

突然変異体を用いた塩生植物アイスプラントの耐塩性機構ならびに 塩集積メカニズムの解明

助成研究者:東江 栄 (佐賀大学 農学部)

共同研究者:野瀬昭博 (佐賀大学 農学部)

通性 CAM である塩生植物アイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*)は、塩ストレスに遭遇すると体表面にブラッダー細胞(EBC)とよばれる細胞小器官を発達させ、塩を集積する。本研究では、EBC を持たない突然変異体を誘導・選抜して、変異株の微細構造観察、高塩環境下での生育量ならびに塩含量を調査し、アイスプラントの耐塩性ならびに塩集積能に対する本細胞の役割を検討した。あわせてゲノム上の変異部位の検出に有効な representational difference analysis (RDA 法)を用いて、EBC 形成遺伝子の単離を試みた。

葉身表面の構造を実体顕微鏡と走査型電子顕微鏡で観察した結果、変異株葉身の表裏、及び茎の表面いずれにも EBC はみられなかった。一方、野生型の葉には、楕円形(ソーセージ様)の、茎には円形の EBC が観察された。変異株と野生株の間には EBC 以外の形態に大きな差異は認められず、EBC の形成以外に変異は起きていないと推察された。透過型電子顕微鏡で葉身断面の微細構造を観察したところ、EBC は表皮細胞の約 4~8 個分に相当することが明らかとなった。

生長に対する塩の阻害効果は変異株で大きく、400mM NaCl で塩処理した変異株の生長量は、7、14、及び 21 日目でそれぞれ野生株の 66%、58%、及び 55%であった。生長量の高さを反映して、個体あたりの NaCl 含量は野生株で高かった。塩処理後 21 日目の野生株の塩含量は一個体あたり約 2g で、変異株の約 1.5 倍であった。EBC に含まれる塩の含量は葉全体の塩含量の約半分を占めた。

RDA 法で EBC 変異株に存在する変異領域として 11 個の PCR 産物を得た。GenBank のデータベースで BLAST による相同性検索を行ったところ、単離した全 11 種類のクローンのうち、5 種類はまだ報告されていない遺伝子と、また他の 5 種類は葉緑体ゲノムあるいは 23S リボソーム RNA と相同性が高かった。さらに残り 1 種類はユビキチンタンパク質リガーゼ、あるいは MAP キナーゼキナーゼと相同性があることがわかった。

以上のことから、EBC はアイスプラントの耐塩性、及び塩集積いずれにも大きく貢献していることが明確になった。EBC は葉内からの塩を除去することで、高塩環境下でのアイスプラントの生存を可能にしていると考えられる。高塩環境下での生育量の増加は、個体あたりの塩吸収量、ひいては塩性土壌から除去する塩の量を増加させる。EBC 形成関連遺伝子の解析は、塩除去能の著しく高いアイスプラントの作出につながり、植物を用いた環境浄化(ファイトリメディエーション)を進める上で大きな一助になると考えられる。

17

助成番号 0217

突然変異体を用いた塩生植物アイスプラントの耐塩性機構ならびに塩集積メカニズムの解明

助成研究者:東江 栄 (佐賀大学 農学部)

共同研究者:野瀬昭博 (佐賀大学 農学部)

1. 研究目的

本研究の究極的な目標は、アイスプラントの耐塩性、及び塩集積機構を明らかにし、作物への耐塩性の付与ならびに塩性土壌からの塩類除去法を確立することである。

高温で降水量の少ない地帯や海水の影響を受けた地帯には、多量の塩を集積した塩類集積土壌が広く分布している。近年、特に乾燥地では、灌漑による塩害が深刻な問題となっている。塩類集積土壌の農業利用は限られており、利用されている地帯でもその作物生産性は極めて低い⁵⁾。世界全耕地面積の約20%が塩類集積の影響をうけている。

ある種の植物は、高塩環境下、あるいは厳しい乾燥条件でも正常に生育できる。塩生植物アイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*)は、地中海沿岸やアメリカ西部、カリブ海沿岸等に自生する南アフリカ原産の1年生草本である。本種は塩、乾燥、強光、及び低温等のストレスに対する耐性をもっており、海水と同程度の塩化ナトリウム(約500mM)を含む土壌でも正常にライフサイクルを完結できる³⁾。この植物が塩ストレスにさらされると、表皮表面にあるブラッダー細胞と呼ばれる細胞小器官を発達させ、塩を蓄積する。さらに光合成型を、イネ・ムギなどがもつC3型からサボテン・ランなどのCAM型へ変換させる³⁾。アイスプラントはこれまで環境条件に伴う光合成変換機構や環境ストレス耐性機構を解析するモデル植物として、多くの研究がなされてきた。

ブラッダー細胞と機能的に似た器官は、乾燥ストレスや塩ストレスをうける植物に多く見られる。例えば、塩生植物の *Atriplex* では体表面に塩毛が観察されるが、この器官が体内の塩の制御に関与することが示されている^{6,7,9,15,16,17)}。アイスプラントでは、ブラッダー細胞はストレスのない状態でも地上部のすべての部分に分化し、表皮外側の水分貯蔵組織を形成する⁸⁾。本細胞の形状・大きさは、ストレスの強さや植物の齢によって異なる。塩ストレスを与えると細胞内に膨圧が生じ突出してくることから、塩の貯蔵庫として機能すると考えられている。しかしこれまでの研究では、ブラッダー細胞内に蓄積された塩の含量に関する報告はあるが¹⁾、塩集積のメカニズムや耐塩性に果たす本細胞の役割についてはほとんど検討されていない。またブラッダー細胞を形成する遺伝子はまだ単離されていない。突然変異体は、植物の機能を調べ、関連する遺伝子を単離するのに有効である。我々は、アイスプラントの種子に中性子線を照射して突然変異体を誘導し、そのうち約3万個体について表皮の形態観察を行い、ブラッダー細胞を持たない突然変異体を1個体単離した。

本研究では、ブラッター欠損変異株の表皮微細構造や塩反応を調査し、アイスプラントの耐塩性、及び塩吸収能に果たすブラッター細胞の役割について検討した。また、合わせて RDA 法によりブラッター細胞形成に関わる遺伝子の単離を試みた。

2. 研究方法

2.1 供試材料と栽培

アイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*)の野生株とブラッター細胞を持たないブラッター細胞欠損突然変異株を供試した。突然変異は種子に中性子線を放射し誘導した。形態観察により選抜した系統を4世代自殖させた。遺伝的な分離はほとんどなかった。

種子を5%アンチホルミンで表面殺菌した後、4.0 g/L ムラシゲ・スクーグ培地塩類、1.0 ml/L ニコチン酸、1.0 ml/L ピリドキシン、10.0 ml/L チアミン、100.0 ml/L イノシトール、30 g/L スクロースを含む7%寒天培地上に播種した。播種1週間後、抽出した幼植物体をウレタンマットに移植し、九州電力生物資源センターの人工気象室内で約10日間予備育苗した。培養液は、1/2濃度の大家ハウスA処方溶液を用い、pHを6.0、及びECを1.42に保った。第3葉齢に達した個体を同センタービニールハウス内のハイポニカ水耕装置に再移植した。1つのハイポニカ水耕装置に25個体移植した。播種45日後、NaClを400 mM、及び800 mMになるように培養液に混和し、塩処理を開始した。

実体顕微鏡、及び走査型電子顕微鏡による観察に用いた個体は、予備育苗まで上記の方法と同様に栽培した。第3葉齢に達した個体を、園芸用培養土を含む10.5 cm ポリポットに移植し、九州電力生物資源センターのビニールハウス内で栽培した。pH 5.9、及びEC 1.42に保った1/2濃度大家ハウスA処方溶液を毎日灌水した。播種35日後、NaClを300 mMになるように前述の灌水用溶液と混和して与え、塩処理を開始した。

透過型電子顕微鏡による観察で用いた個体は、前述した寒天上に播種して1週間ほど栽培した後、畑土:バーミキュライト=1:1を含む1/5000aワグナーポットに移植した。栽培は、グロースチャンバー(明期14時間、光強度:400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 、温度:25°C(明期)/20°C(暗期))内で行った。塩処理区では350 mM NaClを1/5濃度ホークランド溶液に混和し灌水することで塩処理を開始した。

2.2 サンプリングと生育調査

塩処理後、各試験区から1週間ごとに4回、植物体全体の生重を測定した。ついで地上部と根に分け、それぞれの生重を測定した。地上部はさらに、葉、茎及び枯葉に分け、それぞれの生重を測定した。

2.3 ブラッター細胞液の採取

パスツールピペットの先端を熱し引き伸ばして作製したガラスキャピラリーで、ブラッター細胞

中に含まれる溶液を採取した。この作業は実体顕微鏡下で行なった。茎は1～1.5 cmに切り取り、まず生重を測定し、ついで茎表面のブラッダー細胞中の液を葉と同様に採取した。液量はオートピペッターで測定した。

2.4 葉、及び茎のNaCl含量の測定

乾物重を測定した葉及び茎の組織を乳鉢中で磨砕した。磨砕したサンプル1gを20 mlの超純水とともに乳鉢中でさらに磨砕して、3000 Gで15分間遠心分離した。上澄み液をろ紙で濾過して、得られたろ液に超純水を加え50 mlとした。Na⁺含量は、炎光光度法を用いて土壌・作物体総合分析計（島津、SPCA-626D）で測定し、NaCl標準溶液で作成した検量線で含量を算出した。Cl⁻含量は、キャピラリー式イオン分析計（Waters Capillary Ion Analyzer）で測定し、NaCl標準溶液で作製した検量線から含量を算出した。抽出液5 mlをセルアセテート0.45 μmHVフィルターで濾過した。0.46 mMアニオンBT溶液、アニオン用電解質バッファー濃縮液（4.6 mM Na₂CrO₄、0.031 mM H₂SO₄）を加え、アニオン用電解液バッファー（pH 8.0）とした。このバッファーにサンプルを入れCl⁻含量を測定した。

2.5 実体顕微鏡、及び走査型電子顕微鏡による微細構造の観察

塩処理後25日目の野生株と変異株の葉身表面を、実体顕微鏡（Olympus, SZX12）で観察した。走査型電子顕微鏡で観察するために、葉の表面の型をとった。氷上でExtrude Wash BaseとExtrude Wash Catalystを同量混ぜ、実体顕微鏡で観察した葉の表面に滴下した。固化後、葉から剥がして固まった樹脂の上にボンドをのせ、乾かして葉の表面の型をとった。この型に導電性を持たせるためにイオンスパッタリング装置（HITACHI）で3～5分ほど金を蒸着させた。その後、走査型電子顕微鏡（HITACHI, S-2050）で葉の表面の微細構造を観察した。

塩処理後34日目の野生株と変異株の最上位展開葉を固定、包埋し、透過型電子顕微鏡で微細構造を観察した。観察はUeno et al.¹⁹⁾の方法に従った。

2.6 RDA

RDA法はGeneFisher™ PCRサブトラクションシステム（TaKaRa）を用いて行った。用いた制限酵素はHind IIIで、変異株、及び野生株のゲノムDNA 1gを供試し、それぞれテスター（変異株）、及びドライバー（野生株）とした。PCR反応後の増幅産物の純化には、EASYTRAP（TaKaRa）を用いた。テスターとドライバーのDNA断片をハイブリダイズして、同じ配列の断片を除去した。この作業を3回繰り返して、変異株に特異的なDNA断片を濃縮した。

3. 研究結果及び考察

3.1 葉身表面の形態

表皮におけるブラッダー細胞の大きさや部位は、個体の発育段階やストレス状態によって変

化する。ブラッダー細胞は、通常環境条件下では葉身あるいは茎の表皮内に埋没しているが、ストレスにともなって細胞内に膨圧が生じ、表皮から突出する¹⁾。成熟した組織では、ブラッダー細胞は以下に示す3つのタイプに分類される¹⁾：1)ソーセージ様の形状で側枝に多く見られるもの；2)球形で果実に多くみられるもの；3)毛状で、葉身やがく片に観察されるものである。第1図には、実体顕微鏡と走査型電子顕微鏡で観察した葉身表側の形態を示した。ここでは塩処理した葉身のみを示す。野生株葉身には、1)の型に分類されるソーセージ様のブラッダー細胞が観察された。この細胞は塩処理によって大きくなる傾向にあった。変異株では、ブラッダー細胞はほとんど見られなかった。葉の裏側では、表側と同様に野生株のみに観察された(第2図)。裏側のブラッダー細胞は表側のそれより大きかった。茎には、表皮表面を高密度に覆う小型のブラッダー細胞と、その上にある大型のブラッダー細胞が観察された(第3図)。変異株では、大型のものではなく、葉表面を覆う小型のブラッダー細胞のみが観察された。

このように変異株では、表皮表面のブラッダー細胞の発達がみられないこと、また、野生株では塩処理にともなってブラッダー細胞がよく発達することがわかった。また、ブラッダー細胞以外の外部形態には野生株と変異株との間に大きな違いは見られず、ブラッダー細胞の形成を制御する遺伝子だけに突然変異が誘発されたと考えられた。

第4図には、透過型電子顕微鏡で観察した葉身断面図を示した。ブラッダー細胞は薄い表皮細胞の膜からなるため、組織を包埋する過程で開裂がおき、完全な球形を保ったブラッダー細胞は得られなかった。野生株の葉身表面にある半円状のものは、ブラッダー細胞の痕跡と考えられる(図中矢印)。これは表皮細胞の約4~8個分に相当していた。ブラッダー細胞は上述した走査型電子顕微鏡による観察と同様、野生株において塩処理を施した葉身の裏側でよく発達していた。

3.2 塩処理にともなう生長量の変化

第5図Aには、塩処理後の地上部生重の推移を示した。NaCl 0 mM、400 mM 処理区では、生育日数の経過に伴う生重の増加がみられたが、800 mM 処理区ではほとんど増加がみられなかった。野生株と変異株の生重における差は400 mM 処理区で特に大きく、塩処理後7、14、及び21日目の変異株の生長量は野生株の66%、58%、及び55%であった。生長量を乾物重で評価した場合にも、同様な結果が得られた(データは示さず)。乾物重も生重と同様、400 mM 処理区で野生株と変異株との差異が大きくなった。これらの結果はアイスプラントの耐塩性に対し、ブラッダー細胞が大きく寄与していることを示している。アイスプラントは光合成器官周辺の塩をブラッダー細胞へ排出することで、塩によるイオンストレスを回避していると考えられる。塩生植物として知られるアカザ科の植物は塩毛とよばれる器官を有し、葉内の過剰なNaClを貯蔵している。また塩毛はトリコームの変形したものと考えられている。アイスプラントのブラッダー細胞も同様な機能を有した細胞と考えられ、この細胞の分化についてはトリコームの形成様式が参考になるとと思われる。

3.3 植物体内の塩含量

第5図 B には、塩処理に伴う個体あたりの NaCl 含量の推移を示した。NaCl 含量は、生長量を反映して、400 mM 処理区で両者に最も大きな差異がみられた。また 21 日間 NaCl 処理すると、アイスプラント一個体あたり約 2g の NaCl を蓄積した。下田ら¹⁸⁾は、アイスプラントを 100 mM の NaCl を含む培養液で 49 日間栽培した場合、一個体あたり約 15g の NaCl を蓄積したことを報告している。このことは同量の塩を圃場から除去できることを意味しており、本種が塩性土壌から塩類を除去するクリーニングクロープとして有望であることを示唆している。

アイスプラントはナトリウムを体内に蓄積する、いわゆる sodium includer である。ブラッダー細胞内の液量は生育塩濃度の増加に伴い増加する(データは示さず)。塩濃度が高すぎると生育の阻害に伴ってブラッダー細胞の発達も抑制されたが、培養液の塩濃度が 400 mM の場合には、1cm² あたり最大で約 8μl の溶液を蓄積した。この現象は、ブラッダー細胞が塩の貯蔵庫あるいは塩排斥器官として機能していることを示唆している^{2,11,12)}。

ブラッダー細胞に含まれる塩の構成や含量を測定し、葉身全体の塩の蓄積に対するブラッダー細胞の貢献度を調べた(第6図)。塩ストレスのない場合、葉内にはカリウムイオンと硝酸イオンの含量が高く、ブラッダー細胞に含まれる両イオンの含量は全体量の 7%、及び 8% であった。塩ストレスにともなってこれらの含量は低下し、かわりにナトリウムイオンと塩素イオンの含量が顕著に増加した。ブラッダー細胞に含まれるそれらの含量はいずれも葉全体の約半分を占めた。また野生株の塩含量は変異株の約 1.5 倍となった。アイスプラントを用いて環境修復(ファイトリメディエーション)行うためには、ブラッダー細胞の塩類集積能を高めることが重要である。ブラッダー細胞内のナトリウムイオンの蓄積は、液胞膜にある Na⁺/H⁺ アンチポーターと液胞膜の ATPase、それに H⁺ 輸送活性に制御されている。実際、ブラッダー細胞におけるこれらの活性は他の細胞よりもかなり高い³⁾。ナトリウムは根から生長点まで輸送されるが、この長距離輸送は、ナトリウム/プロトンアンチポーターと連結したナトリウム/イノシトールシンポータによって制御されているという報告がある^{4,13,14)}。変異株においてこれらの活性がどのように変化しているのか興味深い。

3.4 RDA 法によるブラッダー細胞形成遺伝子の単離

ブラッダー細胞欠損突然変異体の表現型は突然誘発処理によるゲノム上の遺伝子の変異を反映したものである。RDA (representational difference analysis) 法¹⁰⁾を用いて変異が起きた領域を同定し、ブラッダー細胞形成遺伝子の単離を試みた。本法は、比較する試料のゲノム上で差異のある領域を PCR 法で増幅し分離する方法である。RDA 法によってゲノムを比較した結果、変異株に存在する変異領域として 11 個の PCR 産物が得られた(第7図)。GenBank のデータベースで BLAST による相同性検索を行ったところ、単離した全 11 種類のクローンのうち、5 種類はまだ報告されていない遺伝子と、また他の 5 種類は葉緑体ゲノムあるいは 23S リボゾー

ム RNA と相同性が高かった。さらに残り1種類はユビキチンタンパク質リガーゼ、あるいは MAP キナーゼキナーゼと相同性があった(第1表)。これらの遺伝子がブラッダー細胞の形成と関与するのか、関与しているのであればどのようにして作用しているのか明らかにする必要がある。

以上のことから、ブラッダー細胞は、葉内の光合成器官から塩を除去することで、高塩環境下でのアイスプラントの生存を可能にし、個体あたりの塩含量を高めていると考えられる。つまり、ブラッダー細胞は、アイスプラントの耐塩性、及び塩集積能いずれにも重要な役割を果たしているといえよう。

4. 今後の課題

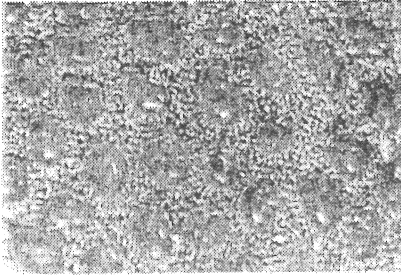
ブラッダー細胞の塩集積能の向上は、高塩環境下で生育量の保持、ひいては土壌からの塩類の除去量の増加を促すと考えられる。本種を用いて環境修復を効率的に行うためには、ブラッダー細胞の塩蓄積能をさらに高めたアイスプラント形質転換体を作成するのも1つの方策と考えられる。そのためには、ブラッダー細胞への塩輸送・蓄積メカニズムを明らかにし、ブラッダー細胞の形成やそのサイズを決定する遺伝子を単離する必要がある。ブラッダー細胞変異株は、これらの研究を進める上で格好の材料であり、今回単離した RDA 産物についての詳細な検討はその一助になるであろう。

5. 引用文献

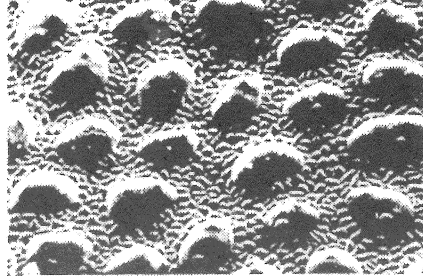
- 1) Adams, P., Nelson, D.E., Yamada, S., Chmara W., Jensen, R.G., Bohnert, H.J., Griffiths, H. (1998). Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol.* 138, 171-190.
- 2) Adams, P., Thomas, J.C., Vernon, D.M., Bohnert, H.J., Jensen, R.G. (1992) Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol.* 33, 1215-1223
- 3) Bohnert, H.J. and Cushman, J.C. (2000) The ice plant cometh: Lessons in abiotic stress tolerance. *J. Plant Growth Regul.* 19, 334-346.
- 4) Chauhan, S., Forsthoefel, N.R., Ran, Y., Nelson, D.E., Quigley, F., Bohnert, H.J. (2000) Na⁺/myo-inositol symporters and Na⁺/H⁺-antiporters in plant sodium transport. *Plant J.* 24, 511-522.
- 5) Cushman, J.C. and Bohnert H.J. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr, Opin. Plant Biol.* 3, 117-124.
- 6) Freitas, H. and Breckle, S.W. (1992) Importance of bladders for salt tolerance of field-grown *Atriplex* species from a Portuguese salt marsh. *Flora* 187, 283-297.
- 7) Freitas, H. and Breckle, S.W. (1993) Accumulation of nitrate in bladder hairs of *Atriplex* species. *Plant, Physiol. Biochem.* 31, 887-892.
- 8) Haberlandt, G. (1904) *Physiologische Pflanzenanatomie*. Leipzig, Engelmann. Adams, P.,

- Nelson, D.E., Yamada, S., Chmara W., Jensen, R.G., Bohnert, H.J., Griffiths, H. (1998) Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol.* 138, 171-190.
- 9) Jeschke, W.D. and Stelter, W. (1983) Ionic relations of Orache, *Atriplex hortensis* L.: growth and ion distribution at moderate salinity and the function of bladder hairs. *J. Exp. Bot.* 34, 795-810.
- 10) Lisitsyn, N., Lisitsyn, N.M., Wigler, M. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science.* 259:946-951.
- 11) Lüttge, U. (1993) The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New phytol.* 125, 59-71.
- 12) Lüttge, U., Fischer, E., Steudle, E. (1978) Membrane potentials and salt distribution in epidermal bladders and photosynthetic tissue of *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Environ.* 1, 121-129.
- 13) Nelson, D.E., Koukoumanos, M., Bohnert, H.J. (1999) Myo-inositol-dependent sodium uptake in ice plant. *Plant Physiol.* 119, 165-172.
- 14) Nelson, D.E., Rammesmayr, G., Bohnert, H.J. (1998) The regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance. *Plant Cell* 10, 753-764.
- 15) Osmond, C.B., Lüttge, U., West, K.R., Pallaghy, C.K., Shacher-Hill, B. (1969) Ion absorption in *Atriplex* leaf tissue. II. Secretion of ions to epidermal bladders. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 797-814.
- 16) Reimann, C. and Breckle, S.W. (1988) Salt secretion in some *Chenopodium* species. *Flora* 180, 289-296. Storey, R., Pitman, M.G., Stelzer, R., Carter, C. (1983) X-ray microanalysis of cells and cell compartments of *Atriplex spongiosa*: 1. Leaves. *J. Exp. Bot.* 34, 778-794.
- 17) Schirmer, U. and Breckle, S.W. (1982) The role of bladders for salt removal in some *Chenopodiaceae* (mainly *Atriplex* species). In: Sen D.N. and Rajpurohit, K.S. (eds), *Contributions to the Ecology of Halophytes*. The Hague, pp. 215-231.
- 18) 下田敏文・小寺暁子・中原光久・東江栄・野瀬昭博. (2003) アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) の NaCl 吸収・蓄積特性について. 日本作物学会紀事 72 別1:224-225.
- 19) Ueno, O. (2001) Ultrastructural localization of photosynthetic and photorespiratory enzymes in epidermal, mesophyll, bundle sheath, and vascular bundle cells of the C4 dicot *Amaranthus viridis*. *J. Exp. Botany* 52:1003-1313.

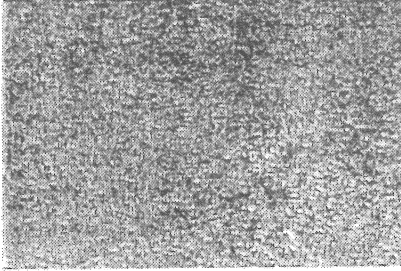
wild (x 8)



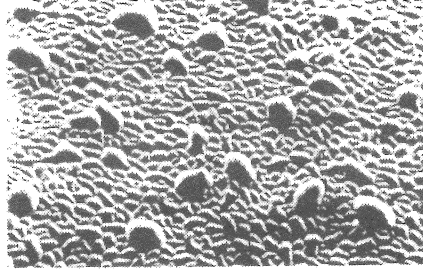
wild (SEM)



mutant (x 8)

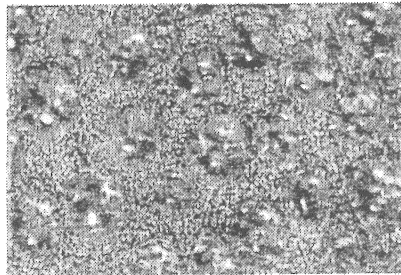


mutant (SEM)

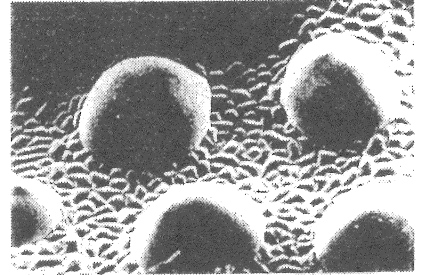


第1図 葉の表側の微細構造.
300mM NaClで25日間塩処理した. バーは1mm.

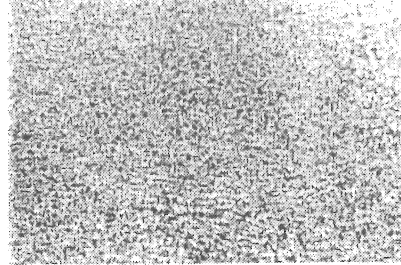
wild (x 8)



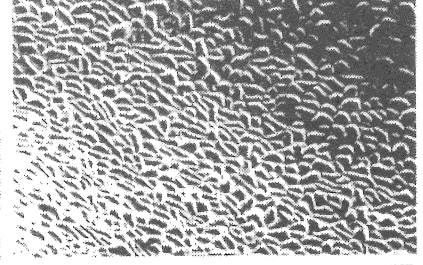
wild (SEM)



mutant (x 8)

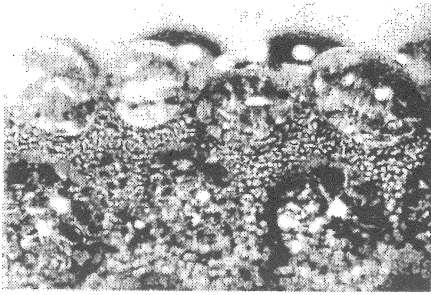


mutant (SEM)

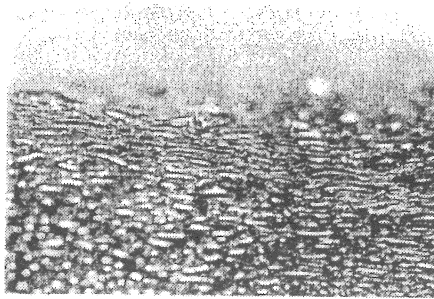


第2図 葉の裏側の微細構造.
300mM NaClで25日間塩処理した. バーは0.5mm.

wild (x 8)



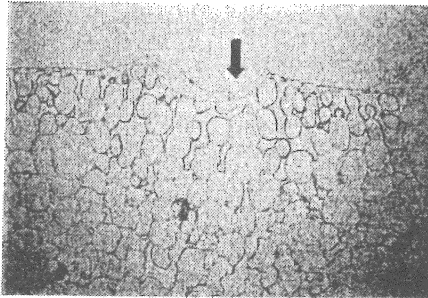
mutant (x 8)



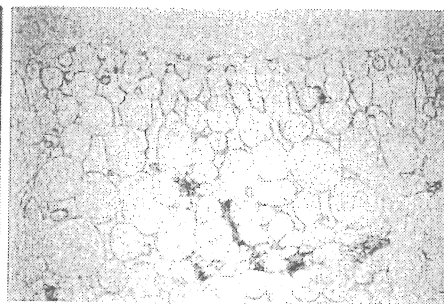
第3図 茎表面の微細構造。

300mM NaClで25日間塩処理した。バーは0.5 mm.

wild

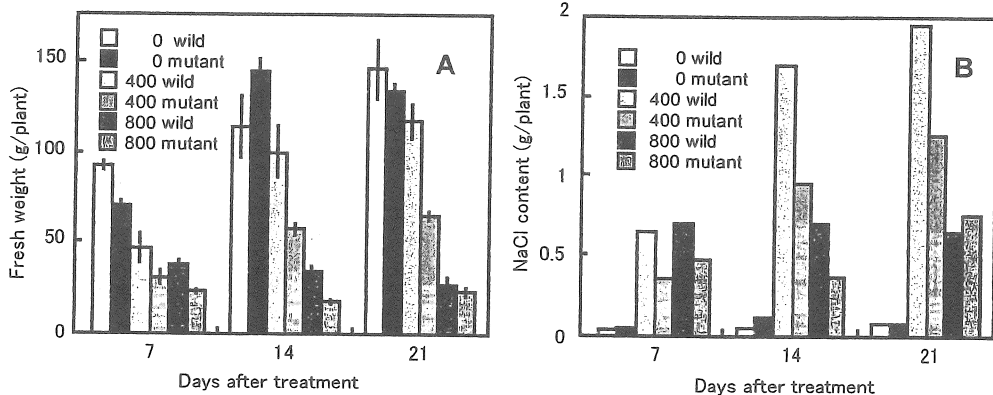


mutant

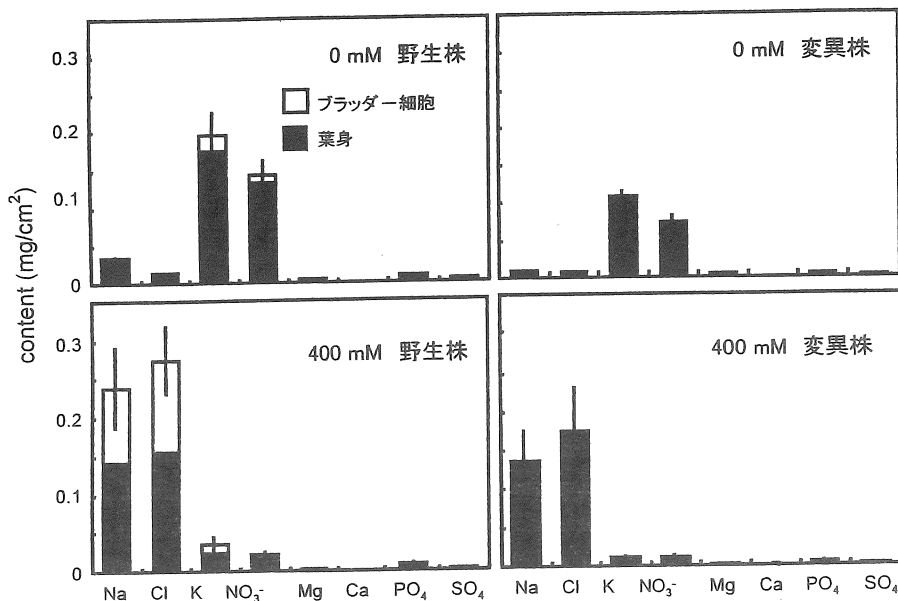


第4図 透過型電子顕微鏡による葉の微細構造。

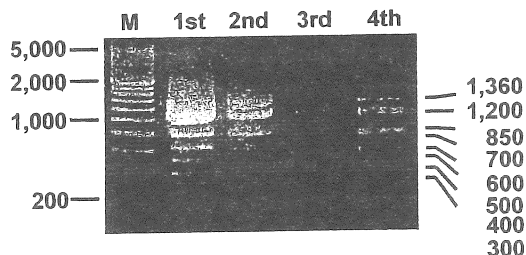
300mM NaClで25日間塩処理した。矢印はブラッター細胞。



第5図 塩処理にともなう生長量とNaCl含量の変化。A, 個体生重; B, 個体あたりのNaCl含量。
0, 0 mM; 400, 400 mM; 800, 800 mM NaCl.



第6図 葉身とブラッダー細胞に含まれる塩の組成と含量。



第7図 野生株と変異株間のRDA産物。

1回~4回、DNAハイブリダイゼーションとPCRによる増幅を行った産物をアガロースゲルで泳動した。

第1表 野生株と変異株間の変異株特異的なRDA産物。

Clone	Length (bp)	Organism	GenBank Accession #	Homology with BLAST
1-4	1360	<i>Spinacia oleracea</i>	AJ400848	Chloroplast genome 23S ribosomal RNA
		<i>Aaranthus tricolor</i>	AF254866	
1-5	1360	<i>Spinacia oleracea</i>	AJ400848	Chloroplast genome 23S ribosomal RNA
		<i>Aaranthus tricolor</i>	AF254866	
2-1	1100	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF127565	ubiquitin-protein ligase 2 MAP kinase kinase mRNA
		<i>Nicotiana tabacum</i>	AF165186	
2-5	1100	<i>Spinacia oleracea</i>	AJ400848	Chloroplast genome 23S ribosomal RNA
		<i>Aaranthus tricolor</i>	AF254866	
3-1	774	?		
4-1	750	?		
4-5	633	?		
5-5	533	?		
6-1	462	<i>Spinacia oleracea</i>	AJ400848	Chloroplast genome
6-2	409	<i>Spinacia oleracea</i>	AJ400848	Chloroplast genome
6-5	425	?		

Elucidating mechanisms for salt accumulation and salt tolerance in the facultative CAM halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* using a mutant lacking the salt storage organ, epidermal bladder cells

Sakae Agarie and Akihiro Nose
Faculty of Agriculture, Saga University

Summary

A facultative CAM halophyte, the common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*), have adapted to extremely high salinity condition. Following salt stress, ice plant develops epidermal bladder cells (EBC) on all aerial parts and accumulates salt into the cells. The EBC has been thought to be a salt excreting system. However, the contribution of the bladder cells to salt regulation in growth of ice plant is less understood. We have induced and isolated the mutant lacking the EBC, and examined the roles of the EBC for salt tolerance and salt integration of the ice plant through anatomical observations, measurements of biomass and salt content under the hypersaline environment. In addition, we have tried to isolate the genes responsible for development of the EBC using representational difference analysis (RDA).

Observation of the structure of the lamina surface using stereoscopic microscope and scanning electron microscope showed that the mutant has only little EBC on the surfaces of leaves and stems. Whereas the wild type has the elliptical (sausage-like) and circular type EBC on the surface of leaves and stems, respectively. Another anatomical features were almost identical between the wild type and the mutant, suggesting that mutation was occurred only in EBC formation. Observation of lamina cross sections by the transmission electron microscope showed that the size of one EBC corresponded to about 4 to 8 epidermal cells. Following salt stress with 400 mM NaCl, the growth was inhibited in larger extent in the mutant than in wild type; the fresh weight of mutant at 7, 14, and 21 days after the salt stress were 66%, 58%, and 55% of that in wild type, respectively. The NaCl content per plant in the wild type at 21 days after salt treatment (400mM NaCl) was about 2g, corresponding to about 1.5 times of that in the mutant. The NaCl content in EBC occupied the almost half of the whole leaf NaCl content, and the content of wild type leaves was about 1.5 times of that in the mutant leaves. Using the RDA, we have obtained 11 PCR products as mutation region, which exist in the mutant. The homology search by BLAST in the database of GenBank showed that five clones were novel genes and other five clones have homologies with chloroplast genome or 23S ribosomal RNA, and one clone has homology with ubiquitin protein ligase or MAP kinase.

These results clearly showed that the EBC largely contributed to salt tolerance and salt storage of the ice plant. The EBC may sequester salt from inside the leaf, and it seemed to enable ice plant to survive under the hypersaline environment. The increased growth under the hypersaline condition increased the quantity of the salt absorption of plant, in turn, of salt removal from saline soil by the plant. The analysis of genes for EBC development may help to generate transgenic ice plant harboring extremely high salt removability from saline soil, and to advance environmental cleanup using the plant, i.e. phytoremediation.