

マンノース添加塩水栽培による成熟早期にビタミン C を最大蓄積するトマト栽培技術の確立

岩井 宏暁

筑波大学生命環境系

概要

果実に含まれる成分は、主要な園芸作物において、食味や消費者の嗜好性を左右する重要な差異形質の一つである。塩ストレスは浸透圧ストレスやイオン毒性を引き起こし、植物の生育や代謝に支障をきたす場合が多いとされるが、塩ストレス条件下の塩水栽培におけるトマトでは、グルコースやフルクトースなどの糖類、プロリン、 γ -アミノ酪酸などのアミノ酸、そしてビタミン C であるアスコルビン酸が蓄積し、商品価値の高い果実が生産されることが知られている。また、ビタミン C を含む高機能成分がどのようにして蓄積するのかについては、ほとんど研究報告がない。トマト果実のサイズ決定および成熟過程では、多糖類や糖類の合成や分解、果実の硬度およびサイズ変化が変化することがわかっている。

本研究では、塩水栽培においてビタミン C が硬度に蓄積され、それに伴い果皮や種子のマンナン量が減少することが示された。ビタミン C はマンナン合成経路と共通部分を持っており、互いに基質であるマンノースを取り合うトレードオフが行われていると考えられる。つまり、塩水栽培では、ビタミン C とマンナンの材料であるマンノース不足に陥っていると考えられる。そこで、マンノース添加を塩水栽培と併せて行う栽培系を構築し、実験したところ、果皮で、緑色の未熟なステージにおいて、完熟に近い赤色の果実とほぼ同量のビタミン C 含量となったことで、早期成熟ステージでビタミン C の合成が進行し最大値レベルまで蓄積することが示された。

合成メカニズムの確認のため、ビタミン C 合成酵素遺伝子である GME の発現解析を行ったところ、塩ストレス条件下では早期成熟段階で発現が増加していたことが分かった。また、マンノースも増加しており、マンナンの合成と分解に関わるエンド β マンナーゼ (LeMan4) やマンナン合成酵素遺伝子 (CSLA) の発現も成熟の中期ステージにおいて大きく増加していた。トマトは未熟な状態で出荷されることから、未熟果実でも熟した果実と同じレベルのビタミン C 含量のトマトが得られる塩水とマンナンを組み合わせた栽培系は、農業技術に転用できる有効な手段であると考えられる。

1. 研究目的

果実に含まれる成分は、主要な園芸作物において、食味や消費者の嗜好性を左右する重要な差異形質の一つである。塩ストレスは浸透圧ストレスやイオン毒性を引き起こし、植物の生育や代謝に支障をきたす場合が多いとされるが、塩ストレス条件下の塩水栽培におけるトマトでは、グルコースやフルクトースなどの糖類、プロリン、 γ -アミノ酪酸などのアミノ酸、そしてビタミン C であるアスコルビン酸が蓄積し、商品価値の高い果実が生産されるこ

とが知られている。また、ビタミン C を含む高機能成分がどのようにして蓄積するのかについては、ほとんど研究報告がない。トマト果実のサイズ決定および成熟過程では、多糖類や糖類の合成や分解、果実の硬度およびサイズ変化が変化することがわかっている。本研究では、塩水栽培においてビタミン C が硬度に蓄積され、それに伴い果皮や種子のマンナン量が減少することが示された。また、マンノースを添加したところ、発芽能力の回復と果皮の早いビタミン C の最大蓄積が観察された。このようにマンノース添加

により、果皮マンナンとビタミン C のさらなる合成の誘導および蓄積増加が確認されている。塩ストレスは果実に対して、特にマンノース代謝に影響しており、そのことがビタミン C およびマンナンの生合成系に変化を生じさせるものと考えられる。そこで本研究では、塩水栽培におけるマンナンとビタミン C 合成と蓄積についてさらなる解析を進めるとともに、その制御がどのように変化しているかについて明らかとすることを目的に研究を行った。

2. 研究方法

2.1 塩ストレス条件下におけるトマト果実のマンノース量とビタミン C 量の測定

トマト(*Solanum lycopersicum*: 品種 Micro-Tom)の塩ストレス処理、無処理区(コントロール)果実を試料として用いた。まずトマト種子を 0.5%次亜塩素酸で殺菌後、蒸留水で洗浄し、ろ紙上に播種した。発芽後、双葉展開期に各系統 6 個体を 5 x 5 x 5 cm サイズのロックウールに移植し、プラスチックトレイを用いて水耕栽培を行った。本葉展開後、これらの植物体を電気伝導度(EC) 1.5 dS m⁻¹に調整した大塚 A 処方培養液に移し、2 日おきに培養液を交換しながら開花期まで育成を行った。生育条件は 16 時間明期(27°C)、8 時間暗期(22°C)とした。塩ストレス処理は、第一花房開花後、培養液に NaCl を加えて 15.0 dS m⁻¹(約 16 mM NaCl に相当)に調整することで行った。ストレス処理開始時は、植物体の状態を観察しながら EC を 2 日おきに 1.5 dS m⁻¹ から 5.0 dS m⁻¹, 8.0 dS m⁻¹, 12.0 dS m⁻¹, 15.0 dS m⁻¹ と徐々に上げていき、8 日程度かけて順化させた。果実の成長・成熟ステージを以下に示す 4 段階に分けて、果実のサンプリングを行った。M: Mature green(30 day post anthesis(DPA)), B: Breaker(35 DPA), T: Turning(37 DPA), R: Red ripe(45 DPA)。また各段階の果実に対し、果皮とゼリー状子室組織のローキュラーに分けてサンプリングを行った(Fig. 1)。

ビタミン C 量の測定: 各成熟ステージの果実から組織ごとに 100 mg ずつを凍結し、乳鉢と乳棒を用いて破碎し、5%メタリン酸(和光特級, Wako)を 100 ml 加えた。攪拌後、4°C, 15000 rpm で 5 分遠心し、上清を専用の試験紙(リフレクトクアント試験紙 Ascorbic acid Test Merck)に垂らし、15 秒後 RQ フレックス(RQflex plus 10 Merck)を用いて測定し、ビタミン C(アスコルビン酸)量とした。

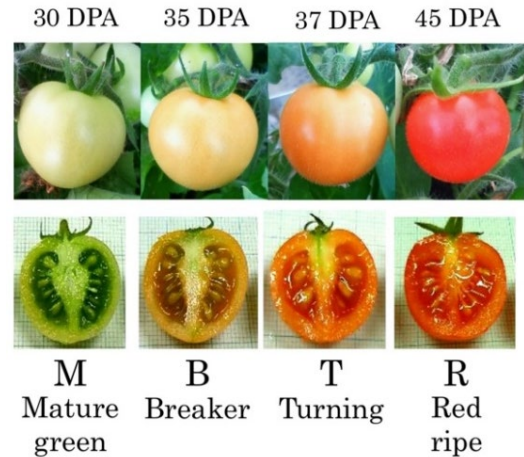


Fig 1. Preparation for tissue-specific analysis. The fruit ripening stages of cv. Micro Tom. The four stages included mature green (M), breaker (B), turning (T), and red ripe (R).

細胞壁の抽出: 果皮、子室組織について、生重量 100 mg ずつを凍結し、乳鉢と乳棒を用いて破碎し、80% EtOH 1.5 ml を加えた。15000 rpm で 1 分遠心し、上清を除いた。これにクロロホルム:MeOH = 1:1 を 1 ml 加えてボルテックスし、15000 rpm で 1 分遠心後、上清を除いた。この操作を 3 回繰り返した。これにアセトン(和光特級, Wako) 1 ml を加えてボルテックス後、15000 rpm で 1 分遠心し上清を除いた。サンプルを乾燥させ、重量を測定し、細胞壁量とした。抽出した細胞壁をねじ口試験管(ST-13M 日電理化硝子)に移し、パスツールピペットを用いて 2 M の TFA 250 μl を加え、121°C で 2 時間加温(EYELA MG-2200)することで加水分解を行った。その後、イソプロパノール 300 μl を加え、室温で吹き付けエバポレーターにて乾燥させた。DW を 100 μl 加えてボルテックスし、遠心したのち、上清を TFA 可溶画分とした。TFA 可溶画分にはペクチンとヘミセルロースが含まれるため、マンノース量の測定が可能となる。

ガスクロマトグラフィーによる細胞壁の構成糖分析: TFA 可溶画分サンプル 30 μl を一晩凍結乾燥し、250 μl の HCl/MeOH を加え、しっかり蓋を閉めた後、80°C で 15 時間加温した(EYELA MG-2200)。そこに 100 μl の t-ブチルアルコールを加え、室温で吹き付けエバポレーターにて乾燥させた。100 μl のピリジン、100 μl のヘキサメチルジミラザン、50 μl のトリメチルクロロシランを加えて蓋を閉めた後、80°C で 20 分加温(EYELA MG-2200)した。これ

らの TMS 化剤は吹き付けエバポレーターによって静かに除去し、1 ml のヘキサンに溶かして遠心を行った。上清を注意深く新しい試験管に移し、再度吹き付けエバポレーターにより乾燥させた。5 μ l のヘキサンに溶かし、そのうちの 1 μ l をガスクロマトグラフィー (GC-2010 Plus series, SHIMADZU, Kyoto, Japan) を用いて解析した。カラムは DB-1 を用いた。糖の量の測定は、中性糖量の測定はアンスロン硫酸法で、酸性糖量の測定は、カルバズール硫酸法を用いた。

2. 2 塩ストレス条件下におけるトマト果実のマンナン合成酵素遺伝子とビタミン C 合成酵素遺伝子の発現解析

各成熟ステージの果実から組織ごとに 100 mg ずつを凍結し、乳鉢と乳棒を用いて破碎した。RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて各組織から total RNA を抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて cDNA を合成した (Gene Amp® PCR System 9700)。発現解析は Go-Taq qPCR Master Mix を利用した。Gotaq® 5 μ l, DNase Free Water 4 μ l, 10 μ M Forward primer 0.2 μ l, 10 μ M Reverse primer 0.2 μ l, CXR Reference Dye 0.1 μ l, template 0.5 μ l を混合し、95°C 2 min \rightarrow (95°C 5 sec, 63°C 10 sec, 72°C 31 sec) \times 50 cycles \rightarrow dissociation stage の条件で PCR を行った (Applied Biosystems 7300 Fast Real-Time PCR System)。内部標準遺伝子として Elongation factor 1 α を用いた。

3. 研究結果

3. 1 ガラクトース加水分解酵素遺伝子の発現解析

RG-I の側鎖であるガラクトースを加水分解する酵素として β -ガラクトシダーゼが知られている^(1, 2)。トマト果実では、未熟時の活性はわずかであるが、成熟とともに活性は増加し、ポリガラクトナーゼ (PG) などとともにペクチンの構造変化を引き起こし、細胞接着の調節に関わるとされている。トマトのゲノム中には、7 つの β -ガラクトシダーゼが存在している⁽¹⁾。そのうち *TBG4* (tomato β -galactosidase4) の発現を抑制した果実でのみ完全に軟化が抑制され、成熟果実では野生型と比較して 40%程度硬くなったことが報告されている⁽¹⁾。このことから、*TBG4* は果実軟化の制御に最も積極的に貢献している遺伝子であると考えられているため、本研究ではこの遺伝子に着目した。

Real-time PCR を用いて中内果皮における *TBG4* の発現解析を行った結果、コントロール条件と塩ストレス条件では *TBG4* の発現パターンに変化がみられた。*TBG4* の発現量は、コントロール条件では成熟に伴い増加した一方で、塩ストレス条件では T ステージで最大となり、R ステージで減少した (Fig. 2A)。また、塩ストレス条件の R ステージではコントロール条件の R ステージと比べて発現量は約 73%有意に減少していた。さらに、コントロール条件と塩ストレス条件における最大発現量をそれぞれ比較すると、有意差はないものの塩ストレス条件では約 64%発現量が増加していた。

3. 2 マンナントランスグリコシラーゼ/ヒドロラーゼ遺伝子の発現解析

マンナントランスグリコシラーゼ/ヒドロラーゼ (MTH) は、加水分解酵素であるマンナーゼとして登録されている酵素であるが、XTH のトランスグリコシル活性と同じように、マンナン多糖類の主鎖の一部を、マンナン由来の別のオリゴ糖に置きかえるマンナントランスグリコシダーゼとしての機能を有していることが示された。つまり MTH は、XTH のようにマンナン多糖類を加水分解する活性と置きかえ活性の 2 つの機能を有することで、マンナンの分解だけでなく、合成の過程にも貢献すると考えられている⁽³⁾。

Real-time PCR を用いて中内果皮における MTH の発現解析を行った結果、有意な差はみられなかったものの、コントロール条件と比べて塩ストレス条件では発現量が B ステージにおいて約 36%、T ステージにおいて約 257%増加していた (Fig. 2B)。

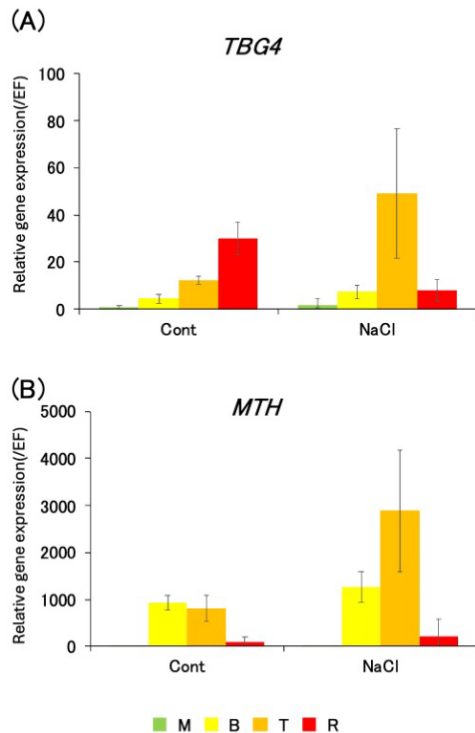


Fig 2. Mannan and Vitamin C biosynthesis-related gene expression patterns during fruit ripening. QRT-PCR analyzed gene expression in tomato preicarp. *TBG4* (tomato β -galactosidase 4), *mannan tarms glucosidase/hydrolase (MTH)* expression levels were compared to rRNA in the same assay. Ripening stages were as follows: M, mature green; B, breaker; T, turning; R, red ripe. Values are means \pm SD (n = 25).

3. 3 ビタミン C 量の測定

トマト果実におけるビタミン C 量は、塩ストレスによって増加することが明らかになっている。本研究では、果皮組織(外果皮・中内果皮)におけるビタミン C 量の測定を行った。その結果、外果皮では早期成熟段階である M ステージにおいて塩ストレス条件ではコントロール条件よりと比べてビタミン C が有意に増加しており、約 174%も多く蓄積することがわかった (**Fig. 3A**)。中内果皮では有意な差はみられなかったものの、外果皮と同様に塩ストレス条件の M ステージにおいてビタミン C は約 39%増加傾向を示した (**Fig. 3B**)。

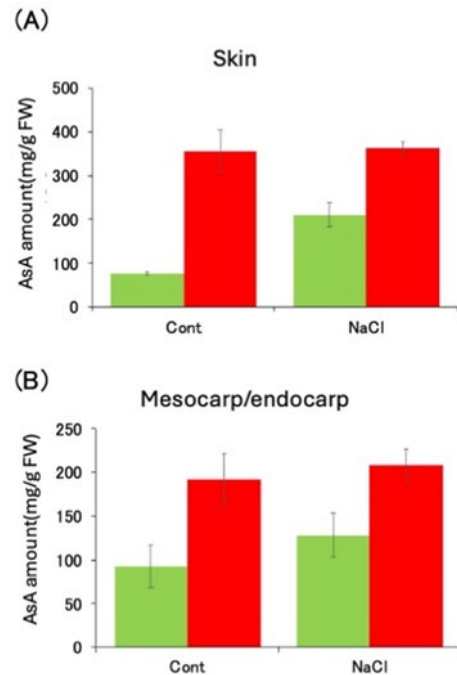


Fig 3. Vitamin C (AsA: ascorbic acid) content per 1 g fresh weight of tomato fruit grown under control, and mannose (1 mM) with saline conditions (160 mM). Vitamin C were extracted from tomato fruit skin and mesocarp/endocarp. Ripening stage: mature green, red ripe.

3. 4 ビタミン C 合成酵素遺伝子の発現解析

植物におけるビタミン C の生合成に関して、これまでにさまざまな代謝経路が提唱されてきた。中でも、最初に報告がなされた高等植物におけるビタミン C 合成経路は、D-マンノース/L-ガラクトース経路である⁽⁴⁾。この経路で働く GDP-マンノース 3',5'-エピメラーゼ (*GME*) 遺伝子は、GDP-D-マンノースを GDP-L-ガラクトースに変換する酵素遺伝子であり、高等植物間で最も高度に保存されているビタミン C 生合成関連遺伝子であるため⁽⁵⁾、多くの研究がなされてきた。*GME* は多くの植物体でシングルコピー遺伝子として存在するが、トマトでは *GME1* と *GME2* という 2 つの遺伝子が存在していることが知られている⁽⁶⁾。それぞれの発現解析に用いるプライマーに関しては、Ye., et al.をもとに作成した。そして、*GME1*, *GME2* の発現解析を Real-time PCR を用いて行った。

その結果、外果皮ではコントロール条件と比べて塩ストレス条件において *GME1* が M ステージで約 434%、B ステージで約 185%、*GME2* が M ステージで約 185%有意

に増加していた (Fig. 4A, B)。中内果皮ではコントロール条件と比べて塩ストレス条件において *GME1* が B ステージで約 88%, *GME2* が T ステージで約 81%有意に増加していた (Fig. 4C, D)。

3.5 マンノース添加個体におけるビタミン C 量の測定

塩ストレス条件にマンノースを添加して栽培したトマト果実のビタミン C 量を組織別に測定し、コントロール条件と塩ストレス条件のトマト果実におけるビタミン C 量との比較を行った。

その結果、塩ストレス条件にマンノースを添加して栽培したトマト果実では、外果皮の M ステージでビタミン C はコントロール条件よりも約 322%有意に増加し、塩ストレス条件よりも増加傾向を示した (Fig. 5A)。また、中内果皮の M ステージでビタミン C は他の 2 条件と比べて増加傾向を示した (Fig. 5B)。しかし、いずれの条件・組織でも R ステージにおけるビタミン C の蓄積量は同程度であった。

3.6 マンノース添加個体におけるマンナン量の測定

塩ストレス条件にマンノースを添加して栽培したトマト果実の中内果皮におけるマンナン量を測定し、コントロールおよび塩ストレス条件との比較を行った。その結果、塩ストレス条件にマンノースを添加して栽培したトマト果実の中内果皮ではマンナン量が、塩ストレス条件よりも M ステージにおいて約 45%有意に減少し、R ステージで約 17%有意に増加することがわかった (Fig. 6)。

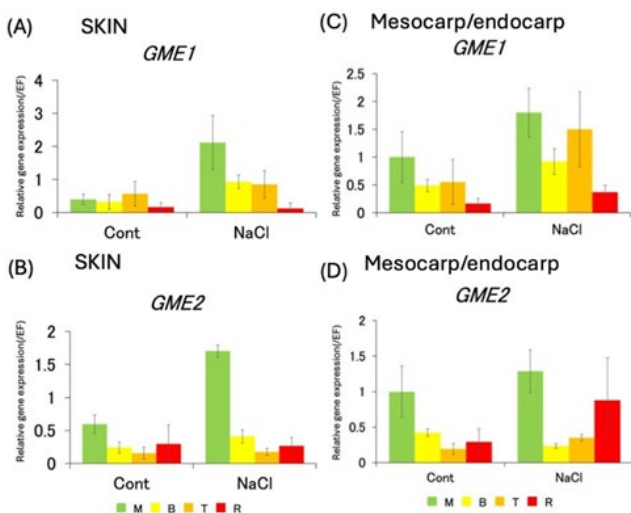


Fig 4. Vitamin C biosynthesis-related gene expression patterns during fruit ripening. Gene expression was analyzed by qRT-PCR in tomato. *GDP-Mannose Epimerase* (*GME*)-1 and 2 are involved in Vitamin C biosynthesis. (A), (B): Skin, (C), (D): mesocarp/endocarp.

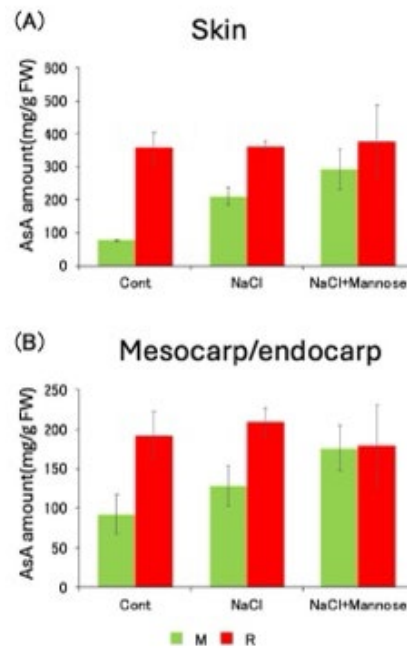


Fig 5. Vitamin C content per 1 g fresh weight of tomato fruit grown under control, and mannose (1 mM) with saline conditions (160 mM). Vitamin C were extracted from tomato fruit skin and mesocarp/endocarp. Ripening stage: mature green, red ripe.

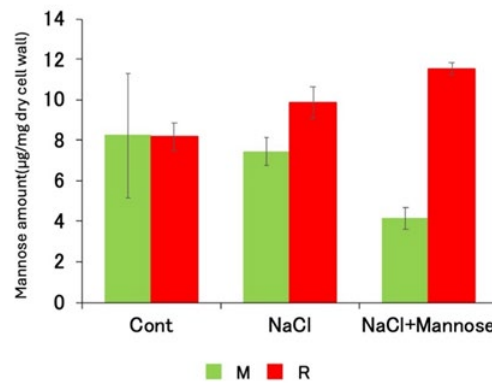


Fig 6. Mannose content per 1 g fresh weight of tomato fruit grown under control, and mannose (1 mM) with saline conditions (160 mM). Mannose were detected from tomato fruit skin and mesocarp/endocarp. Ripening stage: mature green, red ripe.

4. 考察

本研究の結果より、塩ストレスにより硬度減少が起きていた中内果皮では、ガラクトース分解酵素遺伝子である *TBG4* の発現はコントロール条件では成熟に伴い発現が増加していたが、塩ストレス条件の中内果皮の T ステージで

大きく増加し、Rステージで減少していた(**Fig. 2A**)。この結果から、コントロール条件のトマト果実では成熟に伴い *TBG4* が働き、RG-I 側鎖のガラクトースが分解されることでペクチン構造が緩み、果実軟化に繋がると考えられる。一方で、塩ストレス条件のトマト果実では *TBG4* の働きが早期化して T ステージ付近で最大となり、ガラクトース側鎖の分解が大幅かつ早期に行われることで、細胞壁のみならず膜も破壊され組織の崩壊が起こり、より軟らかな一部液状化した組織へと変化した可能性が示唆された。

マンナンはコントロール条件の中内果皮では成熟に伴い変動は見られなかったのに対し、塩ストレス条件の中内果皮では成熟に伴い増加していたことから、細胞壁マンナンは成熟と共に新しい細胞壁構造へと改変されていると考えられる。さらに、マンナンの一部をマンナン由来のオリゴ糖に置きかえる働きをもつ *MTH* の発現は、塩ストレス条件の中内果皮の B、T ステージで増加していた(**Fig. 2B**)。 *MTH* の発現増加により、塩ストレス条件の中内果皮ではより短い分子構造のマンナンが増えたことで細胞壁の結合性が弱まり、より軟らかな細胞壁構造へと変化した可能性が考えられる。

以上のことから、コントロール条件では成熟に伴い、*TBG4* によるガラクトース側鎖の分解や *MTH* によるマンナン構造の置きかえが起こり、果実軟化が起きている一方で、塩ストレス条件では T ステージ付近で *TBG4* の働きが大きく促進されてガラクトース側鎖の急激な分解反応が進むことや、*MTH* の発現増加によるマンナン構造の細分子化によって細胞形態を維持できなくなっている可能性が示唆された。そして、その細胞形態の変形が中内果皮の硬度減少に繋がったと考えられる。

植物は、乾燥や温度、塩分などのさまざまな環境ストレスに対して、活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)の生成を行う。ROS とは、酸素分子が部分的に還元されたもので、化学的に不安定であるために高い反応性を持ち、生体内で脂質やタンパク質、核酸などの生体成分を攻撃し、植物の老化に繋がると言われている⁽⁷⁾。ROS には、分子状酸素が励起されてできる「一重項酸素」、1 電子還元されてできる「スーパーオキシド」、スーパーオキシドが 1 電子還元されてできる「過酸化水素」、過酸化水素の1電子還元体の「ヒドロキシラジカル」の 4 種類があり、トマト果実でも ROS の発生が報告されている⁽⁸⁾。

植物には ROS を除去する機構が備わっており、ROS から植物体を守っている。中でもビタミン C は直接またはビタミン C-グルタチオン(ビタミン C-GSH) サイクルを介して、組織中で発生した ROS の除去や、植物の発育とホルモンシグナル伝達、細胞周期と細胞拡大、開花、種子の発芽と生存能力、他の抗酸化物質の再生、非生物に対する植物の応答に関与する⁽⁹⁾。

塩ストレス条件のトマト果実においてビタミン C 量が増加することは報告されていたが、果実全体のビタミン C 量を測定した結果であった。本研究では塩ストレス条件の果実の外果皮および中内果皮を組織別に測定したところ、ビタミン C 量はいずれの組織でも早期成熟段階で増加することがわかった(**Fig. 3**)。さらに、*GME* の発現解析ではビタミン C 量の増加と同様に早期成熟段階で増加していたことから(**Fig. 4**)、塩ストレスによってビタミン C 合成は成熟早期に促進されることが明らかとなった。

ビタミン C 合成はマンノースを基質とした GDP-マンノース経路だけでなく、ペクチン分解物を材料としたガラクトuron酸経路も存在し、これらの経路はビタミン C 合成と細胞壁多糖合成は基質を共有している⁽¹⁰⁾。そのため、塩ストレス条件の果皮組織では細胞壁マンナンが変化しないもしくは増加していたことから、その他ペクチン分解物などの細胞壁成分がビタミン C 合成に積極的に利用されている可能性も考えられる。さらに、コントロール条件と塩ストレス条件のトマト果実では H_2O_2 の発生量に差はみられないことから⁽¹¹⁾、塩ストレス条件のトマト果実ではビタミン C が増加することで、塩ストレスによって発生する活性酸素への除去が積極的に行われていると考えられる。また、ビタミン C によってトマト果実ペクチンの可溶化が進み、果実軟化が起こることが明らかになっている⁽¹²⁾。以上のことから、塩ストレスによって ROS が発生し、その除去のためにビタミン C の合成が促進される。すると、中内果皮ではビタミン C の増加に伴い、トマト果実ペクチンの分解が進み、Fryらの提唱した仮説と実験結果のように細胞壁の可溶化、すなわち中内果皮の軟化にも影響を与えていた可能性も考えられる。ビタミン C とヘミセルロースの一種である細胞壁マンナンは、それぞれマンノースという同じ基質から合成される。塩ストレス条件下のトマト果実ではビタミン C の合成が促進され、種子マンナンが減少したため、マンノース不足に陥る。それゆえ、塩ストレスと併せてマンノースを添加

して栽培を行った。この研究の結果、塩ストレス条件に合わせてマンノースを添加して栽培したトマト果実では、早期成熟段階のMステージにおいて、塩ストレス条件のみで栽培した場合よりも多くのビタミンCを蓄積することが分かった。また、ストレス条件に合わせてマンノースを添加して栽培したトマト果実では、マンナン量がコントロール条件や塩ストレス条件と比較してMステージで減少し、Rステージで増加した。塩ストレス条件下のトマト果実ではマンノース不足に陥り、細胞壁マンナンの合成が減少していたため、マンノース添加により細胞壁マンナンの合成が積極的に行われることが予想された。この研究の結果から、マンノースを添加すると、成熟早期には細胞壁マンナンよりもビタミンC合成に積極的に使用され、一定量のビタミンCが蓄積すると、成熟後期にかけて細胞壁マンナンの合成に移行することが明らかになった。

以上のことから、塩ストレス条件に合わせてマンノースを添加してトマト果実を栽培すると、マンノースはビタミンC合成に積極的に使われ、未熟なMステージにおいては、コントロール条件や塩ストレス条件のトマト果実よりも多くのビタミンCが合成されることが明らかになった。これは、未熟なMステージの状態で果実を収穫し、出荷する市場において、より多くのビタミンCを含むトマト果実を生産できる可能性があると考えられる。

5. 今後の課題

本研究によりマンノース添加と塩水栽培を組み合わせることにより、未熟果実におけるビタミンC合成の高蓄積が可能となった一方で、完熟果実のビタミンC蓄積の向上にはつながらなかった。今後は、後期のビタミンC合成に関わるとされるグルクロン酸を用いたのビタミンC合成に着目し、グルクロン酸添加と塩水栽培を組み合わせる栽培方法を検討していくことで、塩のさらなる有効利用栽培方法の確立を目指したい。

本研究の遂行に当たりご支援を頂いた公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に心より感謝申し上げます。

6. 文献

1. Smith DL, Gross KC. (2000) A family of at least seven of β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiology* 123: 1173-1183

2. Ishimaru M. (2007) Studied on fruit softening and cell wall degradation mechanism. *Food Preservation Science* 33: 77-83
3. Schröder R, Wegrzyn TF, Sharma NN, Atkinson RG. (2006) LeMAN4 endo- β -mannanase from ripe tomato fruit can act as a mannan transglycosylase or hydrolase. *Planta* 224: 1091-1102
4. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants." *Nature* 393: 365-369
5. Wolucka BA, Van Montagu M. (2007) The VTC2 cycle and the de novo biosynthesis pathways for vitamin C in plants. *Phytochemistry* 68(21): 2602-2613
6. Zou L, Li H, Ouyang B, Zhang J, Ye Z. (2006) Cloning and mapping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism. *Plant Science* 170(1): 120-127
7. Nakamura S. (2013) Chemistry of reactive oxygen species and antioxidants. *Humanities, Natural Sciences, and Medicine* 9(3): 164-169
8. Mhamdi A, Breusegem FV. (2018) Reactive oxygen species in plant development. *Development* 145(15): e164376
9. Mellidou I, Koukounaras A, Kostas S, Patelou E, Kanellis AK. (2021) Regulation of Vitamin C Accumulation for Improved Tomato Fruit Quality and Alleviation of Abiotic Stress." *Genes (Basel)* 12 (5): 694
10. Voxeur A, Gilbert L, Rihouey C, Driouich A, Rothan C, Baldet P, Lerouge P. (2011) Silencing of the GDP-D-mannose 3,5-Epimerase Affects the Structure and Cross-linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II and Plant Growth in Tomato. *Journal of Biological Chemistry* 286(10): 8014-8020
11. Zushi K, Matsuzoe N, Yoshida S, Chikushi J (2005) Comparison of chemical composition contents of tomato fruit grown under water and salinity stresses. *J Sci High Technol Agric* 17: 128-136
12. Dumville JC, Fry SC. (2003) Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta* 217(6): 951-961

Establishment of a Tomato Cultivation Technique that Maximizes the Accumulation of Vitamin C in the Early Stages of Ripening through Saltwater Cultivation with Mannose

Hiroaki Iwai

Institute of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Summary

Fruit constituents play a significant role in determining the taste and consumer appeal of major horticultural crops. Salt stress induces osmotic stress and ion toxicity, often hindering plant growth and metabolism. However, tomatoes cultivated in saline environments under salt-stressed conditions have been observed to accumulate sugars like glucose and fructose, along with proline and γ -amino acids such as aminobutyric acid and vitamin C, resulting in commercially valuable fruits. Despite this, limited research has focused on the accumulation of highly functional compounds such as vitamin C. During the ripening stages of tomato fruit, vitamin C accumulates during saline cultivation, correlating with a decrease in the amount of mannan in the pericarp and seeds. Vitamin C shares a common biosynthetic pathway with mannan, suggesting a potential trade-off between the two for the substrate mannose. It is hypothesized that cultivation in seawater leads to a deficiency in both vitamin C and mannose, the precursor for mannan synthesis. In this study, we established a cultivation system involving mannose supplementation alongside saltwater irrigation. We analyzed the expression of the vitamin C synthase gene and found that its expression increased at the early ripening stage under salt stress conditions. Mannose also increased, and the expression of mannan synthase genes, which are involved in the synthesis and degradation of mannan, also increased significantly at the mid-ripening stage. Our results show that the immature green fruit pericarp contained nearly the same amount of vitamin C as the red, almost ripe fruit, indicating that vitamin C synthesis reaches its peak during the early ripening stage. Tomatoes are shipped in an unripe state, so a cultivation system that combines salt water and mannose is an effective method that can be transferred to agricultural technology, as unripe fruit can yield tomatoes with the same level of vitamin C content as ripe fruit.