

花青素苷调控研究进展

樊荣辉^{1,2,3} 黄敏玲^{1,2,3*}¹福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; ²福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;³福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要 花青素苷是决定植物花色的主要色素。近年来, 随着分子生物学技术的发展及研究的深入, 花青素苷调控机理越来越清晰。该文主要论述了花青素苷生物合成、分子修饰、助色素、液泡pH值、金属离子、转录因子等调控机制, 以期为花色改良提供理论参考。

关键词 花青素苷; 生物合成; 分子修饰; 助色素; 液泡pH值; 金属离子; 转录调控

Progress in Regulation of Anthocyanins

Fan Ronghui^{1,2,3}, Huang Minling^{1,2,3*}¹Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China;²Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China;³Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China)

Abstract Anthocyanins are main determinants of plant flower colors. In recent years, with rapid development of molecular bio-technology and research, the regulation mechanism of anthocyanins has become increasingly clear. In order to provide theoretical reference for flower color improving, this review describes regulation mechanism about biosynthesis of anthocyanins, modification of anthocyanidins, co-pigments, vacuole pH value, metal ions and transcription factors.

Key words anthocyanidin; biosynthesis; molecular modification; co-pigments; vacuole pH value; metal ions; transcription regulation

花色是衡量观赏植物品质的重要质量指标之一, 花色的优劣直接关系到它的观赏价值和商业价值。此外, 花色还有吸引昆虫帮助授粉和抵御病虫害的作用。花青素苷(anthocyanins)是决定花色的主要色素, 能控制花的黄色、橘黄、红色、紫色和蓝色等颜色的形成^[1], 其代谢属于类黄酮化合物的分支途径。

近年来, 众多生物学者对花色的调控机理开展了广泛研究^[2]。研究表明, 花青素苷的颜色主要受以下

几个因素的调控: (1)花青素苷的生物合成及种类; (2)花青素苷分子修饰; (3)助色素; (4)金属离子协同作用; (5)液泡中pH值。另外, 转录因子的调控也会引起花色的改变。深入了解花青素苷的调控机理能够为利用现代生物学技术进行花色改良提供理论依据。本文对花青素苷调控的最新研究进展进行了综述。

1 花青素苷的生物合成

目前, 花青素苷生物合成途径已经研究得比

收稿日期: 2013-01-09 接受日期: 2013-02-22

福建省重大专项专题项目(批准号: 010NZ0003)和福建省农业科学院科技创新团队重点科研项目(批准号: CXTD2011-20)资助的课题

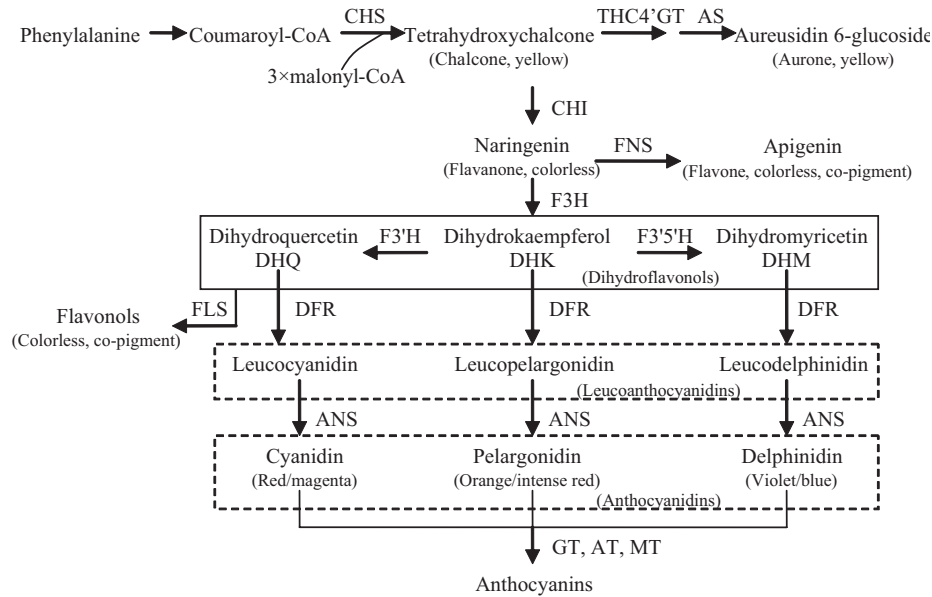
*通讯作者。Tel: 0591-87586106, E-mail: pudang12@yahoo.com.cn

Received: January 9, 2013 Accepted: February 22, 2013

This work was supported by the Science and Technology Major Project of Fujian Province (Grant No.2010NZ0003) and Technology Innovation by Fujian Academy of Agricultural Science (Grant No.CXTD2011)

*Corresponding author. Tel: +86-591-87586106, E-mail: pudang12@yahoo.com.cn

网络发表时间: 2013-04-11 17:03 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130411.1703.002.html>



CHS: 查耳酮合酶; CHI: 查耳酮异构酶; F3H: 黄烷酮-3-羟化酶; F3'H: 类黄酮-3'-羟化酶; F3'5'H: 类黄酮-3',5'-羟化酶; DFR: 二氢黄酮醇-4-还原酶; ANS: 花青素合成酶; FLS: 黄酮醇合成酶; FNS: 黄酮合成酶; THC4'GT: 四羟基查耳酮4'-酰基转移酶; AS: 橙酮合成酶; GT: 葡萄糖基转移酶; AT: 酰基转移酶; MT: 甲基转移酶。

CHS: chalcone synthase; CHI: chalcone isomerase; F3H: flavanone 3-hydroxylase; F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H: flavonoid 3',5'-hydroxylase; DFR: dihydroflavonol 4-reductase; ANS: anthocyanidin synthase; FLS: flavonol synthase; FNS: flavone synthase; THC4'GT: tetrahydroxychalcone 4'-glucosyltransferase; AS: aureusidin synthase; GT: glucosyltransferase; AT: acyltransferase; MT: methyltransferase.

图1 花青素苷生物合成途径

Fig.1 The biosynthesis of anthocyanins

较透彻(图1)。在该生物合成途径中,查耳酮合酶(chalcone synthase, CHS)是花青素苷生物合成的第一个限制酶因子,它催化1分子的香豆酰(coumaroyl-CoA)和3分子的丙二酰CoA(malonyl-CoA)合成四羟基查耳酮(tetrahydroxychalcone, THC)。在查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)催化下,四羟基查耳酮转化成柚皮素(naringenin)。柚皮素是类黄酮物质合成的直接前体。

花色素苷生物合成途径在F3H、F3'H和F3'5'H三个关键酶作用下,形成3个分支。其中,F3'H和F3'5'H能够决定花青素B环羟基化类型,是决定花青素颜色的两个关键酶,在目前花色基因工程研究中应用非常广泛^[3]。在F3H的催化下,柚皮素生成香橙素(dihydrokaempferol, DHK),而F3'H和F3'5'H使香橙素羟基化,分别形成二氢栎皮酮(dihydroquercetin, DHQ)和二氢杨梅黄酮(dihydromyricetin, DHM)。二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)选择性地催化3种二氢黄酮醇DHK、DHQ和DHM,形成相应的花青素苷。因此,3个羟化酶F3H、F3'H、F3'5'H活性的有无、强弱及DFR的底物催化

选择性是决定花色的主要因素。

1.1 生物合成途径中的色素

在诸多影响花色形成的因素中,花瓣中色素的种类及含量是决定植物花色的最重要因素^[4]。花青素苷是花色形成的重要色素类群^[1]。经过花青素苷生物途径合成的天竺葵色素苷、矢车菊色素苷、飞燕草色素苷以及黄酮、二氢黄酮和查耳酮等是形成有色花的主要色素物质。其中,天竺葵色素苷形成橙色或砖红色,矢车菊色素苷形成红色或品红色,飞燕草色素苷形成紫色或蓝色,黄酮、二氢黄酮和查耳酮形成黄色。很多重要的观赏植物,像月季(*Rosa hybrida*)、菊花(*Chrysanthemum morifolium*)和康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)等,因不能生成飞燕草色素而缺少紫色和蓝色品种。

1.2 花青素苷分子修饰

花青素因为结构上带有裸露羟基,在生理pH值条件下不稳定。类黄酮3-O-糖基转移酶(flavonoid 3-O-glucosyl transferase, 3GT)将UDP-glucose上的葡萄糖转移到花青素分子的C3羟基上,形成显色的花青素苷。花青素苷合成后会进行分子修饰,这是花

色素结构多样化和稳定性的基础,在不同的物种中呈现多样性,其修饰类型包括糖基化、酰基化和甲基化。糖基转移酶、酰基转移酶、甲基转移酶等修饰酶在花青素苷的特定位置进行分子修饰,从而引起花色的改变。花青素苷的糖基化和甲基化使颜色更红,而花青素苷的酰基化改变波长吸收最大值,使颜色更蓝,并且酰化的花青素苷分子间的堆积,能使形成的蓝色非常稳定^[5]。例如,在龙胆(*Gentiana makinoi*)花青素苷中,龙胆翠雀花素(gentiodelphin)的3'-端显示出分子堆积,从而形成稳定的蓝色花^[6]。目前,已经明确的花青素苷分子结构达上百种,它们中的大部分都是以花青素3-糖苷作为基本结构^[5,7]。花青素苷分子修饰对特定的物质结构具有特异性,而对底物很少有特异性。

1.3 助色素

助色素主要是黄酮(flavones)或黄酮醇(flavonols)类物质,起辅助着色作用。它们本身几乎无色,与花青素苷结合,形成花青素苷-助色素复合物,从而增强花色、使花色更加稳定^[8-9]。这种辅助着色作用有时还会有一个或多个金属离子的参与^[7]。Yabuza等^[10]研究发现,玉蝉花(*Iris ensata*)在开花过程中,随着花的衰老,蓝紫色品种的花褪色程度比紫红色品种轻,这主要是由于蓝紫色品种的花中含有助色素异牡荆碱(isovitexin),提高了花青素苷的稳定性。Malien-Aubert等^[11]在花青素苷的提取物中加入助色素黄酮醇,使花青素苷的颜色加深并保持稳定。近几年,应用助色素辅助着色原理进行花色基因工程改良取得了一些进展。Nielsen等^[12]将反义黄酮醇合成酶基因(flavonol synthase, *FLS*)导入洋桔梗(*Eustoma grandiflorum* Grise.)中,使黄酮醇的合成受阻。检测结果表明,花青素苷的种类及含量没有改变,助色素黄酮醇的含量显著降低,最终导致洋桔梗的花瓣颜色变浅,由紫色变为品红色。

2 花青素苷的运输机制及液泡pH值调控

花青素苷在细胞质中合成,在液泡中积累。花青素苷在液泡中的积累对花色的形成和改变具有重要作用。花青素苷分子运输到液泡中有三种方式:(1)以膜为介质;(2)以囊泡为介质;(3)以转运子为介质。这三种途径不是专一性的,主要依赖于植物的种类、器官类型及植物生长模式。在以膜为介质的运输途径中,谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-

transferase, GST)和抗多药蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP3)是起关键作用的两个酶。其中, GST在多种植物中参与花青素苷分子的运输,而MRP3目前只发现在玉米中参与花青素苷分子的运输^[13]。花青素苷分子也可以直接通过细胞膜导出的囊泡运输到贮藏液泡中,这个过程不依赖GST和MRP3的活动。这种模式在对拟南芥的研究中得到证实^[14]。在以转运子为介质的运输途径中, MATE(multidrug and toxic compound extrusion)转运子是常见的花青素苷/H⁺逆向转运子,它可以携带一些花青素苷运输到液泡中。在蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)和拟南芥(*A. thaliana*)中, MATE转运子能携带表儿茶素3'-O-葡萄糖苷(epicatechin 3'-O-glucoside)进行运输^[15]。在葡萄(*Vitis vinifera*)中, MATE转运子(AM1和AM3)可以携带酰化的花青素苷进行运输^[16]。目前为止,这三种途径运输到液泡中的机理还不是十分透彻。但可以确定,花青素苷分子运输到液泡对于花色的改变至关重要,且蓝色花会比红色花积累更多的花青素苷分子,这可能是由于红色花的运输系统与大量花青素苷分子的积累不兼容有关^[17]。

液泡的pH值是影响花青素苷颜色的重要因素之一。较低的pH值使花色呈红色,中性pH值使花色呈蓝色。以婆婆纳属(*Veronica persica* Poiret)三种不同颜色的花瓣(紫色、紫罗兰和蓝色)为材料进行研究,结果表明,这三种花瓣含有相同的飞燕草色素苷(形成蓝色花的主要色素),但液泡中具有不同的pH值,分别为5、6、7^[2]。紫花牵牛(*Ipomoea tricolor*)中,紫红色的花蕾在开放后变成蓝色,花冠表皮细胞的pH值从6.6上升到7.7^[18]。目前,已经从紫花牵牛中克隆到一个控制液泡pH值的Pr基因。Pr是一个定位在液泡膜上的Na⁺/H⁺离子泵蛋白,其作用是泵出液泡中的质子,使液泡碱性化。这个基因的突变致使紫花牵牛液泡pH值在花开放过程中不再上升,导致开放后应该是蓝色的花冠仍然保持紫色^[19]。

3 金属离子在花色中的作用

一些金属离子如Fe³⁺、Al³⁺等,在蓝色花的形成中发挥了重要作用。在紫色郁金香(*Tulipa gesneriana* cv. Murasakizuisho)中,花瓣虽然积累了大量的飞燕草色素苷,但没有完全成为蓝色,只有花被末端为蓝色。检测结果表明,紫色部分和蓝色部分含

有相同的飞燕草色素苷和黄酮醇,也含有相同的pH值。不同的是,在蓝色花被中,金属离子 Fe^{3+} 的浓度是紫色部分的25倍^[20]。离体研究中发现,飞燕草色素苷、黄酮醇和 Fe^{3+} 的富集,可使紫色郁金香细胞重新生成蓝色^[20]。这说明 Fe^{3+} 的富集对花色的改变具有重要作用。2009年, Momonoi等^[21]在紫色郁金香中发现,液泡膜上一个金属离子运输基因*TgVlt1*能影响蓝色花的形成,*TgVlt1*基因的瞬时表达可以使紫色郁金香的一些细胞变为蓝色。2010年, Shoji等^[22]在紫色郁金香中发现,金属离子贮藏蛋白(铁蛋白基因*TgFer1*)在郁金香的紫色部分表达,而在花被末端蓝色部分表达受到抑制。通过同时对*TgVlt1*过表达和*TgFer1* RNAi抑制,能够使转基因郁金香中紫色部分完全变为深蓝色。因此得出结论,应用基因工程技术改变金属离子相关蛋白的表达,能够达到花色改良的目的。

绣球花(*Hydrangea macrophylla*)花瓣颜色的改变依赖于对 Al^{3+} 的利用^[23]。Ito等^[23]从绣球花蓝色和红色花瓣中提取有色原生质体以鉴定其化学组成成分,结果表明,蓝色细胞中含有13分子5-酰基奎尼酸(助色素)和1.2分子 Al^{3+} ,而在红色细胞中含有3.6分子5-酰基奎尼酸和0.03分子 Al^{3+} 。离体实验研究表明,在pH4.0含有10 mmol/L的飞燕草色素中添加22.5分子5-酰基奎尼酸和1分子 Al^{3+} ,能使细胞呈蓝色;在pH3.0含有10 mmol/L的飞燕草色素中添加21.5分子5-酰基奎尼酸和0.03分子 Al^{3+} ,能使细胞呈红色。

以上研究结果表明, Fe^{3+} 和 Al^{3+} 有使花青素苷变为蓝色的作用。金属离子从根部传输到地上部分的研究正在快速发展^[24]。然而在转基因植物中应用金属离子使花色成为蓝色还具有一定程度的挑战性,因为重金属离子的过度应用对植物是有害的。

4 转录因子调控及应用

4.1 转录因子调控

目前,研究较多的类黄酮生物合成基因转录调控因子主要包括两大类: bHLH(basic helix loop helix)类转录因子和R2R3-MYB类转录因子。另外,WD40蛋白(MBW复合体)也能激活类黄酮生物合成途径基因的转录。bHLH类转录因子和WD40蛋白的表达是普遍存在的,而特定的MYB类转录因子只能调控特定的生物合成途径^[25]。在类黄酮生物合成基因转录的调控区, bHLH和R2R3-MYB通过结合在

特定的转座子上起作用,WD40蛋白则促进蛋白之间的相互作用。花青素苷生物合成的基本调控机理是保守的,但在不同的物种中又略有所不同。

在花青素苷的转录调控中, bHLH和R2R3-MYB常常是共同起作用, R2B2-MYB在结合和活化转录中起关键作用, bHLH一方面使R2R3-MYB蛋白结构稳定并促使其活化转录,另一方面在一定程度上决定R2R3-MYB的组织特异性^[26-27]。在三花龙胆(*Gentiana triflora*)中, *GtMYB3*和*GtbHLH1*基因的共表达促进了三花龙胆花青素苷生物合成基因的转录。而从中筛选出的一个白色品种,由于转座子插入*GtMYB3*基因,致使*GtMYB3*基因不能表达,导致花色不能正常形成^[28]。从亚洲百合(*Lilium* “Asiatic hybrids”)中分离的两个R2R3-MYB基因(*LhMyb6*和*LhMyb12*),其蛋白与一个bHLH(*LhbHLH2*)相互作用。*LhMyb6*与*LhbHLH2*或者*LhMyb12*与*LhbHLH2*的瞬间共表达能活化百合鳞茎的整个花青素苷代谢途径^[29]。也有一些R2R3-MYB类因子不需要bHLH类因子的辅助,单独调控花青素苷基因的转录。草莓(*Fragaria × ananassa*) MYB10的过表达使草莓的叶、根、果实、柱头的花青素苷水平提高^[30]。苹果(*Malus × domestica*) MYB10上游调控区的重组能激活花青素苷代谢,产生红色叶片,并且果实更加鲜艳。研究证实,这种重组产生了一个自动调控位点,并且这个自动调控位点有利于提高MYB10的转录水平,促进花青素苷的积累^[31]。

除了bHLH和R2R3-MYB类转录因子外,还有很多其它类型的转录因子能够调控花青素苷的代谢。例如, R3-MYB类因子MYBL2能抑制花青素苷生物合成酶系的转录,从而影响了类黄酮生物合成。在拟南芥(*A. thaliana*)中, MYBL2的缺失增强了转录水平,导致幼苗花青素苷的显著增加^[32-33]。另外,植物特异转录因子NAC也能调控花青素苷的生物合成。在强光条件下,拟南芥ANAC078通过活化花青素苷生物合成相关基因来诱导花青素苷的积累^[34]。

4.2 转录因子基因工程应用

近年来,随着分子生物技术的飞速发展,应用转录因子进行花色基因工程改良成为研究的热点。研究中,一个转录因子可以同时改变植物多个性状^[35],其中包括花色改良^[36]。Ben Zvi等^[37]将拟南芥*PAP1*(production of anthocyanin pigment 1,属于AtMYB75)转入矮牵牛中,使*PAP1*过表达。结果表

明, 转基因植株的花青素苷生物合成代谢被激活, 花色加深, 并且花香成分挥发性苯环型化合物含量增加了10倍。Laitinen等^[38]将非洲菊*R2R3-MYB10*过表达, 转基因非洲菊中花青素苷的积累增加, 花色加深; 并且色素着色类型也改变, 叶柄和花茎变为浅褐色。分析结果表明, *R2R3-MYB10*过表达不仅激活了花青素苷生物合成中*PAL*、*C4H*、*CHS*、*F3H*、*F3'H*的表达水平, 同时也激活了涉及花青素苷转运的*GST*基因的转录和丝氨酸羧肽酶类基因(*serine carboxypeptidase-like gene*)的转录。

然而, 应用转录因子进行花色基因工程改良也会遇到一些问题。如拟南芥*PAP1*转入矮牵牛(*P. hybrida*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)中, 均能激活花青素苷生物合成代谢, 但在苜蓿(*Medicago truncatula*)中的异源表达却不能激活花青素苷生物合成代谢; 而其同源性很近的拟南芥相关基因*LAPI*(legume anthocyanin production 1, 属于*R2R3-MYB*类型)在苜蓿中的异源表达, 可以提高类黄酮生物合成途径中两个基因(*MATE-like antiporter*和*ABC transporter*)的转录水平, 从而诱导花青素苷的积累^[39]。产生这种问题的原因还不是很清楚, 这可能与转录因子的激活强度及转录因子调控靶基因的作用方式不同有关^[36]。

5 存在问题及展望

花青素苷合成途径是目前研究相对深入的次级代谢途径。除与花青素苷衍生物合成有关的葡糖基转移酶和酰基转移酶外, 绝大多数相关酶已经被研究。这些相关酶基因的分离为花青素苷结构和花色基因工程的改良奠定了分子基础。但也存在一些问题需要继续探讨, 如花青素苷转运到液泡中的过程以及这些物质的修饰位点还需要进一步深入研究。

通过导入异源花色生物合成相关酶基因(例如*F3'H*、*F3'5'H*)进行花色基因工程改良, 已经研究得比较深入并有了一些成功的应用。研究发现, *F3'H*和*F3'5'H*基因是花色改良的焦点基因。但是, 与液泡pH值调控、金属离子转运相关基因的利用的研究几乎还是空白。这可能是由于液泡pH值调控、金属离子转运是由多个基因共同起作用, 在特定物种中同时调控多个基因的表达比较困难。另外, 由于花青素苷的降解和消失, 一些植物的花瓣在生长过程中褪色或失去颜色^[40], 通过基因工程途径克服这一问题可能是将来花色调控研究的另一重要方向。

花青素苷代谢途径中涉及的一些酶有可能以大分子复合体形式(代谢区室)形成代谢通路并在花青素苷生物合成途径中起作用^[41]。有研究表明, 大分子复合体利用细胞色素P450被传送到内质网中^[41]。目前, 这一机理尚需要更多的实验数据去证明。如果大分子复合物对花青素苷的合成是必须的, 那么异源基因合成酶与内源大分子复合物就是兼容的。深入研究大分子复合体, 也可能成为花色改良的一个重要策略。

参考文献 (References)

- 1 白新祥, 胡可, 戴思兰, 王亮生. 不同花色菊花品种花色色素成分的初步分析. 北京林业大学学报(Bai Xinxiang, Hu Ke, Dai Silan, Wang Liangsheng. Components of flower pigments in the petals of different color *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Cultivars. Journal of Beijing Forestry University) 2006; 28(5): 84-9.
- 2 Mori M, Kondo T, Yoshida K. Anthocyanin components and mechanism for color development in blue Veronica flower. Biosci Biotechnol Biochem 2009; 73(10): 2329-31.
- 3 Tanaka Y. Flower colour and cytochromes P450. Phytochem Rev 2006; 5: 283-91.
- 4 赵云鹏, 陈发棣, 郭维明. 观赏植物花色基因工程研究进展. 植物学通报(Zhao Yunpeng, Chen Fadi, Guo Weiming. Advances in genetic engineering of flower color of ornamental plants. Chinese Bulletin of Botany) 2003; 20(1): 52-8.
- 5 Honda T, Saito N. Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower colour pigment. Heterocycles 2002; 56: 633-92.
- 6 Yoshida K, Toyama Y, Kameda K, Kondo T. Contribution of each caffeoyl residue of the pigment molecules of gentiodelphin to blue color development. Phytochemistry 2000; 54: 85-92.
- 7 Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 2000; 55: 481-504.
- 8 Aida R, Yoshida K, Kondo T, Kishimoto S, Shibata M. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. Plant Sci 2000; 160(1): 49-56.
- 9 Bloor SJ. Novel pigments and copigmentation in the blue Marguerite daisy. Phytochemistry 1999; 8: 1395-9.
- 10 Yabuya T, Nakamura M, Iwashina T, Yamaguchi M, Takehara T. Anthocyanin-flavone Copigmentation in bluish purple flowers of Japanese garden iris (*Iris ensata* Thunb). Euphytica 1997; 98(3): 163-7.
- 11 Malien-Aubert C, Dangles O, Amiot MJ. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. J Agric Food Chem 2001; 49(1): 170-6.
- 12 Nielsen K, Deroules SC, Markham KR, Bradley MJ, Podivinsky E, Manson D. Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in lisianthus. Mol Breeding 2002; 9(4): 217-29.
- 13 Goodman CD, Casati P, Walbot V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. Plant Cell 2004; 16(7): 1812-26.

- 14 Poustka F, Irani NG, Feller A, Lu Y, Pourcel L, Frame K, *et al.* A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to vacuole protein sorting route in *Arabidopsis* and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant Physiol* 2007; 145(4): 1323-35.
- 15 Zhao J, Dixon RA. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-Glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009; 21(8): 2323-40.
- 16 Gomez C, Terrier N, Torregrosa L, Vialet S, Fournier-Level A, Verriès C, *et al.* Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant Physiol* 2009; 150(1): 402-15.
- 17 Tanaka Y, Brugliera F, Kalc G, Senior M, Dyson B, Nakamura N, *et al.* Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: Practical perspectives. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74(9): 1760-9.
- 18 Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Yamaguchi T, Saito N, Iida S. Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* 2000; 407(6804): 581-2.
- 19 Yamaguchi T, Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Saito N, Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, *et al.* Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol* 2001; 42(5): 451-61.
- 20 Shoji K, Miki N, Nakajima N, Monomoi K, Kato C, Yoshida K. Perianth bottom-specific blue color development in tulip cv. Murasakizuisho requires ferric ions. *Plant Cell Physiol* 2007; 48(2): 243-51.
- 21 Momonoi K, Yoshida K, Mano S, Takahashi H, Nakamori C, Shoji K, *et al.* A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant J* 2009; 59(3): 437-47.
- 22 Shoji K, Momonoi K, Tsuji T. Alternative expression of vacuolar iron transporter and ferritin genes leads to blue/purple coloration of flowers in tulip cv. Murasakizuisho. *Plant Cell Physiol* 2010; 51(2): 215-24.
- 23 Ito D, Shinkai Y, Kato Y, Kondo T, Yoshida K. Chemical studies on different color development in blue- and red-colored sepal cells of *Hydrangea macrophylla*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73(5): 1054-9.
- 24 Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, Inoue H, Tsukamoto T, Takahashi M, *et al.* Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *Plant J* 2010; 62(3): 379-90.
- 25 Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* 2005; 10(5): 236-42.
- 26 Hernandez JM, Heine GF, Irani NG, Feller A, Kim MG, Matulnik T, *et al.* Different mechanisms participate in the R-dependent activity of the R2R3 MYB transcription factor C1. *J Biol Chem* 2004; 279(46): 48205-13.
- 27 Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* 2006; 57: 761-80.
- 28 Nakatsuka T, Haruta KS, Pitaksuthepong C, Abe Y, Kakizaki Y, Yamamoto K, *et al.* Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers. *Plant Cell Physiol* 2008; 49(12): 1818-29.
- 29 Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, Masuda K. Two R2R3-MYB genes, homologs of petunia AN2, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of asiatic Hybrid Lily. *Plant Cell Physiol* 2010; 51(3): 463-74.
- 30 Lin-Wang K, Bolitho KGrafton K, Kortstee A, Karunairatnam S, McGhie TK, *et al.* An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biol* 2010; 10: 50.
- 31 Espley RV, Brendolise C, Chagné D, Kutty-Amma S, Green S, Volz R, *et al.* Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. *Plant Cell* 2009; 21(1): 168-83.
- 32 Dubos C, Gourrierc JL, Baudry A, Huet G, Lanet E, Debeaujon I, *et al.* MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2008; 55(6): 940-53.
- 33 Matsui K, Umemura Y, Ohme-Takagi M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 2008; 55(6): 954-67.
- 34 Morishita T, Kojima Y, Maruta T, Nishizawa-Yokoi A, Yabuta Y, Shigeoka S. Arabidopsis NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoid biosynthesis under high-light. *Plant Cell Physiol* 2009; 50(12): 2210-22.
- 35 Cronk QC. Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nature Rev Genet* 2001; 2(8): 607-19.
- 36 Schwinn K, Venail J, Shang YJ, Mackay S, Alm V, Butelli E, *et al.* A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell* 2006; 18(4): 831-51.
- 37 Ben Zvi MM, Negre-Zakharov F, Masci T, Ovadis M, Shklarman E, Ben-Meir H, *et al.* Interlinking showy traits: Co-engineering of scent and colour biosynthesis in flowers. *Plant Biotechnol J* 2008; 6(4): 403-15.
- 38 Laitinen RAE, Ainasoja M, Broholm SK, Teeri TH, Elomaa P. Identification of target genes for a MYB-type anthocyanin regulator in *Gerbera hybrida*. *J Exp Bot* 2008; 59(13): 3691-703.
- 39 Peel GJ, Pang Y, Modolo LV, Dixon RA. The LAPI MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago*. *Plant J* 2009; 59(1): 136-49.
- 40 Oren-Shamir M. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Sci* 2009; 177(4): 310-6.
- 41 Winkel BS. Metabolic channeling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55: 85-107.