

助成番号 0630

オオムギの耐塩性の品種間差に関する研究—耐塩性品種選抜に向けて

山崎 素直¹, 張 経華², 高尾 雄二³, 西山 雅也³¹横浜薬科大学健康薬学科, ²長崎大学客員研究員, ³長崎大学環境科学部

概要 世界に1万種以上あるといわれるオオムギのそれぞれの品種(variety)間に環境ストレスに対する応答にどのような違いがあるだろうか。この違いをオオムギの主要適合溶質であるグリシンベタイン(GB)の存在量から判定することを試みた。岡山大学資源生物科学研究所オオムギ保存施設から供与いただいた約300品種について、乾燥ストレスを負荷したものと、しないもの(対照)を栽培し、幼植物中のGBをキャピラリー電気泳動法で定量し比較した。なお、乾燥ストレスは塩ストレスと同等にGBを誘導することから、実験の簡便さから乾燥ストレスを負荷した。その結果、

- ①幼植物時の耐塩性が既知の品種(耐塩性強7品種, 弱7品種の計14品種)について、乾燥ストレス負荷と非負荷(正常生育)におけるGB誘導量について線形判別関数Zを求めたところ、Z値から耐塩性強の品種と弱の品種を明瞭に判別することができた(図1)。
- ②この判別式を用いて耐塩性未知の299品種を分析したところ、約半数が耐塩性強、残りが弱と判定できた(図2)。
- ③同一種の中でもGB誘導量が塩生植物に劣らないくらい高濃度に誘導するものから、塩感受性植物並みの弱い耐性しか示さないものまで広い分布を示した。
- ④殆ど在来種からなるエチオピアの品種では、GB誘導量は年間降雨量と逆相関していた。このことはオオムギは長年月の間にその土地の乾燥度を遺伝子に記憶し、環境に適応する耐性をGB誘導量として表現していることが分かった。
- ⑤本法を用いてGB誘導量から耐塩性の強弱を判定することができることから、今後実際の品種選抜試験に先立って本法を一次スクリーニング的に用いれば選抜時間の大幅な短縮が図れることが期待される。

本法はオオムギ以外にもコムギ、アルファルファなどGBあるいはその関連化合物を誘導する植物のストレス耐性判別に応用可能である。

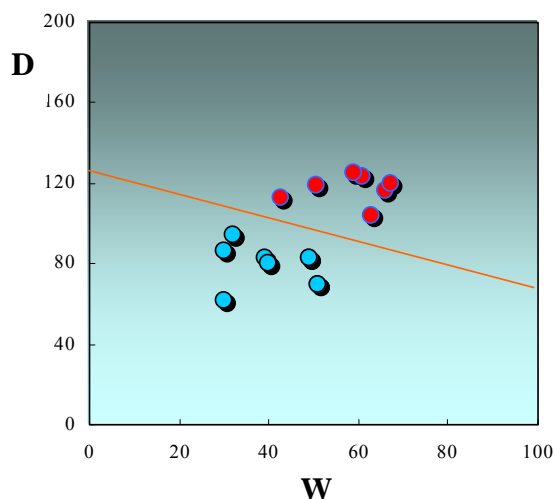


図1 幼植物耐塩性既知14品種の判別散布図

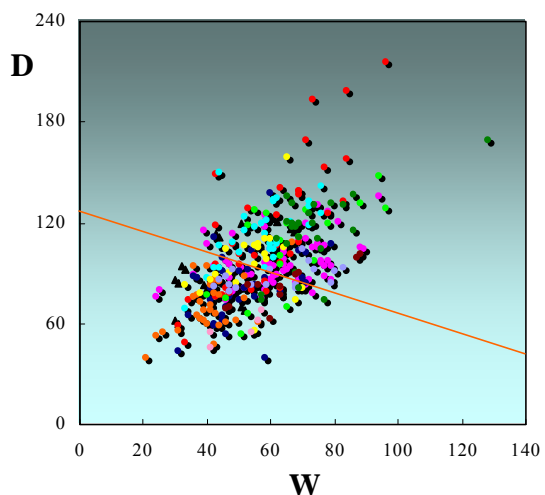


図2 299品種の耐塩性に関する判別散布図

D: 乾燥ストレス下でのGB誘導量, W: 正常生育でのGB誘導量($\mu\text{mol/g dw}$)

直線は線形判別関数Zを示す。

1. 緒言

世界の農耕地の約10%は塩類土壌といわれ、また世界陸地の30%を占める乾燥・半乾燥地域では灌漑による土壌の二次塩類化が深刻な問題となっている。1990年代半ばころから世界の優良農耕地における穀物生産量は頭打ち状態となり、世界人口の増加率が食糧自給率を上回る状態になった。そうした中で急増する世界人口に見合う食糧をどのように確保するかが今世紀の緊急課題となっている。この食糧危機を回避するためには、生産性の低い劣悪土壌（塩類土壌、乾燥・半乾燥地、酸性・アルカリ性土壌など）の積極的利用とその生産性の向上が急務となっている。しかし、これまでの肥料や農薬を多用する集約農業では、究極的には土地の劣化と環境汚染が避けられず、環境を保全しながら生産性を上げるにはどうしたらよいか、という新たな難問を抱えている¹⁻³⁾。

この問題を解決する最適な方法の一つに品種選抜がある。世界中の様々な環境中で生育している品種を集め、この中から品種選抜を繰り返すことによって塩害、旱魃、低温などの複合した環境ストレスに耐性を持つ品種を選抜する方法が広く世界的に行われている。この方法はその土地の環境変化に適合した最適品種を選抜できる点で遺伝子工学的な耐性品種作出に勝るとも劣らない有効な方法であるが、最大の欠点は最適品種を選抜するまでに多大の労力と長年月（数年～十年）を必要とする点で、人口増加のスピードに追いつけない状況にある。例えばオオムギは、五大穀物のなかでは最も耐塩性・耐乾燥性が強いといわれているが、世界には10,000品種以上存在し、その中から最適品種を選抜するには膨大な時間が必要である。筆者は過去10余年間、中国の塩類土壌地帯で品種選抜に関与した経験から、品種選抜の時間を何とか短縮する技術はないか、とその開発の必要性を痛感してきた^{4,5)}。

この目的を達成するためには植物の環境ストレスへの応答の仕組みを理解する必要がある^{6,7)}。高等植物の多くは塩害や旱魃などのストレスを受けると細胞内にグリシンベタイン(GB)をはじめとする浸透圧調節物質(適合溶質)を誘導合成して細胞内の膨圧を維持する^{8,9)}。GBは乾燥、低温、塩害で誘導され、ストレスの強さに応じて誘導量が増加することから、筆者は、逆にGBの誘導量から植物の塩ストレス耐性の強弱を推定できないかと考えた。植物の環境適応を植物の二次代謝物(ここではGB)の誘導量から知ろうとするものである。そこで筆者はキャピラリー電気

泳動法によるGBの簡便迅速な定量法を開発し、これを用いて各種植物におけるストレス負荷によるGB誘導の関係を精査し、ストレス耐性の強さとGB誘導量との間に相関があることを見出してきた¹⁰⁻¹²⁾。この結果を踏まえて、本研究ではオオムギという一つの種の中で、多数の品種間にどのような環境ストレスに対する耐性の差異があるのかを分析化学的に追跡することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 オオムギ試料

オオムギ試料は岡山大学資源生物科学研究所のオオムギ保存施設に系統保存されている品種の中から以下の約330品種を供与いただいた^{13,14)}。

①幼植物時の耐塩性が分かっている品種, 14品種

②発芽時の耐塩性既知の品種, 21品種

③耐塩性未知の品種, 299品種

①は約6,000種の品種の中から圃場での耐塩性試験によって幼植物時における耐塩性の強弱が検定されている品種のうち、最強のもの7品種と最弱のもの7品種。②は発芽時の耐塩性を同様に判定したもの。③は耐塩性試験を行っていない耐塩性未知の品種である。

2.2 栽培試験

上記①～③の試料を岡山大学の実験圃場で発芽後3葉をつけるまで正常に生育させた後、半分を正常に生育させ(対照区)、残り半分を水を切って乾燥ストレスを1週間かけた(ストレス負荷区)¹³⁾。塩ストレスではなく乾燥ストレスを負荷したのは、グリシンベタイン(GB)はどちらのストレスでも誘導されること(後述)、および今後の多数の品種栽培には乾燥ストレスの方が実験が簡単におこなえることによる。乾燥ストレス負荷後1週間目に地上部を採取し、速やかに乾燥後、冷暗所に保存した。

2.3 試料の前処理

上記試料を分析直前に再度80℃、6時間乾燥させた。地上部全体をミキサーで粉碎した。GBを効率よく測定するために各種抽出条件を検討して最適条件を求めた。その結果、粉末試料0.1gをプラスチックバイアルにとり4mlの水を加え80℃、20分熱水抽出するのが最適であった。

2.4 GBのp-ブロモフェナシルエステル化^{10,11)}

上記抽出液0.2mlに緩衝液(100mM炭酸水素カリウム:100mMリン酸二水素カリウム:18-クラウン-6)のアセトニトリル溶液=1:1:4)0.1mlに溶かし、p-bromophenacyl bromide(20mg/mlアセトニトリル溶液)

0.6 ml を加え、高温槽で 80°C、75 分反応させた (Fig. 1)。反応液を室温まで冷却し、0.45 µm のディスクフィルターでろ過した後、電気泳動にかけた。

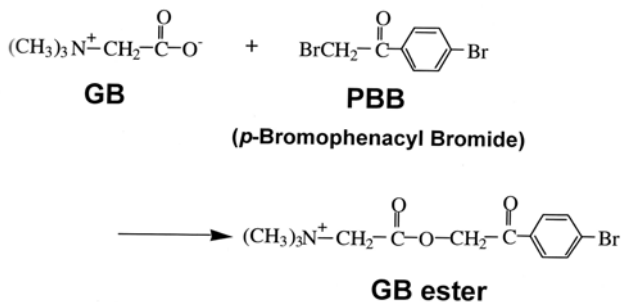


Fig. 1 Esterification of glycinebetaine (GB).

2. 5 キャピラリー電気泳動¹⁰⁻¹²⁾

装置は WatersQuanta-4000 および Beckman-Coulter 社製 P/ACE MDQ キャピラリー電気泳動装置を用いた。前者はキャピラリー 50 µm.i.d. x 60 cm、検出は 254 nm、測定温度 20°C、サンプリングは落差法 10 cm x 10 秒、印加電圧は 15 KV とした。後者は、キャピラリー 75 µm.i.d. x 60 cm、サンプリングは加圧法 5 psi x 5 秒、他は同じ条件でおこなった。泳動液には、50 mM リン酸ナトリウム溶液、pH 3.5 を使い、酸性溶液中で泳動をおこなった。泳動液は 0.45 µm のディスクフィルターでろ過して用いた。オオムギ試料の分析例を Fig. 2 に示す。泳動時間 10 分以内で分離の良いシグナルが得られる。

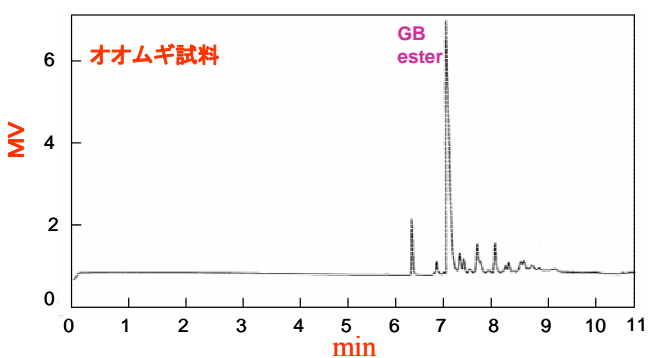


Fig. 2 Determination of GB by low-pH capillary electrophoresis.

GB の標準溶液で調製した誘導体を用いて検量線を作成した。検量線は 0.05-5.0 mM の範囲で良好な直線性を示し (相関係数 $R = 0.9999$), $S/N = 3$ とした時の検出限界は 0.010 mM、繰り返し測定した時の相対標準偏差は、0.5 mM の試料で泳動時間に対して 2.01%、ピーク面積対

して 4.1% と、再現性は良好であった。

2. 6 塩ストレス負荷による栽培

分析した試料のうち、GB 誘導量の異なる三つのグループ①～③の計 7 品種を選び、塩ストレス下で土耕栽培した。播種後 2 週間目に、100 mM NaCl を含むプランターに移植し、引き続き 3 週間栽培し、経時的に GB 含量を測定した。

- ① GB 誘導量の大きいタイプ: C624
- ② GB 誘導量が平均値に近いタイプ: C043, B024, K017
- ③ GB 誘導量が小さいタイプ: C616, B667, I100

3. 結果と考察

3. 1 耐塩性既知のオオムギ 14 品種の GB 含量による耐塩性の判別

圃場における耐塩性試験によって幼植物時の耐塩性が分かっている品種のうち、耐塩性が最強のもの 7 品種と最弱のもの 7 品種について 2. 2 の栽培条件で栽培し、正常生育 (対照区) と乾燥ストレス負荷 (ストレス区) を得た。得られた幼植物中の GB を定量した結果を Table 1 に示す。表より、①耐塩性強の品種は耐塩性弱の品種より GB 誘導量が多い、②耐塩性の強弱に関わらず乾燥ストレス負荷によって GB 誘導量が約 2 倍に増加することがわかった。

この二つの母集団について EXCEL を用いて判別分析を行ったところ、その線形判別関数 Z は、

$$Z = 0.3321W + 0.5481D - 70.0794$$

となった¹⁵⁾。ここで、 W : 正常生育の GB 含量, D : 乾燥ストレス負荷の GB 含量 ($\mu\text{mol/g d.w.}$) を示す。Fig. 3 に W と D を両軸とする散布図を示す。

図より耐塩性強の 7 品種は判別式より上に ($Z > 0$)、耐塩性弱の品種は下に ($Z < 0$) に表わされることが分かった。この判別関数は試料数や栽培条件を変えれば係数が変化するものではあるが、同一条件下で栽培した試料のストレス応答の強弱を判定するには十分であると判断した。

3. 2 耐塩性未知のオオムギ 299 品種の GB 含量による耐塩性の判別

上記判別式によってオオムギ品種の耐塩性の強弱が判別できることが分かったので、この方法を耐塩性未知の 299 品種のオオムギに適用し、この方法の有効性を検証した。

299 品種は、岡山大のオオムギ保存施設ではグループ

Table 1 GB content and Z-values of 14 salt-tolerance-known barley varieties

Salt tolerance	No.	OU No.	Origin	D	W	D/W	Z
Highly tolerant	1	U070	Russia	123	61	2.0	7.59
	2	K017	Korea	119	51	2.3	11.91
	3	K305	Korea	113	43	2.6	6.07
	4	E812	Ethiopia	104	63	1.6	7.84
	5	U342	Austria	116	66	1.8	15.42
	6	B024	Algeria	125	59	2.1	18.02
	7	U643	Austria	120	67	1.8	17.94
			Av.	117	59	2.0	12.12
Weakly tolerant	8	I186	India	94	32	2.9	-7.93
	9	C613	China	83	49	1.7	-8.31
	10	I743	Afghanistan	83	39	2.1	-11.63
	11	A632	Unknown	80	40	2.0	-12.94
	12	C667	China	70	51	1.4	-14.77
	13	I100	India	62	30	2.1	-26.35
	14	A627	Unknown	80	40	2.0	-12.94
			Av.	79	40	2.2	-13.54

D, W: GB content ($\mu\text{mol/g dw}$) induced under drought and normal conditions. Z: linear discriminant function. OU No.: Registration number of barley variety at Germplasm Center, Research Institute for Bioresources, Okayama University.

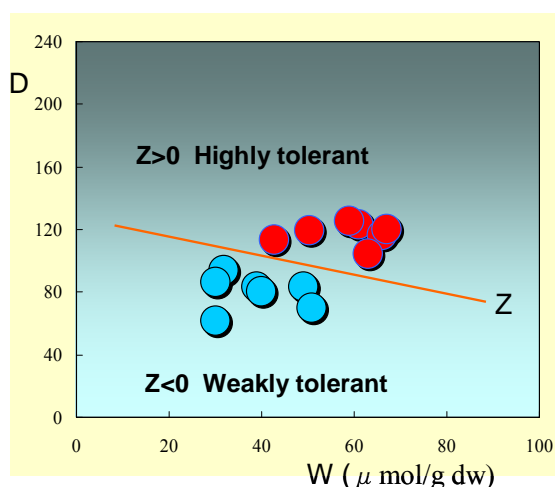


Fig. 3 Linear discriminant function Z for salt tolerance of 14 salt-tolerance-known barley varieties

(生産地あるいは採集地)別に分類されている。すなわち、グループ A(アメリカ、カナダ)、B(北アフリカ)、C(中国)、E(エチオピア)、I(南東アジア)、J(日本)、K(韓国)、N(ネパール)、T(トルコ)、U(ヨーロッパ)など。

各グループごとの分析結果を Fig. 4 に示す。エチオピア、中国、韓国などは $Z > 0$ のものが多く、日本は逆に $Z < 0$ のものが多い。恐らく各生産地の気象状況(温度、水環

境)や土壌の塩含量などのストレス因子の多少によって GB 誘導量が増加すると思われる、大変興味深い。この点はエチオピアの例を後述する。

Fig. 5 に 299 品種全部をまとめた結果を示す。

横軸 W: GB 量で 20~130 $\mu\text{mol/g dw}$ (平均 58 $\mu\text{mol/g dw}$)

縦軸 D: GB 量は 40~220 $\mu\text{mol/g dw}$ (平均 97 $\mu\text{mol/g dw}$)

W は対照区で同じ水環境で栽培したにもかかわらず、品種によって GB 発現量に大きな開きがあった(栽培中に何らかのストレスがかかった可能性があるかもしれない)。一方、乾燥ストレスを負荷した縦軸 D では、GB 誘導量は W の約 2 倍に増加し、かつ品種間の誘導量の差が 5 倍以上を示した。

このことはオオムギではストレス負荷に対して GB を誘導して対応していること、その対応の範囲が約 2 倍程度であること、誘導量の大小は品種によって差があること、その差は誘導量の最小の品種は中性植物や塩感受性植物に近く、誘導量が多い品種は野生の塩生植物並み(およそ 150 $\mu\text{mol/g dw}$ 以上)の誘導量を示した。同一品種でもストレス応答にこのような大きな差があることは、品種選抜の面から本法の有効性を示唆している。

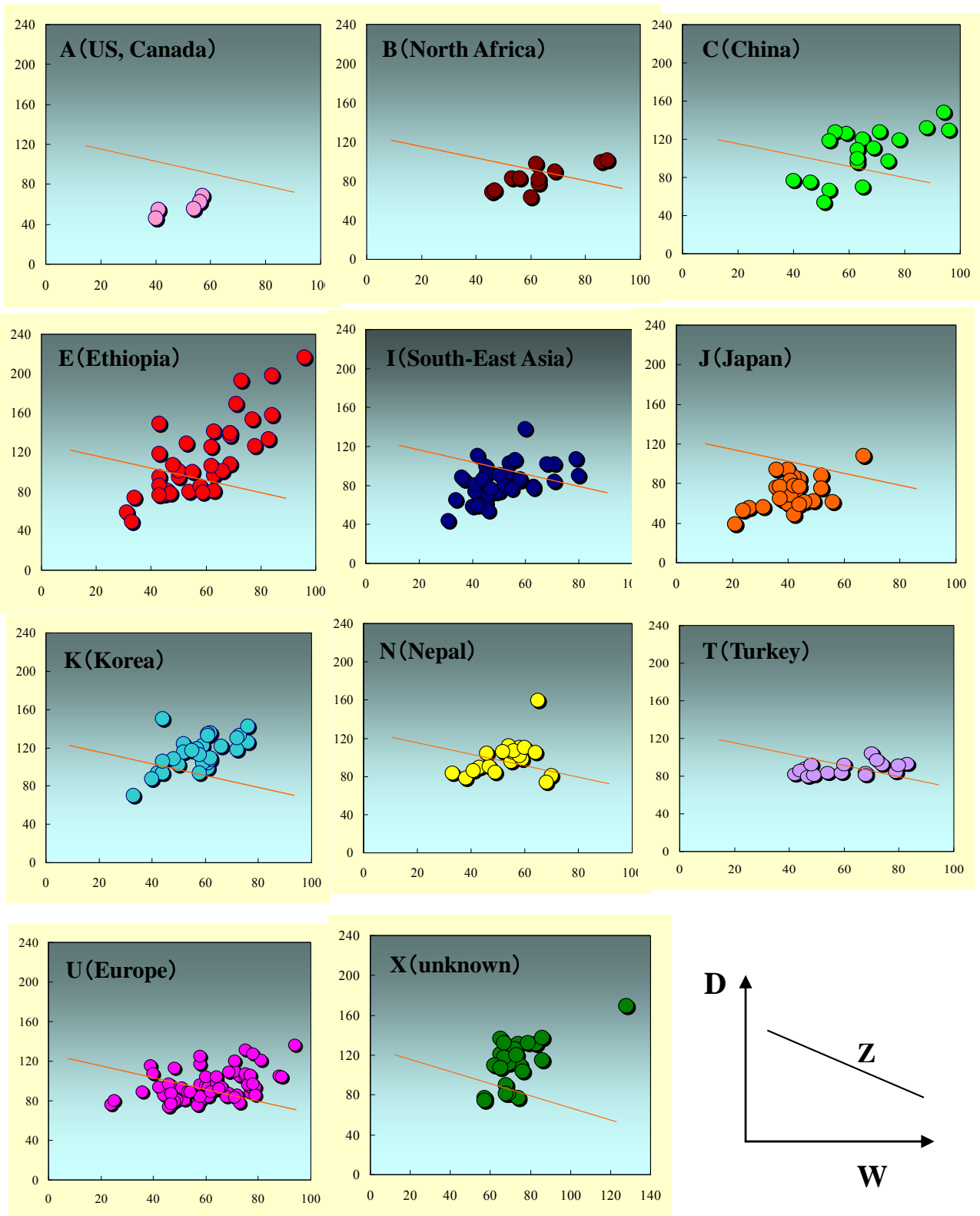


Fig. 4 Discrimination pattern of salt-tolerance-unknown 299 barley varieties.
D, **W** : GB content ($\mu\text{mol/g dw}$) under drought and normal conditions, respectively.
Z : Linear discriminant function, **X** (unknown): unassigned samples.

Fig. 5 において線形判別関数 Z は、 $-40 \sim 80$ を示し、マイナスが大きいほどストレスに弱く、プラスが大きいほど強いことを示す。299 品種のうち $Z > 0$ が 157 品種、 $Z < 0$ が 142 品種と、耐性の強い品種と弱い品種を大別することができた。

3.3 線形判別関数 Z の大きさとストレス耐性の強さの関係

線形判別関数 Z の正負によってストレス耐性の有無が判断できるようになったが、さらに Z の大きさによって耐性の程度を判別できないだろうか。Fig. 5 の中から三つのタイプに分けて 7 品種を選び、塩を添加して土耕栽培を行った。すなわち、Fig. 5 で、

- Type I : D も W も大きいタイプ : C624 ($Z > 42.3$)
- Type II : D, W とも平均値に近いもの : C043, B024, K017 ($10 < Z < 20$)
- Type III : D, W とも小さいもの : C616, B667, I100 ($-26 < Z < -15$)

Fig. 6 に 7 品種の散布図を示す。

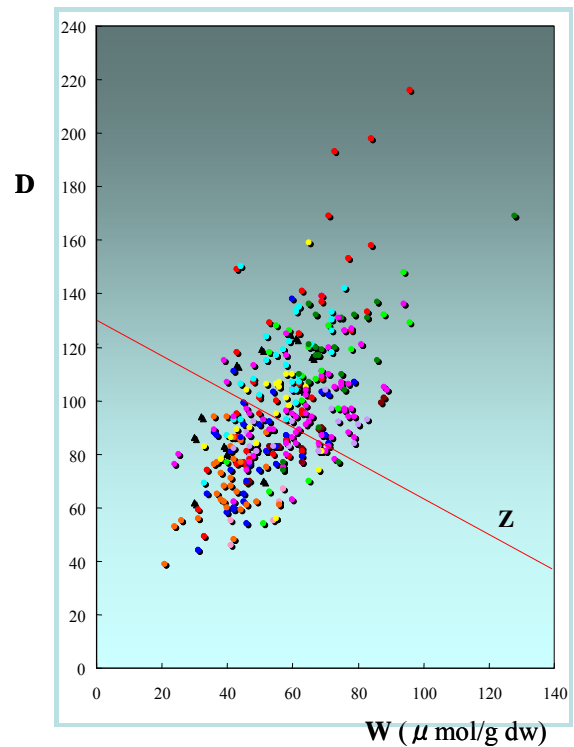


Fig. 5 Discrimination pattern of salt tolerance of 299 barley varieties.

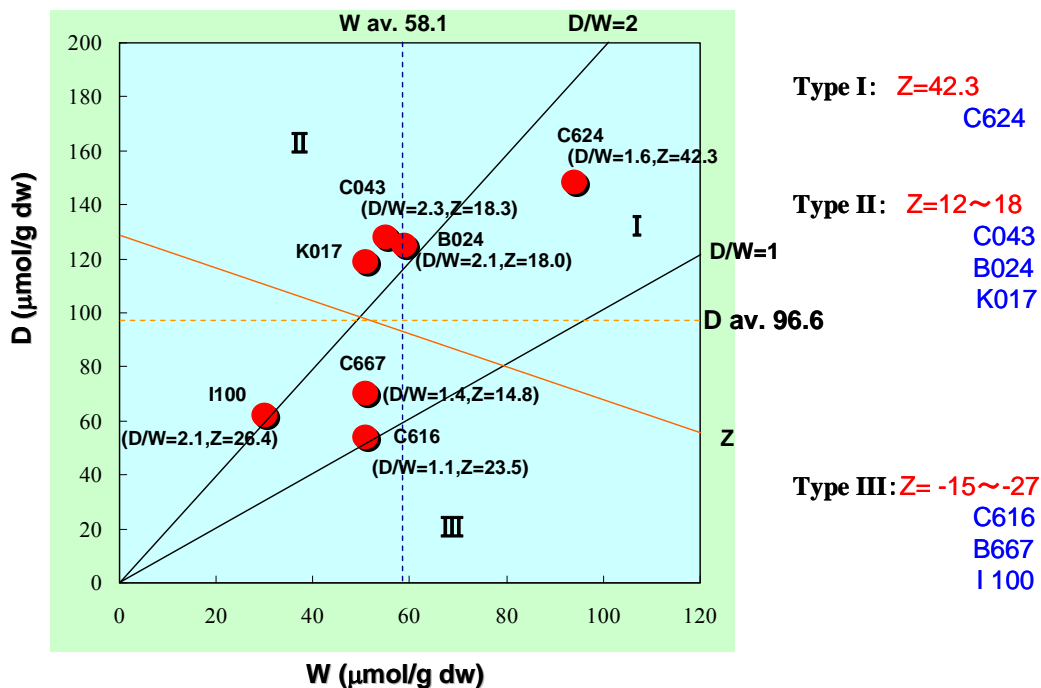


Fig. 6 Selection of 7 varieties with different Z -values. The figure is the same as Fig. 5. Three types are: I ($Z > 40$), II ($10 < Z < 20$) and III ($-26 < Z < -15$).

発芽後2週間の幼植物に100 mM NaClを添加し、35日間栽培し、経時的にGB量を測定した。結果をFig. 7に示す。対照に比べ塩添加後Type Iでは急激にGBを誘導すること、Type IIでは緩やかに誘導がかかること、Type IIIでは塩ストレスの影響で葉が枯れ始め、1ヵ月後には枯死した。このことからZ値の大きさとGB誘導量と耐性の強さは相関しており、したがってZ値の大きさから大よその耐性の強さに対応していることがわかった。

一方、本実験から、塩ストレス負荷によるGB誘導パターンは3. 2で示した乾燥ストレスによるGB誘導パターンと相同であることが分かる。このことから塩ストレス負荷の代わりに乾燥ストレス負荷で実験しても相同な結果が得られることが納得できる。

3. 4 エチオピア品種のZ値とストレス耐性の関係

Table 2 にエチオピア産オオムギで生産地が同定できた品種のGB量とZ値およびその産地の年間降水量を示す¹⁶⁾。表はZ値の大きさ(+80 → -27)で並べてあるが、ほぼ見事に年間降水量と逆の関係が見られる。エチオピ

アの年間降水量は400から1,600 mmで、山岳地帯は乾燥地で低温、低標高地では湿潤気候を示す。エチオピアの研究者によると、エチオピアでは外国からの種子の輸入はなく栽培種は殆ど在来種であること、灌漑も殆ど天水に頼っていること、品種名は栽培地の村または取引されている近くのマーケットの名前がついているとのことであった¹⁷⁾。これらの情報をもとに品種名と生産地を地図の上で結びつけることができた。

この結果から、エチオピアのオオムギは同じ土地で長年栽培され、それによってその土地の水環境が遺伝子に記憶され、乾燥地由来の品種ではGB量が高く、雨量の多い生産地ではGB量が低く出ることが理解できた。Fig. 8にはエチオピア、中国、日本の品種のZ値と年間降雨量を示すが、相関係数がR = 0.759ときわめて高い相関を示した。このことは植物にとってもっとも必要な水の情報が植物そのものに遺伝情報として記憶され、水欠乏に対応するための二次代謝量を決定する仕組みが構築され、それによって環境適応を図っていることが納得できた。

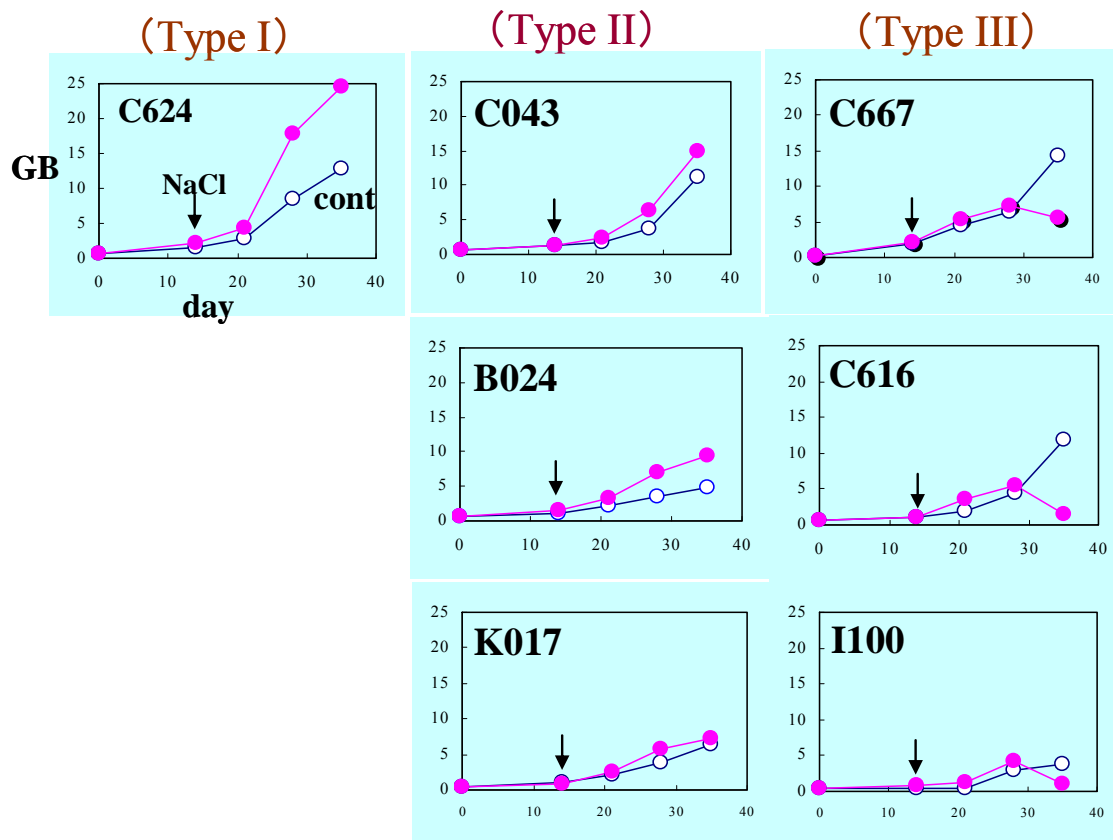


Fig. 7 Relation between GB induction and Z-value of barley varieties cultured under salt condition

Table 2 Relation between GB, Z-values of Ethiopian barley and the annual precipitation

OU No.	D	W	D/W	Z	variety	annual precipitation (mm)
E269	216	96	2.1	80.19	Mota 1	400
E285	198	84	2.4	66.34	Debra Birhan 1	400
E525	193	73	2.6	59.94	Debre Zeit 29	400
E284	169	71	2.4	46.13	Molale 1	800
E560	158	84	1.9	44.41	Asbe Tafari 1	400
E550	153	77	2.0	39.35	Dddis Ababa 56	800
F336	133	83	1.6	30.38	Mai Chew 1	400
E216	139	69	2.0	29.02	Debre Zeit 1	599
F629	139	69	2.0	29.02	Shashamane 1	400
E278	141	63	2.2	28.12	Dabat 1	400
E245	137	69	2.0	27.92	Addis Ababa 40	800
E254	126	78	1.6	24.88	Sululta 1	800
F619	125	62	2.0	19.02	Jimma 2	800
F635	129	53	2.4	18.22	Meki 2	400
E589	108	69	1.6	12.03	Dembi 1	400
F038	118	43	2.7	8.87	digrat 3	500
F324	106	62	1.7	8.61	Asella 1	500
E821	101	66	1.5	7.19	Debre Zeit 18	800
F639	107	48	2.2	4.51	Adigrat 8	500
E574	96	63	1.5	3.46	Gondar 1	900
F606	100	55	1.8	2.99	Debra Markos	1200
F318	101	50	2.0	1.88	Sheki 2	1200
E559	95	43	2.2	-3.72	Nazareth 1	2000
E832	85	58	1.5	-4.22	Addis Ababa 3	800
E883	81	63	1.3	-4.76	Dessie 1	1200
E863	81	46	1.8	-10.40	Kulubi 3	1400
E864	78	47	1.7	-11.71	Dessie 1	1200
E862	77	45	1.7	-12.93	Jijiga 2	1599
F313	76	43	1.8	-14.14	Fiche 1	1100
E879	59	31	1.9	-27.44	Adi Abun 1	1200

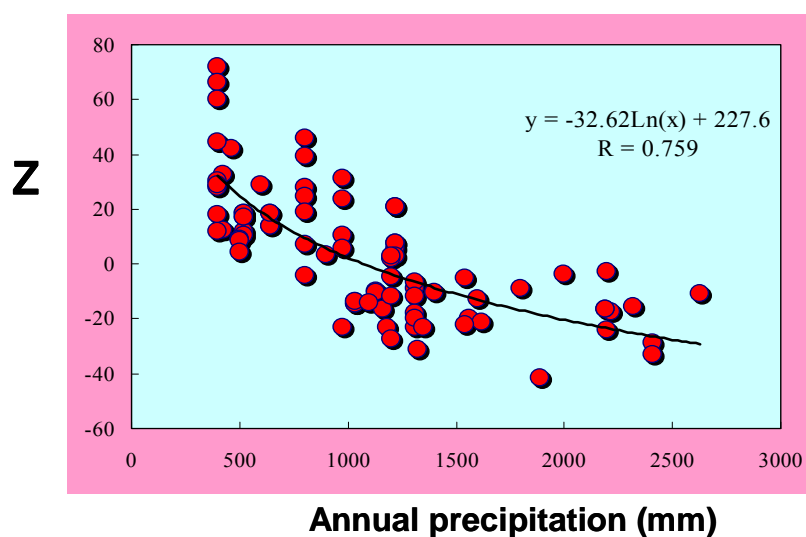


Fig. 8 Correlation between Z-value and annual precipitation in barley varieties. Varieties of Ethiopia, China and Japan are included.

4. まとめと今後の課題

本研究ではオオムギ幼植物約 300 品種を乾燥ストレス負荷と非負荷(対照)で栽培し、誘導されるグリシンベタイ

ン(GB)量の違いを線形判別関数 Z を用いて表す方法を考案した。その結果、

①幼植物時の耐塩性が既知の品種(耐塩性強 7 品種, 弱

- 7品種の計14品種)について、乾燥ストレス負荷と非負荷(正常生育)におけるGB誘導量について線形判別関数Zを求めたところ、Z値から耐塩性の強と弱の品種を明瞭に判別することができた。
- ②この判別式を用いて耐塩性未知の299品種を分析したところ、約半数が耐塩性強、残りが弱と判定できた。
- ③同一種の中でもGB誘導量が塩生植物に劣らないくらい高濃度に誘導するものから、塩感受性植物並みの弱い耐性しか示さないものまでGB誘導量に大きな差があった。
- ④殆ど在来種からなるエチオピアの品種では、GB誘導量は年間降雨量と逆相関していた。このことはオオムギは長年月の間にその土地の乾燥度を遺伝子に記憶し、環境に適応する耐性をGB誘導量として表現していることが分かった。
- ⑤本法を用いてGB誘導量から耐塩性の強弱を判定することができることから、今後実際の品種選抜試験に先立って本法を一次スクリーニング的に用いれば選抜時間の大幅な短縮が図れることが期待される。キャピラリー電気泳動法は極めて簡便・高感度な分析法で、分析に要する時間は1検体十数分で、1日に数十検体、昼夜連続運転を行えば1万品種を数ヶ月で分析可能である。この方法を品種選抜の一次スクリーニング法として活用すれば、品種選抜に要する労力と時間を半減することが期待できる。
- ⑥本法はオオムギ以外にもコムギ、アルファルファなどGBあるいはその関連化合物、例えば、プロリン、プロリンペプチン、トリゴネリン、硫酸化コリン等、低分子有機化合物に広く応用可能で、これらを誘導する植物のストレス耐性判別に応用可能である。

今後の課題として更に二つの点を改良したい。一つは現在分析対象の植物を約1ヶ月間栽培しなければならないが、栽培する場所と時間と手間が律速になっている。栽培することなくGB含量の差異を知るためには、種子中に含まれるGB含量と品種の耐塩性の相関が分かればよい。現在種子中のGBを直接分析する方法を進めており、若干の結果を得つつある。

この過程でもう一つの問題点がある。人間が求めている優良品種とはデンプンやタンパク質が多く(かつ美味しい)品種である。GB含量は[GB量/種子重量]で表されるからデンプンを多く含むほどGB含量は小さな値になる。

GB含量が多ければ確かにストレス耐性は強いが、それだけでは人間の求める優良品種とはいえない。実際中国で選抜された耐塩性が高く産量の多い品種のGB含量は、今回の結果の $Z > 0$ のうち中程度のZ値を与えた。植物が吸収した窒素NやリンPがすべて栄養生長に使われれば最大の生長と産量が達成できるわけであるが、ストレス下でGBを誘導するとGBにもNが含まれるから、植物は供給されたNの一部をストレス応答に用いることになり、その分だけ生長は抑えられることになる。産量の多さとストレス耐性の強さとのバランスを持った品種を見分ける方法を見出すことが次なる問題解決の道と考えている。

謝辞

オオムギ試料(幼植物および種子)を提供いただいた岡山大学資源生物科学研究所の武田和義教授および佐藤和広助教授に感謝いたします。エチオピアの情報提供いただいた長崎大学環境科学部増田研助教授に感謝いたします。

文献

1. 山崎素直: 地球環境の劣化とその修復—塩類土壌および乾燥地における生物生産への挑戦—長崎大学総合環境研究 4, 25-28 (2002).
2. 松本聡, 土壌圏の拡大と土壌改良, 植物細胞工学, 1993, 5, 430-438.
3. 森敏, 植物の遺伝子工学と食糧・環境問題, 学術月報, 1995, 48, 1090-1099.
4. T. Tadano, et. al, Saline Soil. *Proc. Internatl. Symp.*, "Can biological production harmonize with environment?" (Tokyo, 1999), 335-354.
5. K. Takeda, Introduction and selection of crop varieties in Huang-Huai-Hai Plain in China., *ibid.*, 359-360.
6. 間藤徹, 高等植物の耐塩性機構, 植物細胞工学, 1991, 3, 268-272.
7. 但野利秋, 作物の耐塩性とその機構, 化学と生物, 1987, 21, 439-455.
8. Hanson, A.D., Rathinsabapathi, B., Burnet, M., Dillon, M.O., Gage, D.A., Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae, a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, 91, 306-310.
9. McNeil, S. D., Nuccio, M.L., and Hanson, A.D., Betaines

- and related osmoprotectants, *Plant Physiol.*, 1999, **120**, 945-948.
10. 張経華, 大久保明, 山崎素直, フェナシルエステル化/低 pH キヤピラリー電気泳動法による植物中のベタインの分析 *分析化学*, **46**, 275-279 (1997).
 11. J. Zhang, N. Nishimura, A. Okubo, S. Yamazaki, Development of an analytical method for the determination of betaines in higher plants by capillary electrophoresis at low pH. *Phytochem. Anal.*, **13**, 189-194 (2002).
 12. 張経華, 山崎素直他, キヤピラリー電気泳動法によるオオムギ品種における環境ストレス体制の評価 分析化学, **52**, 1209-1213 (2003).
 13. 間野吉郎, 武田和義, オオムギ幼植物の耐塩性における品種変異と各種主働遺伝子効果, 岡山大学資源生物科学研究所報告, 1995, **3**, 71-81.
 14. Yoshiro Mano., Kazuyoshi Takeda., Diallel Analysis of Salt Tolerance at Germination and the Seeding Stage in Barley., *Breeding Science.*, 1997, **47**, 203-209.
 15. 石村貞夫, すぐわかる多変量解析, 東京図書, 1992, 7, 145-151.
 16. Ethiopian Tourism Commission eds., NATIONAL ATLAS OF ETHIOPIA, 4-79 (1988).
 17. 増田研, 私信

No. 0630

Study on the Salt-Stress Tolerance in Barley Varieties – Development of a Selection Method for the Salt-Tolerant Varieties in Barley

Sunao Yamazaki¹, Jinghua Zhang², Yuji Takao² and Masaya Nishiyama²

¹Yokohama College of Pharmacy, ²Faculty of Environmental Studies, Nagasaki University

Summary

More than 10,000 varieties of barley are cultivated in the worldwide agricultural fields under different types and degree of environmental stresses, such as drought, salinity, high temperature, etc. How do they respond and adapt to the stresses they suffered during their growth? To estimate the stress-response relationship in each variety of barley, the content of the major compatible solute, glycinebetaine (GB), in young shoot of barley was determined by the low-pH capillary electrophoresis. More than 300 varieties collected all over the world were grown under the presence and absence of drought stress and the GB content of young shoots were analyzed. Fourteen cultivars whose salt-stress tolerance has been physiologically established (7 strong and 7 sensitive) were first grown in the same way. Based on the GB content, a linear discriminant function Z was obtained, where $Z > 0$ is salt-tolerant and $Z < 0$ salt-sensitive. Using this function, 299 salt-tolerance-unknown samples were well discriminated with 157 being tolerant and 142 being less tolerant or sensitive. The average GB content of 299 samples was 58 $\mu\text{mol/g}$ d.w. under the control (irrigation) condition whereas under the drought condition it increased 97 $\mu\text{mol/g}$ d.w. The content was widely distributed from 40 $\mu\text{mol/g}$ d.w. in the lowest to 220 $\mu\text{mol/g}$ d.w. in the highest under drought condition, which correspond to the Z value being $-40 < Z < 80$. The highest GB content is almost equivalent to that of halophytes.

The GB content of 37 samples of Ethiopian origin out of 299 samples was reversely correlated to the annual precipitation of the producing area. The reason could be attributed that these samples are of native origin and cultured without irrigation except natural precipitation. This means repeated culture in the same environment, the plant acquires the memory in its gene of the shortage of water they need in the culture land.

As it is known that the amount of GB induced is dependent proportionally on the strength of environmental stresses, the Z value could be the expression of the total burdens that plants suffers from environment in spite of the types of stresses. The value is therefore convenient to evaluate the stress-tolerance of each variety. The present method to determine GB in young shoot of barley could be a good candidate as the first screening method prior to the actual field selection of tolerant species in which time and labor for selection could be drastically minimized.

The method is applicable not only to the selection of tolerant species of other GB-producers, such as wheat, alfalfa, etc., but also to that of the GB-related compatible solutes, trigonelline, proline, prolinebetaine, etc.