



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

nrDNA-ITS 염기서열 분석 및  
CAPS marker를 이용한 *Zoysia* 속  
들잔디와 갯잔디의 분자생물학적 동정

Molecular identification of *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica*  
(*Zoysia* species) based on nrDNA-ITS sequences analyses  
and CAPS marker

濟州大學校 大學院

生命工學科

洪旻志

2016年 2月

nrDNA-ITS 염기서열 분석 및 CAPS  
marker를 이용한 *Zoysia* 속 들잔디와  
갯잔디의 분자생물학적 동정

Molecular identification of *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica*  
(*Zoysia* species) based on nrDNA-ITS sequences analyses  
and CAPS marker

指導教授 李 孝 淵

洪 旻 志

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016年 2月

洪旻志의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 권 용 익 (인)

委 員 이 효 연 (인)

委 員 양 대 화 (인)

濟州大學校 大學院

2016年 2月

# 목 차

Abstract	3
I. 서론	4
1장. DNA 바코드 nrDNA-ITS를 이용한 들잔디, 갯잔디, 크리핑 벤트그라스, 켄터키 블루그라스 잔디 동정	
1. 서론	7
2. 재료 및 방법	9
1) 식물 재료	9
2) Genomic DNA 추출	9
3) nrDNA-ITS PCR 증폭	16
4) nrDNA-ITS cloning	16
5) nrDNA-ITS 염기서열 비교 분석	18
6) nrDNA-ITS 염기서열을 이용한 유연관계 분석	18
3. 결과 및 고찰	21
1) 잔디 nrDNA-ITS의 cloning 및 염기서열 비교 분석	21
2) 잔디 nrDNA-ITS 구간 내 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 염기서열의 비교분석	31
3) nrDNA-ITS 염기서열 기반의 잔디 간 유연관계 분석	34
2장. nrDNA-ITS 기반 CAPS marker를 이용한 들잔디와 갯잔디의 동정	
1. 서론	37
2. 재료 및 방법	39
1) 식물 재료	39

2) CAPS marker 전환 및 분석 -----	45
3) 잔디 형태적 분석 -----	48
2. 결과 및 고찰 -----	49
1) 잔디 nrDNA-ITS 염기서열 기반 CAPS marker 분석 -----	49
2) 식별된 들잔디, 갯잔디, 교배종의 형태적 분석 -----	61
III. 종합고찰 -----	64
IV. 참고문헌 -----	67

# Abstract

*Zoysia* plants are important turf grasses used for school playgrounds, parks, roadsides, golf courses, and athletic fields. Especially, *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica* species growing near the beaches are not readily identifiable due to their similar morphology. It is thus desirable to have both morphological and molecular identifications. DNA barcoding using specific gene or non-coding DNA as barcode is one of the molecular identification methods for cryptic species. ITS (Internal Transcribed Spacer) is a non-coding DNA involved in nuclear ribosomal DNA, and is a DNA barcode popularly used because of more frequent evolutionary changes at the DNA level than other DNA barcode regions in plastid.

In this study, we collected 97 *Zoysia* turf grasses and classified into 66 *Zoysia japonica* and 31 *Zoysia sinica* species according to morphological standards for identification. To classify them based on the molecular method, the nrDNA-ITS regions including ITS1, 5.8S nrDNA, and ITS2 from four different grass species (*Zoysia japonica*, *Zoysia sinica*, *Agrostis stolonifera*, and *Poa pratensis*) were used for DNA barcoding. The substitutions and InDel (Insert/Deletion) sites in the nrDNA-ITS sequence of *Z. japonica* and *Z. sinica* were converted into the restriction endonuclease sites (*Bgl*II, *Sty*I, and *Fau*I) for CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) markers, and applied to collected the *Zoysia* grasses to verify whether the markers are presenting both seed and plant samples.

We successfully identified 43 *Zoysia japonica*, 25 *Zoysia sinica*, and 29 hybrids between *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica* among the 97 collected grass samples. These results suggest that *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica* can be identified at the species level using nrDNA-ITS barcode region and CAPS markers.

# I. 서론

잔디는 화본과에 속하는 다년생 지피식물로써 학교 운동장 및 공원, 도로변, 골프장 등 다양한 장소에 식재되고 있는 주요 원예작물이다. 최근 그 범위가 확대되고 있어 실용적 및 잠재적 가치가 점차 증가하고 있다(Hyun et al., 2012; Sun et al., 2010; Yaneshita et al., 1999). 잔디는 생육 적온에 따라 저온에 강한 한지형 잔디와 고온에 강한 난지형 잔디로 구분된다.

한지형 잔디는 크리핑 벤트그라스(*Agrostis stolonifera*), 켄터키 블루그라스(*Poa pratensis*), 툴웨스큐(*Festuca arundinacea*), 페레니얼 라이그라스(*Lolium perenne*) 등이 있다(Kim and Lee, 2010). 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*)는 질감이 우수하고 엽폭이 좁으며 짧은 예초에도 견디는 힘이 강하다(Kang, 2010). 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)는 녹도가 높은 동시에 녹기가 길고 내한성이 강하며 그늘에서도 잘 자란다(Kim, 2013). 툴웨스큐(*Festuca arundinacea*)는 어느 종류의 토양에서나 잘 견디고, 특히 내염성과 내건조성이 한지형 잔디류 가운데 가장 강하다. 페레니얼 라이그라스(*Lolium perenne*)는 재질이 부드럽고 조성속도가 빠르며 생육이 좋아 습하고 차가운 날씨에도 잘 자라는 특성이 있다(Kim and Lee, 2010).

난지형 잔디에는 대표적으로 들잔디(*Zoysia japonica*)와 갯잔디(*Zoysia sinica*), 버뮤다그라스(*Cynodon dactylon*), 세인트 어거스틴 그라스(*Stenotaphrum secundatum*) 등이 있다. 들잔디(*Z. japonica*)는 고온 및 건조 등 각종 환경에 가장 잘 적응하며 토양응집 능력과 저온에 견디는 힘이 강하고, 갯잔디(*Z. sinica*)는 수분과 양분의 요구도가 비교적 적다는 점에서 들잔디와 유사하지만, 내염성과 내건조성이 들잔디 보다 매우 강한 특성이 있다(Chung et al., 2013; Hyun et al., 2012; Li et al., 2006; Toyama et al., 2003). 버뮤다그라스(*C. dactylon*)는 건조한 토양과 습한 토양 모두에서 잘 적응하며, 답압에 의한 피해에 대한 회복력도 빠르다. 세인트 어거스틴그라스(*S. secundatum*)는 아열대와 열대지방에 걸쳐 정원용으로 폭 넓게 이용되며, 지상 포복경에 의한 번식과 그늘에 강한 특성을 갖고 있다(Kim and

Lee, 2010).

특히 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*)는 각각 건조와 염분과 같은 환경스트레스에 비교적 강한 특성이 있으며 종간 및 속간 교잡을 통한 신품종 개발에 있어 충분한 가치를 갖는 유전자원으로 보고되어 있다(Chung et al., 2013; Hyun et al., 2012; Li et al., 2006). 들잔디와 갯잔디 외부 형태학적 특성의 경우 엽폭은 들잔디가 갯잔디보다 넓고 엽장은 들잔디가 갯잔디보다 긴 특성이 있다(Kim and Lee, 2010). 그러나 이러한 외부 형태학적 특성은 생육 환경 및 재배 조건에 따라 달라지기 때문에 외형적 구분이 쉽지 않다. 따라서, 신품종 개발에 활용될 유전자원의 체계적 관리를 위해 기존의 외부 형태학적 동정법 뿐만 아니라 분자적 수준에서 이들을 보다 정확하게 구분할 수 있는 분자생물학적 동정법이 요구된다.

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; Koch, 2010; Kress et al., 2005). 이러한 DNA 바코드 분석법은 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 분류 연구에 활용되고 있다(Ahn et al., 2010; Baigalmaa et al., 2009; Hong et al., 2012; Moon et al., 2013). 따라서 본 연구에서는 난지형 잔디인 들잔디 및 갯잔디의 DNA 바코드 분석을 수행하고, 이와 비교 분석하기 위해 한지형 잔디인 크리핑 벤트그라스와 켄터키 블루그라스의 DNA 바코드 분석도 수행하여 잔디 4종을 동정하고자 하였다. 또한 DNA 바코드를 바탕으로 CAPS marker 분석을 수행하여, 잔디의 분자생물학적 동정 체계를 확립하고자 하였다.

1장. DNA 바코드 nrDNA-ITS를 이용한  
들잔디, 갯잔디, 크리핑 벤투그라스, 켄터키  
블루그라스 잔디 동정

# 1. 서론

최근 DNA 바코드 분석을 이용한 생물종 분류 동정이 국제적 생물 분류 기준으로 권고되고 있다(Baigalmaa et al., 2009; CBOL Plant Working Group, 2009; Moon et al., 2013). DNA 바코드(DNA barcode) 분석법은 다양한 생물종에 공통적으로 존재하는 특정 유전자 또는 염기서열 구간을 PCR을 통해 증폭하고 이를 염기서열 분석함으로써 종을 식별하는 분자생물학적 방법이다(China Plant BOL Group et al., 2011; Kress and Erickson, 2008; Hebert et al., 2003). DNA 바코드 분석법은 아주 적은 양의 시료로도 분석이 가능하며, 간단한 분자생물학적 기법을 통해 신속하게 종을 동정할 수 있다는 장점이 있다(Hebert et al., 2003; Koch, 2010; Kress et al., 2005). 이러한 DNA 바코드 분석은 동물의 경우 미토콘드리아 내에 존재하는 *COI*(Cytochrome *c* Oxidase subunit I) 유전자를 널리 사용하며, 식물의 경우 주로 핵 내의 nrDNA-ITS 염기서열 구간 등을 DNA 바코드 구간으로 이용한다(Kress et al., 2005). 특히 ITS(Internal Transcribed Spacer)는 nrDNA(nuclear ribosomal DNA)의 보존 지역인 18S, 5.8S, 26S ribosomal DNA 사이에 ITS1과 ITS2로 구성되어 있다(Fig. 2). 또한 nrDNA-ITS는 양친 유전적이며 생물 종에 따라 보존 지역과 변이 지역이 뚜렷하여 PCR을 통한 분리 및 염기서열 분석에 유리하다는 이점이 있어 종간 및 속간 유연관계와 진화양상을 연구하고 시중에 유통되는 한약재의 위품을 판별하는 데에 중요한 자료로도 활용되고 있다(Ahn et al., 2010; Baigalmaa et al., 2009; Gao et al., 2010; Hong et al., 2012; Yao et al. 2010). 들잔디와 갯잔디의 경우 생육 환경 및 재배 조건에 따라 외형적 구분이 어렵기 때문에 잔디의 정확한 분류를 위해서는 외부 환경 등에 영향을 받지 않는 분자생물학적 동정 방법이 요구된다. 따라서 본 연구는 난지형 잔디인 들잔디 및 갯잔디의 DNA 바코드 분석을 수행하고, 이와 비교 분석을 위해 한지형 잔디인 크리핑 벤투그라스와 켄터키 블루그라스의 DNA 바코드 분석도 수행하여 잔디 4종을 동정하고자 하였다. DNA 바코드 분석은 nrDNA-ITS 구간을 이용하였으며, 잔디 4종의 각

nrDNA-ITS 구간을 증폭하여 nrDNA-ITS 전체 염기서열을 확보하고, nrDNA-ITS 및 nrDNA-ITS 내에 존재하는 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2를 비교 분석 하였다. 또한, nrDNA-ITS 염기서열을 이용하여 잔디 간 유연관계 분석을 통해 분자생물학적으로 잔디를 동정하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 식물 재료

잔디 종자는 종자회사로부터 구입한 시판종자 중 들잔디(*Z. japonica*, China) 1품종의 10개체, 크리핑 벤투그라스(*A. stolonifera*, USA) 1품종의 10개체, 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*, USA) 3품종 각 10개체 총 50개체를 식물 재료로 사용하였다(Table 1 and 2). 또한, 제주대 아열대원예산업연구소에서 보존 중인 자생 *Zoysia* 속 잔디 614점 중 잔디 종자 20개체도 식물 재료로 사용하였다. 각 종자 70개체는 세척 후 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본 배지에 배양되었으며, 배양한 잔디의 잎은 DNA 추출을 위한 재료로 사용되었다.

### 2) Genomic DNA 추출

잔디 genomic DNA는 GeneAll 회사의 Exgene Plant SV Mini Kit(GeneAll, Korea)를 이용하여 추출하였다(Fig. 1). 우선 분쇄한 잎 조직에 PL buffer 500  $\mu$ l를 첨가하여 vortexing 후 65°C에 15분간 정치하였다. 혼합물에 PD buffer 180  $\mu$ l를 첨가하여 inverting 후 -20°C에서 1시간 동안 정치하였다. Ezsep filter column에 혼합물을 회수하고 상온에서 13000rpm에 1초간 원심분리 하였다. 여과액에 BD buffer 750  $\mu$ l를 첨가하여 pipetting 후 SV column에 혼합물 700  $\mu$ l를 첨가하여 상온에서 13000rpm에 15초간 원심분리 하였다. CW buffer 400  $\mu$ l를 첨가하여 상온에서 13000rpm에 3분간 원심분리 후 column을 새 1.5ml tube로 옮겨 건조하였다. genomic DNA는 60  $\mu$ l의 SDW를 첨가하여 용해 및 원심분리 하였으며, 0.8% 아가로오스 겔을 이용한 전기영동 상에서 확인 후 정량하여 5ng의 genomic DNA를 PCR에 사용하였다.

**Table 1.** List of turf grasses for the nrDNA-ITS analysis and CAPS marker.

No.	Sample No.	Germplasm	Sample Species	Origin	Usage
1	As-1	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
2	As-2	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
3	As-3	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
4	As-4	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
5	As-5	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
6	As-6	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
7	As-7	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
8	As-8	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
9	As-9	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
10	As-10	Seed	<i>Agrostis stolonifera</i>	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
11	Pp-M-1	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
12	Pp-M-2	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
13	Pp-M-3	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
14	Pp-M-4	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
15	Pp-M-5	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
16	Pp-M-6	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
17	Pp-M-7	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
18	Pp-M-8	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
19	Pp-M-9	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker

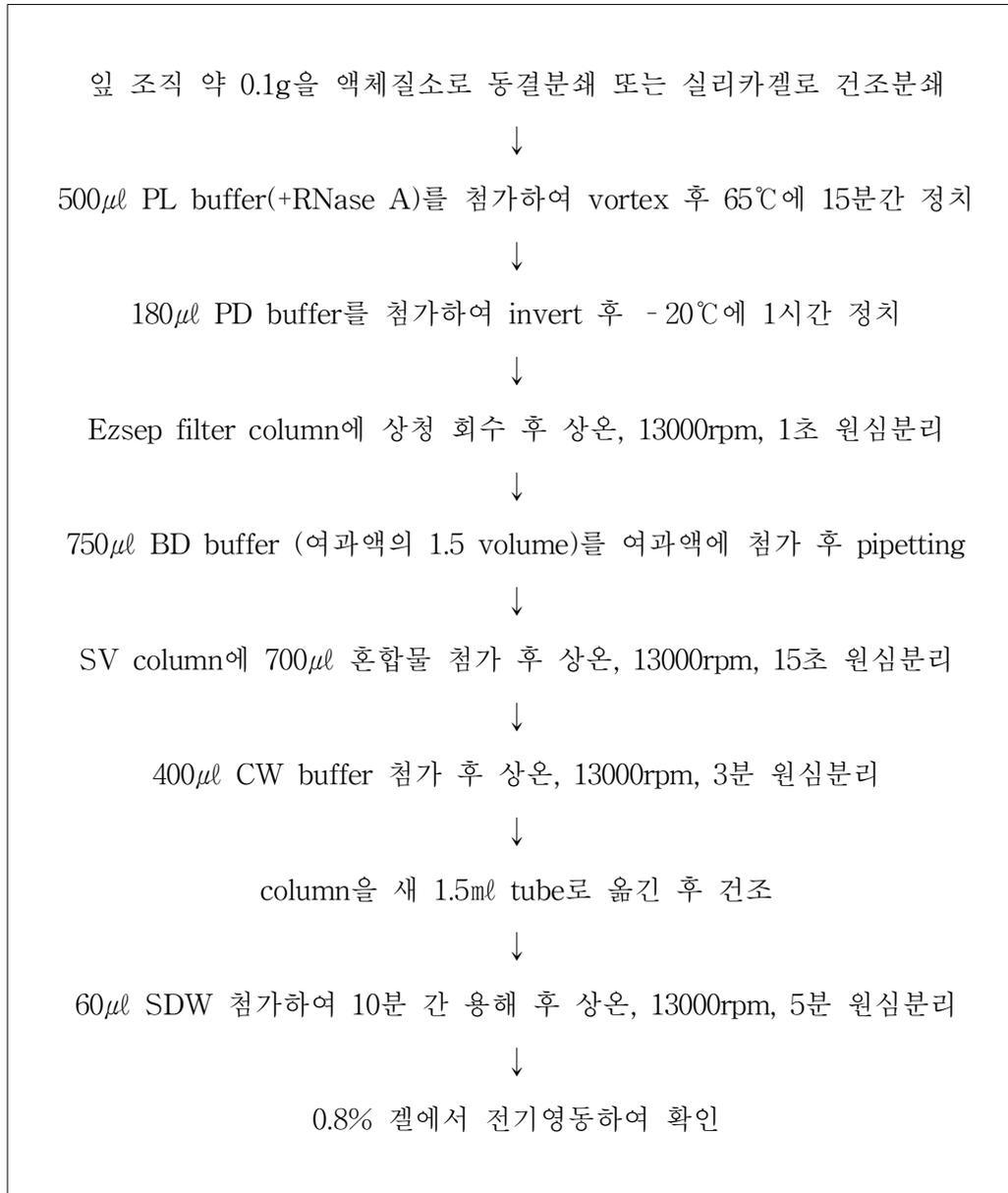
No.	Sample No.	Germplasm	Sample Species	Origin	Usage
20	Pp-M-10	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Midnight)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
21	Pp-B-1	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
22	Pp-B-2	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
23	Pp-B-3	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
24	Pp-B-4	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
25	Pp-B-5	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
26	Pp-B-6	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
27	Pp-B-7	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
28	Pp-B-8	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
29	Pp-B-9	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
30	Pp-B-10	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Blueberry)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
31	Pp-D-1	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
32	Pp-D-2	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
33	Pp-D-3	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
34	Pp-D-4	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
35	Pp-D-5	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
36	Pp-D-6	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
37	Pp-D-7	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
38	Pp-D-8	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
39	Pp-D-9	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker

No.	Sample No.	Germplasm	Sample Species	Origin	Usage
40	Pp-D-10	Seed	<i>Poa Pratensis</i> (cultivar : Diva)	Company, USA	DNA barcode and CAPS marker
41	Zj-D-1	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker
42	Zj-D-2	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker
43	Zj-D-3	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker
44	Zj-D-4	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker
45	Zj-D-5	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker
46	Zj-D-6	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker
47	Zj-D-7	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker
48	Zj-D-8	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker
49	Zj-D-9	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker
50	Zj-D-10	Seed	<i>Zoysia japonica</i>	Company, China	DNA barcode and CAPS marker

**Table 2.** List of collected turf grasses for nrDNA-ITS analysis and CAPS marker: Morphological classification of turf grasses based on reported studies (Kim and Lee, 2010; Yang et al., 1995; Yu et al., 1974).

No.	Sample No.	Germplasm	Collected Place	Origin	Usage
1	Z1	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
2	Z2	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
3	Z3	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
4	Z4	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
5	Z5	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
6	Z6	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
7	Z7	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
8	Z8	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
9	Z9	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
10	Z10	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
11	Z11	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
12	Z12	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
13	Z13	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
14	Z14	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
15	Z15	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
16	Z16	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
17	Z17	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
18	Z18	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker

No.	Sample No.	Germplasm	Collected Place	Origin	Usage
19	Z19	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker
20	Z20	Seed	Jeju Island	Korea	DNA barcode and CAPS marker



**Figure 1.** Extraction of genomic DNA from commercial seeds and collected seeds and plants.

### 3) nrDNA-ITS PCR 증폭

nrDNA-ITS 염기서열 구간을 증폭시키기 위해 AccuPower PCR PreMix(Bioneer, Korea)를 사용하여 genomic-PCR 분석을 수행하였다(Fig. 2). nrDNA-ITS 구간 증폭을 위한 primer로는 Gehrig et al.(2001)이 보고한 ITS1-forward primer(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')와 ITS4-reverse primer(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하였다(Fig. 3). PCR 조건은 95°C에서 5분간 전처리 후, 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 40초를 30회 cycle로 반복한 후 72°C에서 10분간 후처리 하였다. 증폭된 PCR 산물은 EtBr을 첨가한 1.2% 아가로오스 겔에서 전기영동하여 band를 확인하였다.

### 4) nrDNA-ITS cloning

증폭된 PCR 산물은 Expin™ Gel SV kit(GeneAll, Korea)를 이용하여 정제하였다. GB buffer 600 $\mu$ l를 첨가하여 60°C에서 15분간 heat shock을 준 후 column에 넣어 13000rpm에서 1초간 원심분리 하였다. GB buffer 200 $\mu$ l 첨가하여 13000rpm에서 1초간 원심분리 후 CW buffer 400 $\mu$ l를 첨가하고 13000rpm에서 3분간 원심분리하였다. Column을 1.5ml tube로 옮겨 5분간 건조시키고 SDW 40 $\mu$ l에 10분간 용해 후 13000rpm에서 10분간 원심분리하여 다음 실험에 사용하였다. 정제된 PCR 산물은 pGEM-Teasy vector(Promega, USA)에 삽입 후 Top10 *E.coli* competent cell에 형질전환하여 각 시료별 10개의 colony를 선발하였다. Exprep™ Plasmid SV Mini kit(GeneAll, Korea)를 사용하여 선발된 colony로부터 플라스미드 DNA를 추출하였으며 이후 마크로젠(주)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 삽입된 PCR 산물의 염기서열 분석 시 T7과 SP6 universal primer를 이용하여 분석하였다.

Cloning한 들잔디(*Z. japonica*), 갯잔디(*Z. sinica*), 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*), 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*) 잔디 4종의 nrDNA-ITS 구간 염기서열은 DNA Baser Sequence Assembler Ver. 4(Heracle BioSoft, Romania)

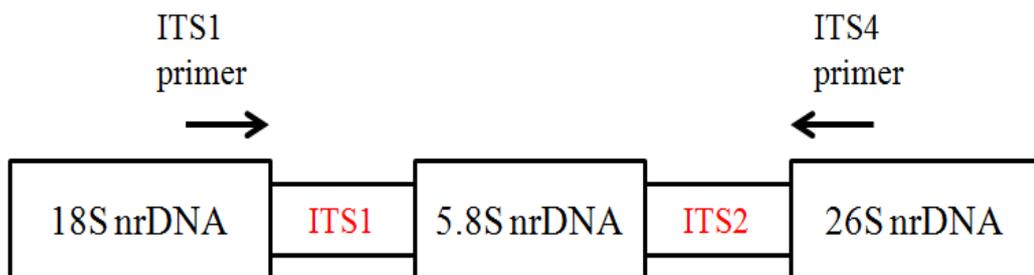
program과 NCBI database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLAST를 이용하여 기존의 분석된 nrDNA-ITS 염기서열과의 상동성 분석을 수행하였다. 확인된 nrDNA-ITS 구간 염기서열은 추후 잔디 4종의 nrDNA-ITS 염기서열 비교 및 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 세부 구성 요소 분석에 이용하였다.

반응액 조성

Genomic-PCR 조건

Genomic DNA	30ng	Pre-denaturation	95°C, 5min	
ITS1 5pM primer	1 $\mu$ l	Denaturation	95°C, 30sec	} 30cycles
ITS4 5pM primer	1 $\mu$ l	Annealing	58°C, 30sec	
Sterile distilled water	17 $\mu$ l	Extension	72°C, 40sec	
PCR premix	고체	Post-elongation	72°C, 10min	
-----				
Total	20 $\mu$ l			

**Figure 2.** Conditions of genomic-PCR for nrDNA-ITS region.



**Figure 3.** Schematic diagram for nrDNA-ITS region: Black arrows indicate positions and directions of two each universal primer for nrDNA-ITS. ITS, internal transcribed spacer; nrDNA, nuclear ribosomal DNA.

## 5) nrDNA-ITS 염기서열 비교 분석

잔디 4종 간 nrDNA-ITS 염기서열의 차이를 확인하기 위해, 확보한 들잔디 (*Z. japonica*), 갯잔디(*Z. sinica*), 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*), 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)의 nrDNA-ITS 염기서열들을 NCBI database와 BioEdit Sequence Alignment Editor program의 ClustalW Multiple Alignment(Thompson, 1994)에 이용하여 비교 분석하였다. 또한 nrDNA-ITS 내에 존재하는 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2의 DNA 염기서열의 길이, G+C 함량을 분석하였다(Fig. 4).

## 6) nrDNA-ITS 염기서열을 이용한 유연관계 분석

확보한 nrDNA-ITS 구간 염기서열들을 이용하여 잔디 간의 유전적 유연관계를 분석하기 위해, MEGA 6.06(Tamura et al., 2013) 프로그램을 사용하여 정렬 후 UPGMA(Unweighted Pair-Group Method Average)와 K2P(Kimura 2-Parameter) model 분석 방법을 이용하여 유연관계 분석을 수행하였다. 각 분계도의 지지 정도를 나타내기 위해 bootstrap(Felsenstain, 1985)으로 1000회 반복 분석하였다(Fig. 5).

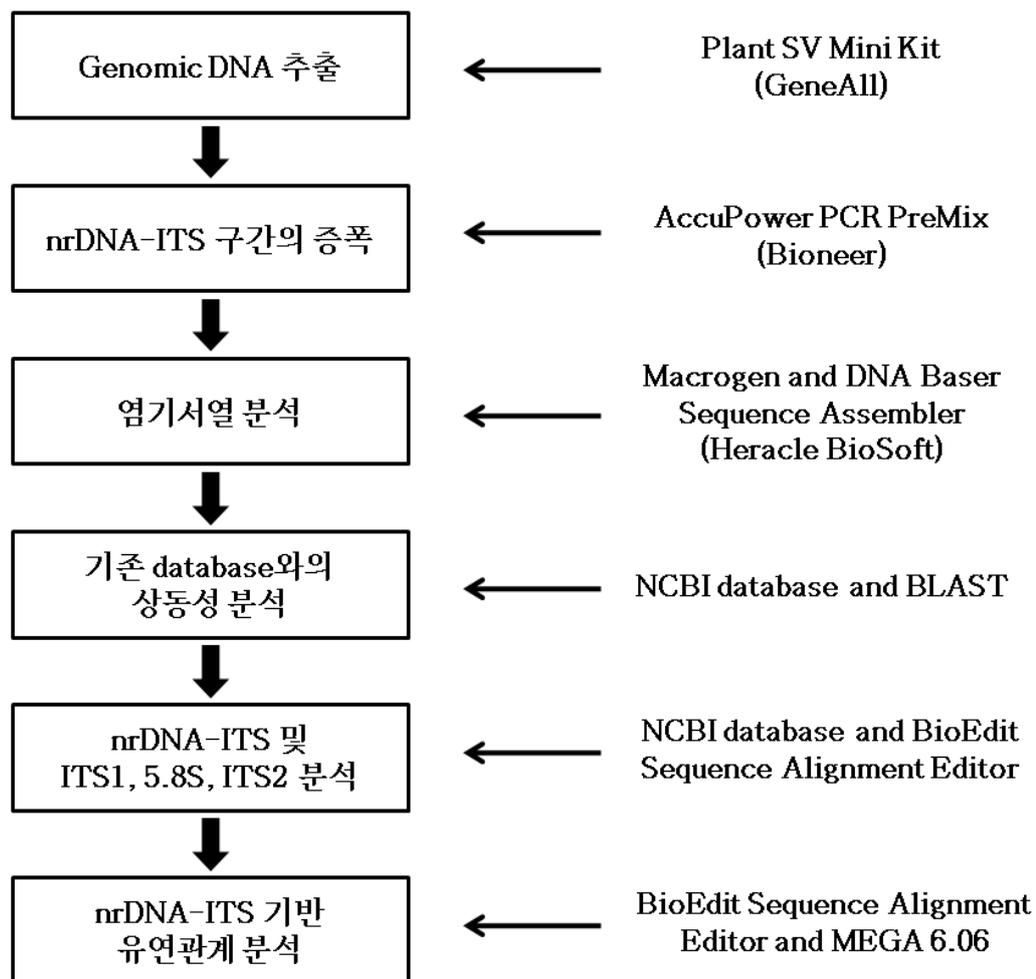
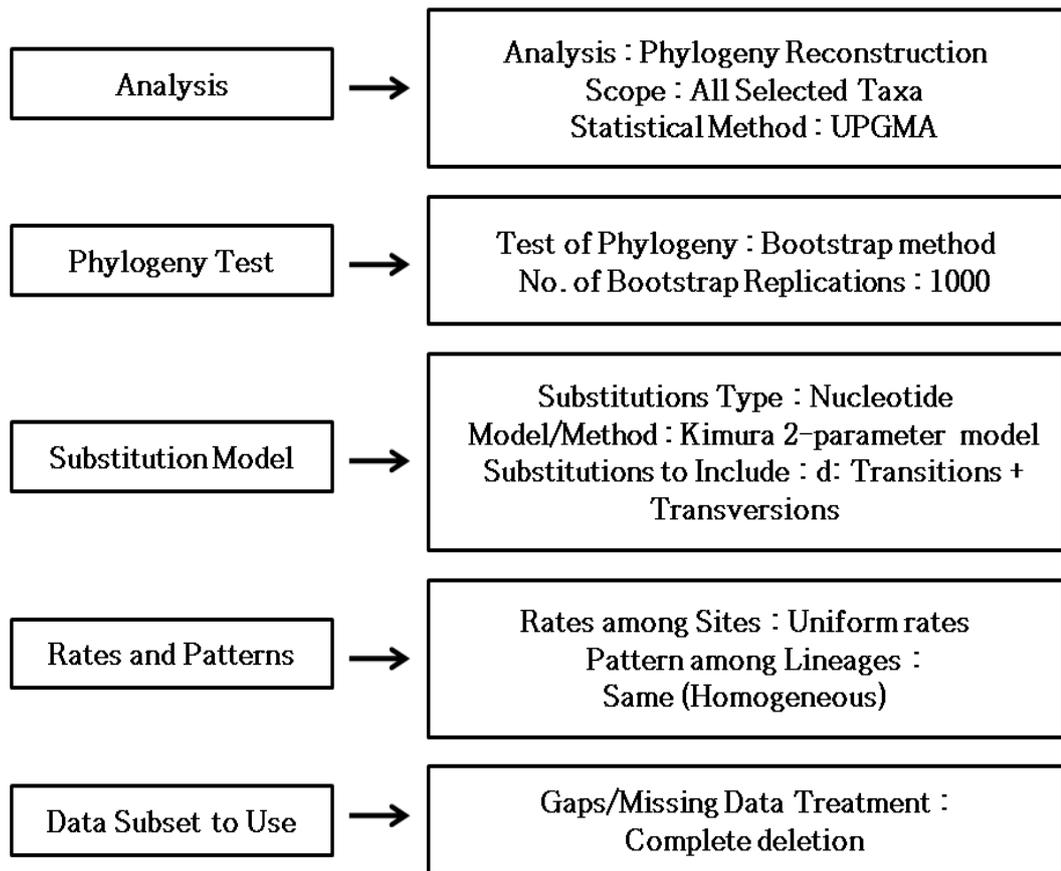


Figure 4. Procedure of plant DNA barcoding using nrDNA-ITS region.



**Figure 5.** Detail options for constructing the phylogenetic tree based on nrDNA-ITS sequences. MEGA 6.06 program was used.

# 1. 결과 및 고찰

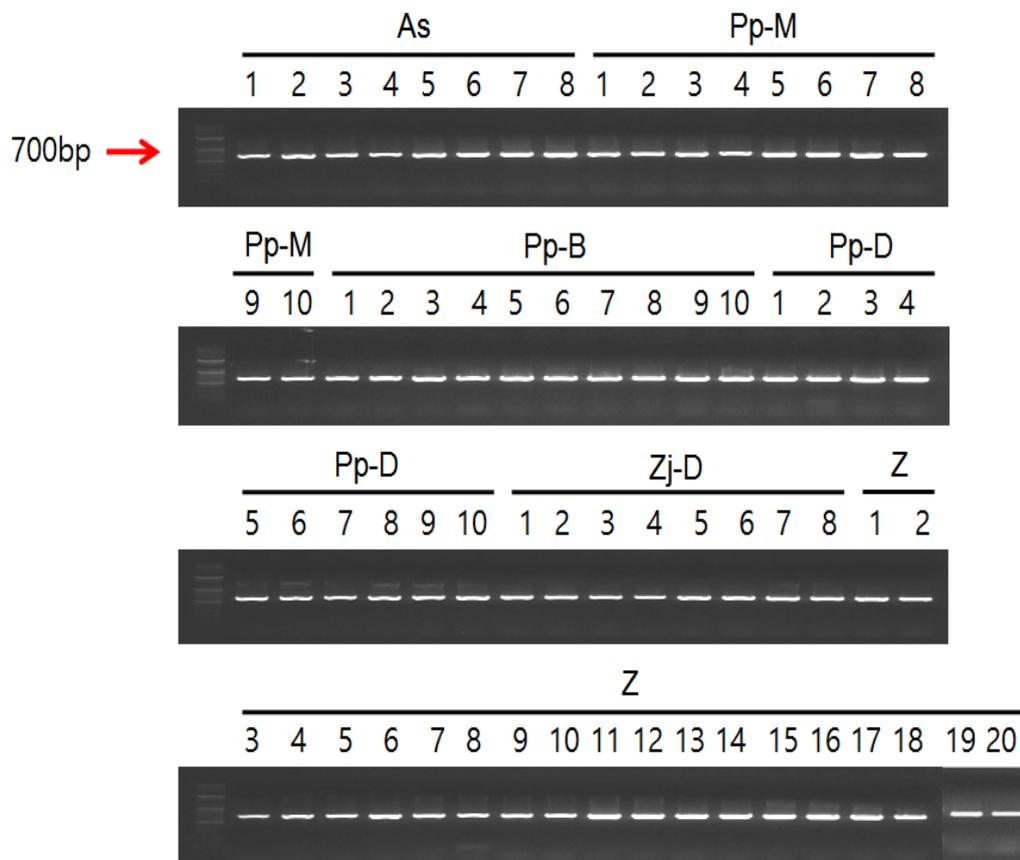
## 1) 잔디 nrDNA-ITS의 cloning 및 염기서열 비교 분석

nrDNA-ITS 염기서열을 바탕으로 들잔디, 갯잔디, 크리핑 벤투그라스, 켄터키 블루그라스를 분류하기 위해 ITS1과 ITS4 universal primer를 이용하여 nrDNA-ITS PCR을 수행한 결과, 들잔디(*Z. japonica*), 외형적으로 갯잔디와 유사한 잔디(*Z. sinica*-like grass), 크리핑 벤투그라스(*A. stolonifera*), 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*) 네 가지 종 모두로부터 약 700bp 산물을 확보하였다 (Fig. 6). 해당 PCR 산물을 cloning 후 염기서열을 분석한 결과, ITS1과 ITS4 primer에 의해 증폭된 전체 nrDNA의 크기는 들잔디(*Z. japonica*)는 686bp, 갯잔디(*Z. sinica*)는 687bp, 크리핑 벤투그라스(*A. stolonifera*)는 683bp, 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)는 681bp 임을 알 수 있었다. 이를 통해 난지형 잔디의 nrDNA-ITS 염기서열 길이가 한지형 잔디 보다 긴 것을 알 수 있었다. 또한 NCBI에 등록된 nrDNA-ITS 염기서열들과 비교 분석한 결과, 들잔디(*Z. japonica*)는 Peterson et al.(2010)이 보고한 들잔디 nrDNA-ITS 서열과 99%의 상동성을 보였다(Accession No. GU359196). 외부 형태학적으로 갯잔디(*Zoysia sinica*-like)로 관찰된 *Zoysia* 속 잔디의 경우, 기존에 보고된 갯잔디 서열(Accession No. KP057082)과 100%의 상동성을 나타내어 수집된 잔디의 종이 *Zoysia sinica*임을 확인하고 추후 실험을 진행하였다. 한지형 잔디인 크리핑 벤투그라스와 켄터키 블루그라스는 NCBI에 보고되어 있는 서열들과 100% 일치함을 알 수 있었다(Accession No. KM999958.1과 No. KF800192.1). 염기서열 비교를 통해 특정 염기의 삽입(Insert), 결실(Deletion), 치환(Substitution)을 확인한 결과, 서로 다른 잔디 4종의 nrDNA-ITS 구간 염기서열 간에 175개 위치의 염기치환, 31개 위치의 삽입/결실이 관찰되었다(Fig. 7). 이 중 염기치환 및 삽입/결실을 포함한 총 160bp의 염기서열 차이가 들잔디와 갯잔디를 포함하는 난지형 잔디와 크리핑 벤투그라스와 켄터키 블루그라스를 포함하는 한지형 잔디를 구분하는 marker nucleotide 역할을 하였으며, 서로 다른 세 속(*Zoysia*

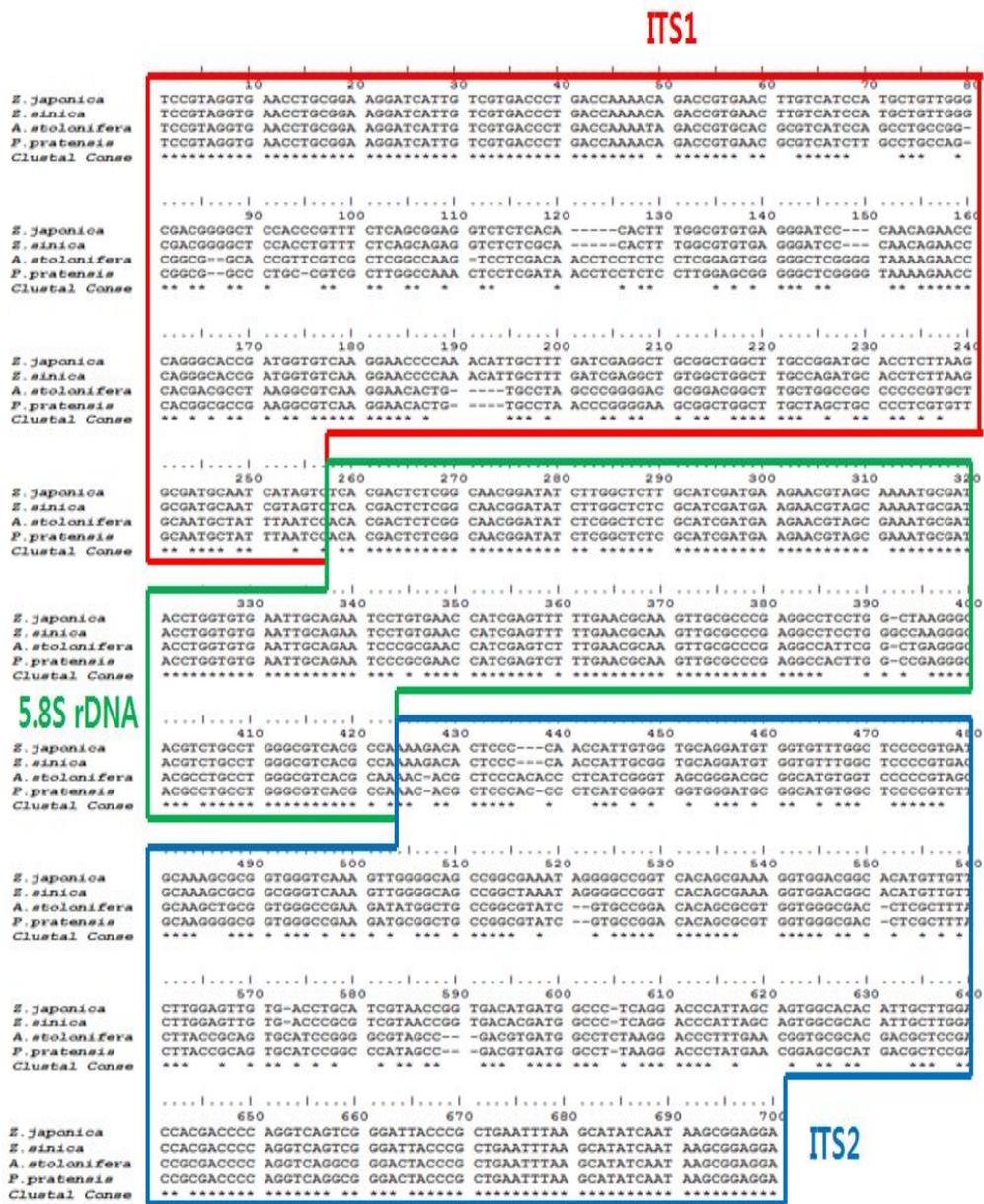
속, *Agrostis* 속, *Poa* 속)을 구별하는 속 특이적 염기치환 및 삽입/결실 또한 13곳에서 관찰되었다(Fig. 7). 다른 종과 구별이 가능한 종 특이적 염기서열의 차이는 크리핑 벤투그라스는 32개, 켄터키 블루그라스는 26개, 갯잔디는 10개, 들잔디는 5개임을 확인하였다(Fig. 7). 이는 크리핑 벤투그라스와 켄터키 블루그라스가 다른 속(*Agrostis* 속, *Poa* 속)에 속하는 종인 반면, 들잔디와 갯잔디는 같은 속(*Zoysia* 속)에 속하는 종이므로 유전적 유연관계와 관계되는 nrDNA-ITS 구간 염기서열(Cho et al., 2010)의 차이가 상대적으로 적게 나타나는 것으로 예상된다. 또한, 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*)의 경우, 갯잔디가 들잔디보다 5.8S 구간에서 1bp 더 길었으며, ITS1과 ITS2 구간에서는 길이가 동일하였다. 염기치환 또는 삽입/결실에 의한 들잔디와 갯잔디 간 nrDNA-ITS 구간의 전체 염기서열 차이는 총 19군데에서 각 1bp씩 차이가 났으며, 그 중 18개의 염기가 치환되었고 오직 한군데의 1bp 염기만이 삽입/결실이 일어남을 확인하였다(Fig. 8). 18개의 염기치환 중 16개의 염기는 들잔디와 갯잔디 종을 명확하게 구분하는 종 특이적 염기서열이며, 이를 제외한 나머지 2개의 염기는 각각 들잔디 종내 구별 marker nucleotide(C↔A)와 갯잔디 종내 구별 marker nucleotide(A↔G)임을 확인하였다(Fig. 12). 따라서, nrDNA-ITS 전 구간 염기서열 내의 염기치환, 삽입, 결실에 의한 염기서열 차이를 확인함으로써 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*)의 종간 구별뿐만 아니라 종내 구별 또한 가능함을 알 수 있었다.

이러한 결과는 기존에 Yao et al.(2010)이 ITS 염기서열 변이에 의한 종간의 차이가 종내 보다 크다고 보고한 결과와 유사하다. 잔디는 nrDNA-ITS 및 DNA 바코드 분석에 관한 연구문헌이 보고된 바 없다. 따라서 다른 식물 종을 대상으로 한 기존에 보고된 결과와 비교하였을 때 본 연구의 결과는 nrDNA-ITS 전체 구간의 크기가 732bp-736bp인 국화과 식물(Moon et al., 2013)과 759-762bp인 오미자 종(Moon et al., 2010) 보다는 작으며, 전체 nrDNA-ITS 구간이 633bp-642bp인 곰취 속 식물(Ahn et al., 2010)과 608bp인 가시오갈피(Han et al., 2006)보다는 큰 수준이었다. 또한, 본 연구에서 관찰된 5.8S ribosomal RNA 유전자 부위에서의 삽입/결실에 의한 들잔디와 갯잔디 간의 염기서열 차이는 ribosomal RNA 부위에서는 종내 변이가 관찰되지 않는다

고 보고한 결과(Moon et al., 2013)와 다르지만, ITS1 부위에서 미미하지만 종 내 변이가 관찰된 결과는 소계와 대계 기원식물을 대상으로 종을 감별하고 유 연관계를 분석한 연구(Moon et al., 2013)의 결과와 유사하다.



**Figure 6.** The amplification of nrDNA-ITS region in *Z. japonica*, *Z. sinica*-like grass, *A. stolonifera*, and *P. pratensis* : A red color arrow indicates about 700bp size of band. M, 100bp plus DNA ladder(Bioneer); As 1~As8, creeping bentgrass (*A. stolonifera*); Pp-M-1~Pp-M-10, "midnight" cultivar of kentucky bluegrass (*P. pratensis*); Pp-B-1~Pp-B-10, "blueberry" cultivar of kentucky bluegrass (*P. pratensis*), Pp-D-1~Pp-D-10, "diva" cultivar of kentucky bluegrass (*P. pratensis*); Zj-D-1~Zj-D-10, zoysiagrass from "duck-chang" company (*Z. japonica*); Z1~Z10, *Zoysia sinica*-like grass collected from Aewol, Jeju Island; Z11~20, *Zoysia japonica*-like grass collected from Hagwi, Jeju Island.



**Figure 7.** nrDNA-ITS alignment of *Z. japonica*, *Z. sinica*, *A. stolonifera*, and *P. pratensis* : Total sizes of ITS sequences in each species are 686bp, 687bp, 683bp, and 681bp, respectively. Red lines indicate ITS1 region. Green lines indicate 5.8S rDNA region. Blue lines indicate ITS2 region.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70
Zj-D-3  GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Zj-D-6  GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Zj-D-8  GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Zj-D-9  GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Zj-D-10 GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Zj-D-1  GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Zj-D-2  GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Zj-D-4  GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Zj-D-5  GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Zj-D-7  GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-1     GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-5     GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-6     GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-8     GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-2     GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-3     GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-4     GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-7     GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-9     GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Z-10    GGATCATTGT CGTGACCCTG ACCAAAACAG ACCGTGAACT TGTCATCCAT GCTGTTGGGC GACGGGGCTC
Clustal Co *****

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      80      90      100     110     120     130     140
Zj-D-3  CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Zj-D-6  CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Zj-D-8  CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Zj-D-9  CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Zj-D-10 CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Zj-D-1  CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Zj-D-2  CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Zj-D-4  CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Zj-D-5  CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Zj-D-7  CACCCSTTTC TCAGCGGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-1     CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-5     CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-6     CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-8     CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-2     CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-3     CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-4     CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-7     CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-9     CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Z-10    CACCTSTTTC TCAGCAGAGG TCTCTGCAC ACTTTGGCGT GTGAGGGATC CCAACAGAAC CCAGGGCACC
Clustal Co *****

```



```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      290      300      310      320      330      340      350
Zj-D-3  CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Zj-D-6  CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Zj-D-8  CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Zj-D-9  CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Zj-D-10 CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Zj-D-1  CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Zj-D-2  CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Zj-D-4  CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Zj-D-5  CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Zj-D-7  CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-1     CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-5     CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-6     CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-8     CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-2     CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-3     CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-4     CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-7     CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-9     CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Z-10    CAAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA ATCCTGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCC
Clustal Co *****

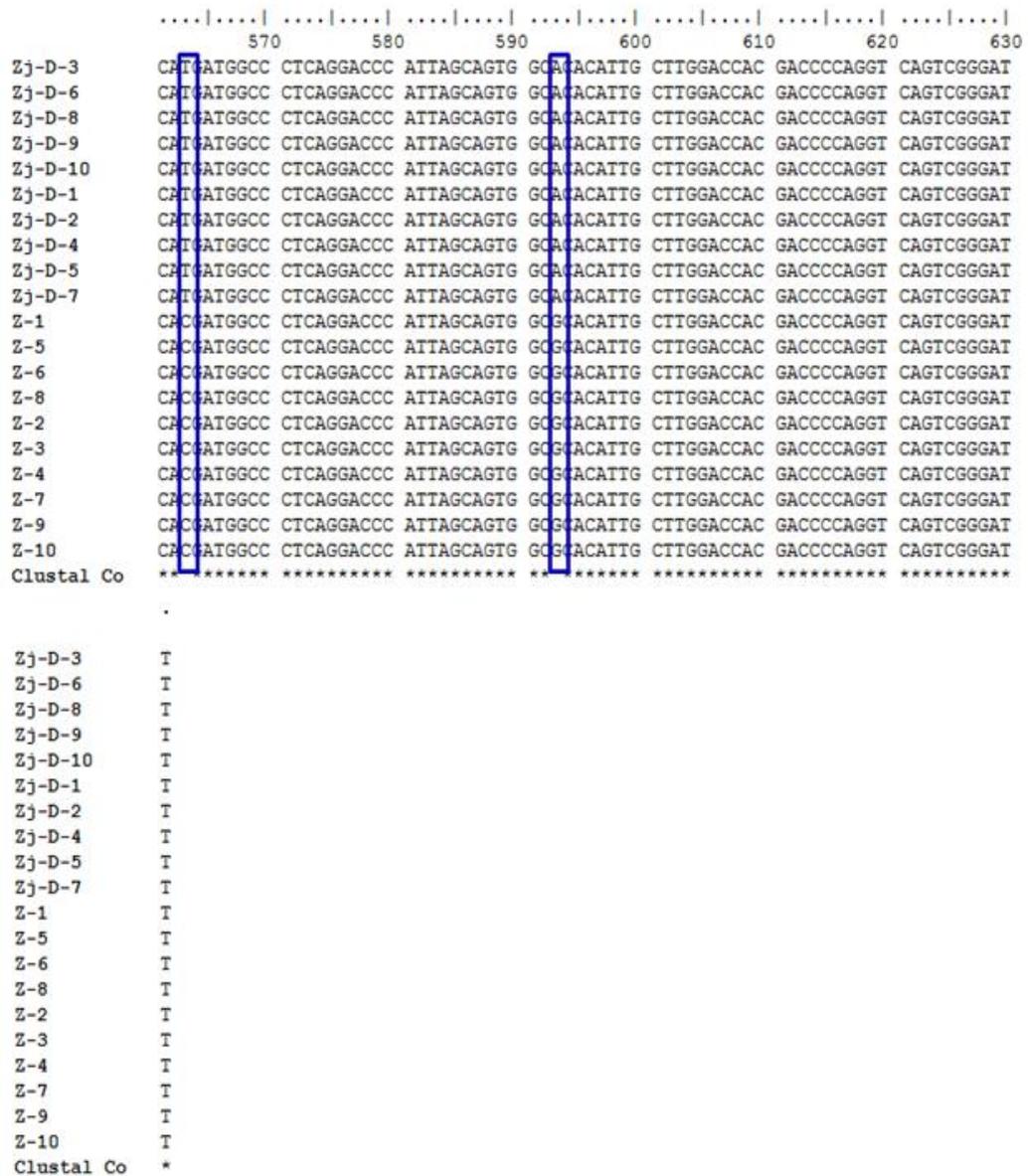
```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360      370      380      390      400      410      420
Zj-D-3  GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Zj-D-6  GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Zj-D-8  GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Zj-D-9  GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Zj-D-10 GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Zj-D-1  GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Zj-D-2  GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Zj-D-4  GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Zj-D-5  GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Zj-D-7  GAGGCCTCCT GCGTAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCPAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-1     GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-5     GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-6     GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-8     GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-2     GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-3     GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-4     GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-7     GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-9     GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Z-10    GAGGCCTCCT GCGCAAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCAC GCCAAAAGAC ACTCCCCAAC CATTGCGGTG
Clustal Co *****

```





**Figure 8.** nrDNA-ITS alignment of *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica* : Blue rectangular boxes indicate the different nucleotide bases between *Z. japonica* and *Z. sinica*. Red rectangular boxes indicate the different nucleotide bases used for recognition sites of restriction endonucleases (*Bgl*I, *Sty*I, and *Fau*I). Purple and green rectangular boxes indicate the different nucleotide bases dividing *Z. sinica* and *Z. japonica* lines into two different groups, respectively. Zj-D-1~Zj-D-10, *Zoysia japonica* from company; Z-1~Z-10, *Zoysia* grass from Aewol, Jeju Island.

## 2) 잔디 nrDNA-ITS 구간 내 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 염기서열의 비교 분석

ITS는 피자식물의 계통발생학적 분류 연구에 있어 유용하다고 알려져 있다 (Ahn et al., 2010). 이러한 ITS는 변이 지역으로써 ITS1과 ITS2로 존재한다. 또한 ITS는 보존 지역인 18S, 5.8S, 26S ribosomal DNA와 함께 nrDNA를 구성한다(Fig. 3). 따라서, 기존에 보고된 nrDNA-ITS 염기서열들과의 비교를 통해 앞서 확보한 잔디 4종의 nrDNA가 포함하는 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2의 길이를 세부 분석하였다. 그 결과, 들잔디(*Z. japonica*)의 경우 총 686bp의 nrDNA 전체 염기서열 중에서 ITS1의 크기가 249bp, 5.8S rDNA가 163bp, ITS2가 274bp이며, 갯잔디(*Z. sinica*)의 경우 총 687bp의 nrDNA 염기서열 중 ITS1이 249bp, 5.8S rDNA가 164bp, ITS2가 274bp임을 확인하였다(Table 3). 한지형 잔디인 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*)와 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)의 경우, nrDNA 전체 구간이 총 683bp인 크리핑 벤트그라스는 ITS1 248bp와 5.8S rDNA 163bp, ITS2 272bp를, 켄터키 블루그라스는 총 681bp의 전체 nrDNA 구간 중 248bp의 ITS1과 163bp의 5.8S rDNA, 270bp의 ITS2를 포함함을 알 수 있었다(Table 3).

여러 피자식물의 ITS1 지역의 길이는 187-298bp, ITS2 지역은 187-252bp 정도를 나타낸다는 Baldwin et al.(1995)의 보고에 따르면, 본 연구에서 얻은 결과 중 ITS1은 이 범위 안에 포함되지만, ITS2의 경우 최소 길이가 270bp로 나타났다. 이러한 결과는 산초 기원종의 감별 연구(Kim et al., 2015)에서 ITS2의 크기가 383-388bp로 보고된 연구 결과와 유사하다.

G + C 함량은 DNA의 이중 나선 구조 및 물리적 특성을 결정하여 중요한 의미를 갖는다(Han et al., 2006). 들잔디의 G + C 함량의 경우 nrDNA 전체 구간은 55%, ITS1은 56.2%, 5.8S rDNA는 53.9%, ITS2는 55.5-55.8%이며, 갯잔디의 경우 nrDNA 전체 구간의 G + C 함량은 56%, ITS1은 55.4-55.8%, 5.8S rDNA는 55.5%, ITS2는 57.6%임을 확인하였다(Table 3). 한지형 잔디인 크리핑 벤트그라스와 켄터키 블루그라스의 경우, 크리핑 벤트그라스의 확보한

nrDNA의 G + C 함량은 62%, ITS1은 62.9%, 5.8S rDNA는 58.2%, ITS2는 63.2%이며, 켄터키 블루그라스의 전체 nrDNA-ITS는 61%, ITS1은 60.0%, 5.8S rDNA는 58.8%, ITS2는 63.3%임을 알 수 있었다(Table 3).

난지형 잔디의 ITS 구간은 56% 중간 정도의 값을, 한지형 잔디의 ITS 구간은 62% 정도로 나타나 비교적 높은 값을 갖는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 Shin et al.(2003)이 3중 수소결합인 구아닌(G)과 시토신(C)의 비율이 높은 것은 DNA 변성 등의 환경변화에 대한 안정도가 비교적 높을 것이라 보고한 것을 바탕으로 한지형 잔디가 난지형 잔디에 비해 환경변화에 있어 보다 안정적인 것으로 판단된다.

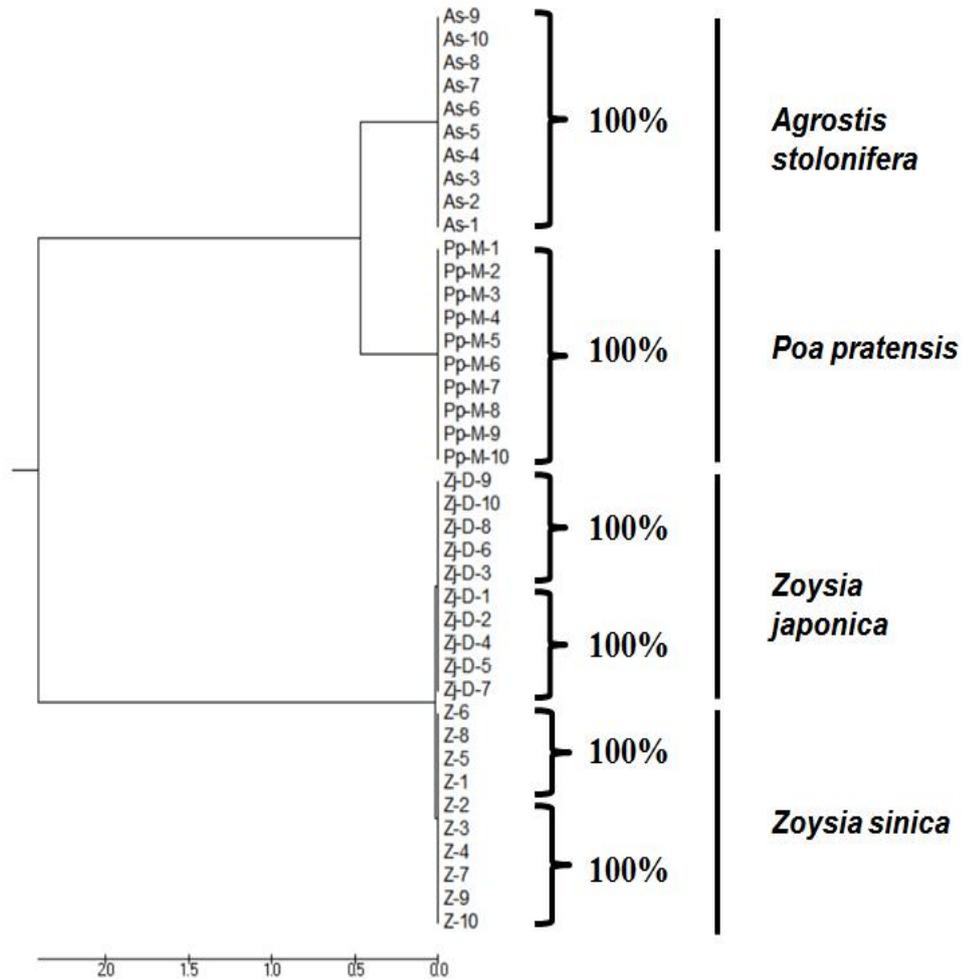
**Table 3.** Molecular analysis of nrDNA-ITS sequence in *Z. japonica*, *Z. sinica*, *A. stolonifera*, and *P. pratensis*.

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

### 3) nrDNA-ITS 염기서열 기반의 잔디 간 유연관계 분석

nrDNA-ITS 염기서열 정보를 바탕으로 들잔디(*Z. japonica*), 갯잔디(*Z. sinica*), 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*), 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*) 간의 유전적 유연관계를 분석하기 위해 MEGA 6.06 program을 이용하여 UPGMA 방법으로 Phylogenetic tree를 작성하여 분석한 결과, 각 개체는 종에 따라 서로 다른 4개의 그룹으로 유집되는 경향이 강하게 나타났다(Fig. 9). 들잔디 그룹은 1군데의 염기치환(A↔G)으로 인해 Zj-D-3, 6, 8, 9, 10 라인들을 포함하는 A 그룹과 Zj-D-1, 2, 4, 5, 7 라인들을 포함하는 G 그룹으로 나뉘었으며, A 그룹과 G 그룹에 속하는 모든 라인들의 염기서열은 100%로 일치하였다(Fig. 9). 갯잔디 그룹은 염기치환(C↔A)로 인해 Z-1, 5, 6, 8 라인들을 포함하는 C 그룹과 Z-2, 3, 4, 7, 9, 10 라인들을 포함하는 A 그룹으로 나뉘었으며, 들잔디 그룹과 마찬가지로 각각의 그룹 내 모든 라인들의 염기서열은 100%로 일치하였다. 갯잔디 그룹은 100%의 높은 지지도를 가지고 들잔디 그룹에 자매군으로 유집되었다(Fig. 9). 크리핑 벤트그라스와 켄터키 블루그라스의 경우, 각각의 그룹은 모든 라인의 염기서열이 100%로 일치하는 동시에 군외군으로 함께 유집되었다(Fig. 9). 이러한 결과는 Han et al. (2006)이 ITS 구간은 진화 속도가 비교적 빠르기 때문에 종 속간 분류 연구에 적합하다고 보고한 것과 유사하다. 또한, 난지형 잔디와 한지형 잔디는 각각 다른 그룹에 속하였으며 특히 난지형 잔디인 갯잔디와 한지형 잔디인 크리핑 벤트그라스가 먼 유연관계를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구를 통해 들잔디는 686bp, 갯잔디는, 687bp, 크리핑 벤트그라스는 683bp, 켄터키 블루그라스는 681bp의 nrDNA-ITS 구간을 확보하였다. 또한 각 잔디의 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 비교 및 유연관계 분석을 통해 서로 다른 잔디 4 종의 종속간 구별이 가능함을 확인하였다. 본 연구의 결과를 바탕으로 추후 잔디 4종 이외에 잔디를 대상으로 한 nrDNA-ITS 염기서열 기반의 분자생물학적 분류에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.



**Figure 9.** Phylogenetic analysis of *Zoysia*, *Agrostis*, and *Poa* species based on nrDNA-ITS region : UPGMA method and Kimura 2-parameter model were used, and 1000 of bootstrap were replicated for the distance between inter- and intra-species. As, *Agrostis stolonifera*; Pp, *Poa pratensis*; Zj, *Zoysia japonica*; Z, *Zoysia sinica*.

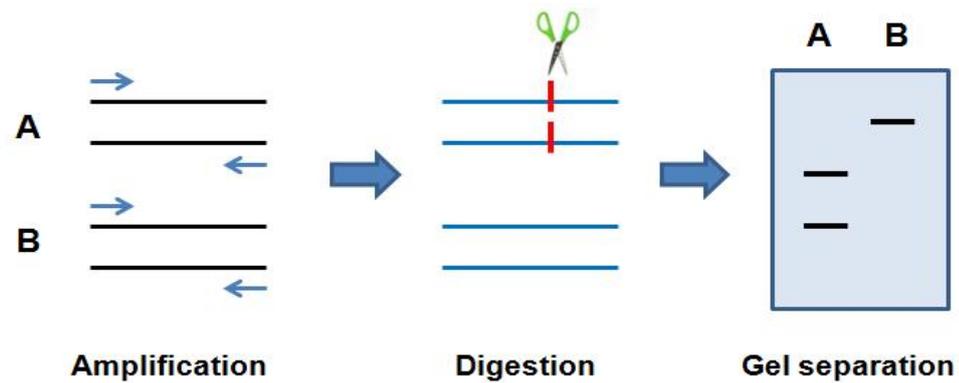
2장. nrDNA-ITS 기반 CAPS marker를  
이용한 들잔디와 갯잔디의 동정

# 1. 서론

본 연구에서는 nrDNA-ITS 구간의 바코드 분석을 통해 들잔디(*Z. japonica*) 및 갯잔디(*Z. sinica*) 뿐만 아니라 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*), 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)를 구분할 수 있음을 확인하였다. 그러나, 대량의 잔디를 신속하게 구별하기에는 염기서열 분석을 위해 많은 시간이 소요된다. 따라서, 염기서열 분석 단계 없이 신속하게 구별하기 위해서 CAPS marker의 전환이 필요하다.

CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) marker는 증폭된 변이 염기서열을 제한효소로 절단하여 형성된 단편의 크기를 비교함으로써 시료를 구분하는 분자적 마커이다. 분류하고자 하는 시료들의 특정 구간을 PCR(Polymerase Chain Reaction)로 증폭한다. 증폭된 시료들은 염기치환(Substitution) 또는 InDeL(Insert/Deletion)에 의해 DNA 염기서열 내에 특정 제한 효소의 인식 부위 포함하거나 포함하지 않게 된다. 따라서 이러한 PCR 산물에 해당 제한 효소를 처리하면 겔 전기영동을 통해 절편 길이 다형성을 확인할 수 있으며, 이를 바탕으로 서로 다른 종을 구별할 수 있게 된다(Fig. 10). 이러한 CAPS marker는 다른 marker들에 비해 비교적 간단하고 기존에 사용 중인 효소를 이용하여 비용을 감소시킬 수 있는 장점이 있다(Kim et al., 2009; Konieczny and Ausubel 1993; Kunihiya et al., 2003).

따라서 본 연구에서는 nrDNA-ITS 염기서열 차이를 바탕으로 들잔디와 갯잔디를 구별 가능한 CAPS marker를 개발하고, 우리나라의 산과 섬, 해안지역에서 자생하는 *Zoysia* 속 잔디류를 대상으로 해당 CAPS marker를 통해 들잔디와 갯잔디를 동정하고자 하였다.

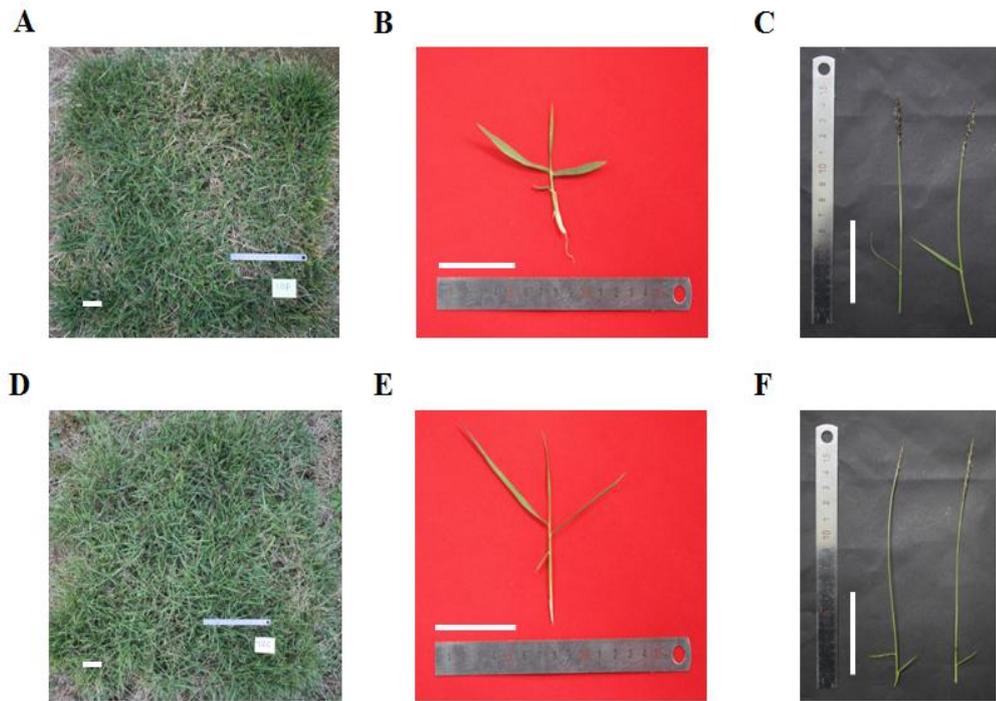


**Figure 10.** The Procedure of CAPS assay : In amplification step, specific region of DNA is amplified by PCR. In digestion step, recognition sites are created or abolished by substitutions or InDels in DNA sequence, and PCR amplicons for specific region are digested by appropriate restriction endonucleases. In gel separation step, restriction fragment length polymorphisms are shown by gel electrophoresis. A sample has the recognition site of specific enzyme. B sample does not have the recognition site of specific enzyme.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 식물 재료

잔디 종자는 종자회사로부터 총 5품종의 시판 종자를 구입하여 들잔디(*Z. japonica*, China) 1품종의 10개체, 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*, USA) 1품종의 10개체, 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*, USA) 3품종 각 10개체 총 50개체를 재료로 사용하였다(Table 1 and 2). 또한, 제주대 아열대원예산업연구소에서 보존 중인 자생 *Zoysia* 속 잔디 614점 중 잔디 종자 20개체도 식물 재료로 사용하였다. 각 종자 70개체는 세척 후 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본 배지에 배양되었으며, 배양한 잔디의 잎은 DNA 추출을 위한 재료로 사용되었다. 잔디 영양체는 제주대 아열대원예산업연구소에서 보존 중인 자생 *Zoysia* 속 잔디 614점 중 잔디 영양체 97개체를 식물 재료로 사용하였다(Fig. 11 and Table 4). 잔디 영양체의 잎은 DNA 추출을 위한 재료로 사용되었다.



**Figure 11.** Photographs of *Z. japonica* and *Z. sinica* : A~C, *Zoysia japonica* grass; D~F, *Zoysia sinica* grass. White scale bars indicate 5 cm.

**Table 4.** List of collected turf grasses for CAPS marker

No.	Sample No.	Germplasm	Collected Place	Origin	Usage
1	162	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
2	165	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
3	171	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
4	174	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
5	180	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
6	182	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
7	214	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
8	218	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
9	222	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
10	183	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
11	185	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
12	188	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
13	191	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
14	198	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
15	200	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
16	204	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
17	211	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
18	138	Plant	Jeollabuk-do	Korea	CAPS marker
19	142	Plant	Jeollabuk-do	Korea	CAPS marker
20	103	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
21	109	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
22	146	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
23	147	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker

No.	Sample No.	Germplasm	Collected Place	Origin	Usage
24	226	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
25	228	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
26	151	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
27	154	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
28	115	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
29	118	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
30	119	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
31	121	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
32	123	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
33	125	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
34	127	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
35	129	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
36	130	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
37	240	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
38	242	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
39	245	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
40	249	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
41	258	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
42	260	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
43	262	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
44	264	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
45	266	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
46	268	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
47	271	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
48	275	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
49	281	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker

No.	Sample No.	Germplasm	Collected Place	Origin	Usage
50	283	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
51	284	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
52	287	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
53	294	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
54	295	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
55	296	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
56	297	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
57	299	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
58	301	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
59	307	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
60	308	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
61	310	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
62	312	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
63	313	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
64	314	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
65	325	Plant	Gyeongsangbuk-do	Korea	CAPS marker
66	330	Plant	Gyeongsangbuk-do	Korea	CAPS marker
67	342	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
68	344	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
69	347	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
70	355	Plant	Jeollanam-do	Korea	CAPS marker
71	372	Plant	Jeollabuk-do	Korea	CAPS marker
72	375	Plant	Jeollabuk-do	Korea	CAPS marker
73	378	Plant	Jeollabuk-do	Korea	CAPS marker
74	380	Plant	Jeollabuk-do	Korea	CAPS marker
75	384	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker

No.	Sample No.	Germplasm	Collected Place	Origin	Usage
76	390	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
77	393	Plant	Jeju Island	Korea	CAPS marker
78	400	Plant	Gyeongsangsam-do	Korea	CAPS marker
79	402	Plant	Gyeongsangsam-do	Korea	CAPS marker
80	405	Plant	Gyeongsangsam-do	Korea	CAPS marker
81	406	Plant	Gyeongsangsam-do	Korea	CAPS marker
82	415	Plant	Gyeongsangsam-do	Korea	CAPS marker
83	419	Plant	Gyeongsangsam-do	Korea	CAPS marker
84	424	Plant	Gyeongsangsam-do	Korea	CAPS marker
85	429	Plant	Gyeongsangbuk-do	Korea	CAPS marker
86	431	Plant	Gyeongsangbuk-do	Korea	CAPS marker
87	432	Plant	Gyeongsangbuk-do	Korea	CAPS marker
88	433	Plant	Gyeongsangbuk-do	Korea	CAPS marker
89	436	Plant	Chungcheongnam-do	Korea	CAPS marker
90	438	Plant	Chungcheongnam-do	Korea	CAPS marker
91	439	Plant	Chungcheongnam-do	Korea	CAPS marker
92	442	Plant	Jeollabuk-do	Korea	CAPS marker
93	445	Plant	Jeollabuk-do	Korea	CAPS marker
94	446	Plant	Chungcheongbuk-do	Korea	CAPS marker
95	447	Plant	Chungcheongbuk-do	Korea	CAPS marker
96	448	Plant	Chungcheongbuk-do	Korea	CAPS marker
97	449	Plant	Chungcheongbuk-do	Korea	CAPS marker

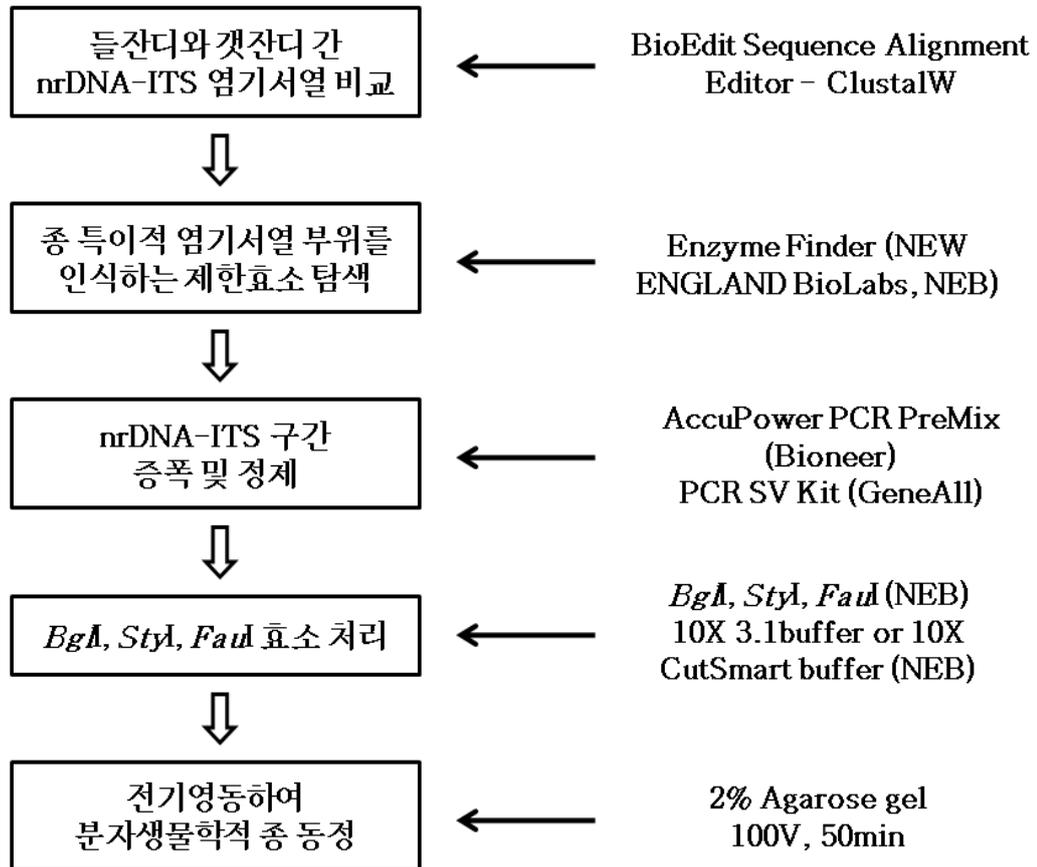
## 2) CAPS marker 전환 및 분석

들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*) 식별용 CAPS marker를 개발하고 이를 검증하기 위해, 본 연구에서 확보한 들잔디와 갯잔디의 nrDNA-ITS 염기서열을 비교 분석하여 염기서열 차이를 확인한 후 NEB(NEW ENGLAND BioLabs) 회사의 Enzyme Finder program을 이용하여 들잔디와 갯잔디의 염기서열 차이를 인식부위로 포함하는 모든 제한효소의 종류 및 위치를 탐색하였다.

구입 및 수집한 종자 총 70개체 중 무작위로 선발한 들잔디 8개체와, 갯잔디 4개체, 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*) 2개체, 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*) 6개체를 대상으로 nrDNA-ITS 구간의 PCR을 수행하였으며, 증폭된 산물은 정제 후 세 가지 제한 효소(*Bgl*I과 *Sty*I, *Fau*I)와 함께 CAPS marker 분석에 사용되었다. nrDNA-ITS 구간의 증폭을 위해 이전 DNA 바코드 분석에서와 동일한 genomic DNA, PCR primers, 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 제한 효소(NEB, England), 10X 3.1 buffer(*Bgl*I과 *Sty*I) 또는 10X CutSmart buffer(*Fau*I)가 포함된 총 14 $\mu$ l의 반응액은 각각 *Bgl*I과 *Sty*I 효소의 경우, 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 반응하였으며, *Fau*I 효소는 55 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 반응하였다. 최종 반응물은 2% 아가로오스 겔에서 전기영동을 통해 확인함으로써 본 연구에서 개발한 CAPS marker가 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*)를 구별할 수 있는지를 검증하였다 (Fig. 10 and 12).

수집한 *Zoysia* 속 잔디 영양체에 앞서 검증한 CAPS marker를 적용하여도 동일한 방식으로 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*) 종의 식별이 가능한지를 확인하기 위해, 제주대 아열대원예산업연구소에서 보존 중인 *Zoysia* 속 잔디류 614개체 중 무작위로 선발한 97개체를 대상으로 nrDNA-ITS 구간의 PCR을 수행하였다. 증폭된 산물은 정제 후 *Bgl*I, *Sty*I, *Fau*I 제한효소를 처리하였다.

nrDNA-ITS 구간을 증폭하기 위해 수집한 영양체 잎으로부터 genomic DNA를 추출하고 종자 수준에서 CAPS marker의 적합성 검토 시 사용한 PCR primer 및 protocol을 따랐다. 이후 제한효소 처리 또한 CAPS marker 검증 시에 이용한 반응물 구성과 반응 조건을 참고하였으며, 최종 반응물은 2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 밴드를 확인하였다.



**Figure 12.** The procedure of developing the CAPS marker to identify *Z. japonica* and *Z. sinica*.

### 3) 잔디 형태적 분석

본 연구에서는 CAPS marker를 기반으로 수집한 *Zoysia* 속 잔디에서 각각 들잔디(*Z. japonica*), 갯잔디(*Z. sinica*)를 식별하고자 하였다. 이에 따라 본 연구의 분자생물학적 동정 결과가 외부 형태학적 특성과 어떠한 연관성을 갖는지 검토하기 위해, 들잔디, 갯잔디, 교배종(hybrid between *Z. japonica* and *Z. sinica*)으로 식별된 종의 잎의 길이와 너비를 전자자를 이용하여 측정하였다. 잎의 털 유무는 실체현미경(SMZ18, Nikon, x0.75)를 이용하여 관찰하였다. 각 형태학적 분석은 3 반복으로 수행되었다.

### 3. 결과 및 고찰

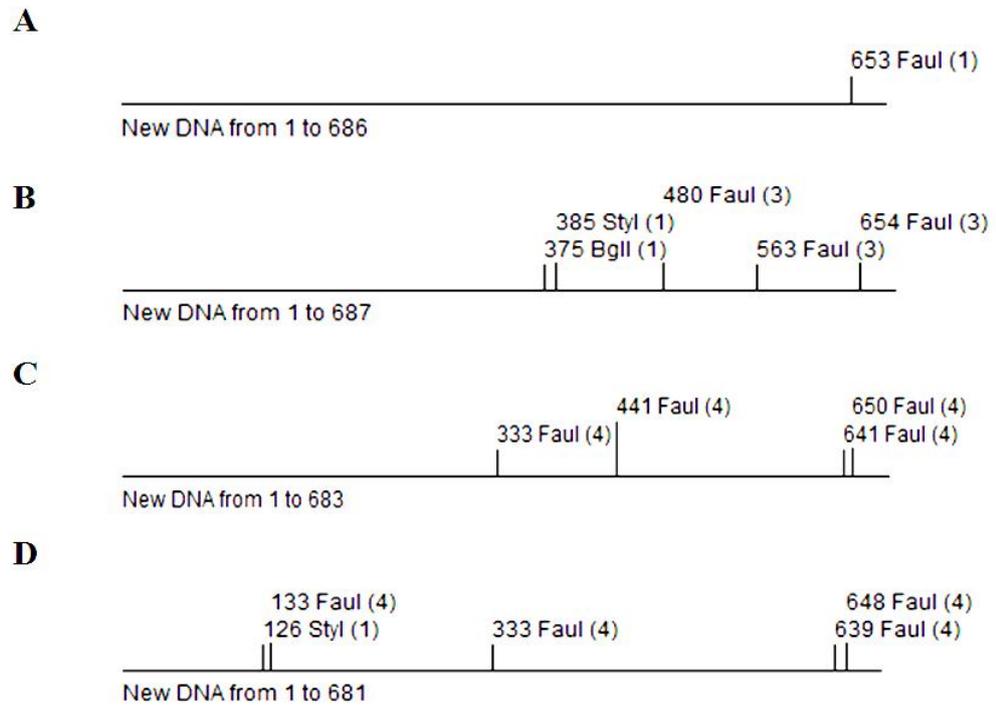
#### 1) 잔디 nrDNA-ITS 염기서열 기반 CAPS marker 분석

nrDNA-ITS 염기서열 기반의 들잔디와 갯잔디 종을 식별 가능한 CAPS marker를 개발하기 위해, nrDNA-ITS 구간 염기서열 차이를 인식부위로 포함하는 제한효소들을 Enzyme Finder program(NEB)을 이용하여 탐색하였다. 그 결과, 절편 길이 다형성(RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism) 결과를 바탕으로 잔디 4종을 구별할 수 있는 *Bgl*II(GCCNNNN $\uparrow$ NGGC)과, *Sty*I(C $\uparrow$ CWWGG), *Fau*I(CCCGC(N)<sub>4</sub> $\uparrow$ ) 등의 제한효소들과 이들의 인식 부위 염기서열들을 확인할 수 있었다(Fig. 13). 선별된 3 가지 효소(*Bgl*II, *Sty*I, *Fau*I)들이 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*)를 식별 가능한 CAPS marker로 적합한지를 검토하기 위해, ITS1과 ITS4 primer를 사용하여 들잔디와 갯잔디, 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*), 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*) 종자로부터 nrDNA-ITS 전체 구간이 증폭된 해당 산물에 *Bgl*II과 *Sty*I, *Fau*I 제한효소를 각각 처리하였다. 그 결과, 갯잔디(*Z. sinica*)의 nrDNA-ITS 구간 염기서열 내에 존재하는 *Bgl*II 효소의 인식 부위가 효소에 의해 절단되어 기존 증폭된 약 700bp의 밴드가 375bp와 312bp 두 개의 조각으로 나타났다. 반면, 한지형 잔디 및 들잔디(*Z. japonica*)는 nrDNA-ITS 염기서열 내에 *Bgl*II 제한효소의 인식 부위가 존재하지 않아 기존에 증폭된 약 700bp 한 개의 밴드만이 관찰되었다(Fig. 14A). *Sty*I 제한효소의 경우, 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)의 nrDNA-ITS 구간 염기서열 내의 인식 부위에 제한효소가 작용하여 기존 증폭된 약 700bp의 밴드가 555bp와 126bp의 두 개의 조각으로 확인되었으며(Fig. 14B), 갯잔디(*Z. sinica*)에서는 *Sty*I의 인식 부위가 *Bgl*II 제한효소의 작용 부위와 인접한 위치에 존재하므로, 앞서 *Bgl*II 결과와 유사한 길이의 385bp와 302bp의 두 개의 조각으로 확인되었다. *Fau*I 제한효소의 경우, 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*)와 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)의 nrDNA-ITS 구간 염기서열 내의 인식 부위에 제한효소가 작용하여 각각 333bp, 200bp, 108bp와

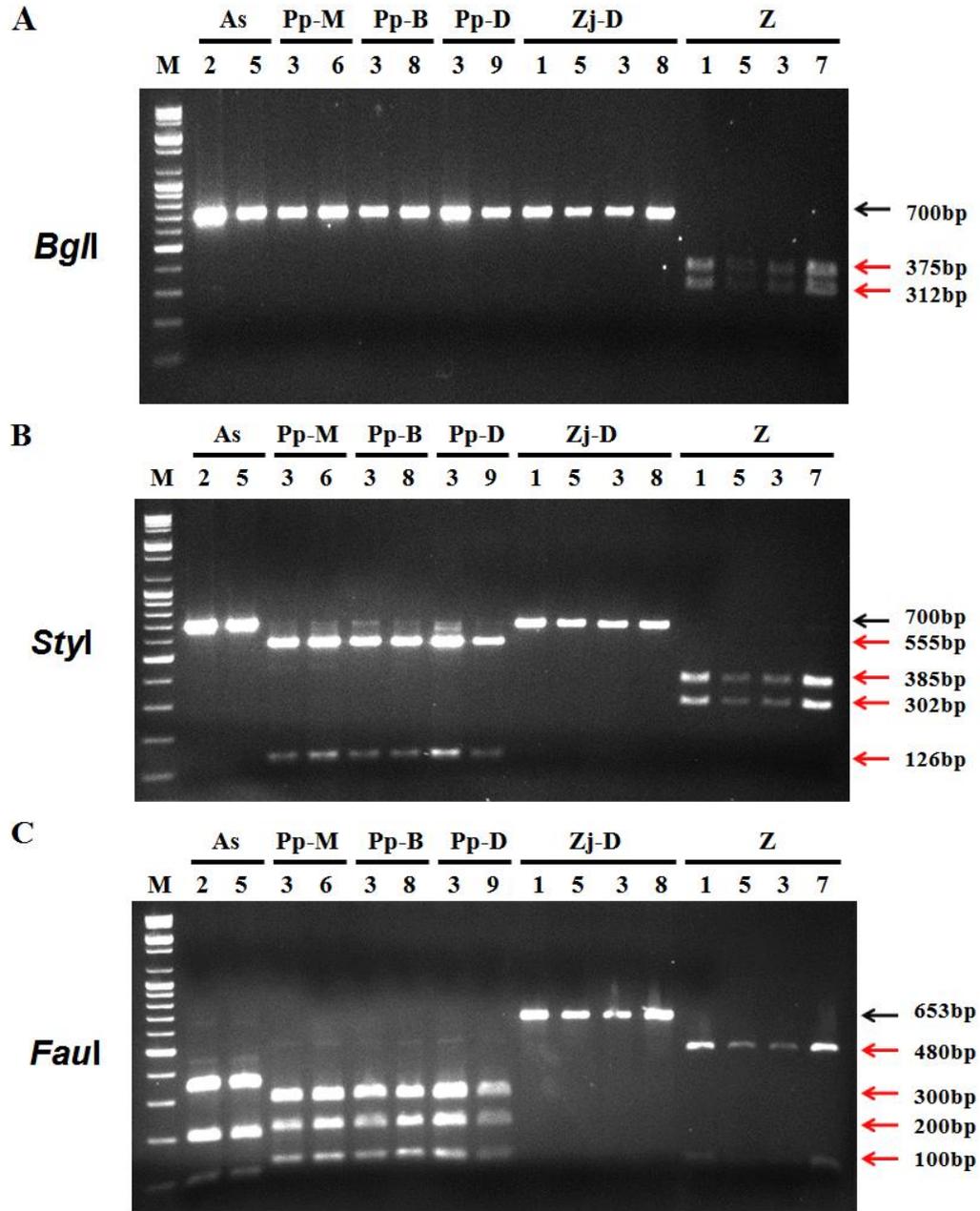
306bp, 200bp, 133bp의 3개의 밴드를, 갯잔디(*Z. sinica*)는 480bp와 91bp 두 개의 밴드 양상을 나타냈다(Fig. 14C). 들잔디의 경우, nrDNA-ITS 구간 염기서열 내의 *FauI* 제한효소 인식 부위가 653bp 부근에 있으므로 2% 아가로오스 겔 상에서는 653bp와 33bp 중에서 653bp의 한 개의 밴드만이 관찰되었다(Fig. 14C). 세 가지 종류의 효소(*BglII*과 *StyI*, *FauI*)들을 이용함으로써 들잔디(*Z. japonica*)의 nrDNA-ITS 구간 염기서열에서는 제한효소에 의해 절단되지 않는 반면, 갯잔디(*Z. sinica*)의 nrDNA-ITS 구간 염기서열에서는 절단되는 차이점을 기반으로 들잔디와 갯잔디간에 구별이 가능하였다. 또한, 효소 종류에 따라서는 들잔디와 갯잔디 뿐만 아니라 한지형 잔디인 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*)와 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)도 함께 구분되었다. *StyI*은 난지형 잔디와 한지형 잔디인 켄터키 블루그라스를, *FauI*은 난지형 잔디와 한지형 잔디인 크리핑 벤트그라스와 켄터키 블루그라스 모두를 구별하였다. 따라서, 본 연구에서는 들잔디와 갯잔디의 식별을 위한 CAPS marker로서 *BglII*과 *StyI*, *FauI* 제한효소들이 적합함을 검증할 수 있었다. *BglII*의 경우, 보리에서 CAPS marker로 활용되어  $\beta$ -glucan 농도와 연관된 *Cs/F6* 유전자를 구별한 연구가 보고된 바 있다(Cory et al., 2012). *StyI*의 경우 CAPS marker로 사용되어 인간에 존재하는  $\alpha 2$ -globin 유전자의 변이를 구별(Masala et al., 2004)하였으며, *FauI*의 경우 해바라기의 노균병균을 구별할 수 있는 CAPS marker로 이용된 연구가 보고되어 있다(Giresse et al., 2007).

바닷가 근처에 자생하는 외형적으로 들잔디와 유사한 영양체로부터 수집한 종자 (Z-11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) 총 10개체를 파종하여 nrDNA-ITS 구간을 PCR로 증폭 후 세 가지 제한효소 *BglII*과 *StyI*, *FauI*을 각각 처리하여 그에 따른 밴드 양상을 확인하였다. 12번 잔디는 *BglII* 제한효소에 의해 절단되어 375bp와 312bp 두 개의 조각으로 나타나며, *StyI* 제한효소에 의해서는 385bp와 302bp, *FauI* 제한효소의 경우, 480bp와 91bp의 두 조각으로 확인되어 12번 잔디는 갯잔디(*Z. sinica*)로 식별되었다(Fig. 15). 18번 잔디는 *BglII*과 *StyI* 제한효소에 의해 절단되지 않아 약 700bp 밴드 한 개만이 확인되었고, *FauI* 제한효소의 경우, 653bp와 33bp로 나뉘는 것으로 보아 18번 잔디는 들잔디(*Z. japonica*)임을 확인하였다(Fig. 15). 예상했던 것과 달리 17번 잔디

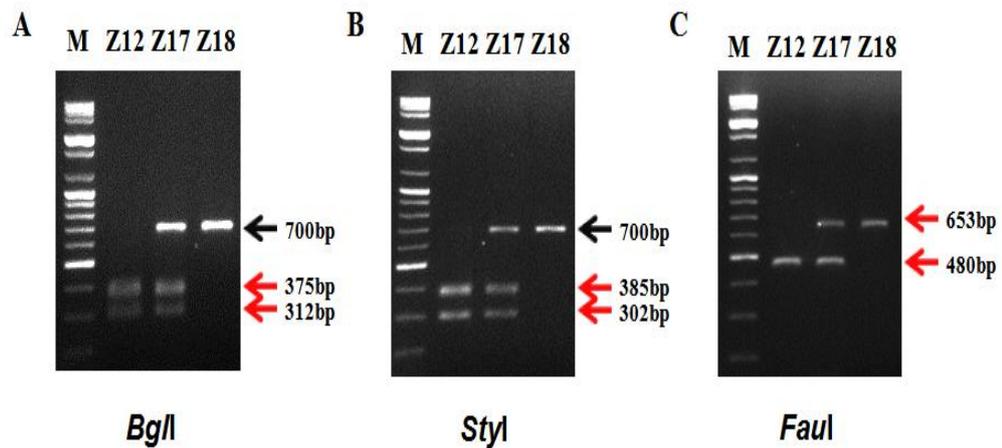
의 경우, *Bgl*II 제한효소에 의해 갯잔디의 양상을 나타내는 밴드 두 개와 들잔디 양상을 나타내는 밴드 한 개가 동시에 확인되었다. *Sty*I 제한효소의 경우에도 갯잔디와 들잔디의 패턴이 동시에 존재하는 *Bgl*II 제한효소와 유사한 패턴을 볼 수 있었으며, *Fau*I 제한효소 또한 갯잔디의 패턴을 나타내는 밴드 한 개와 들잔디의 패턴을 보이는 밴드 한 개를 함께 확인할 수 있었다(Fig. 15). 이는 *Zoysia* 속이 타가수정 작물로서 종내 및 종간 교잡이 가능하다고 보고한 Chung et al.(2013)과 Yaneshita et al.(1999)의 연구를 근거로 17번 잔디는 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*)가 자연 교배된 것(hybrid between *Z. japonica* and *Z. sinica*)으로 판단된다(Fig. 15). 따라서 본 연구에서 개발한 CAPS marker를 이용하여 외부 형태학적으로 판별하기 어려운 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*)의 감별이 가능할 뿐만 아니라 외부 형태적으로는 구별할 수 없는 들잔디와 갯잔디의 자연 교배종(hybrid between *Z. japonica* and *Z. sinica*) 또한 식별 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.



**Figure 13.** Recognition sites of three restriction endonucleases in each turf grass species. The numbers on the vertical lines indicate the position of the three restriction endonucleases. The numbers bottom of the horizontal lines indicate the sizes of each full sequence of ITS in four different grass species. (A), *Zoysia japonica*; (B), *Zoysia sinica*; (C), *Agrostis stolonifera*; (D), *Poa pratensis*.



**Figure 14.** Molecular identification of *Z. japonica*, *Z. sinica*, *A. stolonifera*, and *P. pratensis* using CAPS markers : nrDNA-ITS PCR products were digested by *BglI*, *StyI*, and *FauI*, respectively. Black and red arrows show the sizes of digested bands. M, 100bp plus DNA ladder(Bioneer); As, *Agrostis stolonifera*; Pp, *Poa pratensis*; Zj, *Zoysia japonica*; Z, *Zoysia sinica*.

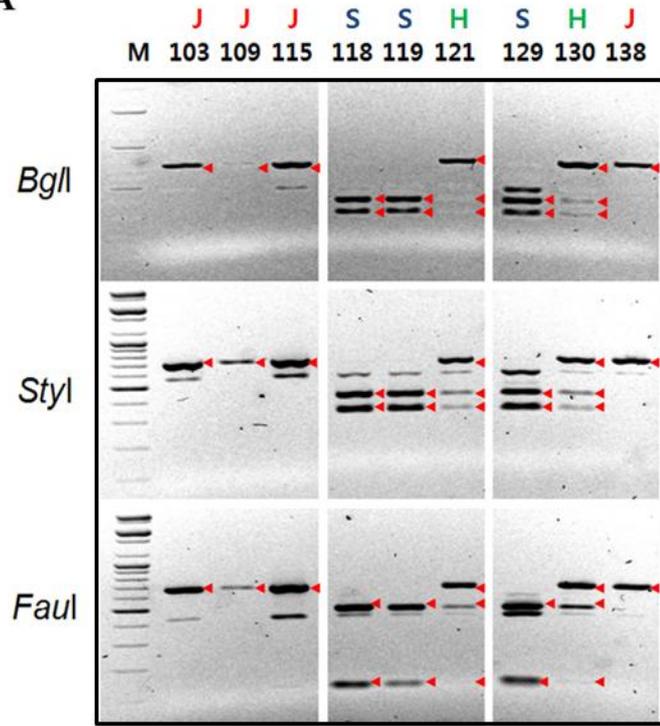


**Figure 15.** Molecular identification of *Z. japonica*, *Z. sinica*, and hybrid between *Z. japonica* and *Z. sinica* using CAPS marker. PCR products are digested by *Bgl*I, *Sty*I, and *Fau*I, respectively. Black and red arrows show the sizes of digested bands. Z12, Z17, and Z18 were identified as *Zoysia sinica*, a hybrid between *Z. japonica* and *Z. sinica*, and *Zoysia japonica* by CAPS markers based on nrDNA-ITS, respectively. M, 100bp plus DNA ladder(Bioneer); Z12, Z17, and Z18, individual samples of *Zoysia japonica*-like grass collected from sand on the Hagwi's beach in Jeju Island.

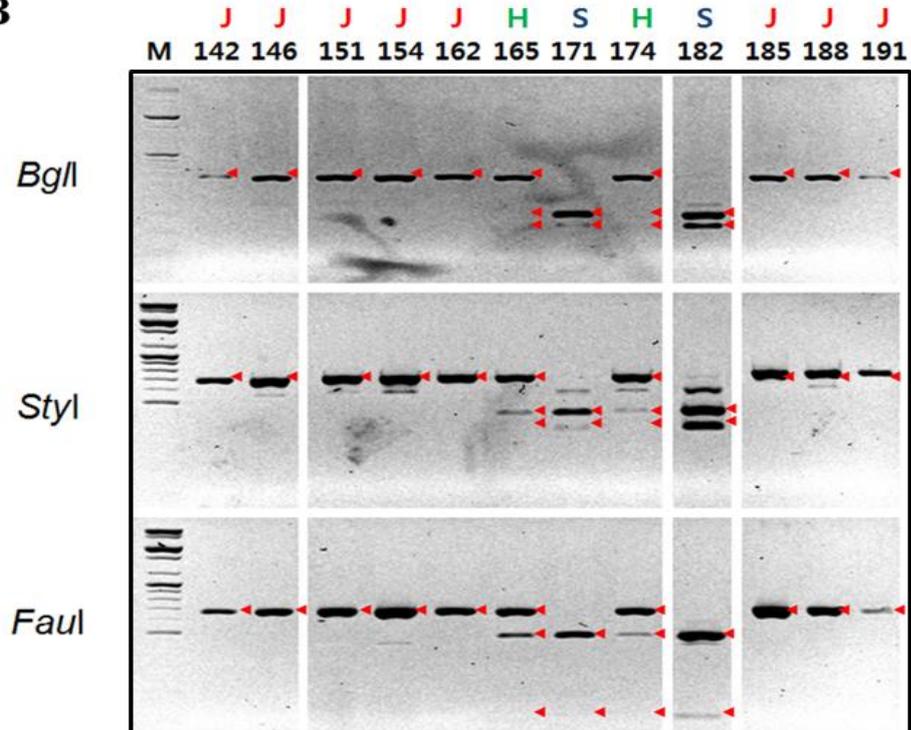
본 연구에서 개발된 CAPS marker가 들잔디(*Z. japonica*), 갯잔디(*Z. sinica*), 교배종(hybrid between *Z. japonica* and *Z. sinica*)를 구별하는 데에 적합함을 확인하였다. 우리나라 전역의 산과 섬, 해안지역 등에서 자생하는 *Zoysia* 속 잔디 영양체에서도 CAPS marker가 동일하게 적용되는 지를 검토하기 위해 무작위로 선발한 97개체(Table 2)를 대상으로 nrDNA-ITS 염기서열 구간을 증폭 후 세 가지 효소 *Bgl*II과 *Sty*I, *Fau*I을 각각 처리하였다(Fig. 16). 그 결과, *Bgl*II의 경우 들잔디는 700bp의 밴드 하나, 갯잔디는 375bp와 312bp의 밴드 두 개를 관찰하였다. *Sty*I의 경우 들잔디는 700bp의 밴드 하나, 갯잔디는 385bp와 302bp 밴드 두 개로 나타났다. *Fau*I의 경우 들잔디는 653bp 밴드 하나, 갯잔디는 480bp와 91bp 밴드 두 개를 확인하였다. 이를 통해 총 97개의 *Zoysia* 속 잔디들로부터 들잔디 43개체와 갯잔디 25개체 그리고 들잔디와 갯잔디의 자연 교배종 29개체를 식별하였다(Fig. 16). 또한, 영양체를 대상으로 CAPS marker를 분석한 결과에서는 이전 종자를 대상으로 수행한 CAPS marker 검증 실험에서는 볼 수 없었던 다른 크기의 밴드(*Bgl*II; 약 430bp, *Sty*I; 약 540bp, *Fau*I; 약 430bp)가 관찰되었다. 이는 추가 실험을 통하여 곰팡이에 속하는 *Cladosporium cladosporioides*의 nrDNA-ITS 염기서열 구간이 증폭된 것임을 알 수 있었으며, 이는 채취 시 식물체의 잎이 해당 식물병 곰팡이에 의해 오염되었던 것으로 보여진다(Fig. 16). 따라서, 본 연구에서는 잔디의 nrDNA-ITS 염기서열 내에 특이적으로 존재하는 *Bgl*II, *Sty*I, *Fau*I 제한 효소를 기반으로 CAPS marker를 개발하여 들잔디, 갯잔디, 교배종을 식별할 수 있었다.

본 연구의 결과를 통해, *Bgl*II, *Sty*I, *Fau*I 세 가지 효소를 이용하여 들잔디, 갯잔디, 교배종의 구분이 가능함을 확인하였다. 특히 *Fau*I은 들잔디와 갯잔디를 포함한 잔디 4종을 손쉽게 동정하는 데에 가장 적합함을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 본 연구에서 개발한 CAPS marker가 다른 잔디의 종 동정에서도 유용하게 쓰일 수 있는지에 대한 연구가 필요할 것이다.

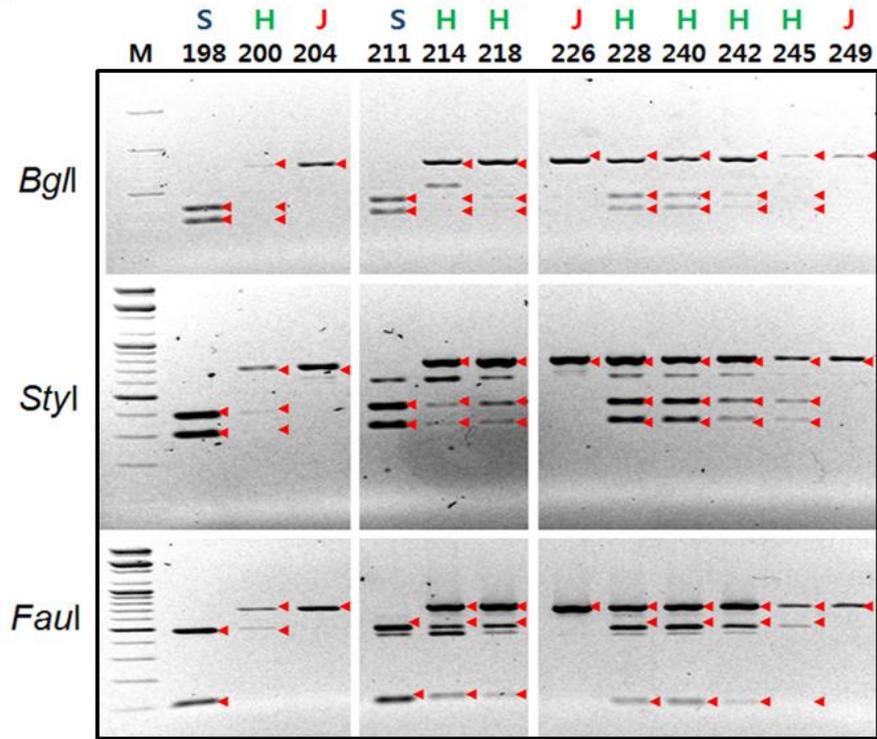
**A**



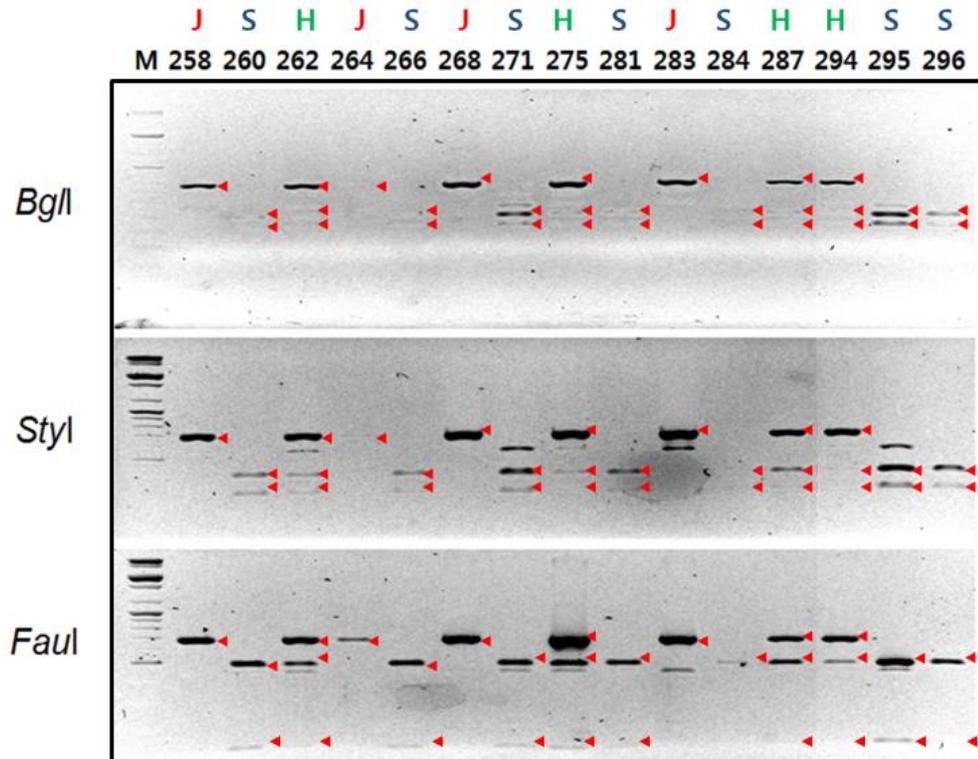
**B**



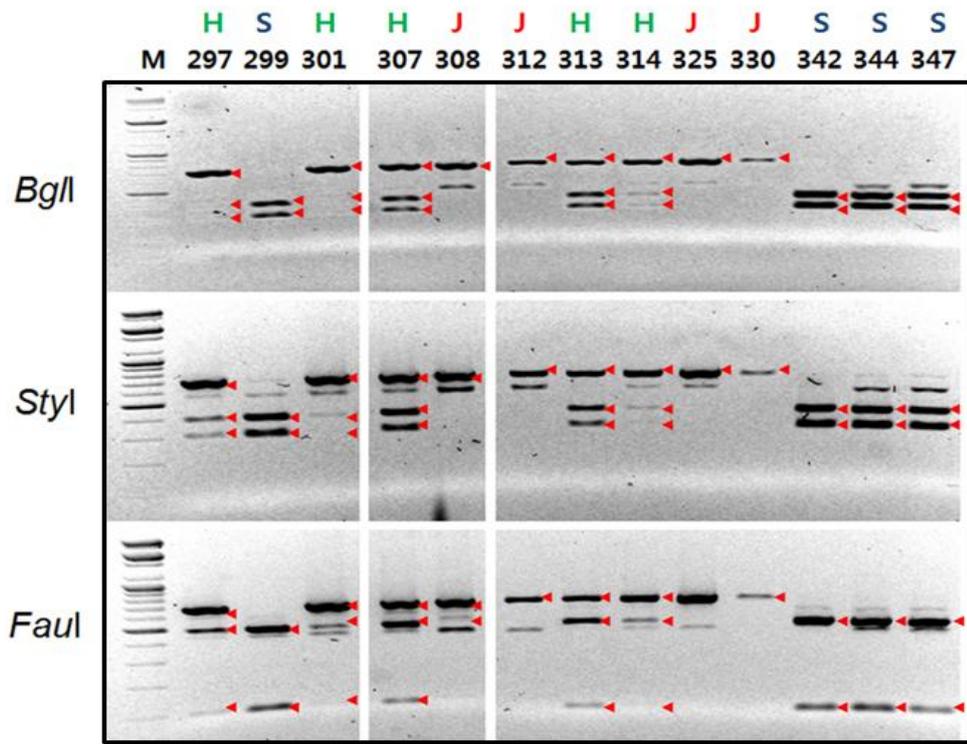
C



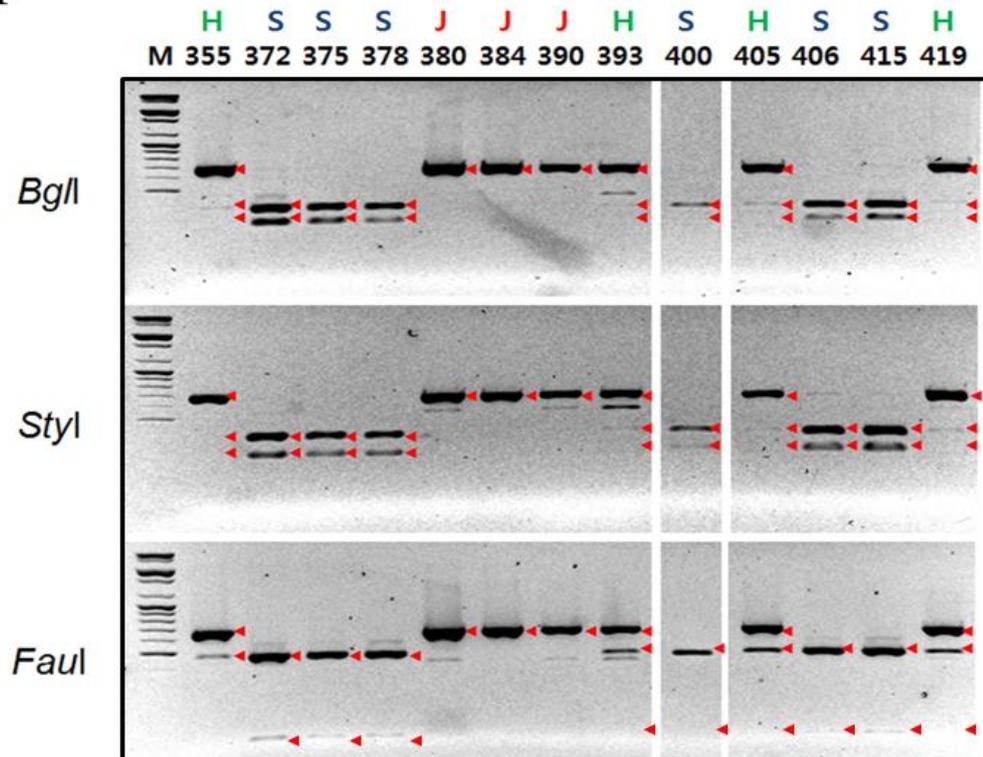
D



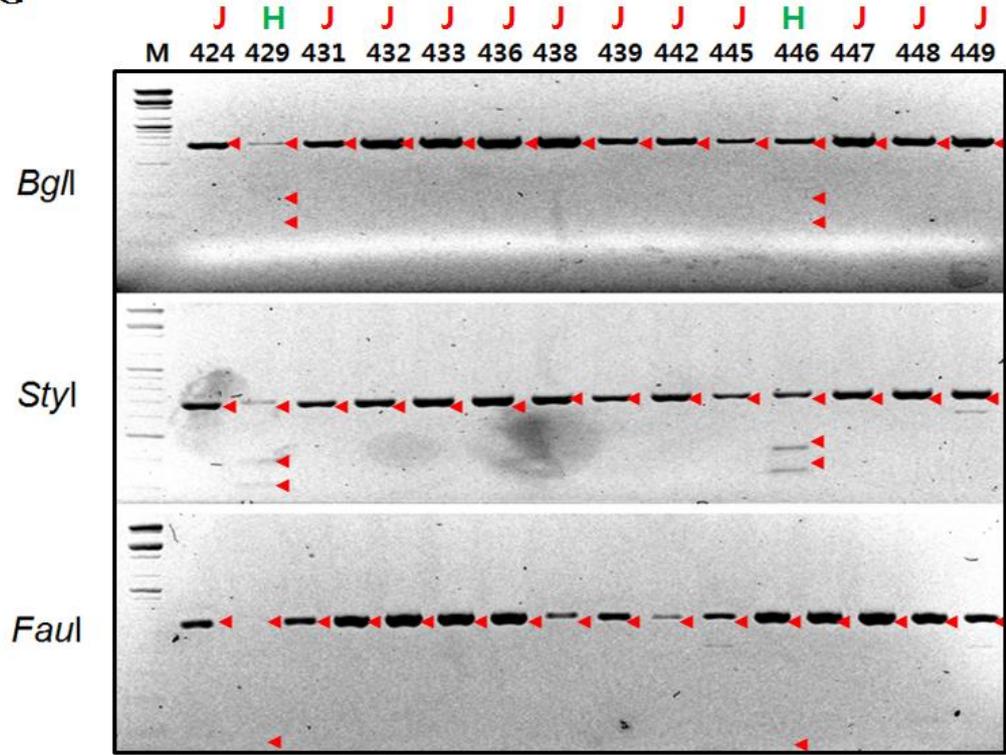
**E**



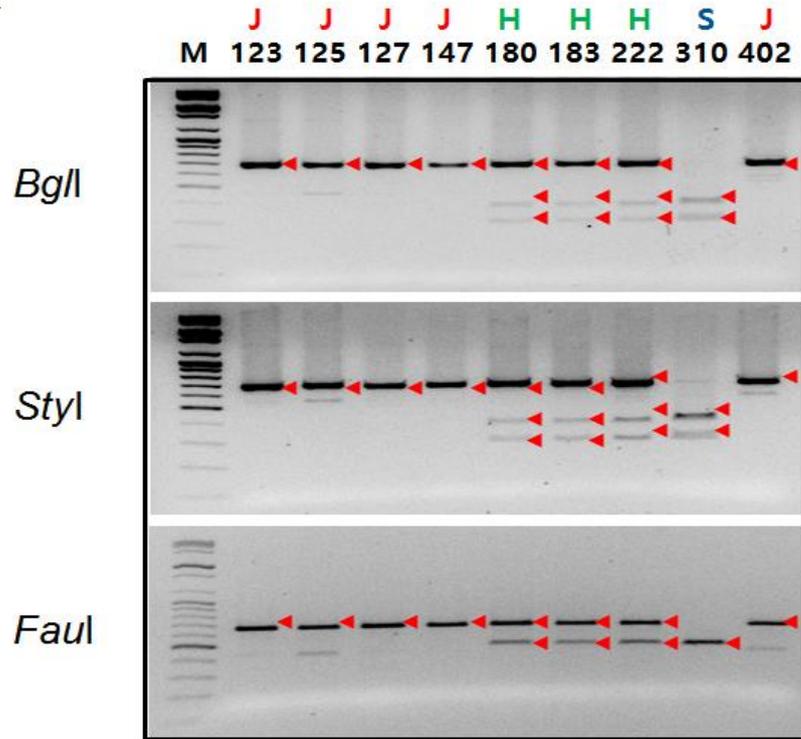
**F**



**G**



**H**



**Figure 16.** Molecular identification of *Z. japonica*, *Z. sinica*, and hybrid between *Z. sinica* and *Z. japonica* using CAPS marker from collected *Zoysia* grasses : Red arrows indicate the digested bands. M, 100bp plus DNA ladder(Bioneer); J, *Z. japonica*; S, *Z. sinica*, H, hybrid between *Z. sinica* and *Z. japonica*. The numbers of samples are shown in Table 2.

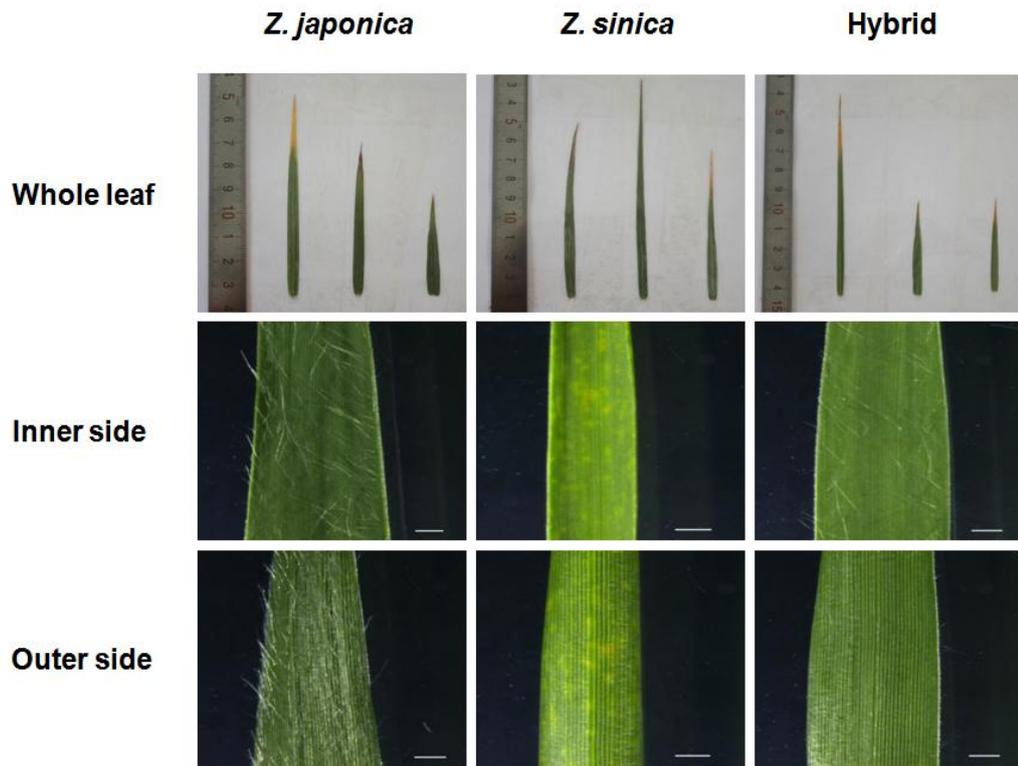
## 2) 식별된 들잔디, 갯잔디, 교배종의 형태적 분석

Yang et al.(1995)이 보고한 외부 형태적 차이를 확인하기 위해 본 연구를 통해 밝혀진 들잔디, 갯잔디, 교배종의 세 번째 잎의 길이와 너비를 측정하고 잎 표면의 털 유무를 관찰하였다(Fig. 17 and Table. 4). 잎 길이의 경우 들잔디는 평균  $7.50 \pm 1.40$  cm, 갯잔디는 평균  $7.43 \pm 0.51$  cm, 교배종은 평균  $7.12 \pm 1.68$  cm임을 확인하였다(Table 5). 잎 너비의 경우 들잔디는 평균  $4.98 \pm 0.21$  mm, 갯잔디는 평균  $3.84 \pm 0.16$  mm, 교배종은 평균  $4.39 \pm 0.22$  mm임을 확인하였다(Table 5). 이에 따라 들잔디와 갯잔디, 교배종 간에 잎 길이에는 차이가 없으나 잎 너비에서는 비교적 차이가 있음을 확인하였다. 따라서, 잎 너비의 기준으로는 들잔디와 갯잔디, 교배종을 구분할 수 있으나 이러한 기준은 재배 조건 및 생육 환경에 따라 달라질 수 있기 때문에 종을 식별하기 위한 정확한 분류 기준으로는 불충분하다. 잎 표면에 존재하는 털 유무의 경우, 들잔디는 잎의 양쪽 표면에 많은 털이 관찰된 반면, 갯잔디에서는 잎의 양쪽 표면 모두에서 털이 존재하지 않음을 확인하였다(Fig. 17). 또한, 교배종의 경우 잎 한쪽 표면에 털이 있거나, 양쪽 모두 있거나, 양쪽 모두 없는 다양한 양상을 보여 확인이 불가능하였다(Fig. 17). 따라서, 털 유무의 기준으로 들잔디와 갯잔디를 구분할 수 있으나 교배종을 구별하는 것은 불가능하다고 판단되며, 이를 바탕으로 들잔디와 갯잔디, 교배종을 정확하게 식별하기 위해서는 외부 형태학적 구별법 뿐만 아니라 분자적 수준의 종 구별법이 반드시 필요하다는 것을 확인할 수 있다.

본 연구에서는 잔디류의 분류를 위해 nrDNA-ITS 염기서열 구간을 비교 분석하고, 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*)의 식별을 위한 CAPS marker를 개발하였다. 본 연구에서 개발된 CAPS marker는 서식 환경에 적응되어 외형적으로 유사한 표현형을 보이는 들잔디와 갯잔디를 분자적 수준에서 구별할 뿐만 아니라 외형적으로는 구분할 수 없는 자연 교배종(hybrid between *Z. japonica* and *Z. sinica*)까지 동정할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 nrDNA-ITS 기반 CAPS marker는 교잡종의 개발 및 교잡 가능성의 분석, 신품종의 계통 분석에 응용될 수 있다는 점에서 의미하는 바가 크다.

**Table 5.** Morphological analysis of the length and the width in *Z. japonica*, *Z. sinica*, and hybrid. Each third leaf was used in this study.

Species	No.	Length of leaf (cm)				Width of leaf (mm)			
		1	2	3	Average	1	2	3	Average
<i>Zoysia japonica</i>	165	8.0	8.7	10.4	9.03±0.71	4.5	4.3	4.0	4.27±0.15
	188	6.3	6.4	10.5	7.73±1.38	6.0	4.8	5.5	5.43±0.35
	204	4.3	9.9	3.0	5.73±2.12	5.0	5.5	5.2	5.23±0.15
	<b>Average</b>				7.50±1.40	<b>Average</b>			4.98±0.21
<i>Zoysia sinica</i>	171	5.4	6.0	6.1	5.83±0.22	4.3	4.0	3.5	3.93±0.23
	182	7.0	9.2	10.1	8.77±0.92	3.5	4.0	3.5	3.67±0.17
	198	6.9	8.2	8.0	7.70±0.40	4.0	4.0	3.8	3.93±0.07
	<b>Average</b>				7.43±0.51	<b>Average</b>			3.84±0.16
Hybrid	174	6.1	9.0	8.3	7.80±0.87	4.3	4.2	4.7	4.40±0.15
	214	12.3	3.6	6.0	7.30±2.59	5.0	5.5	4.3	4.93±0.35
	240	4.6	9.4	4.8	6.27±1.57	3.5	4.0	4.0	3.83±0.17
	<b>Average</b>				7.12±1.68	<b>Average</b>			4.39±0.22



**Figure 17.** Morphological analysis of the hairs in *Z. japonica*, *Z. sinica*, and hybrid between *Z. japonica* and *Z. sinica* : White scale bars indicate 1 mm.

## IV. 종합고찰

잔디는 공원 및 스포츠 경기장 등 다양한 용도로 쓰이는 원예 작물로써 그에 따른 잠재적 가치가 점차 증가하는 추세이다(Sun et al., 2010). 잔디는 생육 적온에 따라 난지형 잔디와 한지형 잔디로 구분되며(Kang, 2010), 그 중 난지형 잔디에 속하는 들잔디(*Zoysia japonica*)와 갯잔디(*Zoysia sinica*)는 각각 극심한 고온과 염분의 환경에서도 비교적 잘 견디는 특성을 지닌다(Kim and Lee, 2010; Toyama et al., 2003). 이에 따라 들잔디와 갯잔디는 잔디의 우수한 신품종을 육종하는 데에 활용될 만한 자원이며 체계적인 관리가 요구된다. 그러나 바닷가 또는 갯벌과 같은 해안 지역에서 발견되는 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*)의 경우, 변화하는 환경에 적응하여 외부 형태학적으로 구별하기가 쉽지 않다. Yang 등(1995)은 잎 너비, 길이, 털의 유무를 기준으로 들잔디와 갯잔디를 구분한다고 보고하였지만, 이러한 형태적 특성은 외부 환경과 재배 방식 등에 영향을 받을 수 있는 양적 형질로서 보다 정확하고 직접적인 결과를 얻기 위해서는 DNA 수준에서의 분자표지 등 분자생물학적 기술의 활용이 필요하다(Ahn et al., 2010; Hong et al., 2012). 현재 분자적 수준에서 들잔디와 갯잔디의 유연관계를 분석하고 종을 분류 및 동정한 연구는 미흡한 실정이다.

최근, 외형적으로 유사한 식물의 종을 분자생물학적으로 분류하고 동정할 수 있는 DNA 바코드 분석법이 활발하게 연구되고 있다(China Plant BOL Group et al., 2011; Kress and Erickson, 2008). DNA 바코드 분석법은 특정 DNA 구간의 염기서열 정보를 이용하여 해당 구간 내에서의 염기서열 차이로 생물 종을 구별하는 것이며(Hebert et al., 2003), 식물에서는 주로 핵 내의 ITS(Internal Transcribed Spacer) 등을 이용하여 종을 식별한다(Kress et al., 2005). 따라서, 본 연구에서는 nrDNA-ITS 구간 염기서열을 이용하여 잔디류를 구별하고 이들의 유연관계를 분석 및 들잔디와 갯잔디를 식별할 수 있는 CAPS marker를 개발하였다.

nrDNA-ITS 구간 염기서열을 이용하여 들잔디(*Z. japonica*), 갯잔디(*Z. sinica*), 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*), 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*) 잔

디를 구별하고 유연관계를 분석하기 위해, nrDNA-ITS 구간을 PCR로 증폭하고 염기서열을 비교 분석한 결과, nrDNA-ITS 염기서열의 총 길이가 들잔디는 686bp, 갯잔디는 687bp, 크리핑 벤투그라스는 683bp, 켄터키 블루그라스는 681bp이며, 이를 통해 난지형 잔디의 nrDNA-ITS 염기서열 길이가 한지형 잔디 보다 긴 것을 알 수 있었다. 종을 구별하게 하는 종 특이적 염기는 크리핑 벤투그라스에서 32개, 켄터키 블루그라스에서 26개, 갯잔디에서 10개, 들잔디에서 5개가 존재함을 확인하였다. 이는 크리핑 벤투그라스와 켄터키 블루그라스가 다른 속(*Agrostis* 속, *Poa* 속)에 속하는 종인 반면, 들잔디와 갯잔디는 같은 속(*Zoysia* 속)에 속하는 종이므로 유전적 유연관계와 관계되는 nrDNA-ITS 구간 염기서열(Cho et al., 2010)의 차이가 상대적으로 적게 나타나는 것으로 판단된다. nrDNA-ITS 구간 내에 존재하는 ITS1과 ITS2의 길이를 세부 분석한 결과, 들잔디의 경우 ITS1은 249bp, ITS2는 274bp이며, 갯잔디의 경우 ITS1은 249bp, ITS2는 274bp임을 확인하였다. 한지형 잔디인 크리핑 벤투그라스의 경우 ITS1은 248bp, ITS2는 272bp이며, 켄터키 블루그라스의 경우 ITS1은 248bp, ITS2는 270bp임을 알 수 있었다. 또한, nrDNA-ITS 구간 염기서열을 기반으로 계통수 분석을 수행한 결과, 들잔디, 갯잔디, 크리핑 벤투그라스, 켄터키 블루그라스의 종 속간 구별이 가능함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 ITS 구간이 진화속도가 비교적 빠르기 때문에 종·속간 분류 등에 연구에 적합하다는 기존의 보고(Han et al., 2006)와 유사하다. 또한, 난지형 잔디와 한지형 잔디는 각각 다른 그룹에 속하였으며 특히 갯잔디와 크리핑 벤투그라스가 먼 유연관계를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

들잔디와 갯잔디 종을 식별할 수 있는 CAPS marker를 개발하기 위해 들잔디와 갯잔디 종의 nrDNA-ITS 염기서열을 추가로 비교 분석한 결과, 총 19군데에서 각 1bp씩 차이가 났으며, 그 중 염기치환, 삽입, 결실이 일어난 16개의 염기는 들잔디와 갯잔디 종을 명확하게 구분하는 종 특이적 염기서열이며, 나머지 2개의 염기치환이 일어난 염기는 각각 들잔디 종내 구별 marker nucleotide(C↔A)와 갯잔디 종내 구별 marker nucleotide(A↔G)임을 확인하였다. 이러한 결과는 기존에 Yao et al.(2010)이 ITS 염기서열 변이에 의한 종간의 차이가 종내 보다 크다고 보고한 결과와 유사하다. 들잔디와 갯잔디 종간의

nrDNA-ITS 염기서열 차이를 CAPS marker로 전환한 결과, *Bgl*II, *Sty*I, *Fau*I 세 가지 제한 효소를 선발하였으며 이들은 CAPS marker의 적합성 검증을 위해 사용되었다. 그 결과, *Bgl*II과 *Sty*I에서 들잔디의 경우 증폭된 약 700bp의 밴드 하나만이 관찰된 반면, 갯잔디의 경우 제한효소에 의해 절단된 약 380bp, 310bp의 두 개의 밴드가 확인되었다. *Fau*I 효소의 경우, 들잔디와 갯잔디 모두 해당 효소에 의해 절단되었지만, 들잔디는 약 650bp의 밴드 한 개, 갯잔디는 약 480bp와 100bp의 두 개의 밴드가 관찰되었다.

이를 통해 nrDNA-ITS 구간 염기서열의 차이를 기반으로 전환된 CAPS marker가 들잔디와 갯잔디 종을 식별할 수 있음을 확인하였으며, 효소 종류에 따라서는 들잔디와 갯잔디 뿐만 아니라 한지형 잔디인 크리핑 벤트그라스(*A. stolonifera*)와 켄터키 블루그라스(*P. pratensis*)도 함께 구분되었다. 특히 *Fau*I 제한 효소의 경우 들잔디와 갯잔디를 포함한 난지형 잔디와 한지형 잔디인 크리핑 벤트그라스, 켄터키 블루그라스까지 모두 구분이 가능함을 알 수 있었다. 또한, 세 가지 효소의 결과 모두에서 들잔디와 갯잔디의 밴드 양상을 동시에 보이는 교배종이 관찰되어 본 연구에서 개발된 CAPS marker는 외부 형태학적으로는 구별될 수 없는 자연 교배종까지 식별 가능함을 확인하였다. 앞서 검증된 CAPS marker가 수집한 잔디 영양체에서도 동일하게 적용이 가능한지를 검토하기 위해, 수집한 *Zoysia* 속 잔디 영양체 총 97 개체의 nrDNA-ITS 염기서열 구간을 증폭하여 해당 산물에 *Bgl*II, *Sty*I, *Fau*I 효소를 각각 처리한 결과, 잔디 영양체 총 97 개체에서 들잔디 43개체와 갯잔디 25개체, 자연 교배종 29개체를 식별할 수 있었다.

본 연구는 nrDNA-ITS 기반의 DNA 바코드 분석을 통해 들잔디, 갯잔디, 크리핑 벤트그라스, 켄터키 블루그라스를 동정하였으며, nrDNA-ITS 염기서열 기반의 CAPS marker 분석을 수행하여 들잔디, 갯잔디, 교배종을 동정하였다. 이러한 결과는 수집 및 보존 중인 자생 *Zoysia* 속 잔디를 체계적으로 관리하는데 활용될 뿐만 아니라 잔디의 신품종 개발 및 교배종 검증 등에 응용될 것으로 기대한다.

## VI. 참고문헌

1. Ahn SY, Cho KS, Yoo Ko, and Suh JT (2010) Phylogenetic relationshi of *Ligularia* species based on RAPD and ITS sequence analysis. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28:638-647.
2. Baigalmaa J, Kim MK, Noh JH, Hua S, and Yang DC (2009) Phylogenetic analysis of *Schizonepeta* Spike on the basis of DNA sequences. K. J. Med. Crop Sci. 17:46-53.
3. Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Missouri Botanical Garden. 82:247-277.
4. CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:12794-12797.
5. 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.
6. Cho HJ, Lee JS, Yoon KN, Alam N, Lee KL, Shim MJ, Lee MW, Cheong JC, Shin PG, Yoo YB, Lee UY, Lee TS (2010) Comparative Molecular Phylogenetic Relationships in Different Strains of *Pleurotus* spp. Kor. J. Mycol. 38:112-119.

7. 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 Journal of Agricultural Science*. 40:115-121.
8. Cory AT, Baga M, Anyia A, Rossnagel BG, Chibbar RN (2012) Genetic markers for *Cs/F6* gene associated with (1,3;1,4)- $\beta$ -glucan concentration in barley grain. *J. Cereal Sci.* 56:332-339.
9. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
10. 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. Ethnopharmacology*. 130:116-121.
11. 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.
12. Giresse X, De Labrouhe DT, Cervera SR, Delmotte F (2007) Twelve polymorphic expressed sequence tags-derived markers for *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew. *Mol. Ecol. Notes*. 7:1363-1365.
13. 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.

14. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Biol. Sci. Ser. B. 270:313-321.
15. Hong SY, Cho KS, Yoo KO (2012) Phylogenetic analysis of Korean native *Aster* plants based on internal transcribed spacer(ITS) sequence. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30:178-184.
16. Hyun YH, Choi BJ, Kim YJ, Joo YK (2012) Analysis of Research Trend on Zoysiagrass (*Zoysia* spp.). Asian J. Turfgrass Sci. 26:89-95.
17. Kang EJ (2010) Development of long-living creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L. cv.penncross) by using ORESARA7(ORE7) gene. graduate paper of JNU graduate school. 3-5.
18. Kim ES, Bolsheva NL, Samatadze TE, Nosov NN, Nosova IV, Zelenin AV, Punina EO, Muravenko OV, Rodionov AV (2009) The unique genome of two-chromosome grasses *Zingeria* and *Colpodium*, its origin, and evolution. Genetika. 45:1329-1337.
19. Kim SY (2013) Development of new turfgrass varieties by tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation. graduate paper of JNU graduate school. 4-7.
20. Kim WJ, Ji Y, Lee YM, Kang YM, Choi G, Moon BC (2015) Development of Molecular Markers for the authentication of *Zanthoxylis Pericarpium* by the analysis of rDNA-ITS DNA barcode regions. Kor. J. Herbology. 30:41-47.

21. 김형기, 이상제 (2010) 잔디학과 골프장. 초판. 선진문화사. 99-180.
22. Koch H (2010) Combining morphology and DNA barcoding resolves the taxonomy of Western Malagasy *Liotrigona* Moure, 1961. African Invertebrates. 51:413-421.
23. Konieczny A and Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J. 4:403-410.
24. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen (2005) Use of DNA barcodes to indentify flowering plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102:8369-8374.
25. Kress WJ and Erickson DL (2008) DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. Proc. Natl. Acad. Sci. 105:2761-2762.
26. Kuniyoshi M, Fukino N, Matsumoto S (2003) Development of cleavage amplified polymorphic sequence(CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. Euphytica. 134:209-215.
27. 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.
28. Masala B, Musino L, Pirastru M, Manca L (2004) The C → G transition in the α2-globin gene of a normal aa-chromosome is responsible for the Hb

G-Philadelphia variant in Sardinians. Eur. J. Haematol. 72:437-440.

29. Moon BC, Ji Y, Seo HS, Lee AY, Chun JM, Kim HK (2010) Molecular Authentication of Schisandrae Fructus and Analysis of Phylogenetic Relationship based on nrDNA-ITS sequences. Kor. J. Herbology. 25:47-54.

30. 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.

31. Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15:473-497.

32. 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.

33. Shin SK, Yun JS, Yun T, Sim WK (2003) Taxonomic relationship of Lotus (*Nelumbo nucifera*) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44:451-457.

34. Sun HJ, Song IJ, Bae TW, Lee HY (2010) Recent development in biotechnological improvement of *Zoysia japonica* Steud. J. Plant Biotechnol. 37:400-407.

35. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol.

30:2725-2729.

36. 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.

37. Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. Mol. Cell. 16:19-27.

38. Yaneshita M, Kaneko S, Sasakuma T (1999) Allotetraploidy of *Zoysia* species with  $2n = 40$  based on a RFLP genetic map. Theor. Appl. Genet. 98:751-756.

39. Yang GM, Ahn BJ, Choi JS (1995) Identification of native zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) using morphological characteristics and esterase isozymes. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 36(2):240-247.

40. 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.

41. Yu TY, Yeam DY, Kim YJ, Kim SJ (1974) Morphological studies on Korean lawn grasses (*Zoysia* spp.). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 15:79-91.