



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

들잔디에서 β -1,3-glucanase
유전자들의 클로닝 및 특성분석

濟州大學校 大學院

生命工學部

康蘇美

2017年 2月



들잔디에서 β -1,3-glucanase
유전자들의 클로닝 및 특성분석

指導教授 李 孝 淵

康 蘇 美

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016 年 12月

康蘇美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

2016 年 12 月

목 차

Abstract	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법.....	5
1. 식물 및 fungi 재료	5
2. Total RNA 추출	5
3. β -1,3-Glucanase 유전자의 클로닝	5
4. Full-length β -1,3-glucanase의 phylogenetic tree 분석.....	10
5. 들잔디 형질전환.....	10
1) Vector construction 및 <i>agrobacterium</i> 형질전환.....	10
2) 잔디 형질전환 및 선발	13
6. β -1,3-Glucanase 유전자의 기관별 발현분석	14
7. <i>E.coli</i> 를 이용한 재조합 β -1,3-glucanase 과발현 및 정제.....	14
1) 발현조건의 검토.....	14
2) GST- β -1,3-glucanase fusion vector 제작	15
3) 균의 대량 배양 및 단백질 정제	17
8. β -1,3-Glucanase protein의 기능분석.....	17
1) 디스크 방산법을 이용한 β -1,3-glucanase 균사신장 억제 분석	17
III. 결과 및 고찰.....	18
1. β -1,3-Glucanase 유전자의 클로닝.....	18
1) β -1,3-Glucanase 유전자의 단편분리를 위한 primer 제작 및 RT-PCR.....	18
2. β -1,3-Glucanase의 구조적 특성 및 발현 분석.....	23
1) β -1,3-Glucanase의 구조적 특성 분석.....	23
2) β -1,3-Glucanase의 phylogenetic tree 분석.....	25

3. <i>E.coli</i> 를 이용한 β -1,3-glucanase의 과발현 및 정제.....	28
4. 재조합 β -1,3-glucanase의 항균활성 분석.....	30
5. 잔디 형질전환체의 선발.....	32
IV. 종합고찰.....	34
V. 참고문헌.....	36

Table list

Table 1. Primers used in this study

Table 2. Amino acid sequence of putative *Z. japonica* β -1,3-glucanase

Figure list

Figure 1. 3' RACE protocol for cloning of β -1,3-glucanase genes.

Figure 2. 5' RACE protocol for cloning of β -1,3-glucanase genes.

Figure 3. Vector construct for transgenic plants.

Figure 4. GST- β -1,3-glucanase fusion vector.

Figure 5. Degenerate PCR results.

Figure 6. 3' RACE PCR results.

Figure 7. 5' RACE PCR results.

Figure 8. Phylogenetic tree and alignment of glucanases.

Figure 9. Expression analysis of *ZjGlu1* and *ZjGlu2* from different organism zoysiagrass showed higher expression.

Figure 10. Overexpression of GST- β -1,3-glucanase fusion protein in *E.coli* and purified GST- β -1,3-glucanase fusion protein(ZjGlu1).

Figure 11. Disk diffusion susceptibility test of purified r- β -1,3-glucanase against various pathogenic fungi on PDA.

Figure 12. Putative transgenic plants.

Abstract

Rhizoctonia leaf blight (large patch) becomes a serious problem in Korean lawngrass, which is extremely hard to treat and develops mostly from the roots of lawngrass 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 which is one of the PR-proteins known to play a critical role in plant defense reaction was cloned from *Zoysia japonica*. β -1,3-glucanase is known to be generated within cells when plant tissues have 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 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 mono-cotyledonous 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. Also, to interpret the functions of *ZJGlu1* gene, each gene-incorporating plant transformation vectors were generated to make lawngrass transformant.

Based on *ZjGlu1* protein, antibacterial activity test was conducted upon 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 every organ based upon the transformant and against 18s gene expression amount.

I. 서론

잔디는 화본과 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(Toyama *et al.* 2003; Ge *et al.* 2006). 우리나라에서 재배되고 있는 잔디는 한국잔디류(*Zoysia* spp.)인 난지형 잔디가 95.7%를 차지하며, 주요 소비처는 도로사면의 사방용이나 묘지 뗏장 조성용(72.4%)이다(Lee *et al.* 2001). 따라서 잔디 재배 농가에서는 난지형 잔디를 재배하는 비율이 높으며, 야생화, 자생관, 조경수, 분재와 함께 산림청의 관광산림식물류에 속한다. 2011년 임산물 생산자료에 의하면 잔디의 생산액은 349억원으로 야생화(335억원)나 분재(308억원)보다 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 알려진 PR(Pathogen-Related)-protein 중 하나인, β -1,3-glucanase는 생물적, 비생물적 스트레스 반응에 중요한 역할을 하며(Xie *et al.* 2014) 곰팡이의 세포벽 구조를 이루는 β -(1,3)-glucan의 가수분해를 촉진시켜(Romero *et al.* 2008) 다양한 병원균에 대항하여 곰팡이병원균의 증식을 억제한다. 식물에서 이들 내병성 유전자의 클로닝 및 과발현을 통해 식물의 질병 저항성을 효과적으로 증대시킬 수 있다(Qiao *et al.* 2014). β -1,3-glucanase는, *R. solani*, *C. albicans*, *A. fumigatus* 등

에도 저항성이 있다고 보고되어 있다(Selitretnnikoff. 2001). 식물의 abiotic 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 보였다(Liu *et al.* 2010). *Paenibacillus* sp. S09의 β -1,3-1,4-glucanase재조합 단백질의 경우 산, 알칼리, 염 등에 내성을 보였으며 NaCl, CaCl₂에 의해 효소활성과 열안정성을 높일 수 있다는 것 확인되었다(Cheng *et al.* 2014). 최근 몇몇 실험에서는 *Trichoderma*와 같은 곰팡이로부터 분리해낸 Chitinase와 β -glucanase가 효과적인 생물학적 조절제가 될 수 있다는 것이 증명되었다(Marco *et al.* 2007). 식물의 β -1,3-glucanase는 병원균 감염으로부터 식물자신을 보호하기 위해 다양한 방어 메커니즘을 이용하며(Ebrahim *et al.* 2011; Leah *et al.* 1991), β -glucanase와 Chitinase의 복합적 발현은 많은 곰팡이 병원균에 대해 저항성을 가지게 한다(Sridevi *et al.* 2008). 식물은 systemicacquiredresistance(SAR)을 통해 전신적으로 병원균에 저항성을 가지며 바이러스나 균의 감염으로 인해 식물조직이 과민반응을 일으킬 때 β -1,3-glucanase가 세포내에서 생성되어 세포외로 분비되고 세포 사이 공간에서 fungi의 세포벽을 이루는 중요한 구성요소인 β -1,3-D-glucan의 β -1,3-linkage의 가수분해를 촉매함으로서 β -D-glucan을 분해한다고 알려져 있다(Jammar *et al.* 2013, Metzger *et al.* 1999). β -1,3-glucanase는 단독 또는 다른 chitinase 같은 항균 단백질과 상호작용하여 항균활성 기능을 가진다(Balansubramanian *et al.* 2012). 식물은 세균성 병원균으로부터 스스로를 보호하기 위해 다양한 단백질성 억제체를 생산해 내는데(Choi *et al.* 2012), PR-2 단백질의 항균활성은 다양한 세포에서의 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 활성화되고 각기 다르게 반응한다(Funnell *et al.* 2004; Selitretnnikoff. 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 나타냈다(Olli *et al.* 2006). 본 연구에서는 잔디 재배에 있어서의 농약 사용량

을 저감시키고 곰팡이 병원균에 의한 발병률을 낮추기 위해 PR-protein 중 하나인 β -1,3-glucanase 유전자를 클로닝하여 ZjGlu1 단백질의 항균활성 기능을 분석하였으며, 이 유전자를 들잔디에 형질전환하였다. ZjGlu1 단백질은 몇 개의 균주에서 항균활성을 나타내었고, 이 유전자가 도입된 형질전환 들잔디는 곰팡이 병원균에 대한 내성이 향상되었을 것으로 기대된다.

II. 재료 및 방법

1. 식물 및 fungi 재료

β -1,3-glucanase 유전자의 cloning에는 덕창(주)에서 구입하여 생육시킨 들잔디(*Zoysia japonica*)의 뿌리와 잎을 이용하였다. β -1,3-glucanase의 항균 활성 측정에 사용한 *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani* AG 2-2(IV), *Rhizoctonia solani* AG-1(1A) 등은 농촌진흥청 농업유전자원정보센터(KACC)로부터 분양받았다. 항균활성 측정용으로 사용한 균주들은 균사체 조각을 PDA(Potato Dextrose Agar) plate에 25°C, 암조건으로 설정한 growth chamber에서 약 7일간 배양한 후 실험에 사용하였다.

2. Total RNA의 추출

들잔디를 채취하여 뿌리 표면의 불순물을 깨끗한 물로 씻어낸 후 물기를 제거하고 액체질소를 이용하여 완전히 분말이 될 때까지 마쇄하였다. 분말화 한 잔디 시료에서 Chomczynski and Sacchi (1987)의 방법에 따라 Trizol reagent (MRC)를 이용하여 total RNA를 추출하였으며, DEPC(Diethyl-pyrocabonate)를 처리한 RNase free water에 녹여 다음 실험에 사용하였다.

3. β -1,3-Glucanase 유전자의 클로닝

단자엽 식물인 옥수수, 밀, 보리, 벼에서 이미 기능분석이 수행되어 있는 기지의 β -1,3-glucanase 유전자들의 염기서열을 이용하여 유사성이 높은 부분에서 Degenerate primer를 디자인하였다(Table 1). 그 외 본 연구에서 사용된 primer list를 다음 Table 1에 제시하였다.

Table 1. Primers used in this study

Use for	Oligo name	Primer sequence
Degenerate	Forward	5' - TCCATCGGCGT V TGCTAYGGC -3'
	Reverse	5' - CTGGTTCTCGTTGAACATGGC -3'
3' RACE	Z/Glu1 Forward1	5' - GAACGTGAAGGTGGTGATCTC -3'
	Z/Glu1 Forward2	5' - CTACAACCAGGGCTGATCAA -3'
	Z/Glu2 Forward1	5' - TACCCGTA C TTCGGCTACAAG -3
	Z/Glu2 Forward2	5' - TACAACCAGAACCTGATCAAC -3
	dT-ACP1	5' -CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)18 -3
	dT-ACP2	5 - CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)15 -3'
5' RACE	5 Glu1-RT	5 - CATACTGATCAAGTG -3'
	5 Glu2-RT	5 - TTCTTCTGCTATCCA -3
	5 Glu1-Forward	5 - TACTGATCGACGAGCAGTACT -3'
	5 Glu2-Forward	5 - TGAAGCTGCGATATTACTGTG -3
	5 Glu1-Reverse 1	5 - CAGCGCCGCTTGTGGGCC -3'
	5 Glu1-Reverse 2	5 - CGGCAGTTGTGGCCAGCGT -3'
	5 Glu2-Reverse 1	5 - CGCAGCGCATCGAGGCGCTTA -3
	5 Glu2-Reverse 2	5 - GATGCCGGCGGTATGTTGTCG -3
Vector construction (pGEX 4T-1)	GLU1_4T-1_F	5 - GGATCC TCGCTTCTCACAACGGTGCAAT -3
	GLU1_4T-1_R	5 - GCGGCCGC TTAGAAGCGGATGGGGTAGACC -3
	GLU2_4T-1_F	5 - GGATCC ATCGGCGTGTGCTACGGC -3
	GLU2_4T-1_R	5 - GCGGCCGC TTAATTTCTGCGAAATTAAT -3
Vector construction (IG2)	GLU1_IG2_F1	5 - GGATCC TCGATCGACGCTTAGGT -3
	GLU1_IG2_R1	5 - GAGCTCG TACAACATTATTAACGTGTT -3
	GLU2_IG2_F1	5 - GGATCC GCGCGCTGCGTGCAAGACAATG -3
	GLU2_IG2_R1	5 - GAGCTCG GAATTACTGCGTGTAGTATCCAGC -3
RT-PCR	RT_primer_Glu1_FW1	5' - AAGGTGGTGATCTCCGAGAG -3
	RT_primer_Glu1_RV1	5' - TGTCTCTGCTCTCGTCCCC -3
	RT_primer_Glu2_FW1	5' - CGGACGTACAACCAGAACCT -3
	RT_primer_Glu2_RV1	5' - GTAAACCGGTGTCCTGTCTCGA -3
18s rRNA	S	5' - ATGATAACTCGACGGTTCGC -3
	AS	5' - CCTCCAATGGATCCTCGTTA -3

Gene Fishing™ DEG Kits(씨젠)에 제공된 adaptor서열이 달린 oligo dT primer(table)을 이용하여 cDNA를 합성한 후, 3' 영역의 미지서열을 알아내기 위한 3'RACE를 진행하였다(Fig. 1). Degenerate PCR을 통해 얻어낸 partial sequence를 이용하여 gene specific primer를 제작하였으며, reverse primer 또한 cDNA합성시 사용한 primer의 adaptor서열과 상보적으로 design하여 3' RACE PCR을 수행하였다. 3'RACE의 결과를 바탕으로, 5'-Full RACE Core Set (Takara)를 이용하여 3' 말단을 phosphorylation 시킨 gene specific RT-primer를 design하여 circularization형태의 cDNA를 합성한 후 5' 말단을 알아내기 위한 5' RACE PCR을 진행하였다(Fig. 2). 그 후에 nested PCR을 수행하여 확실한 단편을 얻어내었고, 3' RACE와 5' RACE PCR에서 형성된 band들은 pGEM T-easy vector system을 이용하여 sequence를 확인하였으며, 이를 바탕으로 primer를 제작한 후 RT-PCR을 통해 β -1,3-glucanase의 full-length cDNA sequence를 확보하였다.

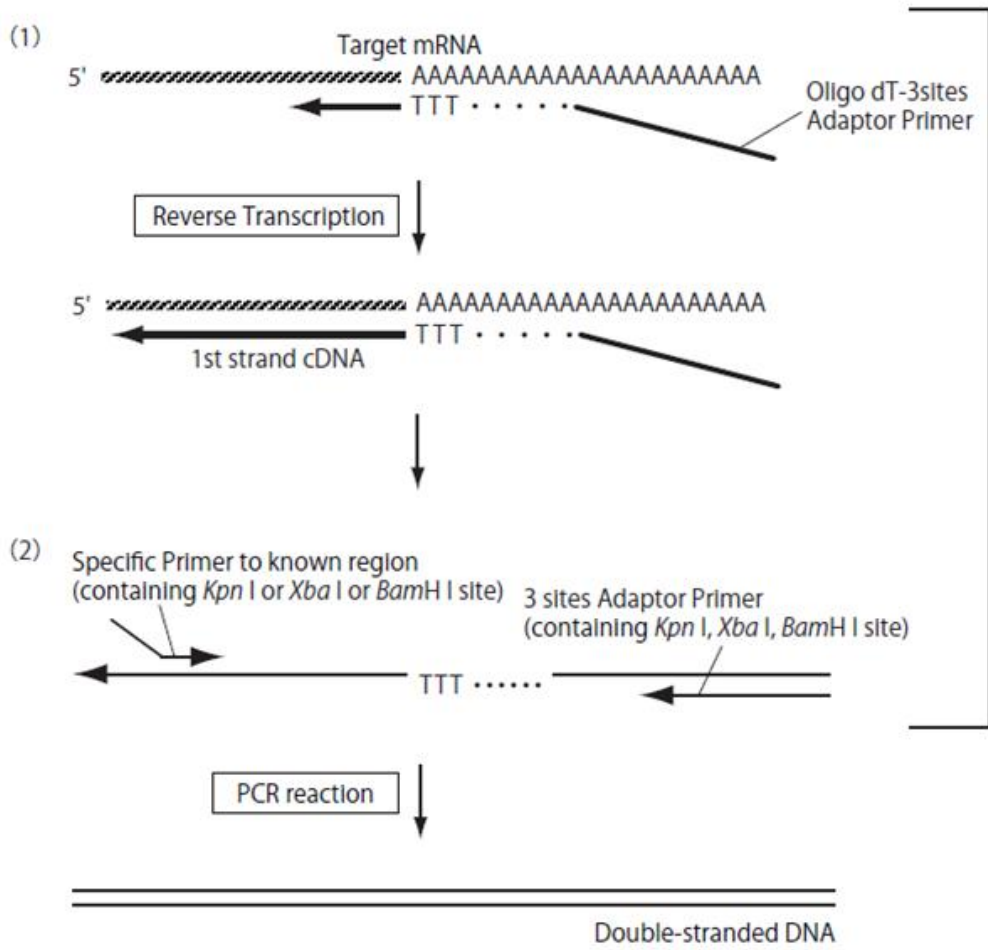


Figure 1. 3' RACE protocol for cloning of β -1,3-glucanase genes.

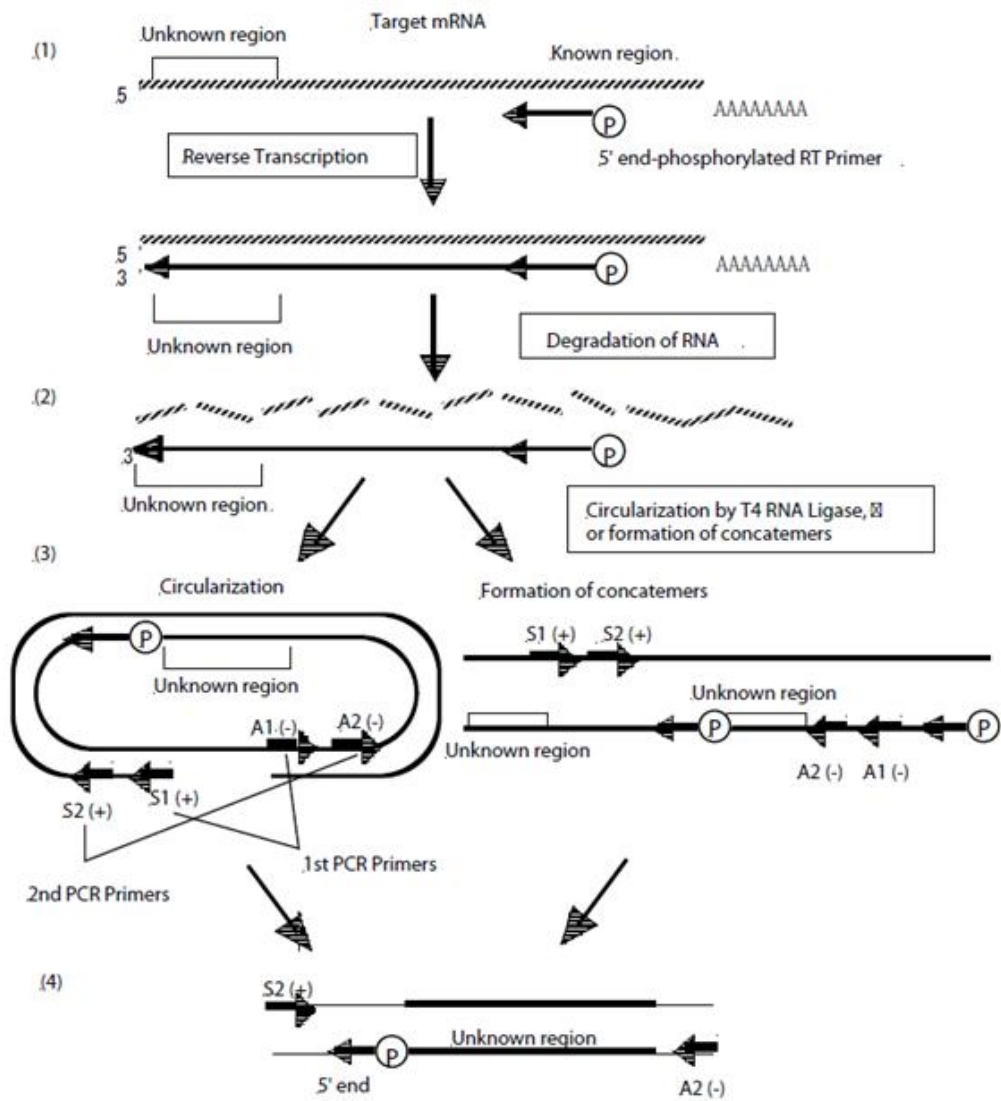


Figure 2. 5' RACE protocol for cloning of β -1,3-glucanase genes

4. Full-length β -1,3-glucanase의 phylogenetic tree 분석

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 ZjGlu1, ZjGlu2의 아미노산 서열과 비교하였다. BioEdit ver 7.7.0(www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)의 ClustalW Multiple alignment 알고리즘을 이용하여 비교·분석을 수행하였으며, Alignment 결과를 fasta file로 저장 한 후 MEGA 6.0 (www.Megasoftware.net/mega.php)에서 불러오기하여 Neighbor-joining method를 통해 계통수로 전환하여 분석에 이용하였다.

5. 들잔디의 형질전환

1) Vector construction 및 *agrobacterium* 형질전환

Agrobacterium tumefaciens EHA105에 유전자를 도입하기 위하여 Binary vector pCAMBIA3301 (www.cambia.org)을 사용하였다. 형질전환용 vector에는 선발마커로 제초제저항성(*bar*) 유전자와 리포터 유전자인 인트론이 포함된 β -glucuronidase 유전자(*intron-gus*)가 포함되어 있으며, β -1,3-glucanase 유전자는 Ubi 프로모터와 Arbc5 터미네이터 사이에 삽입하였다(Fig. 3). *bar* 유전자는

글루타민 합성효소를 저해함으로써 phosphinotricin(PPT, 또는 glufosinate) 과 bialaphos (phosphinotrucyl- alanyl-alanine)에 대한 저항성을 부여하는 phosphinotricin acetyltransferase를 암호화한다. 형질전환용 vector는 freeze-thaw방법을 이용하여(An. 1987) *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 에 도입하여 잔디의 형질전환에 사용하였다.

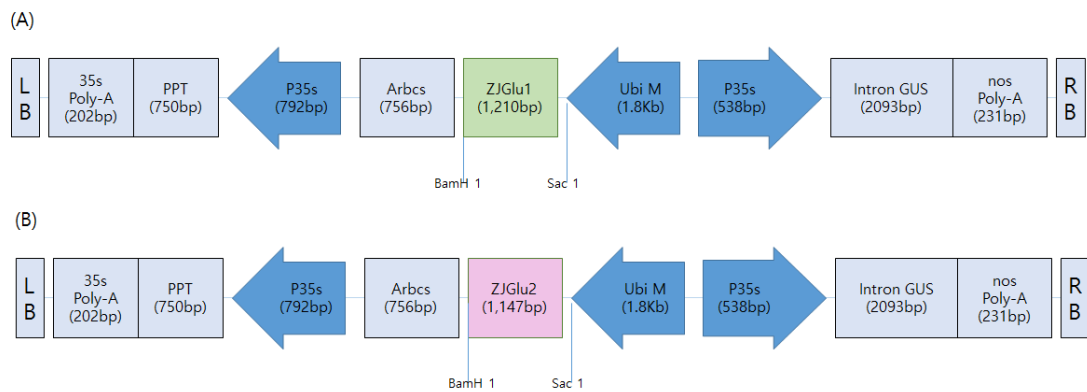


Figure 3. Vector construct for transgenic plants.

RB, right border of T-DNA; LB, left border of T-DNA; P35S, CaMV 35S promoter; UbiM, Ubiquitin promoter; GUS, β -glucuronidase gene; PPT, phosphinotricin acetyltransferase gene; 35S poly-A, CaMV 35S terminator; nos poly-A, nopaline synthase gene terminator; Arbcs, Arbcs gene terminator. (A) vector construct for transgenic plants(*ZjGlu1*), (B)vector construct for transgenic plants(*ZjGlu2*).

2) 잔디 형질전환 및 선발

들잔디 성숙종자 유래의 배발생 callus를 이용한 형질전환은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 성숙종자 유래의 배발생 callus를 유도·선발한 뒤 callus 증식배지에서 2~3주간 전배양하였다.

Rifampicin 25 mg/L, kanamycin 50 mg/L를 포함한 25 mL의 YEP 배지에 형질전환용 vector를 도입한 *Agrobacterium*을 접종하여 28℃, 200rpm에서 24시간 배양하였다. *Agrobacterium* 배양액을 원심분리하여 상청을 제거하고, 50mg/L acetosyringone (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenon)이 포함되어 있는 25 mL의 infection 배지(1/2MS, 3% sucrose, 1% glucose, 1% Betaine, pH 5.2)에 균 pellet을 재현탁한 후 25℃, 110rpm에 2시간동안 pre-activation하고, 배발생 callus를 넣어 25℃, 110rpm에 24시간동안 감염하였다. 감염된 callus를 멸균된 여과지에 올려 여분의 수분을 제거한 후 공동배양 배지(1/2MS, 3% sucrose, 1% glucose, 1% Betaine, 0.4mg/L Kinetin, pH 5.8, 0.2% Gelrite, 50mg/L acetosyringone)에 치상하여 25℃, 암조건에서 3일간 공동배양하였다. 공동배양한 callus로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위해 멸균수로 callus를 4~5회 씻은 후, 250 mg/L cefotaxime이 포함된 멸균수로 세척하고 멸균여과지를 사용하여 여분의 수분을 제거하였다. 수분을 제거한 callus는 250 mg/L cefotaxime이 첨가된 callus 증식배지에 치상하여 25℃, 암조건에서 2~3주간 배양하였다. Callus 선발배지에서 선발한 callus에서 shoot를 유도하기 위하여 1 mg/L phophinothricin(PPT)이 첨가된 shoot 유도배지(MS, 3% maltose, 1 mg/L BA, pH 5.8, 0.3% Gelrite)에 callus를 치상하고 25℃, 광조건에서 4주간 배양하였다. Callus로부터 유도된 shoot를 3 mg/L PPT가 첨가된 shoot 선발배지에 계대배양하고, 5cm 이상 증식한 개체를 5 mg/L PPT가 포함된 1/2 MS배지에 치상하여 뿌리를 유도하였다. PPT가 포함된 배지에서 shoot와 뿌리가 유도된 식물체를 화분에 순화하고, GM온실에서 재배 및 증식하였다.

6. β -1,3-Glucanase 유전자의 기관별 발현 분석

들잔디 식물체는 상토와 모래를 약 5:1로 혼합한 토양에 식재하여 증식하였다. 자연채광의 유리온실에 식재되어 있는 들잔디 식물체의 flower, blade, sheath, stolon, root에서 total RNA를 추출하였다. DNA-free kit(Ambion)을 사용하여 DNA를 제거한 total RNA에 OligodT primer(dT15)를 0.5 μ g 넣고 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열 한 후 얼음에서 냉각한 다음, RNasin Ribonuclease inhibitor 25unit, RTase 200unit, 5x reaction buffer, dNTP 혼합액을 섞어 42 $^{\circ}$ C에서 90분간 반응시켜 single strand cDNA를 합성하였다. 발현분석에 사용한 primer는 full-length β -1,3-glucanase 유전자를 cloning 할 때 사용한 specific primer(Table 1)를 이용하였으며, 각 기관으로부터 합성된 cDNA를 template로 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. RTase는 Promega사에서 판매하는 Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)를 사용하였다.

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

1) 발현 조건의 검토

단백질을 대량정제하기 위해서는 *E. coli*의 단백질 발현 시스템을 이용하여 최적의 발현조건을 찾는 것이 중요하다. 재조합 단백질의 유도하기 위해 균농도(OD₆₀₀)가 0.5~0.6 되었을 때 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)를 0.1, 0.5, 1mM 농도로 넣고, 배양온도를 18, 25, 37 $^{\circ}$ C로 설정하여 배양 후 각 조건별로 균을 수확하였다. 수확된 균은 binding buffer(1xPBS, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mMKH₂PO₄, PH7.4)에 재현탁 한 후 sonication하고, 원심분리를 통해 상층의 수용성단백질, 하층의 불용성단백질로 나누었다. 얻어진 단백질 추출물을 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분리한 다음, 발현의 유도 및 수용성여부 등을 판단하였다. 겔의 Acrylamide농도는 Stocking gel 3%, Separation gel 12%로 하였으며 영동 후 0.2% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma) 용액으로 염색하여 7.5%

acetic acid용액으로 탈색 후 단백질을 검출하였다.

2) GST- β -1,3-glucanase fusion vector 제작

재조합 들잔디 β -1,3-glucanase 단백질을 정제하기 위해 *E. coli*의 단백질 발현 시스템을 이용하였으며, 발현을 벡터로는 GST(Glutathione-S-Transferase) tag 을 가지고 있는 pGEX4T-1(Novagen)을 사용하였다(Fig. 4). 목적 유전자의 도입을 위해 pGEX4T-1의 MCS지역에 5'-*Bam*H 1, 3'-*Not* 1 제한효소 인식부위를 이용하여 ZjGlu1 염기서열을 도입하였으며, 염기서열 분석을 수행하여 pGEX4T-1벡터 안에 β -1,3-glucanase 유전자 서열이 돌연변이가 일어나지 않고 온전히 삽입이 되었는지 확인하였다. 완성된 vector는 *E. coli* DE3(BL21) 균주에 Heat-shock 방법을 통해 도입하여 100mg/L Ampicillin이 포함된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 선발하였다.

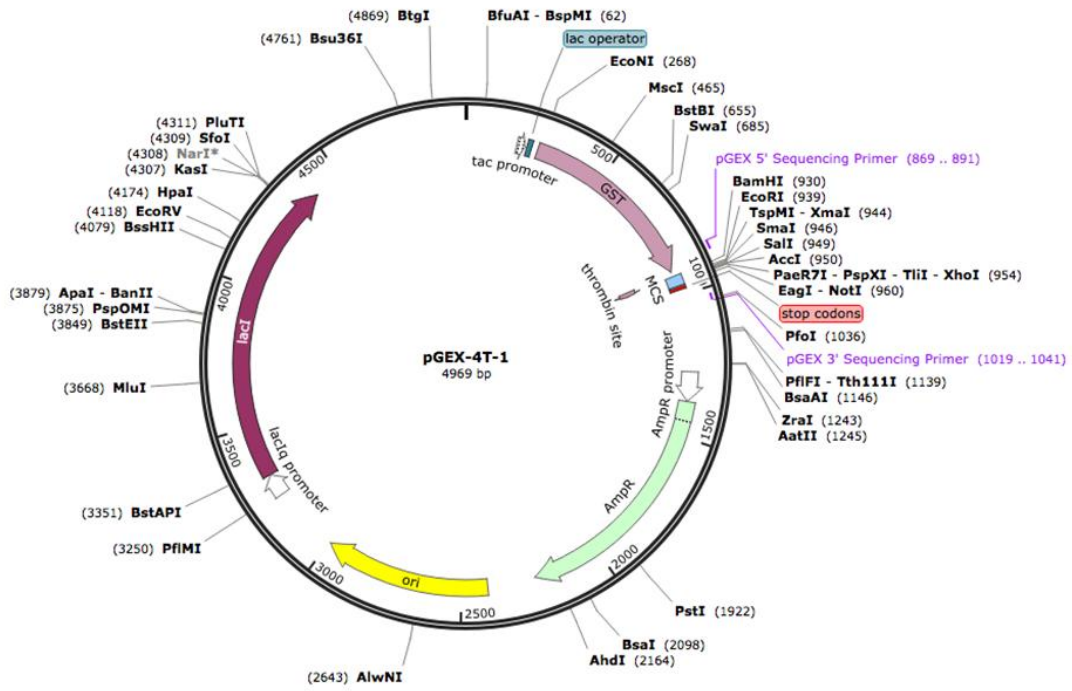


Figure 4. GST- β -1,3-glucanase fusion vector.

3) 균의 대량 배양 및 단백질 정제

발현 조건 검토 결과에 따라 균을 대량으로 배양하고 수집하여 binding buffer에 재현탁한 후, sonication(Sonics & Materials)하였다. 13000rpm에서 10분간 원심분리하여 불용성의 단백질들을 제거하고 상층액을 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare) column을 이용하여 GST가 fusion된 β -1,3-glucanase 단백질을 정제하였다. 상세한 정제 방법은 GST Gene Fusion System Handbook(Amersham Bioscience)을 따랐으며, Elution buffer로는 50mM Tris-HCl, 10mM Reduced glutathione, pH 8.0 을 사용하였다. 정제한 단백질에서 GST tag를 제거하고 순수한 β -1,3-glucanase 단백질을 얻기 위하여 정제한 단백질 10mg당 10 unit의 트롬빈(thrombin)을 처리한 후 실온에서 30분, 4°C에서 완전히 절단될 때까지 처리하였다. 반응종료 후, Glutathione Sepharose 4 Fast flow column을 이용하여 분해된 GST 단백질을 제거하였다.

8. β -1,3-Glucanase protein의 기능분석

1) 디스크 확산법을 이용한 β -1,3-glucanase의 균사신장 억제 분석

재조합 β -1,3-glucanase 단백질의 항균활성 분석을 위하여 원판확산법을 이용하였다. PDA(Potato Dextrose Agar)배지를 분주하여 고체배지를 만들고 종이 디스크를 주변에 치상하였다. 정제한 ZjGlu1-GST fusion 단백질에 트롬빈을 처리한 후 GST단백질을 제거한 ZjGlu1 단백질과, control로 PBS buffer를 이용하여 항균활성 정도를 비교하였다. 각 디스크당 ZjGlu1 단백질 236 μ g을 점적하였다. 중앙에 시험균주를 치상하고 25°C에서 암배양하며 균사의 생장을 관찰하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. β -1,3-Glucanase 유전자의 클로닝

1) β -1,3-Glucanase 유전자의 클로닝

한국 들잔디에서 가장 문제가 되고 있는 라이족토니아잎마름병(라지패취)의 병원균인 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)에 대한 내병성을 가지고 있는 형질전환 들잔디를 개발하기 위해 β -1,3-glucanase 유전자를 NCBI의 데이터베이스를 통하여 보리, 밀, 옥수수, 쌀 등에서 분리된 기지의 β -1,3-glucanase의 아미노산 sequence를 분석한 다음, Degenerate PCR을 통해 들잔디 뿌리 유래의 cDNA로부터 유전자의 단편을 클로닝하였다(Fig. 5).

Degenerate PCR을 통해 얻어낸 단편으로부터 Full-length 유전자를 cloning하기 위해 각 clone에 대하여 Genefishing DEG kit를 이용하여 3' RACE를 진행하였다. 먼저 zoysiagrass의 잎과 뿌리로부터 추출한 total RNA를 template로 사용하여 kit에 포함되어 있는 adapter 서열인 달린 oligo dT primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이미 알고있는 sequence를 바탕으로 제작한 forward primer와 cDNA합성에 이용했던 adapter서열과 상보적인 sequence로 된 reverse primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 모두 350 bp 부근에서 band가 형성 되었고 polyA를 포함 350 bp의 3' region이 증폭된 것을 확인하였다. 그 후, 5' full RACE Core set(TAKARA)를 이용해 5' gene walking을 수행하였다. 들잔디로부터 β -1,3-glucanase 유전자를 분리하고 각각을 *ZjGlu1*, *ZjGlu2*로 명명하였다. *ZjGlu1*은 총장 1,228 bp, 339개의 아미노산으로 구성되어 있고, 신호서열을 제외한 단백질 분자량이 34.7kDa, 등전점(iso-electric point, pI)은 9.14로 계산되었다. *ZjGlu2*는 총장 1,179bp 340개의 아미노산으로 구성되어 있고, 신호서열을 제외한 단백질 분자량이 38.6kDa 등전점은 5.77로 계산되었다.

PR-2 family인 β -1,3-glucanase는 보통 4개의 Class로 나뉘는데 Class I은 33kDa이하의 크기이며, *Fusarium solani*의 성장을 억제하고 식물의 액포에 분비

된다(Claude 2001). Class II, III는 약 34~36kDa의 크기이고 세포 외 공간으로 분비되며, Class IV에 대해대해 알려진 것은 아직 없다. ZjGlu1의 경우 크기는 34.7kDa이며, 염기서열 분석 결과 Class II에 가깝다는 것을 알 수 있었다.

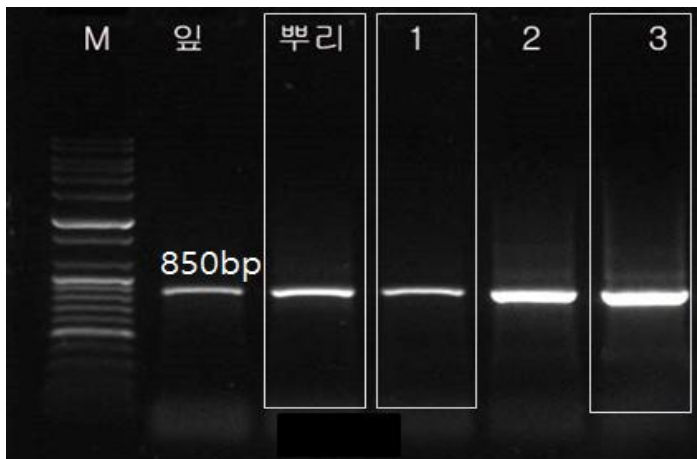


Figure 5. Degenerate PCR results.

M, marker; 앞, 온실에서 재배된 들잔디의 잎; 뿌리, 온실에서 재배된 들잔디의 뿌리; 1, *R. solani* treatment(1 day); 2, *R. solani* treatment(2 days); 3, *R. solani* treatment(3 days).

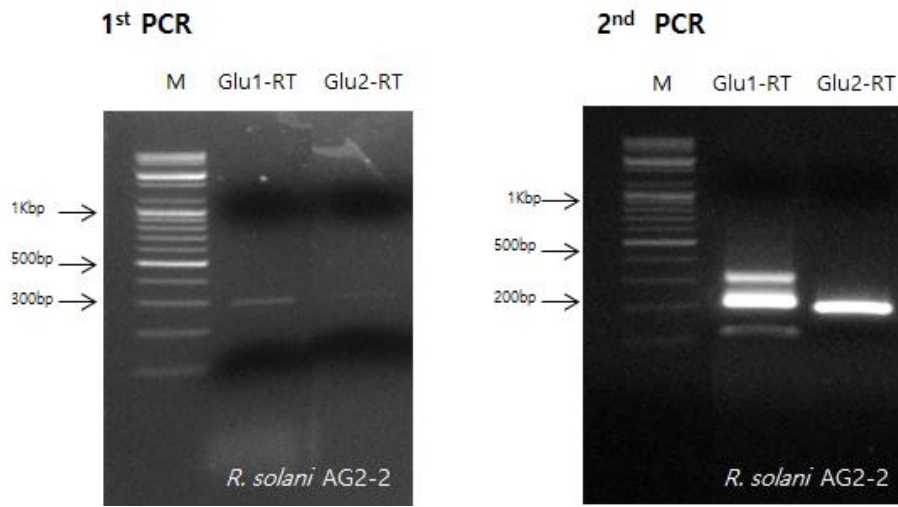


Figure 7. 5' RACE PCR results.

2. β -1,3-Glucanase의 구조적 특성 및 발현 분석

1) β -1,3-Glucanase의 구조적 특성 분석

NCBI에서, 클로닝된 *ZjGlu1*의 아미노산 sequence를 blast한 결과 Glycosyl hydrolases family 17에 속하였으며, VSESGWPSAG서열을 보존하고 있었다 (Table 2). 이를 glycosyl hydrolase motif(LGIVISESGWPSAG)와 비교한 결과, 상당부분 일치함을 알 수 있었다. Protcomp와 Plant mPloc 두 개의 소프트웨어를 사용하여 신호서열 분석을 수행하였다. 그 결과, Protcomp 분석에서는 *ZjGlu1*이 액포와 세포외에 존재하고, Plant mPloc 분석에서는 액포에 존재하는 것으로 예측되었다.

Table 2. Amino acid sequence of putative *Z. japonica* β -1,3-glucanase

β -1,3-glucanase genes	Amino acid sequence
ZjGlu1	MARPQVASALAVALIAGAFASLLTTVQSIGVGYGLGNNLPSASQWQLYRSKGINGMRIYGPNKAALDALRNSEIGLILD TXXNDEMSQLASSPSSAASWVQNNVRPYYPVAVNIKYIIVGNEVEGGATQSILPAMRNLSALSSAGLNSIKVSTSVRF DVIANSYPPSAGVFAQSYMTXXVARFLASAGAPLLANVYPYFAYRGNPRDIKLGATFQGGTTVRDDRNXLYTNLFD AMVDSIYAALEKAGTGNVKKVISESGWPSAGGFGASVDNARNYNQGLINHVGGQTPRRRGALETYIFAMFNENQKKG DETEKHFGLFYXXNTSPVYPIRF
ZjGlu2	MATRGVAPVLVAALAMAALAQGVRAIGVCYGVIGDNIPPASDVVQLYKSNRIGTMRIYFADRKALDALRGSIGLILDV GTEDKVELAGNPSNAASWVKDNVQAYYPDVNIIRYVAVGNELTGTGAASAVLPAMRNVHDALASAGLAGSIKVSTAV SMDTLDEKSSPPSNGMLKDSGVMNPIVQFLATNGAPLLANVYPYFAYKGDQIDLNALFQPSSTTVDPNGGLTYTNL FDAMVDAVRAAVDKAGGGGVVVSESGWPSANGRGATVENARTYNQNLINHAGKGTPRKPGAMEVYVYFAMFNE NQKNGDPTEKKFGLFNPVDRTPVYPIVAFAGN

2) β -1,3-Glucanase의 phylogenetic tree 분석

*ZjGlu1*의 Full-length 염기서열은 *Phyllostachys edulis*(FP092366.1)와 82%, *Oryza sativa*(AF443600.1)와 81% 상동성을 보였다(Figure1). 다양한 식물체와 들잔디 β -1,3-glucanase의 계통도 분석을 위해 NCBI에서 Blastx를 통해 *ZjGlu1*의 sequence와 상동성이 가장 높은 β -1,3-glucanase중 cloning 및 기능 분석이 된 쌍자엽과 단자엽식물의 amino acid sequence와 alignment하고 MEGA 6.0의 Neighbor joining algorithm을 이용하여 Phylogenetic tree를 분석하였다(Fig. 8). 식물에서의 β -1,3-glucanase는 다양한 기관에 위치해 있으며 식물의 구조와 발현조절 등 식물체 내에서 직간접적으로 아주 많은 역할을 수행하고 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, 잎, 꽃, 줄기, 뿌리, stolon 등 모든 기관에서 발현됨을 확인하였다(Fig. 9).

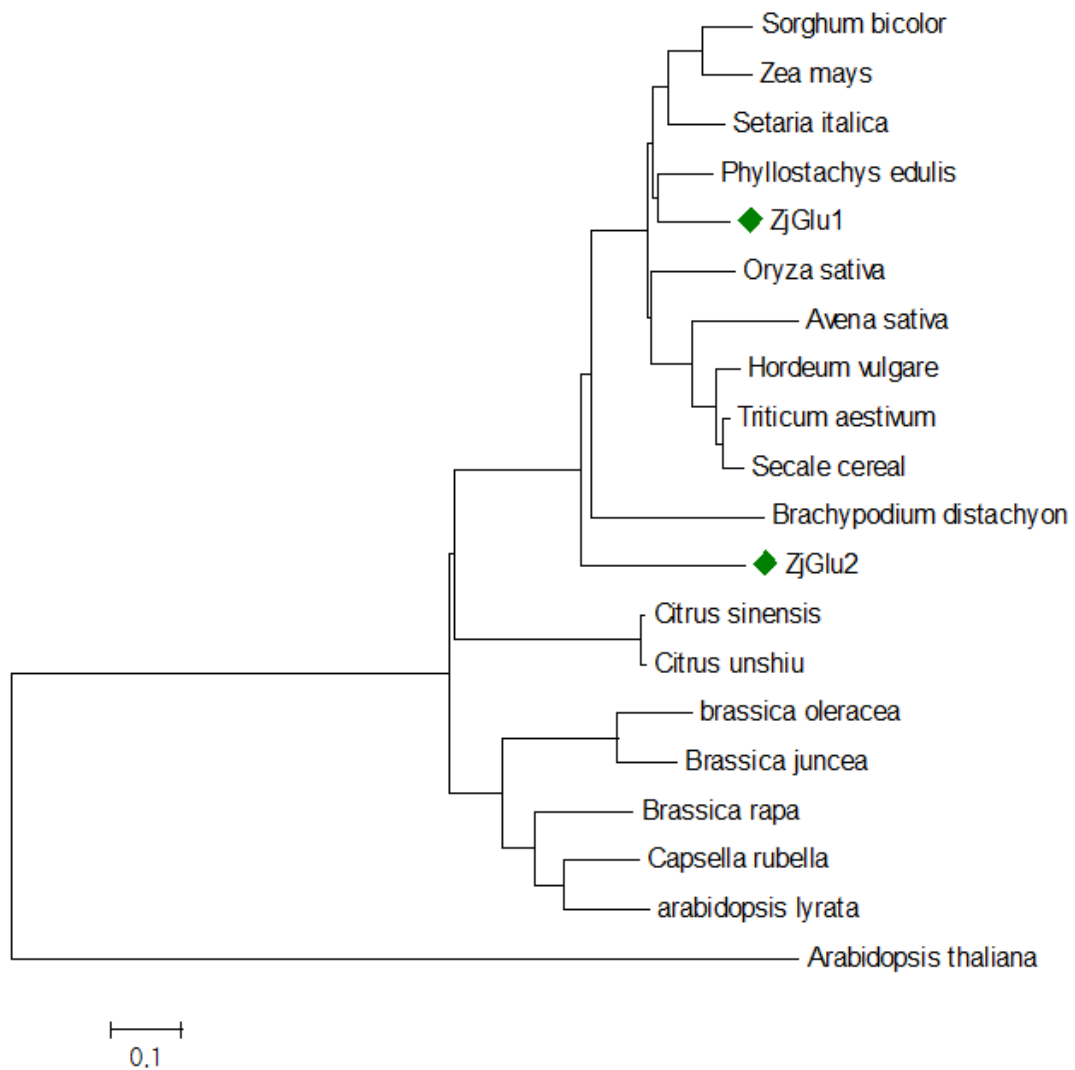


Figure 8. Phylogenetic tree analysis of two glucanases.

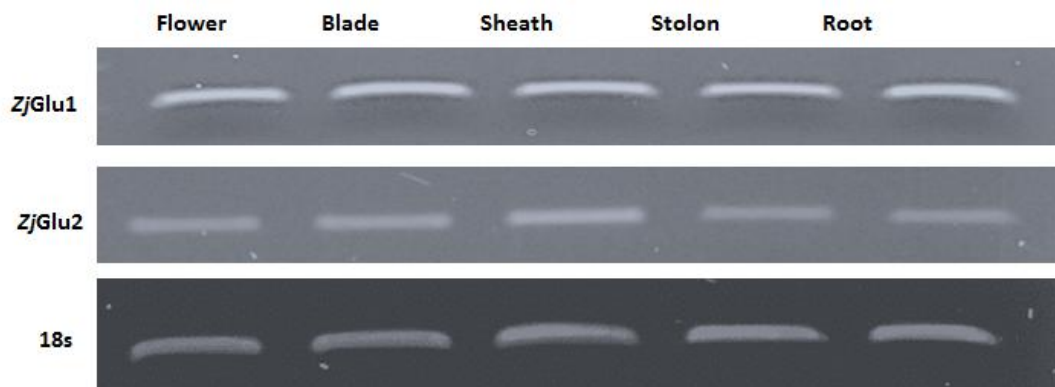


Figure 9. Expression analysis of *ZjGlu1* and *ZjGlu2* from different organ in zoysiagrass. *18S* rRNA was used as loading control.

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

*ZjGlu1*의 정제를 위해 벡터 및 균주의 종류, IPTG 농도, 발현 유도 후 배양시간 등의 조건을 검토한 결과, DE3(BL21)균주에 *ZjGlu1* 유전자를 포함한 pGEX 4T-1 벡터를 도입하고 37°C에서 $OD_{600}=0.6$ 이 되었을 때 IPTG 농도가 0.5 mM이 되도록 넣고, 18°C에서 약 6시간 배양하였을 때 대부분의 발현 단백질이 가용성 획분(soluble protein)에서 발현됨을 확인하였다(Fig. 10). 정제된 GST- β -1,3-glucanase fusion protein은 약 60 kDa의 크기였으며, thrombin을 처리한 후 GST를 제거한 순수한 β -1,3-glucanase protein을 정제하여 항균활성 테스트에 이용하였다(Fig. 10).

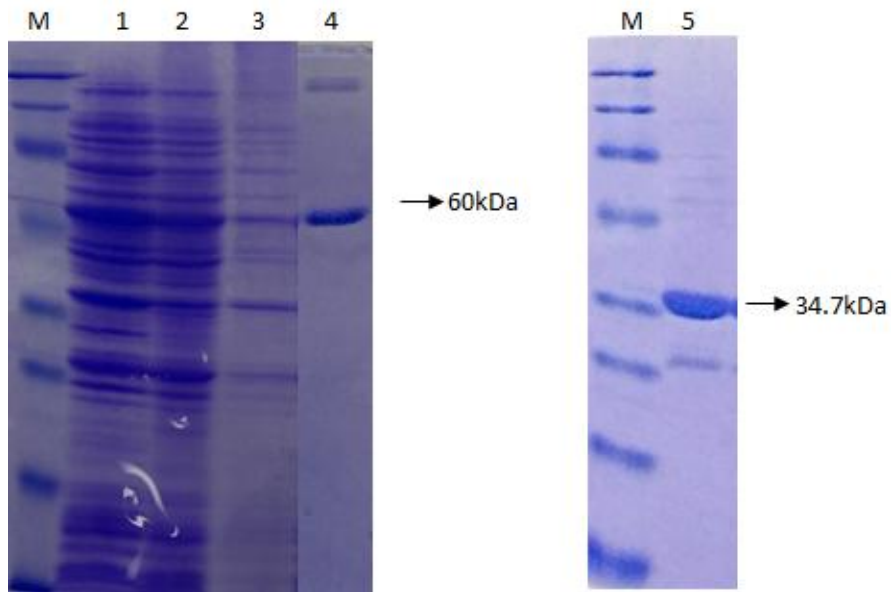


Figure 10. Overexpression of GST- β -1,3-glucanase fusion protein in *E.coli* and purification. M, protein marker; Lane 1, Total protein (+ IPTG); Lane 2, Soluble protein (+ IPTG); Lane 3, insoluble protein (+ IPTG); Lane 4, Purified GST- β -1,3-glucanase fusion protein; Lane 5, Purified β -1,3-glucanase

4. 재조합 β -1,3-glucanase의 항균활성 분석

재조합 단백질의 항균활성을 검정하기 위해 정제된 ZjGlu1 단백질과 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)의 9종의 균주를 고체배지에 올려 관찰하였다. 그 결과, 모든 균주에 대해 활성을 보이지는 않았으나 한국 잔디류를 기주로 발생하는 봄 마름병(춘고병), 황색마름병(Yellow patch)를 일으키는 *R. cerealis* 와, foot and root rot과 head bright를 일으키는 *F. culmorum*, 갈색잎 마름병(brown patch)을 일으키는 *R.solani* AG-1(1B)(Kim *et al*, 2013), 그리고 푸른곰팡이의 한 종류인 *T.atroviride* 등 4개의 균주에 대해서 항균활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11). 균주의 증식 양상을 매 시간 관찰한 결과, 더 높은 농도의 ZjGlu1 protein을 처리하면 다른 균주에 대해서도 활성을 가질 가능성이 있을 것으로 추정된다.

본 실험의 결과, 정제한 들잔디 유래의 재조합 β -1,3-glucanase 는 fungi 균주 4개에 대해서 활성을 보였으며, 이는 β -1,3-glucanase 유전자를 도입한 형질전환 들잔디가 이들 균에 대한 항균활성을 가질 수 있음을 시사한다.

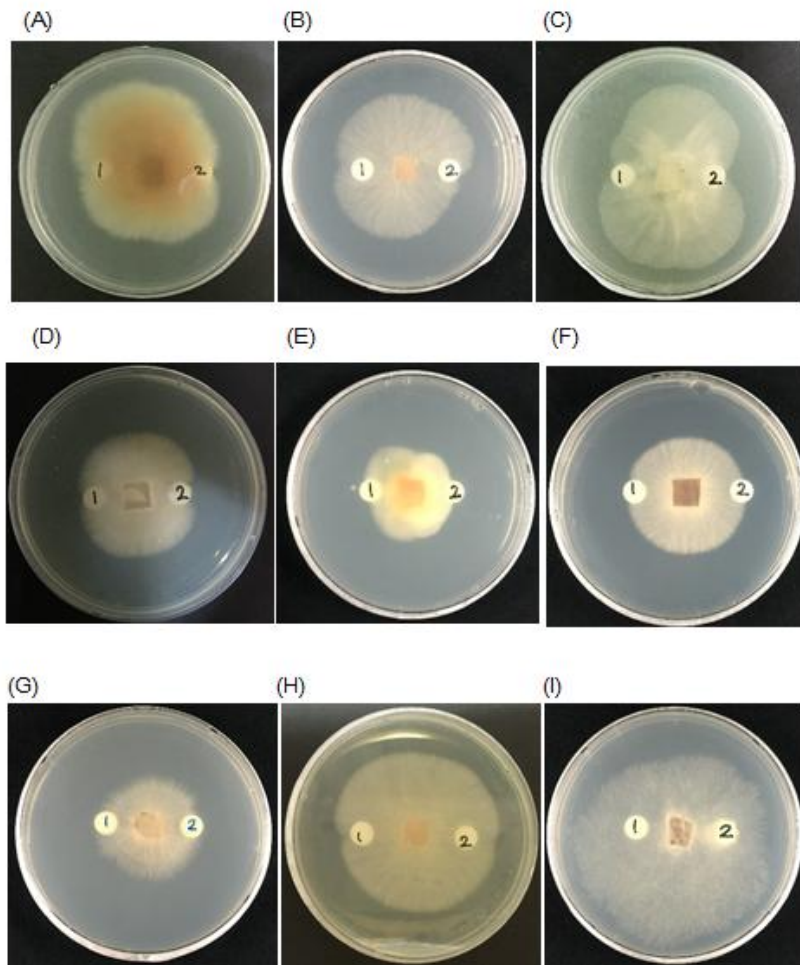


Figure 11. Disk Diffusion susceptibility test of purified r- β -1,3-glucanase against various pathogenic fungi on PDA. (A) *F. culmorum*, (B) *R. solani* AG-1(1B), (C) *T. atroviride*, (D) *R. cerealis*, (E) *F. graminearum*, (F) *R. solani* 2-2(IV), (G) *R. solani* AG-1A, (H) *R. Solani* AG2-2(IIIB). In each of paper disk treated (1) PBS buffer, (2) 236 μ g/80 μ l purified r-ZjGlu1.

5. 잔디 형질전환체의 선발

*ZjGlu1*과 *ZjGlu2* 유전자를 들잔디에 형질전환하여 형질전환 식물체를 선발하였다. 1차로 5 mg/L PPT가 포함된 1/2 MS배지에서 형질전환 후보체를 선발한 다음, 1mg/L PPT가 포함된 1/2 MS배지에서 1개월에 한번씩 계대배양하며 유지하고 있다. 현재 *ZjGlu1*과 *ZjGlu2* 유전자가 도입된 형질전환체를 각각 10개체 이상씩 확보하고 있으며(Figure 12), 향후 이 형질전환 들잔디들의 향균활성을 검증할 계획이다.

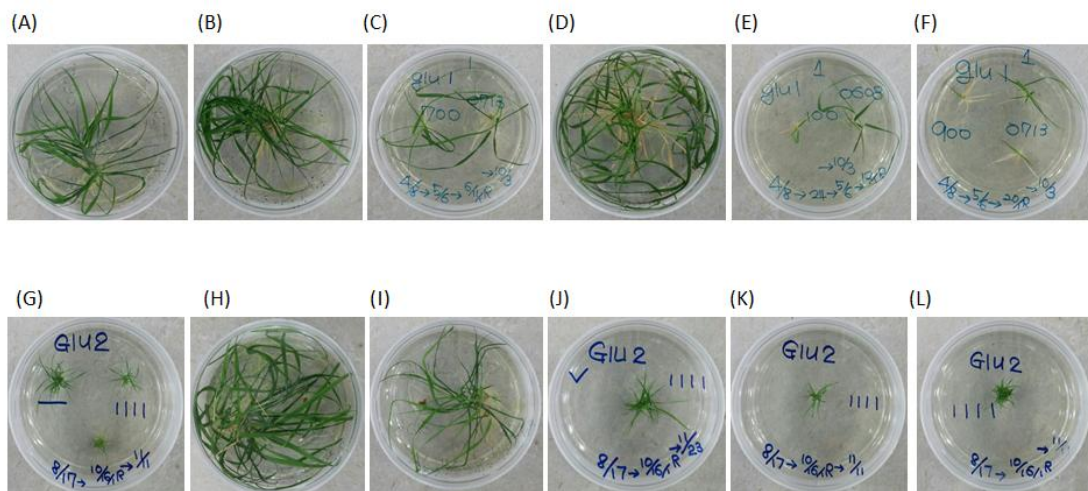


Figure 12. Putative transgenic plants. (A)~(F) ZjGlu1, (G)~(L) ZjGlu2.

IV. 종합고찰

잔디의 병은 곰팡이, 바이러스 등에 의해 주로 발생하고, 특히 골프장 잔디는 곰팡이에 의한 발생이 대부분이다(김 등, 2013). 한국형 잔디에서는 다른 병에 비해 진전 속도가 빠르고 주로 뿌리에서부터 발병하여 잔디를 고사시키고 발병 후에는 구제가 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 cloning 하였다. β -1,3-glucanase는 바이러스나 균의 감염으로 인해 식물조직이 과민반응을 일으킬 때 세포내에서 생성되고 세포 외로 분비되어 세포 사이 공간에서 주로 병원균에 대한 저항성기능을 하는 것으로 알려져 있다(Claude 2001). 들잔디에서 β -1,3-glucanase 유전자를 분리하기 위하여 단자엽식물 중 β -1,3-glucanase 유전자의 내병성에 대한 연구가 보고되어 있는 옥수수, 밀, 보리, 벼의 염기서열에서 공통으로 보존되어 있는 부분을 이용하여 degenerate PCR을 수행한 다음, 확보된 sequence를 통해 Full-length의 cDNA를 cloning 하였다. 분리한 들잔디 유래의 β -1,3-glucanase 유전자들의 기능을 분석하기 위하여 *E. coli* 에서 ZjGlu1을 발현·정제하여 *in vitro* 활성 측정 및 항균테스트를 진행하였다. 또한, ZjGlu1, ZjGlu2 유전자의 들잔디 식물 내에서의 기능을 분석하기 위해 각각의 유전자를 도입한 식물형질전환용 벡터를 제작하여 *Agrobacterium* 법으로 들잔디에 형질전환을 수행하였고, 각각의 유전자가 도입된 형질전환 들잔디를 성공적으로 제작하였다.

정제 단백질을 이용한 항균활성 테스트를 위해 ZjGlu1과 ZjGlu2 단백질을 대장균 발현계에서 발현·정제를 시도하였으나, ZjGlu2 단백질은 가용성으로 발현이 되지 않아 ZjGlu1 단백질만 정제하여 항균활성 실험을 수행하였다. ZjGlu1 단백질을 이용하여 9개의 균주에 대해 항균활성 테스트를 진행한 결과 *R. cerealis*, *F. culmorum*, *R. solani* AG-1(1B), *T. atroviride* 에서 항균활성을 보였다. ZjGlu1과 ZjGlu2 유전자가 도입된 형질전환체를 이용하여 잔디의 기관별 발현량

을 분석한 결과, 각 유전자는 모든기관에서 발현하였으며 기관별 발현량에 큰 차이는 없는 것으로 확인되었다. 정제한 ZjGlu1 protein을 처리한 균주의 증식 양상을 매 시간 관찰한 결과, 더 높은 농도의 ZjGlu1 protein을 처리하면 다른 균주에 대해서도 활성을 가질 가능성이 있을 것으로 판단되었다. 본 실험의 결과, 정제한 들잔디 유래의 재조합 β -1,3-glucanase 는 fungi 균주 4개에 대해서 활성을 보였으며, 이는 β -1,3-glucanase 유전자를 도입한 형질전환 들잔디가 이들 균에 대한 항균활성을 가질 수 있음을 시사한다. 현재 ZjGlu1과 ZjGlu2 유전자가 도입된 형질전환체를 각각 10개체 이상씩 확보하고 있으며, 향후 이 형질전환 들잔디들의 항균활성을 검증할 계획이다.

V. 참고문헌

- Liu B, Xue X, Cui S, Zhang X, Han Q, Zhu L, Liang X, Wang X, Huang L, Chen X, Kang Z. (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 YH¹, 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
- Claude P. selitrennikoff (2001) Antifungal Proteins. Appl Environ Microb 67:2883-2894
- Deanna L. Funnell, Christopher B. Lawrence, Jeffery F. Pedersen, Christopher L. Schardl(2004) Expression of the tobacco β -1,3-glucanase gene, *PR-2d*, following induction of SAR with peronospora tabacina. Physiol Mol Plant P 65:285-296
- DS Kim, KS Lee, EJ Bae, JY Hwang, YS Kwak, DW Lee, SM Lee and YB Park(2013) Disease and weed occurring in zoysiagrass. National institute of forest science 517
- EJ Bae, KS Lee, DS Kim, EH Han, SM Lee, DW Lee(2013) Sod Productio and Current Status of Cultivation Management in Korea. Weed & Turfgrass Science 2(1):95-99
- Ganapathi Sridevi, Chidambaram Parameswari, Natarajan, Sabapathi, Vengoji Raghupathy, Karuppanan 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, Chandrasekkhar 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),
- Hyong Woo Choi, Nak Hyun Kim, Yeon Kyeong Lee, and Byung Kook Hwang(2013) The pepper Extracellular Xyloglucan-Specific Endo-1,4-glucanase Inhibitor Protein Gene, *CaXEGIP1*, Is Required for Plant Cell Death and Defense Responses. *Plant Physiol* 161:384-396
- 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
- JY Kang, DH Kim, DG Lee, IS Kim, MG Jeon, JD Lee, IH Kim, SH Lee(2013) Screening of Antifungal Activities of Medicinal Plants for the Control of Turfgrass Fungal Disease. *Weed & Turfgrass Science* 2(1):70~75.
- Janice Lisboa de Marco and Carlos Rovertto Felix(2007) Purification and Chracterization of a β -glucanase Produced by *Trichoderma harzianim* showing Biocontrol Potential. *Braz Arch Biol Techn* 50:21-29
- Korea forest service 2012
- Lee, J.P., Kim, S.J., Seo, H.Y., Lee, S.J., Jeong, J.I., 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).
- L,X. Qiao, X. Ding, H.C. Wang, J.M. Sui, J.-S. Wang(2014) Chracterization of the β -1,3-glucanase gene in peanut(*Archis hypogaea* L.) by cloning and genetic transformation. *Genetics and Molecular Research* 13: 1893-1904.

- Mahmoud W.F. Yaish^{3*}, Andrew C. Doxey, Brendan J. McConkey, Barbara A. Moffatt, and Marilyn Griffith(2006) Cold-Active Winter Rye Glucanases with Ice-Binding Capacity^{1,2}. *Plant Physiol* 141: 459–1472, 1
- Robert Leah, Henrik Tommerup, Ib Svendsen, and 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 and Bhupinder Singh(2011) Pathogenesis Related(PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Science against microbial pathogens; communicating current research and technological advanced.
- SM Lee, DS Kim, KS Lee, CK Lee, and DW Lee(2013) Antibiotic Properties of *Helicospirium* sp. KCTC 063BP to *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV). *Weed & Turfgrass Science* 2(2):202~206.
- Sudar Olli and P. B. Kirti(2006) Cloning, Characterization and Antifungal Activity of Defensin Tfgd1 from *Trigonella foenum-graecum* L. *J Biochem Mol Biol* 39:278-283
- Toyama K, Bae CH, Kang GJ, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, and 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, Raruang 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.

Yanlin Shi, Yuhua Zhang, Ding S. Shin(2006) Cloning and expression analysis of two β -1,2-glucanase genes from strawberry. J Plant physiol 163:956-967