

Derleme/Review

Meyve Gelişimi ve Olgunlaşmasında Rol Oynayan Gen Düzenleyici Aktörler

Behcet İNAL^{1*}, Koray ÖZRENK², Serdar ALTINTAŞ²

¹Siirt Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kezer Kampüsü, Siirt

²Siirt Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kezer Kampüsü, Siirt

*e-posta: behcetinal@siirt.edu.tr; Tel: 0484 2231224; Faks: 0484 2542057

Özet: Meyveler genel olarak Angiospermlerin ayırt edici özelliğidir. Meyveler çok farklı form ve şekillerde meydana gelebilirler. Ayrıca meyveler, insanlar için mineraller, vitaminler, lifler ve antioksidanlar sağlayarak tamamlayıcı diyetin önemli bir kısmını oluştururlar. Meyvelerin olgunlaşması çok karışık bir süreçtir ve gelişimsel süreçle oldukça koordineli bir şekilde meydana gelir. Olgunlaşma işlemi, perikarp katmanlarının kademeli olarak yumuşaması ve/veya odunlaşması, şekerlerin, asitlerin, pigmentlerin biriktirilmesi ve uçucu bileşiklerin açığa çıkması gibi olayları kontrol eden binlerce gen tarafından düzenlenir. Meyve olgunlaşmasının ardındaki genetik ve moleküler mekanizmayı derinlemesine anlamak meyve üretimi ve kalitesinin gelişmesi açısından kilit bir öneme sahiptir. Bu bağlamda son zamanlarda meyve gelişimi ve olgunlaşması üzerinde rol oynayan mikroRNA'lar (miRNA), transkripsiyon faktörleri (TF), uzun kodlanmayan RNA'lar (lnc RNA), gibi genetik aktörler hızla keşfedilmektedir. Ayrıca günümüzde etkili genom düzenleyici bir teknik olan düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR-Cas9) sistemi ve epigenetik yaklaşımlar da meyve gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmaların belirlenmesi için kullanılmaktadır.

Anahtar kelimeler: CRISPR/cas9, lncRNA, Meyve olgunlaşması, miRNA, Transkripsiyon faktörü

Gene Regulatory Actors Involved in Fruit Development and Ripening

Abstract: Fruits are a distinctive features for Angiosperms. They may occur in many different form and shape. Furthermore, fruits are a rich source of supplementary diet, providing various nutrition such as vitamins, minerals, fibers and antioxidants for human. The maturation of fruits is very complex and highly coordinated with developmental process. Maturation process is regulated by thousands of genes controlling events such as gradual softening, or/and lignification of pericarp layers, accumulation of sugars, acids and pigments, releasing of volatile compounds. Gaining a better and deeper understanding of the mechanism behind fruit maturation plays a key role for fruit production and improvement of quality. In this context, a number of genetic actors regulating fruit development and maturation such as microRNA's, transcription factors and long non-coding RNAs (lncRNAs) have been discovered. Nowadays, Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas9) which is very effective genom regulatory technique and epigenetic approach are used to determine the molecular mechanisms involved in fruit development.

Keywords: CRISPR/cas9, lncRNA, Fruit ripening, miRNA, Transcription factors

Giriş

Meyveler genel olarak Angiospermlerin önemli bir ayırt edici özelliği olarak bilinmektedir. Meyveler çok farklı form ve şekillerde meydana gelebilmektedir (Eriksson ve ark. 2000). Buna bağlı olarak da meyvelerin gelişmesi ve olgunlaşmasının moleküler genetik süreçleri oldukça karmaşık bir şekilde meydana gelmektedir. Özellikle etli meyvelerde olgunlaşma, hayvanların ilgisini çeken ve tohumların dağılmasını kolaylaştıran sulu, yumuşak ve lezzetli perikarp tabakasının oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Giovannoni 2001). Yumuşamaya ilaveten bitkilerde lezzeti artıran şekerlerde, asitlerde, pigmentlerde ve uçucu bileşik miktarlarında artış gözlemlenir. Ayrıca meyveler, insanlar için mineraller, vitaminler, lifler

ve antioksidanlar sağlayarak tamamlayıcı diyetin önemli bir kısmını oluştururlar. Tarımsal açıdan da; meyvenin besinsel değerleri, tadı, işlenme kalitesi ve raf ömrü meyvenin kalitesini belirler.

Meyve olgunlaşması, tohum olgunlaşmasıyla eş zamanlı meydana gelen oldukça koordineli ve karışık bir süreçtir. Olgunlaşma süreci, perikarp katmanlarının kademeli olarak yumuşaması ve/veya odunlaşması, şekerlerin, asitlerin, pigmentlerin biriktirilmesi ve uçucu bileşiklerin açığa çıkması gibi olayları kontrol eden binlerce gen tarafından düzenlenir. Olgunlaşma süreci boyunca bitkide meydana gelen değişiklikleri, renk (yeşil rengin kaybolması ve tür ile çeşide bağlı olarak değişen fotosentetik olmayan pigmentlerde meydana gelen artış), sertlik (Hücre duvarının parçalanması ve kütikula yapısında meydana gelen değişimler sonucu yumuşamanın gözlemlenmesi), tat (şeker miktarında artış ve organik asit miktarında azalma) ve lezzet (bitkiye özgü aromayı oluşturan uçucu bileşiklerin üretimi) şeklinde sıralamak mümkündür. Ancak bitkide meydana gelen bu organik madde birikiminden sorumlu gen aktörlerinin çoğu bilinmemektedir. Dolayısı ile meyve olgunlaşmasının ardındaki moleküler mekanizmayı derinlemesine anlamak zirai ürün geliştirme açısından kilit bir öneme sahiptir. Söz gelimi domates bitkisinde, olgunluğa geçiş sürecini bloke eden mutasyonlar, etilenin ve olgunlaşmanın kontrolünde yer alan etilenle ilgili rol oynayan moleküler ağlar açığa çıkarılmıştır. Ancak şimdiye değin yapılmış çalışmalar ile diğer bitki hormonlarının moleküler fizyoloji anlamındaki rolü henüz tam olarak ortaya çıkarılmamıştır. Bu moleküler fizyoloji ağının anlaşılması için, meyve olgunlaşmasının altında yatan mekanizmayı tam anlamıyla kavramamıza yardımcı olan/olacak, transkriptom (Alba ve ark. 2005; Vriezen ve ark. 2008; Matas ve ark. 2011; Rohrmann ve ark. 2011), proteom (Lee ve ark. 2004; Rose ve ark. 2004; Saravanan ve Rose 2004), ve metabolom (Fait ve ark. 2008; Lombardo ve ark. 2011) gibi yüksek hacimli derin moleküler seviyede yapılmış/yapılacak çalışmalar, canlının detaylı olarak fenotipik özelliklerinin ortaya çıkarılmasını sağlayan analitik yöntemlerdir (Carrari ve ark. 2006; Deluc ve ark. 2007; Grimplet ve ark. 2007; Enfissi ve ark. 2010; Zamboni ve ark. 2010; Osorio ve ark. 2011, 2012; Rohrmann ve ark. 2011; Lee ve ark. 2012; Pan ve ark. 2010). Bu bağlamda son yıllarda klimakterik ve klimakterik olmayan meyvelerde olgunlaşma sürecinde rol alan moleküler mekanizmayı; transkripsiyonel, biyokimyasal, hormonal ve metabolit seviyesinde anlamaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Böylece meyve gelişimi ile ilgili genetik düzenleyici elementlerin de netleştirilmesi, meyve olgunlaşmasının tam anlamıyla anlaşılması için kilit öneme sahiptir.

Meyve Gelişimi ve Olgunlaşmasında Rol Oynayan Transkripsiyon Faktörleri

Ökaryotlarda, genlerin regülasyonunda ya da transkripsiyonunda etkili olan düzenleyiciler olarak bilinen transkripsiyon faktörleri (TF), DNA üzerinde belli bir diziyeye bağlanabilen proteinlerdir. Çevreden kaynaklanan çeşitli etkenlere karşı hücre sürekli sinyal üretir (Transkripsiyon), bu süreçte RNA polimeraz doğrudan promotöre bağlanmak yerine transkripsiyonu özgün olarak başlatacak olan değişik proteinler (transkripsiyon faktörleri) aracılığı ile bağlanır. TF'leri, RNA polimeraz tarafından bir genin transkripsiyonunu ya (bir aktivatör olarak) kolaylaştırırlar ya da (bir represör olarak) engellerler (Latman 1997). Transkripsiyon reaksiyonu üzerindeki etkisinden dolayı düzenleyici rolü olduğu bilinen tüm proteinler, regülatör protein olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, bazı kaynaklarda regülatör proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının birlikte ele alınmasından ötürü regülatör proteinler oldukça karışık bir sınıflandırma oluşturmaktadır (Karaoğlu 2012). Genel olarak trans-etkili faktörler, transkripsiyon sürecinde cis-etkili bölgeler olarak tanımlanan regülatör bölgeleriyle etkileşim kuran proteinler olarak bilinir.

Günümüze kadar ki belirlenen ve meyve gelişimini etkileyen transkripsiyon faktörleri genel olarak mutantlarla ve akabinde de *Arabidopsis* ve *Antirrhinum*'da gen klonlama çalışmaları ile tanımlanmıştır. *AGAMOUS* ve *SQUAMOSA MADS*-box genleri gibi, klasik çiçek homeotik genleri karpel dahil çiçek organlarının oluşumu için gerekli moleküler belirteçleri sunmaktadır, ancak bu genler etki açısından meyveye özgü değillerdir.

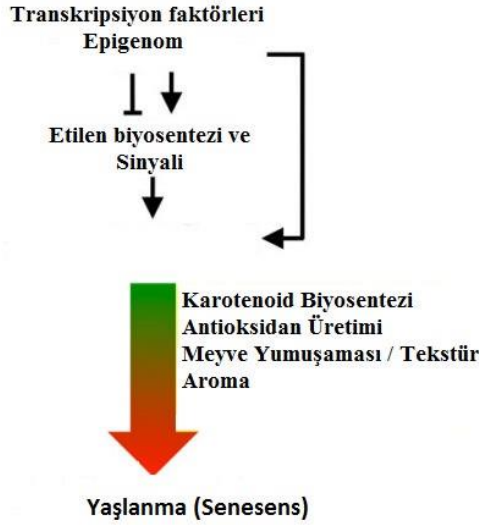
Önceki bazı çalışmalarda, çeşitli *MADS*-box transkripsiyon faktörlerinin doku farklılaşması ve meyve çatlamasında etkisinin olduğu bulunmuştur. Kuru ve etli meyveler arasında göze çarpan anatomik farklılıklara rağmen, daha sonra yapılan çalışmalar ilk olarak *Arabidopsis* model bitkisinde karakterize edilen *MADS*-box genlerinin çeşitli ortologlarının olgunlaşma sürecindeki etkisini ortaya koymuştur (Pnueli ve ark. 1994; Itkin ve ark. 2009; Vrebalov ve ark. 2009; Giménez ve ark. 2010; Bemer ve ark. 2012). Söz konusu meyve gelişiminde rol alan düzenleyici mekanizmaların bir kısmı, etli meyvelerin evrimsel süreçleri boyunca korunmuştur (Smaczniak ve ark. 2012; Seymour ve ark. 2013).

TF'lerin etki ettiği ve olgunlaşma fenomeninin anlaşılmasına yardımcı olan önemli gelişmelerden bazıları monogenik domates mutantlarının kullanılarak (olgunlaşmayı inhibe eden (*rip*), olgunlaşmayan (*nor*), renksiz-olgunlaşmayan (*cnr*), yeşil-olgun (*Gr*), yeşil meyve kabuğu (*gf*), yoğun pigment 1 (*hp1*), yoğun pigment 2 (*hp2*) ve asla olgunlaşmayan (*Nr*)) ilgili genlerin karakterize edilmesi sağlanmıştır (Lanahan ve ark. 1994; Mustilli ve ark. 1999; Vrebalov ve ark. 2002; Liu ve ark. 2004; Barry ve Giovannoni 2006; Manning ve ark. 2006; Barry ve ark. 2008).

Bitkide *rin* proteinleri *SEPALLATA* sınıfına ait kısmen silinmiş proteinleri kodlarken *cnr* ise *SPB* (*SQUAMOSA* promoter binding) proteinlerinin promotör metilasyonunu değiştiren bir tür epigenetik değişikliği tetiklemektedir (Hileman ve ark. 2006) (Şekil 1). Meyve gelişiminde etkisi olan bir diğer TF olan *Nor*, *NAC*-domain transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir (Giovannoni 2007). *Nor* ve *rin* mutantlarının gelişmeleri ve olgunlaşmaları sürecinde yapılan transkriptom, metabolom ve hedef metabolit analizlerinin kombine edildiği son çalışmalar ile, etilenin düzenlediği downstream genlerin ekspresyonu hakkında dolayısı ile meyve gelişim ve olgunlaşma fenomeni hakkında yeni bilgiler edinmede yardımcı olmuştur (Osorio ve ark. 2011). Bu bilgiler *nor* ve *rin*'in meyve olgunlaşma sürecinde kademeli olarak birlikte hareket ettikleri kabul edilmektedir (Giovannoni ve ark. 1995; Thompson ve ark. 1999). Aynı zamanda *nor*'un meyve olgunlaşmasıyla ilgili gen ekspresyonunda *nir*'e göre daha geniş bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Son zamanlarda kromatin immünopresipitasyonu ve transkriptom analizlerine dayalı kombine yaklaşımlar da kullanılarak *rin*'in 200'den fazla genin promotör bölgesiyle etkileşim içinde olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *rin*'in hedef genleri olan *cnr* ve *nor*'un olgunlaşma sürecinin temel düzenleyicileri olduğu bildirilmiştir (Martel ve ark. 2011).

Daha önce biberde yapılmış bir çalışmada, meyve olgunlaşması için önemli bir hormon olan etilen ile ilgili genlerin ifadelerinde belirgin bir farklılık olduğu bulunmuştur. Daha önce domateste tanımlanan durumdan farklı olarak, etilen biyosentez genleri olan; Aminosiklopropan-1-karboksilik asit sentetaz ve Aminosiklopropan-1-karboksilik asit oksidaz genlerinin biberde uyarılmadığı bulunmuştur. Ancak hücre duvarı ile alakalı genler, etilen yanıt faktörü 3 ve karotenoid biyosentez genleri gibi etilenin algılanmasında rol alan downstream genler biberde meyve olgunlaşma süreci boyunca upstream olarak düzenlenirler (Osorio ve ark. 2012). Çilek bitkisinde de *SEPALLATA* geninin (*SEPI/2*; *MADS*-box) meyvenin normal gelişme ve olgunlaşma süreci için gerekli olduğu belirlenmiştir (Seymour ve ark. 2011). Benzer şekilde klimakterik meyve olarak sınıflandırılan muz bitkisinde de, *MADS*-box *SEP3* geninde olgunlaşmayla ilgili yüksek bir ifade gösterdiği bulunmuştur (Elitzur ve ark. 2010). Ayrıca elmada da *MADS 2* gen ekspresyonunun meyve sertliğiyle ilgili olduğu bulunmuşken (Cevik ve ark. 2010), yaban mersininde ise antosiyenin biyosentezinin regülasyonunda rol oynadığı belirlenmiştir (Jaakola ve ark. 2010).

TF'lerin belirlenmesi için son yıllarda yaygın bir şekilde, RNA-dizilimi (RNA-seq) tekniğinin kullanılması ile çeşitli meyvelerin (*Vitis vinifera* (Zenoni ve ark. 2010), *Citrus sinensis* (Yu ve ark. 2012), *Siraitia grosvenorii* (Tang ve ark. 2011), *Rubus coreanus* (Hyun ve ark. 2014), *Pyrus pyrifolia* (Liu ve ark. 2012), *Mangifera indica* (Wu ve ark. 2014) ve *Lyciumruthenicum*, (Zeng ve ark. 2014)) olgunlaşması ve gelişmesi sırasında rol alan düzenleyici mekanizma ve gen ifade karmaşıklığının geniş anlamda çözüldüğü belirlenmiştir. Bu yüzden RNA-Seq metodu, bitki hormonlarıyla ilgili genleri ve transkripsiyon faktörlerini tanımlamada kullanılabilir bir metot olarak görülmüştür. Meyve gelişimine etki eden hormon içi ve hormonlar arası etkileşimin TFs tarafından düzenlendiği bulunmuştur (Kumar ve ark. 2014) Son yapılan çalışmalar *MADSTF*'ün hücre duvarı metabolizması, etilen biyosentezi ve sinyalizasyonu ile karotenoid biyosentezi dahil 200'den fazla genin promotörü ile etkileşim içinde olduğu ortaya konulmuştur (Martel ve ark. 2011) (Şekil 1) Gibberellik asit (GA_3) uygulamasının akabinde yapılan 54 *MADS*-box geninin ekspresyon analizi ile bu genlerin GA_3 uygulamasına tepkileri ortaya konulmuştur (Wang ve ark. 2015). Ayrıca Pamuk bitkisi protoplastındaki hücre duvarının rejenerasyonu sırasında görev alan çeşitli aile (*NAC*, *MYB*, *WRKY* ve zinc-finger) proteinlerini içeren TF'lerin etkisi açığa çıkarılmıştır (Yang ve ark. 2008). Ayrıca *MYB* ve *bHLH* transkripsiyon faktörlerinin flavonoid biyosentezinde yer alan yapısal genleri regüle ettiği görülmüştür (Lea ve ark. 2007). Ancak TF'nin meyve gelişimindeki rolünü netleştirmek için daha çok global moleküler tekniklere, fonksiyonel, fizyolojik ve agronomi çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 1. Domates bitkisinde meyve olgunlaşmasında rol oynayan genetik elementlerin: Transkripsiyon faktörlerinin, epigenetik ve senesense kadarki süreç ile ilişkisini değerlendiren/gösteren yollar (Gapper ve ark., 2013'ten değiştirilmiştir).

Meyve gelişimi ve olgunlaşması ile ilgili *Arabidopsis*'te *EIN3* benzeri bir transkripsiyon faktörü ve domateste *EIN3* benzeri dört gen (*EIL1*, *EIL2*, *EIL3* ve *EIL4*) oluşan bir familya bulunmaktadır. Domateste *EIL1*, *EIL2*, *EIL3* ve *EIL4* genlerinin antisens baskılanması etilen hassasiyetini azaltmıştır (Şekil 1). Domateste bu genlerin fonksiyonel çalışmalar sonucu aşırı ifade oldukları da görülmüştür (Tiemann ve ark. 2001). *EIN2*'de olduğu gibi, *EIN3* içinde de bir protein dönüşüm mekanizması bulunmaktadır. Ayrıca *SIEBF1/SIEBF2* homologlarının baskılanması temel etilen yanıtlarıyla (response) sonuçlanmıştır. Bu durum etilen sinyalizasyonunun *LeEIL* proteinlerinin stabilizasyonu ile aktive olduğunu göstermektedir (Yang ve ark. 2010). Önceki çalışmalar sonucunda *RIN-MADS* ve *CNR-SPL*'ye ilaveten, farklı genetik yaklaşımlar ile olgunlaşmayla ilgili birkaç tane transkripsiyonel düzenleyici tanımlanmıştır. Bu bağlamda Lin ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada meyvelerde aşırı ifade olan ACC oksidaz geninin (*LeACO1*) promotör bölgesine bağlanan HD-ziphomeobox proteinini (*LeHBI*) tanımlamışlardır. *LeHBI* proteinin susturulması ile azalan *LeACO1* transkript birikimiyle orantılı olarak meyve olgunlaşmasında bir gecikmeye yol açmıştır. Domateste *LeACO1* antisens susturmasının aşağıda belirtildiği gibi olgunlaşmanın yavaşlamasına ve meyvedeki etilen miktarının azalmasına neden olduğu bulunmuştur (Hamilton ve ark. 1990; Picton ve ark. 1993). Böylece *LeHBI* promotör bağlama suretiyle *LeACO1* genini olumlu yönde regüle ettiği bulunmuştur. Ancak daha önceki çalışmalar, *RIN-MADS*'in *ACO1* promotörüne bağlandığını kanıtlamamışlardır, fakat *RIN-MADS*'in *LeHBI* genine ait upstream dizisiyle etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir (Martel ve ark. 2011). Bu sonuçlar, *LeHBI-ACO1* genlerinin domates olgunlaşması sürecinde rol aldığını göstermektedir.

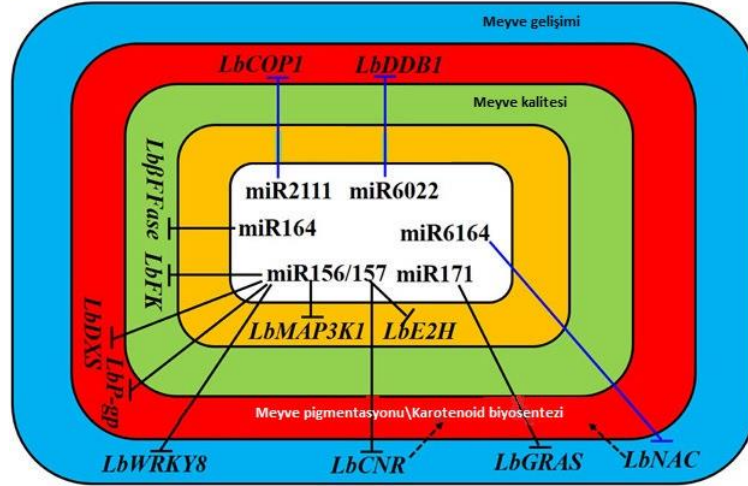
Daha önce yapılan bazı transkriptom çalışmaları sonucunda farklı transkripsiyon faktörleri de tanımlanmıştır. Domateste AGAMOUS-benzeri 1 (*TAGL1*) meyve olgunlaşmayla ilgisi olan *MADS*-box benzeri bir transkripsiyon faktörü olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşmanın indüksiyonuna ilaveten, *TAGL1* karpel gelişmesinin erken safhalarında ifade olunmaktadır. Aynı zamanda *TAGL1* transkripsiyon faktörünün RNA susturması çalışmalarında olgunlaşmanın inhibisyonuna ve daha az hücre tabakasından dolayı karpel kalınlığının azalmasına yol açtığı bulunmuştur (İtkin ve ark. 2009; Vrebalov ve ark. 2009; Pan ve ark. 2010). Kısaca ifade edilirse, epigenom, meyvenin olgunluğa geçişini etkilemektedir. Şu ana kadarki yapılmış çalışmalar ile; senesens ve olgunlaşmanın genetik kontrolüne ilaveten, bu süreçlerin en azından kısmi olarak epigenomdan etkilendiğini gösteren kanıtlar mevcuttur (Şekil 1).

Kodlama Yapmayan RNA'ların Meyve Gelişimi ve Olgunlaşmasındaki Etkileri MikroRNA'nın etkisi

MikroRNA'lar kodlama yapmayan düzenleyici küçük RNA'ların bir sınıfıdır. Yaklaşık olarak 20-24 nükleotitten oluşurlar. Küçük RNA'lar gen transkripsiyonunu baskılayarak ya da mRNA'ları degrade ederek transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyede gen ekspresyonuna aracılık ederler (Cuperus ve ark. 2011). MikroRNA (miRNA)'lar değişik biyolojik mekanizmalarda oldukça önemli fonksiyonlara sahiptir. miRNA'lar özel hedef genlerine etki ederek bitkide biyotik stres, sinyal iletimi, metabolizma ve protein

degradasyonu gibi biyolojik mekanizmalarda oldukça önemli görevler üstlenmektedir. RNA interferans (RNAi), canlı hücreler içinde yer alan ve hangi genlerin proteine translasyon olacağını belirleyen ve kontrol eden transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır. Bu mekanizma doğal bir işlem olup, canlı organizmadaki biyolojik fonksiyonu, hem virüs kalıtım materyali ve transpozonlar gibi hareketli genetik elementlere karşı genomu korumak hem de ökaryotik organizmaların gelişimsel programlarının fonksiyonu için önemli olan transkripsiyon sonrası gen susturma ile gen regülasyonunda önemli rol oynamaktadır (Gündoğdu 2009).

Ayrıca çeşitli bitki türlerinde miRNA fonksiyonunu anlamaya yönelik önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Daha önceki çalışmalar miRNA'ların gelişme, sinyalizasyon, abiyotik stres ve simbiyotik ilişkilerin düzenlenmesi gibi çeşitli metabolik ve biyolojik süreçte rol oynadıklarını göstermiştir (Debat ve Ducasse 2014). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda miRNA'ların meyve gelişimi ve olgunlaşmasında çok önemli roller üstlendiği bulunmuştur (Moxon ve ark. 2008, Karlova ve ark. 2013, Gao ve ark. 2015). Örneğin deneysel olarak AtMIR156b öncüsünün aşırı ekspresyonu sonucu domates bitkisinde anormal yapıdaki çiçekler oluşmuştur (Silva ve ark. 2014) (Şekil 2). Bu durumun sebebi olarak ise AtMIR156b öncü maddesinin meristemin devamlılığı ve yeni organların oluşumuyla ilgili genlerin ekspresyonunu etkilemesidir. MiR156/157 ve miR172 bilinen olgunlaşma düzenleyicileri CNR ve SIAP2'a'yı modüle ederek (ayarlayarak) domates olgunlaşma sürecini etkileyebilirler (Karlova ve ark. 2013) (Şekil 2). Yüksek çıktılı dizileme teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde farklı bitki türlerinden binlerce miRNA tanımlanmış ve miRBase21.0 veri tabanına kaydedilmiştir (Kozomora ve Griffiths-Jones 2014).



Şekil 2. Meyve gelişimi, kalitesi ve pigmentlerin biyosentezi ile ilişkili miRNA'lar ve hedefledikleri genler (Zeng ve ark., 2015'ten değiştirilmiştir)

Muz bitkisinde de, biyoinformatik metotlar kullanılarak diğer türlerde bilinen miRNA'larla 'Pahang' A genom dizisine dayalı benzerlikler olduğu görülmüştür (D'Hont ve ark. 2012; Chai ve ark. 2015). Sonrasında triploid ve yenebilir muz yapraklarından 180 tane pre-miRNAs ve 314 tane olgun miRNAs tanımlanmıştır (Wen ve ark. 2014). Ancak, muzda olgunlaşmayla yakından ilgisi bulunan çok sayıda miRNA hala bilinmemektedir. Muzda bilinmeyen miRNA'ların, tanımlamak için kısa RNA dizilerinin miRBase veri tabanından elde edilen olgun bitki miRNA'ları üzerine haritalanması sonucunda, toplamda bilinen 125 miRNA tanımlanmıştır. Mevcut çalışmada 29 tane korunmuş RNA familyası tespit edilmiştir. miR156, miR159, miR166, miR171, miR172, miR396 familyaları 9 üyeli gruplarla en geniş şekilde temsil edilmiştir. Bu grupları sırasıyla 7 ve 6 üyeye sahip miR167 ve miR319 familyaları takip etmektedir (Bi ve ark. 2015).

Daha önce muzda yapılan çalışmada 13 miRNA familyasına üye olan miR5538'in de içinde olduğu toplam 32 potansiyel miRNA tanımlanmış ve biyoinformatik metotlar kullanılarak geçerlilikleri onaylanmıştır. Sonuç olarak muz bitkisinde yapılmış bu çalışma ile farklı şekilde ifade olan miRNA hedef genlerinin gene ontoloji (gen atflandırma) analizleri, bazı miRNA hedef genlerinin olgunlaşmayla yakından ilgisi olduğunu ortaya koymuştur. Sayısal analizler ve deneysel doğrulamalar kombine edildiğinde, bu çalışmada bulunan miRNA'lar muzda olgunlaşma sürecinde yer alan fonksiyonel analizleri için değerli bilgiler sağlamıştır. Domates meyvesinde de benzer olarak, miR156, miR166 ve

miR171, familyaları arasında yüksek bir ifade farklılığı olduğu görülmüştür. Meyve gelişimi ve olgunlaşmasında rol oynayan önemli miRNA'ların çok sayıda TF genlerini hedefledikleri bulunmuştur. Bu bağlamda; miR156 ve miR157 familyalarına ait miRNA üyelerinin, squamosa promoter-binding-like protein (SPLs) TF'sini hedefledikleri bulunmuştur (Gandikota ve ark 2007; Wang ve ark 2009). miR172 familyasına ait üyelerin de, çiçek homeotik protein *APETALA 2 (AP2)* TF'sini hedeflediği bulunmuştur. *MYB* TF'nin de miR858 ailesine ait üyeler tarafından hedeflendikleri belirlenmiştir (Aukerman ve Sakai 2003). Daha önceki çalışmalar FaMYB1 geninin ektopik ekspresyonu sonucunda tütünde antosiyanin ve flavonol birikimini baskıladığı belirlenmiştir (Aharoni ve ark. 2000). miR159 ve miR319 familyasına ait miRNA üyelerinin hedefledikleri transkripsiyon faktörleri genel olarak *GAMY* genleridir. *GAMYB* transkripsiyon faktör familyası anterde çiçek gelişimini etkilemektedir (Tsuji ve ark. 2006). *Arabidopsis*'te miR169 ailesine ait miRNA üyelerinin *Y* alt ünitesi olan *A-9* TF'ni hedeflediği bulunmuştur (Sorin ve ark 2014).

Daha önce yapılmış bir başka çalışmada mac-miR160a ve mac-miR160b miRNA'ların potansiyel olarak, *ARF17*, *ARF18* ve *ARF22* TF'lerini hedefledikleri bulunmuştur. Ayrıca miR395 familyasına ait bireylerin meyve gelişimindeki rolü çok iyi bilinen *ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3)* genlerini hedefleyerek regüle ettiği bulunmuştur (Kumar ve ark. 2014). miR160 familyasındaki bireylerin de 26S proteazumun önemli bir bileşeni olan E3 ubiquitin ligaz genini hedeflediği belirlenmiştir.

Uzun kodlama yapmayan RNA (lncRNA)'ların etkisi

Yakın zamanda saygın bir dergide yayınlanan bir çalışmada araştırmacılar, uzun, kodlama yapmayan bir RNA (lncRNA) molekülünün *Arabidopsis thaliana* bitkisinde hedef genin transkriptini taklit etmek suretiyle, fosfat homeostazisinde görevli bir miRNA'yı regule ettiğini bulmuşlardır. Buna göre *IPSI* (Induced by Phosphate Starvation1), hedef mRNA'da 9-11 aralığında yanlış eşleşmeden kaynaklanan küçük bir ilimikle ath-miR399'a bağlanmasına rağmen miRNA tarafından kesilememiş, ve hatta bu eşleşme miR399'un gerçek hedefi olan *PHO2* transkriptlerine bağlanmasını engellemiş/yavaşlatmıştır. miRNA aktivitesinin engellendiği bu mekanizmaya "hedef taklidi (targetmimicry-TM)" adı verilmiştir. Endojen TM (eTM) mekanizmasıyla miRNA aktivitesinin doğal olarak düzenlenmesinin anlaşılmasıyla birlikte yapay miRNA regülasyonu adına bitkilerde ve hayvanlarda miRNA çalışmalarına güçlü bir araç kazandırılmıştır. Yapay TM'lerin dizayn edilmesiyle transgenik bitkilerle yapılan çalışmalarda da bu ilişkiyi destekleyen sonuçlar elde edilmiştir (Wu ve ark. 2013).

Bunların yanı sıra genomu tamamen dizilenmiş *Arabidopsis*, *Oryza sativa* ve *Glycine max* bitkilerinde genom düzeyinde korunmuş miRNAları düzenleyen aday eTM'ler biyoinformatik yöntemlerle bulunmuştur (Meng ve ark. 2012, Wu ve ark. 2013, Ye ve ark. 2014). Wu ve ark. (2013) yaptıkları bir aşırı ifade çalışması ile eTM'lerin miR160 ve miR166 fonksiyonları üzerine etkisi ve dolayısıyla bitki gelişimindeki rolü tespit edilmiştir.

lnc-RNA'nın meyve olgunlaşmasındaki rolünü anlamak için daha önce yapılmış bir çalışmada: Yabani tip domates ile *rin* mutanlığı olan domates kıyaslandığında, birçok lncRNA'nın oldukça farklı ekspresyon gösterdiği bulunmuştur. Dahası, yabani domates mutanlığının meyvesinde bulunan bazı intergenik lncRNA (lncRNA1459 ve lncRNA1840) ekspresyonlarının negatif yönde bir regülasyon göstererek meyve olgunlaşmasında belirgin bir gecikmeye sebep olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçların, domates meyve olgunlaşmasının düzenlenmesinde lncRNA'ların çok önemli rolü olduğu görüşünü desteklemektedir (Zhu ve ark. 2015).

Domates bitkisinde lncRNA1459 ve lncRNA1840'ın virüs kaynaklı gen susturması (VIGS) sonucunda meyve olgunlaşmasında gecikmeye neden olduğu tespit edilmiştir (Zhu ve ark. 2015). Capping RNA, RNA'nın birçok nüklear ve sitoplazmik proteinle etkileşimlerinde kilit öneme sahiptir ve RNA stabilitesinde, bağlanmasında, nükleositolazmik taşınımında ve transkripsiyonun başlangıcında kilit öneme sahiptir (Topisirovic ve ark. 2011). Ayrıca, RNA poliadenilasyonu; nüklear taşınım, transkripsiyon ve RNAs stabilitesi için çok önemlidir (Elkon ve ark. 2013). Bu bağlamda, lncrna1840 ve lncrna1459 RNA'larının uç yapı analizleri bunların 5' baş kısmı ve 3' kuyruk kısmına sahip polII bağımlı transkriptler olabileceğini göstermiştir. Bu yüzden mevcut çalışma, lncRNA'ların meyve olgunlaşmasının düzenlenmesinde önemli bir gen düzenleyici aktör olduğu tespit edilmiştir.

CRISPR/Cas9 mekanizmasının meyve gelişimi ve olgunlaşması üzerindeki etkisi

Son zamanlarda genom düzenleme metodlarıyla ilgili gelişmeler, bitkilerde farklı genetik tabanlı çalışmaların yapılmasını mümkün kılmıştır. Belirli genom kısımlarında çift zincir kırılmalarını indüklemek için çeşitli sistemler: Zinc finger nükleazları kullanan sistemler (Kim ve ark. 1996), Transkripsiyon aktivatör- benzeri efektör nükleazlar (TALENs) (Christian ve ark. 2010) ve CRISPR/Cas9 (the clustered regularly interspaced short palindromic repeat) bağlantılı 9 endonükleaz sistemleri (Jinek ve ark. 2012) geliştirilmiştir. CRISPR/cas9 mekanizması ile meydana bu tür kırılmaların bölgesel yönlendirilmiş mutasyonları indüklemeye olasılıkları yüksektir. Tasarlanan endonükleaz sistemleri arasında CRISPR/Cas9 sistemi diğer sistemlere göre daha kolay uygulanabilir, bu durumun sebebi ise sistemin deneysel dizaynının basitliği ve spesifikliğin yüksek olmasıdır (Jinek ve ark. 2012). Bu sistemden bitkileri de içeren çeşitli organizmalardaki mutagenез açısından faydalanılmaktadır (Li ve ark. 2013; Brooks ve ark. 2014). Ancak meyve gelişimi ve olgunlaşması ile ilgili olarak da, CRISPR/Cas9 sisteminin domates *RIN* genindeki mutasyonları etkili bir şekilde indüklediği belirlenmiştir. Bu amaç için, incelenen üç tane rehber gRNA (guide RNA) *RIN* proteinlerinin yapısını veya birikimin etkileyen mutasyonları indüklemiştir. Böylece, CRISPR/Cas9 sistemi ile domates *RIN* geninin farklı bir mutantını oluşturmak için uygulandığı çalışma sonucunda *RIN* geninin domates meyve gelişimine ait moleküler sürecine etki ettiği bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucu olarak, CRISPR/Cas9 sistemi ile mutasyona uğrayan *rin* geni bitkide ifade olunmaz ve bu durumda meyve olgunlaşmada problem yaşar kırmızıya dönüşmez, aksine *rin* geninde mutasyon yapamayan rehber RNA'lar meyvede *rin* geninin toplanmasını ve meyvenin rengini kırmızıya dönüşmesini sağlar (Ito ve ark. 2015). Benzer şekilde CRISPR/Cas9 sisteminin pirinç bitkisinde hücre bölünmesinin ilk safhalarında oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Söz konusu çalışmada CRISPR/Cas9 uygulamasından sonra tipik dizi modifikasyonuna sahip biallelik mutasyonların sıklıkla meydana geldiği görülmüştür (Zhang ve ark. 2014).

Sonuç

Olgunlaşma sürecinde yer alan farklı süreçler arasındaki sinerji ve düzenlenme mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak şimdiye kadarki çalışmalar ile, meyve gelişmesi ve olgunlaşması ile ilgili çok sayıda transkripsiyon faktörleri, mikroRNA'lar, uzun kodlama yapmayan RNA'lar ve CRISPR/cas9 sistemi ile bazı genlerin aktivitesi ortaya konulmuş durumdadır. Ancak meyve gelişme ve olgunlaşma mekanizmasının daha da anlaşılması için gelecekte daha gelişmiş ve global düzeyde olacak şekilde genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik yaklaşımlar kullanılarak meyve gelişme ve olgunlaşmanın genetik mekanizması daha da anlaşılır hale gelecektir.

Kaynaklar

- Aharoni A, De Vos C, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JN, O'Connell AP (2001). The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 28(3), 319-332.
- Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ (2005). Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell*, 17(11), 2954-2965.
- Aukerman MJ, Sakai H (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell*, 15 (11), 2730-2741.
- Barry CS, Giovannoni JJ (2006). Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(20), 7923-7928.
- Barry CS, McQuinn RP, Chung MY, Besuden A, Giovannoni JJ (2008). Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. *Plant Physiology*, 147(1), 179-187.
- Bemer M, Karlova R, Ballester AR, Tikunov YM, Bovy AG, Wolters-Arts M, de Barros Rossetto P, Angenot GC, de Maagd RA (2012). The tomato FRUITFULL homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *The Plant Cell*, 24(11), 4437-4451.
- Bi F, Meng X, Ma C, Yi G (2015). Identification of miRNAs involved in fruit ripening in Cavendish bananas by deep sequencing. *BMC genomics*, 16(1): 1.

- Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology*, 166(3), 1292-1297.
- Carrari F, Baxter C, Usadel B, Urbanczyk-Wochniak E, Zanon MI, Nunes-Nesi A, Nikiforova V, Centero D, Ratzka A, Pauly M (2006). Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiology*, 142(4), 1380-1396.
- Cevik V, Ryder CD, Popovich A, Manning K, King GJ, Seymour GB (2010). A FRUITFULL-like gene is associated with genetic variation for fruit flesh firmness in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Tree Genetics & Genomes*, 6(2), 271-279.
- Chai J, Feng R, Shi H, Ren M, Zhang Y, Wang J (2015). Bioinformatic identification and expression analysis of banana MicroRNAs and their targets. *PloS one*, 10(4), e0123083.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 757-761.
- Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell*, 23(2), 431-442.
- D'Hont A, Denoeud F, Aury JM, Baurens FC, Carreel F, Garsmeur O, Noel B, Bocs S, Droc G, Rouard M (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 488(7410), 213-217.
- Debat HJ, Ducasse DA (2014). Plant microRNAs: recent advances and future challenges. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(6), 1257-1269.
- Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR (2007). Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC genomics*, 8(429), 5-42.
- Elitzur T, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Goldschmidt EE, Friedman H (2010). The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. *Journal of experimental botany*, 61(5), 1523-1535.
- Elkon R, Ugalde AP, Agami R (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nature Reviews Genetics*, 14(7), 496-506.
- Enfissi EM, Barneche F, Ahmed I, Lichtlé C, Gerrish C, McQuinn RP, Giovannoni JJ, Lopez-Juez E, Bowler C, Bramley PM (2010). Integrative transcript and metabolite analysis of nutritionally enhanced DE-ETIOLATED1 downregulated tomato fruit. *The Plant Cell*, 22(4), 1190-1215.
- Fait A, Hanhineva K, Beleggia R, Dai N, Rogachev I, Nikiforova VJ, Fernie AR, Aharoni A (2008). Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant physiology*, 148(2), 730-750.
- Gandikota M, Birkenbihl RP, Höhmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal*, 49(4), 683-693.
- Gao C, Ju Z, Cao D, Zhai B, Qin G, Zhu H, Fu D, Luo Y, Zhu B (2015). MicroRNA profiling analysis throughout tomato fruit development and ripening reveals potential regulatory role of RIN on microRNAs accumulation. *Plant biotechnology journal*, 13(3), 370-382.
- Gapper NE, McQuinn RP, Giovannoni JJ (2013) Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 82 (6), 575-591.
- Giménez E, Pineda B, Capel J, Antón MT, Atarés A, Pérez-Martín F, García-Sogo B, Angosto T, Moreno V, Lozano R (2010). Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS One*, 5(12), e14427.
- Giovannoni JJ, Noensie EN, Ruezinsky DM, Lu X, Tracy SL, Ganai MW, Martin GB, Pillen K, Albert K, Tankslev SD (1995). Molecular genetic analysis of the ripening-inhibitor and non-ripening loci of tomato: A first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes. *Molecular and General Genetics*, 248(2), 195-206.
- Giovannoni J (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual review of plant biology*, 52(1): 725-749.
- Giovannoni JJ (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current opinion in plant biology*, 10(3), 283-289.
- Grimplet J, Deluc LG, Tillett RL, Wheatley MD, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC (2007). Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC genomics*, 8 (187), DOI: 10.1186/1471-2164-8-187, 1-23.

- Guo H, Ecker JR (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF EBF1/EBF2-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, 115(6): 667-677.
- Guo HS, Xie Q, Fei JF, Chua NH (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *The Plant Cell*, 17(5), 1376-1386.
- Gutierrez L, Bussell JD, Păcurar DI, Schwambach J, Păcurar M, Bellini C (2009). Phenotypic plasticity of adventitious rooting in Arabidopsis is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *The Plant Cell*, 21(10), 3119-3132.
- Gündoğdu R ÇV. RNA İnterferans (RNAi) (2009). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(1-2), 34-47.
- Hamilton A, Lycett G, Grierson D (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 346, 284 - 287.
- Hileman LC, Sundstrom JF, Litt A, Chen M, Shumba T, Irish VF (2006). Molecular and phylogenetic analyses of the MADS-box gene family in tomato. *Molecular Biology and Evolution*, 23(11), 2245-2258.
- Hyun TK, Lee S, Rim Y, Kumar R, Han X, Lee SY, Lee CH, Kim JY (2014). De-novo RNA sequencing and metabolite profiling to identify genes involved in anthocyanin biosynthesis in Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel). *PloS one*, 9(2), e88292.
- Itkin M, Seybold H, Breitel D, Rogachev I, Meir S, Aharoni A (2009). TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *The Plant Journal*, 60(6), 1081-1095.
- Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Toki S (2015). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467 (1), 76-82.
- Jaakola L., Poole M, Jones MO, Kämäräinen-Karppinen T, Koskimäki JJ, Hohtola A, Häggman H, Fraser PD, Manning K, King GJ (2010). A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits. *Plant Physiology*, 153(4), 1619-1629.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Karlova R, van Haarst JC, Maliapaard C, van de Geest H, Bovy AG, Lammers M, Angenent GC, de Maagd RA (2013). Identification of microRNA targets in tomato fruit development using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Journal of experimental botany*, 64(7), 1863-1878.
- Karoğlu Z (2012). Karpuzda (*Citrullus lanatus* L.) izole edilmiş erf transkripsiyon faktör genlerinin karakterizasyonu: SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2(1), 27-32.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156-1160.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, 42 (D1), D68-D73
- Kumar R, Khurana A, Sharma AK (2014). Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of experimental botany*, 65(16), 4561-4575.
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1994). The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *The Plant Cell*, 6(4), 521-530.
- Latchman DS (1997). Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology*;29(12), 1305-12.
- Lea US, Slimestad R, Smedvig P, Lillo C (2007). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225(5), 1245-1253.
- Lee SJ, S SaravananR, Damasceno CM, Yamane H, Kim BD, Rose JK (2004). Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant physiology and Biochemistry*, 42(12), 979-988.
- Lee JM, Joung JG, McQuinn R, Chung MY, Fei Z, Tieman D, Klee H, Giovannoni J (2012). Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SIERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. *The Plant Journal*, 70(2), 191-204.
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, 31(8), 688-691.
- Lin Z, Arciga-Reyes L, Zhong S, Alexander L, Hackett R, Wilson I, Grierson D (2008). SITPR1, a tomato tetratricopeptide repeat protein, interacts with the ethylene receptors NR and LeETR1,

- modulating ethylene and auxin responses and development. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4271-4287.
- Liu Y, Roof S, Ye Z, Barry C, van Tuinen A, Vrebalov J, Bowler C, Giovannoni J (2004). Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9897-9902.
- Liu G, Li W, Zheng P, Xu T, Chen L, Liu D, Hussain S, Teng Y (2012). Transcriptomic analysis of 'Suli'pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) buds during the dormancy by RNA-Seq. *BMC genomics*, 13, 700 .
- Lombardo VA, Osorio S, Borsani J, Lauxmann MA, Bustamante CA, Budde CO, Andreo CS, Lara MV, Fernie AR, Drincovich MF (2011). Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage. *Plant Physiology*, 157(4),1696-1710.
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature genetics*, 38(8), 948-952.
- Martel C, Vrebalov J, Tafelmeyer P, Giovannoni JJ (2011). The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiology*, 157(3), 1568-1579.
- Matas AJ, Yeats TH, Buda GJ, Zheng Y, Chatterjee S, Tohge T, Ponnala L, Adato A, Aharoni A, Stark R (2011). Tissue-and cell-type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation. *The Plant Cell*, 23(11), 3893-3910.
- McMurchie, E, McGlasson W, Eaks I (1972). Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature*, 237, 235-236.
- Meng Y, Shao C, Wang H, Jin Y (2012). Targetmimics: an embedded layer of microRNA-involved gene regulatory networks in plants, *BMC Genomics*, 13,197. doi:10.1186/1471-2164-13-197.
- Moxon S, Jing R, Szittyá G, Schwach F, Pilcher RLR, Moulton V, Dalmay T (2008). Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome research*, 18(10), 1602-1609.
- Mustilli AC, Fenzi F, Ciliento R, Alfano F, Bowler C (1999). Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of DEETIOLATED1. *The Plant Cell*, 11(2), 145-157.
- Osorio S, Alba R, Damasceno CM, Lopez-Casado G, Lohse M, Zanor MI, Tohge T, Usadel B, Rose JK, Fei Z (2011). Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiology*, 157(1), 405-425.
- Osorio S, Alba R, Nikoloski Z, Kochevenko A, Fernie AR, Giovannoni JJ (2012). Integrative comparative analyses of transcript and metabolite profiles from pepper and tomato ripening and development stages uncovers species-specific patterns of network regulatory behavior. *Plant Physiology*, 159(4), 1713-1729.
- Pan IL, McQuinn R, Giovannoni JJ, Irish VF (2010). Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *Journal of experimental botany*, June; 61(6), 1795–1806.
- Picton S, Barton SL, Bouzayen M, Hamilton AJ, Grierson D (1993). Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *The Plant Journal*, 3(3), 469-481.
- Pnueli L, Hareven D, Rounsley SD, Yanofsky MF, Lifschitz E (1994). Isolation of the tomato AGAMOUS gene TAG1 and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *The Plant Cell*, 6(2), 163-173.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, 115(6), 679-689.
- Rohrmann J, Tohge T, Alba R, Osorio S, Caldana C, McQuinn R, Arvidsson S, van der Merwe MJ, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B (2011). Combined transcription factor profiling, microarray analysis and metabolite profiling reveals the transcriptional control of metabolic shifts occurring during tomato fruit development. *The Plant Journal*, 68(6), 999-1013.

- Rose JK, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn MM, Saravanan RS (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *The plant journal*, 39(5), 715-733.
- Saravanan RS, Rose JK (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, 4(9), 2522-2532.
- Seymour GB, Ryder CD, Cevik V, Hammond JP, Popovich A, King GJ, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Manning K (2011). A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria× ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue*. *Journal of experimental botany*, 62(3), 1179-1188.
- Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C (2013). Fruit development and ripening. *Annual review of plant biology*, 64, 219-241.
- Silva EM, Silva Azevedo M, Guivin MAC, Ramiro DA, Figueiredo CR, Carrer H, Peres LEP, Nogueira FTS (2014). microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. *The Plant Journal*, 78(4), 604-618.
- Smaczniak C, Immink RG, Angenent GC, Kaufmann K (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*, 139(17), 3081-3098.
- Sorin C, Declerck M, Christ A, Blein T, Ma L, Lelandais-Briere C (2014). A miR169 isoform regulates specific NF-YA targets and root architecture in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 202(4), 1197-211.
- Tang Q, Ma X, Mo C, Wilson IW, Song C, Zhao H, Yang Y, Fu W, Qiu D (2011). An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis. *BMC genomics*, 12(1), 343.
- Thompson AJ, Tor M, Barry CS, Vrebalov J, Orfila C, Jarvis MC, Giovannoni JJ, Grierson D, Seymour GB (1999). Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiology*, 120(2), 383-390.
- Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG, Klee HJ (2001). Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *The Plant Journal*, 26(1), 47-58.
- Topisirovic I, Svitkin YV, Sonenberg N, Shatkin AJ (2011). Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(2), 277-298.
- Tsuji H, Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Shimada Y, Nakazono M, Watanabe R, Nishizawa NK, Gomi K, Shimada A, Kitano H (2006). GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *The Plant Journal*, 47(3), 427-444.
- Vaughn MW, Tanurđić M, Lippman Z, Jiang H, Carrasquillo R, Rabinowicz PD, Dedhia N, McCombie WR, Agier N, Bulski A (2007). Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol*, 5(7), e174.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*, 296(5566), 343-346.
- Vrebalov J, Pan IL, Arroyo AJM, McQuinn R, Chung M, Poole M, Rose J, Seymour G, Grandillo S, Giovannoni J (2009). Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *The Plant Cell*, 21(10), 3041-3062.
- Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C (2008). Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist*, 177(1), 60-76.
- Wang JW, Czech B, Weigel D (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138(4), 738-749.
- Wang L, Yin X, Cheng C, Wang H, Guo R, Xu X, Zhao J, Zheng Y, Wang X (2015). Evolutionary and expression analysis of a MADS-box gene superfamily involved in ovule development of seeded and seedless grapevines. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(3), 825-846.
- Wen JZ, Liao JY, Zheng LL, Xu H, Yang JH, Guan DG, Zhang SM, Zhou H, Qu LH (2014). A contig-based strategy for the genome-wide discovery of microRNAs without complete genome resources. *PLoS one*, 9(2), e88179.
- Wu HJ, Wang ZM, Wang M, Wang XJ (2013). Wide spread long non coding RNAs as endogenous target mimics for micro RNAs in plant. *PlantPhysiol*, 161, (4), 1875-1884.
- Wu Hx, Jia H, Ma X, Wang S, Yao Q, Xu W, Zhou Y, Gao Z, Zhan R (2014). Transcriptome and proteomic analysis of mango (*Mangifera indica* Linn) fruits. *Journal of proteomics*, 105, 19-30.
- Yang X, Tu L, Zhu L, Fu L, Min L, Zhang X (2008). Expression profile analysis of genes involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and macroarray. *Journal of experimental botany*, 59(13), 3661-3674.

- Yang Y, Wu Y, Pirrello J, Regad F, Bouzayen M, Deng W, Li Z (2010). Silencing Sl-EBF1 and Sl-EBF2 expression causes constitutive ethylene response phenotype, accelerated plant senescence, and fruit ripening in tomato. *Journal of experimental botany*, 61(3), 697-708.
- Ye CY, Xu H, Shen E, Liu Y, Wang Y, Shen Y, Qiu J, Zhu Q H, Fan L (2014). Genome-wide identification of non-codingRNAs interacted with microRNAs in soybean. *Front PlantSci*, 5:743, doi:10.3389/fpls.2014.00743.
- Yu K, Xu Q, Da X, Guo F, Ding Y, Deng X (2012). Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). *BMC genomics*, 13(10), DOI: 10.1186/1471-2164-13-10.
- Zamboni A, Di Carli M, Guzzo F, Stocchero M, Zenoni S, Ferrarini A, Tononi P, Toffali K, Desiderio A, Lilley KS (2010). Identification of putative stage-specific grapevine berry biomarkers and omics data integration into networks. *Plant Physiology*, 154(3), 1439-1459.
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan S WL, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen S (2006). "Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 126(6), 1189-1201.
- Zhu B, Yang Y, Li R, Fu D, Wen L, Luo Y, Zhu H (2015). RNA sequencing and functional analysis implicate the regulatory role of long non-coding RNAs in tomato fruit ripening. *Journal of experimental botany*, 66 (15), 4483-4495.
- Zeng S, Wu M, Zou C, Liu X, Shen X, Hayward A, Liu C, Wang Y (2014). Comparative analysis of anthocyanin biosynthesis during fruit development in two *Lycium* species. *Physiologia plantarum*, 150(4), 505-516.
- Zeng S, Liu Y, Pan L, Hayward A, Wang Y (2015). Identification and characterization of miRNAs in ripening fruit of *Lycium barbarum* L. using high-throughput sequencing. *Frontiers in plant science*, 6:778. doi: 10.3389/fpls.2015.00778.
- Zenoni S, Ferrarini A, Giacomelli E, Xumerle L, Fasoli M, Malerba G, Bellin D, Pezzotti M, Delledonne M (2010). Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. *Plant physiology*, 152(4), 1787-1795.