

## Resveratrol synthase로 형질전환 된 지황의 페놀화합물 차이

\*강원대학교, \*\*건국대학교

이동욱\*, 김정대\*, 이재근\*, 김희영\*, 길현영\*, 정일민\*\*, 김재광\*, 김명조\*, 조동하\*,  
유창연\*

### Phenolic compound contents in *Rehmannia glutinosa* L. transformed with Resveratrol synthase

Kangwon National University, Konkuk University

Dong Wook Lee, Jung Dae Lim, Jae Geun Lee, Hee Young Kim, Hyun Young Kil, Il Min  
Chung, Jae Kwang Kim, Myoung Jo Kim, Dong Ha Cho, Chang-Yeon Yu

#### 실험목적

Phytoalexin으로 작용하는 polyketide의 일종인 Resveratrol을 합성하는 유전자인 resveratrol synthase로 형질전환 된 식물의 재해관련 물질의 함량을 분석하고, 작물학적 특성을 조사하여 식물체에서 축적되어지는 resveratrol에 의해 병저항성 획득 및 생육에 미치는 효과를 구명하고자 실시하였다.

#### 재료 및 방법

##### ○ 실험재료

병원균 : CBS (Fungal Biodiversity Center-Utrecht, The Netherlands)로부터 확인된 *Fusarium oxysporum*과 *Phytophthora infestane*을 사용, 근주의 포자를 100 ml 의 potato dextrose broth (PDB medium, Duchefa, The Netherlands)에 접종하고 7일 동안 배양 (150 rpm, 26°C)하였다. 최종 cell density  $10^6$  CFU/ml로 포자현탁액을 제조하여 Resveratrol synthase로 형질전환 된 지황(*Rehmannia glutinosa* (GAERTNER) LIBOSHITZ) 식물체 모든 line (AhRgRS3-1~11)과 형질전환 되지 않은 지황 식물체의 뿌리를 포자 현탁액에 30분 동안 접종한 후에 토양 이식하고 4주 후 병원성 검정을 수행하였다.

##### ○ 실험방법

① Resveratrol synthase로 형질전환 된 지황 식물체의 phenolic acid 정량분석  
지황의 뿌리와 잎의 건조시료를 분쇄하여(40-mesh) 2 g 평량 후, acetonitrile 10mL과 0.1N HCl 2mL을 넣고 실온에서 2시간 정치하였다. 여과(Whatman No. 42) 후 저온진공 냉동건조기로 건조시켜, 80% MeOH 10mL에 재용해시킨다. 0.45 $\mu$ m syringe filter로 여과하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

##### ② Phenolic acid HPLC 분석 조건

- HPLC system : Young-Lin M930 pump and M720 UV/vis detector
- 고정상 : YMC-Pack ODS AM-303 (4.6×250 mm I.D.)
- 이동상 A : 0.018M ammonium acetate in 98% Distilled water + 2% glacial acetic acid
- 이동상 B : 70% solvent A + 30% organic solvent(82% MeOH + 16% butanol + 2% glacial acetic acid)

주저자 연락처 : 유창연

E-mail : cyyu@kangwon.ac.kr

Tel : 033-250-6411

- Flow rate : 1.0 mL/min
- Injection volume : 20  $\mu$ L
- Wave length : 280 nm
- Gradient program : 90% A solvent부터 0% A solvent로 설정

③ 16가지 Phenolic acid standard 회귀곡선

16가지 phenolic acid standard를 각각 1ppm, 50ppm, 100ppm의 일정한 비율로 희석하여 HPLC 분석 후 농도와 면적을 이용해 회귀곡선을 구했다(표 2).

④ 시료의 정량

표 2의 회귀식을 이용해 면적을 y에 대입해 농도(x)를 구한다음, 단위를  $\mu$ g/g으로 환산하여 phenolic acids의 함량을 정량하였다.

결과 및 고찰

Table 4. Distribution of 16 phenolic compounds in control and transgenic plant transformed by resveratrol synthase in *R. glutinosa* under infected pathogen.

<*Fusarium oxysporum*>

Lines		Hyd <sup>1)</sup>	Chl <sup>2)</sup>	Cat <sup>3)</sup>	Caf <sup>4)</sup>	Syr <sup>5)</sup>	Sal <sup>6)</sup>	Cou <sup>7)</sup>	Fer <sup>8)</sup>	Hes <sup>9)</sup>	Nar <sup>10)</sup>	Hyr <sup>11)</sup>	Cin <sup>12)</sup>	Que <sup>13)</sup>	Nan <sup>14)</sup>	Tot <sup>15)</sup>
..... $\mu$ g g <sup>-1</sup> .....																
CON	S	7.08	5.75	0.00	0.00	0.00	0.25	0.25	22.80	0.00	293.04	26.14	0.00	0.00	22.11	364.58
	R	21.40	14.28	0.00	9.82	0.00	7.78	5.73	12.53	0.00	0.00	33.23	94.47	17.66	0.00	181.20
RS1	S	27.98	39.58	2.57	0.00	53.45	22.22	28.97	195.60	0.00	195.35	56.84	0.00	0.00	0.00	555.00
	R	8.97	10.64	0.00	0.00	21.45	0.00	10.21	6.93	0.00	3.35	33.91	211.40	20.16	0.00	318.05
RS2	S	35.27	78.80	1.18	0.25	60.42	240.91	38.61	137.36	15.97	245.74	38.84	6.87	0.00	133.01	919.16
	R	0.00	0.00	0.00	0.00	36.84	0.00	9.04	4.25	8.37	0.00	8.35	223.25	22.58	0.00	312.70
RS3	S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	153.91	353.55	25.04	97.34	47.42	0.00	0.00	0.00	677.26
	R	30.54	14.61	0.00	7.01	0.00	6.02	46.33	21.62	9.93	0.00	26.56	464.94	19.70	0.00	602.11
RS5	S	20.74	86.73	3.40	5.95	19.54	7.54	112.92	83.17	95.58	77.56	54.95	0.00	0.00	0.00	460.61
	R	17.48	2.19	0.00	5.69	0.00	0.00	15.52	9.37	0.00	0.00	4.66	158.44	11.34	0.00	205.01
RS6	S	38.02	80.25	0.00	0.00	38.97	4.21	21.70	168.66	213.12	0.25	0.25	0.00	0.00	0.00	447.17
	R	7.12	2.89	97.39	0.00	30.90	7.39	15.46	2.94	0.00	0.00	0.00	19.16	8.41	0.00	181.66
RS7	S	22.77	90.94	9.91	0.00	69.06	130.52	38.34	117.33	174.47	102.10	23.27	0.25	10.56	0.00	675.82
	R	14.24	5.78	194.79	0.00	61.80	14.78	30.91	5.88	0.00	0.00	0.00	38.33	16.83	0.00	363.31
RS8	S	38.10	97.31	0.00	0.50	70.47	52.84	120.52	231.82	225.45	130.01	74.28	0.00	0.00	0.00	905.88
	R	2.21	4.36	0.00	0.00	7.09	0.00	2.90	2.59	7.71	0.00	28.18	28.80	27.36	0.00	111.21
RS9	S	18.93	39.06	5.43	0.25	26.18	40.57	22.54	107.85	72.94	48.27	71.20	0.00	0.00	0.00	395.22
	R	4.00	3.52	0.00	3.92	0.47	52.60	1.20	2.64	2.14	0.00	31.82	16.80	27.10	0.00	146.20
RS11	S	10.23	44.22	0.00	0.50	34.01	24.07	0.50	48.12	44.27	54.86	33.81	0.00	0.00	0.00	240.15
	R	42.63	23.48	2.85	20.04	6.44	6.91	23.66	26.82	12.56	0.00	0.00	266.92	0.00	0.00	366.18
CGST	S	12.11	69.06	0.00	0.50	23.09	33.45	71.57	76.61	60.05	117.17	9.21	79.52	0.00	0.00	471.46
	R	51.16	13.78	0.00	16.86	36.59	5.35	56.30	34.69	11.84	0.00	4.63	319.08	16.50	0.00	501.85
TGST	S	19.25	72.25	4.70	0.50	41.28	73.17	83.72	112.93	124.14	95.40	52.10	0.00	0.00	0.00	587.95
	R	54.49	22.05	9.52	29.40	8.52	4.29	109.46	57.02	27.93	0.00	5.50	201.19	24.84	0.00	477.66

S: Shoot, R: Root, Hyd<sup>1)</sup>: *p*-Hydroxybenzoic acid, Chl<sup>2)</sup>: Chlorogenic acid, Cat<sup>3)</sup>: Catechin Caf<sup>4)</sup>: Caffeic acid, Syr<sup>5)</sup>: Syringic acid, Sal<sup>6)</sup>: Salicylic acid, Cou<sup>7)</sup>: *p*-Coumaric acid, Fer<sup>8)</sup>: Ferulic acid, Hes<sup>9)</sup>: Hesperidin, Nar<sup>10)</sup>: Narigin, Hyr<sup>11)</sup>: Hyricetin, Cin<sup>12)</sup>: *trans*-cinnamic acid, Que<sup>13)</sup>: Quercetin, Nan<sup>14)</sup>: Narigenin, Tot<sup>15)</sup>: Total

Resveratrol synthase로 형질전환 된 지황 식물체의 병원균인 *Fusarium*과 *phytophthora*를 감염시키고 이에 따른 phenolic acid 함량을 분석하였다. 지상부와 지하부를 나누어 total phenolic compound의 함량을 비교하여 보면 지상부는 Resveratrol synthase로 형질전환 된 지황 식물체가 control 보다 phenolic compound가 높은 수준으로 검출되었으며 root의 경우는 오히려 감소하는 것으로 나타났다.