

シンビジウムの若い花序の高温による壊死を制御する分子機構

^{1*}三田悟・²逸見竜也・³今西俊介・²切岩祥和・²大野始

¹静岡大学遺伝子実験施設 〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836

²静岡大学農学部 〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836

³農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 〒514-2392 津市安濃町草生 360

Molecular mechanism regulating the high-temperature-induced necrosis of young inflorescences of *Cymbidium*

^{1*}Mita S., ²Henmi R., ³Imanishi S., ²Kiriwa Y. and ²Ohno H.

¹Institute for Genetic Research and Biotechnology, Shizuoka University, 836 Ohya, Shizuoka 422-8529, Japan

²Faculty of Agriculture, Shizuoka University, 836 Ohya, Shizuoka 422-8529, Japan

³National Institute of Vegetable and Tea Science, NARO, 360 Kusawa, Ano, Tsu 514-2392, Japan

Growing *Cymbidium* under high temperature conditions (25-30 °C) results in the necrosis of young inflorescences. An increase in the evolution of ethylene was correlated with the necrosis. To study the molecular aspects of high temperature-induced necrosis of *Cymbidium* floral buds, we isolated cDNA clones for proteins that are likely to be involved in the biosynthesis of ethylene during high temperature-induced necrosis of young inflorescences, namely, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase (*CyACS1*) and ACC oxidase (*CyACO1*). In addition, a cDNA (*CyNAC1*) encoding a NAC protein whose expression is modulated during high temperature treatment was isolated by differential display. High levels of expression of *CyACS1*, *CyACO1* and *CyNAC1* were observed in the necrotic inflorescences of wild type *Cymbidium* at high temperatures. Bud necrosis was not observed in the mericlone mutant (*nhn*: non high temperature-induced necrosis) of *Cymbidium*. Ethylene evolution was lower in *nhn* than in wild type, but application of exogenous ACC or ethephon to the young inflorescences of *nhn* restored the high temperature necrosis response. Expression of *CyACS1*, *CyACO1* and *CyNAC1* did not increase with high temperature treatment in the *nhn* mutant. Expression levels of *CyACS1*, *CyACO1* and *CyNAC1* in necrotic inflorescences of *nhn* treated with 5.0 mM ACC were much lower than in necrotic inflorescences of wild type at high temperatures, but *CyACS1* and *CyNAC1* were stimulated by ACC treatment. Overexpression of *CyNAC1* in tomato caused growth impediment compared with non-transgenic wild type tomato. These results suggest that ethylene is involved in high temperature-induced necrosis of young inflorescences of *Cymbidium* and that a NAC protein may be involved in the regulatory mechanisms of genes that are regulated during necrosis.

緒言

花蕾または花序のような若い生殖組織の分化は、成長にとって不適切な環境条件により影響を受け、たとえば花蕾の枯死だとか、または植物の栄養成長への復帰が観察される。こういった若い生殖組織の枯死は、いろいろな植物種、例えばチューリップ、ユリ、バラとグラジオラスにおいて報告されている。枯死は、高温、低温や弱光、ホルモンの合成・作用の状態の異変といった各種の要因に依存している。不適切な環境条件の下の花芽または花序の枯死は、このように植物種を超えて観察されてきたが、枯死を制御する分子機構についてはほとんど知見がない。

シンビジウムにおいては、若い花序の枯死は一種の壊死であり、25 を超える高温下で観察される (Ohno 1991a, 1991b)。高温の影響は花序の発達

段階に極めて依存しており、高温に対して感受性の高い花序の発達段階が明らかにされている (Ohno 1991a)。高温に対する感受性と花序の発達段階の間のこうした関係は、他の植物種における高温による枯死現象においても似たものが報告されている。シンビジウムにおいては、有糸分裂の様子、核 DNA 解析、花の他の特徴に基づき、高温ストレスによって花序が発育不全になるのは、減数分裂前の G1 段階であることが提唱されてきた。そして、連続高温条件の下では、花粉形成が減数分裂前の DNA 合成段階へ進まず、結果的に花序が発育不全になることが示唆された。減数分裂前の花芽が高温に非常に敏感であり、そして、減数分裂を経て成熟した花粉を形成し、正常に開花するためには 20 以下の低温であることが必要である (Ohno

1991a)。Ohno (1991a)が示したように、花粉母細胞の減数分裂の前期にいたった花蕾は高温により影響を受けず、正常に開花する。

植物ホルモンは広範囲にわたるストレスに対する植物の反応を制御する。花蕾の発達段階に関係なく、エセホン(エチレンの放出を促進する)はシンビジウムの花芽の枯死を引き起こす(Ohno 1991b)。チオ硫酸銀(STS)とジベレリンを処理することにより、高温ストレスによるシンビジウム花蕾の発達の阻害は見られない(Ohno 1991b)。しかし、STSの作用とジベレリンの作用の間には際立った違いがある。高温下でも、STS処理による若い花序の枯死の抑止効果が、その後のエセホン処理によっても影響を受けず観察されるのに対して、ジベレリンによる花蕾の枯死の抑止効果は、エセホン処理によって打ち消された。更に、STSで処理した若い花序は対照区より多くのエチレン生成を示したのに対し、ジベレリンで処理した若い花序は対照区より少ない量のエチレン生成を示した(Ohno 1991b)。これらの結果は、ジベレリンがエチレン合成を抑制する一方、STSはエチレンの作用を抑制することを示唆する。

エチレンは、種子の発芽、開花、器官脱離、老化、そして果実の成熟を含む種々の植物の成長や発達に影響を与える。一方、エチレンは、細胞死、傷害、病原菌の感染、冠水などの数多くのストレス応答に関与する(Abeles et al. 1992, Overmyer et al. 2003)。エチレン生合成経路は明らかにされており(Abeles et al. 1992, Kende 1993, Theologis 1992)、その経路において、重要な調節ステップは S-アデノシルメチオニンから 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)への転換であり、ACC合成酵素がそのステップを触媒する。ACC合成酵素の活性は、極めて厳密に制御されており、その酵素活性は密接にエチレン生合成レベルに対応する。ACCは、ACC酸化酵素によってエチレンに変わる(Prescott and John 1996)。ACC合成酵素とACC酸化酵素をコードする遺伝子は種々の植物において単離されてきた(Kende 1993, Theologis 1992)。これら二つの酵素は多重遺伝子族によりコードされる。

本研究では、シンビジウムの若い花序を高温で処理した時のエチレン生成レベルを調べた。更に、我々はシンビジウムの組織培養によって得られたメリクロン変異体(*nhn*, non-high-temperature-induced necrosis)が野生型では壊死をもたらす高温ストレスに対して耐性を示すことを明らかにするとともに、*nhn*変異体におけるエチレン生成レベルが野生型に比べて低いことを確認した。高温ストレスにより誘発される組織の壊死を制御する分子機構を理解するための第一歩として、我々はACC合成酵素とACC酸化酵素をコードするcDNAを単離し、高温下におけるシンビジウム花蕾におけるこれらの

遺伝子の発現レベルを解析した。更に、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法によって、高温による壊死が進行する時に発現レベルが上昇する遺伝子のcDNAを単離した。

材料と方法

植物材料

シンビジウム Ruby Eyes Golden Star' 野生型とそのメリクロン変異体(*nhn*, non-high-temperature-induced necrosis; 高温ストレスに対して耐性を示す)は農家から得たものを株分けにより繁殖し、用いた。*nhn*変異体の生態型は、その野生型と同じである。シンビジウム植物は5月から11月までの期間は屋外で、残りの期間は温室(5-25℃)で栽培した(Ohno 1991a)。高温処理は、植物を25-30℃の温室で栽培することによって行った。花茎の長さ、開花した花の数、開花率を調べた。*nhn*のACC(エチレン前駆体)処理は、ひとつの花序につき0.8mlの0.99mMまたは5.0mMのACC溶液(界面活性剤として0.05% Tween20を含む)を、実験開始時に直接、若い花序(花茎長、3.0-3.5cm)に1回スプレーすることによって行った。*nhn*のエセホン(エチレンを発生する薬剤)処理は、ひとつの花序につき0.8mlの0.035mM、0.35mMまたは1.8mMのエセホン溶液(0.05% Tween20含有)を、実験開始時に直接、若い花序に1回スプレーすることによって行った。対照実験にはTween 20を含む蒸留水を用いた。

エチレンの定量

個々の花序を20℃で2時間、15.5mlの試験管の中に置き、密封状態にした。試験管のヘッドスペースの1mLをプラスチック製の注射器で抜き取り、水素炎イオン化検出器と活性アルミナカラムが装備され、70℃に維持されたガスクロマトグラフ(モデル163; 日立、東京、日本)に注入した。

RNAの抽出

全RNAはフェノールとSDSを用いて少なくとも3つの花序から抽出し、RNAを塩化リチウムによって沈澱させることによって精製した。Poly(A)⁺ RNAは、Oligotex dT-30(宝酒造、京都、日本)を用いることにより、全RNAから分離した。

蛍光ディファレンシャルディスプレイ法

蛍光ディファレンシャルディスプレイは、Fluorescence Differential Display Kit(宝酒造、京都、日本)を用いて行った。健全な花蕾、部分的に壊死した花蕾(花蕾の先端だけ壊死したもの)、壊死した花蕾から全RNAを抽出した。cDNAの合成は300ngの全RNAから合成した。合成することができ

た cDNA のうち 10 分の 1 の量を用いて、任意の 10 塩基の上流プライマーと、cDNA の合成に用いたものと同じ蛍光標識下流プライマーによって PCR で増幅した。PCR の後、等量の電気泳動用バッファーを加えた。各々のサンプルの一部を 94 で 3 分間、過熱した後、7M の尿素と 1 × TBE (89mM Tris-HCL pH 8.0, 89mM のホウ酸、2mM EDTA) を含む 4% の Long Ranger gel system (宝酒造、京都、日本; BMA, Rockland, ME, USA) を用いて電気泳動によって蛍光標識された PCR 産物を分離した。電気泳動パターンを蛍光イメージアナライザーによって解析し、花蕾の壊死の過程で発現様式が変化する DNA バンドをゲルから抽出して、その後、DNA 塩基配列の決定を行った。

リアルタイム RT-PCR を用いた転写産物の定量

定量的リアルタイム PCR 解析はロシュ ダイアグノスティックス社 (Mannheim, ドイツ) の LightCycler システムを使用して行った。全ての PCR 反応は、LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I キット (ロシュ ダイアグノスティックス社) を用いて行った。PCR 条件は最初に鋳型 DNA を変性するために 95 に 10 分間置いたあと、95 の変性反応 15 秒、59-61 でアニーリングを 5 秒、72 の伸長反応を 10 秒、合計 45 サイクル行った。アニーリング温度は、遺伝子特異的プライマーの組み合わせにより変えた。各々の遺伝子のフォワードプライマー (F)、リバープライマー (R) の配列及びアニーリング温度は、以下の通りである: *CyACS1* (ACC 合成酵素)、5'-CTTCTTACTTCGATGGGTGG-3 (F)、5'-TCCTGAAAGTTAGCGACAGC-3 (R)、60 ; *CyACO1* (ACC 酸化酵素) 5'-CACGGATGCGGGAGGGATTA-3 (F)、5'-CTTCTTCTCCTCGCCTCTC-3 (R)、61 ; *CyNAC1* (NAC タンパク質) 5'-CCAACCATTCTTCAGCCAGCAAT-3 (F)、5'-TCTTTCTCCATCTAACCCATACGA-3 (R)、60 ; *Cy37* (対照遺伝子; シロイヌナズナ *Argonate* タンパク質と相同性を示す) 5'-GCAAGGTTTTATATGGAGCC-3 (F)、5'-TGCAAATCCAGCGAAATAGG-3 (R)、59 。

RT-PCR

部分的に壊死した花蕾から調製した全 RNA 4 µg を用いて以前、報告された方法 (Mita et al. 1998) によって、ACC 合成酵素と ACC 酸化酵素の一部をコードする cDNA 断片の単離を行った。

Rapid amplification of cDNA ends

RT-PCR 反応後、未決定のまま残された ACC 酸化酵素の 5' 末と 3' 末の塩基配列は以前、記述された方法 (Mita et al. 1999) により、rapid

amplification of cDNA ends 法 (RACE 法) により決定した。ACC 合成酵素の cDNA の 5' 末の塩基配列も RACE 法 (Mita et al. 1999) によって決定した。RACE 反応は、Marathon cDNA Amplification キット (Clontech Laboratories, パロアルト、CA, USA) を用いて実行した。

DNA 塩基配列解析

各々のクローン化された cDNA のヌクレオチド配列は SequiTherm EXCEL Long-Read DNA Sequencing キット-LC (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) を用い、ジデオキシ法により自動 DNA シーケンサー (model 4000; LI-COR, Lincoln, NE, USA) を用いて解析した。

トマトの形質転換

CyNAC1 の機能を調べるために、そのタンパク質コード領域をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの下流につないだ融合遺伝子を作成し、アグロバクテリウム EHA101 に導入した後、常法に従ってトマト (*Alisa craig*) を形質転換した。形質転換体の選抜はカナマイシンで行った。形質転換トマトは 1/2 ホーランド処方水耕栽培した。

結果

シンビジウムの花蕾の高温による壊死におけるエチレンの関与

野生型のシンビジウムを高温 (25 - 30) に移して育てた時、若い花茎の伸長は 3.5 ~ 4.0cm に達した後、止まり、開花しなかった (Table1)。花序の色は緑から黄色に変わり、そして茶色に変色した (Fig.1A)。高温ストレスは花序の先端の壊死を誘発し、その後、壊死は全体に広がっていった。野生型シンビジウムの若い花序の高温ストレスによる壊死の過程でエチレン生成が著しく高まった (Fig.1B)。それに対して、メリクロン変異体である *nhn* の若い花序では高温ストレスに反応した壊死が観察されなかった (Fig.1A, Table 1)。*nhn* 変異体の花茎は 52cm まで伸長し開花した (Table1)。花序の一部が壊死した野生型シンビジウムと壊死していない *nhn* 変異体の花序におけるエチレン生成を調べたところ、野生型に比べて *nhn* におけるエチレン生成量は極めて低かった (Fig.1C)。高温下で ACC 処理が *nhn* の花序の発達に及ぼす影響を調べたところ、5.0mM の高レベルの ACC で処理した場合、*nhn* の若い花序は壊死を起こし、花茎の伸

Type of plant	The number of inflorescences	Length of flower stalk (cm)	The number of florets flowered	Flowering (%)
Wild type	11	3.6±0.1	0	0
<i>nhn</i>	31	52±1.0	523	96.0±1.0

Table 1. 野生型と non-high-temperature-induced necrosis (*nhn* 変異体)の花蕾の発達と開花に及ぼす高温の影響。野生型シンビジウムと *nhn* の植物体は 25-30 で生育させた。データは平均値 ± 標準偏差で表した。

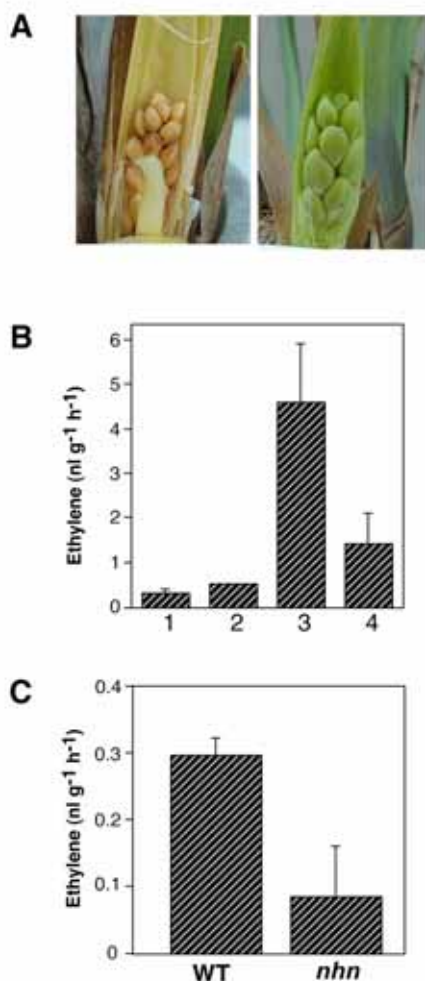


Fig.1 (A)高温(25-30)のもとで生育した野生型(左)と変異体(non-high-temperature-induced necrosis, *nhn*; 右)の若い花序。花蕾が見えるように包葉を除去した。(B)高温のもとで野生型の若い花序が壊死していく過程におけるエチレン生成の上昇。1,壊死していない若い花序、2,花序のうち先端だけが壊死したもの、3,壊死しつつあり黄色に変色した花序(花茎の伸長が止まってから5日経過したもの)、4,壊死して全体が茶色に変色した花序(花茎の伸長が止まってから10日経過したもの)(C)高温で生育した野生型(WT)と変異体(*nhn*)の花序におけるエチレン生成量。

長阻害が見られた (Fig.2)。0.35mM もしくは 1.8mM のエセホン処理も花茎の伸長を著しく阻害した(Fig.2)。これらの実験結果は、高温耐性変異体 *nhn* において、ACC をエチレンに変換する ACC 酸化酵素の働きと、より高いレベルのエチレンに対する応答能に欠陥がないことを示す。

野生型株と *nhn* における遺伝子発現

我々は、RT-PCR 法と RACE 法により ACC 合成酵素と ACC 酸化酵素のそれぞれの cDNA を単離した。野生型シンビジウムの若い花序における *CyACS1* と *CyACO1* の発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて調べた。これら二つの遺伝子発現レベルは、壊死していない花序及び、一部が壊死した花序(花序の先端だけ黄色になっているもの)の両方において極めて低かった。しかし、高温処理された結果、壊死しつつある花序においてはこれらの遺伝子発現は著しく高まった(Fig.3)。これらの結果は、高温ストレスにตอบสนองしたエチレン生成がシンビジウム野生型の若い花序の壊死に関与しているという仮説と合致するものである。*nhn* 変異体の若い花序は高温ストレスに対して耐性であり、壊死は起こらなかった (Fig.1A, Table1)。*nhn* 変異体におけるエチレン生成は野生型に比べて低かった (Fig.1C)。これらの結果と矛盾なく、*nhn* における *CyACS1* と *CyACO1* の遺伝子発現レベルは高温下での花序の発達の過程で低く維持されていた (Fig.3)。しかし、5.0mM の ACC を *nhn* の若い花序に与えると壊死が起こり、そして、*CyACS1* と *CyNAC1*(後述)の遺伝子発現は水で処理した対照区に比べて有意に高いレベルを示した。シロイヌナズナの argonaute タンパク質のホモログである *Cy37* の遺伝子の発現はいずれの組織、またはどの処理区においても、若干の変動はあったものの、ほぼ一定のレベルであった。

更に我々は、シンビジウムの花序から抽出した全 RNA を用いた蛍光ディファレンシャルディスプレイ法を行い、その結果、高温ストレスによる壊死の過程で発現が変動する遺伝子の cDNA(*CyNAC1*)を単離した。*CyNAC1* 遺伝子は 339 個のアミノ酸配

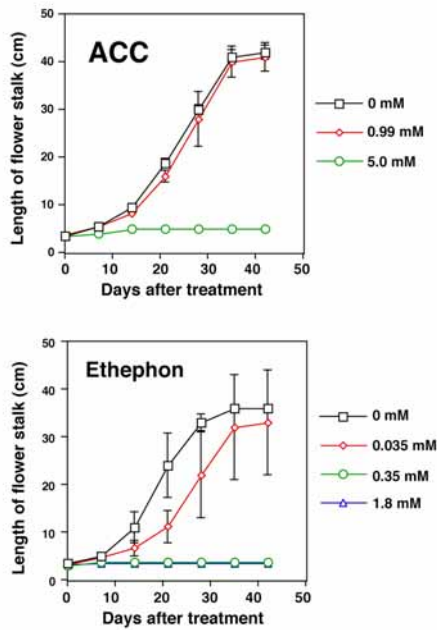


Fig.2 *nhn* 変異体の花茎の伸長に及ぼす1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)もしくはエセホンの影響。(上図) *nhn* の花茎の伸長に及ぼす ACC の影響。 *nhn* の若い花序(3.0-3.5cm)を0.99mMもしくは5.0mMのACCで処理した。ACCで処理した *nhn* 変異体を25-30 で生育させ、7日ごとに花茎の長さを測定した。(下図) *nhn* 変異体の花茎の伸長に及ぼすエセホンの影響。若い花序を0.035mM、0.35mM、1.8mMのエセホンで処理した後、25-30 で生育させ、7日ごとに花茎の長さを測定した。エラーバーは、平均値の標準偏差を示す。

列からなるタンパク質をコードし、植物に特異的なNAC遺伝子ファミリーに属するものであった(データ略)。CyNAC1タンパク質はアミノ酸レベルで他のNACドメインタンパク質であるAtNAP(Sablowski and Meyerowitz 1998)、ATAF2(Collinge and Boller 2001)、そしてPm74(Mita et al. 2006)とそれぞれ44.3%、41.2%、41.1%の相同性を示した。NACドメインに限れば、CyNAC1はAtNAPと75.3%、Pm74とは66.5%、ATAF2とは64.2%のより高い相同性を示した。NAC遺伝子ファミリーは他の遺伝子群の発現を調節する転写制御因子をコードする。野生型シンビジウムと *nhn* 変異体の双方における *CyNAC1* 遺伝子の発現を調べた。*CyNAC1* 遺伝子の発現レベルは野生型の壊死していない花序と一部が壊死した花序では低かった。しかし、高温ストレスによって誘導される花芽の壊死の過程で発現レベルが顕著に上昇した(Fig. 3)。一方、高温で育てた *nhn* の発達過程においては *CyNAC1* 遺伝子の発現は低く抑えられていた(Fig.3)。

考察

野生型に比べて *nhn* におけるエチレン生成量は

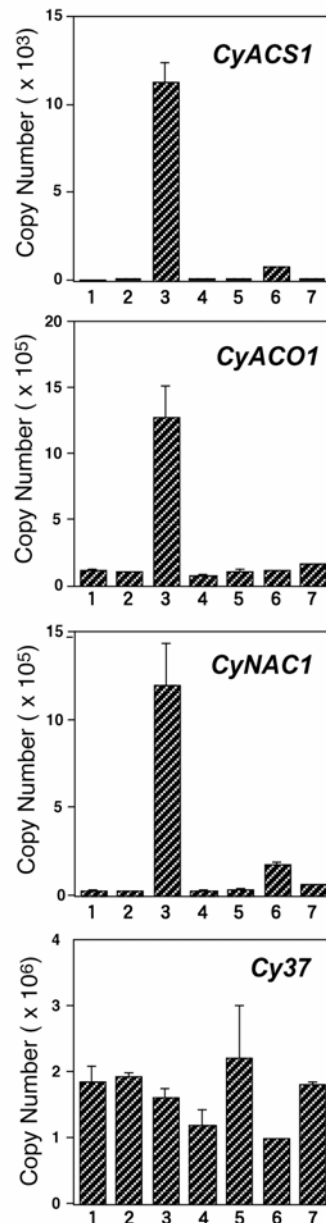


Fig.3 25-30 で育てた野生型及び *nhn* 変異体の若い花序における ACC 合成酵素(*CyACS1*)、ACC 酸化酵素(*CyACO1*)、及び NAC ドメインタンパク質(*CyNAC1*)の発現。1,壊死していない野生型(3.5-4.5cm)の花序、2,部分的に壊死した野生型(3.5-4.5cm、先端だけ壊死している)の花序、3,野生型の壊死しつつある花序(3.5-4.5cm、黄色)、4,壊死していない *nhn* 変異体(3.0cm-3.5cm)、5,壊死していない *nhn* 変異体(3.5cm-4.5cm)、6,ACC(5.0mM)で処理した結果、壊死した *nhn* 変異体の花序(黄色、3.5cm-4.5cm、ACC 処理後、8日経過したもの)、7,対照実験として水で処理した結果、壊死していない *nhn* 変異体の花序(3.5cm-4.5cm)。シロイヌナズナの argonaute タンパク質のホモログ遺伝子(*Cy37*)をコントロール遺伝子として用いた。

低く、また、*CyACS1* と *CyACO1* 遺伝子の発現レベルもまた、*nhn*変異体においては高温であるにも関わらず花序の発達過程において低く抑えられていた。エチレンの作用の阻害剤(STS)とエチレン

合成の阻害剤により、高温によるシンビジウム花序の発達の阻害が見られなくなる (Ohno 1991 b)。 *nhn* 変異体を高いレベルの ACC やエセホンで処理することにより、若い花序の発達が障害を受け、壊死した。これらの結果はエチレンが高温により誘導される花芽の壊死に関わること、及び、*CyACS1* 遺伝子と *CyACO1* 遺伝子が壊死の過程でのエチレン生成における鍵となる遺伝子であり、これらの遺伝子の発現が高温により誘導されることを強く示唆する。エチレンはストレスに関わるホルモンの一つであり、多くのストレス応答に関わることが知られている (Abeles et al. 1992)。しかし、現在、高温により誘導される壊死を制御する分子機構についての知見はまだ少ない。*nhn* 変異体は、*CyACS1* 遺伝子と *CyACO1* 遺伝子の発現を誘導する高温ストレスに対する感受性に欠陥があるのかもしれない。

我々は高温による壊死を制御する分子機構を調べるために、ディファレンシャルディスプレイによって、高温による壊死の過程で発現が制御される遺伝子を単離した。この遺伝子(*CyNAC1*)はNACドメインタンパク質をコードすると考えられた。*CyNAC1* 遺伝子は高温による壊死の過程で発現が顕著に誘導され、それに対し、*nhn* 変異体においてはこうした誘導が見られなかった。*CyNAC1* タンパク質はその構造から転写制御因子であると考えられるため、高温による壊死の過程で発現が制御される他の種々の遺伝子の発現制御メカニズムに関わるかも知れないし、あるいは、壊死に対してもっと直接的な役割を担っているのかも知れない。*CyNAC1* 遺伝子の機能を調べるための第一歩として、形質転換が容易なトマトを用い、アグロバクテリウムを介して *CyNAC1* 遺伝子を高レベルで発現させた形質転換トマトを作成した。*CyNAC1* タンパク質を過剰発現させた形質転換トマトは非形質転換トマト(野生型株)と比べて著しい生育障害を示し、ほとんど開花しなかった(データ略)。*CyNAC1* の発現を遺伝子工学的的手法により抑制することで高温下でも花蕾が壊死しないシンビジウムの分子育種が可能になるかも知れない。*CyNAC1* と構造が似ているシロイヌナズナの AtNAP は葉の老化過程で発現レベルが上昇し、老化を促進する (Guo and Gan, 2006)。高温による花序の壊死は多くの遺伝子の発現制御を伴う複雑なものでありそうだ。本研究は高温による植物組織の壊死の過程で誘導される遺伝子の単離を初めて報告するものである。

参考文献

Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in Plant Biology. Academic Press,

- San Diego, CA, pp, 26-221
- Collinge M and Boller T (2001) Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol* 46: 521-529
- Guo Y, Gan S (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J* 46: 601-612
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 283-307
- Mita S, Kawamura S, Yamawaki K, Nakamura K, Hyodo H (1998) Differential expression of genes involved in the biosynthesis and perception of ethylene during ripening of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell Physiol* 39: 1209-1217
- Mita S, Kirita C, Kato M, Hyodo H (1999) Expression of ACC synthase is enhanced earlier than that of ACC oxidase during fruit ripening of mume (*Prunus mume*). *Physiol Plant* 107: 319-328
- Mita S, Nagai Y, Asai T (2006) Isolation of cDNA clones corresponding to genes differentially expressed in pericarp of mume (*Prunus mume*) in response to ripening, ethylene and wounding signals. *Physiol Plant: Physiol Plant* 128: 531-545
- Ohno H (1991a) Microsporogenesis and flower bud blasting as affected by high temperature and gibberellic acid in *Cymbidium* (*Orchidaceae*). *J Japan Soc Hort Sci* 60: 149-157
- Ohno H (1991b) Participation of ethylene in flower bud blasting induced by high temperature in *Cymbidium* (*Orchidaceae*). *J Japan Soc Hort Sci* 60: 415-420
- Overmyer K, Brosche M, Kangasjarvi J (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in plant sci* 8: 335-342
- Prescott AG, John P (1996) Dioxygenases : Molecular structure and role in plant metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 245-271
- Sablowski RW, Meyerowitz EM (1998) A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell* 92: 93-103
- Theologis A (1992) One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70: 181-184