

红肉猕猴桃品种‘红阳’果实中花青素体的细胞学特征

骆彬彬^{1,2}, 王冬良¹, 满玉萍², 唐徐林³, 王彦昌^{2*}

(1. 安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036; 2. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074;

3. 新疆阿克苏市农村能源环境监测站, 阿克苏 843000)

摘要: 目前关于植物器官着色的生化代谢途径及其调控等已有深入了解, 而关于色素积累的细胞学过程研究还十分缺乏。本研究以目前红肉猕猴桃主栽品种‘红阳’为试验材料, 通过光学显微镜及透射电子显微镜观察了该红肉猕猴桃果实内果皮横剖面着色组织的解剖特征, 并描述了花青素体的细胞学特征。结果表明, ‘红阳’果实中色素体的形成及着色细胞分布存在组织特异性。首次在猕猴桃果实中观察到2种花青素体形态, 一种是规则的圆形色素体, 另一种是小颗粒色素体; 本研究还观察到花青素色素体载体的形态特征及其解体与液泡化过程。‘红阳’猕猴桃开花后30 d时, 果实内果皮的圆形色素体出现在维管束及其周围的小细胞里, 开花后68 d, 小颗粒色素体开始在大的薄壁细胞里出现; 在花后117 d, 维管束及其周围小细胞仍在形成大量色素体颗粒。通过电镜观察表明, 在这个时期的内果皮薄壁细胞中可以观察到大量的色素体载体(AVI carriers), 这些载体内存在多种不同形态的色素体, 可能反映了薄壁细胞的着色过程。有的色素体仍呈现圆形, 有的呈现新月形或者其它不规则形, 总体上载体内的这些色素体变得越来越小且越来越不规则, 最终导致色素体载体不同程度的液泡化。这些结果暗示了红肉猕猴桃果实色素体的形成部位、细胞学形态特征以及色素体的解体与花青素释放过程, 表现了“移位释放”的特点。

关键词: 红肉猕猴桃; ‘红阳’; 花青素体; 色素体载体; 液泡化

中图分类号: S663.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2012)05-0702-05

Cytological observation of anthocyanoplasts in fruit of a red-fleshed kiwifruit cultivar, ‘Hongyang’ (*Actinidia chinensis*)

LUO Bin-bin^{1,2}, WANG Dong-liang¹, MAN Yu-ping², TANG Xu-lin³, WANG Yan-chang²

(1. School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 2. Wuhan Botanical Garden, Wuhan 430074;

3. Akesu Detection Station of Countryside Energy and Environment in Xinjiang, Akesu 843000)

Abstract: Although the biosynthetic pathways for anthocyanins and their regulation have been well studied, the cytology of anthocyanin accumulation is still less understood. Here, we used light and electron microscopy to investigate the anatomical features in pigmented inner pericarp of ‘Hongyang’, the mainly cultivated red kiwifruit in China, and to describe the cytological morphology of anthocyanoplasts. The results showed anthocyanoplasts and pigmented cells were formed in specific tissues. It was firstly observed that there are two forms of anthocyanoplasts, one is vesicle-like pigment bodies, and the other is the smaller intensely pigmented granule. Morphology, degradation and vacuolarization of anthocyanoplasts carriers (or anthocyanic vacuolar inclusions carriers) were also observed. Vesicle-like pigment bodies appeared in the small cells of vascular traces and its adjacent cells (VTs) in inner pericarp of ‘Hongyang’ at 30 days after flowering (DAF). In addition, at 68 DAF, smaller intensely pigmented granules were found in the bigger septum-originated parenchymatous cells (SEP). Anthocyanoplasts were kept in VTs at 117 DAF. Under electron microscopy, plenty of anthocyanoplasts carriers were observed in the bigger parenchymatous cells. Anthocyanoplasts in the carriers were showed to have multiple forms that reflected the coloration of the parenchymatous cells between each of two septums. Some were still keeping round, some were crescent-shaped, but others seemed to change to irregular. In general, those anthocyanoplasts became smaller and more irregular, and finally led to vacuolarization of the carriers to different extents. Our results

收稿日期: 2012-04-23

作者简介: 国家自然科学基金项目(3067143, 31171945)资助。

作者简介: 骆彬彬, 硕士研究生。E-mail: 79971002@qq.com

* 通讯作者: 王彦昌, 男, 博士, 副研究员。E-mail: kiwifruit@wbcas.cn

described the positions of anthocyanoplasts formation and their cytological features. It was suggested that the coloration of ‘Hongyang’ inner pericarp was attributable to anthocyanin release after the anthocyanoplasts shift from VTs to SEP.

Key words: red-fleshed kiwifruit; ‘Hongyang’; anthocyanoplasts; anthocyanoplasts carriers; vacuolarization

猕猴桃市场上共有 3 种颜色的果肉类型: 绿肉、黄肉和红肉, 其中红肉猕猴桃果实横切面内果皮隔膜之间的小腔室为红色, 使放射状组织的色彩鲜艳美观, 近几年开始进入国际市场, 受到中外消费者的广泛欢迎^[1-2]。由于猕猴桃属于藤本果树, 新品种选育周期长, 现有品种多数来源于实生选种, 而红肉猕猴桃野生资源分布极少, 现有主栽品种‘红阳’风味超过大多数品种, 但缺陷也十分明显, 例如适应性差, 易感染溃疡病, 着色易受环境影响, 在商业化过程中栽培管理技术体系还需深入研究。

果实内果皮部分的红色性状是红肉猕猴桃受到消费者青睐的主要原因之一, 为有效调控果实着色, 必须深入了解着色的机制及其内外影响因子。现已查明, 红肉猕猴桃果实着色的化学基础是花青素, 包括飞燕草素-3-[2-(木糖)-半乳糖苷]、飞燕草素-3-半乳糖苷、矢车菊素-3-[2-(木糖)-半乳糖苷]、矢车菊素-3-半乳糖苷以及矢车菊素-3-葡萄糖苷等^[3-4]。目前对植物中花青素合成代谢途径的多个催化酶及其调节基因已经有了较为详尽的了解, 基因相互作用以及对环境因子的响应是该领域当前的热点之一, 但花青素合成后需从细胞质进入液泡才能显色, 而目前对植物中花青素积累的细胞学过程及其相关机理了解很少^[5-6]。

Pourcel^[7]及 Zhang 等^[8]认为, 花青素在细胞中存在多种运转路径。第 1 种是一类谷胱甘肽 S-转移酶 (GST), 这些酶属于花青素结合蛋白, 可能将花青素从合成位置转运到液泡 (如 ATP-binding cassette 运转蛋白, 包括 MARP 及 GST 等)^[9]; 第 2 种是通过液泡膜上的 MATE (multidrug and toxic extrusion) 运转体运输^[10]; 第 3 种是原花青素或者花青素运转过程伴随液泡的形成和囊泡的作用, 即着色细胞的主要液泡可能是通过在合成位置含花青素的液泡前体囊泡生长形成的^[8]。来自多种植物花青素积累的研究表明, 植物花青素的囊泡运转模式普遍存在, 具有一些共同的特征。在植物组织中, 花青素积累的形态包括均匀着色的溶液、囊泡状体、规则或者不规则的浓密压缩体。如红色卷心菜心叶片及幼苗胚轴的花青素体是一种亲水颗粒, 约 10 nm, 具有球形膜结构, 幼苗早期花青素体小而多,

后期逐渐变大, 甚至合成为一个^[11-12]。在很多被子植物呈色器官中都存在一些花青素浓缩体, 被称为花青素液泡包涵体 (anthocyanic vacuolar inclusions, AVI)^[13]。根据洋桔梗花瓣表皮细胞所处位置不同, AVI 分别存在 3 种形态: 囊泡状、线状以及大的不规则 AVI, 大的不规则 AVI 可能是最终形式^[14]。花青素可能首先就近聚集在液泡前体中。这些液泡前体, 随着花青素体一起, 进一步发育并最终进入中央液泡, 将花青素运转进入中央液泡^[15]。

尽管红肉猕猴桃花青素途径的部分基因已经被克隆^[16-18], 研究人员正在解析这些基因及其调节因子的表达及作用模式, 但显然, 红肉猕猴桃着色不仅与这些基因对色素合成的贡献有关, 还与色素的运转有关, 红肉猕猴桃果肉的着色区是否存在特定结构的花青素体, 以及如何在液泡中积累均未有报道。本研究中, 作者用光学显微镜和电子显微镜观察‘红阳’猕猴桃内果皮的组织与细胞学结构, 概括描述了色素体的形态特征及分布, 为阐明花青素形成与积累的细胞生物学机制提供平台。

1 材料与方法

1.1 试验材料

研究材料来自四川苍溪文昌 (海拔 650 m) 8 年生的‘红阳’猕猴桃不同发育阶段 (花后 30 d、68 d、117 d 和 147 d) 的果实。树体的管理都依照当地商业生产规范, 采集‘红阳’猕猴桃 3 个枝条上 8~10 果实, 作为重复。

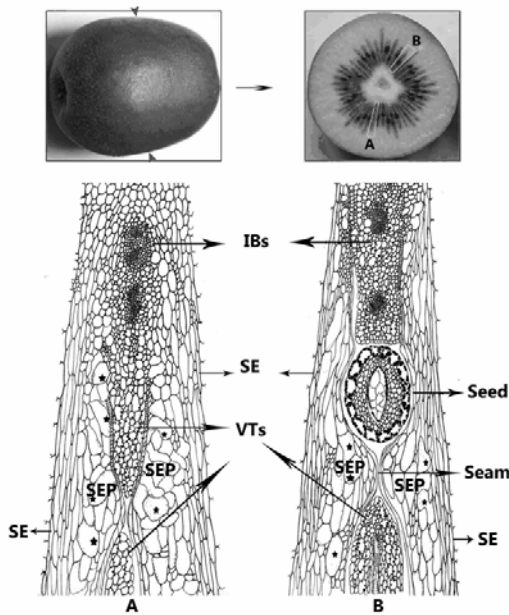
1.2 组织切片剂观察

徒手切片: 取成熟果实内果皮组织 (图 1), 轻轻压碎, 然后在装有数码相机的光学显微镜 (Olympus AX80, Tokyo, Japan) 下观察; 半薄切片: 取的内果皮组织用戊二醛固定, 然后用 1% 四氧化锇缓冲液固定, 再用不同浓度梯度的乙醇脱水, 再用环氧树脂渗入果实。半薄切片 (0.8 μm) 用甲苯胺蓝染色, 光学显微镜观察, 用相机拍摄图片; 超薄切片: 用花后 147 d 的果实内果皮隔区组织, 固定、脱水, 浸润。50 nm 的超薄切片放置在铜载网上, 乙酸铀酰染色后用柠檬酸铅, JEX-100CX II 透射式电子显微镜 (JEOL, TOKYO, Japan) 观察。

2 结果与分析

2.1 ‘红阳’果实内果皮组织结构

‘红阳’猕猴桃果实剖面包括乳白色果心、呈放射状的内果皮、中果皮及外果皮 4 个部分，其中呈现红色的区域主要是果心以外到中果皮之间的内果皮部分，与其它颜色猕猴桃果实类似，‘红阳’内果皮的‘放射线’属于隔膜组织，红色组织仅存在于相邻隔膜之间形成的小腔室中，由于隔膜组织近似白色，隔膜中间呈现红色果肉及黑色种子，因此表现出典型的放射状形态（图 1）。



A: 无种子小隔区横切面 Transsection of septal area without seed; B: 有种子小隔区横切片 Cross section of septal area with seed; IBs: 内向维管束及其周围小细胞 Inner vascular bundles and its adjacent small cells; VTs: 侧向维管束及其周围小细胞 Lateral vascular traces and its adjacent small cells; ES: 加长的隔膜细胞 Elongated septum; SEP: 隔膜衍生的薄壁组织 Septum-originated parenchymatous; Seed: 种子区; Seam: 缝合线; 星形表示在 VTs 组织内含有较大的黑色圆形色素体; 黑色球形表示在 SEP 组织内含有小颗粒色素体 (模式图由作者绘制)

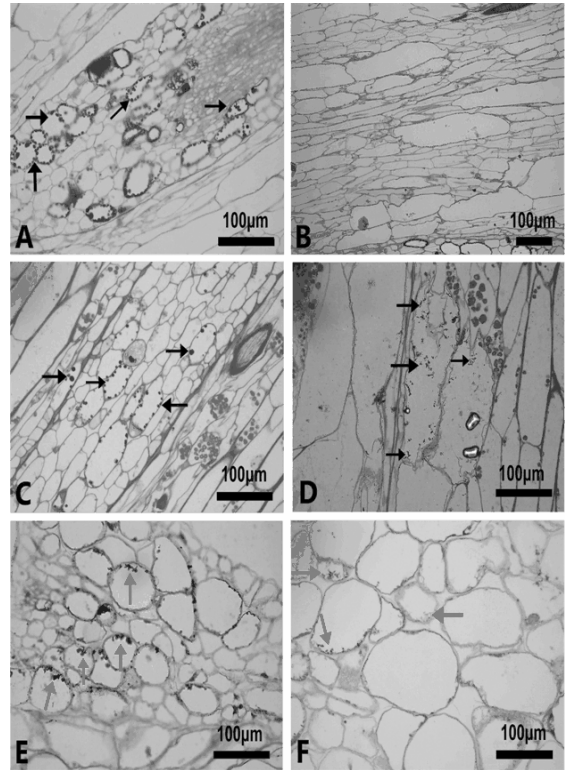
A: transverse section of locules without seed; B: transverse section of locules with seed; IBs: inner vascular bundles and its adjacent small cells; VTs: lateral vascular traces and its adjacent small cells; SE: elongated septum cells; SEP: septum-originated parenchymatous cells; Seed: a seed lies in this site, Seam: a line formed when placenta developing, stars indicate the smaller intensely pigmented granules contained in SEP, and black spheres indicate the vesicle-like pigment bodies

图 1 ‘红阳’果实内果皮组织结构模式

Figure 1 Cutaway model for the tissue structure of ‘Hongyang’ inner pericarp

通过光学显微镜对‘红阳’内果皮横切面的观察，可以发现发育的内果皮包括了种子 (seeds)、纵向隔膜 (ES: elongated septum) 细胞、与隔膜组织相

连的薄壁细胞 (SEP: septum-originated parenchymatous)、内部维管束及其周围小细胞 (IBs: inner vascular bundles and its adjacent small cells)、侧向维管束及其周围小细胞 (VTs: lateral vascular traces and its adjacent small cells) 等不同组织类型。发育初期，由心皮空腔形成的小室内包含了种子和侧向维管束小细胞。在每个种子两端，维管束及其临近小细胞之间可见缝合线 (seam) [19]。笔者在对‘红阳’猕猴桃横切面内果皮各组织进行大量观察的基础上绘制了猕猴桃内果皮的组织类型模式图，见图 1A、1B。



A、B: 花后 30 d; C、D: 花后 68 d; E、F: 花后 117 d; A、C、E: 侧向维管束及其周围小细胞区 (图 1 中的 VTs 区); B、D、F: 隔膜衍生的薄壁细胞 (图 1 中的 SEP 区); 箭头表示色素体

A and B: 30 days after flowering; C and D: 68 days after flowering; E and F: 117 days after flowering; A, C and E: lateral vascular traces and its adjacent small cells; B, D and F: septum-originated parenchymatous cells; The arrows indicate the the vesicle-like pigment bodies (in A, C and E) or smaller intensely pigmented granules (in B, D and F)

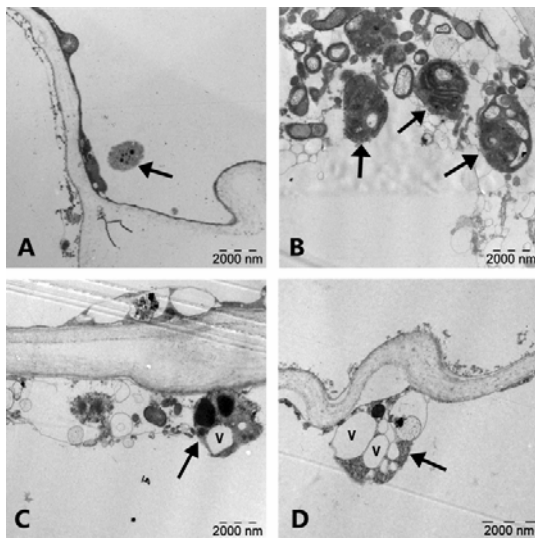
图 2 ‘红阳’果实内果皮花青素体分布

Figure 2 Distribution of anthocyanoplasts in ‘Hongyang’ inner pericarp

2.2 色素体的分布及形态

在‘红阳’果实内果皮靠近维管束的小细胞中发现规则的圆形黑色色素体，类似于已有报道中的规则的花青素液泡内含物。光学显微镜观察下，从花后 30 d 到花后 117 d，圆形色素体仅存在于内部维

管束及其周围小细胞 (IBs) 以及侧向维管束及其周围小细胞 (VTs) 中。花后 30 d, 多数出现在侧向维管束及其周围小细胞的圆形色素体沿着细胞壁边缘分布, 形似珠状, 此时包裹着小腔室的大薄壁细胞不含小颗粒色素体 (图 2A-B)。花后 68 d, 圆形色素体主要分布在隔膜附近且包裹着小腔室的大薄壁细胞里, 开始观察到小颗粒色素体, 而在隔膜附近且包裹着小腔室的大薄壁细胞里开始观察到小颗粒色素体, 这些颗粒体散布在细胞中, 或集聚在细胞膜边缘 (图 2 C-D)。花后 117 d, 内果皮侧向维管束及其周围小细胞 (VTs) 中的圆形色素体仍在大量形成, 但倾向于积聚在细胞膜边缘 (图 2 E-F)。



A: 尚完整的色素体载体, 内含圆形色素体; B: 色素体载体内的色素体已经开始变形, 染色变弱, 部分区域开始液泡化; C: 在色素体载体内形成液泡, 但尚存在正在解体中的色素体; D: 在同一个色素体载体内产生多个液泡, 液泡明显吞噬了色素; A、B、C、D 均为图 1 中的 SEP 区

A: Intact AVI carriers that contain the vesicle-like pigment bodies; B: The pigment bodies distorted in form contained in AVI carriers, less stained and starting the vacuolization; C: vacuole formed in AVI carriers and degrading pigment bodies; D: several separated vacuoles in AVI carriers dissolving the pigments

图 3 ‘红阳’果实内色素体载体的液泡化及色素的释放

Figure 3 Vacuolarization of anthocyanic vacuolar inclusions carriers (AVIC) and release of anthocyanins in ‘Hongyang’ fruit

电子显微镜观察发现, 在‘红阳’果实着色后期, 内果皮薄壁组织的细胞质中存在许多特殊的“色素体载体 (AVIC: AVI carriers)” (图 3), 这些载体里存在不同形态的色素体, 完整的色素体着色均一, 但已经变形的色素体在大小、结构、电子密度上变化多样, 其边缘从平滑到粗糙, 凹凸不平。色素体载体形状大小也不一, 内部出现各种小空泡, 明显属于液泡化不同进程的特征 (图 3-B 及文献 [13])。

3 讨论

前人对猕猴桃果实从授粉受精开始到果实主体结构发育完成过程中的横切面形态结构进行了观察描述, 将猕猴桃果实横切面可分为 4 个部分, 其中较为特殊的是内果皮, 存在由隔膜分开的放射状小腔室^[19-20]。本研究描述了红肉猕猴桃着色过程内果皮各部分组织类型及其结构中色素颗粒的形态学特征、形成部位的组织特异性, 为阐明红肉猕猴桃着色的组织特异性机制、色素合成的组织定位提供了重要的细胞学平台。

本研究在红肉猕猴桃内果皮观察到了花青素色素体的 2 种形态, 圆形色素体以及小颗粒色素体的大小完全不同, 这 2 种结构的组织特异性分布极可能是色素合成运转不同阶段导致的。例如, 可能圆形色素体最初在维管束及其周围小细胞形成, 扩散至薄壁细胞并分散, 小颗粒色素体的存在可能是果肉着色的原因, 具有“移位释放”的特点。但 2 类色素体的形成、发育及其与果肉着色的关系还需要进一步研究。

在前人大量相关研究中, 光学显微镜下观察到的花青素体 (anthocyanoplasts), 被认为正是电子显微镜下对应的花青素液泡包涵体结构 (AVI)。本研究中, 我们在光学显微镜下观察到的圆形色素体以及在电子显微镜下观察到的色素体载体均与前人在多种植物中观察到的 AVI 结构或形态相似^[7,14], 但遗憾的是还未能充分证实圆形色素体与色素体载体属于同一种细胞器结构, 因此还不能确认二者的关系。不过电子显微镜下观察到的不同液泡化程度的色素体载体结构与此前在其它植物器官中观察到的色素体载体 (AVI) 极为相似^[11, 21-23], 而且这种结构并非只含有色素颗粒或由色素物质组成, 而是包含了多种其它结构及成分, 例如线粒体或内质网, 是一个可以液泡化的独立细胞器结构^[8, 14]。因此, 我们认为此前 Markham 等提出的 AVI 定义尽管从物质组成上是合理的, 但我们的观察及其它一些植物中的证据显示^[24-25], 该结构开始位于细胞质中, 其内部逐渐液泡化的过程伴随着色素向液泡的释放溶解, 并非简单地向已经形成的液泡中运转色素颗粒, 其内部也并非全部为一个色素体颗粒占据, 而是含有大量相当对独立的色素体颗粒, 因此该结构应更准确地被定义为“色素体载体”, 而不是“花青素液泡包涵体”, 因为 Markham 等提出的 AVI 定义只是由于该结构最初是在细胞的液泡内观察到的^[14]。在 Zhang 等的报道中, 3 种不同形态的无膜 AVI 可

能代表了 AVI 结构形成过程的 3 个连续的阶段, 不规则体被认识是最终的结构类型, 最终色素积累成为液泡中的不溶性大颗粒状态^[8]。Grotewold 等提出, 花青素运转通过运转蛋白 (LT: ligandin transporter) 及囊泡运转 (VT: vesicular transport) 2 种模式^[7]。前者例如玉米、矮牵牛及拟南芥中的 BZ2、MRP3、AN9、TT19, 后者如已经报道的多种色素体或色素内涵体结构^[7, 10, 26-28]。按照上述观点, 本研究中观察到的色素载体与早期在多种植物中发现的花青素体结构更为接近, 但未发现膜结构的明确证据; 此外, 色素载体内部的液泡化同时可能伴随色素的溶解释放过程, 这一点与 Zhang 等报道的 AVI 形成过程中从液泡前体隔区 (PVC: prevacuolar compartments) 释放并导致色素积累特征不同。有意思的是, 我们的结果与 Zhang、Grotewold 以及很多研究者用光学显微镜观察观察到的色素体结构类似, 可见上述花青素各类结构在植物器官着色过程中必然有时空关联之处, 有待于进一步深入的研究证据。本研究结果还为红肉猕猴桃花青素的囊泡运转模式提供了细胞学线索, 但运转的细节尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 王明忠, 吴伯乐. 红肉猕猴桃新品种的选育研究[J]. 资源开发与市场, 1996, 12(2): 51-54.
- [2] 王明忠. 红肉猕猴桃可持续育种研究[J]. 资源开发与市场, 2003, 19(005): 309-310.
- [3] Comeskey D J, Montefiori M, Edwards P J B, et al. Isolation and structural identification of the anthocyanin components of red kiwifruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(5): 2035-2039.
- [4] Montefiori M, Comeskey D J, Wohlers M, et al. Characterization and quantification of anthocyanins in red kiwifruit (*Actinidia* spp.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(15): 6856-6861.
- [5] 程海燕, 李德红. 光, 糖与激素影响植物花色苷合成与积累的研究进展 (综述)[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(3): 82-86.
- [6] Winkel B S J. Metabolic channeling in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 85-107.
- [7] Pourcel L, Irani N G, Lu Y, et al. The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments [J]. Molecular Plant, 2010, 3(1): 78-90.
- [8] Zhang H, Wang L, Derolles S, et al. New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals [J]. BMC Plant Biology, 2006, 6(1): 29.
- [9] Larsen E S, Alfenito M R, Briggs W R, et al. A carnation anthocyanin mutant is complemented by the glutathione S-transferases encoded by maize Bz2 and petunia An9 [J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(9): 900-904.
- [10] Goodman C D, Casati P, Walbot V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*[J]. The Plant Cell Online, 2004, 16(7): 1812-1826.
- [11] Nozzolillo C, Ishikura N. An investigation of the intracellular site of anthocyanoplasts using isolated protoplasts and vacuoles [J]. Plant Cell Reports, 1988, 7(6): 389-392.
- [12] Small C J, Pecket R C. The ultrastructure of anthocyanoplasts in red-cabbage[J]. Planta, 1982, 154(2): 97-99.
- [13] Kitamura S. Transport of flavonoids: from cytosolic synthesis to vacuolar accumulation [J]. The Science of Flavonoids, 2006: 123-146.
- [14] Markham K R, Gould K S, Winefield C S, et al. Anthocyanic vacuolar inclusions--their nature and significance in flower colouration[J]. Phytochemistry, 2000, 55(4): 327-336.
- [15] Poustka F, Irani N G, Feller A, 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[J]. Plant Physiology, 2007, 145(4): 1323-1335.
- [16] 杨红丽, 王彦昌, 姜正旺, 等. '红阳'猕猴桃 cDNA 文库构建及 F3H 基因的表达初探[J]. 遗传, 2009, 12: 1265-1272.
- [17] 杨俊, 姜正旺, 王彦昌. 红肉猕猴桃 DFR 基因的克隆及表达分析[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(6): 673-681.
- [18] Montefiori M, Espley R V, Stevenson D, et al. Identification and characterisation of F3GT1 and F3GGT1, two glycosyltransferases responsible for anthocyanin biosynthesis in red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*)[J]. The Plant Journal, 2011, 65(1): 106-118.
- [19] Hopping M E. Structure and development of fruit and seeds in Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis* Planch.)[J]. New Zealand Journal of Botany, 1976, 14(1): 63-68.
- [20] Possingham J V, Coote M, Hawker J S. The plastids and pigments of fresh and dried Chinese gooseberries (*Actinidia chinensis*)[J]. Annals of Botany, 1980, 45(5): 529-533.
- [21] Nakamura M. Development of anthocyanoplasts in relation to coloration of 'Kyoho' grapes [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1989: 58.
- [22] Nakamura M. Anthocyanoplasts in 'Kyoho' grapes [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 1993: 62.
- [23] Nakamura M. Distribution and formation of anthocyanoplasts in the skin of "Kyoho" grapes [Vitis][J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1994: 62.
- [24] Lin Y, Irani N, Grotewold E. Sub-cellular trafficking of phytochemicals explored using auto-fluorescent compounds in maize cells [J]. BMC Plant Biology, 2003, 3(1): 10.
- [25] Wise R R. The diversity of plastid form and function [M]// Wise R R, Hooper J K. The structure and function of plastids. Springer verlag, 2006: 3-26.
- [26] Marris K A, Alfenito M R, Lloyd A M, et al. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2[J]. Nature, 1995, 375: 397-400.
- [27] Mueller L A, Goodman C D, Silady R A, et al. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein [J]. Plant Physiology, 2000, 123(4): 1561-1570.
- [28] Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A. Transparent testa 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2004, 37(1): 104-114.