植物学通报 2005, **22** (3): 284~291
Chinese Bulletin of Botany

特 邀 综 述

反义 RNA 技术在花色育种中的应用①

白新祥　戴思兰②

(北京林业大学园林学院　北京　100083)

摘 要　反义RNA技术是用反义RNA链去抑制靶基因的活性, 从而达到对目的基因调控的一项分子生物学技术。该项技术应用于观赏植物的花色育种已有16年的历史并且取得了一定的成就。到目前为止, 已经利用该技术对14种花卉花色形成过程中的3大类基因进行了正义和反义导入, 获得了花色改变的转基因植株。本文简要回顾了反义RNA技术的产生与发展, 并在介绍花色形成的分子生物学的基础上, 综述了国际园艺育种中利用反义RNA技术调控花色基因表达的研究进展, 以期为花色改良的分子育种提供参考资料。

关键词　花色, 反义RNA, 花色素苷, 观赏植物

Application of Antisense RNA Technology in Production of Color-altered Flowers

BAI Xin-Xiang　DAI Si-Lan②

(*College of Landscape Architeture, Beijing Forestry University*, Beijing 100083)

Abstract　Antisense RNA molecules deactivates target gene by binding to the sense strand. This allowed the application to the molecular alteration of flower color. To date, 3 kinds of genes have been transformed into 14 cultivars for this purpose and transgenic plants with color-altered flowers have been obtained. This paper briefly reviews the progress of antisense RNA technology and its use in flower color improvement.

Key words　Flower color, Antisense RNA, Anthocyanin, Ornamental plant

近20年来, 随着改革开放的深入和人民生活水平的提高, 我国的花卉业得到了迅速的发展。但是, 目前存在的一个最大的问题就是我们的花卉企业拥有自主知识产权的花卉品种很少, 一些大宗花卉的生产只能靠引进国外品种。这样虽然在短期内有一定的效益, 但却长期受制于人。造成这种被动局面的主要原因之一就是我们的花卉育种工作相对滞后(李惠芬和李倩中, 1999)。基因工程自20世纪80年代诞生以来, 以其育种周期短、效率高、培育植物定向性强和可跨物种进行遗传物质交流等优点成为花卉育种的一种重要手段而得到广泛应用(白新祥和戴思兰, 2004)。花色是花卉的一个主要的观赏性状, 近年来成为花卉分子育种的一个热点

①教育部振兴行动计划项目和北京林业大学研究生培养基金项目资助。
②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: silandai@sina.com.cn
收稿日期: 2004-06-24　接受日期: 2005-01-16　责任编辑: 于昕

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-101

(Forkmann, 1991; 包满珠, 1997)。利用转基因技术进行花色改良屡见成功报道, 尤其是反义RNA技术在花色分子育种上的应用已有十多年历史, 并取得了一定的成功(van der Krol *et al.*, 1988)。本文对反义RNA技术在观赏植物花色育种上的应用现状进行了综述, 希望能为运用本项技术解决目前花色育种中的难题提供参考。

1 反义RNA技术的产生与发展

反义RNA(antisense RNA)是指一些与特定RNA(多为mRNA)或DNA互补的小分子量的可扩散DNA转录物, 它们通过特异性的碱基互补方式控制基因的表达和参与基因表达的调控(张惠展, 1990)。反义RNA最早是Kawaji等(1979)在研究大肠杆菌(*Escherichia coli*)外膜蛋白基因表达时发现。Tomizawa和Itoh(1981)报道了反义RNA在大肠杆菌的Col E1质粒DNA复制中的调节作用。Simons和 Kleckner(1983)进一步证实反义RNA在大肠杆菌质粒复制中具有识别和调节的功能。由此反义RNA技术研究得到重视。早期的研究多集中于原核生物, 比如在转座子Tn10、λ-噬菌体和大肠杆菌基因组均发现有反义RNA存在。直到Ecker和Davis (1986)发现真核生物中自然存在反义系统以后, 其作用机理的研究引起了人们的极大兴趣。一般认为, 反义RNA通过与靶基因进行碱基配对的方式参与有关基因的表达调控(Patzel and Sczakiel, 2000)。主要的作用方式是在DNA的复制、转录和翻译3个阶段进行调控(石东乔和陈正华, 2001)。特别是自Izant和Weintraub (1984)首次证实人工构建的反义寡核苷酸在真核生物中具有生物学效应以来, 反义技术在真核生物中的研究得到迅速发展(Izant and Weintraub, 1985; Ecker and Davis, 1986)。随着反义RNA的研究逐步深入形成了反义技术, 这为人为控制基因表达提供了一种更为直接有效的方法(Park *et al.*, 2002; Raponi and Arndt, 2002)。

目前, 反义RNA技术已成为反义技术中使用的主要方法之一, 渗透到反向遗传学的各个领域, 诸如抗病因子、反向筛选标记基因、农艺品质改良和次生代谢途径的调控等研究。微注射的反义RNA及天然的或构建的反义基因转录物均有可能对目的基因专一性地起抑制作用(宋俊歧等, 1997)。

2 花色形成的分子生物学

采用反义RNA技术进行花色分子育种的研究, 依赖于对花色形成分子生物学研究的突破性进展。花色形成是指植物营养生长发育停止后, 进入生殖生长阶段, 花器官发育过程中合成一系列的色素化合物而使花朵显现出一定的颜色。花色的分子生物学研究是以黄酮类化合物的生物合成途径的解析为突破口的, 经过多年的研究已取得了丰硕的成果(Harborne, 1994; Bohm, 1998; Wang *et al.*, 2001; Williams and Grayer, 2004)。在过去的50年里, 人们对该类化合物在遗传、生化和分子生物学方面都做了详细的研究, 其合成途径已基本搞清楚(Springob, 2003)。目前已经了解了花色形成的化学和分子生物学的详细过程, 所以在传统育种工作的基础上, 利用分子生物学的手段进行花色育种是十分必要的(徐清燏和戴思兰, 2004)。

2.1 花色色素概况

植物的花色主要由黄酮类化合物、类胡萝卜素和生物碱3类物质决定(Tanaka *et al.*, 1998; 何小玲和王金发, 1998)。类胡萝卜素存在于质体内, 一般呈现黄色、橙色和红色等。类胡萝卜素的显色和分子中的共轭双键数有密切的关系, 随着共轭双键数的增加其颜色就越偏向红色, 另外至少要有7个共轭双键时才能呈现出黄色。黄酮类化合物存在于液泡内, 根据中间吡喃环氧化程度的不同, 将黄酮类化合物分为12类, 即查耳酮(chalcone)、橙酮(aurone)、黄酮(flavone)、黄酮醇(flavonol)、黄烷酮(flavanones)、二氢查耳酮(dihydrochalcone)、

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-101

儿茶精类(catechins)、黄烷-3-4-二醇(flavan-3-4-dilos)、双黄酮 (biflavonoids)、异黄酮(isoflavonoids)、原花色素(proanthocyanidins)和花色素苷(anthocyanin) (Madhuri and Arhula, 1999)。黄酮类化合物中除花色素苷是红色系外, 均属黄色系。查耳酮和橙酮是深黄色, 其他为淡黄色或近于无色。生物碱类色素有小檗碱、罂粟碱和甜菜碱等。

2.2 花色素苷的生物合成

对于花色素苷生物合成途径的研究已十分详尽 (Jayaram, 1990; Forkmann, 1991; Springob, 2003)。其中 3 种植物在研究合成途径和基因分离中起至关重要的作用, 即玉米(*Zea mays*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)和矮牵牛(*Petunia hybrida*) (Tanaka *et al*., 1998)。黄酮类化合物由花色素苷和花黄色素组成, 而花黄色素又是花色素苷合成过程中的中间产物。因此, 所谓黄酮类化合物的合成途径其实就是指花色素苷的合成途径(图 1)。

从这个图中可以看出控制花色形成的结构基因 *CHS*、*CHI*、*DFR*、*F3'H* 和 *F3'5'H* 等对花色色素的合成非常重要, 对这些结构基因实施正义或者反义的调控能够对花色进行改良。

3 应用反义RNA技术进行花色改良

将反义链连接在表达载体上, 用其转化花卉, 通过来抑制黄酮类化合物生物合成过程中的某个基因的活性, 从而改变花色合成的产物, 进而改变花色。

3.1 对*CHS*基因的调控

从图1可知, *CHS*催化4-香豆酰CoA与丙二酰 CoA 缩合成柚配基－查耳酮。*CHS* 基因最初从欧芹(***P****etroslium hortense*)中分离到, 它在矮牵牛中由8～10个成员组成。植物正常发育过程中只有*CHS-A*和*CHS-J*表达, 且这种表达只能在花中。有关研究表明, *CHS*不仅是植

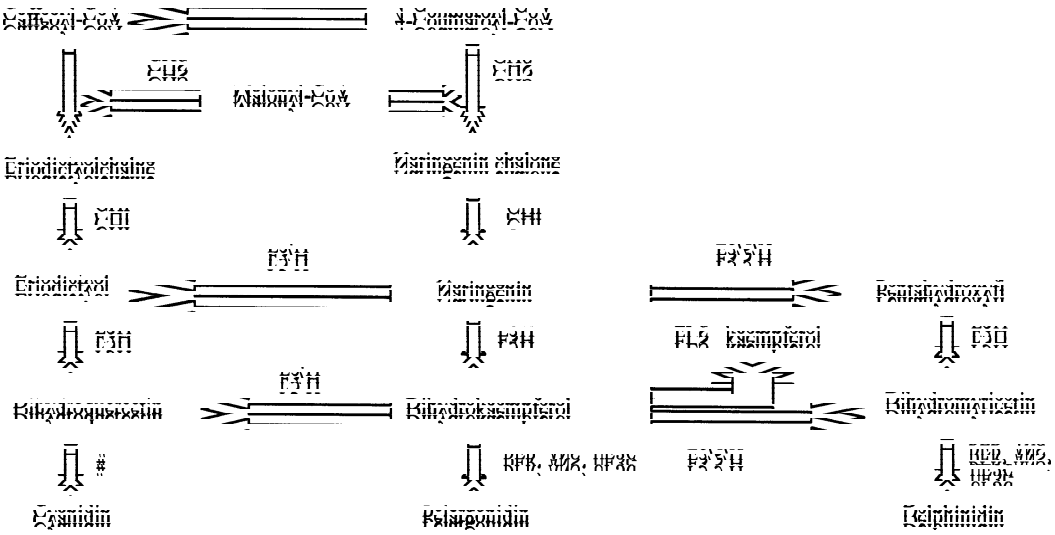


图 1 黄酮类化合物的生物合成途径

CHS. 苯基苯乙烯酮合成酶; CHI. 苯基苯乙烯酮黄烷异构酶; FLS. 黄酮醇合成酶; DFR. 二氢黄酮醇 4- 还原酶; F3'H. 黄烷酮 3'- 羟化酶; ANS. 花色素合成酶; F3'5'H. 黄烷酮 3'.5' - 羟化酶; F3H. 黄烷酮 3- 羟化酶; UF3GT. UDPG:类黄酮 -3-*O*- 葡糖基转移酶

Fig. 1 Biosynthetic pathway of flavonoids

CHS. Chalcone synthase; CHI. Chalcone isomerase; FLS. Flavonol synthase; DFR. Dihydroflavonol reductase; F3'H. Flavonoid 3'-hydroxylase; ANS. Anthocyanidin synthase; F3'5'H. Flavonoid 3', 5'-hydroxylase; F3H. Flavanone 3β-hydroxylase; UF3GT. UDP-glucose:flavonoid-5-*O*-glucosyltransferase

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-101

物花色形成途径中的关键基因, 而且还与 *CHI* 及 *DFR* 之间存在着相互作用。所以最早进行花色改良的研究者就选择了 *CHS* 作为调控对象。对 *CHS* 的反义调控使花色素合成被打断而使花色变淡, 甚至变成白色或者粉色, 所以是淡色花育种的一条途径。van der Krol等(1988)将*CHS*的cDNA反向连接于CaMV的35S启动子上, 再连接双元载体Bin19转化矮牵牛, 使花色由紫红色变为粉红色并夹有白色, 有些花朵完全呈白色。Courthey-Gutterson和Napoli(1994)将菊花(*Dendranthema grandiflorum*)中分离的*CHS*基因以反义和正义方向插入粉红色的菊花品种的基因组中, 结果在正义和反义转化株中都得到了白花或极浅的粉红色花, 而对照没有出现白花植株, 而且还发现转基因植株的白花性状通过营养繁殖能够稳定遗传而不影响其他性状的表达。同样, 在烟草(*Nicotiana tabacum*)中, 反义抑制 *CHS* 基因的表达也获得了改变花色的植株, 使花冠由桃红色变为白色。van der Krol等(1988)将菊花*CHS*基因正义导入菊花园艺品种之后产生了白色花和图案各异的彩瓣花。

3.2 对*DFR*基因的调控

*DFR*基因也是花色素生物合成中重要的基因之一, 在其参与下无色的二氢槲皮醇(dihydroquercetin)、二氢山奈素(dihydrokaempferol)和二氢杨梅黄酮(dihydromyricetin)分别变为红色的矮菊色素(cyanidin)、砖红色的天竺葵色素(pelargonnidin)和蓝色的飞燕草色素(delphindin)。因为 *DFR* 基因很早就从模式植物(玉米、金鱼草和矮牵牛等)中分离出来, 而且它是花色素合成途径中的关键基因, 所以在花色研究的早期是反义 RNA 技术应用的主要对象之一。对 *DFR* 基因的调控通常都导致了不同程度的花色素合成量的减少而出现新奇的花色。Aida 等(2000)将反义 *DFR* 基因导入蝴蝶草(*Torenia fournieri*), 发现转化株的花色素苷合成减少, 黄酮和黄酮醇(此二者为助色素)含量显著提高, 获得了开蓝色花的蝴蝶草, 表明调控花色素苷的助色素含量是花色改变的途径之一。同年, 他还分别将正义的*DFR*和*CHS*转入蓝猪耳(*Vandellia crustacean*)中, 转基因株系的花冠花色素苷含量均呈不同程度的减少, 位于花筒的花色素苷含量减少程度大于花冠檐, 花筒的颜色几近白色(Aida *et al*., 2000)。

3.3 对*F3H*、*F3′H*和 *F3′5′H*基因的调控

*F3H*基因的功能是促使黄酮核C3位置羟基化形成二氢槲皮醇、二氢山奈素和二氢杨梅黄酮。对该基因的反义抑制同样会使花色得以改变, Zuker 等(2002)对香石竹(*Dianthus caryophyllus*) 'Eilat'品种的*F3H*基因反义抑制, 结果导致部分或完全失去了原来的橙红色。通过 4 年的观察, 这个性状能遗传给后代。

*F3′H*催化二氢黄酮醇B环3′位的羟化, 形成红色矢车菊色素的前体二氢槲皮醇, 而 *F3′5′H* 催化二氢黄酮醇 B 环 3′和 5′位的羟化, 形成蓝紫色飞燕草色素的直接前体二氢杨梅黄酮。由于 *F3′5′H* 基因直接控制着形成蓝色花的飞燕草色素的合成, 所以它对蓝色花的育种具有非常重要的作用, 一度曾被称为"蓝色基因"。目前, 很多花卉缺少蓝色花系, 对蓝色花形成分子机理的深入研究, 使蓝色花育种成为花卉分子育种的一个热点, 因此这两个基因也就成为花卉育种工作者培育蓝色花卉的希望所在(Tanaka *et al*., 2000; 孟丽和戴思兰, 2004)。现在, 主要是通过把*F3′5′H*转入一些花卉中, 以期得到蓝色花, 而反义RNA技术的应用相对较少(Fukui *et al*., 2003)。但从花色素的合成途径上看, 如把正义基因的导入和反义基因抑制结合起来, 将对花色的改良开辟更广阔的天地。比如, 菊花产生的主要花色素苷是矢车菊-3-丙二酰糖苷, 而没有天竺葵色素, 可以通过抑制 *F3′H* 基因的表达使其产生天竺葵色素, 创造出新颖的红色花(于晓南和张启翔, 2002)。可以设想在转入*F3′5′H*基因的基础上, 再用反义技术对*F3′H*基因进行抑制, 从而使花色素合成途径朝飞燕草色素糖苷方向发展。表 1 是近年来使用反义

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-101

RNA技术(其中正义基因是作为对照)获得的转基因花卉。

3.4 对调节基因的反义调控

花色的形成是一个很复杂的过程, 从分子水平到各种化合物, 既有结构基因的参与, 又有一些调节基因的调控。现在发现了很多影响花色形成的调节基因(表2), 因此对调节基因的调控也能达到改良花色的目的。目前对调节基因的反义抑制还未见报道, 但是随着更多的调节基因被发现, 利用转基因技术对他们进行调节也会成为改良花色的又一重要的途径。

3.5 对控制花瓣液泡pH值基因的反义调控

液泡的pH值是影响花色形成的一个重要因素(Yoshida *et al.*, 2003)。从三色牵牛(*Ipomoea nil*)的变色(Yoshida *et al.*, 1995)、月

表 1 已获得的改变花色的转基因花卉

Table1 transgenic floral crops of modified color

种名	颜色	基因构建	表型	文献
矮牵牛	紫色	反义 *CHS-A*	白色	van der Krol *et al.*, 1988
Petunia hybrida		正义 *CHS-A*	白色	ven der Krol *et al.*, 1990
		正义 *CHS*	白色或紫白相间	邵莉等, 1996
	白色	正义 *CHS*	淡黄	Davis *et al.*, 1998
	深紫	正义 *CHS*	淡紫	
菊花 *Dendrantherma*	粉红色	正义 *CHS*	白色	Courtney-gutterson *et al.*, 1994
mongolicum		反义 *CHS*	浅红	
非洲菊	红色	反义 *CHS* 和 *DFR*	粉红	Elomaa *et al.*, 1993
G*erbera jamesonii*		正义 *CHS*	浅粉	
月季	红色	正义 *CHS*	粉红	Tanaka *et al.*, 1998
Rosa chinensis				
蝴蝶草	蓝色	正义 *CHS* 和 *DFR*	白色	
Torenia hybrida		正义 *CHS* 和 *DFR*	淡蓝色	
		反义 *CHS* 和 *DFR*	白色	
		正义 *DFR* 和 *CHS*	白色至淡蓝色	Suzuki *et al.*, 2000
		正义 *F3′5′H*	粉红色	
香石竹	橙红色	反义 *F3H*	白色	Zuker *et al.*, 2002
Dianthus fragrans				
洋桔梗	紫色	反义 *CHS*	白色	Nielsen *et al.*, 2002
Eustoma grandiflorm		反义 *FLS*	红色	

表 2 矮牵牛、金鱼草和玉米花色素生物合成的调节基因

Table 2 Regulatory gene of flower pigments biosynthesis in *Petunia hybrida*, *Antirrhinum majus* and *Zea mays*

物种	调节基因	结构基因	参考文献
玉米	*R*(*S* 和 *P*)	*CHS*、*DFR*、*UFGT*、*F3H*、*CHI*	Dellaports *et al.*, 1988
Zea mays	*B*	*DFR*、*UFGT*	Chandler *et al.*, 1989
	Sn	*PAL*、*CHS*、*CHI*、*UFGT*	Tonelli *et al.*, 1991
	In	*CHS*、*CHI*、*DFR*	Dooner *et al.*, 1991
金鱼草	*Delila*	*F3H*、*DFR.*、*UFGT*	Goodrich *et al.*, 1992
Antirrhinum	*Eluta*	*DFR*、*UFGT*	Dooner *et al.*, 1991
majus	*Rosea*	*DFR*、*UFGT*	
矮牵牛	*An1*、*An2*、*An10*	*UF3GT*、*DFR*	Quattrocchio *et al.*, 1993
Petunia hybrida	和 *An11*		

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-101

季的蓝变(Barthe *et al.*, 1991)和对矮牵牛的不同色系的研究(Renuveni *et al.*, 2001)都说明了花色和液泡的 pH 值关系密切。液泡 pH 值偏低, 花呈红色; 反之则为蓝紫色。目前, 已经克隆了矮牵牛的 7 个控制液泡 pH 值的基因(*pH1*～*pH7*), 其中 *pH1*、*pH2* 和 *pH6* 专一影响液泡的 pH 值(Vlaming *et al.*, 1983; Griesbach, 1998)。所以通过对这些基因位点的反义抑制, 就有可能达到提高液泡pH, 这对蓝紫色花系的育种将会有很大的帮助。

4 结束语

反义 RNA 技术应用于观赏植物花色领域的研究已经有很长时间(van der Krol *et al.*, 1988), 但是反义抑制的理论基础研究远远没有跟上其应用领域的研究。不过由于该技术在花色分子育种领域的成功应用, 大大的促进了反义 RNA 的基础研究和花卉的商业化育种。植物分子生物学的飞速发展, 使我们能够利用反义技术进行花色改良。

将反义 RNA 技术用于花色研究不仅有助于揭示花色形成的分子生物学机理, 而且对解决生产实际中的花色育种具有潜在的应用价值。近来发现的RNA干涉技术是反义RNA的进一步发展, 其除了具有反义RNA技术的优势以外, 更兼具针对性强和遗传能力高等优点, 它将会为花色育种做出更大贡献。我国地处亚热带和温带地区, 拥有十分丰富的观赏植物资源, 利用基因工程技术进行花色改良将为中国花卉育种开辟新的途径 。目前, 转基因香石竹的商品化生产已经获得了成功, 反义 RNA 技术在月季、菊花和非洲菊等花卉上也都有很好的应用前景(Fukui *et al.*, 2003)。关于花色的分子生物学及转基因的研究, 目前在我国已经起步, 而且进展相当快, 相信在不久的将来会取得丰硕成果。

参 考 文 献

白新祥, 戴思兰 (2004) 菊花花色研究进展. 见: 张启翔主编, 中国观赏园艺研究进展 2004. 中国林业出版社, 北京, 131-137

包满珠 (1997) 植物花青素基因的克隆及应用. 园艺学报, **24:** 279-284

何小玲, 王金发 (1998) 观赏花卉的品质基因及其基因工程问题. 植物生理学通讯, **34:** 462-466

李惠芬, 李倩中 (1999) 我国花卉育种研究进展. 西南园艺, **27(1):** 36-39

孟丽, 戴思兰 (2004) *F3′5′H* 基因与蓝色花的形成. 分子植物育种, **2:** 413-420

邵莉, 李毅, 杨美珠 (1996) 查耳酮合酶基因对转基因植物花色和育性的影响. 植物学报, **38:** 517-524

石东乔, 陈正华 (2001) 反义 RNA 及其在植物学研究中的应用. 遗传, **23:** 73-76

宋俊歧, 赵春晖, 贺焰 (1997) 控制果实成熟的植物基因工程研究进展. 生物技术通报, **5**: 8-13

徐清燏, 戴思兰 (2004) 蓝色花分子育种. 分子植物育种, **2:** 93-99

于晓南, 张启翔 (2002) 观赏植物的花色素苷与花色. 林业科学, **38:** 148-153

张惠展 (1990) 基因工程概论. 华东理工大学出版社, 上海, 35-55

Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y, Shibata M (2000a) Modification of flower color in torenia (*Torennia fourieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Science*, **153:** 33-42

Aida R, Yoshida K, Kondo T, Kishimoto S, Shibata M (2000b) Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the anti-sense dihydroflavonol1-4-reductase gene. *Plant Science*, **160:** 49-56

Barthe P, Vailiant V, Gudin S (1991) pH of cell sap and vacuolar pH during senescence of the rose petal. *Acta Horticulturae*, **298:** 135-139

Bohm BA (1998) Introduction to Flavonoids. Harwood Academic, Hardback, pp. 5-27

Chandler VL, Radicella JP, Robbins TP, Chen J, Turks D

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-101

(1989) Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences. *The Plant Cell*, **1:** 1157-1183

Courthey-gutterson N, Napoli C, Lemieux C, Morgan A, Firoozabady E, Robinson KEP (1994) Modification of flower color in Florsit's chrysanthemum: production of a white flowering variety through molecular genetics. *Biotechnology*, **12:** 268-271

Davies KM, Bloor SJ, Spiller GB, Deroles SC (1998) Production of yellow color in flower redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*. *The Plant Journal*, **13:** 259-266

Dellaports SL, Greenblatt I, Kermicle JL, Hicks JB, Wessler SR (1988) Molecular cloning of the maize *R-nj* gene by transposon tagging with Ac. In: Gustafson JP, Apples R, eds, Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepets. 18th Stacller Genetics Symposium Plenum Press, New York, pp. 263-282

Dooner HK, Robbins TP, Jorgensen RA (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Review of Genetics*, **25:** 173-199

Ecker JR, Davis RW (1986) Inhibition of gene expression in plant cells expression of antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **83:** 5372-5376

Elomaa P, Honkanen J, Puska R, Seppanen P, Helariutta Y, Mehto M, Kotilainen M, Nevalainen L, Teeri TH (1993) *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synehase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Biotechnology*, **11:** 508-511

Forkmann G (1991) Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breeding*, **106:** 1-26

Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Iwashita T, Nomoto K (2003) A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3′, 5′-hydroxylase gene. *Phytochemistry*, **63:** 15-23

Goodrich J, Carpenter R, Coen ES (1992) A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant spicies. *Cell*, **68:** 955-964

Griesbach RJ(1998) The effect of the *pH6* gene on the color of *Petunia Hybrida* Vilm. flower. *Journal of American Society Horticulturae Science*, **123:** 647-650

Harborne JB (1994) The Flavonoids Advances in Research since 1986. Chapman and Hall Ltd, London, pp. 259-330

Izant JG, Weintraub H (1985) Congtitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by antisense RNA. *Science*, **229:** 345-351

Izant JG, Weintraub H (1984) Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell*, **36:** 1007-1015

Jayaram C, Peterson AP (1990) Anthocyanin pigmentation and transposable elements in maize aleurone. *Plant Breeding Reviews*, **8:** 91-137

Kawaji H, Mizuno T, Mizushima S (1979) Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **140:** 843-847

Madhuri G, Recldy AR (1999) Plant biotechnology of flavonoids. *Plant Biotechnology*, **16:** 179-199

Nielsen K, Deroles SC, Markham KR, Bradley MJ, Podivinsky E, Manson1 D (2002) Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in lisianthus. *Molecular Breeding*, **9:** 217-229

Park SU, Yu M, Facchini PJ (2002) Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California poppy. *Plant Physiology*, **128:** 696-706

Patzel V, Sczakiel G (2000) *In vitro* selection supports the view of a kinetic control of antisense RNA-mediated inhibition of gene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, **28:** 2462-2466

Quattrocchio F, Wing JF, Leppen H, Mol J, Koes RE (1993) Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *The Plant Cell*, **5:** 1497-1512

Raponi M, Arndt GM (2002) Dominant genetic screen for cofactors that enhance antisense RNA-mediated gene silencing in fission yeast. *Nucleic Acids Research*, **30:** 2546-2554

Renveni M, Evenor D, Artzi B, Perl A, Erner Y (2001) Decrease in vacuolar pH during petunia flower opening

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-101

is reflected in the activity of tonoplast H^+-ATPase. *Journal of Plant Physiology*, **158:** 991-998

Simons RW, Kleckner N (1983) Translation control of IS10 transposition. *Cell*, **34:** 683-691

Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K (2003) Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Products Report*, **20:** 288-303

Suzuki K, Xue H, Tanaka Y, Fukui Y, Mizutani MF, Murakami Y, Katsumoto Y, Tsuda S, Kusumi T (2000) Flower color modifications of *Torenia hybrida* by cosuppression of anthocyanin biosynthesis genes. *Molecular Breeding*, **6:** 239-246

Tanaka SF, Inagaki Y, Yamaguchi T, Saito N, Iida S (2000) Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature*, **407:** 581

Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T (1998) Metabolic engineering to modify flower color. *Plant & Cell Physiology*, **11:** 1119-1126

Tomizawa J, Itoh T, Selzer G, Som T (1981) Plasmid Col E I incompatibility determined by interaction of RNAi with primer transcript. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **78:** 1421-1425

Tonelli C, Consonni G, Dolfini SF, Dellaporta SL, Viotti A, Gavazzi G (1991) Genetic and molecular analysis of *Sn*, a light-inducible, tissue specific regulatory gene in maize. *Molecular Genetics and Genomics*, **225:** 401-410

van der Krol AR, Lenting PE, Vennstra J, van der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR (1988) Antisense chalcone synthrase gene in transgenetic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*, **333:** 866-869

van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell*, **2:** 291-299

Vlaming P, Schram AW, Wiering H (1983) Genes affecting flower colour and pH of flower limb homogenates in *Petunia Hybrida. Theory Application Genetics*, **66:** 271-278

Wang LS, Hashimoto F, Shiraishi A, Aoki N, Li JJ, Shimizu K, Sakata Y (2001) Phenetics in tree peony species from china by flower pigment cluser analysis. *Journal of Plant Research*, **114:** 213-221

Williams CA, Grayer RJ (2004) Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Report*, **21:** 539-573

Yoshida K, Kondo T, Okazaki Y (1995) Cause of blue petal colour. *Nature*, **373:** 291

Yoshida K, Yuki TK, Kameda K, Kondo T (2003) Sepal color variation of Hydrangea macrophylla and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. *Plant & Cell Physiology*, **44:** 262-268

Zuker A, Tzfira T, Hagit BM, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Forkmann G, Martens S, Inbol NS, Weiss D, Vainstein A (2002) Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Molecular Breeding*, **9:** 33-41

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-101