

第2章 第3節

遺伝子等の網羅的解析によるモモ研究の進展

農研機構果樹研究所 栽培・流通利用研究領域 立木 美保

1) モモ全ゲノム配列解読と公開情報

モモ (*Prunus persica* (L.) Batsch) は世界全体における生産量が2,100万t (2011年度, FAO Production Year Book) で, 主な生産国は北半球においては, 中国, イタリア, スペイン, アメリカ合衆国, 南半球においてはチリ, アルゼンチンとなっており, 世界の主要な農産物の一つである. 一般的な生食用のモモの肉質は溶質 (melting) と呼ばれるタイプで, 収穫後の軟化 (softening) が著しいため, 日持ち性は極めて低く, 押し傷等もつきやすいことから流通過程で廃棄される果実も多い. また, アメリカなどの生産量の多い国では収穫したモモの鮮度を保持するための低温貯蔵や, 冷蔵コンテナを用いた船便による輸出が行われているが, モモは長期間冷蔵すると, その後常温に戻しても正常に追熟せず, 果実品質が著しく低下することが知られており, このような現象は「低温障害 (chilling injury)」と呼ばれている (Lurie and Crisosto 2005). このようにモモ果実の急激な軟化や低温障害は産業的に最も大きな問題となっていることから, 軟化制御技術や低温障害低減技術は, 世界におけるモモの重要な研究開発目標の一つとなっている.

モモはバラ科 (Rosaceae) サクラ属 (*Cerasus*) の2倍体で, 自家和合性 (self-compatibility) のため, 完全なホモ個体が得られること, 早ければ播種から3年ほどの短期間で結実すること, ハプロイドゲノムサイズが300 Mb以下と

非常に小さいこと (Arús *et al.* 2012) などの理由から、バラ科果樹ゲノム研究のモデルとされている (Jung and Main 2014). モモのDNAマーカーの開発や連鎖地図の作成は海外においてはかなり早い時期から始められ (林 2005), それに続いてESTデータベースの構築, 全ゲノム配列の解読が進められた.

モモの全ゲノム配列の解析は, イタリアとアメリカの研究者によって立ち上げられ, スペイン, フランス, チリの研究機関, 研究者を含む国際モモゲノムイニシアチブ (International Peach Genome Initiative, IPGI) によって始められた. 倍加半数体 (ダブルハプロイド, double haploid) で, 遺伝的には完全なホモ個体の品種である 'Lovell' を用いてサンガー法によってゲノム配列を決定した後に, アセンブリ, アノテーション解析などの作業が進められた. その結果, 2010年4月にモモ全ゲノム配列「Peach v1.0」が公表され (Genome Database for Rosaceae, GDR, URL1-1-4), 論文としては2013年にNature Geneticsに発表されている (Verde *et al.* 2013). その後もアップデートが続けられ, 2015年1月に「Peach v2.0.a1」が発表された. Peach v2.0.a1では8つのpseudomolecule (仮想的な一続きの塩基配列) を8つの染色体ゲノムとして表しており, 全ゲノムの約8.47倍のDNA配列を正確に解読し, Arachne法 (Batzoglou *et al.* 2002) によってアセンブリしている. また, 連鎖地図を用いて改良を重ねることで, 99.2%の配列がマッピングされ, 97.9%の配列について方向性が定められている. さらに, 様々なモモの組織, 器官における膨大な全RNAシーケンス (RNA-Seq) の結果を統合することによって, 遺伝子予測 (Gene prediction) とアノテーションを向上させ, Peach v1.0のアノテーションでは991遺伝子にも満たなかったが, Peach v2.1では26,873遺伝子が予測されている.

2) 網羅的解析による果実成熟等の研究

網羅的解析の例として, 最初に果実成長, 成熟, 軟化に関する研究について紹介する. モモ果実の成長速度はダブルシグモイド曲線を描き, 4段階の成長ステージに分けることができる (Tonutti *et al.* 1991). 第1期 (S1) は細胞分

裂が盛んに起き、細胞肥大が著しい時期である。第2期 (S2) は、核が硬化する硬核期 (pit hardening) と呼ばれる期間で、果実の成長速度はやや遅くなる。第3期 (S3) は、細胞肥大が盛んに起こる時期であり、果実は肥大を続けながらやがて成熟期 (maturity stage, 第4期, S4) を迎える。

(1) 果実成熟の研究

成熟期 (S4) はクライマクテリック (climacteric) 期と呼ばれ、エチレン生成が起こり (Tonutti *et al.* 1991), 果肉が軟化する。果肉の軟化は、様々な細胞壁修飾酵素が一定の順序で働くことで細胞壁が破壊されることにより生じると考えられており、軟化機構を解明するには、細胞壁修飾酵素遺伝子の発現を網羅的に解析することが有効である。そこで、マイクロアレイの手法を用い、モモの果実軟化に関わる細胞壁修飾酵素 (cell wall modifying enzymes) について網羅的な解析が行われた (Trainotti *et al.* 2003)。最初に800以上のユニジェン (unigene) を含む発現遺伝子配列断片 (expression sequence tag, EST) が構築され、そのうち32のcDNAが細胞壁の分解や合成、細胞壁の構造に関わるタンパク質をコードすると推測された。これらのESTについてマイクロアレイ法によって、モモ果実成長S1からS4の各ステージにおける発現の違いを調べると、多くの遺伝子の発現量はS3 II (S3後期, プレクライマクテリック, pre-climacteric) からS4 I (S4前期) の過程で変化していた。さらにS3 IIとS4 Iの果実にそれぞれエチレン処理を行った時の遺伝子発現の変化を解析すると、エチレンによって正または負の制御を受けている遺伝子グループとエチレン処理によって発現量がほとんど変動しないグループに分けられた。この論文では、網羅的な解析により、モモの軟化は呼吸量やエチレン生成量が増加するクライマクテリックライズ (climacteric rise) よりも早くから起こっており、その前に発現している遺伝子の大半はエチレンによって負に制御されているが、成熟と共に発現量が増える遺伝子の大半はエチレンによって正に制御されている、と結論づけている (Trainotti *et al.* 2003)。

モモのマイクロアレイを最初に作成したのは、イタリアの研究者によるコン

ソーシウム (Italian Consortium for Genomics in Prunus : ESTree, URL2-3-1) である。4品種のモモ 'Fantasia', 'Redhaven', 'OroB', 'Bolero' の果肉から抽出したRNAを用いてcDNAライブラリーを作成し, 果実成長ステージS3から1,261EST, S4からは1,131EST, 合計2,394のEST配列を単離している。さらに遺伝子公開情報であるNCBI GenBank (URL2-3-2) およびGDRから得られた8,807EST配列と合わせて計11,201の遺伝子セットを作成している。遺伝子配列のアセンブリの結果, 4,818の独立した遺伝子の配列が得られ, これらの配列の40%はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のプロテオーム解析によって得られたタンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示す。これらのうち4,806遺伝子について, 70merのオリゴヌクレオチドを合成してマイクロアレイ (μ PEACH 1.0) を作成している (ESTree Consortium 2005)。この μ PEACH1.0に搭載された70%以上の遺伝子は果実で発現することを確認している (ESTree Consortium 2005)。イタリアの研究グループは μ PEACH1.0を用いた果実成熟等の網羅的遺伝子解析結果について幾つか報告しているので紹介する。

μ PEACH1.0を用いた最初の報告は, 果実が未成熟から成熟期へ転換する成長ステージ, S3からS4において発現が変化する遺伝子についての網羅的遺伝子解析結果である (Trainotti *et al.* 2006)。S3からS4にかけて267遺伝子の発現が上昇し, 109遺伝子の発現が減少していた。遺伝子の発現が変動していたものとして, MADS-box, AUX/IAA, bZIP, HD (homeobox-leucin zipper domain), Mybファミリーに属する19の転写因子をコードする遺伝子や, モモ果実成熟との関連性が既に報告されている細胞壁修飾酵素や, カロテノイド合成に関わる酵素の遺伝子が認められている。

同研究グループは μ PEACH 1.0を用いてモモ果実成長ステージのS3 IIからS4 Iに発現する遺伝子の解析に加え, この時期におけるエチレンおよびオーキシンとの関わりを明らかにするために, S3 II果実にエチレンまたは合成オーキシン剤である1-ナフチル酢酸 (1-naphthalene acetic acid, NAA) 処理をした際の遺伝子変動について解析している (Trainotti *et al.* 2007)。S3 II

からS4 Iには、219の遺伝子発現が増加し、188の遺伝子発現が減少する（エチレン、NAA処理によって発現量が増減した遺伝子も含む）。発現量が変動した遺伝子には、既にこの時期に発現が変動することが報告されているエンド型ポリガラクトナーゼ（endo-polygalacturonase, endoPG）やエチレン生合成経路の酵素の一つであるACC酸化酵素（ACC oxidase, ACO）やエクспанシン（expansin, EXP）などが含まれるが、その一方で、オーキシンに関わる酵素等をコードする遺伝子が確認されている。例えば、オーキシンの生合成の初期に関わると推測されるインドール-3-グリセロールリン酸合成酵素（indole-3-glycerol phosphate synthase, IGPS）やトリプトファン合成酵素 β サブユニット（tryptophan synthase β subunit）、オーキシンの輸送に関わるPIN、受容体TIR（F-box タンパク質）、転写因子ARF（Auxin response factor）、AUX/IAA等である。エチレン生合成経路の律速酵素であるACC合成酵素（ACC synthase, ACS）をコードする遺伝子の発現量はNAA処理によって増大したこと、およびPINをコードする遺伝子の発現量はエチレン処理で増大したことから、モモ果実においてエチレンとオーキシンのクロストーク（cross talk）が存在する可能性が示唆された。この論文の発表以前に、葉などの栄養器官におけるオーキシンとエチレンのクロストークについては幾つか報告されているが（Chae *et al.* 2000 ; Rahman *et al.* 2002 ; Swarup *et al.* 2002 ; McDonald and Visser 2003 ; Stepanova *et al.* 2005 ; Muday *et al.* 2006）、果実における報告は本論文が初めてとなる。

モモ果実成熟におけるオーキシンの役割についての詳細な研究は後述する。

モモ果実成長のS3からS4への転換期においては、マイクロアレイによる遺伝子発現の研究だけでなく、タンパク質の網羅的な解析（プロテオーム解析）も行われている（Prinsi *et al.* 2011）。不溶質（non-melting）と呼ばれるタイプの品種は一般的な溶質と呼ばれるタイプの品種とは異なり、軟化しにくく、加熱しても煮崩れしないため缶詰等の加工原料に使用される。このような異なる肉質を持つ2品種、不溶質品種‘Ora A’と溶質品種‘Bolero’、の果肉からタンパク質を抽出して解析に用いている。タンパク質の二次元電気泳動

法によって分離したスポットのうち、53が品種および成熟の違いによって異なるパターンを示した。それらのうちの30スポットをLC-ESI-MS/MSを用いて同定したところ、それらは一次代謝やエチレン生成に関わる酵素、二次代謝やストレス応答に関わるタンパク質などであった。その中でもACC酸化酵素はS3からS4にかけてタンパク質量が最も劇的に変化する。エチレンの代謝酵素としては、他にSAM (*S*-adenosylmethionine, *S*-アデノシルメチオニン) 合成酵素や β -シアノアラニン (β -cyanoalanine) 合成酵素のタンパク質量も変化する。不溶質品種の成熟果実では、デハイドリン (dehydrin), 熱ショックタンパク質, シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (cinnamyl alcohol dehydrogenase) などのタンパク質量が溶質品種よりも多い。デハイドリンは late embryogenesis abundant (LEA) タンパク質と似ており、本タンパク質は脂質小胞や膜脂質を保護する作用を持ち、組織強度に関わると考えられている。熱ショックタンパク質はタンパク質と膜の安定化に、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼは細胞壁の強度を保持する役割があると考えられている。このように、組織の強さや細胞膜の安定等に関わる幾つかのタンパク質が不溶質モモで高いことから、これらのタンパク質が関与することで、成熟した不溶質モモの硬さが保持される可能性が高い。この研究を通じて、プロテオミク的なアプローチは果実成熟を生化学的、生理学的に理解するためにも重要な手法であると報告されている (Prinsi *et al.* 2011)。

モモやリンゴ等のクライマクテリック型果実の多くは、収穫後自ら生成するエチレンによって老化が促進され品質が低下するため、貯蔵等に伴う鮮度低下を抑制するにはエチレンの作用を阻害することが重要である。リンゴ等の果実では、1996年に米国において開発された強力なエチレン作用阻害剤1-メチルシクロプロペン (1-methylcyclopropene, 1-MCP) で処理することによって、鮮度が保持され高い貯蔵効果が認められる (Watkins 2006)。一方、モモでは1-MCPによる鮮度保持効果は低く、処理数日後には成熟が再び進行することが報告されている (Mathooko *et al.* 2001, Fan *et al.* 2002)。そこで、イタリアの研究グループはネクタリン (*Prunus persica* L. Batsch) における1-MCP処理

時の分子機構やそれに関わる遺伝子について μ PEACH 1.0 を使って網羅的に解析している (Ziliotto *et al.* 2008). 解析には, ①収穫直後 (収穫直後区), ②収穫後24時間1-MCP処理 (1-MCP処理区), ③収穫後24時間空気処理 (空気処理区), ④24時間1-MCP処理後空气中48時間保管 (1-MCP処理後空気保管区) という4区の果実を用いた. ネクタリン果実の硬度は収穫直後区では59N (ニュートン) で, 空気処理区は28.7Nと低下するが, 1-MCP処理区は52Nと高く維持される. この24時間処理の間に, 収穫直後と比較して空気処理区では90の遺伝子発現が変動するが, 1-MCP処理区ではたった9つの遺伝子しか変動しない. 1-MCP処理の有無の影響について処理24時間後の遺伝子発現を比較すると, 両者では106の遺伝子の発現が異なる (1-MCP処理区で発現量が増加した遺伝子は54, 減少した遺伝子は52). これらの遺伝子のうちの30%は一次代謝に関わるものやエチレン, オーキシシンなどの植物ホルモンに反応する遺伝子である. 1-MCP処理後空気保管区 (収穫72時間後) ではエチレン生成量が急激に増加し, 果肉硬度は31.1Nまで低下する. マイクロアレイ解析の結果から, 1-MCP処理区において空気処理区よりも発現量が減少していた遺伝子 (エチレン受容体遺伝子 *PpETR2* や転写因子 *PpERF* など) のうち67%は1-MCP処理後空気保管区において, 1-MCP処理直後よりも発現量が増加する. このように, ネクタリンでは1-MCP処理効果が持続しない, 1-MCP処理による鮮度保持効果の高いリングゴでは, 1-MCPを処理することで, ACC合成酵素遺伝子の発現は抑制されるが, ネクタリンでは1-MCP処理区においても本遺伝子の発現量はほとんど変化せず, 1-MCP処理後空気保管区では発現量が増大する (Rasori *et al.* 2002, Ziliotto *et al.* 2003, Dal Cin *et al.* 2006). このように, ネクタリンでは1-MCP処理効果が持続しないが, その要因は, ACC合成酵素である可能性が高いと推測される. 一方で, 1-MCP処理後48時間の間に発現量が変わらない遺伝子 (エクспанシン: *PpEXP2*, *PpEXP3* など) もあり, 一部では1-MCPの効果を持続しているものと推測される (Ziliotto *et al.* 2008).

イタリアの研究グループはジャスモン酸 (jasmonic acid) 処理したモモ果実における遺伝子変動について μ PEACH 1.0 を使って網羅的に解析している

(Ziosi *et al.* 2008). ジャスモン酸処理をした果実では、果実の成熟が無処理よりも遅れる。ジャスモン酸処理と無処理果実で比較すると80の遺伝子発現が変動しており (33遺伝子発現が減少, 47遺伝子発現が上昇), これらの遺伝子のうちの30が果実成長や成熟に関わると既に報告されている遺伝子である。その中で, ACC酸化酵素, ポリガラクチュロナーゼ, IAA7 (AUX/IAA) の遺伝子発現が抑制される。また, ジャスモン酸処理によって, ペクチンリアーゼ (pectin lyase) やエクспанシンなどの細胞壁修飾酵素の発現が変動しており, 内生ジャスモン酸生合成に関わる遺伝子などの発現が増加している (Ziosi *et al.* 2008)。

(2) 果実発育の研究

モモでは結実後の胚形成と果実成長が密接に関係しており, 成長初期に胚形成の障害が起こると種子の発育不全や生理落果が起こる。一方で, 成長後期になると胚の発達と果実成長との関係は薄くなる。そこで, イタリアの研究グループは μ PEACH 1.0を使って種子と果肉間 (seed-pericarp) のクロストークと果実成長に関わる遺伝子について解析している (Bonghi *et al.* 2011)。モモ果実成長ステージS1, S2, S3, S4に発現する遺伝子について解析し, 455遺伝子が種子と果肉において, それぞれ異なる発現をしていた。各ステージで発現量が多い遺伝子を発現マーカーとすると, 種子のS1ではLTP (lipid transfer protein, 脂質輸送タンパク質), S2ではPR (pathogenesis-related) タンパク質, S3ではプルニン (prunin), S4ではLEAタンパク質で, 果肉のS1ではRD22様タンパク質, S2ではセリンカルボキシペプチダーゼ (serin-carboxypeptidase), S3では老化関連タンパク質 (senescence related protein), S4ではAUX/IAAである。マイクロアレイで得られたデータをHORMONOMRTER platform (Volodarsky *et al.* 2009) を使って解析すると, 植物ホルモンに反応するとして報告されている遺伝子が同定され, その幾つかについては, 種子と果肉間のクロストークに関与している可能性が明らかとなった。オーキシン, サイトカイニン (cytokinin), ジベレリン (gibberellin)

はS1, S2 (結実などクロストークが最も活発に行われていると思われる時期)に関与しており, エチレンとアブシジン酸 (abscisic acid, ABA) はS3, S4に関与していると推測される (Bonghi *et al.* 2011).

アルゼンチンの研究グループは, モモ果実成長ステージの結実直後, S1, S2, S3, S4 および収穫後追熟した果実におけるメタボローム解析と, 炭素化合物および窒素化合物代謝経路における鍵酵素の活性測定を行っている (Lombardo *et al.* 2011). 主成分分析の結果, S1, S2とS3, S4の果実では代謝産物が大きく変化していることが明らかとなった. S1からS2にかけて, 新鮮果実および乾燥果実重当たりのタンパク質量は大幅に減少するが, 硬核期 (S2) にフェニルプロパノイド (phenylpropanoid) やリグニン (lignin) 合成経路において基質となるポリフェノール (polyphenol) やアミノ酸の含量 (新鮮果実重当たり) が高くなる. ショ糖は結実直後から収穫期までの間に約50倍増加するが (新鮮果実重当たり), これは光合成によって葉から供給される同化産物量の増加によるものと考えられる. 結実直後からS4に向けて果実成長が進むにつれアミノ酸含量は減り, アミノ酸や有機酸分解酵素をコードする遺伝子の発現量が増加する. これらの解析を通じて著者らは発育の初期の代謝調節では, 転写後調節 (posttranscription) の制御が鍵となると推測しており, また, 代謝産物, 転写, タンパク質, 酵素活性の統合した解析が必要であると述べている (Lombardo *et al.* 2011).

3) 網羅的解析による低温障害の研究

モモ果実は, 低温で2週間以上保管すると, 常温に戻しても果肉が粉質化するなど正常に追熟せず, 低温障害とされている. 低温障害に関わるゲノム研究は, 主に長期貯蔵や輸出を行うアメリカ, チリ, アルゼンチンの研究者によって進められている.

チリの研究グループは, モモ品種 'Loring' 果実由来のcDNAライブラリーから単離した重複しない847のESTを使ってマクロアレイを作成している (González-Agüero *et al.* 2008). モモ 'O' Henry' を収穫後21°Cで7日間貯

蔵した果実（正常に軟化した果実）と、4℃で15日間貯蔵した果実と、4℃で15日間貯蔵した後に、21℃で7日間貯蔵した果実（粉質化した果実）についてマクロアレイ解析を行っている。正常に軟化した果実と粉質化した果実間では106の遺伝子が異なる発現様式を示し、それらの90%以上は粉質化した果実において発現量が少ない。低温貯蔵後の果実では、コブラタンパク質 (cobra), エンドポリガラクチュロナーゼ, シンナモイルCoAレダクターゼ (cinnamoyl-CoA reductase), Rab GTP結合タンパク質 (GTP-binding protein rab11) をコードする遺伝子の発現量が低く、これらは貯蔵後に常温において追熟しても低い状態が維持される。また、このような遺伝子の発現傾向は 'O' Henry' 以外の品種においても同様に観察される。コブラタンパク質は細胞伸長等との関連性、シンナモイルCoAレダクターゼはフレーバーとの関連性が指摘されており、また、Rab GTP結合タンパク質はポリガラクチュロナーゼやペクチンメチルエステラーゼ (pectin methylesterase, PME) 等の細胞壁修飾に関わる酵素を輸送すると考えられている。この研究によってこのような機能を持つと推測されるタンパク質が粉質化 (woolliness) に関与している可能性が示唆された。モモの粉質化は細胞壁修飾酵素の中でも、主にポリガラクチュロナーゼやペクチンメチルエステラーゼの活性が低温貯蔵中に影響を受け、細胞壁中の多糖類の代謝に影響を及ぼすことで起こると考えられている (Lurie and Crisosto 2005)。このマクロアレイの結果からもポリガラクチュロナーゼ遺伝子の発現量は、粉質化した果実と比較して正常に軟化した果実では3.2倍高く、これまでの報告と一致する。一方、ペクチンメチルエステラーゼ活性については、粉質化が甚だしいほど活性が高くなると報告されているが (Brummell *et al.* 2004)、このマクロアレイで確認した5つのペクチンメチルエステラーゼ遺伝子の発現は正常に軟化した果実と粉質化した果実で発現量の違いは認められないため、転写以後における制御の可能性について示唆されている (González-Agüero *et al.* 2008)。

アメリカの研究グループは、低温障害に関わる遺伝子の研究を進めるために、マイクロアレイ (ChillPeach) を作成している (Ogundiwin *et al.* 2008)。

低温障害に対して、対照的な性質をもつ2品種、加工用モモ品種である‘Dr. Davis’（低温障害抵抗性）と生食用品種‘Georgia Belle’（低温障害感受性）を交配した後代の果実から4,468のユニジーンを含む7,862のESTを単離している。その内の4,261のユニジーンを搭載したマイクロアレイを作成し、成熟果実の低温処理したものと無処理のものについて、栄養成長組織（葉、根）と無処理の成熟果実についてそれぞれの比較解析を行っている。低温処理した果肉では、温度処理前の果肉と比較して399の遺伝子の発現が変動し（287が増加、112が減少）、最も増加した遺伝子としては、アラビノフラノシダーゼ（ α -L-arabinofuranosidase）、デハイドリン、キチナーゼ（chitinase）等である。マイクロアレイの結果から13の遺伝子を選抜してqRT-PCR（定量的リアルタイムPCR）により解析し、この内10の遺伝子は、低温耐性品種において低温処理で発現量が増加する。これらの遺伝子について、低温耐性の異なる2品種間の後代を用いて解析を進めることで、低温耐性の原因解明につながると期待される（Ogundiwin *et al.* 2008）。ChillPeachには果実特異的および低温誘導性の遺伝子が多く含まれており、その詳細について公開されている（URL2-3-3）。

先にマイクロアレイ解析結果を報告したチリの研究グループでは、果実の熟度と低温貯蔵を組み合わせた4つの異なる処理（未成熟-低温貯蔵なし、成熟-低温貯蔵なし、未成熟-低温貯蔵、成熟-低温貯蔵）をした‘O’Henry’果実から作成したライブラリーを用いて、50,625のESTについて配列を決定している（Vizoso *et al.* 2009）。これらはアセンブルの結果、10,830のユニジーンとなり、ESTの統計学的な解析によって、熟度と低温貯蔵の組み合わせにおいて異なる発現をする遺伝子を同定している。細胞壁の修飾に関与するタンパク質の遺伝子発現は長期間低温で貯蔵することで増加または減少するが、これらのパターンは先の報告（Ogundiwin *et al.* 2008）とほぼ一致する。グルタチオン酸化酵素（glutathione peroxidase）遺伝子の発現量も低温貯蔵中に増大する。この酵素は酸化ストレスにより発現が増加する遺伝子として報告されていることから、長期的な低温貯蔵によって、酸化ストレスが上昇していると推測される。

細胞壁修飾酵素の一つであるポリガラクトクロナーゼについては、5つのア

イソジーンが観察され、何れも成熟が進んだ果実で発現量が多いが、発現パターンはアイソジーン (isogene) により若干異なっている。また、ポリガラクトチュロナーゼの発現は、以前から報告されていたように、粉質化した果実と正常に軟化した果実では異なることが示された。(gene ontology, GO) 解析を行った結果、粉質化した果実では、成熟に必要な代謝過程に関わるタンパク質をコードする遺伝子の発現が正常に増加せず、このような異常にはミトコンドリアやプラスチドが深く関与していると推論されている (Vizoso *et al.* 2009)。

チリの研究グループは、果実熟度と低温障害についてプロテオーム解析を行っている (Nilo *et al.* 2010)。モモ 'O' Henry' の収穫直後果実 (E1)、20°C で貯蔵して軟化させた果実 (E2)、4°C で3週間貯蔵した直後の果実 (E3)、低温貯蔵後に20°C で追熟させた果実 (E4) からタンパク質を抽出した。これらのタンパク質を二次元電気泳動し、処理区によってタンパク質量が異なる58のスポットについてタンパク質を同定している。E1、E2、E3、E4果実の間で、統計学的に有意に変化が認められたものは全体の18%となる43スポットである。そのうちの39スポットのタンパク質は、ポリガラクトチュロナーゼ、ACC酸化酵素、低温ストレスに関わるタンパク質として報告されているデハイドリン様タンパク質、タウマチン様タンパク質等と同定されている。多変量解析により、エンドポリガラクトチュロナーゼ、カタラーゼ (catalase)、NADP 依存性イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (NADP dependent isocitrate dehydrogenase)、ペクチンメチルエステラーゼ、デハイドリン様タンパク質は、正常に軟化した果実と低温障害を受け正常に軟化しなかった果実を区別するために重要であることが示されている。本論文の著者らは過去の報告と併せて次のように考察している。モモの軟化における肉質の変化はペクチンの水溶化と脱重合によって起こり、これらにはポリガラクトチュロナーゼやペクチンメチルエステラーゼが深く関与していると考えられている。その機構としては、ペクチンメチルエステラーゼによって脱メチル化されたホモガラクトツロナン (homogalacturonan) がポリガラクトチュロナーゼによって切断され、低分子化されると考えられる。本研究では過去の報告通り (Lurie and Crisosto 2005)、

低温貯蔵直後の果実でのペクチンメチルエステラーゼタンパク質量は多いにも関わらず、ポリガラクトクロナーゼは非常に少なかった。このような状況では、脱メチル化されたガラクトツロナンは切断されないため、高分子のペクチンが存在し、粉質状の肉質が形成されるのかもしれない。一方、細胞壁ペクチンのラムノガラクトツロナン I の構成成分であるアラビノース (arabinose) 含量も、正常に軟化した果実と低温障害を受け粉質化した果実では異なるという報告がある (Brummell *et al.* 2004)。本研究において、低温障害を受けた果実で特異的に遺伝子発現が増加していたグルカン合成酵素 (1, 4-glucan-protein synthase) は、イネのUDP-アラビノピラノースからUDP-アラビノフラノースの合成に関わる酵素であるUDP-アラビノピラノースムターゼ (UDP-arabinopyranose mutase, UAM) とよく似た配列を持つことから、モモの低温障害には、アラビナンやUDP-アラビノピラノースムターゼも深く関わる可能性が示唆された。

低温貯蔵する前の収穫後果実に熱処理を加えることで、軟化は抑制され、収穫後の病気が抑制されるなど果実品質は高く保持されることが報告されている (Paull and Chen 2000)。そこで、アルゼンチンの研究グループは、モモ果実に熱処理することで変動する遺伝子について、ディファレンシャルディスプレイ法 (differential display, Liang and Pardee 1998) によって解析している (Lauxmann *et al.* 2012)。収穫直後の果実 (H)、収穫後20℃に3日間保管した果実 (H3)、収穫後20℃に7日間保管した果実 (H7)、収穫後39℃で3日間熱処理した果実 (HT)、HT果実を熱処理後20℃に3日間保管した果実 (HT3)、HT果実を熱処理後20℃に7日間保管した果実 (HT7) の6つの処理区について比較したところ、127の遺伝子が異なる発現パターンを示した。これらの遺伝子を発現量の違いから4つのクラスターに分けると、47%は熱処理によって誘導されるもの、36%は熱処理によって抑制されるもの、10%は遺伝子の発現は変化するが、熱処理に対して変化しないもの、7%は収穫直後のみ発現している遺伝子となる。熱処理に反応する23の遺伝子を選抜して、低温貯蔵における反応を調べると、それらの90%以上は低温でも発現が変動しており、こ

のうち60%近くが熱処理と同様の発現パターンを示し、40%近くが反対の発現パターンを示す。このように、貯蔵前熱処理をすることで、低温貯蔵に反応を示す多くの遺伝子発現が変動することから、著者らは熱による前処理は、低温貯蔵への適応性を引き起こすのかもしれないと推論している (Lauxmann *et al.* 2012)。

モモの低温障害に関する網羅的解析の例を示したが、近年では一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) と量的形質座位 (Quantitative trait loci, QTL) 解析を総合した解析なども進められており、粉質化とリンクする SNPsについても報告されている (Martínez-García *et al.* 2013a)。

4) 生理機構解明における網羅的解析の活用事例

一般的なモモ (普通モモ) は、収穫後に急激に軟化すると同時にエチレン生成量の急激な増加が認められる。一方、硬肉モモと呼ばれるタイプのモモでは収穫後もエチレン生成量の増加が起こらず、軟化しないが (Haji *et al.* 2001)、エチレンやエチレンと同様な生理作用を有するプロピレン (propylene) を人為的に処理すると普通モモと同様に軟化する (図2-3-1)。これらのことから、モモ果実の収穫後に見られる急激な軟化にはエチレンが関与しており、硬肉モモはエチレンに対する感受性、果肉が軟化する能力ともに正常に有しているが、成熟に伴うエチレン生成量の増加が生じないために軟化しないものと考えられる。ここでは、このような硬肉モモの遺伝的特性の解明において活用した網羅的解析について紹介する。

硬肉モモではエチレン生合成経路のACC合成酵素に問題が生じている可能性が示されたため (Haji *et al.* 2003)、モモからACC合成酵素遺伝子 (*PpACS1*) を単離して解析したところ、普通モモ果実では収穫後に*PpACS1*の発現量が増加したのに対し、硬肉モモでは本遺伝子の発現量の増加が確認されなかった。これらのことから、硬肉モモではACC合成酵素遺伝子の発現が抑制されているためにエチレン生成が起こらないことが明らかとなった。また、一般的にエチレンは葉などに傷を与えた時にも生成されるが、硬肉モモであっても、傷害

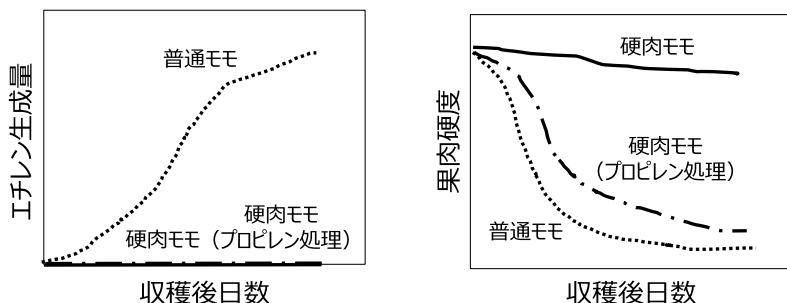


図2-3-1 普通モモ、硬肉モモ（無処理）、硬肉モモ（プロピレン処理）の収穫後果実におけるエチレン生成量と果肉硬度の変化（模式図）

普通モモは収穫後エチレン生成量が増加して急激に軟化するが、硬肉モモはエチレン生成量が増加せず、ほとんど軟化しない。硬肉モモにプロピレン処理をすると、エチレン生成量は増加しないが、軟化する。

を与えた葉においては $PpACS1$ が誘導され、エチレンも生成される。サザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、 $PpACS1$ 遺伝子ゲノム上においてDNAの大きな欠損または挿入は見られなかった(Tatsuki *et al.* 2006)。従って、硬肉モモの成熟果実におけるエチレン生成の抑制は、 $PpACS1$ 遺伝子の欠損によるものではなく、果実成熟に伴う発現が特異的に抑制されているためであると考えられた。

このような結果から硬肉モモでは、成熟に伴う $PpACS1$ 遺伝子の発現を特異的に制御する原因因子（転写制御因子等）に変異等が生じている可能性が考えられた。このような原因因子の候補は数多く想定されるため、モモの成熟過程において発現する遺伝子を網羅的に解析し、 $PpACS1$ と類似した発現パターンを示すものを選抜することとした。そこで、43,803プローブ（独立した21,313のCDSやEST）を搭載した4 X 44Kフォーマット（Agilent Technologies社）のオリゴDNAマイクロアレイ（藤井ら 2009）を用いて、硬肉モモと普通モモにおいて発現する遺伝子の違いを解析した（図2-3-2）。

$PpACS1$ の発現量はS3では低く、普通モモではS4で急激に増加するが、硬肉モモではS4においても増加しない。また、 $PpACS1$ はエチレン（またはブ

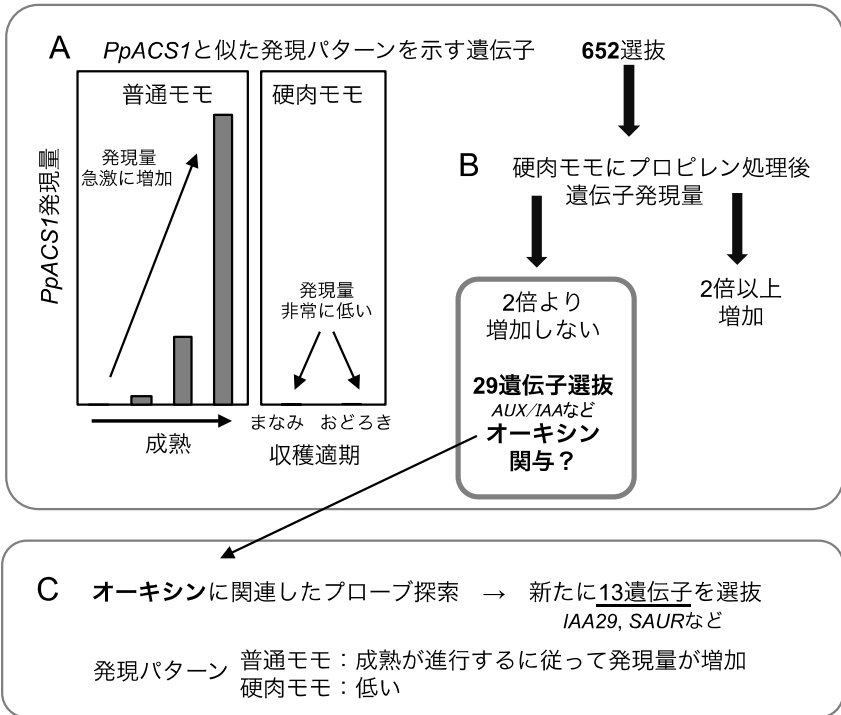


図2-3-2 *PpACS1*発現抑制の原因因子を探索するためのマイクロアレイ解析の進め方

A: 普通モモと硬肉モモにおいて*PpACS1*と似た発現パターンを示す遺伝子を選抜。
 B: Aの中から硬肉モモにプロピレン処理をして、発現量が増加しない遺伝子を選抜。
 C: Bの結果、オーキシンの関与が示唆されたため、新たにマイクロアレイプローブの中からオーキシンに関連したものを選抜し、発現パターンを確認。

ロピレン) 処理して軟化させた硬肉モモ果実でも発現量はほとんど増加しない。マイクロアレイでは、普通モモ‘あかつき’のS3からS4にあたる受粉後92日, 98日, 104日, 106日(収穫適期)の果実, 硬肉モモ品種である‘まなみ’と‘おどろき’の収穫適期の果実, および成熟した硬肉モモに収穫後5,000 ppmのプロピレンを3日間通気処理して軟化させた果実について解析した。普通モモのS3, S4の比較, S4の普通モモと硬肉モモの比較だけでは、*PpACS1*と類似した発現パターンを示す遺伝子が数多く選抜されることが予想

されるため、硬肉モモのプロピレン処理（エチレン処理）を加えた。エチレンによって誘導される遺伝子はプロピレン処理（エチレン処理）により発現が増加するが、*PpACS1*制御に関わる遺伝子の発現は増加しないものと推測される。解析にはGeneSpring GX10（Tomy Digital Biology社）を用い、最初に「find similar genes」というプログラムの機能を使って、普通モモにおいて*PpACS1*と発現パターンのが類似する遺伝子を652選抜した。パラメータは、minimum Pearson correlation value = 0.85 and raw expression value >1000とした。次に、この652遺伝子の中から、硬肉モモのプロピレン処理と空気（対照）処理における発現量の差が2倍以下である29遺伝子を選定した。これらのうち、19遺伝子は機能未知なものであったが、残りの10遺伝子には、ジベレリン2 β -ジオキシゲナーゼ（gibberellin 2 β -dioxygenase）やホメオボックスロイシンジッパータンパク質（homeo-box leucine zipper protein）-17（HB-17）等をコードする遺伝子の他に*AUX/IAA*（Chapman and Estelle 2007）のようにオーキシンに関連する遺伝子が複数含まれていた。そこで、次にマイクロアレイのデータの中から、オーキシンに関連したプローブを探し、新たに13の遺伝子を選抜した。これらには、*IAA29*（indole-3-acetic acid inducible 29）やSAUR様タンパク質（SAUR-like auxin-responsive protein family）（Hagen and Guilfoyle 2002）をコードする遺伝子等が含まれており、その発現パターンは、普通モモでは成熟が進行するに従って発現量が増加し、硬肉モモでは発現量が低く保持されるというものであった。このようにマイクロアレイ解析の結果、選抜した遺伝子の中に、転写制御因子などの想定していたような原因因子は見出せなかったが、オーキシンによって発現が誘導されることが知られている遺伝子が多く含まれていた。このことから、モモ果実ではオーキシンが成熟に伴う*PpACS1*の発現を制御することで、エチレン生成や果肉軟化に関与している可能性が高いものと推測された（Tatsuki *et al.* 2013）。

植物におけるオーキシンの作用は極めて多様であるが、果実成熟に関与している可能性を示す知見も得られている。モモに限定してみても、果実成熟期におけるエチレン生成量の増加が内生オーキシンであるインドール酢酸

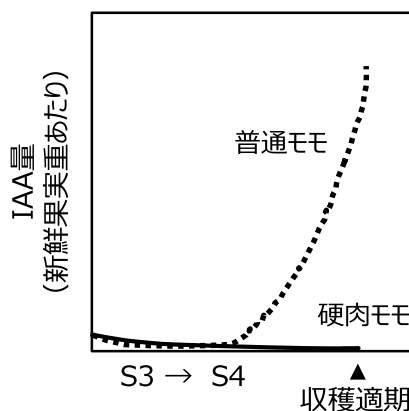


図2-3-3 普通モモおよび硬肉モモのS3～S4におけるIAA含量の変化（模式図）

可能性が考えられたため、モモの果実成長期間中の内生IAA量の変化を普通モモと硬肉モモについて調査した。普通モモのIAA量は、果実の成長に伴い徐々に減少し、収穫適期の2週間ほど前には検出限界値以下となった。そのような状態が数日続いた後、IAA量は増加し始め、収穫適期直前には急激に増加した。硬肉モモでは、普通モモと同様に果実の成長に伴い徐々に減少するが、普通モモとは異なり収穫期に達してもIAA量の急激な増加は認められなかった（図2-3-3）。このように、IAA量が普通モモでは成熟期に増加するのに対し、硬肉モモでは成熟期に達しても増加しないことから、硬肉モモにおける成熟に伴うエチレン生成および軟化の抑制にはオーキシンが関与している可能性が高いと考えられる。モモ果実におけるエチレン生成および軟化とオーキシンの関係をより明確にするために、果実にオーキシン剤を塗布する試験を行った。普通モモを収穫適期の10日前（エチレン生成量が上昇する前）に収穫し、NAAをスプレー処理した後に貯蔵したところ、処理濃度が高いものほどエチレン生成量が増加し軟化した。この時、*PpACS1*やエンドポリガラクトクロナーゼ遺伝子（*PpPG2*）の発現量もNAAの処理濃度が高いほど増加した。一方、硬肉モモの成熟果実にNAAを処理したところ、*PpACS1*が誘導され、エチレン生成が

(IAA)の増加と一致すること（Tonutti *et al.* 1991）、モモ果肉ディスクにオーキシン処理をするとエチレン生成が起こること（Ohmiya 2000）等の知見が報告されている。また、成熟期にオーキシン誘導性遺伝子の発現が増加することも示されている（Trainotti *et al.* 2007）。

硬肉モモの成熟果実におけるエチレン生成および軟化の抑制にオーキシンが関与している可

起こり、軟化した。これらの結果から、成熟期のモモ果実では、硬肉モモも含め、オーキシンによってエチレン生成が誘導され、それに伴い果肉が軟化することが明らかとなった。更に、普通モモを用いて、収穫前の果実にオーキシン作用阻害剤である α -(phenylethyl-2-one)-IAA (PEO-IAA) を処理する試験を行ったところ、無処理の果実に比べ、エチレン生成量は少なく、果肉硬度は高い傾向を示した。また、*PpACS1*や*PpPG2*の発現量も処理果実で少なかった。以上の結果から、普通モモにおける成熟に伴うエチレン生成および軟化は内生オーキシンによって制御されている可能性が高いものと考えられる (Tatsuki *et al.* 2013)。

普通モモでは、収穫後にエチレン生成量が増加するとともに、ポリガラクトクロナーゼ等細胞壁を代謝・修飾する酵素の遺伝子発現が増加し、軟化する。また、硬肉モモも、収穫した果実にエチレンを処理すると、処理濃度が高いほど細胞壁の代謝・修飾に関わる遺伝子の発現が増加し、著しく軟化する (Hayama *et al.* 2006)。このような収穫後に見られる急激な軟化はエチレンによって引き起こされるが、ここまで述べてきたように、エチレン生成はオーキシンによって制御されている可能性が高い。硬肉モモでは、成熟後期に達してもオーキシンが増加しないためにエチレン生成が誘導されず、軟化が起こらないものと考えられる。

一方、モモ果実はS3に入ると急激に肥大するとともに、緩やかに軟化する。このような傾向は収穫後に急激な軟化が見られない硬肉モモでも同様である。この時期は普通モモであってもエチレン生成量、IAA量ともに極めて低いことから、このような緩やかな軟化は、収穫後の急激な軟化とは異なり、エチレンもオーキシンも関与しないものと思われる。先に述べたように細胞壁修飾酵素の網羅的な発現解析により、一部の遺伝子はエチレン生成量が増加する前から発現し、かつ転写はエチレンによって促進されることはなく、むしろ抑制されることが明らかにされている (Trainotti *et al.* 2003)。以上のことから、モモ果実の軟化は2段階に制御されていると考えられる (Pressey *et al.* 1971)。

5) モモの網羅的解析を通じて

今回は、モモにおける遺伝子の網羅的解析の研究例として、果実の成熟や低温障害など様々な要因が関わる複雑な現象に関する研究を紹介した。網羅的解析では、非常に多くの遺伝子について発現の挙動を一度に知ることができる。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 等のモデル植物において明らかにされている各遺伝子の機能に関する情報も加味すれば、複雑な生理現象について分子機構を推論することも可能となる。たとえば、低温障害では、従来から関与が指摘されてきたポリガラクトクトロナーゼ等の細胞壁修飾酵素に加えて、熱反応性のタンパク質やストレス応答性のタンパク質等をコードする非常に多くの遺伝子も関与する可能性が明らかにされつつある。複雑な現象は、個々の遺伝子を単独で解析しても全体像を把握することは難しく、網羅的解析が必須である。一方、最後に紹介した硬肉モモにおける研究事例のように的を絞った上で網羅的に遺伝子発現を解析することも有用である。ただし、一般的に、このような解析では非常に多くの遺伝子が変動するため、簡単には目的とする遺伝子にたどりつけない。網羅的解析を行う点を増やすなど工夫が必要である。

本稿ではほとんど触れなかったが、モモでは近年QTL解析とSNPsマッピングから様々な現象の原因を絞り込む研究も行われており、非常に膨大な情報が得られている (Ahmad *et al.* 2011 ; Eduardo *et al.* 2013 ; Martínez-García *et al.* 2013a, 2013b)。しかしながら、これらの研究は候補因子の提示や制御機構の推測に留まるものである。候補因子や推測された制御機構の中から重要なものに焦点を当て、一つずつ証明することにより現象の一端を明らかにできるものと思われる。

引用文献

- Ahmad, R. *et al.* (2011) Whole genome sequencing of peach (*Prunus persica* L.) for SNP identification and selection. *BMC Genomics*. 12 : 569.
- Arús, P. *et al.* (2012) The peach genome. *Tree Genetics & Genomes*. 8 : 531-547.
- Batzoglou, S. *et al.* (2002) ARACHNE : a whole-genome shotgun assembler. *Genome research*. 12 : 177-189.
- Bonghi, C. *et al.* (2011) A microarray approach to identify genes involved in seed-pericarp cross-talk and development in peach *BMC Plant Biology* 2011, 11 : 107 <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/107>
- Brummell, D. A. *et al.* (2004) Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit : association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *Journal of Experimental Botany*. 55 : 2041-2052.
- Chae, H. S. *et al.* (2000) Hormonal cross-talk between auxin and ethylene differentially regulates the expression of two members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in rice (*Oryza sativa* L.) . *Plant and Cell Physiology*. 41 : 354-362.
- Chapman, E. J. and M. Estelle (2007) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics*. 43 : 265-285.
- Dal Cin, V. *et al.* (2006) The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 42 : 125-133.
- Eduardo, I. *et al.* (2013) Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit : QTL analysis and identification of candidate genes using dense SNP maps. *Tree Genetics and Genomes*. 9 : 189-204.
- ESTree Consortium (2005) Development of an oligo-based microarray (μ PEACH1.0) for genomics studies in peach fruit. *Acta Horticulturae*. 682 : 263-268.
- Fan, X. *et al.* (2002) Interactive effects of 1-MCP and temperature on 'Elberta' peach quality. *Horticultural Science*. 37 : 134-138.
- 藤井 浩ら (2009) 公開データを利用したブドウとモモのオリゴDNAマイクロアレイの開発. *園芸学研究*. 8 (別2) : 407.
- González-Agüero, M. *et al.* (2008) Identification of woolliness response genes in peach fruit after post-harvest treatments. *Journal of Experimental Botany*. 59 : 1973-1986.
- Hagen, G. and Guilfoyle, T. (2002) Auxin-responsive gene expression: genes,

- promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*. 49 : 373-385.
- Haji, T. *et al.* (2001) Changes in ethylene production and flesh firmness of melting, nonmelting and stony hard peaches after harvest. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 70 : 458-459.
- Haji, T. *et al.* (2003) Softening of stony hard peach by ethylene and the induction of endogenous ethylene by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) . *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 72 : 212-217.
- Hayama, H. *et al.* (2006) Ethylene - regulation of fruit softening and softening - related genes in peach. *Journal of Experimental Botany*. 57 : 4071-4077.
- 林 建樹 (2005) バラ科果樹ゲノム研究の現状.
Bulletin of the NARO Institute of Fruit Tree Science. 4 : 1 -11.
- Jung, S. and D. Main (2014) Genomics and bioinformatics resources for translational science in Rosaceae. *Plant Biotechnology Reports*. 8 : 49-64.
- Lauxmann, M. A. *et al.* (2012) Transcriptomic profiling during the post-harvest of heat-treated dixiland *Prunus persica* fruits : common and distinct response to heat and cold. *PLoS ONE*. 7 : e51052. doi : 10.1371/journal.pone.0051052
- Liang, P. and A. B. Pardee (1998) Differential display. A general protocol. *Molecular biotechnology*. 3 : 261-267.
- Lombardo, V.A. *et al.* (2011) Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage. *Plant Physiology*. 157 : 1696-1710.
- Lurie, S. and Crisosto, C. H. (2004) Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest Biology and Technology*. 37 : 195-208.
- Martínez-García, P. J. *et al.* (2013a) Effect prediction of identified SNPs linked to fruit quality and chilling injury in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] . *Plant Molecular Biology*. 81 : 161-174.
- Martínez-García, P. J. *et al.* (2013b) High density SNP mapping and QTL analysis for fruit quality characteristics in peach (*Prunus persica* L.) . *Tree Genetics and Genomes*. 9 : 19-36.
- Mathooko, F. M. *et al.* (2001) Regulation of genes encoding ethylene biosynthesis in peach fruit by carbon dioxide and 1- methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*. 21 : 265-281.
- McDonald, M. P. and Visser, E. J. W. (2003) A study of the interaction between auxin and ethylene in wild type and transgenic ethylene insensitive tobacco during adventitious root formation induced by stagnant root zone conditions.

- Plant Biology. 5 : 550-556.
- Muday, G. K. *et al.* (2006) RCN1-regulated phosphatase activity and EIN2 modulate hypocotyl gravitropism by a mechanism that does not require ethylene signaling. *Plant Physiology*. 141 : 1617-1629.
- Nilo, R. *et al.* (2010) Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE) . *BMC Genomic*. 11 : 43
- Ogundiwin, E. A. *et al.* (2008) Development of ChillPeach genomic tools and identification of cold - responsive genes in peach fruit. *Plant Molecular Biology*. 68 : 379-397.
- Ohmiya A. (2000) Effects of auxin on growth and ripening of mesocarp discs of peach fruit. *Scientia Horticulturae*. 84 : 309-319.
- Paull, R. E. and Chen, N. J. (2000) Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*. 21 : 21-37.
- Prinsi, B. *et al.* (2011) Peach fruit ripening : A proteomic comparative analysis of the mesocarp of two cultivars with different flesh firmness at two ripening stages. *Phytochemistry*. 72 : 1251-1262.
- Pressey, R. *et al.* (1971) Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during ripening. *Journal of Food Science*. 36 : 1070-1073.
- Rahman, A. *et al.* (2002) Auxin and ethylene response interactions during Arabidopsis root hair development dissected by auxinflux modulations. *Plant Physiology*. 130 : 1908-1917.
- Rasori, A. *et al.* (2002) Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *Journal of Experimental Botany*. 53 : 2333-2339.
- Stepanova, A. N. *et al.* (2005) A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root - specific ethylene - insensitive mutants in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 17 : 2230-2242.
- Swarup, R. *et al.* (2002) Auxin cross - talk : integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology*. 49 : 411-426.
- Tatsuki, M. *et al.* (2006) The involvement of 1-aminocyclopropane - 1 - carboxylic acid synthase isogene, *Pp-ACS1*, in peach fruit softening. *Journal of Experimental Botany*. 57 : 1281-1289.
- Tatsuki, M. *et al.* (2013) Increased levels of IAA are required for system 2 ethylene

- synthesis causing fruit softening in peach (*Prunus persica* L. Batsch) . Journal of Experimental Botany. 64 : 1049-1059.
- Tonutti, P. *et al.* (1991) Ethylene biosynthesis during peach fruit development. Journal of the American Society for Horticultural Science. 116 : 274-279.
- Trainotti, L. *et al.* (2003) A cell wall-oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of the softening in peaches. Journal of Experimental Botany. 54 : 1821-1832.
- Trainotti, L. *et al.* (2006) The use of microarray μ PEACH1.0 to investigate transcriptome changes during transition from preclimacteric to climacteric phase in peach fruit. Plant Science. 170 : 606-613.
- Trainotti, L. *et al.* (2007) The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. Journal of Experimental Botany. 58 : 3299-3308.
- Verde, I. *et al.* (2013) The high - quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. Nature Genetics. 45 : 487-496.
- Vizoso, P. *et al.* (2009) Comparative EST transcript profiling of peach fruits under different post - harvest conditions reveals candidate genes associated with peach fruit quality. BMC Genomics. 10 : 423. doi : 10.1186/1471-2164-10-423
- Volodarsky, D. *et al.* (2009) HORMONOMETER : a tool for discerning transcript signatures of hormone action in the *Arabidopsis* transcriptome. Plant Physiology. 150 : 1796-1805.
- Watkins, C. B. (2006) The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. Biotechnology Advances. 24 : 389-409.
- Ziliotto, F. *et al.* (2003) Effect of 1-MCP on nectarine fruit post-harvest physiology. In : Vendrell M, H. Klee, J. C Pech, F. Romojaro (eds.) Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene. III. p. 457-458. IOS Press
- Ziliotto, F. *et al.* (2008) Transcriptome profiling of ripening nectarine (*Prunus persica* L. Batsch) fruit treated with 1-MCP. Journal of Experimental Botany. 59 : 2781-2791.
- Ziosi, V. *et al.* (2008) Jasmonate - induced transcriptional changes suggest a negative interference with the ripening syndrome in peach fruit. Journal of Experimental Botany. 59 : 563-573.