

助成番号 0819

## 塩ストレスがトマトの機能性成分に与える影響:塩ストレスが引き起こす アスコルビン酸含量の変化と光・温度環境との相互作用

圖師 一文

尚絅大学短期大学部

**概要** 1. 研究目的 近年、トマト果実の高品質化のために、栽培時に塩ストレスを与えることが試みられている。しかしながら、これまでの研究において塩ストレス下で栽培したトマト果実は、糖、有機酸含量の増加は認められるが、アスコルビン酸含量は影響がないか、減少することが明らかになった。また、この原因のひとつとして、塩ストレス以外の他の環境要因が関与することが示唆された。そこで本研究は、塩ストレス下で栽培したトマト果実のASA含量の制御メカニズムを明らかにするために、塩ストレスと他の環境条件(温度・光)の相互作用がASA含量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法 供試植物としてトマト(*Solanum lycopersicum* L)品種マイクロトムを用いた。実験は環境条件を正確に制御できるように培養果実を用いて行った。果実の培養は、開花後約2、3週間目の果実(1~1.6 g)を4% スクロースとビタミン類を含むムラシゲ・スクーグ培地(pH 5.5, 0.8% agar)に果柄を差し込むことで行った。培養条件は、温度 25°C(昼)/20°C(夜)、日長14時間、光条件は光強度暗黒、弱光および強光条件とした。塩ストレス処理は培地内に100 mM NaClを添加することで行い、対照として100 mM NaClを添加しない培地も用いた。

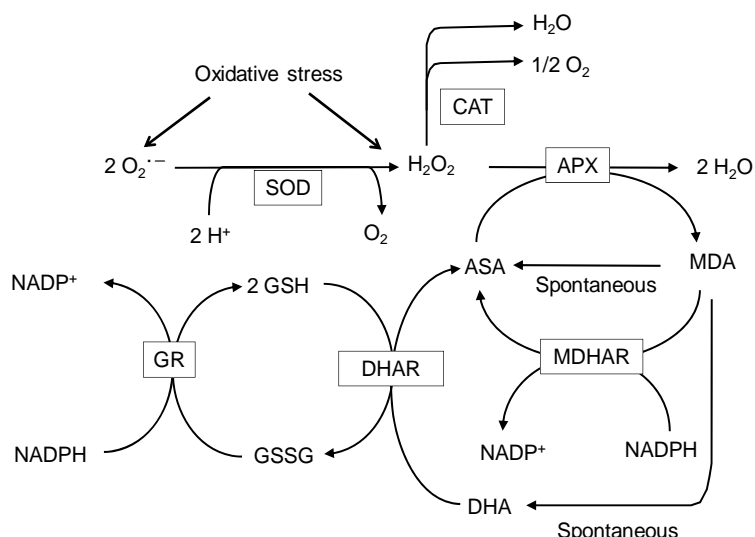
3. 研究結果および考察 果実成長には光条件の差は認められなかったが、塩ストレスによって果実成長の低下、乾物率の上昇が認められた。アスコルビン酸含量は、未熟段階および完熟段階ともに光強度増加に伴い上昇したが、塩ストレスによって完熟果の弱光および強光下で低下した。一方、グルタチオン含量は光条件および塩ストレスによる影響は小さかった。アスコルビン酸-グルタチオンサイクルに関連する抗酸化酵素活性において、APXは光強度増加に伴い上昇したが、他の酵素は影響がなかった。一方、他の酵素活性は、塩ストレスによって影響を受けなかった。以上の結果から、塩ストレス下のトマト果実のアスコルビン酸含量は光条件との相互作用によって影響を受けることが明らかになった。すなわち、光強度の上昇に伴い増加するが塩ストレスによって低下することが明らかになった。さらにこのメカニズムは、塩ストレスによって抗酸化酵素活性は影響を受けなかったことから、アスコルビン酸生合成経路が変化したことに起因すると示唆された。

### 1. 研究目的

アスコルビン酸(ビタミンC, ASA)は、ヒトにとって重要なビタミンの一つであり、近年は動脈硬化、ある種のガンの予防に効果のあることが注目されている。ASAは、トマトにおいても比較的多く含まれており、トマトは日常の摂取量の多さからASA摂取のための重要な食品である。

一般に、植物のASA含量は、様々な環境条件の影響を受けることが知られている。例えば、オオムギ葉のASA含量は光強度の増加に伴い上昇し、さらに前駆物質であ

るL-galactono-1,4-lactoneあるいはL-galactoseを葉の切片に吸収させると光強度の上昇に伴い、前駆物質からASAへの生成も高まることが報告されている(Smirnoff, 2000)。一方、ASAは、グルタチオン(GSH)とともに植物における活性酸素消去システム(ASA-GSHサイクル)において重要な役割を果たす(Mittler *et al.*, 2004) (Fig. 1)。すなわち、アスコルビン酸は、活性酸素の一種である過酸化水素を消去するためにASAペルオキシダーゼ(APX)によって酸化され、このときAPXによって酸化されたASA



**Fig. 1.** The antioxidant system in plant cells. APX: ascorbate peroxidase, ASA: ascorbate, CAT: catalase, DHA: dehydroascorbate (oxidized ASA), DHAR: DHA reductase, GR: glutathione reductase, GSH: glutathione, GSSG: GSH disulfide (oxidized GSH), MDA: monodehydroascorbate, MDHAR: MDA reductase, SOD: superoxide dismutase.

はモノデヒドロアスコルビン酸(MDA)およびDHAレダクターゼ(DHAR)によってASAに還元される。このときGSHはDHARによって酸化されるが、グルタチオンレダクターゼ(GR)によってGSHに再生される。

近年トマトの生産現場では、生産量だけでなく品質も重要視されており、さまざまな技術を利用した高品質(高糖度)果実が生産されている。これら高品質トマト生産の一つとして、海水や塩を積極的にトマト植物体に与える(塩ストレス)ことが行われている。例えば、養液栽培においてNaCl(塩化ナトリウム)を与え培養液の電気伝導度(EC)を高める栽培法などが行われている。これらの栽培法で生産されたトマト果実は、果実が小さくなるにもかかわらず可溶性固形物含量(糖度)が高く、食味が良いことから、高値で取引されている(圖師, 2008)。

しかしながら、塩ストレス下で栽培したトマトのASA含量の変化は一致した結果が得られていない。例えば、塩ストレス下で栽培したトマトのASA含量が上昇する(Petersen *et al.*, 1998)、あるいは変化しない(Krauss *et al.*, 2006; Sgherri *et al.*, 2007; Zushi and Matsuzoe, 2007)ことが報告されている。また、塩ストレス下で栽培したトマトのASA含量が、どのようなメカニズムで変化するか明らかでない。これまでの研究において塩ストレス下で栽培したトマト果実のASA含量の変化を検討した結果、ASA含量は塩スト

スによって必ずしも上昇せず、栽培時期によって影響が異なることが明らかになった(Zushi and Matsuzoe, 2007; Zushi and Matsuzoe, 2009)。さらに、塩ストレスが引き起こす酸化ストレスに対する防御にASAが利用されること、その抗酸化システム(ASA-GSHサイクル)の変化は、光や温度条件の異なる栽培時期によって大きく異なることが明らかになった。したがって、塩ストレスと温度や光条件との相互作用を明らかにすることで、塩ストレスによるASA含量増加の最適環境を導き出せると考えられる。

一方、トマト果実における温度・光環境は、天候の変化、葉の被覆によって正確に制御することが困難である。これまでの報告において、植物体から切り離れたトマト果実を組織培養することによって、樹上で生育した果実と同様な生育を行うことが明らかにされている(Guan and Janes, 1991, 1991)。さらに、彼らは、組織培養したトマト果実を用いることによって、シンク代謝(糖)に及ぼす直接的な光の影響を明らかにしている。

そこで本研究は、塩ストレス下で栽培したトマト果実のASA含量の制御メカニズムを明らかにするために、アスコルビン酸含量に及ぼす塩ストレスと他の環境条件(温度・光)との相互作用を明らかにすることを目的とする。これらことから、本研究では塩ストレスによってASA含量が増加するような最適環境を導き出し、塩ストレスによる食味に

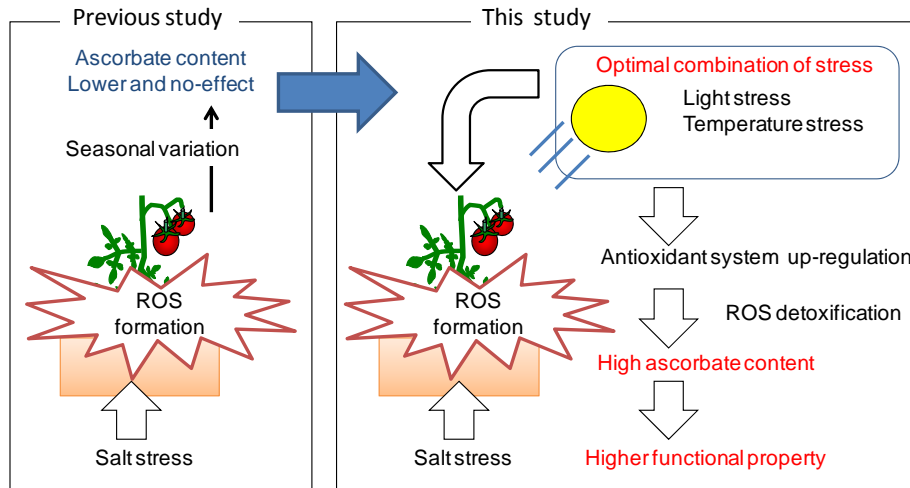


Fig. 2. Schematic diagram of purpose of this study

関する成分の増加だけでなく機能性成分の増加による更なる高品質化を試みるための基礎的知見を得ることを最終目標とする (Fig. 2)。なお、本報告書では、環境条件の中でも光環境についてのみ述べる。

## 2. 研究方法

### 2.1 供試品種および培養方法

供試植物としてトマト (*Solanum lycopersicum* L) 品種マイクロトムを用い、慣行の栽培法に従いガラス温室内で栽培した。果実の培養方法は Fig. 3 に示した。すなわち、開花後約 2~3 週間目の果実 (1~1.6 g) を採取後、10 分間 1% 次亜塩素酸ナトリウム内でゆっくり攪拌しながら浸漬し、その後滅菌水で 3 回洗浄した。その後、果実のガク片をメスですべて取り除き、果柄を 1 cm 程度残して離層直上で切断した。得られた果実は、4% スクロースとビタミン類を含む 10 ml ムラシゲ・スクーグ培地 (pH 5.5, 0.8% agar) に果柄を差し込むことで培養した (Guan and Janes, 1991)。

### 2.2 果実の培養条件

培養条件は、温度 25°C (昼)/20°C (夜)、日長 14 時間とした。光条件は、光強度 (光合成光子束密度: PPFD) と塩ストレスの相互作用を明らかにするために、3 段階に調整し、暗黒、弱光および強光条件とした。暗黒条件は培養瓶にアルミホイルを二重にまくことで行った。弱光および強光条件は、インキュベーター内の PPFD および光源から培養容器の距離を変えることで、培養瓶内の果実に達する PPFD が  $170 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (弱光) および  $614 \pm 13$

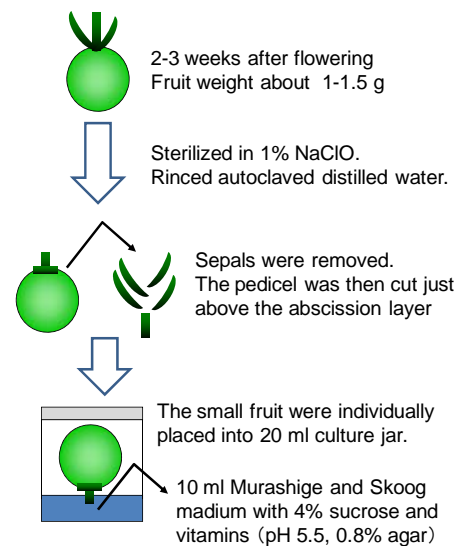


Fig. 3. Procedure for set-up of *in vitro* fruit

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (強光) になるように調整した。なお、自然環境下での PPFD は、約  $2,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (夏期) に達するので、本実験における強光条件は暗黒・弱光条件と比べて相対的に強光であると定義した。塩ストレス処理は、4% スクロースとビタミン類を含むムラシゲ・スクーグ培地 (pH 5.5, 0.8% agar) に 100 mM NaCl を添加することで行った。対照として 100 mM NaCl を添加しない培地も用いた。

### 2.3 抗酸化成分および抗酸化酵素の測定

培養した果実は、培養 10 日目 (未熟果) および完全に熟した段階 (完熟果) で採取し、培養前の重さと採取時の重さの比率から成長率を算出した。採取した果実は、液体

窒素で直ちに凍結させ分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

抗酸化成分含量(ASA, GSH)および ASA-GSH サイクルに関連する抗酸化酵素活性(APX, DHAR, MDHAR)は、(Zushi and Matsuzoe, 2009)の方法に準じて測定した。

### 3. 研究結果

#### 3.1 果実の成長率

本実験で培養した果実は、すべての処理で正常に成長し、着色した(Fig. 4)。未熟果および完熟果ともに、果実外観および内部に処理間差は認められなかった。

果実の成長率は、未熟果および完熟果ともに光条件による影響はなかった(Fig. 5)。一方、未熟果では塩ストレスによって、暗黒区と強光区において成長率が低下した。完熟段階では、塩ストレスによって強光区の果実のみ成長率が低下した。

乾物率は、未熟果では、光条件、塩ストレスによる影響はなかった。一方、完熟果では、強光区において、塩ストレス区のほうが対照区より高かった。

#### 3.2 ASA および GSH 含量

ASA 含量は、未熟果では光強度に伴い上昇したが、塩ストレスによる影響は認められなかった。一方、完熟果では光強度に伴い ASA 含量は上昇したが、弱光区と強光区において塩ストレスによって低下した(Fig. 6)。

GSH 含量は、未熟果と完熟果ともに光条件の影響は認められなかった(Fig. 7)。一方、未熟果の暗黒区においてのみ、塩ストレスによって低下した。

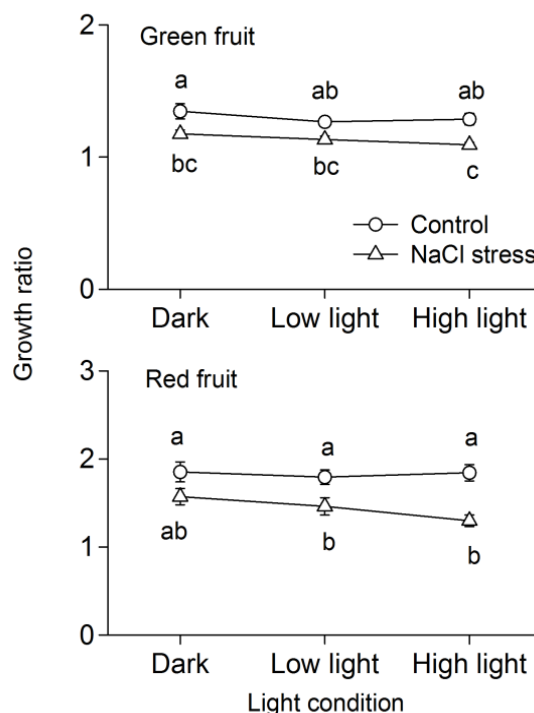


Fig. 5. Effect of salt stress on the growth ratio of fruit grown under three light conditions. Values indicate average  $\pm$  standard error. Different letters indicate significant differences by Tukey-Kramer test at 5% level.

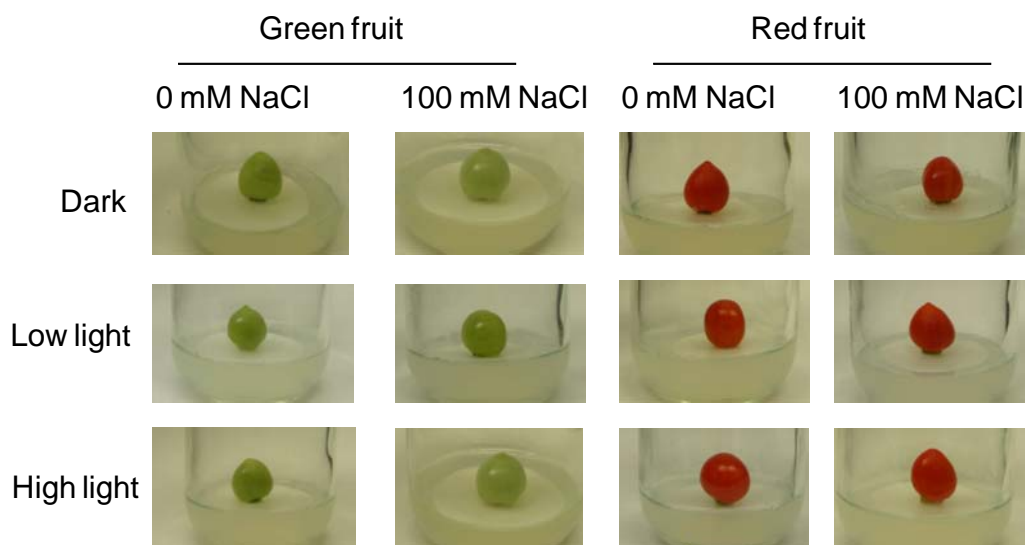
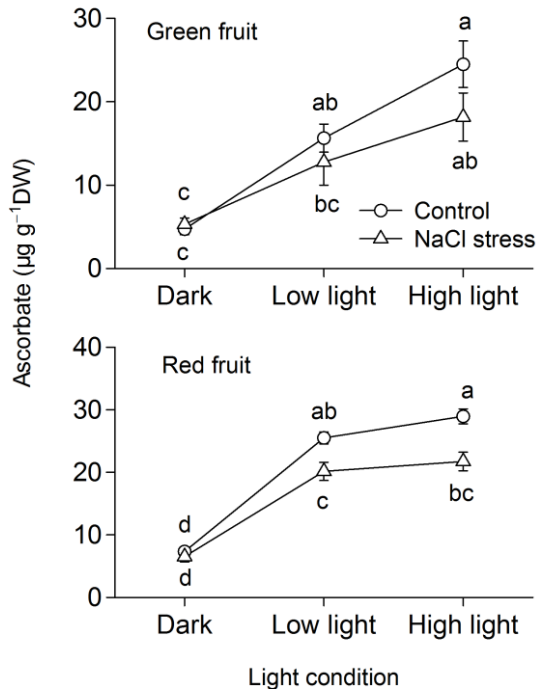
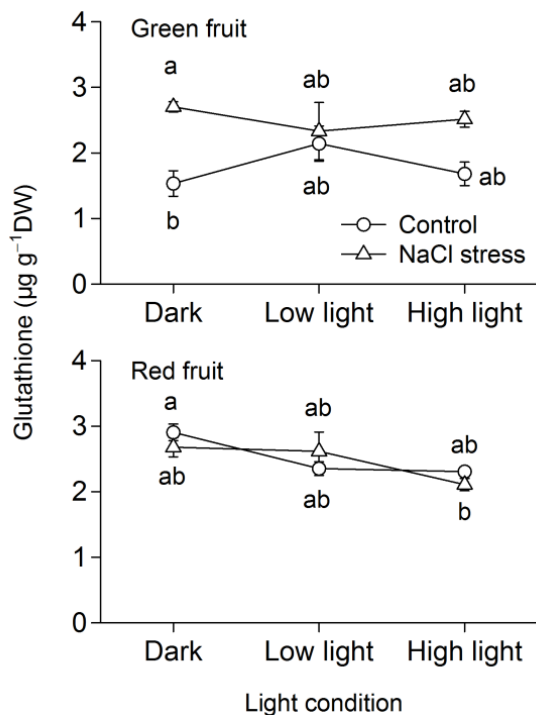


Fig 4. *In vitro* fruit grown under salt stress (100 mM NaCl) and different light conditions at dark, low light ( $170 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and high light ( $614 \pm 13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) conditions



**Fig. 6.** Effect of salt stress on ascorbate content ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  DW) of fruit grown under three light conditions. Other details are as described in the legend of Fig. 5



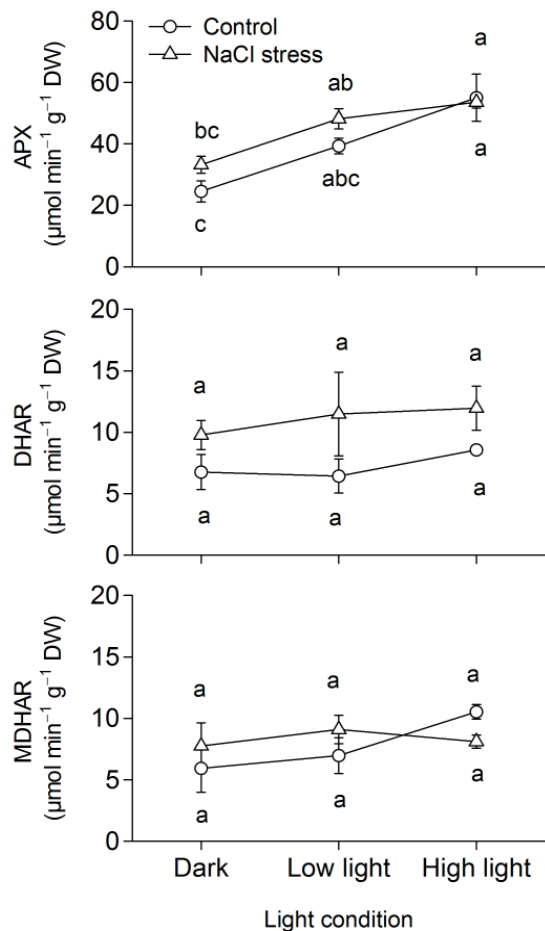
**Fig. 7.** Effect of salt stress on glutathione content ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  DW) of fruit grown under three light conditions. Other details are as described in the legend of Fig. 5

### 3.3 抗酸化酵素活性

完熟果における ASA 含量の変化が、抗酸化システムと関連するか検討するために、APX、DHAR および MDHAR 活性を測定した。APX 活性は、光強度に伴い上昇したが、塩ストレスの影響は認められなかった (**Fig. 8**)。一方、DHAR と MDAHR は光条件および塩ストレスの影響は認められなかった。

### 4. 考察

本実験において、*in vitro* で培養したトマト果実は正常に成熟し、得られた果実は果実の大きさが小さいながらも通常のトマト果実と同様の生育をした。したがって、本研



**Fig. 8.** Effect of salt stress on antioxidant enzyme activities ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  DW) of ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR) and monodehydroascorbate (MDHAR) of red-ripe fruit grown under three light conditions. Other details are as described in the legend of Fig. 5

究で用いた *in vitro* で培養した果実は、環境条件を正確に制御できるとともに、植物体から切り離すことで他の器官からの影響を受けない果実自身の塩ストレス応答を明らかにすることの出来るモデル実験系として利用可能であると考えられる。

一般に、植物に対する環境ストレスは、単一のストレスで生じることは少なく、様々なストレスが組み合わさって生じる(Mittler, 2006)。しかしながら、これまで植物の環境ストレス応答に関する研究は単独のストレスに対するものが多く、複合的なストレスの影響を見た報告は少ない。光ストレスと塩ストレスの複合的な影響を見た報告は、シアノバクテリアの PSII に及ぼす影響を検討した報告に限られ、シアノバクテリアの PSII に及ぼす塩ストレスと光ストレスの影響は完全に異なることが明らかになっている(Allakhverdiev *et al.*, 2002)。

本研究において、*in vitro* 果実を用いて様々な光条件下で塩ストレスを与えた結果、ASA 含量は光条件と塩ストレスとの間に相互作用があった(Table 1)。すなわち、光強度の上昇はASA 含量を増加させ、塩ストレスはASA 含量を減少させるが、光強度が低い場合は塩ストレスの影響が認められなかった。したがって、トマト果実の ASA 含量において、光と塩ストレスの影響は異なり、光強度の上昇に伴い塩ストレスの影響が強まることが明らかになった。

これまでの研究において、圃場環境下で春夏期(強光期)にトマトに塩ストレスを与えた場合、ASA と GSH 含量は塩ストレスによって低下する傾向にあったが、秋冬期

(弱光期)では ASA と GSH 含量に影響がなかった(Zushi and Matsuzoe, 2007; Zushi and Matsuzoe, 2009)。これまでの研究と本実験は光強度が異なるために直接比較することは出来ないが、本研究で得られた結果は圃場条件下で行った結果と一部は一致しており、光条件と塩ストレス間の相互作用を直接的に証明できたと考えられる。

一方、光強度と抗酸化システムの関係は、葉を対象とした研究は多くあるが、果実を対象としたものは少ない。例えば、常緑広葉樹の葉では、光強度が高まるにつれ ASA、GSH および抗酸化酵素活性が上昇することが報告されている(Grace and Logan, 1996)。本実験において、未熟果、完熟果ともに ASA と APX は光強度の上昇に伴い増加したが、完熟果の GSH は減少した。さらに、APX 以外の抗酸化酵素は光強度の影響を受けなかった。このことから、葉と果実では光に対する抗酸化システムの反応が異なることが示唆された。

塩ストレスがアスコルビン酸含量に与える影響のメカニズムは完全に解明されていない。塩ストレス下(100 mM NaCl)のトマトの葉や根では、アスコルビン酸含量の低下が観察され、酸化ストレスの指標である脂質過酸化物質含量の上昇が生じる(Mittova *et al.*, 2002; Mittova *et al.*, 2004)。果実においても、塩ストレスによってアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性(アスコルビン酸を用いて活性酸素の一種である過酸化水素を消去する酵素)が上昇し、アスコルビン酸含量は低下する(D'Amico *et al.*, 2003)。このことは、塩ストレス下のトマトにおいて、アスコルビン酸が

**Table 1.** Result of two-way analysis of variance (ANOVA) of light conditions (L), salt stress (S) and their interaction (L×S) in full-ripe fruit

	Light (L)	Salt stress (S)	Interaction (L×S)
Growth ratio	ns	*	ns
Dry weight (%)	*	*	ns
Ascorbate	*	*	*
Glutathione	*	ns	ns
APX	*	ns	ns
DHAR	ns	ns	ns
MDHAR	ns	ns	ns

\* and ns indicate significant difference and no significant difference at 5 % level.

塩ストレスによって引き起こされる活性酸素生成に対する防御(抗酸化システム)のために利用されることを示している。しかしながら、本研究において、塩ストレスによって APX、DHAR および MDHAR 活性は大きな影響を受けなかった。したがって、塩ストレスによる ASA 含量の低下は抗酸化システムの変化に起因しないことが明らかになった。

ASA は糖からいくつかの反応を経て、L-galactono-1,4-lactone から L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)によって生成される(Ioannidi *et al.*, 2009)。乾燥ストレス下のコムギ葉において、ASA 含量はGalLDH活性の変化より ASA 再生酵素活性の変化に依存していることが報告されている(Bartoli *et al.*, 2005)。本研究では、Bartoli *et al.*(2005)の報告とは異なるが、塩ストレスによって ASA に関連する抗酸化酵素活性は影響を受けなかったことから、塩ストレスによる ASA 含量の低下は、塩ストレスによってアスコルビン酸生合成経路が変化したこと起因すると示唆された。今後は、塩ストレスが GalLDH に与える影響を検討する必要がある。

以上の結果から、塩ストレス下のトマト果実のアスコルビン酸含量は光条件との相互作用によって影響を受けることが明らかになった。すなわち、アスコルビン酸含量は光強度の上昇に伴い増加するが塩ストレスによって低下することが明らかになった。さらにこのメカニズムは、塩ストレスによって ASA 再生酵素は影響を受けなかったことから、アスコルビン酸生合成経路が変化したこと起因すると示唆された。

## 5. 今後の課題

当初の計画では、光条件に加え温度条件と塩ストレスとの相互作用を検討する予定であったが、研究助成期間内では温度条件に関する結果を得ることが出来なかった。したがって、今後の課題としては、温度条件と塩ストレスとの相互作用を明らかにすることが挙げられる。今後は、本申請書に記載した光条件と塩ストレスとの相互作用に、温度条件を加えることによって、塩ストレスによってアスコルビン酸含量が増加するような最適環境を導き出し、塩ストレスによるトマト果実の更なる高品質化を試みるための基礎的知見を得る予定である。

## 引用文献

- Allakhverdiev SI, Nishiyama Y, Miyairi S, Yamamoto H, Inagaki N, Kanasaki Y, Murata N (2002) Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of psbA genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* 130: 1443-1453
- Bartoli CG, Guamet JJ, Kiddle G, Pastoli GM, Cagno RD, Theodoulou FL, Foyer CH (2005) Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell & Environment* 28: 1073-1081
- D'Amico ML, Izzo R, Tognoni F, Pardossi A, Navari-Izzo F (2003) Application of diluted sea water to soilless culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): effects on plant growth, yield, fruit quality and antioxidant capacity. *Food Agric. Environ* 1: 112-116
- Grace SC, Logan BA (1996) Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiol* 112: 1631-1640
- Guan HP, Janes HW (1991) Light Regulation of Sink Metabolism in Tomato Fruit : I. Growth and Sugar Accumulation. *Plant Physiol* 96: 916-921
- Guan HP, Janes HW (1991) Light Regulation of Sink Metabolism in Tomato Fruit : II. Carbohydrate Metabolizing Enzymes. *Plant Physiol* 96: 922-927
- Ioannidi E, Kalamaki MS, Engineer C, Pateraki I, Alexandrou D, Mellidou I, Giovannonni J, Kanellis AK (2009) Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *J Exp Bot* 60: 663-678
- Krauss S, Schnitzler WH, Grassmann J, Woitke M (2006) The influence of different electrical conductivity values in a simplified recirculating soilless system on inner and outer fruit quality characteristics of tomato. *J. Agric. Food Chem.* 54: 441-448
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science* 11: 15-19
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem FV (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends*

Plant Sci 9: 490-498

- Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M (2004) Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. J Exp Bot 55: 1105-1113
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. Physiol Plant 115: 393-400
- Petersen KK, Willumsen J, Kaack K (1998) Composition and taste of tomatoes as affected by increased salinity and different salinity sources. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 73: 205-215
- Sgherri C, Navari-Izzo F, Pardossi A, Soressi GP, Izzo R (2007) The influence of diluted seawater and ripening stage on the content of antioxidants in fruits of different tomato genotypes. J Agric Food Chem 55: 2452-2458
- Smirnoff N (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 355: 1455-1464
- Zushi K, Matsuzoe N (2007) Seasonal and cultivar differences in salt-induced change in ascorbic acid and dehydroascorbic acid contents of tomato fruit. Environ. Cont. Biol. 45: 165-171
- Zushi K, Matsuzoe N (2009) Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. Sci Hort 120: 181-187
- 圖師 (2008) 高品質トマト生産のための塩利用. 日本海水学会誌 62: 179-186



No. 0819

## Effect of Salt Stress on Functional Components of Tomato Fruit: Salt-Induced Changes in Ascorbate Content and Their Interactions to Light and Temperature Conditions

Zushi K

Shokei University

### Summary

In tomato plants, salt stress has been applied to improve the quality of fruit. Salt-induced changes in ASA (vitamin C) content have been examined extensively in leaves and roots, but little is known about fruits. Our previous study, we show that tomato fruits have antioxidant systems such as ascorbate (ASA)-glutathione (GSH) cycle to protect themselves from salt-induced oxidative stress, but the ASA content depended on cultivars and cropping seasons. The aim of this study was to clear the interaction between light intensities and salt stress on ASA content in salt-stressed fruit using *in vitro* grown fruit. Small green fruit were harvested from greenhouse and sterilized. Sterilized fruits were individually placed into jars containing 10 ml Murashige and Skoog medium with 4% sucrose, 0.8% agar, pH 5.5. Fruit were grown in the dark, low light (PPFD  $170 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and high light ( $614 \pm 13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) conditions in an environmentally controlled chamber (25°C/20°C, 14 h light/10 h dark). Salt stress was applied by adding 100 mM NaCl to the medium. Despite of the different light condition, the growth ratio of fruit was lower in salt-stressed fruit than in control fruit. In green and red-ripe fruit, the ASA content was increased with light intensities, but decreased by salt stress in the low and high light grown fruit. In contrast, GSH content was not influenced by light intensities and the salt stress. ASA peroxidase (APX) that is scavenger of hydrogen peroxide, increased with light intensities, but not effect by salt stress. In addition, ASA recycling enzymes such as dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase were not influenced by both the light intensities and salt stress. These results indicate ASA content interacted between light and salt stress conditions. Furthermore, I suggest that these mechanisms may be resulted from the change in the ASA biosynthesis rather than the changes in recycling enzymes of ASA under salt stress condition.