

# ITS 염기서열 분석 및 CAPS를 이용한 조이시아 속(*Zoysia*) 들잔디와 갯잔디의 구별

홍민지<sup>1\*</sup> · 양대화<sup>2,3\*</sup> · 정옥철<sup>2</sup> · 김양지<sup>1</sup> · 박미영<sup>2</sup> · 강홍규<sup>2</sup> · 선현진<sup>2,3</sup> · 권용익<sup>2</sup> · 박신영<sup>4</sup> · 양바오로<sup>5</sup> · 송필순<sup>2</sup> · 고석민<sup>6\*</sup> · 이효연<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 생명공학부, <sup>2</sup>제주대학교 아열대원예산업연구소, <sup>3</sup>제주대학교 아열대 열대생물유전자은행센터, <sup>4</sup>제주한라대학교 임상병리학과, <sup>5</sup>충남대학교 농학과, <sup>6</sup>오믹시스

## Molecular Identification of *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica* (*Zoysia* Species) Based on ITS Sequence Analyses and CAPS

Min-Ji Hong<sup>1\*</sup>, Dae-Hwa Yang<sup>2,3\*</sup>, Ok-Cheol Jeong<sup>2</sup>, Yang-Ji Kim<sup>1</sup>, Mi-Young Park<sup>2</sup>, Hong-Gyu Kang<sup>2</sup>, Hyeon-Jin Sun<sup>2,3</sup>, Yong-Ik Kwon<sup>2</sup>, Shin-Young Park<sup>4</sup>, Paul Yang<sup>5</sup>, Pill-Soon Song<sup>2</sup>, Suk-Min Ko<sup>6\*</sup>, Hyo-Yeon Lee<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>2</sup>Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>3</sup>Subtropical/tropical Organism Gene Bank, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>4</sup>Department of Clinical Pathology, Cheju Halla College, Jeju 63092, Korea

<sup>5</sup>Department of Agronomy, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

<sup>6</sup>Omicis. Inc. BVC, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 34141, Korea

\*Corresponding author: hyoyeon@jejunu.ac.kr, kkheyne@hanmail.net

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

Received: December 3, 2015

Revised: October 25, 2016

Accepted: November 3, 2016

 OPEN ACCESS



HORTICULTURAL SCIENCE and TECHNOLOGY  
35(3):344-360, 2017  
URL: <http://www.kjhst.org>

pISSN : 1226-8763  
eISSN : 2465-8588

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright©2017 Korean Society for Horticultural Science.

본 연구는 산림청 국립산림품종관리센터 산림생명자원개발사업, 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원 농림축산식품부사업(과제번호: 315025-3), 교육부 한국연구재단(과제번호: 2009-0094059)과 기초연구사업(과제번호: 2016R1A6A1A03012862), 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ011244)의 지원을 받아 연구되었음.

## Abstract

Zoysiagrasses are important turf plants used for school playgrounds, parks, golf courses, and sports fields. The two most popular zoysiagrass species are *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica*. These are widely distributed across different growing zones and are morphologically distinguishable from each other; however, it is phenotypically difficult to differentiate those that grow along the coastal line from those in beach area habitats. A combination of morphological and molecular approaches is desirable to efficiently identify these two plant cultivars. In this study, we used a rapid identification system based on DNA barcoding of the nrDNA-internal transcribed spacer (ITS) regions. The nrDNA-ITS regions of ITS1, 5.8S nrDNA, and ITS2 from *Z. japonica*, *Z. sinica*, *Agrostis stolonifera*, and *Poa pratensis* were DNA barcoded to classify these grasses according to their molecular identities. The nrDNA-ITS sequences of these species were found at 686 bp, 687 bp, 683 bp, and 681 bp, respectively. The size of ITS1 ranged from 248 to 249 bp, while ITS2 ranged from 270 to 274 bp. The 5.8S coding region ranged from 163 - 164bp. Between *Z. japonica* and *Z. sinica*, nineteen (2.8%) nucleotide sites were variable, and the G+C content of the ITS region ranged from 55.4 to 63.3%. Substitutions and insert/deletion (indel) sites in the nrDNA-ITS sequence of *Z. japonica* and *Z. sinica* were converted to cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers, and applied to the *Zoysia* grasses sampled

to verify the presence of these markers. Among the 62 control and collected grass samples, we classified three groups: 36 *Z. japonica*, 22 *Z. sinica*, and 4 *Z. japonica/Z. sinica* hybrids. Morphological classification revealed only two groups; *Z. japonica* and *Z. sinica*. Our results suggest that used of the nrDNA-ITS barcode region and CAPS markers can be used to distinguish between *Z. japonica* and *Z. sinica* at the species level.

**Additional key words:** cleaved amplified polymorphic sequence, internal transcribed spacer, restriction endonuclease, species identification, *Zoysia japonica*, *Zoysia sinica*

## 서 언

잔디는 학교운동장 및 공원, 도로변, 골프장, 스포츠 경기장 등에 다양한 장소에 식재되고 있는 주요 원예 작물이다. 최근 그 범위가 확대되고 있어 실용적 및 잠재적 가치가 점차 증가하고 있는 추세이다(Sun et al., 2010; Hyun et al., 2012). 잔디는 생육 적온에 따라 고온에 강한 난지형 잔디와 저온에 강한 한지형 잔디로 구분되며, 난지형 잔디에는 대표적으로 들잔디(*Zoysia japonica*)와 갯잔디(*Zoysia sinica*), 금잔디(*Zoysia matrella*), 왕잔디(*Zoysia macrostachya*), 버뮤다그라스(*Cynodon dactylon*) 등이 속하며, 한지형 잔디는 크리핑 벤트그라스(*Agrostis stolonifera*), 켄터키 블루그라스(*Poa pratensis*), 톨웨스큐(*Festuca arundinacea*), 라이그라스(*Lolium perenne*) 등이 있다(Kim and Lee, 2010). 우리나라에서 주로 자생하는 난지형 잔디 *Zoysia* 속(*Zoysia species*) 중 잔디로 이용되는 것은 들잔디(*Z. japonica*)와 금잔디(*Z. matrella*)가 있으며, 특히 들잔디는 여름철의 극심한 고온 및 건조, 해안가 모래의 염분 같은 환경에서도 잘 적응하는 특성이 있다(Sun et al., 2010; Hyun et al., 2012). 그 외에 해안지대에서 자생하는 갯잔디(*Z. sinica*)와 왕잔디(*Z. macrostachya*)가 있으며, 그 중 갯잔디는 수분과 양분의 요구도가 비교적 적다는 점에서 들잔디와 유사하지만, 내염성과 내건성이 들잔디 보다 매우 강한 특성이 있어 종 및 속간 교잡을 이용하여 신품종 개발에 활용될 수 있는 유전자원이다(Yu et al., 1974; Li et al., 2006; Hyun et al., 2012; Chung et al., 2013). 그러나 바닷가 및 갯벌과 같은 장소에서 자생하는 내염성 들잔디 및 갯잔디의 경우에는 다른 난지형 잔디에 비해 외부 형태적 특성이 매우 유사하여 비전문가가 구별하는 것이 쉽지 않다. 따라서 기존의 외부형태학적 동정법에만 의존하기 보다는 분자생물학적 기법을 이용한 분류 또한 필요한 실정이다.

이러한 문제점을 해결하기 위해서 restriction fragment length polymorphism(RFLP), random amplified polymorphic DNA(RAPD), amplified fragment length polymorphism(AFLP), simple sequence repeat(SSR), sequence related amplified polymorphism(SRAP) 등 많은 종류의 식물 분류를 위한 molecular marker가 개발되어 왔다. 잔디의 경우 라이그라스(Kubik et al., 2001), 버팔로그라스(Wu et al., 1994; Budak et al., 2004), 텍사스 블루그라스(Renganayaki et al., 2001)에서 marker가 보고되어 있다. 그러나 이러한 marker들은 비교적 비용과 시간이 많이 들고 다소 복잡하다.

최근 표준화 가능한 분류 및 동정법으로 모든 생물에 존재하는 DNA 염기서열 정보를 동정에 응용하는 DNA 바코드(DNA barcode) 분석법이 개발되었다(Hebert et al., 2003). DNA 바코드는 다양한 생물종에 공통적으로 보존 및 변이되어 존재하는 특정한 유전자 및 염기서열 구간이며, 생물의 아주 작은 조각에서도 DNA 분석이 가능하고 간단한 PCR 증폭과 염기서열 분석을 통하여 미동정 생물체 동정에 활용되고 있다(Hebert et al., 2003; Kress et al., 2005; Koch, 2010; Kim et al., 2015). 이러한 DNA 바코드 분석법은 생물다양성협약(Convention on Biological Diversity, CBD)의 국제적 생물종 분류기준(Consortium for the Barcode of Life, CBOL, <http://barcoding.si.edu>)으로 채택되어 나라별 고유종 및 신종 등록과 수집한 생물의 표본관리, 의약품 등 신물질 재료 판별 검증 등에 응용이 가능하여 식약처 및 환경부, 농림부 등 다양한 기관에서 생물 분류시 연구 및 활용되고 있다(Baigalmaa et al., 2009; Ahn et al., 2010; Hong et al., 2012; Moon et al., 2013). 생물 분류를 위한 DNA 바코드 분석은 핵 내 ribosomal DNA(nrDNA)의 internal transcribed spacer (ITS) 염기서열 구간 등을 이용하여 연구되어 왔다(Kress et al., 2005; Baigalmaa et al., 2009; Ahn et al., 2010; China Plant BOL Group et al., 2011; Hong et al., 2012; Kress and Erickson, 2008; Moon et al., 2013). ITS 염기서열 구간은 18S와 26S ribosomal DNA 사이에 존재하는 ITS1과 ITS2 염기서열로(Fig. 2),

양친 유전성을 가지며, 생물 종에 따라 보존 지역과 변이 지역이 뚜렷하여 polymerase chain reaction(PCR)을 통한 분리 및 염기서열 분석에 유리하다(Kress et al., 2005; CBOL Plant Working Group, 2009; Ahn et al., 2010; Hong et al., 2012). 또한, ITS는 종간 및 속간 유연관계, 진화양상, 시중에 유통되는 한약제 위품들의 판별 등을 분석하는데 중요한 자료로도 이용되고 있다(Baigalmaa et al., 2009; Gao et al., 2010; Yao et al., 2010).

그러나 ITS 분석을 바탕으로 *Zoysia* 속 들잔디와 갯잔디 간의 유연관계 및 종 구별을 위한 분자생물학적 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 제주도 및 전라남도, 전라북도, 경상남도, 경상북도의 산, 해안지역, 섬에서 자생하는 *Zoysia* 속 잔디를 수집하고, ITS 염기서열 구간을 이용하여 자생 *Zoysia* 속 잔디로부터 들잔디 및 갯잔디를 구별하고자 하였다. 또한, 각 잔디별 ITS 염기서열 차이를 기반으로 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker (Konieczny and Ausubel 1993; Kunihiya et al., 2003; Kim et al., 2012)를 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 잔디 유전자원

본 연구에서 사용된 들잔디(*Z. japonica*, China)와 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*, USA), 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*, USA)의 판매 종자 및 수집된 갯잔디(*Z. sinica*, Jeju, Korea) 종자는 ITS DNA 바코드 분석에 의한 분자 생물학적 분류를 위해 서 대조구로 사용하였으며, 2010년부터 2014년까지 수집된 자생 *Zoysia* 속 종자와 영양체는 대조구와 비교 분석을 위해 사용하였다(Table 1). 종자는 소독 및 파종 후 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 배양하였으며, 각 잔디잎은 ITS의 DNA 바코드 분석을 위한 DNA 추출 재료로 사용되었다. 수집된 자생 *Zoysia* 속 잔디 영양체는 제주대학교 아열대원예산업연구소 포장 및 온실에 이식되었다. 수집된 잔디는 외부형태적 분류의 주요 방법인 잎표면의 털유무(Yang et al., 1995)에 의해 들잔디(유)와 갯잔디(무)로 1차 분류하였으며, 수집된 잔디 잎표면의 털유무 확인은 실체현미경(NikonSMZ18, Japan)를 이용하여 3반복으로 관찰하였으며, 각 잔디잎은 DNA 추출 재료로 사용되었다.

Table 1. List of turf grasses used for morphological and molecular classification

Sample No.	Germplasm	Sample Species	Source information	Usage
As1	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
As2	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
As3	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
As4	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
As5	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
As6	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
As7	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
As8	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
As9	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
As10	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Imported seed, USA	Control
Pp1	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control
Pp2	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control
Pp3	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control
Pp4	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control
Pp5	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control
Pp6	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control
Pp7	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control

Table 1. Continued

Sample No.	Germplasm	Sample Species	Source information	Usage
Pp8	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control
Pp9	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control
Pp10	Seed	<i>Poa Pratensis</i>	Imported seed, USA	Control
Zj1	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Zj2	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Zj3	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Zj4	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Zj5	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Zj6	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Zj7	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Zj8	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Zj9	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Zj10	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Imported seed, China	Control
Z1	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z2	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z3	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z4	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z5	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z6	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z7	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z8	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z9	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z10	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Aewol, Korea	Control, collected <i>Zoysia</i>
Z12	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Hagwi, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z17	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Hagwi, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z18	Seed	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Hagwi, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z21	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Pyoseon, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z22	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Pyoseon, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z23	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Pyoseon, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z24	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Heuksando Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z25	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Heuksando Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z26	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Heuksando Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z27	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Bogildo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z28	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Bogildo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z29	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Gogeumdo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z30	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Bogildo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z32	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Bogildo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z33	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Geumodo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z34	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Geumodo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z35	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Geumodo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z36	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Geogeumdo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z37	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Geogeumdo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z38	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollanam-do, Geogeumdo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z39	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollabuk-do, Jirisan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z40	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollabuk-do, Jirisan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z41	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeollabuk-do, Jirisan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z42	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Hallasan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z43	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Hallasan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>

Table 1. Continued

Sample No.	Germplasm	Sample Species	Source information	Usage
Z44	Plant	<i>Zoysia turfgrass</i>	Jeju, Hallasan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z45	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollanam-do, Wolchulsan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z46	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollanam-do, Wolchulsan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z47	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollanam-do, Wolchulsan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z48	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeju, Pyoseon, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z49	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollanam-do, Aphaedo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z50	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollanam-do, Bigeumdo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z51	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollabuk-do, Seonyudo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z52	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollabuk-do, Seonyudo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z53	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollabuk-do, Seonyudo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z54	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Gyeongsangsam-do, Changseondo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z55	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Gyeongsangsam-do, Geojedo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z56	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Gyeongsangsam-do, Geojedo Island, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z57	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Gyeongsangbuk-do, Gayasan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z58	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Gyeongsangbuk-do, Gayasan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z59	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollabuk-do, Naejangsan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>
Z60	Plant	<i>Zoysiaturfgrass</i>	Jeollabuk-do, Naejangsan, Korea	Collected <i>Zoysia</i>

### 잔디 DNA 추출 및 ITS 구간 증폭

DNA 추출은 GeneAll 회사의 Exgene™ Plant SV Mini Kit(GeneAll, Korea)를 이용하여 추출하였으며, 추출한 DNA는 0.8% 젤을 이용하여 전기영동 상에서 확인한 후 정량하여 PCR에 사용하였다. ITS 증폭을 위한 primer는 Gehrig et al. (2001)이 보고한 ITS1-forward primer(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')와 ITS4-reverse primer(5'-TCCTCCGCTTATTATATGC-3')가 사용되었다(Fig. 1). PCR은 AccuPower® PCR PreMix(Bioneer, Korea)의 Protocol을 따랐으며, DNA 증폭은 PCR Thermal Cycler Dice(TaKaRa, Japan)를 사용하여 수행되었다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 전처리 후, 95°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 40초를 30회 cycle로 반복한 후 72°C에서 10분간 후처리 하였다. 증폭된 PCR 산물은 마크로젠(주)에서 염기서열을 분석하였다.

### 잔디 ITS 염기서열 확보 및 염기서열 유사도와 유연관계 분석

구입 및 수집한 *Zoysia* 잔디류는 기존에 보고된 들잔디와 갯잔디, 크리핑 벤투그라스, 켄터키 블루그라스의 ITS 염기서열 구간의 유사성을 비교 및 분석하기 위해서 NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)와 BLAST 프로그램을 이용하였다. 또한 NCBI를 이용하여 ITS1와 ITS2 구간을 분석하고, DNA Baser Sequence Assembler Ver. 4 (Heracle BioSoft, Romania) 프로그램과 BioEdit Sequence Alignment Editor 프로그램의 ClustalW Multiple Alignment (Thompson, 1994)을 이용하여 염기서열 차이를 확인하였다. 확보된 ITS 구간은 MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013)을 사용하여 정렬 후 잔디의 유사도 분석을 수

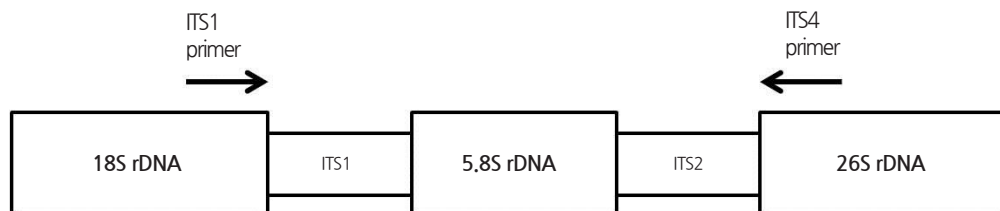


Fig. 1. Schematic diagram of internal transcribed spacer (ITS) regions: Black arrows indicate positions and directions of two universal ITS sequence region primers.



행하였으며, 분석방법으로는 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean(UPGMA)와 kimura 2-parameter (K2P) model을 이용하였으며, 각 분계도의 지지 정도를 나타내기 위해 bootstrap(Felsenstein, 1985)으로 1000회 반복 분석하였다.

### ITS 염기서열의 CAPS marker 전환 및 분석

본 연구에서 확보한 ITS 염기서열을 바탕으로 CAPS marker 전환을 위해 NEB (NEW ENGLAND BioLabs) 회사의 Enzyme Finder 프로그램을 사용하여 ITS 염기서열에 존재하는 모든 제한효소의 위치를 탐색하였다. CAPS marker 검증을 위한 PCR은 ITS 염기서열 분석에서와 동일한 DNA와 PCR primer인 ITS1-forward primer(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')와 ITS4-reverse primer(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 및 protocol을 사용하였으며, 증폭된 PCR 산물은 Expin™ PCR SV Kit(GeneAll, Korea)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물과 5 unit의 *Bgl*I, *Sty*I, *Fau*I 제한효소(NEB, England), 10X 3.1 buffer (*Bgl*I과 *Sty*I) 또는 10X CutSmart buffer (*Fau*I)가 포함된 14μL 반응액은 최적 반응 온도에서 충분한 시간 동안 반응시켰다. 최종 반응물은 2% agarose gel에서 전기영동 하여 CAPS marker를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 잔디의 ITS 증폭 및 염기서열 분석

ITS 염기서열 구간을 이용한 분자생물학적 잔디의 분류는 기존 NCBI에 보고된 들잔디 및 갯잔디, 크리핑 벤프그라스, 켄터키 블루그라스의 ITS 염기서열 구간을 기준라인으로 설정하고 대조구로 사용할 판매종자인 들잔디, 크리핑 벤프그라스, 켄터키 블루그라스 및 수집된 갯잔디 종자의 ITS와 비교 분석하였다(Table 1). 각 잔디 앞에서 ITS PCR 증폭 및 염기서열 분석 후 기존 NCBI에 등록된 서열들과 비교 분석을 수행한 결과, 들잔디 판매종자의 경우 10개체 모두 Peterson et al.(2010)이 얻어낸 들잔디 ITS 서열(Accession No. GU359196)과 99%의 상동성 보였으며, 들잔디 10개체내에서 1bp(A 및 G) 차이 2 그룹으로 *Z. japonica*(A) 그룹 5개체와 *Z. japonica*(G) 그룹 5개체로 분류됨을 Table 2 및 Fig. 2에서 확인하였다. 또한, Fig. 1에서 ITS 염기서열 구간은 18S와 26S ribosomal DNA 사이 특이적 변이를 보이는 ITS1과 ITS2 구간이 존재하므로, ITS 내부에 존재하는 ITS1과 5.8S rDNA, ITS2 염기서열 구간을 분석하였다. 들잔디 ITS 염기서열은 총 686bp이며, ITS1의 크기가 249bp, 5.8S rDNA는 163bp, ITS2는 274bp임을 알 수 있었다(Table 2). DNA의 구조 및 물리적 특성을 결정하는 G + C 함량은 들잔디 ITS 전체 염기서열 구간에서 55%로 확인되었다(Table 2). 갯잔디의 경우, 판매종자가 없어서 외부형태학적 주요 분류기준인 잎 표면의 털 유무(Yang et al., 1995)로 수집 당시 갯잔디로 분류된 갯잔디의 종자 10개체도 ITS 염기서열을 분석하였다. 수집 갯잔디 종자 10개체는 1bp(A 및 C) 차이로 2 그룹으로 *Z. sinica* (A) 그룹 6개체와 *Z. sinica* (C) 그룹 4개체로 분류되었다. 4개체는

**Table 2.** Internal transcribed spacer (ITS) sequence characteristics of the control turfgrasses of *Zoysia japonica*, *Z. sinica*, *Agrostis stolonifera*, and *Poa pratensis*: Differences in ITS sequences (ITS1, 5.8S, ITS2) allowed the classification of *Z. japonica* into two groups, A and G, and *Z. sinica* into two groups, A and C.

Taxa	ITS1		5.8S		ITS2	
	Length (bp)	G + C (%)	Length (bp)	G + C (%)	Length (bp)	G + C (%)
<i>Z. japonica</i> (A)	249	56.2	163	53.9	274	55.5
<i>Z. japonica</i> (G)	249	56.2	163	53.9	274	55.8
<i>Z. sinica</i> (A)	249	55.4	164	55.5	274	57.6
<i>Z. sinica</i> (C)	249	55.8	164	55.5	274	57.6
<i>A. stolonifera</i>	248	62.9	163	58.2	272	63.2
<i>P. pratensis</i>	248	60.0	163	58.8	270	63.3

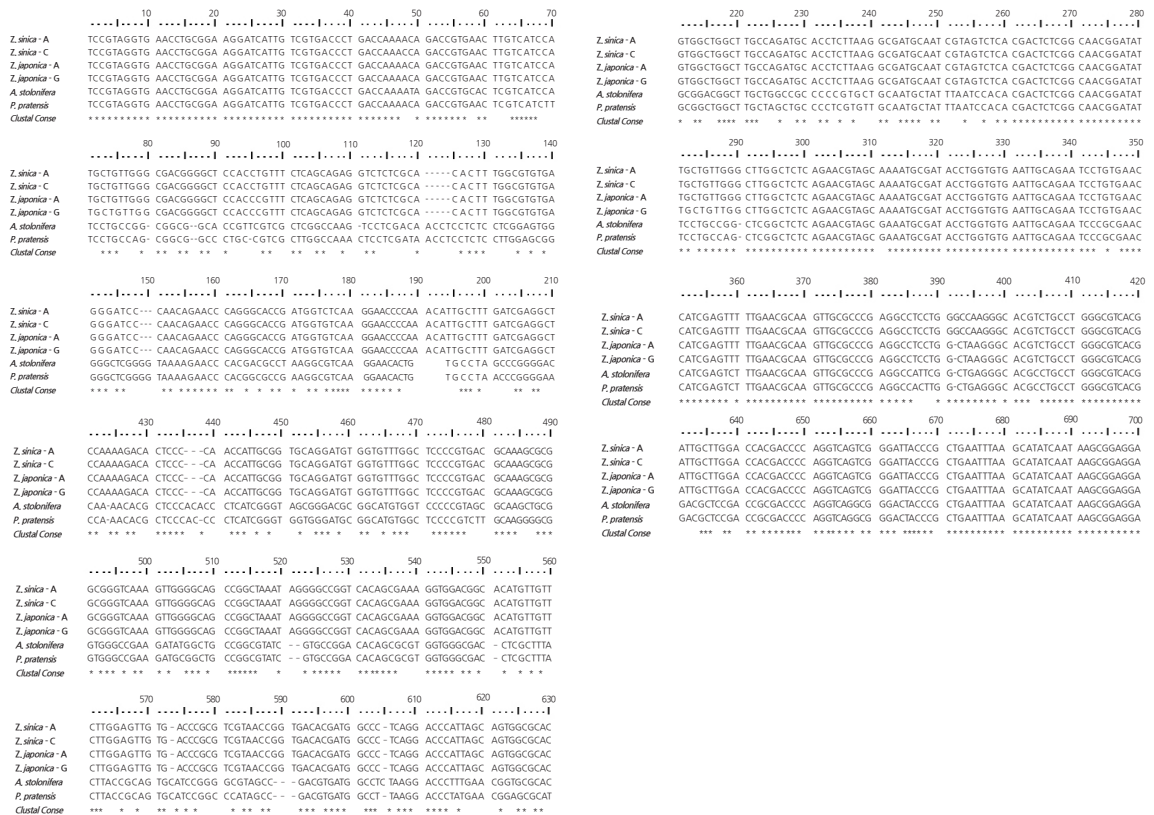


Fig. 2. Comparison of internal transcribed spacer (ITS) sequences in control lines of *Zoysia japonica* (*Z. japonica*-A and *Z. japonica*-G groups), *Z. sinica* (*Z. sinica*-A and *Z. sinica*-G groups), *Agrostis stolonifera*, and *Poa pratensis*: Sizes of ITS sequences in each species are 686 bp, and 687 bp, 683 bp, and 681 bp, respectively.

기존에 보고된 갯잔디로 등록된 서열(Accession No. KP057082)과 100%의 상동성을 보였으며, 6개체는 99%의 상동성을 Table 2 및 Fig. 2에서 확인하였다. 갯잔디(*Z. sinica*) ITS 염기서열은 총 687bp이며, 249bp의 ITS1과 164bp의 5.8S rDNA, 274bp의 ITS2를 확보하였으며 ITS 전 구간의 G + C 함량은 56%를 보였다. 한지형 잔디인 크리핑 벤프그라스 및 캔터키 블루 그라스의 판매 종자의 경우는 모두 기존에 NCBI에 보고된 서열들과 비교하여 크리핑 벤프그라스 Accession No. KM999958 및 캔터키 블루그라스 No. KF800192와 100% 일치함을 Table 2 및 Fig. 2에서 확인하였다. 크리핑 벤프그라스와 캔터키 블루 그라스는 총 683bp와 681bp의 ITS 구간 염기서열을 각각 확보하였으며, 기존에 등록된 서열(Accession No. KM999958과 No. KF800192)들과 비교하였을 때 크리핑 벤프그라스는 ITS1 248bp와 5.8S rDNA 163bp, ITS2 272bp, 캔터키 블루그라스는 248bp의 ITS1과 163bp의 5.8S rDNA, 270bp의 ITS2를 포함함을 알 수 있었다. 전체 ITS 구간의 G + C 함량은 각각 62%와 61%로 대체적으로 한지형 잔디가 한지형 잔디보다 낮은 G+C 함량을 가짐을 알 수 있었다(Table 2).

본 연구에서 대조군으로 사용된 판매 및 수집종자인 들잔디, 갯잔디, 크리핑 벤프그라스, 캔터키 블루그라스의 각 잔디들 간 ITS 염기서열 유사성 비교 분석을 multiple sequence alignment를 수행하였다. 들잔디 및 갯잔디, 크리핑 벤프그라스, 캔터키 블루 그라스의 ITS 염기서열 전체 구간은 각 686bp와 687bp, 683bp, 681bp 크기이며, 잔디 4종은 각 1-5bp차이로 총 206bp의 염기서열 차이를 보였다. 그 중 31bp는 INDEL에 의한 차이임을 확인하였다(Fig. 2). 차이가 나는 전체 206bp의 염기서열 차이 중에서 160bp는 두 개의 *Zoysia* 종을 다른 속들로부터 구분되도록 하며, 다른 13bp의 염기서열 차이들은 세 가지 속들이 모두 다른 염기를 가짐으로써 각각의 속들(*Zoysia* 속, *Agrostis* 속, *Poa* 속)의 구분을 가능하게 하였다. 종을 구별하게 하는 종 특이적 염기는 크리핑 벤프그라스에서 32개, 캔터키 블루그라스에서 26개, 갯잔디에서 10개, 들잔디에서 5개가 존재함을 확인하였다.

이는 크리핑 벤프그라스와 켄터키 블루그라스가 다른 속(*Agrostis* 속, *Poa* 속)에 속하는 종인 반면, 들잔디와 갯잔디는 같은 속(*Zoysia* 속)에 속하는 종이므로 유전적 유연관계와 관계되는 ITS 염기서열 구간의 차이가 상대적으로 적게 나타나는 것으로 추정된다. 이러한 결과는 ITS 염기서열의 종간 차이가 종내 보다 크다고 보고한 결과와 유사하다(Han et al., 2006; Yao et al., 2010). 또한 들잔디와 갯잔디 두 종간의 전체 ITS 구간 염기서열들을 비교 분석한 결과, 치환된 염기의 수는 18개이며, 오직 1bp의 염기만이 INDEL에 의한 차이임을 확인하였다(Fig. 2). 치환된 18bp의 염기들 중 16bp와 INDEL에 의한 1bp의 차이는 서로 다른 종의 들잔디와 갯잔디를 명확하게 구분하는 기준이 되었으며, 이를 제외한 나머지 2bp의 염기 차이 중 한 염기는 같은 갯잔디 종의 라인(line)들을 서로 다른 두 그룹으로, 또 다른 1bp의 염기 치환은 동일한 들잔디 종내 라인들을 두 개의 그룹으로 나누는 것을 확인하였다. 따라서, ITS 전 구간 내의 염기치환 및 INDEL에 의한 염기 차이를 이용하여 들잔디와 갯잔디, 크리핑 벤프그라스, 켄터키 블루그라스의 속간 및 종간의 구별뿐만 아니라 들잔디와 갯잔디의 종내 구별 또한 가능성을 확인하였다.

따라서, ITS 염기서열 차이를 바탕으로 들잔디 및 갯잔디, 크리핑 벤프그라스, 켄터키 블루그라스의 분류가 가능함을 확인하였으며, 들잔디, 크리핑 벤프그라스, 켄터키 블루그라스의 판매종자와 갯잔디 수집종자를 대조구로 설정하여 우리나라에서 수집된 자생 *Zoysia* 속 잔디를 분류하고, 비교 분석하는데 대조구로 적절함을 확인하였다. 이상의 결과는 ITS 염기서열 구간이 생물 종에 따른 보존 및 변이가 뚜렷하여 다양한 생물종을 분류하는데 활용되고 있다는 기존의 보고와 일치하는 결과이다(Hebert et al., 2003; Kress et al., 2005; CBOL Plant Working Group, 2009; Ahn et al., 2010; Koch et al., 2010; Hong et al., 2012).

### 잔디 ITS 염기서열 기반 CAPS marker 전환 및 적용

들잔디와 갯잔디의 ITS 염기서열 차이를 바탕으로 CAPS marker를 개발하기 위해, 대조구 잔디 4종의 ITS 염기서열 내부에 제한효소 인식부위를 탐색한 결과, 각 잔디간에 구별 가능한 *Bgl*I, *Sty*I, *Fau*I 등의 주요 제한효소 인식부위를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 선별된 3 가지 제한효소가 들잔디와 갯잔디를 식별 가능한 CAPS marker로 적합한 지를 검토하기 위해, 대조구인 들잔디와 갯잔디, 크리핑 벤프그라스, 켄터키 블루그라스로부터 ITS1과 ITS4 primer를 사용하여 ITS 염기서열 구간

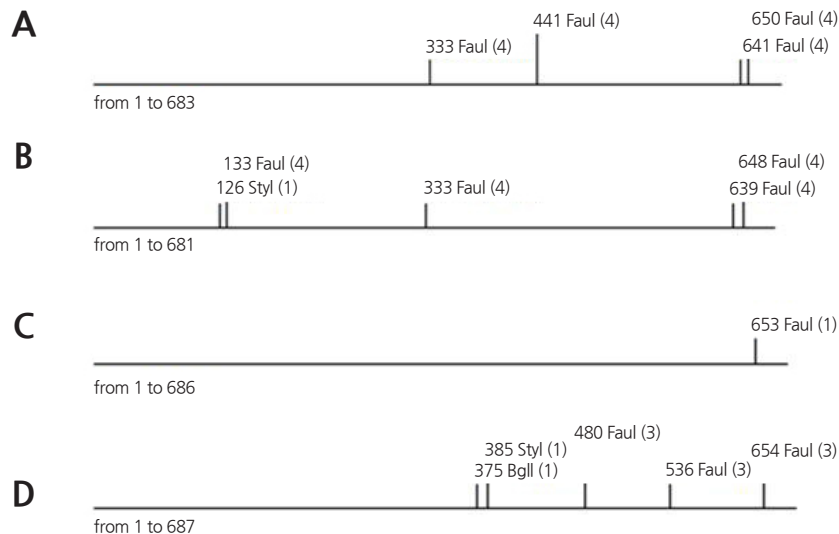


Fig. 3. Recognition sites of three restriction enzymes (*Bgl*I, *Sty*I, *Fau*I) in each turfgrass species: Numbers underneath the lines indicate the sizes of each internal transcribed spacer (ITS) sequence in *Agrostis stolonifera* (A), *Poa pratensis* (B), *Zoysia japonica* (C), and *Z. sinica* (D).



PCR 증폭을 수행한 후 *Bgl*II, *Sty*I, *Fau*I 제한효소를 각각 처리하였다. 그 결과, 갯잔디(Z)는 인식 부위가 효소에 의해 절단되어 375bp와 312bp 두 개의 조각으로 나뉘는 반면 한지형 잔디(As, Pp) 및 들잔디(Zj)는 ITS 염기서열 내에 *Bgl*II 제한효소 인식 부위가 없어서 기존에 증폭된 약 700bp 한 개의 밴드만이 관찰되었다(Fig. 4A). *Sty*I 제한효소의 경우 제한효소가 켄터키 블루그라스(Pp) ITS 구간의 인식 부위에 작용하여 555bp와 126bp의 두 개의 조각으로 분리되었다(Fig. 4B). 갯잔디(Z)에서는 *Sty*I이 *Bgl*II 제한효소의 작용 부위와 인접한 위치의 인식부위에 작용하여 385bp와 302bp의 두 개의 조각으로 나뉘어 앞선 *Bgl*II의 결과와 유사하였다. *Fau*I 제한효소의 경우 크리핑 벤프그라스(As)와 켄터키 블루그라스(Pp) ITS 구간 내 인식 부위에 제한효소가 작용하여 각각 333bp, 200bp, 108bp와 306bp, 200bp, 133bp의 세 개의 밴드를, 갯잔디(Z)는 480bp와 91bp 두 개의 밴드 양상을 확인하였다(Fig. 4C). 들잔디(Zj)의 경우 ITS 염기서열 내에 *Fau*I 제한효소 인식 부위가 653bp 부근에 있어서 653bp와 33bp 중 2% agarose gel 상에서 653bp 크기의 밴드 한 개만이 확인되었다(Fig. 4C). 세 가지 종류의 효소(*Bgl*II과 *Sty*I, *Fau*I)를 이용함으로써 들잔디 ITS 염기서열에서는 제한효소에 의해 절단되지 않고 갯잔디에서만 절단되어 들잔디와 갯잔디간의 구별이 쉽게 가능하게 하였으며, 특히 *Fau*I 효소는 들잔디와 갯잔디 뿐만 아니라 크리핑 벤프그라스와 켄터키 블루그라스 같은 한지형 잔디도 함께 구분하였다(Fig. 4C). 따라서 들잔디와 갯잔디를 식별하는 CAPS marker에 *Bgl*II과 *Sty*I, *Fau*I이 적합함을 확인할 수 있었다.

또한, 바닷가 근처에서 수집한 잔디 종자의 분자생물학적 분류를 하기 위해서, 본 연구에서 개발한 ITS 염기서열 기반 CAPS marker를 이용하여 구분하였다. 수집 종자를 파종 후 ITS CAPS marker 분석을 수행한 결과, 12번 잔디(Z12)는 *Bgl*II 제한효소에 의해 절단되어 375bp와 312bp 두 개의 조각으로, *Sty*I 제한효소에 의해 385bp와 302bp, *Fau*I 제한효소에 의해 480bp와

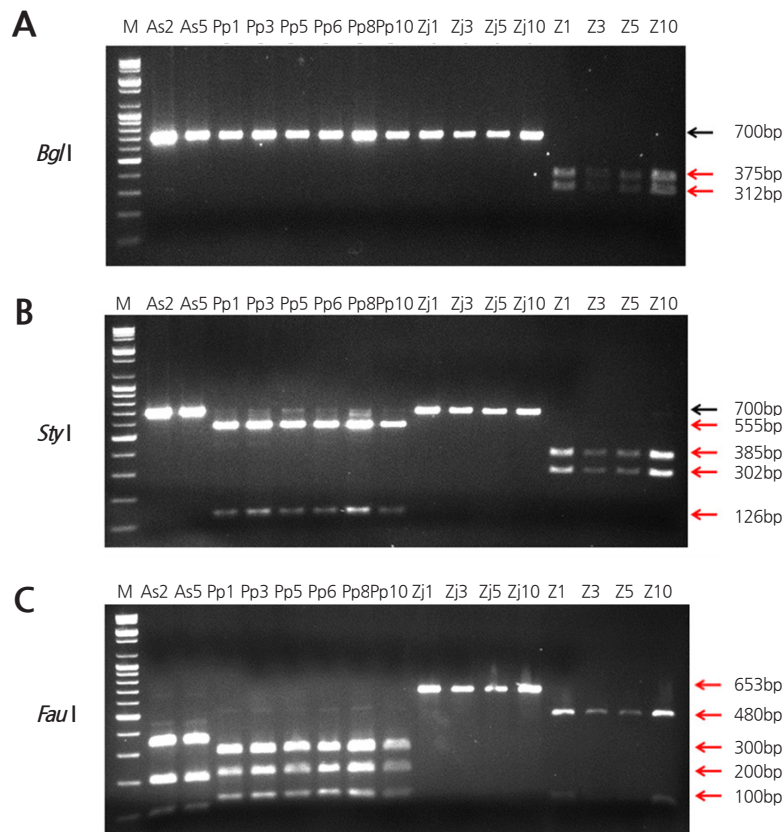


Fig. 4. Molecular classification of control lines of *Zoysia japonica* (Zj), *Z. sinica* (Z), *Agrostis stolonifera* (As), and *Poa pratensis* (Pp) turfgrasses using cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers: ITS products purified by the polymerase chain reaction (PCR) were digested by *Bgl*II (A), *Sty*I (B), and *Fau*I (C), respectively; Black arrows indicate original PCR product sizes (about 700 bp), and red arrows indicate digested sizes; M indicates size marker. Sample numbers are shown in Table 1.

91bp으로 나누어 지는 것을 확인할 수 있어, 12번 잔디(Z12)는 갯잔디임을 확인하였다(Fig. 5). 18번 잔디(Z18)는 *Bgl*I와 *Sty*I, *Fau*I 제한효소에 의해 약 700bp 밴드 한 개만 확인할 수 있어, 18번 잔디(Z18)는 들잔디임을 확인하였다(Fig. 5). 예상했던 것과는 달리 17번 잔디(Z17)의 경우는 각 *Bgl*I 제한효소에 의해 갯잔디 패턴을 나타내는 밴드 두 개와 들잔디 패턴을 나타내는 밴드 한 개를 확인하였으며, *Sty*I 경우도 *Bgl*I 제한효소와 같은 패턴으로 나타나 갯잔디와 들잔디 패턴이 동시에 존재하였으며, *Fau*I 경우도 갯잔디 패턴을 나타내는 밴드 한 개와 들잔디 패턴을 나타내는 밴드 한 개를 확인할 수 있어, 17번 잔디(Z17)는 들잔디와 갯잔디의 자연교배된 개체임을 확인하였다(Fig. 5). 이는 *Zoysia* 속이 자기수정 및 타가수정에 의하여 모두 수정이 가능하므로 종내 및 종간 교잡이 가능하다는 기존의 보고를 근거로 들잔디와 갯잔디가 자연 교배된 것으로 보여진다(Yu et al., 1974; Choi et al., 2008; Chung et al., 2013). 이러한 결과는 본 연구에서 개발한 ITS 염기서열 기반 CAPS marker 분석을 통하여 들잔디와 갯잔디 뿐만 아니라 이들의 자연교배종(hybrid between *Z. japonica* and *Z. sinica*)도 신속하게 식별 가능함을 보여 준다.

### 미동정 수집 자생 *Zoysia* 속 잔디의 외부형태적 및 ITS 기반 CAPS marker 분석을 통한 잔디 분류

자생 *Zoysia* 속 들잔디와 갯잔디의 외부형태적 분류는 주로 잎 표면의 털 유무 등이 주요 분류학적 형질로 활용되고 있다(Yang et al., 1995). 들잔디의 경우 잎 앞면 및 뒷면에 털이 존재하며, 갯잔디는 앞 뒤면 모두 털이 존재하지 않기 때문에(Yang et al., 1995), 수집된 자생 *Zoysia* 속 잔디는 실체현미경(Nikon SMZ18, Japan)를 이용하여 잎 표면의 털 유무를 관찰한 후 들잔디 및 갯잔디로 1차 분류하였다. Fig. 6에서 수집 잔디 영양체 Z27, Z28, Z32, Z36, Z38, Z48, Z50, Z51, Z52, Z54, Z55번은 잎 표면에 털이 존재하지 않아서 갯잔디로 분류되었고, 그 외 잔디는 잎 한쪽 표면에만 털이 존재하거나, 양쪽면 모두 털이 존재하여 모두 들잔디로 1차 분류되었다(Table 3).

외부형태적으로 들잔디 및 갯잔디로 1차 분류된 수집된 *Zoysia* 속 잔디 영양체는 들잔디 및 갯잔디의 대조구 종자로부터 개발된 ITS CAPS marker를 이용하여 수집 잔디에 적용하여 들잔디 및 갯잔디 뿐만 아니라 들잔디와 갯잔디 교배종으로 2차 분류를 수행하였다. 대조구 잔디에서 *Bgl*I과 *Sty*I은 제한효소 인식 부위가 ITS 염기서열 내부에서 인접해 있기 때문에 *Bgl*I만 잔디에 이용하였다(Fig. 3). 수집된 잔디 영양체는 *Bgl*I 및 *Fau*I에서 각각 들잔디, 갯잔디, 들잔디와 갯잔디 교배종 패턴으로 밴드가 확인되었으며, ITS CAPS marker가 대조구인 들잔디와 갯잔디의 종자 뿐만 아니라 수집된 자생 *Zoysia* 속 잔디 영양체에서도 적용이 됨을 확인하였다(Fig. 7). 또한 Z26, Z29, Z49번의 수집된 잔디 영양체를 제외한 모든 잔디에서 외부형태학적 1차 분류와 ITS CAPS marker 분석에 의한 2차 분류 결과가 일치 함을 확인할 수 있었다(Table 3). Z26, Z29, Z49번의 경우, Fig. 6에서 외부형태학적으로 잎 표면에 털이 관찰되어 들잔디로 분류된 Z26, Z29, Z49은 Fig. 7에서 ITS CAPS marker 2차 분석을 통해 들잔디와 갯잔디의 자연교배종(H)으로 최종 분류되었다(Table 3). 따라서, 털 유무의 기준으로 들잔디와 갯잔디는 구분할

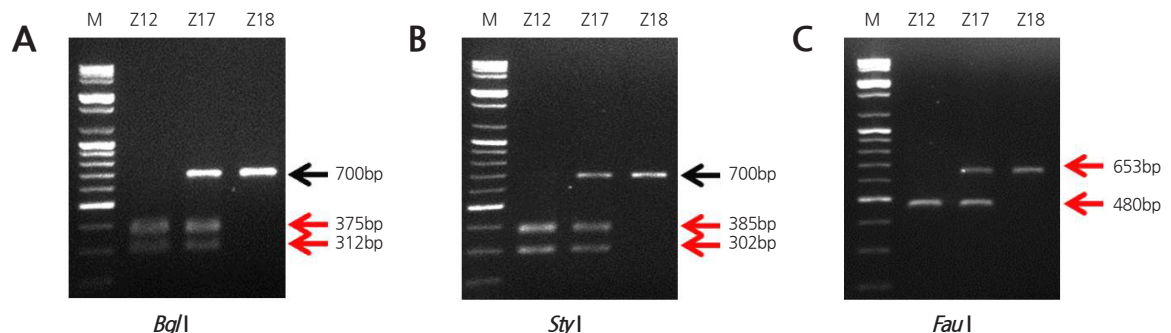


Fig. 5. Molecular classification of control lines of *Zoysia japonica* (Zj), *Z. sinica* (Z), *Agrostis stolonifera* (As), and *Poa pratensis* (Pp) turfgrasses using cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers: ITS products purified by the polymerase chain reaction (PCR) were digested by the *Bgl*I (A), *Sty*I (B), and *Fau*I (C), respectively; Black arrows indicate original PCR product sizes (about 700 bp), and red arrows indicate digested sizes; M indicates size marker. Sample numbers are shown in Table 1.

**Table 3. Classification of collected *Zoysia* turfgrasses based on morphological and molecular approaches:** *Z. japonica* (Zj) and *Z. sinica* (Zs) were morphologically classified by the presence of leaf trichomes; Trichomes were present on the surface of *Z. japonica* leaves, but not on *Z. sinica* leaves; Zj, Zs, and hybrid *Z. japonica/Z. sinica* plants (H) were molecularly classified according to their internal transcribed spacer (ITS) sequences and ITS cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers using ITS DNA barcode analysis; Analysis of ITS CAPS markers allowed classification of *Zoysia* turfgrasses into Zj, Zs, and H, while differences in ITS sequences allowed classification of Zj into two groups (Zj-I and Zj-II), and Zs into four groups (Zs-I-Zs-IV). Sample numbers are shown in Table 1.

Sample No.	Germplasm	Origin	Classification of collected <i>Zoysia</i> turfgrasses according to each methods	
			Morphological method (presence of leaf trichomes)	Molecular method (ITS DNA barcode analysis)
Z21	Plant	Jeju, Pyoseon, Korea	Zj	Zj-I
Z22	Plant	Jeju, Pyoseon, Korea	Zj	Zj-I
Z23	Plant	Jeju, Pyoseon, Korea	Zj	Zj-I
Z24	Plant	Jeollanam-do, Heuksando Island, Korea	Zj	Zj-I
Z25	Plant	Jeollanam-do, Heuksando Island, Korea	Zj	Zj-I
Z26	Plant	Jeollanam-do, Heuksando Island, Korea	Zj	H
Z27	Plant	Jeollanam-do, Bogildo Island, Korea	Zs	Zs-III
Z28	Plant	Jeollanam-do, Bogildo Island, Korea	Zs	Zs-III
Z29	Plant	Jeollanam-do, Gogeumdo Island, Korea	Zj	H
Z30	Plant	Jeollanam-do, Bogildo Island, Korea	Zj	Zj-I
Z32	Plant	Jeollanam-do, Bogildo Island, Korea	Zs	Zs-IV
Z33	Plant	Jeollanam-do, Geumodo Island, Korea	Zj	Zj-I
Z34	Plant	Jeollanam-do, Geumodo Island, Korea	Zj	Zj-I
Z35	Plant	Jeollanam-do, Geumodo Island, Korea	Zj	Zj-I
Z36	Plant	Jeollanam-do, Geogeumdo Island, Korea	Zs	Zs-IV
Z37	Plant	Jeollanam-do, Geogeumdo Island, Korea	Zj	Zj-I
Z38	Plant	Jeollanam-do, Geogeumdo Island, Korea	Zs	Zs-I
Z39	Plant	Jeollabuk-do, Jirisan, Korea	Zj	Zj-I
Z40	Plant	Jeollabuk-do, Jirisan, Korea	Zj	Zj-I
Z41	Plant	Jeollabuk-do, Jirisan, Korea	Zj	Zj-I
Z42	Plant	Jeju, Hallasan, Korea	Zj	Zj-I
Z43	Plant	Jeju, Hallasan, Korea	Zj	Zj-I
Z44	Plant	Jeju, Hallasan, Korea	Zj	Zj-I
Z45	Plant	Jeollanam-do, Wolchulsan, Korea	Zj	Zj-I
Z46	Plant	Jeollanam-do, Wolchulsan, Korea	Zj	Zj-I
Z47	Plant	Jeollanam-do, Wolchulsan, Korea	Zj	Zj-I
Z48	Plant	Jeju, Pyoseon, Korea	Zs	Zs-I
Z49	Plant	Jeollanam-do, Aphaedo Island, Korea	Zj	H
Z50	Plant	Jeollanam-do, Bigeumdo Island, Korea	Zs	Zs-III
Z51	Plant	Jeollabuk-do, Seonyudo Island, Korea	Zs	Zs-III
Z52	Plant	Jeollabuk-do, Seonyudo Island, Korea	Zs	Zs-I
Z53	Plant	Jeollabuk-do, Seonyudo Island, Korea	Zj	Zj-I
Z54	Plant	Gyeongsangsam-do, Changseondo Island, Korea	Zs	Zs-I
Z55	Plant	Gyeongsangsam-do, Geojedo Island, Korea	Zs	Zs-IV
Z56	Plant	Gyeongsangsam-do, Geojedo Island, Korea	Zj	Zj-I
Z57	Plant	Gyeongsangbuk-do, Gayasan, Korea	Zj	Zj-I
Z58	Plant	Gyeongsangbuk-do, Gayasan, Korea	Zj	Zj-I
Z59	Plant	Jeollabuk-do, Naejangsan, Korea	Zj	Zj-I
Z60	Plant	Jeollabuk-do, Naejangsan, Korea	Zj	Zj-I





Fig. 6. Morphological classification of collected *Zoysia* turfgrasses by presence of leaf trichomes indicated *Z. japonica* (Zj) and *Z. sinica* (Zs): Left and right panels show adaxial and abaxial leaf surfaces, respectively; Trichomes were present on the surfaces of *Z. japonica* leaves, a few trichomes were present the leaves of *Z. japonica*/*Z. sinica* hybrid (Z26, Z29, Z49), and no trichomes were present on *Z. sinica* leaves; Sample numbers are shown in Table 1. Scale bars = 1 mm.

수 있으나, 교배종을 구별하는 것은 불가능 하다고 판단되며, 이를 바탕으로 들잔디, 갯잔디, 교배종을 정확히 식별하기 위해서는 외부형태학적 구별법 뿐만 아니라 분자생물학적 종 구별법도 반드시 필요하다는 것을 확인할 수 있었다.

### 동정된 들잔디와 갯잔디의 ITS 염기서열 유사성 분석 및 유연관계 분석

ITS 염기서열 및 ITS 기반 CAPS 마커에 의해 들잔디와 갯잔디로 분류된 대조구로 사용된 들잔디 및 갯잔디 종자와 제주도 및 전라도, 경상도의 산 및 해안, 섬에서 수집된 들잔디 및 갯잔디 영양체 간에 ITS 염기서열 유사성 분석 및 유전적 유연관계를 분석하기 위해 각 잔디 ITS 염기서열 구간의 multiple sequence alignment (Fig. 8) 및 MEGA 6.0 프로그램에 의한 계통학적 분석 (Fig. 9)을 수행하였다. 총 62개의 잔디 중에서 들잔디와 갯잔디 교배종의 잔디 종자 1개체와 영양체 3개체는 들잔디 및 갯잔

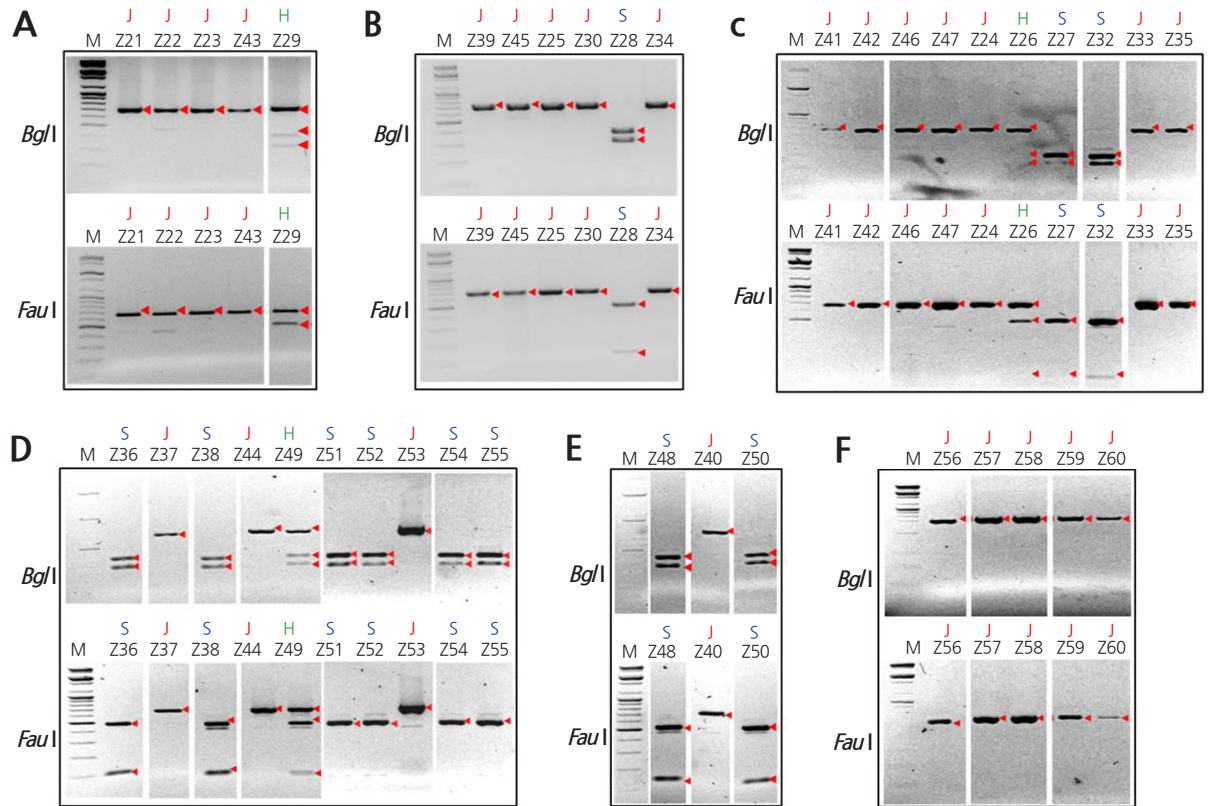


Fig. 7. Molecular classification of collected *Zoysia* turfgrasses using internal transcribed space (ITS)-based cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers: ITS products purified by the polymerase chain reaction (PCR) were digested by *Bgl*I and *Fau*I, respectively; Analysis of ITS CAPS markers allowed classification of *Zoysia* turfgrasses into *Z. japonica* (J), *Z. sinica* (S), and *Z. japonica*/*Z. sinica* hybrid (H); M indicates size marker; Sample numbers are shown in Table 1.

디의 ITS 염기서열 피크가 2개로 중첩되어 염기서열 확보되지 않기 때문에 유사성 및 유연관계 분석에서 제외되었다. 총 58개의 들잔디 및 갯잔디는 Fig. 8의 ITS 염기서열 차이에 의해 Fig. 9 및 Table 4에서 들잔디 2 그룹(Zj-I, Zj-II), 갯잔디 4 그룹(Zs-I - Zs-IV)으로 총 6개의 그룹으로 유집되었다. 들잔디의 경우에는 Zj3, Zj6, Zj8, Zj9, Zj10의 대조구 들잔디 5개체 종자라인들을 포함하는 *Z. japonica*(A) 그룹과 제주도 및 전라남도, 전라북도, 경상남도, 경상북도에서 수집된 들잔디 영양체 25개체가 Zj-I로 분류 되었으며, Fig. 8에서 1bp의 염기치환으로 구분되는 Zj1, Zj2, Zj4, Zj5, Zj7의 5개체 종자라인들을 포함하는 *Z. japonica*(G) 그룹과 제주 하귀에서 수집된 들잔디 종자 1개체 Z18이 Zj-II 그룹으로 유집 되었으며(Table 4), 각 2 그룹별로 그룹내의 모든 개체들은 염기서열이 100% 일치하여 Fig. 8에서 Zj-I 및 Zj-II으로 나타내었다. 갯잔디의 경우에는 Z1, Z5, Z6, Z8의 대조구 갯잔디 종자 4개체 *Z. sinica*(C) 그룹이 Zs-II 그룹으로 유집 되었으며(Table 4), Zs-II 그룹의 ITS 염기서열 1bp의 염기치환으로 분리된 Zs-I 그룹은 Z2, Z3, Z4, Z7, Z9, Z10의 대조구 갯잔디 종자 6개체 *Z. sinica*(A) 그룹과 제주 하귀에서 수집된 갯잔디 종자 Z12 및 수집된 갯잔디 영양체인 제주 표선 Z48, 전라남도 거금도 Z38, 전라북도 선유도 Z52, 경상남도 창선도 Z54의 영양체 5개체로 총 11개체가 한 그룹으로 유집되었다(Table 4). 갯잔디의 Zs-III 그룹은 Zs-I 그룹과 1bp 및 Zs-II 그룹과 2bp의 염기치환으로 확인되어(Fig. 8), Table 4 및 Fig. 9에서 수집 갯잔디 영양체인 전라남도 보길도에서 Z27과 Z28, 비금도 Z50, 전라북도 선유도 Z51의 영양체 4개체가 한 그룹으로 유집되었다. Zs-IV는 Fig. 8에서 Zs-I과 insert / deletion(INDEL)에 의한 염기서열 차이는 각 1bp의 삽입과 2bp의 염기치환이 확인되었으며, Zs-II와 INDEL 의한 1bp 삽입과 3bp의 염기치환, Zs-III와 INDEL 의한 염기서열 1bp 삽입과 염기치환 3bp로 Fig. 8에서 확인되었으며, Zs-IV 그룹은 Table 4 및 Fig. 9에서 수집 갯잔디 영양체인 전라남도 보길도 Z32, 전라남도 거금도 Z36, 경상남도 거제도 Z55의 총 3개체가 한 그룹으로 유집되었다.



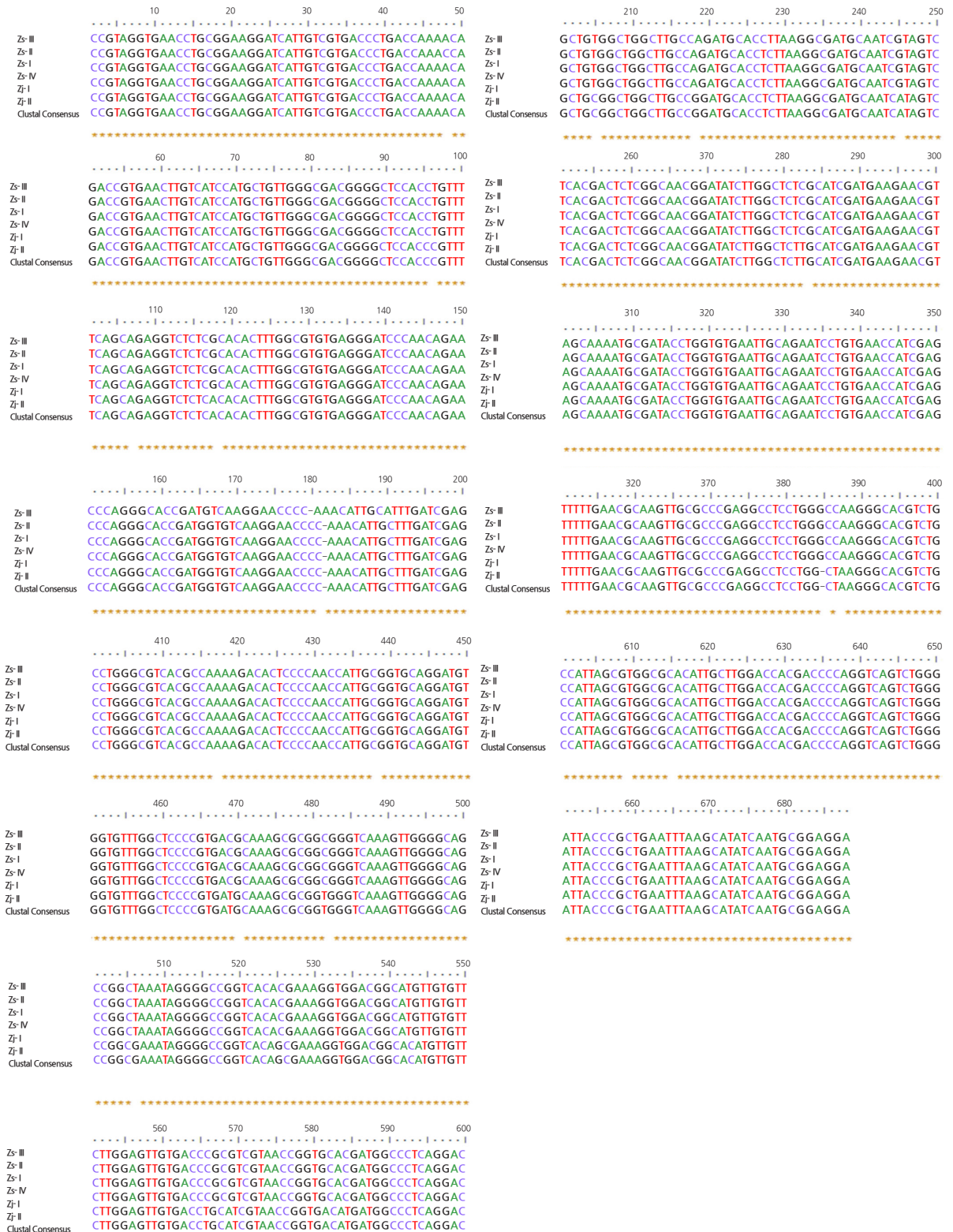


Fig. 8. Internal transcribed spacer (ITS) alignment of control and collected *Zoysia japonica* (Zj-I and Zj-II) and *Z. sinica* (Zs-I-IV): According to differences in their ITS sequences, control and collected samples of *Z. japonica* and *Z. sinica* were classified into two *Z. japonica* groups (Zj-I and Zj-II), and four *Z. sinica* groups (Zs-I-Zs-IV); The number of Zj-I, Zj-II and Zs-I-IV groups are shown in Table 4.

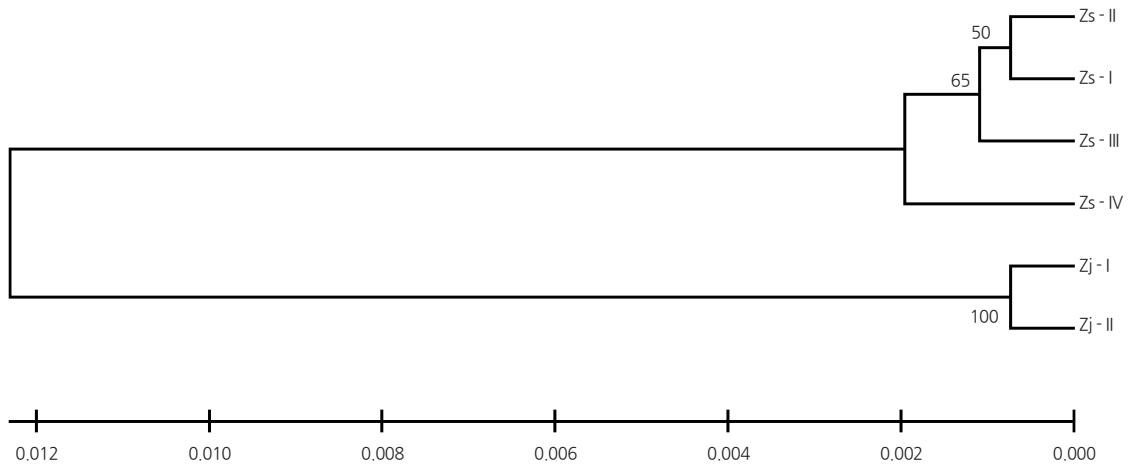


Fig. 9. Phylogenetic analysis of *Zoysia japonica* groups Zj-I and II, and *Z. sinica* groups Zs-I-IV by internal transcribed spacer (ITS) sequence region: Phylogenetic tree of four different species was constructed using MEGA 6.0 software and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA); The Kimura two-parameter model and 1000 bootstrap replications were used for interspecies and intraspecies distances; Numbers included in sample names indicate the designated numbers of individual samples; The numbers of Zj-I, Zj-II and Zs-I-IV groups are shown in Table 4.

Table 4. Molecular classification of control and collected *Zoysia* turfgrasses: Classification was based on differences in ITS sequences between *Z. japonica* (Zj) and *Z. sinica* (Zs). Sample numbers are shown in Table 1.

Molecular classification	Sample No.
Zj-I	Zj3, Zj6, Zj8, Zj9, Zj10, Z21, Z22, Z23, Z24, Z25, Z30, Z33, Z34, Z35, Z37, Z39, Z40, Z41, Z42, Z43, Z44, Z45, Z46, Z47, Z53, Z56, Z57, Z58, Z59, Z60
Zj-II	Zj1, Zj2, Zj4, Zj5, Zj7, Z18
Zs-I	Z2, Z3, Z4, Z7, Z9, Z10, Z12, Z38, Z48, Z52, Z54
Zs-II	Z1, Z5, Z6, Z8
Zs-III	Z27, Z28, Z50, Z51
Zs-IV	Z32, Z36, Z55

Table 4 및 Fig. 8와 9에서 갯잔디 수집종의 경우, 제주도에서 수집한 갯잔디는 Zs-I과 Zs-II그룹에 속해 있으며, 경상남도 Zs-I과 Zs-IV그룹, 전라남도 Zs-III과 Zs-IV, 전라북도 Zs-I과 Zs-III으로 갯잔디의 수집 지역별 차이가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 반면에 들잔디 그룹은 수집 지역별 차이는 미흡하였으나, 들잔디와 갯잔디 그룹간에 들잔디 Zj-II 그룹과 갯잔디 Zs-II가 먼 유연관계를 나타냈으며, 특히 갯잔디 그룹의 제주 수집종의 일부인 Zs-II와 전라남도 및 경상남도 수집종 Zs-IV는 갯잔디 그룹별 유연관계가 가장 차이가 많음을 알 수 있었다(Fig. 9). 이상의 결과에서 *Zoysia* 속 대조구 잔디 종자 및 수집 잔디 영양체는 외부형태학적 분류법에 비해 DNA 바코드 분석의 ITS 염기서열 차이에 의해 신속하게 들잔디 2그룹과 갯잔디 4그룹으로 종간 및 종내 구별에 성공하였으며, 유전적 유연관계 또한 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 ITS 염기서열 구간은 진화속도가 비교적 빠르기 때문에 종 속간 분류 연구에 적합하다는 기존의 보고와 유사하다(Kress et al., 2005; Han et al., 2006; Kress and Erickson, 2008; Baigalmaa et al., 2009; Ahn et al., 2010; Gao et al., 2010; Yao et al., 2010; Hong et al., 2012; Moon et al., 2013).

본 연구는 잔디류의 분류 및 식별을 위해서 ITS 염기서열을 비교 분석하였고, ITS 염기서열 차이를 기반으로 CAPS marker를 개발하였다. 본 연구에서 개발된 CAPS marker를 이용하면 우리나라에서 자생하는 들잔디 및 갯잔디, 들잔디와 갯잔디의 자연 교배종을 분자생물학적 수준에서 구별할 뿐만 아니라 교잡종 개발 및 교잡 가능성 분석, 신품종 계통 분석에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 초 록

*Zoysia* 속 잔디는 학교운동장 및 공원, 골프장, 스포츠경기장과 같이 다양한 장소에 식재되고 있는 중요한 잔디이다. 해안가에서 자생하는 *Zoysia* 속 들잔디와 갯잔디는 외부 형태적 특성이 유사하여 외부 형태적 분류 뿐 만 아니라 분자생물학적 분류도 필요하다. 본 연구에서는 nrDNA-ITS(Internal Transcribed Spacer)의 DNA 바코드 분석을 통해서 자생하는 들잔디와 갯잔디의 분자생물학적 신속한 분류체계를 확립하고자 하였다. 이를 위해 난지형 잔디인 *Zoysia* 속 들잔디(*Z. japonica*) 및 갯잔디(*Z. sinica*)와 한지형 대표 잔디인 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*) 및 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)의 nrDNA-ITS 염기서열을 확보하였다. 확보된 들잔디 및 갯잔디, 크리핑 벤트그라스, 켄터키 블루그라스의 ITS 염기서열 전체 구간은 각 686bp와 687bp, 683bp, 681bp으로 확인되었으며, nrDNA-ITS 내부 염기서열구간 분석 결과, ITS1의 크기는 248-249bp, ITS2는 270-274bp, 5.8S rDNA는 163-164bp의 차이로, 각 4종의 잔디가 ITS 염기서열을 이용하여 식별되었다. 특히, 들잔디와 갯잔디 nrDNA-ITS 염기서열은 19 염기(2.8%) 차이를 나타냈으며, ITS1과 ITS2의 G + C 함량은 55.4-63.3%임을 확인하였다. 이러한 들잔디와 갯잔디의 ITS 염기서열 차이를 바탕으로 CAPS 마커로 전환하여 대조구 및 수집된 자생 *Zoysia* 속 잔디 영양체 62개체를 분석한 결과, 외부형태학적 분류법으로 들잔디 개체, 갯잔디 개체로 동정되었지만, ITS CAPS 마커를 이용한 분자생물학적 분류법으로 들잔디 36개체와 갯잔디 22개체 뿐만 아니라 들잔디와 갯잔디간의 자연교배종 4개체도 식별하였다. 이상의 결과에서 들잔디와 갯잔디는 ITS 염기서열 및 ITS 기반 CAPS를 통하여 식별할 수 있을 것으로 판단된다.

**추가주요어:** 캡스, Internal Transcribed Spacer, 제한 효소, 종 식별, 들잔디, 갯잔디

## Literature Cited

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Yu TY, Yeom DY, Kim YJ, Kim SJ (1974) Morphological studies on Korean lawn grasses (*Zoysia* spp.). *J Kor Soc Hortic Sci* 15(1):79-91
- Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4:403-410
- Gehrig H, Gaußmann O, Marx H, Schwarzott D, Kluge M (2001) Molecular phylogeny of the genus *Kalanchoe* (Crassulaceae) inferred from nucleotide sequences of the ITS-1 and ITS-2 regions. *Plant Sci* 160:827-835
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673-4680
- Wu L, Lin H (1994) Identifying buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm] cultivar breeding lines using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J Am Soc Hortic Sci* 119:126-130
- Yang GM, Ahn BJ, Choi JS (1995) Identification of native zoysiagrasses (*Zoysia* spp) using morphological characteristics and esterase isozymes. *J Kor Soc Hortic Sci* 36(2):240-247
- Kubik C, Sawkins M, Meyer WA, Gaut BS (2001) Genetic diversity in seven perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L) cultivars based on SSR markers. *Crop Sci* 41:1565-1572
- Renganayaki K, Read JC, Fritz AK (2001) Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 102:1037-1045
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR de (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270:313-321
- Kunihisa M, Fukino N, Matsumoto S (2003) Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 134:209-215
- Budak H, Shearman RC, Parmaksiz I, Gaussoin RE, Riordan TP, Dweikat I (2004) Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor Appl Genet* 108:328-334
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8369-8374
- Han HS, Kim DY, Lee KY, Park WG, Cho IK, Jung JS (2006) Comparative Analysis of *Acanthopanax senticosus* Harms from Korea, China and Russia Based on the ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA. *Korean J Plant Res* 19:54-58
- Li RF, Wei JH, Wang HZ, He J, Sun ZY (2006) Development of highly regenerable callus lines and *Agrobacterium*-mediated

- transformation of Chinese lawngrass (*Zoysia sinica* Hance) with a cold inducible transcription factor, CBF1. *Plant Cell Tiss Org* 85:297-305
- Choi DK, Yang GM, Choi JS (2008) Flowering periods, genetic characteristics, and cross-pollination rate of *Zoysia* spp In natural open-pollination. *Kor Turfgrass Sci* 22:13-24
- Kress WJ, Erickson DL (2008) DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2761-2762
- Baigalmaa J, Kim MK, Noh JH, Hua S, Yang DC (2009) Phylogenetic analysis of *Schizonepeta* Spike on the basis of DNA sequences. *K J Med Crop Sci* 17:46-53
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:12794-12797
- Ahn SY, Cho KS, Yoo KO, Suh JT (2010) Phylogenetic relationship of *Ligularia* species based on RAPD and ITS sequence analysis. *Korean J Hortic Sci Technol* 28:638-647
- Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, MA X, Pang X, Xu H, Chen S (2010) Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS 2. *J Ethnopharmacol* 130:116-121
- Kim HK, Lee SJ (2010) Turfgrass and golf course. Sunjinmunhwa Publishing 99-180
- Koch H (2010) Combining morphology and DNA barcoding resolves the taxonomy of Western Malagasy *Liotrigona* Moure, 1961. *African Invertebrates* 51:413-421
- Peterson PM, Romaschenko K, Johnson G (2010) A classification of the Chloridoideae (Poaceae) based on multi-gene phylogenetic trees. *Mol Phylogenet Evol* 55:580-598
- Rodionov AV, Nosov NN, Kim ES, Machs EM, Punina EO, Probatova NS (2010) The origin of polyploidy genomes of bluegrasses *Poa* L and gene flow between Northern Pacific and sub-Antarctic islands. *Genetika* 46:12:1598-1608
- Sun HJ, Song JJ, Bae TW, Lee HY (2010) Recent development in biotechnological improvement of *Zoysia japonica* Steud. *J Plant Biotechnol* 37:400-407
- Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, Pang X, Xu H, Zhu Y, Xiao P, Chen S (2010) Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE* 5:e13102
- China Plant BOL Group (2011) Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer(ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:19641-19646
- Hong SY, Cho KS, Yoo KO (2012) Phylogenetic analysis of Korean native Aster plants based on internal transcribed spacer (ITS) sequence. *Korean J Hortic Sci Technol* 30:178-184
- Hyun YH, Choi BJ, Kim YJ, Joo YK (2012) Analysis of Research Trend on Zoysiagrass (*Zoysia* spp). *Asian J Turfgrass Sci* 26:89-95Kim HJ, Lee HR, Hyun JY, Won DC, Hong DO, Harn CH (2012) CAPS Marker Linked to Tomato Hypocotyl Pigmentation. *Korean J Hortic Sci Technol* 30:56-63
- Chung SJ, Park SJ, Choi YI, Kim IK, Lee KY, Kim HJ, Lee GJ (2013) SCAR markers were developed to identify zoysiagrass mutants exhibiting fine leaf characteristics. *CNU J of Agri Sci* 40:115-121
- Moon BC, Lee YM, Ji Y, Choi G, Chun JM, Kim HK (2013) Molecular Authentication and Phylogenetic Analysis of Plant Species for Breeae and Cirsii Herba based on DNA barcodes. *Kor J Herbology* 28:75-84
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 60. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729
- Kim SJ, Cho KS, Yoo KO, Lim KB, Hwang YJ, Chang DC, Kim KS (2015) Sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) Chrysanthemum species in Korea. *Hortic Environ Biotechnol* 56:44-53