

역새 EST 정보 유래 전사요소 WRKY의 난지형 잔디의 저온 발현 반응성

정성진 · 최영인 · 이금주*

충남대학교 원예학과

Miscanthus EST-originated Transcription Factor WRKY Expression in Response to Low Temperature in Warm-season Turfgrasses

Sung Jin Chung, Young In Choi, and Geung-Joo Lee*

Dept. of Horticultural Science, Chungnam Nat'l Univ., Daejeon 305-764, Korea

(Received on November 09, 2013; Revised on December 08, 2013; Accepted on December 09, 2013)

ABSTRACT. Whole genome transcriptomes from *Miscanthus* species were sequenced and analyzed, which provided 50 different types of transcription factor (TF) involving various developmental processes or environmental stresses. Among the explored TF, WRKY gene family was the major type and one of the WRKY genes, *MSIR7180_WRKY4*, induced under low temperature environment was selected to investigate how the *Miscanthus*-originated *MSIR7180_WRKY4* TF responds when exposed to low temperature in four warm-season turfgrasses (*Z. matrella* 'Semil', bermudagrass, St. Augustinegrass, and seashore paspalum). The *MSIR7180_WRKY4* was expressed higher during low temperature period in Bermudagrass, but the expression was enhanced in St. Augustinegrass. In contrast, the gene in 'Semil' cultivar was barely expressed and relatively less expressed, but repressed gradually in seashore paspalum, which seems to allow two turfgrasses stay-green longer in the fall season. The results indicate that bermudagrass and St. Augustinegrass adapt to low temperature quickly, but relative tolerance to low or cold temperature at the molecular level needs to be further investigated at different physiological stages and the corresponding genes systematically.

Key words: DNA-binding protein, Low temperature stress, Reverse-transcript PCR, Transcriptional control, WRKY family gene

서 론

전사요소(transcription factor; TF)는 특이한 염기서열을 가지고 있는 DNA 결합 단백질로 특정 유전자가 mRNA로 전사되는 과정중 유전자의 프로모터 부위에서 작용을 촉진 또는 방해함으로써 식물체의 발달 또는 여러 환경 요인에 대한 반응을 조절하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Chen et al., 2012; Latchman, 1997). 진핵생물의 경우 전사요소들은 전체 게놈의 약 7%를 차지하는 것으로 알려져 있으며 하나의 전사요소들은 유사 또는 특이한 기능을 가진 여러 개의 유전자 군(gene family)으로 존재하

고 있으며, 진화과정에서 여러 생물종 특히 식물종에서 잘 보존되어 있는 것으로 보고되고 있다(Wang et al., 2010).

이제까지 알려진 여러 전사요소들은 각각 특이성 있는 기능을 보이고 있는 것으로 알려졌다. 전사요소 bZip는 생물학적 및 비생물학적 신호작용 또는 발달단계에 관여하는데 특히 ABA (abscisic acid)에 반응하는 유전자들의 전사작용을 촉진하는 것으로 보고 되었다(Jakoby et al., 2002). 또 다른 커다란 식물 전사요소 유전자군에 속하는 Myb은 UV 광, 상처, 혐기성 스트레스, 생물 및 비생물적 스트레스에 반응하는 것으로 보고되고 있다(Cai et al., 2011; Dubos et al., 2010). WRKY 전사요소군 역시 식물체 전사조절에서 매우 독특한 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Chen et al., 2012). 특히 전사조절 유전자들 중에는 식물이 생육 적온보다 낮은 온도에서의 냉해 또는 빙점에 가까운 온도에서 동해피해를 대비하여 식물의 생리적 및

*Corresponding author:

Phone) +82-42-821-5734, Fax) +82-42-823-1382

E-mail) gjlee@cnu.ac.kr

대사적 조절작용에 관여하는 것들이 다수 알려져 있다 (Chen et al., 2012; Tang et al., 2005). 이들은 공통적으로 생육 적은 범위를 벗어나 냉해 또는 동해를 유발할 수 있는 환경조건에서 그 발현량이 증가되어 하부 조절작용에 관여하는 여러 유전자들과 결합하여 그 기능을 향상 또는 억제시킴으로써 식물체의 적응력을 높이는 작용을 한다 (Gao et al., 2002; Qin et al., 2004).

난지형 잔디는 27-35°C의 온도 범위에서 원활한 생육을 보이는 것으로 알려졌지만 종 또는 품종간에도 온도에 대한 적응력 차이를 보이고 있고, 특히 St. Augustinegrass는 저온내성이 아주 낮고, seashore paspalum과 bermudagrass가 중간정도, 그리고 상대적으로 한국 들잔디가 높은 것으로 알려졌다(Duncan and Carrow, 2000). 하지만 이들 난지형 잔디에서 저온 반응성과 관련한 유전정보는 다른 식량작물들에 비하여 미약한 편이고 최근의 차세대 염기서열 정보를 활용한다면 실제 유전체 정보가 상대적으로 미흡한 잔디에서 유용한 유전정보를 활용할 수 있을 것으로 기대된다(Duncan and Carrow, 1999). 실제로 최근의 비교 유전체 연구를 통해서 유전체 구조가 복잡하거나 유전자 기능이 잘 알려져 있지 않은 잔디에서 기존 모델식물에서 밝혀진 저온내성 유전자 종류, 전사조절 기작 및 유전자 기능들을 활용하는 사례는 많이 보고되고 있다(Takuhara et al, 2011; Thomashow, 2010).

난지형 잔디와 같이 저온 휴면형 식물체는 가을철 온도 하강과 함께 잎의 노화가 일어나고 녹기연장형(stay-green type)은 노화의 시작, 노화속도의 지연, 그리고 엽록소 분해 정도에 따라서 4가지 유형으로 분류되고 있다(Kusaba et al., 2013). 식물체가 저온에 노출되었을 때 이러한 노화 또는 엽록소의 변화는 많은 유전자의 발현차이와 이들 유전자 조절 전사요소들이 관여하는 것으로 나타났다. 식물 발달단계에 따라 발현하는 전사요소 중에는 식물체의 노화시기를 결정하는데 관여하고 있어 이들 전사조절 유전자의 기능이 상실됨에 따라 식물체 잎의 녹색연장이 가능하다는 것을 실험적으로 증명하기도 하였다(Kusaba et al., 2013).

본 연구의 목적은 역세 전사체 분석을 통하여 얻어진 전사조절 유전자 중에서 저온에 관여하는 유전자를 분리하고, 다른 작물에서의 기능을 근거로 저온에서 발현이 증가하는 유전자를 중심으로 난지형 잔디에서의 저온 반응성을 비교하는 것이다. 이를 위해서 먼저 타겟 전사조절 유전자의 유전정보를 확보하고 다른 작물과의 상동성을 비교하여 특성을 검증할 것이다. 또한 식물 종간에 비교적 잘 보존된 DNA 영역에서 프라이머 디자인을 한 뒤 저온 반응성이 다른 난지형 잔디를 저온에 노출시켜 시간에 따라 저온 반응 유전자의 변화를 조사하여 저온 적응성,

내한성 그리고 녹기지연 특성간의 관련성을 알아보려고 한다.

재료 및 방법

식물체 재료 및 저온처리

본 연구에 이용된 식물체는 충남대학교에서 수집 또는 분양받아 보관중인 난지형 잔디 4종 [한국 금잔디 교배종 '세밀'(단국대 분양품종, *Zoysia matrella*), bermudagrass (국내 수집종, *Cynodon dactylon*), St. Augustinegrass (미국 조지아대학교 분양, *Stenotaphrum secundatum*), seashore paspalum (미국 조지아대학교 분양, *Paspalum vaginatum*)]을 이용하여 실시하였다. 종자를 이용하여 번식시킨 Seashore paspalum을 제외하고는 영양체를 이용하여 증식하였고, 유리온실 조건에서 15 cm 직경의 화분에서 4개월 이상 생육시켜 충분히 자란 식물체를 이용하였다. 온실의 화분에서 생육중에 있던 상기 4종의 잔디로부터 RNA 추출을 위하여 잎을 샘플링한 뒤 10°C로 맞추어진 생육상(16 및 8 시간 명기와 암기)에 옮긴 후 1, 3 그리고 5 일차에 같은 방법으로 잎 조직으로부터 유전자 발현을 위한 RNA를 추출하였다. 모든 잎 샘플은 액체 질소에 곧바로 동결한 뒤 막자사발을 이용하여 신속하게 분쇄한 후 RNA 분석에 이용하였고 남은 조직은 모두 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하였다.

역세 전사요소의 탐색과 출현빈도

본 연구에 이용된 전사요소는 잔디와 같이 화분과 작물의 하나인 역세 EST (Expressed Sequence Tag)에서 유래하였다(Kim et al., 2013). 참역세 (*Miscanthus sinensis*)와 물역세(*M. sacchariflorus*) 2종의 잎과 지하경(rhizome)으로부터 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Seoul, Korea)을 이용하여 총 RNA를 추출한 뒤 SuperScript II (Life Technologies, Carlsbad, CA)로 cDNA를 합성하였고, Roche GS-FLX 454 염기서열 분석기(Roche, Brandford, CT)를 이용하여 염기서열 정보를 확보하였다. 총 4개의 역세 EST 집단(2개 역세로부터 각각 잎과 지하경 조직)에서 확보된 DNA 단편 조각들은 GS de novo assembler (version 2.6)를 이용하여 유전자의 기능분석을 위한 길다란 contig들로 재조합하였다.

GS-FLX 염기서열 분석장치를 활용한 NGS 분석을 통해 확보한 역세 잎과 지하경의 EST 데이터는 데이터베이스 검색(<http://www.phytozome.net/>)을 통해 애기장대와 벼에서 밝혀진 유전자를 기초로 역세 EST 염기서열에 대한 annotation을 수행하였다. 역세 전사조절 요소 분석은 Jin et al. (2013)이 개발한 Plant Transcription Factor Database v3.0 (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>)에 있는 데이터 베이스

Table 1. List of the identified transcription factors from two *Miscanthus* species.

Transcription factor family	No. of isotig ^a				Total	%
	MSA leaf	MSA rhizome	MSI leaf	MSI rhizome		
WRKY	55	48	83	40	226	9.6
ERF	43	66	54	49	212	9.0
bZIP	30	25	93	31	179	7.6
MYB_related	58	51	32	20	161	6.8
NAC	40	32	56	28	156	6.6
MYB	25	39	40	34	138	5.9
bHLH	36	30	43	11	120	5.1
C2H2	38	21	27	26	112	4.8
ARF	18	31	23	21	93	3.9
TALE	9	20	22	25	76	3.2
GRAS	16	17	25	17	75	3.2
HSF	8	17	18	27	70	3.0
HD-ZIP	9	22	11	17	59	2.5
GATA	11	13	11	16	51	2.2
C3H	22	8	9	10	49	2.1
CO-like	14	5	18	7	44	1.9
CAMTA	4	10	20	9	43	1.8
Dof	6	15	10	7	38	1.6
MIKC	9	8	11	10	38	1.6
DBB	14	6	9	4	33	1.4
Trihelix	6	11	8	8	33	1.4
G2-like	7	9	10	6	32	1.4
SBP	4	7	5	10	26	1.1
ARR	7	6	6	6	25	1.1
B3	3	5	9	6	23	1.0
LBD	-	7	6	9	22	0.9
NF-YA	3	5	4	6	18	0.8
HB-other	2	3	6	6	17	0.7
EIL	5	2	7	2	16	0.7
NF-YC	4	3	5	3	15	0.6
Nin-like	4	3	7	1	15	0.6
RAV	7	-	5	2	14	0.6
HB-PHD	3	3	5	2	13	0.6
BES1	2	3	3	3	11	0.5
GRF	1	1	4	5	11	0.5
FAR1	2	1	4	3	10	0.4
NF-YB	1	2	3	4	10	0.4
TCP	3	4	2	-	9	0.4
AP2	4	1	2	1	8	0.3
BBR/BPC	-	3	1	3	7	0.3
GeBP	1	2	3	1	7	0.3
NF-X1	4	-	2	-	6	0.3
S1Fa-like	1	1	1	1	4	0.2
SRS	1	-	1	2	4	0.2
Whirly	-	1	2	1	4	0.2
CPP	-	2	-	1	3	0.1
ZF-HD	1	1	1	-	3	0.1
VOZ	-	1	-	1	2	0.1
E2F/DP	-	-	-	1	1	0.04
YABBY	-	-	1	-	1	0.04

^aMSA: *M. sacchariflorus*, MSI: *M. sinensis*.

를 기초로 수행하였다.

난지형 잔디의 WRKY 전사요소의 분석

역세 전사요소를 분석한 결과 WRKY family가 참억새와 물억새 잎과 줄기에서 발견되는 모든 종류 중 가장 높은 빈도로 출현(9.59%)하였고, 저온 스트레스에서 식물의 방어기작에 관여한다는 사실을 근거로 본 연구에서는 여러 난지형 잔디의 저온 반응의 차이를 알아보기 위하여 WRKY 전사요소를 대상으로 분석하게 되었다.

잔디 WRKY 유전자의 염기서열은 역세 transcription 분석을 통해 얻어진 EST 데이터로부터 plant TF DB(<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>)에 있는 데이터를 기초로 약 230여개의 WRKY family와 상동성을 보이는 isotig로부터 확보하였다. 그 중 약 80여개의 isotig가 저온에 반응하는 WRKY family와 높은 상동성을 보이는 것으로 확인되었다. 80여개의 역세 isotig에서 얻어진 염기서열 정보들은 BLASTN을 이용하여 NCBI database에서 검색된 자료들과 비교 분석하였고 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)를 이용하여 여러 식물체에서 공통적으로 나타나는 염기서열을 기초로 degenerate primer를 디자인하였다(Table 3).

NCBI database에서 확보한 여러 식물체의 WRKY family 유사도 분석과 phylogenetic tree는 BioEdit 소프트웨어 (V.7.0.9.0, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit>)와 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 소프트웨어(v.5.2, <http://www.megasoftware.net>) (Tamura et al., 2011)를 이용하여 neighbor-joining methods으로 작성하였다(Saitou and Nei, 1987).

WRKY 전사요소의 잔디 저온 반응성 분석

저온(10°C)에서 잔디 WRKY 전사요소의 발현양상을 알아보기 위하여 4종의 잔디 잎(100 mg)으로부터 Hybrid R (Geneall, Seoul, Korea)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 흡광도계를 이용하여 정량하여 냉동고(-80°C)에 보관하여 사용하였다. RT (reverse transcription) PCR은 Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 제조사 사용방법을 따라 실시하였고, NCBI에 공개되어 있는 한국잔디(*Zoysia japonica*) beta-actin (GU290545, 1134bp)을 기준으로 참억새와 물억새 잎 또는 지하부 조직으로부터 탐색된 저온반응 WRKY 전사요소(MSAL314_WRKY33, MSAL1702_WRKY33, MSIR7180_WRKY4)의 상대적인 발현차이를 조사하였다(Table 3). 발현량을 조사하기 위한 들잔디 Actin 유전자의 프라이머는 Actin_F: 5'-ATG GCT GAC GGT GAG GAT ATC-3', Actin_R: 5-TTA GAA GCA TTT CCG GTG

Table 2. *Miscanthus* WRKY transcription factors responding to low temperature and their corresponding homologous genes from *Arabidopsis*, rice and sorghum.

Miscanthus isotig No. ^a	<i>A. thaliana</i> ID	<i>O. sativa</i> ID	<i>S. bicolor</i> ID	Gene annotation ^b	
				<i>Arabidopsis</i>	rice
MSAL_isotig00314	AT2G38470.1	Os05g27730.1	Sb09g015900.1	<i>AtWRKY33</i>	<i>OsWRKY53</i>
MSAL_isotig01702	AT2G38470.1	Os01g61080.1	Sb03g038510.1	<i>AtWRKY33</i>	<i>OsWRKY24</i>
MSAL_isotig01948	AT4G23810.1	Os09g16510.1	Sb02g022290.1	<i>AtWRKY53</i>	<i>OsWRKY74</i>
MSAL_isotig04544	AT4G26640.2	Os07g39480.1	Sb02g037660.1	<i>AtWRKY20</i>	<i>OsWRKY78</i>
MSAL_isotig05174	AT2G46400.1	Os09g16510.1	Sb02g022280.1	<i>AtWRKY46</i>	<i>OsWRKY74</i>
MSAR_isotig05845	AT4G39410.1	Os01g08710.1	Sb03g003640.1	<i>AtWRKY13</i>	<i>OsWRKY79</i>
MSIR_isotig07180	AT1G13960.1	Os08g17400.1	Sb07g016330.1	<i>AtWRKY4</i>	<i>OsWRKY</i>

^aMSAL: Leaf of *M. sacchariflorus*, MSAR: rhizome of *M. sacchariflorus*, MSIR: rhizome of *M. sinensis*.

^bGenes in bold letter were induced in response to low temperature in *Arabidopsis* or rice.

AAC-3으로 디자인하였다. 잔디 Actin 유전자의 증폭은 우선 94°C에서 5분간 DNA 가닥의 변성, 이어 25회에 걸쳐 변성(94°C에서 30초)-결합(53°C에서 30초)-신장(72°C에서 1분 10초)을 반복한 뒤 마지막으로 72°C에서 7분간 안정화 과정을 거쳐 중합반응을 완료했다. 잔디의 저온반응성을 알아보기 위하여 사용된 MSIR7180_WRKY4 전사요소의 연쇄중합반응은 94에서 5분간 DNA 가닥의 변성, 이어 25회에 걸쳐 변성(94°C에서 30초)-결합(55°C에서 30초)-신장(72°C에서 1분)을 반복한 뒤 마지막으로 72°C에서 7분간 안정화시켜 완료했다.

결과 및 고찰

전사요소는 유전자의 전사작용, 발생의 조절, 세포간 신호전달, 환경에 대한 식물의 반응, 그리고 세포주기의 조절에 필요한 유전자의 발현을 조절하는 중요한 기능을 수행한다(Chen et al., 2012; Latchman, 1997). 따라서 식물의 발달 단계 또는 환경의 변화는 이를 감지하는 신호로 변환되어 하부 관련 유전자의 작용으로 이어지는데 전사 조절 요소들은 이 과정에서 전사 개시 전과 후에 타겟 유전자와 결합하여 유전자 발현을 유도(induction) 또는 억제(repression)하게 된다. 본 연구에서는 역세의 잎과 지하경 조직으로부터 확보한 4개의 역세 EST 라이브러리로부터 유전자 전사요소 전체를 탐색하여 그 중 생육 적온보다 낮은 저온에 반응하는 전사조절 요소를 조사하고 난지형 잔디에서 반응차이를 알아보는 것을 목적으로 하였다.

난지형 잔디는 많은 유용한 특성을 가지고 있어 우리나라에서는 매우 중요한 지피 또는 조경소재로 이용되고 있다. 특히 골프장과 같은 대규모 이용지역에서는 이른 봄철 지온 상승에 따른 지상부의 출현 시기와 기온의 하강

에 따른 지상부의 휴면돌입 시기가 잔디의 활용빈도에 직접 관련이 있기 때문에 최근 녹색기간이 연장된 새로운 품종에 대한 요구가 높아지고 있다(Chang and Kim, 1986). 휴면의 돌입은 결국 지상부 잎의 노화와 관련이 있고 이에 따라 최근 분자수준에서 잎의 녹색지속 식물형을 Type A에서 Type E까지 5개 그룹으로 분류하여 보고하고 있다(Kusaba et al., 2013).

분석결과 탐색된 전사조절 요소의 종류는 총 50 종류로 나타났고, 그 중 WRKY family 전사요소와 관련 있는 isotig가 226개로 가장 많이 발견되었고(9.6%), 다음으로 ERF 전사요소와 관련 있는 isotig가 212개(9.0%), bZIP 전사요소와 관련 있는 isotig가 179개(7.6%), Myb-related 전사요소와 관련 있는 isotig가 161개(6.8%), 그리고 NAC 전사요소와 관련 있는 isotig가 156개(6.6%)순으로 상위 5종류에 포함되었다(Table 1).

역세 종류 및 조직별 전사요소의 분포를 보면 물억새는 앞에서 MYB_related 유전자가 가장 많았고(10.6%) WRKY(10.1%)와 ERF(7.9%) 유전자가 그 다음 순으로 EST isotig와 관련 되었고, 지하경의 경우 ERF(11.5%), MYB_related(8.9%), 그리고 WRKY(8.3%) 순으로 분포하였다. 참억새 잎의 경우는 bZIP(12.7%) 유전자가 가장 많았고 WRKY(11.4%), NAC(7.7%)순으로 분포하였으며, 지하경에서는 ERF(9.7%), WRKY(7.9%) 그리고 MYB(6.7%)순으로 높게 나타났다. 역세의 조직별로는 CPP와 VOZ 유전자는 지하경에서만 관찰되었으며, NF-X1은 반대로 잎에서만 관찰되었다. 역세의 종류에 따라 E2F/DP는 참억새의 지하경에서, YABBY는 참억새의 잎에서만 관찰되는 것을 알 수 있었고, 물억새 잎과 지하경에서만 관찰되는 유전자는 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 전사요소는 식물 종 또는 조직 특이적으로 유전자 발

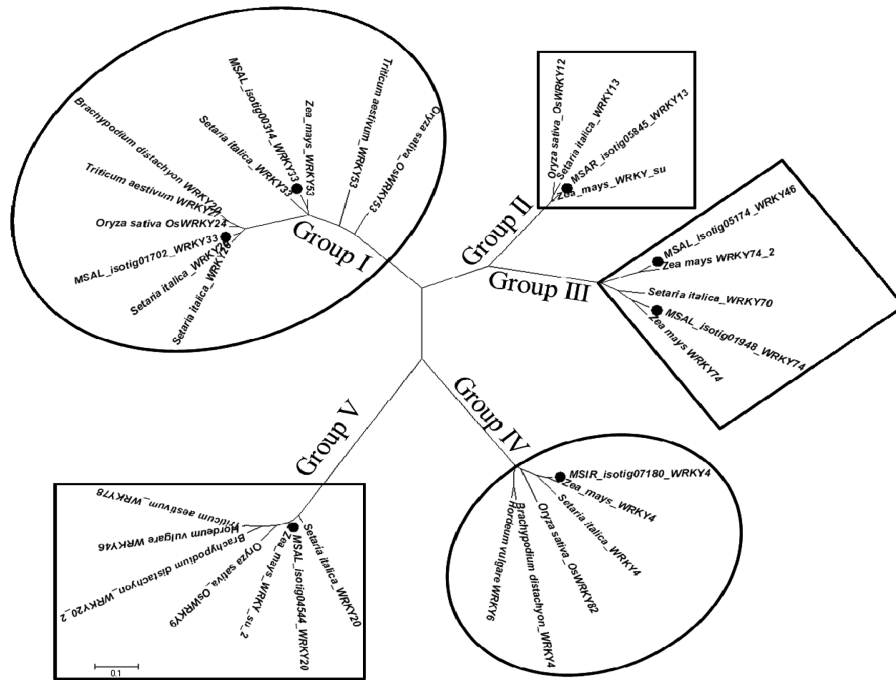


Fig. 1. Five phylogenetic groups (group I to V) of *Miscanthus* cold-responding *WRKY* isotigs with relation to other *WRKY* proteins from different plant species. Each *Miscanthus* isotig was shown with a dot and the *WRKY* number at the end of the isotig depicts *Arabidopsis* gene. The *WRKY* families in the group I and IV in circles were reported to be induced, but those in the group II, III and V in squares were repressed in response to cold treatment (Rushton et al., 2010).

현 조절기능이 다르다는 것을 알 수 있었다. 기존의 발표 결과에서도 동일한 전사조절 유전자(예, *WRKY*, *CBF*) family가 식물 종에 따라 1~197개까지 다양하게 발견된다고 하였고, 잎, 줄기, 종자 또는 꽃 등 발현되는 조직도 달랐으며, 저온 스트레스를 받았을 때 조직 별로 발현차이가 있다는 사실이 보고되고 있다(Rushton et al., 2010; Takuhara et al., 2011).

발견된 전사조절 유전자 중에서 제일 많이 발견된 것은 *WRKY* 전사요소였고, 따라서 본 연구에서는 역대 *WRKY* family를 애기장대, 벼 그리고 수수에서 기능이 밝혀진 *WRKY* 유전자들과 비교 검색한 결과 약 80개의 역대 isotig가 저온에 반응하여 발현이 유도 또는 억제되는 것으로 나타났고, 이들은 또한 저온 또는 다른 비생물적 스트레스 환경에서 자란 타 작물의 *WRKY* 유전자들과 매우 높은 상동성을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Rushton et al., 2010). 탐색된 80개의 역대 isotig 중 염기서열 길이가 가장 길고 상동성이 가장 높은 것(e-value 기준)으로 확인된 7개의 역대 isotig를 얻을 수 있었고 애기장대와 벼에서 저온에 대한 반응성을 기초로 상동성이 높은 유전자를 찾을 수 있었다(Table 2). 애기장대의 경우 *AtWRKY4*와 *AtWRKY33*은 저온 스트레스에서 발현이 증가되는 것으로 보고되어 있으나 *AtWRKY25*는 저온 스트레스에 대한 저항성의 증가

및 감소 현상이 동시에 일어난다고 알려져 있다(Rushton et al., 2010). 벼의 경우는 *OsWRKY79*만 저온에서 발현이 증가하고 다른 *WRKY* family (*OsWRKY Y26*, *OsWRKY39*, *OsWRKY45*, *OsWRKY50*, *OsWRKY51*, *OsWRKY55*, *OsWRKY62*, *OsWRKY66*, *OsWRKY67*, *OsWRKY68*, *OsWRKY74*, *OsWRKY78*, *OsWRKY93*)는 억제된다고 보고되고 있다(Rushton et al., 2010).

계속해서 이들 7개 isotig들의 염기서열 정보들을 BLASTN을 이용하여 NCBI database에 등록된 다른 유전자들의 염기서열과 비교하였고 여기서 확보한 염기서열들은 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>)를 이용하여 여러 식물체(*Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*)의 염기서열 정보와 유사도 분석을 위한 alignment를 수행한 결과 5개의 그룹으로 분류할 수 있었다(Fig. 1). 그림에서 표시된 것처럼 원형안의 group I과 IV에 속하는 *WRKY* family들은 저온에 처했을 때 발현이 증가되고, group II, III, 그리고 V에 있는 *WRKY* family들은 저온에서 억제되는 것으로 알려졌다(Rushton et al., 2010). 즉 저온에서 발현이 증가되는 *WRKY* 전사요소들은 세포의 핵으로부터 세포질로 이동하여 하부의 저온 내성에 관여하는 유전자들(예, *AtABF4*, *AtDREB1A* 등)의 발현을 유도하여 식물로

Table 3. A degenerated primer used for expression analysis of warm-season turfgrass *WRKY* gene, which was designed from the conserved region of the reported *WRKY4* sequences of some plant species including *Miscanthus* EST. The zoysiagrass *Actin* gene was used as a control.

Primer name ^a	5' to 3' sequence	Target size (bp)
MSIR7180_WRKY4_F	CATCAAGCAGCTTTGGCRAG	800
MSIR7180_WRKY4_R	CGCCATCTRTAYCCATCACTC	
Zoysia_ACTIN_F	ATGGCTGACGGTGAGGATATC	1,134
Zoysia_ACTIN_R	TTAGAAGCATTTCCGGTGAAC	

^a MSIR: rhizome of *M. sinensis*.

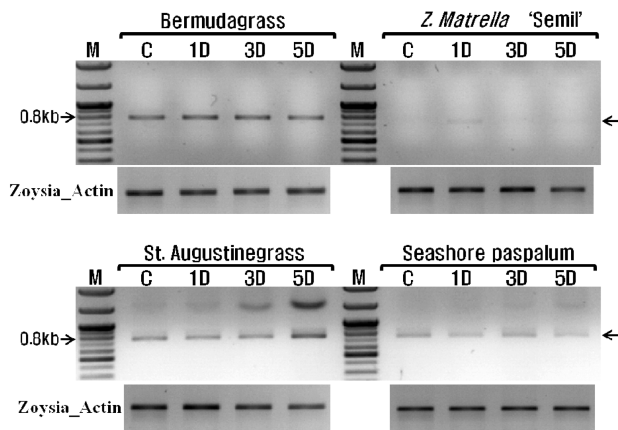


Fig. 2. An RT-PCR analysis of the *MSIR7180_WRKY4* transcription factor in four turfgrasses in response to low temperature (10°C) for 1, 3, and 5 days treatment. Zoysiagrass *Actin* gene was used as a loading control. The arrow indicates the expected size of the *WRKY4* gene.

하여금 추위에서 견딜 수 있도록 한다(Chen et al., 2012).

난지형 잔디의 저온 반응성을 비교하기 위하여 무가온 온실에서 자란 4가지 난지형 잔디의 *MSIR7180_WRKY4* 유전자(Fig. 1 group IV)의 발현을 저온(10°C)에서 노출시킨 뒤 조사하였다. *MSIR7180_WRKY4* 유전자는 애기장대와 벼에서 저온 처리 후 발현이 증가되는 것으로 알려졌고 역세 isotig가 이들 유전자와 상동성이 높아 동일한 것으로 간주되어 *WRKY4*의 이름을 붙였다(Table 3 and Fig. 1). *MSIR7180_WRKY4* 유전자는 참억새의 지하경과 잎에서만 확인되었고, 지하경에서 확인된 염기서열 정보가 잎에서 확인된 염기서열 보다 길고 애기장대 및 벼와 상동성이 높아서 지하경의 염기서열을 이용하여 blast 검색을 실시하여 프라이머 제작을 시도하였다(Table 3).

MSIR7180_WRKY4 유전자의 발현 양상은 4가지 난지형 잔디에서 특징적으로 달리 나타났다. 버뮤다그래스는 처리기간 동안 유전자의 발현에 큰 차이는 보이지 않았으나 비교구(무가온 온실)에서도 높은 발현을 보이고 있었고,

금잔디간의 교배를 통해 얻어진 세밀 품종(Choi et al., 2013)은 처리기간 내내 발현이 미약하였다(Fig. 2). 한편 St. Augustinegrass는 3일 동안은 비교구와 큰 차이가 없다가 5일째부터 발현이 증가하였고, 반면에 Seashore paspalum은 처리 초기의 발현이 5일째에는 약해지는 경향을 나타냈다. 이러한 결과로 유추해 볼 때 버뮤다그래스와 St. Augustinegrass는 저온에 노출되었을 때 급속히 관련 유전자들이 작동하여 휴면 또는 저온 적응성을 보이지만, 상대적으로 금잔디와 Seashore paspalum 잔디는 저온 반응 유전자의 작동이 상대적으로 늦은 것으로 해석될 수 있었다.

본 연구에 사용한 네가지 난지형 잔디 모두 저온에 대한 내성은 다른 한지형 또는 난지형 잔디에 비하여 상대적으로 낮으나, 본 연구 결과만으로는 저온에 대한 내성을 판단하기에는 무리가 있어 보인다. 하지만 한국잔디류 중에서 '세밀'과 같은 금잔디가 가을 철 녹색기간이 비교적 오래 유지되는 것은 *MSIR7180_WRKY4* 유전자의 저온 반응성이 낮아 휴면진입이 늦어지는 것과 관련이 있어 보인다. 따라서 녹색 기간이 늦게까지 유지되면서 내한성이 높은 잔디 품종의 개발을 위해서는 Stay-green에 관여하는 유전자(예, *Ossgr*), 저온에 반응하여 신속하게 세포 또는 조직을 생리생화학적으로 적응하게 하는 기작에 관련된 유전자(예, LEA)들과 저온 적응에 관여하는 또 다른 환경 요인(예, 단일조건)을 종합적으로 고려해야 할 필요가 있다고 판단된다(Jiang et al., 2007; Kusaba et al., 2013; Thomashow, 2010).

요 약

국내에 자생하는 참억새(*M. sinensis*)와 물억새(*M. sacchariflorus*)의 잎과 지하경 조직 EST로부터 유전자의 전사를 조절하는 전사요소 탐색하여 저온에 반응하는 유전자를 분리하고 난지형 잔디에서 저온 반응의 차이를 알아보기 위하여 본 연구를 실시하였다. 분석 결과 탐색된 전사조절 요소의 종류는 총 50 종류로 나타났고, 그 중

WRKY family에 속하는 EST 절편이 226개로 가장 많이 발견되었다(9.6%). 그 중 역세 *WRKY* family를 기능이 밝혀진 다른 작물의 *WRKY* 유전자들과 비교 검색한 결과 약 80개의 역세 isotig가 저온에 반응하여 발현이 유도 또는 억제되는 것으로 나타났다. 그 중 애기장대와 벼에서 저온 처리 후 발현이 증가되는 것으로 알려진 역세의 *MSIR7180_WRKY4* 유전자를 대상으로 그 발현양상을 조사한 결과 버뮤다그래스는 비교구에서와 비슷하게 처리기간 동안 높은 유전자의 발현을 보였고, 금잔디(*Z. matrella*) 간의 교배를 통해 얻어진 세밀 품종은 처리기간 내내 발현이 미약하였다. *St. Augustinegrass*는 3일 동안은 비교구와 큰 차이가 없다가 5일째부터 발현이 증가하였고, *Seashore paspalum*은 처리 초기에 발현이 높다가 처리가 진행되면서 약해지는 경향을 나타냈다. 이 결과로 미루어 볼 때 버뮤다그래스와 *St. Augustine grass*는 저온 반응성이 신속하여 휴면을 준비하지만 금잔디와 *Seashore paspalum*은 휴면 돌입이 늦어 녹색이 상대적으로 늦게까지 유지되는 것으로 판단되어 저온 적응을 위한 또 다른 환경요인의 작용이 있을 것으로 여겨진다. 녹색 기간이 길고 내한성이 높은 품종의 개발을 위해서는 더 많은 유전자의 종합적인 고찰과 판단이 요구된다.

주요어: DNA 결합 단백질, 저온스트레스, RT-PCR, 전사조절, *WRKY* 유전자

Acknowledgements

This research was financially supported by research fund of Chungnam National University and the Plant Molecular Breeding Center of the Next-Generation BioGreen 21 Program, Rural Development Administration (no. PJ008131).

References

- Cai, H., Tian, S., Liu, C. and Dong, H. 2011. Identification of a MYB3R gene involved in drought, salt and cold stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Gene* 485:146-152.
- Chang, N.K. and Kim, H.K. 1986. Physiological and ecological studies on prolongation of the green period in Korean lawn. *J. Kor. Grassl. Sci.* 6:131-137. (In Korean)
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C. and Yu, D. 2012. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochim. Biophys. Acta* 1819:120-128.
- Choi, J.S. and Yang, G.M. 2013. Development of new hybrid cultivar 'Semil' in zoysiagrass. *Weed Turf. Sci.* 2:198-201. (In Korean)
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L. 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 15:573-581.
- Duncan, R.R. and Carrow, R.N. 1999. Turfgrass molecular genetic improvement for abiotic/edaphic stress resistance. *Adv. Agron.* 67:233-305.
- Duncan, R.R. and Carrow, R.N. 2000. *Seashore paspalum*: The environmental turfgrass. John Wiley & Sons, Inc, NJ, USA
- Gao, M.J., Allard, G., Byass, L., Flanagan, A.M. and Singh, J. 2002. Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 49:459-471.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., et al., 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 7:106-111.
- Jiang, H., Li, M., Liang, N., Yan, H., We, Y., et al. 2007. Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice. *Plant J.* 52:197-209.
- Jin, J., Zhang, H., Kong, L., Gao, G. and Luo, J. 2013. Plant TF DB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucl. Acids Res.* first published online October 29, 2013 doi:10.1093/nar/gkt1016.
- Kim, C.S., Lee, T.H., Jeon, Y.J., Chung, S.J., Paterson, A.H., et al. 2013. Whole genome scanning of transcriptomes from two *Miscanthus* species reveals their functional specificity and evolutionary relationships. (in preparation).
- Kusaba, M., Tanaka, A. and Tanaka, R. 2013. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynth. Res.* DOI 10.1007/s11120-013-9862-x (e-online published ahead of print).
- Latchman, D.S. 1997. Transcription factors: an overview. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29:1305-12.
- Qin, F., Sakuma, Y., Li, J., Liu, Q., Li, Y.Q., et al. 2004. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.* 45:1042-1052.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. and Shen, Q.J. 2010. WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci.* 15:247-258.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Takahara, Y., Kobayashi, M. and Suzuki, S. 2011. Low-temperature-induced transcription factors in grapevine enhance cold tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *J. Plant Physiol.* 168:967-975.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics

- analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.
- Tang, M., Lü, S., Jing, Y., Zhou, X., Sun, J. and Shen, S. 2005. Isolation and identification of a cold-inducible gene encoding a putative DRE-binding transcription factor from *Festuca arundinacea*. *Plant Physiol. Biochem.* 43:233-239.
- Thomashow, M.F. 2010. Molecular basis of plant cold acclimation: Insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiol.* 154:571-577.
- Wang, X., Kuang, T. and He, Y. 2010. Conservation between higher plants and the moss *Physcomitrella patens* in response to the phytohormone abscisic acid: a proteomics analysis. *BMC Plant Biol.*10:192.