

들잔디로부터 β -1,3-glucanase 유전자의 클로닝 및 특성분석

강소미 · 강홍규 · 선현진 · 양대화 · 권용익 · 고석민 · 이효연

Molecular cloning and characterization of β -1,3-glucanase gene from *Zoysia japonica* steud

So-Mi Kang · Hong-Gyu Kang · Hyeon-Jin Sun · Dae-Hwa Yang · Yong-Ik Kwon · Suk-Min Ko · Hyo-Yeon Lee

Received: 12 December 2016 / Revised: 19 December 2016 / Accepted: 20 December 2016

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Rhizoctonia leaf blight (large patch) has become a serious problem in Korean lawn grass, which is extremely hard to treat and develops mostly from the roots of lawn grass to wither it away. Rhizoctonia leaf blight (large patch) is caused by *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV). To develop zoysia japonica with strong disease tolerance against this pathogenic bacterium, β -1,3-glucanase was cloned from zoysia japonica, which is one of the PR-Proteins known to play a critical role in plant defense reaction. β -1,3-glucanase is known to be generated within the cells when plant tissues have a hypersensitive reaction due to virus or bacterium infection and secreted outside the cells to play mainly the function of resistance against pathogenic bacteria in the space between the cells. This study utilized the commonly preserved part in the sequence of corn, wheat, barley, and rice which had been researched for their disease tolerance among the β -1,3-glucanase monocotyledonous plants. Based

on the part, degenerate PCR was performed to find out the sequence and full-length cDNA was cloned. *E.coli* over-expression was conducted in this study to mass purify target protein and implement *in vitro* activation measurement and antibacterial test. In addition, to interpret the functions of ZjGlu1 gene, each gene-incorporating plant transformation vectors were produced to make lawn grass transformant. Based on ZjGlu1 protein, antibacterial activity test was conducted on 9 strains. As a result, *R. cerealis*, *F. culmorum*, *R.solani* AG-1 (1B), and *T. atroviride* were found to have antibacterial activity. The gene-specific expression amount in each organ showed no huge difference in the organs based upon the transformant and against 18s gene expression amount.

Keywords Beta-1,3-glucanase, Zoysiagrass, Over-expression, Antibacterial activity

S.-M. Kang · H.-G. Kang · H.-J. Sun · D.-H. Yang · Y.-I. Kwon
제주대학교 아열대원예산업연구소
(Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju, 63243, Republic of Korea)

S.-M. Ko (✉)
Omicsis. Inc.
(BVC, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 34141, Korea)
e-mail: heyna@jejunu.ac.kr

H.-Y. Lee (✉)
제주대학교 아열대원예산업연구소
(Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju, 63243, Republic of Korea)
제주대학교 분자생명공학전공
(Faculty of Biotechnology, Jeju National University, jeju 63243, Korea)
e-mail: hyoyeon@jejunu.ac.kr

서론

잔디는 화분과 작물로 생육적온에 따라 난지형과 한지형 잔디로 분류된다. 난지형 잔디는 여름철 고온 및 건조에 강한 품종이나, 추위에 약하고 녹기 유지기간이 짧은데 반해, 한지형 잔디는 추위에 강하며 녹도 및 밀도가 높은 장점이 있지만, 고온 및 건조에 취약하여 여름철에는 관리가 까다롭다(Ganesan et al. 2012). 들잔디는 한국을 비롯한 일본, 중국 등 동아시아 지역을 중심으로 매우 중요하게 사용되는 품종이다. 고온 및 건조에 강하고, 병해충에도 잘 견디며 척박한 토양에서도 생육이 왕성하여 골프장, 경기장, 도로법면, 하천제방 등 다양한 곳에 이용되고 있다(Ge et al. 2006; Toyama et al. 2003).

우리나라에서 재배되고 있는 잔디는 들잔디류(*Zoysia* spp.)의 난지형 잔디가 95.7%를 차지하여 주류를 이루고 있고, 우리나라에서 잔디가 소비되는 주요 소비처가 도로사면의 사방용이나 모지 뗏장 조성용(72.4%)으로(Lee et al. 2001) 이곳에서 들잔디가 주로 사용되기 때문에 재배 농가도 난지형 잔디를 재배하는 비율이 높으며, 야생화, 자생란, 조경수, 분재와 함께 산림청의 관광산림식물류에 속하는데 2011년 임산물 생산자료에 의하면 생산액은 349억원으로 야생화 335억원이나 분재 308억원보다 많다(Bae et al. 2013).

한국형 잔디에는 *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV)가 일으키는 라이족토니아잎마름병(라지패취), *Rhizoctonia cerealis*가 일으키는 황색마름병과 *Sclerotinia homoeocarpa*가 일으키는 동전마름병이 주로 발생한다. 다른 병에 비해 진전 속도가 빠르고 주로 뿌리에서부터 발병하여 잔디를 고사시켜 발병 후 구제하기 매우 어려운 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)에 의한 라이족토니아잎마름병(라지패취)이 큰 문제가 되고 있으며, 방대한 지역의 잔디를 구제하기 위해 병원균에 강한 내병성 들잔디를 개발하는 것이 필요하다(Kang et al. 2013; Lee et al. 2013). 식물 방어반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는(Xie et al. 2014) PR (Pathogenesis-Related) protein 중 하나인, β -1,3-glucanase는 병원균 감염으로부터 식물이 자신을 보호하기 위해 다양한 방어 메커니즘을 이용한다(Ebrahim et al. 2011; Leah et al. 1991). 곰팡이의 세포벽 구조를 이루는 β -(1,3)-glucan의 가수분해를 촉진시켜(Romero et al. 2008) 그리고, *R. solani*, *C. albicans*, and *A. fumigatus*에 저항성이 있다고 보고 되어 있으며(selitrennikoff 2001), 다양한 병원균에 대항하여 곰팡이병원균의 증식을 억제함으로써 식물에서의 이들 내병성 유전자의 클로닝 및 과발현을 통해 식물의 질병 저항성을 효과적으로 증대시킬 수 있다(Qiao et al. 2014). 식물의 비생물적 스트레스 내성은 신호전달 캐스케이드와 유전자 발현의 조절에 의해 이루어지는데, 밑에서는 salicylic acid, methyl jasmonic acid, ethephon을 처리하였을 때 β -1,3-glucanase의 발현이 높아지는 것을 확인하였고, methyl jasmonic acid를 처리하였을 때가 가장 높은 발현을 보였으며(Liu et al. 2010), *Paenibacillus* sp. S09의 β -1,3-1,4-glucanase재조합 단백질의 경우 산, 알칼리 저항성, 내염성을 보였으며 NaCl, CaCl₂에 의해 효소활성과 열안정성을 높일 수 있다는 것을 확인하였다(Cheng et al. 2014). 최근 몇몇 실험에서는 *Trichoderma*종 같은 곰팡이로부터 분리해낸 Chitinase와 β -glucanase가 효과적인 생물학적 조절제가 될 수 있다는 것이 증명되었다(Marco et al. 2007). 식물 β -1,3-glucanase는 병원균 감염으로부터 식물이 자신을 보호하기 위해 다양한 방어 메커니즘을 이용한다(Ebrahim et al. 2011; Leah et al. 1991). 그리고, β -glucanase와 Chitinase의 복합적 발현은 많은 곰팡이 병원균에 대해 저항성을 가진다(Sridevi et al.

2008). 식물은 systemic acquired resistance (SAR)을 통해 전신적으로 병원균에 저항성을 가지며 바이러스나 균의 감염으로 인해 식물조직이 과민반응을 일으킬 때 β -1,3-glucanase가 세포내에 생성되어 세포외로 분비되어 세포 사이 공간에서 fungi의 세포벽을 이루는 중요한 구성요소인(1,3) β -D-glucan의 β -1,3-linkage의 가수분해를 촉매함으로써 1,3) β -D-glucan을 분해한다고 알려져 있다(Jammar et al. 2013, Metzger et al. 1999). β -1,3-glucanase자체로도 항균활성을 가지나 다른 chitinase 같은 항균 단백질과도 상호작용하여 항균활성 기능을 가진다(Balansubramanian et al. 2012). 식물은 세균성 병원균으로부터 스스로를 보호하기 위해 다양한 단백질성 억제제를 생산해 내는데(Choi et al. 2012), PR-2 단백질의 항균활성은 다양한 세포 효소 분석에 의해 증명되었다. β -1,3-glucanase 유전자들은 각기 다른 스트레스 반응과 *R. solani*, *C. albicans*, and *A. fumigatus*를 포함한 다양한 병원균 침투에 대해 활성화되어 다르게 반응한다(Funnell et al. 2004; Selitrennikoff 2001). *Trigonella foenum-graecum* L.로부터 분리해낸 디펜신의 항진균성을 보았을 때 *E. coli*를 이용해 발현된 재조합 단백질은 *Rhizoctonia solani*, *Phaeoisariopsis personata*외에도 다양한 숙주의 곰팡이에 대하여 저항성을 가진다(Olli et al. 2006).

본 연구에서는 농약 사용량을 저감시키고 곰팡이 병원균에 의한 발병률을 낮추어 방대한 지역의 잔디를 구제하기 위해 PR-protein 중 하나인 β -1,3-glucanase유전자를 클로닝하여 들잔디 형질전환을 위한 검증을 하였다. 더불어, ZjGluI 효소의 기능을 확인하고자 항균활성 테스트를 진행한 결과 몇 개의 균주에서 항균활성을 보여 후에 형질전환 식물체에도 곰팡이 병원균에 대한 활성이 있을 것으로 예측이 된다.

재료 및 방법

식물 및 fungi 재료

야외 온실에서 생육된 들잔디(*Zoysia japonica* S. var 덕창)의 뿌리와 잎을 β -1,3-glucanase 유전자의 클로닝에 이용하였다. 그리고 농촌진흥청 농업유전자원정보센터(KACC)로부터 분양받은 *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia minor*, *Trichoderma atroviride*, *pythim* sp., *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani* AG 2-2(IV), *Rhizoctonia solani* AG 2-2(IIIB), *Rhizoctonia solani* AG-1(1A), *Rhizoctonia solani* AG-1(1B) 등 9개의 균주를 β -1,3-glucanase의 항균 활성 측정하는데 이용하였다. 상기 균주들은 균사체 조각을 PDA (Potato Dextrose Agar) plate에 25°C, 암조건으로 유지되는 growth chamber에서 약 14일간 배양한 후 실험에 사용하였다.

Table 1 Gene specific primers used in this study

Use for	Oligo name	Primer sequence
Degenerate	Forward	5'-TCCATCGGCGTGTGCTAYGGC-3'
	Reverse	5'-CTGGTTCTCGTTGAACATGGC-3'
3' RACE	Glu -1 Forward1	5'-GAACGTGAAGGTGGTATCTC-3'
	Glu - Forward2	5'-CTACAACCAGGGGCTGATCAA-3'
	dT-ACPI	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)18-3'
	dT-ACP2	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)15-3'
5'RACE	5'Glu1-RT	5'-CATACTGATCAAGTG-3'
	5'Glu1-Forward	5'-TACTGATCGACGAGCAGTACT-3'
	5'Glu-Reverse 1	5'-GGGCCCAACAAGGCGGCGCTG-3'
	5'Glu-Reverse 2	5'-ACGCTGGGCAACAACCTGCCG-3'
GST-fusion vector (pGEX 4T-1)	GLU1_4T-1_F	5'-GGATCCTCGCTTCTCACAAACGGTGAAT-3'
	GLU1_4T-1_R	5'-GCGGCCGCTTAGAAGCGGATGGGGTAGACC-3'

β -1,3-glucanase 유전자 클로닝

한국형 들잔디에 존재하는 β -1,3-glucanase 유전자의 분리는 계통학적으로 근연관계가 가까운 단자엽 식물인 옥수수, 밀, 보리, 벼에서 이미 β -1,3-glucanase 유전자들의 기능분석이 되어있는 염기서열을 이용하여 유사성이 높은 부분에서 특이적primer를 제작하였다(Table 1).

들잔디의 total RNA는 ChomczynskiP and SacchiN.1987의 방법에 따라 trizol reagent (MRC,미국)를 이용하여 추출하였으며, 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 β -1,3-glucanase 유전자가 분리되었다. 분리된 유전자는 Gene Fishing™ DEG Kits (씨젠, 한국)에 제공된 adaptor서열이 달린 oligo dT primer (Table 1)을 이용하여 cDNA를 합성한 후, pGEM T-easy vector system을 이용하여 β -1,3-glucanase의 full-length cDNA sequence를 얻어냈다.

클로닝이 끝난 β -1,3-glucanase의 아미노산서열을 NCBI에서 blast한 후 상동성이 높은 단자엽과 쌍자엽 식물인 *Setaria italica* (XM_004971176.1), *Phyllostachys edulis* (FP092366.1), *Triticum aestivum* (Y18212.1), *Oryza sativa* (AF443600.1), *Secale cereal* (AM181309.1), *Hordeum vulgare* (M23548.1), *Avena sativa* (AF155932.1), *Zea mays* (HM641756.1), *Brachypodium distachyon* (XM_003565006.1), *Arabidopsis thaliana* (NC_003074.8), *Capsella rubella* (XM_006291382.1), *Brassica rapa* (XM_009118181.1), *brassica oleracea* (EF484879.1), *Brassica juncea* (DQ359126.1), *Citrus sinensis* (XM_006491438.1), *Citrus unshiu* (EF121321.1), *Arabidopsis lyrata* (XM_002878094.1), *Prunus persica* (AAL30426.1), *Malus hupehensis* (ADR71671.1) 등으로부터 β -1,3-glucanase의 아미노산서열을 확보하여 ZjGlu1와의 비교하였다.

사용한 program은 BioEdit ver 7.7.0 (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)의 ClustalW Multiple alignment 알고리즘을 이용하여 비교 분석하였으며, Alignment 결과를 fasta

file로 저장 한 후 MEGA 6.0 (www.Megasoftware.net/mega.php)에서 불러오기하여 Neighbor-joining method를 통해 계통수로 전환하여 분석하는데 이용하였다.

RT-PCR 분석

식물체는 상토와 모래를 약 5:1로 혼합한 토양에 식재하여 자연채광의 유리온실에 있는 들잔디의 식물체의 flower, blade, sheath, stolon, root에서 total RNA를 추출하였다. DNA-free kit (Ambion,미국)을 사용하여 섞여있는 DNA를 제거한 total RNA에 OligodT primer (dT15)를 0.5 ug 넣고 70°C에서 5분간 가열 한 후 얼음에 식히고, RNasin Ribonuclease inhibitor 25 unit, RTase 200 unit, 5x reaction buffer, dNTP 혼합액을 섞어 42°C에서 90분간 반응시킴으로써 1쇄 cDNA를 합성하였다. RTase는 Promega (미국)사에서 판매하는 Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)를 사용하였다.

*E. coli*를 이용한 재조합 β -1,3-glucanase의 과발현 및 정제

단백질을 대량정제 하기 위해 *E.coli*의 단백질 발현 시스템을 이용하여 최적의 배양조건을 찾는 것이 중요하다. 프로모터 작동을 유도하기 위해 균농도가 OD₆₀₀ = 0.5~0.6이 되었을 때 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 0.1, 0.5, 1 mM 농도로 넣은 후 배양온도를 18, 25, 37°C로 설정하여 배양 후 각 조건별로 균을 수확하였다. 수확된 균은 binding buffer (1xPBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, PH7.4)에 재현탁 한 후 sonication하여 용해, 원심분리를 통해 상층의 수용성단백질, 하층의 불용성단백질로 나누었다.

얻어진 단백질 추출물을 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate

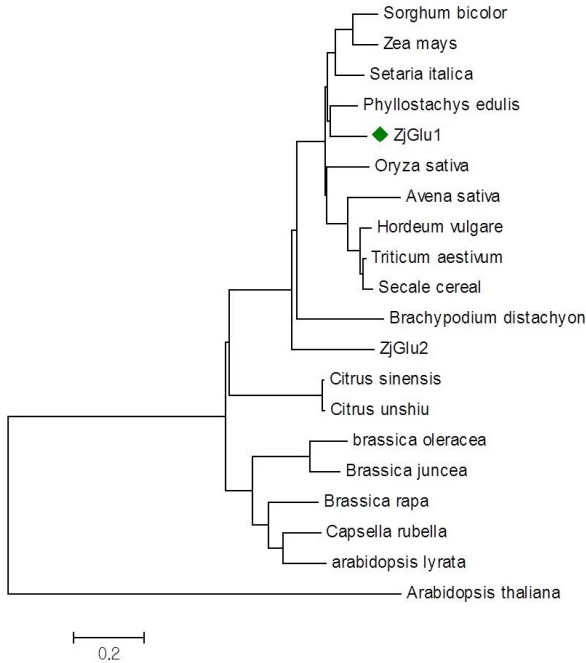


Fig. 2 Phylogenetic tree of deduced sequences of β -1,3-glucanase genes from plants. Phylogenetic analysis was generated using MEGA 5.0 by the neighbor-joining method. One gene from *zoysia japonica* Steud. is shown as a green diamond

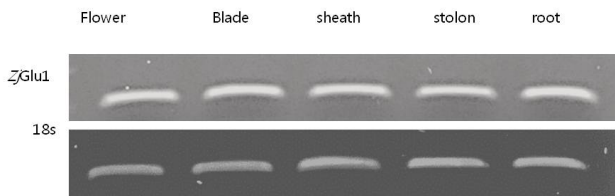


Fig. 3 Organ-specific expression of β -1,3-glucanase by RT-PCR. Expression analysis of *ZjGlu1* from different organs in zoysiagrass showed higher expression. *18S* rRNA was used as a loading control

와 상동성이 가장 높은 β -1,3-glucanase 중 클로닝 및 기능 분석이 된 쌍자엽과 단자엽식물의 amino acid sequence와 alignment하고 MEGA 6.0의 Neighbor joining algorithm을 이용하여 Phylogenetic tree를 분석하였다(Fig. 2).

여러 논문을 통해서 β -1,3-glucanase는 생식기관 및 각기 발달이 다른 다양한 기관에 위치해 있으며 식물 β -1,3-glucanase의 구조와, 발현조절 등 식물에서의 직접적, 간접적으로 아주 많은 역할을 하는 것을 알 수 있다(Claude 2001; Magdalena et al. 2004; Yanlin et al. 2006; Saboki et al. 2011). *ZjGlu1*의 잔디 기관별 발현량을 분석하기 위해서 RT-PCR을 수행한 결과 잎과 꽃, 줄기, 뿌리, stolon의 모든 기관에서 발현됨을 확인하였다(Fig. 3).

β -1,3-glucanase (*ZjGlu1*)의 정제 및 항균활성 검증

*ZjGlu1*의 정제를 위해 벡터 균주, IPTG 농도, 발현 유도

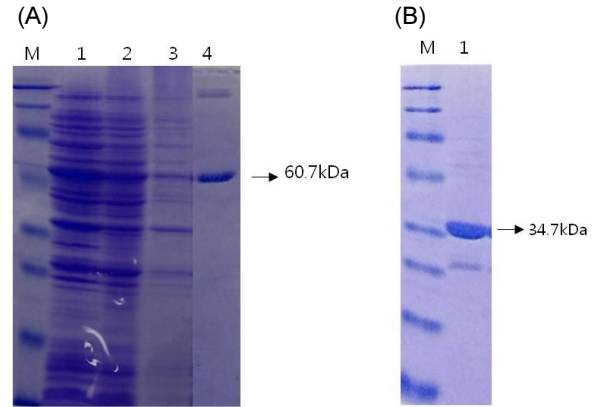


Fig. 4 SDS-PAGE and purification of GST- β -1,3-glucanase. Overexpression of GST- β -1,3-glucanase fusion protein in *E. coli* and purified GST- β -1,3-glucanase fusion protein (*ZjGlu1*). (A) M, protein marker; Lane1, Total protein (+ IPTG); Lane2, Soluble protein (+ IPTG); Lane 3, insoluble protein (+ IPTG); Lane4, Purified GST- β -1,3-glucanase fusion protein. (B) M, protein marker; Lane 1, purified β -1,3-glucanase Protein(*ZjGlu1*)

후 배양시간 등 여러가지 최적의 조건을 찾기 위해 테스트를 한 결과, DE3 (BL21)균주를 이용하여 pGEX 4T-1 벡터에서 37°C에서 OD₆₀₀=0.6까지 자랐을 때 IPTG농도가 0.5 mM이 되도록 넣고 18°C에서 6시간 가량 배양하였을 때 insoluble protein보다 대부분 soluble protein으로 가는 것을 SDS-PAGE를 통해 가장 높은 수율로 단백질을 얻을 수 있는 것으로 확인 되었다(Fig. 4). GST- β -1,3-glucanase fusion protein은 60 kDa의 크기이며, thrombin을 처리한 후 GST를 제거한 순수한 β -1,3-glucanase protein을 정제하여 항균활성 테스트를 하는데 이용하였다.

한국형 들잔디에서 가장 문제가 되고 있는 라이족토니아 잎마름병(라지패취)의 병원균인 *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV)에 대한 내병성을 가지고 있는 형질전환 들잔디를 개발하기 위해 β -1,3-glucanase를 클로닝하였다. PR-2 family인 β -1,3-glucanase는 보통 4개의 Class로 나뉘는데 Class I은 33kDa이하의 크기이며, *Fusarium solani*의 성장을 억제하고 식물의 액포에 분비된다(Claude 2001). Class II, III는 약 34~36 kDa의 크기이고 세포 외 공간으로 분비되며, Class IV에 대해 알려지지 않은 것은 아직 없다. *ZjGlu1*의 경우 크기는 34.7 kDa이며, 염기서열 분석 결과 Class II에 가깝다는 것을 알 수 있었다.

재조합 단백질의 항균활성을 검증하기 위해 정제된 *ZjGlu1* 단백질과 *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV)의 9종의 균주를 고체배지에 올려 관찰한 결과 모든 균주에 대해 활성을 보이지는 않았으나 한국 잔디류를 기주로 발생하는 봄 마름병(춘고병), 황색마름병(옐로우패취)을 일으키는 *R. cerealis*와, foot and root rot과 head bright를 일으키는 *F. culmorum*, 갈색잎 마름병(브라운패취)을 일으키는 *R. solani* AG-1 (1B) (Kim et al. 2013), 그리고 푸른곰팡이의 한 종류

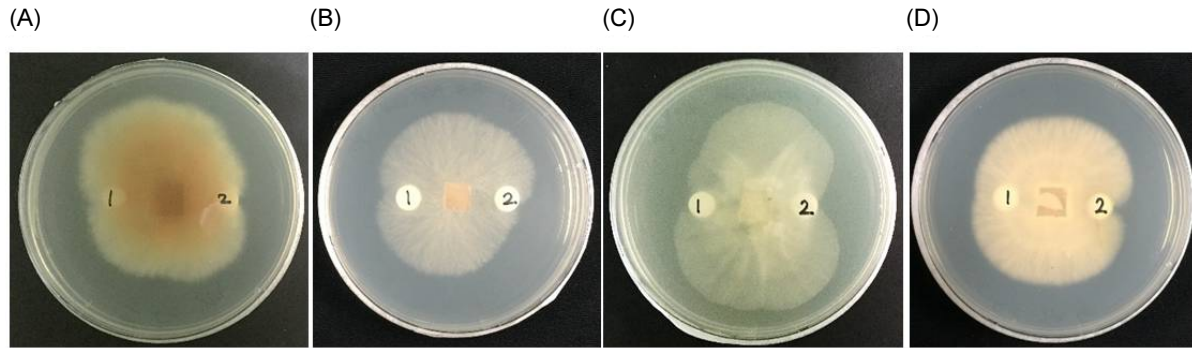


Fig. 5 Activity of glucanase. (A)*Fusarium culmorum*, (B) *solani* AG-1(1B), (C) *Trichoderma atroviride*, (D) *Rhizoctonia cerealis*

인 *T.atroviride* 등 4개의 균주에서 항균활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 균주가 커 가는 것을 때 시간 관찰한 결과 조금 더 높은 농도의 ZjGlu1 protein을 치상하였을때에 다른 균주에 대해서도 활성이 있을 것으로 기대가 되므로 ZjGlu1 protein의 농도를 더 높여서 실험해 볼 필요성이 있다고 사료된다. 그리고 Fungi 균주 4개에 대해서 활성을 확인하였으므로 들잔디의 형질전환체에서도 항균활성이 있을 것으로 기대 할 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

한국형 잔디에서는 다른 병에 비해 진전 속도가 빠르고 주로 뿌리에서부터 발병하여 잔디를 고사시키고 발병 후 구제하기 매우 어려운 라이족토니아잎마름병(라지패취)이 큰 문제로 대두되고 있다. 라이족토니아잎마름병(라지패취)은 *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV)병원균에 의해 발생하는데, 이 병원균에 강한 내병성 들잔디를 개발하기 위해 식물방어반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 PR-Protein 중 하나인 β-1,3-glucanase를 들잔디로부터 클로닝 하였다. β-1,3-glucanase는 바이러스나 균의 감염으로 인해 식물조직이 과민반응을 일으킬 때 세포내에서 생성되고 세포 외로 분비되어 세포 사이 공간에서 주로 병원균 저항성기능을 하는 것으로 알려져 있다. β-1,3-glucanase 단자엽식물 중 내병성에 대한 연구가 되어있는 옥수수, 밀, 보리, 벼의 염기서열에서 공통으로 보존되어 있는 부분을 이용해 degenerate PCR을 수행하고 얻어낸 sequence를 통해 Full-length의 cDNA를 클로닝 하였다. *E.coli* over-expression을 수행하여 목표 단백질을 대량 정제하여 *in vitro* 활성 측정 및 항균테스트를 진행하였다. 또한, ZjGlu1 유전자의 기능을 해석하기 위해 각각의 유전자를 도입한 식물형질전환용 벡터를 제작하여 잔디 형질전환체 제작을 하였다. ZjGlu1 단백질을 이용하여 9개의 균주에 대해 항균활성 테스트를 진행 한 결과 *R. cerealis*, *F. culmorum*,

R.solani AG-1 (1B), *T. atroviride* 에서 항균활성을 보였으며, 형질전환체를 이용해 18s 유전자의 발현량을 상대적으로 각 유전자의 기관별 발현량은 크게 차이없이 모든 기관에 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

사 사

이 논문은 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2016R1A6A1A03012862). 본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린사업(과제번호 PJ01186001)의 지원을 받아 수행 되었음.

Reference

Bae EJ, Lee KS, Kim DS, Han EH, Lee SM, Lee DW (2013) Sod Productio and Current Status of Cultivation Management in Korea. Weed & Turfgrass Science 2(1):95-99

Bo Liu, Xiaodan Xue, Suping Cui, Xiaoyu Zhang, Qingmei Han, Lin Zhu, Xiaofei Liang, Xiaojie Wang, Lili Huang, Xiamning Chen, Zhensheng Kang (2010) Cloning and characterization of a wheat β-1,3-glucanase gene induced by the stripe rust pathogen *puccinia striiformis* F. sp. *Tritici*. Mol Biol Rep 37:1045-1052

Cheong YH, Kim CY, Chun HJ, Moon BC, Park HC, Kim JK, Lee S, Han C, Lee SY, Cho MJ (2000) Molecular cloning of a soybean class III beta-1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. Plant Sci 154(1):71-81

Choi HW, Kim NH, Lee YK, Hwang BK (2013) The pepper Extracellular Xyloglucan-Specific Endo-1,4-Glucanase Inhibitor Protein Gene, *CaXEGIP1*, Is Required for Plant Cell Death and Defense Reponses. Plant Physiol 161:384-396

Claude P, Selitrennikoff (2001) Antifungal Proteins. Appl Environ Microb 67:2883-2894

Deanna L. Funnell, Christopher B. Ljawrence, Jeffery F. Pedersen, Christopher L. Schardl (2004) Expression of the tovacco β -1,3-glucanase gene, *PR-2d*, following induction of SAR with

- peronospora tabacina. *Physiol Mol Plant P* 65:285-296
- Ganapathi Sridevi, Chidambaram Parameswari, Natarajan, Sabapathi, Vengoji Raghupathy, Karuppannan Veluthambi (2008) Combined expression of chitinase and β -1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. *Plant Sci* 275:283-290
- Ganesan M, Han YJ, Bae TW, Hwang OJ, Chandrasekhar T, Shin AY, Goh CH, Nishiguchi S, Song IJ, Lee HY, Kim JI, and Song PS (2012) Overexpression of phytochrome A and its hyperactive mutant improves shade tolerance and turf quality in creeping bentgrass and zoysiagrass. *Planta* 236:1135-1150
- Gerhard Leubner-metzger and Frederick Meins Jr. (1999) Functions and regulation of plant β -1,3-glucanase (PR-2)
- Irene Romero, Carlos Fernandez-Caballero, Oscar Goñi, M. Isabel Escribano, Carmen Merodio, M. Teresa Sanchez-Ballesta (2008) Functionality of a class I beta-1,3-glucanase from skin of table grapes berries. *Plant Sci* 174:641-648
- Janice Lisboa de Marco and Carlos Rovertto Felix (2007) Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* showing Biocontrol Potential. *Braz Arch Biol Techn* 50:21-29
- Kang JY, Kim DH, Lee DG, Kim IS, Jeon MG, Lee JD, Kim IH, Lee S (2013) Screening of Antifungal Activities of Medicinal Plants for the Control of Turfgrass Fungal Disease. *Weed & Turfgrass Science* 2(1):70-75
- Kim DS, Lee KS, Bae EJ, Hwang JY, Kwak YS, Lee DW, Lee SM, Park YB (2013) Disease and weed occurring in zoysiagrass. *National institute of forest science* 517
- Korea forest service 2012
- Lee JP, Kim SJ, Seo HY, Lee SJ, Jeong JI et al. (2001) Contribution of turfgrass industry to the economy in Florida state and present and future of Korea turfgrass industry. *Korean Turfgrass Science* 15:187-198 (In Korean)
- Lee SM, Kim DS, Lee KS, Lee CK, Lee DW (2013) Antibiotic Properties of *Helicosporium* sp. KCTC 063BP to *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV). *Weed & Turfgrass Science* 2(2):202-206
- Mahmoud WF, Yaish, Andrew C. Doxey, Brendan J. McConkey, Barbara A. Moffatt, Marilyn Griffith (2006) Cold-Active Winter Rye Glucanases with Ice-Binding Capacity 1,2. *Plant Physiol* 141:1459-1472, 1
- Olli S, Kirti PB (2006) Cloning, Characterization and Antifungal Activity of Defensin Tfgd1 from *Trigonella foenum-graecum* L. *J Biochem Mol Biol* 39:278-283
- Qiao LX, Ding X, Wang HC, Sui JM, Wang JS (2014) Characterization of the β -1,3-glucanase gene in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by cloning and genetic transformation. *Genetics and Molecular Research* 13:1893-1904
- Robert Leah, Henrik Tommerup, Ib Svendsen, John Mundy (1991) Biochemical and Molecular Characterization of Three Barley Seed Proteins with Antifungal Properties. *J Biol Chem* 266(3):1564-1573
- Rui Cheng, Linxiang Xu, Shiming Wang, Yang Wang, Jianfa Zhang (2014) Recombinant expression and characterization of an acid-, alkali- and salt-tolerant β -1,3-1,4-glucanase from *Paenibacillus* sp. S09. *Biotechnol Lett* 36:797-803
- Saboki Ebrahim, K. Usha, Bhupinder Singh (2011) Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Science against microbial pathogens; communicating current research and technological advanced
- Shi Y, Zhang Y, Shin DS (2006) Cloning and expression analysis of two β -1,2-glucanase genes from strawberry. *J Plant Physiol* 163:956-967
- Toyama K, Bae CH, Kang GJ, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2003) Production of Herbicide-tolerant Zoysiagrass by Agrobacterium-mediated Transformation. *Mol Cells* 16:19-27
- Vaiyapuri Balansubramanian, Divya Vashisht, Jean Cletus, Natarajan Sakthivel (2012) Plant β -1,3-glucanase: their biology functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol Lett* 34:1983-1990
- Vivek Dogra, Yelam Sreenivasulu (2015) Cloning and functional characterization of β -1,3-glucanase gene from *Podophyllum hexandrum* – A high altitude Himalayan plant. *Gene* 554:25-31
- Xie YR, Ruarung Y, Chen ZY, Brown RL, Cleveland TE (2015) ZmGns, a maize class I β -1,3-glucanase, is induced by biotic stresses and possesses strong antimicrobial activity. *J Integr Plant Biol*, 57(3):271-83