

질소 결핍, 인 결핍 및 광 처리가 토마토 하배축에서 안토시아닌 생합성에 미치는 영향

문수빈, 구연종*

Effects of Nitrogen or Phosphorus Deficiency and Light Treatment on Anthocyanin Biosynthesis in Tomato Hypocotyls

Subeen Mun  and Yeonjong Koo 

전남대학교 농화학과

Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

* Correspondence: yeonjong@jnu.ac.kr

<https://doi.org/10.5338/KJEA.2025.44.07>

Agric. Environ. Sci. 2025, 44, 55-67

Received: December 4, 2024

Revised: January 13, 2025

Accepted: February 3, 2025

Published: February 27, 2025

Online ISSN: 2233-4173

Print ISSN: 1225-3537



© The Korean Society of Environmental Agriculture 2025



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Anthocyanins are pigment ingredients with great potential as health-functional materials, and they are processed and used in various fields. These compounds function as antioxidants and are synthesized in response to various stress conditions. In the case of tomatoes, they have an unstable flavonoid biosynthesis pathway. So, they are rich in lycopene in a normal state and produce red fruits. However, when plants detect specific environmental changes, they can synthesize anthocyanins. In this study, we observed the expression of anthocyanin biosynthesis genes in tomato hypocotyls under nutrient deficiency conditions and various light treatments. Under nitrogen or phosphate deficiency conditions, the anthocyanin content in hypocotyls increased compared to the control, and similar levels were shown under nitrogen-deficient and phosphorus-deficient conditions. The expression levels of most anthocyanin biosynthesis genes were higher in the nutrient-deficient treatment group. Under light-treatment conditions, the anthocyanin content was higher in the light-treated groups. and the expression levels of anthocyanin biosynthesis genes were also higher in the light-treated group. These data provide insight into how anthocyanin accumulation is regulated through distinct genetic induction pathways in response to nitrogen deficiency, phosphate deficiency, and light signaling.

Keywords: Anthocyanin, Light, Nitrogen, Nutrient deficiency, Phosphorus, Tomato

서론

토마토(*Solanum lycopersicum*)는 전세계적으로 많은 소비가 이루어지는 작물 중 하나이다. 특히 토마토는 지용성 카로티노이드 성분으로 알려진 라이코펜을 많이 함유하고 있어 항암 효과를 가진 작물로도 잘 알려져 있다[1-3].

안토시아닌은 수용성 플라보노이드 색소 성분으로, 항암 효과, 시력 건강 개선, 성인병 예방 등 다양한 효능을 지닌 건강 기능성 소재로서 역할을 할 수 있어 다양

한 분야에서 각광받고 있다. 특히 안토시아닌은 식물체 내에서 항산화제로서 기능할 수 있기 때문에 여러 가지 환경적인 스트레스 조건 아래에서 이를 인지하여 생합성될 수 있다[4-6].

식물 내에서 안토시아닌 생합성에 관여하는 유전자에는 활성인자 역할의 R2R3-MYB 전사인자와 억제인자 역할을 하는 R3-MYB 전사인자가 포함된다. 현재 사과, 복숭아, 페튜니아 등 다양한 식물의 MYB 인자가 알려져 있으며, 토마토의 경우 *SIAN2*, *SIANT1*, *SIAN2-like*의 R2R3-MYB 인자와 *SIMYBATV*, *SITRY* 등의 R3-MYB 인자가 알려져 있다. 특히 인디고로즈 (Indigo-Rose) 품종의 토마토는 *Aft*로 알려진 *SIAN2-like*라는 활성인자가 광에 반응하여 토마토의 열매에서 보다 높은 안토시아닌 함량을 갖게 된다[7-16]. 이처럼 식물이 주변 환경으로부터 자극을 감지하면 관련 수용체가 안토시아닌 생합성 경로에서 activator 역할을 하는 MYB 인자의 발현을 활성화하고, 활성화된 MYB 인자들은 basic Helix-Loop-Helix (bHLH), WD40과 함께 MBW (MYB-bHLH-WD40) 복합체를 형성한다[17]. 형성된 MBW 복합체는 안토시아닌 생합성 유전자의 프로모터 부위에 결합해 그들의 발현을 촉진하여 결과적으로 식물의 안토시아닌 함량이 증가하게 된다[18]. 이와 관련하여 십자화과 작물에서 작물 생장에 필수적인 N 또는 P가 결핍된 조건에서 안토시아닌 함량 증진이 관찰되었으며, UV, Blue light 등 다양한 광 조건 아래에서도 안토시아닌 축적이 관찰되었다는 관련한 연구 결과들을 다양한 작물에서 확인할 수 있다[19-22].

안토시아닌은 식물의 배축, 잎, 줄기 등 영양조직부터 꽃, 열매 등 생식기관에 이르기까지 식물의 모든 곳에서 축적될 수 있다. Phenylalanine으로부터 phenylalanine ammonia-lyase (PAL)과 cinnamate 4-hydroxylase (C4H), 4-coumarate CoA ligase (4CL)에 의해 4-coumaroyl-CoA가 만들어지면 4-coumaroyl-CoA는 3분자의 Malonyl-CoA와 함께 chalcone synthase (CHS)와 chalcone isomerase (CHI)의 효소적 작용으로 naringenin으로 전환된다[23]. 이 성분은 flavanone 3-hydroxylase (F3H)에 의해 dihydrokaempferol로 전환되며, Dihydrokaempferol은 flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)에 의해 dihydroquercetin을 생성하거나 flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H)에 의해 Dihydromyricetin을 생성한다[24]. 이러한 dihydroflavonol들은 dihydroflavonol 4-reductase (DFR)에 의해 환원되어 무색 안토시아닌으로 알려진 leucodelphinidin, leucopelargonidin, leucocyanidin을 생성하고 이후에 anthocyanidin synthase (ANS)에 의해 글리코실화되어 유색 안토시아닌인 delphinidin, pelargonidin, cyanidin으로 전환된다[25]. 이 색소 성분은 이후 추가적인 메틸화, 글리코실화, 아실화 등을 거쳐 안토시아닌 수송체로 알려진 glutathione s-transferase (GST)에 의해 액포로 운반된다(Fig. 1)[26,27].

식물은 일상적인 환경에서는 안토시아닌을 만들지 않지만, 가뭄, 빛, 영양소 결핍, 온도, 병원체의 침입 등 식물의 생장에 영향을 줄 수 있는 다양한 스트레스에 반응하여 안토시아닌이 축적될 수 있다[28-33]. 대표적으로 안토시아닌은 강한 광 강도에 의해 일어나는 식물체 내의 광산화 반응에 대응하여 생성될 수 있다[34]. 식물의 광수용체로는 적색광을 인지하는 Phytochrome [35], 청색광을 인지하는 Cryptochrome[36], UV-B 파장을 인지하는 UVR8이 알려져 있으며[37], 이들은 평소와 다른 빛을 감지하면 빛에 의한 안토시아닌 생합성 경로의 대표적인 억제인자로 알려진 COP1과 결합한다. COP1과 빛 수용체 단백질이 결합하여 그 기능을 하지 못하게 되면 COP1에 의해 분해되던 HY5가 안정화되어 안토시아닌 생합성에 기여할 수 있다[38]. HY5는 빛에 의한 안토시아닌 생합성에서 활성화제로 기능하여 MYB 인자의 발현을 증가시키고 MBW 복합체에 의한 안토시아닌 생합성을 촉진한다[39]. 또한 HY5는 안토시아닌 생합성에 관여하는 여러 유전자의 프로모터 부위에 결합할 수 있어 안토시아닌 생합성 유전자의 발현을 촉진시켜 식물에서 안토시아닌 생합성 증가에 기여한다[40,41].

영양소의 결핍은 식물 내에서 안토시아닌 생합성을 촉진하는 또 다른 인자이다. 질소 결핍 조건에서 토마토는 잎과 줄기에 안토시아닌을 축적하며, 인 결핍 조건에서 또한 잎과 줄기에서 안토시아닌을 축적하는 것으로 알려져 있다[29]. 이는 스트레스에 의해 생성된 ROS에 대항하는 안토시아닌의 역할을 나타낸다. 또한 애기장대는 질소가 결핍된 조건에서 MYB 유전자의 발현이 증가하며 특히 AtPAP2가 영양 결핍 상태에서의 안토시아닌 축적 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[42].

안토시아닌은 잘 알려진 천연 항산화제로써 노화 방지, 항암 활성 등 유용한 효능으로 이어져 건강 기능성 소재로 주목받고 있다. 본 연구에서는 특정한 비생물적 스트레스 아래에서 토마토의 안토시아닌 생합성 유전자의 발현을 관찰하고, 토마토 식물의 안토시아닌 생합성 증진에 대한 기초적인 지식을 제공하고자 하였다.

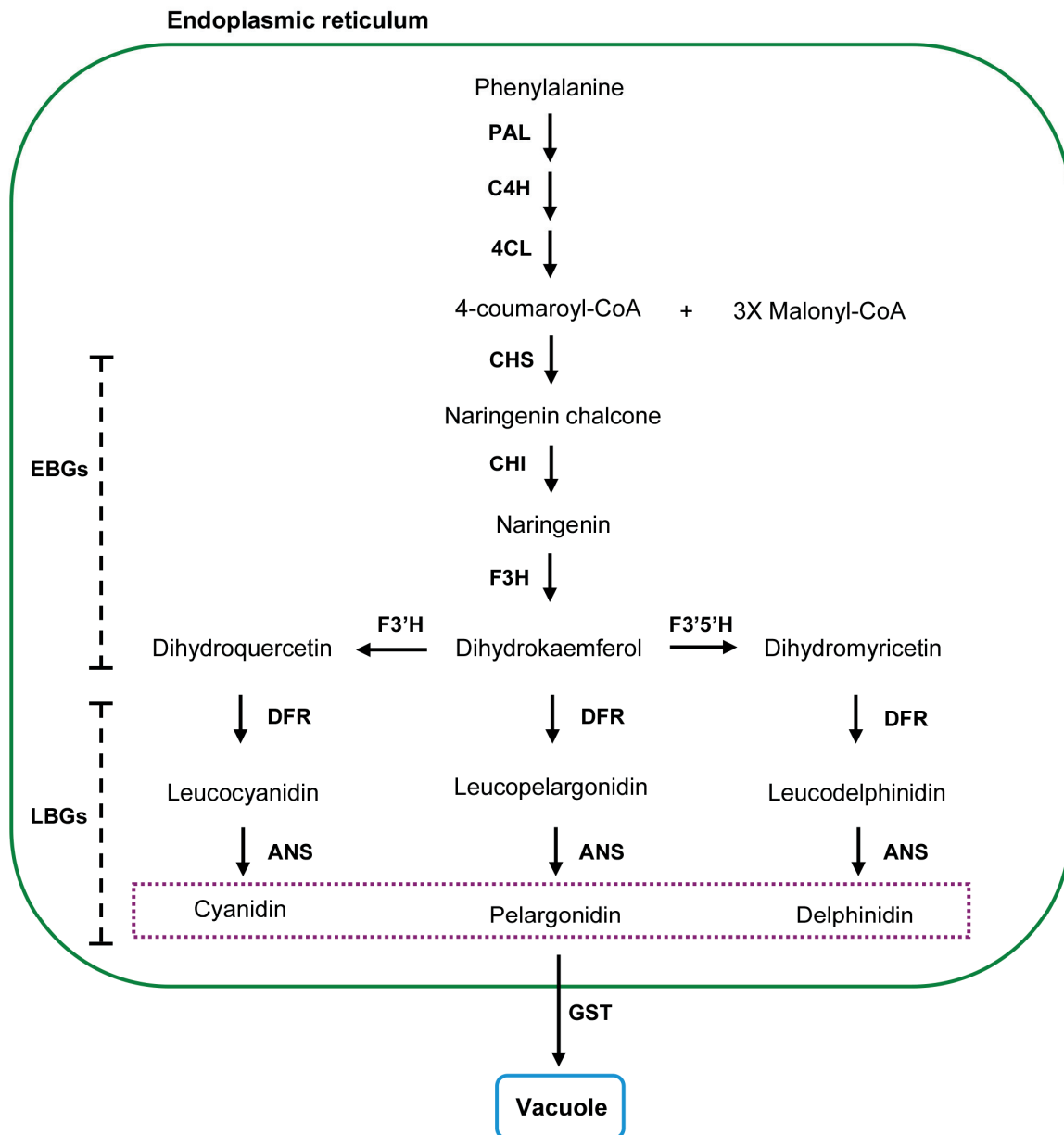


Fig. 1. Mechanism of anthocyanin biosynthesis in plants.

The biosynthesis of anthocyanins in plants involves various enzymes. The enzymes are as follows: PAL (phenyl ammonia lyase), C4H (cinnamate 4-hydroxylase), 4CL (4-coumarate CoA ligase) CHI (chalcone isomerase) F3H (flavanone 3-hydroxylase), F3'H (flavonoid 3'-hydroxylase), F3'5'H (flavonoid 3'5'-hydroxylase), DFR (dihydroflavonol 4-reductase), ANS (anthocyanidin synthase) GST (Glutathione S-transferase). The purple box represents anthocyanins.

재료 및 방법

토마토 배양 조건

본 논문은 토마토(*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom)를 실험에 사용하였다. 토마토 유묘는 3S 배지(MS salt including MS vitamin 4.4 g/L, Sucrose 30 g/L, Plant agar 8 g/L)에 종자를 파종하고 2일간 4°C, 암조건에서 배양하여 종자의 휴면 타파를 유도한 후, 발아시켜 얻었다. 종자는 500배 희석한 락스에 10분간 소독하고 멸균수로 1회 세척하였다. 세척한 종자는 70% 에탄올에서 5분간 소독하고 멸균수로 3회 이상 세척한 후 3S 배지에 파종하였다. 종자는 2일간 4°C에서 휴면시켰다. 식물은 25°C의 환경에서 광 주기 12시간/12시간으로 성장시켰다.

질소와 인 결핍 스트레스 처리

토마토 종자를 앞서 언급한 방법으로 소독하고 MS 배지(MS medium including vitamin 4.4 g/L, MES 0.5 g/L, Plant agar 8 g/L), 질소가 결핍된 MS 배지(MS medium nitrate free 4.4 g/L, MES 0.5 g/L, Plant agar 8 g/L), 인이 결핍된 MS 배지(MS medium without phosphate 4.4 g/L, MES 0.5 g/L, Plant agar 8 g/L)에 각각 종자를 파종하였다. 토마토 유묘는 발아 후 2주 뒤에 수집되었다. 각 처리구는 3개 이상의 독립된 MS 배지에서 채집한 시료의 결과에서 평균값을 계산하여 나타냈으며 3회 이상 반복을 통해 동일한 결과를 얻은 자료를 제시하였다.

광 처리

멸균한 종자를 3S 배지에서 발아시키고, 이로부터 약 7일이 지난 토마토 유묘를 1/2 MS 배지(MS medium including vitamin 2.2 g/L, MES 0.5 g/L, Plant agar 8 g/L)로 옮겼다. 2일간 약 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 낮은 조도의 빛을 처리한 후, 48시간 동안 암 처리 또는 광 처리를 수행하였다. 백색광은 약 $65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조도로 처리되었으며, 이때 6500K의 LED 조명(GML-T518K-LA, (주)한승, 대한민국)을 사용하였다. 이때 광 주기 및 성장 조건은 앞에서 명시한 조건으로 실험을 진행하였다. 유묘는 48시간 후 RNA 추출을 위해 수집되었다.

RNA 추출 및 cDNA 합성

RNA는 각 처리를 진행한 토마토 유묘의 하배측으로부터 추출되었다. 이때 하배측은 최소 6개 이상 수집되었다. 수집된 하배측은 액체질소에서 동결시킨 후, Tissue-Lyser II (QIAZEN, 독일)을 이용해 bead와 함께 분쇄되었다. 분쇄한 시료로부터 Ribospin™ Plant (Cat. No 307-150, GeneAll, 한국)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA의 농도와 순도는 ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop)으로 정량되었다. 이때 cDNA는 SuperScript™ III (ThermoFisher, 미국)과 18 mer의 Oligo-dT를 이용하여 역전사 반응을 수행하여 제작되었다. cDNA의 농도는 $1 \mu\text{g}$ 이 되도록 조정했다. 역전사 반응은 65°C에서 5분, 4°C에서 10분, 23°C에서 10분, 50°C에서 50분 동안 수행되었고, 반응물은 12°C에서 유지되었다. 이후 반응물 20 μL 에 ddH₂O 80 μL 를 첨가하여 -80°C에서 보관하였다.

유전자 발현 실시간 정량분석

유전자의 발현은 RT-qPCR을 통해 상대적으로 정량되었다. 제작된 cDNA를 주형으로 하여 반응을 수행하였고, 이 때 iQ SYBR-Green Super mix (Bio-Rad, 미국)를 사용하였다. 형광은 Bio-Rad사의 CFX-Duet을 사용하여 검출하였다. 사용한 프라이머는 Table 1에 명시하였다. 반응은 95°C에서 3분간 polymerase를 활성화시키고, denaturation 후, 95°C에서 10초간 denaturation, 60°C에서 10초간 annealing 후, 72°C에서 30초간 extension했다. PCR 반응은 39번 반복하였다. Melt curve는 65°C를 시작으로 95°C가 될 때까지 0.5°C씩 증가하도록 하여 분석되었다.

안토시아닌 정량

안토시아닌은 각 처리구에서 수집된 토마토 유묘의 하배측으로부터 정량되었다. 수집한 하배측 최소 6개를 액체질소에서 동결시킨 후, Tissue-Lyser II을 이용해 bead와 함께 분쇄했다. 분쇄한 샘플에 1%의 HCl을 포함하는 Methanol을 300 μL 첨가하고 4°C에서 1일 동안 암배양했다. 이후 샘플에 500 μL 의 chloroform (Cat. No 25666-100ML, Sigma Aldrich, 미국)을 첨가하고 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액으로부터 색소성분을 정량하였다. 안토시아닌 추출물을 NanoDrop-1000 spectrophotometer (ThermoFisher, 미국)의 UV-Vis로 측정하고 다음과 같은 수식을 통해 정량했다.

$$\text{Anthocyanin content} = (A_{530} - 0.25 \times A_{657}) / \text{fresh weight}$$

결과 및 고찰

질소 또는 인 결핍 조건에서 토마토의 안토시아닌 함량

식물의 성장에 필수적인 영양소 중 질소 또는 인이 결핍된 조건에서 토마토의 안토시아닌 함량 축적을 관찰하기 위해 질소 또는 인이 결핍된 MS 배지에 토마토 종자를 파종하고, 2주 후 하배축을 수집했다. 토마토의 안토시아닌 함량을 관찰했을 때, 토마토의 하배축은 무처리구에서 가장 녹색을 나타냈으며, 영양 결핍 처리구의 경우 자색의 하배축을 지녔다. 또한 독특하게도 질소 결핍 처리구의 경우 다른 처리구보다 뿌리의 길이가 길어지는 경향을 나타냈다(Fig. 2A, 2B, 2C)[43]. 토마토의 하배축으로부터 안토시아닌을 추출하고 정량했을 때, 안토시아닌 함량은 하배축 1 g 당 무처리구 0.56, 질소 결핍 처리구 2.94, 인 결핍 처리구 3.12로 무처리구에 비해 영양 결핍 처리구에서 더 높았고, 질소 결핍 처리구와 인 결핍 처리구는 유사한 값을 보였다(Fig. 2D).

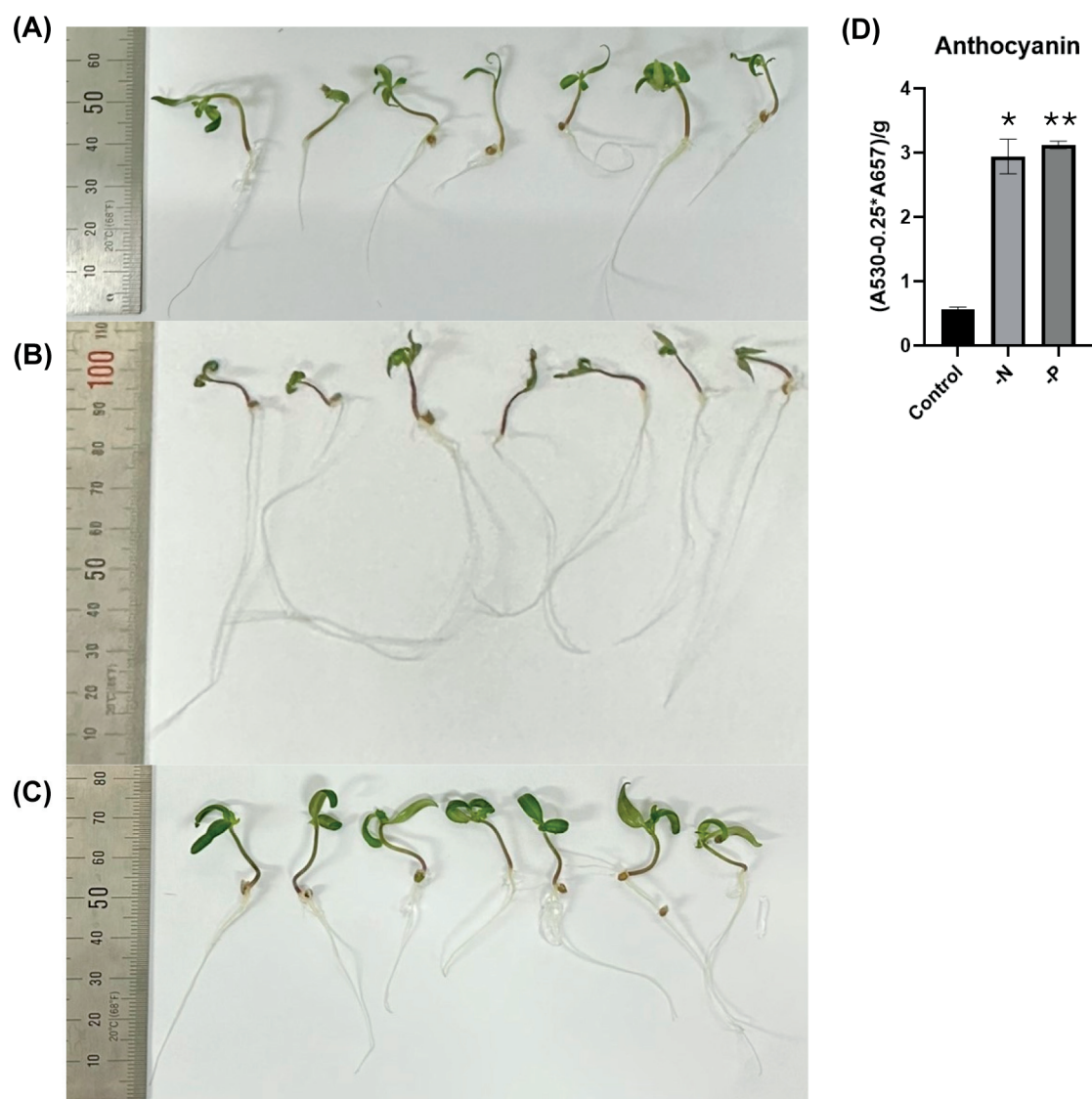


Fig. 2. Anthocyanin contents of tomato hypocotyls under nutrient deficiency conditions: (A) Tomato seedlings in the untreated group, (B) Tomato seedlings in the nitrogen-deficient group, (C) Tomato seedlings in the phosphorus-deficient group, (D) Anthocyanin content in tomato hypocotyls in each treatment group.

Hypocotyls were collected in 4 pieces for each treatment. Anthocyanins were extracted from hypocotyls treated for 7 days under nutrient deficient conditions. The quantified anthocyanin content was expressed per fresh weight of the hypocotyls. Each treatment was performed in triplicate. Error bars represent the standard error.

질소 또는 인 결핍 조건에서 토마토의 안토시아닌 생합성 유전자의 발현 수준

질소 또는 인이 결핍된 조건 아래에서 토마토 유묘 하배측의 안토시아닌 생합성 유전자의 발현 수준을 관찰했다. 각 처리구는 생물학적, 기술적으로 각각 3반복하여 수행되었다. 이때 사용한 Primer는 Table 1에 나타났다. 토마토에서 안토시아닌을 축적하는 데 관여하는 것으로 알려진 MYB factor의 발현 수준을 관찰했을 때, MYB75의 경우 무처리구에 비해 영양 결핍 처리구에서 높은 발현을 보였다. 이전의 연구에 따르면, PAP1/MYB75를 과발현한 애기장대의 경우, 질소가 결핍된 조건 아래에서 질산염 수송체로 알려진 NRT1.1의 발현이 무처리 애기장대 대조구(Col-0)에 비해 높았으며, 안토시아닌 함량 또한 Col-0에서 높았다[44]. 이를 통해 MYB75는 질소가 부족한 조건에 대응할 수 있으며, 안토시아닌 생산을 통해 식물의 질소 회복을 촉진한다고 설명할 수 있다. 이와 비슷한 경향으로, 토마토 하배측에서 MYB75의 발현 수준이 질소 결핍 처리구에서 보다 더 높게 관찰되었다. MYB75와 비슷한 활성을 갖는 것으로 알려진 *ANT1* 또한 무처리구보다 영양 결핍 처리구에서 더 높은 발현을 보였지만, MYB75와 다르게 인 결핍 처리구에서 더 높은 발현 수준을 보였다. 토마토 열매에 안토시아닌을 축적하는 것으로 알려진 *Aft*는 인 결핍 처리구에서 높은 발현을 나타냈다. R3-MYB 억제인자로 잘 알려진 ATV의 발현 수준은 무처리구보다 영양 결핍 처리구에서 더 높았으며, 그 중에서도 인 결핍 처리구에서 더 높은 발현을 보였다(Fig. 3A). 이는 R2R3-MYB 인자의 발현 증가로 ATV의 발현이 자극되어 나타난 결과로 여겨진다[21,45].

안토시아닌 생합성 유전자의 발현 수준을 관찰했을 때, Early Biosynthesis Genes (EBGs)로 알려진 CHS의 발현 수준은 영양 결핍 처리구에서 무처리구보다 더 낮았으며, 질소 결핍 처리구에서 가장 낮은 발현 수준을 보였다. 이와 반대로 F3'5'H의 발현 수준은 영양 결핍 처리구에서 높았으며, 질소 결핍 처리구에서 특히 더 높았다. Late Biosynthesis Genes (LBGs)에 속하는 DFR 또한 F3'5'H와 유사하게 영양 결핍 조건에서 더 높은 발현을 나타냈으며, 특히 질소 결핍 조건에서 더 높은 발현 수준을 보였다. 이와 반대로 ANS는 영양 결핍 조건에서 무처리구보다 더 낮은 발현 수준을 나타냈다(Fig. 3B). MYB75의 발현이 증가된 질소 결핍 처리구에서 DFR과 F3'5'H의 발현 수준도 증가했지만, CHS의 발현 수준은 미미한 경향이 관찰되었다. 이전의 연구에 따르면 MYB75가 DFR의 발현 증가에 관여하고 CHS의 발현에는 연관성을 보이지 않았다고 하며, 이와 비슷한 경향으로 설명된다[46]. 또한 *ANT1* 발현이 높았던 질소 결핍 처리구에서 DFR의 발현 증가가 관찰되었으며, 실제로 *ANT1*이 DFR의 발현을 조절한다는 연구 결과와 일치하는 경향을 나타냈다[13]. 이와 더불어 CHS와 ANS의 발현 수준 감소는 ATV 발현 수준 증가로부터 유래한 것으로 추측된다.

Table 1. Primer list used for real-time qPCR analysis

Primer	Sequence	Target
Solanum-l-actin-F	CTTCCTCAGCACCTTCCAG	Reference Gene
Solanum-l-actin-R	GCATCTCTGGTCCAGTAGGAA	
SIHY5_RT_F	TTTCGGGTGGATTGTTCTGA	Light signaling factor
SIHY5_RT_R	CCACAATCCTTCACTCTCTGCT	
pAft-RT-3-F	TGCCAAGACATTGGGAGTGA	R2R3-MYB
pAft-RT-3-R	CCAGAGCAAAGTCACCTCTCT	
SIMYB75-RT-F	GGCAATAGGTAAGTCTATGCTGC	
SIMYB75-RT-R	TCTTGATCCACATCAGACAACGA	R3-MYB
SIATV-RT-F	CCAGGAGGAAATACAGGCCCAATC	
SIATV-RT-R	CCAACGAATGGGCCTCAACAGCTA	Anthocyanin Synthesis Gene
SICH5-RT-F	GGGACAGACCCATTTAGACACA	
SICH5-RT-R	CCTTGGCCACTCTAAAGCCA	
SIDFR-RT-F	CCTTGAACGCGGTTATAATGTCC	
SIDFR-RT-R	CAGCCTTGAATGGCTTCATCAAA	
SIANS-RT-F	TAATGTCCACGGCTATGGAAGCA	
SIANS-RT-R	CGGACACCACCATTGTCAAAAA	
SIF3'5'H-RT-F	ATTCAGTCTGGTACAGACACTT	
SIF3'5'H-RT-R	TAGGGAGATTAGTGGCGTTGAG	

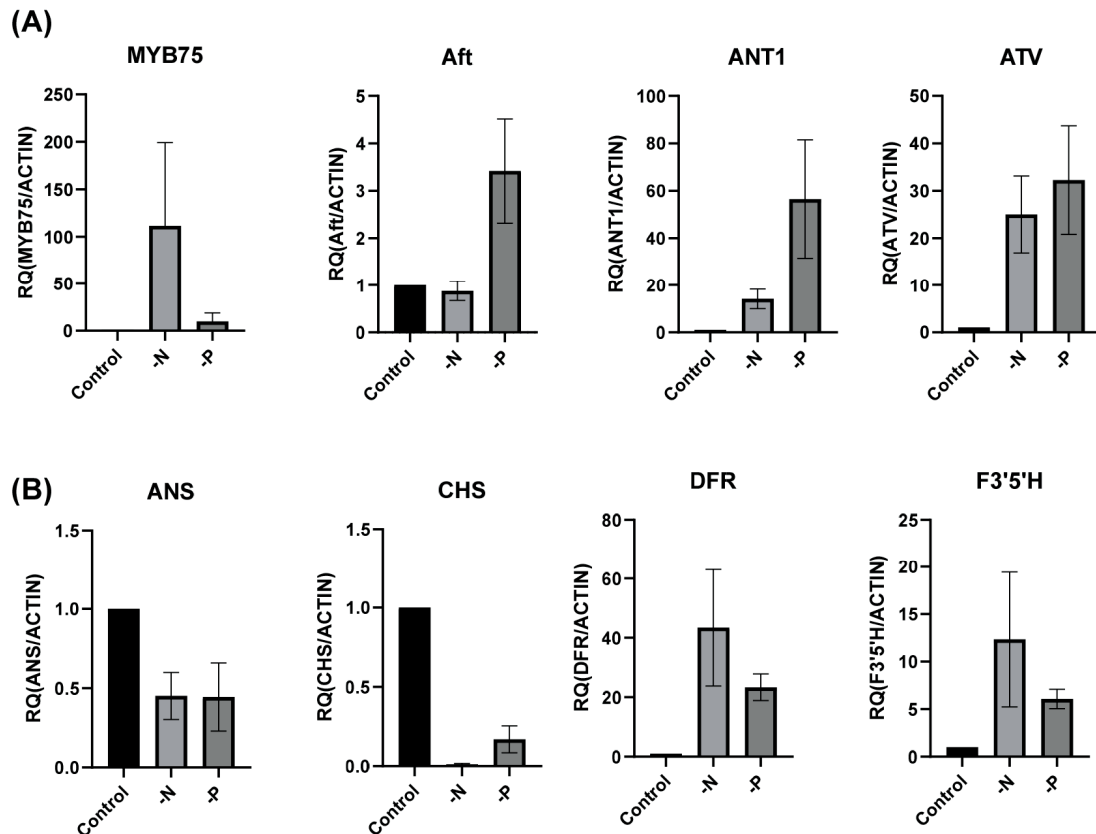


Fig. 3. Expression of anthocyanin synthesis genes in tomato hypocotyls under nutrient deficiency conditions: (A) Expression levels of MYB transcription factors under nutrient deficiency conditions, (B) Expression levels of anthocyanin biosynthesis genes under nutrient deficiency conditions.

The expression levels of each gene were normalized to the ACTIN gene. Control means seedlings grown on a complete nutrient MS medium, -N represents seedlings grown on an MS medium deficient in nitrogen, and -P represents seedlings grown on an MS medium deficient in phosphorus. The expression level of seedlings grown on the complete nutrient MS medium was set to 1. Error bars represent the standard error.

광 처리에 따른 토마토의 안토시아닌 함량

광 처리에 따른 토마토의 안토시아닌 생합성 수준을 확인하기 토마토 유묘를 2일 동안 저조도 처리 후, 48시간 동안 암 조건 또는 광 조건에 노출시켰다. 각 처리구는 3반복으로 수행되었다. 토마토의 하배측은 암처리구에서 가장 녹색을 나타냈으며, 광 처리구에서는 약간의 자색을 띄었다(Fig. 4A, 4B). 이와 일치하게 안토시아닌 함량은 암처리구의 경우 하배측 1 g당 0.52, 백색광 처리구는 1.88로 암처리한 토마토의 하배측보다 광처리구의 토마토의 하배측에서 더 높은 수치를 나타냈다(Fig. 4C). 이들 사이의 유의수준은 0.05보다 낮았으며, 유의미한 차이로 해석된다.

광 처리에 따른 토마토의 안토시아닌 생합성 유전자 발현 수준

광 처리에 따른 토마토의 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 발현 수준을 관찰하기 위해 광 처리 후 토마토 유묘의 하배측을 수집했다. 각 처리구는 생물학적, 기술적으로 각각 3반복하여 수행되었다. 식물의 광범위한 빛 수용체로 알려진 HY5의 발현은 무처리구보다 광 처리구에서 더 높았으며(Fig. 5A), 토마토에서 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 것으로 알려진 MYB 활성인자들의 발현 또한 모두 광 처리구에서 높았다. 이는 광 수용체에 의해 발현 수준이 증가한 HY5가 R2R3-MYB 인자의 발현을 자극시킬 수 있음을 나타내며, 실제로 HY5는 MYB75와 *Aft*의 프로모터 부위에 결합할 수 있다[16,47]. 반면 R3-MYB 억제인자로 알려진 ATV의 발현은 암처리구에서 발현 수준이 더 높았다(Fig. 5B).

이와 비슷하게 안토시아닌 생합성 유전자도 대부분 광 처리구에서 더 높았다. 안토시아닌 생합성 유전자 중 EBGs로 알려진 CHS와 F3'5'H 또한 광 처리구에서 가장 높은 수준의 발현을 나타냈으며, LBGs 중 하나인 DFR도 마찬가지로 광 처리구에서

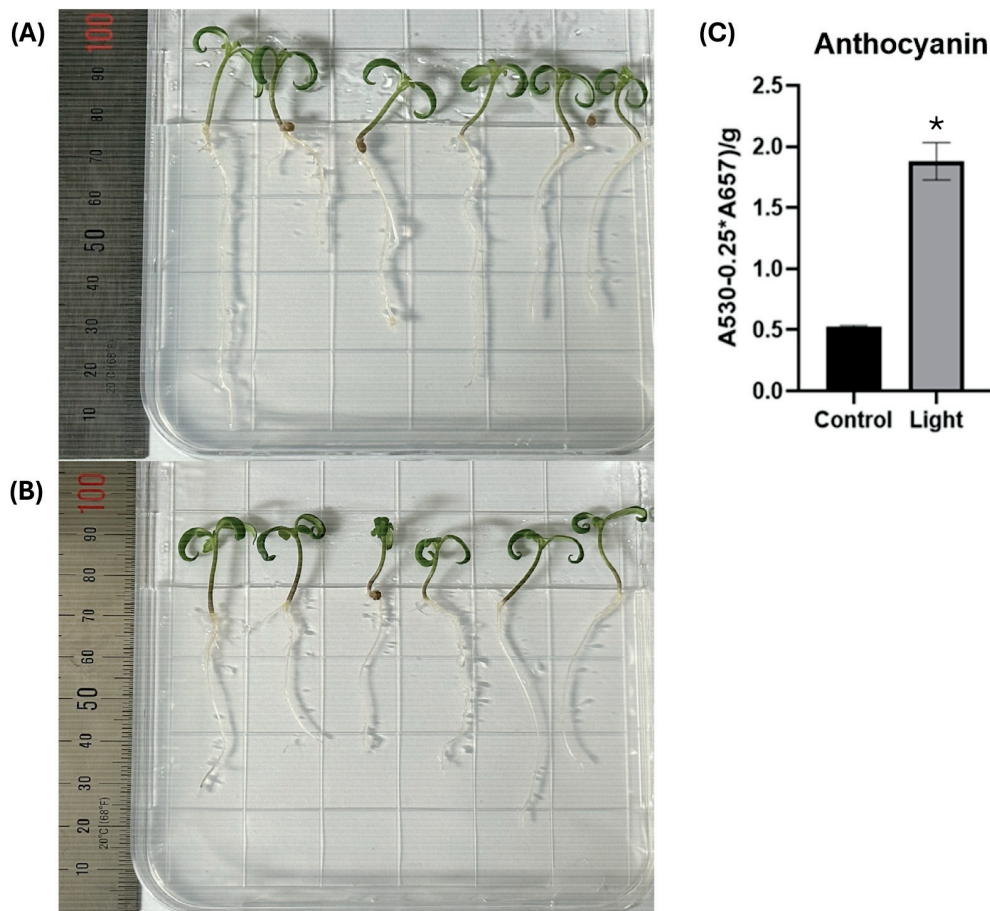


Fig. 4. Anthocyanin contents of tomato hypocotyls under light conditions: (A) Tomato seedlings in the dark treatment group, (B) Tomato seedlings in the light treatment group, (C) Anthocyanin content in tomato hypocotyls for each treatment group.

Hypocotyls were collected 4 pieces for each treatment. Anthocyanins were extracted from hypocotyls grown for 7 days under different light conditions. The quantified anthocyanin content was expressed per fresh weight of the hypocotyls. The treatment was performed in triplicate. Error bars represent the standard error.

가장 높은 발현을 보였다(Fig. 5C). 이는 달라진 주변의 광 환경에 의해 유도된 결과로 추측된다[48]. 특히 HY5는 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 유전자의 프로모터 부위에서 특정한 ACE-box에 결합하는 능력을 가지고 있어, R2R3-MYB 활성인자 뿐 아니라 안토시아닌 생합성 유전자의 발현을 직접적으로 증가시킬 수 있다고 알려져 있다[49]. 이러한 사실을 통해서 안토시아닌 생합성 유전자의 발현 증가에는 R2R3-MYB 인자뿐만 아니라 HY5도 기여했음을 추측할 수 있다. 그러나 ANS의 경우, 광 처리구는 암처리구보다 낮은 발현을 보였다(Fig. 5C). 안토시아닌을 축적하는 과일 중 하나인 딸기에서 백색광 처리를 수행했을 때, CHS, DFR을 포함한 안토시아닌 생합성 유전자의 발현 수준 증가가 관찰되었지만 ANS의 발현 수준은 낮았으며, 이는 본 연구 결과와 비슷한 경향으로 보인다[50]. 이러한 결과를 종합하면, 토마토가 달라진 광 환경을 인지하면 광수용체인 HY5가 활성화되어 R2R3-MYB 인자의 발현을 자극하게 되고, 이 전사인자들은 안토시아닌 생합성 유전자의 프로모터 부위에 결합하여 이들의 발현 수준을 증가시킴으로써 토마토의 안토시아닌 함량 증진을 유도할 수 있다[41,51]. 이 때 안토시아닌 생합성 유전자의 발현 증가에는 MYB 인자뿐만 아니라 HY5도 관여할 수 있다[21,49].

본 연구에서 관찰하고자 하는 질소 결핍, 인 결핍, 그리고 광 조사에 의한 안토시아닌 유전자의 발현은 토마토가 가지는 기본적인 안토시아닌 합성 조절 경로에 해당한다. 이러한 안토시아닌 합성 신호전달 경로는 토마토 외 다른 식물에서도 발견되는 조절 경로로써, 본 연구에서는 토마토에서 질소, 인 결핍 또는 광 변화에 대한 기본적인 안토시아닌 생합성 반응, 즉 조직 특이적이지 않은 반응을 확인하고자 하였다. 따라서 안토시아닌 생성 유무를 가장 빠르게 눈으로 확인 가능한 조직인 유묘의 하배축을 타깃으로 선택하였다. 본 논문에서는 식물체에 가해지는 환경 변화 중 생존에 필수적인 영양 상태와 빛 조건을 선택하였고 이들과 안토시아닌의 생합성 사이의 연관성을 토마토 유묘의 하배축에서 관찰함으로써 선택한 스트레스 조건 아래에서 토마토 유묘의

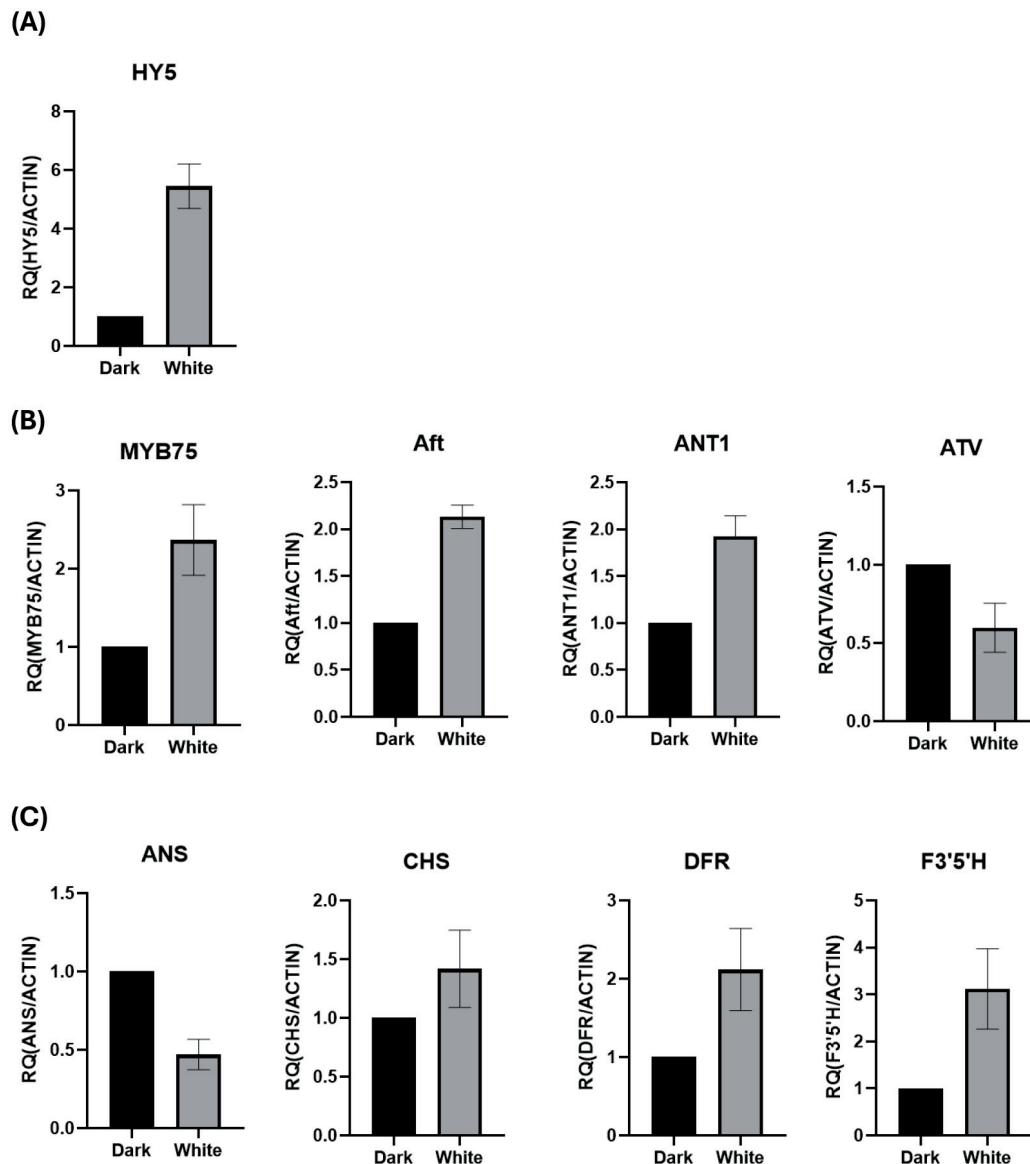


Fig. 5. Expression of anthocyanin synthesis genes in tomato hypocotyls under light treatment conditions: (A) Expression levels of HY5 under light treatment conditions, (B) Expression levels of MYB transcription factors under light treatment conditions, (C) Expression levels of anthocyanin biosynthesis genes under light treatment conditions.

The expression levels of each gene were normalized to the ACTIN gene. Dark refers to the complete darkness treatment, and White represents light treatment. The gene expression level under dark conditions was set to 1, and error bars represent the standard error.

안토시아닌 생합성과 관련한 경향성을 제시하고자 했다. 스트레스 조건의 토마토 유묘의 하배측으로부터 안토시아닌 생합성 유전자의 발현 수준을 정량했을 때, 무처리구에 비해 높은 발현 수준을 나타냈으며, 안토시아닌 함량도 증진되었다. 특히 광 처리에 의한 토마토의 안토시아닌 함량 증진에 비해 비교적 그 조절 경로가 덜 알려진 영양 결핍 조건 아래의 토마토에서 안토시아닌 함량 증진을 확인하고 유전자 발현 수준을 비교함으로써 각 스트레스에 대응하여 나타난 토마토의 안토시아닌 함량 증진에 대한 배경지식을 제공했다. 본 논문에서 선택한 2가지의 스트레스 조건 아래에서 토마토의 안토시아닌 생합성 경향을 도식화하여 Fig. 6에 나타냈다. 달라진 주변의 광 환경을 광수용체가 인지하면 광범위한 광수용체인 HY5가 R2R3-MYB 인자의 발현을 증가시켜 안토시아닌 생합성 증진을 유도할 수 있다[36,37,41,47]. 또한 질소 또는 인이 결핍된 조건은 영양소 수용체의 발현을 증가시키고 더불어 스트레스에 대응하기 위해 R2R3-MYB 인자의 발현을 증가시킬 수 있다[29,42,44,52]. R2R3-MYB 인자는 MBW 복합체를 형성하여 안토시아닌 생합성 증진을 유도할 수 있다. 또한 MBW 복합체는 억제인자인 R3-MYB Repressor의 발현을 자극하고, 억제인자들은 MBW 복합체의 발현을 억제함으로써 안토시아닌 생합성의 균형을 유지하게 된다[16,53]. 하지만

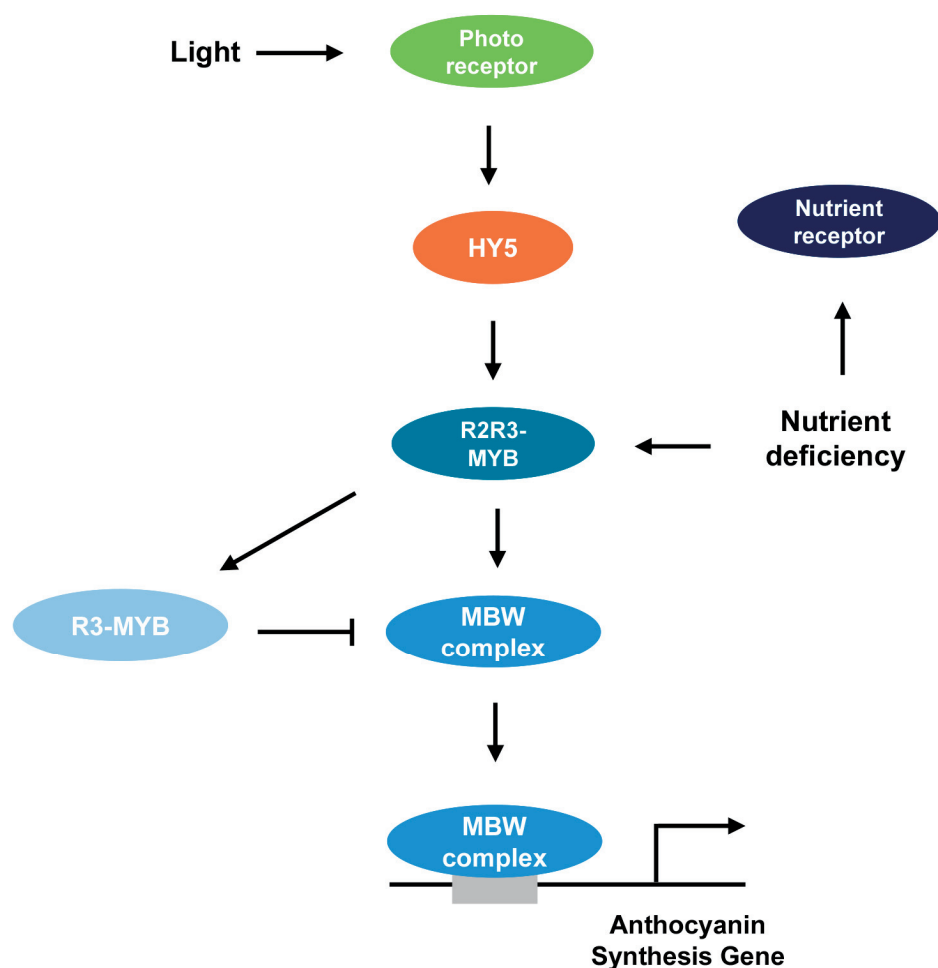


Fig. 6. Mechanism of MYB transcription factors under light treatment or nutrient deficiency conditions.

MYB transcription factors can promote anthocyanin biosynthesis in tomato under stress conditions. When the expression of R2R3-MYB factors increases under stress, they form MBW complexes, which bind to the promoter region of anthocyanin biosynthesis genes, inducing an increase in anthocyanin content. In addition, the MBW complex enhances the expression of R3-MYB repressors to regulate the balance of anthocyanin biosynthesis.

토마토의 어린 유묘는 매우 복잡한 안토시아닌 생합성 경로를 가지기 때문에 본 연구에서 관찰하지 않은 다른 시간대에서의 발현 수준에 대한 분석이 필요하다.

Data Availability: All data are available in the main text or in the Supplementary Information.

Author Contributions: SM conducted all the experiment and wrote the manuscript, YK designed and supervised the experiment.

Notes: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments: YK received funding from “Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development” of Rural Development Administration of Korea (RS-2024-00322437).

Additional Information:

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.5338/KJEA.2025.44.07>
Correspondence and requests for materials should be addressed to Yeongjong Koo.

Peer review information Korean Journal of Environmental Agriculture thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at <http://www.korseaj.org>

References

1. Rick CM (1980) Tomato. Hybridization of Crop Plants, 669-680. <https://doi.org/10.2135/1980.hybridizationofcrops.c48>.
2. Petro-Turza M (2009) Flavor of tomato and tomato products. Food Reviews International, 2(3), 309-351. <https://doi.org/10.1080/87559128609540802>.
3. Kumar KS, Paswan S, Srivastava S (2012) Tomato-a natural medicine and its health benefits. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 1(1), 33-43.
4. Lin BW, Gong CC, Song HF, Cui YY (2017) Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. British Journal of Pharmacology, 174(11), 1226-1243. <https://doi.org/10.1111/bph.13627>.
5. Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van De Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA (2002) The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. Free Radical Research, 36(2), 217-233. <https://doi.org/10.1080/10715760290006484>.
6. Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS (2013) The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12(5), 483-508. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12024>.
7. Hu DG, Sun CH, Ma QJ, You CX, Cheng LL, Hao YJ (2016) MdMYB1 regulates anthocyanin and malate accumulation by directly facilitating their transport into vacuoles in apples. Plant Physiology, 170(3), 1315-1330. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01333>.
8. Zhou H, Peng Q, Zhao JB, Owiti A, Ren F, Liao L, Wang L, Deng XB, Jiang Q et al. (2016) Multiple R2R3-MYB transcription factors involved in the regulation of anthocyanin accumulation in peach flower. Frontiers in Plant Science 7, 1557. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01557>.
9. Ravaglia D, Espley RV, Henry-Kirk RA, Andreotti C, Ziosi V, Hellens RP, Costa G, Allan AC (2013) Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors. BMC Plant Biology, 13, 68. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-68>.
10. Chen ZY, Yuan JW, Yao Y, Cao JH, Yang WJ, Long Y, Liu JX, Yang WY (2023) *PhAAT1*, encoding an anthocyanin acyltransferase, is transcriptionally regulated by PhAN2 in petunia. Physiologia Plantarum, 175(1), e13851. <https://doi.org/10.1111/ppl.13851>.
11. Byun J, Kim TG, Lee JH, Li N, Jung S, Kang BC (2022) Identification of *CaAN3* as a fruit-specific regulator of anthocyanin biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*). Theoretical and Applied Genetics, 135(7), 2197-2211. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04106-y>.
12. Zhi JJ, Liu XX, Li DJ, Huang YGM, Yan SS, Cao BH, Qiu ZK (2020) CRISPR/Cas9-mediated *SLAN2* mutants reveal various regulatory models of anthocyanin biosynthesis in tomato plant. Plant Cell Reports, 39, 799-809. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02531-1>.
13. Kiferle C, Fantini E, Bassolino L, Povero G, Spelt C, Buti S, Giuliano G, Quattrocchio F, Koes R et al. (2015) Tomato R2R3-MYB proteins *SLANT1* and *SLAN2*: Same protein activity, different roles. PLoS One, 10(8), e0136365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136365>.
14. Shin DH, Cho M, Choi MG, Das PK, Lee SK, Choi SB, Park YI (2015) Identification of genes that may regulate the expression of the transcription factor production of anthocyanin pigment 1 (PAP1)/MYB75 involved in *Arabidopsis* anthocyanin biosynthesis. Plant Cell Reports, 34, 805-815. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1743-7>.
15. Li N, Wu H, Ding QQ, Li HH, Li ZF, Ding J, Li Y (2018) The heterologous expression of *Arabidopsis* PAP2 induces anthocyanin accumulation and inhibits plant growth in tomato. Functional & Integrative Genomics, 18, 341-353. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0590-3>.
16. Sun C, Deng L, Du M, Zhao J, Chen Q, Huang T, Jiang H, Li CB, Li C (2020) A transcriptional network promotes anthocyanin biosynthesis in tomato flesh. Molecular Plant, 13(1), 42-58. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.10.010>.
17. Zimmermann IM, Heim MA, Weisshaar B, Uhrig JF (2004) Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. The Plant Journal, 40(1), 22-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02183.x>.
18. Xu W, Dubos C, Lepiniec L (2015) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. Trends in Plant Science, 20(3), 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.12.001>.
19. Yan H, Pei X, Zhang H, Li X, Zhang X, Zhao M, Chiang VL, Sederoff RR, Zhao X (2021) MYB-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis. International Journal of Molecular Sciences, 22(6), 3103. <https://doi.org/10.3390/ijms22063103>.
20. Hodges DM, Nozzolillo C (1996) Anthocyanin and anthocyanoplast content of cruciferous seedlings subjected to mineral nutrient deficiencies. Journal of Plant Physiology, 147(6), 749-754. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81488-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81488-4).
21. Zhou H, Lin-Wang K, Wang F, Espley RV, Ren F, Zhao J, Ogutu C, He H, Jiang Q et al. (2019) Activator-type R2R3-MYB genes induce a repressor-type R2R3-MYB gene to balance anthocyanin and proanthocyanidin accumulation. New Phytologist, 221(4), 1919-

1934. <https://doi.org/10.1111/nph.15486>.
22. Kim MJ, Kim P, Chen Y, Chen B, Yang J, Liu X, Kawabata S, Wang Y, Li Y (2021) Blue and UV-B light synergistically induce anthocyanin accumulation by co-activating nitrate reductase gene expression in Anthocyanin fruit (*Afi*) tomato. *Plant Biology*, 23(S1), 210-220. <https://doi.org/10.1111/plb.13141>.
 23. Dooner HK, Robbins TP, Jorgensen RA (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Review Genetics*, 25, 173-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.001133>.
 24. Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733-749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>.
 25. Chaves-Silva S, dos Santos AL, Chalfun A, Zhao J, Peres LEP, Benedito VA (2018) Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants - Tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 153, 11-27. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.013>.
 26. Alappat B, Alappat J (2020) Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics. *Molecules*, 25(23), <https://doi.org/10.3390/molecules25235500>.
 27. Zhang Y, Butelli E, Martin C (2014) Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 19, 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.011>.
 28. Eryilmaz F (2006) The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(1), 47-52. <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817303>.
 29. Khavari-Nejad RA, Najafi F, Tofighi C (2009) Diverse responses of tomato to N and P deficiency. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11, 209-213.
 30. León-Chan RG, Lightbourn-Rojas LA, López-Meyer M, Amarillas L, Heredia JB, Martínez-Bastidas TF, Villicaña C, León-Félix J (2020) Differential gene expression of anthocyanin biosynthetic genes under low temperature and Ultraviolet-B radiation in bell pepper (*Capsicum annuum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 23(3), 501-508. <https://doi.org/10.17957/Ijab/15.1315>.
 31. Napar WPF, Kaleri AR, Ahmed A, Nabi F, Sajid S, Cosic T, Yao YN, Liu JK, Raspor M et al. (2022) The anthocyanin-rich tomato genotype LA-1996 displays superior efficiency of mechanisms of tolerance to salinity and drought. *Journal of Plant Physiology*, 271, 153662. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153662>.
 32. Zhang Y, Butelli E, De Stefano R, Schoonbeek HJ, Magusin A, Pagliarani C, Wellner N, Hill L, Orzaez D et al. (2013) Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. *Current Biology*, 23(12), 1094-1100. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.072>.
 33. Shin YC, Yeon JY, Joo SH, Moon YE, Kim WS (2023) Effect of light quality on petal coloring in potted miniature roses. *Flower Research Journal*, 31(3), 173-181. <https://doi.org/10.11623/frj.2023.31.3.07>.
 34. Zhang Y, Xu S, Cheng Y, Peng Z, Han J (2018) Transcriptome profiling of anthocyanin-related genes reveals effects of light intensity on anthocyanin biosynthesis in red leaf lettuce. *PeerJ*, 6, e4607. <https://doi.org/10.7717/peerj.4607>.
 35. Chen M, Chory J (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology*, 21(11), 664-671. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.002>.
 36. Li QH, Yang HQ (2007) Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and Photobiology*, 83, 94-101. <https://doi.org/10.1562/2006-02-28-IR-826>.
 37. Huang X, Ouyang X, Yang P, Lau OS, Chen L, Wei N, Deng XW (2013) Conversion from CUL4-based COP1-SPA E3 apparatus to UVR8-COP1-SPA complexes underlies a distinct biochemical function of COP1 under UV-B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(41), 16669-16674. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316622110>.
 38. Ma Y, Ma X, Gao X, Wu W, Zhou B (2021) Light induced regulation pathway of anthocyanin biosynthesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11116. <https://doi.org/10.3390/ijms222011116>.
 39. Paik I, Huq E (2019) Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 92, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2019.03.007>.
 40. Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*, 405(6785), 462-466. <https://doi.org/10.1038/35013076>.
 41. Liu CC, Chi C, Jin LJ, Zhu J, Yu JQ, Zhou YH (2018) The bZip transcription factor HY5 mediates CRY1a-induced anthocyanin biosynthesis in tomato. *Plant, Cell Environment*, 41(8), 1762-1775. <https://doi.org/10.1111/pce.13171>.
 42. Koo Y, Poethig RS (2021) Expression pattern analysis of three R2R3-MYB transcription factors for the production of anthocyanin in different vegetative stages of *Arabidopsis* leaves. *Applied Biological Chemistry*, 64(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00584-0>.
 43. Sun X, Chen F, Yuan L, Mi G (2020) The physiological mechanism underlying root elongation in response to nitrogen deficiency in crop plants. *Planta*, 251, 84. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03376-4>.
 44. Truong HA, Lee WJ, Jeong CY, Trinh CS, Lee S, Kang CS, Cheong YK, Hong SW, Lee H (2018) Enhanced anthocyanin accumulation confers increased growth performance in plants under low nitrate and high salt stress conditions owing to active modulation of nitrate metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 231, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.015>.
 45. Yan S, Chen N, Huang Z, Li D, Zhi J, Yu B, Liu X, Cao B, Qiu Z (2020) *Anthocyanin Fruit* encodes an R2R3-MYB transcription

- factor, *SLAN2-like*, activating the transcription of *SLMYBATV* to fine-tune anthocyanin content in tomato fruit. *New Phytologist*, 225, 2048-2063. <https://doi.org/10.1111/nph.16272>.
46. Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 53, 814-827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03373.x>.
47. Shin DH, Choi M, Kim K, Bang G, Cho M, Choi SB, Choi G, Park YI (2013) HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 587, 1543-1547. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.03.037>
48. Zhang YJ, Li Y, Li WP, Hu ZL, Yu XH, Tu Y, Zhang M, Huang JY, Chen GP (2019) Metabolic and molecular analysis of nonuniform anthocyanin pigmentation in tomato fruit under high light. *Horticulture Research*, 6, 56. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0138-2>.
49. Wang WH, Wang PW, Li XJ, Wang YY, Tian SP, Qin GZ (2021) The transcription factor SIHY5 regulates the ripening of tomato fruit at both the transcriptional and translational levels. *Horticulture Research*, 8, 83. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00523-0>.
50. Zhang Y, Jiang L, Li Y, Chen Q, Ye Y, Zhang Y, Luo Y, Sun B, Wang X et al. (2018) Effect of red and blue light on anthocyanin accumulation and differential gene expression in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Molecules*, 23, <https://doi.org/10.3390/molecules230408200>
51. Li SN, Wang WY, Gao JL, Yin KQ, Wang R, Wang CC, Petersen M, Mundy J, Qiu JL (2016) MYB75 Phosphorylation by MPK4 is required for light-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 28, 2866-2883. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00130>.
52. Zhang Y, Wang Y, Wang E, Wu X, Zheng Q, Han Y, Lin W, Liu Z, Lin W (2021) SLPH1, a MYB-CC transcription factor identified from tomato, positively regulates the phosphate starvation response. *Physiologia Plantarum*, 173, 1063-1077. <https://doi.org/10.1111/ppl.13503>.
53. Menconi J, Perata P, Gonzali S (2024) In pursuit of purple: anthocyanin biosynthesis in fruits of the tomato clade. *Trends In Plant Science* 29, 589-604. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.12.010>.