

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**NDR1/HIN1-LİKE (NHL) GEN AİLESİNİN AYÇİÇEĞİ BİTKİSİNDE OMİKS
YAKLAŞIMLAR KULLANILARAK KARAKTERİZE EDİLMESİ VE
ABİYOTİK STRES ALTINDAKİ ROLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ahmet Aşkın YILMAZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2025**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

NDR1/HIN1-LİKE (NHL) GEN AİLESİNİN AYÇİÇEĞİ BİTKİSİNDE OMİKS YAKLAŞIMLAR KULLANILARAK KARAKTERİZE EDİLMESİ VE ABİYOTİK STRES ALTINDAKİ ROLLERİNİN BELİRLENMESİ

Ahmet Aşkın YILMAZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlker BÜYÜK

NDR1/HIN1-benzeri (*NHL*) gen ailesinin temel bir işlevi, bitkilerin büyüme ve gelişim evrelerinin yanı sıra stres tepkilerini düzenlemektir. *NHL* gen ailesi, günümüze dek çeşitli bitki türlerinde biyoinformatik araçlar kullanılarak incelenmiş olmasına rağmen, *Helianthus annuus* (ayçiçeği) üzerinde henüz araştırılmamıştır. Bu araştırma, *H. annuus*'un tüm genomu boyunca *NHL* gen ailesinin tanımlandığı ve karakterize edildiği ilk çalışmadır. Çalışmada *NHL* gen ailesinin moleküler ve fizikokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak in siliko bir yaklaşım benimsenmiştir. Sonuç olarak, 33 adet *NHL* geni keşfedilmiş ve filogenetik analizlere göre bu genler üç kategoride sınıflandırılmıştır. Eşanlı (Ks) ve eşanlı olmayan (Ka) substitüsyon oranlarının analizi, filogenetik ilişkiler ve sinteni desenleri, *H. annuus*, *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* türlerinde *NHL* genlerinin poliploidizasyonu ve evrimi hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Transkriptom analizi, *NHL* genlerinin ayçiçeğinde dokuya özgü bir ifade değişim modeli gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, kantitatif Real-Time PCR sonuçlarına göre *H. annuus* yapraklarında kuraklık stresine yanıt olarak *NHL* genlerinin mRNA seviyelerinde kontrole göre önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Bunun yanında, PhotosynQ cihazı ile gerçekleştirilen ölçümlere göre birçok fotosentetik, biyokimyasal ve fiziksel parametrenin değiştiği gösterilmiştir. Genel olarak, bu araştırmanın sonuçları, *H. annuus*'ta *NHL* genlerinin gelişimi ve işlevlerinin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında önemli yeni bilgiler sunmaktadır.

Ağustos 2025, 74 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Helianthus annuus*, *NHL*, RNAseq, Abiyotik Stres, Çoklu Omik Veri Madenciliği, Biyoinformatik, PhotosynQ

ABSTRACT

PhD Thesis

CHARACTERIZATION OF THE NDR1/HIN1-LIKE (NHL) GENE FAMILY IN SUNFLOWER PLANT USING OMICS APPROACHES AND DETERMINATION OF THEIR ROLES UNDER ABIOTIC STRESS

Ahmet Aşkın YILMAZ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. İlker BÜYÜK

An essential function of the NDR1/HIN1-like (NHL) gene family is to regulate the growth and developmental phases of plants as well as stress response. The NHL gene family has not yet been examined in *Helianthus annuus* (sunflower), despite the fact that it has been examined in several plant species utilizing bioinformatics technologies. This research was the first that the NHL gene family was identified and characterized throughout the whole genome of *H. annuus*. An in-silico approach was employed, utilizing various bioinformatics tools to explore the molecular and physicochemical characteristics of NHL genes. Consequently, 33 NHL genes were discovered and categorized using phylogenetic analysis into three categories. The analysis of synonymous (Ks) and non-synonymous (Ka) substitution rates, phylogenetic relationships, and synteny patterns provided important insights into the polyploidization, evolution, and domestication of NHL genes across *H. annuus*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. Transcriptome analysis demonstrated a tissue-specific expression pattern of NHL genes in *P. vulgaris*. Additionally, in reaction to drought stress in *H. annuus* leaves, most of NHL genes were discovered to be activated on the basis of Real-Time PCR results. Moreover, many photosynthetic, biochemical and physical parameters have been revealed to change with the PhotosynQ device. In general, the outcomes of this research provide important new insights into the molecular mechanisms underlying the development and functions of NHL genes in *H. annuus*.

August 2025, 74 Pages

Key Words: *Helianthus annuus*, NHL, RNAseq, Abiotic Stress, Multi-Omics Data Mining, Bioinformatics, PhotosynQ

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bana her konuda çalışma imkânı sunan ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. İlker BÜYÜK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı), araştırmalarımnda yardım ve desteğini benden esirgemeyen, her zaman çalışmalarımna katkılarını sunan Sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı), çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan bütün laboratuvar arkadaşlarıma, hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan, her zaman yanımda olan sevgili aileme; sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar Burs Programı kapsamındaki desteklerinden dolayı YÖK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet Aşkın YILMAZ
Ankara, Ağustos 2025

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1 <i>Helianthus Annuus</i> Genomunda HaNHL Gen Ailesi Üyelerinin Tanımlanması	18
3.2 Dizi Hizalaması ve Filogenetik Ağaç	19
3.3 Korunmuş Motifler, Domainler ve Gen Yapısı.....	21
3.4 HaNHL Gen Ailesinin Hücre Lokalizasyonu ve Promotor Analizi.....	22
3.5 NHL Proteinlerinin Modellenmesi	24
3.6 <i>HaNHL</i> Genlerindeki miRNA Hedeflerinin in Silico Değerlendirilmesi.....	24
3.7 Gen Dağılımı ve Duplikasyonlar.....	26
3.8 Hassas ve Dayanıklı Ayçiçeği Çeşitlerinde RNaseq Analizi Yoluyla Kuraklık Stresine Yanıt Veren <i>HaNHL</i> İfade Seviyelerinin Belirlenmesi.....	27
3.9 Bitki Materyali, Büyüme Koşulları ve Stres Maruziyeti.....	28
3.10 PhotosynQ ile Veri Toplama ve Verilerin Analizi	29
3.11 RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Analizi	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	34
4.1 <i>H. Annuus</i> Genomunda <i>NHL</i> Genlerinin Tanımlanması ve Hücre İçi Lokalizasyonu.....	34
4.2 <i>HaNHL</i> Genlerinin Kapsamlı Karakterizasyonu: Filogeni, Motifler, Alanlar, Gen Yapısı, Promotör Analizi ve 3B Modelleme	38
4.3 <i>H. annuus</i> , <i>O. sativa</i> ve <i>A. thaliana</i> Genomları Arasındaki NHL Genlerinin Kromozomal Lokalizasyonu, Duplikasyonları ve Synteny İlişkileri.....	42
4.4 <i>HaNHL</i> Genlerini Hedefleyen miRNA'ların Tanımlanması.....	46

4.5 <i>HaNHL</i> Genlerinin Dokuya Özgü Ekspresyonları	46
4.6 SRA Verileri Kullanılarak Hassas Ve Dirençli Bitkiler Açısından <i>HaNHL</i> Yaprak Genlerinin Kuraklık Stresine Tepkisinin İncelenmesi	48
4.7 Yerli Turay ve Sun Ayçiçeği Çeşitlerinde Kuraklığa Yanıt Olarak <i>NHL</i> Genlerinin Kök, Gövde Ve Yaprakta RT-qPCR ile Ekspresyon Analizi	49
4.8 FotosynQ Ölçümleri ve Değerlendirmesi.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ.....	74

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
Φ	Fi
°C	Santigrad Derece
CH ₄	Metan
cm	Santimetre
Cq	Quantification cycles
CO ₂	Karbondioksit
Da	Dalton
GST	Glutatyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
K	Potasyum
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
μ mol	Mikromol
dk	Dakika
g	Gram
h	Saat
L	Litre
M	Molar
NaCl	Tuz
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
N	Azot
N ₂ O	Nitröz oksit
O ₂ ⁻	Süperoksit
OH ⁻	Hidroksil
pH	Potential of Hydrogen
pI	İzoelektrik Nokta
RuBP	Ribuloz Bisfosfat
sn	Saniye

Kısaltmalar

ANOVA	Analysis of Variance
ABA	Absisik Asit
BLAST	Basic Local Alingment Search Tool
cDNA	Complementary DNA
CDS	Kodlama Dizisi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinukleotidtrifostat Karışımı
ET	Etilen
FAO	Food and Agriculture Organization
FvP/FmP	Variable fluorescence/ Maximum Fluorescence
HDL	High-density Lipoprotein
HIN1	Harpin-indüklenen gen 1
JA	Jasmonik asit
LEA	Korunmuş Geç Embriyogenez Bol Protein
LEF	Linear Electron Flow
IFAD	International Fund for Agricultural Development
IPPC	The International Plant Protection Convention
MÖ	Milattan Önce
mRNA	Mesajcı RNA
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDR1	Irksal olmayan hastalık direnci geni 1
NPQt	Non-photosynthetic Quenching
RuBisCO	Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz
PAR	Photosynthetically Active Radiation
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Phi2	Quantum yield of Photosystem II
PhiNO	The ratio of incoming light
PhiNPQ	Quantum yield of non-photochemical quenching
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
qL	Fotosistem II Redoks Durumu
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SPAD	Relative chlorophyll content
UNCCD	United Nations Convention to Combat Desertification
UNICEF	United Nations Children's Fund
WFP	World Food Programme
WHO	World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Ayçiçek yaprak ve tohumu	4
Şekil 1.2 PhotosynQ internet sitesi giriş ekranı	10
Şekil 3.1 Phytozome genom veritabanı arayüzü	18
Şekil 3.2 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) ve NCBI Conserved Domain Database (CDD) arama ekranı	19
Şekil 3.3 Mega programı çalışma ekranı.....	20
Şekil 3.4 Interactive Tree of Life (iTOL) biyoinformatik aracı giriş ekranı.....	20
Şekil 3.5 Meme Suite veritabanı motif arama ekranı.....	21
Şekil 3.6 TBTools biyoinformatik programı motif, domain, ekson-intron analiz ekranı	22
Şekil 3.7 Wolf Psort hücresel lokalizasyon analizi programı	23
Şekil 3.8 PlantCARE promotor analizi arama ekranı	23
Şekil 3.9 Phyre2 üç boyutlu protein analiz uygulaması arayüzü	24
Şekil 3.10 Pmiren veritabanı arayüzü	25
Şekil 3.11 Zhaolab miRNA veritabanı arayüzü	25
Şekil 3.12 Cytoscape programı giriş ekranı	26
Şekil 3.13 TBtool programı MCSanX analiz ekranı	27
Şekil 3.14 Yetiştirme kabindeki bitkiler	29
Şekil 3.15 PhotosynQ ölçüm cihazı	30
Şekil 4.1 Ayçiçeği (<i>H. annuus</i>), <i>A. thaliana</i> ve <i>O. sativa</i> türlerinde NDR1/HIN1 benzeri (NHL) protein dizilerinin filogenetik ağaç analizi (Grup 1=Koyu Sarı, Grup 2=Yeşil, Grup 3= Mavi).....	38
Şekil 4.2 HaNHL üyelerinin motif, domain ile ekzon ve intron yapıları.....	39
Şekil 4.3 <i>HaNHL</i> genlerinin promotör bölgelerindeki öngörülen cis-acting elementlerin şematik gösterimi.....	40
Şekil 4.4 <i>H. annuus</i> ' ta seçilmiş HaNHL proteinlerinin tahmini üç boyutlu yapısal modelleri.....	42
Şekil 4.5 NDR1/HIN1 benzeri (NHL) genlerinin <i>Helianthus annuus</i> ve <i>Arabidopsis thaliana</i> arasındaki duplikasyon analizi	43
Şekil 4.6 NDR1/HIN1 benzeri (NHL) genlerinin <i>Helianthus annuus</i> ve <i>Oryza sativa</i> arasındaki duplikasyon analizi.....	43
Şekil 4.7 HaNHL genlerinin kromozomlar üzerindeki dağılımı.....	45
Şekil 4.8 <i>Helianthus annuus</i> genomu içindeki HaNHL genlerinin genom çapında sinteni analizi.....	45

Şekil 4.9 <i>HaNHL</i> genlerini hedefleyen miRNA'ların şematik gösterimi	46
Şekil 4.10 <i>Helianthus annuus</i> 'ta <i>HaNHL</i> genlerinin dokuya özgü gen ifade kalıpları ...	47
Şekil 4.11 Kuraklık stresi altındaki hassas ve toleranslı ayçiçeği yapraklarında farklı şekilde ifade edilen <i>HaNHL</i> genlerinin Heat-map analizi	49
Şekil 4.12 Kuraklığa dayanıklı ayçiçeği çeşidi Sun-2235' te kuraklık stresi altında <i>HaNHL</i> genlerinin qRT-PCR tabanlı ifade analizi	50
Şekil 4.13 Kuraklığa duyarlı ayçiçeği çeşidi Turay' da kuraklık stresi altında <i>HaNHL</i> genlerinin qRT-PCR tabanlı ekspresyon analizi	51
Şekil 4.14 Sun ayçiçeği çeşidinde kontrol ile stres grubu arasındaki gözlemsel farklılık	52
Şekil 4.15 Turay ayçiçeği çeşidinde kontrol ile stres grubu arasındaki gözlemsel farklılık	53
Şekil 4.16 Kuraklık boyunca PhiNPQ, NPQt ve PhiNO değerlerinin değişimi	54
Şekil 4.17 Kuraklık esnasında SPAD değişimi	54
Şekil 4.18 PAR, LEF, Phi2 değerlerinin kuraklık stresinde değişim grafiği	55
Şekil 4.19 PS1 Active Centers, FvP/FmP ve qL değerlerinin değişim grafiği	56
Şekil 4.20 Kuraklık esnasında bitki ağırlığı ve yaprak kalınlığı değişimi	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Dünya genelinde ayçiçek tohumu üretimi	4
Çizelge 1.2 Ayçiçeği tohumunun diğer tohumlarla kıyaslanması	5
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kitler, kodları ve firmalar	31
Çizelge 3.2 cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri.....	31
Çizelge 3.3 cDNA sentezi reaksiyon koşulları	32
Çizelge 3.4 qRT-PCR reaksiyon bileşenleri	32
Çizelge 3.5 qRT-PCR reaksiyon koşulları	33
Çizelge 4.1 HaNHL genlerinin kataloğu.....	35
Çizelge 4.2 HaNHL proteinlerinin sahip olduğu motifler	40
Çizelge 4.3 HaNHL ve AtNHL genleri arasındaki duplikasyonlar	43
Çizelge 4.4 HaNHL ve OzNHL genleri arasındaki duplikasyonlar.....	44

1. GİRİŞ

Gıda ihtiyacındaki büyük artışın karşılanamaması, insan nüfusunun sürekli yükselmesi ile birleşince kıtlığa, hastalıklara ve hatta ölümlere neden olmaktadır. Dünya nüfusu için gıda üretimini artırmak amacıyla tarım tekniklerine daha fazla önem verilmesi gerekmektedir (Pandey, 2018). Sağlıklı bir yaşam tarzı, insanların tükettiği gıdalarla doğrudan ilişkilidir (El-Hamidi ve Zaher, 2018). FAO, IFAD, UNICEF, WFP ve WHO tahminlerine göre, 2020 yılında dünyada 720 ila 811 milyon insan açlıkla karşı karşıya kalmıştır ve mevcut gıda üretimi küresel ihtiyaçları karşılamaya yeterli olmasına rağmen yaklaşık üç kişiden biri (2,37 milyar) yeterli gıdaya erişememiştir. Açlığın sebepleri dünya genelinde farklılık göstermekle beraber (askeri çatışmalar, doğal afetler, iklim değişikliği, elverişsiz toprak ve tarımsal üretim için çevresel koşullar), diğer yandan küresel gıda fazlasının dağıtımının çözülememesi başka bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Artan gıda talebi, gıda ve yem üretimi için kullanılan tarım arazilerine ve meralara olan talebi arttırmaktadır. Tahminlere göre, tarım arazisi alanı, nüfus artışına ve insan beslenmesindeki niteliksel değişikliklere ayak uydurabilmek için 2050 yılına kadar iki katına çıkmalıdır (Daszkiewicz, 2022). Ürün verimini ve genel anlamıyla üretkenliği artırmak amacıyla, birçok çiftçi zaman içinde geleneksel tarım tekniklerinin bir parçası olarak kimyasal gübreleri kullanmaya devam etmektedir. Ancak bu teknikler; ürün verimi, toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri, yüzey akışıyla taşınan su ve mikrobiyal ekolojik denge üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır (Elemike vd., 2019). Ek olarak küresel ölçekte yoğun tarımsal (gıda) üretimi, sıcaklıkları artıran ve iklim değişikliğine yol açan sera gazı emisyonlarına sebep olmaktadır. 2019 yılında, sera gazı emisyonlarının %30,6' sının (CO₂ eşdeğeri cinsinden), küresel gıda zinciri (tarımsal gıda sistemleri) kaynaklı olduğu bulunmuştur; bu gazlar arasında %21,35 CO₂, %78,03 N₂O ve %53,21 CH₄ olduğu analizlerle ortaya gösterilmiştir (Daszkiewicz, 2022). İklim değişikliğinin tarım ve gıda üretimi üzerinde çok yönlü ve gözlemlenebilir etkileri bulunmaktadır. Su kaynaklarına ulaşılabilirliği azaltmaktadır ve sonuç olarak toprak kuraklığına, geniş alanların çölleşmesine yol açmaktadır. İklim değişikliği, doğal afetlere (kuraklık, sel, kasırgalar, tayfunlar, siklonlar, hortumlar, fırtınalar) yol açar ve hava anomalileri riskini arttıran en önemli faktörlerden biridir. Bu olaylar ürünlere zarar vermektedir ve mahsul verimini düşürmektedir. İlaveten seller sırasında toprak kirlenmektedir. Aşırı hava

koşullarından kalıcı olarak etkilenen bölgelerdeki arazilerin tarıma uygunluğu azalmaktadır, bu durumda uzun vadeli etkiler de görülebilmektedir. Bu anomaliler gıda güvenliği için bir tehdit oluşturmaktadır. Örneğin, 2020'deki uzun süreli kuraklık, ürün verim potansiyelinde bir azalmaya yol açmıştır ve mısır verimini %6,0, kışlık buğday verimini %3,0, soya fasulyesi verimini %5,4 ve pirinç verimini 1981-2010 ortalamasına göre %1,8 oranında düşürmüştür (Daszkiewicz, 2022; Romanello vd., 2021).

Ayçiçeği, *Helianthus annuus* L., Asteraceae ailesine bağlı *Helianthus* cinsine ait tek yıllık bir bitkidir. *Helianthus* cinsi 19 alt tür ve 51 tür içerir. Bunların 37'si çok yıllık, 14'ü ise tek yıllıktır ve kromozom sayıları türden türe farklılık göstermektedir (Khalil vd., 2015). İspanyol kâşifler tarafından 16. yüzyılda anavatanı olan Kuzey Amerika'dan Avrupa'ya getirilmiştir. Doğal ortamında yetişmesi için gerekli olan sıcaklık 20-25°C arasında değişmektedir (Vilvert vd., 2018). Ayçiçeği terimi, güneşe göre yönelme hareketinden (heliotropizm) köken almaktadır. Geniş, sert ve dişli yaprakları, uzun kazık kökü, tüylü sapları ve güneşe bakan büyük, yuvarlak, sarı çiçek başları ile ayırt edilmektedir (Vilvert vd., 2018). Daha derin topraklardan su emebilen güçlü bir kök sistemine sahiptir ve yaprağın her iki tarafında stoma bulunması nedeniyle yüksek fotosentez kabiliyeti bulunmaktadır (Wu vd., 2022b). Ayçiçeği, yüksekliği 0,7 ila 3,5 m arasında değişen bir dikottur (Tekin vd., 1998). Yaprakları pürüzlü, geniş, kaba dişlidir. Genellikle ayçiçeğinin "çiçeği" olarak adlandırılan yapı, aslında çok sayıda küçük yapraklı çiçeklerden ("çiçekçikler") oluşan, pseudanthium veya captulum adı verilen bir "çiçek başı"dır. Yapraklara benzeyen dış çiçeklere ışın çiçekleri denmektedir. Bu ışın çiçekleri, asimetrik bir düzende kaynaşmış yapraklardan oluşan bir ligule sahiptir. Başın ortasındaki çiçekler disk çiçekleri olarak bilinir ve bunlar spiral olarak düzenlenmiştir. Tozlaşma, genellikle böcekler tarafından yapılırsa, çiçekler meyveye (tohumlara) dönüşür. Ana kök güçlüdür, 3 m derinliğe kadar nüfuz eder ve yüzey köklerinin geniş yanal yayılımına sahiptir. *H. annuus* tohumları, her biri bir çekirdekten (gerçek tohum) ve bir perikarptan (kabuk) oluşan akenlerdir (veya meyveler). Perikarp dört kenarlı ve düzdür (Becker vd., 2023). Tohumlar yaklaşık 0,6 cm uzunluğunda ve 0,3 cm genişliğindedir. Genellikle siyah tohum kabuğuna sahiptir, tüketim için yetiştirilen tohumların (yağ içeriği yaklaşık %30) ise genellikle koyu kahverengi veya beyaz bir kabuğu bulunmaktadır. Çekirdek, embriyo, endosperm ve tohum kabuğundan

oluşmaktadır. Perikarp (ana doku) birkaç katmana sahiptir. Bu katmanlar; kütikül (dış katman), epidermis, hipodermis, fitomelanin katmanı, fibroz doku ve çekirdeğe bitişik parankimal katmanlardır (Becker vd., 2023). Pseudanthium (çiçek başı) 1000 ila 4000 çiçekçik içerebilmektedir ve aynı sayıda tohum potansiyeline sahiptir. Bir pseudanthiumdaki ortalama tohum verimi 1200 ila 1500 arasında değişmektedir (Becker vd., 2023). Tohumlar, yaklaşık %20 proteinden oluşmaktadır. Tohumdaki depo proteinler, çimlenmeden sonra fide gelişimi için gereken kükürt ve azotu sağlamaktadır (Youle ve Huang, 1978).

Dünya çapında yetiştirilen ve tüketilen ayçiçeği tohumu; protein, doymamış yağlar, lif, vitaminler (özellikle E), selenyum, bakır, çinko, demir dahil olmak üzere çok sayıda besleyici bileşen sağlar. Yemeklik yağ olarak kullanılabilir, kavrulmuş veya tuzlanmış bir atıştırılabilir olarak tüketilebilir, ayrıca ayçiçeği tohumundan şekerleme yemişi olarak yararlanılabilir. Ayçiçeği tohumu sülfürik amino asitler açısından zengin olmasından dolayı, onu hayvan yemi olarak geniş kapsamda kullanılmaktadır (Guo vd., 2017). Ek olarak ayçiçeği tohumu, özellikle oleik ve linoleik asitler olmak üzere yüksek konsantrasyonlarda çoklu doymamış yağ asitleri ihtiva eder. Doymamış yağ asidi, insan tüketimi bakımından daha sağlıklıdır ve düşük yoğunluklu lipoprotein seviyelerini azaltarak kandaki kolesterol oranlarının düzenlenmesine yardımcı olur. Bu da koroner kalp hastalıklarının ortaya çıkmasında önemli bir azalmaya yol açar (Celik Altunoglu vd., 2018). Oleik asit, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterolü artırabilen ve dolayısıyla kalp krizi riskini azaltabilen tekli doymamış bir omega-9 yağ asididir. Oleik asit ayrıca meme kanseri ile daha güçlü bir ilişki göstermektedir. Buna en güçlü kanıt, oleik asit kaynaklarının alımının koruyucu görüldüğü güney Avrupa popülasyonları üzerindeki çalışmalardan gelmektedir (S. Guo vd., 2017). Araştırmalar, aynı zamanda ayçiçeği tohumunun antioksidan özellikler taşıdığını göstermektedir (Bester vd., 2010).



Şekil 1.1 Ayçiçek yaprak ve tohumu (Puttha vd., 2023 'ten uyarlanmıştır)

Çizelge 1.1 Dünya genelinde en çok ayçiçek tohumu üretimini, ülke bazında göstermektedir. Çizelgeden görüleceği üzere 2024/2025 yıllarında, 1,35 milyon ton ile Türkiye 7. sıraya yer almıştır.

Çizelge 1.1 Dünya genelinde ayçiçek tohumu üretimi

Ülke	Global Üretim (%)	Toplam Üretim (2024/2025, Metrik Ton)
Rusya	32%	16.9 Milyon
Ukrayna	25%	13 Milyon
Avrupa Birliği	16%	8.53 Milyon
Arjantin	10%	5.1 Milyon
Kazakistan	3%	1.83 Milyon
Çin	3%	1.75 Milyon
Türkiye	3%	1.35 Milyon

(Anonymous 2025a)

FAO kaynaklarına göre ayçiçeği, dünya genelinde soya fasulyesi, kolza tohumu ve aspiden sonra en kârlı ve ekonomik dördüncü yağ bitkisidir (Çizelge 1.2) (Anonymous 2025). Bitki bilimciler tarafından, uygun koşullar altında yüksek yağ verimine sahip çeşitler elde etmek amacıyla yetiştirilmektedir. Besinleri sınırlayan iklimsel, edafik (toprakla ilgili) ve yönetimsel faktörlerin elverişsiz koşulları; tohum, yağ içeriği ve diğer ürünler açısından ayçiçeği veriminde azalmaya yol açabilmektedir. Organik gübrenin sentetik gübreyle birlikte uygulanması, ayçiçeğinin verimini ve kalitesini etkilemektedir (Enebe ve Babalola, 2018). Ayrıca ayçiçeği, toprağın iyileştirilmesinde kullanılabilir. Bunun yanı sıra sağlık ürünleri, yeşil gübre ve biyoyakıt için hammadde olarak da kullanılmaktadır. Her yıl artan ayçiçeği tohumu tüketimi, bu bitkiyi dünya genelinde önemli bir yenilebilir yağ kaynağı haline getirmektedir (Huang vd., 2022).

Çizelge 1.2 Ayçiçeği tohumunun diğer tohumlarla kıyaslanması

Yağlı tohum	Üretim (milyon metrik ton) 2017-2022 Arası					
	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Yağ palmyesi	69.63	72.31	79.21	76.17	80.74	78.87
Soya tohumu	56.13	56,79	59,47	59,05	61.81	58.05
Kolza tohumu	24.3	24.75	28,04	25.19	26,59	26.69
Ayçiçeği tohumu	18.14	18.39	20,05	20.56	18.43	20.26

(Anonymous 2025b)

Bitkiler sıcaklık, kuraklık, aşırı yağış ve aşırı tuzluluk gibi çeşitli abiyotik streslere karşı fizyolojik ve metabolik olarak uyum sağlama yeteneğine sahiptir (Korkmaz ve Durmaz, 2017). Bitkilerin stres koşullarına karşı savunma mekanizmaları hâlâ tam olarak anlaşılammıştır, ancak bu konuda birçok çalışma yapılmıştır (Örs ve Ekinci, 2015). Bitkiler, karşılaştıkları olumsuz koşulların etkilerini azaltmak veya önlemek amacıyla koruyucu moleküller sentezleme, reaktif oksijen türleri (ROS) biriktirme, iyon ve makromolekül homeostazını sağlama gibi mekanizmalar kullanır. Bu zor koşullara karşı proteinlerin görevleri bitki savunma mekanizmaları açısından oldukça önemlidir. İklim

değişikliği senaryosunda ve erken kuraklıkların başlamasıyla, ürünler kuraklık stresinden etkilenebilir (Debaeke vd., 2017). Su stresinin yarattığı soruna ek olarak, sulamalı gıda üretim sistemlerine ayrılan alanın azalması ve bunun sonucunda daha az gıda üretiminin gerçekleşmesi beklenmektedir (Alexandratos ve Bruinsma, 2012; Aroca, 2013). Bununla birlikte suyu evsel, endüstriyel ve tarımsal amaçla kullananlar arasındaki su rekabeti nedeniyle sulanan arazinin genişletilmesi mümkün değildir (Hussain vd., 2018). Farklı kullanıcılar arasındaki şiddetli su rekabeti, sulanan arazileri ağırlıklı olarak yağmurla beslenen sistemlere dönüştürecek ve sonuçta ürünler periyodik olarak kuraklık stresi yaşamak zorunda kalacaktır (Elliott vd., 2014). Dolayısıyla, tüm tarımsal ürünler ve hatta ayçiçeği gibi orta derecede kuraklığa dayanıklı ürünler bile kuraklık stresinden ciddi şekilde etkilenecektir. Son yıllarda kurak ve yarı kurak iklime sahip ülkeler de dahil olmak üzere Asya'da ve ötesinde şiddetli kuraklık olayları kaydedilmiştir. Bu durum kuraklık stresinin yönetimini daha da zorlaştırmaktadır (Hussain vd., 2018).

Kuraklık, bitki büyümesini tehdit eden küresel bir sorundur ve Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli'nde (IPCC), küresel ısınma nedeniyle önümüzdeki yıllarda kuraklıkların sıklığı ve süresinin artacağı rapor edilmiştir (Sheffield ve Wood, 2008). Bitkilerde kuraklık stresine karşı; stomaların kapanması, gaz değişiminin azalması, turgor basıncının düşmesi, toplam su potansiyelinin azalması, solgunluk ve hücre büyümesinde azalma gibi fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir (Mahalingam, 2015). Kuraklık stresi, moleküler yollarla birçok biyokimyasal ve fizyolojik süreci etkileyerek bitki büyümesini, gelişimini ve üretimini olumsuz etkiler (Prasad vd., 2011). Kuraklık stresi, dünya genelinde birçok bölgede ayçiçeğinin tohumunda azalma ve yağ veriminde düşme ile korelasyon göstermektedir. Su kıtlığı, kuru madde dağılımını etkiler ve biyokütle üretiminde yer alan fizyolojik ve biyokimyasal süreçler üzerinde önemli etkilere sahiptir (Hussain vd., 2017). Kuraklık mekanizmasını anlamaya yönelik ilk çalışmalar fizyolojik parametre analizleri üzerine olmuştur. Daha sonra abiyotik stresle ilgili olarak özellikle absisik asit (ABA) biyosentezi üzerine yapılan biyokimyasal araştırmalar artmıştır. ABA biyosentezi, stomaların kapanmasını sağlayarak su kaybını azaltır (Kim vd., 2010).

Kuraklık stresi altındaki ayçiçeğinde fotosentez süreci iki ayrı mekanizmadan etkilenir: (1) stomaların kapanması nedeniyle yaprak içinde CO₂ difüzyonunun azalması ve (2) CO₂

metabolizmasının inhibisyonudur (Tezara vd., 1999). Stomaların kapanması nedeniyle düşük fotosentez oranından kaynaklı olarak, ayçiçeğinin büyümesi ve verimliliği, nem eksikliği koşullarında büyük ölçüde etkilenir ve böylece yapraklara CO₂ difüzyonu kısıtlanır (Flexas vd., 2004). RuBP (Ribuloz bisfosfat) fotosentezde önemli bir role sahiptir ve karanlık reaksiyonu için anahtar moleküldür. Strese girmiş sağlam yapraklarda karboksilasyon ve RuBP rejenerasyon kapasitesi ciddi şekilde azalır (Galmés vd., 2013), ancak kuraklığa dayanıklı genotiplerde miktarı, uzun süreli kuraklığa yanıt olarak artar (Pankovic' vd., 1999). Bu da kuraklık toleransının bir işareti olarak daha fazla RuBP üretimi demektir (Hussain vd., 2018). Kuraklık şiddetinin artmasıyla birlikte ayçiçeği yapraklarında stoma iletkenliği ve CO₂ asimilasyonu azalır (Ghobadi vd., 2013; Iqbal vd., 2009; Joã Correia vd., 2013). Ayçiçeği, sağlam kazık kök sistemi nedeniyle mevcut toprak suyunu kullanma konusunda daha güçlü bir yeteneğe sahiptir (Hussain vd., 2018). Kuraklık stresi, ek olarak mineral emilimini önemli ölçüde azaltır ve besin dengesini de bozar (Gunes vd., 2008), ancak bitki türleri ve tür içindeki genotipler, su eksikliğine karşı verdikleri tepkilerde farklılıklar gösterir (Hussain vd., 2018). Hussain vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, kuraklığın iki ayçiçeği melezinde azot (N) ve potasyum (K) emilimini azalttığı neden bildirilmiştir (Hussain vd., 2016). Kuraklık stresi altında bütün gelişim süreci boyunca N ve K kullanımı; toprağın fiziko-kimyasal özelliklerinden, kuraklığın süresi ve yoğunluğundan, organizmanın evrimsel geçmişi dahil olmak üzere bir dizi faktörden etkilenmektedir (Killingbeck, 1996; Silla ve Escudero, 2006). Stoma kapanması, epidermal hücrelerde turgorun geri basınç sistemi ile gerçekleşir. Bu mekanizmadan da K sorumludur, yeteri kadar K alamayan bitki, stomalarını kapatamaz (Hussain vd., 2018).

Reaktif oksijen türleri (ROS), hücre sinyalizasyonunda önemli rol oynadıkları için normal koşullar altında bile, bitkilerde sürekli üretilen serbest oksijen radikalleridir. Bununla birlikte, ROS'un aşırı üretimi oksidatif strese yol açar. Bitkilerdeki başlıca ROS molekülleri süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikallerini (OH⁻) içerir; bunlar arasında OH⁻ en reaktif türdür (Impa vd., 2012). Bunlar bitkinin fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri için oldukça toksiktir moleküllerdir (El-Shabrawi vd., 2010). Kuraklık stresi, çoğu hücrenel bileşene zarar verebilen farklı ROS türlerinin aşırı üretimine neden olur (Hussain vd., 2018).

Gelecek yüzyılın gıda ve enerji ihtiyaçlarını karşılayacak ileri düzey bitki ıslahı ve yönetim teknikleri; büyük ölçekli, yüksek verimli bitki fenotipleme süreçlerine bağlıdır. Bu süreçler, bitki biyolojisinde ve tarımda giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Kuhlger ve ark. (2016) tarafından geliştirilen, düşük maliyetli ancak gelişmiş, açık kaynaklı bilimsel bir cihaz olan PhotosynQ-MultispeQ; araştırmacılar, bitki ıslahçıları, eğitimciler, çiftçiler ve vatandaşların yüksek kaliteli saha verileri toplamasına olanak tanımaktadır. PhotosynQ hem sahada fenotipleme ve ıslah için son derece önemlidir, hem de laboratuvar çalışmalarında birçok parametreyi elde etmek amacıyla bu cihazdan istifade edilmektedir. MultispeQ; pek çok çevresel faktörleri (sıcaklık, nem, CO₂, zaman, konum, ışık yoğunluğu ve kalitesi), fotosentetik verileri (fotosistem II kuantum verimi-ΦII, fotokimyasal olmayan eksiton söndürülmesi-NPQ, fotosistem II fotoinhibisyonu, ışıkla yönlendirilen proton taşınımı, tilakoid proton itici gücü, klorofil pigmenti gibi) ve biyokimyasal parametreleri (Doğrusal elektron akışı-LEF, Fotosentetik Olarak Aktif Radyasyonu-PAR gibi) ölçmektedir. Ölçülen bu değerler, strese yanıt açısından bitkideki değişimleri değerlendirmede yardımcı olabilmektedir. Ek olarak her bitkinin farklı stres faktörlerine verdiği yanıt farklıdır. Bu cihaz, strese yanıtı anlamada ve türleri kıyaslama açısından biyokimyasal ve fotosentetik olarak değerlendirmede katkı sağlar (Kuhlger vd., 2016).

Büyük ölçekli, toplu bitki fenotiplemesi için yeni yaklaşımlara duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Gıda ve biyoyakıt üretimi için ortaya çıkan ihtiyaçları karşılamak, bitki verimliliğinde önemli ilerlemeler gerektirecektir. Aynı zamanda iklimdeki hızlı değişiklikler, mahsullerin çevreye karşı dayanıklılığını güçlendirmeyi zorunlu hale getirecektir. Bitki genetiği ve biyokimyasındaki son gelişmeler, yeni bitki geliştirme amacıyla prensipte bu sorunları ele alabilecek çok sayıda temel veri sağlamıştır. Ancak, özellikle tarım ürünlerinin yetiştirildiği dinamik çevre koşulları altında bitkilerin fenotiplerini değerlendirme kısmı sınırlı kalmıştır. Bitki fenotiplerinin saha koşullarında ölçülmesi; hem biyolojilerinin temel olarak anlaşılması, hem de mühendislik yoluyla performanslarının iyileştirilmesi için son derece önemlidir (Kuhlger vd., 2016). Fakat, işlem oldukça karmaşıktır çünkü bitkinin fonksiyonları, birden fazla etkileşimli çevresel ve yönetimsel faktörlere bağlıdır. Dolayısıyla kontrollü denemeler altında görülen fenotipler, belirli saha koşulları ve ortamlarında görülenlerden oldukça farklı olabilir

(Fahlgren vd., 2015; White vd., 2012). Bu çevresel bağımlılık, özellikle çevre koşullarındaki hızlı değişimlerden güçlü bir şekilde etkilenen fotosentez süreci için kritiktir (Cruz vd., 2016; Tikkanen vd., 2012). PhotosynQ ve MultispeQ projeleri, bitkiler için laboratuvar ve değişken saha arasındaki boşlukları kapatmayı amaçlamaktadır. MultispeQ cihazı, arazide bilmeyenler için bile kullanımı kolaydır. Açık kaynaklı ve yeni tekniklerin hızla dahil edilmesine olanak verecek şekilde tasarlanmıştır. Ayrıca protokollerin, verilerin ve analiz araçlarının paylaşımı için kolayca erişilebilen zengin bir kullanıcı arayüzüne sahiptir. Verilere, internet bağlantısı olan modern cep telefonları, tabletler veya düşük maliyetli dizüstü bilgisayarlarla bile ulaşılabilir.

Bu cihazın ölçtüğü değerlere bakılacak olursa; Fotosentetik Olarak Aktif Radyasyon (PAR) değerini algılamak; fotosentezin ışık koşullarına verdiği tepkileri anlamak ve doğrusal elektron akışını (LEF) hesaplamak için kritik öneme sahiptir. PAR sensörleri, genellikle yeşil bitki fotosentezini desteklemede aktif olan dalga boyu aralığı (400–700 nm) üzerindeki ışık yoğunluğunu ($\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ biriminde) ölçer. Bağlı klorofil içeriği (SPAD), bitki azot durumunun, hastalıkların veya diğer streslerin başlangıcının bir göstergesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Culman vd., 2013; de Andrade vd., 2015; Xiong vd., 2015). MultispeQ, kırmızı (650 nm) ve kızılötesi (940 nm) ışığın bağlı geçirgenliklerini ölçerek bağlı klorofil içeriğini tahmin etmek amacıyla SPAD parametresinin değiştirilmiş bir versiyonunu kullanır (Markwell vd. 1995).

Genty ve çalışma arkadaşlarının denklemlerini kullanarak, hem fotosistem II'nin (PSII) maksimum kuantum verimliliği (F_vP/F_mP), hem de sabit durum verimliliği (Φ_{II}) hesaplanır (Genty vd., 1989). Elektron taşıyıcılarını oksitlemek için kısa bir karanlık periyot boyunca uzak kırmızı aydınlatmanın uygulanması, minimum floresan veriminin tahmin edilmesine olanak sağlar. Bu ölçüm, emilen ışığın fotokimya için kullanılmadığı durumlarda oluşan fotokimyasal olmayan eksiton söndürme (NPQ) (Φ_{NPQ}) ve düzenleyici olmayan enerji dağılımının (Φ_{NO}) kuantum veriminin hesaplanmasına imkan tanır (Baker vd., 2007; Kramer vd., 2004).



Şekil 1.2 PhotosynQ internet sitesi giriş ekranı

Stres ile ilişkili PhotosynQ verileri incelenirken, aynı zamanda strese etkili genleri analiz etmek son derece önemli ve gereklidir. Hem biyotik hem de abiyotik stresle ilişkili olan NHL gen ailesi, bu tez kapsamında analizi yapılan gen ailesidir. *Arabidopsis thaliana*'da keşfedilmiş olan *NDR1/HIN1*-benzeri (*NHL*) genler, Harpin-indüklenen gen 1 (*HIN1*) ve Irksal olmayan hastalık direnci geni 1 (*NDR1*) den oluşmuştur. *HIN1*, harpin proteini tarafından indüklenir ve bitki savunma mekanizmalarında, büyüme ve gelişmede, abiyotik streslere karşı dirençte önemli rol oynar. NHL proteinlerinin çoğu LEA (Late Embryogenesis Abundant) domaini içerir (Liu vd., 2020). NHL proteinlerinin amino asit dizileri bir veya iki olası transmembran domainine ve işlevi bilinmeyen üç korunmuş motife sahiptir. Bunlar arasında motif 1 daha az korunmuş haldeyken, diğer iki motif evrimsel anlamda daha yüksek oranda korunarak varlığını sürdürmüştür (Shahbaz vd., 2023). Önceki çalışmalar, NHL3 ve NDR1'in glikozile edilmiş plazma membran proteinleri olduğunu göstermiştir (Varet vd., 2003). Ek olarak, korunmuş geç embriyogenez bol (LEA) protein domaini genellikle çoğu NHL gen ailesi üyelerinde bulunur (Peng vd. 2017). LEA proteinleri çoğunlukla ozmotik düzenlemede yer alır. LEA proteinlerini kodlayan genler, tohumun embriyonik gelişimi sırasında ve bitkinin ısı,

düşük sıcaklık ve kuraklık gibi çevresel streslere verdiği tepki sırasında önemli ölçüde ifade edilmektedir (Gardy vd., 2005). Isı stresi; bitkilerde metabolik iyon düzenlemesi, turgor dengesi, enzimatik mekanizmalar gibi bir dizi düzenleyici sistemleri etkileyen en zararlı abiyotik streslerden biridir. Dolayısıyla bu stres, büyüme geriliğine ve nihayetinde bu tür ortamlarda büyüyen bitkilerin ölümüne yol açar (Shahbaz vd., 2023).

NHL gen ailesi üyelerinin, bitki hastalık direncinde önemli bir rol oynadığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Peng vd. 2017). Maldonado ve arkadaşları, *A. thaliana* türünde *GmNHL1* ve *GmNHL8* genlerinin aşırı ekspresyonunun, jasmonik asit (JA) ve etilen (ET) yollarını aktive ederek *Heterodera glycines* patojenine karşı direnci arttırdığını raporlamışlardır. Bu yüzden *NHL1* ve *NHL8* genlerinin, patojenlere karşı bitki savunma mekanizmasına katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Maldonado vd., 2014).

Biberde (*Capsicum annuum* L.), genom çapında yapılan bir analizde on beş *NHL* geni tanımlanmış ve bu genlerin fonksiyonları farklı abiyotik stresler altında karakterize edilmiştir (Liu vd., 2020). *Brassica napus*' tan izole edilen bir *NHL* üyesinin, *BnNHL18A*, tuz (NaCl), H₂O₂, ethephon ve salisilik asit dahil olmak üzere birçok farklı streste kritik rol oynadığı gösterilmiştir (Lee vd., 2006).

Arabidopsis' te, biyotik ve abiyotik stresle ilişkili 45 *NHL* geni tanımlanmıştır. *AtNHL6* geninin; kuraklık, tuzluluk ve ozmotik stres gibi abiyotik stres koşulları altında ABA sinyal yollarını ve biyosentezini düzenleyerek tohum çimlenmesine katıldığı gösterilmiştir. Ayrıca, bu genlerin kuraklık ve düşük sıcaklık gibi çevresel stresler altında yüksek düzeyde stimüle edildiği saptanmıştır (Bao vd., 2016; Wang vd., 2022). Biberde (*Capsicum annuum* L.) yapılan genom çapında analizde 15 *NHL* geni tanımlanmış ve bu genlerin farklı abiyotik stresler altındaki ifade düzeyleri incelenmiştir. İlgili genlerin hem biyotik (mikroorganizmalar ve böcekler gibi) hem de abiyotik (soğuk, tuz, kuraklık gibi) streslerde önemli rol oynadıkları belirlenmiştir. Ayrıca bu genlerin jasmonik asit (JA) ve salisilik asit (SA) ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Liu vd., 2020). Başka bir çalışmada ise tuzlu veya alkali stresle birlikte üretilen bazı transkripsiyon faktörlerinin NHL yolağı ile birlikte aynı zamanda ifade edildiği ve tuz/alkali koşullara karşı cevabı düzenledikleri gösterilmiştir (Zhang vd., 2022).

Bu tez kapsamında, ayçiçeği genomunda bulunan *NHL* genlerinin tanımlanması, kromozomal dağılımlarının belirlenmesi, gen organizasyonu, filogenetik ilişkileri, korunmuş motif bölgeleri, gen ontolojisi analizleri ve ilgili proteinlerin tahmin edilen üç boyutlu modellerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca, bu genleri hedefleyen miRNA gruplarının belirlenmesi, cis-aktif elementlerin analizi, tandem ve segmental duplikasyonların hesaplanması, genler arasındaki ayrışma oranlarının belirlenmesi ve diğer türlerle olan ortolog ilişkilerin tanımlanması planlanmıştır.

Çalışmanın diğer aşamasında ise açık erişimli veri tabanlarından elde edilen verilere dayalı olarak tanımlanan ayçiçeği *NHL* gen ailesi üyelerinin ifade seviyeleri, heat-map oluşturularak incelenmiştir. Ayrıca qRT-PCR ile elde edilen gen ifade düzeyleri, tamamlayıcı analizlerle desteklenerek direnç özelliklerine sahip potansiyel aday genlerin belirlenmesi planlanmıştır. Ek olarak, fotosentetik parametrelerin PhotosynQ cihazı ile elde edilmesi ve bu parametrelerin analizi de hedeflenmiştir.

Bu çalışma, değerli bir tarım ürünü olan ayçiçeğinde stresle ilişkili *NHL* proteinlerinin yapısı, organizasyonu ve evriminin aydınlatılması açısından önemlidir. Ayrıca bu çalışmada, omik yaklaşımlar sayesinde, gen ifade analizleri aracılığıyla bitki stres mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlanması beklenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

Ortalama küresel sıcaklık, Dünya atmosferinde artan CO₂ emisyonları nedeniyle sanayi devri öncesi seviyelerin $1,2 \pm 0,1$ °C üzerine çıkmıştır (Song vd., 2021). Sterk ve Stoorvogel, UNCCD verilerine dayanarak her yıl 12 milyon hektar arazinin çölleşme ve kuraklık nedeniyle kaybedildiğini, bunun 20 milyon ton tahıl kaybına eşdeğer olduğunu ileri sürmüşlerdir (Sterk ve Stoorvogel, 2020). Bu sorun en çok Afrika, Asya ve Latin Amerika'da belirgindir; ancak, aynı zamanda toprak bozulma riskinin daha yüksek olduğu Doğu Avrupa ve Akdeniz ülkeleri (Portekiz, İspanya, İtalya, Yunanistan, Arnavutluk, Bosna-Hersek, Hırvatistan, Kıbrıs, Fransa, Malta, Slovenya, İspanya ve Türkiye) dahil olmak üzere, Dünya'nın diğer bölgelerini de etkilemektedir (Salvia vd., 2019).

H. annuus, yüksek adaptasyon yeteneği sayesinde farklı ekolojik koşullarda yetiştirilebildiği için yüksek kalitede yemeklik yağ içermesinden dolayı en önemli tohum bitkilerindedir. Potansiyel evapotranspirasyonun büyüme mevsimi boyunca yağışı aştığı Türkiye'nin Orta Anadolu bölgesinde, yaygın olarak sulama yapılmadan yetiştirilmektedir. Bölgede toprak neminin eksikliği ve yağışın düzensiz dağılımı, su stresine ve verimin düşmesine neden olmaktadır (Kaya ve Kolsarici, 2011).

Ayçiçeği kuraklığa orta derecede dayanıklı bir bitki olmasına rağmen (kuraklıktan kaçma davranışından dolayı), yetersiz toprak nemi ve terleme oranlarını düzenlemedeki yetersizliği nedeniyle erken çiçeklenmeden aken dolumuna kadar kuraklığa ve ısı stresine karşı oldukça hassastır (García-López vd., 2014). Toprak nemindeki düşüş yaprak solmasına yol açar ve bu da düşük yağış alan yarı kurak alanlarda önemli verim kaybına neden olmaktadır (Aboudrare vd., 2006). Birkaç çalışma, kuraklık stresinin ayçiçeği aken verimini, yağ miktarını ve kalitesini küresel olarak önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Hussain vd., 2018). Ancak kuraklık stresinin ayçiçeği verimliliği üzerindeki etkileri tüm büyüme aşamalarında aynı değildir. Çimlenme, anter ve aken oluşumu gibi bazı özel süreçlerde kuraklığa maruz kalma, ayçiçeğinde %50' ye varan verim düşmesine neden olur (Kalarani vd.,2004; Hussain vd., 2008). Sezon başındaki kuraklık stresi çimlenmeyi, gövde uzamasını ve yaprak alanını baskılar. Anterdeki kuraklık stresi ise polen kısırlığına bağlı olarak boş aken oluşmasına neden olur (Hussain

vd., 2018). İlk büyüme aşamalarında daha fazla kullanılabilir su, iyi vejetatif büyümeyle sonuçlanır. Ancak çiçeklenme ve tohum gelişimi aşamalarında oluşabilecek düşük nem ortamı, yüksek terleme nedeniyle bitkideki verimi önemli ölçüde azaltır (Aboudrare vd., 2006).

Ayçiçeği, uzun ve derin kök sistemi sayesinde daha derin toprak katmanlarından su çekebilir (Hussain vd., 2018). *H. annuus*, sıklıkla nem koşullarının zayıf olduğu yataklarda ve sırtlarda yetişir. Bu aşamada yağış eksikliği, ek sulama imkânının bulunmadığı kurak iklimlerde düzensiz çimlenme ve fide çıkışına neden olabilir (Angadi ve Entz, 2002; Kaya vd., 2006; Mwale vd., 2003). Daha önceki çalışmalar, ayçiçeğindeki kuraklık stresinin, bu bitki tohumunun çimlenmesini olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir (Hussain vd., 2018). Kuraklık stresi çok boyutlu bir süreçtir ve bitkileri tüm organizasyonel düzeyde etkiler. Çimlenmeden sonra oluşan kuraklık stresi; su potansiyelinin, bağıl su içeriğinin ve bitki hücrelerindeki turgorun azalmasına yol açar, bu da bitkilerin büyümesi üzerinde sistematik bir etkiye sahiptir. Kuraklık durumunda sitozoldeki çözünen maddelerin konsantrasyonu yükselir. Bu değişiklikler hücre uzamasını azaltarak büyümenin inhibisyonuna yol açar (Hussain vd., 2018). Büyüme inhibisyonunu daha az karbon asimilasyonu, dengesiz mineral alımı ve bitkilerin solmasına neden olan absisik asit (ABA) birikimi izler (Aroca, 2013; Lisar vd., 2012). Kuraklık stresinin mineral beslenmesi ve metabolizma üzerindeki olumsuz etkileri, yaprak alanının azalmasına neden olur.

Canavar ve Kaptan (2014) yaptıkları çalışmada, kuraklık stresi altındaki üç ayçiçeği melezinin besin maddelerini (Fosfor, potasyum, magnezyum, kalsiyum, demir, çinko, bakır, manganez ve sodyum) alımını araştırmıştır. Su stresinin bu besin maddelerinin alımı üzerinde olumsuz etkisi yarattığını, ancak genotiplerin tepkilerinde farklılık olduğunu göstermişlerdir (Canavar ve Kaptan, 2014).

Kuraklık stresi ayçiçeğinde de ROS üretimini uyarır (Soleimanzadeh, 2012), bunların arasında en baskın olanı süperoksit radikalleridir. Su eksikliği hücre hacminde büzölmeye yol açar, bu da hücresel içerikleri daha viskoz hale getirir. Sonuçta bu durum, proteinlerin denatürasyonuna ve agregasyonuna neden olur (Hoekstra vd., 2001). Oluşan fenomen

fotosentezde yer alan enzimlerin normal fonksiyon gösterememesine yol açar. Kuraklığa yanıt olarak oluşan kısmi stoma kapanması, CO₂ girişini ve bu molekülün fotosentez için kullanılabilirliğini sınırlar. Bu sınırlama, RuBisCO enziminin karboksilasyon verimliliğinin azalmasına neden olur, daha sonra da oksijenasyonu artırır. Ek olarak, gerçekleşen mekanizmalar arasında foto-solunum kayıpları vardır ve ROS üretimi artar (Noctor vd., 2002). Ayrıca, fotosentezde CO₂ fiksasyonunun düşmesi, kloroplasttaki elektron taşıma zincirinin son elektron alıcısı olan NADP⁺ molekülünün rejenerasyonunu azaltmaktadır. Dolayısıyla elektron taşıma zincirinin aşırı azalması, ROS üretimine neden olmaktadır (Sgherri vd., 1996.; Smirnov, 1993). Kuraklık stresinin bütünsel anlamda yönetilebilmesi için; bitkilerin morfolojisi ve fizyolojisi üzerindeki etkilerini anlamak gerekir.

Proteinler; yüksek sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk gibi çevresel değişikliklere karşı yeni fenotiplerin ortaya çıkmasını ve bitkilerin adaptasyonunu sağlar (Korkmaz ve Durmaz, 2017). Yapılan çalışmalar, özellikle kuraklık ve düşük sıcaklık gibi stresler altında LEA domaini içeren *NHL* genlerinin, yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermiştir (Liu vd., 2020).

Veritabanlarına dayanarak yapılan ilk çalışmalar, *A. thaliana*'daki *NDRI* ve *HINI* genleriyle önemli benzerliklere sahip en az 29 *NHL* gen ailesi üyesinin olduğunu öne sürmüştür. Daha sonra bu sayı, *Arabidopsis*' in tüm genom diziliminin analizi ile 44'e çıkarılmıştır (Zheng vd., 2004). *NHL* gen ailesi üyeleri, *Triticum aestivum*, *Glycine max*, *Solanum tuberosum*, *Mangifera indica* ve *Capsicum annuum* dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerinde çalışılmış ve raporlanmıştır (Shahbaz vd., 2023). Biberde, genom çapında yapılan biyoinformatik analizler yoluyla 15 *NHL* geni tanımlanmıştır. Ek olarak çevresel stres koşullarında, *NHL* genlerinin potansiyel önemi ortaya konmuştur (Liu vd., 2020).

Chen ve arkadaşları, *NHL* gen ailesinin bir üyesi olan *StPOTHR1* geninin aşırı ekspresyonunun, hızlı patojen çoğalmasını kısıtlayarak *Phytophthora infestans*' a karşı direnci arttırdığını göstermiştir (Chen vd., 2018). Mutant *Arabidopsis NDRI* geninin *Vitis vinifera* L.' daki (*VvNHL1*) aşırı ekspresyonu, hücre nekrozunu arttırarak transgenik bitkilerin *Botrytis cinerea*' ya karşı direncinin artmasıyla sonuçlanmıştır (Chong vd.,

2008). *A. thaliana*'daki *NHL10* geninin ifadesi, salatalık mozaik virüsü (CMV) ile enfeksiyonundan sonra önemli ölçüde artmıştır ve bu genin bitki direncinde rol oynayabileceği düşünülmüştür (Zheng vd., 2005). İlâveten, *A. thaliana*'da *AtNHL3* ve *AtNHL25* genlerinin ifadesi, patojen enfeksiyonuna yanıt olarak yüksek oranda indüklenmiştir. Son olarak, *AtNHL3* geninin ayrıca bir savunma yanıtı oluşturmak için *Pseudomonas syringae* patojeninden türetilen sinyallere karşı hızla yanıt verdiği gösterilmiştir (Varet vd., 2002). Bu yapılan çalışmalar, farklı bitki türlerinde tanımlanan NHL proteinlerinin çeşitli biyotik streslere karşı cevap oluşturmada görev aldığını ve bitki savunma yollarını indüklemeye aktif bir rol oynadığını güçlü bir şekilde kanıtlamaktadır.

Arabidopsis'te, *NHL6* geninin aşırı ekspresyonu tuza, ozmotik ve ABA maruziyetine duyarlılığı arttırmıştır. *NHL6*, bu streslerden kaynaklı ABA sinyal yolağı altında tohum çimlenmesini ve erken fide gelişimini etkilemiştir (Bao vd., 2016). Ek olarak, çalışmalar tuzlu veya alkali stres ile ilişkili bazı transkripsiyon faktörlerinin, bu iki stres koşullarına uyumu sağlamak için NHL genleriyle birlikte aynı yolda görev aldığını göstermiştir (Zhang vd., 2022). Soya fasulyesi NHL genlerinin, soğuk stresi ve ABA maruziyeti sırasında, tohum çimlenmesini düzenlediği belirlenmiştir (Wang vd., 2022). Bir çalışmada, kuraklık stresinin ayçiçeğinde ROS (özellikle H₂O₂) ve yaprak malondialdehit içeriğini artırdığı ve aynı zamanda katalaz aktivitesinde bir azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur (Gunes vd., 2008).

Bitki yetiştirme çalışmalarında, tarla, sera ve büyütme kabininde kullanılmak üzere; hastalıkların ve diğer streslerin etkisini değerlendirmede kullanılmak üzere 200' den fazla MultispeQ beta prototip cihazı geliştirilmiştir. Afrika' daki birkaç ülke de dahil olmak üzere dünya çapında en az 18 ülkeden 290.000' den fazla MultispeQ deneysel veri seti toplanmıştır. Cihazlar, sahada zorlu koşullar altında yoğun bir şekilde kullanılmasına rağmen, nispeten düşük arıza oranına (18 ayda yaklaşık %10) sahiptir. İlâveten bu cihazların uzak bölgelerde bile son derece sağlam ve dayanıklı olduğu kanıtlanmıştır. PhotosynQ platformu, topluluk odaklı fenotipleme amacıyla araştırmacılar, yetiştiriciler ve bilim insanlarından oluşan büyük gruplar için dizayn edilmiştir. Kullanımı kolay bir

enstrüman (MultispeQ) olarak geliştirilmiş, ilk bitki araştırma (fenotipleme) platformudur (Kuhlgert vd., 2016).

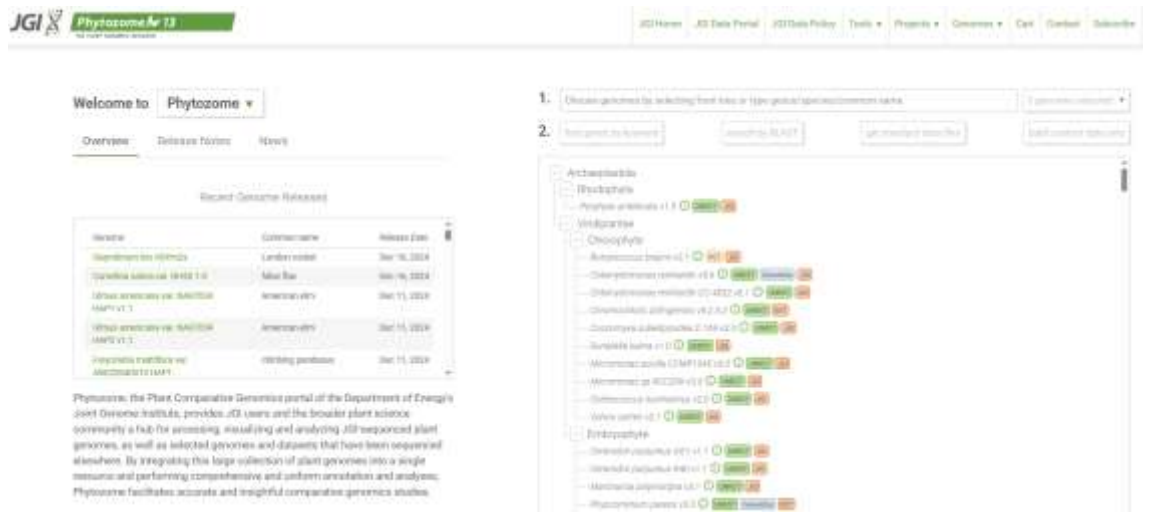
Bu çalışmada, MultispeQ cihazı ile kuraklık stresine tepkilerini araştırmak ve fizyolojik durumlarını görmek için, bitkilerin geniş anlamda fenotipik ve çevresel parametreleri ölçülmüştür. Burada, PAR, bağıl klorofil içeriği (SPAD) ve belirli fotosentetik ölçümler dahil olmak üzere en yaygın olarak kullanılan parametreler analiz edilmiştir.

NHL gen ailesi çeşitli bitki türlerinde tanımlanmış ve biyotik, abiyotik streslere karşı verilen yanıtlardaki önemi ortaya konmuştur. Ayçiçeği; gıda üretimi, küresel ticaretteki önemi ve Türkiye' de çok yaygın ekilen yağ bitkisi olması nedeniyle çeşitli alanlarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Ayçiçeği bitkisinde stres ile ilişkili birçok çalışma bulunmaktadır ancak, NHL gen ailesiyle ilgili literatürde herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Ek olarak PhotosynQ cihazı ile ölçülen parametrelerle strese verilen cevabın ayçiçeğinde gösterilmesi açısından bu tez çalışması bir ilktir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 *Helianthus Annuus* Genomunda HaNHL Gen Ailesi Üyelerinin Tanımlanması

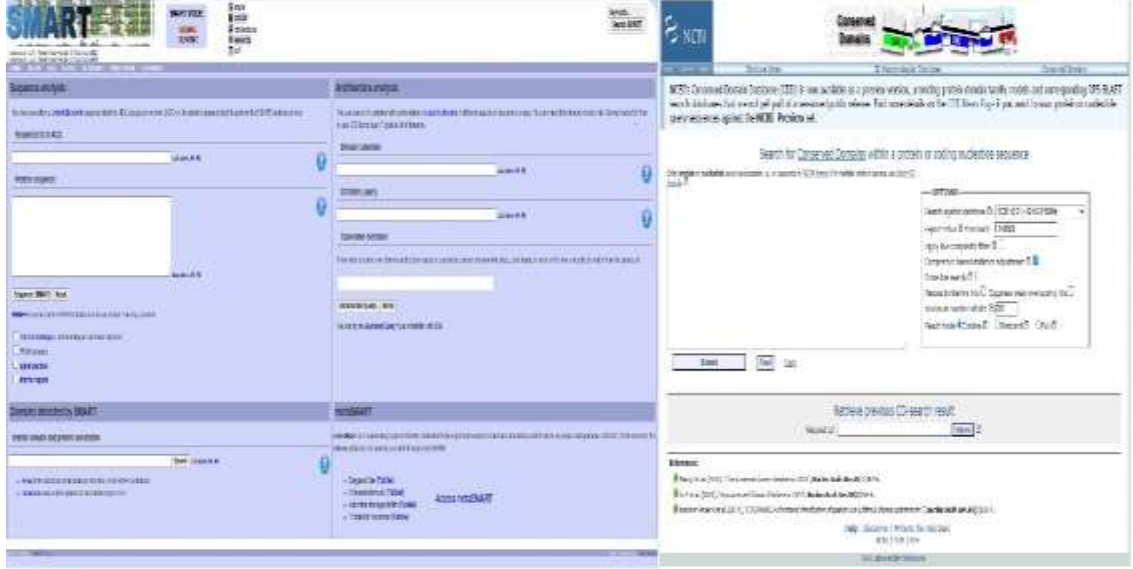
İlk olarak ayçiçeğinde NHL gen ailesi üyeleri tanımlanmıştır. Üyeler, Phytozome v12.1 genom veritabanı kullanılarak *H. annuus* bitkisinde NHL odaklı bir arama ile elde edilmiştir. Gizli Markov modeli (HMM) ve Phytozome veritabanında blastp araması yapılarak, *H. annuus* genomundaki tüm olası NHL proteinleri taranmıştır (Goodstein vd., 2012).



Şekil 3.1 Phytozome genom veritabanı arayüzü

Varsayılan HaNHL proteinleri kullanılarak yapılan blastp araması sonucunda, varsayımsal proteinler tanımlanmıştır. Tekrarlayan diziler, decrease redundancy (fazlalığı azaltma) aracı ile elenmiş ve NHL domainlerine ait diziler, SMART veritabanı ve Pfam veritabanlarında bulunan HMMER aracı kullanılarak incelenmiştir. Blastp sonuçları ile HMM arama sonuçları birleştirilmiştir. Birleştirilen sonuçlar, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) ve NCBI üzerindeki Conserved Domain Database (CDD) kullanılarak korunmuş domain analiziyle doğrulanmıştır. Doğrulama amacı ile NDR1, HIN1-benzeri (HIN1-like) ve LEA_2 yapısal domainlerine sahip diziler, ileri analizlerde kullanılmıştır. E-değeri 1×10^{-10} ' dan küçük olan sonuçlar analiz dışı

bırakılmıştır. NHL proteinlerinin fiziko-kimyasal özellikleri, ProtParam Tool (Zhang vd., 2024) kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) ve NCBI Conserved Domain Database (CDD) arama ekranı

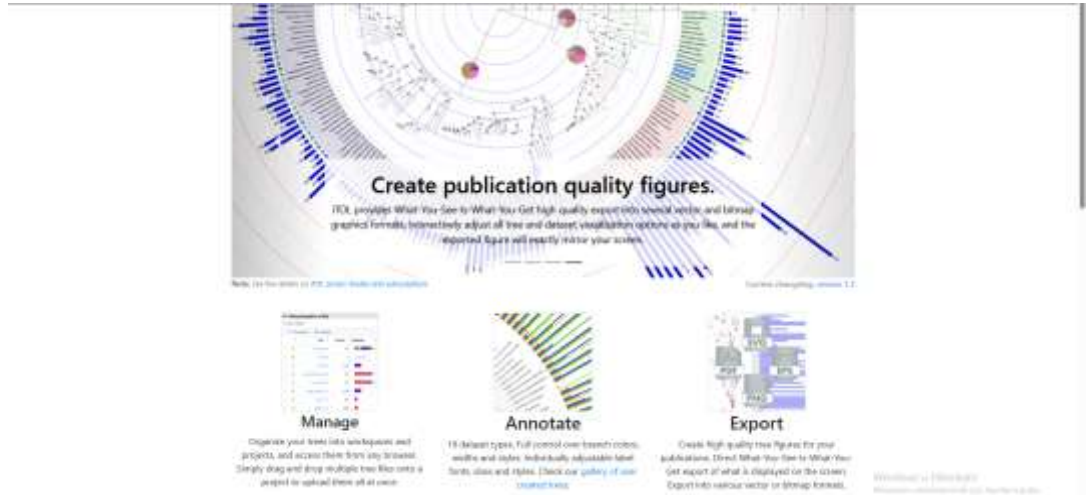
3.2 Dizi Hizalaması ve Filogenetik Ağaç

İlk olarak ayçiçeğinde, model organizmada ve pirinçteki NHL üyelerinin protein dizileri, filogenetik ağaç oluşturulma amacıyla hizalanmıştır. Hizalama, MEGA 11.0 programı kullanılarak Clustal-W aracılığıyla yapılmıştır. Ardından, MEGA programında, 1000 bootstrap tekrarına sahip Maksimum Likelihood (ML) yöntemi ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Nguyen vd., 2015).



Şekil 3.3 Mega programı çalışma ekranı

Filogenetik analizde üç türe ait NHL proteinleri kullanılmıştır: *Helianthus annuus* (ayçiçeği), *Arabidopsis thaliana* (Model organizma) ve *Oryza sativa* (çeltik/pirinç). Son olarak ağaç, internet bazlı Interactive Tree of Life (iTOL) aracı ile düzenlenmiş ve görselleştirilmiştir (Letunic ve Bork, 2011).



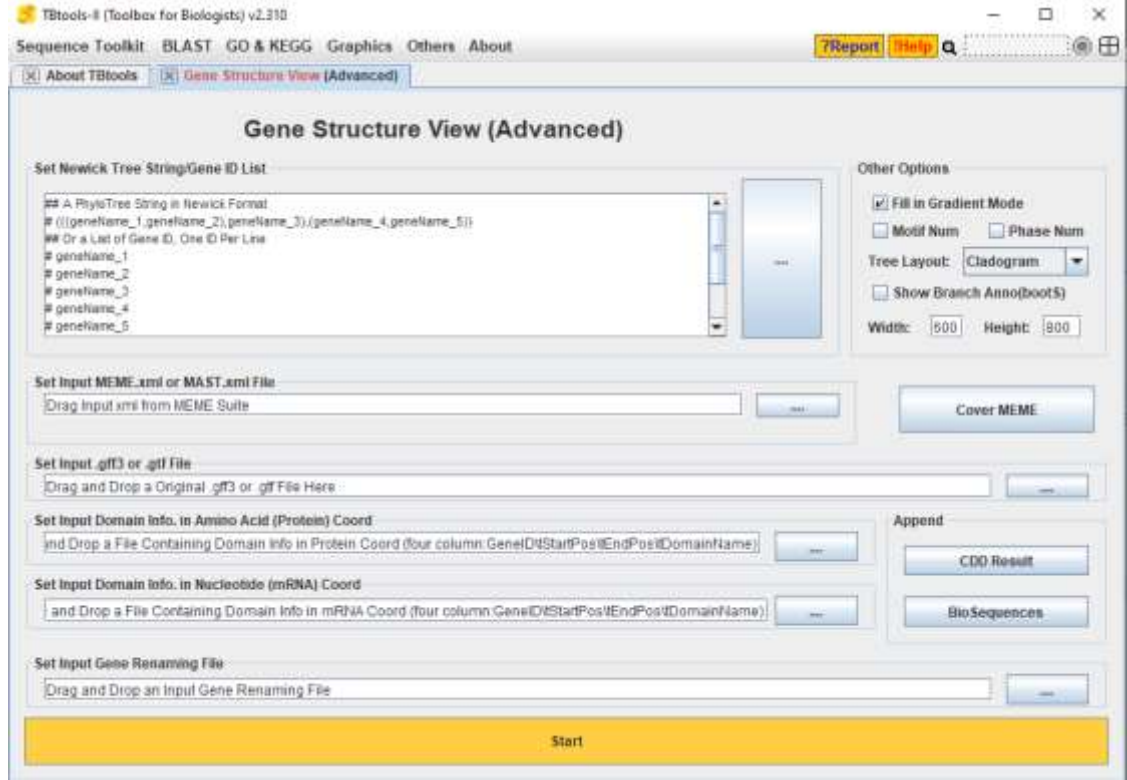
Şekil 3.4 Interactive Tree of Life (iTOL) biyoinformatik aracı giriş ekranı

3.3 Korunmuş Motifler, Domainler ve Gen Yapısı

NHL gen ailesi üyelerine ait korunmuş motifleri belirlemek amacıyla, MEME sürüm 5.5.1 (10 motif sayısı ile) kullanılmıştır. Domain yapıları NCBI-CDD Domain sitesinden elde edilmiştir (Marchler-Bauer vd., 2015). Ekzon ve intron analizi için gerekli veriler JGI Phytozome 12'den indirilmiştir (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). TBtools sürüm 1.098; korunmuş motiflerin, protein domainlerinin, gen yapılarının ve filogenetik ağaç verilerinin çizilmesinde kullanılmıştır (Bailey vd., 2015; Chen vd., 2020). Ayrıca, motiflerin ne olduğunu ortaya koymak amacıyla MOTIF Search aracı da uygulanmıştır (Kanehisa vd., 2002).

The image shows the MEME Suite 5.5.8 web interface. On the left is a navigation menu with options like 'Motif Discovery', 'Motif Enrichment', 'Motif Scanning', etc. The main area is the 'Data Submission Form' for performing motif discovery. It includes sections for selecting the discovery mode (Classic, Discriminative, Differential Enrichment), the sequence alphabet (DNA, RNA or Protein, Custom), inputting primary sequences (via upload or file), selecting site distribution (Zero or One Occurrence Per Sequence), and the number of motifs to find (set to 3). There are also fields for optional email and job description, and a 'Start Search' button. A note at the bottom states: 'Note: if the combined form inputs exceed 50MB the job will be rejected.'

Şekil 3.5 Meme Suite veritabanı motif arama ekranı



Şekil 3.6 TBTools biyoinformatik programı motif, domain, ekson-intron analiz ekranı

3.4 HaNHL Gen Ailesinin Hücre Lokalizasyonu ve Promotor Analizi

HaNHL proteinlerinin hücre içi yerleşimlerini belirlemek amacıyla, WoLF PSORT, Protein subcellular localization prediction tool kullanılmıştır (Horton vd., 2007). Ayrıca, PlantCARE veritabanından yararlanılarak, *HaNHL* genlerinin 1500 baz çifti gerisindeki bölgelerden in silico (bilgisayar destekli) cis-acting elementleri araştırılmıştır (Lescot vd., 2002). İlk bulgular filtrelendikten sonra, bir sonraki aşamanın görselleştirilmesi için TBtools sürüm 1.098 kullanılmıştır (Chen vd., 2020).

WoLF PSORT

Protein Subcellular Localization Prediction

[about WoLF PSORT](#) [WoLF PSORTについて](#) [links](#) [Example Output](#)

Please select an organism type:

- Animal
 Plant
 Fungi

Please select input method:

- From Text Area
 From File

Input Filename:

Dosya seçilmedi



Text Area: Enter multifasta format protein sequence(s) here:

() Select organism type to activate the submit button)

Contact:

[Functional Analysis in silico | NAKALLab](#)

8F General Research Bldg., 4-6-1 Shirokanedai Minato-ku Tokyo 108-8639, Japan

E-mail: fais "AT" hgc.jp (replace "AT" to @)

Şekil 3.7 Wolf Psort hüresel lokalizasyon analizi programı

Menu

- Query CARE
- Search for CARE
- Other Queries
 - Classification...
 - Gene...
 - Name of Location...
 - Name of Site...
 - Reference...
- Mail Service
- Clipboard
- Export your data
- General Information
 - Legal stuff...
 - Our Home Page...
 - Our References...

QueryCARE

ID of a CARE: Show e.g. TAD-Box

Name of the Site: Show

Long Name: Show

Gene ID or AC: Show

Organism: Show only latin names allowed

Cell Type: Show

Function(*): Show

Sequence(**): Show

Records per page: 10

See **HELP** for more details on usage

(*) Use space or "*" character to separate (parts of) different keywords or terms to search on.

(**) You can use numbers to indicate repetitions and N as a wildcard in your sequence, e.g. (AT)2(CA)N(7)

Plant Systems Biology
We are funded by
Noboru Saitoh

Şekil 3.8 PlantCARE promotor analizi arama ekranı

3.5 NHL Proteinlerinin Modellenmesi

Phyre2 veri tabanı (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), protein yapısını, işlevini ve mutasyonlarını incelemek amacıyla kullanılan web tabanlı bir araçtır. Tüm HaNHL proteinleri için, amino asit dizileri kullanılarak bu site üzerinden tarama gerçekleştirilmiştir. Bu işlem, benzer dizi ve üç boyutlu yapılarına dayalı olarak en uygun şablonların belirlenmesi ve ileri düzey sınıflandırma yapılabilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir (Berman vd., 2000). Phyre2 aracılığıyla *H. annuus*' ta bulunan NHL proteinlerinin dördüncül yapısı elde edilmiş ve homoloji modellemesinin 'intense (yoğun)' modu ile proteinlerin öngörülen üç boyutlu yapıları analiz edilmiştir (Kelley ve Sternberg, 2009).



Şekil 3.9 Phyre2 üç boyutlu protein analiz uygulaması arayüzü

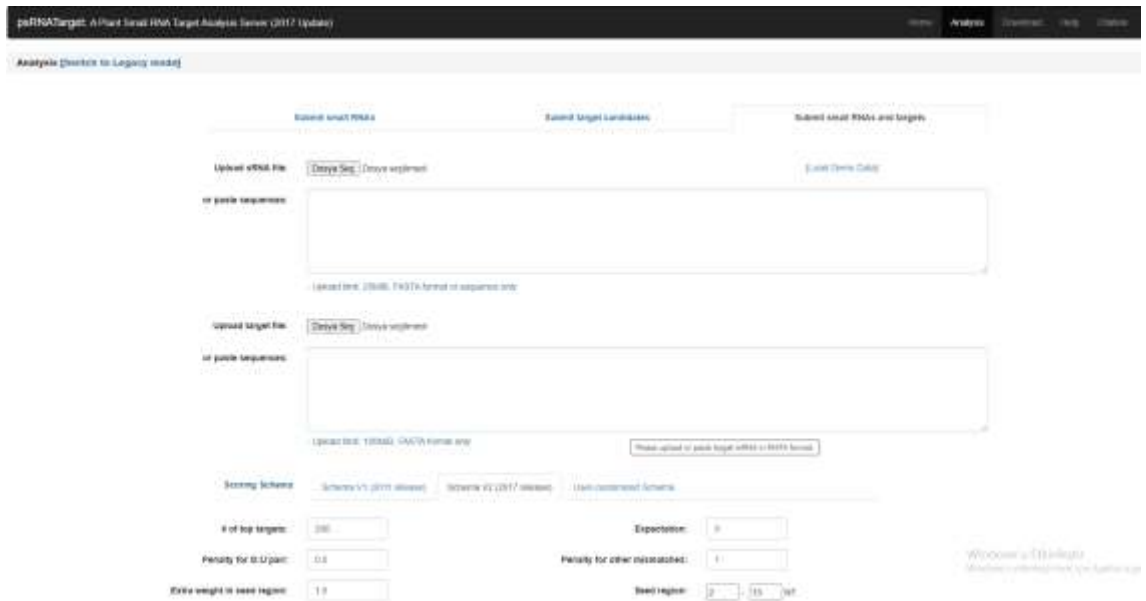
3.6 HaNHL Genlerindeki miRNA Hedeflerinin in Silico Değerlendirilmesi

Bilinen tüm bitkilere ait miRNA dizilerini toplamak amacıyla, PmiREN v2.0 veritabanı kullanılmıştır (<https://www.pmiREN.com/>). Bir sonraki adımda, psRNA Target Server web

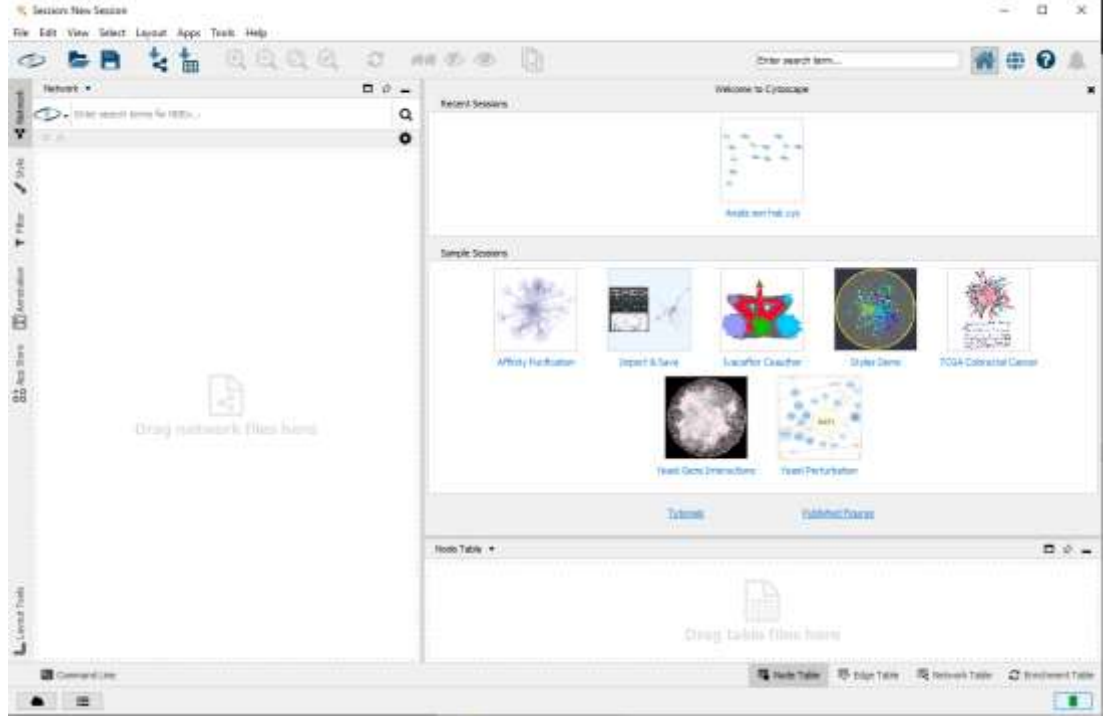
sitesi aracılığıyla *NHL* genlerine yönelik miRNA analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen veriler, Cytoscape 3.9.1 yazılımı kullanılarak görselleştirilmiştir (Shannon vd., 2003).



Şekil 3.10 Pmiren veritabanı arayüzü



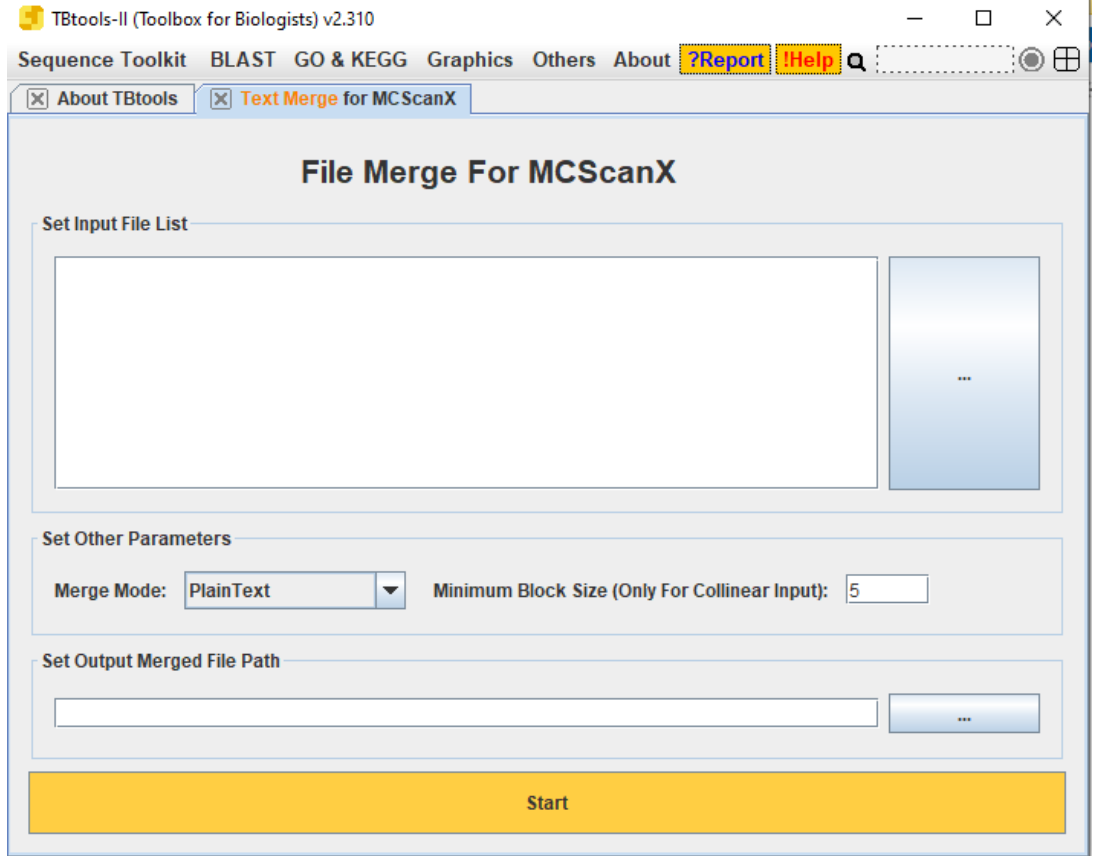
Şekil 3.11 Zhaolab miRNA veritabanı arayüzü



Şekil 3.12 Cytoscape programı giriş ekranı

3.7 Gen Dağılımı ve Duplikasyonlar

Tüm *NHL* genlerinin fiziksel haritalaması, TBtools sürüm 1.098 kullanılarak yapılmıştır (Chen vd., 2020). Duplikasyon ile çoğalmış gen çiftlerini değerlendirmek amacıyla, MCScanX aracı varsayılan ayarlarla kullanılmıştır (Wang vd., 2012). Ardından, synteny haritası, tekrar TBtools sürüm 1.098 kullanılarak oluşturulmuştur (Chen vd., 2020). Tekrarlayan *NHL* genlerine ait eş anlamlı (synonymous) ve eş anlamlı olmayan (non-synonymous) yer değişimlerini belirlemek için Simple Ka/Ks Calculator, TBtools programı aracılığıyla kullanılmıştır (Chen vd., 2020).



Şekil 3.13 TBtool programı MCScanX analiz ekranı

3.8 Hassas ve Dayanıklı Ayçiçeği Çeşitlerinde RNAseq Analizi Yoluyla Kuraklık Stresine Yanıt Veren *HaNHL* İfade Seviyelerinin Belirlenmesi

HaNHL genlerinin ekspresyon seviyeleri, Sequence Read Archive (SRA) veri tabanından elde edilen Illumina RNA-seq verileri kullanılarak, kuraklık stresine maruz kalma süresinde (0, 7, 14 gün) nicel olarak belirlenmiştir. Wu ve arkadaşları tarafından daha önce elde edilen aşağıdaki veri erişim numaraları kullanılmıştır: SRR17624347 (0. gün - toleranslı), SRR17624344 (7. gün - toleranslı), SRR17624338 (14. gün - toleranslı), SRR17624351 (0. gün - hassas), SRR17624361 (7. gün - hassas), SRR17624341 (7. gün - hassas) (Wu vd., 2022a). Ekspresyon verileri Log₂ formatına dönüştürülmüş, ardından sonuçların görselleştirilmesi için TBtools yazılımı kullanılarak bir heatmap oluşturulmuştur (Chen vd., 2020).

3.9 Bitki Materyali, Büyüme Koşulları ve Stres Maruziyeti

Çalışmada kullanılan ‘Sun 2235’ ve ‘Turay’ ayçiçeği çeşitleri Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Çanakkale, Türkiye’den temin edilmiştir (Altunoglu vd., 2018). Gen ekspresyon analizi için, her iki çeşide ait tohumlar %5 (v/v) hipoklorit içeren bir solüsyonda 5 dakika süreyle yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra çimlendirilmiş ve 0.2 L modifiye 1/10 Hoagland solüsyonu içeren saksılardaki toprak ortamında yetiştirilmiştir. Tüm saksılar aynı oranda toprak içerecek şekilde düzenlenmiştir ve toprak ağırlıkları iki günde bir ölçülerek takip edilmiştir. Hoagland solüsyonu, makro besin maddeleri (K_2SO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ve KCl) ve mikro besin maddeleri (H_3BO_3 , $MnSO_4$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, NH_4Mo , $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) içermekte olup, iyonların son konsantrasyonları şu şekildedir: 2 mM Ca, 10^{-6} M Mn, 4 mM NO_3 , 2×10^{-7} M Cu, 1 mM Mg, 10^{-8} M NH_4 , 2 mM K, 10^{-6} M Zn, 0.2 mM P, 10^{-4} M Fe ve 10^{-6} M B (Barac vd., 2004). Ayçiçeği fideleri, $250 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ foton yoğunluğundaki ışıkta, 25 °C sıcaklıkta ve %70 bağıl nem altındaki kontrollü bir iklim odasında yetiştirilmiştir. Kuraklık stresi, bitkiler kendi ağırlıklarının % 20’ sine indiği noktaya ulaşıncaya kadar uygulanmıştır. Bu da yedi gün sürmüştür. Stres uygulamasının yedinci gününün ardından, her iki ayçiçeği çeşidinden kök, gövde ve yaprak dokuları toplanmış ve bu dokular qPCR analizine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.14 Yetiştirme kabinindeki bitkiler

3.10 PhotosynQ ile Veri Toplama ve Verilerin Analizi

PhotosynQ, bitkilerdeki birçok fotosentetik ve biyokimyasal ölçümleri yapmayı sağlayan bir cihazdır. Bu cihaz kullanılarak elde edilen parametreler analiz edilmiştir. Projenin adı "UNFLOWER61224" olarak belirlenmiştir ve bu proje PhotosynQ platformuna 30643 ID numarasıyla kayıt edilmiştir. Bu çalışma kapsamında, ayçiçeği fideleri yapraklarından bir adet MultispeQ V2.0 cihazı kullanılarak toplam 715 ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçüm,

kuraklık stresi boyunca her iki çeşitten alınmıştır. Cihazda sıcaklık, bağıl nem ve CO₂ sensörleri bulunmaktadır. MultispeQ cihazından elde edilen veriler PhiNPQ, NPQt, Phi2 (Φ II), Göreceli klorofil içeriği (SPAD), PhiNO, LEF fraksiyonları, PAR, PS1 aktif merkezleri, qL, FvP/FmP ve yaprak kalınlığıdır (Kuhlgert vd., 2016). Ayrıca, bitkilerin ağırlıkları ölçülmüş ve su stresine dair semptomlar fenotipik olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 3.15 PhotosynQ ölçüm cihazı

Elde edilen veriler GraphPad yazılımı ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. İki grup arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) testi uygulanmıştır (Sun Kontrol - Sun Stres, Turay Kontrol - Turay Stres). Tüm değişkenlerdeki anlamlılık düzeyi P-değeri ile belirlenmiştir.

3.11 RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Analizi

İki ayçiçeği çeşidinin yaprak, gövde ve kök dokularına ait total RNA' lar, üretici firmanın protokolüne uygun olarak FavorPrep™ Total RNA Isolation Kit (Favorgen, Tayvan) ile izole edilmiştir. RNA'ların kalite ve miktar tayini NanoDrop Lite Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, USA) ile gerçekleştirilmiştir. mRNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR reaksiyonlarında kullanılan kitlerin markaları ve kodları çizelge 3.1 de verilmiştir

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kitler, kodları ve firmalar

KİT ADI	KODU	FİRMA
mRNA Isolation Kit	FAPRK 001-1	Favorgen
cDNA Synthesis Kit	1708891	BioRAD
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	1725271	BioRAD

cDNA sentezi, son miktar 500ng/ µl RNA olacak şekilde ayarlanarak cDNA sentez kiti (Biorad) ile gerçekleştirilmiştir. Bu kitin bileşimi şunları içermektedir:

Çizelge 3.2 cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
iScript Reaksiyon Karışımı	2 µl
iScript Ters Transkriptaz Enzimi	0,5 µl
Nükleaz içermeyen su	X
RNA kalıbı	X

Reaksiyon koşulları şu şekilde uygulanmıştır:

Çizelge 3.3 cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Döngü	°C	Süre (dk)
Primer Bağlanması	25	5
Ters Transkripsiyon	46	20
RT inaktivasyonu	95	1
Opsiyonel	4	sonsuz

Elde edilen cDNA'nın kalite ve miktarı da Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür.

qRT-PCR analizleri, Bio-Rad CFX96 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin ve normalizasyon için kullanılan housekeeping geninin primer dizileri, IDT PrimerQuest Tool ve NCBI Design PCR primers araçları kullanılarak dizayn edilmiştir. Primerler, 20 adet *HaNHL* genin CDS dizilerine dayalı olarak tasarlanmıştır.

Tüm qPCR reaksiyonları, olası kontaminasyonları kontrol etmek amacıyla üç bağımsız biyolojik ve teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. PCR ürün amplifikasyonları, SYBR Green boya içeren interkalatör bazlı bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri aşağıda Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 qRT-PCR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
SYBR Green Mix (2x)	5 µl
İleri Primer (10 µM)	0,5 µl
Geri Primer (10 µM)	0,5 µl
cDNA	1 µl
Su	3 µl

PCR reaksiyon döngüsü Çizelge 3.5 teki gibi uygulanmıştır:

Çizelge 3.5 qRT-PCR reaksiyon koşulları

Döngü	°C	Süre (sn)
Ön denatürasyon	95	30
Denatürasyon	95	15
Bağlanma	60	30
Tm Analizi	60 → 95	

Melting-curve analizi, tek ürün varlığını ve primer-dimer oluşumunun olmadığını doğrulamak için yapılmıştır. Hedef gen transkriptleri, Aktin Geni kullanılarak normalize edilmiştir. İleri analizler, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yönteminden (Livak ve Schmittgen, 2001) yararlanılarak yapılmış, *HaNHL* genlerinin oransal bakımdan göreceli miktarı değerlendirilmiştir. Veriler Log_2 formatına dönüştürülerek grafiklerle görselleştirilmiştir. Genin ifade düzeylerindeki değişimler, iki yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş; %5 anlamlılık düzeyinde Fisher'ın en küçük önemli fark (LSD) testi uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *H. Annuus* Genomunda *NHL* Genlerinin Tanımlanması ve Hücre İçi Lokalizasyonu

Bu tez kapsamında, ayçiçeği genomunda 33 aday *HaNHL* geni (*HaNHL01*'den *HaNHL33*'e kadar) tespit edilmiştir. Yinelenen diziler elendikten ve SMART aracılığıyla LEA-2 domaininin varlığı doğrulandıktan sonra ileri analizlere geçilmiştir. Bu genlerin kromozomal konumları, izoelektrik noktaları (pI değerleri), protein uzunlukları, moleküler ağırlıkları, alifatik indeksleri, kararsızlık indeks değerleri, NCBI erişim numaraları ve öngörülen hücre içi yerleşimleri Çizelge 4.1' de sunulmuştur.

HaNHL proteinlerinin amino asit uzunlukları 127 (*HaNHL02*) ile 262 (*HaNHL14*) kalıntı arasında değişmektedir. Moleküler ağırlıkları ise 13.80 kilodalton (*HaNHL02*) ile 28.79 kilodalton (*HaNHL14*) arasında farklılık göstermektedir. *HaNHL* proteinlerinin izoelektrik noktaları 6.08 (*HaNHL13*) ile 10.42 (*HaNHL17*) arasında değişmekte olup, çoğu *HaNHL* proteini ağırlıklı olarak bazik özellik sergilemektedir. Hücre içi yerleşim analizleri, *HaNHL* proteinlerinin neredeyse tüm organellerde bulunduğunu ortaya koymuştur.

Çizelge 4.1 HaNHL genlerinin kataloğu

ID	Genomik Veritabanı Tanımlayıcısı	<i>Helianthus annuus</i> NHL genlerinin kromozomdaki fiziksel yeri			Protein uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlığı (Da)	Alifatik indeks	GRAV Y	Kararlılık Durumu	NCBI Accession No.
		Kromozom	Başlangıç pozisyonu (bp)	Bitiş pozisyonu (bp)							
HaNHL-01	HanXRQChr02g0055291	2	164,497,343	164,497,955	203	9.87	23496.65	110.84	0.007	kararlı	XP_022008202.1
HaNHL-02	HanXRQChr03g0066581	3	40,016,565	40,019,195	127	9.39	13796.88	98.90	0.138	kararlı	XP_035843424.1
HaNHL-03	HanXRQChr03g0091001	3	161,065,692	161,067,147	209	8.87	23914.63	100.62	-0.021	kararlı	XP_022027086.1
HaNHL-04	HanXRQChr07g0202391	7	87,966,334	87,967,060	241	9.44	27480.92	74.77	-0.272	kararsız	XP_021973905.1
HaNHL-05	HanXRQChr09g0239841	9	15,284,334	15,285,074	239	9.04	27643.72	81.13	-0.341	kararsız	XP_021981036.1
HaNHL-06	HanXRQChr09g0239851	9	15,297,214	15,297,928	237	8.91	27447.33	76.08	-0.448	kararsız	XP_021981037.1
HaNHL-07	HanXRQChr09g0239921	9	15,461,437	15,463,841	212	9.91	24040.82	95.09	-0.026	kararsız	XP_021981041.1
HaNHL-08	HanXRQChr09g0276481	9	206,982,257	206,983,010	250	10.28	27442.11	80.36	-0.175	kararlı	XP_021984503.1
HaNHL-09	HanXRQChr10g0286711	10	48,400,805	48,401,426	173	9.70	18818.05	117.23	0.140	kararlı	KAF5785332.1
HaNHL-10	HanXRQChr10g0300241	10	152,406,976	152,423,324	247	9.39	27198.31	92.35	-0.114	kararsız	XP_021988926.1
HaNHL-11	HanXRQChr10g0305321	10	190,854,011	190,854,650	212	9.47	23841.96	107.08	0.056	kararsız	XP_021989346.1
HaNHL-12	HanXRQChr10g0312971	10	224,223,560	224,224,322	253	10.41	27804.47	87.83	-0.138	kararsız	XP_021990027.1

Çizelge 4.1 HaNHL genlerinin kataloğu (devam)

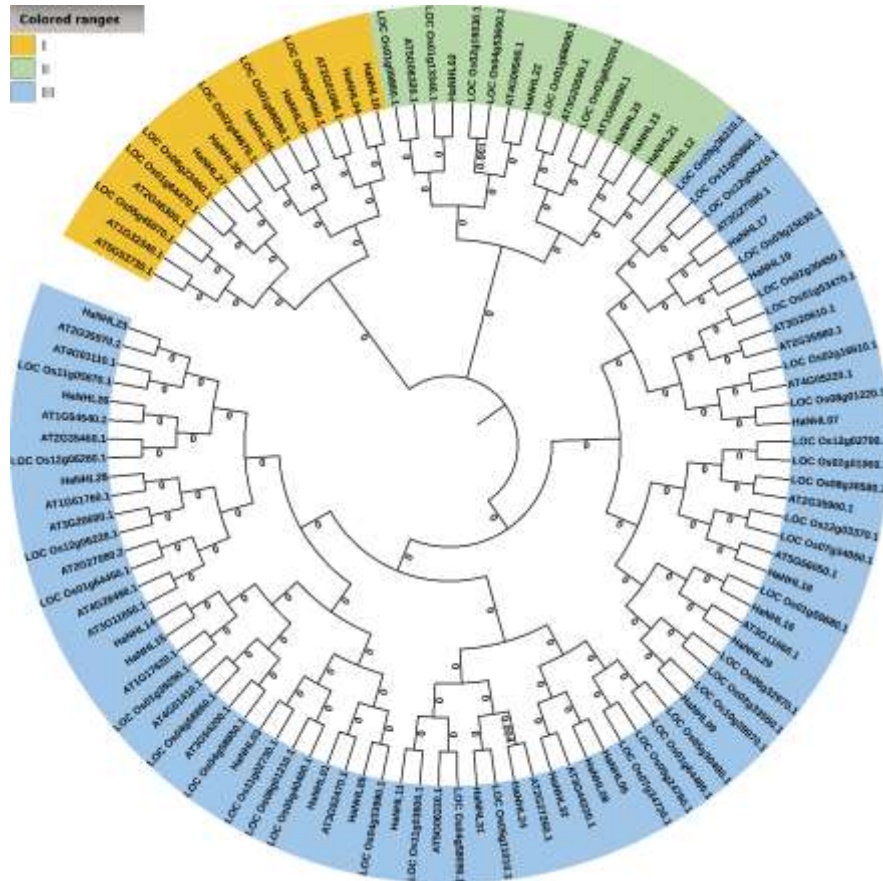
ID	Genomik Veritabanı Tanımlayıcısı	<i>Helianthus annuus</i> NHL genlerinin kromozomdaki fiziksel yeri			Protein uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlığı (Da)	Alifatik indeks	GRAV Y	Kararlılık Durumu	NCBI Accession No.
		Kromozom	Başlangıç pozisyonu (bp)	Bitiş pozisyonu (bp)							
HaNHL-13	HanXRQChr10g0313371	10	226,001,515	226,004,117	243	6.08	26493.61	109.09	0.195	kararsız	XP_021990059.1
HaNHL-14	HanXRQChr11g0337561	11	88,097,738	88,099,256	262	8.94	28793.15	93.74	-0.111	kararsız	XP_021993599.1
HaNHL-15	HanXRQChr11g0345001	11	137,336,715	137,337,360	214	9.64	23427.59	121.12	0.163	kararsız	XP_021994230.1
HaNHL-16	HanXRQChr11g0345011	11	137,541,872	137,542,561	215	9.17	23746.74	118.65	0.108	kararsız	XP_021994232.1
HaNHL-17	HanXRQChr12g0360521	12	19,109,508	19,110,257	239	10.42	26260.90	94.06	-0.021	kararlı	XP_021997083.1
HaNHL-18	HanXRQChr12g0365621	12	38,796,116	38,796,904	255	9.94	28109.99	96.59	-0.067	kararsız	XP_021997497.1
HaNHL-19	HanXRQChr12g0382031	12	148,262,708	148,264,874	241	9.96	26891.69	76.93	-0.170	kararsız	XP_021999001.1
HaNHL-20	HanXRQChr13g0394631	13	54,582,546	54,583,218	223	9.32	24579.06	116.05	0.247	kararlı	XP_022004845.1
HaNHL-21	HanXRQChr13g0398321	13	79,154,544	79,155,174	209	9.87	23192.16	106.32	0.157	kararlı	XP_022000640.1
HaNHL-22	HanXRQChr13g0403571	13	99,378,265	99,378,874	202	9.81	22849.55	99.90	-0.149	kararlı	XP_022001086.1
HaNHL-23	HanXRQChr13g0420221	13	174,900,628	174,901,464	212	9.27	23942.75	101.56	0.103	kararsız	XP_022002469.1

Çizelge 4.1 HaNHL genlerinin kataloğu (devam)

ID	Genomik Veritabanı Tanımlayıcısı	<i>Helianthus annuus</i> NHL genlerinin kromozomdaki fiziksel yeri			Protein uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlığı (Da)	Alifatik indeks	GRAV Y	Kararlılık Durumu	NCBI Accession No.
		Kromozom	Başlangıç pozisyonu (bp)	Bitiş pozisyonu (bp)							
HaNHL-24	HanXRQChr13g0420231	13	174,905,962	174,908,789	244	9.72	27063.78	78.24	-0.130	kararlı	XP_022002468.1
HaNHL-25	HanXRQChr14g0432161	14	43,851,894	43,852,620	241	10.35	26554.59	80.83	-0.102	kararlı	XP_022007432.1
HaNHL-26	HanXRQChr14g0459101	14	166,262,919	166,263,687	255	9.80	28506.58	100.39	-0.109	kararlı	XP_022006416.1
HaNHL-27	HanXRQChr15g0469231	15	17,301,739	17,302,462	240	10.00	26804.77	108.83	0.004	kararlı	XP_022010895.1
HaNHL-28	HanXRQChr15g0473381	15	34,058,252	34,058,951	232	9.92	26398.33	83.66	-0.250	kararsız	XP_022010112.1
HaNHL-29	HanXRQChr15g0494881	15	155,448,904	155,450,045	214	9.98	24310.29	94.63	-0.024	kararsız	XP_022013405.1
HaNHL-30	HanXRQChr16g0514191	16	97,038,263	97,067,111	240	9.30	25980.23	103.67	0.228	kararlı	XP_022015427.1
HaNHL-31	HanXRQChr16g0516361	16	110,425,95	110,426,665	237	9.73	26880.94	83.12	-0.216	kararsız	XP_022017678.1
HaNHL-32	HanXRQChr16g0523691	16	150,674,324	150,677,554	221	9.88	24616.80	98.19	-0.154	kararlı	XP_022017755.1
HaNHL-33	HanXRQChr16g0532691	16	186,255,689	186,256,487	256	9.87	28511.18	86.72	-0.254	kararlı	XP_022016088.1

4.2 *HaNHL* Genlerinin Kapsamlı Karakterizasyonu: Filogeni, Motifler, Alanlar, Gen Yapısı, Promotör Analizi ve 3B Modelleme

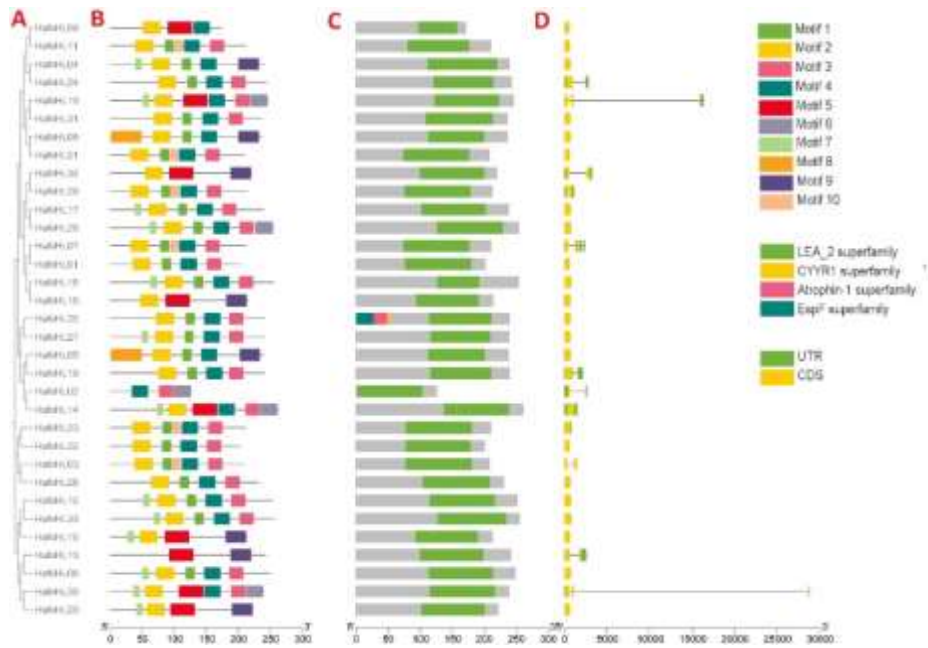
A. thaliana, *O. sativa* ve *H. annuus* türlerinden elde edilen NHL proteinlerine ait filogenetik ağaç oluşturularak, bu bitki türleri arasındaki NHL protein ailesi üyeleri bakımından homologluk ilişkileri araştırılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaç, üç ana gruba ayrılmıştır (Şekil 4.1). Bu gruplar arasında, Grup III en geniş olanıdır ve sırasıyla *O. sativa*, *A. thaliana* ve *H. annuus* türlerinden 35, 23 ve 21 NHL proteinini içermektedir. Grup I ve Grup II ise eşit sayıda üyeye sahiptir. Grup I, *H. annuus* bitkisinden 6, *O. sativa* bitkisinden 6 ve *A. thaliana* bitkisinden 4 NHL proteinine sahipken; Grup II, sırasıyla *H. annuus*, *O. sativa* ve *A. thaliana* türlerinden 6, 6 ve 3 NHL proteini içermektedir.



Şekil 4.1 Ayçiçeği (*H. annuus*), *A. thaliana* ve *O. sativa* türlerinde NDR1/HIN1 benzeri (NHL) protein dizilerinin filogenetik ağaç analizi (Grup 1=Koyu Sarı, Grup 2=Yeşil, Grup 3= Mavi)

H. annuus türündeki HaNHL üyeleri arasındaki yapısal farklılıkların araştırılması amacıyla motif, domain ve gen yapısı analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). Sonuç olarak, uzunlukları 11 ila 49 amino asit arasında değişen 10 adet korunmuş motif tanımlanmıştır (Şekil 4.2B). Özellikle, Motif 2'nin neredeyse tüm HaNHL proteinlerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.2B'den de görülebileceği üzere, genellikle aynı evrimsel grupta yer alan HaNHL üyeleri benzer motif bileşimlerine sahiptir. Örneğin, HaNHL03, HaNHL22, HaNHL23 ve HaNHL28 proteinleri, aynı şablonda konumlanmış motif 1, motif 2, motif 3 ve motif 4'e sahiptir. İlginç bir şekilde, HaNHL13, HaNHL16 ve HaNHL32, Motif 5 ve Motif 9'u içermektedir. Bu proteinlerin Grup III içerisinde birlikte kümelenmiş olması, sahip oldukları sınırlı sayıda korunmuş motifler ile ilişkili olabilir. HaNHL gen ailesi üyelerinin sahip olduğu motifler, Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, HaNHL gen ailesinin dört domain taşıdığı saptanmıştır (Şekil 4.2C). Domain analizine yönelik daha ileri incelemeler, HaNHL üyelerinin her birinde LEA_2 alt ailesinin öne çıktığını ortaya koymuştur. Yalnızca HaNHL25, bunlara ek olarak Atrophin-1 süper ailesi, EspF süper ailesi ve CYYR1 süper ailesi domainlerine sahiptir.



Şekil 4.2 HaNHL üyelerinin motif, domain ile ekzon ve intron yapıları

HaNHL üyelerinin gen yapısına ilişkin analizler, bu genlerin ekzon sayısının 1 ile 3 arasında değiştiğini göstermektedir. Ekzon-intron yapısı dikkate alındığında, benzer gen şablonuna sahip *HaNHL* genlerinin çoğunlukla filogenetik ağacın aynı dallarında (Şekil 4.1 ve 4.2D) yer aldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2 *HaNHL* proteinlerinin sahip olduğu motifler

Motif Numarası	Motif Sekansı
Motif 1	RNPNKKIGIYYDKVS
Motif 2	GLIILIIWLILRPKPKFTVQDVTITQFN
Motif 3	VPLRJRLDGRVRFKVGSLKSPRY
Motif 4	IPPFYQGHKNTTVLSTTLAGTQVPVD
Motif 5	SLNLSRLDITVKNPNKVGIKYENSTASJMYRGIPLGRV
Motif 6	QVSIDCAIAISPRKQALVYKQCGFDGLQ
Motif 7	RSCCCCLCLWI
Motif 8	MSDQSHLNGAYYGPSIPPPAKKRSYHRPGGGGGSCNPFSWCFSCICGC
Motif 9	FIKPHVTPQFECDLKVDITSRGVGNQTCKEKT
Motif 10	VYASYRNQQITLFT

Buna ek olarak, NHL proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları saptanmış ve birçok *HaNHL* proteininin neredeyse tüm organellerde lokalize olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1).

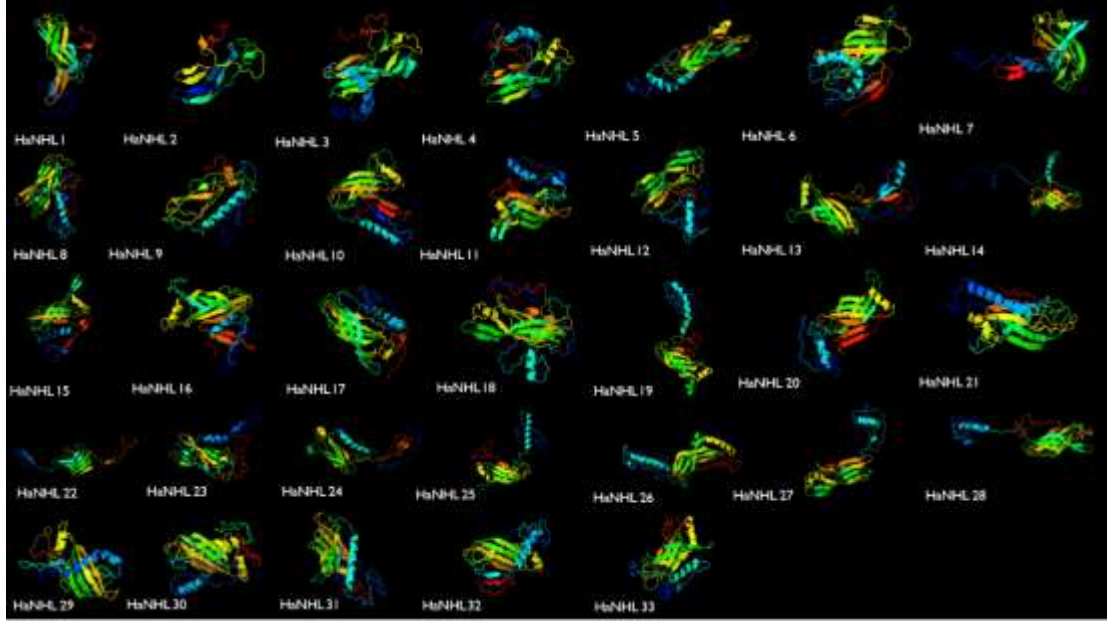


Şekil 4.3 *HaNHL* genlerinin promotör bölgelerindeki öngörülen cis-acting elementlerin şematik gösterimi

Bir genin promotör bölgesi, bitkilerde stres etmenlerine karşı genetik ağların düzenlenmesinde son derece önemli bir faktördür (Thilakarathne vd., 2025). Bu nedenle, *HaNHL* genlerine ait cis-acting elementler biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre bu elementler; büyüme, abiyotik stres, bağlanma bölgeleri, hormon, promotör, biyotik stres, ışık, DNA metilasyonu, lignin biyosentezi, hücre döngüsü ve diğerleri olmak üzere 11 kategori altında gruplandırılmıştır (Şekil 4.3).

Bu tez çalışmasında, bitkilerde büyüme ve olgunlaşma süreçlerinde önemli rol oynayan beş cis-acting element (GCN4 motifi, SP1, O2-site, sirkadiyen element ve CAT-box) tespit edilmiştir. Ayrıca, hormonal yanıtlarda da görev alan birçok cis-acting element tanımlanmıştır. Örneğin, CGTCA ve TGACG motifleri metil jasmonat (MeJA) yanıtı ile, AuxRR-core ve TGA-element auxin yanıtı ile, P-box ve GARE motifi ise gibberellin yanıtı ile ilişkilidir. Bu durum *HaNHL* genlerinin MeJA sinyal yollarında potansiyel bir rolleri olabileceğini düşündürmektedir.

Buna ek olarak, etilen, salisilik asit ve absisik asit yanıtlarıyla ilişkili olduğu saptanmış ABRE ve TCA cis-elementleri de belirlenmiştir. Ayrıca, GATA-motifi, Box 4, I-box, GT1-motifi, GA-motifi, AE-Box, G-Box, TCT-motifi, MRE, LAMP-element, AT1-motifi, TCCC-motifi, chs-CMA1a ve ATC-motifi gibi çok sayıda ışığa duyarlı cis-acting elementler tespit edilmiştir.

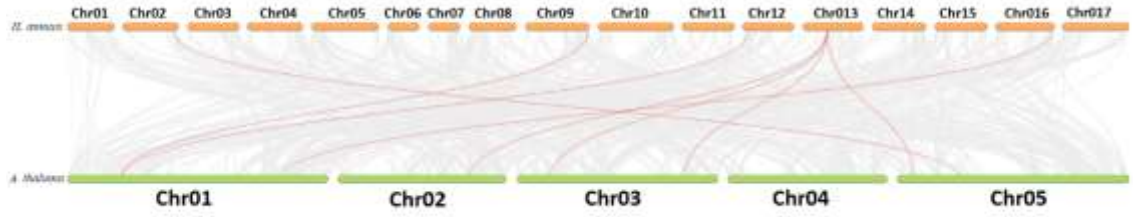


Şekil 4.4 *H. annuus*' ta seçilmiş HaNHL proteinlerinin tahmini üç boyutlu yapısal modelleri

Promotor analizlerinin yanı sıra, toplam 33 HaNHL proteini için homoloji modelleme ve üç boyutlu yapı tahminleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4). NHL proteinlerinin yapısal benzerlik oranı, %46 ile %81 arasında değişen güven düzeyiyle tespit edilmiştir. Üç boyutlu protein yapıları arasında en yaygın olarak gözlemlenenler ise α -heliks ve β -tabaka konfigürasyonları olmuştur.

4.3 *H. annuus*, *O. sativa* ve *A. thaliana* Genomları Arasındaki NHL Genlerinin Kromozomal Lokalizasyonu, Duplikasyonları ve Synteny İlişkileri

H. annuus–*A. thaliana* ve *H. annuus*–*O. sativa* genomları arasındaki *NHL* genlerinin evrimsel ilişkileri değerlendirilmiştir. Yapılan ortolog analizi sonucunda, *H. annuus* ile *A. thaliana* arasında *NHL* gen ailesi üyeleri açısından 8 çift gen duplikasyonu tanımlanmıştır. Bu iki tür arasındaki duplikasyona uğramış *NHL* genlerinin, ayçiçeğine ait beş farklı kromozomdan (Kromozom 02, 09, 12, 13 ve 16) türediği belirlenmiştir (Şekil 4.5). Bu türler arasında yer alan bir genin (*HaNHL17* – *AT1G17620.1.TAIR10*) tahmini en uzak duplikasyon zamanı yaklaşık 16 milyon yıl öncesine dayanmaktadır (Çizelge 4.3).

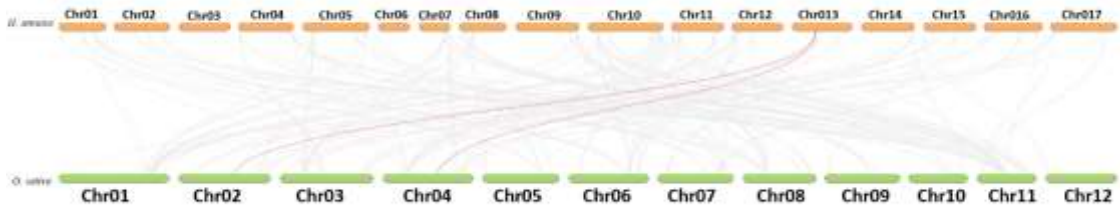


Şekil 4.5 NDR1/HIN1 benzeri (NHL) genlerinin *Helianthus annuus* ve *Arabidopsis thaliana* arasındaki duplikasyon analizi

Çizelge 4.3 HaNHL ve AtNHL genleri arasındaki duplikasyonlar

Gen 1	Gen 2	Ka	Ks	Ka/Ks	MYA
HaNHL-01	AT5G22870.1.TAIR10	0,613254	NaN	NaN	NaN
HaNHL-08	AT1G17620.1.TAIR10	0,401147	1,238983	0,323771	9,530645
HaNHL-17	AT1G17620.1.TAIR10	0,487992	2,089583	0,233535	16,07372
HaNHL-21	AT2G35960.1.TAIR10	0,377308	1,298622	0,290545	9,989406
HaNHL-21	AT3G11660.1.TAIR10	0,326536	1,634599	0,199765	12,57384
HaNHL-21	AT3G52470.1.TAIR10	0,356230	1,494414	0,238374	11,4955
HaNHL-21	AT5G06330.1.TAIR10	0,350562	1,8547790	0,189005	14,26753
HaNHL-33	AT1G65690.1.TAIR10	0,391714	NaN	NaN	NaN

Öte yandan, *H. annuus* ile *O. sativa* arasında yalnızca 2 çift NHL gen duplikasyonu belirlenmiştir ve bu gen çiftleri ayçiçeğinin yalnızca tek bir kromozomunda lokalize olduğu bulunmuştur. Bu iki tür arasında yer alan bir genin (*HaNHL21-LOC_Os04g33990.1.MSUv7.0*) en uzak duplikasyon zamanının da yaklaşık 16 milyon yıl öncesine dayandığı tahmin edilmektedir (Şekil 4.6, Çizelge 4.4).



Şekil 4.6 NDR1/HIN1 benzeri (NHL) genlerinin *Helianthus annuus* ve *Oryza sativa* arasındaki duplikasyon analizi

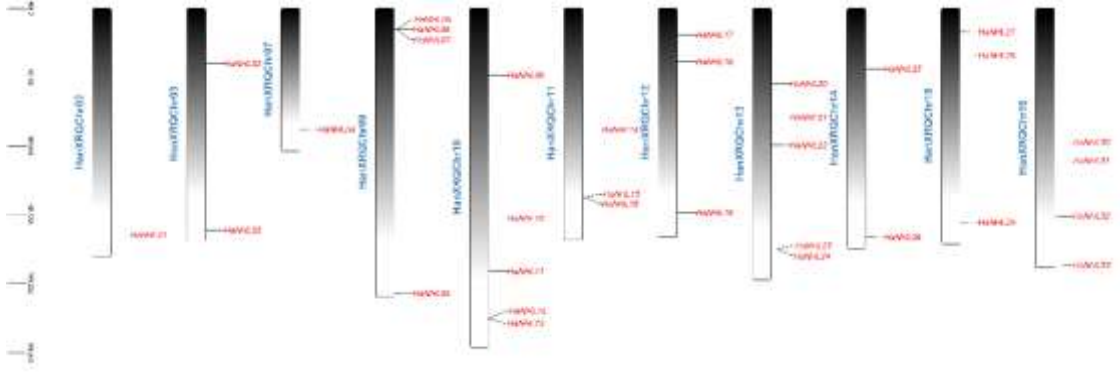
NHL genleri bakımından *H. annuus*-*A. thaliana* (n=5) arasında daha yüksek miktarda ortolog ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu duplikasyon olaylarındaki belirgin farklılığın temel nedeninin, *H. annuus* ile *A. thaliana* arasındaki daha yakın taksonomik ilişkiden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.4 *HaNHL* ve *OzNHL* genleri arasındaki duplikasyonlar

Gen 1	Gen 2	Ka	Ks	Ka/Ks	MYA
<i>HaNHL</i> -21	LOC_Os02g33550.1.MSUV7. 0	0,562729	1,55520 7	0,361835	11,9631
<i>HaNHL</i> -21	LOC_Os04g33990.1.MSUV7. 0	0,628235	2,08610 8	0,301152	16,0469

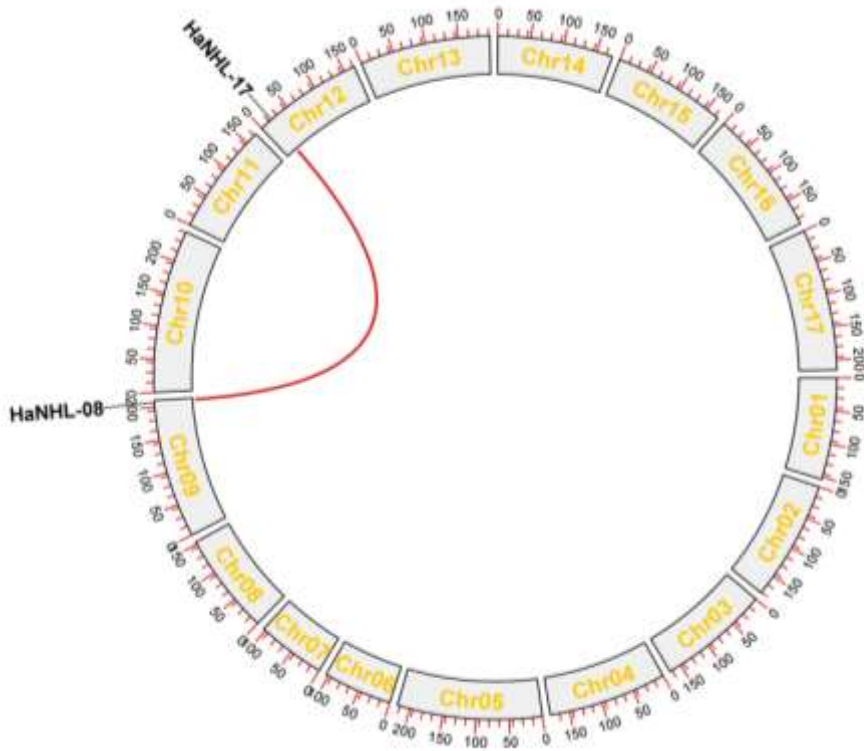
İlaveten, bu sonuçlar *H. annuus* ile *O. sativa* arasındaki *NHL* gen duplikasyonlarının, *H. annuus* ile *A. thaliana* arasındaki duplikasyonlarla aynı dönemde gerçekleştiğini göstermektedir. *H. annuus* ile *O. sativa* arasında yalnızca iki duplikasyon olayı tespit edilmiş olmasına karşın, *H. annuus* ile *A. thaliana* arasında çok sayıda *NHL* geninin duplikasyona uğradığı belirlenmiştir. Bu duplikasyon olaylarındaki belirgin farklılığın temel nedeni, *H. annuus* ile *A. thaliana* arasındaki daha yakın taksonomik ilişkidir.

33 *NHL* geninin, *H. annuus* türüne ait 17 kromozomdan 11'ine dağılmış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Sadece Kromozom 6' da *HaNHL* genine rastlanmamıştır. *NHL* genlerinin sayısal olarak en yüksek bulunma kromozom, (beş gen) 10 ve 13 iken, en düşük *HaNHL* gen sayısı (her kromozomda bir gen olmak üzere) Kromozom 2 ve 7'de tespit edilmiştir.



Şekil 4.7 HaNHL genlerinin kromozomlar üzerindeki dağılımı

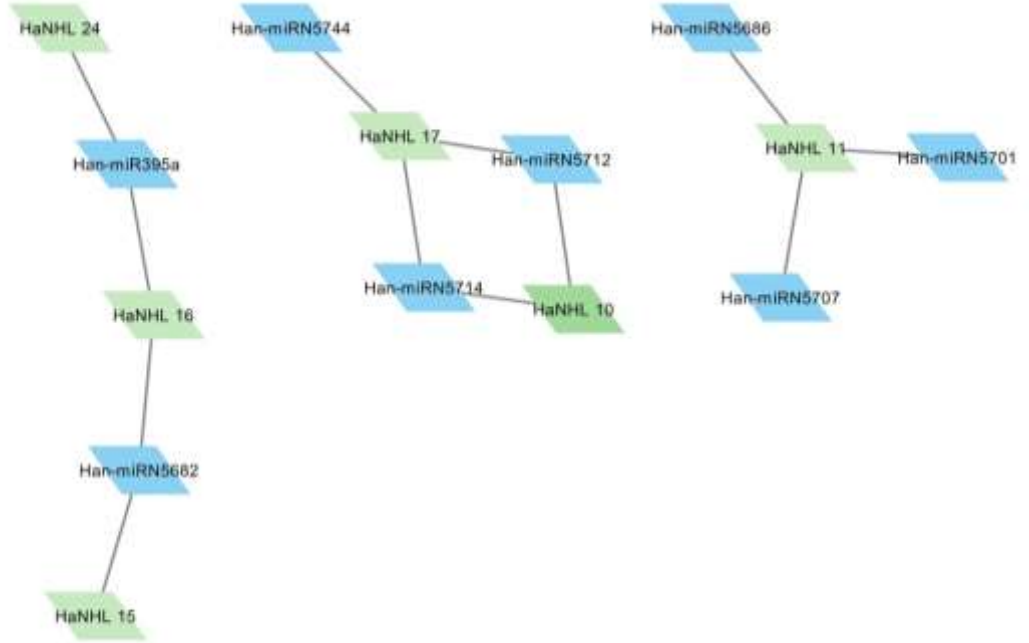
Ayçiçeği NHL genlerinin olası evrimsel yolları, gen duplikasyon olaylarının incelenmesiyle belirlenebilir (Şekil 4.8). Bu çalışmada, ayçiçeği genomunda *NHL* genleri açısından bir çift paralog tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular, NHL üyelerinin ayçiçeğinde düşük seviyede gen ailesi genişlemesi gösterdiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.8 *Helianthus annuus* genomu içindeki HaNHL genlerinin genom çapında sinteni analizi

4.4 *HaNHL* Genlerini Hedefleyen miRNA'ların Tanımlanması

Bu çalışmada gerçekleştirilen miRNA analizleri sonucunda, 6 adet *HaNHL* genini hedefleyen toplam 8 farklı miRNA tespit edilmiştir. Maksimum beklenti değerleri 3.0 ile 5.0 arasında değişmektedir. *HaNHL10*, *HaNHL11*, *HaNHL15*, *HaNHL16*, *HaNHL17* ve *HaNHL24* genleri dışında tüm *NHL* genleri, en az bir miRNA tarafından hedeflenmektedir. Hedeflenen genler arasında *HaNHL11*, miRNA ile en sık ilişkilendirilen gen olarak öne çıkmıştır (Şekil 4.9).

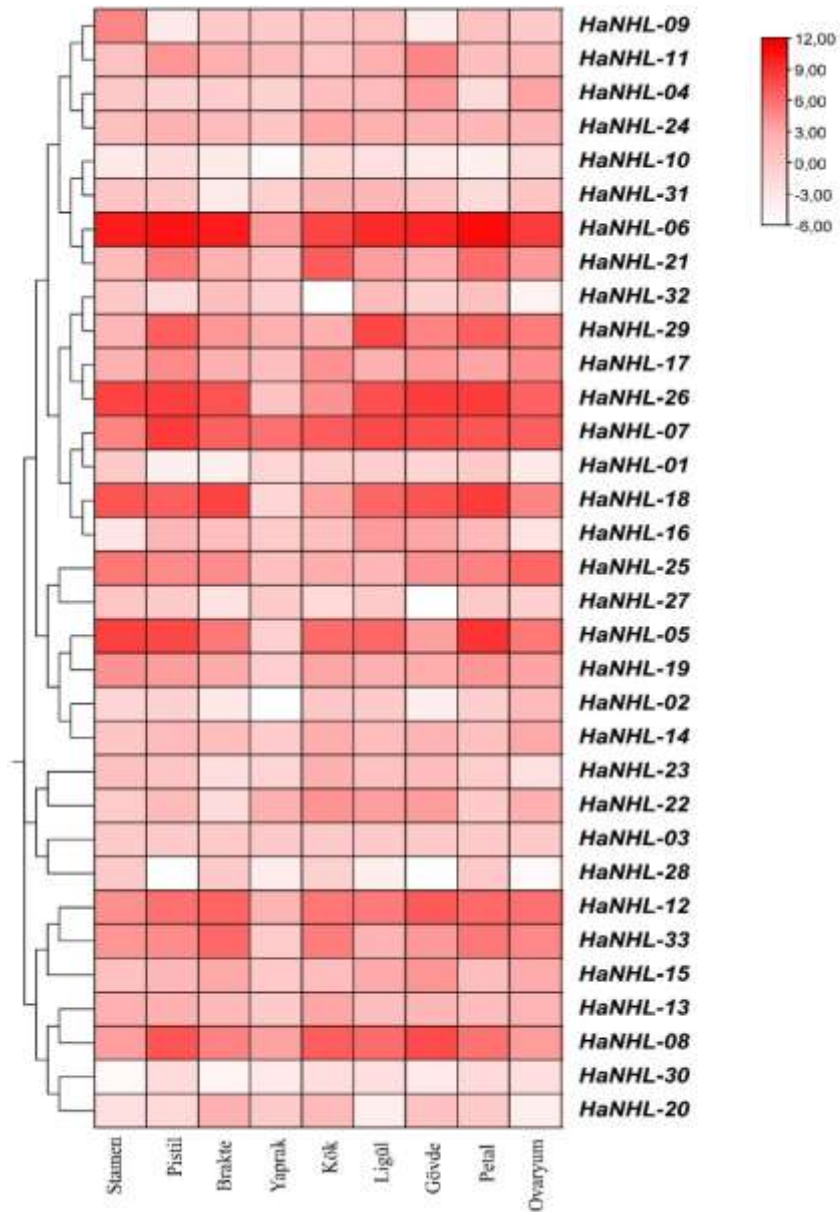


Şekil 4.9 *HaNHL* genlerini hedefleyen miRNA'ların şematik gösterimi

4.5 *HaNHL* Genlerinin Dokuya Özgü Ekspresyonları

Bu tez kapsamında, NCBI veritabanından temin edilen halka açık SRA dataları kullanılarak *HaNHL* genlerinin mRNA ekspresyon profillerinin analiz edilmesi hedeflenmiştir. *HaNHL* genlerinin ekspresyon analizi stamen (SRR4996809), pistil (SRR4996814), brakte (SRR4996800), yaprak (SRR4996821), kök (SRR4996828), ligül (SRR4996822), gövde (SRR4996799), petal (SRR4996833) ve ovaryum (SRR4996831) gibi çeşitli bitki dokularında Heat-map oluşturularak değerlendirilmiştir (Şekil 4.10)

(Badouin vd., 2017). Heat-map grafiğine göre, *HaNHL-05*, *-06*, *-07*, *-08*, *-12*, *-18*, *-21*, *-25*, *-26*, *-29* ve *-33* genleri neredeyse tüm bitki dokularında yüksek ekspresyon göstermiştir. Buna karşın, *HaNHL-02*, *-10*, *-20*, *-28* ve *HaNHL-30* diğer genlere kıyasla daha düşük ekspresyon seviyelerine sahiptir. Genel olarak, diğer genlerde farklı bitki dokuları arasında minimal ekspresyon değişimi gözlenmiştir. Tüm genler açısından pistil, ligül, gövde, petal ve ovaryum dokularında yüksek ekspresyon paterni; bu gen ailesinin hem üreme, hem de büyüme ve gelişme süreçlerinde rol oynadığını göstermektedir.



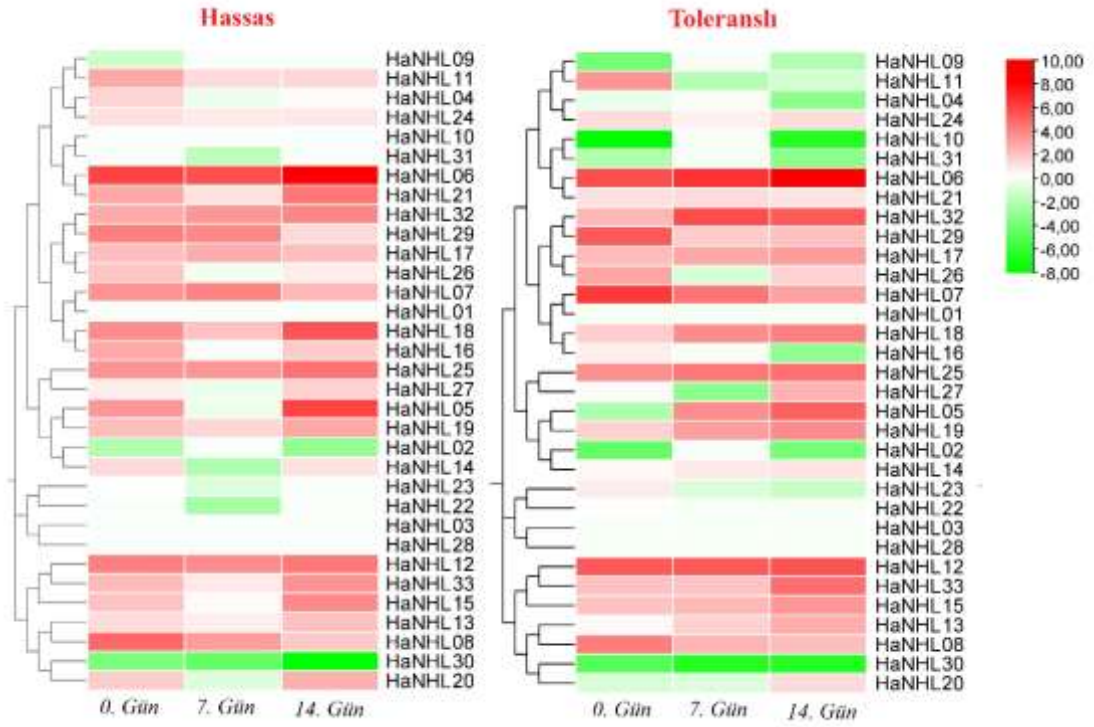
Şekil 4.10 *Helianthus annuus*'ta HaNHL genlerinin dokuya özgü gen ifade kalıpları

4.6 SRA Verileri Kullanılarak Hassas Ve Dirençli Bitkiler Açısından *HaNHL* Yaprak Genlerinin Kuraklık Stresine Tepkisinin İncelenmesi

Wu ve ark. (2022) tarafından sağlanan halka açık SRA verileri kullanılarak *HaNHL* genlerinin kapsamlı bir RNA-seq analizi gerçekleştirilmiştir (Wu vd., 2022a). Şekil 4.11, kuraklık stresine karşı duyarlı ve dayanıklı ayçiçeğinde *NHL* gen ailesi üyelerinin gen ekspresyonundaki değişimlerini göstermektedir. Sonuçlar, yapraklarda bazı genlerin ekspresyonunun değiştiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.11). Kuraklık stresi altında, hassas ayçiçeğinde *HaNHL-02*, *-05*, *-09*, *-15*, *-18*, *-20* ve *-29* genlerinin yapraklardaki ekspresyon seviyeleri, sıfırıncı güne kıyasla anlamlı şekilde değişmiştir. Heat-map analizine göre, *HaNHL-05*, *-09*, *-15*, *-18* ve *-20* yüksek ekspresyon gösteren genler olarak belirlenirken, *HaNHL-02* ve *-29* ise baskılanmış (downregüle) genler olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, genlerin yarısından fazlasının hafif değişiklikler sergilemesine karşın, yedi üye genin belirgin ekspresyon farklılıkları gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Dayanıklı çeşitte ise, kuraklık stresi altında *HaNHL-04*, *-05*, *-07*, *-09*, *-11*, *-13*, *-16*, *-18*, *-19*, *-20*, *-23*, *-27*, *-29*, *-32* ve *-33* genlerinin yapraklardaki mRNA ifade seviyeleri sıfırıncı güne göre anlamlı değişiklikler göstermiştir. *HaNHL-05*, *-09*, *-13*, *-18*, *-19*, *-20*, *-27*, *-32* ve *-33* yüksek gen ifadesi gösteren genler olarak belirlenirken, *HaNHL-04*, *-07*, *-11*, *-16*, *-23* ve *-29* düşük ekspresyonlu genler olarak bulunmuştur. Diğer *NHL* gen ailesi üyelerinin mRNA seviyeleri kuraklık stresi koşullarında minimal değişiklikler göstermiş olup, bu durum daha ileri araştırmalar gerektirmektedir. Genel olarak, ayçiçeğinde yedinci gün sonundaki gen ekspresyonundaki değişimler, on dördüncü güne göre ters yönlüdür, bu durum stres yanıtı olarak direnç kazanımıyla ilişkilendirilmiştir. İlaveten, söz konusu bu değişiklikler özellikle dayanıklı ayçiçeği çeşidinde daha belirgindir.

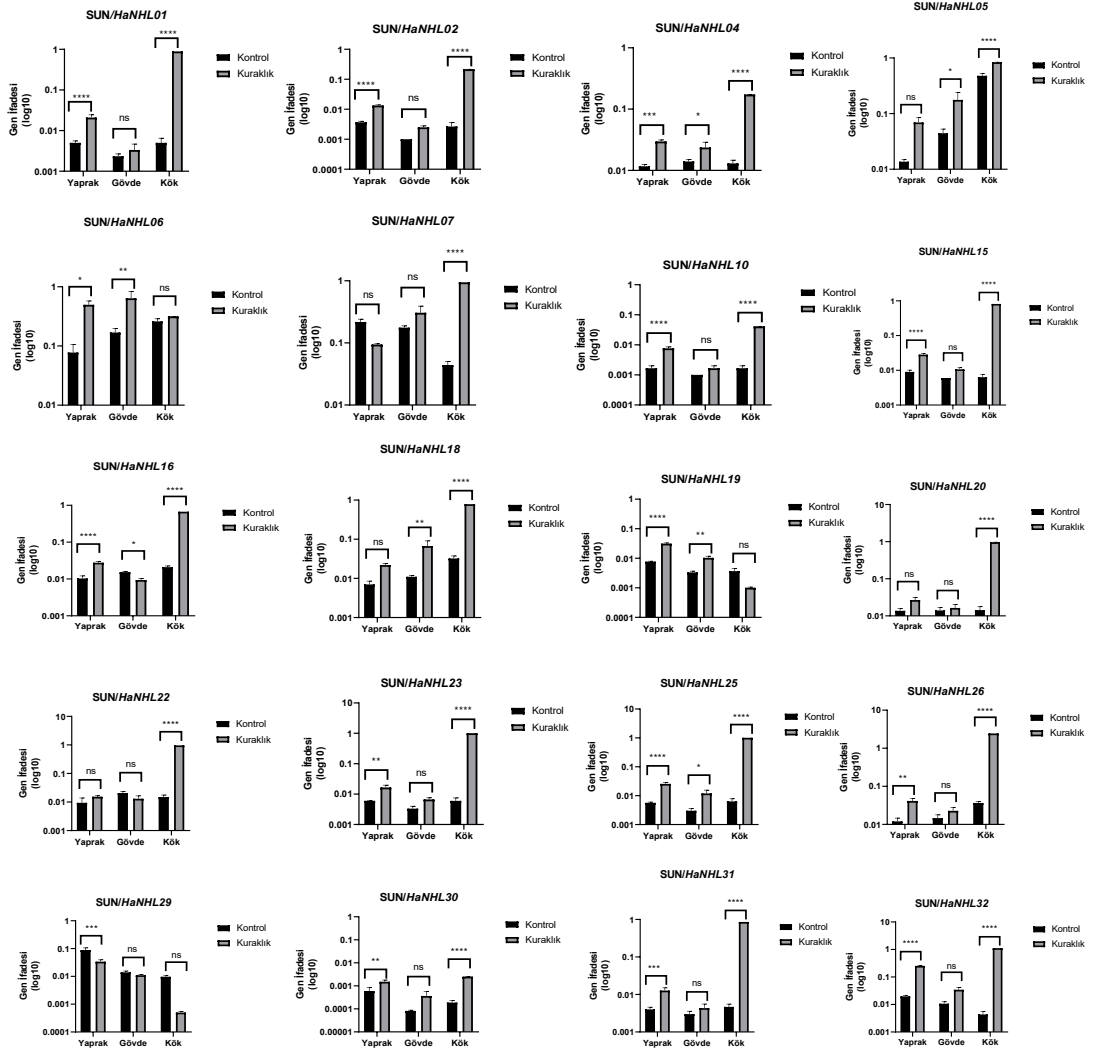
Son olarak hassas ile toleranslı ayçiçeği çeşitleri kıyaslanacak olursa, gen ekspresyonu açısından toleranslı bitkinin eski seviyesine gelme kabiliyeti daha fazladır. Örnek olarak *HaNHL09* geninin ekspresyon düzeyi hassasta artmış ve değişmeden kalmışken; toleranslıda bir artış göstermiş, ardından tekrar düşmüştür. Her iki çeşitte de en yüksek değişim gösteren gen *HaNHL05*' tir.



Şekil 4.11 Kuraklık stresi altındaki hassas ve toleranslı ayçiçeği yapraklarında farklı şekilde ifade edilen *HaNHL* genlerinin Heat-map analizi

4.7 Yerli Turay ve Sun Ayçiçeği Çeşitlerinde Kuraklığa Yanıt Olarak *NHL* Genlerinin Kök, Gövde Ve Yaprakta RT-qPCR ile Ekspresyon Analizi

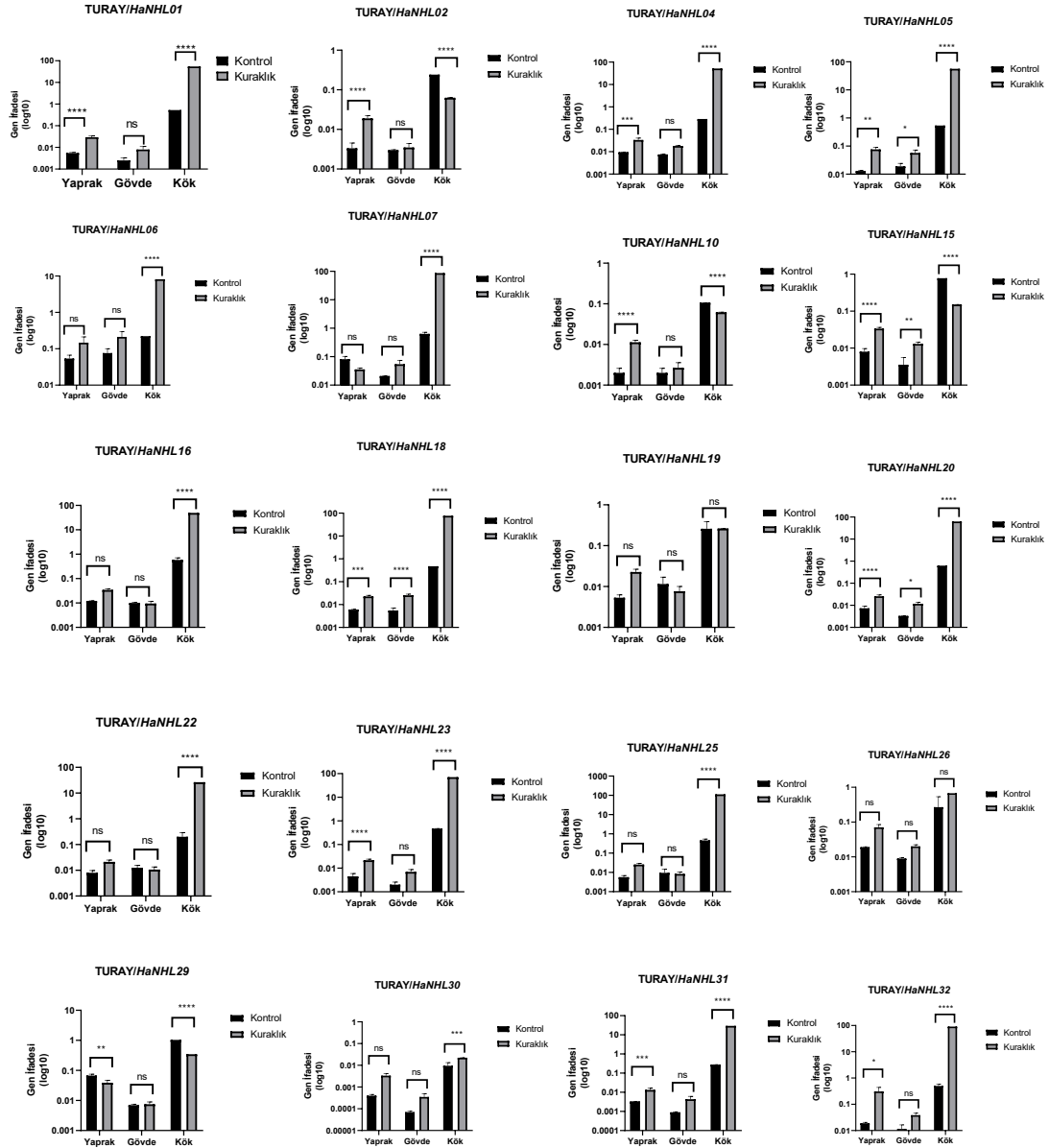
NHL gen ailesinin kuraklık stresine karşı direnç göstermede potansiyel rollerini değerlendirmek amacıyla, 20 adet *HaNHL* geninin ekspresyon profilleri RT-qPCR tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, SUN-2235 ayçiçeği çeşidi genlerinin su stresi koşullarında farklı şekilde indüklendiğini göstermiştir. Bu genler (*HaNHL-01, -02, -04, -05, -06, -10, -15, -18, -20, -23, -25, -26, -30, -31, -32*) anlamlı düzeyde up-regüle olmuştur (Şekil 4.12). En belirgin değişiklik kök dokusunda ve takiben olarak yaprak dokusundadır. Ayrıca, istisna olarak *Sun/HaNHL29* geni, yaprak dokusunda zıt ekspresyon profili göstermiştir (Şekil 4.12). Kök ve gövdede anlamsız bir değişim varken, yaprakta down-regülasyon gözlenmiştir. Benzer şekilde, *Sun/HaNHL16* geninde yaprak ve kökteki mRNA seviyesi artış gösterirken, gövdede mRNA miktarında anlamlı bir azalma olmuştur. Sonuç olarak, qRT-PCR analizleri, *HaNHL* gen ailesinin su yetersizliğine karşı verilen yanıtlarda rol alabileceğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.12 Kuraklığa dayanıklı ayçiçeği çeşidi Sun-2235' te kuraklık stresi altında *HaNHL* genlerinin qRT-PCR tabanlı ifade analizi

Kuraklık stresine karşı Sun-2235 ile beraber Turay çeşidinin *NHL* genleri açısından ekspresyon profillerindeki değişimler de belirlenmiştir. 7 günlük kuraklıkta, Turay çeşidine ait *NHL* genleri, özellikle kök ve yaprak dokularında büyük ölçüde up-regüle olmuştur (Şekil 4.13). Buna karşılık, bazı *Turay/HaNHL* genlerinin ekspresyon seviyelerinde hafif derecede azalmalar gözlenmiş, bazı genlerin ise ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Örneğin, Turay/*HaNHL16* geninde yaprak ve gövde dokularında anlamlı bir değişim gözlenmemiş, ancak kök dokusunda belirgin bir up-regülasyon tespit edilmiştir. İstisna olarak, *Turay/HaNHL-02, -10, -15, -29* genlerinde down-regülasyonlar görülmüştür. *Turay/HaNHL29* geninde gövde

ekspresyon seviyesi sabit kalırken, kökte belirgin bir down-regülasyon gözlenmiştir. Sonuç olarak, qRT-PCR analizleri, *NHL* gen ailesinin su yetersizliğine karşı verilen biyolojik yanıtlarda rol oynayabileceğini doğrulamaktadır. Genel olarak, bu bulgular *NHL* gen ailesinin kuraklıkla ilişkili sinyal yollarında yer aldığını ve su stresi koşullarına karşı farklı işlevler üstlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.13 Kuraklığa duyarlı ayçiçeği çeşidi Turay' da kuraklık stresi altında *HaNHL* genlerinin qRT-PCR tabanlı ekspresyon analizi

4.8 FotosynQ Ölçümleri ve Değerlendirmesi

Stoma kapanması, bitkilerin kuraklığa karşı verdiği ilk tepkidir. Her ne kadar kapalı stomalar yapraklardan su buharlaşmasını azaltsa da, aynı zamanda CO₂' nin yapraklara difüzyonunu da engeller. Stomal iletkenlik ile fotosentez arasındaki yakın ilişki nedeniyle, fotosentezin tepkisi su stresinin şiddetini dolaylı olarak belirlemek için kullanılabilir. Bu bağlamda, fotosentezin kuraklığa verdiği tepki ve stresin ortadan kalkmasının ardından iyileşme süreci, farklı bitki türlerinin kuraklığa karşı dayanıklılığına dair önemli bir gösterge olabilir. Özellikle, habitat koridorunda bulunan çeşitli ağaç türlerinin kuraklık tepkisini taramak için klorofil floresansı basit ve etkili bir yöntemdir.

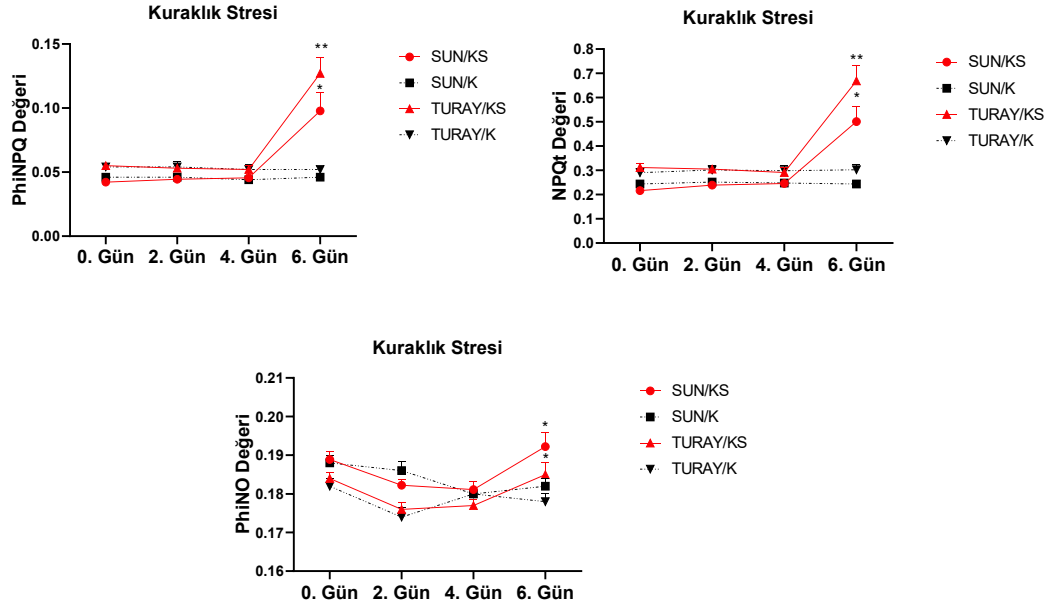


Şekil 4.14 Sun ayçiçeği çeşidinde kontrol ile stres grubu arasındaki gözlemsel farklılık



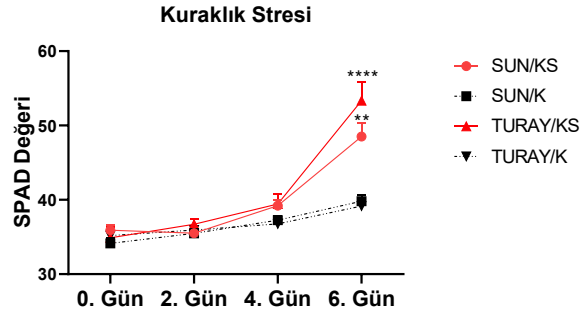
Şekil 4.15 Turay ayçiçeği çeşidinde kontrol ile stres grubu arasındaki gözlemsel farklılık

Moleküler ve biyokimyasal açıdan bakılacak olursa, Sun ve Turay çeşitlerinde kuraklıkla ilişkili olan PhiNPQ, PhiNO ve NPQt değerlerinde artış gözlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, dirençli olduğu tahmin edilen çeşidin (Sun) kuraklığa daha etkili bir yanıt verdiği saptanmıştır. Bu nedenle genel anlamda, Turay çeşidinde gözlenen değişim, Sun çeşidine kıyasla daha büyüktür (Şekil 4.16).



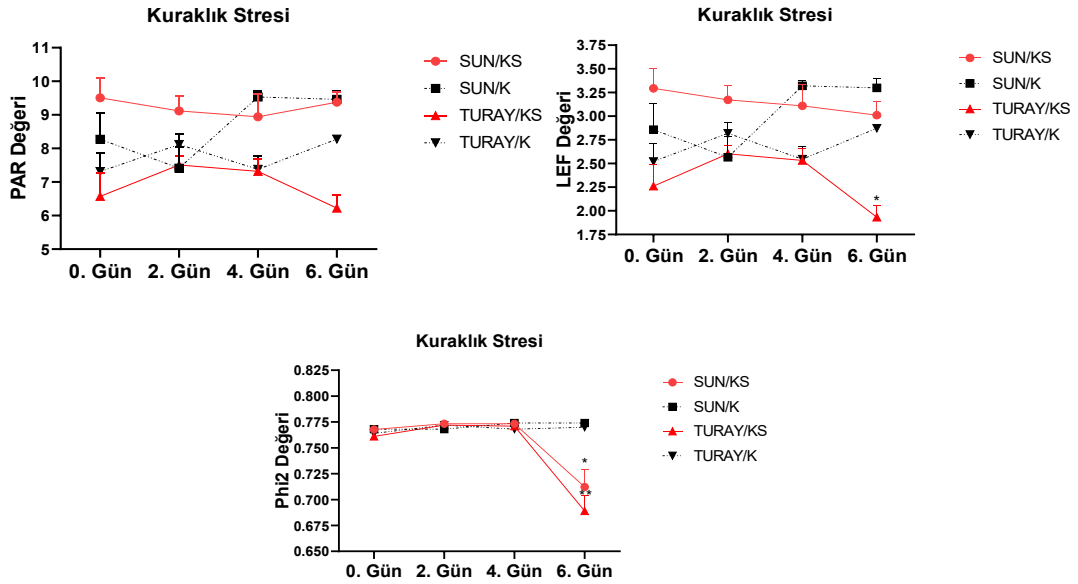
Şekil 4.16 Kuraklık boyunca PhiNPQ, NPQt ve PhiNO değerlerinin değişimi (KS:Kuraklık Stresi, K:Kontrol)

Kuraklık stresi, bitkilerde klorofil düzeylerinin azalmasına neden olabilir. Bu durum sonucunda, relatif klorofil içeriği (SPAD) genellikle belirgin şekilde düşme eğilimi gösterir. Ancak Şekil 4.17' de de görüldüğü üzere, SPAD değerlerinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu durumun olası açıklaması, su stresi altındaki bitkilerde yaprakların önemli ölçüde büzülmesiyle birlikte, ölçüm sırasında birim yüzey alanına düşen klorofil miktarının artmasıdır. Ayrıca, Turay çeşidiyle kıyaslandığında, SPAD miktarındaki artış Sun çeşidinde daha yüksek düzeyde gerçekleşmiştir.



Şekil 4.17 Kuraklık esnasında SPAD değişimi (KS:Kuraklık Stresi, K:Kontrol)

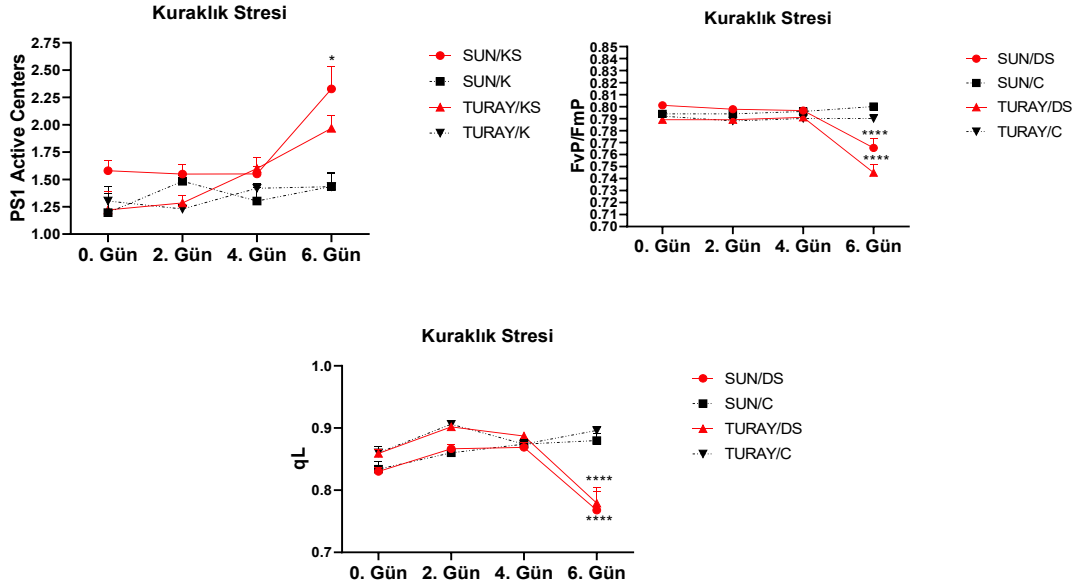
Fotosistem II'nin kuantum verimi (Φ_{II}), fotosentetik aktivitenin yavaşlaması nedeniyle stres altında azalması beklenen bir parametredir. Şekil 4.18' de de görüldüğü üzere, Φ_{II} değerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Kuraklık, fotosistem II veriminden (Φ_{II}) türetilen doğrusal elektron akışı (LEF) üzerinde de kayda değer bir etki yaratmıştır. Özellikle Turay çeşidinde, LEF değerinde belirgin bir düşüş gözlemlenmiş, ancak Sun çeşidinde benzer bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu durum, Turay' a kıyasla Sun' da fotorespirasyonun daha güçlü olduğuna işaret etmektedir. Fotosentetik olarak aktif radyasyon (PAR), LEF ile ilişkili bir parametredir. Kuraklık stresi sırasında PAR değerinin azalması beklenmekle birlikte, bu çalışmada PAR'da anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir (Urban vd., 2023).



Şekil 4.18 PAR, LEF, Phi2 değerlerinin kuraklık stresinde değişim grafiği (KS:Kuraklık Stresi, K:Kontrol)

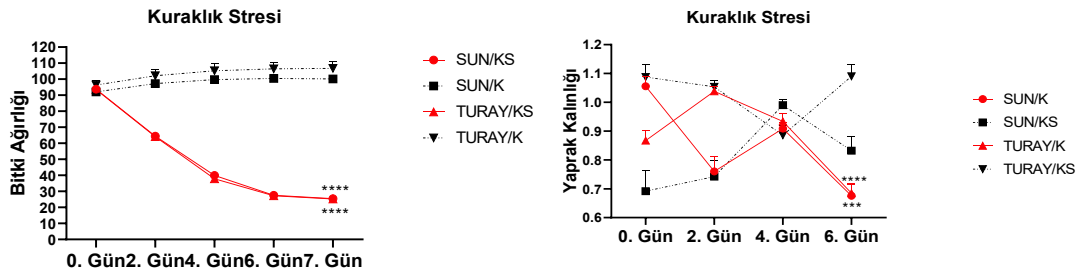
Fotosistem I'deki elektron akışını temsil eden PS1 aktif merkezinde, Sun çeşidinde bir artış gözlenirken, Turay çeşidinde anlamlı bir artış tespit edilmemiştir (Şekil 4.19). Öte yandan, her iki ayçiçeği çeşidinde de Fotosistem II'nin maksimum kuantum verimliliğini gösteren Fv/Fm değerinde belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Fv/Fm, Fotosistem II ile ilişkili önemli bir stres göstergesi olduğundan, tıpkı Φ_{II} (Phi2) parametresinde olduğu

gibi azalma eğilimi sergilemiştir. Ayrıca, elektron akışını yansıtan qL değeri de fotosentezin yavaşlamasına bağlı olarak öngörüldüğü üzere azalmıştır.



Şekil 4.19 PS1 Active Centers, FvP/FmP ve qL değerlerinin değişim grafiği (KS:Kuraklık Stresi, K:Kontrol)

Ağırlık kaybı, su stresinin en belirgin fiziksel göstergelerinden biridir. Her iki ayçiçeği çeşidinde de (Sun ve Turay) bitki ağırlığında anlamlı düzeyde azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca, PhotosynQ cihazı ile ölçümler sırasında yaprak kalınlığı nicel olarak belirlenmiştir. Başlangıçta Sun ve Turay çeşitlerinde yaprak kalınlığında hafif bir artış tespit edilmiş, ancak bunu takiben belirgin bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Kuraklık esnasında bitki ağırlığı ve yaprak kalınlığı değişimi (KS:Kuraklık Stresi, K:Kontrol)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Önceki çalışmalar, fen otu (*Arabidopsis*), tütün, soya fasulyesi, üzüm, domates ve diğer bazı bitki türlerinde stres toleransı mekanizmasının *NHL* genleri tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur (Gopalan vd., 1996). Bu çalışmada, ayçiçeğinde *NHL* genlerinin genom çapında tanımlaması gerçekleştirilmiştir. *HaNHL* genlerinin fonksiyonel analizleri, ayçiçeğinin kuraklık stresine karşı verdiği yanıtta *NHL* gen ailesinin önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, ayçiçeğine ait 33 *NHL* geni tanımlanmıştır (Çizelge 4.1). Üç bitki türüne ait filogenetik ağaçtan elde edilen verilere göre, biyoinformatik analizler *NHL* gen ailesi üyelerinin üç gruba ayrılabilceğini göstermektedir. Bu bulgu, Shahbaz ve ark. (2023) tarafından yapılan önceki çalışma ile uyumludur (Şekil 4.1) (Shahbaz vd., 2023). Şekil 4.2' den elde edilen sonuçlara göre, aynı filogenetik gruptaki genlerin motif yapılarının büyük ölçüde benzer olduğu görülmektedir. Bu durum, aynı gruptaki üyelerin bitki gelişimi ve stres yanıtlarında benzer işlevler üstlenebileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.2).

Biyoinformatik analizlere dayanan bulgulara göre, *HaNHL* gen ailesi üyelerinde korunmuş bir LEA-2 domaini bulunmaktadır. Önceki araştırmalar, LEA protein ailesinin strese cevap oluşturmada rol oynadığını ortaya koymuştur (Liu vd., 2020). Örneğin, LEA içeren proteinleri kodlayan genlerin, tohum gelişiminin geç evrelerinde ve kuraklık ile soğuk gibi çevresel stres koşullarında, yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (Goyal vd., 2005). Singh ve arkadaşları; kuraklık, soğuk, ozmotik stres ve yüksek sıcaklık gibi stres etmenlerinin *A. thaliana*' da *LEA14* geninin ekspresyonunu stimüle ettiğini raporlamışlardır (Singh vd., 2005). Bu çalışmada, LEA ihtiva eden proteinleri kodlayan bazı *HaNHL* genlerinin, kuraklık gibi stres koşulları altında aktive olduğu görülmüştür (Şekil 4.12–4.13). Bu bulgu, Zhang ve ark. (2022) tarafından raporlanan sonuçlarla da uyum içerisindedir (Zhang vd., 2022). Elde edilen veriler, ayçiçeğinde su kıtlığına karşı oluşan stres mekanizmasında, *HaNHL* gen ailesi üyelerinin de rol alabileceğini göstermektedir.

Cis-acting düzenleyici elementler, hormonal yanıtlar ve çeşitli stres tepkileri dâhil olmak üzere birçok biyolojik süreci kontrol eden moleküler anahtarlar olarak önemli roller üstlenmektedir (Zhang vd., 2022). Düzenleyici elementlerin analizleri, *HaNHL* genlerinin promotör bölgelerinde kuraklık stresi ile ilişkili olanlar da dâhil olmak üzere çeşitli streslere cevap oluşturma ile ilgili elementlerin bulunduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.3). İlginç bir şekilde, MeJA hormonuna duyarlı düzenleyici elementlerin de tespit edilmesi, *HaNHL* genlerinin MeJA sinyal iletim yollarında önemli roller oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, anaerobik solunumla ilişkili ARE elementleri, CAAT-kutusu promotör ve güçlendirici bölgeleri, TATA-kutusu transkripsiyon başlangıç bölgeleri, metabolizma düzenleme bölgesi (O₂-site) gibi promotör dizilerinin yanı sıra kuraklığa duyarlı MYB bağlanma bölgeleri, düşük sıcaklık yanıt elementleri (LTR) ve savunmayla ilişkili stres yanıt elementleri (TC-rich) gibi çok sayıda düzenleyici motif tanımlanmıştır. Bu bulgular, *HaNHL* gen ailesinin hormon yanıtları ve abiyotik streslere karşı tepkilerde potansiyel olarak rol oynayabileceğini göstermektedir (Liu vd., 2020). Bunlara ek olarak *Arabidopsis*' te, tohum çimlenme ve gelişim süresi boyunca, *AtNHL6* geninin, abiyotik streslerin tetiklediği ABA sinyal yollarında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Bao vd., 2016). Tüm bu veriler, *NHL* gen ailesinin iki farklı ayçiçeği çeşidinde stres toleransı ve bitki hormonlarına yanıt süreçlerinde görev alabileceğini açıkça göstermektedir.

HaNHL gen ailesine ait proteinlerin üç boyutlu yapıları incelenmiştir (Şekil 4.4). Yapılan analizler sonucunda, *HaNHL* protein modellerinin ikincil yapılarında β -tabakalarının baskın olduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalara göre, LEA_2 grubuna ait proteinlerde büyük oranda β -tabaka ve düşük düzeyde α -sarmal yapılar tespit edilmiştir. Bu yapının, hayvan hücre yüzeylerinde bulunan fibronectin Tip III bölgelerine benzer şekilde, sıvı sızıntısını önleyerek bitki dokularında stres veya yaralanmaların etkilerini azaltmaya yardımcı olabileceği öne sürülmektedir (Li ve Cao, 2016; Singh vd., 2005). Bu öngörülen protein yapılarının, gelecekte moleküler biyoteknoloji alanında gerçekleştirilecek araştırmalara katkı sağlaması beklenmektedir.

Ortak atadan evrimsel ayrışma yoluyla türeyen ve genellikle türler arasında benzer işlevlerini koruyan genler, ortolog genler olarak tanımlanır. Ortologların belirlenmesi,

gen fonksiyonlarının anlaşılmasını derinleştirmek açısından kritik bir adımdır (Koonin, 2005). Bu çalışmada, *H. annuus*, *O. sativa* ve *A. thaliana* genomları arasında *NHL* genlerinin ortolog ilişkileri araştırılmıştır. *H. annuus* ile *A. thaliana* arasında 8, *H. annuus* ile *O. sativa* arasında ise 2 gen çifti tespit edilmiştir. Bu bulgular, *NHL* genlerinin *O. sativa* ve *A. thaliana*' da tandem ve segmental duplikasyon olayları sonucunda genişlediğini göstermekte olup, Guo ve ark. (2023) tarafından yapılan önceki çalışmalarla uyumludur (Guo vd., 2023). Ayrıca, elde edilen sonuçlar tüm *NHL* gen duplikasyonlarının Ka/Ks oranlarının 1'in altında olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum da söz konusu genlerin arındırıcı (purifying) seçilim baskısı altında evrimleştiğine işaret etmektedir.

miRNA' lar, hedef genlerin ekspresyon düzeylerini kontrol ederek; bitki büyümesi, gelişimi ve stres yanıtı üzerinde önemli etkiler göstermektedir (Wang vd., 2019). Ayçiçeğinde altı *HaNHL* geninin, daha önce bitkilerde abiyotik ve biyotik stres tepkilerinde önemli rolleri olduğu bilinen sekiz farklı miRNA ailesi tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. Bu çalışmada, H₂S metabolizması ve taşınmasında görev alan APS redüktaz genini hedefleyen *miR395a*'nın, *HaNHL16* ve *HaNHL24* genleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Arenas-Huertero vd., 2009; Fu vd., 2018). Ayrıca, *Brassica rapa*' da ısı stresine yanıt verdiği bilinen *miR5712*' nin, *HaNHL10* ve *HaNHL17* genlerini hedeflediği gösterilmiştir (Wang vd., 2017).

RNA-seq sonuçları, farklı dokuların *HaNHL* genlerinin ekspresyon düzeylerinde büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. *HaNHL05*, *HaNHL06*, *HaNHL07*, *HaNHL08*, *HaNHL12*, *HaNHL18* ve *HaNHL26* gibi birçok gen neredeyse tüm dokularda yüksek düzeyde ifade profilleri sergilerken; *HaNHL02*, *HaNHL10*, *HaNHL20*, *HaNHL28* ve *HaNHL30* genleri düşük ekspresyon seviyelerine sahiptir. Gen ekspresyonundaki değişimlerin genellikle doku kaynaklı değil, genden gene fark ettiği gözlemlenmiştir.

Bitkilerde belirli RNA düzeylerindeki değişiklikler, fizyolojiyi önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Güncel araştırmalar, RNA düzeylerindeki değişimlerin, bitkilerdeki çeşitli fizyolojik değişimlerin biyobelirteçleri olarak işlev görebileceğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda, Zhang ve ark. (2018) tarafından yürütülen bir çalışmada,

çeltikte su stresi ile RNA düzeylerindeki değişiklikler arasındaki ilişki incelenmiştir (Zhang vd., 2018). Çalışmada, su stresinin gelişim, metabolizma ve stres tepkisi ile ilişkili çeşitli RNA' ların ifade düzeylerinde anlamlı değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, bu RNA düzeylerindeki değişikliklerin, yaprak su potansiyeli ve klorofil konsantrasyonu gibi fizyolojik parametrelerdeki dalgalanmalarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Li ve ark. (2019) tarafından yapılan bir başka çalışmada, *Arabidopsis* bitkisinde kuraklık stresi ile RNA değişimleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir (Li vd., 2019). Bu çalışmada da kuraklık stresinin, büyüme ve stres metabolizması ile ilişkili birçok RNA' nın ifade seviyesinde önemli değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Ek olarak bu değişimlerin, stomatal iletkenlik ve yaprak su potansiyeli gibi fizyolojik faktörlerle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Genel olarak, kontrol ile karşılaştırıldığında, stres sonrası mRNA seviyesi değişimi Sun ayçiçeği çeşidinde, Turay çeşidine kıyasla daha fazladır. Ayrıca, RT-qPCR ile doğrulanan RNA-seq verilerinin analizi de bu hipotezi desteklemiştir. Örneğin, kuraklık stresine yanıt olarak *HaNHL02*, *HaNHL04*, *HaNHL05* ve *HaNHL16* gibi yüksek düzeyde up-regüle olan genlerin, promotör bölgelerinde stres ve hormon yanıtına duyarlı düzenleyici elementler taşıdığı belirlenmiştir. Bu bulgular, HaNHL gen ailesinin abiyotik stres yanıtındaki potansiyel rolünü desteklemektedir.

Kuraklığın yaprak seviyesinde fizyolojiye etkisi, klorofil floresansı ile gözlemlenmiştir. Bitkilerin azot durumu ile hastalık veya diğer stres etkenlerinin gelişimini değerlendirmede sıklıkla kullanılan göreceli klorofil içeriği (SPAD) ölçümü (Kuhlgert vd., 2016), bu çalışmada da incelenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada, buğdayda kuraklık stresi sırasında SPAD değerinin düşme eğiliminde olduğu bildirilmiş (Saghouri el idrissi vd., 2023), ancak bu bulgu bizim sonuçlarımızla örtüşmemektedir. Bu farkın nedeni, su stresi altında yaprakların belirgin biçimde büzülmesi ve ölçüm sırasında birim yüzeye düşen klorofil konsantrasyonunun yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Turay çeşidinde doğrusal elektron akışı (LEF) hafif bir azalma gösterirken, Sun çeşidinde stres sırasında değişim olmamış ve iyileşme gözlenmiştir. LEF, fotosistemler arasındaki elektron aktarım miktarını gösterir ve gerçek fotosentez ile birlikte fotorespirasyonla doğrudan ilişkilidir (Urban vd., 2023). Azalmış Fv/Fm değeri, yaprakta yapısal hasar olduğunu yansıtır (Waldhoff vd., 2002). Bu nedenle Fv/Fm değeri,

yaprak hasarı ve canlılığının basit bir göstergesi olarak kullanılabilir. Ancak Fv/Fm değeri, hafif derecede kuraklıklara karşı çok duyarlı olmamakla birlikte, yalnızca yaprakların fotokimyasal fonksiyonları ciddi şekilde bozulduğunda belirgin olarak düşer (Urban vd., 2023). Kuraklık stresi çalışmalarında en uygun ölçüt, düzenlenen (Φ NPQ) ve düzenlenmeyen (Φ NO) süreçlerde enerji kaybı oranıdır. Tüm türlerde kuraklık arttıkça Φ NPQ artarken, Φ NO azalmıştır. Φ NPQ, fotokimyasal süreçlerin baskılandığı durumlarda kaybedilen kuantum verimini gösterir (Dreuw vd., 2005). Stres altındaki bitkiler, aşırı uyarıcı enerjiden korunmak için ısıyı (Φ NPQ) dağıtan NPQ mekanizmalarını kullanır. Öte yandan, Φ NO genellikle toksik reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açar (Murchie ve Niyogi, 2011). Maksimal fotokimyasal verimlilik (Fv/Fm), gerçek PSII fotokimyasal verimliliği (Φ PSII) ve PSII antenlerinin birbirine bağlı olduğunu varsayan fotokimyasal floresans sönümü katsayısı (qL) gibi modüle edilmiş klorofil floresans özellikleri, fotosentetik biyokimya aktivitesi ile ilişkilidir (Wang vd., 2017). Çalışmamızda, 7 günlük kuraklık uygulamasının sonunda, iki uygulama grubu açısından, Fv/Fm değeri göz önüne alındığında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Ayrıca, Φ PSII ve qL değerlerinde de belirgin azalma görülmüş; bu durum fotokimyasal dönüşümün ve doğrusal elektron akışının kuraklık stresinin şiddetine ve süresine duyarlı olduğunu göstermiştir. Ek olarak NPQ artışı ve Fm azalması, ksantofil döngüsü yoluyla enerji dağılımında artış olduğunu göstermektedir. Bu, bitkilerin fotosentez fonksiyonlarını korumak için geliştirdiği savunma mekanizmasıdır (Adams, 1994). Bitkiler kuru ortam koşullarında daha kalın yapraklar geliştirme eğilimindedir. Soya fasulyesi ile yapılan bir çalışmada yaprak kalınlığının su eksikliğiyle arttığı bildirilmiştir (Aneja vd., 2024). Elde edilen bulgular, bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu değildir. Analiz edilen veriler kapsamında, ayçiçeği bitkisinde stres koşullarına yanıt olarak yaprak kalınlığının azalmasının, canlılığını yitirmeye çok yaklaşmış bitkiler olarak, yapraktaki mezofil tabakasının tüketmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Son olarak, bitkilerin kuru ağırlığında belirgin bir azalma saptanmıştır. Önceki çalışmalar, kuraklık stresinin, yaprakların fotosentetik üretimini önemli ölçüde azalttığını ve bunun sonucunda koza ve tohum ağırlıklarının düştüğünü göstermiştir (Du vd., 2023).

Özetle, elde edilen bulgular, ayçiçeğinde *NHL* genleri tarafından düzenlenen stres tolerans yollarının anlaşılmasını derinleştirerek *NHL* gen ailesi üzerine yapılacak gelecekteki fizyolojik çalışmalara temel oluşturacaktır. Son olarak, bu araştırma stres toleransına sahip bitkilerin geliştirilmesine ve daha yüksek ürün verimlerine katkı sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Aboudrare, A., Debaeke, P., Bouaziz, A. ve Chekli, H. 2006. Effects of soil tillage and fallow management on soil water storage and sunflower production in a semi-arid Mediterranean climate. *Agricultural Water Management*, 83(3), 183-196.
- Alexandratos, N. ve Bruinsma, J. 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working Papers 288998, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Agricultural Development Economics Division, 12-03. Rome, Italy.
- Altunoglu, Y. C., Unel, N. M., Baloglu, M. C., Ulu, F., Can, T. H. ve Cetinkaya, R. 2018. Comparative identification and evolutionary relationship of fatty acid desaturase (FAD) genes in some oil crops: the sunflower model for evaluation of gene expression pattern under drought stress. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32(4), 846-857.
- Aneja, P., Sanyal, R. ve Ranjan, A. 2024. Leaf growth in third dimension: a perspective of leaf thickness from genetic regulation to ecophysiology. *New Phytologist*, 245, 989–999.
- Angadi, S. V. ve Entz, M. H. 2002. Agronomic performance of different stature sunflower cultivars under different levels of interplant competition. *Canadian Journal of Plant Science*, 82(1). 43-52.
- Anonymous. 2025a. Web Sitesi <https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity/2224000>, Erişim Tarihi: 02.09.2025.
- Anonymous. 2025b. Web Sitesi: <https://ourworldindata.org/grapher/vegetable-oil-production?tab=discrete-bar&time=latest>, Erişim Tarihi: 23.08.2025.
- Anonymous. 2025a. Web Sitesi: <https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity/2224000>, Erişim Tarihi: 02.09.2025.
- Anonymous. 2025b. Web Sitesi: <https://ourworldindata.org/grapher/vegetable-oil-production?tab=discrete-bar&time=latest>, Erişim Tarihi: 23.08.2025.
- Arenas-Huertero, C., Pérez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De La Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., Sanchez, F., Covarrubias, A. A. ve Reyes, J. L. 2009. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molecular Biology*, 70(4), 385-401.
- Aroca, R. 2012. Plant responses to drought stress. From Morphological to Molecular Features. Springer, 461, Berlin/Heidelberg.
- Badouin, H., Gouzy, J., Grassa, C. J., Murat, F., Staton, S. E., Cottret, L., Lelandais-Brière, C., Owens, G. L., Carrère, S., Mayjonade, B., Legrand, L., Gill, N., Kane, N. C., Bowers, J. E., Hubner, S., Bellec, A., Bérard, A., Bergès, H., Blanchet, N., ... Langlade, N. B. (2017). Badouin, H., Gouzy, J., Grassa, C.J., Murat, F., Staton, S.E., Cottret, L., Lelandais-Brière, C., Owens, G.L., Carrère, S., Mayjonade, B., Legrand, L., Gill, N., Kane, N.C., Bowers, J.E., Hubner, S., Bellec, A., Bérard, A., Bergès, H., Blanchet, N., Boniface, M.C., Brunel, D.,

- Catrice, O., Chaidir, N., Claudel, C., Donnadiou, C., Faraut, T., Fievet, G., Helmstetter, N., King, M., Knapp, S.J., Lai, Z., Le Paslier, M.C., Lippi, Y., Lorenzon, L., Mandel, J.R., Marage, G., Marchand, G., Marquand, E., Bret-Mestries, E., Morien, E., Nambeesan, S., Nguyen, T., Pegot-Espagnet, P., Pouilly, N., Raftis, F., Sallet, E., Schiex, T., Thomas, J., Vandecasteele, C., Varès, D., Vear, F., Vautrin, S., Crespi, M., Mangin, B., Burke, J.M., Salse, J., Muños, S., Vincourt, P., Rieseberg, L.H. ve Langlade N.B. 2017. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature*, 546(7656), 148-152.
- Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E. ve Noble, W. S. 2015. The MEME Suite. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), 39-49.
- Baker, N. R., Harbinson, J. ve Kramer, D. M. 2007. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant, Cell and Environment*, 30(9), 1107-1125.
- Bao, Y., Song, W. M., Pan, J., Jiang, C. M., Srivastava, R., Li, B., Zhu, L. Y., Su, H. Y., Gao, X. S., Liu, H., Yu, X., Yang, L., Cheng, X. H. ve Zhang, H. X. 2016. Overexpression of the *NDRI/HINI*-Like gene *NHL6* modifies seed germination in response to abscisic acid and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plos one*, 11(2), e0148572.
- Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J. V., Vangronsveld, J. ve Van Der Lelie, D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology*, 22(5), 583-588.
- Becker, L. C., Boyer, I. J., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks Jr, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Gill, L. J. ve Heldreth, B. 2023. Safety Assessment of *Helianthus annuus* (Sunflower)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 42(1), 93-116.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. ve Bourne, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242.
- Bester, D., Esterhuysen, A. J., Truter, E. J. ve Van Rooyen, J. 2010. Cardiovascular effects of edible oils: A comparison between four popular edible oils. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 334-348.
- Canavar, O. ve Kaptan, M. A. 2014. Changes in macro and micro plant nutrients of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, 67(2), 136-139.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y. ve Xia, R. 2020. TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. *Molecular Plant*, 13(8), 1194-1202.
- Chen, Q., Tian, Z., Jiang, R., Zheng, X., Xie, C. ve Liu, J. 2018. *StPOTHR1*, a *NDRI/HINI*-like gene in *Solanum tuberosum*, enhances resistance against *Phytophthora infestans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(4), 1155-1161.

- Chong, J., Le Henanff, G., Bertsch, C. ve Walter, B. 2008. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 469-481.
- Correia, M. J., Fonseca, F., Azedo-Silva, J., Dias, C., David, M. M., Barrote, I., Osório M. L. ve Osório, J. 2005. Effects of water deficit on the activity of nitrate reductase and content of sugars, nitrate and free amino acids in the leaves and roots of sunflower and white lupin plants growing under two nutrient supply regimes. *Physiologia Plantarum*, 124(1), 61-70.
- Cruz, J. A., Savage, L. J., Zegarac, R., Hall, C. C., Satoh-Cruz, M., Davis, G. A., Kovac, W. K., Chen, J. ve Kramer, D. M. 2016. Dynamic Environmental Photosynthetic Imaging Reveals Emergent Phenotypes. *Cell Systems*, 2(6), 365-377.
- Culman, S. W., Snapp, S. S., Green, J. M. ve Gentry, L. E. 2013. Short- and long-term labile soil carbon and nitrogen dynamics reflect management and predict corn agronomic performance. *Agronomy Journal*, 105(2), 493-502.
- Daszkiewicz, T. 2022. Food Production in the Context of Global Developmental Challenges. *Agriculture (Switzerland)*, 12(6), 832.
- de Andrade, S. A. L., Domingues, A. P. ve Mazzafera, P. 2015. Photosynthesis is induced in rice plants that associate with arbuscular mycorrhizal fungi and are grown under arsenate and arsenite stress. *Chemosphere*, 134, 141-149.
- Debaeke, P., Bedoussac, L., Bonnet, C., Mestries, E., Seassau, C., Gavaland, A., Raffailac, D., Tribouillois, H., Vericel, G., Justes, E., Bret-Mestries, E., Seassau, C. ve Véricel, G. 2017. Sunflower crop: environmental-friendly and agroecological. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 23(4), 12-22.
- Demir Kaya, M. ve Kolsarici, O. 2011. Seed yield and oil content of some sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids irrigated at different growth stages. *African Journal of Biotechnology*, 10(22), 4591-4595.
- Demmig-Adams, B. ve Adams, W. W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant science*, 1(1), 21-26.
- Dreuw, A., Fleming, G. R. ve Head-Gordon, M. 2005. Role of electron-transfer quenching of chlorophyll fluorescence by carotenoids in non-photochemical quenching of green plants. *Biochemical Society Transactions*, 33(4), 858-62.
- Du, X., Zhang, X., Wei, Z., Lei, W., Hu, G., Huang, Z. ve Kong, L. 2023. Photosynthetic characteristics of subtending leaves and their relationships with soybean pod development under heat, drought and combined stresses. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 209(1), 204-215.
- Elemike, E. E., Uzoh, I. M., Onwudiwe, D. C. ve Babalola, O. O. 2019. The role of nanotechnology in the fortification of plant nutrients and improvement of crop production. *Applied Sciences*, 9(3), 499.
- El-Hamidi, M. ve Zaher, F. A. 2018. Production of vegetable oils in the world and in Egypt: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 42(1), 1-9.
- Elliott, J., Deryng, D., Müller, C., Frieler, K., Konzmann, M., Gerten, D., Glotter, M., Flörke, M., Wada, Y., Best, N., Eisner, S., Fekete, B. M., Folberth, C., Foster,

- I., Gosling, S. N., Haddeland, I., Khabarov, N., Ludwig, F., Masaki, Y., Olin, S., Rosenzweig, C., Ruane, A. C., Satoh, Y., Schmid, E., Stacke, T., Tang, Q. ve D. Wisser, D. 2014. Constraints and potentials of future irrigation water availability on agricultural production under climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(9), 3239-3244.
- El-Shabrawi, H., Kumar, B., Kaul, T., Reddy, M. K., Singla-Pareek, S. L. ve Sopory, S. K. 2010. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. *Protoplasma*, 245(1), 85-96.
- Enebe, M. C. ve Babalola, O. O. 2018. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(18), 7821-7835.
- Fahlgren, N., Gehan, M. A. ve Baxter, I. 2015. Lights, camera, action: High-throughput plant phenotyping is ready for a close-up. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, 93-99.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. ve Sharkey, T. D. 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, 6(3), 269-279.
- Fu, Y., Tang, J., Yao, G. F., Huang, Z. Q., Li, Y. H., Han, Z., Chen, X. Y., Hu, L. Y., Hu, K. D. ve Zhang, H. 2018. Central role of adenosine 5'-phosphosulfate reductase in the control of plant hydrogen sulfide metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 24(9), 1404.
- Galmés, J., Aranjuelo, I., Medrano, H. ve Flexas, J. 2013. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosynthesis Research*, 117, 73–90.
- García-López, J., Lorite, I. J., García-Ruiz, R. ve Domínguez, J. 2014. Evaluation of three simulation approaches for assessing yield of rainfed sunflower in a Mediterranean environment for climate change impact modelling. *Climatic Change*, 124, 147-162.
- Gardy, J. L., Laird, M. R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C. J., Ester, M. ve Brinkman, F. S. L. 2005. PSORTb v.2.0: Expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics*, 21(5), 617-623.
- Genty, B., Briantais, J. M. ve Baker, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1), 87-92.
- Ghobadi, M., Taherabadi, S., Ghobadi, M. E., Mohammadi, G. R. ve Jalali-Honarmand, S. 2013. Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress. *Industrial Crops and Products*, 50, 29-38.

- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N. ve Rokhsar, D. S. 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40, 1178-1186.
- Gopalan, S., Wei, W. ve He, S. Y. 1996. hrp gene-dependent induction of hin1: A plant gene activated rapidly by both harpins and the avrPto gene-mediated signal. *Plant Journal*, 10(4), 591-600.
- Goyal, K., Walton, L. J. ve Tunnacliffe, A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*, 388(1), 151-157.
- Gunes, A., Pilbeam, D. J., Inal, A. ve Coban, S. 2008. Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: Growth, antioxidant mechanisms, and lipid peroxidation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(13-14), 1885-1903.
- Guo, S., Ge, Y. ve Na Jom, K. 2017. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.). *Chemistry Central Journal*, 11(1), 95.
- Guo, X., Wei, F., Jian, H., Lian, B., Dang, X., Yang, M., Fu, X., Ma, L., Lu, J., Wang, H., Wei, H. ve Yu, S. 2023. Systematic analysis of the NDR1/HIN1-like (NHL) family in *Gossypium hirsutum* reveals a role of *GhNHL69* in responding to cold stress. *Industrial Crops and Products*, 206, 117659.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. ve Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(9), 431-438.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. ve Nakai, K. 2007. WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35, 585-587.
- Huang, Q., Lei, Z., Xiang, L., Zhang, W., Zhang, L. ve Gao, Y. 2022. Transcriptomic Analysis of Sunflower (*Helianthus annuus*) Roots Resistance to *Orobanche cumana* at the Seedling Stage. *Horticulturae*, 8(8), 701.
- Hussain, M. M., Rauf, S., Riaz, M. A., Al-Khayri, J. M. ve Monneveux, P. 2017. Determination of drought tolerance related traits in *Helianthus argophyllus*, *Helianthus annuus*, and their hybrids. *Breeding Science*, 67(3), 257-267.
- Hussain, M., Farooq, S., Hasan, W., Ul-Allah, S., Tanveer, M., Farooq, M. ve Nawaz, A. 2018. Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives. *Agricultural Water Management*, 201, 152-166.
- Hussain, M., Malik, M. A., Farooq, M., Ashraf, M. Y. ve Cheema, M. A. 2008. Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(3), 193-199.
- Hussain, R. A., Ahmad, R., Nawaz, F., Ashraf, M. Y. ve Waraich, E. A. 2016. Foliar NK application mitigates drought effects in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 83.
- Iqbal, N., Ashraf, M. ve Ashraf, M. Y. 2009. Influence of exogenous glycine betaine on gas exchange and biomass production in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

- under water limited conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(6), 420-426.
- Kalarani, K., Senthil, A. ve Thangaraj, M. 2004. Effect of water stress on morpho-physiological traits of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *Madras Agricultural Journal*, 91, 1.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S. ve Nakaya, A. 2002. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 42-46.
- Kaya, M. D., Okçu, G., Atak, M., Çikili, Y. Ve Kolsarici, Ö. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy*, 24(4), 291-295.
- Kelley, L. A. ve Sternberg, M. J. E. 2009. Protein structure prediction on the web: A case study using the pyre server. *Nature Protocols*, 4(3), 363-373.
- Khalil, S. R. M., Hussein, B. A., Hussein, E. H. A. ve Tawfik, M. S. 2015. Silver nitrate is essential for successful regeneration of Egyptian sunflower (*Helianthus annuus* L.) cv. Giza 102. *International Journal of Advanced Research*, 3(9), 506-512.
- Killingbeck, K. T. 1996. Nutrients in Senesced Leaves: Keys to the Search for Potential Resorption and Resorption Proficiency. *Ecology*, 77(6), 1716-1727.
- Kim, T. H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N. Ve Schroeder, J. I. 2010. Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 561-591.
- Koonin, E. V. 2005. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, 39, 309-38.
- Korkmaz, H. Ve Durmaz, A. 2017. Bitkilerin Abiyotik Stres Faktörlerine Verdiği Cevaplar. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(2), 192-207.
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O. ve Edwards, G. E. 2004. New fluorescence parameters for the determination of Q A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*, 79(2), 209-218.
- Kuhlgert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M. I., Roth, M. G., Bi, K., TerAvest, D., Weebadde, P. ve Kramer, D. M. 2016. MultispeQ Beta: A tool for large-scale plant phenotyping connected to the open photosynQ network. *Royal Society Open Science*, 3(10), 160592.
- Lee, S. B., Ham, B. K., Park, J. M., Kim, Y. J. Ve Paek, K. H. 2006. *BnNHL18A* shows a localization change by stress-inducing chemical treatments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(1), 399-406.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van De Peer, Y., Rouzé, P. ve Rombauts, S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 325-32.
- Letunic, I. Ve Bork, P. 2011. Interactive Tree of Life v2: Online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Research*, 39, 475-478.

- Li, H., Mo, Y. L., Cui, Q., Yang, X. Z., Guo, Y. L., Wei, C. H., Yang, J., Zhang, Y., Ma, J. X. Ve Zhang, X. 2019. Transcriptomic and physiological analyses reveal drought adaptation strategies in drought-tolerant and -susceptible watermelon genotypes. *Plant Science*, 278, 32-43.
- Li, X. Ve Cao, J. 2016. Late Embryogenesis Abundant (LEA) Gene Family in Maize: Identification, Evolution, and Expression Profiles. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 15-28.
- Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M. Ve Rahman, I. M. 2012. Causes, effects and responses. *Water stress*, 25(1), 33.
- Liu, C., Peang, H., Li, X., Liu, C., Lv, X., Wei, X., Zou, A., Zhang, J., Fan, G., Ma, G., Ma, L. ve Sun, X. 2020. Genome-wide analysis of *NDR1/HIN1*-like genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) and functional characterization of *CaNHL4* under biotic and abiotic stresses. *Horticulture Research*, 7(1), 93.
- Livak, K. J. Ve Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Luisa, C., Sgherri, M., Pinzino, C. ve Navari-Izzo, F. 1993. Chemical changes and O₂ production in thylakoid membranes under water stress. *Physiologia Plantarum*, 87(2), 211-216.
- Mahalingam, R. 2015. Combined Stresses in Plants: Physiological, Molecular, and Biochemical Aspects. Springer International Publishing, 264, Oklahoma City.
- Maldonado, A., Youssef, R., McDonald, M., Brewer, E., Beard, H. Ve Matthews, B. 2014. Overexpression of four *Arabidopsis thaliana NHL* genes in soybean (*Glycine max*) roots and their effect on resistance to the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 86, 1-10.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C. ve Bryant, S. H. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, 43, 222-226.
- Markwell, J., Osterman, J.C. ve Mitchell, J.L. 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research* 46, 467-472.
- Murchie, E. H. ve Niyogi, K. K. 2011. Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1), 86-92.
- Mwale, S. S., Hamusimbi, C. ve Mwansa, K. 2003. Germination, emergence and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to osmotic seed priming. *Seed Science and Technology*, 31(1), 199-206.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A. ve Minh, B. Q. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L. ve Foyer, C. H. 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. *Annals of botany*, 89(7), 841-850.

- Örs, S. ve Ekinçi, M. 2015. Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. *Derim*, 32(2), 237-250.
- Pandey, G. 2018. Challenges and future prospects of agri-nanotechnology for sustainable agriculture in India. *Environmental Technology & Innovation*, 11, 299-307.
- Panković, D., Sakač, Z., Kevrešan, S. ve Plesničar, M. 1999. Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of experimental botany*, 50(330), 128-138.
- Peng H., Pan Q., Wei Z., Pu Y., Zhang Y., Wu G., Qing L., Sun X. 2017. Cloning, expression and anti-virus function analysis of tomato resistance-related gene *SlHin1*. *Scientia Agricultura Sinica*, 50, 1242–1251.
- Prasad, P. V. V., Pisipati, S. R., Momčilović, I. ve Ristic, Z. 2011. Independent and Combined Effects of High Temperature and Drought Stress During Grain Filling on Plant Yield and Chloroplast EF-Tu Expression in Spring Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(6), 430-441.
- Puttha, R., Venkatachalam, K., Hanpakdeesakul, S., Wongsas, J., Parametthanuwat, T., Srean, P., Pakeechai, K. ve Charoenphun, N. 2023. Exploring the Potential of Sunflowers: Agronomy, Applications, and Opportunities within Bio-Circular-Green Economy. *Horticulturae*, 9(10), 1079.
- Romanello, M., McGushin, A., Di Napoli, C., Drummond, P., Hughes, N., Jamart, L., Kennard, H., Lampard, P., Rodriguez, B. S., Arnell, N., Ayeb-Karlsson, S., Belesova, K., Cai, W., Campbell-Lendrum, D., Capstick, S., Chambers, J., Chu, L., Ciampi, L., Dalin, C., Dasandi, N., Dasgupta, S., Davies, M., Dominguez-Salas, P., Dubrow, R., Ebi, K. L., Eckelman, M., Ekins, P., Escobar, L. E., Georgeson, L., Grace, D., Graham, H., Gunther, S. H., Hartinger, S., He, K., Heaviside, C., Hess, J., Hsu, S.C., Jankin, S., Jimenez, M. P., Kelman, I., Kiesewetter, G., Kinney, P.L., Kjellstrom, T., Kniveton, D., Lee, J. K. W., Lemke, B., Liu, Y., Liu, Z., Lott, M., Lowe, R., Martinez-Urtaza, J., Maslin, M., McAllister, L., McMichael, C., Mi, Z., Milner, J., Minor, K., Mohajeri, N., Moradi-Lakeh, M., Morrissey, K., Munzert, S., Murray, K. A., Neville, T., Nilsson, M., Obradovich, N., Sewe, M. O., Oreszczyn, T., Otto, M., Owfi, F., Pearman, O., Pencheon, D., Rabbaniha, M., Robinson, E., Rocklöv, J., Salas, R. N., Semenza, J. C., Sherman, J., Shi, L., Springmann, M., Tabatabaei, M., Taylor, J., Trinanes, J., Shumake-Guillemot, J., Vu, B., Wagner, F., Wilkinson, P., Winning, M., Yglesias, M., Zhang, S., Gong, P., Montgomery, H., Costello, A., Hamilton, I. 2021. The 2021 report of the Lancet Countdown on health and climate change: code red for a healthy future. *The Lancet*, 398(10311), 1619-1662.
- Saghouri el idrissi, I., Kettani, R., Ferrahi, M., Nabloussi, A., Ziri, R. ve Brhadda, N. 2023. Water stress effect on durum wheat (*Triticum durum Desf.*) advanced lines at flowering stage under controlled conditions. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100696.
- Salvia, R., Egidi, G., Vinci, S. ve Salvati, L. 2019. Desertification risk and rural development in Southern Europe: Permanent assessment and implications for sustainable land management and mitigation policies. *Land*, 8(12), 191.

- Shahbaz, M., Azeem, F., Rafique, M. U., Siraj, H. M. S. ve Rizwan, M. 2023. Heat-Induced Transcriptome and Genome-Wide Analysis of *NHL* Genes in Maize (*Zea mays* L.) Suggest a Role of *ZmNHLs* Under Heat Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(11), 6891-6902.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. ve Ideker, T. 2003. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504.
- Sheffield, J. ve Wood, E. F. 2008. Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. *Climate Dynamics*, 31(1), 79-105.
- Silla, F. ve Escudero, A. 2006. Coupling N cycling and N productivity in relation to seasonal stress in *Quercus pyrenaica* Willd. saplings. *Plant and Soil*, 282(1-2), 301-311.
- Singh, S., Cornilescu, C. C., Tyler, R. C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Lee, M. S. ve Markley, J. L. 2005. Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. *Protein Science*, 14(10), 2601-2609.
- Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125(1), 27-58.
- Soleimanzadeh, H. 2012. Response of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) To Selenium Application under Water Stress. *World Applied Sciences Journal*, 17(9), 1115-1119.
- Song, F., Zhang, G. J., Ramanathan, V. ve Leung, L. R. 2022. Trends in surface equivalent potential temperature: A more comprehensive metric for global warming and weather extremes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(6), e2117832119.
- Sterk, G. ve Stoorvogel, J. J. 2020. Desertification—scientific versus political realities. *Land*, 9(5), 156.
- Tekin, F. ve Bozcuk, S. 1998. *Helianthus annuus* L. var. santafe (Ayçiçeği) tohumlarının çimlenmesi ve erken büyüme üzerine tuz ve dışsal putresinin etkileri. *Turkish Journal of Biology*, 22(3), 331-340.
- Thilakarathne, A. S., Liu, F. ve Zou, Z. 2025. Plant Signaling Hormones and Transcription Factors: Key Regulators of Plant Responses to Growth, Development, and Stress. *Plants*, 14(7), 1070.
- Tikkanen, M., Grieco, M., Nurmi, M., Rantala, M., Suorsa, M. ve Aro, E. M. 2012. Regulation of the photosynthetic apparatus under fluctuating growth light. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1608), 3486-3493.
- Urban, J., Matoušková, M., Robb, W., Jelínek, B. ve Úradníček, L. 2023. Effect of Drought on Photosynthesis of Trees and Shrubs in Habitat Corridors. *Forests*, 14(8), 1521.

- Varet, A., Hause, B., Hause, G., Scheel, D. ve Lee, J. 2003. The *Arabidopsis NHL3* gene encodes a plasma membrane protein and its overexpression correlates with increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Plant Physiology*, 132(4), 2023-2033.
- Varet, A., Parker, J., Tornero, P., Nass, N., Nürnberger, T., Dangl, J. L., Scheel, D. ve Lee, J. 2002. *NHL25* and *NHL3*, two *NDR1/HIN1*-like genes in *Arabidopsis thaliana* with potential role (s) in plant defense. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(6), 608-616.
- Vilvert, E., Lana, M., Zander, P. ve Sieber, S. 2018. Multi-model approach for assessing the sunflower food value chain in Tanzania. *Agricultural Systems*, 159, 103-110.
- Waldhoff, D., Furch, B. ve Junk, W. J. 2002. Fluorescence parameters, chlorophyll concentration, and anatomical features as indicators for flood adaptation of an abundant tree species in Central Amazonia: *Symmeria paniculata*. *Environmental and Experimental Botany*, 48(3), 225-235.
- Wang, J., Mei, J. ve Ren, G. 2019. Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in plant science*, 10, 360.
- Wang, J., Wu, R., Shanguan, T., Chen, G., Zheng, Y., Tao, X., Li, S., Wang, Y. ve Xu, S. 2022. *NDR1/HIN1*-like genes may regulate *Glycine max* seed germination under chilling stress through the ABA pathway. *Plant Growth Regulation*, 98(3), 613-624.
- Wang, Y., Tang, H., Debarry, J. D., Tan, X., Li, J., Wang, X., Lee, T. H., Jin, H., Marler, B., Guo, H., Kissinger, J. C. ve Paterson, A. H. 2012. MCSScanX: A toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic acids research*, 40(7), e49-e49.
- Wang, Z., Qiao, Y., Zhang, J., Shi, W. ve Zhang, J. 2017. Genome wide identification of microRNAs involved in fatty acid and lipid metabolism of *Brassica napus* by small RNA and degradome sequencing. *Gene*, 619, 61-70.
- White, J. W., Andrade-Sanchez, P., Gore, M. A., Bronson, K. F., Coffelt, T. A., Conley, M. M., Feldmann, K. A., French, A. N., Heun, J. T., Hunsaker, D. J., Jenks, M. A., Kimball, B. A., Roth, R. L., Strand, R. J., Thorp, K. R., Wall, G. W. ve Wang, G. 2012. Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crops Research*, 133, 101-112.
- Wu, Y., Shi, H., Yu, H., Ma, Y., Hu, H., Han, Z., Zhang, Y., Zhen, Z., Yi, L. ve Hou, J. 2022a. Combined GWAS and Transcriptome Analyses Provide New Insights Into the Response Mechanisms of Sunflower Against Drought Stress. *Frontiers in plant science*, 13, 847435.
- Wu, Y., Wang, Y., Shi, H., Hu, H., Yi, L. ve Hou, J. 2022b. Time-course transcriptome and WGCNA analysis revealed the drought response mechanism of two sunflower inbred lines. *PLoS One*, 17(4), e0265447.
- Xiong, D., Chen, J., Yu, T., Gao, W., Ling, X., Li, Y., Peng, S. ve Huang, J. 2015. SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics. *Scientific reports*, 5(1), 13389.

- Youle, R. J. ve Huang, A. H. C. 1978. Albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. *Plant Physiology*, 61(1), 13-16.
- Zhang, J., Zhang, H., Srivastava, A. K., Pan, Y., Bai, J., Fang, J., Shi, H. ve Zhu, J. K. 2018. Knockdown of rice *microRNA166* confers drought resistance by causing leaf rolling and altering stem xylem development. *Plant Physiology*, 176(3), 2082-2094.
- Zhang, M., Fu, R., Lin, M. M., Fang, J. B., Wang, R., Li, Y. K., Chen, J. Y., Sun, L. M. ve Qi, X. J. 2024. Genome-wide identification of *NDR1/HIN1*-like genes in kiwifruit and function analysis of *AeNHL17* in response to disease resistance. *BMC Plant Biology*, 24(1), 1184.
- Zhang, X., Xue, Y., Wang, H., Nisa, Z., Jin, X., Yu, L., Liu, X., Yu, Y. ve Chen, C. 2022. Genome-wide identification and characterization of *NHL* gene family in response to alkaline stress, ABA and MEJA treatments in wild soybean (*Glycine soja*). *PeerJ*, 10, e14451.
- Zheng, M. S., Takahashi, H., Miyazaki, A., Hamamoto, H., Shah, J., Yamaguchi, I. ve Kusano, T. 2004. Up-regulation of *Arabidopsis thaliana NHL10* in the hypersensitive response to Cucumber mosaic virus infection and in senescing leaves is controlled by signalling pathways that differ in salicylate involvement. *Planta*, 218(5), 740-750.
- Zheng, M. S., Takahashi, H., Miyazaki, A., Yamaguchi, K. ve Kusano, T. 2005. Identification of the cis-acting elements in *Arabidopsis thaliana NHL10* promoter responsible for leaf senescence, the hypersensitive response against Cucumber mosaic virus infection, and spermine treatment. *Plant Science*, 168(2), 415-422.