

9426 植物耐塩機構の分子遺伝学的解析

助成研究者：小林 裕和（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

共同研究者：梅根 一夫（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

佐伯 真理（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

丹羽 康夫（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

小林 京子（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

目 的

砂漠乾燥地帯の緑化を図るためには灌漑が必要であるが、水の確保が可能な場合も、水分蒸発による土壌中塩分の地表層集積の問題が生じる可能性が高い。また、海岸乾燥地域においては希釈海水灌漑が考えられる。いずれの場合も、植物に耐塩性を付与しなければならない。この目的に対し、植物の耐塩機構およびそれを支配している遺伝子を解析したいと考えた。

結果と考察

塩ストレス条件化においては、光合成機能構築活性も低下し、したがって恒常的光合成遺伝子発現も抑制されていると考えられる。代表的な光合成遺伝子としてリブローズ-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) のSサブユニット遺伝子 (*RBCS*) とクロロフィル *a/b* 結合タンパク質遺伝子 [*CAB* (*LHC*)] 両遺伝子群のうち、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *RBCS-3B* および *CAB1* (*LHCBI*AB*) に注目した。これら遺伝子発現をモニターするために、これら遺伝子プロモーター (上流制御部位を含む) の制御下に置いた各種レポーター遺伝子を形質転換によりシロイヌナズナに導入した。

耐塩性に対する他環境要因の複合的影響

塩無添加培地において播種後1週間生育させた後、200 - 250 mM NaCl (海水の約 1/2 の塩濃度) 添加培地に一定期間 (1 - 2週間) 放置すと、シロイヌナズナは枯死するが、植物の塩感受性は実験ごとに変動が大きかった。変動の原因としては光照度が考えられた。塩処理後 4 - 5 日目における生存率は、1,000 lux ($13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 以下の光照射下においては 90% 以上であったが、3,000 lux では 10 - 30% に低下した。この際、生存個体におけるルシフェラーゼ活性によりモニターされる光合成遺伝子発現は、1,000 lux 前後で最大を示した。

シロイヌナズナの ecotypes (生態型) による耐塩性の違い

発芽時における 200 mM NaCl に対する耐性は、ecotype Columbia および Bensheim が高く (塩無添加培地における発芽の 10 - 20% の発芽率)、Norway および WS は低かった (発芽率 0%)。また、播種後1週間目に 200 mM NaCl 添加培地に移した後、さらに2週間放置した際の生存率を指標にした耐塩性は Bensheim が高く、本葉の形成を指標にした場合は WS の耐塩性が高かった。これら耐塩性を支配する遺伝子を解析するために、塩感受性が高い ecotype との交配実験を行っている。

変異原処理シロイヌナズナからの耐塩性突然変異体の選抜

200 mM および 250 mM NaCl 添加培地を用い、変異原 ethylmethane sulfonate (EMS) 処理系統 12,400 種類およびT-DNA挿入変異系統 4,900 種類から塩耐性変異体を選抜した。その結果、数系統の塩耐性突然変異体 ste (salt-tolerant expression of photosynthesis genes) を見いだし、交配により遺伝学的解析を行っている。

シロイヌナズナの耐塩性は、光照度に依存し、また遺伝学的解析において、耐塩性形質はメンデルの法則に従った単純な分離を示さず、その形質は、表現型が環境の影響を受け易い複数の quantitative trait loci (QTL) により支配されていると考えられた。

9426 植物耐塩機構の分子遺伝学的解析

助成研究者：小林 裕和（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

共同研究者：梶根 一夫（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

佐伯 真理（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

丹羽 康夫（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

小林 京子（静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科）

1. 研究目的

人類の生存に必要な食糧（家畜飼料を含む）および酸素（O₂）は、太陽エネルギーを利用して光合成を営む植物に主として由来している。地球上陸地に残された不毛砂漠乾燥地帯は、地上の1/3までも占め、さらに毎年約60,000 km²（四国と九州を合わせた面積に相当）ずつ拡大している。砂漠乾燥地帯の緑化を図るためには灌漑が必要であるが、水の確保が可能な場合も、水分蒸発による土壌中塩分の地表層集積の問題が生じる可能性が高い。また、海岸乾燥地域においては希釈海水灌漑が考えられる。いずれの場合も、植物に耐塩性を付与しなければならない。この目的に対し、耐塩機構を支配している遺伝子をクローニングし、それを有用植物において有効に発現させたいと考える。

耐塩機構発動に関与するタンパク質の中には、微量かつ不安定なものも含まれ、タンパク質の側からの研究には限界があると考えられる。塩に対し耐性および超感受性になった突然変異植物体を作製し、変異相補により遺伝子をクローニングするという方法論は極めて有効であると考えられる。モデル植物シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）は、この種の分子遺伝学的解析に不可欠な条件を備えている。すなわち、高等植物の中でゲノムが最も小さく（1 × 10⁸塩基対）、1世代が短く（4～5週間）、交配が可能であり、高密度栽培できるのみならず、変異原処理および挿入突然変異（insertion mutagenesis）による変異植物体の作製、さらに、野生植物体DNAによる変異体の形質転換に基づく変異相補という方法論の適用も可能である。このような観点から、昨今、モデル植物シロイヌナズナに対する関心は高い。しかしながら、塩のような光合成活性阻害環境ストレスに対し耐性になった植物突然変異体の研究は未だ他に報告がない。本助成課題研究の結果、植物の塩感受性は他環境要因の影響を受け易く、耐塩性を支配する遺伝子は複数あることが明らかになった。

2. 研究の方法

2.1. 突然変異体選抜遺伝子の光合成遺伝子プロモーター制御下への導入

塩ストレス条件下においては、光合成機能構築活性も低下し、したがって恒常的光合成遺伝子発現も抑制されていると考えられる。代表的な光合成遺伝子として、リブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（Rubisco）のSサブユニット遺伝子（*RBCS*）とクロ

ロフィル *alb* 結合タンパク質遺伝子 [*CAB (LHC)*] 両遺伝子群のうち、シロイヌナズナ *RBCS-3B* および *CAB1 (LHCBI*At3)* に注目した。これらプロモーター (上流制御部位を含む) の制御下に突然変異体選抜遺伝子 (reporter 遺伝子) と

して β -glucuronidase

(GUS) 遺伝子 (*uidA*) あ

るいは luciferase 遺伝子

(*luc*) を (Fig. 1) を導入し、

シロイヌナズナ

(Columbia) を根切片より

Agrobacterium

tumefaciens Ti プラスミ

ド法 (1) により形質転換

した。

pSGCL

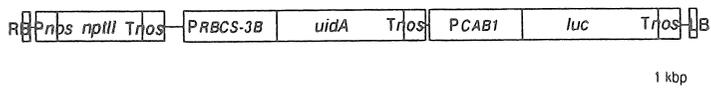


Fig. 1. A construct of T-DNA region harbored in a binary vector (1) for making *A. thaliana* transgenic to monitor the activities of *RBCS-3B* and *CAB1* promoters. RB, right border of T-DNA; *Pnos*, promoter of gene for nopaline synthase; *nptII*, gene for neomycin phosphotransferase II; *Trnos*, terminator of gene for nopaline synthase; *PRBCS-3B*, promoter and its upstream region of *RBCS-3B*; *uidA*, gene for β -glucuronidase (GUS); *PCAB1*, promoter and its upstream region of *CAB1*; *luc*, gene for luciferase; LB, left border of T-DNA.

2.2. 塩ストレス条件に対する光合成遺伝子発現の応答

上記形質転換ホモ接合植物体あるいは各種純系ecotypes (生態型) を発芽後、mineral 栄養培地 (2) で 1 週間生育させ、異なる濃度の NaCl を含む同一の培地に移植した。なお、シロイヌナズナは、22℃、湿度 50~60%、および異なる照度の連続白色蛍光下で生育させた。luciferase 活性は既報 (3) にしたがって測定した。

2.3. 塩ストレス条件下における突然変異体の選抜

上記植物体 (ホモ接合体) 種子を変異原 ethylmethanesulfonate (EMS) により処理した。変異誘導処理をした形質転換植物体 (M 1 個体) の白花受粉による M 2 個体実生を mineral 栄養培地 (2) において生育させ、高濃度 NaCl [200 mM (1.2%, w/v), 海水の約半分の塩濃度に相当] を含む同一の培地に移し、耐性 (光合成遺伝子発現継続) 突然変異体を生存を指標にして選抜した。

3. 研究結果および考察

3.1. 耐塩性に対する他環境要因の複合的影響

塩無添加培地において播種後 1 週間生育させた後、200 - 250 mM NaCl (海水の約 1/2 の塩濃度) 添加培地に一定期間 (1 - 2 週間) 放置すと、シロイヌナズナは枯死する。植物の根は、 K^+ の細胞内への、また Na^+ の細胞外への能動共輸送系を有していると考えられる。したがって、細胞外 K^+ 濃度の NaCl 耐性の影響について検討した (Fig. 2)。37.5 mM K^+ において、200 mM Na^+ に対するシロイヌナズナの耐性は最も高く、37.5 mM 以下よりも以上 (150 mM まで) の K^+

において耐性であった。これは、これら両イオンによる細胞膜 membrane potential を一定に保つために、細胞外 K^+ 濃度が高い場合は、細胞外 Na^+ に対する耐性も高くなると考えられる。植物に耐塩性を付与するためには、施肥土壌における K^+ 濃度に近い K^+ を用いた変異体の選抜が適当であると考えられたため、その目的には 7.5 mM K^+ を用いた。

植物の塩感受性は実験ごとに変動が大きかった。変動の原因としては光照度が考えられた。塩処理後 4 - 5 日目における生存率は、1,000 lux ($13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 以下の光照射下においては 90% 以上であったが、3,000 lux では 10 - 30% に低下した (Fig. 3)。この際、生存個体におけるルシフェラーゼ活性によりモニターされる光合成遺伝子発現は、1,000 lux 前後で最大を示した (Fig. 4)。

3.2. シロイヌナズナの ecotypes (生態型) による耐塩性の違い

発芽時における 200 mM NaCl に対する耐性は、ecotype Columbia および Bensheim が高く (塩無添加培地における発芽の 10 - 20% の発芽率)、Norway および WS は低かった (発芽率 0%) (Fig. 5)。また、播種後 1 週間目に 200 mM NaCl 添加培地に移した後、さらに 2 週間放置した際の生存率を指標にした耐塩性は Bensheim が高く、本葉の形成を指標にした場合は WS の耐塩性が高かった (Fig. 6)。これら耐塩性を支配する遺伝子を解析するために、塩感受性が高

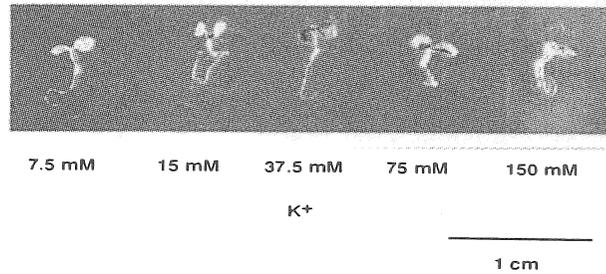


Fig. 2. Effects of K^+ added to the mineral nutrient medium (2) containing 200 mM NaCl on the growth of *A. thaliana* (Columbia). Seedlings in one week after germination were maintained on the medium containing NaCl for eight days under incandescent light ($3,000 \text{ lux}$, $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). K^+ was supplied as $\text{KNO}_3 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ (2:1, molar ratio) adjusted to pH 5.5.

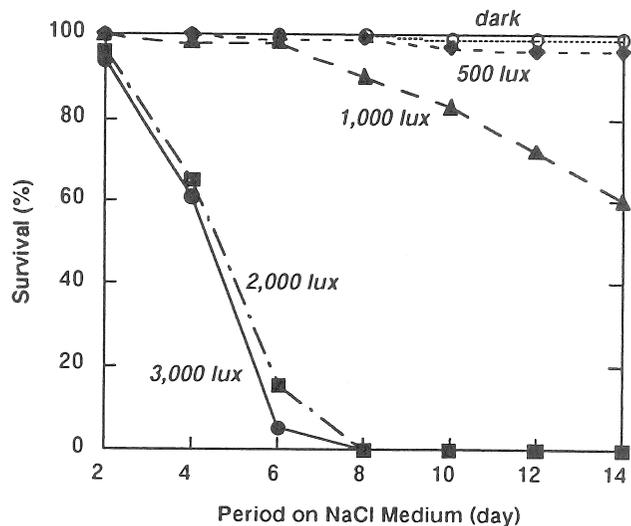


Fig. 3. Effect of NaCl on survival of the transgenic *A. thaliana* Columbia LG11-1, a homozygote for the T-DNA of pSGCL. Seedlings in one week after germination were maintained on the minimal nutrient medium (2) with or without 200 mM NaCl under the indicated intensities of incandescent light ($1,000 \text{ lux} = 13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

い ecotype との交配実験を行っている。

3.3. 変異原処理シロイヌナズナからの耐塩性突然変異体の選抜

200 mM および 250 mM NaCl 添加培地を用い, 変異原 ethylmethane sulfonate (EMS) 処理系統 12,400 種類および T-DNA 挿入変異系統 4,900 種類から塩耐性変異体を選抜した (Table 1-3)。その結果, 数系統の塩耐性突然変異体 *ste* (*salt-tolerant expression of photosynthesis genes*) を見だし, 交配により遺伝学的解析を行っている。

シロイヌナズナの耐塩性は, 光照度に依存し, また遺伝学的解析において, 耐塩性形質はメンデルの法則に従った単純な分離を示さず, その形質は, 表現型が環境の影響を受け易い複数の quantitative trait loci (QTL) により支配されていると考えられた。

4. 今後の課題

可能性のあるすべての突然変異体を得るためにさらに選抜を継続したい。また, 既に得られた *ste* 変異体候補については, 戻し交配および染色体マーカー系統との交配によりその遺伝子座を特定したい。T-DNA 挿入変異体については inverse PCR に

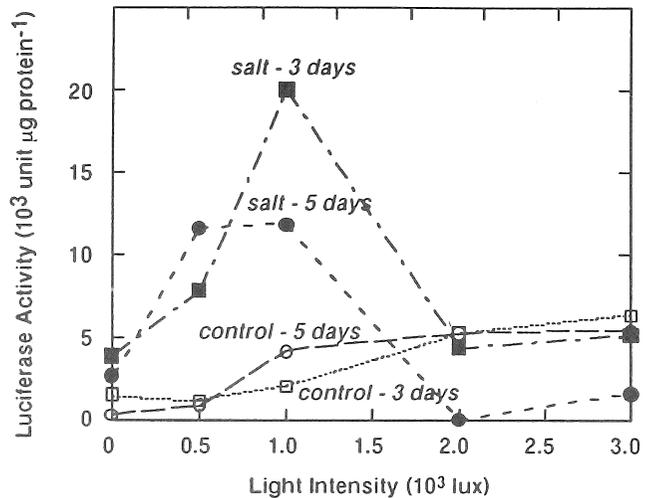


Fig. 4. Effect of NaCl on luciferase activity in the transgenic *A. thaliana* Columbia LG11-1, a homozygote for the T-DNA of pSGCL. Seedlings in one week after germination were maintained on the minimal nutrient medium (2) with or without 200 mM NaCl for the indicated periods under the different intensities of incandescent light (1,000 lux = 13 µmol m⁻² sec⁻¹).

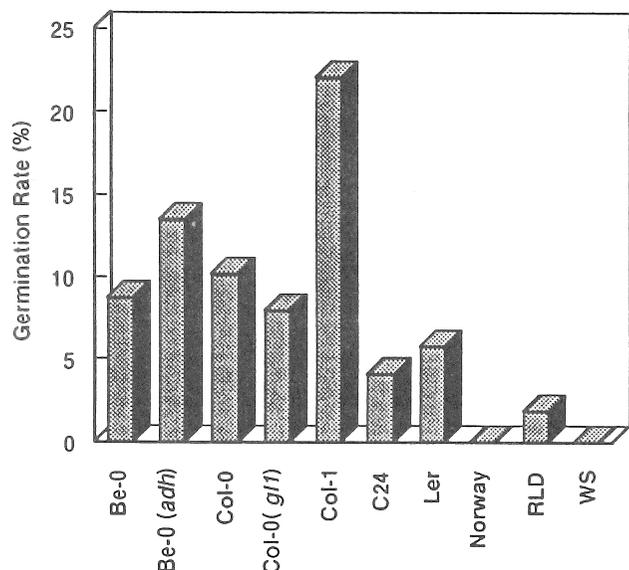


Fig. 5. Differences in the sensitivities of germination of *A. thaliana* ecotypes to NaCl. Seeds were germinated on the minimal nutrient medium (2) containing 200 mM NaCl.

より, また, EMS変異体については RFLPマーカーおよびシロイヌナズナ染色体 DNA yeast artificial chromosome (YAC) library を用い, 変異遺伝子をクローニングしたい。

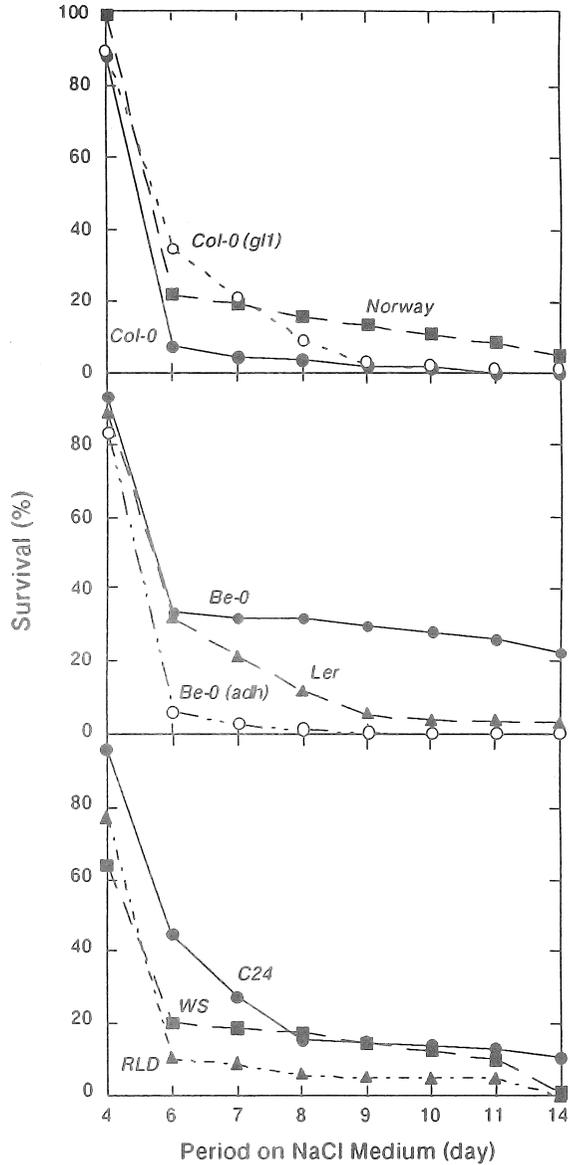


Fig. 6. Differences in the sensitivity of growth of *A. thaliana* ecotypes to NaCl. Seedlings in one week after germination were maintained on the minimal nutrient medium (2) containing 200 mM NaCl for the indicated periods.

Table 1. A partial list of selection of salt-tolerant M2 *A.thaliana* (Columbia) after treatment with EMS

Group no.	No. seeds	No. survived plants	
		Salt	Soil
22	600	20	2
23	840	56	41
24	120	0	0
25	720	23	0
26	840	0	0
27	960	15	0
28	960	2	0
29	840	31	0
30	840	0	0
31	960	8	0
32	840	26	0
33	840	4	3
Total	9,360	185	46

Seedlings in one week after germination were maintained on the minimal nutrient medium (2) containing 200 mM NaCl for two weeks under incandescent light (3,000 lux, 39 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), followed by transferring to MSO medium based on Murashige and Skoog plant salt mixture containing 2% (w/v, 58.4 mM) sucrose (2) for two months with replacing the medium more than twice and then to soil for flowering.

Table 2. A partial list of selection of salt-tolerant M2 *A.thaliana* (the transgenic Columbia LG11-1, a homozygote for the T-DNA of pSGCL) after treatment with EMS

Group no.	No. seeds	No. survived plants	
		Salt	Soil
36	840	2	0
37	960	10	0
38	880	6	0
39	800	1	0
40	720	16	0
41	840	9	0
42	840	29	0
43	960	16	0
44	840	31	0
45	960	0	0
46	800	16	0
47	840	5	0
48	800	8	2
49	840	6	0
50	900	0	0
51	880	7	0
52	720	18	0
53	840	3	0
54	960	2	0
55	960	3	0
56	960	4	2
57	960	2	0
58	960	3	1
59	960	1	0
60	840	0	0
61	960	8	0
62	1,200	1	0
63	1,080	9	0
64	1,200	6	0
65	1,320	3	0
66	1,200	3	0
67	1,320	1	0
68	1,080	1	0
69	840	0	0
70	840	3	0
71	840	0	0
72	960	1	0
73	720	0	0
74	840	0	0
75	720	10	0
76	900	8	0
77	980	9	0
78	980	11	0
79	1,020	14	0
80	980	0	0
81	880	8	0
82	800	0	0
83	360	5	0
84	900	0	0
Total	44,780	304	5

Seedlings in one week after germination were maintained on the minimal nutrient medium (2) containing 200 mM NaCl for two weeks under incandescent light (3,000 lux, 39 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), followed by transferring to MSO medium based on Murashige and Skoog plant salt mixture containing 2% (w/v, 58.4 mM) sucrose (2) for two months with replacing the medium more than twice and then to soil for flowering.

Table 3. A partial list of selection of salt-tolerant M3 *A.thaliana* [Columbia (SR22 to SR33) and the transgenic Columbia LG11-1 (SR48 to SR58)] after treatment with EMS

Line no.	No. seeds	No. survived plants	
		Salt	Soil
SR22-1	300	1	0
SR22-2	500	0	0
SR23-1	600	8	8
SR23-2	500	2	0
SR23-3	360	0	0
SR23-4	300	4	0
SR23-5	240	0	0
SR23-6	350	0	0
SR23-7	600	0	0
SR23-8	350	0	0
SR23-9	500	3	0
SR23-10	300	0	0
SR23-11	600	0	0
SR23-12	720	7	0
SR23-13	300	3	0
SR23-14	400	4	2
SR23-15	800	7	0
SR23-16	210	7	6
SR23-17	600	4	0
SR23-18	900	9	0
SR23-19	700	59	14
SR23-20	900	10	0
SR23-21	720	3	0
SR23-22	210	11	3
SR23-23	280	5	2
SR23-24	900	10	9
SR23-25	350	5	0
SR23-26	300	1	0
SR23-27	900	2	0
SR23-28	200	2	0
SR23-29	210	2	0
SR23-30	180	1	0
SR23-31	140	2	0
SR23-32	240	3	1
SR23-33	200	2	0
SR23-34	240	3	0
SR23-35	70	1	0
SR23-36	200	2	0
SR23-37	600	2	1
SR23-38	300	1	0
SR23-39	200	2	0
SR23-40	240	1	0
SR23-41	160	1	0
SR33-1	500	0	0
SR33-2	900	5	2
SR33-3	400	0	0
SR33-4	250	0	0
SR33-5	700	6	0
SR33-6	400	5	0
SR33-7	400	1	0
SR33-8	500	3	0
SR48-1	300	0	0
SR48-2	200	2	0
SR56-1	360	1	0
SR56-2	0	0	0
SR58-1	300	2	0
Total	23,080	215	48

Seedlings in one week after germination were maintained on the minimal nutrient medium (2) containing 200 mM NaCl for two weeks under incandescent light (3,000 lux, 39 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), followed by transferring to MSO medium based on Murashige and Skoog plant salt mixture containing 2% (w/v, 58.4 mM) sucrose (2) for two months with replacing the medium more than twice and then to soil for flowering.

5. 引用文献

1. H. Kobayashi, K. Kobayashi, K. Goto, and Y. Niwa: *Research in Photosynthesis, Vol. 3, edited by N. Murata, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, pp. 441-443 (1992)
2. C. Koncz, N.-H. Chua, and J. Schell, eds.: *Methods in Arabidopsis Research, World Scientific, Singapore* (1992)
3. K. R. Luehrsen, J. R. de Wet, and V. Walbot: *Meth. Enc.* 216, 397-414 (1992)

6. 研究成果発表

6.1. 原著論文

1. K. Isono, Y. Niwa, K. Satoh, and H. Kobayashi: A dominant regulatory step at transcription in expression of the photosynthesis gene *rbcL* in root plastids of *Arabidopsis thaliana*. (submitted)
2. Y. Niwa, H. Seki, M. Morikawa, K. Goto, K. Kobayashi, and H. Kobayashi: Potency of *Arabidopsis thaliana* roots for transcription under the controls of promoters of the nuclear photosynthesis gene *RBCS* and *CAB*. (submitted)
3. K. Isono, and H. Kobayashi: Structures of three distinct promoters of plastid genes from *Arabidopsis thaliana*. (submitted)
4. G. Horiike, M. Kuroyanagi, A. Ueno, Y. Niwa, and H. Kobayashi: A quick PCR method for detecting T-DNA in plants transformed with *Agrobacterium* spp. using rapidly-prepared DNA. (submitted)
5. M. Sacki, K. Kobayashi, K. Tsugane, Y. Niwa, and H. Kobayashi: Response of photosynthesis gene expression to salt stress in *Arabidopsis* and its mutants. (submitted)

6.2. 国際会議における発表および招待講演

1. Y. Niwa, H. Tsukaya, T. Masuda, M. Sacki, Y. Komeda, and H. Kobayashi: Approaches with transgenic *Arabidopsis* to understanding regulatory mechanisms of expression of photosynthesis genes. *4th International Congress of Plant Molecular Biology, Amsterdam, The Netherlands, 6月* (1994)
2. M. Shimizu, Y. Niwa, G. Horiike, and H. Kobayashi: Root-specifically expressed genes in *Arabidopsis thaliana*. *4th International Congress of Plant Molecular Biology, Amsterdam, The Netherlands, 6月* (1994)
3. H. Kobayashi: Strategies based on mutagenesis and their applications: Creation of new species of a gene product and analysis of plant signal transduction pathways. *The 1995-Tottori Meeting of the US-Japan Joint Research on the Molecular Biology of HST, 鳥取, 1月* (1995)
4. H. Kobayashi: Problems surrounding enhancement of photosynthetic CO₂ fixation:

Improvement of photosystem and regulation of rubisco gene expression in higher plants. *The Second Meeting of the NEDOIRITE Super-Rubisco Program: Toward Biological Elimination of Atmospheric CO₂ by Enhanced Pump Activities and Super-Rubisco*. Honolulu, 2月 (1995)

6.3. 国内における学会発表

1. 小林裕和 : 植物遺伝子操作技術の活用: 高光合成活性植物の作出および植物を用いた物質生産 (基調講演). 静岡県試験研究調整会議バイオテクノロジー部会, 磐田, 9月 (1994)
2. 丹羽康夫, 小林京子, 増田拓也, 菅原山行, 佐伯真理, 小林裕和 : プラスチド機能発達異常シロイヌナズナ核突然変異体の選抜と解析. 第5回基礎生物学研究所形質統御実験施設シロイヌナズナ・ワークショップ, 岡崎, 12月 (1994)
3. 丹羽康夫, 小林裕和, Jen Sheen: シロイヌナズナにおける部位特異的相同組換え遺伝子発現誘導系の開発他. 第5回基礎生物学研究所形質統御実験施設シロイヌナズナ・ワークショップ, 岡崎, 12月, 1994.
4. 清水正則, 丹羽康夫, 小林裕和 : シロイヌナズナ根組織発現遺伝子の解析. 第5回基礎生物学研究所形質統御実験施設シロイヌナズナ・ワークショップ, 岡崎, 12月 (1994)
5. 丹羽康夫, 増田拓也, 佐伯真理, 菅原山行, 小林裕和 : *Arabidopsis* を用いた組織特異的光合成遺伝子発現異常突然変異体の選抜. 日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (1994)
6. 佐伯真理, 小林京子, 梶根一夫, 丹羽康夫, 小林裕和 : *Arabidopsis* における光合成遺伝子発現塩ストレス応答およびその突然変異体. 日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (1994)
7. 増田拓也, 丹羽康夫, 佐伯真理, 菅原山行, 小林裕和 : シロイヌナズナ RBCS 根組織発現突然変異体の選抜. 日本植物生理学会年会, 松江, 3月 (1995)
8. 小林京子, 梶根一夫, 丹羽康夫, 小林裕和 : シロイヌナズナ RBCS 低発現突然変異体の選抜と解析. 日本植物生理学会年会, 松江, 3月 (1995)
9. 丹羽康夫, 小林裕和, Jen Sheen: シロイヌナズナおよびトウモロコシにおける誘導可能な部位特異的組換え系の開発. 日本植物生理学会年会, 松江, 3月 (1995)

Molecular Genetical Analysis of Mechanisms of Salt Tolerance in Plants

Hirokazu Kobayashi, Kazuo Tsugane, Mari Saeki, Yasuo Niwa, and Kyoko Kobayashi
School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

Summary

Accumulation of salts derived from sandy soil on the land surface by desiccation is a serious problem even when irrigation is partially possible, although the irrigation is needed to make dry desert areas green. Irrigation with diluted sea water may be available in areas closed to sea. In any cases, it is desired to confer the salt tolerance ability on plants. Therefore, we intended to characterize genes regulating to make plants salt tolerant and further bestow that ability on cultivating plants. We have applied genetical methodology to the model plant *Arabidopsis thaliana*, which is suited for mutagenesis and the subsequent gene cloning by complementation.

It is speculated that the rate of formation of the photosynthetic machinery is reduced under salt stress conditions, resulting from suppression of constitutive expression of genes for photosynthesis. We have focused on well known genes for photosynthesis, the genes for the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) (*RBCS*) and for chlorophyll *alb*-binding proteins (*CAB*, *LHC*), especially their gene members *RBCS-3B* and *CAB1* (*LHCB1*At3*) of *A. thaliana*. In order to monitor their expression, several reporter genes were placed under the controls of their promoter regions including their upstream sequences.

A. thaliana grown in one week after germination on a standard medium has become bleached during one to two weeks after transferring to media containing 200 to 250 mM NaCl (approx. a half of NaCl concentration in sea water). This sensitivity of *A. thaliana* to salt was variable in each experiment, speculated to be caused by difference in light intensity illuminating plants. The survival rate of *A. thaliana* maintained on a salt medium for four to five days under light less than 1,000 lux ($13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) was 90% or more, and that under 3,000 lux decreased to 10 to 30%. Expression of *CAB1* monitored by luciferase activity in surviving plants showed maximal at illumination of approx. 1,000 lux.

Germination of *A. thaliana* ecotype Columbia and Bensheim was less sensitive to 200 mM NaCl (10 to 20% in germination rate of that on the standard medium) and ecotype Norway and WS was quite sensitive (no germination). The resistance of plant growth to 200 mM NaCl as indicated by survival rate of plants grown for one week after germination during the subsequent two weeks, was high in case of ecotype Bensheim, and that as judged by formation of true leaves was high with ecotype WS. To analyze genes responsible for salt tolerance, genetical crossing of those resistant ecotypes and sensitive ones is being achieved.

The 12,400 lines mutagenized with ethylmethane sulfonate (EMS) and 4,900 lines of insertion mutagenesis with T-DNA were exposed to 200 to 250 mM NaCl after germination. A few lines of salt-tolerant mutants designated "ste" (salt-tolerant expression of photosynthesis genes) were obtained and are further being genetically analyzed.

Salt tolerance of *A. thaliana* is concluded to depend on light intensity and genetically controlled by quantitative trait loci (QTL) which are not simply explained by Mendel's laws.