

# ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ С ИЗМЕНЁННОЙ ОКРАСКОЙ ЦВЕТКОВ

Санникова В.Ю.

Санкт-Петербургский государственный университет,  
Биологический факультет,  
199034 Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9;  
✉ st049681@student.spbu.ru

Важным направлением в цветоводстве является получение новых сортов декоративных растений, среди которых наибольшим спросом пользуются растения с необычной окраской цветков. Ранее для их получения успешно применялись традиционные программы по разведению и селекции. Однако в настоящий момент генная инженерия способна предложить альтернативный путь создания новых форм и сортов. Антоцианы, относящиеся к флавоноидам, беталаины и каротиноиды являются основными типами пигментов, которые синтезируются в растениях и отвечают за окраску лепестков цветка. Модификация путей биосинтеза пигментов с помощью методов генной инженерии позволяет добиться результатов, которые не могут быть получены при помощи традиционной селекции. В данном обзоре литературы представлены основные достижения применения методов генной инженерии в цветоводстве путём модификации окраски цветков. Существует несколько основных направлений в работе с генами биосинтеза пигментов. Среди них чаще всего используется стратегия по подавлению экспрессии генов для предотвращения синтеза пигмента или, наоборот, для устранения факторов, препятствующих развитию окраски. Нередко используется метод введения в геном растений дополнительных гетерологичных генов, недостающих в пути биосинтеза пигментов. Также для модификации окраски прибегают к геномному редактированию посредством технологии CRISPR/Cas, но данный метод в отношении декоративных растений стал использоваться относительно недавно. Несмотря на быстрое развитие биотехнологий, существуют препятствия для распространения генномодифицированных растений на мировом рынке. Преодоление ряда проблем сможет сделать производство трансгенных декоративных растений экономически более выгодным и привлекательным, чем выведение новых сортов исключительно с помощью традиционных методов селекции.

**Ключевые слова:** декоративные растения, генная инженерия, окраска цветка, агробактериальная трансформация, CRISPR/Cas, геномное редактирование.

## Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах./The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы./The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

## Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны/Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-1-01>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы./The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись/All authors approved the manuscript  
Конфликт интересов отсутствует/No conflict of interest

## GENETIC ENGINEERING AS A WAY TO OBTAIN ORNAMENTAL PLANTS WITH A CHANGED FLOWER COLOR

Sannikova V. Yu.

St. Petersburg State University, Faculty of Biology,  
7/9, University Emb., St. Petersburg 199034, Russia;  
✉ st049681@student.spbu.ru

An important trend in the field of floriculture is the creation of new varieties of ornamental plants, among which varieties with unusual color are most in demand. To this end, traditional breeding and selection programs have been successfully applied for many years. However, currently genetic engineering is able to offer an alternative way to obtain new forms and varieties. Anthocyanins belonging to flavonoids, betalains and carotenoids are the main types of pigments that are synthesized in the plant and are responsible for the color of flower petals. The modification of pigment biosynthesis pathways using genetic engineering techniques can produce results that cannot be obtained by traditional breeding. This review presents the main advances in the application of genetic engineering techniques in floriculture using the example of flower color modification. There are several main areas of work with the genes of pigment biosynthesis. Among them, the strategy of suppressing gene expression is used most often. Expression of certain genes is suppressed to prevent pigment synthesis, or vice versa, to eliminate factors that hinder color development. The method of additional heterologous genes insertion to plants lacking them in the pathway of pigment biosynthesis is often used. Genomic editing, in particular by using the CRISPR/Cas system, is also used for color modification, but the application of this method to ornamental plants is a relatively recent innovation. Despite the rapid development of biotechnology, there are obstacles to the distribution of genetically modified plants on the world market. By addressing a number of problems, the production of transgenic ornamental plants may become economically more cost-effective and attractive than the development of new varieties exclusively through traditional breeding methods.

**Keywords:** ornamental plants, genetic engineering, flower color, Agrobacterium-mediated transformation, CRISPR/Cas, genome editing.

**Для цитирования:** Санникова В.Ю. Генная инженерия как способ получения декоративных растений с изменённой окраской цветков. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):40–45. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-01

**For citation:** Sannikova V. Yu. Genetic engineering as a way to obtain ornamental plants with a changed flower color. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):40–45. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-01

## ORCID:

Sannikova V. Yu. <https://orcid.org/0000-0003-4861-4805>

УДК 577

Поступила в редакцию: 13.01.2020

Принята к публикации: 28.03.2020

## Введение

В настоящее время декоративные растения, обладающие определённым набором признаков, широко используются для удовлетворения эстетических потребностей человека. Декоративные растения используются в озеленении, оформлении садов, парков, скверов и различных территорий, в том числе для украшения зданий и помещений. Их также используют для составления букетов, корзин и декоративных композиций. Растения с не свойственными сорту признаками пользуются большим спросом среди населения. В связи с этим растёт потребность в создании новых форм декоративных растений (Chandler, Tanaka, 2007).

Некоторые сорта разрабатываются традиционными методами с помощью гибридизации и мутагенеза. Однако данные методы могут быть применены к ограниченному числу растений. Скрещивания и отбор мутантов не подходят для стерильных сортов растений, например, орхидей (Chandler, Sanchez, 2012). Кроме того, получение новых форм некоторых растений путём традиционных методов является слишком трудным и длительным процессом (Chandler, Sanchez, 2012). Поэтому в последнее время активно развиваются методы генной инженерии, которые позволяют в относительно короткие сроки придать растению новые признаки, которые не могут быть получены при помощи селекции. В настоящее время трансформировано уже более 50 родов декоративных растений (Shibata, 2008; Boutigny et al., 2020). Чаще всего культурные растения трансформируют путём прямой регенерации побегов или соматического эмбриогенеза с использованием агробактериальной трансформации или биобаллистики (Brand, 2006).

В основном у растений стремятся изменить признаки внешнего вида, такие как форма, размер, окраска цветков, листьев, высота и диаметр стебля. Кроме внешних признаков изменяются и физиологические характеристики декоративных растений: устойчивость к абиотическим факторам среды, время цветения, аромат и многие другие (Kuligowska, Lütken, Müller, 2016). Во флористике наибольший экономический эффект дают растения с необычной окраской лепестков венчика, поэтому изменение окраски цветка является самым популярным направлением создания новых форм декоративных растений. В данном обзоре всё внимание уделяется применению технологии генетической модификации в отношении окраски лепестков венчика декоративных растений.

## Окраска цветков

Окраска цветка определяется сочетанием различных факторов: типом пигментов, копигментами, ионами металлов и вакуолярным pH. Окраска лепестков венчика в основном обусловлена тремя типами пигментов: беталаинов, каротиноидов и флавоноидов (Tanaka, Brug-

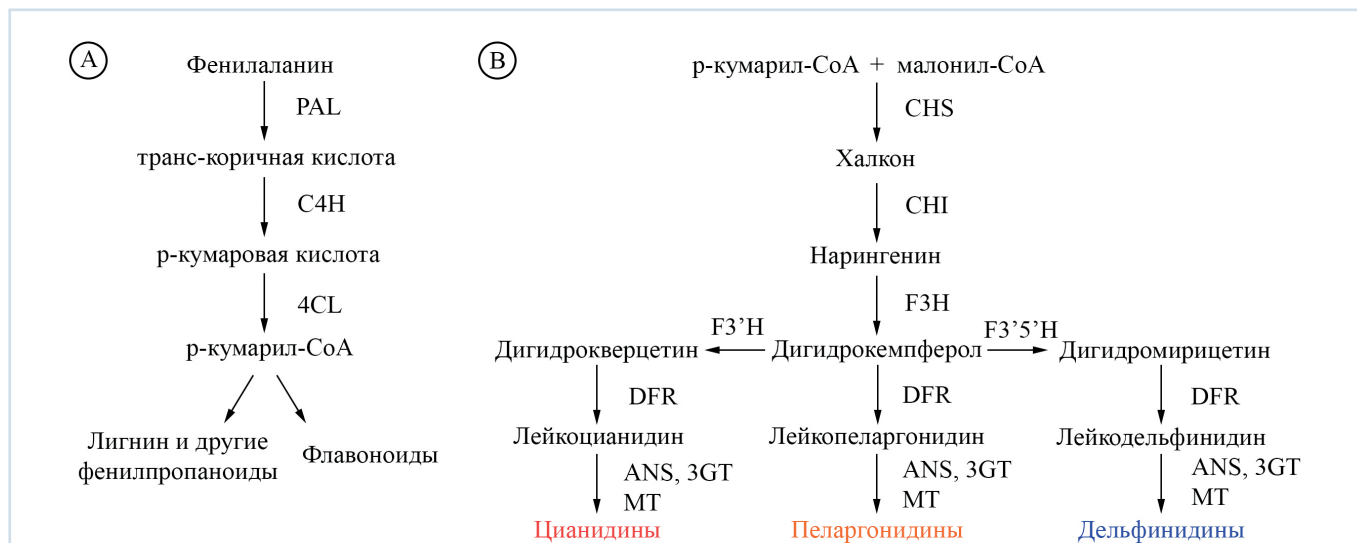
liera, 2013). Беталаины являются производными индола, они ответственны за жёлтую, оранжевую, розовую, красную окраску цветков. Антоцианы, относящиеся к группе флавоноидов (Рисунок), придают цветкам красную, синюю и фиолетовую окраску, а являющиеся производными ликопина каротиноиды – жёлтую, оранжевую и ярко-красную (Rodriguez-Amaya, 2019). В природе беталаины и антоцианы не встречаются вместе в одном растении (Delgado-Vargas, Jimenez, Paredes, Lopez, 2000). Беталаины среди высших растений обнаружены только у представителей порядка Гвоздичноцветные, например, у представителей семейств Aizoaceae и Portulacaceae, тогда как антоцианы и каротиноиды широко распространены у многих покрытосеменных видов растений (Delgado-Vargas, Jimenez, Paredes, Lopez, 2000; Stafford, 1994). Многие виды растений не имеют полной цветовой гаммы окраски цветков, что связано с отсутствием у них генов, необходимых для биосинтеза конкретного пигмента (Chandler, Brugliera, 2011). К настоящему моменту с помощью методов генной инженерии удалось модифицировать биосинтез флавоноидов (в частности антоцианов), каротиноидов и беталаинов. Существует несколько стратегий по получению новых форм растений.

## Подавление экспрессии генов

Большинство модификаций окраски цветов у трансгенных растений связано с подавлением определённого гена биосинтеза пигментов. Первой успешной модификацией окраски цветка (Krol A et al., 1988) было получение белых петуний путём введения гена антисмысловой РНК для подавления экспрессии гена, кодирующего халконсинтазу (CHS) – фермента, участвующего в биосинтезе флавоноидов. Нормальные цветки *Petunia hybrida* Vilm. имеют равномерную красную окраску, в то время как трансгенные растения в разной степени демонстрируют уменьшение пигментации: от цветков с белыми секторами до полностью белых цветков (Krol A et al., 1988). Позже с помощью подавления экспрессии гена CHS получили белую окраску цветков у *Chrysanthemum morifolium* Ramat. (Courtney-Guterson et al., 1994), *Gerbera hybrida* (Elomaa et al., 1993), *Torenia fournieri* Linden ex E. Fourn. (Aida et al., 2000a).

Кроме того, на синтез антоцианов влияют гены *DFR* и *ANS*, кодирующие дигидрофлавонол - 4 -редуктазу и антоцианидинсинтазу. Так, *T. fournieri*, трансформированные антисмысловыми последовательностями генов *CHS* и *DFR*, имели белый и бледно-голубой цвет соответственно (Aida et al., 2000b). Сходным образом, трансгенные *Torenia hybrida* и *Gentiana triflora* Pall. cv. Maciry, в которых ген *ANS* был подавлен с помощью РНК-интерференции, также имели бледно-голубые цветки (Nakamura et al., 2006; Nakatsuka et al., 2008a).

Позже у растений были обнаружены белки EFP (Enhancer of Flavonoid Production), которые обеспечивают выработку достаточного количества флавоноидов (Mor-



**Рисунок. Путь биосинтеза антоцианов. (А) Общий фенилпропаноидный путь. Участвующие ферменты:** PAL – фенилаланин-аммиак-лиаза; C4H – циннамат-4-гидроксилаза; 4CL – 4-кумарат-КоА лигаза. **(В) Конкретные этапы биосинтеза антоцианов. Участвующие ферменты:** CHS – халконсинтаза; CHI – халкон изомеразы; F3H – флаванон-3-гидроксилаза, F3'H – флавоноид-3'-гидроксилаза, F3'5'H – флавоноид-3',5'-гидроксилаза; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза; ANS – антоцианидинсинтаза; 3GT – глюкозилтрансфераза; MT – метилтрансфераза (модифицировано по Delgado-Vargas et al., 2000).

**Figure. Anthocyanin biosynthesis pathway. (A) General phenylpropanoid metabolism. Enzymes involved:** PAL – phenylalanine ammonia lyase; C4H – cinnamate-4-hydroxylase; 4CL – 4-coumarate-CoA ligase. **(B) Specific steps of anthocyanin biosynthesis. Enzymes involved:** CHS – chalcone synthase; CHI – chalcone isomerase; F3H, F3'H, F3'5'H – flavonol hydroxylases; DFR – dihydroflavonol-4-reductase; ANS – anthocyanin synthase; 3GT – glucosyl transferase; MT – methyl transferase (modified according to Delgado-Vargas et al., 2000).

ita et al, 2014). Подавление экспрессии гомологов EFR в *P. hybrida* и *T. hybrida* привело к бледной окраске цветков по причине низкого уровня накопления флавоноидов в растениях.

Сообщений об изменении окраски цветков декоративных растений путём модификации биосинтеза каротиноидов известно намного меньше. Первая такая попытка была предпринята на *Ch. morifolium*. Известно, что у хризантемы белый цвет лепестков доминирует над жёлтым (Ohmiya et al., 2006). Каротиноид-расщепляющие диоксигеназы (CCD) являются ключевыми ферментами, расщепляющими каротиноиды в нормальных белых лепестках хризантемы. С помощью РНК-интерференции была подавлена экспрессия гена *CCD4a*, что привело к изменению окраски лепестков с белого на жёлтый цвет (Ohmiya et al., 2006).

### Введение дополнительных генов

Известно, что флавоноиды в цветках сильно различаются по химическому составу между разными видами и сортами растений (Scarano, Chieppa, Santino, 2018). Некоторые растения могут продуцировать определенные антоцианы, а другие нет. Таким образом, многообещаю-

щим подходом является синтез ненативных флавоноидов (особенно пигментированных антоцианов) путём введения чужеродных генов в интересующее растение. Этот подход был впервые продемонстрирован на *P. hybrida* более 30 лет назад в 1987 году (Meyer et al., 1987). Петуния не способна синтезировать пеларгонидин оранжевого цвета из-за отсутствия фермента дигидрофлавонол-4-редуктазы (DFR). Окраска цветка была успешно изменена с помощью сверхэкспрессии гетерологичного гена *DFR* (*At*), кодирующего дигидрофлавонол-4-редуктазу кукурузы. *DFR* кукурузы привела к образованию антоцианов типа пеларгонидина, в результате чего окраска цветков сменилась с бледно-розового на кирпичный цвет (Meyer et al., 1987).

Характер гидроксирования антоцианов значительно влияет на их окраску, количество гидроксильных групп контролируется генами *F3'H* и *F3'5'H*, продукты экспрессии которых вводят в В-кольцо дигидрокемпферола гидроксильные группы в положения 3' и 3', 5' соответственно (Khoo et al., 2017). Посредством контроля характера гидроксирования были получены коммерческие трансгенные фиолетовые розы (*Rosa hybrida*) и гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L.), накапливающие антоцианы типа дельфинидинов, которые не синтезируются

естественным путём в данных растениях (Tanaka, Brugliera, 2013). В случаях гвоздики и розы для получения желаемых пигментов была необходима не только дополнительная экспрессия чужеродного гена, но также одновременное подавление нескольких эндогенных генов. У *D. caryophyllus* избыточная экспрессия одного гена *F3'5'H* была недостаточной для полного преобразования биосинтеза антоцианов в сторону дельфинидина, который придаёт цветкам синюю окраску (Nishihara, Nakatsuka, 2010). Поэтому для получения фиолетовых цветков, накапливающих дельфинидины, работали с гвоздикой, у которой отсутствовала активность эндогенного *DFR*. Белую гвоздику с дефицитом *DFR* трансформировали геном *F3'5'H* петунии или фиалки и геном *DFR* петунии, в результате чего накапливались дельфинидины, придающие фиолетовую окраску (Nishihara, Nakatsuka, 2010).

В случае с *R. hybrida* (Katsumoto et al., 2007) экспрессию эндогенного гена *DFR* подавили с помощью РНК-интерференции. Кроме того, ввели ген фиалки (*Viola × wittrockiana*), кодирующий фермент *F3'5'H*, и ген *DFR Iris × hollandica* для синтеза дельфинидина. При этом чтобы ферменты *F3'5'H* фиалки и *F3'H* розы не конкурировали друг с другом за субстрат – предшественника дельфинидина, для создания голубой розы был выбран генотип с отсутствием активности эндогенного гена *F3'H* (Katsumoto et al., 2007). Сходным образом были получены *Ch. morifolium* (Brugliera et al., 2013; Noda et al., 2017), *Petunia grandiflora* (Qi et al., 2013).

Одним важным фактором для регуляции генов является выбор промотора. В большинстве случаев в создании трансгенных растений использовался промотор 35S (CaMV 35S) вируса мозаики цветной капусты. Однако CaMV 35S не функционирует у некоторых культур, таких как горечавка и хризантема; поэтому для таких растений должны использоваться другие промоторы. (Nishihara, Nakatsuka, 2011)

Примером преобразования биосинтеза каротиноидов является изменение окраски цветка у *Lotus japonicus* L. Путём агробактериальной трансформации в растения был введён ген *crtW* бактерии *Agrobacterium aurantiacum*, который кодирует β-каротин-кетотазу, участвующую в синтезе каротиноидов розового и красного цвета. В результате у трансгенных линий растений характерный для дикого типа светло-жёлтый цвет лепестков изменился на темно-жёлтый – оранжевый цвет (Suzuki et al., 2007).

Единственное сообщение об успешном изменении окраски венчика цветка декоративного растения с помощью модификации пути биосинтеза беталаинов было сделано в 2017. Белый сорт петунии (*Petunia × hybrida* cv. Mitchell) был трансформирован вектором pX11, содержащим гены *DODA1*, *CYP76AD1* от *Beta vulgaris* L. и *cDOPA5GT* от *Mirabilis jalapa* L. После трансформации петунии демонстрировали бледно-фиолетовый цвет лепестков. LC-MS анализ лепестков подтвердил наличие бетанина и изобетанина в качестве основных продуцируемых беталаинов (Polturak et al., 2019).

## Факторы транскрипции и редактирование генома

Молекулярные исследования показывают, что пути биосинтеза пигментов регулируются на уровне транскрипции (Nishihara, Nakatsuka, 2010). Из трёх основных пигментов хорошо изучен биосинтез флавоноидов, и известно, что три фактора транскрипции, такие как R2R3-MYB, bHLH и WD40 (WDR), участвуют в регуляции генов биосинтеза флавоноидов (Quattrocchio et al., 2006). Эти факторы транскрипции образуют комплексы и активируют различные гены биосинтеза флавоноидов в растениях (Albert et al., 2014). В настоящее время ещё не было выявлено ни одного ключевого транскрипционного фактора, участвующего в биосинтезе каротиноидов и беталаинов (Nishihara, Nakatsuka, 2010).

Были получены петунии, которых трансформировали с помощью гена *Lc* кукурузы, кодирующего регуляторный фактор bHLH биосинтеза антоцианов. За счёт сверхэкспрессии гена *Lc* у *Zea mays* L. под промотором CaMV 35S все стадии биосинтеза антоцианов были интенсифицированы, трансгенные растения проявляли сильную пигментацию, как в вегетативных, так и в генеративных тканях (Bradley et al., 2002). Было показано, что транскрипционные факторы R2R3-MYB также регулируют пигментацию таких растений как *Ipomoea nil* (L.) Roth (Morita et al., 2006), *G. triflora* cv. Maciry (Nakatsuka et al., 2008b), *Antirrhinum majus* L. (Schwinn et al., 2006), лилии (*Lilium* spp.) 'Montreux' (Yamagishi et al., 2010), *R. hybrida* (Lin-Wang et al., 2010), *Petunia axillaris* × (*P. axillaris* × *P. hybrida* cv. 'Rose of Heaven'; Cornu and Farcy, 1981) и *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinnars (Schwinn et al., 2014).

Современные технологии редактирования генома позволяют вносить мутации в почти любую целевую геномную последовательность при правильном выборе метода. Подобно тому, как у трансгенных растений может наследоваться трансген, растения с отредактированным геномом, могут передавать введённую мутацию своему потомству (Kishi-Kaboshi, Aida, Sasaki, 2018).

Первое изменение окраски лепестков данным методом было проведено на *I. nil*. С помощью технологии CRISPR/Cas9 через агробактериальную трансформацию удалось изменить окраску цветов и стеблей растений путём генерации мутаций в гене *DFR-B*, который отвечает за синтез антоцианов (Watanabe et al., 2018). Полученные мутантные растения имели белые, а не фиолетовые цветы. Кроме того, были получены химерные растения с промежуточной окраской цветка, но количество химерных растений было мало. После данного исследования последовало получение новых форм *I. nil* через CRISPR/Cas9-направленный нокаут гена *CCD4*, кодирующего CCD, за счёт чего лепестки растений приобрели бледно-жёлтую окраску в результате накопления каротиноидов (Watanabe et al., 2018). Изменение окраски цветков с помощью CRISPR/Cas9 также удалось осуществить на *T. fournieri* (Nishihara et al., 2018) путём введения мутаций в ген *F3H*.



Технология позволила получить бледно-голубые (почти белые) цветки торении с высокой частотой (около 80% регенерированных линий).

## Перспективы и будущие направления

Несколько лет назад Джим Данвелл (Dunwell, 1999) предсказал, что генномодифицированные декоративные растения будут широко распространены к 2020 году. Однако в настоящее время по-прежнему существует ряд проблем, препятствующих распространению коммерческих сортов ГМ растений на рынке.

Получение разрешения на культивирование и распространение ГМ декоративных растений – сложный, длительный и дорогостоящий процесс, который делает разработку новых сортов, по словам Добрес, «непривлекательной с точки зрения бизнеса» (Dobres, 2008. Р. 13). Если затраты на одобрение ГМ растений сократятся, на рынке появится больше возможностей для использования трансгенных декоративных растений. В настоящее время ГМ декоративными растениями, которые могут использоваться в розничной торговле, являются розы и гвоздики (Chandler, Brugliera, 2011). Компания Florigene Flowers является производителем различных сортов гвоздики широкого спектра оттенков фиолетового. Розы с синими оттенками появились благодаря совместной работе компаний Florigene и Suntory (Noda, 2018).

Ещё одной важной проблемой является трудоёмкость и низкая эффективность трансформации в отношении некоторых видов растений. Так, однодольные растения обладают низкой чувствительностью к агробактериальной инфекции, а древесные растения характеризуются низкой частотой трансформации и трудностями, связанными с регенерацией (Chandler, Sanchez, 2012). Поскольку трансформация сильно зависит от вида растения, необходимо разработать более эффективные системы трансформации, которые будут подходить для большого числа видов и сортов.

## Заключение

В обзоре описаны некоторые удачные примеры модификации окраски цветков декоративных растений с помощью различных стратегий, таких как подавление экспрессии эндогенных генов, введение дополнительных генов, отвечающих за биосинтез пигментов, непосредственное редактирование генома, регуляция факторов транскрипции и сочетание данных методов. За последние годы технологии создания новых форм растений значительно улучшились. В самых ранних исследованиях для изменения окраски цветка работа велась с одним единственным геном растения, в то время как более поздние эксперименты позволили модифицировать сложные пути биосинтеза пигментов с помощью регуляции одновременно несколь-

ко генов.

Несмотря на существующие проблемы ГМ растений по распространению на рынке, трансгенный подход в ряде случаев является единственной возможностью для создания многих ранее недостижимых оттенков цветков. Благодаря совершенствованию методов генной инженерии получение новых форм и сортов может представлять не только научный интерес, но и экономическую выгоду для производителей декоративных растений.

*Обзор подготовлен в рамках магистерской программы «Молекулярная биология и агробиотехнология растений» биологического факультета СПбГУ. Особую благодарность автор выражает д.б.н. Матвеевой Татьяне Валерьевне за предложенную тему обзора и ценные замечания / The review was prepared as part of the master degree program in Molecular Biology and Plant Agrobiotechnology of the Faculty of Biology of St. Petersburg State University. The author expresses special gratitude to Dr. Biol. Sci. Tatiana V. Matveeva for the proposed topic of the review and valuable comments.*

## References/Литература

- Aida R., Kishimoto S., Tanaka Y., Shibata M. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Science*. 2000a;151(1):33-42. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00239-3
- 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 Science*. 2000b;160(1):49-56. DOI: 10.1016/S0168-9452(00)00364-2
- Albert N.W., Davies K.M., Lewis D.H., Zhang H., Montefiori M., Brendolise C., Boase M.R., Ngo H., Jameson P.E., Schwinck K.E. A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots. *The Plant Cell*. 2014;26(3):962-80. DOI: 10.1105/tpc
- Boutigny A.L., Dohin N., Pomin D., Rolland M. Overview and detectability of the genetic modifications in ornamental plants. *Horticulture Research*. 2020;7:11. DOI: 10.1038/s41438-019-0232-5
- Bradley J., Davies K., Dolores S., Bloor S., Lewis D. The maize *Lc* regulatory gene up regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. *The Plant Journal*. 2002;13(3):381-392. DOI: 10.1046/j.1365-3113.1998.00031.x
- Brand M.H. Ornamental Plant Transformation. *Journal of Crop Improvement*. 2006;17(1):27-50. DOI: 10.1300/J411v17n01\_02
- Brugliera F., Tao G.Q., Tams U., Kalc G., Mouradova E., Price K., Stevenson K., Nakamura N., Stacey I., Katsumoto Y., Tanaka Y., Mason J.G. Violet/blue chrysanthemums--metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant and Cell Physiology*. 2013;54(10):1696-1710. DOI: 10.1093/pcp/ptt110
- Chandler S.F., Brugliera F. Genetic modification in floriculture. *Biotechnology Letters*. 2011;33(2):207-214. DOI: 10.1007/s10529-010-0424-4
- Chandler S.F., Sanchez C. Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnology Journal*. 2012;10(8):891-903. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00693.x
- Chandler S.F., Tanaka Y. Genetic Modification in Floriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2007;26(4):169-197. DOI: 10.1080/07352680701429381
- Courtney-Gutterson N., Napoli C., Lemieux C., Morgan A., Firoozabady E., Robinson K.E. Modification of flower color in florist's chrysanthemum: production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Biotechnology*. 1994;12(3):268-271. DOI: 10.1038/nbt0394-268

- Delgado-Vargas F., Jimenez A.R., Paredes-Lopez O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000;40(3):173-289. DOI: 10.1080/10408690091189257
- Dobres M. Barriers to Genetically Engineered Ornamentals: An Industry Perspective. In: J.A.T. da Silva (ed.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, Volume V. London: Global Science Books; 2008. p.1-14.
- Dunwell J. Transgenic Crops: The Next Generation, or an Example of 2020 Vision. *Annals of Botany*. 1999;84(3):269-277. DOI: 10.1006/anbo.1999.0934
- Elomaa P., Honkanen J., Puska R., Seppänen P., Helariutta Y., Mehto M., Kotilainen M., Nevalainen L., Teeri T.H. *Agrobacterium*-Mediated Transfer of Antisense Chalcone Synthase cDNA to *Gerbera hybrida* Inhibits Flower Pigmentation. *Biotechnology*. 1993;11:508-511. DOI: 10.1038/nbt0493-508
- Katsumoto Y., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Brugliera F., Holton T.A., Karan M., Nakamura N., Yonekura-Sakakibara K., Togami J., Pigeaire A., Tao G.Q., Nehra N.S., Lu C.Y., Dyson B.K., Tsuda S., Ashikari T., Kusumi T., Mason J.G., Tanaka Y. Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating. *Plant and Cell Physiology*. 2007;48(11):1589-1600. DOI: 10.1093/pcp/pcm131
- Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*. 2017;61(1):1361779. DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779
- Kishi-Kaboshi M., Aida R., Sasaki K. Genome engineering in ornamental plants: Current status and future prospects. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018;131:47-52. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.03.015
- Krol A., Lenting P., Veenstra J., Meer I., Koes R., Gerats A., Mol J., Stuitje A. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*. 1998;333:866-869. DOI: 10.1038/333866a0
- Kuligowska K., Lutken H., Muller R. Towards development of new ornamental plants: status and progress in wide hybridization. *Planta*. 2016;244(1):1-17. DOI: 10.1007/s00425-016-2493-7
- Lin-Wang K., Bolitho K., Grafton K., Kortstee A., Karunairetnam S., McGhie T.K., Espley R.V., Hellens R.P., Allan A.C. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology*. 2010;10:50. DOI: 10.1186/1471-2229-10-50
- Meyer P., Heidmann I., Forkmann G., Saedler H. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature*. 1987;330(6149):677-678. DOI: 10.1038/330677a0
- Morita Y., Saitoh M., Hoshino A., Nitasaka E., Iida S. Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH and WDR Transcriptional Regulators and Identification of c and ca Mutations Conferring White Flowers in the Japanese Morning Glory. *Plant and Cell Physiology*. 2006;47(4):457-470. DOI: 10.1093/pcp/pcj012
- Morita Y., Takagi K., Fukuchi-Mizutani M., Ishiguro K., Tanaka Y., Nitasaka E., Nakayama M., Saito N., Kagami T., Hoshino A., Iida S. A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation. *The Plant Journal*. 2014;78(2):294-304. DOI: 10.1111/tpj.12469
- Nakamura N., Fukuchi-Mizutani M., Miyazaki K., Suzuki K., Tanaka Y. RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnology*. 2006;23(1):13-17. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.23.13
- Nakatsuka T., Mishiba K., Abe Y., Kubota A., Kakizaki Y., Yamamura S., Nishihara M. Flower color modification of gentian plants by RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology*. 2008a;25(1):61-68. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.25.61
- Nakatsuka T., Haruta K.S., Pitaksutheepong C., Abe Y., Kakizaki Y., Yamamoto K., Shimada N., Yamamura S., Nishihara M. Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers. *Plant and Cell Physiology*. 2008b;49(12):1818-1829. DOI: 10.1093/pcp/pcn163
- Nishihara M., Higuchi A., Watanabe A., Tasaki K. Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower color in *Torenia fournieri*. *BMC Plant Biology*. 2018;18(1):331. DOI: 10.1186/s12870-018-1539-3
- Nishihara M., Nakatsuka T. Genetic engineering of novel flower colors in floricultural plants: recent advances via transgenic approaches. *Methods in Molecular Biology*. 2010;589:325-347. DOI: 10.1007/978-1-60327-114-1\_29
- Nishihara M. Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology Letters*. 2011;33(3):433-441. DOI: 10.1007/s10529-010-0461-z
- Noda N. Recent advances in the research and development of blue flowers. *Breeding Science*. 2018;68:79-87. DOI: 10.1270/jsbbs.17132
- Noda N., Yoshioka S., Kishimoto S., Nakayama M., Douzono M., Tanaka Y., Aida R. Generation of blue chrysanthemums by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Science Advances*. 2017;3(7):e1602785. DOI: 10.1126/sciadv.1602785
- Ohmiya A., Kishimoto S., Aida R., Yoshioka S., Sumitomo K. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology*. 2016;142(3):1193-1201. DOI: 10.1104/pp.106.087130
- Polturak G., Grossman N., Vela-Corcia D., Dong Y., Nudel A., Pliner M., Levy M., Rogachev I., Aharoni A. Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. *PNAS*. 2017;114(34):9062-9067. DOI: 10.1073/pnas.1707176114
- Qi Y., Lou Q., Quan Y., Liu Y., Wang Y. Flower-specific expression of the *Phalaenopsis* flavonoid 3', 5'-hydroxylase modifies flower color pigmentation in *Petunia* and *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2013;115:263-273 DOI: 10.1007/s11240-013-0359-2
- Quattrocchio F., Baudry A., Lepiniec L., Grotewold E. The Regulation of Flavonoid Biosynthesis. In: Grotewold E. (eds) *The Science of Flavonoids*. New York: Springer; 2006. p. 97-122. DOI: 10.1007/978-0-387-28822-2\_4
- Rodriguez-Amaya D.B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*. 2019;124:200-205. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.028
- Scarano A., Chieppa M., Santino A. Looking at Flavonoid Biodiversity in Horticultural Crops: A Colored Mine with Nutritional Benefits. *Plants (Basel)*. 2018;7(4):98. DOI: 10.3390/plants7040098
- Schwinn K.E., Boase M.R., Bradley J.M., Lewis D.H., Deroles S.C., Martin C.R., Davies K.M. MYB and bHLH transcription factor transgenes increase anthocyanin pigmentation in petunia and lisianthus plants, and the petunia phenotypes are strongly enhanced under field conditions. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:603. DOI: 10.3389/fpls.2014.00603
- Schwinn K., Venail J., Shang Y., Mackay S., Alm V., Butelli E., Oyama R., Bailey P., Davies K., Martin C. A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *The Plant Cell*. 2006;18(4):831-851. DOI: 10.1105/tpc.105.039255
- Shibata M. Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding. *Plant Biotechnology*. 2008;25(1):3-8. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.25.3
- Suzuki S., Nishihara M., Nakatsuka T., Misawa N., Ogiwara I., Yamamura S. Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Cell Reports*. 2007;26(7):951-959. DOI: 10.1007/s00299-006-0302-7
- Stafford H.A. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science*. 1994;101(2):91-98. DOI: 10.1016/0168-9452(94)90244-5
- Tanaka Y., Brugliera F. Flower color and cytochromes P450. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013;368(1612):20120432. DOI: 10.1098/rstb.2012.0432
- Watanabe K., Oda-Yamamizo C., Sage-Ono K., Ohmiya A., Ono M. Alteration of flower color in *Ipomoea nil* through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. *Transgenic Research*. 2018;27(1):25-38. DOI: 10.1007/s11248-017-0051-0
- 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 and Cell Physiology*. 2010;51(3):463-474. DOI: 10.1093/pcp/pcq011