

## ノ ー ト

## キャ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耐性の評価

張 経 華<sup>1</sup>, 西村 直記<sup>2</sup>, 坂田 信二<sup>2</sup>, 尾崎 美果<sup>1</sup>,  
武田 和義<sup>3</sup>, 山崎 素直<sup>①</sup>

## Evaluation of environmental stress-tolerance in barley varieties by capillary electrophoresis

Jinghua ZHANG<sup>1</sup>, Naoki NISHIMURA<sup>2</sup>, Shinji SAKATA<sup>2</sup>,  
Mika OZAKI<sup>1</sup>, Kazuyoshi TAKEDA<sup>3</sup> and Sunao YAMAZAKI<sup>①</sup><sup>1</sup> Faculty of Environmental Studies, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521<sup>2</sup> Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657<sup>3</sup> Research Institute for Bioresources, Okayama University, 2-20-1, Chuo, Kurashiki-shi, Okayama 710-0046

(Received 6 August 2003, Accepted 3 October 2003)

Varieties of barley were cultured with and without drought stress and an osmoregulatory cellular component, glycine betaine, was determined by capillary electrophoresis. The relation between the betaine levels and stress-tolerance in the varieties was surveyed. The salt stress-tolerant and -sensitive varieties were well discriminated by the betaine levels in the seedlings of barley cultured under stressed and unstressed conditions. Also, the betaine levels could discriminate between African and Japanese varieties, presumably due to the climate difference between the two areas. It was found that glycine betaine is a good candidate as a probe in selecting environmental stress-tolerant plant species.

**Keywords** : barley; capillary electrophoresis; drought stress; glycine betaine; salt stress.

## 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・半乾燥地域ではかんがいによる土壌の二次的塩類集積という新たな問題も派生している。世界人口が急増し食糧危機が叫ばれる中で、食糧増産のためにこうした生産性の低い塩類土壌や乾燥地・半乾燥地帯の積極的活用とそこにおける生産性向上が急務となっている<sup>1)2)</sup>。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。世界に広がる様々な環境の中で生育している

品種(種子)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、かんばつ、低温などの複合した環境ストレスに強い耐性品種を選抜することができる。ただし、適正品種を見いだすまでには多大の労力と長い年月を必要とする<sup>3)</sup>。例えば、オオムギは世界に1万種以上存在し、それぞれ育った環境に応じて極めてストレスに弱い品種から強いものまで様々である。実際に、乾燥地などの不良耕地では多くの品種を導入し数年間かけて適正品種を選抜しており、より短時間で簡便に選抜できる方法が求められている<sup>4)</sup>。

高等植物は乾燥や塩害など様々な環境ストレス下におかれると、浸透圧調節物質(適合溶質)を誘導合成し、細胞内の水分を保つことによって細胞内の恒常性を維持している。グリシンベタイン  $\{(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-, \text{GB}\}$  は植

<sup>1</sup> 長崎大学環境科学部: 852-8521 長崎県長崎市文教町1-14<sup>2</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科: 113-8657 東京都文京区弥生1-1-1<sup>3</sup> 岡山大学資源生物科学研究所: 710-0046 岡山県倉敷市中央2-20-1

物中に最も広く分布している適合溶質である<sup>5)</sup>。GBは安定な化合物であり、高等植物の細胞にとって毒性がなく、その分解系は存在しないと言われている<sup>6)</sup>。これまでGBの定量法として核磁気共鳴法(NMR)<sup>7)</sup>、高速液体クロマトグラフ法(HPLC)<sup>8)</sup>などが開発されているが、多数の試料の分析には不向きである。著者らは高分離能を持つキャピラリー電気泳動装置による簡便な測定法を開発した<sup>9)10)</sup>。また、GBをはじめとする適合溶質を誘導体化することにより高感度な分析が可能となった<sup>11)</sup>。

GBは乾燥、低温、塩害などストレスで誘導合成されることから、著者らは、逆にGBの誘導合成量を指標として植物のストレス耐性を評価できないか、と考えた。GB量から耐性種を判別できれば品種選抜における省力化と迅速化を図ることができると考えた。イネ科では、ムギ類は耐塩性が高く、GBの蓄積量も多いことが分かっている<sup>12)</sup>。そこで生物学的に耐塩性が明確にされているオオムギ品種と未知の品種についてキャピラリー電気泳動法を用いてGB分析を行い、その定量値と品種間の耐性差との関係について検討した。

## 2 実 験

### 2.1 装置と試薬

キャピラリー電気泳動装置は、Waters Quanta-4000Eを用い、使用したキャピラリーは75  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  60 cm (有効長50 cm)、検出は254 nmで行った。測定温度25 $^{\circ}\text{C}$ で、サンプリングは落差法10 cm  $\times$  10秒で行い、印加電圧は12 kVとした。

エステル化用の

-

プロモフェナシルプロミド(PBB)は東京化成製を使用した。標準品のGB及び他の試薬はすべて和光純薬製の試薬特級を用いた。脱イオン水はMilli-Q(日本ミリポア製)を使用した。

### 2.2 オオムギの栽培及び試料の採取

オオムギ(*Hordeum vulgare* L.)は岡山大学資源生物科学研究所で系統保存されていた品種の中から選抜されたものを用いた。1997年12月から1998年4月にかけて無加温自然光ガラス室で土耕栽培した。耐塩性既知の品種を3葉期、未知の品種を4~5葉期まで生育させた後、乾燥ストレスをかけた。すなわち、同一の種について引き続きかん水を行った適湿区(W)とかん水を行わなかった乾燥区(D)の2区に分けて1週間養成した。その後地上部(葉及び茎)を採取し、80 $^{\circ}\text{C}$ の乾燥器で乾燥させ、乾燥剤と一緒にポリエチレン袋に入れ保存した。

### 2.3 GBの定量及び判別分析

分析直前に再度オオムギ試料を80 $^{\circ}\text{C}$ 、4時間以上乾燥させた。乾燥した地上部の全長は約30 cmで、10 cmほど

の茎が含まれていた。耐塩性既知の品種については、地上部全体(葉と茎)をはさみで裁断し、ミニブレンダー(大阪ケミカル製)を用いて粉碎した後、ふるい(40 Mesh)にかけたものを粉末試料とした。未知の品種は茎を除去して葉のみを同様に処理した。

マイクロチューブ(2 ml)にオオムギの粉末試料0.1 gを取り、水1.5 mlを加え恒温水槽で75 $^{\circ}\text{C}$ 、20分間抽出した。そのチューブを1000  $\times$  gで10分間遠心し、上澄みを分取し、PBBによりエステル化した後、50 mM、pH 3.5のリン酸塩泳動液を使用して、キャピラリー電気泳動装置により分析した<sup>9)11)</sup>。

適湿区(W)及び乾燥区(D)で栽培したオオムギ試料の分析結果についてマイクロソフト製の表計算ソフトExcelを用いて処理した<sup>13)14)</sup>。

## 3 結果と考察

### 3.1 耐塩性既知のオオムギ試料における解析

今回用いたオオムギ幼植物は、岡山大学資源生物科学研究所で系統保存されている6000品種の中から耐塩性の異なる品種を選び、発芽後3葉をつけるまで正常に生育させた後、500 mM NaClのストレスをかけ栽培し、4週間後の生育状況から耐性強度を5群に分類し、そのうち耐塩性の最強のものと最弱のものについて分析を行った<sup>3)15)</sup>。

本研究では乾燥ストレスをかけた。塩ストレス及び乾燥ストレスは植物細胞中の水分変動にかかわる水ストレスであり、GBの誘導・合成に同じ効果を持つことが知られていることから<sup>16)</sup>、本研究では異なる耐塩性のオオムギに対して、栽培操作上、作業しやすく均一性がよい乾燥ストレスをかける方法を選んだ。

キャピラリー電気泳動によるオオムギ試料のエレクトロフェログラムをFig. 1に示す。1検体15分以内で高分離かつ感度よく測定できることが分かった。この方法により耐塩性既知の15種類について地上部(葉と茎)に含まれるGBを定量した結果をTable 1に示す。その中にNo. 1~8は幼植物時の耐塩性の最も強い品種(耐塩性品種)、No. 9~15は逆に感受性を示す品種(感受性品種)である。GB含量を比べると、いずれも乾燥ストレスをかけた区(D区)が高くなっていることからGBがストレスで誘導されることが分かった。また耐塩性品種では正常生育(W区、平均56  $\mu\text{mol/g}$ )及び乾燥ストレス(D区、平均82  $\mu\text{mol/g}$ )のどちらも感受性品種より高い値を示した。D/WをGBの誘導率と見なすと感受性品種のほうがGBの誘導率がわずかに高くなっているようにみえるが、GBの絶対量は耐性種のそれに比べて両区とも低い(W区: 平均40  $\mu\text{mol/g}$ , D区: 平均69  $\mu\text{mol/g}$ )。

D区とW区のGB値をもとに耐塩性品種(●)と感受性品種(○)の相関図を作成したところ、Fig. 2のように

なった. 両品種は線形判別関数  $z = 0.24x_1 + 0.14x_2 - 22$  によって耐塩性グループと感受性グループに明りように分離できることが分かった.

### 3.2 地域既知のオオムギ試料における解析

更に GB 量から乾燥ストレス耐性に関する品種間の差を検証するため, アフリカ原産のオオムギ 14 種類及び日本産の 13 種類を 3.1 と同じ条件で栽培して分析した. それぞれの GB 含量を Table 2 に示す. その結果, アフリカ原産のオオムギは日本産より W, D 両区とも高い GB 値が

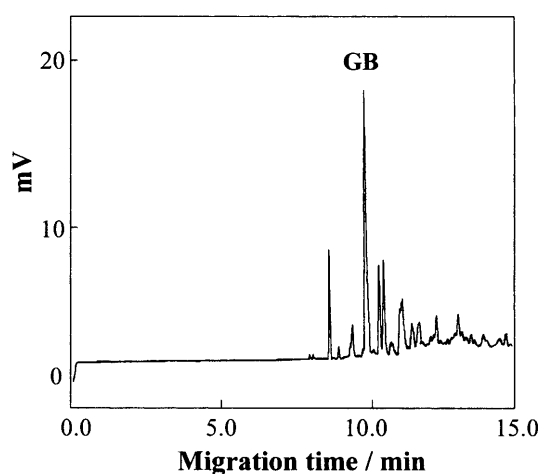


Fig. 1 Electropherogram of a leaf extract of barley detected at 254 nm

GB: glycine betaine ester. The other conditions are described in section 2.1 and 2.3. Main peak is GB ester, and the others are esters of some amino acids.

示された. GB 値をもとに D, W 区の相関図 (Fig. 3) を作成したところ, アフリカ産の品種 (▲) と日本産の品種 (△) の間に明らかな分離が見られた. 図中の▲ B033 を除くと両者の線形判別関数は  $z = 0.27x_1 + 0.08x_2 - 24$  となって前項と極めて類似した係数を持つ判別関数が得られた. このことは地域的に高温, かんばつの厳しいアフリカ大陸と 1 年中温暖多雨の日本では気象的に明確な差があるので, これがオオムギ品種の GB 含量に反映されている

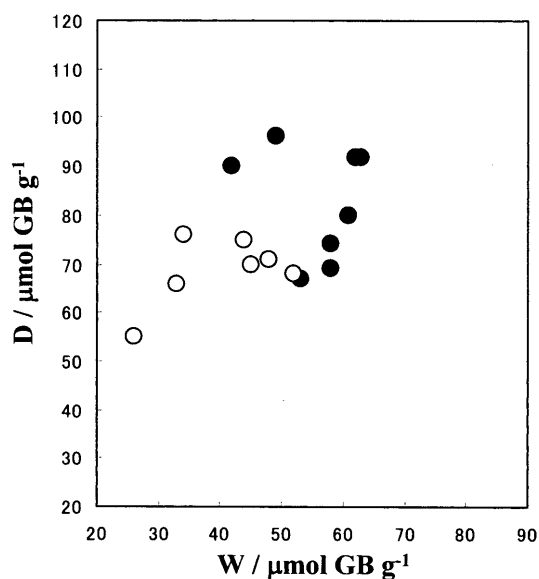


Fig. 2 Distinction between salt tolerant variety (●) and sensitive variety (○) of barley at the seedling stage  
W: GB content ( $\mu\text{mol/g}$  dry weight) of barley grown under a wet condition as a control; D: GB content of barley without irrigation in the last week before harvest

Table 1 Content of glycine betaine in salt tolerant and sensitive varieties of barley ( $\mu\text{mol/g}$  dry weight)

	No.	OU No. <sup>a)</sup>	Origin	Row type	Hull type	W <sup>b)</sup>	D <sup>c)</sup>	D/W
Tolerant at the seedling stage	1	K017	Korea	Six <sup>d)</sup>	C <sup>e)</sup>	49	96	2.0
	2	K305	Korea	Six	C	42	90	2.1
	3	U070	Russia	Six	C	62	92	1.5
	4	U342	Austria	Six	C	61	80	1.3
	5	U643	Austria	Six	C	63	92	1.5
	6	B024	Algeria	Six	C	58	74	1.3
	7	E669	Ethiopia	Six	C	53	67	1.3
	8	E812	Ethiopia	Six	C	58	69	1.2
					(average: 56)	82	1.5)	
Sensitive at the seedling stage	9	C613	China	Two <sup>e)</sup>	C	52	68	1.3
	10	C667	China	Six	N <sup>f)</sup>	48	71	1.5
	11	I100	India	Six	N	26	55	2.1
	12	I186	India	Six	C	33	66	2.0
	13	I743	Afghanistan	Six	C	44	75	1.7
	14	A627	(unknown)	Two	C	45	70	1.6
	15	A632	(unknown)	Six	N	34	76	2.2
					(average: 40)	69	1.8)	

Average values of duplicate measurements were shown. a) accession number at The Barley Germplasm Center of Okayama University (OU); b) grown under a wet condition as control; c) without irrigation in last week before harvest; d) six-rowed; e) two-rowed; f) covered; g) naked

Table 2 Content of glycine betaine in barley collected from Africa and Japan ( $\mu\text{mol/g}$  dry weight)

OU No. <sup>a)</sup>	Origin	W <sup>b)</sup>	D <sup>c)</sup>	D/W	OU No.	Origin	W	D	D/W
B008	North Africa	67	135	2.0	J016	Japan	56	101	1.8
B015	Morocco	71	83	1.2	J040	Japan	49	73	1.5
B033	North Africa	58	74	1.3	J044	Japan	32	77	2.4
B069	Egypt	84	157	1.9	J064	Japan	46	89	1.9
B318	Algeria	75	154	2.0	J069	Japan	46	99	2.2
B327	Tunisia	59	158	2.7	J075	Japan	47	89	1.9
B349	Egypt	68	162	2.4	J080	Japan	57	96	1.7
B369	Egypt	64	119	1.8	J087	Japan	42	70	1.7
B623	Algeria	60	106	1.8	J097	Japan	43	82	1.9
B669	Egypt	55	103	1.9	J183	Japan	46	87	1.9
B670	North Africa	63	145	2.3	J326	Japan	37	86	2.3
E284	Ethiopia	59	116	2.0	J330	Japan	35	67	1.9
E285	Ethiopia	64	134	2.1	J334	Japan	54	95	1.8
E525	Ethiopia	62	117	1.9					
average value		65	126	2.0			45	85	1.9

a), b), c) same as in Table 1

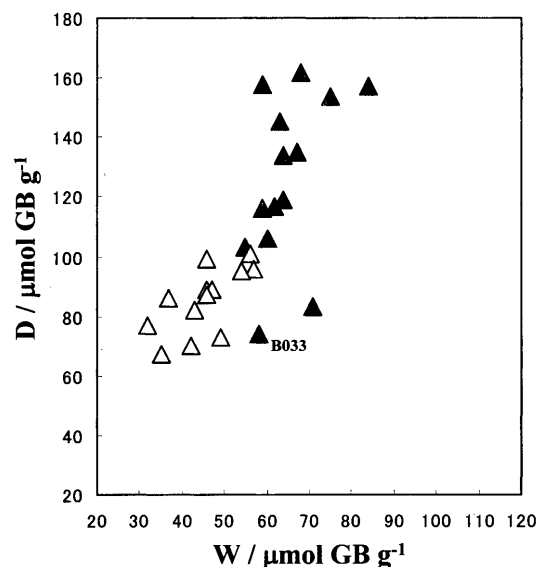


Fig. 3 Distinction between varieties originated from Africa ( $\blacktriangle$ ) and Japan ( $\triangle$ )

W and D are same as in Fig. 2.

ことが推察された。なお、アフリカ産の中にも Fig. 3 の  $\blacktriangle$  B033 のように乾燥ストレスに弱い品種も見られる。詳細は不明であるが、同じ地域でも湿潤な環境もあれば環境の激しいところもあるので、こうした気候的な差が品種にも現れているのではないかと考えられる。現在、品種の栽培されている地域を検定し、気候と GB 含量の関係を調査中である。

これらのことから極端な気候的な差がある品種間についても GB 含量は相関していることが推察された。現在、中国原産のオオムギ 19 種類も分析しているが、分布が広がっており明りょうな分離ができない。これについても品種の採取地とそこでの気象条件などからオオムギのストレス

耐性の違いを解析する必要がある。

ここで Table 1 と Table 2 において、GB の値が Table 1 のほうが小さく、Table 2 のほうが大きくなっている。諸処検討の結果、Table 1 の試料では葉と茎の全部を用いたこと、Table 2 では葉のみを用いたことによる。GB は葉で合成され葉に蓄積されること<sup>5)</sup>、また実際の塩類土壌で栽培されたコムギの葉、茎、穂を分析した例では、塩ストレス負荷の違いによって GB 含量が変動するが、茎の GB 含量は葉の GB 含量のおよそ 3~5 割程度であることが報告されている<sup>17)</sup>。今回の Table 1 の試料では、植物全体の GB 含量を知るために茎を含めて分析したため、分析値が低くなったと考えられる。GB 含量の明りょうな相違を知るためには葉のみを分析したほうがよいことが分かった。

以上をまとめると、高分離能かつ簡便なキャピラリー電気泳動法によりオオムギ品種間の耐塩性及び地域の差異に明りょうな関係を見いだすことができた。今後、試料数を増やし、オオムギの形質、栽培地域や気候特性と GB 誘導量の関係を精査し、オオムギのストレス耐性にかかわる要因を明らかにしていく予定である。

本研究の一部は平成 15 年度文部科学省基盤研究 B (No. 15380225) の研究助成により行われた。

## 文 献

- 1) 松本 聡: 植物細胞工学, **15**, 430 (1993).
- 2) 間野吉郎, 武田和義: 岡大資生研報, **3**, 71 (1995).
- 3) Y. Mano, K. Takeda: *Euphytica*, **103**, 137 (1998).
- 4) 武田和義: 平成 7 年度~平成 12 年度科学研究費補助金研究成果報告書 No. 09NP0901, p. 146 (2000).
- 5) I. Tozlu, G. A. Moore, C. L. Guy: *Aust. J. Plant Physiol.*, **27**, 35 (2000).
- 6) A. D. Hanson, R. Wyse: *Physiol. Plant*, **70**, 1191 (1982).

ノート 張, 西村, 坂田, 尾崎, 武田, 山崎 : キャ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耐性の評価 1213

- 7) P. Harinasut, K. Tsutsui, T. Takabe, M. Nomura, T. Takabe, S. Kishitani: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 366 (1996).
- 8) J. Gorham, E. McDonnell, R. J. W. Jones: *Anal. Chim. Acta*, **138**, 277 (1982).
- 9) 張 経華, 大久保 明, 山崎素直: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 275 (1997).
- 10) J. Zhang, X. XU, N. Nishimura, M. Abo, A. Okubo, S. Yamazaki: *Anal. Sci.*, **17** Suppl, i1315 (2001).
- 11) J. Zhang, N. Nishimura, A. Okubo, S. Yamazaki: *Phytochem. Anal.*, **13**, 189 (2002).
- 12) W. D. Hitz, J. A. R. Ladyman, A. D. Hanson: *Crop Sci.*, **22**, 47 (1982).
- 13) 内田 治: “すぐわかる EXCEL による多変量解析”, p. 108 (2002), (東京図書).
- 14) 室 淳子, 石村貞夫: “Excel でやさしく学ぶ多変量解析”, p. 124 (2001), (東京図書).
- 15) Y. Mano, K. Takeda: *Euphytica.*, **94**, 263 (1997).
- 16) 中村敏英, 高倍鉄子: 植物細胞工学, 別冊 11, p. 86 (1999).
- 17) 山崎素直: 平成 7 年度～平成 12 年度科学研究費補助金研究成果報告書 No. 09NP0901, p. 157 (2000).