



Olgunlaşan Meyvede Dokuyu Düzenleyen Moleküler Mekanizmalar

Selman ULUIŞIK*

*Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur Gıda Tarım Ve Hayvancılık Meslek Yüksek Okulu Örtülü Mevkii İstiklal Yerleşkesi, Merkez / Burdur

*Sorumlu Yazar:

E-posta: suluisik@mehmetakif.edu.tr

Geliş Tarihi : 30 Mayıs 2018

Kabul Tarihi: 28 Ekim 2018

Özet

Olgunlaşan meyvenin dokusundaki değişimler hasat zamanını, meyvelerin raf ömrünü, patojenlere karşı dayanıklılığını, taşınabilirliğini ve son aşamada ise müşteri tercihini etkilemektedir. Çevresel şartlar ve genetik faktörler dokudaki bu değişimleri simultane bir şekilde etkileyerek meyvelerin raf ömrünü azaltmakta ve ekonomik olarak zarar vermektedir. Son yıllarda gelişen biyoteknoloji ve genetik sayesinde yumuşamaya neden olan etkenler daha iyi anlaşılmalı ve bu etkenleri ortadan kaldırmak ya da etkilerini yavaşlatmak için çalışmalar devam etmektedir. Bu derlemede, hücre duvarı modifikasyonlarında görev alan enzimler ve yumuşamada önemli bir etkiye sahip olan etilen hormonunun meyve dokusu üzerindeki etkileri tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Meyve yumuşaması, raf ömrü, hücre duvarı, enzim, pektin

Molecular Mechanisms Regulating Texture in Ripening Fruits

Abstract

Texture changes in ripening fruits influence consumer preference, fruit storability, transportability, shelf-life, and response to pathogen attack. Genetic regulatory factors as well as environmental conditions simultaneously affect texture changes in ripening fruit. In recent years, the factors that cause softening have been better understood and efforts are being made to remove these factors or slow down their effect through improved biotechnology and genetics. In this review, enzymes involved in cell wall modifications or regulation, and the effects of ethylene hormone which has a big effect on fruit texture are discussed.

Keywords: Fruit softening, shelf life, cell wall, enzyme, pectin

GİRİŞ

Meyve ve meyveden elde edilen çeşitli ürünler sağlıklı bir hayatın en önemli parçalarından birisi olurken, ticari anlamda ise Dünya’da ve ülkemizde büyük yatırımlar yapıldığı üretim ve tüketim sektörünü oluşturmaktadır. Başlıca bu iki sebepten dolayı, besin yönünden kaliteli ve uzun ömürlü meyve üretmeye karşı olan yönelim gittikçe artmaktadır. Ancak meyvelerde kalite parametrelerini sınırlayan faktörler vardır ve bu faktörlerin başında ise olgunlaşma döneminde görülen yumuşama gelmektedir. Olgunlaşma, meyvenin aromasında, renginde ve sertliğinde çok hızlı değişimlere neden olan genlerin, aromaların ve çeşitli kimyasal mekanizmaların koordineli bir şekilde çalışmasının sonucudur. Bu olgunlaşma sürecinin sonunda, aroması artmış, yumuşak bir dokuya sahip olan bir yapı oluşur [1]. Meyvedeki bu dokusal değişiklikler türler arasında farklılıklar gösterse de, genel olarak olgunlaşma ve yumuşama, hücre duvarındaki yapı taşlarının parçalanmasından ve turgordaki değişimlerden kaynaklanmaktadır. Tüm bu değişimlerin tek sebebi ise, insan ve hayvanların tüketimi için meyveyi daha çekici hale getirmektir [2].

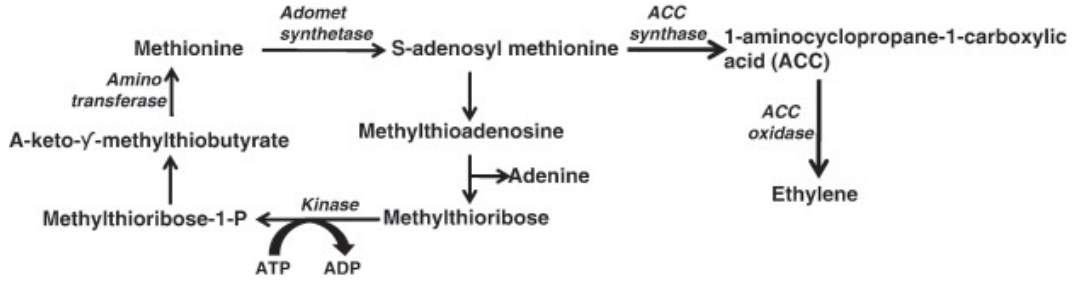
Tarımsal olarak meyvelerin raf ömrü, işleme kalitesi, besin değeri ve tadı kaliteyi belirleyen parametrelerdir. Bu kalite parametreleri, meyvenin aşırı olgunlaşması sonucu ortaya çıkan patojen duyarlılığından ve dokuda oluşan istenmeyen renklerden dolayı kaybolmaktadır [2]. Bundan dolayı meyvenin olgunlaşma seviyesi sadece raf ömrünü belirlemek ile kalmaz, meyvenin hangi sıklıkla toplanacağını ve ne kadar mesafeye taşınabileceğini de belirler. Olgunlaşmadaki bu seviyeyi kontrol edip olgunlaşma hızını yavaşlatmak için son 20 yılda çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Özellikle, genlerin modifikasyonunu kolaylaştıran teknoloji ilerledikçe, meyvelerin raf ömrünü uzatmak, besin değerini ve verimini arttırmak için yüzlerce çalışma yapılmıştır. Bu derleme çalışmasında, hücre duvarı modifikasyonunu direkt ve/veya dolaylı olarak etkileyen etilen hormonundan bahsedilecek ve bitki biyoteknolojisinde model bitki olarak kullanılan domates başta olmak üzere, çeşitli meyvelerde hücre duvarına yönelik yapılan çalışmalar anlatılacaktır. Derlemede domatesin temel olarak incelenmesinin başlıca sebepleri ise, çok hızlı gelişen bir olgunlaşma dönemine sahip olması, kültür edilebilmesi, değişik iklim şartlarında yetişebilmesi, 900 Mb’lık kompakt bir genomla sahip olması ve 2012 yılında genom diziliminin tamamlanmış olmasıdır [3].

Olgunlaşmanın Hormonal Düzenlemesi

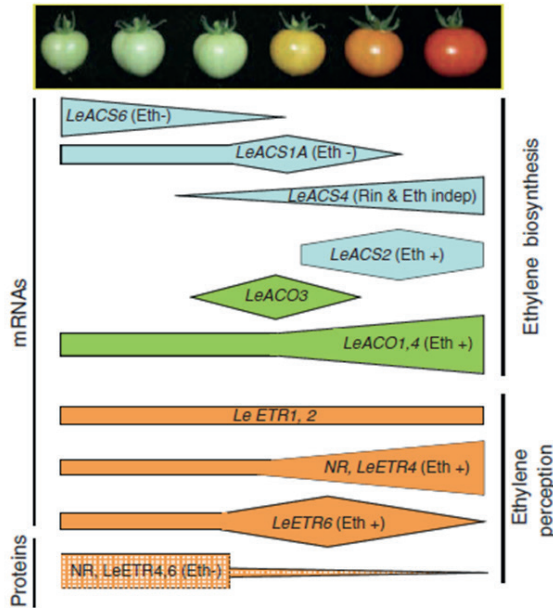
Etilen hormonunun renksiz, gazlı bir bitki hormonu olduğu, doğal yollarla üretildiği, bitki köklerinin oluşması, çiçeklerin çıkması, tohumun filizlenmesi, meyvenin olgunlaşması, yumuşaması ve bitkinin ölümü gibi çeşitli gelişim süreçlerinde aktif rol oynadığı elli yıldır bilinmektedir. Bu tarihten itibaren birçok çalışma yapılmış, etilenin fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde olgunlaşmaya olan etkisi kanıtlanmıştır. Bu kanıtlar ise, etilenin biyosentezi (şekil 1), reseptörler vasıtasıyla hedef hücreler tarafından algılanması, pozitif ve negatif düzenleyicileri (CTR, EIN2, EIN3 vb.) içeren sinyal iletim basamakları, son olarak ise, hedef genin ifadesinin, etilen yanıt faktörleri (ERF’ ler) gibi transkripsiyon faktörleri ile düzenlenmesidir [2].

Meyveler solunum aktivitelerine göre iki guruba



Şekil 1. Etilen biyosentezinin ilk aşamasında s-adenozil-L-metiyonin (SAM), ACC sentez (ACS) enzimi ile aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC)'ye dönüştürülür. ACC daha sonra ACC oksidaz (ACO) enzimi ile etilen hormonuna dönüştürülür [2].

ayrılırlar. Olgunlaşma sırasında solunum ve etilen miktarında hızlı bir artış gösteren meyveler klimakterik (domates, muz), bu artışı göstermeyenler ise klimakterik olmayan (üzüm, çilek) meyveler olarak tanımlanmaktadır [1]. Klimakterik meyvelerin gelişim ve olgunlaşma süreçlerinin birçok basamağında etilen hormonu rol alırken, klimakterik olmayan meyvelerde ne kadar görev aldığı tam olarak bilinmemektedir. Meyvenin olgunlaşmasında etilenin rolüne dair bilgilerin çoğu domates üzerindeki çalışmalara dayanmaktadır. Domatesin genomunda en az 14 ACS geni, 7 tane ACO geni ve 7 tane ERF (etilen reseptör geni) keşfedilmiştir [4]. Bu genlerin olgunlaşma dönemlerine ait ifade durumları şekil 2' de gösterilmiştir.



Şekil 2. Domatesin gelişimi ve olgunlaşmasında sistem 1 ve sistem 2 etilen algılanması ve sentezleriyle ilişkili ACS ve ACO genlerinin ifade edilme dönemleri. Sistem 1 de etilenin otomatik durdurulması *LeACS1A*, 6 ve *LeACO1,3,4* genleri ile sentezlenir. Geçiş döneminde, *LeACS4* genin ifadesinde otokatalitik etilen başlangıcı ile birlikte büyük bir artış gözlenir. *LeACO1,4* ve *LeACS2,4* genleri ise sistem 2 de yüksek otokatalitik etilen üretiminden sorumludur [5].

Etilenin meyve yumuşamasında ne kadar rol aldığı uzun yıllar merak konusu olmuştur. Bunun en önemli sebebi ise, etilen hormonun pratikte ve tarımsal faaliyetlerdeki etkisidir. Etilenin meyvede salgılanması ile hücre duvarını modifiye eden enzim ve proteinlerin çalışması arasında bir bağlantının olup olmadığını anlamak için birçok genetik çalışma yapılmıştır. Domateste '1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid' genini kodlayan *ACS*, antisens metodu ile ifadesi azaltıldığında meyve olgunlaşmasının yavaşladığı ve doku sertliğini daha uzun süre muhafaza ettiği görülmüştür [6]. Yine etilen sentezinde görev alan antisens *ACO* genini taşıyan transgenik kavunların dokusu daha sert kalmış ve raf ömrü uzamıştır [7]. Elmada yapılan bir çalışmada ise, ifadesi durdurulan *MdACO1* geni etilen üretimini yavaşlatmıştır. Bu transgenik meyvelere dışarıdan etilen verildiğinde ise nişastanın şekere dönüşmesi gibi bütün olgunlaşma göstergeleri normal seviyelerine dönmüştür [8].

Etilen Sinyal İletimi (Etylene Signal Transduction), etilen reseptörleri ile düzenlenir. Etilen hormonunun meyvede salgılanmadığı dönemde (örneğin domates yeşil halde iken) bu reseptörler aktif durumdadır, dolayısı ile etilenin salgılanması bu reseptörler vasıtası ile durdurulur. Ancak etilen salgılanmaya başladığında bu reseptörler pasif duruma geçer ve etilen salgılanır. Domateste 7 tane etilen reseptör geni bulunmaktadır (*LeETR1*, *LeETR2*, *NR LeETR3*, *LeETR4*, *LeETR5*, *LeETR6* ve *LeETR7*). *LeETR4* ve *LeETR6* reseptörlerini kodlayan genlerin durdurulması, domateslerin 5-7 gün civarında daha erken olgunlaşması ile sonuçlanmıştır [9]. *LeETR1* ve *LeETR2* gen ifadelerinin durdurulması sonucunda ise, domateslerin raf ömrü ve sertlikleri azalmıştır [10]. Bu çalışma sinyal iletiminde görev alan *LeETR1* ve *LeETR2*'nin ortamdaki kaldırılması etilen hormonunun aktif hale gelerek yumuşamaya ortam hazırladığını göstermiştir.

Etilen Cevap Faktörleri (Etylene Response Factors, ERF) etilen hormonuna verilen tepkiyi düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Domateste *LeERF1* geninin durdurulması domatesin raf ömrünü uzatmıştır [11]. Bir diğer çalışmada ise aday gen olarak seçilen *ERF*, domatesin 2. kromozomunun 2. hattına haritalanmıştır (*ERF2-2*). Yapılan doku sertliği çalışmasında ise bu genin yumuşamaya neden olduğu ifade edilmiştir [12].

Etilenin meyve olgunlaşmasındaki önemini teknik olarak gösteren bir çalışma Pan ve arkadaşları [13] tarafından yapılmıştır. Yapılan çalışmada, 3 erik çeşidine sırası ile 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ etilen veya 2.0 $\mu\text{L L}^{-1}$ 1-Metilsiklopropan (1-MCP) uygulanmıştır. Buna göre dışarıdan etilen gazı uygulanan meyvelerin kabuk rengi değişirken, 1-MCP uygulamasında değişmemiştir. Aynı şekilde uygulanan etilen gazı meyvelerin raf ömrünü kısaltırken, inhibitör hormon olan 1-MCP uygulamasında ise raf ömürleri uzamıştır. Özellikle etilen biyosentezi aşamalarında görev alan genlerin ifade

Pektinmetilesteraz (PME veya PE, EC3.1.1.11) Meyvenin olgunlaşması sürecinde, hücre duvarında modifikasyona uğrayan ilk makromolekül genellikle pektindir. PME, hücre duvarındaki metil ester guruplarını kaldırıp, karboksil gurupları oluşturarak hücre duvarına metanol bırakır. Bu enzim hücre duvarına iki şekilde etki eder. PME izoformu galakturonik asitten metil guruplarını ya blockwise (tek zincir mekanizması) modeli ile ya da düz model şeklinde kaldırıp, esterleşmiş pektini oluşturur. PME, düz modelde Ca^{2+} ile etkileşime girerek egg box (yumurta kutusu) adı verilen jelimsi yapıyı oluşturur ve sonuçta hücre duvarını poligalakturonaz (PG)- pektat liyaz (PL) etkisinden koruyarak serbest karboksil guruplarını oluşturur. Ancak, PME, galaktronik asitin metil guruplardan rastgele silinmesi durumunda ise, PG-PL gibi enzimlerin parçalayıcı etkisine ortam oluşturarak hücre duvarının yumuşamasına neden olmaktadır [27].

Domatesin genom haritasına göre hücre duvarı ile ilişkili 5 tane PME'nin gen ifadeleri gelişme ve olgunlaşma döneminde aktif hale geçmektedir [28]. Bu genlerin ifade seviyeleri olgunlaşmanın ilk dönemine kadar 2-3 kat artmaktadır [29]. Bu genlerden *Pmeu1*'in bitkisel dokuda ve meyvede ifadesi görülürken, *Pmeu2* izoformlarının ifadeleri sadece meyvenin olgunlaşması döneminde görülmüştür. *Pmeu1* gen ifadesinin durdurulması sonucunda meyveler daha çabuk yumuşamıştır ve bu durum göstermiştir ki bu gen hücre duvarının stabilitesi için kalsiyum bağlantı bölgelerinde görevlidir [30]. PE2 antisens cDNA parçası domatese transfer edildiğinde ise meyvenin yumuşamasında bir fark görülmemiştir [31]. Domatesin, yüksek çözünürlüklü QTL (Quantitative Trait Locus) haritalamasında ise Chapman ve arkadaşları [12] birbirine çok yakın gen dizilimine sahip olan 3 tane *ERF* genini 2. Kromozomun 5. hattına (*ERF2-5*) haritalamışlardır. Yapılan meyve dokusu sertliği çalışmalarında ise bu genin domatesin sertliğini arttırıcı bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Her ne kadar PME gen ifadesinin durdurulması meyvenin sertliği üzerinde bir rol oynamamış olsa da, bu genin susturulmasından elde edilen transgenik meyvelerin doku bütünlüğü daha geç bozulmuştur, dolayısı ile raf ömürleri artmıştır [32].

Poligalakturonaz (PG) (EC3.2.1.15) PG, başta domates olmak üzere birçok meyvenin olgunlaşma evresinde birincil hücre duvarı ve orta lamelde bulunan homogalakturonanın depolimerizasyonunda ana rolü oynar. Domates yeşil halde iken PG aktivitesi neredeyse yoktur, ancak meyve kızarmaya başlayınca enzim aktivitesinin en üst seviyeye çıktığı belirtilmiştir [33]. *Rin* (ripening inhibitör-olgunlaşmayı durduran) ve *cnr* (colourless nonripening-renksiz olgunlaşmayan) mutant domatesler olgunlaşmayan türler olarak bilinirler ve bu meyvelerde PG enzim aktivitesi görülmemiştir [34]. Bu durum PG'nin olgunlaşmadaki rolünü fazlasıyla göstermektedir. Ancak, PG gen ifadesinin durdurulması ile elde edilen meyveler ile kontrolleri arasında sertlik bakımından neredeyse hiçbir fark gözlemlenmemiştir ve bu meyvelerde normal yumuşama devam etmiştir. PG gen ifadesinin durdurulması ile domatestede sadece pektin depolimerizasyonu etkili bir şekilde azaltılmıştır [35]. Buna benzer bir sonucu Ghiani ve arkadaşları şeftalide elde etmişlerdir. Bu çalışmada, PG'nin etkisi yumuşak ve yumuşak olmayan iki şeftali türünde incelenmiştir. Sonuca göre, PG geninin şeftalide de doku bütünlüğünü korumada görev aldığı ancak meyve sertliğini sağlamadığı görülmüştür [36]. Çilekte ise bu çalışmalardan farklı bir sonuç elde edilmiş, antisens PG ile üretilen transgenik meyvelerin yumuşaması

yavaşlatılmış, raf ömürleri uzatılmıştır [37]. Buradan çıkan sonuç, PG geni domates ve şeftalinin yumuşamasında tek başına görev alan bir gen değil iken, çileğin yumuşamasında etkin rol oynamaktadır. Bundan dolayı, aynı genler farklı meyvelerde farklı roller oynadığı için her meyvede ayrı ayrı çalışılmalıdır.

Galaktanaz (EC 3.2.1.89) Araştırmalara göre, olgunlaşan meyvelerde serbest galaktozun artması ile birlikte ekzo-galaktanaz enziminin aktivitesinde 4-5 katlık bir artış gözlemlenmiştir. Bu enzimler muhtemelen ramnogalakturonan(1) 'ın (RG1) galaktozilce zengin yan zincirlerini parçalarlar. Domatesin gelişme ve olgunlaşma dönemine ait en az 7 tane β -galaktosidaz (TBG) geninin varlığı belirlenmiştir. Carey ve arkadaşları [38] *TBG1* genini %90 seviyesinde durdurularına rağmen hücre duvarının kompozisyonunda ve domatesin dokusunda herhangi bir değişim görmemişlerdir. Aynı şekilde *TBG3* genide antisens yöntemi ile susturulmuş, fakat dokuda herhangi bir değişiklik görülmemiştir [38]. Ancak, *TBG4* gen ifadesinin domatestede susturulması, meyve dokusunun sertliğini %40 kadar arttırmış ve böylece bu genin hücre duvarı modifikasyonunda önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır [39]. Domatestede bir diğer TBG geni olan *TBG6*'nın ifadesi de %98 seviyelerine kadar durdurulmuş ve meyvenin sertliği %35 kadar arttırılmıştır. Ancak bu modifikasyon meyve kabuğundaki çatlama arttırmıştır [40]. Aynı şekilde, *Faβgal4* çilek olgunlaşırken aktivitesi artan bir enzimdir ve bu enzimi kodlayan genin susturulması çileğin sertliğini % 30 kadar arttırmıştır [41]. Her ne kadar genetik bir çalışma yapılmamış olsa da, β -gal enziminin elma [42] ve armutta da [43] hücre duvarını modifiye ederek yumuşamaya neden olduğu kanıtlanmıştır. Pektik galaktan yan zincirlerinin β -gal enzimi ile parçalanarak meyvede yumuşamaya sebep olması her ne kadar bu enzimin önemini ortaya koysa da, enzimin gerçek fonksiyonu farklı meyvelerde ekspresyon seviyesinin arttırılması veya azaltılması ile elde edilen transgenik meyvelerde anlaşılacaktır.

Pektat Liyaz (PL) (EC 4.2.2.2) PL enzimi, β -eliminasyon reaksiyonu ile galaktozil rezidüleri arasındaki $\beta(1-4)$ bağlantılarını rastgele kırarak, 4-5 doymamış oligogalakturonatlar oluşturur [44]. PL gen dizilimleri çiçek erkek organı (anter), çiçek dişi organı (pistil) ve polen gibi bitkilerin çeşitli dokularında görülmektedir. Zayan ve arkadaşları zinnia hücre kültürlerinde ve Japon Çamı olarak bilinen büyük ağaçların polenlerinde de PL gen dizilimleri keşfedilmiştir [45]. Esas olarak PL geninin aktivitesi çilek, muz ve üzüm gibi olgunlaşan meyvelerde araştırılmıştır. Jimenez-Bermudez ve arkadaşları [46] çilekte PL geninin ifadesini durdurmuşlar ve transgenik meyvelerin daha sert olmasını sağlamışlardır. Bu transgenik meyvelerin raf ömürlerinin normal meyvelere göre daha uzun olduğu da gözlemlenmiştir. Muzda, PL geninin ifadesi genetik olarak modifiye edilmese de, PL benzeri gen dizilimleri keşfedilmiş ve bu enzimin aktivitesinin olgunlaşma sürecinde arttığı gözlemlenmiştir [47]. Domates Genom Konsorsiyumu'nun [28] sonuçlarına göre domatesin meyve kısmında 5 tane PL geni tespit edilmiş olmasına rağmen bu genler hep göz ardı edilmiştir. PL enziminin domatestede çok fazla araştırılmamasının sebebi, enzim aktivitesinin ölçülmesindeki aşırı zorluklardır. Ancak, Uluşık ve arkadaşlarının [48] çalışması ile domatestede ilk kez PL geninin ifadesi durdurulmuş, enzim aktivitesi ölçülmüş ve diğer kalite özelliklerini etkilemeden domatesin doku sertliği arttırılıp, raf ömrü uzatılmıştır (şekil 5). Bu çalışma ile birlikte hücre duvarının parçalanma mekanizması da

ortaya çıkarılmıştır. Buna göre, PG geninin durdurulması pektin depolimerizasyonunu azaltmış, fakat pektin solubizasyonunu ve yumuşamayı durduramamıştır. Bu durumdan yola çıkarak denilebilir ki, PG enzimi polüüronid maddesinin büyük bir kısmının parçalanması için gerekli, ancak meyve yumuşaması için gerekli değildir. Transgenik PL domateslerde ise poliüronid parçalanması tamamen durmuştur. Bu göstermiştir ki PG enzimi hücre duvarına etki etmek için PL enzimine ihtiyaç duymaktadır. Bu çalışma bir bakıma da enzimlerin sinerjik olarak çalıştıklarına da bir örnek olmuştur.



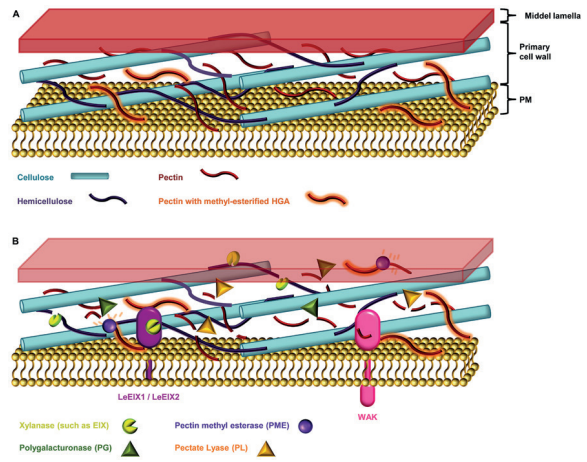
Şekil-5. Antisens pektat liyaz (transgenik) ve kontrol (yabani tip) domateslerinin 14 gün ve 40 gün sonunda oda sıcaklığındaki muhafazada görünüşleri [48].

Daha önce bahsedildiği üzere, selüloz/hemiselülöz, pektin polimerleri ile birlikte doku bütünlüğüne ve hücre duvarı dayanıklılığına katkıda bulunan elementlerdir. Selülozlar, bir multienzim sistemi olup (endo-ekzo glukozid, glukosidaz) meyvenin yumuşaması sürecinde selüloz matriksini parçalamadaki görevi geniş bir çalışma konusu olmuştur. Ancak bugüne kadar selülozların gerçek substratı tam olarak belirlenememiştir. Domateste 2 tane selüloz enzimi vardır (*Cell* ve *Cel2*). Bu enzimler ayrı ayrı ve aynı anda transgenik meyvelerde durdurulmuş ancak yumuşamada bir etkisinin olduğu görülmemiştir [49,50]. *Cell* geninin *rin* mutant domatesinde ifadelerinin artırılması ise bir miktar yumuşamayı arttırmış, ancak olgunlaşmaya neden olmamıştır. Domateste benzer bir sonuçta çilekte alınmış, *Cell* geninin durdurulması dokunun sertliğinde herhangi bir etkiye yol açmamıştır [51,52].

Hemiselülözler, heterojen bir yapıya sahip olduklarından dolayı çeşitli enzimlere gereksinim duyarlar. Endo-transglukozilaz (XET) hemiselülözlerin ana enzimidir [4]. Bu enzimi kodlayan gen, üzümün yumuşama sürecinde ekspresyon seviyesi en fazla olan gendir [53]. Domateste ise, hemiselülözle bağlantılı olan glikanlar yumuşama döneminde XET tarafından parçalanırlar. Domateste bu enzimi kodlayan 2 gen *LeEXGT1* [54] ve *LeXETB1* [55] susturulmuş, ancak meyve sertliği üzerinde herhangi bir etkileri görülmemiştir.

Expansinler ise hücre duvarının modifikasyonunda çok önemli roller üstlenen enzimatik olmayan proteinlerdir. Bu proteinlerin, hücre duvarında gevşemeye yol açarak EGaz'ların (*LeCel1* and *LeCel2*), ya da *XYLOGLUCAN ENDO-TRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE* (XTHs) gibi hidrolazların etkilerine katkı yaptıkları açıklanmıştır.

Domates Genom Konsorsiyumu'na göre domateste 7 tane expansin izorformu bulunmaktadır ve bunlardan sadece *LeExp1* meyvenin olgunlaşması ile bağlantılıdır. Bu genin susturulması ile meyvedeki yumuşamanın az miktarda engellendiği görülmüştür [56]. Aynı genin, ifade seviyesinin artırılması (overexpression) hemiselülözün depolimerizasyonunu arttırmış ve meyvenin daha hızlı yumuşamasına neden olmuştur [50]. Özetle, hücre duvarını modifiye eden enzimler, polisakkaritlerin doğrudan bozunmasında ve polisakkarit yan zincirlerinin modifikasyonunda etki alanlarını paylaşmaktadırlar. Bugüne kadar yapılan genetik çalışmaların vardığı en önemli sonuç ise bir enzimin, hücre duvarı polimerlerine etkisini etkin bir şekilde göstermesi için başka bir enzime ihtiyaç duymasındadır. Enzimlerin birbirleriyle olan bu ilişkisi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Birincil hücre duvarı selüloz mikrofibrilleri, hemiselülöz polisakkarit ve pektin ağından oluşmuştur. PME, pektik homogalakturnanın (HGA) omurgasını esterleştirir. β -Gal ve PL'in etkisi ile hücre duvarındaki uzun pektin zinciri çözünür. Ancak burada β -Gal enziminin öncelikli etki ettiği ve PL enzime ortam hazırladığı düşünülmektedir. Son aşamada ise çözünür pektin molekülleri PG tarafından bozunur [57].

Pektik polisakkaritlerinin etkin bir şekilde parçalanması, pektin zincirindeki farklı bağları kırmaktan sorumlu olan enzimlerin birlikte çalışmasını gerektirir. Polisakkarit omurgasındaki bileşenleri silen PME veya AE'nin (asetilesteraz) etkisini arttırmak için PG, PL ve RGazlar gerekmektedir. Meyvenin yumuşamasında az bir etkiye sahip olan β -gal enziminin susturulması, PL ve PG etkisi için pektinlerin salımında önemli olabilir. Ancak, Uluşık ve arkadaşları [48] PL'nin hücre duvarına sıkı bağlanmış olan, karbonat çözünür pektinlerinin salınmasında da yer aldığını göstermişlerdir. Rose ve Bennett [58] selüloz / hemiselülöz ve pektin parçalayıcı enzimler arasında potansiyel bir işbirliğinin var olduğunu belirtmişlerdir. Örneğin, PG geninin fazla ifadesi sonucunda minimal bir yumuşama görülen *rin* mutant domatesinde, olması beklenen pektin depolimerizasyonu yerine hemiselülöz depolimerizasyonu görülmüştür. Bunun aksine, selüloz/ hemiselülöz depolimerizasyonundan sorumlu olan expansin gen ifadesinin artırılması, pektinin parçalanmasını arttırmıştır [50]. PG ve β -gal ile ilgili önceki çalışmalar ve PL ile ilgili mevcut çalışma göstermiştir ki, meyve yumuşaması birçok

genin sinerjik ve kolektif etkisinin bir sonucudur. Bundan sonraki çalışmalar, hücre duvarının modifiyesinde görev alan genlerin beraber nasıl bir etki alanına sahip olduğunu anlamaya yönelik olmalıdır. Bu şekilde her bir genin hangi bileşen üzerinde etkili olduğu daha net anlaşılabilir ve bitki ıslahında, meyvelerin raf ömürlerinin uzatılmasında daha etkin çalışmalar üretilebilir.

SONUÇ

Hücre duvarının esterifikasyonu, depolimerizasyonu, solubizasyonu ve nötr şekerlerin parçalanması gibi modifikasyonlar meyvenin olgunlaşmasının ve yumuşamasının bir sonucudur. Bu değişimler, hücre duvarındaki polimerlerin bozunmasına, orta lameldeki bütünlüğün kaybolmasına ve dolayısı ile hücre duvarları arasındaki bağlantıların kopmasına neden olarak meyve dokusunun yapısını etkilerler. Son yıllarda bitkilerin gen haritalarının çıkarılması ve gen düzenleme yöntemlerinin gelişmesi ile birlikte meyve yumuşamasını kontrol etmek amacı ile yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Önümüzdeki yıllarda, aynı anda birden fazla geni aynı bitkide modifiye ederek diğer kalite özelliklerini etkilemeden yumuşamasını yavaşlatarak raf ömürlerini uzatmak ve kaliteyi arttırmak mümkün olacaktır. Tüm bu çalışmalar bitki ıslah çalışmalarının hızlanmasına ve kolaylaşmasına, ekonomisi tarıma dayalı olan ülkelere ve insanlığa büyük faydalar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Klee HJ, Giovannoni JJ. 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review Genetics* 45: 41-59

[2] Bapat VA, Trivedi PK, Ghosh A, Sane VA, Ganapathi TR, Nath P. 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances* 28: 94-107

[3] Gapper NE, McQuinn RP, Giovannoni JJ. 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology* 82(6): 575-591

[4] Seymour GB, Østergaard L, Chapman, NH, Knapp S, Martin C. 2013. Fruit Development and Ripening. *Annual Review of Plant Biology* 219-241

[5] Bouzayen M, Latche A, Nath P, Pech JC. 2010. Mechanism of Fruit Ripening. In: *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*, France, Springer

[6] Oeller PW, Wong LM, Taylor LP, Pike DA, Theologis A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437-439

[7] KNishiyama K, Gui M, Rose JK, Kubo Y, Bennett KA, Wangjin L, Kato K, Ushijima K, Nakano R, Inaba A, Bouzayen M, Latche, A, Pech JC, Bennett AB. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany*. 58: 1281-1290

[8] Johnston JW, Gunaseelan K, Pidakala P, Wang M, Schaffer RJ. 2009. Co-ordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. *Journal of Experimental Botany*. 60: 2689-2699

[9] Kevany BM, Taylor MG, Klee HJ. 2008. Fruit-specific suppression of the ethylene receptor LeETR4 results in early-ripening tomato fruit. *Plant Biotechnology*. 6: 295-300

[10] Bao BL, Ke LQ, Jiang JM, Ying TJ. 2007. Fruit quality of transgenic tomatoes with suppressed expression of LeETR1 and LeETR2 genes. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 16: 122-126

[11] Li Y, Zhu B, Xu W, Zhu H, Chen A, Xie Y, Shao Y, Luo Y. 2007. LeERF1 positively modulated ethylene triple response on etiolated seedling, plant development and fruit ripening and softening in tomato. *Plant Cell Reports*. 26: 1999-2008

[12] Chapman NH, Bonnet J, Grivet L, Lyn J, Graham N, Smith R, Sun G, Walley PG, Poole M, Causee M, King G, Baxter C, Seymour GB. 2012. High-Resolution Mapping of a Fruit Firmness-Related Quantitative Trait Locus in Tomato Reveals Epistatic Interactions Associated with a Complex Combinatorial Locus. *Plant Physiology*. 159: 1644-1657

[13] Pan H, Wang R, Wang J, Cao J, Weibo J. 2016. Manipulation of ripening progress of different plum cultivars during shelf life by post-storage treatments with ethylene and 1-methylcyclopropene. *Scientia Horticulturae*. 198: 176-182

[14] Li X, Xu C, Korba, SS, Chen K. 2010. Regulatory mechanisms of textural changes in ripening fruits. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 29: 222-243

[15] Brummel DA. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*. 33: 103-119

[16] Cosgrove DJ, Jarvis MJ. 2012. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant science*. 3: 1-6

[17] Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 850-861

[18] Crookes PR, Grierson D. 1983. Ultrastructure of Tomato Fruit Ripening and the Role of Polygalacturonase Isoenzymes in Cell Wall Degradation. *Plant Physiology* 72(4): 1088-1093

[19] Wakabayashi K. 2000. Changes in Cell Wall Polysaccharides During Fruit Ripening. *Journal of Plant Research*. 113: 231-237

[20] Nishiyama Y, Langan P, Chanzy H. 2002. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *Journal of the American Chemical Society*. 124(31): 9074-9082

[21] Scheller HV, Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant biology*. 61: 263-289

[22] Toivonen PMA, Brummel DA. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 48: 1-14

[23] Vicente AR, Ortugno C, Powel AL, Greve LC, Labavitch J. 2007a. Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 4119-4124

[24] Vicente AR, Powel, A, Greve LC, Labavitch JM. 2007c. Cell Wall disassembly events in boysenberry (*Rubus idaeus* L. \times *Rubus ursinus* Cham. & Schldl.) fruit development. *Functional Plant Biology*. 34: 614-623

[25] Huber DJ. 1984. Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science*. 49 : 1310-1315

[26] Wade NL, Kavanagh EE, Hockley DG, Brady CJ. 1992. Relationship between softening and the polyuronides in ripening banana fruit. *Journal of the science of Food Agriculture* 60: 61-68

[27] Wen B, Ström A, Tasker A, Tucker GA. 2012. Effect of silencing the two major tomato fruit pectin methylesterase isoforms on cell wall pectin metabolism. *Plant Biology*. 15(6): 1025-1032

[28] The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*. 485: 635-641

- [29] Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK. 1992. An Antisense Pectin Methylsterase Gene Alters Pectin Chemistry and Soluble Solids in Tomato Fruit. *The Plant Cell*. 4: 667-679
- [30] Phan TD, Bo W, West G, Lycett GW, Tucker GA. 2007. Silencing of the Major Salt-Dependent Isoform of Pectinesterase in Tomato Alters Fruit Softening. *Plant Physiology*. 144(4): 1960-1967
- [31] Hall LN, Tucker GA, Smith CJS, Watson C, Seymour GB, Bundick Y, Boniwell JM, Fletcher JD, Ray JA, Schuch W, Bird CR, Grierson D. 1993. Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. *The Plant Journal*. 1: 121-129
- [32] Tieman DM, Handa AK, 1994. Reduction in pectin methylsterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Plant Physiology*. 106: 429-436
- [33] Hobson GE, Grierson D. 1993. *Tomato, Biochemistry of Fruit Ripening*, London, Chapman & Hall, 405-442p
- [34] Eriksson EM, Bovy A, Manning K, Harris L, Andrews J, Silva JD, Tucker GA, Seymour GB. 2004. Effect of the Colorless non-ripening Mutation on Cell Wall Biochemistry and Gene Expression during Tomato Fruit Development and Ripening. *Plant Physiology*. 136: 4184-4197
- [35] Smith JCS, Watson CF, Ray J, Bird CR, Morris PC, Schuch W, Grierson D. 1988. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*. 334:724-726
- [36] Ghiani A, Onelli E, Ain, R, Cocucci M, Citterio S. 2011. A comparative study of melting and non-melting flesh peach cultivars reveals that during fruit ripening endopolygalacturonase (endo-PG) is mainly involved in pericarp textural changes, not in firmness reduction. *Journal of Experimental Biology*. 11: 4043-4054
- [37] García-Gago JA, Pose S, Muñoz-Blanco J, Quesada MA, Mercado JA. 2009. The polygalacturonase FaPG1 gene plays a key role in strawberry fruit softening. *Plant Signaling Behavior*. 4(8): 766-768
- [38] Carey AT, Smith DL, Harrison E, Bird CR, Gross KC, Seymour GB, Tucker GA. 2001. Down-regulation of a ripening-related beta-galactosidase gene (TBG1) in transgenic tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*. 52(357): 663-668
- [39] Smith DL, Abbott JA, Gross KC. 2002. Down-regulation of tomato beta-galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiology*. 129(4): 1755-1762
- [40] Moctezuma E, Smith DL, Gross KC. 2003. Antisense suppression of a β -galactosidase gene (TBG6) in tomato increases fruit cracking. *Journal of Experimental Botany*. 54: 2025-2033
- [41] Paniagua C, Blanco-Portales R, Barceló-Muñoz M, García-Gago JA, Waldron KW, Quesada MA, Muñoz-Blanco J, Mercado JA. 2016. Antisense down-regulation of the strawberry β -galactosidase gene Fa β Gal4 increases cell wall galactose levels and reduces fruit softening. *Journal of Experimental Botany*. 67 (3): 619-631
- [42] Gwanpua SG, Buggenhout SV, Verlinden BE, Christiaens S, Shpigelman A, Vicent V, Kermani ZJ, Nicolai BM, Hendricx M, Geeraerd A. 2014. Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. *Food Chemistry*. 158: 283-291
- [43] Song L, Wang Z, Wang Z, Meng G, Zhai R, Cai M, Ma F, Xu L. 2016. Screening of cell wall-related genes that are expressed differentially during ripening of pears with different softening characteristics. *Postharvest Biology and Technology*. 115: 1-8
- [44] Marín-Rodríguez CM, Orchard J, Seymour GB. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*. 53 (377): 2115-2119
- [45] Domingo C, Roberts K, Stacey NJ, Connerton I, Teran Ruiz F, McCann MC. 1998. A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. *The Plant Journal*. 13(1): 17-28
- [46] Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevado J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuest, V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA. 2002. Manipulation of Strawberry Fruit Softening by Antisense Expression of a Pectate Lyase Gene. *Plant Physiology*. 128: 751-759
- [47] Payasi A, Sanwal GG. 2003. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry*. 63(3): 243-248
- [48] Uluşık S, Chapman NH, Smith R, Poole M, Adams G, Gills RB, Besong T, Sheldon J, Stiegelmeier S, Perez L, Samsulrizal N, Wan, D, Fisk ID, Yang N, Baxter J, Rickett D, Fray R, Blanco-Ulate B, Powell AL, Harding SE, Craigon J, Rose JKC, Fich EA, Sun L, Domozych DS, Fraser PD, Tucker GA, Grierson D, Seymour GB. 2016. Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nature Biotechnology*. 34: 950-952
- [49] Lashbrook CC, Gonzalez BC, Bennett AB. 1994. Two divergent endo-beta-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell*. 10: 1485-1493
- [50] Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, Dunsmuir P. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell*. 11(11): 2203-2216
- [51] Woolley LC, James DJ, Manning K. 2001. Purification and properties of an endo-beta-1,4-glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, cell. *Planta*. 1: 11-21
- [52] Palomer X, Llop-Tous I, Vendrel, M, Krens FA, Schaart JG, Boone MJ, van der Valk H, Salentijn EMJ. 2006. Antisense down-regulation of strawberry endo- β -(1,4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Science*. 171: 640-646
- [53] Ishimaru M, Kobayashi S. 2002. Expression of a xyloglucan endo-transglycosylase gene is closely related to grape berry softening. *Plant Science*. 162: 621-628
- [54] Asada K, Ohba T, Takahashi S, Kato I. 1999. Alteration of Fruit Characteristics in Transgenic Tomatoes with Modified Gene Expression of Endo-xyloglucan Transferase. *Hortical Science*. 34: 533
- [55] Desilva J, Arrowsmith D, Hellyer A, Whiteman S, Robinson S. 1994. Xyloglucan endotransglycosylase and plant growth. *Journal of Experimental Botany*. 45: 1693-1701
- [56] Brummell DA, Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*. 1: 311-340
- [57] Malinovsky FG, Fangel JU, Willats WG. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*. 5: 1-12
- [58] Rose JKC, Bennet AB. 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science*. 5:176-183