

포플러로부터 flavone synthase I 유전자의 클로닝 및 생화학적 특성

김봉규 · 안중훈*

건국대학교 생명공학과, 건국대학교 생명분자정보학 센터

Cloning and Characterization of Flavone synthase I from *Populus deltoids*

Bong Gyu Kim and Joong-Hoon Ahn*

Department of Bioscience and Biotechnology, Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Received January 13, 2009; Accepted January 19, 2009

Poplar contains various flavonoids including naringenin, kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin, rhamnetin, and quercetin. These flavonoids are synthesized from naringenin with various enzymes. However, none of genes from poplar involved in flavonoid biosynthesis have been biochemically characterized. We cloned *PFNS I-1* from *Populus deltoids* by RT-PCR method. The open reading frame of *PFNS I-1* consisted of 1,017-bp and it showed high similarity with other FNS genes. The purified recombinant PFNS I-1, expressed in *Escherichia coli*, catalyzed the reaction from flavanone (naringenin) to flavone (apigenin). The reaction of PFNS I-1 was enhanced by cofactors such as oxoglutarate, Fe²⁺, ascorbate and catalase. Thus, it is concluded that *PFNS I-1* encodes a flavone synthase I.

Key words: flavone synthase I, flavonoid, poplar

서 론

식물은 알칼로이드, 테르페노이드, 페닐프로파노이드와 같은 다양한 이차대사산물을 생산한다. 이들 중 페닐프로파노이드는 아미노산인 페닐알라닌에서 phenylalanine lyase(PAL)이라는 효소에 의해 만들어진다. PAL에 의해서 만들어진 최초의 산물은 cinnamic acid이다. 이는 리그닌과 플라보노이드 합성의 전구 물질이 된다. 리그닌은 목재의 가장 많은 부분을 차지하는 cellulose 다음으로 많이 존재하는 구성물질 중의 하나이다. 리그닌의 생합성은 C4H(cinnamate 4-hydroxylase), 4CL(4-coumarate:CoA ligase), CCR (cinnanoyl-CoA reductase), CAD(coniferyl alcohol dehydrogenase)와 같은 유전자들에 의해 *p*-coumaryl, coniferyl, sinapyl alcohol과 같은 monolignol이 만들어진다[Li 등, 2001]. Monomeric unit들은 β-O-4 ether bond에 의해 중합체 형태로 만들어진다. 리그닌은 식물체의 지지 및 외부 병원성에 대한 방어기능 및 수분의 통도기능과 같은 중요한 역할을 수행한다. 한편, 리그닌은 제지산업에 있어서는 꼭

제거되어야 할 물질 중의 하나이기도 하다[Hervé 등, 2001].

플라보노이드는 가장 많은 연구가 이루어진 이차대사산물의 하나로서 지금까지 약 10,000여 종 이상이 알려져 있다[Tahara, 2007]. 플라보노이드는 식물에서 다양한 기능을 가지고 있다. 예를 들어 꽃 색을 나타내는 데에 관여하고 UV와 같은 외부 스트레스로부터 식물조직을 보호하기도 한다[Harbone과 Williams, 2000]. 또한, 식물과 미생물, 식물과 곤충의 신호전달 물질로도 이용된다[Schijlen 등, 2004]. 대부분의 플라보노이드는 인간의 건강에 이로운 항산화, 항암, 항염, 항알러지 등과 같은 다양한 생리적 기능을 갖고 있다[Havsteen, 2003]. 플라보노이드는 1,3-diphenylpropan-1-one(C6-C3-C6)의 유도체로 3개의 aromatic ring(ring A, ring B)들이 heterocyclic ring(ring C)에 의해 구조적으로 결합되어 있다. 플라보노이드의 생합성은 한 분자의 *p*-coumaroyl-CoA 와 3분자의 malonyl-CoA가 CHS(chalcone synthase)와 CHI(chalcone isomerase)에 의해서 flavanone인 2S-naringenin 으로 합성된다[Winkel-Shirley, 2001]. 플라보노이드 탄소 2와 3 사이의 이중 결합의 유무 그리고 3번 탄소의 hydroxyl기의 유무 등에 따라서 flavanones, flavones, isoflavones, dihydroflavonols, flavonols, flavan-3-ols 그리고 anthocyanins 등으로 나누어진다[Forkmann과 Heller, 1999]. 이러한 플라보노이드는 hydroxylation, O-methylation, C-methylation, isoprenylation, O-glycosylation, C-glycosylation 등

*Corresponding author
Phone: +82-2-450-3764; Fax: +82-2-3437-6106
E-mail: jhahn@konkuk.ac.kr

과 같은 변형으로 인하여 다양한 형태의 플라보노이드를 생성하게 된다[Winkel-Shirley, 2001].

Flavone은 flavanone에서 합성이 되는데 flavanone 2번과 3번 탄소에 이중결합이 형성되어 만들어진다. Flavone의 생합성 효소는 flavone synthase I(FNS I)와 flavone synthase II(FNS II)로 구조적으로 전혀 다른 두 개의 유전자가 flavanone에서 flavone의 반응에 관여한다[Martens과 Mithöfer, 2005]. 일반적으로 FNS II 유전자는 cytochrome P450 monooxygenase family에 속하는 유전자로 membrane에 binding하고 반응에 필요한 전자는 NADPH로부터 직접 공급받지 못하고 cytochrome P450 reductase에 의해 제공 받는다. 대부분의 식물체에서 flavone의 생합성은 FNS II에 의해서 이루어진다[Heller와 Forkmann, 1993]. FNS I은 수용성 2-oxoglutarate/Fe²⁺-dependent dioxygenase에 속하는 효소이다. 유전자는 parsley에서 처음으로 발견되어 대장균과 효모에서 발현한 재조합단백질을 이용하여 2S-naringenin을 기질로 apigenin이 생성되는 것을 확인하였다[Marten 등, 2001, 2003]. FNS I은 주로 *Apiaceae* family에서만 발견되는 수용성 2-oxoglutarate-/Fe²⁺-dependent dioxygenase이다.

포플러는 목본식물의 모델식물로서 전세계적으로 약 30 수종 이상이 생육하고 있고 목본식물에서 가장 많이 연구가 이루어진 수종의 하나이다. 포플러의 유전자지도의 작성과 게놈염기서열분석이 진행 중이다[Britsch와 Grisebach, 1986; Cervera 등, 2001; Yin 등, 2004; Tuskan 등, 2006]. 포플러의 어린 잎과, 눈, 눈의 침출물 등에는 다양한 종류의 플라보노이드가 존재하고 있는데, 특히 정단조직에 존재하는 플라보노이드는 태양의 UV로 부터 식물체를 보호해주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[Dixon 등, 2002; Christensen 등, 2004]. 포플러는 naringenin, kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin, rhamnetin, quercetin등과 같은 플라보노이드를 가지고 있는 것으로 알려져 있다[Tsai 등, 2006]. 포플러에 존재하는 다양한 플라보노이드의 구성을 볼 때 이들의 생합성에 관여하고 있는 유전자 또한 다양하게 존재 할 것이다. 하지만, 아직까지 포플러에서 flavone 생합성에 관여하는 유전자의 분리 및 생화학적 특성에 대해서 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 포플러에서 클로닝한 flavanone을 flavone으로 전환하는 *PFNS I-1* 유전자의 클로닝 및 생화학적 특성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약. 본 실험에 사용된 플라보노이드는 Indofine Chemicals (Hillsborough, NJ, USA) 또는 Sigma(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HPLC 분석에 사용된 용매는 Merck(Germany)로부터 구입하였다.

PFNS I-1의 클로닝. Total RNA는 새로 나온 포플러의 싹을 채취하여 습도가 80% 이상 유지되는 암 상태의 박스에 넣어 25°C의 식물생장실에서 24시간 순화시킨 후 UV를 1시간 처리하였다. UV처리한 샘플은 곧바로 액체 질소에 넣어 막자 사발로 곱게 분쇄한 후 Plant total RNA isolation kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 분리하였다. cDNA는 oligo dT primer로

이용하여 Omniscript reverse transcriptase(Qiagen, Germany)를 사용하여 합성하였다. Polymerase chain reaction(PCR)은 Hotstart Taq DNA Polymerase(Qiagen, Germany)를 사용하여 94°C에서 1분 동안 denaturation, 55°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 amplification 의 과정을 40회 반복 수행하였다. PCR용 primer들은 TIGR(The Institute of Genome Research) poplar gene index accession number(TC66305)에 근거하여 5'-ATGGATACAAAAGTAATTCCTCTG-3'를 forward primer로 5'-AGCAAATTGCAACAATAGTAAGGTG-3'를 reverse primer로 제작하여 사용하였다. PCR 산물은 pGEMT-easy (Promega, Madison, WI, USA) 벡터에 클로닝 한 후 염기서열을 분석하였다.

대장균에서 PFNS I-1의 발현. *PFNS I-1* 유전자의 open reading frame에 해당하는 유전자 부위를 Pfu Taq polymerase (Qiagen, Germany)를 이용하여 증폭하여 glutathione *S*-transferase가 tagging되어 있는 대장균 발현벡터인 pGEX 5X-2에 클로닝하여 pFNS-GST로 명명하였다. pFNS-GST는 단백질 발현에 널리 사용되는 대장균 BL21 균주에 형질전환 하였다. 형질전환체는 엠포실린(50 µg/mL)이 포함되어 있는 LB 2 mL에 약 12시간 정도 전 배양을 실시하였다. 전 배양한 대장균은 50 µg/mL 엠포실린을 포함하고 있는 새로운 50 mL LB배지에 250 µL를 접종하여 600 nm에서 흡광도가 0.6이 되도록 배양하여 이 시점에 isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 최종농도가 0.1 mM이 되도록 첨가하여 20°C에서 12시간 이상 *PFNS I-1* 재조합 단백질을 유도하였다. 세포는 원심분리기를 이용하여 회수 하였으며, PBS 완충용액(10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.5)에 현탁하여 세척한 다음 동일한 완충용액에 재현탁 하였다. 대장균세포는 sonicator를 이용하여 파쇄하여 원심분리기를 이용하여 상등액을 회수하여 GSTrap affinity column을 이용하여 재조합 단백질을 정제하였다.

2S-Naringenin 의 준비. Naringenin의 광학이성질체(2S-naringenin, 2R-naringenin)는 PDA(photodiode array detector)가 부착되어 있는 HPLC(Varian, USA)에 AD-RH column(4.6×150 mm, Daicel Chemical Industries)을 장착하여 분리하였다. HPLC조건은 Acetonitrile:증류수(3:7, pH 2.0)의 용매를 이용하여 분당 0.4 mL의 유속으로 isocratic으로 흘려주었으며 UV 288 nm에서 분석하였다[Miyahisa 등, 2006].

PFNS I-1의 효소활성 측정 및 반응물 분석. *PFNS I-1*의 활성을 측정하기 위한 반응액은 1 mM ascorbate, 2 mg catalase (bovine, Sigma USA), 100 µM FeSO₄, 160 µM 2-oxoglutaric acid, 10 mM Tris/HCl(pH 8.0), 40 µM *S*- 또는 *R*-naringenin, 정제된 *PFNS I-1* 재조합 단백질 30 µg을 첨가하여 최종볼륨이 500 µL가 되게 하였다. 반응액은 37°C에서 1시간 동안 반응 한 후 ethyl acetate를 첨가하여 추출하였다. 추출물은 진공건조기를 이용하여 건조시킨 후 소량의 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹여 HPLC분석에 이용하였다. 효소반응속도는 Lineweaver-Burke plots의 방법에 따라 계산하였다. 반응물의 분석은 Kim 등[2006]의 방법에 HPLC 분석과 LC-MS 분석은 Kim 등[2008]의 방법에 따라 실시하였다.

결과 및 고찰

포플러 flavone synthase 유전자의 분리. 포플러에서 flavone synthase 유전자를 클로닝하기 위하여, parsley에서 분리 규명된 FNS I 유전자를 가지고 TIGR의 데이터 베이스에서 검색하였다. 그 결과 flavone synthase와 높은 유사성을 가지고 있는 유전자 하나를 찾았다. RT-PCR(reverse transcription and polymerase chain reaction)방법을 이용하여 이 유전자의 ORF를 포함하는 유전자 부위를 클로닝하여 *PFNS I-1*으로 명명하였다. *PFNS I-1*은 1,017 bp의 핵산으로 이루어져 있으며, 예상되는 단백질의 크기는 38.5 kDa이었다. Blast를 이용하여 분석한 결과 이 유전자는 *Vitis vinifera*의 2OG-Fe oxygenase와 77%, *Arabidopsis thaliana*의 2OG-Fe oxygenase와 71%, *Oryza sativa*의 2OG-Fe oxygenase와 69%의 높은 상동성을 보였다(Fig. 1). 2OG-Fe oxygenase의 특징인 Fe²⁺ 바인딩 영역과 oxoglutarate 바인딩 영역이 잘 보존되어 있는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

PFNS I-1 유전자의 발현 및 기질반응. FNS I은 flavanone의 3번 탄소에 hydroxyl기를 붙여주는 flavanone 3-β-hydroxylase (F3H) 그리고 flavanone의 2번과 3번 탄소의 이중 결합을 형성함과 동시에 3번 탄소에 hydroxyl기를 붙여 주는 flavonol

synthase(FLS)와 아미노산 수준에서 상당히 높은 유사성을 보여 주기 때문에 이들을 아미노산 유사성에 근거하여 유전자의 기능적 차이를 예측하기는 어렵다[Turnbull 등, 2004]. 따라서, 포플러에서 클로닝한 *PFNS I-1* 유전자가 flavone synthase의 기능을 하는지 알아 보기 위해서 이 유전자를 대장균에서 발현하였다. *PFNS I-1* 유전자의 open reading frame을 대장균 발현백터인 pGEX 5X-2 벡터에 클로닝하여 대장균 BL21 균주에 형질전환하였다. 재조합 *PFNS I-1*은 대장균에서 발현을 확인한 후에, GST affinity column 크로마토 그래피 방법으로 정제하였다. 정제된 단백질의 순도 및 크기는 SDS-PAGE를 이용하였다. 그 결과 약 64 kDa 크기의 밴드를 관찰 할 수 있었는데, 이것은 *PFNS I-1* 단백질의 분자량인 38.5 kDa과 GST의 분자량인 26 kDa의 합과 거의 일치 하는 것을 알 수 있었고 정제된 단백질의 순도는 약 90% 이상이였다(Fig. 2).

정제한 *PFNS I-1* 단백질을 이용하여 효소 반응을 실시 하였다. 이때, FNS들은 2*R*-naringenin 보다 2*S*-naringenin을 더 효과적인 기질로 사용하는 것으로 알려져 있다. Racemic mixture인 naringenin을 chiral HPLC 컬럼을 이용하여 2*S*과 2*R*-naringenin으로 분리 하여 *PFNS I-1*의 반응에 사용하였다[Miyahisa 등, 2006]. 이때, cofactor로 사용되는 Fe²⁺, 2-oxoglutarate, ascorbate

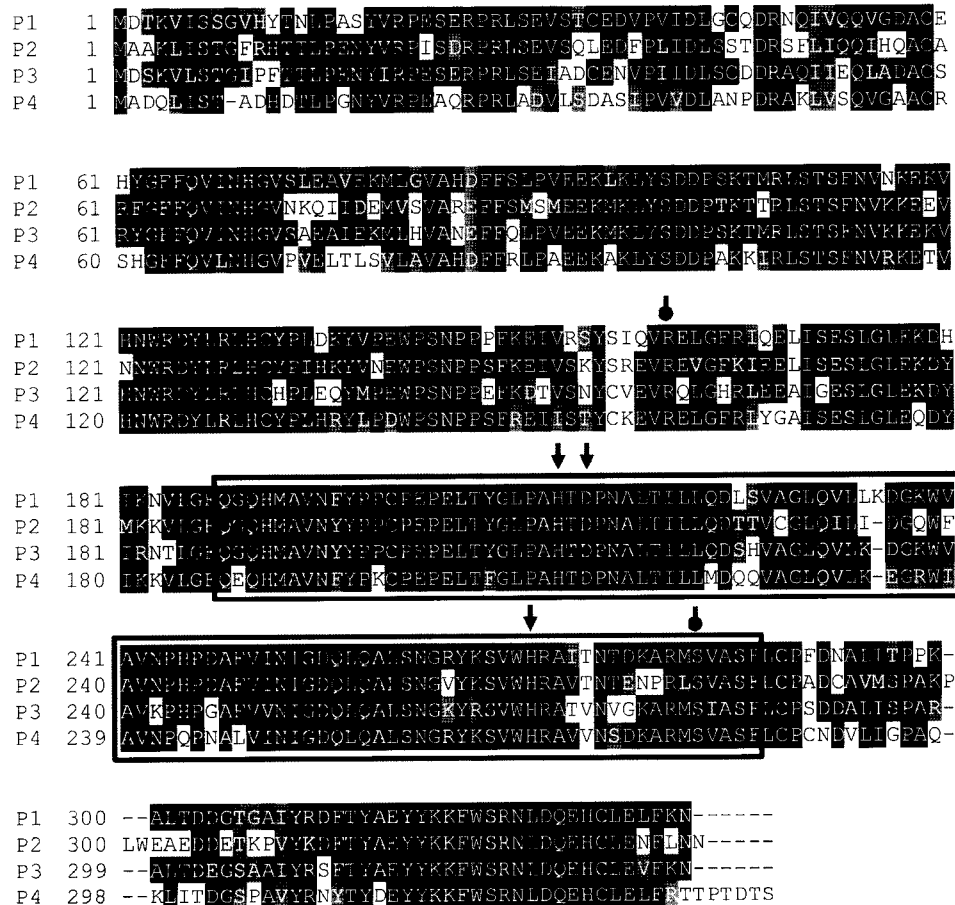


Fig. 1. Alignment of the 2-oxoglutaric acid-Fe²⁺ dependent dioxygenase from several plants. The sequences listed here correspond to P1, *PFNS I-1*; P2, 2OG-Fe(II) oxygenase from *Arabidopsis thaliana* (GenBank Number, NP_197841.1); P3, 2OG-Fe(II) oxygenase from *Vitis vinifera* (GenBank Number, CAO46190.1); P4, 2OG-Fe(II) oxygenase from *Oryza sativa* (GenBank Number, NP_001048799). Note that Fe²⁺ binding sites are indicated as ↓ and oxoglutarate binding sites are indicated as ⬇. Black box represents conserved 2OG-Fe(II) oxygenase domain.

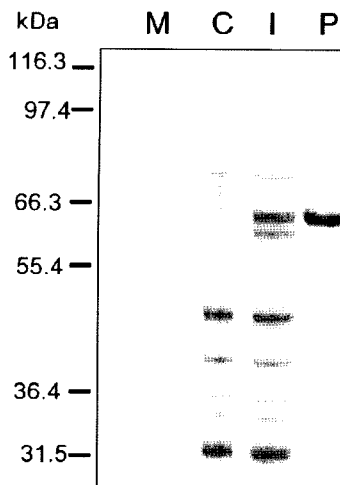


Fig. 2. Expression and purification of the recombinant PFNS I-1. M, Molecular marker; C, *E. coli* lysate before induction; I, *E. coli* lysate after induction; P, purified recombinant PFNS I-1.

도 효소 반응액에 함께 넣어 효소반응을 실시하였다. 2S-Naringenin을 기질로 사용하여 반응시킨 반응물의 HPLC를 분석한 결과 control에서는 보이지 않은 새로운 peak이 15.7 min에서 생성된 것을 관찰 할 수 있었다. 새롭게 생성된 물질은 표준물질인 apigenin과 동일한 retention time과 UV 흡광도를 가지고 있었다(Fig. 3). 또한 MS로 분석한 결과 분자량은 $[271+H]^+$ Da으로 이것은 기질로 사용한 naringenin과 비교했을 때 2 Da이 줄어든 것으로 apigenin 표준물질과 동일한 분자량을 가지는 것을 알 수 있다(Fig. 3). 2R-naringenin을 기질로 사용하여 반응한 경우와 2S-naringenin과의 상대활성을 비교해보면 10% 이하였다. 2S-naringenin을 2R-naringenin보다 더 좋은 기질로 사용하는 것은 naringenin에 존재하는 이성질체에서 오는 구조적인 차이점에서 기인하는 것으로 보인다. 이러한 결과는 앞서 parsley와 벼에서 보고된 FNS의 기질 특이성과 동일한 양상을 보여주고 있다[Martens 등, 2001; Lee 등, 2008]. 아마도, PFNS I-1이 2S-naringenin을 더 좋은 기질로 사용하는 것은 식물에서 naringenin이 합성될 때 *p*-coumaroyl-CoA와 malonyl CoA를 기질로 하여 CHS(chalcone synthase)에 의해서 생성된 chalcone naringenin이 CHI(chalcone isomerase)에 의해서 오로지 2S-naringenin만을 생성하는 특성에서 기인하는 것으로 보인다[Martens 등, 2001]. PFNS I-1이 2번 탄소와 3번 탄소 사이에 이중 결합을 형성 할 수 있을 뿐만 아니라 3번 탄소에 hydroxyl기를 첨가할 수 있는 FLS의 활성이 있는지 여부를 확인 하기 위해서 taxifolin을 기질로 사용하여 반응을 실시하였으나 생성물을 만들지 못하였다. 이는 PFNS I-1이 FLS활성이 없음을 의미 한다. 따라서 PFNS I-1은 naringenin에서 apigenin을 생성하는 flavone synthase의 기능을 하는 유전자임을 알 수 있다. Naringenin을 기질로 사용하여 PFNS I-1의 kinetics parameter를 구한 결과 K_m 은 30 μ M, V_{max} 는 103.5 nkat mg^{-1} 이었다. 이것은 벼에서 보고된 FNS와 V_{max}/K_m 을 비교 할 때 V_{max}/K_m 가 2.3배 높은 것으로 나타나 PFNS I-1이

벼의 FNS보다 naringenin으로부터 apigenin으로 전환을 더 효율적으로 할 수 있음을 의미한다[Lee 등, 2008]. 최근 들어 여러 종류의 플라보노이드 합성유전자들을 미생물에서부터 발현 시켜서 다양한 구조의 플라보노이드를 합성하고 있다[Katsuyama 등, 2007; Leonard 등, 2008]. 본 연구에서 사용한 PFNS I-1은 kinetics parameter들을 볼 때 기존에 알려진 FNS보다 더 효율적으로 naringenin을 apigenin으로 전환시키는 것으로 나타났다. *in vitro* flavonoid 합성에 더 효과적으로 사용 될 것 수 있을 것으로 생각 된다.

PFNS I-1은 Fe^{2+} 와 oxoglutarate dependent 효소이기 때문에 이들 cofactor들이 효소반응에 미치는 역할을 조사하였다. Ascorbate 또는 2-oxoglutarate를 반응액에 첨가하지 않았을 경우에는 전혀 반응을 시키지 못하는 것으로 나타났으며, Fe^{2+} 를 첨가하지 않았을 경우에는 약 65% 정도의 활성이 감소되는 현상을 보였다. 또한, 여러 oxygenase의 반응성을 증진시키는 것으로 알려진[Britsch와 Grisebach, 1986] catalase를 첨가하지 않았을 때는 약 57% 정도의 활성이 감소하는 것으로 나타났다. PFNS I-1역시 catalase에 의해 활성이 증가함을 알 수 있다. 이러한 결과들로 미뤄볼 때 PFNS I-1은 Fe^{2+} 와 2-oxoglutarate dependent 유전자임을 알 수 있다. 지금까지 FNS I 유전자들은 *Apiaceae* family에서만 제한 적으로 발견되는 유전자로 알려져 왔다. 그런데 최근의 보고에 따르면 벼에서도 FNS I의 기능을 하는 유전자가 존재하고 있음을 알 수 있다[Lee 등, 2008]. 이러한 결과들은 *Apiaceae* family외에도 다양한 식물체에 FNS I의 기능을 하는 유전자들이 존재하고 있을 가능성을 암시하고 있다. 위와 같은 결과는 포플러에서 일어나는 플라보노이드 생합성경로의 이해와 PFNS I-1 유전자의 *in vivo* 유전자 기능을 연구하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

초 록

포플러는 naringenin, kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin, rhamnetin, quercetin과 같은 플라보노이드를 가지고 있다. 이러한 플라보노이드들은 여러 가지 효소에 의해 naringenin으로부터 합성된다. 그러나, 포플러에서는 플라보노이드 합성에 관여하는 효소들의 연구가 거의 이루어 지지 않았다. 포플러에서 flavone synthase I 유전자를 RT-PCR방법을 이용하여 클로닝하였다. PFNS I-1 유전자의 기질 특성을 알아보기 위하여 대장균에 과발현하여 glutathione S-transferase 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 정제한 PFNS I-1 재조합 단백질은 flavanone인 2S-naringenin기질을 이용하여 flavone인 apigenin을 생성함을 알 수 있었다. 또한 cofactor인 oxoglutarate, $FeSO_4$, ascorbate, catalase가 PFNS I-1의 반응성에 중대한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 PFNS I-1 유전자는 flavone synthase I을 암호화하는 유전자임을 확인하였다.

Key words: flavone synthase I, flavonoid, Poplar

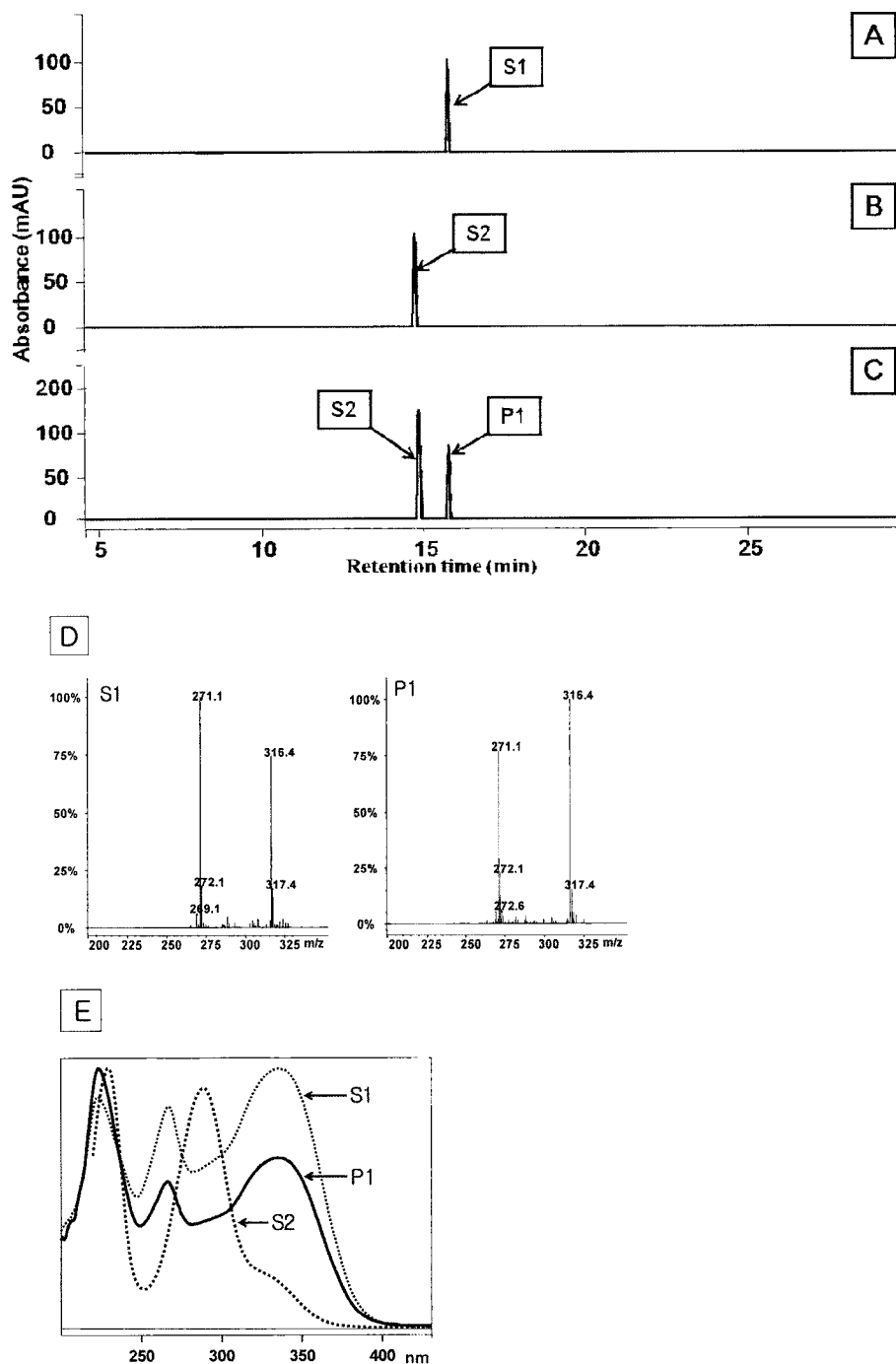


Fig. 3. HPLC and MS analysis of naringenin reaction product with PFNS I-1. A, authentic apigenin (S1); B, authentic naringenin (S2); C, reaction product of 2S-naringenin with PFNS I-1 (P1); D, MS analysis of authentic apigenin (S1) and reaction product (P1). E : UV-spectra of authentic naringenin (S2), authentic apigenin (S1) and reaction product (P1).

감사의 글

이 논문은 2006년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문임.

참고문헌

Britsch L and Grisebach H (1986) Purification and characterization

of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrid*. *Eur J Biochem* **156**, 569-577.

Cervera M-T, Storme V, Ivens B, Gusmão J, Liu BH, Hostyn V, Van Slycken J, Van Montagu M, and Boerjan W (2001) Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics* **158**, 787-809.

Christensen AB, Gregersen PL, Olsen CE, and Collinge DB (1998) A flavonoid 7-O-methyltransferase is expressed in barley leaves

- in response to pathogen attack. *Plant Mol Biol* **36**, 219-227.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Srinivasa Reddy MS, and Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defense - a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* **3**, 371-390.
- Forkmann G and Heller W (1999) Biosynthesis of flavonoids. In: Barton D, Nakanishi K, and Meth-Cohn O (eds.), *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Elsevier Science Ltd., Oxford, pp. 713-748.
- Harborne JB and Williams C (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Havsteen B (2003) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* **32**, 1141-1148.
- Heller W and Forkmann G (1993) Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne JB (ed.), *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. Chapman & Hall, London, pp. 499-535.
- Hervé P, Jauneau A, Pâques M, Marien JN, Boudet AM, and Teulières C (2001) A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: Comparative histology. *Plant Sci* **161**, 645-653.
- Katsuyama Y, Funa N, Miyahisa I, and Horinouchi S (2007) Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chem Biol* **14**, 613-621.
- Kim BG, Kim JH, Kim J, Lee C, and Ahn J-H (2008) Accumulation of flavonols in response to ultraviolet-B irradiation in soybean is related to induction of flavanone 3- β -hydroxylase and flavonol synthase. *Mol Cells* **25**, 247-252.
- Kim BG, Lee Y, Hur H-G, Lim Y, and Ahn J-H (2006) Flavonoid 3'-O-methyltransferase from rice: cDNA cloning, characterization and functional expression. *Phytochemistry* **67**, 387-394.
- Lee YJ, Kim JH, Kim BG, Lim Y, and Ahn J-H (2008) Characterization of flavone synthase I from rice. *BMB Rep* **41**, 68-71.
- Leonard E, Yan Y, Fowler ZL, Li Z, Lim C-G, Lim K-H, and Koffas MAG (2008) Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. *Mol Pharm* **5**, 257-265.
- Li L, Cheng XF, Leshkevich J, Umezawa T, Harding SA, and Chiang VL (2001) The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* **13**, 1567-1585.
- Martens S, Forkmann G, Matern U, and Lukačič R (2001) Cloning of parsley flavone synthase I. *Phytochemistry* **58**, 43-46.
- Martens S and Mithöfer A (2005) Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **66**, 2399-2407.
- Miyahisa I, Kaneko M, Funa N, Kawasaki H, Kojima H, Ohnishi Y, and Horinouchi S (2006) Efficient production of (2S)-flavones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 498-504.
- Schijlen EG, de Vos RCH, van Tunen AJ, Bovy AG (2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* **65**, 2631-2648.
- Tahara S (2007) A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1387-1404.
- Tsai C-J, Harding S, Tschaplinski T, Lindroth R, and Yuan Y (2006) Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*. *New Phytologist* **172**, 47-62.
- Turnbull JJ, Nakajima J, Welford RWD, Yamazaki M, Saito K, and Schoriold CJ (2004) Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 1206-1216.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A *et al.* (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**, 1596-1604.
- Winkel-Shirley B (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* **126**, 485-493.
- Yin TM, DiFazio SP, Gunter LE, Riemenschneider D, and Tuskan GA (2004) Large-scale heterospecific segregation distortion in *Populus* revealed by a dense genetic map. *Theor Appl Genet* **109**, 451-463.