



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

저온스트레스에 유도되는 들잔디
ZjWRKY3, *ZjWRKY7*의 클로닝
및 기능분석

Cloning and functional analysis of
ZjWRKY3, *ZjWRKY7*, induced by cold
stresses in *Zoysia japonica*

濟州大學校 大學院

生命工學科

金 雨 南

2017年 2月

저온스트레스에 유도되는 들잔디 *ZjWRKY3*,
*ZjWRKY7*의 클로닝 및 기능분석

Cloning and functional analysis of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*,
induced by cold stresses in *Zoysia japonica*

指導教授 李 孝 淵

金 雨 南

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2017年 2月

金雨南의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

2017年 2月

목차

Table list	2
Figure list	3
Abstract	4
I. 서론.....	5
II. 재료 및 방법	
1. 식물재료 및 스트레스 처리	8
2. RNA 추출 및 first cDNA의 합성	8
3. <i>WRKY</i> 유전자들의 분리	9
4. <i>ZjWRKY</i> 유전자들의 상동성 분석	9
5. <i>ZjWRKY</i> 유전자들의 발현 분석	10
6. 효모에서 <i>ZjWRKY</i> 단백질의 W-box 결합 분석	11
III. 결과 및 고찰	
1. <i>WRKY</i> 유전자들의 클로닝.....	14
2. Full-length <i>WRKY</i> 유전자의 클로닝.....	16
3. Full-length <i>WRKY</i> 유전자의 구조적 특성 확인 및 상동성.....	18
4. <i>ZjWRKY</i> 유전자의 phylogenetic tree 분석.....	20
5. <i>ZjWRKY</i> 유전자들의 발현분석.....	22
6. 효모에서 <i>ZjWRKY</i> 단백질의 W-box 결합 분석.....	27
IV. 종합고찰	29
V. 참고문헌.....	32

Table list

Table 1. Set of primers for *WRKY* genes cloning12

Table 2. List of PCR conditions for zoysiagrass *WRKY* genes13

Figure list

- Fig. 1. Design of degenerate primers for *WRKY* genes cloning and RT-PCR.··15
- Fig. 2. Cloning of *WRKY* genes depending on PCR from zoysiagrass.·····17
- Fig. 3. Alignment of the cloned *ZjWRKY* genes by using the Clustal X program. ·····19
- Fig. 4. Phylogenetic analysis of *ZjWRKY* in context with other closely related *WRKY* proteins.·····21
- Fig. 5. The expression analyses of the *ZjWRKY* in response to abiotic stress in *Zoysia japonica*.·····24
- Fig. 6. Expression profiles of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* under treatments with 4°C, drought, salt, in zoysiagrass leaves.·····25
- Fig. 7. Expression profiles of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* under treatments *R. solani* in zoysiagrass leaves.·····26
- Fig 8. Analysis of the W-box binding activity of *ZjWRKY* using a yeast one-hybrid system.·····28

Abstract

All kinds of crops including foods, feeds and turf grasses are damaged frequently by various environmental stresses such as drought, salt, cold, and high temperature, which cause the loss of agronomic productivity. Plants cannot escape from environmental stresses. Thus, plants were evolving in the direction of overcoming environmental stresses. Some genes such as ARF, AB13, NAC, HSF, WRKY respond to environmental stresses have been reported in plants. The genes play a role in stress responses pathway of plants, the transcription factor in response to environmental stress. Typically OsWRKY76 increased the low temperature and pathogen resistance, AtWRKY28 been reported to be related to the environmental stress. Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) is used primarily useful for the garden or the golf course. But *WRKY*, environmental stress-related gene, is unknown in zoysiagrass. In this study, *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*, which included one WRKY domain, were isolated in zoysiagrass. Expression of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* was increased at low temperature, drought, and salt stress. Furthermore, infection of *Rhizoctonia solani*, which causes brown patch, induced expression of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7*. *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* bind to the W-box of the *Zjchi* promoter and it was predicted regulates transcription. Thus, *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* regulate abiotic and biotic stress related downstream genes as transcription factor.

I. 서론

식물은 가뭄, 저온, 고온 같은 다양한 환경 스트레스에 영향을 받는다 (Smirnoff *et al.* 1988). 이로 인하여 생장지연, 종자생산량 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 매출감소로 이어진다. 잔디에 발생하는 병은 갈색피짐병 (large patch), 동전마름병 (dollar spot), 피시움마름병 (Pythium blight), 갈색마름병 (brown patch), 탄저병 (anthracnose), 황색엽부병 (yellow patch) 등 약 10 여종이 알려져 있으며, 들잔디의 경우에는 *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV)에 의하여 발생하는 갈색피짐병이 가장 큰 문제가 되고 있다 (Jung *et al.*, 2008).

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 약화 시킬 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. 그러나 들잔디의 형질전환 방법이 개발되면서 분자육종이 가능하게 되었다 (Toyama *et al.* 2003). 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 전사 수준에서 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 family 는 식물 특이적 전사인자로서, N 말단 지역에 보존된 WRKYGQK 서열 과 C 말단 지역에 zinc finger-like motif 를 가진다. WRKY 단백질은 domain 의 구조에 따라 두 개의 WRKY domain 을 포함하는 group I, 하나의 domain 을 포함하는 group II 와 III 로 구분 되며, group II 와 III 는 C 말단에 존재하는 zinc finger motif 의 종류로 구분된다. WRKY 단백질은 스트레스 반응 유전자의 프로모터에 존재하는 *cis*-acting element 인 W-box 에 결합 하여 식물 스트레스 저항성 유전자의 전사를 조절한다(Eulgem *et al.* 2000). W- box 의 core sequence 인 TGAC 는 WRKY 단백질의 결합에 중요한 서열이라는 것이 다수의 DNA binding 실험을 통하여 증명되었다 (Ulker and Somssich, 2004; Ciolkowski *et al.* 2008; Wang *et al.* 2015). 지금까지의 연구에서, WRKY 유전자는 애기장대에서 74 개 (Eulgem *et al.* 2000), 벼에서 100 개 이상의 유전자가 발견되었다. (Zhang and Wang 2005; Ramamoorthy *et al.* 2008). 환경스트레스에 반응하는 WRKY 가 식물에서 많이 존재하는 이유는 식물은 동물과 달리 이동이 불가능하여 한 지역에서 다양한 스트레스를 극복하기 위함이다. 현재까지 밝혀진 WRKY 의 기능을 살펴보면, 보리의 WRKY38 은 저온과 가뭄스트레스 상황에서 전사가 촉진 되었다 (Xiong *et al.* 2010). 또한 밀의 WRKY33 은 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 반응과 기능을 분석을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 스트레스 처리

본 연구는 유전자 클로닝을 위하여 난지형 잔디인 들잔디 (*Zoysia japonica* S. var 덕창)의 잎을 이용하였다. 유전자 기능 연구를 위한 형질전환 실험에는 모델 식물인 애기장대를 이용하였다. 들잔디는 야외 온실에서 상토와 모래를 혼합한 토양에 식재하여 배양 하거나 1/2 MS (2.2 g/L Murashige and Skoog medium including vitamin (MS, duchefa), 1.5% sucrose, 0.4% Agar)배지에서 무균배양 하였다. 들잔디의 종자는 종피를 제거한 후 0.02% Tween 20 과 2% NaOCl로 20분간 세척한 후 멸균된 증류수로 NaOCl을 씻어내고 1/2 MS배지에 파종 하였다. 애기장대는 상토와 펠라이트를 혼합한 토양에 식재하여 21℃, 장일 조건의 식물생장실에서 관리되었다.

2. RNA 추출 및 first cDNA의 합성

기내 성장된 들잔디 seedling 은 4 ℃에 24시간 처리한 후 *WRKY* 유전자의 cloning 을 위하여 수집하였다. 4 ℃ 처리된 들잔디 잎은 수집 즉시 액체질소에 급속 냉각 시켰다. 이 후 미리 냉각시킨 막자사발에 넣고 액체 질소를 이용하여 완전한 분말이 될 때까지 분쇄하였으며, 분쇄된 시료에 Trizol reagent 1 ml 을 첨가한 후 실온에서 10 분간 정치하였다. 이 후 13000 rpm 에서 10 분간 원심분리하고 상층액을 새 튜브에 옮겨 chloroform 200 ml 을 가한 후 강하게 흔들여 섞고, 3 분간 실온에 정치하였다. 이 후, 4 ℃, 15000 rpm 에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 분리하였으며, 동량의 isopropanol 을 첨가하였다. 이 후, 원심분리로부터 얻어진 pellet 을 70% ethanol 로 세척하였으며, 0.1% Dierhyl pyrocarbonate (DEPC) 용액이 처리된 RNase free water 를 이용하여 녹였다. 이 후, 추출한 total RNA 를 1% agarose gel 전기영동을 이용하여 확인하였다. 0.5 ul 의 oligo dT primer, M-MLV 5 x reaction buffer, 10 mM dNTP, 25 unit

RNasin Ribonuclease inhibitor, 200 unit M-MLV reverse transcriptase (Promega), 1 ug 의 RNA 는 1 st strand cDNA 합성을 위하여 사용되었으며, PCR Thermal Cycler Dice (Takara)를 이용하여 증폭하였다 (table 1, primer set 3).

3. WRKY 유전자들의 분리

들잔디로부터 WRKY 유전자들을 분리하기 위하여 NCBI GenBank data base 는 이용되었다. 먼저 WRKY 단백질의 아미노산 서열을 수집한 후, 보존된 WRKY domain 으로부터 degenerate primer 를 제작하였다. 이 후, 합성된 cDNA 를 주형가닥으로 이용하여 PCR 을 진행하였다. (Table 1, primer set 1,2; Table 2, condition 1).

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

4. ZjWRKY 유전자들의 상동성 분석

Phylogenetic tree 분석에는 MEGA 6 program 을 이용하였다. NCBI GenBank database 를 이용하여 이미 보고된 다른 WRKY 의 아미노산 서열을 수집하였으며, 들잔디로부터 분리된 두 개의 WRKY 유전자와 비교 분석 하였다. 이 후, bioedit program 을 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 (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 (HM173628), AtWRKY31 (NM_001341527), AtWRKY42 (NM_001340482)이다.

5. *ZjWRKY* 유전자들의 발현 분석

들잔디로부터 분리된 두 개의 *ZjWRKY* 유전자들의 발현분석을 위하여, 기내 배양된 들잔디의 seedling을 이용하였다. 먼저 ABA, ACC, H₂O₂는 각각 들잔디의 잎을 3 mM MES buffer에 담근 후 100 uM의 ABA 와 ACC, 15 uM의 H₂O₂를 처리하여 시간대 별로 샘플링 하여 Semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. 염 스트레스와 건조 스트레스 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 sample로부터 total RNA는 Trizol reagent이 용하여 추출하였으며, M-MLV Reverse transcriptase (Promega)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 후 semi-quantitative PCR과 IQTM SYBERGREEN supermix (BIO-RAD)를 이용한 real-time PCR을 수행하여 각 스트레스에 대한 발현을 분석하였다 (Table 1, primer set 14, 15; Table 2, condition 6)

6. 효모에서 *ZjWRKY* 단백질의 W-box 결합 분석

ZjWRKY 가 W-box 와의 결합 유무를 확인하기 위하여 Yeast one-hybrid assay (Matchmaker® Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System, Clontech)를 수행 하였다. *Zoysiagrass* chitinase (*Zjchi*)의 W-box 를 포함하는 두 개의 약 400 bp promoter 지역을 PCR 을 통하여 증폭하고 *Hind*III와 *Xho* I 을 사용하여 pBait-AbAi vector 에 삽입하였다 (Kang *et al.*, 2016). 확인된

pBait-AbAi vector 를 *BstB I* 을 사용하여 linearization 하고 Y1H gold yeast strain (Clontech)에 형질전환 한 후 PCR 을 통하여 유전자의 삽입을 확인 하였다. Full - length *ZjWRKY3* 과 *ZjWRKY7* 을 PCR 을 통하여 증폭 하였고 *HindIII*와 *Xho I* 을 사용하여 pGADT7-AD vector 에 삽입하여 실험에 사용하였다. 이전에 준비된 bait strain 을 SD/-Leu/AbA 배지에 plating 하여 테스트하고 bait strain 에 pGADT7-AD vector 를 형질전환 하였다. 형질전환 반응물을 희석하여 SD/-Leu, SD/-Leu/AbA 배지에 도말하고 30 °C에서 3 일간 배양한 후 결과를 확인 하였다.

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

Table 2. List of PCR conditions using zoysiagrass *WRKY* genes cloning

condi tions	Reaction mixture	Genes	Initial denaturation					Final extension		Cycle
			Denaturation		Annealing		Extension			
1	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 2 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 2 ul, 1 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase (Takara), 50 pmol each primer set 0.4 ul	<i>ZjWR</i> <i>KY3</i>	94℃	94℃	55℃	72℃	72℃	30		
		<i>ZjWR</i> <i>KY7</i>	5 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min			
2	cDNA 50 ng, 10 × Ex Taq buffer 2 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 2 ul, 0.5 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase (Takara), 10 pmol each primer set 0.5 ul	<i>ZjWR</i> <i>KY3</i>	94℃	94℃	60℃	72℃	72℃	30		
		<i>ZjWR</i> <i>KY7</i>	3 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min			
3	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 5 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 8 ul, 5 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase (Takara), 20 pmol each primer set 0.5 ul	<i>ZjWR</i> <i>KY3</i>	94℃	94℃	65℃	72℃	72℃	30		
		<i>ZjWR</i> <i>KY7</i>	3 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min			
4	PCR product 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 5 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 8 ul, 5 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase (Takara), 20 pmol each primer set 0.5 ul	<i>ZjWR</i> <i>KY3</i>	94℃	94℃	58℃	72℃	72℃	30		
		<i>ZjWR</i> <i>KY7</i>	3 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min			
5	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 3 ul, dNTP mixture of each 2.5 mM 3 ul, 1 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase (Takara), 10 pmol each primer set 0.4 ul	<i>ZjWR</i> <i>KY3</i>	94℃	94℃	58℃	72℃	72℃	30		
		<i>ZjWR</i> <i>KY7</i>	3 min	30 sec	30 sec	30 sec	10 min			

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. WRKY 유전자들의 클로닝

WRKY family 유전자를 클로닝하기 위하여 NCBI를 통하여 기존에 보고된 환경스트레스에 반응하는 다른 작물의 WRKY family 유전자들의 염기서열을 수집하였다. 보존된 WRKY domain 지역에서 degenerate 프라이머를 디자인하여 RT-PCR을 수행한 결과, 약 900 bp 와 600 bp 위치에서 band가 형성되었다 (Fig. 1). 증폭된 DNA를 pGEMT easy 벡터에 삽입하여 염기서열을 확인 하였다. 이 염기서열을 Blast를 통해 분석한 결과 첫 번째 단편은 *Triticum aestivum* WRKY2 (*TaWRKY2*)과 97%의 상동성을 나타냈다. TaWRKY2은 WRKY domain을 포함하는 group I WRKY로 열, 건조, 노화 등의 스트레스에 의해 전사가 촉진되고, 과발현 시켰을 경우 건조 및 염 스트레스에 대한 식물체의 내성을 증가 시키는 것으로 보고되었다 (Niu *et al.*, 2012). 두 번째 단편은 *Oryza sativa* WRKY71 (*OsWRKY71*)과 99%의 상동성을 나타내었고, 방어 신호전달물질인 salicylic acid (SA)와 methyl jasmonate (MeJA)에 반응 하는 것으로 보고되었다. 벼에서 *OsWRKY71*을 과발현 시켰을 때 벼 흰빛잎마름병을 유발하는 *Xanthomonas oryzae* pv.에 대한 내성을 나타내었다 (Liu *et al.* 2007). 따라서 본 연구에서 분리된 두 단편 모두 환경스트레스에 유도되는 WRKY 유전자일 것으로 예상하였고, 1702 bp 길이의 첫 번째 단편은 *ZjWRKY3*로, 975 bp 길이의 두 번째 단편은 *ZjWRKY7*로 명명하였다 (Fig. 1).

(A)

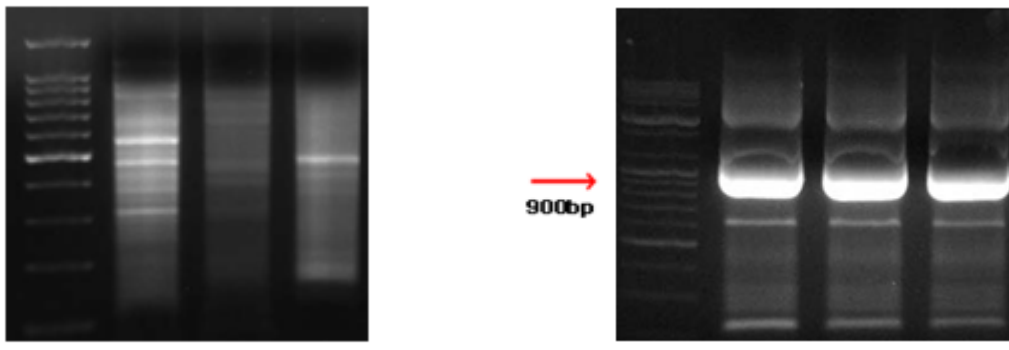
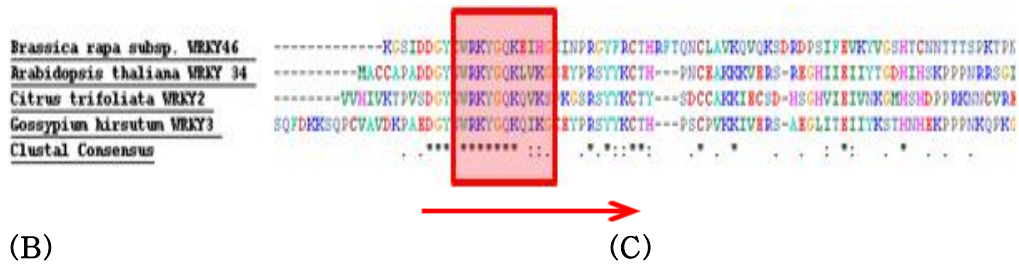


Figure 1. Design of degenerate primers for *WRKY* genes cloning and RT-PCR. (A) Alignment of the amino acid sequence *WRKY* genes in NCBI GeneBank. The red box appeared forward primer sequence to amplify of *WRKY* fragments. (B) From RT-PCR using the primers designed in *WRKY* domain amplified band. (C) In second PCR using the primers including *WRKY* domain produced band of approximately 900 bp.

2. Full-length WRKY유전자들의 클로닝

Degenerate PCR을 통해 얻은 염기서열을 바탕으로 3' RACE에 사용될 프라이머를 제작하였다. 3' RACE를 진행한 결과 첫 번째 단편은 약 1.1 Kbp에서 밴드가 형성되었고, 두 번째 단편은 약 600 bp에서 형성되었다. 3' RACE를 통해 증폭된 단편은 각각 pGEMT easy 벡터에 삽입하여 염기서열을 확인 하였다. 확인된 염기서열을 바탕으로 5' RACE를 위한 프라이머를 제작하여 PCR을 진행하였다. 5' RACE 결과 첫 번째 단편은 500 bp, 두 번째 단편은 650 bp의 밴드를 확인할 수 있었다. 5' RACE를 통하여 얻은 두 개의 단편 역시 각각 pGEMT easy 벡터에 삽입하여 염기서열을 확인 하였다. 3'/5' RACE 결과를 통하여 각 유전자의 full-length 염기서열을 예상할 수 있었고, 이 염기서열을 바탕으로 full-length WRKY유전자를 클로닝 하기 위한 프라이머를 제작하였다. 제작한 프라이머를 이용하여 PCR한 결과 첫 번째 단편은 약 1.7 Kbp, 두 번째 단편은 약 1 Kbp에서 밴드가 형성되었다. Full-length WRKY유전자들의 염기서열을 분석한 결과 첫 번째 단편은 ZmWRKY52와 81%의 상동성을 나타냈으며 ZmWRKY52는 아직까지 기능이 보고되지 않았다 (Fig. 2A). 두 번째 단편은 OsWRKY76과 75%의 상동성을 보였다 (Fig. 2B). OsWRKY76은 벼가 냉해를 심하게 입었을 때 일어나는 도열병에 대한 저항성과 저온 스트레스에 대한 저항성을 나타내는 것으로 보고되었다 (Yokotani *et al.*, 2013). 따라서 본 연구에서 분리된 두 단편 모두 환경스트레스에 유도되는 WRKY유전자일 것으로 예상하였고, 1702 bp 길이의 첫 번째 단편은 ZjWRKY3로, 975 bp 길이의 두 번째 단편은 ZjWRKY7로 명명하였다 (Fig. 1B).

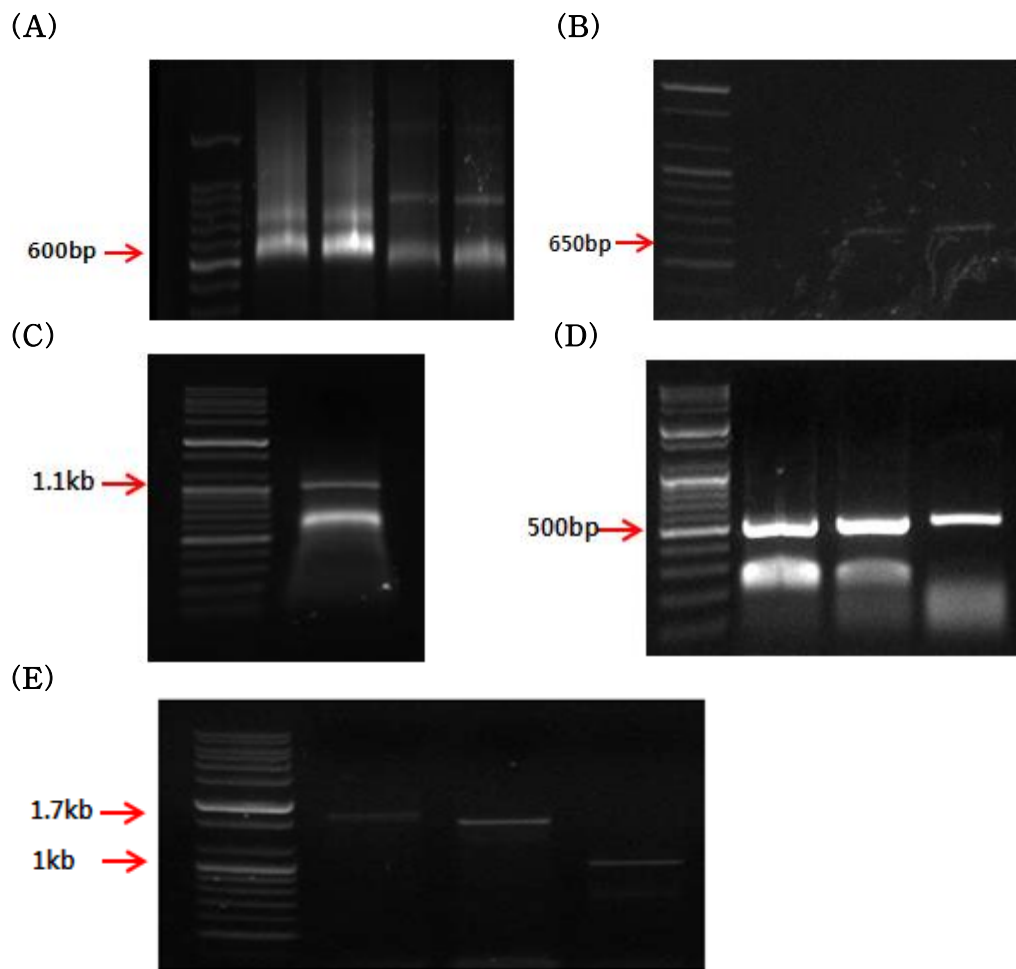


Figure 2. Cloning of *WRKY* genes depending on PCR from zoysiagrass. Agarose gel electrophoresis result analysis of 3' RACE (A) and (C). 3' RACE PCR produced PCR products of 600 bp and 1.1 Kbp, respectively. Agarose gel electrophoresis result analysis of 5' RACE (B) and (D). 5' RACE PCR produced PCR products of 650 bp and 500 bp, respectively. (E) RT-PCR using the full-length primers.

3. Full-length WRKY 유전자의 구조적 특성확인 및 상동성

기존에 보고된 기능이 알려진 다른 작물들의 *WRKY* 유전자들을 NCBI GeneBank 에서 수집한 다음, MEGA6 프로그램을 이용하여 Full-length *WRKY* 유전자의 전체 ORF 부분을 기존에 기능이 알려진 다른 식물들의 *WRKY* family 유전자들과 분석하였다 (Fig. 3). 그 결과 ZjWRKY7 은 TaWRKY16, GmWRKY13, AtWRKY18, AtWRKY60, OsWRKY76, AtWRKY40 을 포함하여 groupII 에 속한 것을 확인할 수 있었고, 이 groupII 에 속하는 유전자들은 염 스트레스와 삼투 스트레스 등에 반응하는 것으로 보고되었다 (Chen *et al.* 2012). ZjWRKY3 은 TaWRKY1, ZmWRKY52, TaWRKY17, TaWRKY27, NtWRKY1, OsWRKY33, TaWRKY13, TaWRKY18 을 포함하는 groupIII 에 속한 것을 확인할 수 있었다. (Eulgem *et al.*, 2000). ZjWRKY3 과 같은 그룹에 속한 TaWRKY1 은 고온, 노화, 건조 스트레스에 반응하고 과발현 시켰을 때 건조스트레스에 대한 내성을 나타낸다고 보고되었다(He *et al.* 2016). GroupIII 에 속하는 유전자들은 여러 가지 환경 스트레스에 대해 반응하였으며 세포사멸경로에도 관여하는 것으로 보고되었다 (He *et al.*, 2016; Ogata *et al.*, 2015). ZjWRKY3 과 ZjWRKY7 은 하나의 domain 을 포함하는 비교적 가까운 subfamily 에 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 달라 질 수 있고, 이러한 차이 때문에 유전자 발현과정에서 변화가 생길 것으로 예상된다 (Eulgem *et al.*, 2007).

4. ZjWRKY 유전자들의 phylogenetic tree 분석

기존에 보고된 기능이 알려진 다른 작물들의 WRKY 유전자들을 NCBI GeneBank를 통하여 수집한 다음, MEGA6 프로그램을 이용하여 분석하였다.

그 결과 ZjWRKY7은 TaWRKY16 (EU665428), GmWRKY13 (DQ322694), AtWRKY18 (JN848519), AtWRKY60 (NM_001335968), OsWRKY76 (BK005079), AtWRKY40 (NM_106732), TaWRKY1 (KT285206), TaWRKY42 (EU665456), TaWRKY5 (EU665434), AtWRKY53 (NM_118512), TaWRKY19 (EU665430), AtWRKY6 (HM173628), AtWRKY31 (NM_001341527), AtWRKY42 (NM_001340482)을 포함하여 group II에 속한 것을 확인할 수 있었고, ZjWRKY3은 ZmWRKY52 (KJ728370), TaWRKY17 (EU665429), TaWRKY27 (EU665431), NtWRKY1 (AB022693), OsWRKY33 (BK005036), TaWRKY13 (EU665426), TaWRKY18 (EU665443)을 포함하는 group III에 속한 것을 확인할 수 있었다.

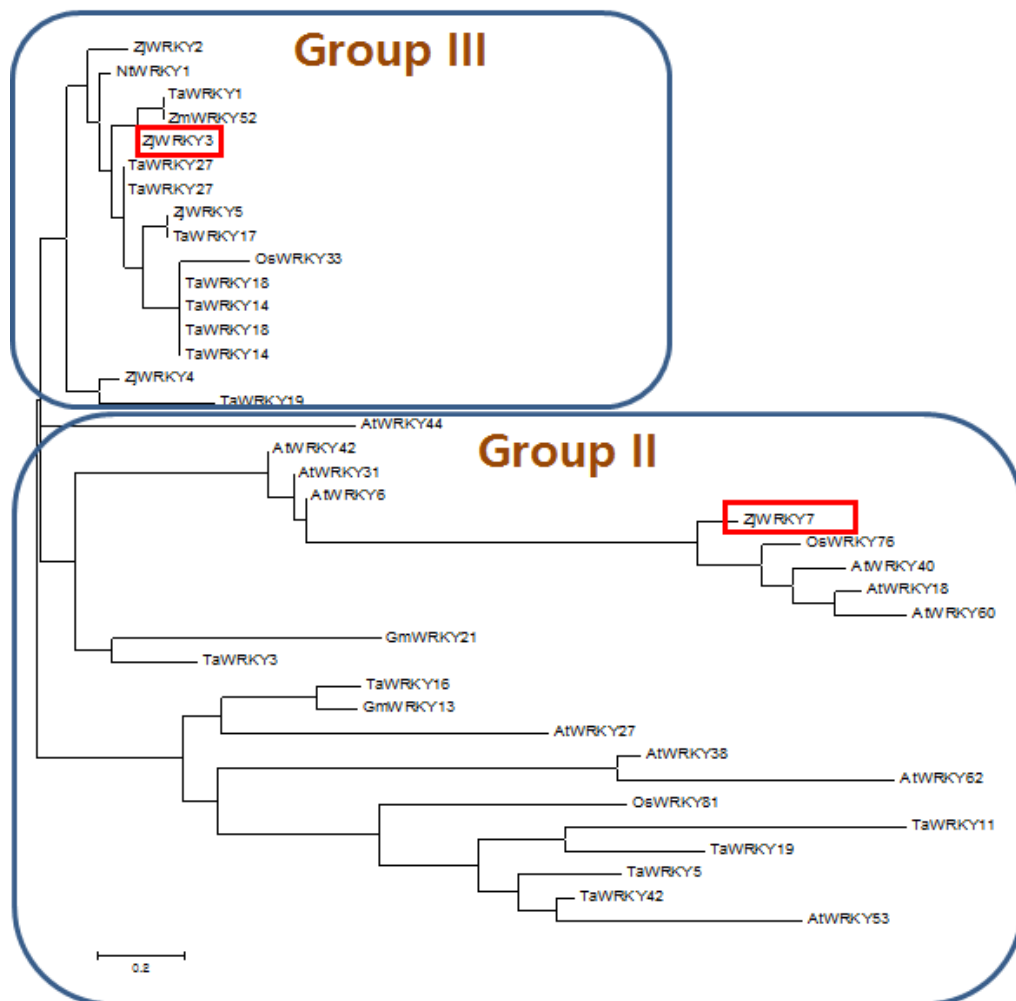


Figure 4. Phylogenetic analysis of ZjWRKY in context with other closely related WRKY proteins. The bootstrapped tree was constructed using Clustal W and MEGA 6 software. Red box indicates the ZjWRKY. Significant homologies and close phylogenetic relations with other WRKYs.

5. ZjWRKY 유전자들의 발현분석

WRKY는 외부 환경의 신호를 전달하는 전사인자로 보고되어 있다 (Eulgem T *et al.* 2000). 들잔디에서 분리한 ZjWRKY3, ZjWRKY7도 이미 보고된 바와 같이 환경스트레스에 대한 반응여부를 조사하였다. 들잔디를 활용하는 골프장 및 운동장에서 요구되는 조건은 저온에 강하며 건조를 잘 견디는 것이다. 또한 간척지 및 해안가의 공원에서조차 생존이 요구된다 (Kim 2005). 따라서 본 연구에서는 들잔디의 활용에 요구되는 환경조건을 기준으로 들잔디에서 분리한 ZjWRKY3, ZjWRKY7의 발현을 분석하였다. 먼저 노화스트레스 (ABA, ACC)와 산화스트레스 (H_2O_2)는 각각 들잔디의 잎을 3 mM MES buffer에 담근 후 100 μ M의 ABA 와 ACC, 15 μ M의 H_2O_2 를 처리하여 시간대 별로 샘플링 하여 분석했다. H_2O_2 처리구는 ZjWRKY3과 ZjWRKY7 모두 6시간째에 대조구와 비슷한 발현을 유지하다가 16시간부터 둘 다 발현이 감소하는 패턴을 보였다. ABA 처리구에서 ZjWRKY3은 대조구보다 발현양이 증가했지만 ZjWRKY7은 6시간에 증가 했다가 16시간에 발현양이 감소하였고 다시 24시간에 증가 하였다. ACC 처리구 에서는 ZjWRKY3과 ZjWRKY7모두 약하게 발현이 증가하는 패턴을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 저온 (4 $^{\circ}$ C) 조건에서의 발현을 분석한 결과 ZjWRKY3은 저온 처리 후 24시간 까지 지속적으로 증가하여 대조구를 기준으로 발현이 약 4배 증가하였고, ZjWRKY7은 저온 처리 후 초기에는 큰 변화를 보이지 않았으나 48시간에서 대조구를 기준으로 발현이 약 2배 증가하였다 (Fig. 6A). 건조에 대한 반응을 분석하기 위해 건조와 동일한 효과를 보이는 mannitol을 처리한 결과 ZjWRKY3과 ZjWRKY7은 각각 2시간, 8시간 후에 발현이 약 1.5배 증가하였다 (Fig. 6B). 염에 대한 반응은 ZjWRKY3은 2시간 후에 발현이 약 2배 증가하였고, ZjWRKY7은 8시간 후에 발현이 약 4배 증가하였다 (Fig. 6C). ZjWRKY3, ZjWRKY7 모두 저온 스트레스를 처리했을 때 시간이 지남에 따라 발현양이 증가하였다. ZjWRKY3은 건조, 염 스트레스 처리 시 2시간 후에 발현양이 소폭 증가 하였고, ZjWRKY7은 건조, 염 스트레스 처리 시 8시간 후에 발현양이 증가하였다. 본 결과로 ZjWRKY3, ZjWRKY7 모두 저온, 건조, 염의 조건에서 발현이 증가한 결과는 이미 알려진 WRKY와 동일하게 환경스트레스의 저항성에 기여할 것으로 예상된다

다. 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*을 처리한 결과 *ZjWRKY3*은 처리 후 3일부터 증가하여 4일에 대조구 기준으로 발현이 약 2.5배 증가하였고, *ZjWRKY7*은 처리 후 지속적으로 증가하여 3일부터 4일까지 급속도로 증가하여 대조구 기준으로 발현이 약 35배 증가하였다 (Fig. 7). *R. solani*를 처리한 결과에서는 *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* 모두 발현양이 증가하였고, 특히 *ZjWRKY7*은 *ZjWRKY3*에 비하여 발현양이 약 10배 이상 증가하였다. *ZjWRKY7*과 상동성이 가장 높은 *OsWRKY76*은 벼 도열병에 대한 내성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다 (Yokotani *et al.*, 2013). 따라서 *ZjWRKY7*도 병 저항성 메커니즘에서 더욱 중요한 역할을 할 것으로 예측된다.

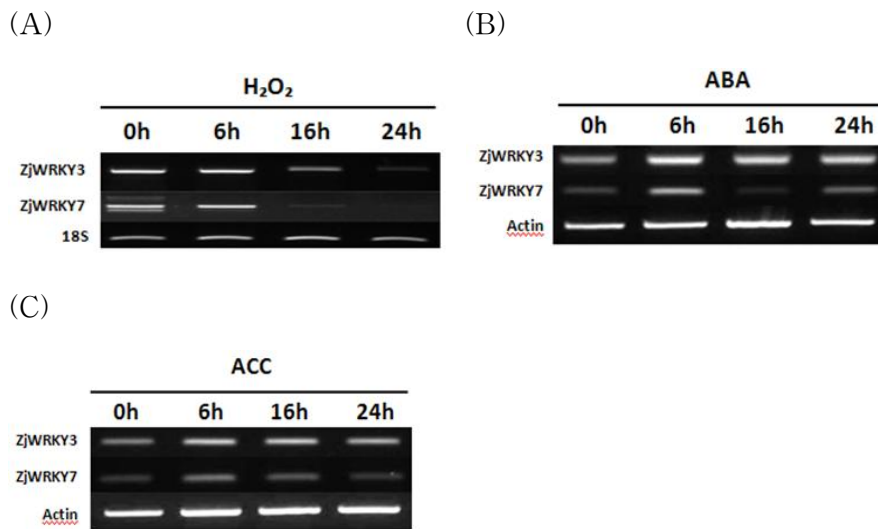


Figure 5. The expression analyses of the *ZjWRKY* in response to abiotic stress in *Zoysia japonica*. Expression profiling of *ZjWRKY* under various stress stimuli. a Semi-quantitative RT-PCR analysis of expression of *ZjWRKY* in leaves of *Zoysia japonica*. At different time points after various stress treatments as visualized on a 1.5% agarose gel. *18S* rRNA, *actin* were amplified as RT-PCR controls. (A) H₂O₂, oxidative stress; (B) ABA, senescence stress; (C) ACC, regulate ethylene production.

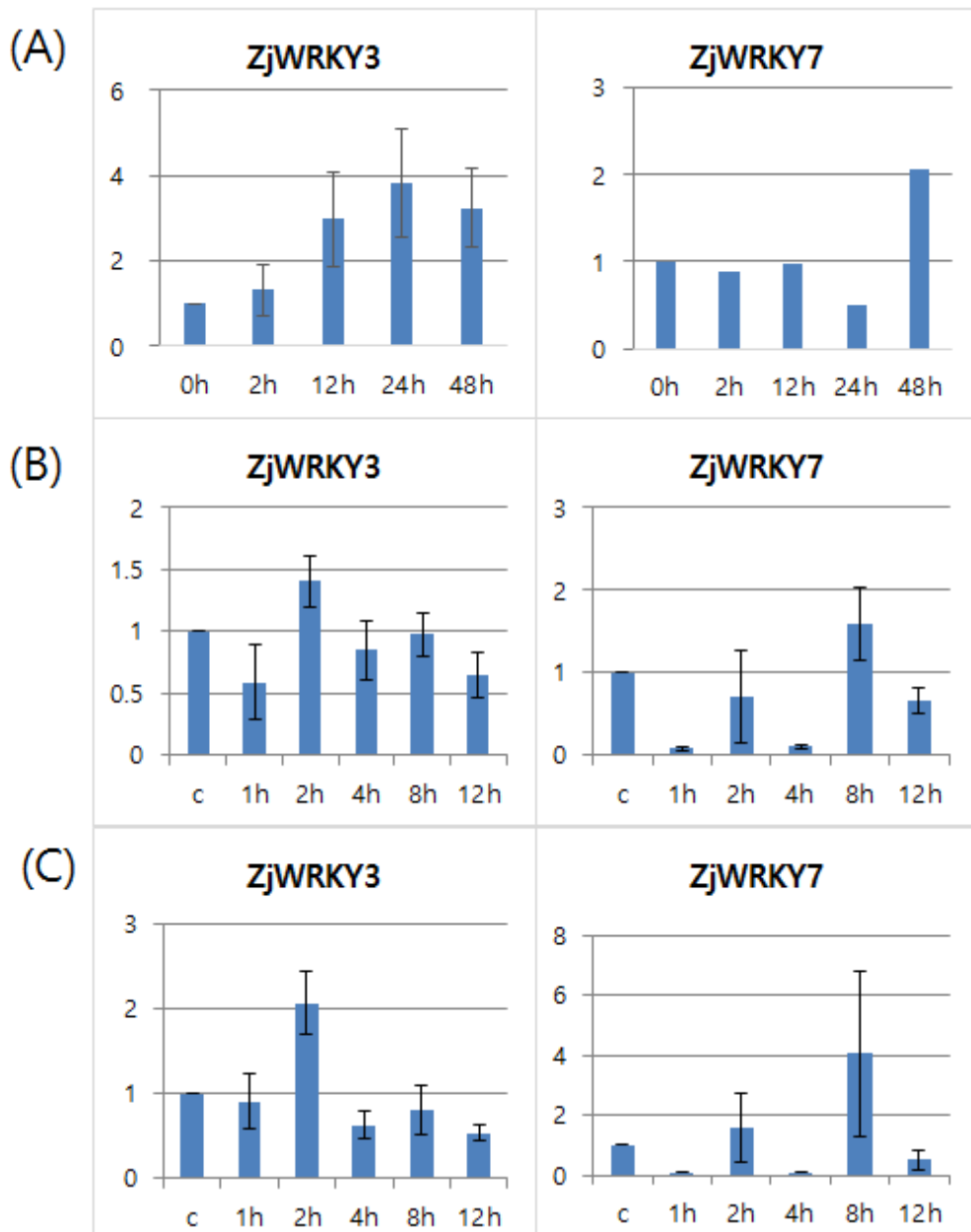


Figure 6. Expression profiles of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* under treatments with 4°C, drought, salt, in zoysiagrass leaves. The *actin* gene was used as an internal control for qRT-PCR. The Y-axis indicates the relative expression level; X-axis indicated hours of stress treatment. (A) Expression profiles of *ZjWRKY* genes under cold (4 °C), (B) drought (100 mM Mannitol) and (C) salinity (100 mM NaCl) growth conditions, respectively.

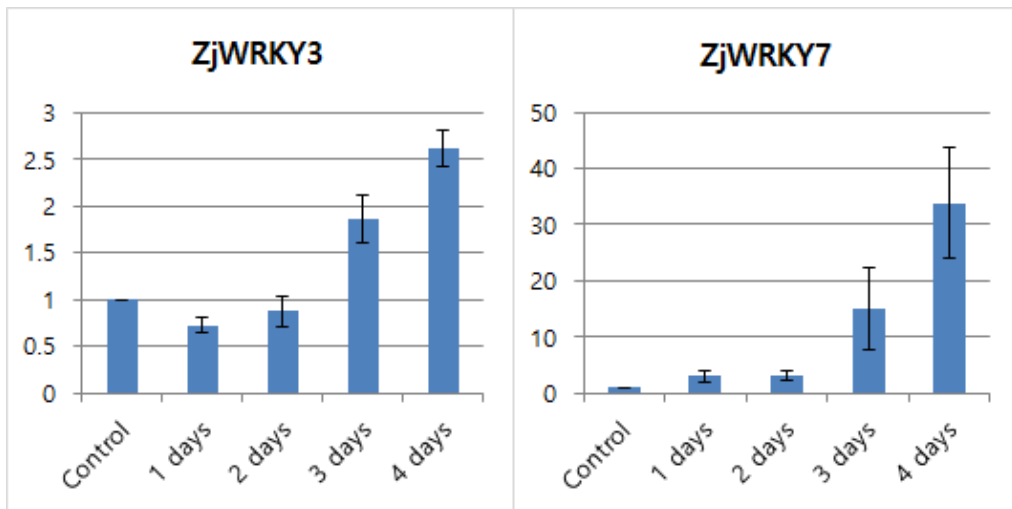


Figure 7. Expression profiles of *ZjWRKY3*, *ZjWRKY7* under treatments *R. solani* in zoysiagrass leaves. The *actin* gene was used as an internal control for qRT-PCR. The Y-axis indicates the relative expression level; X-axis (1, 2, 3 and 4 d) indicated days of stress treatment.

6. 효모에서 ZjWRKY3, ZjWRKY7의 W-box 결합 분석

식물 WRKY 은 수많은 방어관련 유전자의 프로모터에서 TGAC core sequence 을 포함하는 다양한 W-box 에 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-box 와 ZjWRKY3, ZjWRKY7 의 특이적 결합에 대해 yeast one-hybrid system 을 사용하여 분석하였다. Prey vector 인 pGADT7-AD vector 의 GAL4 활성화 도메인과 ZjWRKY3, ZjWRKY7 유전자를 fusion 시킨 후 클로닝 하여 확인하였다. 그리고 Bait vector 인 pBait-AbAi vector 의 Aureobasidin A (AbA) 에 저항성을 나타내는 AUR1-C 와 zoysiagrass Zjchi 유전자 promoter 지역의 W-box (TTGACC)를 포함하는 약 400 bp 의 서열을 fusion 시킨 후 클로닝 하였다. 그리고 Yeast strain Y1HGold 에 형질전환 하였다. 선별마커 AbA 를 넣은 SD/-Leu/AbA 배지에서는 pGADT7-WRKY3/WRKY7 과 pBait-W-box 를 같이 넣은 경우에만 효모가 증식 하였다. 반면에 pGADT7-WRKY3/WRKY7 만 넣은 경우와 pBait-W-box 만 넣은 경우에 효모가 자라지 않았음을 확인할 수 있었다. 음성대조구로 사용 된 pBait-AbAi, pGADT7-AD 만 넣은 경우에는 효모가 증식하지 않았으며, AbA 를 넣지 않은 양성 대조 구에서는 모두 효모가 증식하였다 (Fig. 8).

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

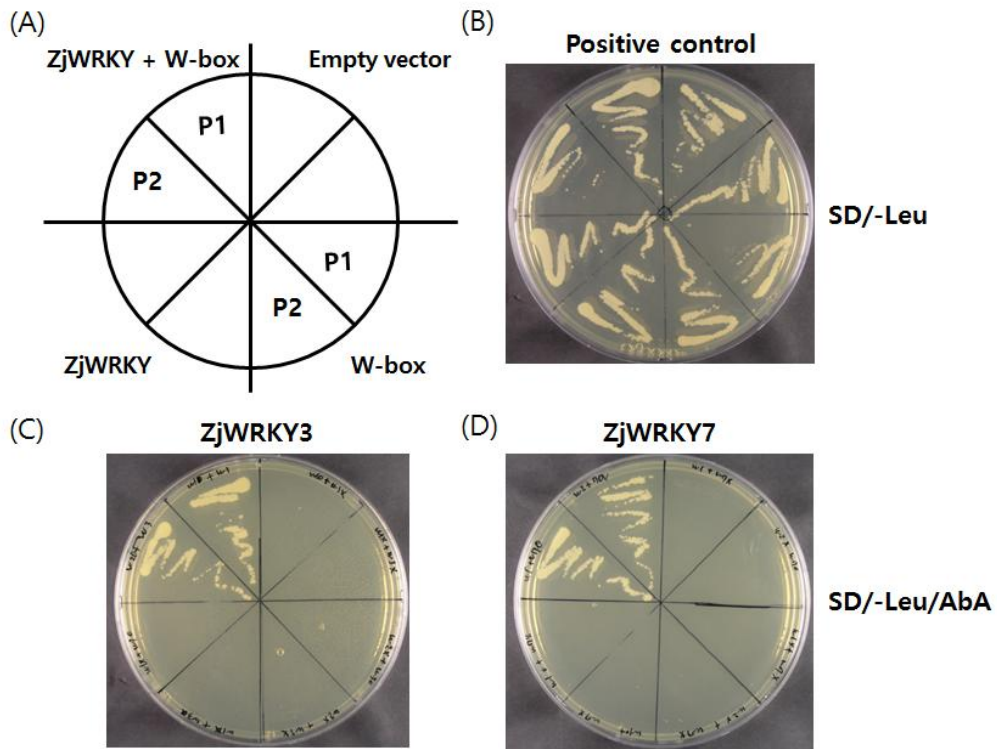


Figure 8. Analysis of the W-box binding activity of ZjWRKY using a yeast one-hybrid system. (A) Schematic diagrams. (B) Positive control. (C) ZjWRKY3 bind to W-box(P1, P2). (D) ZjWRKY7 bind to w-box (P1, P2). P1, promoter region 1. P2 promoter region 2.

IV. 종합고찰

본 연구에서는 들잔디에서 저온스트레스에 의해 유도되는 WRKY family 유전자의 클로닝을 실시하기 위하여 실험을 수행하였다. WRKY family 는 식물 특이적 전사인자로서, N 말단 지역에 보존된 WRKYGQK서열 과 C 말단 지역에 zinc finger-like motif를 가진다. WRKY 단백질은 domain의 개수에 따라 두 개의 WRKY domain을 포함하는 group I, 하나의 domain을 포함하는 group II 와 III로 구분 되며, 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 조절한다고 보고되었다 (Eulgem T *et al.* 2000).

WRKY family의 보존된 WRKY domain지역을 바탕으로 degenerate PCR을 수행하여 partial cDNA를 분리하였다. 분리된 partial cDNA sequence를 기반으로 하여 5'/3'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE)를 수행하였다. 5'/3'-RACE sequence에 기반하여 두 개의 full-length WRKY 유전자들을 cloning하였다. full-length WRKY 유전자들의 염기서열을 분석한 결과 첫 번째 단편은 ZmWRKY52와 81%의 상동성을 나타냈으며 ZmWRKY52는 아직까지 기능이 명확하게 보고되지 않았다. 두 번째 단편은 OsWRKY76과 75%의 상동성을 보였다. OsWRKY76은 벼가 냉해를 심하게 입었을 때 일어나는 도열병에 대한 저항성과 저온 스트레스에 대한 저항성을 나타내는 것으로 보고되었다 (Yokotani *et al.*, 2013). 따라서 본 연구에서 분리된 두 단편 모두 환경스트레스에 유도되는 WRKY 유전자일 것으로 예상하였고, 1702 bp 길이의 첫 번째 단편은 ZjWRKY3로, 975 bp 길이의 두 번째 단편은 ZjWRKY7로 명명하였다.

여러 가지 환경스트레스 중 건조스트레스와 염스트레스는 보통 식물의 생장, 발달, 생존에 영향을 주는 스트레스이고, 일부 WRKY 단백질이 식물에서 건조스트레스와 염스트레스에 반응 하는 것으로 보고되었다 (Chen *et al.*, 2012). 예를 들어 벼의 OsWRKY11은 *HSP101* 프로모터의 조절 하에 과발현 시켰을 때 노화 지연 및 생존력이 향상되었다 (Wu *et al.*, 2009). 따라서 분리된 ZjWRKY3,

ZjWRKY7 역시 환경스트레스에 반응하는지 확인하기 위하여 여러 가지 환경스트레스 조건 하에서 발현분석을 수행하였다. 환경스트레스와의 관련성을 보기 위하여 ABA, ACC, NaCl, Mannitol, 그리고 저온스트레스를 처리하고 real-time PCR을 이용하여 분석하였다. ZjWRKY3의 경우 염, 건조, 저온 스트레스에 의하여 발현이 증가한 반면, ZjWRKY7의 경우에는 동일한 조건하에서 발현이 증가하였지만 건조, 염 스트레스에서 발현양의 증감을 반복하였다. 따라서 염, 건조 스트레스 조건 하에서 ZjWRKY7의 발현은 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

앞선 계통분석 결과에서 ZjWRKY7이 병과 관련된 OSWRKY76와 근연관계를 나타내었고, ZjWRKY7과 구조적으로 가까운 AtWRKY18, AtWRKY40, AtWRKY60은 상호작용을 통하여 환경스트레스와 생물학적 스트레스 모두에 반응하는 것으로 보고되었다 (Banerjee *et al.* 2015). 따라서 ZjWRKY3과 ZjWRKY7이 질병에 관련이 있을 것으로 예상하고 기내에서 성장된 zoysiagrass seedling에 *Rhizoctonia solani*를 처리한 후 4일간의 발현 패턴을 분석하였다. *R. solani*을 처리한 결과 ZjWRKY3은 처리 후 3일부터 증가하여 4일에 대조구 기준으로 발현이 약 2.5배 증가하였고, ZjWRKY7의 경우는 *R. solani* 처리 4일 후에 control에 비해서 약 35배 정도로 상당히 증진된 발현을 보였다. 이 결과는 ZjWRKY7이 ZjWRKY3에 비해 pathogen 침투 시 더 중요한 역할을 할지도 모른다는 것을 예상하게 하는 결과이다. 분리된 ZjWRKY7의 phelogenetic tree 분석결과 병 저항성에 연관 있음을 보였으며, 발현 분석 결과에서도 *Rhizoctonia solani*에 강하게 유도되어졌다. 이에 따라 이 ZjWRKY7이 병 저항성과 관련된 transcription factor로 예상을 하였다. 기존에 보고되어진 논문에서 WRKY단백질이 담배의 chitinase유전자의 프로모터 지역에 존재하는 w-box에 결합하여 하위 스트레스관련 유전자들의 발현을 조절하였다 (Yang *et al.* 1999). 따라서 ZjWRKY3, ZjWRKY7 또한 zoysiagrass 안에서 병 저항성 관련 유전자와 상호작용 할 것이라는 가설을 세웠고, 이것을 증명하고자 yeast one hybrid system을 이용하여 실험을 수행하였다. 실험을 수행한 결과 ZjWRKY유전자가 w-box에 결합하여 reporter gene의 전사를 활성화 시킨 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 ZjWRKY7이 병저항성 관련 유전자인 zoysiagrass chitinase 유전자의 발현을

조절하며, 그 과정에서 W-box가 중요한 역할을 한다는 사실을 보여주는 결과이다. 따라서 이 두 개의 유전자의 상호작용이 들잔디의 병 저항성 메커니즘에 있어 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

결론적으로 들잔디에서 WRKY유전자를 클로닝 하였으며, 이 유전자들이 환경 스트레스 및 생물학적 스트레스에 유도되고 있음을 확인하였다. 클로닝된 ZjWRKY3과 ZjWRKY7을 들잔디에서 과발현 시켜 스트레스 저항성과 관련된 기능을 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

- Banerjee, A., & Roychoudhury, A. (2015). WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. *The Scientific World Journal*, 2015. Article ID 807560, 17 pages
- 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.
- Ciolkowski, I., Wanke, D., Birkenbihl, R. P., & Somssich, I. E. (2008). Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant molecular biology*, 68(1-2), 81-92.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, 16(6), 735-743.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., & Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in plant science*, 5(5), 199-206.
- Eulgem, T., & Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology*, 10(4), 366-371.

- Golldack, D., Lüking, I., & Yang, O. (2011). Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant cell reports*, 30(8), 1383-1391.
- He, G. H., Xu, J. Y., Wang, Y. X., Liu, J. M., Li, P. S., Chen, M., ... & Xu, Z. S. (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, J. N., Kang, H. G., Sun, H. J., Kwon, Y. I., Yang, D. H., Ko, S. M., & Lee, H. Y. (2016). Molecular cloning and characterization of chitinase genes from zoysiagrass (*Zoysia Japonica* Steud.). *Plant Biotechnology Reports*, 1-13.
- Kyoung-Nam Kim (2005) introductory turfgrass science. Sahmyook university publishing department
- Lee, H. Y. (2003). Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecules and Cells*, 16(1), 19-27.
- 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.
- NIU, C. F., Wei, W., ZHOU, Q. Y., TIAN, A. G., HAO, Y. J., ZHANG, W. K., ... & CHEN, S. Y. (2012). Wheat WRKY genes TaWRKY2 and TaWRKY19 regulate abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *Plant, cell & environment*, 35(6), 1156-1170.
- Ogata, T., Okada, H., Kawaide, H., Takahashi, H., Seo, S., Mitsuhara, I., & Matsushita, 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, S. Y., Kumar, N., Venkatesh, P. N., & 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, C. H., Kang, J. G., Lim, Y. P., Adachi, T., Riu, K. Z., & Jung, W. C., Shin, T. S., Kim, B. S., Im, J. S., Lee, J. H., & Kim, J. W. (2008). Efficacy of antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia* blight (large patch) on zoysiagrass. *Research in Plant Disease*, 14(1), 43-50.
- Ülker, B., & Somssich, I. E. (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current opinion in plant biology*, 7(5), 491-498.
- 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.
- Wu, X., Shiroto, Y., Kishitani, S., Ito, Y., & Toriyama, K. (2009). Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant cell reports*, 28(1), 21-30.
- Xiong, X., James, V. A., Zhang, H., & Altpeter, F. (2010). Constitutive expression of the barley HvWRKY38 transcription factor enhances drought tolerance in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge).

Molecular Breeding, 25(3), 419-432.

Yang, P., Chen, C., Wang, Z., Fan, B., & Chen, Z. (1999). A pathogen and salicylic acid induced WRKY DNA binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *The Plant Journal*, 18(2), 141-149.

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.

감사의 글