

## 다양한 스트레스에 유도되는 들잔디 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*의 분석

김우남 · 송인자 · 강홍규 · 선현진 · 양대화 · 이용익 · 권용익 · 이효연

### Analysis of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* induced by multiple stress in *Zoysia japonica*

Woo-Nam Kim · In-Ja Song · Hong-Gyu Kang · Hyeon-Jin Sun · Dae-Hwa Yang · Yong-Eok Lee · Yong-Ik Kwon · Hyo-Yeon Lee

Received: 17 December 2016 / Revised: 14 April 2017 / Accepted: 22 August 2017  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Many crops including cereals, tuber crops, feeds, and turf grasses are often damaged by various environmental stresses such as drought, salt, cold, and high temperature, causing the reduction of their productivity. Plants are sessile and cannot escape from environmental stresses. Thus, plants evolve in the direction of overcoming the environmental stresses. Some plant genes such as ARF, ABI3, NAC, HSF, and WRKY are known to respond to environmental stresses as they transcriptionally regulate the stress response pathways. For example, the *OsWRKY76* gene contributes to the enhanced resistance to low temperatures and pathogenic infections. The *AtWRKY28* also plays a role in environmental stresses. Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) is popularly grown for gardens and golf courses. However, the function of the *WRKY* gene, another environmental stress-related gene, is not known in zoysiagrass. In this study, the *ZjWRKY3* and *ZjWRKY7* genes with one shared *WRKY* domain have been

isolated in zoysiagrass. The expression of these genes increased in response to low temperature, drought, and salt stresses. Furthermore, the infection of the brown patch-causing *Rhizoctonia solani* induced the expression of *ZjWRKY3* and *ZjWRKY7*. The corresponding proteins bind to the W-box of the *Zjchi* promoter, possibly regulating their transcriptions. The researchers suggest that the *ZjWRKY3* and *ZjWRKY7* genes transcriptionally regulate abiotic and biotic stress related downstream genes

**Keywords** Stress, Biotic stress, WRKY, Transcription factor, Zoysiagrass

## 서 언

식물은 가뭄, 저온, 고온 같은 다양한 환경 스트레스에 영향을 받는다(Smirnoff et al. 1988). 이로 인하여 생장지연, 종자 생산량 감소, 잎의 노화 등이 대표적으로 관찰되며, 작물의 상품가치를 떨어뜨리고 작물의 생산량을 감소시키는 주요 원인이 된다. 특히 잔디와 같은 조경 식물은 공원, 스포츠 공원, 골프장 등에 식재 되어 일반작물보다 지속적으로 더 많은 환경스트레스에 노출되는 경우가 많다. 또한 잔디에 발생하는 병으로 인해서 시각적 효과감소, 골프장에서는 매출 감소로 이어진다. 잔디에 발생하는 병은 갈색퍼짐병(large patch), 동전마름병(dollar spot), 피시움마름병(Pythium blight), 갈색마름병(brown patch), 탄저병(anthraxnose), 황색엽부병(yellow patch)등 약 10여종이 알려져 있으며, 들잔디의 경우에는 *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV)에 의하여 발생하는 갈색 퍼짐병이 가장 큰 문제가 되고 있다(Jung et al. 2008).

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

W.-N. Kim<sup>†</sup> · H.-Y. Lee (✉)  
제주대학교 생명자원과학대학  
(Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)  
e-mail: hyoyeon@jejunu.ac.kr

I.-J. Song<sup>†</sup> · H.-G. Kang · H.-J. Sun · D.-H. Yang · Y.-I. Kwon (✉)  
제주대학교 아열대원예산업연구소  
(Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)  
e-mail: yongikk@jejunu.ac.kr

Y.-E. Lee  
동국대학교 과학기술대학  
(Department of Medical Bioscience, Dongguk University, Gyeongju 38866, Korea)

들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)는 자연환경에 대한 적응력이 뛰어나 거의 모든 기후와 토양에서 성장할 수 있기 때문에 공원, 골프장, 제방, 운동 경기장 등에서 폭넓게 사용되는 품종이며, 산업적인 측면으로 많이 이용되고 있다. 그러나 들잔디를 비롯한 난지형 잔디들은 저온 스트레스에서 잎과 뿌리의 생장지연, 잎 노화 등을 일으키는 것으로 보고되었다. 이러한 저온스트레스는 온도자체에 의한 영향뿐만 아니라 저온에 의한 삼투, 산화 스트레스를 수반하며, 이차적으로 다른 병에 대한 저항성을 약화시킬 수 있다. 저온뿐만 아니라 산업적으로 다양하게 이용됨에 따라 고온, 염, 건조 등에 대한 환경스트레스에 대한 저항성도 요구된다. 따라서 작물에 각종 피해를 일으키는 환경 스트레스에 대한 저항성을 높여 줄 수 있는 연구가 반드시 필요한 실정이다. 들잔디는 형질전환이 쉽지 않아서 스트레스 저항성 작물의 개발을 위해 다양한 형질의 잔디를 인위적으로 교배시키는 전통육종방법을 주로 사용해왔지만 원하는 형질을 얻기까지의 시간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있었다. 1994년 건조에 강한 형질을 얻기 위해 들잔디(*Zoysia japonica*)와 금잔디(*Zoysia matrella*) 등이 교잡된 잔디에서 건조에 강한 들잔디를 조사하여 스트레스저항성 잔디를 선별하였다(Marcum et al. 1994). 그러나 2003년 들잔디의 형질전환 방법이 개발되면서 보다 빠른 방법으로 원하는 형질을 얻을 수 있는 분자육종이 가능하게 되었다(Toyama et al. 2003).

WRKY는 다양한 식물에 보존되어 있으며 건조, 저온 등 다양한 환경스트레스에 관여하고 있다(Chen et al. 2012; Eulgem et al. 2000). 최근 보고된 논문에서 들잔디의 WRKY 유전자 137개를 동정하였고, 그 중 20개의 WRKY 유전자가 환경스트레스에 반응하는 것으로 보고되었다(Xie et al. 2015). 또한 들잔디의 *ZjNAC* 과 *ZjGA20* 은 염, 건조, 산화스트레스 등 여러 가지 스트레스 조건에 반응하는 것으로 보고되었다(Zhang et al. 2016; Dai et al. 2012). 따라서 보다 우수한 품종을 육성하기 위해서는 스트레스에 대한 저항성 메커니즘을 분자적 수준에서 이해하고, 유용 유전자를 발굴하는 연구와 노력이 필요하다(Tuteja et al. 2005).

식물들이 환경스트레스에 노출되면 스트레스를 인지함과 동시에 세포 내에서 신호전달에 변화가 생긴다. 외부 환경으로 받은 신호전달에 따라 환경스트레스에 반응하는 많은 유전자들이 전사수준에서 조절되고 이 유전자들의 산물들이 스트레스에 대한 식물의 저항성을 높여준다(Shnozaki et al. 2000). 식물이 환경스트레스에 저항하기 위해서는 신호전달 유전자, 효소 유전자, 전자조절 유전자 등을 포함한 다양한 종류의 유전자가 필요하다. 이 중에서 외부 환경의 신호를 전달하는 신호전달 유전자가 환경에 반응하는 첫 단계로 알려져 있으며, 환경스트레스에 반응하는 대표적인 전사인자로는 DREB/CBFs, AREB/ABFs, NACs, NAMs, WRKY 등이 알려져 있다. 그 중에서 WRKY family는 식물 특이적 전사인자로서, N 말단 지역에 보존된 WRKYGQK서열 과 C 말단

지역에 zinc finger-like motif를 가진다. WRKY 단백질은 domain의 구조에 따라 두 개의 WRKY domain을 포함하는 group I, 하나의 domain을 포함하는 group II 와 III로 구분되며, group II 와 III는 C 말단에 존재하는 zinc finger motif의 종류로 구분된다. WRKY 단백질은 스트레스 반응 유전자의 프로모터에 존재하는 cis-acting element인 W-box에 결합 하여 식물 스트레스 저항성 유전자의 전사를 조절한다(Eulgem T et al. 2000). W-box의 core sequence인 TGAC는 WRKY 단백질의 결합에 중요한 서열이라는 것이 다수의 DNA binding 실험을 통하여 증명되었다(Ulker and Somssich, 2004; Ciolkowski et al. 2008; Xiatian Wang et al. 2015). 지금까지의 연구에서, WRKY 유전자는 애기장대에서 74개(Eulgemt et al. 2000), 벼에서 100개 이상의 유전자가 발견되었다(Zhang and Wang 2005; Ramamoorthy et al. 2008). 환경스트레스에 반응하는 WRKY가 식물에서 많이 존재하는 이유는 식물은 동물과 달리 이동이 불가능하여 한 지역에서 다양한 스트레스를 극복하기 위함이다. 현재까지 밝혀진 WRKY의 기능을 살펴보면, 보리의 WRKY38은 저온과 가뭄스트레스 상황에서 전사가 촉진 되었다(Xiong et al. 2010). 또한 밀의 WRKY33은 고온, 저온, 가뭄스트레스 상황에서 전사가 촉진 되었으며, 애기장대 과발현체에서 가뭄스트레스 대한 저항성을 향상 시키는 것으로 보고되었다(He et al. 2016). 본 연구는 다양한 스트레스에 노출되는 들잔디에서 환경스트레스에 관련된 전사인자로 알려진 WRKY 유전자를 분리하여 환경스트레스에 대한 반응을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 연구에서 유전자 클로닝을 위하여 난지형 잔디인 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)의 잎을 이용하였다. 먼저 들잔디 종자는 종피를 제거한 후 0.02% Tween20과 2% NaOCl로 20분간 세척한 후 멸균된 증류수로 NaOCl을 씻어내고 1/2 MS배지에 파종 하였다. 애기장대는 상토와 펄라이트를 혼합한 토양에 식재하여 21°C, 장일 조건의 식물생장실에서 관리되었다.

### RNA 추출 및 cDNA 합성

기내 성장된 들잔디 seedling은 4°C에 24시간 처리한 후 WRKY 유전자의 cloning을 위하여 수집하였다. 4°C 처리된 들잔디 잎은 수집 즉시 액체질소에 급속 냉각 시켰다. 이후 미리 냉각시킨 막자사발에 넣고 액체 질소를 이용하여 완전한 분말이 될 때까지 분쇄하였으며, 분쇄된 시료에 Trizol reagent 1 ml을 첨가한 후 실온에서 10분간 정치하였다. 이후 13000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 새 튜브에 옮겨 chloroform 200 ml을 가한 후 강하게 흔들어 섞고, 3분간 실온에 정치하

**Table 1** A set of primers for *WRKY* genes cloning

Set	PCR types	Genes	Oligo sequences(5' → 3')
1	Degenerate PCR	<i>ZjWRKY3</i>	Forward AAT GGM GGA AGT AYG GKC AGA
2			Reverse GWG ACG AGY GCC GCC TTG AA
3	cDNA synthesis for 3'-RACE	<i>ZjWRKY7</i>	Forward AAT GGM GGA AGT AYG GKC AGA
4			Reverse GWG ACG AGY GCC GCC TTG AA
5	3'-RACE	<i>ZjWRKY3</i>	CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA TXX XXX(T)18
6			Forward AAG AAT CGG CAA GTG GCA AC
7	cDNA synthesis for 5'-RACE	<i>ZjWRKY7</i>	Reverse CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA TXXXX(T)
8			Forward GTA CGA GGG CGA GCA TAA C
9	5'-RACE	<i>ZjWRKY3</i>	Reverse CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA TXXXX(T)
10			①*GAG GAC AAC ACC A
11	Full-length	<i>ZjWRKY7</i>	①*GAG TGG CTA CTG TCA
12			Forward TGC AAC ACA AGC CTC TTA CC
13	Real time PCR	<i>ZjWRKY3</i>	Reverse GAG AAG GCT GTG CCA TCT TA
14			Forward AAG AAT CGG CAA GTG GCA AC
15		<i>ZjWRKY7</i>	Reverse GAG TAG GTA TCT CTG CAC TC
			Forward CTT AGC CTC GTG GTG AAA GAC
		<i>ZjWRKY3</i>	Reverse GGT TTG TAC TCC TCC CGG ATA
		<i>ZjWRKY7</i>	Forward GAA GTA CGG GCA GAA GGT GA
		<i>ZjWRKY3</i>	Reverse GAC GTG CAC TCC ATC TGG T
		<i>ZjWRKY7</i>	Forward CCC GGG TTA CAT CTG AGG ACC A
		<i>ZjWRKY3</i>	Reverse TCT AGA ATG GCC GGC ACA AG
		<i>ZjWRKY7</i>	Forward GCC ATG GAT CCG TGG ATC GGC C
		<i>ZjWRKY3</i>	Reverse CTA CTG TTG CGT CGG CGA GAT AA
		<i>ZjWRKY7</i>	Forward GGA TCC TGC ATG GCC GGC ACA
		<i>ZjWRKY3</i>	Reverse GAG CTC TTA CAT CTG AGG ACC
		<i>ZjWRKY7</i>	Forward GGA TCC ATG GAT CCG TGG ATC
		<i>ZjWRKY3</i>	Reverse CGA CGC AAC AGT AGC CCG GG

\* phosphorylation

였다. 이 후, 4°C, 15000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리하였으며, 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 이 후, 원심분리로부터 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척하였으며, 0.1% Dierhyl pyrocarbonate (DEPC) 용액이 처리된 RNase free water를 이용하여 녹였다. 이 후, 추출한 total RNA를 1% agarose gel 전기영동을 이용하여 확인하였다. 0.5 ul의 oligo dT primer, M-MLV 5x reaction buffer, 10 mM dNTP, 25 unit RNasin Ribonuclease inhibitor, 200 unit M-MLV reverse transcriptase (Promega), 1 ug의 RNA는 1 st strand cDNA 합성을 위하여 사용되었으며, PCR Thermal Cycler Dice (Takara)를 이용하여 증폭하였다(Table 1, primer set 3).

#### *WRKY* 유전자들의 분리

들잔디로부터 *WRKY* 유전자들을 분리하기 위하여 NCBI GeneBank data base는 이용되었다. 먼저 *WRKY* 단백질의 아미노산 서열을 수집한 후, 보존된 *WRKY* domain으로부터 degenerate primer를 제작하였다. 이 후, 합성된 cDNA를 주형가닥으로 이용하여 PCR을 진행하였다(Table 1, primer set 1,2; Table 2, condition 1).

증폭된 단편 유전자의 sequence에 기반하여, 5'/3'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 는 Full RACE Core Set (Takara) 를 이용하여 수행되었다(Table 1, primer set 3 ~ 11; Table 2, condition 2 ~ 4). 마지막으로, 5'/3'-RACE sequence에 기반하여 두 개의 full-length *WRKY* 유전자들은 cloning되었다(Table 1, primer set 12, 13; Table 2, condition 5). 증폭된 모든 products는 pGEM-T easy vector (Promega) 를 이용하여 sequencing 하였다.

#### *ZjWRKY* 유전자들의 상동성 분석

Phylogenetic tree 분석에는 MEGA 6 program을 이용하였다. NCBI GenBank database를 이용하여 이미 보고된 다른 *WRKY* 의 아미노산 서열을 수집하였으며, 들잔디로부터 분리된 두 개의 *WRKY* 유전자와 비교 분석 하였다. 이 후, bioedit program을 이용하여 *WRKY* 아미노산 서열을 정렬하였으며, neighbor joining 방법을 사용하여 phylogenetic tree 분석을 수행하였다. 분석에 이용된 *WRKY*는 *TaWRKY16* (EU665428), *GmWRKY13* (DQ322694), *AtWRKY18* (JN848519), *AtWRKY60* (NM\_001335968), *OsWRKY76* (BK005079), *AtWRKY40* (NM\_106732), *TaWRKY1*

**Table 2** A List of PCR conditions for zoysiagrass *WRKY* genes

Conditions	Reaction mixture	Genes	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	Cycle
1 Degenerate PCR	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 2 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 2 ul, 1 unit Ex taq DNA polymerase (Takara), 50 pmol each primer set 0.4 ul	<i>ZjWRKY3</i>	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	30
		<i>ZjWRKY7</i>	5 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min	
2 3'-RACE	cDNA 50 ng, 10 × Ex Taq buffer 2 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 2 ul, 0.5 unit Ex taq DNA polymerase (Takara), 10 pmol each primer set 0.5 ul	<i>ZjWRKY3</i>	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	30
		<i>ZjWRKY7</i>	5 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min	
3 5'-RACE	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 5 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 8 ul, 5 unit Ex taq DNA polymerase (Takara), 20 pmol each primer set 0.5 ul	<i>ZjWRKY3</i>	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C	30
		<i>ZjWRKY7</i>	3 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min	
4 Nested PCR	PCR product 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 5 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 8 ul, 5 unit Ex taq DNA polymerase (Takara), 20 pmol each primer set 0.5 ul	<i>ZjWRKY3</i>	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C	30
		<i>ZjWRKY7</i>	3 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min	
5 Full-length PCR	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 3 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 3 ul, 1 unit Ex taq DNA polymerase (Takara), 10 pmol each primer set 0.4 ul	<i>ZjWRKY3</i>	94°C	94°C	65°C	72°C	72°C	30
		<i>ZjWRKY7</i>	3 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min	
6 Real time PCR	cDNA 30 ng, Sybergreen supermix 10ul, 10 pmol each primer set 0.5 ul,	<i>ZjWRKY3</i> <i>ZjWRKY7</i>	95°C	95°C	60°C			40

(*KT285206*), *ZmWRKY52* (*KJ728370*), *TaWRKY17* (*EU665429*), *TaWRKY27* (*EU665431*), *NtWRKY1* (*AB022693*), *OsWRKY33* (*BK005036*), *TaWRKY13* (*EU665426*), *TaWRKY18* (*EU665443*), *TaWRKY42* (*EU665456*), *TaWRKY5* (*EU665434*), *AtWRKY53* (*NM\_118512*), *TaWRKY19* (*EU665430*), *AtWRKY6* (*HMI73628*), *AtWRKY31* (*NM\_001341527*), *AtWRKY42* (*NM\_001340482*) 이다.

**ZjWRKY** 유전자들의 발현 분석

들잔디로부터 분리된 두 개의 *ZjWRKY* 유전자들의 발현분석을 위하여, 기내 배양된 들잔디의 seedling을 이용하였다. 저온에 대한 발현분석은 들잔디 유식물을 4°C에서 2, 12, 24, 48 시간 처리한 후 수집 하였다. 염 스트레스와 건조 스트레스에 대한 발현 분석은 들잔디 유식물을 배지로부터 조심스럽게 분리한 후, 100 mM NaCl 용액과 100 mM Mannitol 용액이 담긴 50 ml tube에 뿌리가 잠기도록 처리한 후 1, 2, 4, 8, 12 시간 간격으로 수집하였다. *Razoctonia solani*에 대한 발현분석은 들잔디 유식물에 균을 접종한 후 24 시간 간격으로 수집하였다. 수집된 모든 샘플로부터 total RNA는 Trizol reagent 이용하여 추출하였으며, M-MLV Reverse transcriptase (Promega) 을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 1 ug을 IQ<sup>™</sup> SYBER-GREEN supermix (BIO-RAD)를 이용하여 Real-time PCR을 수

행하여 각 스트레스에 대한 발현을 분석하였다(Table 1, primer set 14,15, Table 2 condition 6).

효모에서 *ZjWRKY* 단백질의 W-box 결합 분석

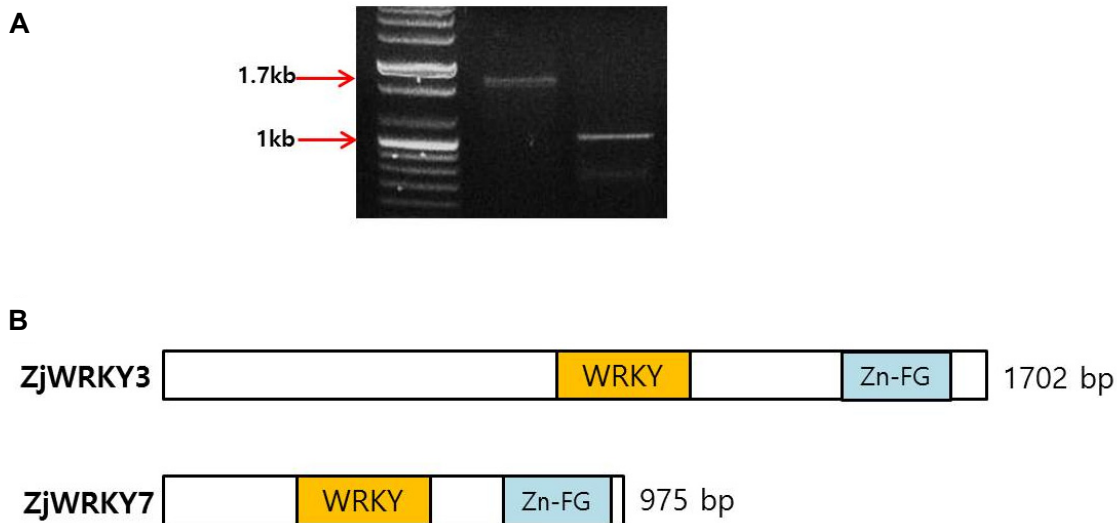
*ZjWRKY*가 W-box와의 결합 유무를 확인하기 위하여 Yeast one-hybrid assay (Matchmaker® Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System, Clontech)를 수행 하였다. Zoysiagrass Chitinases (*Zjchi*)의 W-box를 포함하는 약 400 bp promoter 지역을 PCR을 통하여 증폭하고 *Hind* III와 *Xho* I을 사용하여 pBait-AbAi vector에 삽입하였다(Kang et al. 2016). 확인 된 pBait-AbAi vector를 *Bst*BI을 사용하여 linearization하고 Y1H gold yeast strain (Clontech)에 형질전환 한 후 PCR을 통하여 유전자의 삽입을 확인 하였다. Full-length *ZjWRKY3*과 *ZjWRKY7*을 PCR을 통하여 증폭 하였고 *Hind* III와 *Xho* I을 사용하여 pGADT7-AD vector에 삽입하여 실험에 사용하였다. 이전에 준비된 bait strain을 SD/-Leu/AbA 배지에 plating 하여 테스트하고 bait strain에 pGADT7-AD vector 를 형질전환 하였다. 형질전환 반응물을 희석하여 SD/-Leu, SD/-Leu/AbA, SD/AbA200 (for control) 배지에 도말하고 30°C에서 3일간 배양 한 후 결과를 확인 하였다.

## 결과 및 고찰

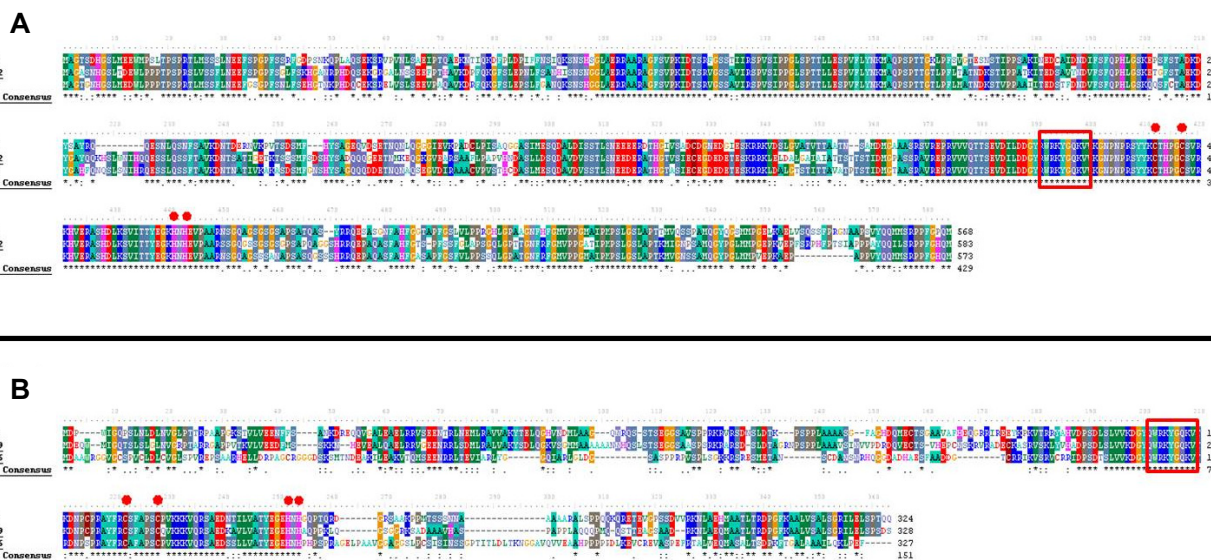
### WRKY 유전자들의 클로닝

WRKY family 유전자를 클로닝하기 위하여 NCBI를 통하여 기존에 보고된 환경스트레스에 반응하는 다른 작물의 WRKY family 유전자들의 염기서열을 수집하였다. 보존된 WRKY domain 지역을 이용하여 degenerate PCR을 수행하였고, 그 후 3′/5′ RACE 를 수행하였다. 3′/5′ RACE 결과를 통하여 각 유전자의 full-length 염기서열을 예상할 수 있었고, 이 염기

서열을 바탕으로 full-length WRKY 유전자를 PCR한 결과 첫 번째 단편은 약 1.7 kbp, 두 번째 단편은 약 1 kbp에서 밴드가 형성되었다(Fig. 1A). full-length WRKY 유전자들의 염기서열을 분석한 결과 첫 번째 단편은 *ZmWRKY52*와 81%의 상동성을 나타냈으며 *ZmWRKY52*는 아직까지 기능이 보고되지 않았다(Fig. 2A). 두 번째 단편은 *OsWRKY76*과 75%의 상동성을 보였다(Fig. 2B). *OsWRKY76*은 벼가 냉해를 심하게 입었을 때 일어나는 도열병에 대한 저항성과 저온 스트레스에 대한 저항성을 나타내는 것으로 보고되었다(Naoki et al. 2013). 따라서 본 연구에서 분리된 두 단편 모두 환경스트레스에 유도되



**Fig. 1** Cloning of *ZjWRKY3* and *ZjWRKY7* (A) RT-PCR for full-length *ZjWRKY* genes. For full-length sequence of two WRKY genes performed RT-PCR, and amplified about 1 kp and 1.7 kb, respectively. (B) Structure of *ZjWRKY3* and *ZjWRKY7*



**Fig. 2** Alignment of the cloned *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* genes by using the Clustal X program. (A) *ZjWRKY3* compared with *ZmWRKY52* and *SiWRKY2*. (B) *ZjWRKY7* compared with *TaWRKY79* and *OsWRKY76*. Red box indicates the conserved WRKY domain. Red dot indicates the Zinc finger motif. Zj, *Zoysia japonica*; Ta, *Triticum aestivum*; Zm, *Zea mays*; Si, *Solanum lycopersicum*; Os, *Oryza sativa*



는 *WRKY* 유전자일 것으로 예상하였고, 1702 bp 길이의 첫 번째 단편은 *ZjWRKY3*로, 975 bp 길이의 두 번째 단편은 *ZjWRKY7*로 명명하였다(Fig. 1B).

### ZjWRKY3, ZjWRKY7의 phylogenetic tree 분석

기존에 보고된 기능이 알려진 다른 작물들의 *WRKY* 유전자들을 NCBI GeneBank에서 수집한 다음, MEGA6 프로그램을 이용하여 Full-length *WRKY* 유전자의 전체 ORF 부분을 기존에 기능이 알려진 다른 식물들의 *WRKY* family 유전자들과 분석하였다(Fig. 3). *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* 이외에도 *ZjWRKY2*, *ZjWRKY5*, *ZjWRKY4* 유전자도 분리를 하였지만 본 연구에서는 우선 연구가 진행된 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*만 분석을 진행하였다. 그 결과 *ZjWRKY7*은 *TaWRKY16*, *GmWRKY13*, *AtWRKY18*, *AtWRKY60*, *OsWRKY76*, *AtWRKY40*을 포함하여 group II에 속한 것을 확인할 수 있었고, 이 group II에 속하는 유전자들은 염 스트레스와 삼투 스트레스 등에 반응하는 것으로 보고되었다(L. Chen et al. 2012). *ZjWRKY3*은 *TaWRKY1*, *ZmWRKY52*, *TaWRKY17*, *TaWRKY27*, *NtWRKY1*, *OsWRKY33*, *TaWRKY13*, *TaWRKY18*을 포함하는 group III에 속한 것을 확인할 수 있었다(Eulgem T et al. 2000). *ZjWRKY3*과 같은 그룹에 속한 *TaWRKY1*은 고온, 노화, 건조 스트레스에 반응하고 과발현 시켰을 때 건조 스트레스에 대한 내성을 나타낸다고 보고되었다(He et al. 2016). Group III에 속하는 유전자들은 여러 가지 환경 스트레스에 대해 반응하였으며 세포사멸 경로에도 관여하는 것으로 보고되었다(He et al. 2016, Ogata T

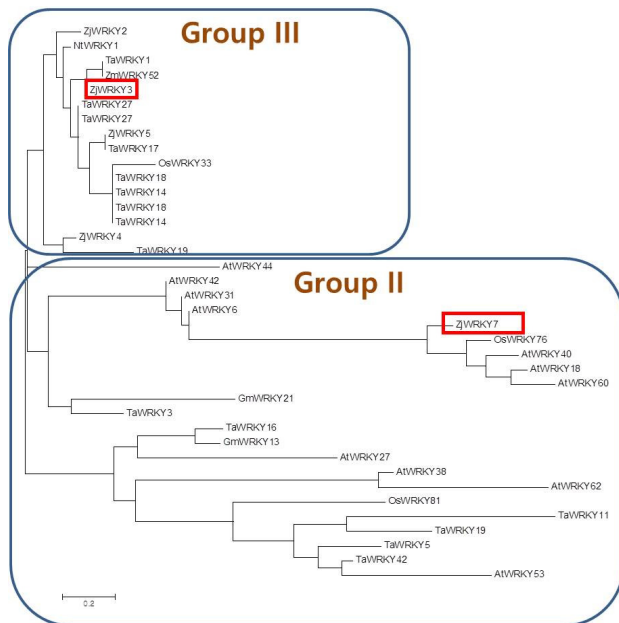
et al. 2015).

*ZjWRKY3*과 *ZjWRKY7*은 하나의 domain을 포함하는 비교적 가까운 subfamily에 속하지만 아미노산 서열을 비교해본 결과 상동성이 20%에 불과하다. *WRKY*같은 subfamily 유전자는 식물의 진화 과정에서 돌연변이에 의해 변화가 생기고, 이러한 변화로 인해 구조나 기능이 달라질 수 있고, 이러한 차이 때문에 유전자 발현 과정에서 변화가 생길 것으로 예상된다(Eulgem T et al. 2007).

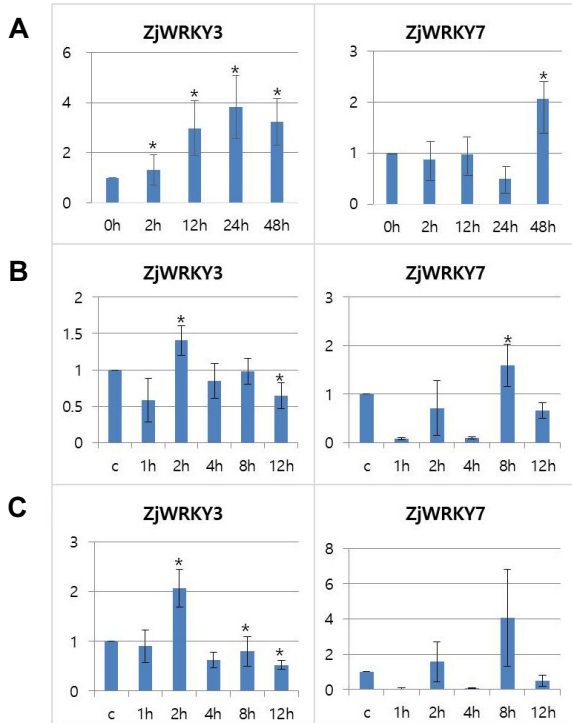
### 환경스트레스 및 병원균에 의한 ZjWRKY3, ZjWRKY7의 발현 분석

*WRKY*는 외부 환경의 신호를 전달하는 전사인자로 보고되어 있다(Eulgem T et al. 2000). 들잔디에서 분리한 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*도 이미 보고된 바와 같이 환경스트레스에 대한 반응 여부를 조사하였다. 들잔디를 활용하는 골프장 및 운동장에서 요구되는 조건은 저온에 강하며 건조를 잘 견디는 것이다. 또한 간척지 및 해안가의 공원에서 생존이 요구된다(Kim 2005). 따라서 본 연구에서는 들잔디의 활용에 요구되는 환경조건을 기준으로 들잔디에서 분리한 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*의 발현을 분석하였다. 저온(4°C) 조건에서의 발현을 분석한 결과 *ZjWRKY3*은 저온 처리 후 24시간 까지 지속적으로 증가하여 대조구를 기준으로 발현이 약 4배 증가하였고, *ZjWRKY7*은 저온 처리 후 초기에는 큰 변화를 보이지 않았으나 48시간에서 대조구를 기준으로 발현이 약 2배 증가하였다(Fig 4A). 건조에 대한 반응을 분석하기 위해 건조와 동일한 효과를 보이는 mannitol을 처리한 결과 *ZjWRKY3*과 *ZjWRKY7*은 각각 2시간, 8시간 후에 발현이 약 1.5배 증가하였다(Fig. 4B). 염에 대한 반응은 *ZjWRKY3*은 2시간 후에 발현이 약 2배 증가하였고, *ZjWRKY7*은 8시간 후에 발현이 약 4배 증가하였다(Fig. 4C). *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* 모두 저온 스트레스를 처리했을 때 시간이 지남에 따라 발현양이 증가하였다. *ZjWRKY3*은 건조, 염 스트레스 처리 시 2시간 후에 발현양이 소폭 증가하였고, *ZjWRKY7*은 건조, 염 스트레스 처리 시 8시간 후에 발현양이 증가하였다. 본 결과로 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* 모두 저온, 건조, 염의 조건에서 발현이 증가한 결과는 이미 알려진 *WRKY*와 동일하게 환경스트레스의 저항성에 기여할 것으로 예상된다. 특히 *ZjWRKY3*은 *ZjWRKY7* 보다 빠른 시간에 발현양이 증가한 것으로 보아 *ZjWRKY3*이 환경스트레스에 더 중요한 역할을 할 것으로 예상된다. *ZjWRKY7*이 건조, 염 스트레스에서 발현양의 증감을 반복한 이유에 대해서는 추후 연구가 필요하다.

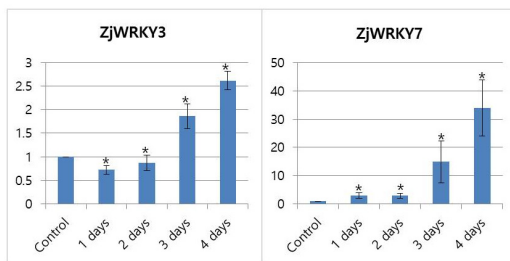
들잔디에서 주요한 병원균의 하나인 갈색퍼짐병(large patch)의 병원균(*Rhizoctonia solani*)에 대한 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*의 반응을 조사하였다. *R. solani*를 처리한 결과 *ZjWRKY3*은 처리 후 3일부터 증가하여 4일에 대조구 기준으로 발현이 약 2.5배 증가하였고, *ZjWRKY7*은 처리 후 지속적으로 증가하여



**Fig. 3** Phylogenetic analysis of *ZjWRKY* in context with other related *WRKY* proteins. The bootstrapped tree was constructed using ClustalX and MEGA 6 software. Red box indicates the *ZjWRKY3* and *ZjWRKY7*

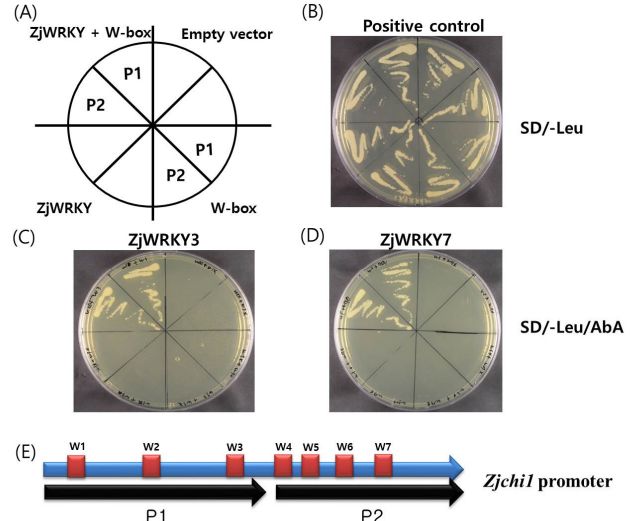


**Fig. 4** Expression profiles of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* under treatments with 4°C, drought, salt, in zoysiagrass leaves. The *ZjActin* gene was used as an internal control for qRT-PCR. The Y-axis indicates the relative expression level; X-axis indicated hours of stress treatment. (A) Expression profiles of *ZjWRKY* genes under cold (4°C), (B) drought (100 mM Mannitol) and (C) salinity (100 mM NaCl) growth conditions, respectively. \*( $P < 0.05$ )



**Fig. 5** Expression profiles of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* under treatments *R. solani* in zoysiagrass leaves. The *ZjActin* gene was used as an internal control for qRT-PCR. The Y-axis indicates the relative expression level; X-axis (1, 2, 3 and 4d) indicated days of stress treatment. \*( $P < 0.05$ )

3일부터 4일까지 급속도로 증가하여 대조구 기준으로 발현이 약 35배 증가하였다(Fig. 5). *R. solani*를 처리한 결과에서는 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* 모두 발현양이 증가하였고, 특히 *ZjWRKY7*은 *ZjWRKY3* 비해 발현양이 약 10배 이상 증가하였다. *ZjWRKY7* 과상동성이 가장 높은 OsWRKY76은 벼도열병에 대한 내성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(Naoki et al. 2013). 따라서, *ZjWRKY7*도 병 저항성 메커니즘에서 더욱 중요한 역할을 할 것으로 예측된다.



**Fig. 6** Analysis of the W-box binding activity of *ZjWRKY* using a yeast one-hybrid system. (A) Schematic diagrams. (B) Positive control. (C) *ZjWRKY3* bind to W-box (P1, P2). (D) *ZjWRKY7* bind to W-box(P1, P2). (E) P1, promoter region 1. P2, promoter region 2

효모에서 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*의 W-box 결합 분석

식물 WRKY는 수많은 방어관련 유전자의 프로모터에서 TGAC core sequence을 포함하는 다양한 W-box에 대해 높은 결합 친화도를 갖는다(Yu et al. 2001). 앞서 수행한 발현분석 결과에서 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*이 병원균 감염에 의해 발현이 증가되는 경향을 보였다. 따라서 병저항성 유전자로 알려진 zoysiagrass chitinases (*Zjchi*)의 promoter 지역에 존재하는 W-box와 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*의 특이적 결합에 대해 yeast one-hybrid system을 사용하여 분석하였다. Prey vector인 pGADT7-AD vector의 GAL4 활성화 도메인과 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* 유전자를 fusion 시킨 후 클로닝 하여 확인하였다. 그리고 Bait vector인 pBait-AbAi vector의 Aureobasidin A (AbA) 에 저항성을 나타내는 AUR1-C와 zoysiagrass *Zjchi* 유전자 promoter 지역의 W- box(TTGACC)를 포함하는 약 400 bp의 서열을 fusion 시킨 후 클로닝 하였다. 그리고 Yeast strain Y1HGold에 형질전환 하였다. 선별마커 AbA를 넣은 SD/-Leu/AbA배지에서는 pGADT7-WRKY3/WRKY7과 pBait-W-box를 같이 넣은 경우에만 효모가 증식 하였다. 반면에 pGADT7-WRKY3/WRKY7만 넣은 경우와 pBait-W-box만 넣은 경우에 효모가 자라지 않았음을 확인할 수 있었다. 음성대조구로 사용 된 pBait-AbAi, pGADT7-AD만 넣은 경우에는 효모가 증식하지 않았으며, AbA를 넣지 않은 양성대조 구에서는 모두 효모가 증식하였다(Fig. 6).

*ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*은 들잔디의 병원균인 *R. solani*에 의해 발현량이 증가하였으며 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*이 병저항성 유전자 *Zjchi*의 프로모터 W-box에 결합한 결과는 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*이 병원균을 인식하여 전사인자로 병저항성 유전

자를 발현시키는 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 따라서 들잔디에서 분리한 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*은 이미 보고된 *WRKY*와 동일하게 환경 및 병에 대한 저항성 유도에 중요한 역할을 한다고 판단한다.

## 적 요

식용작물, 사료, 잔디를 포함하는 모든 작물은 건조, 염, 저온, 고온 등의 여러 가지 환경스트레스의 영향을 빈번히 받기 때문에 작물의 생산성이 떨어지게 된다. 식물은 환경스트레스 상황에서 스스로 벗어날 수 없다. 따라서 식물은 환경스트레스를 극복하는 방향으로 진화하였다. ARF, ABI3, NAC, HSF, WRKY 같은 환경스트레스에 반응하는 유전자들이 식물에서 보고되었다. 이 유전자들은 환경스트레스에 반응하는 전사인자로, 식물의 스트레스반응 경로에 연관되어 있다. *OsWRKY76*의 경우에는 저온 및 병원균에 대한 내성을 증가시켰고, *AtWRKY28*의 경우 여러 가지 환경스트레스에 관련이 있는 것으로 보고되었다. 들잔디는 정원이나 골프코스에서 가장 흔하게 사용되는 잔디이다. 하지만 들잔디에서는 아직 *WRKY* 유전자가 알려지지 않았다. 본 연구에서는 들잔디로부터 1개의 *WRKY* domain을 포함하는 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*를 분리하였다. *ZjWRKY3*과 *ZjWRKY7*은 저온, 건조, 염 스트레스에 발현이 증가하였다. 들잔디의 갈색퍼짐병을 일으키는 *R. solani*의 감염이 *ZjWRKY3*과 *ZjWRKY7*의 발현을 증가시켰다. 또한 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*이 *Zjchi* 유전자 promoter의 W-box에 결합하여 전사를 조절한다는 사실을 확인하였다. 따라서 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* 유전자는 전사인자로서 환경스트레스 및 병원균 관련 하위 유전자들을 조절할 것으로 예상된다.

## 사 사

이 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(PJ011860)과 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF2011-0014959, 2016R1A6A1A03012862).

## References

- Chen L, Song Y, Li S, Zhang L, Zou C, Yu D (2012) The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2):120-128
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for grobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal* 16(6):735-743
- Dai X, Cheng X, Li Y, Tang W, Han L (2012) Differential expression of gibberellin 20 oxidase gene induced by abiotic stresses in *Zoysiagrass* (*Zoysia japonica*). *Biologia*, 67(4): 681-688
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in plant science*, 5(5):199-206
- Eulgem T, Somssich IE (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology*, 10(4):366-371
- He GH, Xu JY, Wang YX, Liu JM, Li PS, Chen M, Xu ZS (2016) Drought-responsive WRKY transcription factor genes TaWRKY1 and TaWRKY33 from wheat confer drought and/or heat resistance in *Arabidopsis*. *BMC plant biology*, 16(1):1
- Kang JN, Kang HG, Sun HJ, Kwon YI, Yang DH, Ko SM, Lee HY (2016) Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *zoysiagrass* (*Zoysia Japonica* Steud.). *Plant Biotechnology Reports*, 1-13
- Kim KN (2005) introductory turfgrass science. Sahmyook university publishing department
- Liu X, Bai X, Wang X, Chu C (2007) OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *Journal of plant physiology* 164(8):969-979
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics* 444(2): 139-158
- Marcum KB, Engelke MC, Morton SJ, White RH (1995) Rooting Characteristics and Associated Drought Resistance of *Zoysiagrasses*. *Agron. J.* 87(3):534-538
- Ogata T, Okada H, Kawaide, H, Takahashi H, Seo S, Mitsuhashi Y (2015) Involvement of NtERF3 in the cell death signalling pathway mediated by SIPK/WIPK and WRKY1 in tobacco plants. *Plant Biology* 17(5):962-972
- Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran, S (2008) A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant and cell physiology* 49(6):865-879
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current opinion in plant biology* 3(3):217-223
- Smirnov N (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current opinion in Biotechnology* 9(2):214-219
- Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Jung WC, Shin TS, Kim BS, Im JS, Lee JH, Kim JW (2008) Efficacy of antagonistic bacteria for biological control of Rhizoctonia blight (large patch) on *zoysiagrass*. *Research in Plant Disease* 14(1):43-50
- Wang C, Deng P, Chen L, Wang X, Ma H, Hu W, He G (2013) A wheat WRKY transcription factor TaWRKY10 confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco. *PloS one* 8(6):e65120
- Wang X, Zeng J, Li Y, Rong X, Sun J, Sun T, Chen M (2015) Expression of TaWRKY44, a wheat WRKY gene, in transgenic tobacco confers multiple abiotic stress tolerances. *Frontiers in*



- plant science, 6
- Xie Q, Niu J, Xu X, Xu L, Zhang Y, Fan B, Han L (2015) De novo assembly of the Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) root transcriptome and identification of candidate unigenes related to early responses under salt stress. *Frontiers in plant science* 6, 610
- Yokotani N, Sato Y, Tanabe S, Chujo T, Shimizu T, Okada K, Kaku H (2013) WRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. *Journal of experimental botany*, 64(16):5085-5097
- Yu D, Chen C, Chen Z (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *The Plant Cell* 13(7):1527-1540
- Zhang YB, Sun XB, Fan B (2016). Cloning and expression of ZjNAC from *Zoysia japonica*[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016 25(4):239-245