

FT-IR스펙트럼 데이터의 다변량통계분석 기반 들잔디와 갯잔디의 대사체 수준 신속 식별 체계

양대화 · 안명숙 · 정옥철 · 송인자 · 고석민 · 전예인 · 강홍규 · 선현진 · 권용익 · 김석원 · 이효연

Rapid metabolic discrimination between *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica* based on multivariate analysis of FT-IR spectroscopy

Dae-Hwa Yang · Myung Suk Ahn · Ok-Cheol Jeong · In-Ja Song · Suk-Min Ko · Ye-In Jeon · Hong-Gyu Kang · Hyeon-Jin Sun · Yong-Ik Kwon · Suk Weon Kim · Hyo-Yeon Lee

Received: 6 April 2016 / Revised: 16 June 2016 / Accepted: 16 June 2016
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study aims to establish a system for the rapid discrimination of *Zoysia* species using metabolite fingerprinting of FT-IR spectroscopy combined with multivariate analysis. Whole cell extracts from leaves of 19 identified *Zoysia japonica*, 6 identified *Zoysia sinica*, and 38 different unidentified *Zoysia* species were subjected to Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). PCA (principle component analysis) and PLS-DA (partial least square discriminant analysis) from FT-IR spectral data successfully divided the 25 identified turf grasses into two groups, representing good agreement with species identification

using molecular markers. PC (principal component) loading values show that the 1,100 ~ 950 cm^{-1} region of the FT-IR spectra are important for the discrimination of *Zoysia* species. A dendrogram based on hierarchical clustering analysis (HCA) from the PCA and PLS-DA data of turf grasses showed that turf grass samples were divided into *Zoysia japonica* and *Zoysia sinica* in a species-dependent manner. PCA and PLS-DA from FT-IR spectral data of *Zoysia* species identified and unidentified by molecular markers successfully divided the 49 turf grasses into *Z. japonica* and *Z. sinica*. In particular, PLS-DA and the HCA dendrogram could mostly discriminate the 47 *Z. japonica* grasses into two groups depending on their origins (mountainous areas and island area). Considering these results, we suggest that FT-IR fingerprinting combined with multivariate analysis could be applied to discriminate between *Zoysia* species as well as their geographical origins of various *Zoysia* species.

[†]These authors contributed equally to this work.

H.-Y. Lee (✉)
제주대학교
(Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea)
e-mail: hyoyeon@jejunu.ac.kr

D.-H. Yang[†] · O.-C. Jeong · S.-M. Ko · H.-G. Kang · H.-J. Sun · Y.-I. Kwon · H.-Y. Lee (✉)
제주대학교 아열대원예산업연구소
(Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea)

M. S. Ahn[†] · Y.-I. Jeon · S. W. Kim (✉)
한국생명공학연구원 생물자원센터
(Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeollabuk-do 56212, Korea)
e-mail: kimsw@kribb.re.kr

I.-J. Song
한국생명공학연구원 국가연구안전관리사업본부
(National Research Safety Headquarters, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Chungcheongbuk-do 28116, Korea)

Keywords Turf grasses, *Zoysia japonica*, *Zoysia sinica*, Fourier transform - infrared spectroscopy (FT-IR), Principal component analysis (PCA), Partial least square discriminant analysis (PLS-DA)

서론

한국잔디류(*Zoysiagrass*)는 화본과(*Gramineae* family)의 *Zoysia* 속(*Zoysia* genus)에 속하는 다년초이며, 주로 한국, 일본, 중국,

필리핀, 네팔, 뉴질랜드 등 아시아지역의 온대기후지역부터 열대기후지역에 자생하는 대표적인 식물종이다(Hyun et al. 2012; Yu et al. 1974). *Zoysia* 속 식물 중에서 우리나라에서 자생하고 있는 잔디는 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*), 금잔디(고려잔디 : *Z. matrella*) 등이 있다(Hyun et al. 2012). 들잔디는 건조, 고온 등에 대해 내성이 뛰어나며, 갯잔디는 해안지대에 주로 생육하여 건조와 염분에 강한 특성이 있다(Hyun et al. 2012; Li et al. 2006; Sun et al. 2010).

국내에 자생하는 들잔디와 갯잔디의 구분은 대체로 외부 형태학적 특성에 따라 동정이 이루어지며, 대표적인 분류학적 특성은 엽폭 및 종자 길이, 털의 유무 등이 분류학적 형질로 활용되고 있다(Yang et al. 1995). 그러나 잔디의 구분에 사용되고 있는 외부형태학적 특성 중에서 엽폭과 종자 길이에 따른 잔디 식별은 연구자에 따라 상이한 분류학적 결과를 보인다. 특히 들잔디의 경우는 엽폭이 2~5.1 mm로 금잔디와 갯잔디의 범위를 포함하기 때문에 엽폭차이를 잔디 식별 기준으로 사용하기에는 한계가 있다(Yang et al. 1995). 또한, 이러한 잔디의 외부 형태학적 특성은 생육 환경 및 재배 조건에 따라 엽장과 엽폭과 같은 생육특성이 변하기 때문에 보다 신속하고 정확한 품종 식별기법의 개발이 요구된다. 주요 작물의 경우는 분자마커가 품종 식별을 위한 중요한 수단으로 활용되고 있으며 잔디의 경우도 esterase 동위효소를 이용한 식별방법(Yang et al. 1995), 일부 들잔디의 변이체인 중지 및 세엽 잔디의 RAPD-SCAR 마커를 이용한 식별방법(Chung et al. 2013; Kang et al. 1999) 등이 보고된 바 있으나 현재까지 한국잔디류의 분류학적 분자마커에 관한 보고는 미미한 실정이다(Chung et al. 2013; Kang et al. 1999).

최근 FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy)의 대사체 분석기술을 이용하여 대사체 수준에서 생물 종 식별이

보고되었다(Krishnan et al. 2005). 적외선분광분석(FT-IR)은 대사체 수준에서 시료간의 양적 및 질적 패턴 차이를 조사하는 연구 분야로, 시료의 전세포추출물에 대한 적외선분광 스펙트럼데이터를 다변량 통계분석기법을 통해 생물종간의 유연관계를 식별할 수 있다(Ahn et al. 2015; Kim et al. 2004; Kim et al. 2007; Kim et al. 2009; Kwon et al. 2011; Kwon et al. 2014). 이와 같은 FT-IR의 대사체 수준에서 시료의 유연관계 식별방법은 비교적 신속한 분석이 가능하기 때문에 다수의 식물체 집단 식별 및 분자마커 개발이 이루어지지 않은 생물종의 식별 대체수단으로 활용이 가능하다.

따라서 본 연구에서는 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석 기법을 이용하여 대표적인 *Zoysia* 속 잔디인 들잔디와 갯잔디의 대사체 수준에서 유연관계 규명 및 신속한 식별체계 확립이 가능한지 여부를 조사하였다. 또한, FT-IR 기반 신속 식별체계를 이용하여 분자마커로 미동정된 잔디 시료에 적용함으로써 잔디의 신속한 식별수단으로 활용 가능성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에서 사용된 잔디는 제주대학교 아열대원예산업연구소에서 2011년부터 2015년까지 제주도 및 전라도 지역의 잔디를 수집하여 제주대학교 포장내에서 보존중인 *Zoysia* 속 잔디영양제 63개체의 잎 시료를 사용하였다. 외부형태적 차이에 의한 식별 오차를 최소화 하기 위하여 비교적 동일한 온실내 화분(Fig. 1)에서 재배중인 잔디 영양제의 잎을 동일한

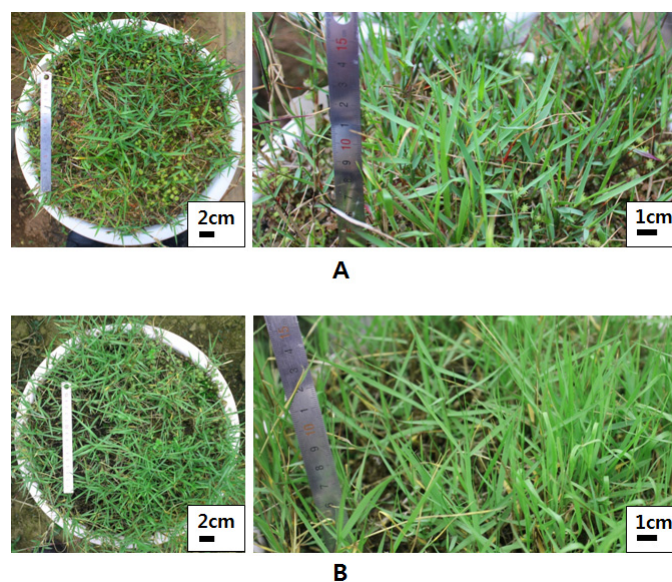


Fig. 1 Photographs of *Zoysia japonica* grass (A) and *Zoysia sinica* grass (B). Scale bars indicate 1 and 2 cm, respectively

Table 1 List of standard turf grasses identified by molecular markers for FT-IR analysis. H: High-altitude environment (mountainous areas), L: Low-altitude environment (islands)

Sample_name	address	species	altitude
103	Jeju, Hallasan	<i>Z. japonica</i>	H
104	Jeju, Hallasan	<i>Z. japonica</i>	H
109	Jeju, Hallasan	<i>Z. japonica</i>	H
120	Jeju, Pyoseon	<i>Z. japonica</i>	L
122	Jeju, Pyoseon	<i>Z. japonica</i>	L
130	Jeju, Pyoseon	<i>Z. japonica</i>	L
131	Jeollabuk-do, Jirisan	<i>Z. japonica</i>	H
138	Jeollabuk-do, Jirisan	<i>Z. japonica</i>	H
142	Jeollabuk-do, Jirisan	<i>Z. japonica</i>	H
149	Jeollanam-do, Wolchulsan	<i>Z. japonica</i>	H
151	Jeollanam-do, Wolchulsan	<i>Z. japonica</i>	H
154	Jeollanam-do, Wolchulsan	<i>Z. japonica</i>	H
162	Jeollanam-do, Heuksando Island	<i>Z. japonica</i>	L
169	Jeollanam-do, Heuksando Island	<i>Z. japonica</i>	L
179	Jeollanam-do, Bogildo Island	<i>Z. japonica</i>	L
185	Jeollanam-do, Geumodo Island	<i>Z. japonica</i>	L
187	Jeollanam-do, Geumodo Island	<i>Z. japonica</i>	L
188	Jeollanam-do, Geumodo Island	<i>Z. japonica</i>	L
204	Jeollanam-do, Geogeumdo Island	<i>Z. japonica</i>	H
118	Jeju, Pyoseon	<i>Z. sinica</i>	L
171	Jeollanam-do, Bogildo Island	<i>Z. sinica</i>	L
172	Jeollanam-do, Bogildo Island	<i>Z. sinica</i>	L
182	Jeollanam-do, Bogildo Island	<i>Z. sinica</i>	L
198	Jeollanam-do, Geogeumdo Island	<i>Z. sinica</i>	L
211	Jeollanam-do, Geogeumdo Island	<i>Z. sinica</i>	L

시기에 채집하여 사용하였다. 들잔디와 갯잔디의 대사체 수준에서 식별하기 위해서 기준라인으로 외부형태학적 및 분자마커를 이용하여 종 식별이 이루어진 *Zoysia* 속 들잔디 19개체와 갯잔디 6개체를 FT-IR 분석에 사용하였다(Table 1). 또한, 제주도 및 전라도지역에서 수집된 잔디 중에서 서식지가 상이하며 분자마커를 이용한 종 동정이 이루어지지 않은 들잔디 38개체를 추가로 FT-IR 분석을 수행하였다(Table 2). FT-IR 분석을 위해 채집된 각 잔디시료는 액체질소에 얼린 다음 막자사발을 이용하여 분말형태로 분쇄하였으며, -70°C 동결보존기에서 건조하여 사용하였다.

잔디 전세포추출물 제조

FT-IR 분석을 위한 전세포추출물을 제작하기 위하여 들잔디, 갯잔디의 각 영양체 건조 분말 약 20 mg을 Eppendorf tube (2 ml)에 넣고 20% methanol (v/v) 용액을 200 μ L 씩 첨가하여 혼합한 다음 50°C에서 수조에서 20 분간 반응하였다. 반응

된 시료는 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 상층액을 새로운 1.5 ml tube에 옮겨주었다. 세포찌꺼기가 혼입되지 않도록 상기의 추출과정은 1회 반복 실시하였다. 회수된 상층액은 -20°C에서 보관하면서 FT-IR 스펙트럼 분석에 사용하였다.

FT-IR 스펙트럼과 데이터 전처리 및 다변량 통계분석

FT-IR (Fourier transform infrared) 스펙트럼 조사는 Tensor 27 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany)를 사용하였고, DTGS (deuterated triglycine sulfate) 검출기로 분석하였다. 추출된 각 잔디 시료 5 μ L를 384-well silicon plate에 분주하여, 37°C에서 약 20분간 건조하였다. 건조된 silicon plate는 Tensor 27에 장착된 HTS-XT (Bruker Optics GmbH) 고효율 자동화 장치를 이용하여 스펙트럼을 조사하였다. 각 잔디 시료의 스펙트럼은 총 4,000 ~ 400 cm^{-1} 범위에서 그리고 4 cm^{-1} 간격으로 총 128회 반복 측정된 평균 스펙트럼을 분석에 사용되었다. 각

Table 2 List of turf grasses subjected to FT-IR analysis. H: High-altitude environment (mountainous areas); L: Low-altitude environment (islands)

	Sample_name	origins	species	altitude
identified samples	<i>Z. japonica</i> 1	Jeju, Pyoseon	<i>Zoysia japonica</i>	L
	<i>Z. japonica</i> 2	Jeju, Pyoseon	<i>Zoysia japonica</i>	L
	<i>Z. japonica</i> 3	Jeju, Pyoseon	<i>Zoysia japonica</i>	L
	<i>Z. japonica</i> 4	Jeollabuk-do, Jirisan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	<i>Z. japonica</i> 5	Jeollanam-do, Wolchulsan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	<i>Z. japonica</i> 6	Jeollanam-do, Heuksando Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	<i>Z. japonica</i> 7	Jeollanam-do, Heuksando Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	<i>Z. japonica</i> 8	Jeollanam-do, Bogildo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	<i>Z. japonica</i> 9	Jeollanam-do, Geumodo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	<i>Z. sinica</i> 1	Jeju, Pyoseon	<i>Zoysia sinica</i>	L
	<i>Z. sinica</i> 2	Jeollanam-do, Bogildo Island	<i>Zoysia sinica</i>	L
unidentified samples	98	Jeju, Hallasan Gwaneumsa	<i>Zoysia japonica</i>	H
	99	Jeju, Hallasan Gwaneumsa	<i>Zoysia japonica</i>	H
	100	Jeju, Hallasan Gwaneumsa	<i>Zoysia japonica</i>	H
	107	Jeju, Hallasan Seongpanak	<i>Zoysia japonica</i>	H
	108	Jeju, Hallasan Seongpanak	<i>Zoysia japonica</i>	H
	111	Jeju, Hallasan Seongpanak	<i>Zoysia japonica</i>	H
	112	Jeju, Hallasan Seongpanak	<i>Zoysia japonica</i>	H
	114	Jeju, Hallasan Seongpanak	<i>Zoysia japonica</i>	H
	134	Jeollabuk-do, Jirisan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	135	Jeollabuk-do, Jirisan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	137	Jeollabuk-do, Jirisan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	143	Jeollabuk-do, Jirisan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	148	Jeollanam-do, Wolchulsan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	150	Jeollanam-do, Wolchulsan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	156	Jeollabuk-do, Deogyusan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	157	Jeollabuk-do, Deogyusan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	159	Jeollabuk-do, Deogyusan	<i>Zoysia japonica</i>	H
	163	Jeollanam-do, Heuksando Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	167	Jeollanam-do, Heuksando Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	168	Jeollanam-do, Heuksando Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	176	Jeollanam-do, Bogildo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	178	Jeollanam-do, Bogildo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	184	Jeollanam-do, Geumodo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	186	Jeollanam-do, Geumodo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	192	Jeollanam-do, Geumodo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	195	Jeollanam-do, Geumodo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	200	Jeollanam-do, Geogeumdo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	205	Jeollanam-do, Geogeumdo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	209	Jeollanam-do, Geogeumdo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
	210	Jeollanam-do, Geogeumdo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L
213	Jeollanam-do, Gogeumdo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L	
214	Jeollanam-do, Gogeumdo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L	
220	Jeollanam-do, Gogeumdo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L	
223	Jeollanam-do, Gogeumdo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L	
224	Jeollanam-do, Gogeumdo Island	<i>Zoysia japonica</i>	L	
225	Jeju, Hallasan Yeongsil	<i>Zoysia japonica</i>	H	
227	Jeju, Hallasan Yeongsil	<i>Zoysia japonica</i>	H	
228	Jeju, Hallasan Yeongsil	<i>Zoysia japonica</i>	H	

시료의 FT-IR 스펙트럼은 통계적 분석을 위해 각각 3반복 측정하였다. FT-IR 스펙트럼 조사 및 데이터 변환에 사용된 프로그램은 Bruker에서 제공하는 OPUS Lab (ver. 6.5, Bruker Optics Inc.)를 사용하였다. FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석을 위해 먼저 FT-IR 스펙트럼 데이터의 baseline 교정, normalization 및 mean centering 등 스펙트럼의 전처리 과정을 R 프로그램(version 2.15.3, Auckland, New Zealand)을 이용하여 수행하였다. FT-IR 스펙트럼상에서 대기성분과 시료내의 수분함량이 반영되는 FT-IR 스펙트럼 부위(4,000 ~ 1,800 cm^{-1})와 스펙트럼 노이즈가 심한 부위(800 ~ 400 cm^{-1})를 제거한 다음 baseline 교정을 위해 FT-IR 스펙트럼 분석 영역의 양 끝점(1,800 ~ 800 cm^{-1})의 흡광도를 0으로 조정하였다. 또한 시료의 무게측정이나 추출액의 부피측정 등 실험과정에서 시료의 정량적 오차를 최소화하기 위하여 각 스펙트럼을 동일 면적으로 normalization 하였다. 이후 데이터의 mean centering 과정을 거쳐 미분을 수행한 다음 전처리가 완료된 스펙트럼 데이터를 다변량 통계분석 분석을 위한 표준화된 데이터로 사용하였다.

가공된 FT-IR 스펙트럼 데이터는 NIPALS 알고리즘(Wold 1966)을 이용하여 R 프로그램(version 2.15.0)에서 PCA (Principal component analysis)와 PLS-DA (Partial least square discriminant analysis) 분석(Fiehn et al. 2000; Trygg et al. 2007)을 수행하였다. PCA 및 PLS-DA 분석을 통해 얻어진 score를 이용하여 HCA (hierarchical clustering analysis) 분석하였으며 유사도 지수로 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean analysis)를 이용한 Euclidean distance를 분석하여 각 잔디 시료의 대사체 수준 유연관계를 확인하였다.

결과 및 고찰

들잔디 및 갯잔디의 FT-IR 스펙트럼 비교 분석

분자마커를 이용하여 종 동정이 이루어진 기준라인 들잔디(19개체) 및 갯잔디(6개체)의 잎 시료로부터 FT-IR 스펙트럼을 조사하였다(Fig. 2). 각 잔디 시료의 FT-IR 스펙트럼을 비교한 결과 FT-IR 스펙트럼상의 1,700 ~ 1,500, 1,500 ~ 1,300, 1,100 ~ 950 cm^{-1} 부위에서 대사체의 양적, 질적 패턴 차이가 크게 이루어짐을 알 수 있었으며, 특히 1,100 ~ 950 cm^{-1} 부위에서 들잔디와 갯잔디 사이에 가장 큰 차이를 보였다(Fig. 2A). FT-IR 스펙트럼 비교분석 결과 갯잔디 시료들의 경우는 들잔디 시료에 비해 FT-IR 스펙트럼 전역에서 흡광도가 높게 나타났으며 이는 잎 시료 내에 존재하고 있는 대사체 성분의 양적 함량이 더 높음을 의미하는 결과이다. FT-IR 스펙트럼의 1,700 ~ 1,500 cm^{-1} 부위는 Amide I과 II를 포함하는 아미노산 및 단백질계열의 화합물, 1,500 ~ 1,300 cm^{-1} 부위는 핵산 및 인지질로부터 phosphodiester bond 및 인

을 포함하는 지방산, 1,100 ~ 950 cm^{-1} 부위는 단당류나 복합 다당류를 포함하는 carbohydrates 계열의 탄수화물의 양적 및 질적 정보를 반영하는 스펙트럼 부위이다(D'Souza et al. 2008; Dumas and Miller 2003; Lopez-Sanchez et al. 2010; Parker 1983; Wolkers et al. 2004; Yee et al. 2004). 특히 들잔디와 갯잔디 시료간 큰 차이를 보인 1,100 ~ 950 cm^{-1} 범위는 단당류나 복합 다당류를 포함하는 carbohydrates 계열의 화합물들의 질적, 양적 정보를 반영하는 부위이므로 이 계열의 화합물의 양적, 질적 차이가 들잔디, 갯잔디의 대사체 수준 구분에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 잔디의 경우 서식지에 따라 포함된 탄수화물계열 물질의 함량 차이가 존재한다. 특히 저온에 강한 한지형 잔디의 경우 단당류 함량이 높고, 고온에 강한 난지형 *Zoysia* 속 잔디는 다당류의 함량이 높다(Christians 1998; Turgeon 1985). 본 연구에서도 들잔디와 갯잔디의 경우 탄수화물 계열 화합물의 양적 차이가 크게 이루어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 들잔디와 갯잔디 식물체가 각각의 서식지에 적응하는 과정에서 이루어진 진화적 결과라 추측된다. 따라서 *Zoysia* 속 자생 들잔디, 갯잔디 시료들은 탄수화물 계통의 화합물 대사체의 질적, 양적 변화를 조사하고 이들 화합물의 함량에 의한 신속한 계통 선별 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

들잔디 및 갯잔디 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석을 통한 신속 식별체계 확립

기준라인 들잔디 19개체와 갯잔디 6개체의 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량통계분석을 통해 들잔디와 갯잔디의 대사체 수준 신속 식별체계를 확립하였다(Fig. 2). 들잔디와 갯잔디의 PCA 분석 결과 PC 1과 2 score의 설명력은 전체 변이량의 각각 23.2%, 5.7%로 전체 변이량의 약 28.9%로 변이 정도가 크지 않았으나 PC1 기준으로 왼쪽에 들잔디 시료들이, 오른쪽에는 갯잔디 시료들이 별도의 그룹을 형성하며 분포함을 알 수 있었다(Fig. 2B). 이러한 결과는 잔디 시료의 FT-IR 스펙트럼 분석을 통해 잔디의 종식별이 비교적 용이하게 이루어질 수 있음을 보여주는 결과라 사료된다. 또한 고산지대와 저지대에서 수집된 잔디의 경우 PCA 분석결과 PC1을 기준으로 대체로 한라산 및 지리산 등의 고산지대에서 자생하던 들잔디 시료들은 왼쪽, 섬지역의 해안가 등의 저지대에서 자생하는 들잔디는 중간부분, 해안가에 자생하는 갯잔디는 오른쪽부분에 분포하는 경향을 보였으나, 전라남도 금오도(185번, 188번), 전라남도 보길도(179번) 등의 시료는 집단간의 경계가 겹쳐져 PCA 분석만으로는 들잔디 내에 수집지 특성에 따른 식별은 불가능하였다(Fig. 2B).

PCA score plot 상에서 각 시료들 간의 구분이 이루어지는데 관여하는 중요한 변수를 조사하기 위하여 PCA loading value를 조사한 결과 PC1에 관여하는 들잔디와 갯잔디 사이에 가장 중요한 부위는 1,100 ~ 900 cm^{-1} 범위였다(Fig. 2C).

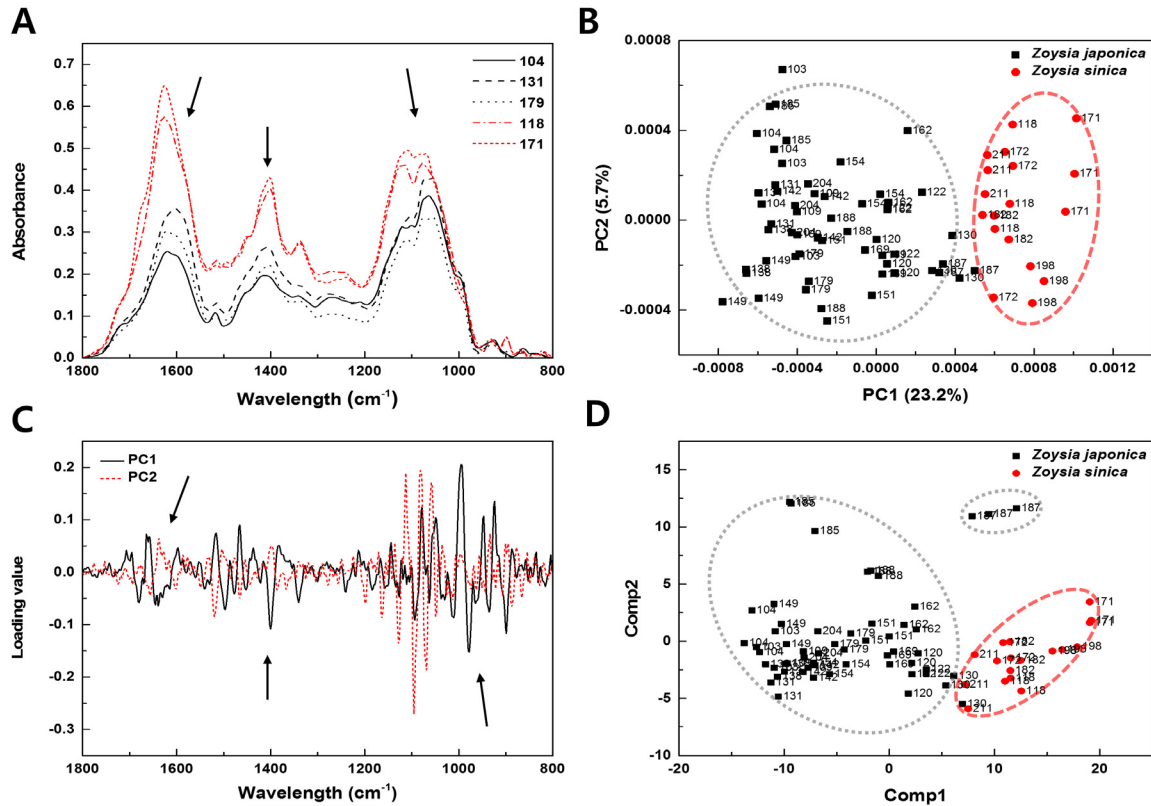


Fig. 2 Multivariate analysis of FT-IR spectra from standard turf grasses (*Zoysia japonica* and *Zoysia sinica*) identified by molecular markers. (A) Representative FT-IR spectra from *Z. japonica* grass (104, 131, 179) and *Z. sinica* grass (118, 171). Arrows represent the FT-IR spectral regions showing significant variations between *Z. japonica* and *Z. sinica*. (B) PCA score plot devised from the FT-IR spectra of *Z. japonica* and *Z. sinica*. (C) PC loading values from the FT-IR spectra of *Z. japonica* and *Z. sinica*. Arrows represent significant spectral regions for determining PC 1 and 2 scores. (D) PLS-DA score plot of FT-IR data from *Z. japonica* and *Z. sinica*. Symbols represent the *Zoysia* species: ■, *Zoysia japonica*; ●, *Zoysia sinica*

이 부위는 FT-IR 스펙트럼상에서 들잔디와 갯잔디 간에 차이를 보였던 부위(Fig. 2A)로 탄수화물 계열 물질의 양적 및 질적 차이가 들잔디와 갯잔디의 대사체 수준 식별에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

기준라인 들잔디와 갯잔디의 PLS-DA 분석의 경우 PCA 분석 결과와 유사하게 Comp1 상에 주로 왼쪽에 들잔디, 오른쪽에 갯잔디로 그룹 식별이 이루어졌으며, 187번 들잔디는 들잔디 그룹보다 약간 상단에 또 다른 그룹으로 구별됨을 확인하였다(Fig. 2D). 대체로 고산지에서 자생하는 들잔디는 왼쪽, 저지대에서 자생하는 들잔디는 중간부분, 해안가에 자생하는 갯잔디는 오른쪽부분에 PLS-DA spot이 위치하였으며, 각 지역별로 집단을 형성하여 각 집단간의 경계가 PCA 분석보다 더욱 분명해짐을 알 수 있었다(Fig. 2D). 이상의 결과로 미루어볼 때 PCA 분석 보다는 PLS-DA 분석을 통해 들잔디와 갯잔디의 대사체 수준에서의 신속한 식별이 가능할 것으로 기대된다.

PCA 분석 데이터를 이용한 HCA dendrogram 결과 기준라인 들잔디와 갯잔디의 명확한 구분이 가능하였다(Fig. 3A). HCA dendrogram 을 보면 크게 두개의 그룹으로 구분이 이루어지며 갯잔디 시료 6개는 모두 하나의 그룹 즉 갯잔디 그룹

으로 집단 형성이 이루어지며 나머지 하나의 그룹은 187번 들잔디 시료를 제외한 18개 들잔디 시료들이 모두 하나의 집단 즉 들잔디 그룹으로 집단 형성이 이루어짐을 알 수 있었다. 이 결과는 분자 마커를 이용한 들잔디와 갯잔디의 식별 결과와 일치하는 결과로 향후 FT-IR 분석을 통한 잔디 대사체 수준 신속 식별 수단으로 활용 가능성이 매우 높음을 보여주는 결과라 사료된다. 그러나 187번 들잔디 시료의 경우는 예외적으로 갯잔디 시료 그룹에 포함됨을 알 수 있었다. 아직 이에 대한 정확한 원인 분석은 이루어지지 않았으나 시료의 시료준비 및 스펙트럼 조사 과정에서의 시료간 오염이나 초기 생육과정에서의 시료 혼입이 원인으로 추정된다. PLS-DA 분석 데이터를 이용한 HCA dendrogram 결과에서도 들잔디와 갯잔디의 시료 식별이 2개의 주요 그룹으로 구분되었으며, 들잔디 그룹내에서는 대체로 고산지대(103 ~ 109번, 131 ~ 154번)와 저지대(120 ~ 130번, 160 ~ 188번) 2개의 소그룹을 형성하는 것으로 나타나 PCA dendrogram 결과보다 채집지역별 유연관계 차이를 명확하게 볼 수 있었다(Fig. 3B). 이상의 결과는 FT-IR을 이용한 바위솔, 두과작물, 아프리카얌 등의 대사체 수준 식별 보고에서도 PCA 분석 보다 PLS-DA 분석이 중간 식별이 뚜렷함을 보고한 것

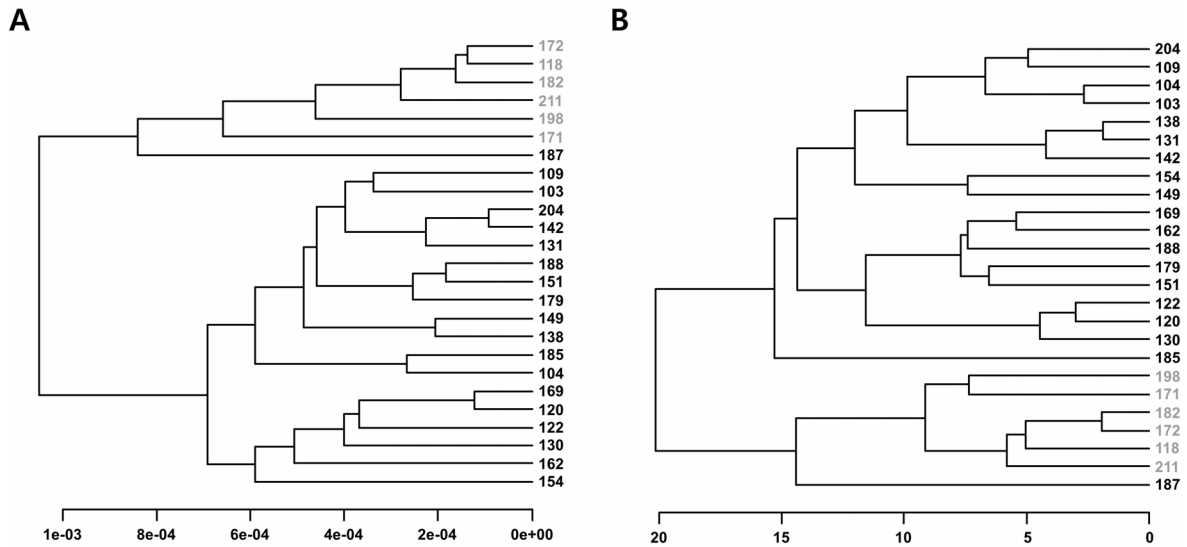


Fig. 3 HCA dendrograms from PCA (A) and PLS-DA (B) of FT-IR spectral data from standard turf grasses (*Zoysia japonica* and *Zoysia sinica*) identified by molecular markers. Black fonts, *Zoysia japonica*; grey fonts, *Zoysia sinica*

과 일치하는 결과이다(Kwon et al. 2011; Song et al. 2012; Song et al. 2014).

미동정 잔디 시료의 통합분석을 통한 FT-IR 스펙트럼 다변량 통계분석 기반 잔디 식별체계 효율 검증

기준라인 잔디 중 들잔디(9개체, *Z. japonica* 1 - *Z. japonica* 9) 및 갯잔디(2개체, *Z. sinica* 1 - *Z. sinica* 2)와 비교분석하기 위해서 미동정 잔디의 잎 시료(38개체)를 추가하여 FT-IR 스펙트럼 분석을 실시하였다(Fig. 4A; Table 2). 기준라인 들잔디와 갯잔디 시료는 Fig. 2A와 유사한 FT-IR 스펙트럼 결과를 보였으며 미동정 잔디 38개 시료들의 경우 들잔디와 유사한 FT-IR 스펙트럼 패턴을 보였다. 각 잔디 시료의 FT-IR 스펙트럼을 비교한 결과 FT-IR 스펙트럼상의 주요 변이 부위는 1,700 ~ 1,500, 1,500 ~ 1,300, 1,100 ~ 950 cm^{-1} 부위로 대사체의 양적, 질적 패턴 차이가 크게 이루어짐을 알 수 있었으며, 특히 1,100 ~ 950 cm^{-1} 부위에서 들잔디와 갯잔디 사이에 가장 큰 차이를 보였다(Fig. 4A). 미동정 시료들의 경우 1,100 ~ 950 cm^{-1} 부위에서 들잔디와 거의 유사한 스펙트럼 패턴을 보였으며 흡광도의 양적 변화 역시 들잔디와 유사하였다. 따라서 FT-IR 스펙트럼 비교분석 결과로 미루어볼 때 미동정 시료들은 모두 들잔디에 속하는 것으로 예측된다.

기준라인 들잔디 및 갯잔디와 미동정 들잔디 38개 라인 이 포함된 시료 집단의 FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA 분석 결과 PC 1과 2 score의 설명력은 전체 변이량의 각각 9.4%, 5.0%, 전체 변이량의 약 14.4%로 나타나 중 동정이 이루어진 들잔디와 갯잔디 시료집단의 PCA분석(Fig. 2B)에 비해 변이 정도가 크지 않았다(Fig. 4B). PCA score plot상에서 갯잔

디 시료는 가장 좌측, 미동정 시료가 포함된 들잔디 집단 내에서 저지대에서 수집한 들잔디 시료가 중간 부위, 고지대에서 수집한 들잔디 시료가 가장 우측에 주로 분포함을 알 수 있었다(Fig. 4B).

시료의 집단 구분에 중요한 역할을 하고 있는 FT-IR 스펙트럼 부위를 조사하기 위하여 PCA loading value를 조사한 결과 PC1에 관여하는 들잔디와 갯잔디 사이에 가장 중요한 부위는 1,100 ~ 900 cm^{-1} 범위였다(Fig. 4C). 이 부위는 FT-IR 스펙트럼상에서 들잔디와 갯잔디 간에 차이를 보였던 부위(Fig. 2A and 2B)와 거의 일치하며 carbohydrates 계열의 탄수화물 계통의 양적 및 질적 차이가 들잔디와 갯잔디의 대사체 수준 식별에 중요한 역할을 하고 있음을 재 확인 할 수 있었다.

PLS-DA 분석을 실시한 결과 각 집단 경계가 넓게 퍼져있는 PCA 분석보다 각 시료간의 집단 구분이 더욱 명확하게 이루어짐을 알 수 있었다(Fig. 4D). PLS-DA plot 상에서 갯잔디 시료는 가장 우측 하단에 위치하였으며 미동정 시료가 포함된 들잔디 집단내에서 주로 저지대 지역에서 수집된 들잔디 시료들이 중간 부위에 위치하였으며, 좌측에는 주로 고산지대에서 수집된 시료들이 분포함을 알 수 있었다(Fig. 4D). 이 결과는 중 동정이 이루어진 들잔디와 갯잔디 시료집단의 PLS-DA 분석 결과(Fig. 2D)와 유사하며, FT-IR 스펙트럼 기반 다변량 통계분석을 통한 대사체 수준 식별 기술이 수집지역의 지리적 특성과 연관이 있음을 보여주는 결과라 사료된다.

미동정 들잔디 시료의 PCA 분석 결과를 기반으로 HCA dendrogram 분석을 실시한 결과 먼저 갯잔디와 들잔디로 2개 그룹 형성이 이루어짐을 알 수 있었다(Fig. 5A). 미동정 시료들은 모두 들잔디 그룹 내로 위치하였으며 대체로 고산

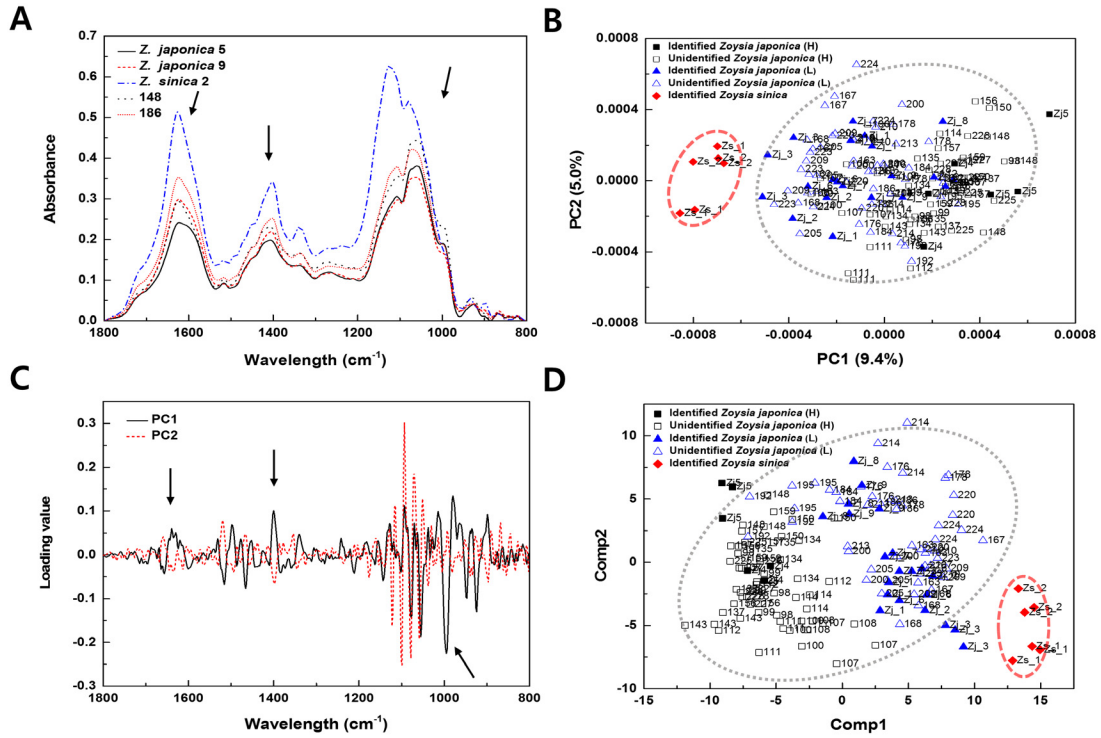


Fig. 4 Multivariate analysis of FT-IR spectra from identified turf grasses (standard) and unidentified turf grasses (*Zoysia japonica* and *Zoysia sinica*). (A) Representative FT-IR spectra from identified turf grasses (*Z. japonica*, 5; *Z. japonica*, 9; *Z. sinica*, 2) and unidentified turf grasses (148, 186). Arrows represent the FT-IR spectral regions showing significant variations among turf grasses. (B) PCA score plot from the FT-IR spectra of identified turf grasses and unidentified turf grasses. (C) PC loading values from the FT-IR spectra of identified turf grasses and unidentified turf grasses. Arrows represent significant spectral regions for determining the PC 1 and 2 scores. (D) PLS-DA score plot of FT-IR data from identified turf grasses and unidentified turf grasses. Characters and symbols represent *Zoysia* species and geographical origins, respectively. Zj, *Zoysia japonica*; Zs, *Zoysia sinica*; ■, Identified *Zoysia japonica* (high altitude); □, Unidentified *Zoysia japonica* (high altitude); ▲, Identified *Zoysia japonica* (low altitude); △, Unidentified *Zoysia japonica* (low altitude); ◆, Identified *Zoysia sinica*

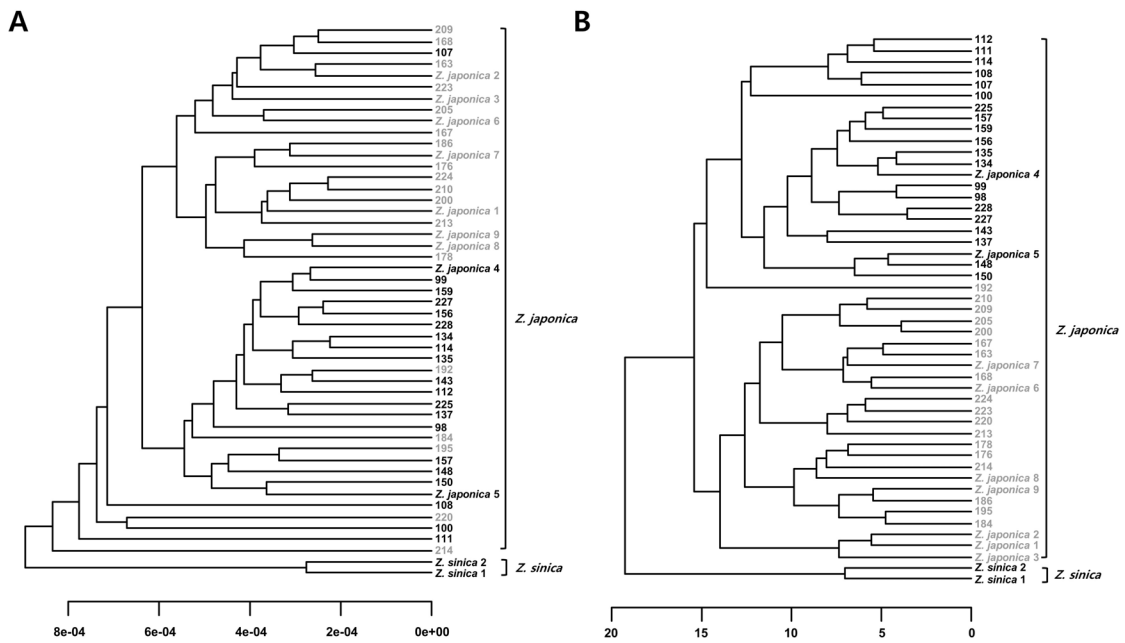


Fig. 5 HCA dendrograms from PCA (A) and PLS-DA (B) of FT-IR spectral data from identified turf grasses (standard) and unidentified turf grasses (*Zoysia japonica* and *Zoysia sinica*). Black fonts of *Zoysia japonica*, low altitude; grey fonts of *Zoysia japonica*, high altitude

지대 및 저지대 등 수집지 특성에 따라 별도의 그룹을 형성하지만 여러 미동정 시료들이 예외적인 분포를 나타냄을 알 수 있었다. 이 결과는 FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA 분석을 통하여 미동정 들잔디 시료들의 수집지역별 유연관계를 규명하는 것은 한계가 있음을 나타낸다. 그러나 PLS-DA 분석 데이터를 이용한 HCA dendrogram 결과에서는 들잔디와 갯잔디의 두 그룹으로 구분됨을 알 수 있었으며(Fig. 5B), 특히 고산지대에서 수집된 들잔디 시료들(*Z. japonica* 4, *Z. japonica* 5, 98 ~ 159번, 225 ~ 228번)이 별도의 소그룹을 형성하였으며, 저지대에서 수집된 시료들(*Z. japonica* 1-3, *Z. japonica* 6-9, 163 ~ 224번)의 경우 192번 시료만을 제외하고 모두 또 다른 별도의 소그룹을 형성하였다. 이와 같은 식별 결과는 PLS-DA 분석을 통하여 들잔디와 갯잔디의 식별 및 수집지역별 들잔디의 유연관계 분석이 가능함을 의미한다. 또한 이 결과는 시료의 전세포추출물들로부터 얻어진 스펙트럼 데이터를 다변량 통계분석기법을 이용하여 생물종들간의 유연관계뿐만 아니라(Ahn et al. 2015; Kim et al. 2004; Kwon et al. 2011) 같은 종내 시료들간의 유연관계를 대사체 수준에서 식별할 수 있다는 이전 보고들과 상응하는 연구결과이다(Kim et al. 2007; Kim et al. 2009; Kwon et al. 2014).

본 연구 결과를 통해 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석기술은 대사체 수준에서 잔디의 종 식별뿐만 아니라 고산지대와 저지대의 수집지역별 유연관계를 분석하는 수단으로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한, 다수의 잔디 수집종에 대한 선별 및 특성 평가를 위한 기초 자료로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

적 요

본 연구에서는 FT-IR 스펙트럼 분석을 통해 한국에서 자생하는 *Zoysia* 속인 들잔디(*Zoysia japonica*)와 갯잔디(*Zoysia sinica*)의 전세포추출 시료로부터 대사체 수준에서 신속한 식별체계를 확립하고자 하였다. 이를 위해 기준라인으로 분자마커를 이용해 동정이 완료된 들잔디와 갯잔디 시료를 FT-IR 분석에 사용하였으며, 제주도와 전라도에서 수집된 미동정 잔디들을 기준라인과 비교분석하기 위해 FT-IR 분석에 사용하였다. 기준라인 들잔디와 갯잔디 시료로부터 확보된 FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA (principal component analysis)와 PLS-DA (partial least square discriminant analysis) 분석 결과 각 기준라인은 들잔디 및 갯잔디 종에 따라 뚜렷하게 식별되었다. 들잔디와 갯잔디 시료 사이에서 가장 큰 PC loading value 값을 보인 부위는 $1,100 \sim 950 \text{ cm}^{-1}$ 였다. 이 부위는 carbohydrates 계열의 화합물들의 질적, 양적 정보를 반영하는 부위로 이 계열의 화합물의 양적, 질적 차이가 들잔디, 갯잔디의 대사체 수준 구분에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 기준라인 들잔디와 갯잔디 시료집단에

미동정된 잔디 시료 집단을 추가하여 PCA와 PLS-DA 분석한 결과, 일차적으로 들잔디와 갯잔디로 구분이 이루어졌으며 미동정 집단은 모두 들잔디 그룹내에 분포하였다. 특히, HCA (hierarchical clustering analysis) dendrogram 분석 결과에서 동정 및 미동정 들잔디 시료들은 모두 수집지 특성에 따라 국내 국립공원의 고산지대와 국내 섬지역 해안가의 저지대로 별도의 소그룹을 형성하였다. 따라서, 본 연구 결과에서 확립된 FT-IR 스펙트럼 분석법은 한국 전역에 자생하는 들잔디와 갯잔디의 신속한 종 식별뿐만 아니라 수집지역의 특성에 따라 대사체 수준에서의 유연관계를 규명하는데 활용 가능할 것으로 기대된다.

사 사

본 논문은 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원 농림축산식품부사업(과제번호: 315025-3)과 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No.2009-0094059)과 2015년도 농림수산식품부(111161-5)의 지원을 받아 수행된 농생명산업기술개발사업에 의해 이루어진 것임.

References

- Ahn MS, Min SR, Jie EY, So EJ, Choi SY, Moon BC, Kang YM, Park SY, Kim SW (2015) Rapid comparison of metabolic equivalence of standard medicinal parts from medicinal plants and their in vitro-generated adventitious roots using FT-IR spectroscopy. *J Plant Biotechnol* 42:257-264
- Christians N (1998) Fundamentals of turfgrass management, Ann Arbor Press, Chelsea, MI.
- 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 Agr Sci* 40:1-5
- D'Souza L, Devi P, Shridhar MPD and Naik CG. 2008. Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Study Cadmium-Induced Changes in *PadinaTetrasomatica* (Hauck). *Anal Chem Insights* 3:135-143
- Dumas P, Miller LM (2003) The use of synchrotron infrared microspectroscopy in biological and biomedical investigations. *Vib Spectrosc* 32:3-21
- Fiehn O, Kopka J, Drmann P, Altmann T, Trethewey R, Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* 18:1157-1161
- Hyun YH, Choi BJ, Kim YJ, Joo YK (2012) Analysis of Research Trend on Zoysiagrass (*Zoysia* spp.) *Asian J. Turfgrass Sci* 26(2):89-95
- Kang BC, Namkung Y, Shin HK (1999) Analysis of the genetic variation in Anyang Joonggi and development of Anyang

- Joonggi specific DNA marker. Kor J Hort Sci Technol 17:197
- Kim SW, Ban SH, Chung H, Cho SH, Chung HJ, Choi PS, Yoo OJ, Liu JR (2004) Taxonomic discrimination of higher plants by multivariate analysis of Fourier transform infrared spectroscopy data. Plant Cell Rep 23:246-250
- Kim SW, Cho SH, Chung H, Liu JR (2007) Genetic discrimination between *Catharanthus roseus* cultivars by multivariate analysis of fourier transform infrared spectroscopy data. J Plant Biotechnol 34:201-205
- Kim SW, Min SR, Kim JH, Park SK, Kim TI, Liu JR (2009) Rapid discrimination of commercial strawberry cultivars using Fourier transform infrared spectroscopy data combined by multivariate analysis. Plant Biotechnol Rep 3:87-93
- Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG (2005) Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. J Exp Bot 56:255-265
- Kwon YK, Kim SW, Seo JM, Woo TH, Liu JR (2011) Prediction and discrimination of taxonomic relationship within *Orostachys* species using FT-IR spectroscopy combined by multivariate analysis. J Plant Biotechnol 38:9-14
- Kwon YK, Ahn MS, Park JS, Liu JR, In DS, Min BW, Kim SW (2014) Discrimination of cultivation ages and cultivars of ginseng leaves using Fourier transform infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. J Ginseng Res 38:52-58
- 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
- Lopez-Sanchez M, Ayora-Canada MJ, Molina-Diaz A (2010) Olive fruit growth and ripening as seen by vibrational spectroscopy. J Agric Food Chem 58:82-87
- Parker FS. 1983. Applications of infrared, raman and resonance raman spectroscopy in biochemistry, Plenum Press, New York, P. 527
- Sun HJ, Song IJ, Bae TW, Lee HY (2010) Recent development in biotechnological improvement of *Zoysia japonica* Steud. J Plant Biotechnol 37:400-407
- Song SY, Ha TJ, Jang KC, Kim IJ, Kim SW (2012) Establishment of rapid discrimination system of leguminous plants at metabolic level using FT-IR spectroscopy with multivariate analysis. J Plant Biotechnol 39:121-126
- Song SY, Jie EY, Ahn MS, Lee IH, Nou IS, Min BW, Kim SW (2014) Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy of genomic DNA to discriminate F₁ progenies from their paternal lineage of Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*). Mol Breeding 33:453-464
- Trygg J, Holmes E, Londstedt T (2007) Chemometrics in metabonomics. J Proteome Res 6:467-479
- Turgeon AJ. 1985. Turgrass Management, Rev Ed, Raston Publishing, Raston, Virginia
- Wolkers WF, Oliver AE, Tablin F, Crowe JH (2004) A fourier transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. Carb Res 339:1077-85
- 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
- Yee N, Benning LG, Phoenix VR, Ferris FG (2004) Characterization of metal-Cyanobacteria sorption reactions: A combined macroscopic and infrared spectroscopic investigation. Environ Sci Technol 38:775-82
- Yu TY, Yeom DY, Kim, YJ, Kim SJ (1974) Morphological studies on Korean lawn grasses (*Zoysia* spp.). Jour Kor Soc Hort Sci 15(1):79-91