINHX* genlerinin polimeraz zincir reaksiyonunda şablon olarak genomik DNA (gDNA) kullanılırken, *EXPRESSED* kontrol (housekeeping) geni için komplementer DNA (cDNA) kullanılmıştır. Kontrol geni ve *SINHX* genleri için gerekli bileşenler hazırlandıktan sonra örnekler polimeraz zincir reaksiyonu için Thermal Cycler (Applied Biosystems® Veriti® 96 Well Thermal Cycler) cihazına yerleştirilmiştir. Thermal Cycler cihazına ait sıcaklık, zaman ve döngü sayıları Tablo 11'de sunulmuştur.

Tablo 11

Thermal Cycler cihazına ait reaksiyon aşamaları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	10 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	} 35
Bağlanma (Annealing)	55	45 sn	
Uzama (Extension)	72	45 sn	
Son uzama	72	3 dk	1

PCR döngüsü olarak 95 °C’de 10 dakika boyunca ön denatürasyon işlemine tabi tutularak çift zincirli nükleik asit yapıları tek zincir haline getirilmiştir. Devamında 95 °C’de 15 saniye denatürasyon, primerlerin hedef zincire bağlanması için 55 °C’de 45 saniye ve primerlerin bağlandığı hedef zincirin uzaması için 72 °C’de 45 saniye boyunca toplamda 35 döngü olacak şekilde reaksiyon devam etmiştir. Reaksiyonun son adımı olarak 72 °C’de 3 dakika boyunca son uzama gerçekleştirilmiştir.

### Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (RT-qPCR) Reaksiyonu

Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (RT-qPCR) analizlerini gerçekleştirmek için Ampliqon RealQ Plus SYBR Green/ROX Master Mix kiti kullanılmıştır. RT-qPCR analizleri için gerekli olan reaksiyon bileşenleri ve hacimleri Tablo 12’de sunulmuştur.

Tablo 12

RT-qPCR reaksiyonu için gerekli bileşenler ve kullanılan miktarlar.

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
RealQ Plus 2X Master Mix	10 µl
PCR-Grade H <sub>2</sub> O	8 µl
cDNA (1:100)	1 µl
10 mM İleri Primer	0.5 µl
10 mM Geri Primer	0.5 µl
<b>Total hacim</b>	<b>20 µl</b>



Choi ve diğeri (2018), Micro-Tom domates çeşidinde gen ekspresyonu analizleri için sekiz tane (*TIP41*, *GAPDH*, *EXPRESSED*, *PP2a*, *SAND*, *RPL8*, *CAC*, *ACT*) kontrol (housekeeping) gen adaylarının stabilitesini ve uygulanabilirliğini test etmişlerdir. RT-qPCR analizlerinde kullanılacak kontrol geninin farklı bitki gelişim evrelerindeki kararlılık durumunun tespit edilmesi amacıyla çiçeklerden ve meyvelerden on yedi tane farklı örnek toplamışlar ve geNorm ile NormFinder istatistiksel algoritmaları kullanılarak aday genlerin ekspresyon stabilitesini analiz etmişlerdir. Araştırmacılar *EXPRESSED* geninin diğer adaylar arasında en kararlı ve güvenilir kontrol geni olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, *SINHX* gen ailesi üyelerinin NaCl şoku stresi altında gen ifade seviyelerinin belirlenmesi için yapılacak analizlerde kontrol geni (housekeeping) olarak *EXPRESSED* kullanılmıştır. Kontrol geni ve hedef *SINHX* genlerine ait her örnek reaksiyon başına toplam hacim 20 µl olarak ayarlanmıştır ve analizler üç biyolojik tekrar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR aşamalarına ait sıcaklık, zaman ve döngü sayıları Tablo 13’de sunulmuştur.

Tablo 13  
RT-qPCR reaksiyon aşamaları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	8 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	} 40
Bağlanma (Annealing)	55	30 sn	
Uzama (Extension)	72	30 sn	
Erime Eğrisi (Melting Curve)	95	20 sn	} 1
	67	60 sn	
	97	0 sn	

Reaksiyonun ilk aşamasında 95 °C 8 dakika boyunca ön denatürasyon uygulanmış ve sonrasında amplifikasyon aşamasına geçilerek 95 °C’de 15 saniye denatürasyon, 55 °C’de 30 saniye bağlanma ve 72 °C’de 30 saniye uzama olmak üzere toplamda 40 döngü olacak şekilde reaksiyon devam etmiştir. Reaksiyonun son adımı olan melting curve aşaması, 95 °C’de 20 sn, 67 °C’de 1 dk ve 97 °C’de 0 sn olarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 13).

### 3.2.5. Verilerin Analizi

*SINHX* genlerinin göreceli ekspresyon seviyeleri,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu yöntemle göre;

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{Hedef Gen}} - Ct_{\text{Kontrol Gen}}),$$

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{Hedef Gen}} - Ct_{\text{Kontrol Gen}})_{\text{Zaman}} - (Ct_{\text{Hedef Gen}} - Ct_{\text{Kontrol Gen}})_{\text{Zaman (Kontrol)}}$  formülleri kullanılarak hedef *SINHX* üyelerinin göreceli ifade seviyeleri belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). Genlerin göreceli ifade seviye analizleri esnasında, veri setlerinde meydana gelen standart sapma ve standart hata değerleri Microsoft Office Excel programı aracılığıyla belirlenmiştir.



## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

#### 4.1.1. *SINHX* Genlerinin Tanımlanması ve Sınıflandırılması

Domates (*Solanum lycopersicum*) genomundaki (SL 4.0 ve ITAG 4.0)  $Na^+/H^+$  antiporter (*NHX*) gen ailesini tanımlamak için, *Arabidopsis thaliana*'da bulunan *AtNHX*'lerin amino asit sekansları hizalamalarda kullanılmıştır. Sonuçlar, domates genomunda  $Na^+/H^+$  antiporter kodlayan toplam yedi tane *SINHX* geni olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 14).

Sekans homoloji analizlerine göre genler, *SINHX1* (*Solyc01g067710*), *SINHX2* (*Solyc01g098190*), *SINHX3* (*Solyc10g006080*), *SINHX4* (*Solyc06g008820*), *SINHX6* (*Solyc04g056600*), *SINHX7* (*Solyc01g005020*), *SINHX8* (*Solyc04g018100*) olarak tanımlanmış ve adlandırılmıştır.

*SINHX* genlerinin dizi analizleri, genomik sekansların 4232 bç (*SINHX3*) ile 15997 bç (*SINHX6*) uzunluğu arasında değiştiğini, CDS (kodlanan sekans) sayılarının 14 ile 23 arasında ve sekans uzunluklarının 1578 bç (*SINHX3*) ile 3456 bç (*SINHX7*) arasında değiştiğini ve amino asit sekansların 526 (*SINHX3*) ile 1152 aa (*SINHX7*) arasında değiştiğini göstermiştir (Tablo 14).

*SINHX* proteinlerinin moleküler ağırlıkları (MW) 58.5 ile 127.5 (kDa) arasında ve izoelektrik noktalarının (pI) 5.32 ile 9.12 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak, *SINHX* proteinlerinin transmembran sarmal alanları sayısı 11 ile 13 arasında değişiklik göstermektedir (Tablo 14).

Tablo 14

Domates genomunda tanımlanan *SINHX* genlerinin sekans ve moleküler özellikleri.

Gene adı	Lokus adı	Genomik sekans	CDS sekans	Ekzon sayısı	Amino asit sekans	$Na^+/H^+$ antiporter domain	TM	Chr	<i>NHX</i> Sınıfı	Plant-mPLoc	MW (kDa)	pI
<i>SINHX1</i>	<i>Solyc01g067710</i>	4956	1614	14	538	29-443	12	1	I	Vacuole	59.4	8.55
<i>SINHX2</i>	<i>Solyc01g098190</i>	5857	1611	14	537	29-442	12	1	I	Vacuole	58.7	7.24
<i>SINHX3</i>	<i>Solyc10g006080</i>	4232	1578	14	526	27-444	11	10	I	Vacuole	59.1	8.48
<i>SINHX4</i>	<i>Solyc06g008820</i>	7602	1605	14	535	27-442	13	6	I	Vacuole	59	6.60
<i>SINHX6</i>	<i>Solyc04g056600</i>	15997	1596	20	532	34-437	12	4	II	Vacuole	58.5	5.42
<i>SINHX7</i>	<i>Solyc01g005020</i>	13405	3456	23	1152	29-441	13	1	III	CM	127.5	5.89
<i>SINHX8</i>	<i>Solyc04g018100</i>	15127	2952	22	983	55-462	13	4	III	CM-Vacuole	108.2	5.75

**CDS:** kodlanan sekans; **Chr:** kromozomal lokasyon; **MW:** moleküler ağırlık; **pI:** izoelektrik noktası; **TM:** transmembran domain; **CM:** hücre membranı (cell membrane).

*SINHX* genlerinin amino asit sekansları, *Arabidopsis thaliana*'da bulunan *AtNHX* genlerinin amino asit sekansları ile ikili dizi hizalaması (EMBOSS Matcher-Pairwise Sequence Alignment) yapılmış ve genlerin, *AtNHX* genleri ile olan benzerlikleri (% identity) belirlenmiştir. *SINHX* ve *AtNHX* genleri arasında yapılan benzerlik matris skorlarına göre, en yüksek değer %81.6 ile *Solyc04g056600* (*SINHX6*) ve *AtNHX6* arasında olurken, en düşük değer %49.8 ile *Solyc04g018100* (*SINHX8*) ve *AtNHX8* arasında tespit edilmiştir (Tablo 15).

Amino asit seviyesinde, *Solyc04g056600* geni *Arabidopsis*'te *AtNHX5* (%80.6 identity) ve *AtNHX6* (%81.6 identity) ile benzerlik göstermiştir. Sonuç olarak, *Solyc04g056600* geni *AtNHX6*'ya daha çok benzerlik oranı gösterdiği için *SINHX6* olarak kabul edilmiştir. *AtNHX5*'in ortolog geni domates genomunda tanımlanmamıştır.

*SINHX* üyelerinde  $Na^+/H^+$  antiporter domaini (PF00999), Hidden Markov Modeli (HMM) kullanılarak doğrulanmıştır.

Tablo 15

*Solanum lycopersicum* ve *Arabidopsis thaliana* genomlarındaki *NHX* genlerine ait amino asit sekansları arasındaki yüzde (%) identity matrisi.

% Identity	<i>AtNHX1</i>	<i>AtNHX2</i>	<i>AtNHX3</i>	<i>AtNHX4</i>	<i>AtNHX5</i>	<i>AtNHX6</i>	<i>AtNHX7</i>	<i>AtNHX8</i>
<i>Solyc01g067710</i> ( <i>SINHX1</i> )	<b>72.5</b>	73.5	55.9	66.9	22.2	20.9	10.2	12.3
<i>Solyc01g098190</i> ( <i>SINHX2</i> )	73.9	<b>75.5</b>	56.7	66.5	26.4	25.0	10.4	12.0
<i>Solyc10g006080</i> ( <i>SINHX3</i> )	55.7	55.1	<b>69.9</b>	53.1	22.7	22.3	9.8	12.2
<i>Solyc06g008820</i> ( <i>SINHX4</i> )	65.1	66.4	53.4	<b>63.1</b>	24.4	23.1	10.2	12.9
<i>Solyc04g056600</i> ( <i>SINHX6</i> )	22.6	22.2	22.8	22.4	80.6	<b>81.6</b>	12.4	12.9
<i>Solyc01g005020</i> ( <i>SINHX7</i> )	9.7	9.6	9.7	9.6	10.4	10.0	<b>64.4</b>	42.1
<i>Solyc04g018100</i> ( <i>SINHX8</i> )	10.2	9.7	9.9	11.1	10.2	10.1	42.4	<b>49.8</b>

Domates genomunda tanımlanan *SINHX* gen ailesi üyelerine ait ekzon, intron, kodlanmayan bölge (UTR) ve CDS yapıları, genomik sekans üzerinden SnapGene Viewer 5.2.4. programı kullanılarak haritalandırılmıştır (Şekil 21).

*SINHX1* (*Solyc01g067710*) geni, 4956 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1614 bç uzunluğunda CDS sekansına, 15 tane ekzon, 14 tane intron ve 14 tane CDS yapısına sahiptir (Şekil 21). Bu gen için tasarlanan ileri primer (*SINHX1* F) genomik sekans üzerinde 5' ucundan 3' ucuna doğru 2797 ve 2820 pozisyonları arasında 23 baz uzunluğuna, geri primer (*SINHX1* R) 3' ucundan 5' ucuna doğru 3020 ve 3040 pozisyonları arasında 20 baz uzunluğuna sahiptir (Şekil 21).

*SINHX2* (*Solyc01g098190*) geni, 5857 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1611 bç uzunluğunda CDS sekansına, 16 tane ekzon, 15 tane intron ve 14 tane CDS yapısına sahiptir (Şekil 22). Bu gen için tasarlanan ileri primer (*SINHX2* F) genomik sekans üzerinde 5' ucundan 3' ucuna doğru 4263 ve 4283 pozisyonları arasında 20 baz uzunluğuna, geri primer (*SINHX2* R) 3' ucundan 5' ucuna doğru 4556 ve 4576 pozisyonları arasında 20 baz uzunluğuna sahiptir (Şekil 22).

*SINHX3* (*Solyc10g006080*) geni, 4232 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1578 bç uzunluğunda CDS sekansına, 14 tane ekzon, 13 tane intron ve 14 tane CDS yapısına sahiptir (Şekil 23). Bu gen için tasarlanan ileri primer (*SINHX3*F) genomik sekans üzerinde 5' ucundan 3' ucuna doğru 2310 ve 2330 pozisyonları arasında 20 baz uzunluğuna, geri primer (*SINHX3* R) 3' ucundan 5' ucuna doğru 2811 ve 2831 pozisyonları arasında 20 baz uzunluğuna sahiptir (Şekil 23).

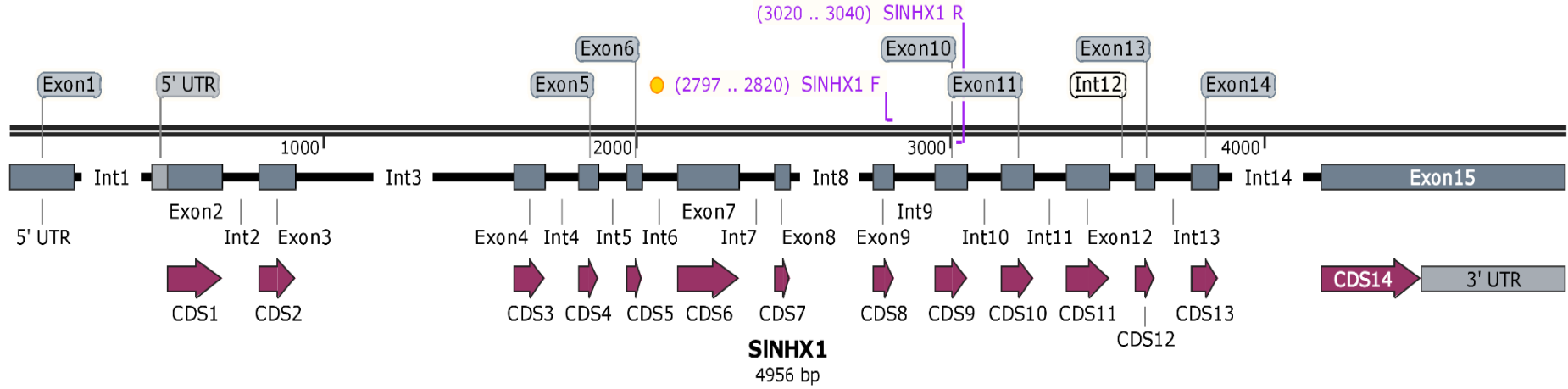
*SINHX4* (*Solyc06g008820*) geni, 7602 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1605 bç uzunluğunda CDS sekansına, 15 tane ekzon, 14 tane intron ve 14 tane CDS yapısına sahiptir (Şekil 24). Bu gen için tasarlanan ileri primer (*SINHX4* F) genomik sekans üzerinde 5' ucundan 3' ucuna doğru 5683 ve 5703 pozisyonları arasında 20 baz uzunluğuna, geri primer (*SINHX4* R) 3' ucundan 5' ucuna doğru 5871 ve 5891 pozisyonları arasında 20 baz uzunluğuna sahiptir (Şekil 24).

*SINHX6* (*Solyc04g056600*) geni, 15997 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1596 bç uzunluğunda CDS sekansına, 21 tane ekzon, 20 tane intron ve 20 tane CDS yapısına sahiptir (Şekil 25). Bu gen için tasarlanan ileri primer (*SINHX6* F) genomik sekans üzerinde 5' ucundan 3' ucuna doğru 9209 ve 9228 pozisyonları arasında 19 baz uzunluğuna, geri primer (*SINHX6*

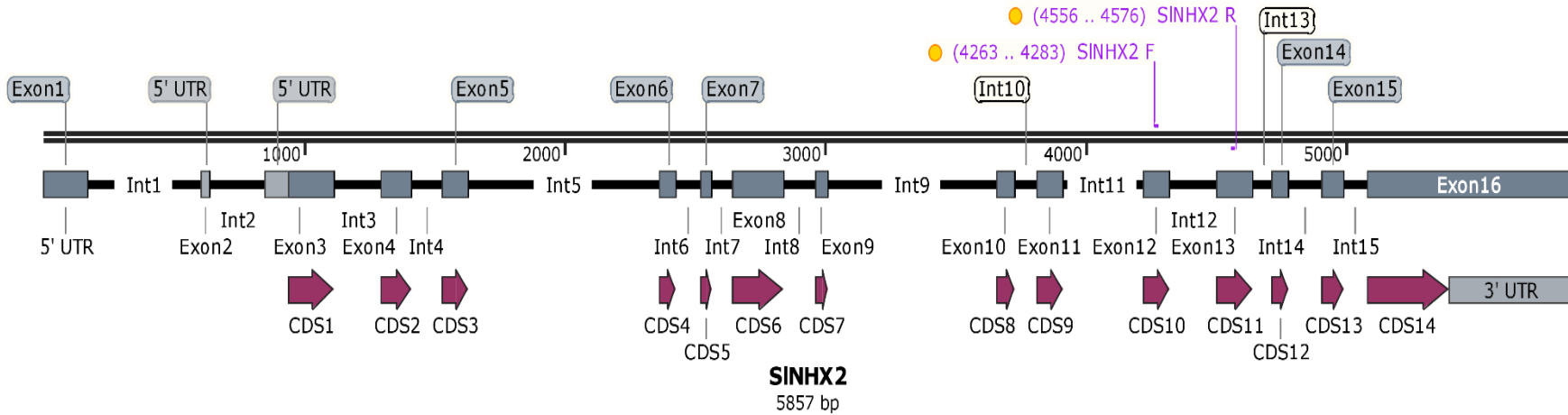
R) 3' ucundan 5' ucuna doğru 9381 ve 9400 pozisyonları arasında 19 baz uzunluğuna sahiptir (Şekil 25).

*SINHX7 (Solyc01g005020)* geni, 13405 bç uzunluğunda genomik sekansa, 3456 bç uzunluğunda CDS sekansına, 23 tane ekzon, 22 tane intron ve 23 tane CDS yapısına sahiptir (Şekil 26). Bu gen için tasarlanan ileri primer (*SINHX7 F*) genomik sekans üzerinde 5' ucundan 3' ucuna doğru 2433 ve 2452 pozisyonları arasında 19 baz uzunluğuna, geri primer (*SINHX7 R*) 3' ucundan 5' ucuna doğru 2655 ve 2674 pozisyonları arasında 19 baz uzunluğuna sahiptir (Şekil 26).

*SINHX8 (Solyc04g018100)* geni, 15127 bç uzunluğunda genomik sekansa, 2952 bç uzunluğunda CDS sekansına, 23 tane ekzon, 22 tane intron ve 22 tane CDS yapısına sahiptir (Şekil 27). Bu gen için tasarlanan ileri primer (*SINHX8 F*) genomik sekans üzerinde 5' ucundan 3' ucuna doğru 2091 ve 2110 pozisyonları arasında 19 baz uzunluğuna, geri primer (*SINHX8 R*) 3' ucundan 5' ucuna doğru 2280 ve 2299 pozisyonları arasında 19 baz uzunluğuna sahiptir (Şekil 27).

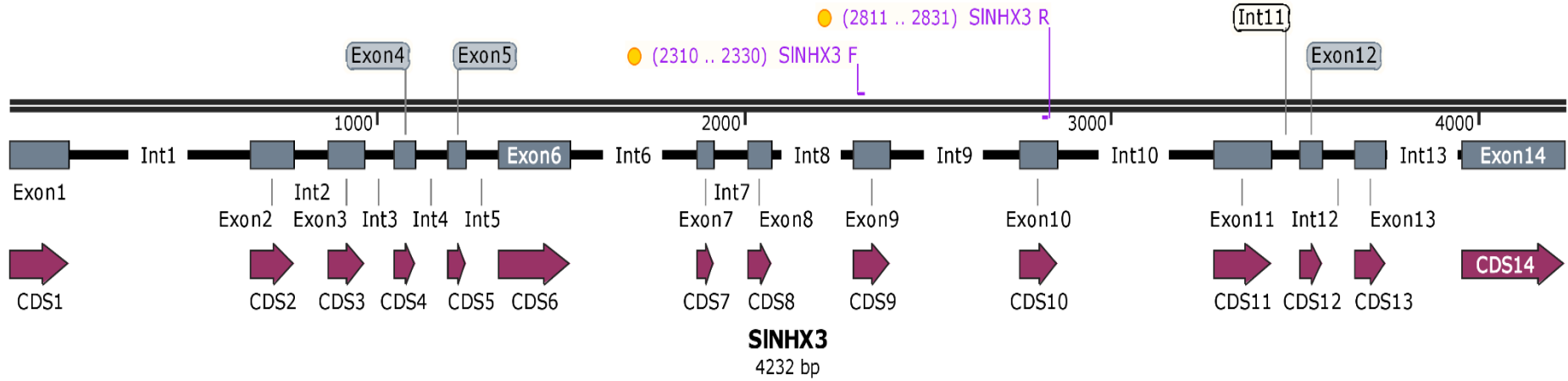


Şekil 21. *SINHX1* üyesinin gen yapısı. Bu haritalarda koyu gri renkli kutular ekzonu, siyah çizgiler intronu, mor renkli oklar CDS yapılarını ve açık gri renkli kutular kodlanmayan bölgeleri temsil etmektedir. Buna ek olarak, *SINHX* genlerine ait tasarlanmış ileri/geri primerler harita üzerinde sarı renkli yuvarlak şekil ile gösterilmiş ve bunların pozisyon bilgileri de haritalarda detaylandırılmıştır.

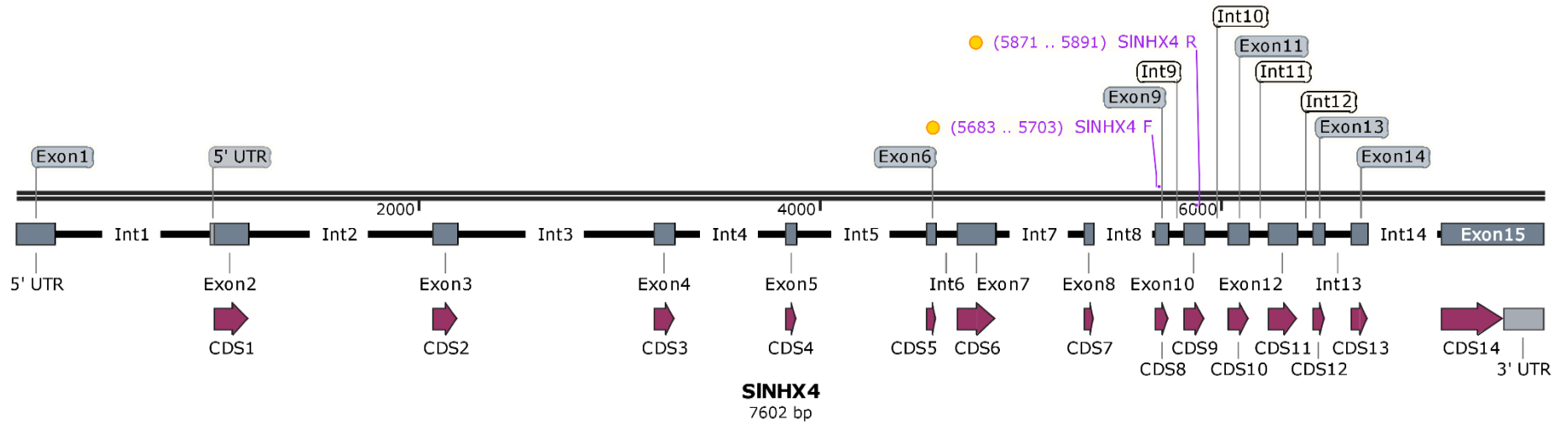


Şekil 22. *SINHX2* üyesinin gen yapısı.

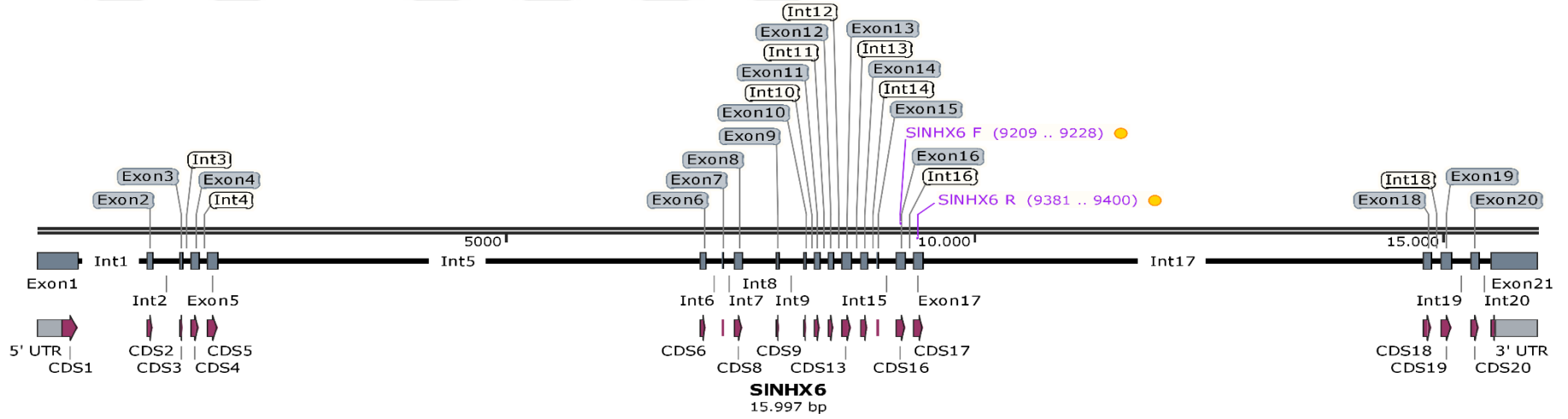




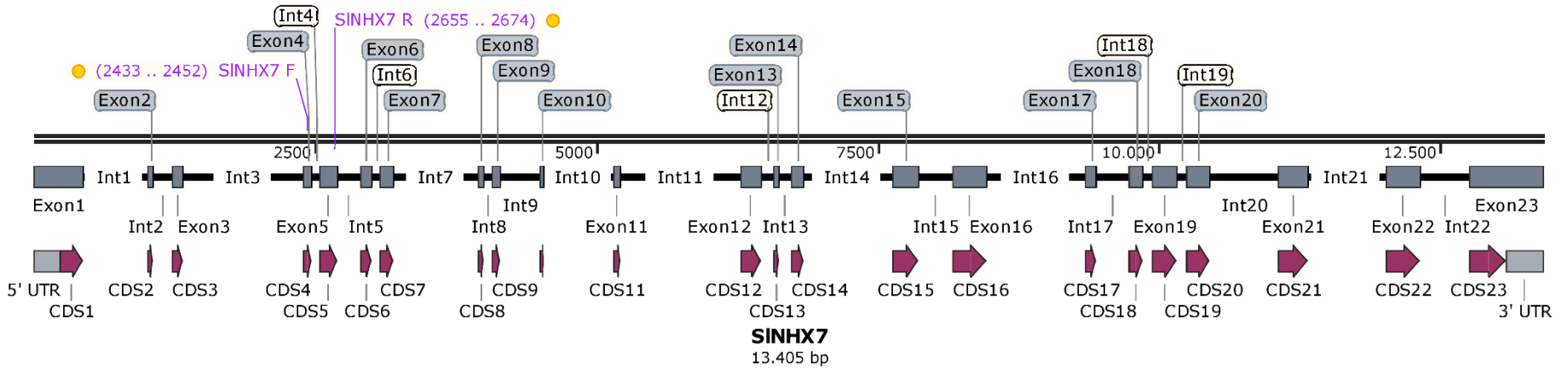
Şekil 23. *SINHX3* üyesinin gen yapısı.



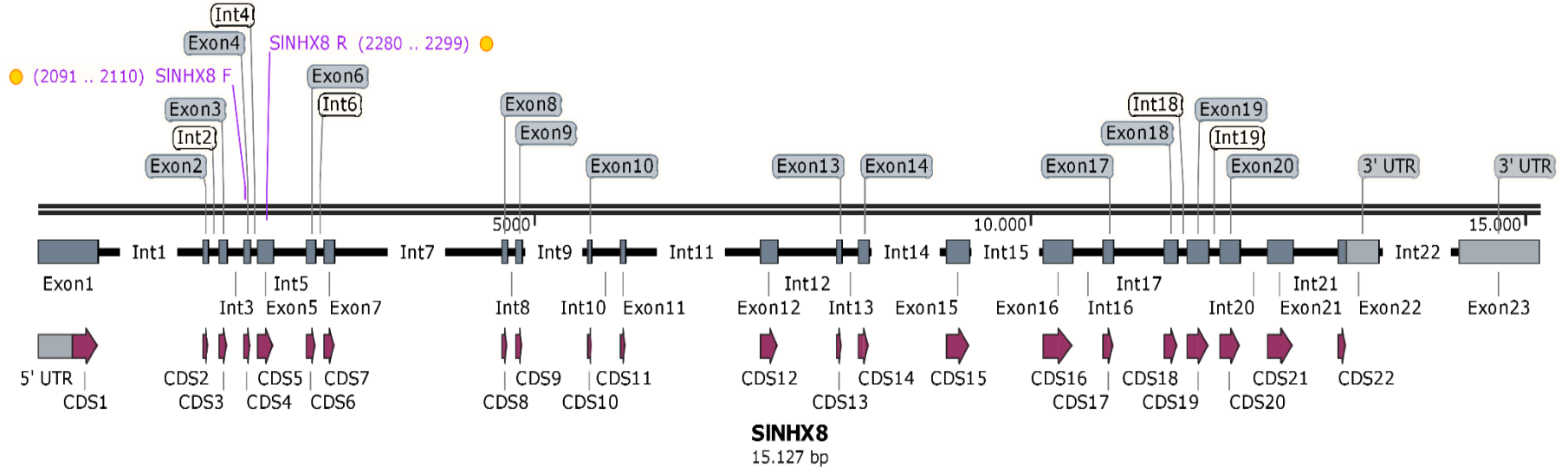
Şekil 24. *SINHX4* üyesinin gen yapısı.



Şekil 25. *SINHX6* üyesinin gen yapısı.



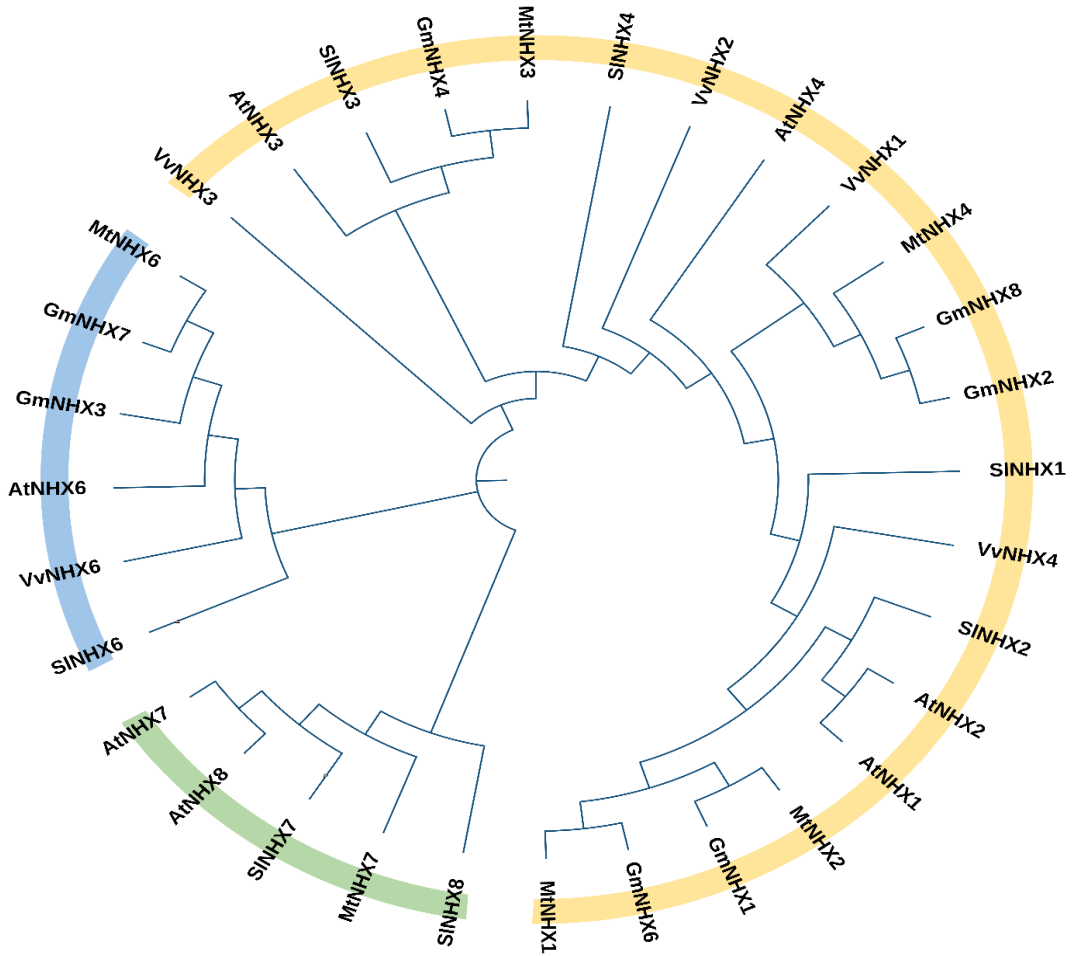
Şekil 26. *SINHX7* üyesinin gen yapısı.



Şekil 27. *SINHX8* üyesinin gen yapısı.

#### 4.1.2. Filogenetik Analiz

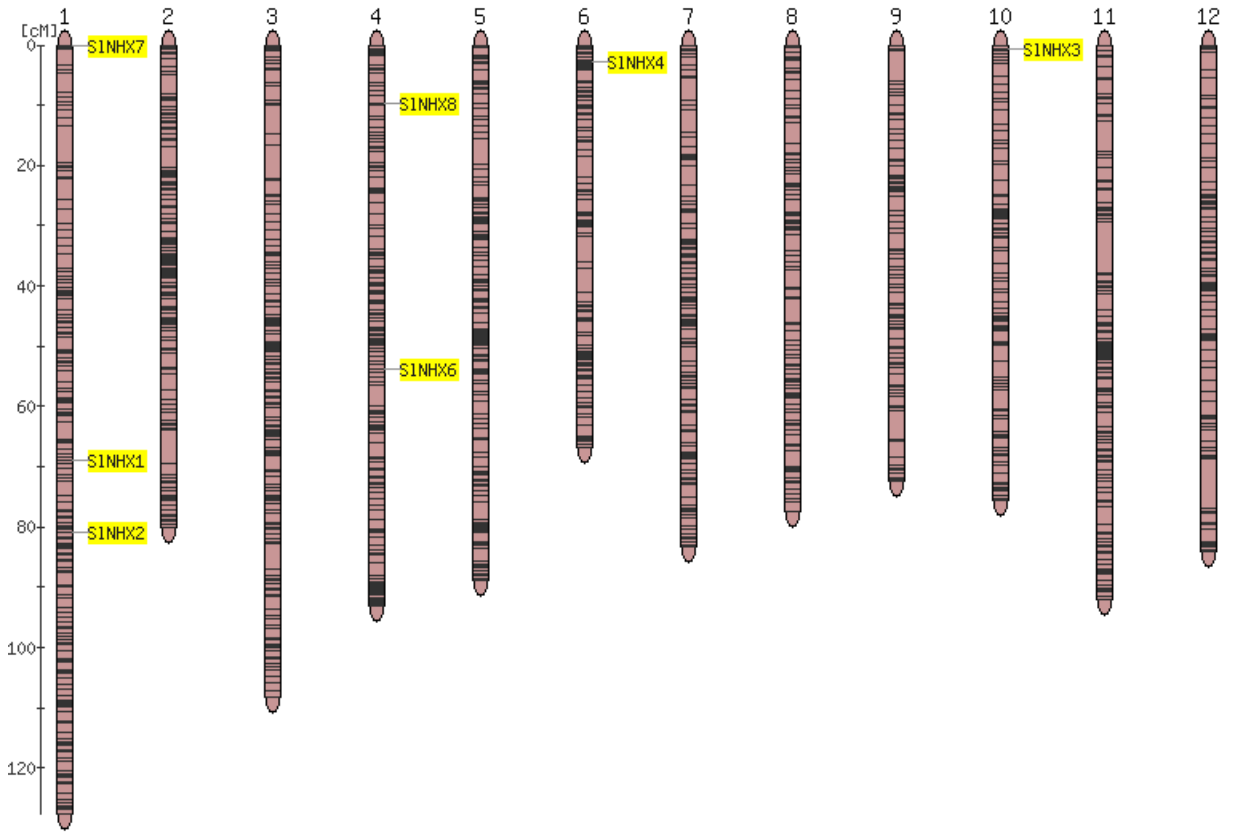
*NHX* genlerinin seçilen diğer bitki türleriyle evrimsel ilişkilerini belirlemek için, *SINHX*'ler *Arabidopsis thaliana* (*AtNHX*), *Medicago truncatula* (*MtNHX*), *Glycine max* (*GmNHX*) ve *Vitis vinifera* (*VvNHX*) türlerine ait *NHX*'ler ile karşılaştırılmıştır. Toplamda 35 gen kullanılarak, MEGA-X programında, komşu birleştirme (neighbor-joining) yöntemiyle filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Sonuçlar iTOL ile görselleştirilmiştir. Filogenetik ağacın oluşturulmasında önyükleme (Bootstrap) yöntemi ayar değeri 1000 olarak alınmış ve diğer parametreler için varsayılan değerler kullanılmıştır. Filogenetik analiz sonuçlarına göre *SINHX* genleri, *SINHX1*, -2, -3 ve -4 vakuol membranlar (Vac sınıfı) üzerinde (Aharon, vd., 2003), *SINHX6* endozomal bölge (Endo sınıfı) üzerinde (Bassil, vd., 2011) ve *SINHX7*, -8 plazma membranı (PM sınıfı) üzerinde (Shi, vd., 2000) üç farklı gruba ayrılmıştır (Şekil 28).



Şekil 28. Domates ve seçilen diğer bitki türlerine ait *NHX* üyeleri arasındaki ilişkileri temsil eden filogenetik ağaç. *Solanum lycopersicum* (*SINHX*), *Arabidopsis thaliana* (*AtNHX*), *Medicago truncatula* (*MtNHX*), *Glycine max* (*GmNHX*), *Vitis vinifera* (*VvNHX*).

### 4.1.3. *SINHX* Genlerinin Domates Kromozomlarına Dağılımı

*SINHX* genlerinin kromozom üzerindeki konum bilgisi Sol Genomics (SL 4.0 ve ITAG 4.0) veri tabanı kullanılarak elde edilmiştir. Domates genomunda tanımlanan yedi *NHX* geninin, 4 kromozom üzerine lokalize olduğu belirlenmiştir (Şekil 29). *SINHX3* geni on numaralı kromozomda, *SINHX6* ve *SINHX8* genleri dört numaralı kromozomda, *SINHX1*, -2, -7 genleri bir numaralı kromozomda iken *SINHX4* geni altı numaralı kromozomda konumlanmıştır.

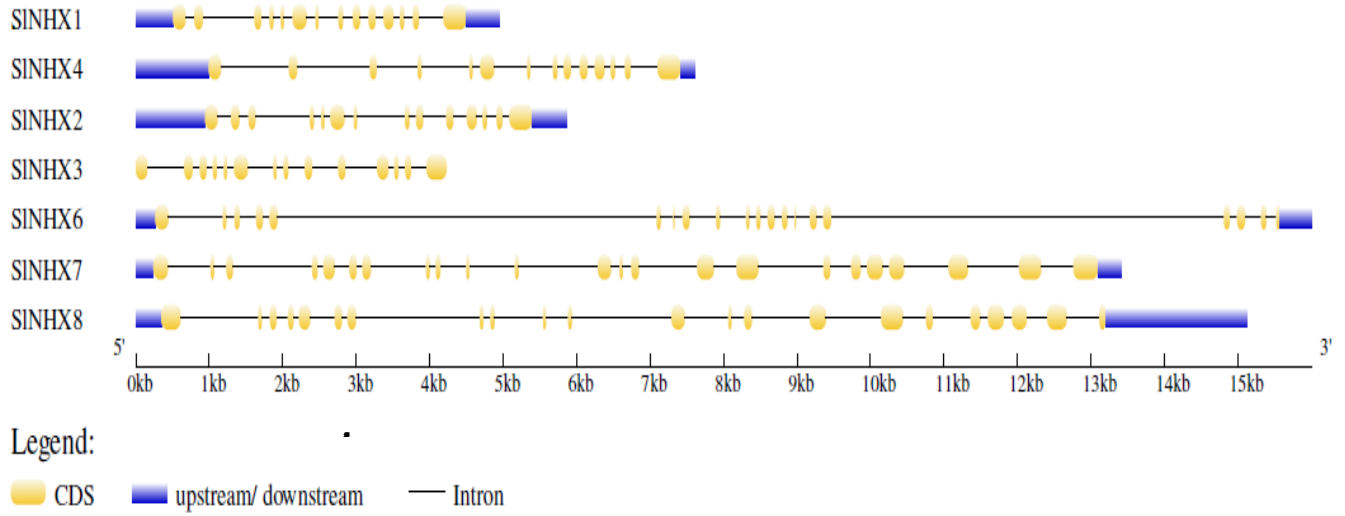


Şekil 29. *SINHX* genlerinin domates kromozomlarına dağılımları ve kromozomlar üzerindeki konumları.

### 4.1.4. *SINHX* Genlerinin Yapısal Analiz Sonuçları

*SINHX* genlerinin yapısal özelliklerini daha ayrıntılı tanımlamak ve birbirleri arasında karşılaştırmak için ekzon/intron yapıları GSDS 2.0 (Gene Structure Display Server) aracı ile analiz edilmiştir (Şekil 30). Vac sınıfı *SINHX1*, -2, -3, -4 genlerinde 14 ekzon, 13 intron, Endo sınıfı *SINHX6* geninde 22 ekzon, 21 intron ve PM sınıfı *SINHX7*, -8 genlerinde sırasıyla 23 ekzon, 22 intron, 22 ekzon, 21 intron bulunmaktadır. *SINHX* genleri arasındaki

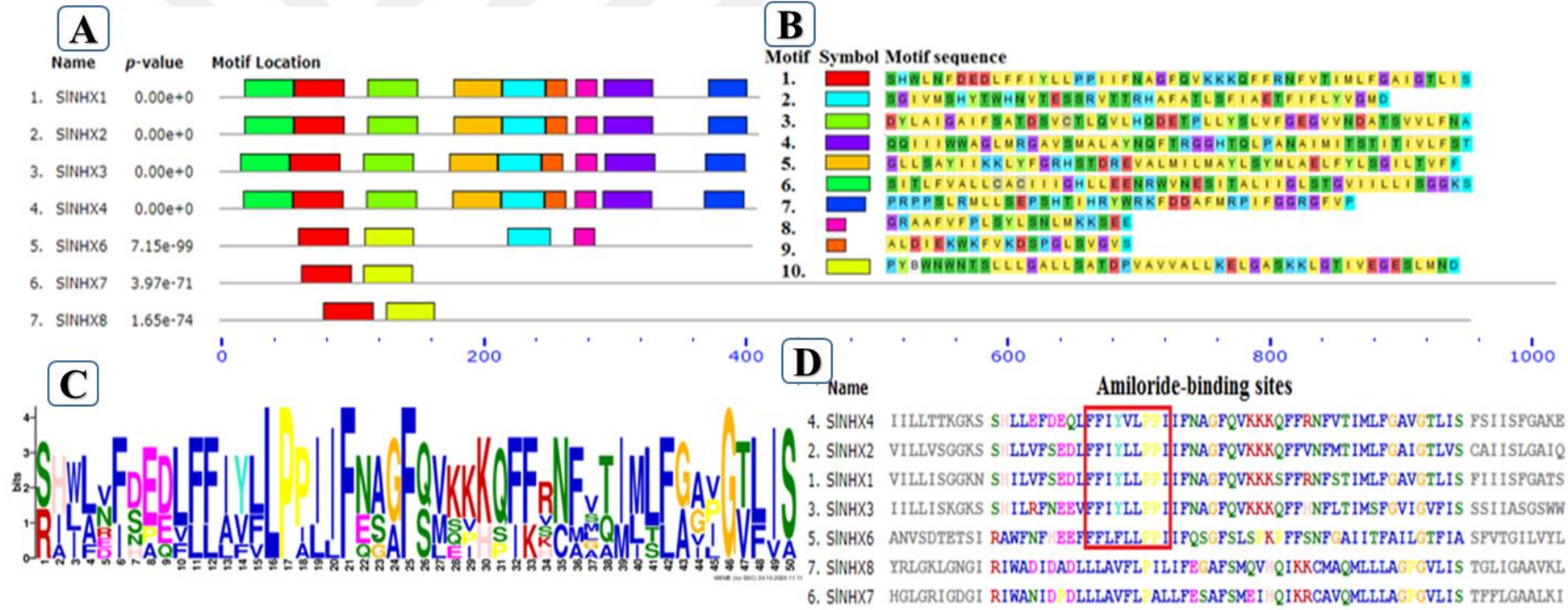
en büyük genomik sekans uzunluğuna 15997 bç ile *SINHX6* sahipken, en kısa genomik sekans uzunluğuna 4232 bç ile *SINHX3* sahiptir (Şekil 30).



Şekil 30. *Solanum lycopersicum*'da tanımlanan *NHX* ailesi üyelerinin gen yapısı. Ekzon yapıları sarı renkli kutularla ifade edilirken, intron yapıları siyah çizgilerle gösterilmiştir.

#### 4.1.5. *SINHX* Genlerinin Korunan Motif Analizi

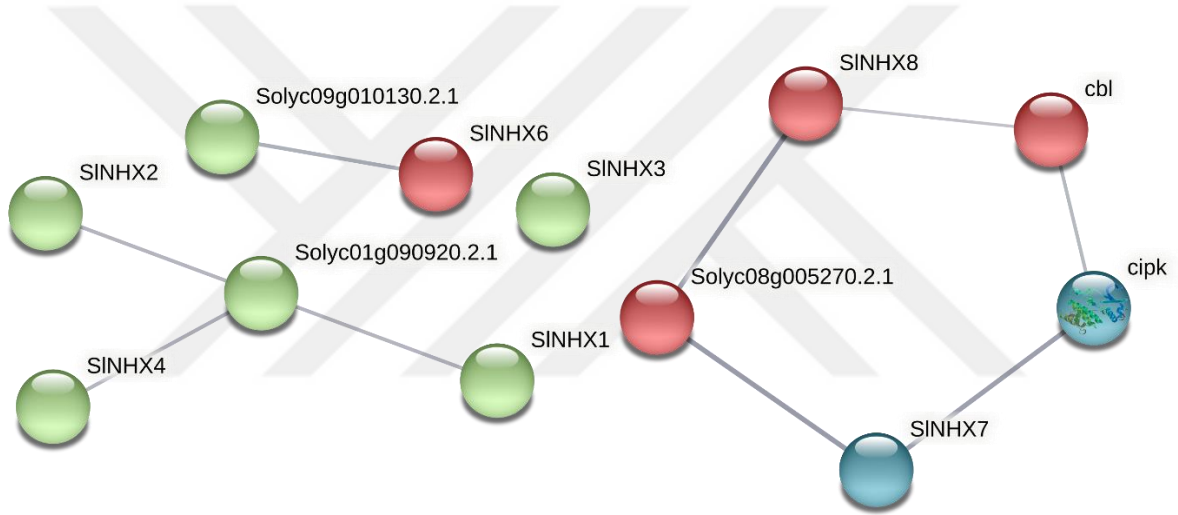
*SINHX* genlerinin olası korunmuş motiflerini incelemek için MEME (Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation) aracı kullanılmış ve korunmuş motifler farklı renklerle gösterilmiştir (Şekil 31). Analiz sonuçları, *SINHX* ailesi üyelerinde toplamda korunmuş 10 motifin var olduğunu ve bu korunmuş motiflerin 21 ila 50 amino asit uzunluğu arasında değiştiğini göstermiştir (Şekil 31 A-B). Motif 1 tüm *SINHX* üyelerinde bulunurken, Motif 2, -3, -4, -5, -6, -7, -9 numaralı korunmuş motifler *SINHX1*, -2, -3, -4 üyelerinde tespit edilmiştir (Şekil 31 A-C). Buna ek olarak, Motif 10 *SINHX6*, -7, -8 üyelerinde bulunurken, Motif 8 *SINHX7* ve *SINHX8* haricinde diğer tüm üyelerde belirlenmiştir. Amilorid bağlanma bölgesi [FFIYLLPPI] *SINHX1-2-3*'te tamamen korunurken, *SINHX4* ve *SINHX6*'da yüksek oranda korunmuştur. Buna ek olarak, *SINHX7* ve *SINHX8* üyeleri amilorid bağlanma bölgesine sahip değildir (Şekil 31D).



Şekil 31. *SINHX* genlerine ait amino asit sekanslarının korunmuş motiflerin analizi. A: *SINHX*'lerin korunmuş motifleri. B: On motif farklı renklerle belirtilmiştir. C: Motif 1 (kırmızı renk) tüm *SINHX*'lerde korunmuştur. D: *SINHX*'lerin amilorid bağlama bölgesi.

#### 4.1.6. SINHX Proteinlerinin Protein-Protein Etkileşim Tahmin Sonuçları

SINHX proteinlerinin protein-protein etkileşimi (PPI, Protein Protein Interaction), STRING veritabanı tarafından tahmin edilmiştir. SINHX7 ve SINHX8 proteinlerinin varsayımsal olarak protein kinazlar (CIPK) ile etkileşime girdiği tespit edilmiştir (Şekil 32). SOS (Salt Overly Sensitive) sinyal yolağı, SOS1(NHX7), SOS2 (CIPK24) ve SOS3 (CBL4) proteinlerinden oluşmaktadır. Bu sinyal yolağında *CIPK24* (Calcineurin B-like interacting serine/threonine-protein kinase 24) geninin, *CBL4* (Calcineurin B-like) ile etkileşime girdiği ve kinazı plazma membranına yönlendirerek plazma membranında lokalize  $Na^+/H^+$  antiporter'ı (NHX7/*SOS1*) tuz toleransını teşvik etmek için etkinleştirdiği bildirilmiştir (Batelli, vd., 2007).

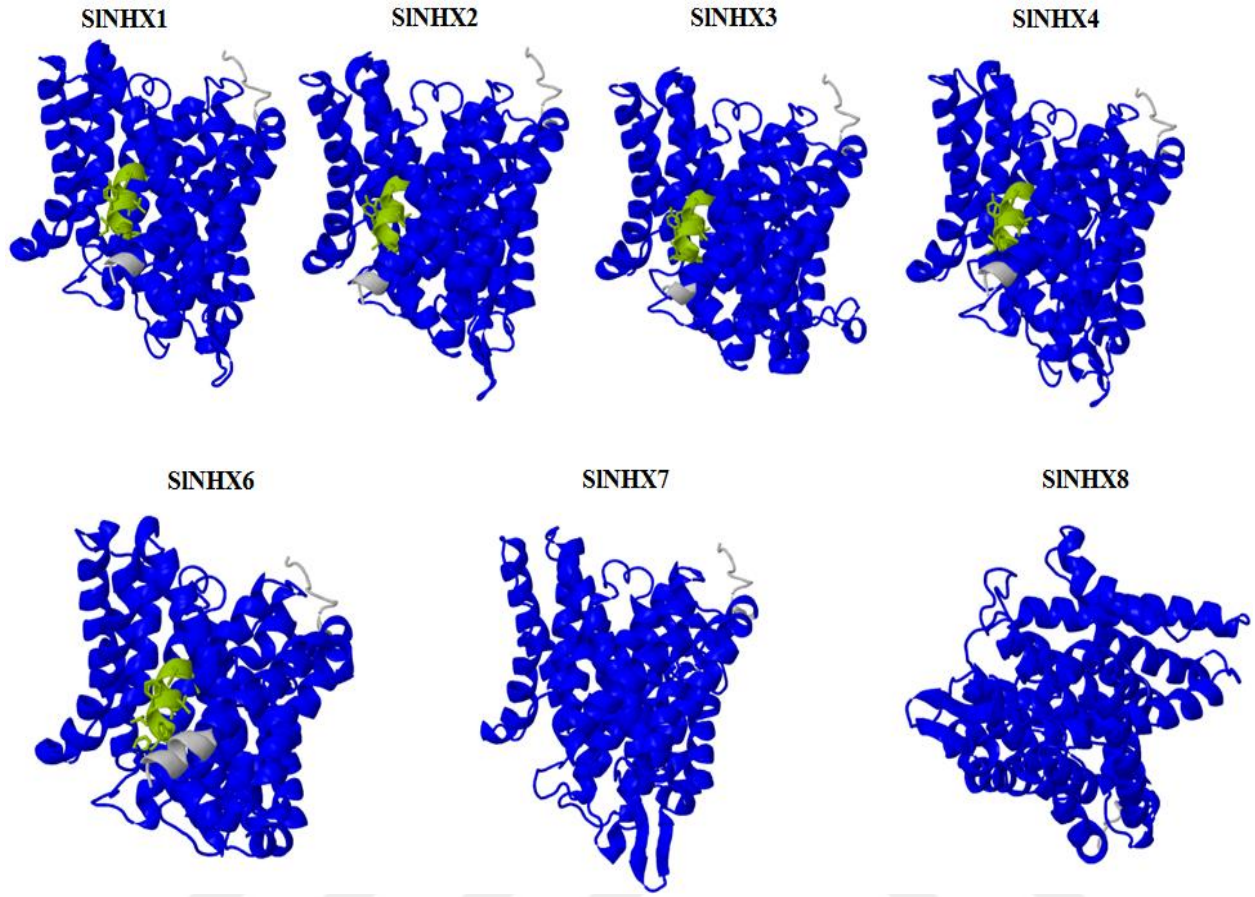


Şekil 32. SINHX ailesi üyelerinin protein-protein etkileşim (PPI) ağı.

#### 4.1.7. SINHX Proteinlerinin Üç Boyutlu (3D) Yapısal Tahmin Sonuçları

SINHX proteinlerinin tahmini 3D modellenmiş protein yapıları ePlant-BAR aracı kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 33). Amilorid bağlanma bölgesi, SINHX7 ve SINHX8 proteinleri haricindeki diğer tüm SINHX üyelerinde tam veya yüksek korunumlu şekilde bulunmaktadır.





Şekil 33. SINHX proteinlerinin tahmini 3D yapıları. Yapılan 3D modellemede  $\alpha$ -helix yapısındaki lacivert renkli kısımlar  $Na^+/H^+$  antiporter domainlerini temsil ederken, yeşil renkli domainler amilorid bağlanma bölgelerini ifade etmektedir.

## 4.2. Moleküler Analizler

### 4.2.1. *EXPRESSED* ve *SINHX* Genlerinin PCR Testleri

#### Genomik DNA Testi

*SINHX* genlerine ait primerlerin özgünlüğü gDNA örnekleri kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar *SINHX3* dışında diğer *SINHX* üyelerine ait primerlerin gene özgü amplifikasyonlar sergilediklerini ve 55 °C'nin optimum bağlanma sıcaklığı olarak kullanılabilceğini göstermiştir (Şekil 15). *SINHX3* dışında diğer üyelere ait primerlerin oluşturdukları moleküler büyüklükler ile Tablo 9'da sunulan gDNA ürün boyutları değerlerinin birbirleriyle tutarlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SnapGene programı aracılığıyla *EXPRESSED* ve *SINHX* genlerinin gDNA sekansları kullanılarak %2.5'lik agaroz jelde *in silico* analizi de gerçekleştirilmiştir (Şekil 16).

*SINHX3* genine ait PCR sonuçlarında hedef ürün ile birlikte spesifik olmayan amplifikasyonların da var olduğu tespit edilmiştir. Bu hedef dışı amplifikasyonlardan dolayı *SINHX3* genine ait primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları Gradient PCR kullanılarak dört farklı sıcaklık (56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C) ile test edilmiştir. Sonuçlar dört farklı sıcaklığın da *SINHX3* genine özgü amplifikasyonlar sergilediğini ve bu sıcaklıkların *SINHX3* için optimum bağlanma sıcaklığı olarak kullanılabilceğini göstermiştir (Şekil 17).

#### Total RNA Testi

NaCl şoku stresinin 0 (kontrol), 6, 12 ve 24. saat zaman aralıklarında toplanan açık çiçek dokularına ait total RNA molekülleri %2'lik agaroz jel üzerinde görselleştirilerek varlıkları teyit edilmiştir (Şekil 13).

#### cDNA Testi

NaCl şoku stresinin 0 (kontrol), 6, 12 ve 24. saat zaman aralıklarında toplanan açık çiçek dokularına ait cDNA örnekleri *EXPRESSED* genine ait primerler kullanılarak test edilmiştir. PCR sonuçları, *EXPRESSED* genine ait primerlerin oluşturduğu moleküler büyüklüklerin Tablo 9'da sunulan cDNA ürün boyutu değerleri ile tutarlı olduğunu göstermiştir (Şekil 20). Ayrıca %2.5'lik agaroz jel görüntüsü cDNA örneklerinin gDNA ile kontimine olmadığını da ortaya koymuştur (Şekil 20).

#### 4.2.2. Total RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Domates açık çiçek dokularından izole edilen total RNA'ların konsantrasyonlarını belirlemek için "Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers" cihazı kullanılmıştır. Açık çiçek örneklerine ait total RNA'ların  $A_{260}/A_{280}$  ile  $A_{260}/A_{230}$  absorbans değerlerinin saflık oranları ve konsantrasyonları (ng/ $\mu$ l) Tablo 16'da sunulmuştur.

Tablo 16

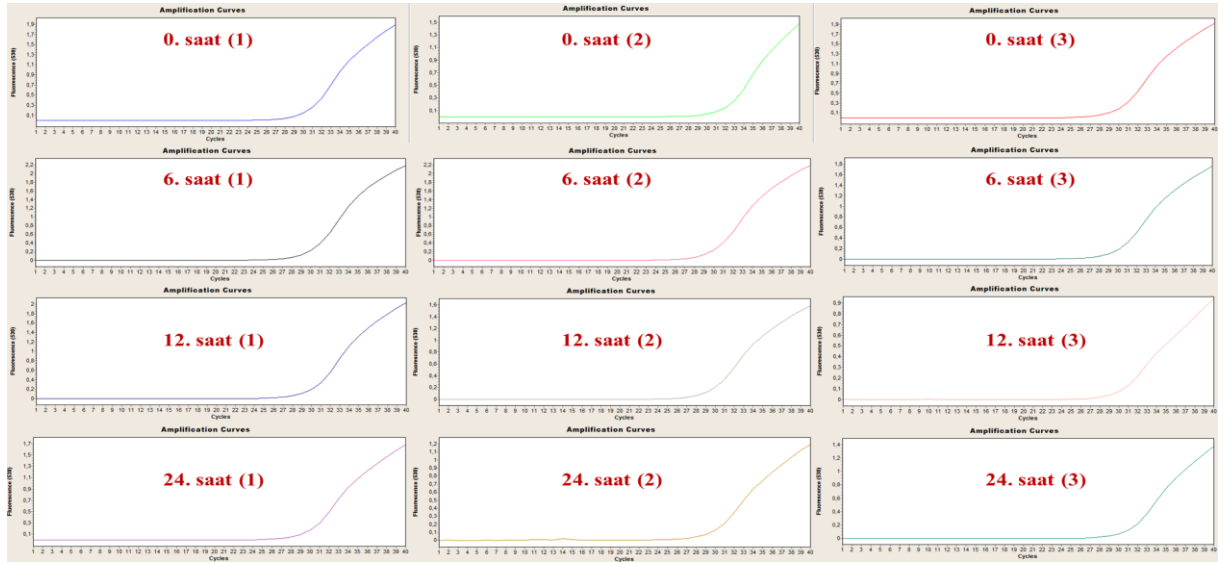
Açık çiçek dokularına ait total RNA'ların absorbans saflık oranları ve konsantrasyon değerleri.

Doku	Konsantrasyon		Konsantrasyon		Ortalama
	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	-1 (ng/ $\mu$ l)	-2 (ng/ $\mu$ l)	Konsantrasyon (ng/ $\mu$ l)
Açık Çiçek					
Kontrol-1	2,37	-6,43	241,7	251,2	<b>246</b>
Kontrol-2	2,39	-2,28	196,7	273,5	<b>235</b>
Kontrol-3	2,22	2,54	941,3	874,9	<b>908</b>
6.saat-1	2,38	-2,02	182,2	178,8	<b>181</b>
6.saat-2	2,40	-2,21	190,6	196,0	<b>193</b>
6.saat-3	2,34	-3,32	236,2	236,7	<b>236</b>
12.saat-1	2,26	1,91	449,3	451,8	<b>451</b>
12.saat-2	2,39	-2,46	197,0	194,8	<b>196</b>
12.saat-3	2,33	-5,68	283,5	281,7	<b>283</b>
24.saat-1	2,29	11,78	408,3	407,7	<b>408</b>
24.saat-2	2,20	5,93	587,5	589,0	<b>588</b>
24.saat-3	2,25	6,91	608,3	617,6	<b>613</b>

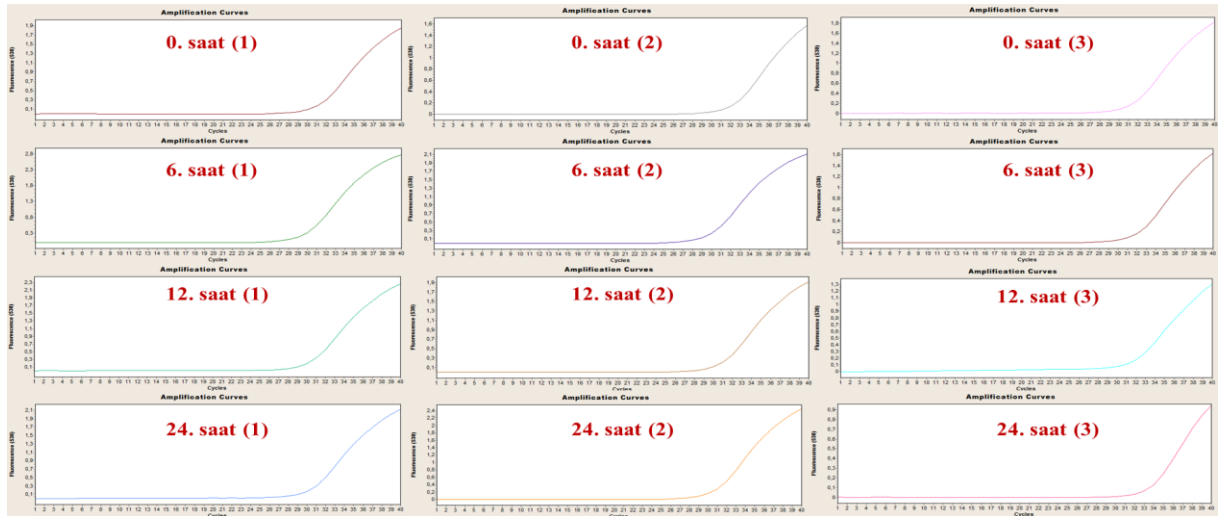
### 4.2.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (RT-qPCR) ile Gen İfade Analizleri

#### Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Reaksiyonlarına ait Amplifikasyon ve Erime Eğrileri

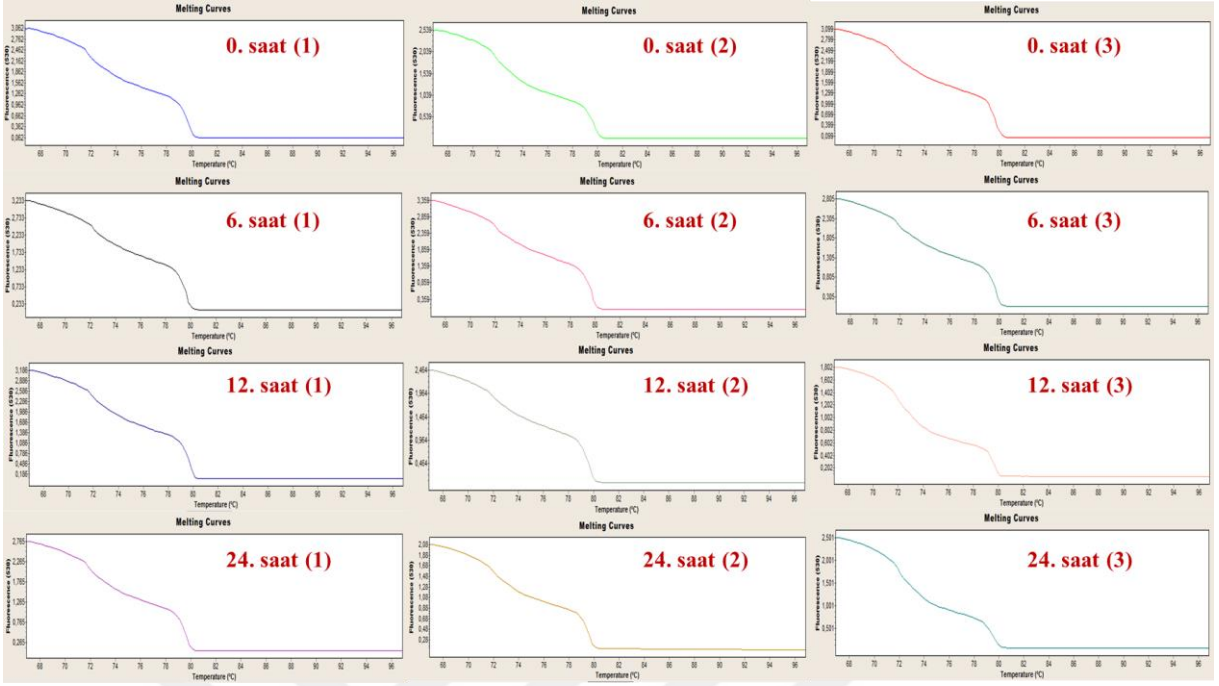
*EXPRESSED* ve domates genomunda tanımlanan *SINHX* genlerinin, NaCl şoku stresinin 0. saat (kontrol), 6. saat, 12. saat ve 24. saatlerinde alınan açık çiçek dokularına ait nükleik asit örneklerinin amplifikasyon (amplification curve) ve RT-qPCR reaksiyonlarında primer-dimer gibi hataların kontrol edilmesine olanak sağlayarak reaksiyonların spesifikliğini gösteren erime eğrisi (melting curve) grafikleri aşağıda sunulmuştur (Şekil 34-57). Her örnek için 3 biyolojik tekrar uygulanmıştır.



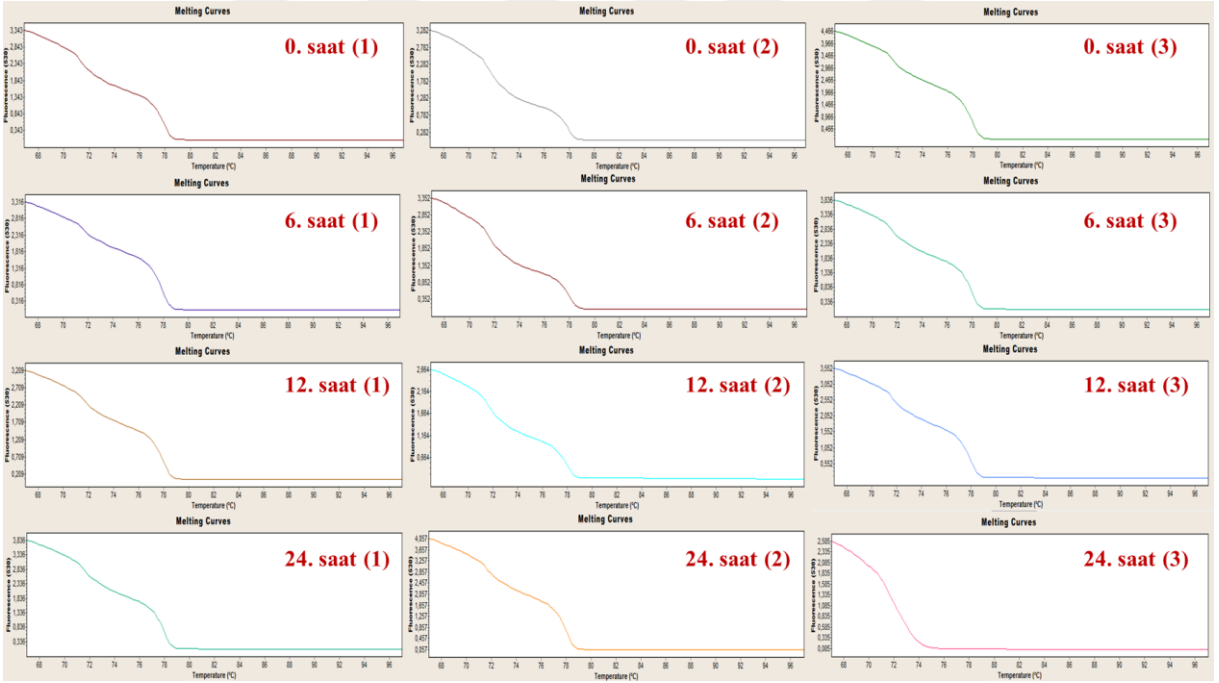
Şekil 34. *SINHX1* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait amplifikasyon eğrileri.



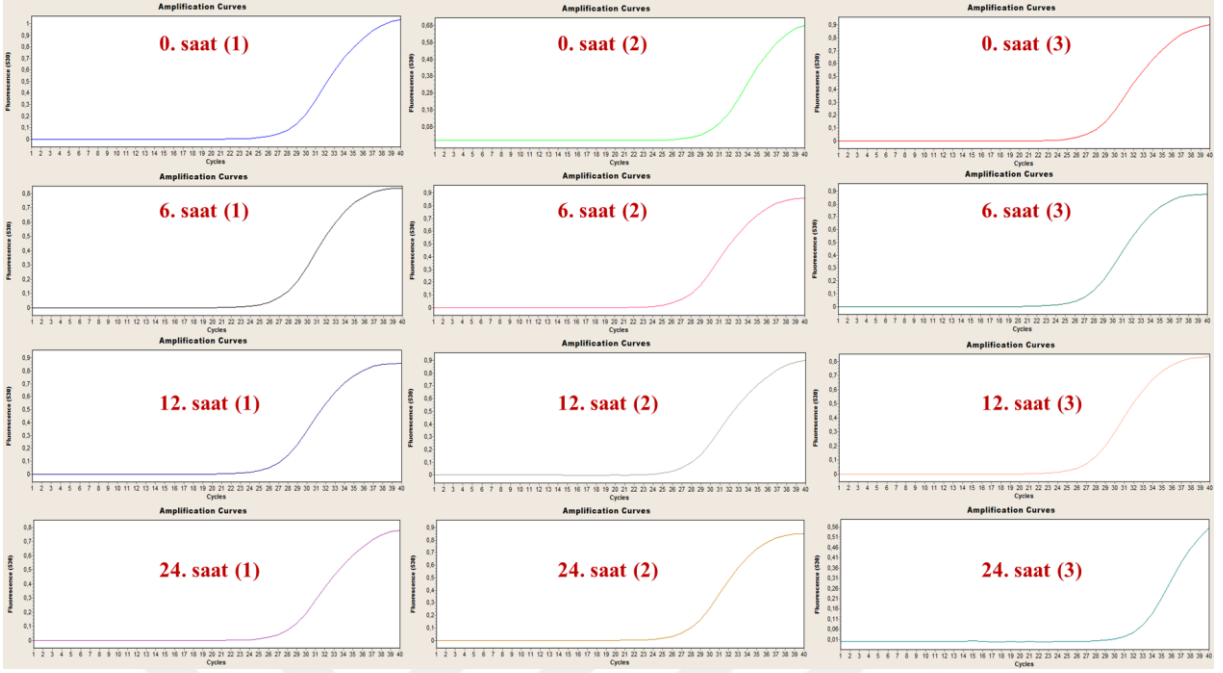
Şekil 35. *SINHX1* genine ait amplifikasyon eğrileri.



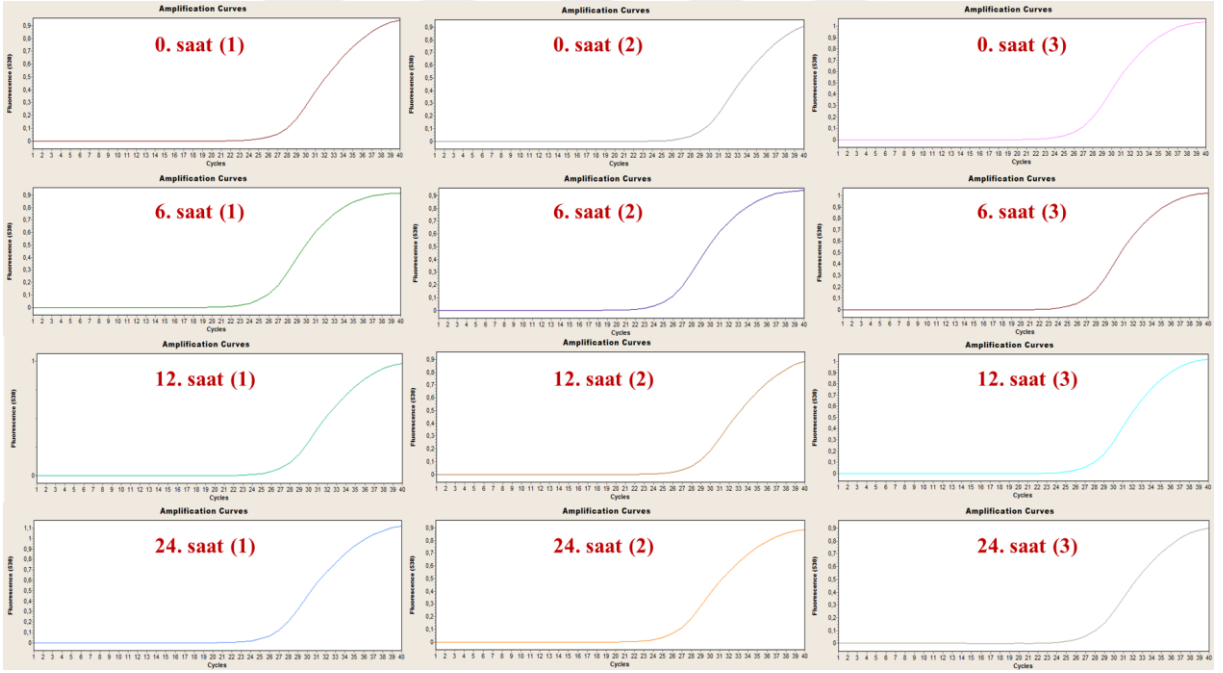
Şekil 36. *SINHX1* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait erime eğrileri.



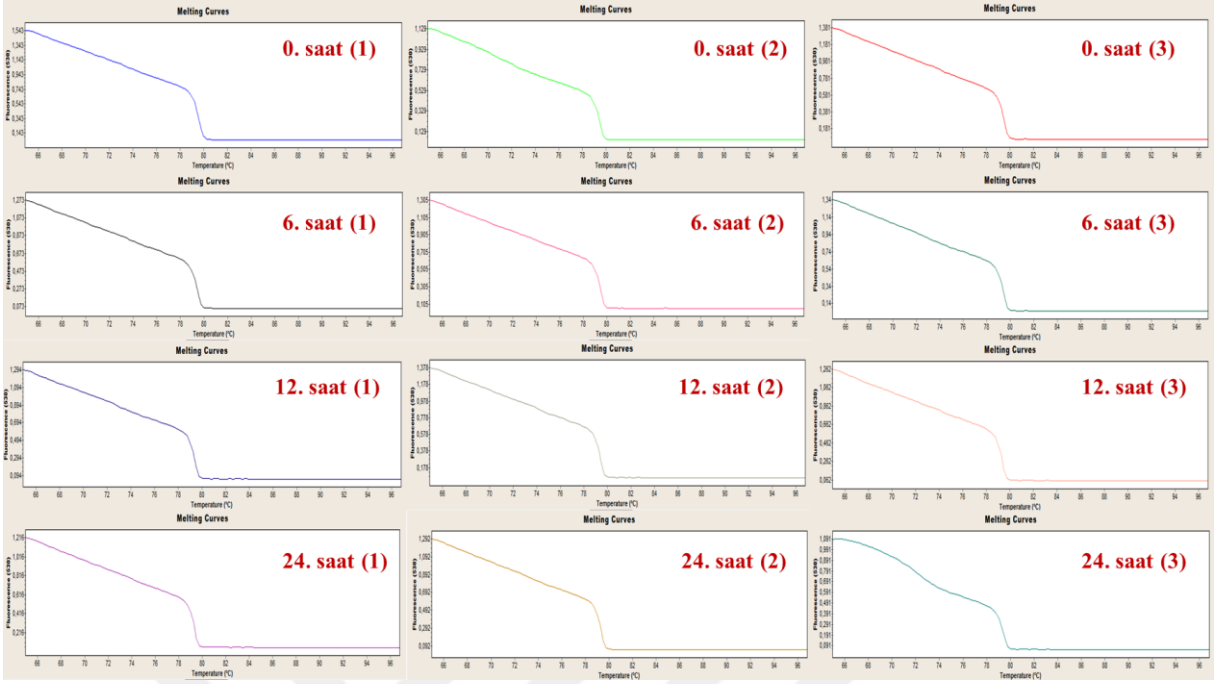
Şekil 37. *SINHX1* genine ait erime eğrileri.



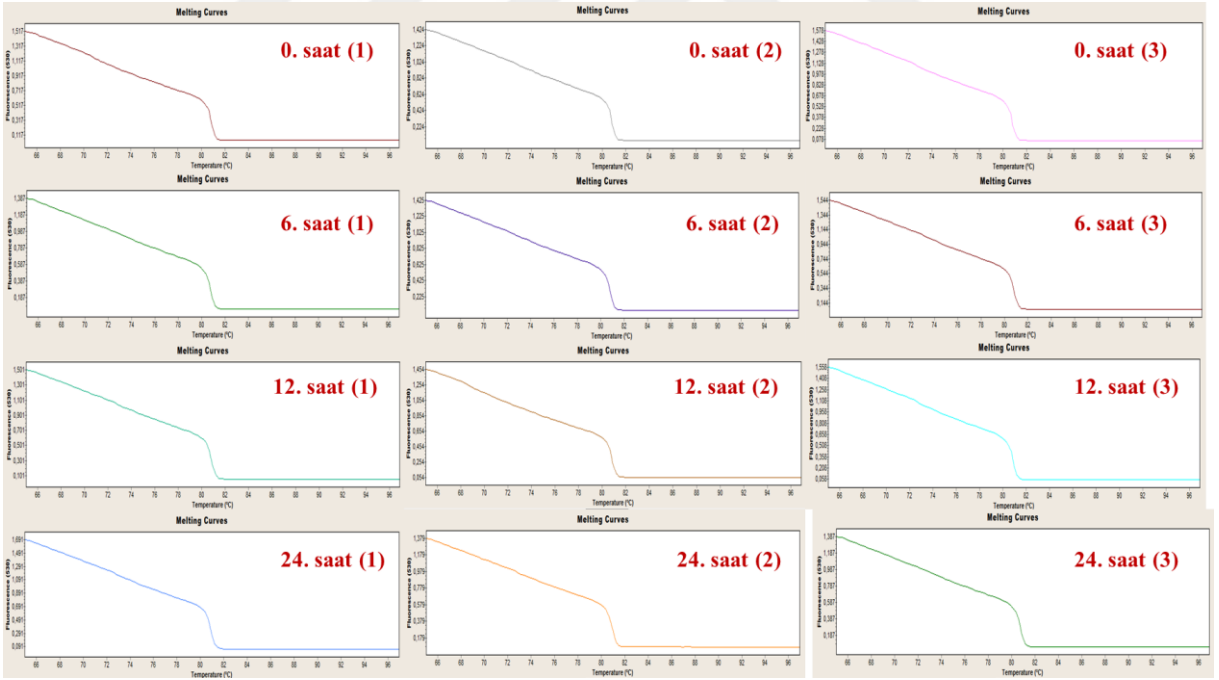
Şekil 38. *SINHX2* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait amplifikasyon eğrileri.



Şekil 39. *SINHX2* genine ait amplifikasyon eğrileri.

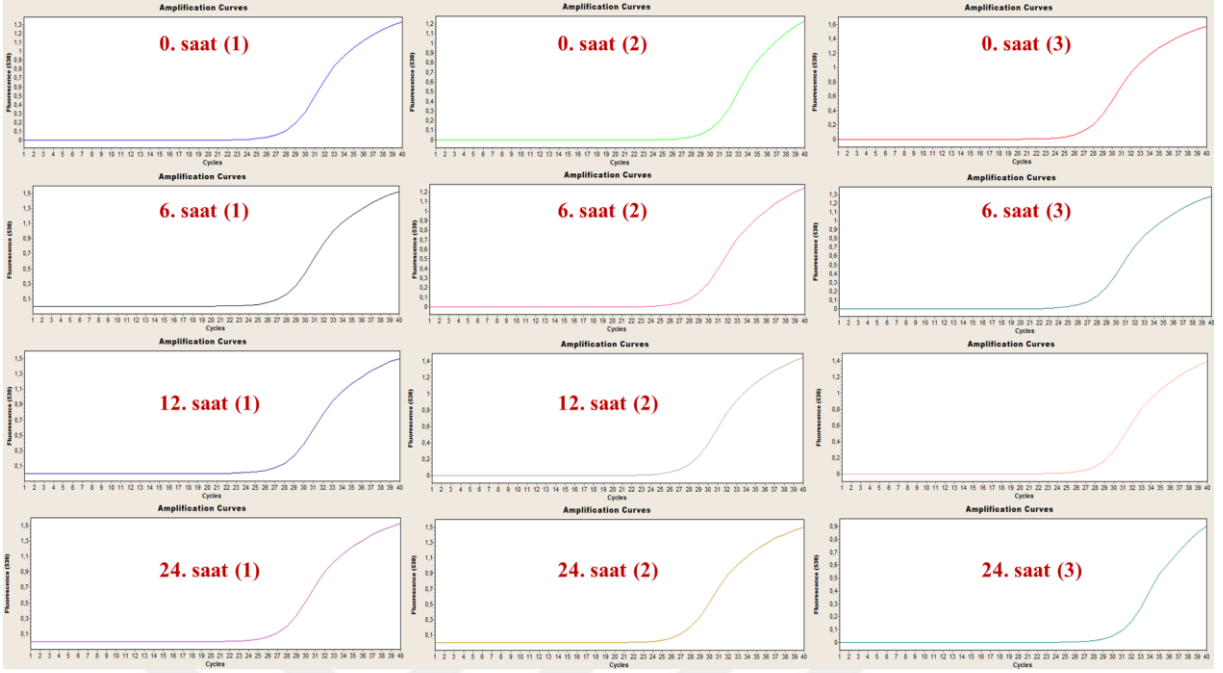


Şekil 40. *SINHX2* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait erime eğrileri.

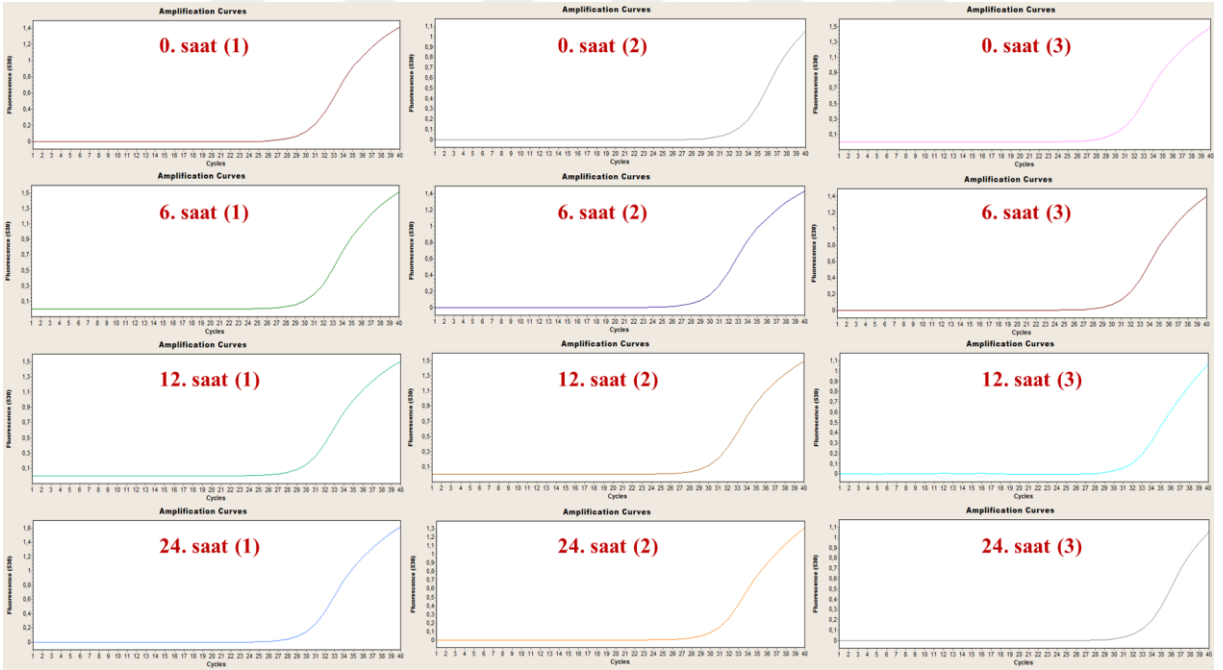


Şekil 41. *SINHX2* genine ait amplifikasyon eğrileri.



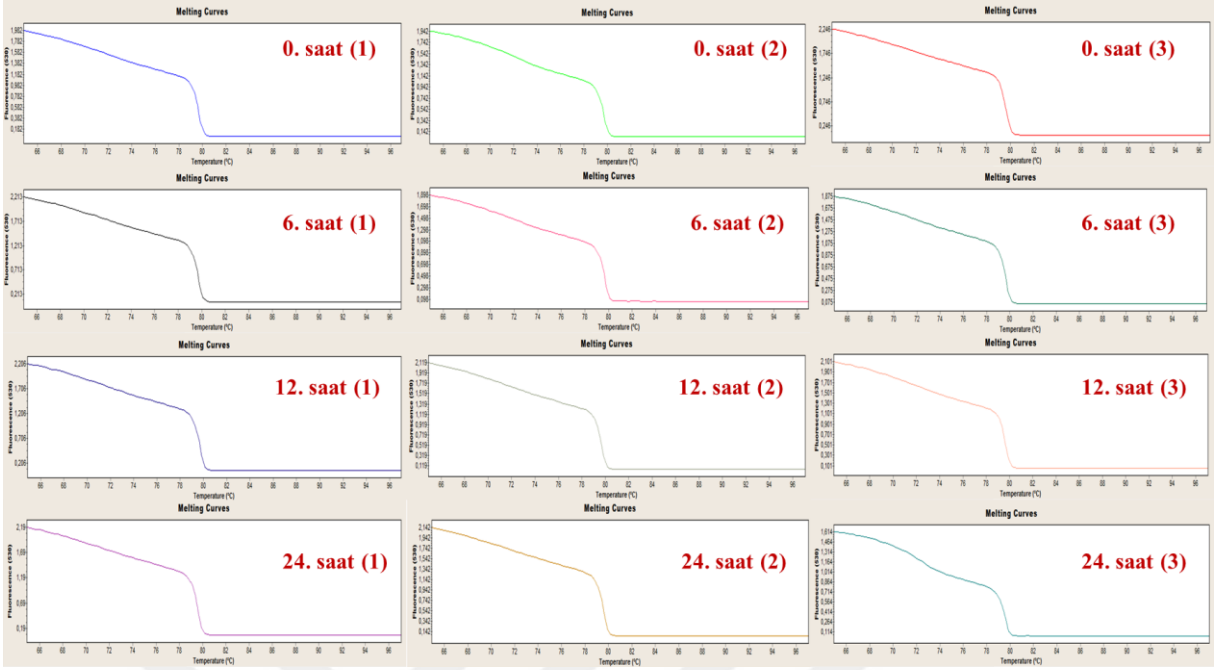


Şekil 42. *SINHX4* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait amplifikasyon eğrileri.

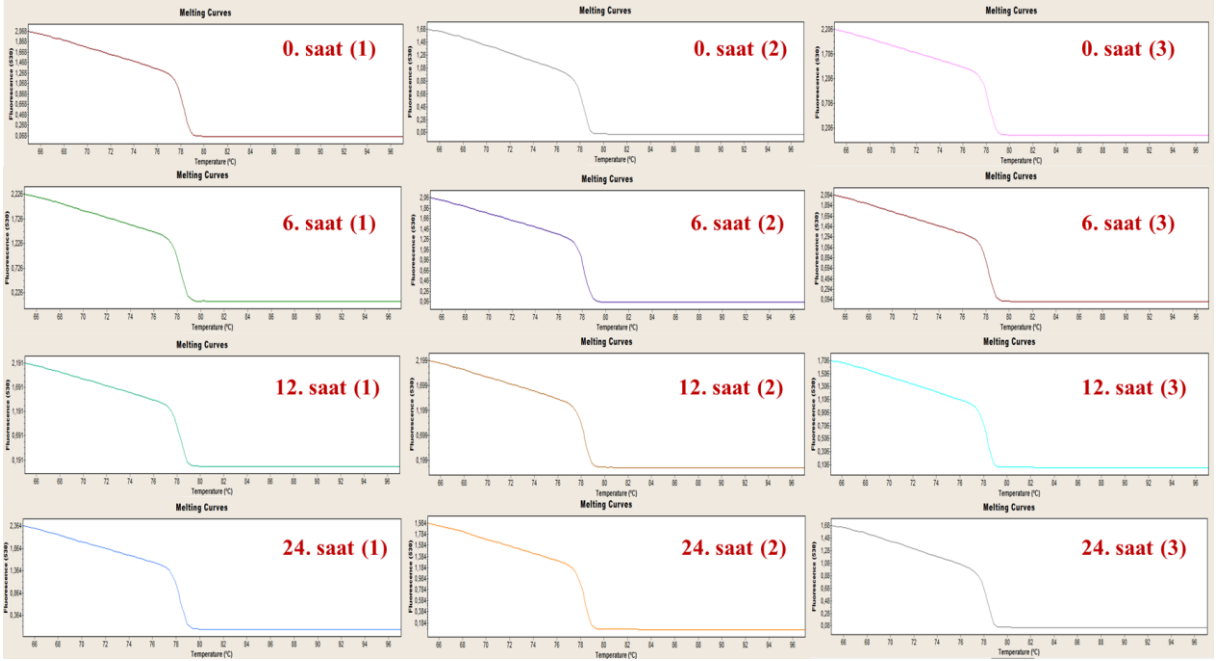


Şekil 43. *SINHX4* genine ait amplifikasyon eğrileri.

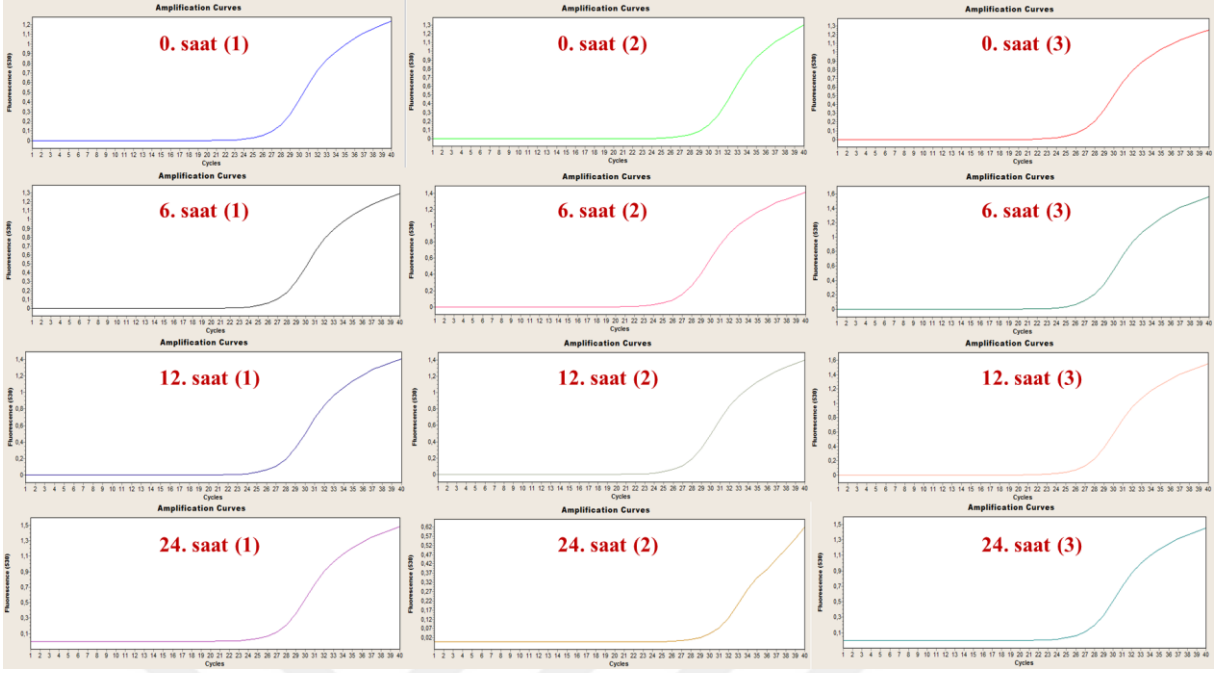




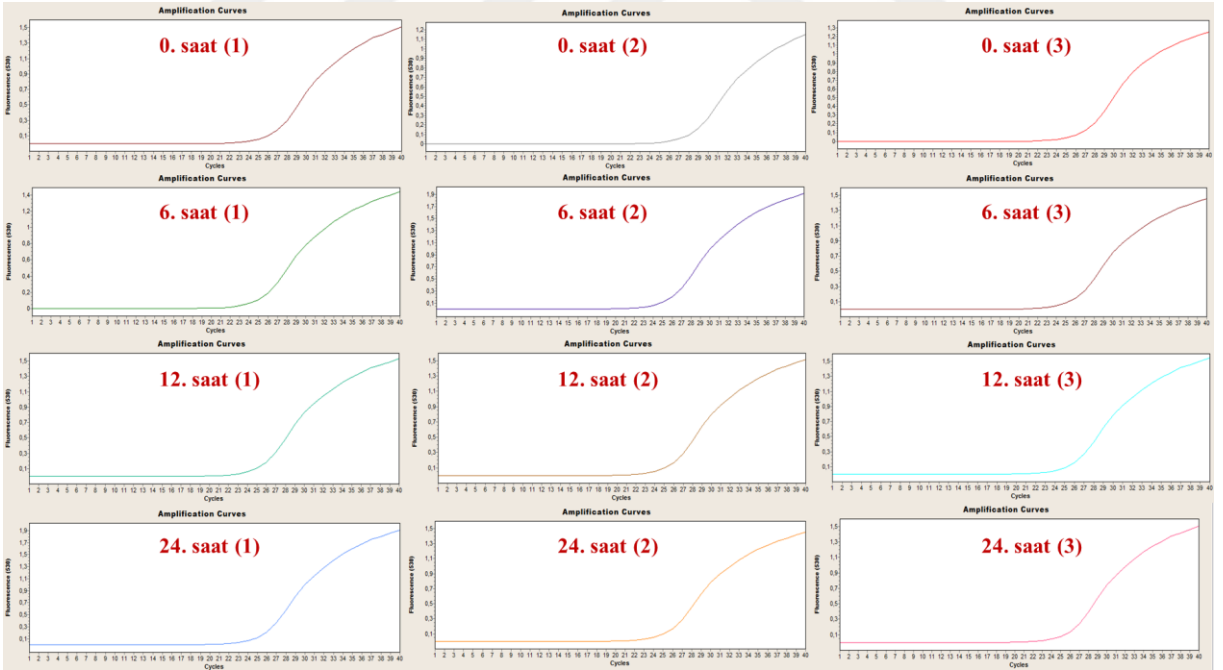
Şekil 44. *SINHX4* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait erime eğrileri.



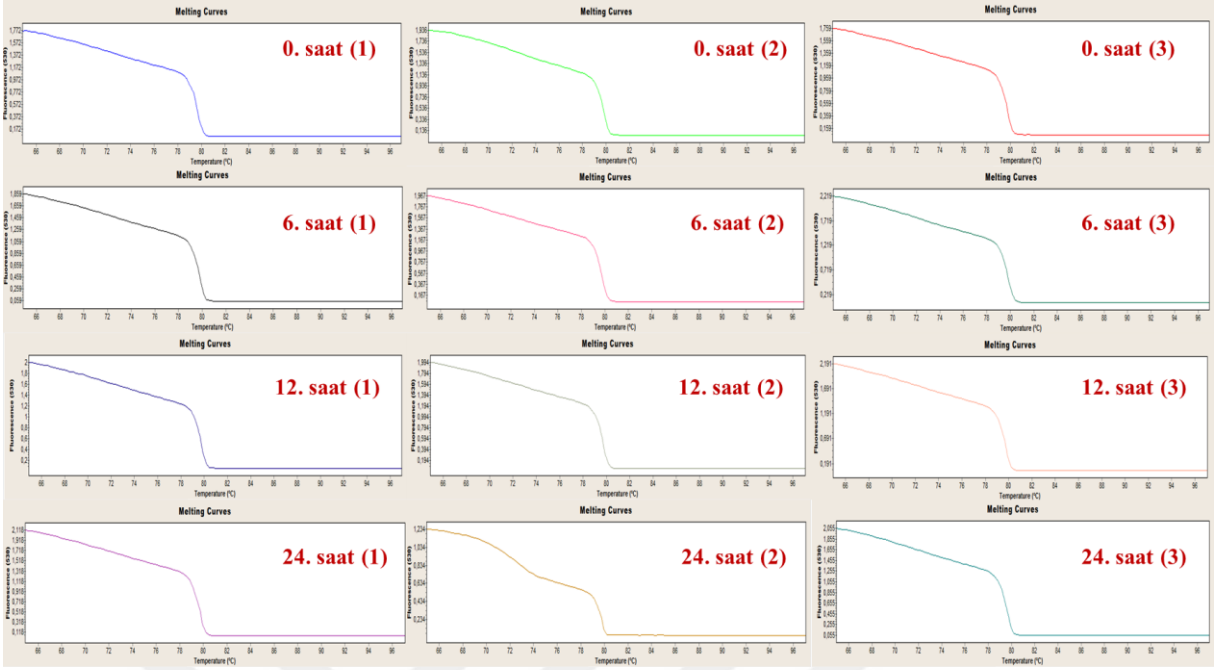
Şekil 45. *SINHX4* genine ait erime eğrileri.



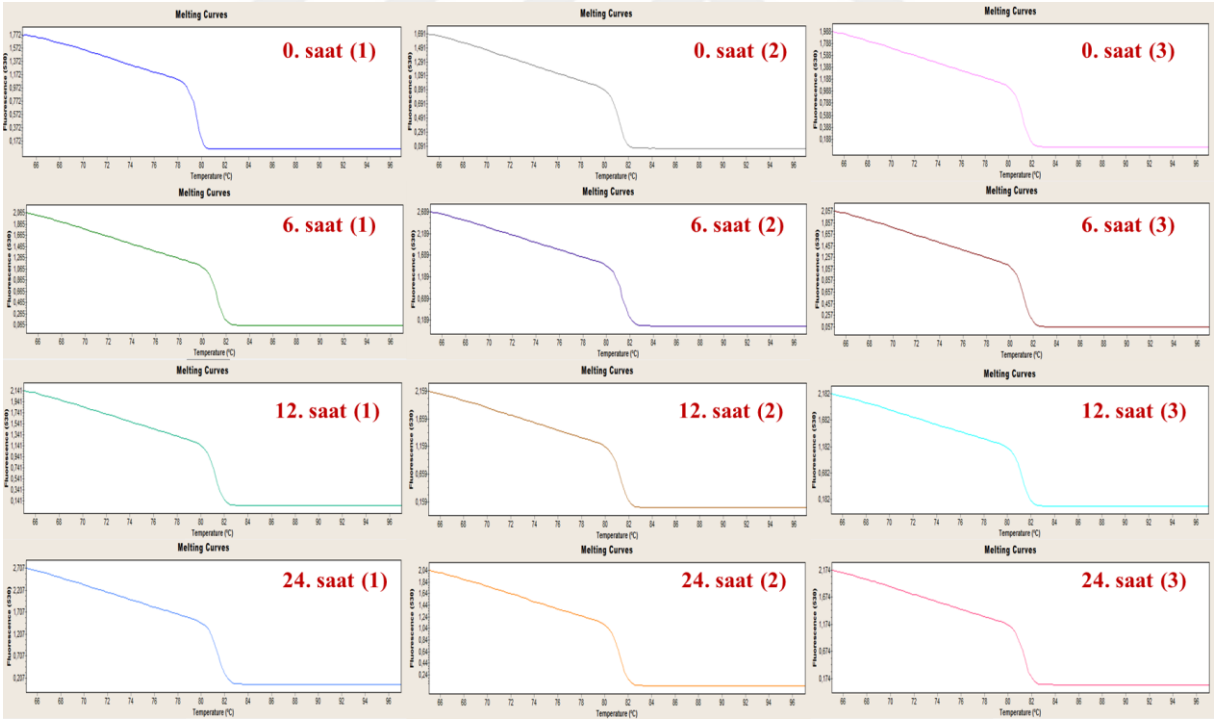
Şekil 46. *SINHX6* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait amplifikasyon eğrileri.



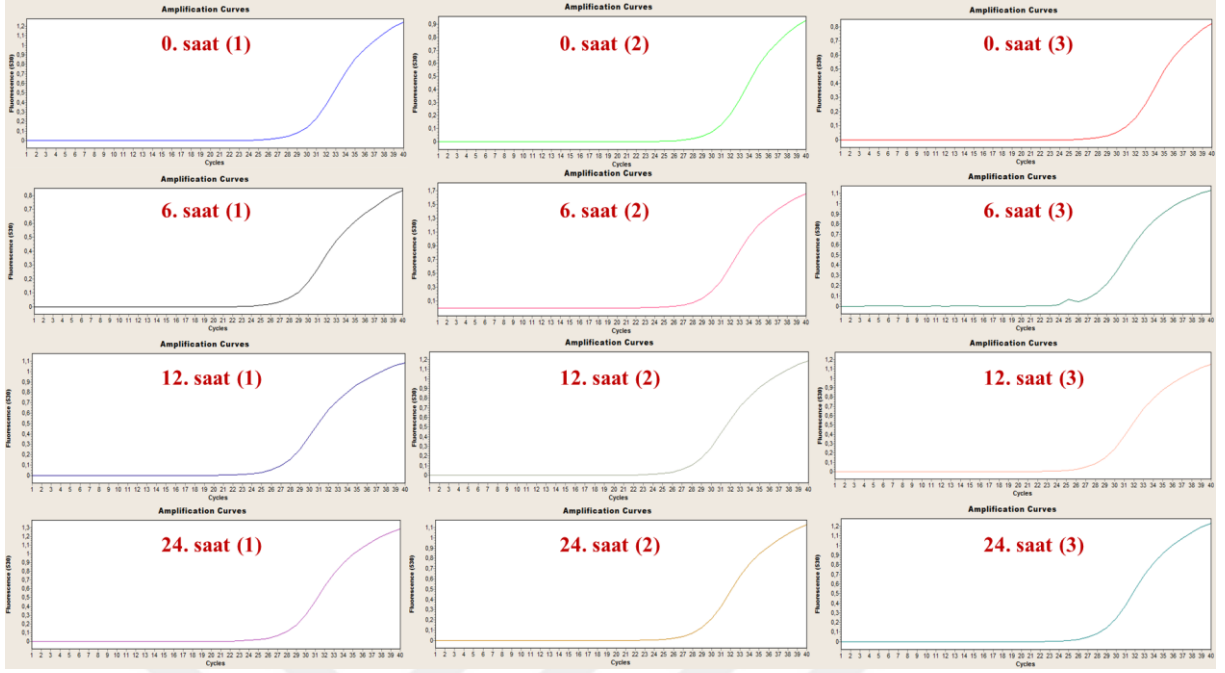
Şekil 47. *SINHX6* genine ait amplifikasyon eğrileri.



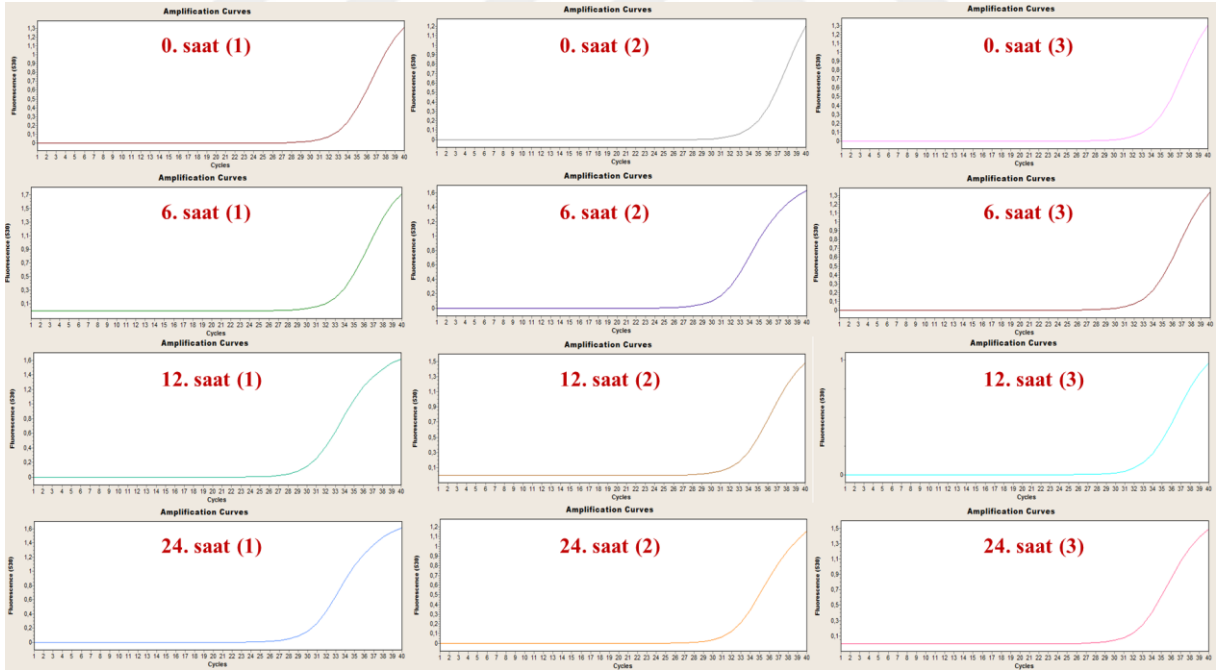
Şekil 48. *SINHX6* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait erime eğrileri.



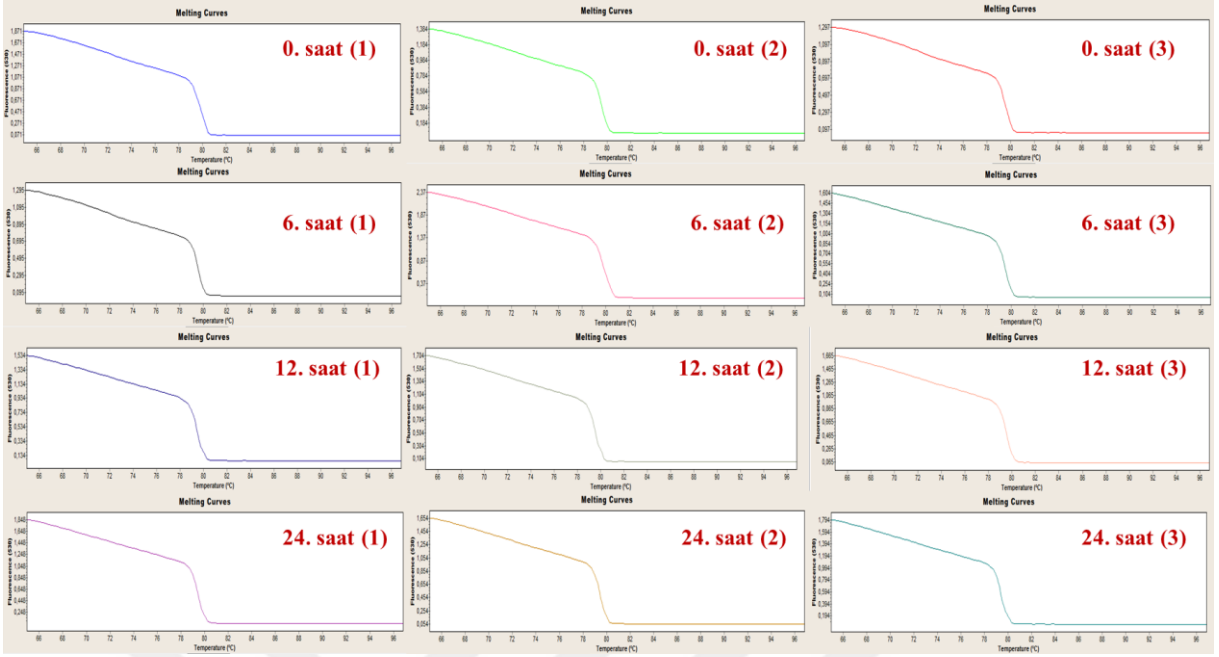
Şekil 49. *SINHX6* genine ait erime eğrileri.



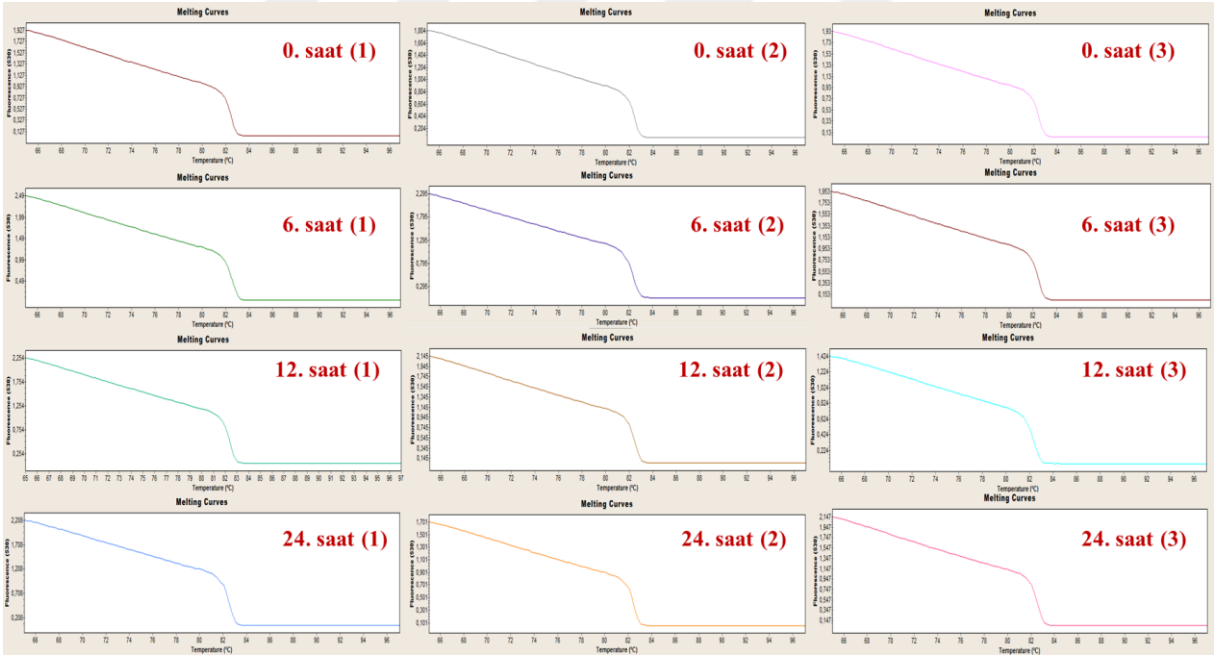
Şekil 50. *SINHX7* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait amplifikasyon eğrileri.



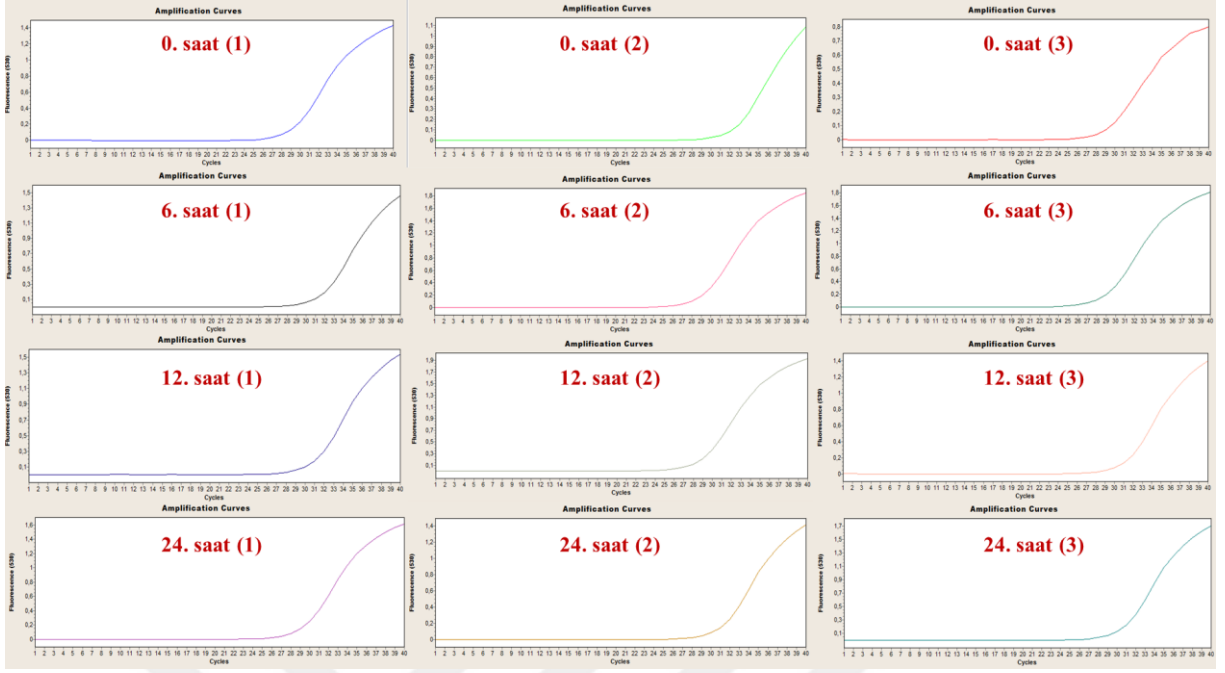
Şekil 51. *SINHX7* genine ait amplifikasyon eğrileri.



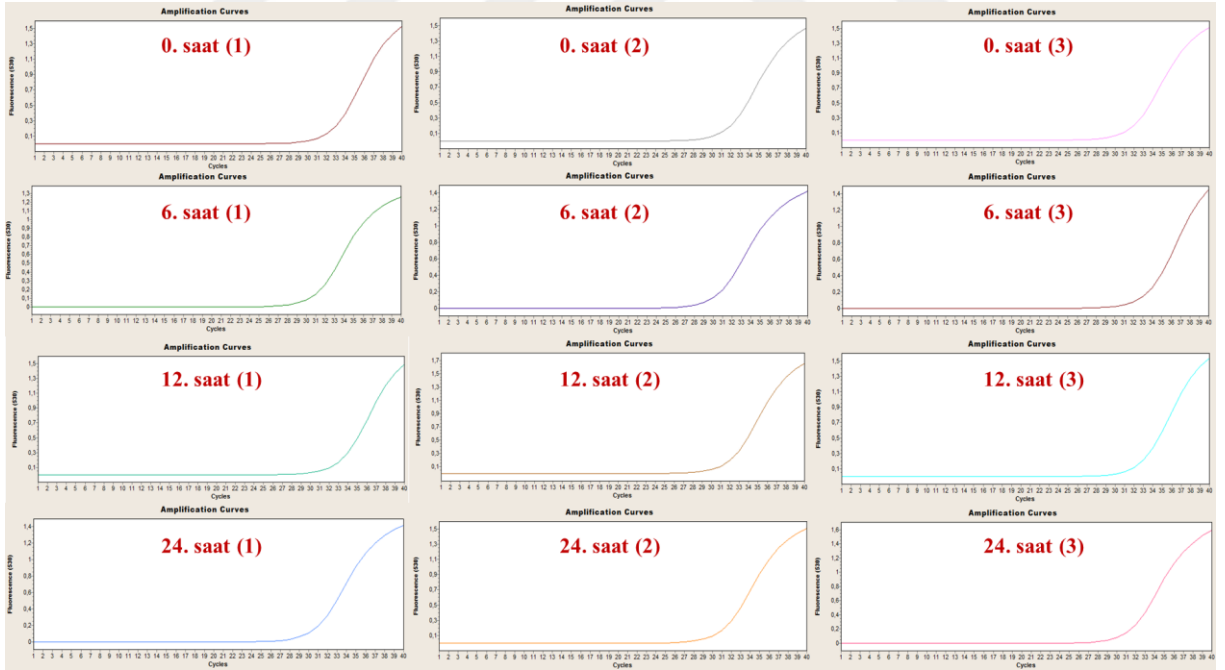
Şekil 52. *SINHX7* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait erime eğrileri.



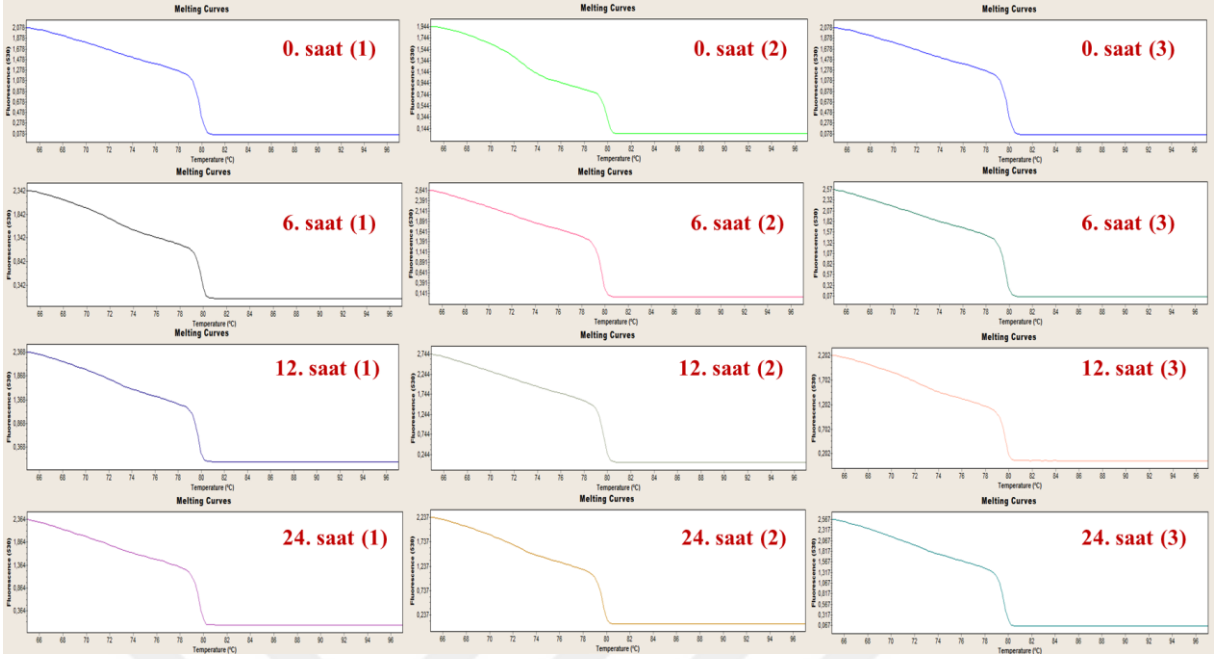
Şekil 53. *SINHX7* genine ait erime eğrileri.



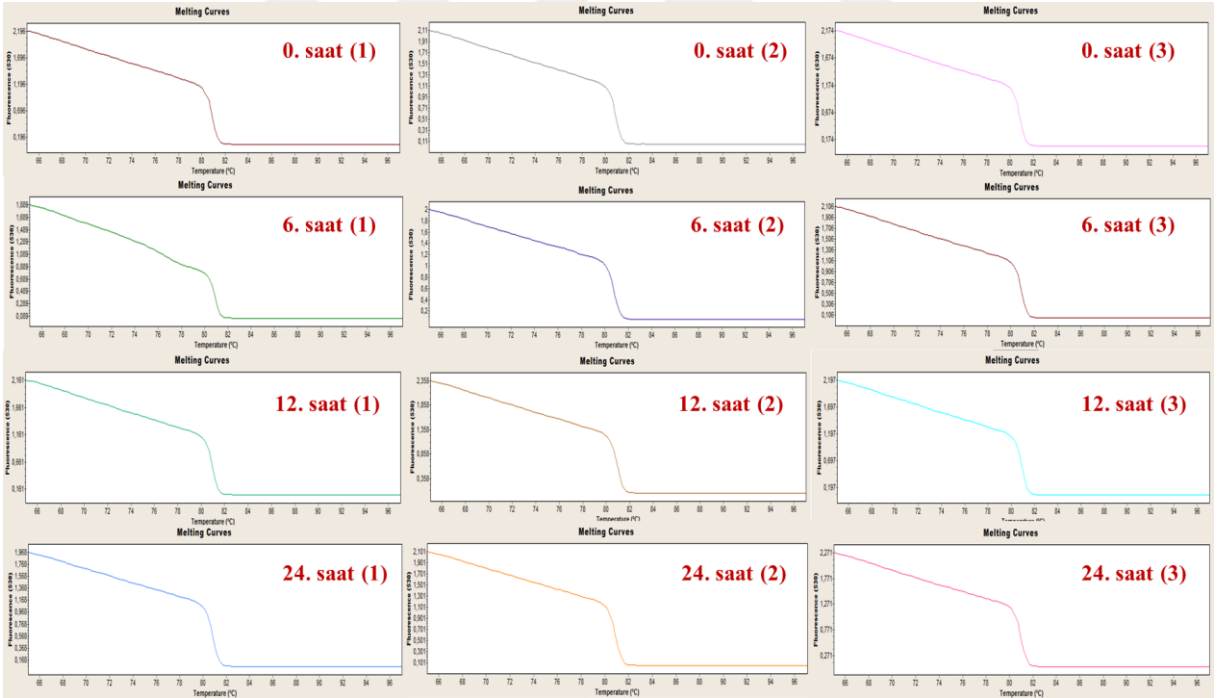
Şekil 54. *SINHX8* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait amplifikasyon eğrileri.



Şekil 55. *SINHX8* genine ait amplifikasyon eğrileri.



Şekil 56. *SINHX8* geni için kurulan reaksiyonda *EXPRESSED* genine ait erime eğrileri.



Şekil 57. *SINHX8* genine ait erime eğrileri.

## ***SINHX* Genlerinin Göreceli Gen İfade Seviyeleri**

Domates genomunda tanımlanan hedef *SINHX* genlerinin, NaCl şoku stresi (240 mM) uygulandıktan sonra farklı zamanlarda (0. saat, 6. saat, 12. saat, 24. saat) alınan açık çiçek dokularına ait göreceli ifade seviyelerindeki değişimler Şekil 58-63'de verilmiştir. *SINHX* genlerinin ifadesi, *EXPRESSED* (*Solyc07g025390*) kontrol geni ile normalize edilmiştir (Choi, vd., 2018).

*SINHX3* geni için gerçekleştirilen RT-qPCR analizlerinde formülasyona (normalizasyona) uygun Ct değerleri elde edilemediğinden dolayı bu gene ait göreceli ifade seviyeleri hesaplanamamıştır.

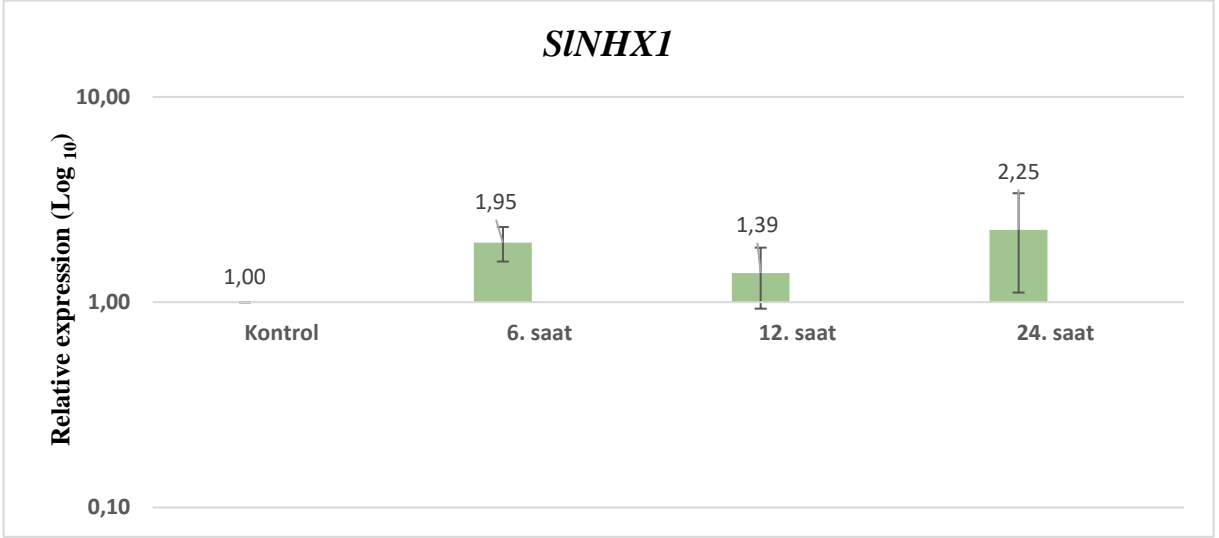
*SINHX3* geni için kurulan ilk RT-qPCR reaksiyonunda herhangi bir okumanın gerçekleşmediği boş (saptanmamış) veya '' >35.00'' gibi formülasyona uygun olmayan oldukça yüksek Ct değerleri elde edilmiştir.

Deney setinde yapılan bir hata, yetersiz cDNA şablonunun kullanılması veya kalitesiz total RNA izolasyonu gibi etmenler RT-qPCR reaksiyonu esnasında *SINHX3* geninin amplifikasyona geç girmesine ve '' >35.00'' gibi yüksek değerli okumaların gerçekleşmesine neden olmuş olabilir. Bu olası etmenler göz önünde bulundurularak *SINHX3* geni için üç farklı RT-qPCR reaksiyon seti daha kurulmuştur.

*SINHX3* geni için RT-qPCR reaksiyonunun toplamda dört kez tekrar edilmesi, deney seti kaynaklı hatalar sonucu formülasyona uygun olmayan Ct değerlerinin elde edilmesi ihtimalini oldukça düşük tutmaktadır. Benzer şekilde diğer *SINHX* üyelerinde formülasyona uygun Ct okumalarının gerçekleşmesi kalitesiz total RNA olasılığını da azaltmaktadır. Ayrıca kurulan deney setlerinde birbirinden farklı konsantrasyonlarda (1x, 5x, 20x, 100x) cDNA örneklerinin test edilmesi yetersiz cDNA şablonu ihtimalini de oldukça düşük tutmaktadır.

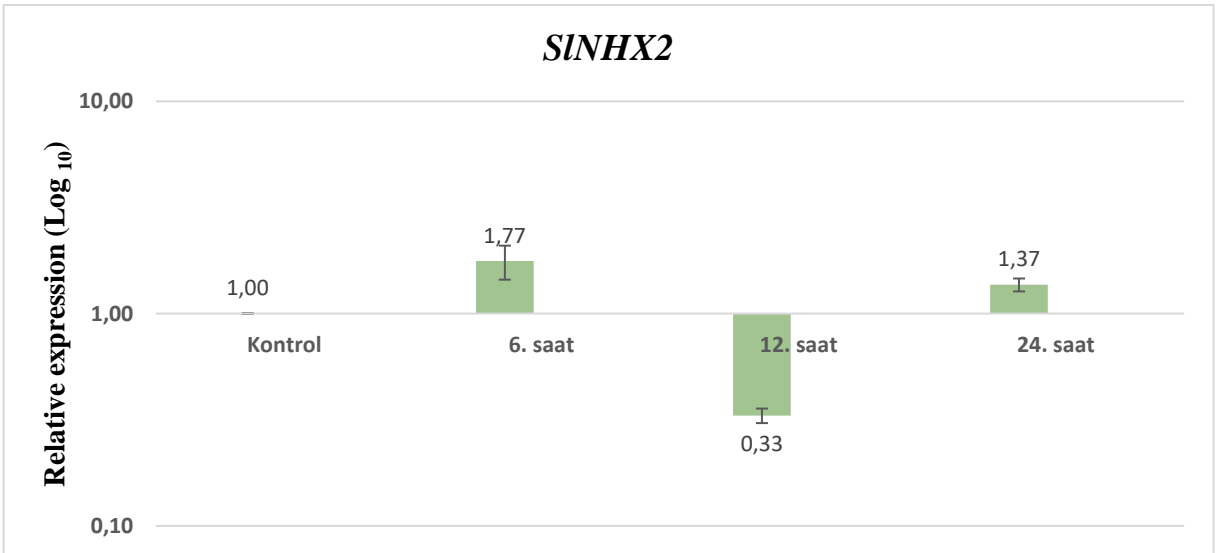
Deney sonuçları ampikon boyutu, erime sıcaklığı veya ekzon/intron seçimi gibi parametrelere bağlı olarak *SINHX3* geni için tasarlanan ileri ve geri primerlerin RT-qPCR reaksiyonlarına uygun olmadığını düşündürmektedir.





Şekil 58. NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra farklı zaman aralıklarında alınan açık çiçek dokularında *SINHX1* geninin göreceli ifade seviyeleri. Barlar üzerindeki değerler genlerin göreceli ifade seviyelerini temsil eder. Hata çubukları üç biyolojik kopyanın standart hatasını gösterir (n=3).

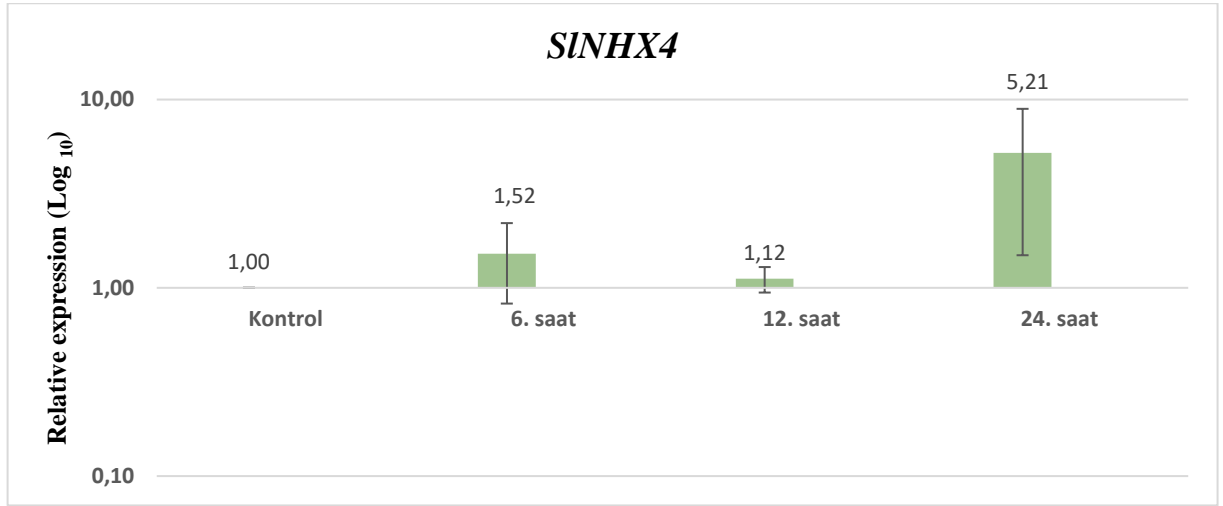
NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra 6. saatte *SINHX1* geninin göreceli ifade seviyesi 1,95 olarak tespit edilmiş ve yukarı regüle edildiği görülmüştür. *SINHX1* geninin, NaCl şoku stresinin 12. ve 24. saatlerinde de yukarı regülasyon sergilediği görülmüş ve göreceli ifade seviyelerinin sırasıyla 1,39 ve 2,25 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 58).



Şekil 59. NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra farklı zaman aralıklarında alınan açık çiçek dokularında *SINHX2* geninin göreceli ifade seviyeleri. Barlar üzerindeki değerler genlerin göreceli ifade seviyelerini temsil eder. Hata çubukları üç biyolojik kopyanın standart hatasını gösterir (n=3).

NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra 6. saatte *SINHX2* geninin göreceli ifade seviyesi 1,77 olarak yukarı regülasyon gösterirken, 12. saatte 0,33 göreceli ifade seviyesi ile aşağı regülasyon göstermiştir. Stres uygulamasının 24. saatinde ise *SINHX2* geninin 1,37 göreceli ifade seviyesi ile tekrardan yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 59).

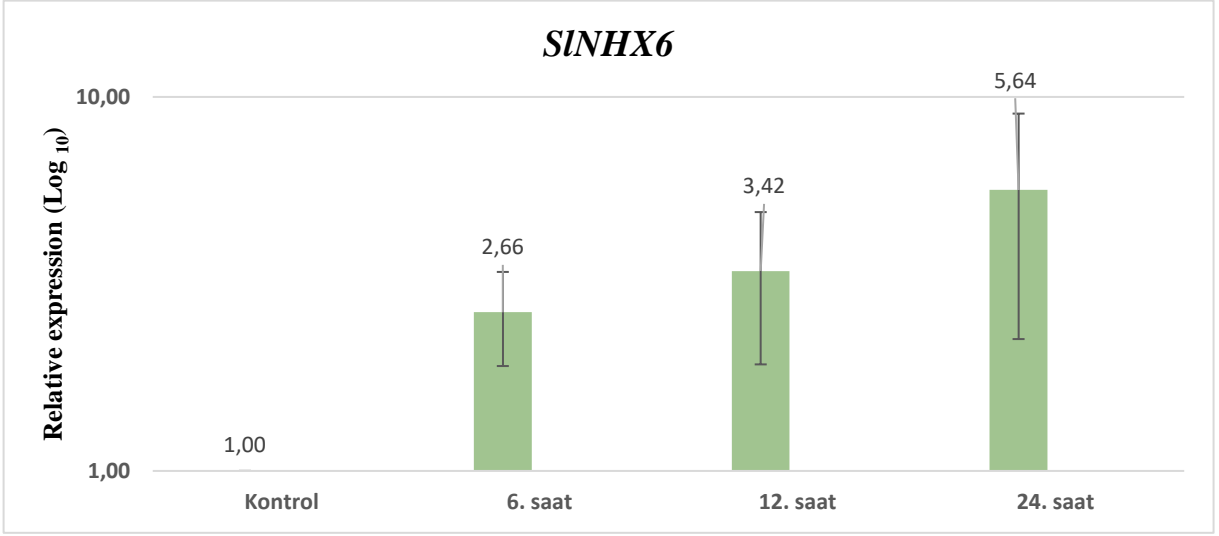
NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra 6. saatte *SINHX4* geninin göreceli ifade seviyesi 1,52 olarak tespit edilmiş ve yukarı regüle edildiği görülmüştür. NaCl stresinin 12. saatinde *SINHX4* geni, 1,12 göreceli ifade seviyesi ile yukarı regülasyon sergilerken, 24. saatinde 5,21 göreceli ifade seviyesiyle yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 60).



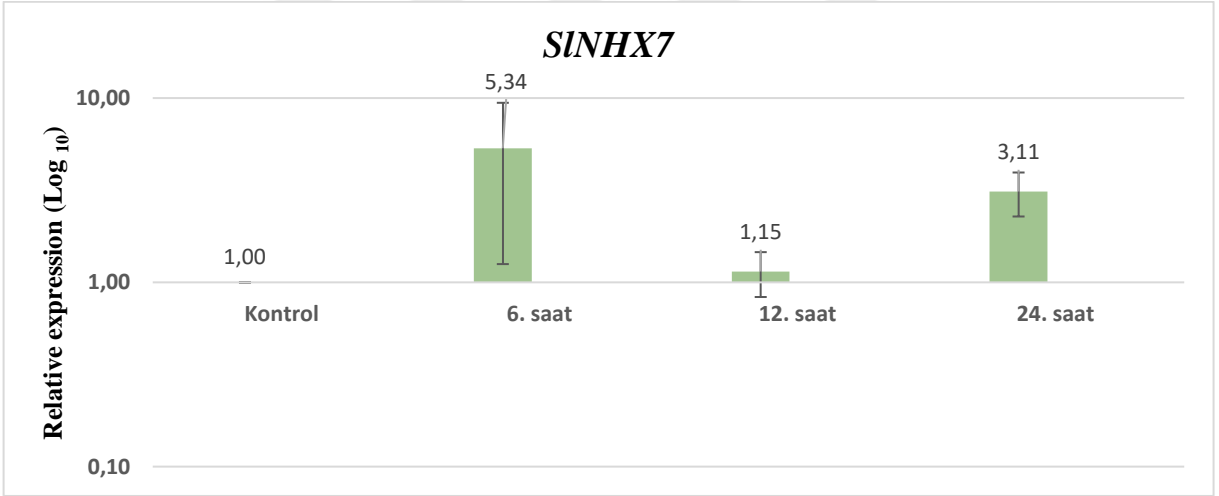
Şekil 60. NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra farklı zaman aralıklarında alınan açık çiçek dokularında *SINHX4* geninin göreceli ifade seviyeleri. Barlar üzerindeki değerler genlerin göreceli ifade seviyelerini temsil eder. Hata çubukları üç biyolojik kopyanın standart hatasını gösterir (n=3).

NaCl şoku stresinin 6. saatinde *SINHX6* geninin göreceli ifade seviyesi 2,66 olarak yukarı regülasyon göstermiştir. Stresin 12. ve 24. saatlerinde *SINHX6* geninin, sırasıyla 3,42 ve 5,64 göreceli ifade seviyeleri ile kademeli bir artış göstererek yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 61).

NaCl şoku stresinin 6. saatinde *SINHX7* geninin göreceli ifade seviyesi 5,34 olarak yukarı regülasyon sergilediği görülmüştür. Stresin 12. ve 24. saatinde *SINHX7* geninin göreceli ifade seviyeleri sırasıyla 1,15 ve 3,11 olarak yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir (Şekil 62).

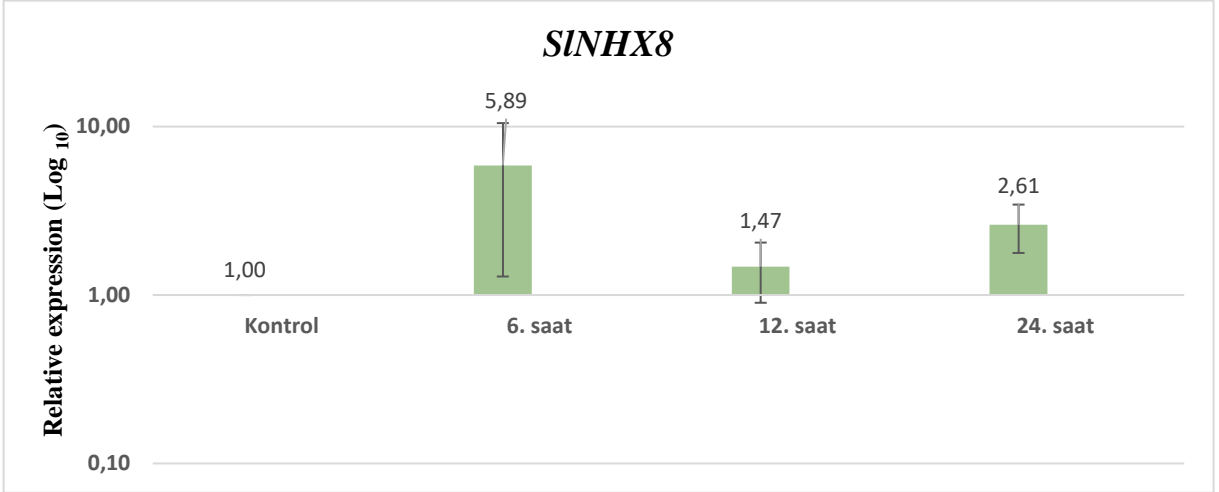


Şekil 61. NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra farklı zaman aralıklarında alınan açık çiçek dokularında *SINHX6* geninin göreceli ifade seviyeleri. Barlar üzerindeki değerler genlerin göreceli ifade seviyelerini temsil eder. Hata çubukları üç biyolojik kopyanın standart hatasını gösterir (n=3).

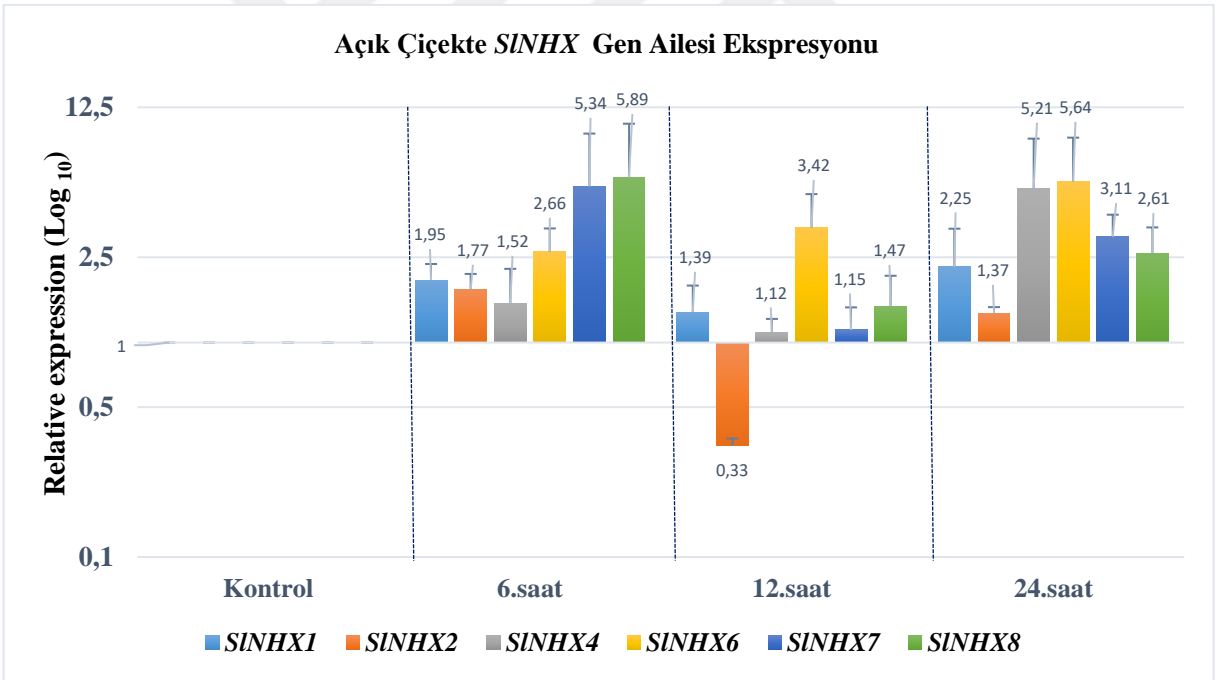


Şekil 62. NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra farklı zaman aralıklarında alınan açık çiçek dokularında *SINHX7* geninin göreceli ifade seviyeleri. Barlar üzerindeki değerler genlerin göreceli ifade seviyelerini temsil eder. Hata çubukları üç biyolojik kopyanın standart hatasını gösterir (n=3).

NaCl şoku stresinin 6. saatinde *SINHX8* geninin göreceli ifade seviyesi 5,89 olarak yukarı regülasyon sergilediği görülmüştür. Stresin 12. ve 24. saatinde *SINHX8* geninin göreceli ifade seviyeleri sırasıyla 1,47 ve 2,61 olarak yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir (Şekil 63).



Şekil 63. NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra farklı zaman aralıklarında alınan açık çiçek dokularında *SINHX8* geninin göreceli ifade seviyeleri. Barlar üzerindeki değerler genlerin göreceli ifade seviyelerini temsil eder. Hata çubukları üç biyolojik kopyanın standart hatasını gösterir (n=3).



Şekil 64. NaCl şoku stresi uygulandıktan sonra 0. saat (kontrol), 6. saat, 12. saat ve 24. saat zaman aralıklarında alınan açık çiçek dokularında *SINHX* gen ailesi üyelerinin gen ifade profilleri. Barlar üzerindeki değerler genlerin göreceli ifade seviyelerini temsil eder. Hata çubukları üç biyolojik kopyanın standart hatasını gösterir (n=3).

Domates genomunda tanımlanan *SINHX* gen ailesi üyeleri arasında, NaCl şoku stresinin 6. saatinde alınan açık çiçek dokularında yukarı regülasyon olarak en yüksek göreceli ifade seviyesi (5,89) *SINHX8* geninde tespit edilirken, en düşük göreceli ifade seviyesinin (1,52) *SINHX4* geninde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 64). *SINHX1*, *SINHX4*, *SINHX6*, *SINHX7* ve *SINHX8* genleri, NaCl şoku stresinin 12. saatinde yukarı yönlü regülasyon sergilerken, *SINHX2* geninin aşağı yönlü regülasyon sergilediği gözlemlenmiştir (Şekil 64). Buna ek olarak, *SINHX6* geninin göreceli ifade seviyesi, diğer üyelerden farklı olarak ilerleyen zamanla birlikte kademeli bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 64).

Biber (*Capsicum annuum*) genomunda tanımlanan *CaNHX* genlerinin, 100 mM NaCl stresi altında köklerdeki gen ifade seviyelerinin incelendiği bu çalışmada, *CaNHX1*, *CaNHX2*, *CaNHX6* ve *CaNHX9* genlerinin artan bir şekilde yukarı doğru regülasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Luo, vd., 2021). Bu çalışmaya benzer olarak, domates genomunda tanımlanan *SINHX6* geninin açık çiçek dokularında zamana bağlı olarak artan bir şekilde yukarı regülasyon sergilediği görülmüştür (Şekil 61). Buna ek olarak, *CaNHX8* geni diğer *CaNHX* üyeleri ile karşılaştırıldığında stresin 6. saatinde köklerde düşük seviyede regüle edilirken, *SINHX8* geni, diğer *SINHX* üyelerine kıyasla açık çiçek dokularında stresin 6. saatinde en yüksek yukarı regülasyon seviyesini sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 64).

Sandhu, vd., (2018), *Medicago truncatula* bitkisinde, *MtNHX1*, *MtNHX2*, *MtNHX3*, *MtNHX4*, *MtNHX6* ve *MtNHX7* genlerinin NaCl stresi ( $10 \text{ dS m}^{-1}$ ) altında gen ifade seviyelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, *MtNHX3*, *MtNHX6* ve *MtNHX7* genlerinin, köklerde kontrol bitkilerine göre önemli derecede yukarı regülasyon sergilediklerini, *MtNHX1* ve *MtNHX2* genlerinin ise hem yaprak hem de kök dokularında yukarı doğru regülasyon göstermediklerini bildirmişlerdir. Buna ek olarak, *MtNHX3* geninin, NaCl stresi ile birlikte yaprak dokularında diğer genlerden farklı olarak aşağı regülasyon sergilediği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde bu çalışma sonucunda *SINHX* üyelerinden farklı olarak *SINHX2* geni, NaCl şoku stresinin 12. saatinde açık çiçek dokusunda aşağı şekilde regüle olduğu tespit edilmiştir (Şekil 59).

Bu çalışmada, 240 mM NaCl şoku stresine maruz bırakılmış domates bitkilerinin açık çiçek dokularında zamana bağlı olarak *SINHX* genlerinin göreceli gen ifade seviyelerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Özellikle, NaCl şoku stresinin 6. saatinde açık çiçek dokularında, başta *SINHX6*, *SINHX7* ve *SINHX8* genleri olmak üzere tüm *SINHX* genlerinin tuz stresi tarafından önemli ölçüde yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir.

*SINHX2* geninin, NaCl şoku stresinin 12. saatinde aşağı regüle olması dışında diğer tüm *SINHX* üyelerinin 12. ve 24. saat zamanlarında yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 64). Gen ifade analiz sonuçları, domateste *SINHX* genlerinin tuz stresine karşı savunma cevapları oluşturmak için önemli rollere sahip olabileceğini göstermiştir.



## BEŞİNCİ BÖLÜM SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, biyoinformatik araçlar kullanılarak domates genomundaki (SL4.0 ve ITAG4.0) hedef  $Na^+/H^+$  antiporter (*NHX*) genlerinin tanımlanması, farklı türler arasındaki korunmuşluğu, diğer türler ile arasındaki filogenetik ilişkilerinin incelenmesi, kromozomlara dağılımlarının belirlenmesi, protein-protein etkileşimleri (PPI), korunmuş motifler ile üç boyutlu protein yapılarının analiz edilmesi amacıyla yürütülmüştür. Buna ek olarak, domates genomunda tanımlanan *SINHX* genlerinin NaCl şoku stresi altında açık çiçek dokularında meydana gelen gen ifade değişimleri incelenmiştir.

Çalışmada domates genomunda  $Na^+/H^+$  antiporter kodlayan toplam yedi tane *SINHX* geni tanımlanmıştır. Bu genlere ait sekans homoloji analizlerine göre *SINHX1* (*Solyc01g067710*), *SINHX2* (*Solyc01g098190*), *SINHX3* (*Solyc10g006080*), *SINHX4* (*Solyc06g008820*), *SINHX6* (*Solyc04g056600*), *SINHX7* (*Solyc01g005020*), ve *SINHX8* (*Solyc04g018100*) olarak tanımlanmıştır. *Solyc04g056600* geni *Arabidopsis*'te *AtNHX5* (%80.6 identity) ve *AtNHX6* (%81.6 identity) ile benzerlik göstermiştir. Sonuç olarak, *Solyc04g056600* geni *AtNHX6*'ya daha çok benzerlik oranı gösterdiği ve bu nedenle *SINHX6* olarak isimlendirilmesinin daha doğru olacağı değerlendirilmiştir. *AtNHX5*'in ortolog geni ise domates genomunda tanımlanmamıştır. *SINHX* ve *AtNHX* genleri arasında yapılan identity matris skorlarına göre, en yüksek değer %81.6 ile *Solyc04g056600* (*SINHX6*) ve *AtNHX6* arasında olurken, en düşük değer %49.8 ile *Solyc04g018100* (*SINHX8*) ve *ATNHX8* arasında tespit edilmiştir.

Filogenetik analiz sonuçlarına göre *SINHX* genleri, *SINHX1*, -2, -3 ve -4 vakuol membranlar (Vac sınıfı) üzerinde, *SINHX6* endozomal bölge (Endo sınıfı) üzerinde ve *SINHX7*, -8 plazma membranı (PM sınıfı) üzerinde üç farklı gruba ayrılmıştır.

Domates genomunda tanımlanan yedi *SINHX* geninin, 4 kromozom üzerine dağıldığı belirlenmiştir. *SINHX3* geni on numaralı kromozoma, *SINHX6* ve *SINHX8* genleri dört numaralı kromozoma, *SINHX1*, -2, -7 genleri bir numaralı kromozoma ve *SINHX4* geni ise altı numaralı kromozoma haritalanmıştır.

Amilorid bağlanma bölgesi domaini [FFIYLLPPI] SINHX1-2-3'te tamamen korunurken, bu domain SINHX4 ve SINHX6'da yüksek oranda korunmuştur. Buna ek olarak, SINHX7 ve SINHX8 üyelerinde amilorid bağlanma bölgesi domaini bulunmadığı tespit edilmiştir.

$Na^+/H^+$  antiporter domaini (PF00999), Hidden Markov Model'i (HMM) kullanılarak doğrulanmış ve *SINHX* üyelerinin her biri için ekzon/intron yapıları analiz edilmiştir. *SINHX1* (*Solyc01g067710*) geni, 4956 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1614 bç uzunluğunda CDS sekansına, 15 ekzon, 14 intron yapısına, *SINHX2* (*Solyc01g098190*) geni, 5857 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1611 bç uzunluğunda CDS sekansına, 16 ekzon, 15 intron yapısına, *SINHX3* (*Solyc10g006080*) geni, 4232 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1578 bç uzunluğunda CDS sekansına, 14 ekzon, 13 intron yapısına, *SINHX4* (*Solyc06g008820*) geni, 7602 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1605 bç uzunluğunda CDS sekansına, 15 ekzon, 14 intron yapısına, *SINHX6* (*Solyc04g056600*) geni, 15997 bç uzunluğunda genomik sekansa, 1596 bç uzunluğunda CDS sekansına, 21 ekzon, 20 intron yapısına, *SINHX7* (*Solyc01g005020*) geni, 13405 bç uzunluğunda genomik sekansa, 3456 bç uzunluğunda CDS sekansına, 23 ekzon, 22 intron yapısına, *SINHX8* (*Solyc04g018100*) geni, 15127 bç uzunluğunda genomik sekansa, 2952 bç uzunluğunda CDS sekansına, 23 ekzon, 22 intron yapısına sahip olduğu belirlenmiştir.

*SOS* (*Salt Overly Sensitive*) sinyal yolu, üç birincil proteinden *SOS1*(*NHX7*), *SOS2* (*CIPK24*) ve *SOS3* (*CBL4*)'ten oluşmaktadır (Shi, vd., 2000; Zhu 2003). *SOS* yolağı, iyon homeostazının sürdürülmesinde ve köklerden sürgünlere uzun mesafeli sodyum taşınmasının kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar (Feki, vd., 2014). Bu sinyal yolunda *CIPK24* (Calcineurin B-like interacting serine/threonine-protein kinase 24), *CBL4* (Calcineurin B-like) ile etkileşime girer ve bu etkileşim, kinazı plazma membranına yönlendirmektedir. Burada plazma membranında lokalize  $Na^+/H^+$  antiporter'i (*SOS1*) tuz toleransını teşvik etmek için etkinleştirmektedir (Batelli, vd., 2007). Plazma zarı  $Na^+/H^+$  antiporter *SOS1/NHX7* geni,  $Na^+$  iyonunu hücrelerden uzaklaştırır ve sonuç olarak tuz stresi altında hücrel homeostazının korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Shi, vd., 2000, 2003). Çalışma sonuçları *SINHX* proteinlerinin, protein-protein etkileşim analizi *SINHX7/SOS1* ve *SINHX8* proteinlerinin varsayımsal olarak *CBL* ile etkileşime giren protein kinazlar (*CIPK*) ile etkileşime girdiğini ortaya koymuştur.



*SINHX1*, *SINHX2*, *SINHX4*, *SINHX6*, *SINHX7* ve *SINHX8* genlerinin göreceli ifade seviyeleri sırasıyla, 6. saat için, 1.95, 1.77, 1.52, 2.66, 5.34, 5.89 olarak yukarı regülasyon, 12. saat için, 1.39, 0.33 (aşağı regülasyon), 1.22, 3.42, 1.15, 1.47 olarak yukarı regülasyon ve 24. saat için, 2.25, 1.37, 5.21, 5.64, 3.11, 2.61 olarak yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. *SINHX1*, *SINHX4*, *SINHX6*, *SINHX7* ve *SINHX8* genleri, NaCl şoku stresinin 12. saatinde yukarı yönlü regülasyon sergilerken, *SINHX2* geninin aşağı yönlü regülasyon sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca, *SINHX6* geninin göreceli ifade seviyesi, diğer üyelerden farklı olarak kademeli bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, 240 mM NaCl şoku stresine maruz bırakılmış domates bitkilerinin açık çiçek dokularında zamana bağlı olarak *SINHX* genlerinin göreceli gen ifade seviyelerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. NaCl şoku stresinin 6. saatinde açık çiçek dokularında, özellikle *SINHX6*, *SINHX7* ve *SINHX8* genleri olmak üzere tüm *SINHX* genlerinin tuz stresi tarafından önemli ölçüde yukarı regüle edildiği görülmüştür. Çalışma sonucunda elde edilen gen ifade sonuçları, *SINHX* genlerinin domatesin NaCl stresine karşı savunma cevabının oluşturmasında önemli rollere sahip olabileceğini, biyoinformatik analiz sonuçları ise domateste *NHX* genlerinin daha ayrıntılı olarak çalışılabilmesine olanak sağlayan, genom seviyesinde önemli temel bilgilerin ortaya çıkmasını sağlamıştır.

## KAYNAKÇA

- Adachi, J., Hasegawa, M. (1992). MOLPHY, programs for molecular phylogenetics I: PROTML, maximum likelihood inference of protein phylogeny. Institute of Statistical Mathematics, Tokyo.
- Adalid, A., Roselló, S., Cebolla-Cornejo, J., and Nuez, F. (2005). Evaluation and selection of *Lycopersicon* accessions for their high carotenoid and vitamin C content. XV Meeting of the EUCARPIA Tomato Working Group (Bari, September 20-23, 2005): 60.
- Aharon, G.S., Apse, M.P., Duan, S., Hua, X., Blumwald, E. (2003). Characterization of a family of vacuolar  $Na^+/H^+$  antiporters *Arabidopsis thaliana*. Plant Soil, 253, 245–256.
- Ali, S. G., Rab, A., Khan, N. U., & Nawab, K. (2011). Enhanced proline synthesis may determine resistance to salt stress in tomato cultivars. Pak. J. Bot, 43(6), 2707-2710.
- Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers, EW., Lipman, DJ. (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410.
- Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389-3402.
- Amini, F., Ehsanpour, A. A., Hoang, Q. T., & Shin, J. S. (2007). Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. Russian Journal of Plant Physiology, 54(4), 464-471.
- Anonim, (2021). <https://tr.pinterest.com/pin/127297126943014022/> Son erişim tarihi:16.07.21
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar  $Na^+/H^+$  antiporter in *Arabidopsis*. Science 285:1256–1258. doi:10.1126/ science.285.5431.1256.
- Apse, M.P., Blumwald, E. (2007).  $Na^+$  transport in plants. FEBS Lett. 581, 2247–2254, doi:10.1016/j.febslet.2007.04.014.

- Aranda-Sicilia, M.N., Cagnac, O., Chanroj, S., Sze, H., Rodríguez-Rosales, M.P., Venema, K. (2012). *Arabidopsis KEA2*, a homolog of bacterial KefC, encodes a  $K^+/H^+$  antiporter with a chloroplast transit peptide. - *Biochim. biophys. Acta* 1818: 2362-2371.
- Ashraf, M., Harris, P.J.C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166: 3–16.
- Ashraf, M., & McNeilly, T. (2004). Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Critical reviews in plant Sciences*, 23(2), 157-174.
- Ayadi, M., Martins, V., Ayed, R. B., Jbir, R., Feki, M., Mzid, R., ... & Hanana, M. (2020). Genome wide identification, molecular characterization, and gene expression analyses of grapevine *NHX* antiporters suggest their involvement in growth, ripening, seed dormancy, and stress response. *Biochemical genetics*, 58(1), 102-128.
- Babu, M. A., Singh, D., & Gothandam, K. M. (2012). The effect of salinity on growth, hormones and mineral elements in leaf and fruit of tomato cultivar PKM1. *J Anim Plant Sci*, 22(1), 159-164.
- Bacha, H., Tekaya, M., Drine, S., Guasmi, F., Touil, L., Enneb, H., ... & Ferchichi, A. (2017). Impact of salt stress on morpho-physiological and biochemical parameters of *Solanum lycopersicum* cv. Microtom leaves. *South African Journal of Botany*, 108, 364-369.
- Bahmani, K., Noori, S. A. S., Darbandi, A. I., & Akbari, A. (2015). Molecular mechanisms of plant salinity tolerance: a review. *Australian journal of crop science*, 9(4), 321-336.
- Ballesteros, E., Blumwald, E., Donaire, J.P., Belver, A. (2006).  $Na^+/H^+$  antiporter activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol Plant* 99:328–334. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb05420.x.
- Bandeh, Hagh A., Toorchi, M., Mohammadi, A., Chaparzadeh, N., Salekdeh, G.H., Kazemnia, H. (2008). Growth and osmotic adjustment of canola genotypes in response to salinity. *J Food Agric Environ.* 6 (2): 201-208.

- Bao-Yan, A.N., Yan, L.U.O., Jia-Rui, L.I., Wei-Hua, Q.I.A.O., Zhang, X.S., Xin-Qi, G.A.O. (2008). Expression of a vacuolar  $Na^+/H^+$  antiporter gene of alfalfa enhances salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Acta Agronomica Sinica*, 34(4), 557-564.
- Barbouchi, M., Abdelfattah, R., Chokmani, K., Aissa, N. B., Lhissou, R., & El Harti, A. (2014). Soil salinity characterization using polarimetric InSAR coherence: Case studies in Tunisia and Morocco. *IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing*, 8(8), 3823-3832.
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.C., Onto, M.A., Ushijima, K., Nakano, R., Esumi, T., Coku, A., Belmonte, M., Blumwald, E. (2011). The *Arabidopsis*  $Na^+/H^+$  antiporters *NHX1* and *NHX2* control vacuolar pH and  $K^+$  homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *Plant Cell*, 23, 3482–3497.
- Batelli, G., Verslues, P. E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., ... & Zhu, J. K. (2007). SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar  $H^+$ -ATPase and upregulating its transport activity. *Molecular and cellular biology*, 27(22), 7781-7790.
- Benson, DA., Karsch-Mizrachi, I., Clark, K., Lipman, DJ., Ostell, J. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Res* 40: D48-53.
- Benson, DA., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, DJ., Ostell, J., Wheeler, DL. (2008). GenBank. *Nucleic Acids Res* 36: D25-30.
- Berman, HM., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, TN. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242.
- Bohs, L. (2005). Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences. In: Keating RC, Hollowell VC, Croat T (eds) *Festschrift for William G. Darcy: the legacy of a taxonomist (Monographs in Systematic Botany 104)*. Missouri: MBG Press, pp 27–49.
- Brett, C.L., Donowitz M., Rao R., (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am. J. Physiol.* 288, C223–C239.
- Burge, C., Karlin, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* 268: 78-94.

- Caines, A. M., & Shennan, C. (1999). Interactive effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and NaCl salinity on the growth of two tomato genotypes differing in  $\text{Ca}^{2+}$  use efficiency. *Plant physiology and biochemistry*, 37(7-8), 569-576.
- Candolle, A. de. (1883). *Origine des plants cultivées*. 10<sup>a</sup> Ed. Baillière, Paris. France.
- Cellier, F., Conéjéro, G., Ricaud, L., Luu, D.T., Lepetit, M., Gosti, F., Casse, F. (2004). Characterization of *AtCHX17*, a member of the *cation/H<sup>+</sup> exchangers*, *CHX* family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in  $\text{K}^+$  homeostasis. - *Plant J.* 39: 834-846.
- Chandna, R., Azooz, M. M., & Ahmad, P. (2013). Recent advances of metabolomics to reveal plant response during salt stress. *Salt stress in plants*, 1-14.
- Chanroj, S., Lu, Y., Padmanaban, S., Nanatani, K., Uozumi, N., Rao, R., Sze, H. (2011). Plant-specific *cation/H<sup>+</sup> exchanger* 17 and its homologs are endomembrane  $\text{K}^+$  transporters with roles in protein sorting. - *J. Biol. Chem.* 286: 33931-33941.
- Chanroj, S., Wang, G., Venema, K., Zhang, M. W., Delwiche, C. F., & Sze, H. (2012). Conserved and diversified gene families of monovalent *cation/H<sup>+</sup> antiporters* from algae to flowering plants. *Frontiers in plant science*, 3, 25.
- Chen, H., An R., Tang J.H., Cui X.H., Hao F.S.H., Chen J., Wang X.C.H. (2007). Over-expression of a vacuolar *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter* gene improves salt tolerance in an upland rice. *Mol breeding* 19:215– 225. doi:10.1007/s11032-006-9048-8.
- Chen, H.T., Xin C.H.E.N., Wu B.Y., Yuan X.X., Zhang H.M., Cui X.Y., Liu X.Q. (2015). Whole-genome identification and expression analysis of *K<sup>+</sup> efflux antiporter (KEA)* and *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (NHX)* families under abiotic stress in soybean. *Journal of integrative agriculture*, 14(6), 1171-1183.
- Chen, L.H., Zhang, B., Xu Z.Q. (2008). Salt tolerance conferred by overexpression of *Arabidopsis* vacuolar *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter* gene *AtNHX1* in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Transgenic Res* 17:121–132. doi:10.1007/s11248-007-9085-z.
- Child, A. (1990). A Synopsis of *Solanum* Subgenus Potatoe (G. Don) D'Arcy [*Tuberarium* (Dun.) Bitter (s.l.)]. *Feddes Repert.* 101: 209-235.

- Choi, S. W., Hoshikawa, K., Fujita, S., Thi, D. P., Mizoguchi, T., Ezura, H., & Ito, E. (2018). Evaluation of internal control genes for quantitative realtime PCR analyses for studying fruit development of dwarf tomato cultivar 'Micro-Tom'. *Plant Biotechnology*, 18-0525.
- Chou, KC., Elrod, DW. (1999). Protein subcellular location prediction. *Protein Eng* 12: 107-118.
- Chun-yan, Y. S. L. (2007). Effects of Salt Stress on Physiological-biochemistry Index of Different Tomato Seedling [J]. *Northern Horticulture*, 4.
- Chutipajit, S., Cha-um, S., Sompornpailin, K. (2011). High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. indica. *Aust J Crop Sci* 5:1191–1198.
- Clinton, S.K. (2005). Tomatoes or lycopene: a role in prostate carcinogenesis?. *J. Nutr.* 135 (8): 2057S-2059S.
- Cox, S. (2000). From discovery to modern commercialism: the complete story behind *Lycopersicon esculentum*. <http://www.landscapeimagery.com/articles.html>.
- Çekiç, S. D., Filik, H., & Apak, R. (2004). Use of an o-aminobenzoic acid-functionalized XAD-4 copolymer resin for the separation and preconcentration of heavy metal (II) ions. *Analytica Chimica Acta*, 505(1), 15-24.
- Çulha, Ş., & Çakırlar, H. (2011). Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(2), 11-34.
- Dantas, BF., De Sa, RL., Aragao, CA. (2007). Germination, initial growth and cotyledon protein content of bean cultivars under salinity stress. *Rev Bras de Sementes* 29:106–110.
- Deinlein, U., Stephan A.B., Horie T., Luo W., Xu G., Schroeder J.I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sci.*, 19, 371–379.
- Díez, M. J., & Nuez, F. (2008). Tomato. In *Vegetables II* (pp. 249-323). Springer, New York, NY.

- Doganlar, Z. B., Demir, K., Basak, H., & Gul, I. (2010). Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. *African Journal of Agricultural Research*, 5(15), 2056-2065.
- Dong, J., Liu, C., Wang, Y., Zhao, Y., Ge, D., & Yuan, Z. (2021). Genome-wide identification of the *NHX* gene family in *Punica granatum* L. and their expressional patterns under salt stress. *Agronomy*, 11(2), 264.
- Dorgan, J.F., Sowell, A., Swanson, C.A., Potischman, N., Miller, R., Schussler, N., and Stephenson, Jr. H.E. (1998). Relationships of serum carotenoids, retinol, alpha-tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri (United States). *Cancer Causes Control* 9 (1): 89-97.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue (No. RESEARCH).
- Esquinas-Alcázar, J., and Nuez, F. (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión. In: "Nuez, F. (Ed.). *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid: 14-42.
- Evans, A.R., Hall, D., Pritchard, J., Newbury, H.J., 2012. The roles of the cation transporters *CHX21* and *CHX23* in the development of *Arabidopsis thaliana*. - *J. exp. Bot.* 63: 59- 67.
- Farooq, M., Hussain, M., Wakeel, A., Siddique, KHM. (2015). Salt stress in maize effects resistance mechanisms and seedling vigor as affected by seed priming in coarse rice. *Can J Botany*, 84:1196–202.
- Feki, K., Quintero, F. J., Khoudi, H., Leidi, E. O., Masmoudi, K., Pardo, J. M., & Brini, F. (2014). A constitutively active form of a durum wheat *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1* confers high salt tolerance to transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 33(2), 277-288.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP phylogeny inference package. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

- Finn, RD., Bateman, A., Clements, J., Marco Punta, Penny C Coggill. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucl Acids Res* 42: D222-D230.
- Finn, RD., Clements, J., Eddy, SR. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* 39: W29-37.
- Flicek, P., Amode, MR., Barrell, D., Beal, K., Brent, S. (2012). Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res* 40: D84-90.
- Freckleton, RP., Harvey, PH., Pagel, M. (2002). Phylogenetic analysis and comparative data: a test and review of evidence. *Am Nat* 160: 712-726.
- Fukuda, A., Chiba K., Maeda M., Nakamura A., Maeshima M., Tanaka Y. (2004a). Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H<sup>+</sup> - pyrophosphatase, H<sup>+</sup> -ATPase subunit A, and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from barley. *J Exp Bot* 55:585–594. doi:10.1093/jxb/erh070.
- Fukuda, A., Nakamura A., Tagiri A., Tanaka H., Miyao A., Hirochika H., Tanaka Y. (2004b). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant Cell Physiol* 45:146–159. doi:org/10.1093/pcp/pch014.
- Gagneul, D., Ai`nouche, A., Duhaze', C., Lugan, R., Larher, F.R., and Bouchereau, A. (2007). A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic *plumbaginaceae Limonium latifolium*. *Plant Physiol.* 144(3): 1598–1611. doi:10. 1104/pp.107.099820. PMID:17468212.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, RD. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31: 3784-3788.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881-902.
- Ghanem, M. E., Ghars, M. A., Frettinger, P., Pérez-Alfocea, F., Lutts, S., Wathelet, J. P., ... & Fauconnier, M. L. (2012). Organ-dependent oxylipin signature in leaves and roots of salinized tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *Journal of plant physiology*, 169(11), 1090-1101.



- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., & Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in plant science*, 5, 151.
- Gomes-Filho, E., Machado Lima, CRF., Costa, JH., da Silva, AC., da Guia Silva Lima M, de Lacerda, CF., Prisco, J.T. (2008). Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. *Plant Cell Rep* 27:147–157.
- Gould, W.A. (1983). Tomato production, processing and quality, AVI Publ, Westport, CT, USA.
- Grime, J.P. (1977). Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *Am Nat* 111:1169–1194.
- Gull, A., Lone, A. A., & Wani, N. U. I. (2019). Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and biotic stress in plants*, 1-19.
- Guo, Y., Qui, QH., Wuintero, FJ., Pardo, JM., Ohta, M., Zhang, C., Schumaker, KS., Zhu, JK. (2004). Transgenic Evaluation of Activated Mutant alleles of *SOS2* Reveals a Critical Requirement for Its Kinase Activity and C-Terminal Regulatory Domain for Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 16: 435-449.
- Güvenç, İ. (2019). Türkiye’de domates üretimi, dış ticareti ve rekabet gücü. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(1), 57-61.
- Hall, D., Evans, A.R., Newbury, H.J., Pritchard, J. (2006). Functional analysis of *CHX21*: a putative sodium transporter in *Arabidopsis*. - *J. exp. Bot.* 57: 1201-1210.
- Hamada, A., Shono M., Xia T., Ohta M., Hayashi Y., Tanaka A., Hayakawa T. (2001). Isolation and characterization of a  $Na^+/H^+$  antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol Biol* 46:35–42. doi:10.1023/A:1010603222673.
- Hamamoto, S., Horie, T., Hauser, F., Deinlein, U., Schroeder, J.I., Uozumi, N. (2015). HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. - *Curr. Opin. Biotechnol.* 32: 113-120.
- Haq, T. U., J. Gorham, J. Akhtar, N. Akhtar, and K. A. Steele. (2010). Dynamic quantitative trait loci for salt stress components on chromosome 1 of rice. *Functional Plant Biology* 37(7):634–645. doi:10.1071/FP09247.

- Hare, P.D., and Cress, W.A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21(2): 79–102. doi:10.1023/A:1005703923347.
- Hasegawa, P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:463–499. doi:10.1146/annurev. arplant.51.1.463.
- Hasegawa, P.M., (2013). Sodium (Na<sup>+</sup>) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environ Exp Bot*, 92:19–31.
- Hesper, B., Hogeweg, P. (1970). Bioinformatica: een werkconcept. *Kameleon* 1: 28-9.
- Ho, L. C., & Hewitt, J. D. (1986). Fruit development. In *The tomato crop* (pp. 201-239). Springer, Dordrecht.
- Hobson, G., & Grierson, D. (1993). Tomato. In *Biochemistry of fruit ripening* (pp. 405-442). Springer, Dordrecht.
- Hogeweg, P. (2011). The roots of bioinformatics in theoretical biology. *PLoS Comput Biol* 7: e1002021.
- Hossain, M. M., & Nonami, H. (2012). Effect of salt stress on physiological response of tomato fruit grown in hydroponic culture system. *Horticultural Science*, 39(1), 26-32.
- Hu, Y., Schmidhalter, U. (2005). Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J Plant Nutr Soil Sci* 168:541–549.
- Ji, H., Pardo, J.M., Giorgia, B., Van Oosten, M.J., Bressan, R.A., Li, X. (2013). The *Salt Overly Sensitive (SOS)* pathway: established and emerging roles. *Mol Plant Adv.* Access published January 25.
- Jia, B., Sun, M., Duanmu, H., Ding, X., Liu, B., Zhu, Y., Sun, X. (2017). *GsCHX19.3*, a member of *cation/H<sup>+</sup> exchanger* superfamily from wild soybean contributes to high salinity and carbonate alkaline tolerance. - *Sci. Rep.* 7: 9423.
- Jia, Q., Zheng, C., Sun, S., Amjad, H., Liang, K., & Lin, W. (2018). The role of plant *cation/proton antiporter* gene family in salt tolerance. *Biologia plantarum*, 62(4), 617-629.

- Joshi, S., Kaur, K., Khare, T., Srivastava, A. K., Suprasanna, P., & Kumar, V. (2021). Genome-wide identification, characterization and transcriptional profiling of *NHX*-type ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) antiporters under salinity stress in soybean. *3 Biotech*, 11(1), 1-17.
- Kanber, R., Çullu, M. A., Kendirli, B., Antepi, S., & Yılmaz, N. (2005). Sulama, drenaj ve tuzluluk. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi*, 3-7.
- Kang, D., Seo, Y., Lee, J.D., Ishii, R., Kim, K.U., Shin, D.H. (2005). Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *J Agronomy Crop Sci*, 191:273–82.
- Kaur, H., & Gupta, N. (2018). Ameliorative Effect of proline and ascorbic acid on seed germination and vigour parameters of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under salt stress. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 7(1), 3523-3532.
- Keutgen, A.J., Pawelzik, E. (2009). Impacts of NaCl stress on plant growth and mineral nutrient assimilation in two cultivars of strawberry. *Environ Exp Bot* 65:170–176.
- Khan, F.A., Phillips, C.D., Baker, R.J. (2014). Timeframes of speciation, reticulation, and hybridization in the bulldog bat explained through phylogenetic analyses of all genetic transmission elements. *Syst Biol* 63: 96-110.
- Khan, M.A., Rizvi, Y. (1994). Effect of salinity, temperature and growth regulators on the germination and early seedling growth of *Atriplex griffithii* var. Stocksii. *Can J Bot* 72:475–479.
- Khan, M.A., Weber, D.J. (2008). *Ecophysiology of high salinity tolerant plants (tasks for vegetation science)*, 1st edn. Springer, Amsterdam.
- Khare, T., Joshi, S., Kaur, K., Srivastava, A., Shriram, V., Srivastava, A. K., ... & Kumar, V. (2021). Genome-wide in silico identification and characterization of sodium-proton ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) antiporters in Indica rice. *Plant Gene*, 26, 100280.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (1994). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci* 10: 189-191.
- Labate, J. A., Grandillo, S., Fulton, T., Muñoz, S., Caicedo, A. L., Peralta, I., ... & Causse, M. (2007). Tomato. In *Vegetables* (pp. 1-125). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Leinonen, R., Akhtar, R., Birney, E., Bower, L., Cerdano-Tárraga, A. (2011). The European Nucleotide Archive. *Nucleic Acids Res* 39: D28-31.
- Li, N., Wang, X., Ma, B., Du, C., Zheng, L., Wang, Y. (2017). Expression of a  $Na^+/H^+$  antiporter *RtNHX1* from recretohalophyte *Reaumuria trigyna* improved salt tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.*, 218, 109–120.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25, 402–408.
- Luckwill, L.C. (1943). The genus *Lycopersicon*: An historical, biological, and taxonomical survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberdeen Univ. Stud.* 120: 1-44.
- Luo, X., Yang, S., Luo, Y., Qiu, H., Li, T., Li, J., ... & Qin, C. (2021). Molecular Characterization and Expression Analysis of the  $Na^+/H^+$  Exchanger Gene Family in *Capsicum annuum* L. *Frontiers in Genetics*, 1547.
- Mahajan, S., Pandey, G.K., Tuteja, N. (2008). Calcium and salt stress signaling in plants: Shedding light on *SOS* pathway. *Arch Biochem Biophys.* 471: 146–158.
- Manaa, A., Ahmed, H. B., Smiti, S., & Faurobert, M. (2011). Salt-stress induced physiological and proteomic changes in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. *Omics: a journal of integrative biology*, 15(11), 801-809.
- Mane, AV., Karadge, BA., Samant JS. (2010). Salinity induced changes in photosynthetic pigments and polyphenols of *Cymbopogon Nardus* (L.) Rendle. *J Chem Pharm Res* 2:338–347.
- Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H. Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., Guerinot, M.L. (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. - *Plant Physiol.* 126: 1646-1667.
- Maser, P., (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126, 1646–1667.

- McCormack, J. H. (2004). Seed processing and storage: principles and practices of seed harvesting, processing, and storage: an organic seed production manual for seed growers in the Mid-Atlantic and Southern US. McCormack.
- McCue, G. (1952). The history and use of the tomato: an annotated bibliography. *Ann Missouri Bot Gar* 39:289–348.
- Mehmood, M. A., Sehar, U., & Ahmad, N. (2014). Use of bioinformatics tools in different spheres of life sciences. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 5(2), 1.
- Metternicht, G., & Zinck, A. (2008). Remote sensing of soil salinization: Impact on land management. CRC Press.
- Miller, P. (1754). *The Gardener's Dictionary, Abridged* 4th ed. London. John and James Rivington.
- Miyazaki, S., Sugawara, H., Gojobori, T., Tateno, Y., (2003). DNA Data Bank of Japan (DDBJ) in XML. *Nucleic Acids Res* 31: 13-16.
- Mottaleb, S.A., Rodríguez-Navarro, A., Haro, R. (2013). Knockouts of *Physcomitrella patens* *CHX1* and *CHX2* transporters reveal high complexity of potassium homeostasis. - *Plant Cell Physiol.* 54: 1455-1468.
- Mount, DW. (2004). *Sequence and genome analysis*. New York: Cold Spring.
- Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment*, 16(1), 15-24.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Mushtaq, Z., Faizan, S., & Gulzar, B. (2020). Salt stress, its impacts on plants and the strategies plants are employing against it: a review. *J Appl Biol Biotechnol*, 8, 81-91.
- Oertli, JJ. (1991). Nutrient management under water and salinity stress. In: *Proceeding of the symposium on nutrient management for sustained productivity*. Dept Soils Punjab Agric UnverLudhiana, India, pp 138–165
- Ohta, M., Hayashi Y., Nakashima, A., Hamada, A., Tanaka, A., Nakamura, T., Hayakawa, T. (2002). Introduction of a *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>* antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers

- salt tolerance to rice. FEBS Lett 532:279–282. doi:10.1016/S0014-5793(02)03679-7.
- Othman, Y., Al-Karaki, G., Al-Tawaha, AR., Al-Horani, A. (2006). Variation in germination and ion uptake in barley genotypes under salinity conditions. *World J Agric Sci* 2:11–15.
- Padmanaban, S., Chanroj, S., Kwak, J.M., Li, X., Ward, J.M., Sze, H. (2007). Participation of endomembrane *cation/H<sup>+</sup> exchanger AtCHX20* in osmoregulation of guard cells. - *Plant Physiol.* 144: 82-93.
- Pandolfi, C., Mancuso, S., Shabala, S. (2012). Physiology of acclimation to salinity stress in pea (*Pisum sativum*). *Environ Exp Bot.* 84: 44– 51.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., Quintero, F.J. (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57, 1181–1199, doi:10.1093/jxb/erj114.
- Pardo, J.M. (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57, 1181–1199.
- Parida, A.K., Das, A.B. (2005). Salt Tolerance and Salinity Effects on Plants: a Review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and Pollution research*, 22(6), 4056-4075.
- Peitsch, MC. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* 24: 274-279.
- Peralta, IE., Spooner, DM. (2001). Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Am J Bot* 88:1888–1902.
- Peralta, I.E., and Spooner, D.M. (2005). Relationships and morphological characterisation of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Garden*: 227-257.
- Perrenoud, S. (1990). Potassium and Plant Health, International Potash Institute, Basel.

- Pospisilova, J., Vagner, M., Malbeck, J., Travniakova, A., Batkova, P. (2005). Interactions between abscisic acid and cytokinins during water stress and subsequent rehydration. *Biol Plantarum*;49:533–40.
- Poustini, K., Siosemardeh, A., and Ranjbar, M. (2007). Proline accumulation as a response to salt stress in 30 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt tolerance. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54(5): 925–934. doi:10.1007/s10722-006-9165-6.
- Punta, M. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 40, D290–D301.
- Qui, QS., Guo, Y., Dietrich, MA., Schumaker, KS., Zhu, JK. (2002). regulation of *SOS1*, a plasma membrane  $Na^+/H^+$  exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by *SOS2* and *SOS3*. *PNAS* 99: 8436-8441.
- Raghavendra, AS., Gonugunta, VK., Christmann, A., Grill E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15:395–401.
- Rameeh, V. (2013). Effect of Salinity Stress on Yield, Component Characters and Nutrient Compositions in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Genotypes. *Agri tropica subtrop.* 46 (2): 58-63.
- Rick, CM. (1995). Tomato: *Lycopersicon esculentum*(*Solanaceae*). In: Smartt J, Simmonds NW (eds) *Evolution of crop plants*. Longman, Harlow, Essex, England, UK, pp 452–457.
- Rick, C.M. (1973). Potential genetic resources in tomato species: Clues from observations in native habitats. In: A.M. Srb (Editor), *Genes, Enzymes and Populations*. Plenum, New York. pp. 255-269.
- Robertson, LD., Labate JA. (2007). Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *esculentum*) and wild relatives. In: Razdan MK, Mattoo AK (eds) *Genetic Improvement of Solanaceous crops. vol 2: tomato*. Science Publ, Enfield, NH, USA, pp 25–75.
- Robinson, WR. (2003). *Chemistry problem-solving: Symbol, macro, micro, and process aspects*.
- Rodríguez, M., Canales, E., & Borrás-Hidalgo, O. (2005). Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnología Aplicada*, 22(1), 1-10.

- Rogers, ME., Grieve, CM., Shannon, MC. (2003). Plant growth and ion relations in lucerne (*Medicago sativa* L.) in response to the combined effects of NaCl and P. *Plant Soil* 253:187–194.
- Romero-Aranda, R., Soria, T., Cuartero, S. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci* 160:265–272.
- Sainju, U. M., Dris, R., & Singh, B. (2003). Mineral nutrition of tomato. *Food, Agriculture & Environment*, 1(2), 176-183.
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandhu, D., Pudussery, M.V., Kaundal, R., Suarez, D.L., Kaundal, A., Sekhon, R.S. (2018). Molecular characterization and expression analysis of the *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger* gene family in *Medicago truncatula*. *Functional & integrative genomics*, 18(2), 141-153.
- Shi, H., Quintero F.J., Pardo J.M., Zhu J.K. (2002). The putative plasma membrane *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1* controls long-distance *Na<sup>+</sup>* transport in plants. *Plant Cell* 14:465–477. doi:10.1105/tpc.010371.
- Shi, H., Zhu J.K. (2002). Regulation of expression of the vacuolar *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter* gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* 50:543–550. doi:10.1023/A:1019859319617.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(12), 6896-6901.
- Shi, H., Lee, B. H., Wu, S. J., & Zhu, J. K. (2003). Overexpression of a plasma membrane *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter* gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature biotechnology*, 21(1), 81-85.
- Sholi, N. J. (2012). Effect of salt stress on seed germination, plant growth, photosynthesis and ion accumulation of four tomato cultivars. *American Journal of Plant Physiology*, 7(6), 269-275.



- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7: 539.
- Smedema, L. K., & Shiati, K. (2002). Irrigation and salinity: a perspective review of the salinity hazards of irrigation development in the arid zone. *Irrigation and drainage systems*, 16(2), 161-174.
- Smith, AF. (1994). The tomato in America: early history, culture, and cookery. The Univ of South Carolina Press, Columbia, SC, pp 224.
- Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Cheng, N.-H., Bock, K.W., Conéjéro, G., Li, X., Twell, D., Ward, J.M., Hirschi, K.D. (2004). Expression patterns of a novel *AtCHX* gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K<sup>+</sup> homeostasis in pollen development. - *Plant Physiol.* 136: 2532-2547.
- Sze, H., (2004). Expression patterns of a novel *AtCHX* gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K<sup>+</sup> homeostasis in pollen development. *Plant Physiol.* 136, 2532–2547.
- Tanveer, K., Gilani, S., Hussain, Z., Ishaq, R., Adeel, M., & Ilyas, N. (2020). Effect of salt stress on tomato plant and the role of calcium. *Journal of Plant Nutrition*, 43(1), 28-35.
- Taylor, IB. (1986). Biosystematics of the tomato. In: Atherton JG, Rudich J (eds) the tomato crop: a scientific basis for improvement. Chapman and Hall, London, pp 1–34.
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of botany*, 91(5), 503-527.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Tian, N., Wang, J., Xu, ZQ. (2011). Overexpression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene *AtNHX1* from *Arabidopsis thaliana* improves the salt tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *S Afr J Bot.* 77: 160–169.

- UniProt Consortium, (2008). The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 36: D190-195.
- UniProt Consortium, (2014). Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 42: D191-198.
- Varis, S., & George, R. A. T. (1985). The influence of mineral nutrition on fruit yield, seed yield and quality in tomato. *Journal of horticultural science*, 60(3), 373-376.
- Villareal, R.L. (1980). *Tomato in the Tropics*. Westview Press, Inc. Colorado.
- Ward, J.M., Mäser, P., Schroeder, J.I. (2009). Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. - *annu. Rev. Physiol.* 71: 59-82.
- Waterhouse, AM., Procter, JB., Martin, DM., Clamp, M., Barton, GJ. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191.
- Wu, C.A., Yang, G.D., Meng, Q.W., Zheng, C.C. (2004). The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast  $Na^+/H^+$  antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol* 45:600–607. doi:10.1093/pcp/pch071.
- Wu, C.X., Gao, X.H., Kong, X.Q., Zhao, Y.X., Zhang, H. (2009). Molecular cloning and functional analysis of a  $Na^+/H^+$  antiporter gene *ThNHX1* from a halophytic plant *Thellungiella halophila*. *Plant Mol Biol Rep* 27:1–12. doi:10.1007/s11105-008-0048-1.
- Wu, CH, Yeh, LS, Huang, H, Arminski, L, Castro-Alvear, J. (2003) .The Protein Information Resource. *Nucleic Acids Res* 31: 345-347.
- Wu, G.Q., Wang, J.L., Li, S.J., (2019). Genome-Wide Identification of  $Na^+/H^+$  Antiporter (*NHX*) Genes in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) and Their Regulated Expression under Salt Stress. *Genes*, 10(5), 401.
- Wu, Y.Y., Chen, Q.J., Chen, M., Chen, J., Wang, X.C. (2005). Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar  $Na^+/H^+$  antiporter gene. *Plant Sci* 169:65–73. doi:10.1016/j.plantsci.2005.02.030.

- Xia, T., Apse, M.P., Aharon, G.S., Blumwald, E. (2002). Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar  $Na^+/H^+$  antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiol Plant* 116:206–212. doi:10.1034/j.1399-3054.2002.1160210.
- Xue, Z.Y., Zhi, D.Y., Xue, G.P., Zhang, H., Zhao, Y.X., Xia, G.M. (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar  $Na^+/H^+$  antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf  $Na^+$ . *Plant Sci* 167:849–859. doi:10.1016/j.plantsci.2004.05.034.
- Yamaguchi, T., Hamamoto, S., Uozumi, N. (2013). Sodium transport system in plant cells. - *Front. Plant Sci.* 4: 410.
- Yang, Q., Wu, M., Wang, P., Kang, J., Zhou, X. (2005). Cloning and expression analysis of a vacuolar  $Na^+/H^+$  antiporter gene from alfalfa. *DNA Seq* 16:352–357. doi:10.1080/10425170500272742.
- Yokoi, S. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* *NHX*  $Na^+/H^+$  antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 30, 529–539, doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01309.
- Zhang, H.X., Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* 19:765–768. doi:10.1038/90824.
- Zhang, H.X., Hodson, J.N., Williams, J.P., Blumwald, E. (2001). Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci* 98:12832–12836. doi:10.1073/pnas.231476498.
- Zhang, M.H., Qin, Z.H., Liu, X. (2005). Remote sensed spectral imagery to detect late blight in field tomatoes. *Precision Agriculture* 6: 489–508.
- Zhang, J.H., Nishimura, N., Okubo, A., and Yamazaki, S. (2002). Development of an analytical method for the determination of betaines in higher plants by capillary electrophoresis at low pH. *Phytochem. Anal.* 13(4): 189–194. doi:10.1002/pca.639. PMID: 12184170.
- Zhao, J.S., Zhi D.Y., Xue Z.Y., Liu H., Xia G.M. (2007). Enhanced salt tolerance of transgenic progeny of tall fescue (*Festuca arundinacea*) expressing a vacuolar

- Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter* gene from *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 164:1377–1383. doi:10.1016/j.jplph.2007.04.001.
- Zhao, Q., Zhang, H., Wang, T., Chen, S.X., Dai, S.J. (2013). Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. *J. Proteom.* 82, 230–253.
- Zhao, C.; Liu, B.; Piao, S.; Wang, X.; Lobell, D.B.; Huang, Y.; Huang, M.; Yao, Y.; Bassu, S.; Ciaia, P. (2017). Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, 9326–9331.
- Zhao, J., Cheng, N.-H., Motes, C.M., Blancaflor, E.B., Moore, M., Gonzales, N., Padmanaban, S., Sze, H., Ward, J.M., Hirschi, K.D. (2008). *AtCHX13* is a plasma membrane K<sup>+</sup> transporter. - *Plant Physiol.* 148: 796-807.
- Zheng, S., Pan, T., Fan, L., Qiu, Q.-S. (2013). A novel *AtKEA* gene family, homolog of bacterial *K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters*, plays potential roles in K<sup>+</sup> homeostasis and osmotic adjustment in *Arabidopsis*. - *PLoS ONE* 8: e81463.
- Zhu, ZJ., Wei, GQ., Li, J., Qian, QQ., Yu, JQ. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of saltstressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci* 167:527–533.
- Zhu, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 441-445.

