

助成番号 9904

塩生植物シチメンソウの耐塩性維持機構の解析

助成研究者：谷本 静史 (佐賀大学 農学部 応用生物科学科)

共同研究者：仁藤 伸昌 (佐賀大学 農学部 応用生物科学科)

有明海の潮間帯に自生する塩生植物であるシチメンソウは、発芽という現象を指標として調べると、きわめて強い耐塩性を有していた。そしてこの耐塩性は、適合溶質であるベタインを細胞内に蓄積することによって維持されているようであり、また、その合成酵素であるbataine-aldehyde dehydrogenase(BADH)の活性も塩濃度を上昇させるにつれて増加した。ベタインの前駆体やベタインそれ自体を塩を含む培地に添加すると塩による発芽抑制効果は解除された。さらに、乾燥ストレスの代用としてpolyethylene glycol(PEG)を添加した場合、シチメンソウはかなり高濃度のPEG存在下でも発芽し、その時内生ベタイン含量も増加していた。従って、シチメンソウは塩ストレスばかりでなく乾燥ストレスに対してもベタインを蓄積することにより耐性を発揮している可能性が示唆された。耐乾性を制御していると考えられている遺伝子の発現にABAが関与しているという報告があるので、塩と同時にABAを添加してその効果を調べたが、ABAは発芽に全く影響せず、BADH遺伝子がABAによって発現誘導されるという可能性は否定された。次に、塩存在下での発芽直後にはBADH活性は低いがその後上昇するという点について解析した。塩による発芽抑制はベタインアルデヒドの同時添加によって解除されるが、その時mRNA合成や蛋白質合成の阻害剤を加えるとベタインアルデヒドの効果は消失した。すなわち、塩はBADH遺伝子の発現を誘導しているものと考えられた。塩処理した実生からmRNAを単離し、cDNAライブラリーを作成した。すでに報告されているBADHのcDNAに存在し、よく保存されていると思われる部分から2ヶ所の配列をプライマーとして用い、シチメンソウのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行って約300bpのDNA断片を増幅し、この断片をプローブとしてスクリーニングを行ったが、ポジティブクローンは得られなかった。その断片の塩基配列を調べると二つのイントロンが存在していた。従って、イントロンを含まない領域をプローブとして再度スクリーニングを行う必要がある。今後は、BADHのcDNAクローン及びゲノムDNA中のBADHクローンの単離を行う予定である。cDNAクローンについては、PCR増幅された300bp断片の二つのイントロンに挟まれた領域を合成し、それをプローブとしてスクリーニングを行う予定である。また、シチメンソウのゲノムDNAライブラリーを作成し、300bpPCR断片それ自体をプローブとしてゲノムDNA中のBADHクローンを単離する予定である。

助成番号 9904

塩生植物シチメンソウの耐塩性維持機構の解析

助成研究者：谷本 静史 (佐賀大学 農学部 応用生物科学科)

共同研究者：仁藤 伸昌 (佐賀大学 農学部 応用生物科学科)

研究目的

有明海沿岸の潮間帯に自生し、アカザ科に属する塩生植物シチメンソウは強い耐塩性を持っている。我々は、シチメンソウの耐塩性機構を解明するために、塩ストレス下での発芽、培養細胞の成長について調べてきた。その結果シチメンソウはある程度の期間塩ストレスに曝されていると、適合溶質であるグリシンベタイン（以下ベタインと略す）を高濃度で蓄積すること、その合成酵素であるbetaine-aldehyde dehydrogenase(BADH)活性が上昇すること(1)、さらにそのBADHの活性上昇には葉緑体の発達が関与していること(2)等を明らかにしてきた。

以上のことから、まず、ベタイン内生量の増加が耐塩性を維持する上で本当に必要であるかという点の確認、BADH活性の上昇がBADHの遺伝子発現によるものであるかという点の確認、それらが確認された後にBADHのcDNAクローンの単離を行うこととした。また、塩ストレスと乾燥ストレスとは類似した応答反応を示すことが知られているので(3)、乾燥ストレスとしてpolyethyleneglycol(PEG)を与え塩ストレスと同じような応答反応が起こるかという点、さらに、乾燥ストレス時には植物ホルモンであるabscisic acid (ABA)が耐乾性遺伝子の発現に関与しているという報告(4)もあるので、塩ストレスと同時にABAを与えることで、耐塩性が向上するかといった点についても検討を加えた。

研究方法

材料として、シチメンソウ(*Suaeda japonica* Makino)と、比較対照として、同じアカザ科に属するインカライス(*Chenopodium quinoa* Willd.)の種子を用いた。シチメンソウの種子は佐賀県佐賀郡東与賀町の干潟で採取し、インカライスの種子は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社ペルー出張所よりご分与いただいた。

種子を播種する際の基本培地として、3%ショ糖と0.3%ゲルライトを添加したMurashigeとSkoogの培地(5)を用い、オートクレーブで滅菌した。いずれの実験においても、種子を次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度2%)で30分間滅菌し、滅菌水でよくすすいで培地に播種した。発芽率を測定する場合、各処理区において少なくとも100粒の種子を用い、長日条件下(光量 $100\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{sec}$)、温度 $25\pm 2^\circ\text{C}$ の培養室で7日間培養した。実験は3回以上繰り返して標準偏差を求めた。

ベタイン含量の測定は、 ^1H NMR (JEOL, JNM GX270)にて行った(6)。種子あるいは実生にメタノール：クロロホルム：蒸留水(12:5:3)を加え、ホモジナイザーで粉碎し、3,000rpmで10分間遠心した。上清をエバポレーターで濃縮乾固し、10mlの蒸留水に溶かした後、AG50W-X4のカラムに吸着させ、120mlの4M HClで溶出した。溶出液をエバポレーターで乾固し、5mlの蒸留水に溶かして凍結乾燥した。残渣を1mlの D_2O に溶かしてt-ブタノールを内部標準として加え、 ^1H NMRのサンプルとした。

BADH活性の測定は以下のようにして行った。種子あるいは実生を収穫し、10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% polyvinyl polypyrrolidoneを含む50 mM MOPS-NaOH抽出用緩衝液(pH 7.5)中でホモジナイザーで粉碎し、30分間15,000gで遠心した。上清に最終濃度55%の硫酸アンモニウム(硫安)を加えて攪拌し、15,000gで20分間遠心した。その上清に最終濃度70%となるように再度硫安を加え攪拌し、15,000gで20分間遠心した。沈殿を抽出用緩衝液で溶解し、同じ緩衝液に対して終夜透析した。透析後の試料中のBADH活性を蛍光光度計を用い、Panらの方法(7)に基づいて行った。活性は55-70%硫安沈殿画分の蛋白質量に基づいて表記した。

1. ベタイン内生量の増加が耐塩性に関与しているのか？

実験1：滅菌種子を各種濃度のNaClを添加した基本培地に播種し、7日後に発芽率、実生中のベタイン含量及びBADH活性を測定した。

実験2：滅菌種子を0.5MのNaClを添加した基本培地に播種し、6時間、1, 3, 5, 7日後に収穫し、実生中のベタイン含量及びBADH活性を測定した。培養開始時の試料とは、播種後6時間目の種子であり、培養1及び3日目の試料はまだ発芽していないので、各々の期間培養した種子を用いた。

実験3～6：滅菌種子を各種濃度のNaClと共にベタインの前駆体であるベタインアルデヒド(実験3)、ベタイン(実験4)、ABA(実験6)あるいはPEG(6000)のみ(実験5)を添加した基本培地に播種し、7日後に発芽率及び一部の実験では実生中のベタイン含量を測定した。

2. BADH活性の増加はBADH遺伝子発現によるのか？

塩による発芽率の低下がベタインアルデヒドの同時添加によって回復したとすれば、そのことは、取り込まれたベタインアルデヒドが細胞内のBADHによってベタ

インに変換されたためであると考えられる。この時問題となるのは、BADH蛋白質が塩によって活性化されたのか、あるいはBADH遺伝子が塩という刺激によって発現したのかという点である。この点は、mRNA合成の阻害剤であるactinomycin D (Act D)や蛋白質合成の阻害剤であるchcloheximide (CHI)によって、ベタインアルデヒドの発芽回復効果が抑制されるか否かを確認することで明らかにできる。

実験7：滅菌種子を0.5 MのNaCl、各種濃度のベタインアルデヒド、さらに3 mg/ℓのAct Dあるいは1 mg/ℓのCHIを添加した基本培地に播種し、7日後に発芽率を測定した。

3. シチメンソウのcDNAライブラリーの作成とBADHのcDNAクローンの単離

実験8：0.5 MのNaClを含む基本培地にシチメンソウの種子を播種し、4日間育てた。実生約10gを採取し、guanidine thiocyanate/CsCl法により全RNAを抽出した。全RNAからのmRNAの単離は、PolyATtract mRNA Isolation System (Promega)を用いて行った。

mRNAからのcDNAライブラリーの作成は、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE)を用いて行った。作出したライブラリーに対して青白判定を行った結果、およそ 3×10^6 pfu/ μ gの組換えプラークが得られたので、おそらくこのライブラリー中にはBADHのcDNAクローンが含まれるものと考えられた。そこでこのライブラリーからBADHのcDNAクローンを単離するために、プローブとして用いる oligonucleotideをデザインした。BADHのcDNAはずでに、ホウレンソウ(8)、サトウダイコン(9)、オオムギ(10)で単離されている。3種の植物のBADHcDNAに存在し、よく保存されていると思われる部分から2ヶ所の配列を合成した。その配列は、センス側が、5'-GGTCCAGATGC-3'であり、アンチセンス側が、5'-AGGAC TTTTACCCCAAG TTC-3'である。これらをプライマーとして用い、シチメンソウのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果約300bpのDNA断片が増幅された。この断片をプローブとしてシチメンソウのcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。

研究結果

1. ベタイン内生量の増加が耐塩性に関与しているのか？

実験1：シチメンソウとインカライスの種子を各種濃度のNaClを含む培地に播種し、発芽率に及ぼす塩の影響を調べた。Fig. 1に示したように、対照としたインカ

ライスも比較的塩に強く、0.3 MのNaCl存在下でも約75%の発芽率を示したが、0.5 Mで30%と減少し、0.7 M以上のNaCl存在下ではほとんど発芽しなかった。それに対してシチメンソウは、0.7 MのNaCl存在下でも約75%が発芽し、非常に強い耐塩性を有していた。これらの実生中のベタイン含量を測定したところ、インカライスにはほとんどベタインは含まれていなかったが、シチメンソウは非常に高濃度のベタインを含有しており、さらにその含量は塩濃度を上げると増加した(Table 1)。また、BADH活性についても同様の結果が得られ、インカライスのBADH活性は検出限界程度であったが、シチメンソウではベタイン含量と同じく、高いBADH活性及び塩濃度の上昇に伴う活性増加が認められた(Table 1)。

実験2：シチメンソウの種子を0.5MのNaClを添加した培地に播種し、6時間、1、3、5、7日後に収穫し、実生中のベタイン含量及びBADH活性を測定した。その結果(Fig. 2)、播種直後はベタイン含量及びBADH活性ともきわめて低レベルであり、時間が経過するにつれて、まずBADH活性が上昇し、ついでベタイン含量が増加することがわかった。

実験3：シチメンソウ及びインカライスの種子を各種濃度のNaCl及びベタインの前駆体であるベタインアルデヒドを添加した培地に播種し、7日後に発芽率及び実生中のベタイン含量を測定した。Table 2に示したように、インカライスの発芽率は0.5 MのNaClによって26%まで低下し、ベタインアルデヒドを同時添加しても回復しなかった。しかし、シチメンソウの場合は、NaCl添加で74%まで低下した発芽率が、10 mMのベタインアルデヒドによって92%まで回復した。ベタイン含量については、インカライスではベタイン含量は検出限界であったが、シチメンソウでは、NaCl添加によってg新鮮重あたり80 μ moleであったものが、ベタインアルデヒドの同時添加でg新鮮重あたり100 μ mole以上まで増加した。

実験4：シチメンソウは塩ストレス下でも高率で発芽し(Fig. 1)、さらにその時ベタイン含量も増加した(Table 1)ことから、ベタインの蓄積によって耐塩性を維持していることはほぼ確実であると思われる。例えば0.5 MのNaCl添加によって発芽率は70%程度まで低下したが、さらに外部からベタインの前駆体であるベタインアルデヒドを添加すると発芽率は90%程度まで回復した。従って、ベタイン合成にはある程度の限界があり、それは前駆体の不足によるものである可能性が示唆される。この点についてさらに確認するために、発芽に対するベタインの効果を調べた。滅菌したシチメンソウ及びインカライスの種子を各種濃度のNaCl及びベタインを添加

した培地に播種し、7日後に発芽率を測定した。その結果(Table 3)、インカライスではベタインは発芽率の回復をもたらさなかったが、シチメンソウでは、1 mMのベタインによって発芽率はほぼ100%まで回復した。

実験5：塩ストレスと乾燥ストレスに対して、植物はほぼ同一の応答反応を示すことが知られている(3)。発芽実験の場合には、吸水が発芽の引き金になることから乾燥自体を種子に与えるわけにはいかない。そこで、乾燥とほぼ同じ効果を与えることになるポリエチレングリコール(PEG)の発芽に及ぼす影響について検討した。シチメンソウ及びインカライスの種子を各種濃度のPEGを添加した培地に播種し、7日後に発芽率及び実生中のベタイン含量を測定した。その結果をTable 4に示した。インカライスの発芽は2g/ℓのPEGにより50%以下にまで減少し、400g/ℓのPEGを添加すると全く発芽しなかった。それに対してシチメンソウでは、200g/ℓのPEG添加でも95%の発芽率を示し、発芽が完全に阻害されたのは600g/ℓのPEGによってであった。シチメンソウのベタイン含量はPEGの添加により約2倍にまで上昇した。

実験6：乾燥ストレス時には、ABAによって耐乾性遺伝子が発現するという報告(4)がある。従って、シチメンソウの耐塩性維持機構が同時に耐乾性をも維持している可能性がある。もしそうであるならば、塩存在下でもABAの同時添加によって発芽率が回復する筈である。そのことを確認するための検討を行った。シチメンソウ及びインカライスの種子を各種濃度のABAを添加した培地に播種し、7日後に発芽率を測定した。その結果ABAの同時添加は全く発芽に影響しなかった(Table 5)。

2. BADH活性の増加はBADH遺伝子発現によるのか？

実験7：シチメンソウの種子を0.5 MのNaCl, 各種濃度のベタインアルデヒド, さらに3 mg/ℓのAct Dあるいは1 mg/ℓのCHIを添加した基本培地に播種し、7日後に発芽率を測定した。その結果をFig. 3に示した。先に述べたように(Table 2), NaClによる発芽率の低下は同時に添加したベタインアルデヒドによって回復したが、この時さらにAct DあるいはCHIを添加すると、ベタインアルデヒドによる発芽率の回復は完全に阻害された。

3. シチメンソウのcDNAライブラリーの作成とBADHのcDNAクローンの単離

実験8：BADHのcDNAはすでに、ホウレンソウ(8)、サトウダイコン(9)、オオムギ(10)等で単離されている。3種の植物のBADHのcDNAに存在し、よく保存されていると思われる部分から2ヶ所の配列(一方はアンチセンス側)を合成した。その

配列は、センス側が、5'-GGTCCAGATGC-3'であり、アンチセンス側が、5'-AGG ACTTTTACCCCAAGTTC-3'である。これらをプライマーとして用い、シチメンソウのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行って約300bpのDNA断片を増幅し、この断片をプローブとしてシチメンソウのcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。しかしながら、ポジティブクローンは見い出せなかった。この断片の塩基配列を調べたところ、Fig. 4に示すように、2ヶ所にイントロンが含まれていることが判明した。

考察

発芽という現象を指標として調べると、シチメンソウはきわめて強い耐塩性を有していた(Fig. 1)。そしてこの耐塩性は、適合溶質であるベタインを細胞内に蓄積することによって維持されているようであり、また、その合成酵素であるBADH活性も塩濃度を上昇させるにつれて増加した(Table 1)。ベタインの前駆体やベタインそれ自体を塩を含む培地に添加すると塩による発芽抑制効果は解除された(Table 2 & 3)。さらに、乾燥ストレスの代用としてPEGを添加した場合、シチメンソウはかなり高濃度のPEG存在下でも発芽し、その時内生ベタイン含量も増加していた(Table 4)。従って、シチメンソウは塩ストレスばかりでなく乾燥ストレスに対してもベタインを蓄積することにより耐性を発揮している可能性が示唆された。耐乾性を制御していると考えられている遺伝子の発現にABAが関与しているという報告(4)がある。そこで、塩と同時にABAを添加してその効果を調べたが、ABAは発芽に全く影響せず(Table 5)、BADH遺伝子がABAによって発現誘導されるという可能性は否定された。

次に問題となるのは、Fig. 2に示したように、塩存在下での発芽直後にはBADH活性は低いがその後上昇するという点である。すなわち、塩によるBADH活性の上昇が、BADH酵素蛋白質の活性化によるものか、あるいはBADH遺伝子の発現によるものかを明らかにする必要がある。Fig. 3に示した実験から、塩による発芽抑制がベタインアルデヒドの同時添加によって解除されるが、その時mRNA合成や蛋白質合成の阻害剤を加えるとベタインアルデヒドの効果は消失した。すなわち、塩はBADH遺伝子の発現を誘導しているものと考えられた。

次の課題はこのBADHのcDNAクローンの単離である。塩処理した実生からmRNAを単離し、cDNAライブラリーを作成した。すでに報告されている3種の植物(8, 9, 10)のBADHのcDNAに存在し、よく保存されていると思われる部分から2ヶ所の配

列を合成した。これらをプライマーとして用い、シチメンソウのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行って約300bpのDNA断片を増幅し、この断片をプローブとしてシチメンソウのcDNAライブラリーのスクリーニングを行ったが、ポジティブクローンは得られなかった。その断片の塩基配列を調べると二つのイントロンが存在していた (Fig. 4)。従って、イントロンを含まない領域をプローブとして再度スクリーニングを行う必要がある。

今後の課題

BADHのcDNAクローン及びゲノムDNA中のBADHクローンの単離を行う。cDNAクローンについては、PCR増幅された300bp断片の二つのイントロンに挟まれた領域を合成し、それをプローブとしてスクリーニングを行う予定である。その領域の塩基配列は、5'-GCATTCCTGGGAGTAGTGCTACTGGAAGCAAGGTTATGGGTTCTGCTG CCCAATTAGTTA-3'である。また、シチメンソウのゲノムDNAライブラリーを作成し、300bpPCR断片それ自体をプローブとしてゲノムDNA中のBADHクローンを単離する予定である。両者の単離後は、塩という刺激がどのようにしてBADH遺伝子の発現を制御しているのか、特にそのシス領域の解析を行いたい。

文献

- (1) Yokoishi, T. and Tanimoto, S. (1994) Seed germination of the halophyte *Suaeda japonica* under salt stress. *J. Plant Res.* 107; 385-388.
- (2) Tanimoto, S., Itoh, Y. and Yokoishi, T. (1997) Possible involvement of greening in cell growth of *Suaeda japonica* under salt stress. *Plant Cell Physiol.* 38; 129-132.
- (3) Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. and Shinozaki, K. (1993) An Arabidopsis *myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5; 1529-1539.
- (4) Marcotte, W. R., Russell, S. H. and Quatrano, R. S. (1989) Abscisic acid-responsive sequences from the EM gene of wheat. *Plant Cell* 1; 969-976.
- (5) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15; 473-497.
- (6) Jones, G. P., Naidu, B. P., Starr, R. K. and Paleg, L. G. (1986) Estimates of solutes accumulating in plants by ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Aust. J. Plant Physiol.* 13; 649-658.
- (7) Pan, S.-M., Moreau, P. A., Yu, C. and Huang, A. H. C. (1981) Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 67; 1105-1108.
- (8) Weretilnyk, E. A. and Hanson, A. D. (1990) Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87; 2745-2749.
- (9) McCue, K. F. and Hanson, A. D. (1992) Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beat: cDNA cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* 18; 1-11.
- (10) Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S. Y. and Takabe, T. (1995) Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 27; 307-315.

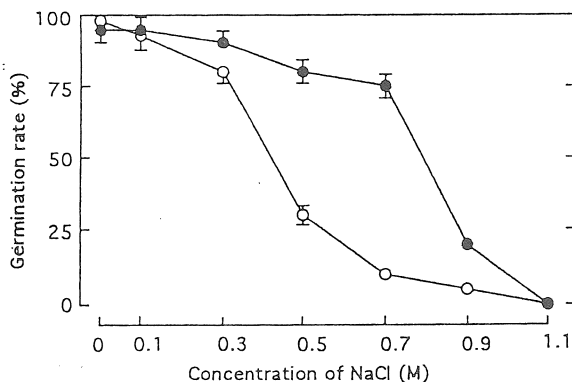


Fig. 1 Changes in Germination Rates under Salt Stress in *Suaeda japonica* and *Chenopodium quinoa*.

The seeds of *C. quinoa* (○) and *S. japonica* (●) were sown and cultivated for 7 days on the medium containing various concentrations of NaCl.

Table 1 Effects of NaCl on Glycinebetaine (Betaine) Contents and Betaine-aldehyde Dehydrogenase (BADH) Activities in *Chenopodium quinoa* and *Suaeda japonica*.

NaCl concentration (M)	Betaine content (μ moles/gFW)		BADH activity (nmoles/min/mg pro.)	
	<i>C. quinoa</i>	<i>S. japonica</i>	<i>C. quinoa</i>	<i>S. japonica</i>
0	0	46.7 \pm 1.64	0.01 \pm 0.001	0.06 \pm 0.004
0.1	0.1 \pm 0.04	48.3 \pm 2.06	0.02 \pm 0.002	0.10 \pm 0.007
0.3	0.1 \pm 0.05	49.9 \pm 1.89	0.01 \pm 0.002	0.24 \pm 0.010
0.5	-	88.1 \pm 2.23	-	0.32 \pm 0.016

The seeds of *C. quinoa* and *S. japonica* were sown on the medium with various concentrations of NaCl and cultivated for 7 days. The betaine contents in extracts from seedlings, about 2 g fresh weight (FW) for each treatment, were calculated from the ^1H NMR spectrum. The BADH activities of extracts from seedlings (ca. 5 g FW for each treatment) were assayed by a fluorometric method, and expressed as based on the protein (pro.) content of 55-70% ammonium sulfate fraction.

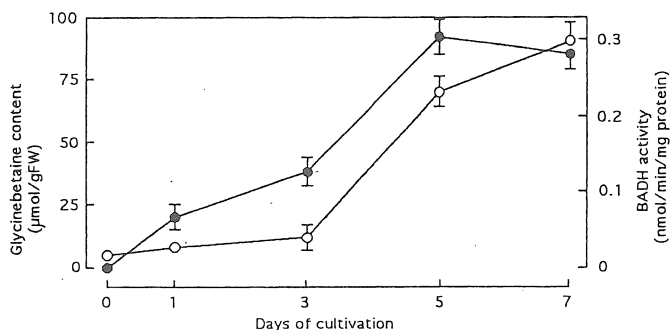


Fig. 2 Changes in Glycinebetaine Contents and BADH Activities in *Suaeda japonica* Seedlings under Salt Stress during Seed Germination.

The seeds of *S. japonica* were sown on the medium with 0.5 M NaCl, and cultivated for various periods. For glycinebetaine (○) analysis and BADH activity (●), the experimental procedures were the same as those noted in Table 1.

Table 2 Effects of Betaine-aldehyde (Be-al) on Seed Germination and Glycinebetaine (Betaine) Contents in *Suaeda japonica* and *Chenopodium quinoa*.

Concentration		Germination rate (%)		Betaine content (μ moles/gFW)	
NaCl (M)	Be-al (mM)	<i>C. quinoa</i>	<i>S. japonica</i>	<i>C. quinoa</i>	<i>S. japonica</i>
0	0	100	100	0	45.8 \pm 2.04
0	10	100	100	0.1 \pm 0.04	90.4 \pm 3.46
0.5	0	26 \pm 1.2	74 \pm 2.4	0	84.2 \pm 3.24
0.5	0.1	25 \pm 1.8	83 \pm 3.8	0.2 \pm 0.06	93.4 \pm 3.20
0.5	1	22 \pm 1.4	86 \pm 2.3	0.1 \pm 0.05	99.4 \pm 4.22
0.5	10	19 \pm 1.8	92 \pm 2.5	0	106.8 \pm 5.64

The seeds of *C. quinoa* and *S. japonica* were sown on the medium with various concentrations of NaCl and betaine-aldehyde and cultivated for 7 days. For glycinebetaine analysis, the experimental procedures were the same as those noted in Table 1.

Table 3 Effect of Glycinebetaine (Betaine) on Seed Germination in *Suaeda japonica* and *Chenopodium quinoa*.

Concentration		Germination rate (%)	
NaCl (M)	Betaine (mM)	<i>C. quinoa</i>	<i>S. japonica</i>
0	0	100	100
0	10	100	100
0.5	0	28 \pm 2.0	74 \pm 2.4
0.5	0.1	31 \pm 1.8	86 \pm 3.0
0.5	1	35 \pm 2.6	98 \pm 1.8
0.5	10	26 \pm 1.2	92 \pm 3.2
0.5	100	18 \pm 1.4	87 \pm 2.3

The seeds of *C. quinoa* and *S. japonica* were sown on the medium with or without 0.5 M NaCl and various concentrations of betaine, and cultivated for 7 days.

Table 4 Effects of Polyethyleneglycol (PEG) on Seed Germination and Glycinebetaine (Betaine) Contents in *Suaeda japonica* and *Chenopodium quinoa*.

Concentration of PEG (g/ℓ)	Germination rate (%)		Betaine content (μ moles/gFW)	
	<i>C. quinoa</i>	<i>S. japonica</i>	<i>C. quinoa</i>	<i>S. japonica</i>
0	100	100	0.1 \pm 0.03	48.6 \pm 1.78
2	45 \pm 1.6	100	0	49.9 \pm 1.98
20	45 \pm 2.1	100	0.1 \pm 0.05	86.3 \pm 3.46
200	30 \pm 1.4	95 \pm 3.4	0.1 \pm 0.04	80.8 \pm 4.12
400	0	25 \pm 1.2	-	20.2 \pm 1.12
600	0	0	-	-

The seeds of *C. quinoa* and *S. japonica* were sown on the medium with various concentrations of PEG and cultivated for 7 days. For glycinebetaine analysis, the experimental procedures were the same as those noted in Table 1.

Table 5 Effect of Abscisic acid (ABA) on Seed Germination in *Suaeda japonica* and *Chenopodium quinoa*.

Concentration		Germination rate (%)	
NaCl (M)	ABA (mM)	<i>C. quinoa</i>	<i>S. japonica</i>
0	0	100	100
0.5	0	26 ± 1.3	74 ± 2.8
0.5	0.001	23 ± 1.1	74 ± 3.2
0.5	0.01	19 ± 0.9	73 ± 2.4
0.5	0.1	17 ± 1.0	66 ± 2.8

The seeds of *C. quinoa* and *S. japonica* were sown on the medium with or without 0.5 M NaCl and various concentrations of ABA, and cultivated for 7 days.

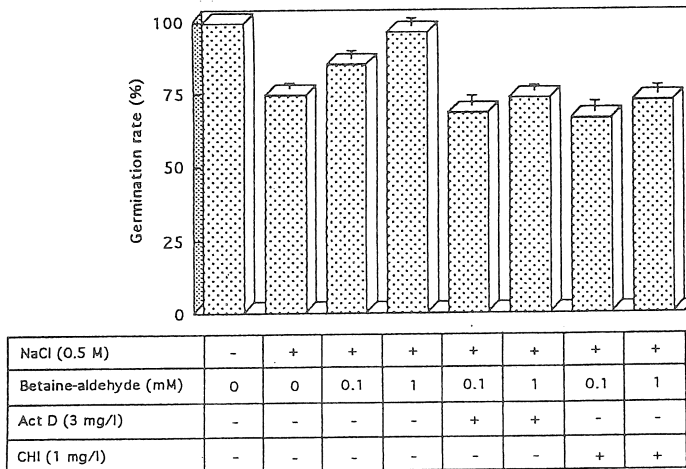


Fig. 3 Effects of Actinomycin D (Act D) and Cycloheximide (CHI) on Recovery of Germination by Betaine-aldehyde under Salt stress in *Suaeda japonica*.

The seeds of *S. japonica* were sown on the medium with or without NaCl, betaine-aldehyde, Act D, CHI, and cultivated for 7 days.

GGTCCAGATG CGGGTGCACC ATTAGTGTCT CATCCTGATG TTGACAAGGT TTTTATCATG TCTGCT
GCTGTACAGT TTAAAACGTC ACTGTCTCAT ATTATTTTAG GGCTGATCAT AATTCTAATT AAATA
CATTCACTGG GAGTAGTGTCT ACTGGAAGCA AGGTTATGGG TTCTGCTGCC CAATTAGTTA AGGTG
CAGCACAAA AATTAGAATA ATTTAACCTT AATTTCGAAT CTCAACTATG GTATTGGTAC TGCCA
GTCTATCTGA TTGTAGCCTG TCACCTTG

Fig. 4 Nucleotide sequence of DNA fragment amplified by PCR.

Template DNA used was extracted from seedlings of *Suaeda japonica*. Sense primer used was 5'-GGTCCAGATGC-3' and antisense primer used was 5'-AGGACTTTTACCCCAAGTTC-3'. Exon regions were underlined.

Analysis of Salt Tolerant Mechanism in *Suaeda japonica*

Shizufumi Tanimoto and Nobumasa Nitoh

Department of Applied Biological Sciences,
Faculty of Agriculture, Saga University

Summary

Suaeda japonica Makino is a halophyte and grows at the shore of Ariake sea in Japan. The seeds maintained 75% germination rates on the medium containing 0.7 M NaCl. We have previously been reported that very high levels of glycinebetaine (betaine), compatible solute, were kept in the seedlings under salt stress. It is synthesized from betaine-aldehyde by betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH). The decrease in germination rates by NaCl was cancelled by simultaneous addition of betaine-aldehyde and/or betaine. The seeds of *S. japonica* could be germinated on the medium with relatively high concentrations of polyethylene glycol (PEG), as substitute for drought stress, and endogenous contents of betaine also increased. Although some drought stress-related gene expression was known to be induced by ABA, application of ABA did not affected seed germination under salt stress in *S. japonica*. Effectiveness of betaine-aldehyde for seed germination under salt stress was disappeared by simultaneous addition of inhibitors for mRNA and/or protein synthesis. Therefore, salt stress may be induced gene expression for BADH. The cDNA library was synthesized from mRNAs isolated from seedlings cultivated on medium with NaCl and tried to isolate BADH cDNA clone. Using two primers synthesized and genomic DNA from *S. japonica* as template, PCR was carried out, and about 300bp fragment was produced. Using this fragment as probe, cDNA library was screened. However, the BADH cDNA clone could not be isolated. Because the fragment contained intron sequence. Efforts are directed to obtaining gene encoding BADH from cDNA and genomic DNA library in *S. japonica*.