

## 第2章 第5節

## ***d*-リモネン合成酵素遺伝子をアンチセンスで導入した 遺伝子組換えカンキツの遺伝子発現プロファイリング**

農研機構果樹研究所 カンキツ研究領域 島田 武彦

### 1) カンキツのゲノム研究とマイクロアレイの開発

カンキツのゲノム研究の初期段階においては、さまざまな組織由来のcDNAライブラリーを用いた発現遺伝子配列断片 (expressed sequence tag, EST) 解析が進められた (第2章第1節参照)。ESTは、これまでに56万以上 (重複を含む) 明らかにされ、それらの塩基配列がDNA Data Bank of Japan (DDBJ, URL1-4-2) やNational Center for Biotechnology Information (NCBI, URL1-4-1) などの公的データベースに登録された。カンキツのEST解析については、本書第2章第1節に詳述されている。2003年には、カンキツ国際コンソーシアム (International Citrus Genome Consortium, 2015-11-09) が設立され、アメリカ、スペイン、ブラジル、オーストラリア、イスラエル、イタリア、フランス、中国、日本の国際協力体制のもとに、カンキツゲノム解読に向けた取り組みがすすめられた。その結果、クレメンティン (*Citrus clementina* Hort. ex Tan) とスイートオレンジ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) のゲノム解読が2009年と2013年にそれぞれ終了し (Aleza *et al.* 2009; Xu *et al.* 2013), それらの配列が米国エネルギー省のJoint Genome Institute (JGI) のゲノムデータポータルサイトPhytozome (URL1-1-1, 第1章第1節参照) から公開されている。これらの公開配列をもとに遺伝子予測プログラムを用いて遺伝子数を推測した結果、一般的なカンキツのゲノム中には約3万3千個の遺伝子が存在する

ことが明らかになった (Wong *et al.* 2014).

以上のような網羅的な塩基配列情報を利用すると、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) や単純反復配列 (simple sequence repeat, SSR) などのDNAマーカーやプロテオミクス (proteomics) のためのゲノム研究ツールを開発することが可能になるが、それらのツールの中でも、一度の実験で多数の遺伝子の発現情報が得られるマイクロアレイ (microarray) は、遺伝子の機能解明の分野において画期的な発展をもたらすツールとして注目され、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), イネ (*Oryza sativa* L.), トマト (*Solanum lycopersicum* L.) などさまざまな植物種で開発が進んだ。本書でも、第1章第5節でマイクロアレイの開発方法が詳述されているほか、第2章第3節でモモ (*Prunus persica* (L.) Batsch), 第4節でブドウ (*Vitis*) での応用研究が紹介されている。カンキツでは、ゲノム研究の初期段階においてEST解析が進められたため (Hisada *et al.* 1996, 1997, 1999; Moriguchi *et al.* 1998; Kita *et al.* 2000; Shimada *et al.* 2003; Fujii *et al.* 2003), EST解析で解明した発現遺伝子のcDNAを調製し、調製したcDNAをプローブとしてガラススライドなどの基板に結合させたcDNAマイクロアレイが、初期型のマイクロアレイとして日本とスペインそれぞれで開発された (Shimada *et al.* 2005a; Forment *et al.* 2005; Goldberg-Moeller *et al.* 2008)。このcDNAマイクロアレイは、これまで多くの研究に利用されてきたが、プローブとして使用するcDNAの調整に手間がかかること、クロスハイブリダイゼーション (cross hybridization) によるミスシグナルが発生しやすいことなどの問題があった。一方、インクジェットプリンターの原理などを利用してプローブを基板上に高密度に配置させる技術や、クロスハイブリダイゼーションを軽減できるプローブの設計技術などが進歩し、これまで問題となっていたcDNA調整の手間やミスシグナルの発生の問題に対応できるようになった。このタイプのマイクロアレイは、オリゴマイクロアレイ (oligo microarray) と称され、現在、マイクロアレイの主流となっている。カンキツにおいても、Affymetrix社から2万個のプローブを登載した20Kのオリゴマイクロアレイ (URL2-5-1) が発

売されているほか、Agilent Technologies社のシステムを用いた22Kのプローブを搭載したオリゴマイクロアレイ (Fujii *et al.* 2007) が開発され、生理活性物質に対する応答を遺伝子発現の面から網羅的に解析する研究 (Fujii *et al.* 2007, 2008) などに活用されている。Agilent Technologies社のシステムによるカスタムマイクロアレイの設計方法は本書第1章第5節に詳述されている。本稿ではカンキツでゲノム情報を活用した代表的な研究事例として、カンキツの香気成分代謝に関わる遺伝子の構造解析を行った研究、*d*-リモネン (limonene) 含有量を改変した遺伝子組換えカンキツのマイクロアレイ解析を行った研究などについて紹介する。

## 2) カンキツの果皮に含まれる主要な香気成分と その生合成に関わる遺伝子の構造と発現

カンキツには、モノテルペン(monoterpene)やセスキテルペン (sesquiterpene) などの200種類程度のテルペン類が含有されているが、主要な香気成分 (aroma component) は、*d*-リモネンと呼ばれるモノテルペンであり、香気成分含量の8割から9割をこの成分が占めている (Sawamura, 2000)。*d*-リモネンをはじめとしたこれらの香気成分は、果皮 (peel) の油胞 (oil cell) に蓄積されており、カンキツの香りの品種間差は、油胞に含まれる香気成分の組成や含有量の違いに起因する。また、これらの香気成分の中には、カビなどの果実の腐敗に関与する病原菌に対する抗菌活性などが見出されている。モノテルペンとセスキテルペンの植物での生合成経路を図2-5-1に示した。モノテルペンとセスキテルペンの合成は、それぞれプラスチドと細胞質で行われる。プラスチドでは非メバロン酸 (mevalonic acid) 経路でイソペンテニルピロリン酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) が合成され、IPPが重合してモノテルペンの基質 (substrate) となるゲラニルピロリン酸 (geranyl diphosphate, GPP) が合成される。一方、細胞質ではメバロン酸経路でIPPが合成され、IPPが重合してセスキテルペンの基質となるファルネシルピロリン酸 (farnesyl diphosphate, FPP) が合成される。さらに、これらの基質に対して、さまざまな酵素がはたらき、プラスチ

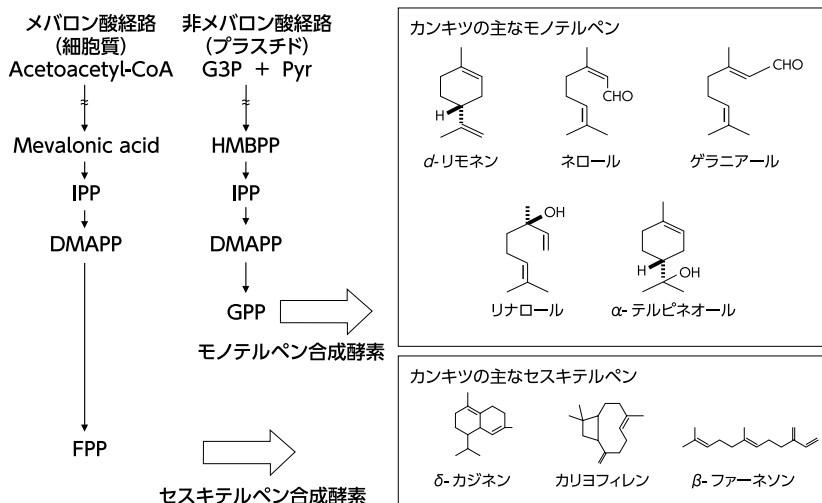


図2-5-1 カンキツの香気成分の代謝経路

ドでモノテルペン，細胞質でセスキテルペンが合成される。前述のとおり，カンキツの果皮には多くのモノテルペン，セスキテルペンが含有されているため，これらのテルペン類の合成に関わる多種類の酵素遺伝子がゲノム中に存在すると考えられる。

テルペン類の合成に関わる酵素遺伝子は，植物ではゲノム中に多重遺伝子族 (multigene family) として存在しており，全ゲノムシーケンスが解読されたシロイヌナズナでは，モノテルペン合成酵素遺伝子の配列を持つ遺伝子がゲノム中に40個存在していることが明らかにされている (Aubourg *et al.* 2002)。さらに，それらのいくつかは染色体上にクラスターを形成しているため，遺伝子重複によって生じたパラログ (paralog) として進化したと考えられている (Aubourg *et al.* 2002)。著者らは，アルギニン (arginine) タンデムモチーフ (RR motif) や金属結合モチーフ等の植物由来のテルペン合成酵素に特徴的なモチーフ配列を持つ遺伝子を，カンキツから多数単離した (Shimada *et al.* 2004, 2005b, 2012, 2014b)。さらに，モノテルペンやセスキテルペンの合成酵

素遺伝子について、カンキツの全ゲノム配列対象にした相同性検索 (homology search) の結果、これらの遺伝子と相同性の高い遺伝子がカンキツには49個存在すること (Dornelas *et al.* 2007)、モノテルペン合成酵素遺伝子、セスキテルペン合成酵素遺伝子ともに、7個のエクソン (exon) と6個のイントロン (intron) を有する構造を持ち、イントロンの挿入位置も概ね保存されていることを明らかにした (Shimada *et al.* 2012, 2014b)。なお、カンキツの $\gamma$ -テルピネン (terpinene) 合成酵素遺伝子と $\alpha$ -ピネン (pinene) 合成酵素遺伝子のアミノ酸配列の違いは数%で、このわずかな違いによって、異なるモノテルペンが生成されることが明らかにされており (Lücker *et al.* 2002)、他の植物種と比較すると、カンキツでは異なる機能を有するモノテルペン合成酵素遺伝子間の塩基配列の類似性が高いことが明らかになっている (Shimada *et al.* 2004)。

さらに、多くのcleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーを用いて作成したカンキツの遺伝子地図 (Omura *et al.* 2003 ; Shimada *et al.* 2014a) に、モノテルペン合成酵素遺伝子やセスキテルペン合成酵素遺伝子をマッピング (mapping) したところ (口絵2-1-2)、 $d$ -リモネンや $\gamma$ -テルピネンなどの複数のモノテルペン合成酵素遺伝子やセスキテルペン合成酵素遺伝子が第8連鎖群 (linkage group) の同じ領域 (region) にマッピングされていることが明らかとなった。この結果は、カンキツでものシロイヌナズナと同様に、モノテルペン合成酵素遺伝子やセスキテルペン合成酵素遺伝子は、遺伝子重複によって生じたパラログとして進化し、カンキツの多様な香気成分の生合成に関与していることを示唆している。

モノテルペンやセスキテルペンは、葉、花、果皮などにある油胞を取り囲む分泌細胞で生合成されているため (Yuya *et al.* 2015)、これらの生合成に関わる酵素遺伝子の転写産物の集積を調べた。その結果、花や幼果の果皮で、これらの酵素遺伝子の転写産物の集積を認めた (図2-5-2)。また、香気成分の組成は器官によって異なるため、それぞれの器官における香気成分組成と酵素遺伝子の発現との関係を調べた。カンキツの花には媒介昆虫に誘引効果のある

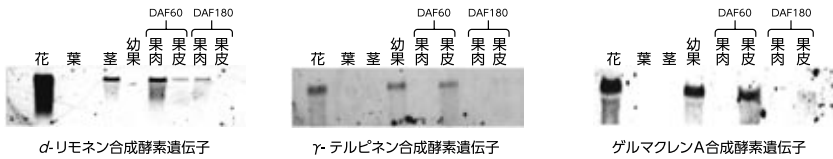


図2-5-2 代表的なモノテルペン合成酵素遺伝子、セスキテルペン合成遺伝子の発現パターン、遺伝子発現はノーザンプロット法により分析

DAF: 開花後の日数 (Days After Flowering)

リナロール (linalool), オシメン (ocimene) および  $\gamma$ -テルピネンが多く含まれ (Azam *et al.* 2013), 一方, 果実では *d*-リモネン, セスキテルペンの蓄積量が多い (Vekari *et al.* 2002). これらの香気成分の組成の変動は, 酵素遺伝子の発現パターンと相関がみられたことから, カンキツの香気成分の生合成は遺伝子の転写レベル (transcriptional level) で制御されていると考えられた (Shimada *et al.* 2005).

### 3) *d*-リモネン含有量を低下させた遺伝子組換えカンキツの作出と病害抵抗性の賦与

カンキツには数年以上の幼若期 (juvenile period) が存在することから, 遺伝子組換え体 (genetically modified plant) の果実形質の評価には長い年月が必要となる. このため, カンキツの果実形質を遺伝子組換え技術で改変した事例はこれまで極めて少なかった. そこで, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所は, カンキツの早期開花遺伝子 (*Citrus FLOWERING LOCUS T*, *CiFT*) をカラタチ (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) に導入して, 遺伝子導入後2年以内に開花・結実させる系を確立した (Endo *et al.* 2005). さらに, この *CiFT* と機能改変に必要な遺伝子を共発現 (co-expression) させる *CiFT* 共発現ベクターを開発し (Endo *et al.* 2009), このベクターを改変して利用することで (口絵2-5-1), 遺伝子組換えによる果実形質の改変効果の評価を数年程度の短い期間で実施できるようにした. 実際, 上記の *CiFT* 共発現ベクターを用いて, ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marcow.)

から単離した $d$ -リモネン合成酵素遺伝子をアンチセンス (antisense) 方向で、カラタチにおいて発現させたところ (口絵2-5-2), 果実中の $d$ -リモネン含量が低下し, カンキツでは世界で初めて, 遺伝子組換え技術による香気成分の改変に成功した (Endo *et al.* 2009). さらに, 同様の手法を用いて, スペインのバレンシア農業研究所のPeña博士と共同研究を行い,  $d$ -リモネン含量が低下した遺伝子組換えオレンジの作出にも成功した (Rodriguez *et al.* 2011). このオレンジの遺伝子組換え体では, カラタチ同様に $d$ -リモネンの含有量が著しく低くなったが, 果実の外観や生育の様相は通常のオレンジと変わりなく, リナロールなどの鎖状テルペン類の含有量が微増した (口絵2-5-3).

マイクロアレイはゲノム上の遺伝子の発現変動を網羅的にモニタリングできることから, 外来遺伝子 (foreign gene) の導入に伴って, 内生遺伝子 (endogenous gene) の発現がどのように変動するのかを迅速に評価できる有効な手法である. そこで, 20KのcDNAマイクロアレイを用いて,  $d$ -リモネン含有量が低下した遺伝子組換えオレンジ果実において, 内生遺伝子の発現がどのように変化するのか調べた (Rodríguez *et al.* 2014). その結果,  $d$ -リモネンのアンチセンス方向の遺伝子導入によって, フラベド (flavado) 及び砂じょう (juice sac) において, テルペン合成, フラボノイド (flavonoid) 合成, ストレス誘導性の遺伝子の発現が抑制され, 熱誘導等に関わる遺伝子の発現が増加することを示唆した.

このように, 遺伝子組換え体の果実では,  $d$ -リモネン含有量の低下に伴いストレスなどで誘導される遺伝子の発現量が低下したことから, このような遺伝子発現プロフィールの変化が, 果実の病害抵抗性のどのような影響を及ぼすかについて調べた. カンキツ果実に感染する主要な病原菌のカンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) や緑カビ病菌 (*Penicillium digitum*) を,  $d$ -リモネン含有量が低下した遺伝子組換えオレンジの果実に接種し, 果実での発病の程度を観察した. その結果, この遺伝子組換えオレンジは, カンキツかいよう病や緑カビ病に対して強い抵抗性を示すことが明らかとなった (口絵2-5-4). 植物では, 乾燥, 塩害および低温などの環境ストレスに対する応答シグ

ナルと、病原菌感染などの生物ストレスに対する全身獲得抵抗性誘導シグナル (systemic acquired resistance : SAR) との間に、拮抗的な相互作用があることが報告されている (Yasuda *et al.* 2008)。また、昆虫などによる食害や傷害などの刺激によってジャスモン酸 (jasmonic acid) を介してSARを誘導する抵抗性機構もあり、ジャスモン酸のシグナル、サリチル酸 (salicylic acid) のシグナル、アブシジン酸 (abscisic acid) のシグナルは共に拮抗的であることが知られている (Yasuda *et al.* 2008)。このため、*d*-リモネン含有量が低下した遺伝子組換えオレンジのサリチル酸、ジャスモン酸、アブシジン酸およびジャスモン酸の前駆体12-オキソ-フィトジエン酸 (12-0xo-phytodienoic acid) の含有量を調査したところ、この遺伝子組換えオレンジの果実ではジャスモン酸の前駆体が通常の果実より多く蓄積されていることを明らかにした (Rodríguez *et al.* 2014)。さらに、傷害処理2時間後では、ジャスモン酸の含有量が遺伝子組換えオレンジの果実で顕著に増加し、このシグナルを受けて病害抵抗性関連の遺伝子の発現量が増加して、これらの病原菌に対して強い病害抵抗性が付与されたと推察した (図2-5-3)。

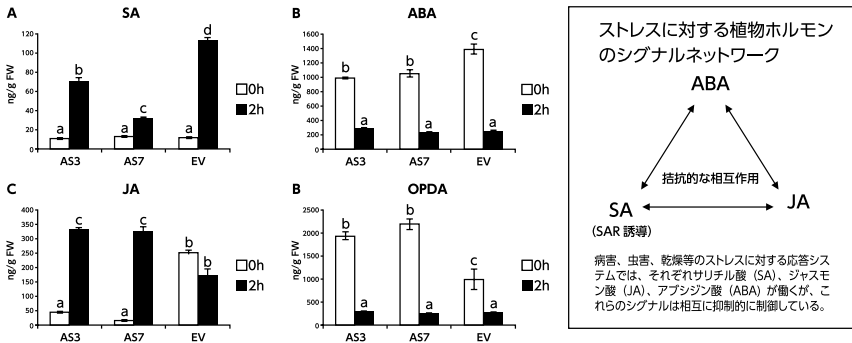


図2-5-3 遺伝子組換え体果実におけるサリチル酸 (SA)、アブシジン酸 (ABA)、ジャスモン酸 (JA) とジャスモン酸の前駆体 (OPDA) の処理後24時間の果実における変動

AS3: *d*-リモネン合成酵素遺伝子をアンチセンス方向に導入した遺伝子組換え体系



#### 4) カンキツの香気成分と病害抵抗性の関連

カンキツでは、ポンカン (*Citrus reticulata* Blanco) の香気成分がフザリウム腐敗病 (原因菌, *Fusarium oxysporum*), 立枯れ病 (原因菌, *Rhizoctonia solani*), 黒腐病 (原因菌, *Alternaria alternata*), 緑カビ病等の病原菌の生育の抑制 (Chutia *et al.* 2009), 青カビ病 (原因菌, *Penicillium italicum*) や緑カビ病などの胞子の発芽を抑制する (Wang *et al.* 2012), 黒腐病の抵抗性に促進的に関与 (Yamazaki *et al.* 2007) していることが既に報告されている. さらに遺伝子組換えオレンジでは $d$ -リモネンの含有量が低下したことによりリナロールやシトラール (citral) 等の鎖状テルペン類が微増していることから, 香気成分と病害抵抗性の関連について調査を進めた (Shimada *et al.* 2014b). カンキツの果皮に含まれる18種類の香気成分の標品を用いてカンキツかきよう病原菌と青カビ病原菌に対する抗菌活性について調査したところ, カンキツの主要な香気成分の $d$ -リモネンは両病原菌に対して抗菌活性を示さず, リナロール, シトラール, ゲラニオール (geraniol), ネロリドール (nerolidol) などの鎖状テルペン類がこれらの病害菌に対して抗菌活性を示すことが明らかとなった (図2-5-4). この結果は, リナロールやゲラニオールなどの含酸素モノテルペンが, バクテリアなどの菌類に対して広範囲の抗菌スペクトルを有するとする既報の結果と一致する (Kotan *et al.* 2007).

そこで, 抗菌活性を持つ香気成分の鎖状テルペンのうち, リナロールがカンキツの果実で最も多く含有される香気成分であることから, リナロールについて詳細な研究を進めた (Shimada *et al.* 2014b). ウンシュウミカンではリナロールの合成に関わる遺伝子は3種類存在し, そのうち2個 (*CuSTS3-1*, *CuSTS3-2*) は, モノテルペン合成酵素遺伝子の構造を持ち, 基質のゲラニルピロリン酸 (GPP) からリナロールを合成することを明らかにした. 残りの遺伝子 (*CuSTS4*) は, セスキテルペン合成酵素遺伝子の構造を持ち, ゲラニルピロリン酸 (GPP) とファルネシルピロリン酸 (FPP) の両者を基質として利用して, それぞれからリナロールとネロリドールを合成することを明らかにした. また,

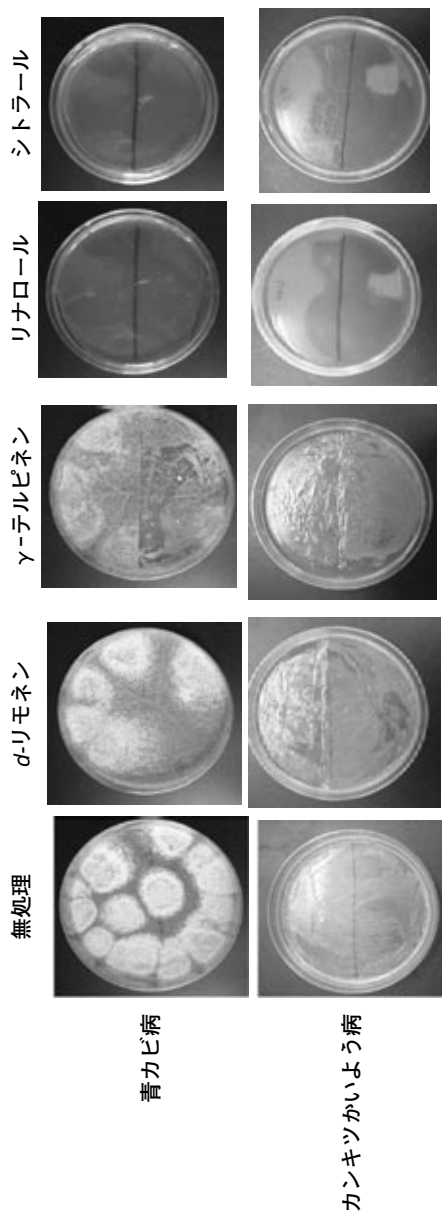


図2-5-4 カンキツ果皮に含まれる香気成分の標品を用いた青カビ病とカンキツかいよう病に対する抗菌活性の調査。

これらの遺伝子は、カンキツかいよう病と青カビ病の病原菌接種や傷害処理を行うと、遺伝子発現が誘導されることを示した。さらに、サリチル酸とジャスモン酸を処理したところ、ジャスモン酸処理した葉や果実の方が、サリチル酸よりリナロール合成酵素遺伝子の発現量が増加することを示した（口絵2-5-5）。これまで、カンキツかいよう病や緑カビ病などに対するカンキツで類での抵抗性メカニズムは明らかとなっていないが、以上の結果は、ジャスモン酸やリナロールなどの香気成分が、これらの病害抵抗性の誘導に関与する可能性を示唆している。

さらに、カンキツにおけるリナロール含量とカンキツかいよう病抵抗性の品種間差からも、リナロールと病害抵抗性との関係を推定できると考えた。カンキツでは、ポンカンがカンキツかいよう病や貯蔵病害などの抵抗性素材として育種に利用されている。このため、ポンカンを含む代表的なカンキツのリナロール含有量を調査したところ、ポンカンは葉や成熟果実でリナロール含有量が高いことが明らかとなった（口絵2-5-6）。さらに、複数のポンカン系統について、葉に含有されるリナロールを調査したところ、すべての系統でリナロールが他のカンキツよりも高いことが明らかとなった。

カンキツでは、カンキツテトラザウイルス病（原因ウイルス、*Citrus tristeza*）に対するカラタチの抵抗性の事例を除き、多くの主要病害については明確な抵抗性メカニズムが解明されておらず、圃場レベルで抵抗性素材として利用できる系統を品種育成に利用しているのが現状となっている。今回、ジャスモン酸やリナロールがカンキツの病害抵抗性に関与することが示唆されとことから、ジャスモン酸やリナロールが誘導する病害抵抗性などについて、マイクロアレイなどを活用してさらに詳細に解析し、ポンカンの持つ病害抵抗性のメカニズムの解明を進めていく予定である。

## 5) 今後の展望

本稿では遺伝子組換え体の評価手法として、マイクロアレイの活用事例を紹介したが、カンキツでマイクロアレイが開発されて以降、病害抵抗性遺伝子の

探索, 植物ホルモン応答性遺伝子の探索, 幼若期特異的な遺伝子の探索など, さまざまな目的で利用普及が進んでいる。さらに, プロテオミクス (proteomics) 解析などの分析法の確立により, マイクロアレイデータと統合したマルチオミックス (multiomics) 解析がカンキツでも実施可能な状況となっており, テルペノイドやフラボノイドなどの多様な二次代謝成分を含有するカンキツでは, その代謝制御の鍵となる転写因子の探索や新規の代謝酵素遺伝子の単離に極めて有効な方法になることが期待される。現在, カンキツでは, プラットホームの異なる複数のマイクロアレイが開発されているが, カンキツでマイクロアレイ解析などのトランスクリプトーム (transcriptome) 解析のデータを集積してバイオインフォマティクス研究を進展させるためには, マイクロアレイのプラットフォームの共通化が重要な課題となる。今後, カンキツの分野において, 世界共通のマイクロアレイが開発されバイオインフォマティクス研究が進展することを期待したい。

## 引用文献

- Aleza, P. *et al.* (2009) Obtention and characterization of *Citrus clementina* Hort ex Tan 'Clemenules' haploid lines to establish the reference whole *Citrus* genome sequence. *BMC Plant Biology*. 9 : 110.
- Aubourg, S. *et al.* (2002) Genomic analysis of the terpenoid synthase (*AtTPS*) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*. 267 : 730 - 745.
- Azam, M. *et al.* (2013) Comparative analysis of flower volatiles from nine citrus at three blooming stages. *International Journal of Molecular Sciences*. 14 : 22346-22367.
- Chutia, M. *et al.* (2009) Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology*. 42 : 777-780.
- Dornelas, M. *et al.* (2007) A genomic approach to characterization of the *Citrus* terpene synthase gene family. *Genetics and Molecular Biology*. 30 : 832-840.

- Droby, S. *et al.* (2008) Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biology and Technology*. 49 : 386-396.
- Endo, T. *et al.* (2005) Ectopic expression of an FT homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) . *Transgenic Research*. 14 : 703-712.
- Endo, T. *et al.* (2009) Development of a *CiFT* Co-expression system for functional analysis of genes in citrus flowers and fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 78 : 74-83.
- Fujii, H. *et al.* (2003) Expressed sequence tags from citrus albedo at the initiation stage of rind peeling. *Bulletin of National Institute of Fruit Tree Science*. 2 : 127-143.
- Fujii, H. *et al.* (2007) Profiling ethylene-responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22K oligoarray. *Plant Science*. 173 : 340-348.
- Fujii, H. *et al.* (2008) Profiling gibberellin (GA3) - responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22K oligoarray. *Scientia Horticulturae*. 116 : 291-298.
- Goldberg, M. R. *et al.* (2008) A genome - wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics*. 9 : 318.
- Hisada, S. *et al.* (1996) Random sequencing of sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) cDNA library derived from young seeds. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 65 : 487-495.
- Hisada, S. *et al.* (1997) Expressed sequence tags of *Citrus* fruit during rapid cell development phase. *Journal of American Society for Horticultural Science*. 122 : 808-812.
- Hisada, S. *et al.* (1999) Refinement of cDNA clone expression analysis in random sequencing from the rapid cell development phase of citrus fruit. *Journal of Plant Physiology*. 155 : 699-705.
- International Citrus Genome Consortium.  
<<http://www.citrusgenome.ucr.edu>> 参照2015-11-09.
- Kita, M. *et al.* (2000) Changes in the levels of mRNAs for the putative cell growth - related genes in rind (albedo and flavedo) during citrus fruit development. *Plant Cell Physiology*. 19 : 582-587.
- Kotan, R. *et al.* (2007) Screening of antibacterial activities of twenty one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 62 : 507-513.

- Lücker, J. *et al.* (2002) Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) : cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *European Journal of Biochemistry*. 269 : 3160-3171.
- Moriguchi, T. *et al.* (1998) Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruit through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Gene*. 211 : 221-227.
- Omura, M. *et al.* (2003) Graphical genotype of citrus cultivars by co-dominant CAPS markers. *Plant & Animal genome XI Conference*. 2000 : 71-74.
- Rodríguez, A. *et al.* (2011) Terpene down-regulation in orange reveals the role of fruit aromas in mediating interactions with insect herbivores and pathogens. *Plant Physiology*. 156 : 793-802.
- Rodríguez, A. *et al.* (2014) Terpene down-regulation triggers defense responses in transgenic orange leading to resistance against fungal pathogens. *Plant Physiology*. 164 : 321-339.
- Forment, J. *et al.* (2005) Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology*. 57 : 375-391.
- Sawamura, M. (2000) Volatile components of essential oils of the *Citrus* genus. *Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry*. 4 : 131-164.
- Shimada, T. *et al.* (2003) Expressed sequence tags of ovary tissue cDNA library in *Citrus unshiu* Marc. *Plant Science*. 165 : 167-168.
- Shimada, T. *et al.* (2004) Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. *Plant Science*. 166 : 49-58.
- Shimada, T. *et al.* (2005a) Toward comprehensive expression profiling by microarray analysis in citrus : monitoring the expression profiles of 2213 genes during fruit development. *Plant Sci*. 168 : 1383-1385.
- Shimada, T. *et al.* (2005b) Isolation and characterization of (*E*)-beta-ocimene and 1,8. cineole synthases in *Citrus unshiu* Marc. *Plant Science*. 168 : 987-995.
- Shimada, T. *et al.* (2012) Isolation and characterization of germacrene A synthases gene in *Citrus unshiu* Marc. *Scientia Horticulturae*. 145 : 102-108.
- Shimada, T. *et al.* (2014a) Construction of a citrus framework genetic map anchored by 708 gene-based markers. *Tree Genetics and Genomes*. 10 :

1001-1013.

- Shimada, T. *et al.* (2014b) Characterization of three linalool synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. and analysis of linalool - mediated resistance against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Penicillium italicum* in citrus leaves and fruits. *Plant Science*. 10 : 1001-1013.
- Taniguchi, S. *et al.* (2014) Jasmonate induction of the monoterpene linalool confers resistance to rice bacterial blight and its biosynthesis is regulated by JAZ protein in rice. *Plant Cell and Environment*. 37 : 451-461.
- Vekiari, S. *et al.* (2002) Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 : 147-153.
- Wang, H. *et al.* (2012) Effect of Shatangju (*Citrus reticulata* Blanco) Essential Oil on Spore Germination and Mycelium Growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 15 : 715-723.
- Wong, D. *et al.* (2014) Annotation of gene function in citrus using gene expression information and co-expression networks. *BMC Plant Biology*. 14 : 186.
- Xu, Q. *et al.* (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*) . *Nature Genetics*. 45 : 59-66.
- Yamazaki, Y. *et al.* (2007) Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. *Journal of General Plant Pathology*. 73 : 168-179.
- Yasuda, M. *et al.* 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid - mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 20 : 1678-1692.
- Yuya, U. *et al.* (2015) Isolation of a sesquiterpene synthase expressing in specialized epithelial cells surrounding the secretory cavities in rough lemon (*Citrus jambhiri*) . *Journal of Plant Physiology*. 180 : 67-71.

