

발아중인 종자로부터 Salinity Stress에 의해 유도되는 Anthocyanin과 Betaine에 관한 연구

이 인 순 · *문 혜 연
대구대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 2001. 6. 14., 게재승인 : 2001. 8. 17.)

Induction of Anthocyanin and Betaine by Salinity Stress in Germinating Seeds

In-Soon Lee and Hye-Yeon Moon†
Department of Biotechnology, Taegu University, Kyungbook 712-714, Korea
(Received : 2001. 6. 14., Accepted : 2001. 8. 17.)

The effect of salinity stress of *Brassica olearacea* and *Capsicum annuum* were studied at various levels of salinity conditions(Na-gluconate, K-gluconate, NaCl, KCl). The effects of salinity stress were measured by seedling growth rates and secondary metabolites contents of the stressed plants. Each seedling studied on the response of different salinity stress. Seedling growth of *Capsicum annuum* was inhibited up to 200 mM salt tolerance and *Brassica olearacea* was inhibited up to 400 mM salt tolerance. The produced anthocyanin was separated to high value from 200 mM NaCl in case of *Brassica olearacea* and 50 mM K-gluconate in case of *Capsicum annuum*. The BADH activity was very high in *Brassica olearacea* seedlings treated with 200 mM NaCl and in *Capsicum annuum* seedlings treated with 100 mM K-gluconate. The BADH activities were increased during the early culture days, it induced betaine synthesis. The salinity stress promoted BADH activity, subsequently endogenous betaine contents were increased, and it seemed to be secure seedling from salinity stress. The salinity concentration of 200 mM was effective on the inhibition of seed germination and on the increase of proline accumulation in tissue. The inhibition of seedling growth and accumulation of secondary metabolites in seedling were caused osmotic hypersensitivity against salinity stress.

Key Words : seedling growth, salinity stress, anthocyanin, betaine, BADH

서 론

최근 자연환경의 파괴로 인한 토양환경의 변화는 각종 오염원으로 인해 식물체에 스트레스를 유발하는 원인으로 부각되고 있으며, 특히 작물에 직간접적으로 작용하여 전체 수확량을 감소시키고 있다(1). 이러한 여러 요소 중 염분에 의한 오염은 식물에 salinity hypersensitivity를 유발하여 세포성장의 안정성을 저해하여 세포주기를 변화시키며, 또한 토양내의 이온적 변화를 초래하여 식물세포에 osmotic adjustment, osmoprotection과 osmotolerance를 유도한다. 이러한 식물은 공통적으로 수분 팽압의 균형이 파괴되는데 그로 인해 식물은 생리대사를 조절하게 되고 그 결과, proline과 glycine

betaine, polysol 등의 특이적인 2차대사산물들이 합성된다(2-10).

2차대사산물로 알려진 식물색소 anthocyanin은 flavonoid계 열로서 주로 red, pink, purple blue색의 꽃잎, 열매에서 발견된다. anthocyanin의 기능은 UV로부터 식물을 보호하며 병원성 미생물에 대항하는 항생제와 같은 물질로 식물과 미생물의 상호작용, 꽃가루와 암술의 신호전달제로 작용한다(11-16, 24). 이 색소는 외부의 다양한 스트레스(자외선, 고광도 빛, 병원성 물질 흡착, 건조, 영양분 변이)에 의해 과량으로 유도되는 것으로 알려지고 있으며 최근에는 산업적으로 이용도가 높아져 식품 첨가제와 의약품 보조제로써 널리 사용되고 있다. 또한, proline과 betaine은 많은 식물에서 염 스트레스에 의해 축적되는 특이적 산물로 알려져 있으며 스트레스에 적응하고 있음을 나타내는 표식물질로 이용된다. Betaine의 합성대사과정은 전구체인 choline이 betaine aldehyde로 변하며 betaine aldehyde에서 betaine으로 전환이 된다. 두번째 대사과정에서 betaine aldehyde dehydrogenase (EC 1,2,18, BADH)라는 효소

†Corresponding Author : Department of Biotechnology, Taegu-University, Kyungbook 712-714, Korea
Tel : +82-53-850-6552, Fax : +82-53-850-6559
E-mail : moonhy@taegu.ac.kr

의 분해작용에 의해 최종 산물인 betaine이 합성되는데, 이 물질은 의약제제로써 근단력과 근퇴화를 치료하는 치료제로 이용되고 있으며 주로 내염성 작물로부터 분리·정제되어 상품화 되고 있다(17-19). Proline은 secondary amino acid로써 glutamate를 전구체로 하여 합성되며, 식물세포의 액포안에 염 성분이 축적되지 않도록 하기 위해 보호제와 같은 역할로 분비되어 삼투압을 조절하는 기능을 가지고 있다(20-24).

이와같이 염 성분의 영향은 식물의 성장을 둔화시킴과 동시에 유전학적인 변이도 동반하고 있으며, 그 중에서도 NaCl에 의한 스트레스는 대부분의 식물에 작용하여 생리적 변화를 유발하는 주요 원인이 되고 있다. 식물체의 생리적 변화는 2차대사를 유도하게 되며 이 과정에서 유용한 물질들이 생산되기 때문에 이러한 대사변화를 활용한다면 산업적 응용 또한 가능해 질 것이다. 따라서, 본 연구에서는 염에 의한 스트레스가 식물에 미치는 영향을 분석하기 위해 고추와 양배추의 종자를 스트레스 조건배지하에서 발아를 유도하여 유묘의 분화와 성장효율을 알아 보았으며, 아울러 염분 스트레스에 의해 생성되는 표식물질인 proline과 betaine생합성에 필요한 BADH활성을 염 성분과 농도별로 분석하였다. 이 결과를 토대로 BADH활성이 가장 높은 조건을 선정하여 배양시간에 따른 BADH 활성변화와 betaine생합성과의 관계를 구체적으로 알아 보았다. 또한, 2차대사산물인 anthocyanin을 스트레스 조건별로 추출·분석하여 식물체의 salinity stress physiology를 이해하였으며, 영양분 변이에 의해 합성이 유도되는 특이적 2차대사산물인 betaine과 anthocyanin의 대량생산에 대한 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료와 조직배양법

식물재료는 양배추(*Brassica olearacea*, "YR湖月")와 고추(*Capsicum annuum*, "거성고추")의 종자를 종묘상으로부터, 시약은 미국의 Sigma회사 제품을 구입하여 사용하였다. 구입한 식물종자는 70% ethanol에서 30초간 살균 후 멸균된 증류수로 3회 이상 세척한 다음 1% sodium hypochlorite에서 20분간 살균하였다. 살균이 끝난 종자는 멸균된 증류수로 5회 이상 세척한 다음 5시간 이상 침윤하였다. 침윤된 종자는 여러 조건농도(대조구, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM, 1000 mM)의 염 성분이 첨가된 MS (Murashige and Skoog, pH 5.8) stress 조건배지에서 발아시켰다. 이때, 광조건은 광기에서 16시간, 암기에서 8시간을 선정, 25℃에서 10일간 배양하여 종자 발아를 유도하였다. 염분 스트레스의 효과를 보다 구체적으로 알아보기 위해서 배지에 첨가되는 염의 성분을 NaCl, KCl과 Cl⁻가 제거된 Na-gluconate, K-gluconate로 각각 선정하여 동일한 농도 조건을 적용하였다.

유묘성장효율

염분이 포함된 조건배지에서 자라고 있는 유묘의 성장 지수를 알아보기 위해 1일 간격으로 고추와 양배추의 길이와 발아 효율을 측정하였다. 유묘의 성장 지수와 모든 물질 추출은 3번 반복 실험한 결과를 토대로 평균하였다.

Anthocyanin추출 및 분석

다양한 염분농도가 처리된 조건배지에서 10일간 배양한 고추와 양배추의 유묘를 이용하여 추출용액인 propanol: HCl:H₂O (18:1:81, v/v)를 1 g당 5 ml씩 처리하여 분쇄한 후 3분간 끓인 다음, 25℃에서 12시간 반응을 유도하여 추출된 용액을 535 nm와 650 nm에서 각각 흡수치를 측정하여 그 차이값을 anthocyanin분석 수치로 이용하였다(2). 유묘의 성장이 없는 경우에는 조건배지에서 배양된 종자를 물질 추출에 이용하였다.

Betaine aldehyde dehydrogenase(BADH)정제와 효소활성 측정

조건배지에서 10일간 배양한 고추와 양배추의 유묘를 5 g씩 채취하여 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT와 10% polyvinylpyrrolidone이 포함된 50 mM MOPS-NaOH (pH7.5) buffer와 함께 분쇄한 다음, 16,000 g에서 30분간 원심분리하여 상등액만을 취하여 ammonium sulfate로 포화도 55%로 포화한 후 상등액을 원심분리로 회수하여 포화도 70%로 재포화를 유도하였다. 16,000 g에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물은 2 mM DTT, 1 mM EDTA와 10% glycerol이 첨가된 50 mM MOPS-NaOH(pH7.5) buffer로 녹인 다음 동일한 buffer로 투석을 하였다(17). 이렇게 얻어진 BADH는 Claudine방법(19)을 적용하여 340 nm에서 효소활성을 측정하였다.

Betaine추출 및 분석

Endogenous한 betaine을 얻기 위해 스트레스 조건배지에서 고추와 양배추 종자를 발아시켜 1일 간격으로 고추와 양배추의 유묘를 5 g씩 채취하였으며 0일은 각 조건배지에서 6시간 발아를 유도한 것을 적용하였다. 채취한 조직은 methanol, chloroform과 물이 12:5:3으로 섞인 용액을 fresh weight g당 5 mL씩 처리하여 분쇄한 다음, 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액만을 회수하였다. Evaporator로 추출용 용매를 제거한 후, AG50W-X4(200-400 mesh Bio-Rad)로 column (2x15)을 제작하여 4 M HCl로 용출하였다. 용출된 용액은 evaporator로 건조후 1 mL D₂O와 4 μM t-butanol로 녹인 다음, ¹H NMR spectra(Varian-Mercury 300)를 이용하여 spectral width 1,000Hz, frequency 90MHz로 분석하였다(17).

Proline추출 및 분석

염이 포함된 조건배지에서 10일간 배양된 각각의 식물조직으로부터 proline을 추출하였다. 고추와 양배추의 조직을 2 g 정도 취하여 proline 추출용액인 3% sulfosalicylic acid를 g당 4 ml씩 처리하여 조직분쇄기로 분쇄한 다음, 12,000 g에서 10분간 원심분리를 하였다. 상등액만을 취하여 acid ninhydrin을 처리한 후 1시간 동안 중탕한 다음, 흡광도 520 nm에서 흡수치를 측정하여 검정하였다. Proline의 양은 fresh weight 당 μmol로 산출하였다(20).

결과 및 고찰

유묘성장과 발아 효율

양배추와 고추종자를 염분이 포함된 조건배지에서 발아를

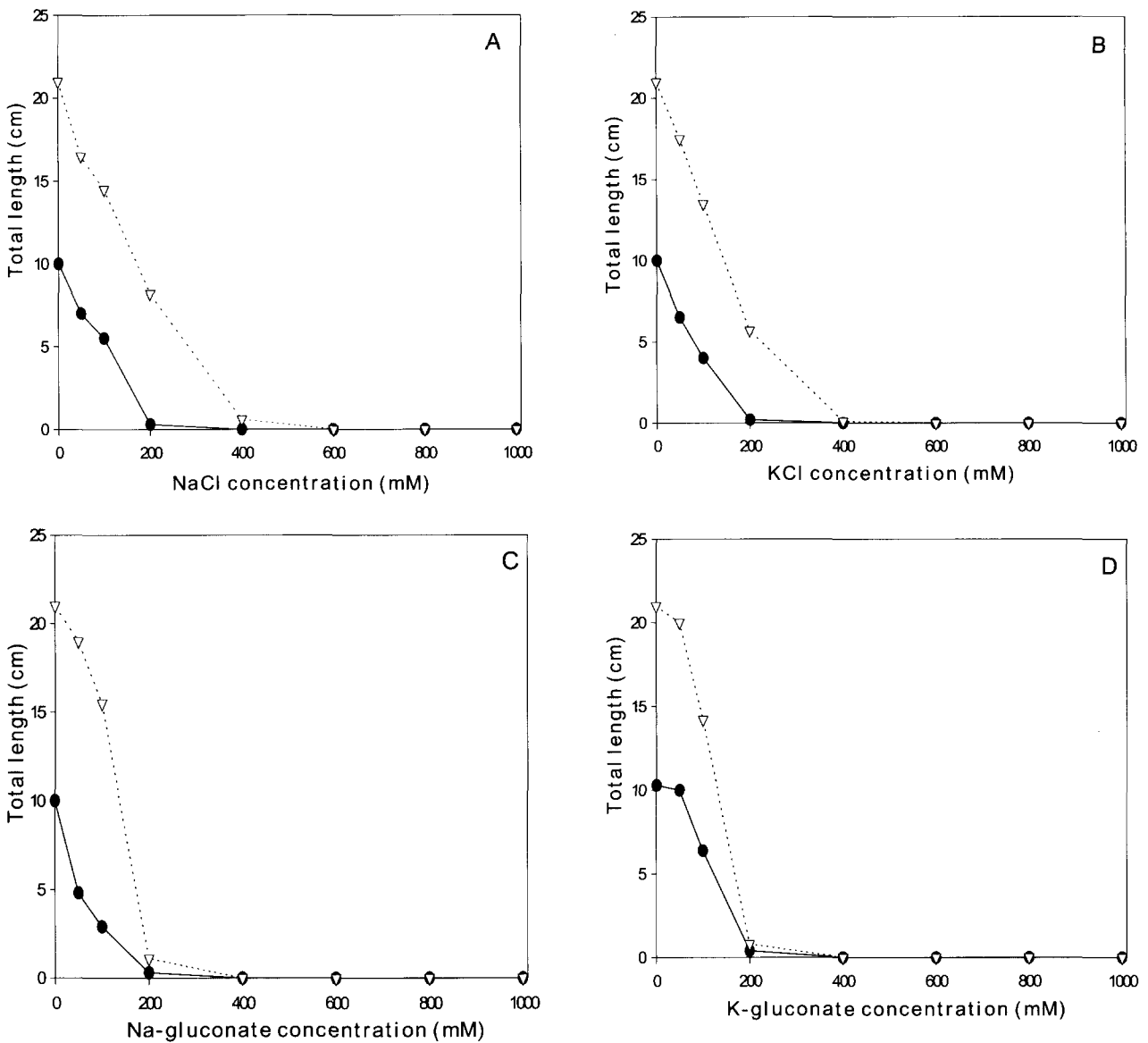


Figure 1. Changes in germination rates under different salinity stress. Seeds of *Brassica oleracea* and *Capsicum annuum* were cultivated for 10 days on the medium containing various concentrations of NaCl(A), KCl(B), Na-gluconate(C), K-gluconate(D). To calculate the average of germination rate, more than 30 seeds were used for each treatment. The 6 hrs cultivated seeds were used as 0 day samples and germination rates were determined after 10 days. The experiments were repeated at least 3 times. —●— : *Capsicum annuum*, —▽— : *Brassica oleracea*.

유도하여, 각 농도별로 유묘 성장 지수를 확인하였다(Figure 1) 양배추의 경우, 높은 농도인 600 mM에서도 발아는 유도되지만, 발아상태만 유지되고 떡잎의 성장 및 뿌리의 분화는 관찰할 수 없었으며, 특히, 400 mM KCl과 200 mM K-gluconate에서부터는 분화된 조직이 갈변화되면서 괴사되는 현상이 나타났다. 이는 양배추의 경우, K⁺의 해리농도가 높아 식물체의 intracellular대사에 영향을 주어 세포의 노화를 촉진하여 성장억제작용을 나타내는 것으로 추론된다. 고추의 경우 갈변화 현상은 나타나지 않는 반면에 400 mM 이상의 모든 조건 배지에서 동일하게 종자의 발아와 유묘의 성장이 거의 일어나지 않는 것을 알 수 있었다. 이 두가지 사실에서 양배추가 고추에 비해 염분에 더 민감하게 적응하여 성장하는 작물로 판단되며, 이는 뿌리조직의 분화과정을 살펴보면

서 확인할 수 있었다. 고추의 경우는 염분농도가 50 mM, 100 mM일때 뿌리털의 성장이 왕성해지다가 1차 근의 성장이 눈에 띄게 둔화된다는 것을 관찰할 수 있었으며, 양배추의 경우는 뿌리의 전체적 분화가 두드러지게 관찰되다가 200 mM에서는 1차 근의 분화가 더 왕성해짐을 알 수 있었다. 이 현상은 배지내에 첨가한 염 성분이 hyperosmotic stress를 유발, cellular ion homeostasis를 파괴함으로써 뿌리의 성장과 분화를 변화시킨다는 것을 시사하는 것으로 각각의 염분농도와 식물의 종, 환경에 대한 적응도에 따라 다른 반응이 나타난다는 것으로 생각된다(1, 3). 결국, 염 스트레스는 삼투현상과 관계있는 뿌리조직의 분화를 억제시킴으로써 종자발아에 요구되는 수분의 흡수를 방해하여 유묘의 성장을 둔화시키는 것으로 판단된다.

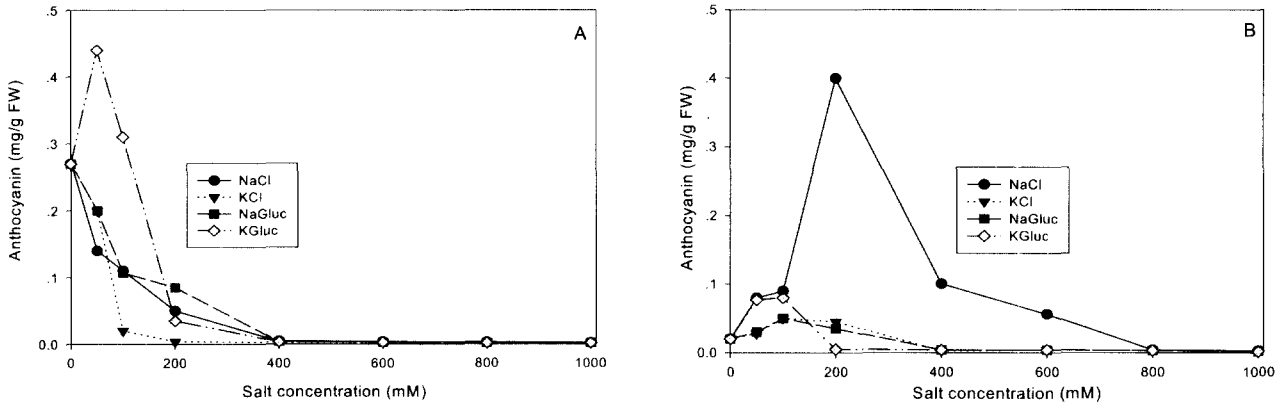


Figure 2. Effect of different salinity stress on the anthocyanin product in seedlings. Anthocyanin was extracted from 2 g fresh weight tissues with propanol:HCl:H₂O (18:1:81). The extraction solution were measured at 535 nm and 650 nm respectively, and the difference between these two readings was used as a measure of anthocyanin concentration. The 6 hrs cultivated seeds were used as 0 day samples. Anthocyanin product was determined after 10 days. The experiments were repeated at least 3 times. *Capsicum annum*(A) *Brassica olearacea*(B)

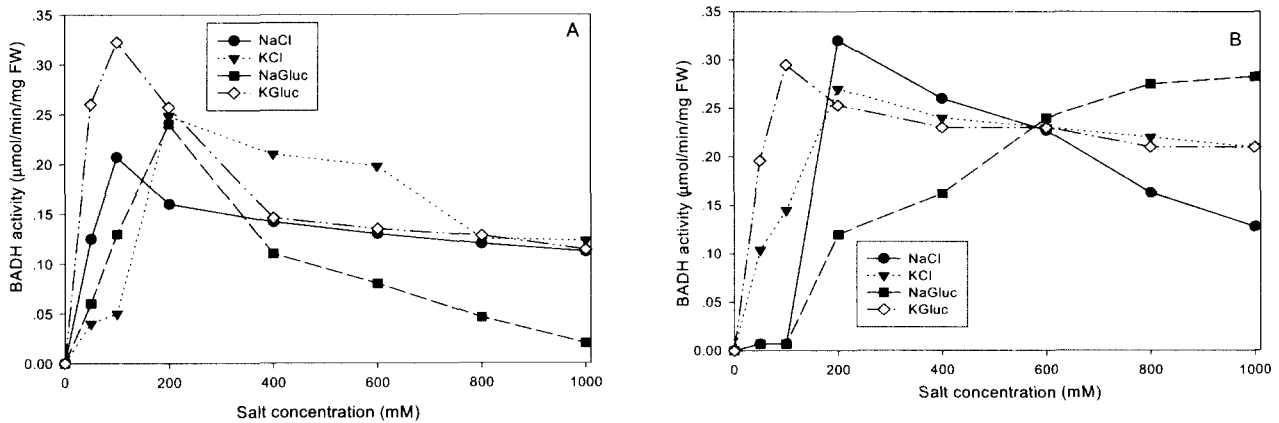


Figure 3. BADH(betaine aldehyde dehydrogenase) activity assay of *Capsicum annum*(A) and *Brassica olearacea*(B) seedlings under condition medium during germination. The extraction of BADH was used for each treatment tissue, and separated from the protein content of 55-70% saturated ammonium sulfate fraction. The 6 hrs cultivated seeds were used as day 0 samples and that determined after 10 days. The experiments were repeated 3 times at least.

Anthocyanin 분석

10일간 조건배지에서 배양된 고추와 양배추의 유묘로부터 2차 대사산물인 anthocyanin을 추출하였다(Figure 2). 고추는 50 mM K-gluconate가 첨가된 조건배지에서 성장한 유묘의 조직에서 가장 높은 값으로 anthocyanin이 검출되었으며 양배추의 유묘는 200 mM NaCl이 첨가된 조건배지에서 자란 것이 가장 많은 양으로 검정되었다. 염 성분은 식물세포에 수분스트레스를 유발하게 되며, 이를 신호로 생리적 반응이 2차 대사반응으로 유도되면서 색소관련 유전자를 촉진하는 물질들이 합성되어, 유묘로 성장하는 동안에 anthocyanin의 생합성이 증가하는 것으로 사료된다. 실험 결과를 분석해 보면 고추유묘에서는 K⁺이, 양배추유묘에서는 Na⁺이 신호인자로 작용하는 것으로 판단된다. 이는 식물체내에 전달된 환경변이가 1차적으로 transcription factor들을 만들어 대사조절을 유발하는데 이때, anthocyanin의 생합성에 영향을 미치는 transcription factor인 MYC-related protein이 유도되어 색소관련유전자를 특이적으로 발현시켜, anthocyanin의 생합성을 유도한다는 Kazuo(9)와 Urao(14)의 보고와 일치하는 것으로

이는 환경변이로 작용한 염 성분이 flavonoid계 색소의 생합성 경로 중 외부의 환경 변화에 가장 민감하게 반응하는 PAL (phenylalanine ammonia lyase)유전자를 transcription factor인 MYC-related protein이 자극함으로써 anthocyanin의 합성을 증가시키는 것으로 추측된다(11, 23).

Betaine분석과 BADH 활성

염분 스트레스에 따른 생리대사의 변화로 합성되는 betaine에 대해 구체적으로 알아 보기 위해 모든 조건배지에서 자란 유묘조직로부터 BADH를 분리하여 활성을 확인한 결과 고추는 100 mM의 K-gluconate에서, 양배추는 200 mM의 NaCl이 처리된 조건배지에서 가장 높은 활성을 보였다(Figure 3). 이 사실을 토대로, BADH 활성과 betaine 생합성과의 관계를 분석하기 위해 BADH 활성이 가장 높았던 염 성분의 농도를 첨가한 각각의 조건배지에서 자란 고추와 양배추의 유묘로부터 1일 간격으로 10일 동안 betaine과 BADH를 분리·정제하였다(Figure 4). 200 mM NaCl이 첨가된 배지에서 자란 양배추 유묘에서는 1일이 경과하였을 때 BADH의 활성이 증가하

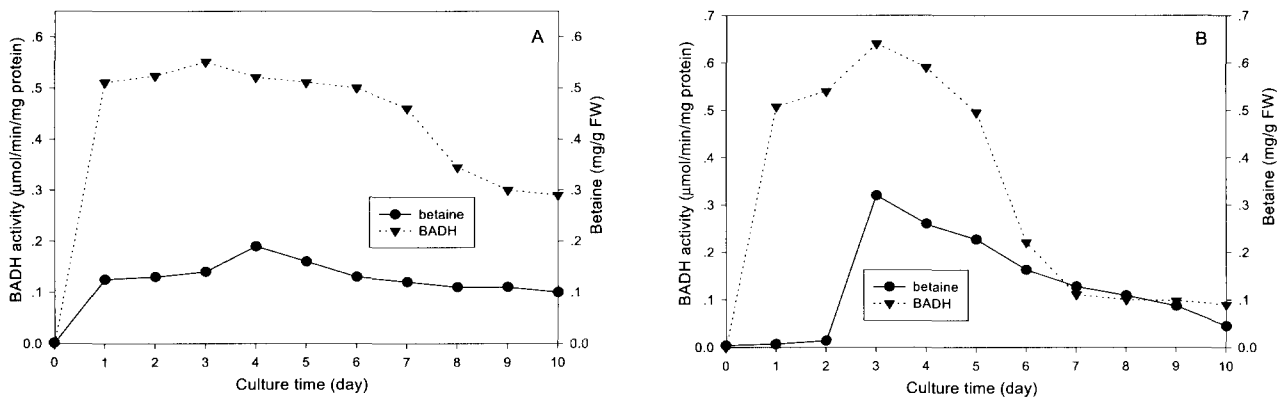


Figure 4. Changes of betaine and BADH activities. Seeds of *Brassica oleracea*(A) and *Capsicum annuum*(B) were cultivated for 10 days by the intervals one day on the medium containing each 200 mM NaCl and 100 mM K-gluconate. For betaine analysis, the extracts from seedling and seeds were calculated from the ¹H NMR spectrum. Betaine and BADH were extracted from tissues of 5 g fresh weight treated with salts.

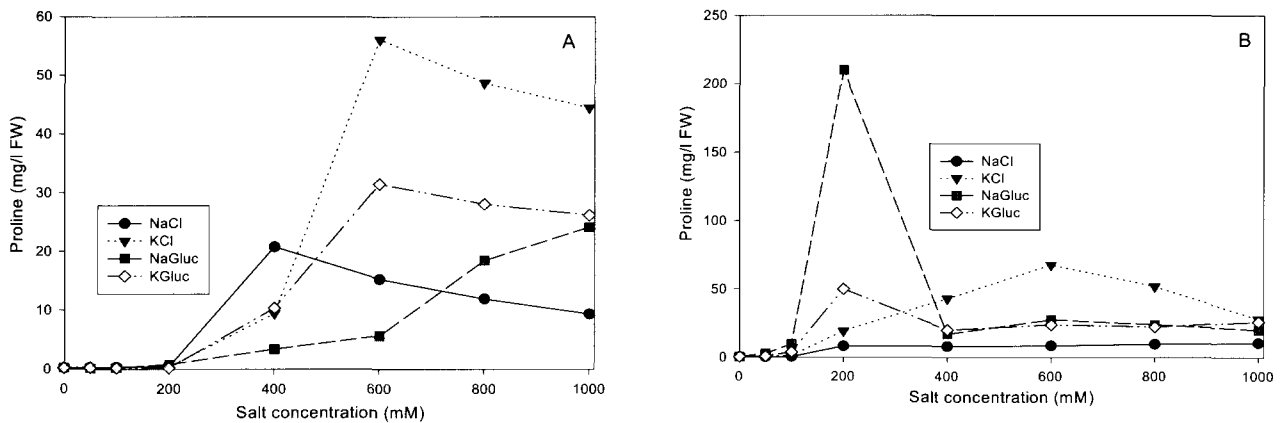


Figure 5. Changes in proline levels of *Brassica oleracea*(A) and *Capsicum annuum*(B) seedlings under salinity stress during germination. Proline were extracted from 2 g fresh weight tissues with 3% Sulfosalicylic acid. The 6 hrs cultivated seeds were used as day 0 samples. Proline levels were determined after 10 days. The experiments were repeated 3 times at least.

기 시작하여 4일이 지난 후로는 급격하게 활성이 감소하기 시작하였으며, betaine은 3일간 배양했을 때 가장 많은 양이 정제되었을 뿐 BADH 활성이 떨어지는 시기와 동일하게 감소하다 배양 7일째부터는 거의 일정한 양으로 분석 되었다. 100 mM K-gluconate가 첨가된 조건배지에서 배양한 고추의 유묘에서는 양배추와 동일하게 1일이 경과했을 때 BADH 활성이 증가하기 시작하여 배양 7일째부터는 활성이 감소하였으며, betaine은 배양 3일째에서 가장 많은 양이 정제되었고 7일을 배양한 이후의 조직에서는 거의 유사한 양으로 검출되었다. 이들 결과에서 알 수 있듯이 식물세포는 스트레스 조건배지에서 발생하는 초기에 염 성분에 대해 가장 민감하게 영향을 받는 것으로 보이며 또한, 유묘의 성장이 왕성한 시기(2일~6일)에 액포 보호물질인 betaine의 양이 증가하는 것으로 판단된다. 이는 염분에 의해 발생하는 2차적 수분 스트레스에 식물세포가 적응하는 과정에서 변화된 생리조건이 BADH의 발현을 유도하게 되며, 이 효소의 활성이 결국 2차 대사산물인 betaine합성을 조절하게 된다는 것을 시사하고 있다(17, 18). 이 현상은 높은 농도로 처리된 염 성분이 발아 초기에는 독성물질로 작용하여 hypersensitivity를 유발하기 때문이며, 유묘성장시에는 액포내에 염 성분이 비정상적으로

축적되는 것을 방지하기 위한 것과 액포의 노화 및 세포질 효소의 활성을 보호하기 위해 세포내 ion homeostasis를 유지 삼투 팽압의 이상을 조절하기 위한 것으로 추론된다.

Proline추출 및 검정

고추와 양배추 종자를 염이 포함된 조건배지에서 10일 동안 배양한 다음 유묘조직을 이용 세포내부에 축적된 proline을 추출하였다(Figure 5). 고추와 양배추 모두에서 조건배지 농도가 200 mM일 때 부터 proline의 검출량이 증가되는 것으로 분석되었다. 이 결과는 종자의 발아는 유도되지만 유묘로서의 성장이 둔화되는 시점과 일치하였다. 이는 종자발아에 요구되는 수분의 흡수시 조건배지에 포함된 염 성분이 과잉흡수됨으로써 생리반응의 교란이 일어나 proline의 전구체인 glutamate의 축적이 유발되고, 따라서 secondary amino acid인 proline이 과량 합성되는 것으로 판단된다. 특히, glutamate로부터 proline의 생합성을 유도하는 신호기능을 가진 K⁺이 다량으로 첨가된 조건배지에서 배양한 고추와 양배추의 유묘조직이 높은 수치의 proline값을 갖는다는 것이 이를 증명하는 것이다(8). 고추의 경우 Na⁺ 성분이 첨가된 조건에서는 proline의 양이 일정한 농도를 유지하는 것은 Na⁺ 농

도가 일시적으로 증가되면서 tonoplast와 세포질에 발생할 수 있는 이상현상을 방지하기 위한 보호제로 사용하기 위해 proline 생합성을 증가시키는 것으로 판단된다. 이는 저염성 식물에서 뚜렷하게 나타나는 현상으로 염분에 대한 스트레스 정도를 파악하는 표식물질로 proline을 이용하고 있다(7). 이러한 결과들을 통해 식물이 염 스트레스에 적응해 가는 생리 현상을 이해할 수 있었으며 식물배양조건을 조절하므로써 특이적 대사산물인 betaine과 anthocyanin을 더 많이 합성하도록 유도할 수 있음을 알았다. 이는 앞으로 식물세포배양 기술과 함께 유용물질 대량생산이 가능함을 시사하고 있다.

요 약

염 성분이 처리된 조건배지에서 발아를 유도한 양배추와 고추 종자는 각각 400 mM, 200 mM의 염분농도에서부터 발아상태만 유지되고 유묘로서의 성장은 더 이상 진행되지 않았다. 뿌리의 분화에서 고추의 경우는 성장하는 유묘에서 뿌리털만이 왕성하게 분화되는 것을 관찰할 수 있었지만, 양배추는 전체적으로 고른 뿌리털의 분화가 유도되다가 200 mM에서는 오히려 1차 근의 발달이 두드러지게 나타났다. 이러한 뿌리털의 뚜렷한 분화 현상은 염에 의한 hyperosmotic stress에 대하여 식물 세포가 cellular ion homeostasis를 유지하기 위한 것으로, 이러한 영향이 뿌리조직 중 1차 근의 분화가 둔화되고 결국 유묘의 성장이 억제된다. 유묘로부터 anthocyanin을 추출한 결과 양배추의 경우는 200 mM NaCl 첨가 배지에서, 고추는 50 mM K-gluconate 첨가배지에서 가장 많은 anthocyanin이 검출되었다. 이 결과는 염분 스트레스에 의해 식물색소의 합성량을 변화시킬 수 있다는 것을 시사하는 것으로 이 조건을 토대로 식물체로부터 anthocyanin의 합성을 다량으로 유도할 수 있을 것이다. Betaine합성과 BADH와의 관계를 알아본 결과, 영양변이에 의한 스트레스가 BADH의 활성을 유도하게 되며 아울러 betaine 생합성을 조절하고 있음을 알 수 있었다. 고추는 100 mM의 K-gluconate 첨가 배지에서, 양배추는 200 mM의 NaCl이 처리된 조건배지에서 발아되는 초기에 염분에 대해 많은 영향을 받는 것으로 보이며 유묘의 성장이 왕성한 시기에 betaine의 함량이 증가하였다. Anthocyanin 추출과 BADH활성에서 알 수 있듯이 고추는 K^+ 이, 양배추는 Na^+ 이 수분 스트레스의 신호로 작용하여 다양한 transcription factor를 합성함으로써 2차 대사반응을 유도하는 것으로 판단된다. 이 과정에서 식물조직은 염분 스트레스에 따른 특이적 산물과 여러 유용물질을 합성하게 되는 것이다. Proline과 betaine은 높은 농도로 처리된 염 성분이 액포내에 축적되는 것을 방지하여 액포의 노화와 세포질의 효소활성을 보호하여 세포내 ion homeostasis를 유지하고 삼투대사를 조절하여 액포를 보호하는 인자와 같은 역할을 한다.

감 사

본 연구는 대구대학교 학술연구조성비(일반과제)지원사업에 의한 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. D. W. Rains(1996), Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress : How to interpret osmotic relations?, *Plant physiol.* **110**, 1051-1053.
2. Jill Deikman and Philip E.Hammer(1995), Induction of an thocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*, *Plant physiol.* **108**, 47-57.
3. Xiaomu Niu, Raul A.Bressan, and Jose M. Pardo(1995), I on Homeostasis in NaCl stress environments, *Plant physiol.* **109**, 735-742.
4. F.Larher, N.Rotival-Garnier, and A.Bouchereau(1996), The glycine betaine inhibitory effect on the osmoinduced proline response of rape leaf discs, *Plant Science* **113**, 21-31.
5. Carlos A. Martinez, Moacyr Maestri(1996), In vitro salt tolerance and proline accumulation in andean potato differing in frost resistance, *Plant Science* **116**, 177-184.
6. Perrino LA and Pierce SK(2000), Betaine aldehyde dehydrogenase kinetics partially account for oyster population differences in glycine betaine synthesis, *J. Exp. Zool* **286**(3), 238- 249.
7. Lei Ding and Jian-Kang Zhu(1997), Reduced Na^+ uptake in the NaCl-hypersensitive *sos1* mutant of *Arabidopsis thaliana*, *Plant physiol.* **113**, 795-799.
8. Jiping Lin and Jian-Kang Zhu(1997), Proline accumulation and salt stress induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*, *Plant physiol.* **114**, 591-596.
9. Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki(1997), Gene expression and signal transduction in water stress response, *Plant physiol.* **115**, 327-334.
10. M. T. Chaudhaty and M. J. Merrett(1997), Growth, ion content and proline accumulation in NaCl selected and non-selected cell lines of lucerne culture on sodium and potassium salts, *Plant Science* **127**, 71-79.
11. Gong ZZ, Yamagishi E, Yamazaki M, and Saito K(1999), A constitutively expressed Myc-like gene involved in anthocyanin biosynthesis from *Perilla frutescens*, *Plant Mol. Biol.* **41**(1), 33-44.
12. Kenji Sato and Mamoru Nakayama(1996), Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry, *Plant Science* **113**, 91- 98.
13. Maurizio Vurro and Brian E. Ellis(1997), Effect of fungal toxins on induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in elicited cultures of hybrid poplar, *Plant Science* **126**, 29-38.
14. Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Mitsukawa N, Shibata D, and Shinozaki K(1996), Molecular cloning and characterization of a gene that encodes a MYC-related protein in *Arabidopsis*, *Plant Mol. Biol.* **32**(3), 571-576.
15. P. Liua W. Baob(1998), Cell type in the wild type callus of rice as revealed by screening for salt tolerant line with selection pressure, *Plant Science* **131**,195-202.
16. Manisha Sharan, Gore Taguchi, and Mitsuo Okazaki(1998), Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopletin and scopolin in tobacco cell cultures, *Plant Science* **132**, 13-19.
17. Takaharu Yokoishi & Shizufumi Tanimoto(1994), Seed germination of the Halophyte *Suaeda japonica* under salt stress, *J.Plant Res.* **107**, 385-388.
18. Shu-mei Pan, Robert A. Moreau, Charles Yu, and Anthony H. C. Huang(1981), Betaine accumulation and betaine-al

- dehyde dehydrogenase in spinach leaves, *Plant physiol.* **67**, 1105-1108.
19. Claudine Trossat, Bala Rathinasabapathi, and Andrew D. Hanson(1997), Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethyl-sulfonylpropionaldehyde and ω -aminoaldehydes, *Plant physiol.* **113**, 1457-1461.
 20. Chuan Chi Lin and Ching Huei Kao(1996), Proline accumulation is associated with inhibition of rice seedling root growth caused by NaCl, *Plant Science* **114**, 121-128.
 21. M. V. Lopez and S. M. E. Satti(1996), Calcium and potassium enhanced growth and yield of tomato under sodium chloride stress, *Plant Science* **114**, 19-27.
 22. Ann Moons, Jan Gielen, and Marc Van Montagu(1997), An abscisic acid and salt stress responsive rice cDNA from a novel plant gene family, *Planta* **202**, 443-454.
 23. Gong ZZ, Yamazaki M, and Saito K(1999), A light-inducible Myc-like gene that is specifically expressed in red *Perilla frutescens* and presumably acts as a determining factor of the anthocyanin forma, *Mol. Gen. Genet.* **261**(1), 65-72.
 24. Xu W, Moriya K, Yamada K, Nishimura M, Shioiri H, Kojima M, and Nozue M(2000), Detection and characterization of a 36-kDa peptide in C-terminal region of a 24-kDa vacuolar protein (VP24) precursor in anthocyanin-producing sweet potato cells in suspension culture, *Plant Science* **160**(1), 121-128.