



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](#)

석사학위논문

제주도 당근 재배 토양에서
Xanthomonas hortorum pv. *carotae*의
분리 및 동정

김미진

제주대학교 대학원
농학과

2024년 2월

제주도 당근 재배 토양에서
Xanthomonas hortorum pv. *carotae*의
분리 및 동정

이 논문을 농학 석사 학위논문으로 제출함

김 미 진

제주대학교 대학원

농학과

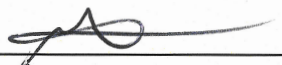
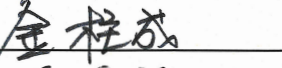

지도교수 전용철

김미진의 농학 석사 학위논문을 인준함

2023년 12 월

심사위원장
위 원
위 원

정 용 석
김 주 성
전 용 철

목 차

List of Tables	iii
List of Figures	iv
ABSTRACT	1
I. 서 론	2
II. 연구사	4
III. 재료 및 방법	9
1. 당근 세균잎마름병균 채집 및 분포조사	
2. 순수분리한 토양 분리균의 형태학적 동정	
3. 분리균의 분자생물학적 동정	
3-1. 분리 세균의 DNA 추출과 PCR 증폭	
3-2. PCR 증폭산물의 Sequencing을 이용한 유전자분석	
3-3. Phylogenetic tree 작성	
4. 코흐의 법칙을 통한 병원균 검정	

IV. 결과 및 고찰	14
1. 당근 토양에서의 세균잎마름병원균 분포조사 결과	
2. 토양에서 분리한 세균의 형태학적 동정결과	
3. 분리균의 분자생물학적 동정	
3-1. 분리 세균의 DNA 추출과 PCR 증폭	
3-2. 분리 세균의 DNA sequence 분석과 NCBI 비교분석 결과	
3-3. Phylogenetic tree 작성 결과	
4. 코흐의 법칙을 통한 병원균 검정 결과	
V. 적 요	36
VI. 참고 문헌	37

Tables

Table 1. Morphological standard of the colonies isolated from the soil cultivating carrot in Jeju Island.....	18
Table 2. Blast result of bacterial isolates from the soil cultivating carrot in Jeju Island.....	19
Table 3. Morphological standard of the bacterial colonies showing the typical characteristics like <i>Xhc</i> on mKM medium.....	21
Table 4. Identification of isolates from carrot cultivating soil in Jeju by analysis of DNA sequences.	39

List of Figures

Fig. 1. Location of area cultivating carrot where soil was collected in this study. Hado-ri, Pyeongdae-ri, Gimnyeong-ri, Woljeong-ri, , Deokcheon-ri and Haengwon-ri form a boundary Gujwa-eup (A) Haengwon-ri 1260-2, (B) Hado-ri 2641-1, (C) Hado-ri 2635-1, (D) Pyeongdae-ri 466, (E) Pyeongdae-ri 465, (F) Haengwon-ri 447-1, (G) Haengwon-ri 1260-6, (H) Haengwon-ri 1260-31, (I) Woljeong-ri 251-3, (J) Woljeong-ri 1016-26, (K) Woljeong-ri 1892, (L) Deokcheon-ri 625, (M) Gimnyeong-ri 308-1, (N) Gimnyeong-ri 181-3, (O) Woljeong-ri 1813, (P) Woljeong-ri 1774, (Q) Woljeong-ri 1400-13, (R) Gimnyeong-ri 467-1, (S) Gimnyeong-ri 84, (T) Gimnyeong-ri 497-5. 15

Fig. 2. Location of carrot farms (red spots) isolated *Xhc* in Jeju Island in this study. carrot cultivation production in Jeju Island is concentrated. 16

Fig. 3. Biodiversity of bacterial isolates from the soil cultivating carrot in Jeju Island. 20

Fig. 4. Bacterial colonies (A-C) and single colony by streaking (D) on mKM medium from the carrot cultivating soil in Jeju Island. Red circles were selected as candidates for diagnosis by molecular biological analysis and the square boxes on right sides of each figure are magnified parts around red circles. 24

Fig. 5. Electrophoresis images of PCR product of bacterial isolates from the soils cultivating carrot in Jeju Island. The total DNA were amplified with universal primers 27F and 1492R. Ld: 1-kb DNA ladder (BIOFACT, Co. Ltd.), Xh: *X. hortorum* pv. *carotae*, the rest lanes: bacterial isolates. 25

Fig. 6. Electrophoresis images of the total DNA product of bacterial isolates from the soils cultivating carrot in Jeju Island. The total DNA were amplified with universal primer 27F and 1492R. Ld: 1-kb DNA ladder (BIOFACT, Co. Ltd.), arrow=10 kb. 26

Fig. 7. Gel electrophoresis images of PCR products of bacterial isolates from the carrot cultivating soil in Jeju Island using specific primer 3SF and 3R. Ld: 1-kb DNA ladder (BIOFACT, Co. Ltd.), Xh: *X. hortorum* pv. *carotae*, lane 15A1-9~15A13-1: bacterial isolates from the carrot cultivation soil in Jeju Island. Arrow = 350 bp. 27

Fig. 8. Bacteria identification of the of bacterial isolates from the soils cultivating carrot in Jeju Island. (A) Representative chromatogram of DNA 15A9-1 sequence among the isolates. (B) Representative sequence alignment between the query sequence of the isolates DNA 15A9-1 with accession number AB795020. (C) BLAST analysis of DNA 15A9-1 in specific primer 3S for amplifies of the *X. hortorum* pv. *carotae*. 30

Fig. 9. Phylogenetic tree of the bacterial isolates from the soils cultivating carrot in Jeju Island. There were two groups; Group I were consisted with mostly the bacterial isolates from the soil cultivating carrot in Jeju Island (15A-1~15A-13) including strain *Xhc* JJ2001 from National Institute of Agricultural Sciences (rad arrow) and strain *Xhc* 3S (green arrow) registered in NCBI including strain. Group II were the bacterial strains registered as *Xhc* in NCBI. 33

Fig. 10. Photographs of carrot leaves (A) H₂O treated control, (B) inoculated with *X. hortorum* pv. *carotae* JJ2001 and (C) inoculated with the bacterial strain 15A9-1 from the soil cultivating carrot in Jeju Island. The photographs were taken at 25 days after inoculation. (D) Gel electrophoresis images of PCR products of bacterial isolates re-isolated from the artificial infected carrot leaves using specific primer 3SF and 3SR. Ld: 1-kb DNA ladder (BIOFACT, Co. Ltd.), 1: *Xhc* JJ2001, 2: bacterial isolate 15A9-1. Arrow = 350 bp. 35

ABSTRACT

Bacterial leaf blight in carrot is one of the most important diseases in the worldwide. In the past decade, its introduction into Korea is causing great concern due to the potential damage to carrot crops domestically. This bacterial disease is caused by *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* (*Xhc*). This study aimed to isolate and identify bacterial strains from the soil of carrot farms in Jeju Island. The bacterial isolates showing characteristics similar with those of *Xhc* were selected when cultured on artificial media. Through DNA sequencing and analysis based on NCBI data, some of the selected bacterial strains were identified as *Xhc*. The results of this study showed the potential establishment of *Xhc* in the soil of Jeju Island and it may be valuable data for establish a strategy preventing the domestic spread of carrot bacterial leaf blight in the future.

I. 서 론

전 세계적으로 경제 중요 10대 작물 중에 하나인 당근에 발생하는 당근 세균잎마름병은 *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*(*Xhc*)에 의해 발생하는 종자 전염성 세균병으로서 1931년 캘리포니아에서 처음 발견되었으며, 당근 종자 생산에 심한 피해를 줌으로써 당근 종자 수출에 막대한 지장을 초래하였고 결국 당근 생산량을 감소시켰다 (Bastas et al., 2021; Kuan et al., 1985). 감염된 종자는 잎, 줄기 그리고 엽병에 작고 불규칙한 노란 반점을 일으키고 나중에는 수침상 병반과 괴저 증상으로 발전하며 당근 뿌리의 수확에 감소를 야기한다. 당근 종자 생산 중 꽃 감염이 종자 수확량 감소로 이어지고, 오염 당근 종자의 발아율 감소로 이어질 수 있다(Umesh et al., 1998). *Xhc*는 당근 종자 수량을 감소시키는 당근의 고위험 병원균으로 당근 종자 사업뿐만 아니라 당근 종자를 수입하는 지역에서도 주요 관심사이다. 미국에서 생산하는 종자 평균량의 40%를 전세계로 공급하고 있고(Gilbertson et al., 2002; Scott and Dung, 2020), 우리나라는 종자의 해외수입 의존도가 높아 감염종자의 수입이 이루어질 확률이 있고, 돌발적 병원균의 유입 위험을 예상할 수 있다.

주요 작물의 경제적 피해를 주는 당근 세균잎마름병은 미국의 여러 주 뿐만 아니라 스페인에서도 발견되었으며(Lee et al., 2013; Palomo et al., 2021; Pflieger et al., 1974), 최근 일본과 한국의 제주도에서도 2012년에 처음 발견이 되었다(Du Toit et al., 2014; Myung et al., 2014; Nishiyama et al., 1979). 이러한 고위험성 식물병의 유입은 심각한 경제적 피해를 유발할 수도 있기 때문에 세계 각국에서는 철저한 국내외 검역을 통하여 식물병의 유입을 사전에 차단하려고 노력해왔다(Lee et al., 2013). 해외 유입 병해충을 차단하지

못할 경우 국가적인 피해와 자국 농업 생태계 보호에 큰 영향을 줄 수 있기 때문에 당근 세균잎마름병은 해외 유입 병해충의 일종으로 식물검역병해충에서 관리병균으로 구분되어 관리되어 왔다(Lee et al., 2013; Hong et al., 2020). 그러나 국제간 교류가 활발해지고, 농산물 교역이 증가함에 따라 그 동안 보고되지 않았던 검역 대상 식물병원균이 국내로 유입되는 사례가 빈번하게 발생하였다(Hong et al., 2020).

우리나라의 당근은 전국적으로 봄과 가을, 고랭지대에서는 여름 재배를 하며 단기간 생산으로는 하우스 재배를 한다. 이 중 제주는 온난한 기후로 노지 월동 재배의 형태로 제주 당근 재배 면적은 전국의 50%, 생산량은 60%를 차지하며 제주의 노지 월동 재배는 온난한 기후의 특성과 화산 회토의 양질의 유기물 함량, 우수한 배수로 토층이 부드러워 유리하다(park et al., 2001). 제주지역의 제주 당근 재배 생산은 화산회토의 사질 양토가 분포되어 있는 제주시 구좌, 성산, 표선 동부지역에 집단화 되어 있다(유과 현, 1995). 우리나라 제주도에서 당근생산은 1980년대 이후 급속히 증가하였으며, 1993년 이후 전국의 50% 수준을 차지하는 등 제주도는 당근의 주요생산지로 역할을 하고 있다(유 그리고 현, 1995).

그 동안 당근 연구는 주로 재배 생리 등에 집중되었고 당근에 발생하는 병해충에 대한 연구는 본격적으로 이루어지지 않았지만 병해충의 국내 유입을 차단해야 한다는 요구가 꾸준히 제기되었다(Kwon et al., 2007). 당근 세균잎마름병 경우 국내로의 유입 억제 노력에도 불구하고 2012년 제주도에서 조사 대상 50개 조사지 중 40%에서 잎마름증세가 발견되었으며 평균 10% 발병도의 세균잎마름병 중 4개의 *Xhc*를 분리 검출하였다. 이후 2018년과 2019년에 계속하여 발견되어 보고되었다(Myung et al., 2014). *Xhc*의 국내 유입이 확인되고 있기에 경제적 위협에 대한 대비를 위하여 *Xhc*의 정확한 동정이 선제적으로 이루어져야 한다.

전통적으로 표현학적 동정은 세균을 동정하는데 근거가 되며 형태학적,

생리학적, 생화학적인 특징을 포함하며 분류군을 확인하기 위한 정보를 제공해준다. 세균의 종을 감별을 위한 분류는 세균 간의 유사성을 바탕으로 체계적인 배열을 통해 균이 어떠한 종에 속해 있는지 확인하여 적절하게 지칭하게 된다(Goodfellow and O'Donnell, 1993). 형태학적 동정에는 세포모양과 크기, 형태, 그람 염색의 특징 등 세포형태를 동정하는 것과 균총의 색깔, 크기, 형태 등을 관찰하는 형태를 띄는데, 균들이 나타내는 표현형을 유의미한 재현성을 기반으로 직관적으로 확인하여 균총을 동정하게 된다(Kim and Jang, 2012).

형태학적 동정인 육안 동정의 경우 표현형적인 기술의 필요성이 인정되기는 하지만 온도, pH 조건, 공기 조건, 다양한 항생제나 효소 등에 따라 균총의 색깔, 크기, 형태들이 달라질 수 있다는 점에서 합리적인 양의 노력과 시간 내에 변별력 있는 표현형적인 특성을 찾아내기가 어렵다. 게다가 종을 분류하는 기술이 발전하여 각각의 종들이 형태학적으로 공통적이고 특징적인 형태를 나타내기도 하지만, 한가지 이상의 중요한 특성으로 다른 종으로 인식되기에 균총들 간에 진화적 상관관계를 결정하는 염기서열에 관한 관심이 커져가면서 점차적으로 화학적 분류, 분자생물학적 분류가 진행되고 있다(Kim and Jang, 2012).

1987년 Ad Hoc 위원회에서 세균종의 분류는 계통발생학적인 결정과 유전체 염기서열을 기준으로 종을 결정지어야 한다고 선포하였다(Wayne et al., 1987). 유전체의 특성은 유전적인 요소들이 결정하며 유전체의 상당부분이 각 균 주마다 독특할 수 있다는 것은 이전 연구들에 의해 알려졌다. 분자생물학적 분류가 연구 되면서 밝혀지는 균총의 유전자 정보 분석이 증가하고 이에 따라, 유전자 염기서열의 비교 분석법, 전체의 유전체에 대해서 염기서열의 비교 연구하는 것 등 새로운 접근이 가능해졌다(Coenye et al., 2005; Konstantinidis and Tiedje, 2005). 그리하여 앞서 육안으로 관찰한 균총의 특성을 기준으로 분자생물학적 동정을 위해 분리한 세균의 DNA 염기서열

분석을 통한 동정을 수행한다(Wayne et al., 1987).

생물학의 발전 과정에서 처음으로 유전의 세포 기반인 염색체를 확립한 후 유전의 분자적 기초인 DNA의 이중나선에 관한 정의가 있었다. 유전자의 복제와 염기서열결정의 기술 발달로 유전의 정보를 기초화했다. DNA 서열은 유전체 구조, 진화 등의 연관성을 연구하여 종 다양성 및 변이를 확인할 수 있다. DNA sequence를 통해 DNA 내 염기서열을 결정하여 종을 동정한다(Hawkins et. al., 2001; Pushkarev et al., 2009).

식물병원세균의 보다 정확한 동정을 위해서 코흐의 법칙에 의한 동정 과정을 거친다. 코흐의 법칙에 의하면 식물체에 병징이 나타난 것과 그 원인이 되는 병원균과의 관계를 네 가지 간단한 규칙을 적용하여 확인하게 되어있다. 먼저, 병징이 나타난 식물체에서 병원균이 반드시 검출되어야 한다. 다음으로 병원균은 식물체에서 순수 분리되어 단독 배양이 가능해야 한다. 또, 단독 배양된 병원체는 병징이 나타났던 동일한 종의 식물체에 분리한 병원체를 접종하였을 때 처음과 동일한 병징을 보여야 한다. 마지막으로 인위적으로 접종된 식물체에서 병원체를 다시 분리하였을 때 처음 발견한 병원균과 동일한 것이어야 한다.

이미 국내로 유입된 당근 세균잎마름병 방제를 위하여 *Xhc*에 대한 국내 정착 여부를 조사하고, 위험성에 대한 종합적인 평가 및 선제적인 대응 체계의 구축이 필요하다. 기존 당근 세균잎마름병 연구는 종자와 식물체에 관한 연구가 주로 이루어졌다. 이에 비해 본 연구에서는 제주의 당근 재배 토양에서 *Xhc*의 생존 여부를 최초로 확인함으로써 재배환경 중 토양을 통한 전염 가능성을 제시하여 당근 세균잎마름병 확산 저지 수단을 수립하는데 도움이 되는 자료를 제공하기 위해 본 연구를 수행하였다.

II. 연구사

본 연구의 주요 병원균인 *Xhc*가 포함되어 있는 *X. hortorum* 병원체의 분류학적 역사는 *Xanthomonas* 속처럼 길고 복잡하다. *X. hortorum* 병원체를 다루는 이전의 대부분의 문헌에서는 주요한 숙주 7개의 병원균을 균일한 개체로 다루고 있으나 현재는 분화되어 구분하고 있다(Dia et al., 2022).

Xanthomonas 속 *X. hortorum* 종의 병원균은 pv. *carotae*, pv. *vitians*, pv. *hederae*, pv. *pelargonii*, pv. *taraxaci*, pv. *cynarae*. 그리고 pv. *gardneri* 로 총 7개의 주요한 숙주로 구분되어 있다. *X. hortorum*은 병을 일으키는 숙주에서 알 수 있듯이 농작물, 원예 식물과 야생 식물에까지 영향을 미친다. 실험들을 통해 숙주들이 밝혀지고 있고 현재의 범위보다 더 넓을 것으로 예상되고 있다(Dia et al., 2022).

국제간 교류가 많아지면서 농업환경이 변화하였고, 그로 인해 농산물 교역도 증가하였다. 식물, 종자 및 기타 변식 물질의 이동은 병원체가 이동하는 경로를 만들어내어 새로운 지역으로 유입되고 확산되었다. 확산된 *X. hortorum* pathovars는 주로 감염된 종자 또는 식물체의 절단에 의해 전파되며 바람과 비에 의해 추가로 분산되거나 식재 및 재배 중에 기계적으로 전달되었다. 병원체는 잔류물과 토양에서 생존할 수 있으며 다음 성장기까지 월동할 수 있는데 대표적인 병원균이 *Xhc*로 알려져 있다(Kendrick, 1934).

*X. hortorum*에 의한 최초로 발생한 질병 보고는 1890년대로 거슬러 올라가며, 1894년 독일에서 잉글리시 아이비의 세균성잎반점과 마름병에 대한 보고가 있었고 (Lindau, 1894) 1898년과 1907년 각각 미국 매사추세츠에서 제라늄의 세균성마름병과

상추의 세균성잎반점에 대한 보고가 있었다(Stone and Smith, 1898; Stone, 1907).

상추의 세균성잎반점을 유발하는 종 *Bacterium vitians* 에 대한 최초의 분류학적 보고는 1918년에 발표되었다(Brown, 1918). 그 후 병든 잉글시리 아이비에서 *Bacterium hederæ*가 보고되었고(Arnaud, 1920), 병든 제라늄에서 *Bacterium pelargonii*가 분리되었다 (Brown, 1923). *B. vitians*, *B. hederæ*와 *B. pelargonii*는 *X. hortorum*에서 *Phytomonas*속으로 재분류되었다(Burkholder and Guterman, 1932; Morinière et al., 2020; Vauterin 1995).

*Xhc*는 1931년 캘리포니아에서 Sacramento Valley 상부 델타 지역에서 당근 종자 생산을 위해 상업적으로 재배된 당근에서 발견되었고 1932년에 광범위하고 심각한 방식으로 재발하여 종자 수확량에 상당한 손실이 수반되었다. 불규칙한 괴사 반점이 생기고 잎과 잎자루, 가지, 줄기에까지 갈색줄무늬를 수반하는 특성을 지녔으며 발견 이후로도 상당한 피해를 관찰할 수 있었다. 세균성마름병을 유발하는 세균들을 *Phytomonas*속으로 분류한 상황에서 당근의 병든 조직으로부터 분리된 박테리아를 이전에 설명되지 않은 것으로 간주하고, 당근의 세균성 마름병을 일으키는 박테리아로 특징지어져 *Pseudomonas carotæ*라는 이름으로 제안하였다(Kendrick, 1934).

이후 1943년 새로운 분류체계를 제한하여, *Pseudomonas*속 중에서 노란색의 콜로니를 형성하는 4종 *X. hederæ*, *X. carotæ*, *X. pelargonii*, *X. vitians*을 *Xantomonas*속으로 재분류하였다(Dawson, 1943; Starr and Burkholder, 1942). 같은 해 소련에서 처음 보고된 러시아 민들레의 마름병을 일으키는 박테리아는 *X. taraxaci*로 지정되었다(Niederhauser, 1943).

1974년 Dye과 Lelliott에 의해 *Xanthomonas* 속에 대한 일반적인 정의가 *Pseudomonas*속과 구별하지는 않지만 두 속의 광범위한 표현형이 만들어지지 않았기 때문에 속이 결합되지는 않았다. 앞서 보고된 *Xanthomonas* 5종 *X. hederæ*, *X. carotæ*, *X. pelargonii*, *X. vitians* 및 *X. taraxaci*은 1980년에 최초의 승인 목록이 발표되기까지 개별적인 *Xantomonas*종으로 간주되었다. 그리하여 일반적으로 *X. campestris*와 구별할 수 없

거나 숙주 범위를 제외하고 서로 구별할 수 없는 종 및 아종으로 *X. campestris*의 병원체로 제안되었다(Dye and Lelliott, 1974).

이후 병리학자들이 세균 명명 규칙을 지침으로 하여 숙주 범위를 기준으로 유기체를 지정하는데 사용되는 하위 특이적 용어 “pathovar”를 식물 병원성 박테리아를 분류하는데 도입하였고, pathovar가 도입되기 전까지는 *X. hortorum* pv. *carotae*가 *X. comperstris* 종으로 포함되어 있었다(Young et al., 1978). *X. comperstris* pv. *carotae*는 1993년에 DNA-DNA 교잡(DNA-DNA hybridization) 연구 방법을 통해 새로운 종인 *X. hortorum* pv. *carotae*로 구분되었다(Palleroni et al., 1993; Amann et al., 1995). *X. hortorum*의 공식적인 분류학적 설명 및 변화를 설명하는 분류학적 역사는 2000년도 초 공식적으로 동일한 분류학적 개체로 승인되었다(Parkinson et al., 2009; Young et al., 2008). 이러한 계통적 위치와 속명의 변화에 의해 *Xhc*와 *X. comperstris*간의 유사성이 매우 높다고 할 수 있다(Dia et al., 2022; Dupas et al., 2023).

III. 재료 및 방법

1. 당근 세균잎마름병균 채집 및 분포조사

본 연구에서는 제주 당근 재배 토양에서 *Xhc*의 생존 여부를 밝히고 잔류물과 토양에서 생존할 수 있으며 다음 성장기까지 월동할 수 있는 *Xhc*의 특징에 따라 토양을 통한 전염 가능성 여부를 확인하고자 하였다. 그리하여 제주 당근 생산이 집단화 되어 있는 제주 동쪽 구좌읍 행원리, 하도리, 평대리, 김녕리, 월정리, 덕천리에서 총 20개 농가를 선정하여 토양을 채취하였다.

각 재배지에서는 당근을 수확 후 당근 뿌리가 존재하였던 토양을 개별성을 띄는 곳곳을 선정하였고 모종삽을 이용하여 15 cm 이상의 깊이로 파내어 안쪽에 있는 토양 50 g을 채취하여 지퍼백에 넣은 후 사용하기 전까지 -4°C 냉장고에 보관하였다.

채집한 토양 1 g을 살균수 10 ml에 넣어 토양 현탁액을 만들고 10^{-8} 로 희석하여 사용하였다. 10^{-8} 토양 희석액을 마이크로피펫을 이용하여 100 μ l씩 modified Kuzdas and Morse(mKM; Hornsby et al., 2000) 배지에 분주하였고 루프를 이용하여 전체 도말한 후 28°C에서 3일 동안 배양하였다.

2. 순수분리한 토양 분리균의 형태학적 동정

형태학적 동정을 위하여 mKM 배지에서 자란 분리균을 색, 크기 그리고 형태를 관찰하여 육안 동정하여 제주 토양에 존재하는 토양균의 다양성을 알아보았다. 그 후 *Xhc* 의 전형적인 특징인 색, 크기, 형태와 비슷한 형태를 보인 연노랑, 노랑 그리고 진노랑을 띄고 반짝이며 점액질이며 동그란 균총을 크기별로 Small(1~2mm), Middle(2~4mm), Big(4mm~ over) (ISTA, 2014) 기준으로 육안 동정하여 삼단 분리법으로 순수 분리하였다.

분리된 균은 1.5 ml 마이크로튜브에 살균된 glycerin 30 %가 포함된 Tryptic Soy Broth(TSB; KisanBio Co., Ltd., Seoul, Korea) 배지 1 ml 를 분주한 후 순수 분리된 균을 루프로 수집하여 TSB 배지에 골고루 풀어 보관 균주를 작성하여 보관하였다. 보관 균주를 작성하여 상온에서 1 시간 정도 안정화를 시킨 후 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다. 실험 시 보관된 균을 실온 해동하여 사용하였다(Morinière et al, 1995).

3. 분리균의 분자생물학적 동정

3-1. 분리 세균의 DNA 추출과 PCR 증폭

분리 세균의 total DNA 추출을 위해 보관된 균주 100 µl를 3 ml TSB에 첨가하여

28°C 진탕배양기(HB-201SL, Bucheon, South Korea)에서 80 rpm으로 3 일 동안 진탕배양하였다. 진탕배양액 3 ml 중 2 ml를 2 ml마이크로튜브로 옮겨 세균의 분자생물학적 동정을 위하여 DNeasy Plant mini Kit(Qiagen., Netherlands)를 이용하여 세균의 total DNA를 추출하였다.

제주 당근 토양에서의 세균 다양성을 확인하기 위해 먼저 total DNA의 분자생물학적 동정을 실시하였고 ITS 염기 서열 부분을 universal primer 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')로 PCR Thermal cycler Dice TP600 사용하였으며 조건은 94°C에서 1min denature 후, 94°C에서 30 sec, 57°C에서 30 sec, 72°C에서 1 min 동안 처리하여 총 29 cycle 반복 후 72°C에서 1min 동안 처리하여 해당 DNA를 증폭하였다.

이후 *Xhc*에 350 bp 크기의 유전자를 특이적으로 증폭시키는 specific primer 3SF(5'-CATTCCAAGAAGCAGCCA-3')와 3SR(5'-TCGCTCTTAACACCGTCA-3')를 사용하여 PCR증폭하였다(Meng et al., 2004; Kubilay et al., 2021). 작성된 PCR cocktail은 PCR Thermal cycler Dice TP600(TaKaRa, japan)을 사용하여 95°C에서 5 min denature 후, 94°C에서 15 sec, 58°C에서 20 sec, 72°C에서 30 sec 동안 처리하여 총 35 cycle 반복 후 72°C에서 5 min 동안 처리하여 해당 DNA를 증폭하였다(Kubilay et al., 2021).

PCR증폭은 각각 세균의 total DNA 2 µl, 각각의 primer 1 µl, 10× buffer 5 µl, dNTP 1 µl, MgCl 5 µl, Teq polymerase(iNtRON BioTechnology Inc., Seoul, Korea) 0.25 µl에 나머지는 3차 증류수를 채워 Total Volume 50 µl로 cocktail을 혼합하여 작성하였다. 증폭된 DNA는 1.2 % agarose gel에서 전기영동을 통하여 DNA 증폭 유무를 확인하였다.

3-2. PCR 증폭산물의 sequencing을 이용한 유전자분석

분리균의 DNA sequencing를 위하여 분석전문업체 Macrogen에 의뢰하여 분석하였고 분석된 자료는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 홈페이지의 Basic Local Alignment Search Tool (Blast; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 생물학적 염기서열 간의 유사성 영역의 확인하고 염기서열로 등록되어 있는 데이터베이스와 비교 분석하여 세균의 염기서열의 통계적 유의성을 확인하였다.

3-3. Phylogenetic tree 작성

증폭된 DNA 분석 결과를 유전적 근연관계를 확인하기 위하여 NCBI 홈페이지의 Blast를 이용하여 등록되어 있는 비교 분류할 *Xhc* 및 *X.campastri* 균 10개의 염기서열을 임의 선정하였다. 이후 본 연구에서 분리한 균 15A1-9~15A13-1의 13개 염기서열과 농촌진흥청에서 분양 받은 *Xhc* 2001 1개 균 포함 총 24개의 Sequence를 Alignment 하였고 MEGA (version 11) software을 사용하여 Phylogenetic tree 작성하였다.

4. 코흐의 법칙을 통한 병원균 검증

코흐의 가설에 의거하여 *Xhc*로 동정된 세균을 생체 접종 실험을 실시하였다. 생체 접종 실험을 위하여 당근종자(Dream7)를 50°C 온수에서 20 분간 온탕 소독한 후 파종하여 1 엽이 완개한 당근 모종을 직경 10 cm 포트로 옮겨 심어 3~4 엽이 전개된 당근 모종을 접종에 사용하였다.

제주도 당근 재배 토양에서 분리한 세균 균주 중 15A9-1균주를 TSA배지에 도말하여 28°C에서 24 h동안 배양한 후 멸균수를 이용하여 현탁액을 제조하였고 UV/VIS Spectrophotometer(Optizen POP, Korea)를 이용하여 1.0×10^8 cfu/ml 이 되도록 농도를 조정하였다. 접종원을 건강한 당근 식물체에 분무 접종한 후 상대습도 99%인 생장상 (DA-DC, Dona-A, Korea)에서 온도 28°C, 24 h 동안 보관한 후 온도 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 80 ~ 90%를 유지하는 식물배양실로 옮겨 병징이 나타날 때까지 배양하였다. 비교구로는 농촌진흥청에서 분양 받은 *Xhc* JJ2001를 사용하였으며 무처리구 비교구는 접종원 대신 H₂O를 분무하였다.

분리 세균 균주 15A9-1와 농촌진흥청에서 분양 받은 균주 *Xhc* JJ2001를 통한 인위적인 접종에 의해 감염된 당근 잎에서 발병부위를 5 x 5 mm 크기로 절단하여 1 % 차아염소산나트륨과 70 % 알코올을 이용하여 표면 살균하였다. 살균된 식물조직을 멸균된 면도날을 이용하여 4 등분으로 절단한 후 멸균수 1 ml를 넣고 10 분간 vortexing한 후 상등액 100 μl 를 TSA배지에 도말한 후 28°C에서 3 일 동안 배양하였다. 배양한 세균의 total DNA를 토양에서 분리한 세균 균주에서와 동일한 방법(참고 3-1. 분리 세균의 DNA 추출과 PCR 증폭)으로 추출하였다. 또한 이들을 *Xhc* 특이적으로 프라이머 3S를 이용하여 PCR증폭하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. 당근 세균잎마름병균 채집 및 분포조사

우리나라의 당근 재배는 전국적으로 봄과 가을에 재배한다. 단기간 생산을 위해 하우스 재배를 하고 고랭지 지대에서 여름 재배를 하기도 한다. 본 연구는 제주의 당근 재배 토양에서 *Xhc*의 생존 여부를 최초로 확인하여 재배환경 중 토양을 통한 전염 가능성을 제시하고 당근 세균잎마름병 확산 저지 수단을 수립하는 기초자료를 위해 수행하였다.

제주지역에서는 노지 월동 재배의 형태를 보이는데 이는 제주지역은 온난한 기후의 특성, 화산회토의 유기물 함량, 배수 등의 양질의 토양이 있어 가능하다. 제주도 당근 재배 생산은 화산회토의 사질 양토가 분포되어 있는 제주시 구좌, 성산, 포선 동부지역에 집단화 되어 있다(제주동부농업기술원, 2021. <https://agri.jeju.go.kr/dongbu/local/status.htm>).

21년과 22년 총 2년에 걸쳐 당근 재배지가 가장 많이 분포하는 제주 동부지역의 구좌읍 하도리, 평대리, 김녕리, 월정리, 덕천리, 그리고 행원리의 당근 재배지 농가의 토양을 채취하였고, 본 연구에서는 총 20개 농가의 토양을 선정하였다(Figs. 1, 2).



Fig. 1. Location of area cultivating carrot where soil was collected in this study. Hado-ri, Pyeongdae-ri, Gimnyeong-ri, Woljeong-ri, , Deokcheon-ri and Haengwon-ri form a boundary Gujwa-eup (A) Haengwon-ri 1260-2, (B) Hado-ri 2641-1, (C) Hado-ri 2635-1, (D) Pyeongdae-ri 466, (E) Pyeongdae-ri 465, (F) Haengwon-ri 447-1, (G) Haengwon-ri 1260-6, (H) Haengwon-ri 1260-31, (I) Woljeong-ri 251-3, (J) Woljeong-ri 1016-26, (K) Woljeong-ri 1892, (L) Deokcheon-ri 625, (M) Gimnyeong-ri 308-1, (N) Gimnyeong-ri 181-3, (O) Woljeong-ri 1813, (P) Woljeong-ri 1774, (Q) Woljeong-ri 1400-13, (R) Gimnyeong-ri 467-1, (S) Gimnyeong-ri 84, (T) Gimnyeong-ri 497-5.

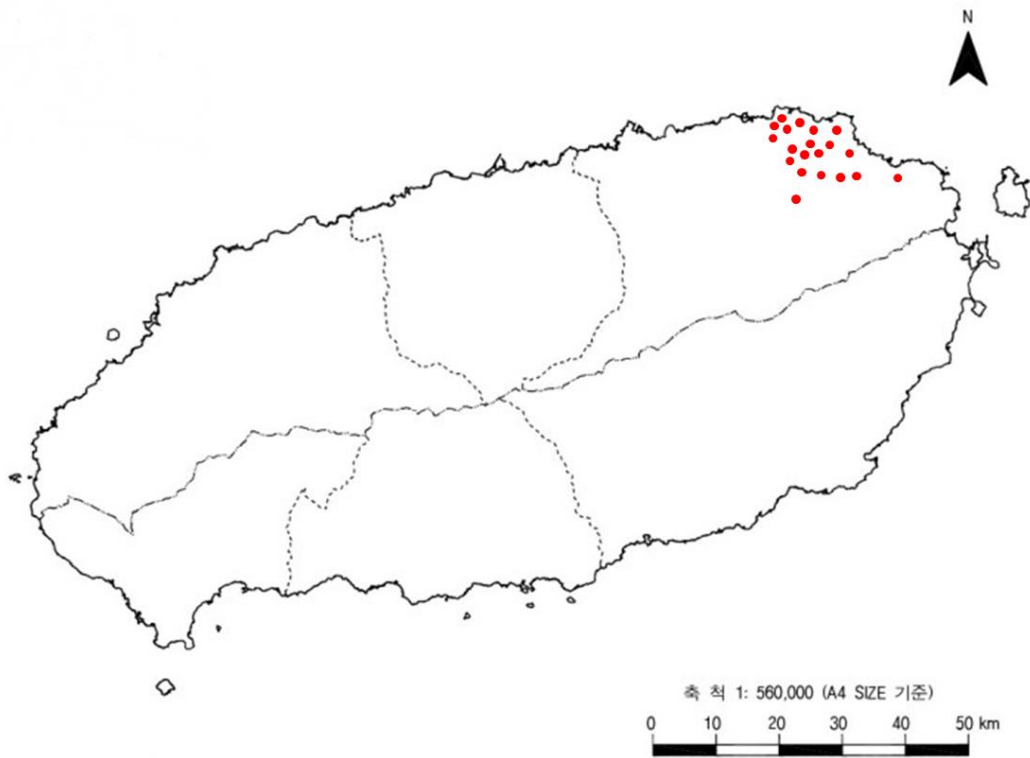


Fig. 2. Location of carrot farms (red spots) isolated *Xhc* in Jeju Island in this study.

2. 토양에서 분리한 세균의 형태학적 동정

토양을 희석하여 도달한 mKM 배지에 자란 분리균을 색, 크기 그리고 형태를 관찰하여 다양한 균종을 육안으로 확인하였다(Table 2). 균분리시 다양한 균종을 관찰할 수 있었는데 노란색, 흰색과 분홍색계열의 균종이 있고, 반짝이거나 탁한 표면과 동그랗거나 퍼지거나 흐르는 형태의 균종과 불록하거나 납작한 형태의 균종 등 다양한 형태의 균종이 관찰되었으며 총 18 그룹의 균종을 선정하여 총 51개 식물병원균들의 분포를 일차적으로 확인하였다(Table 3).

다양한 종의 세균 가운데 *Xanthomonas* sp.가 6%가량 확인이 되었고 식물병원 세균인 *Pseudomonas* sp.가 33%로 많은 부분을 차지하고 있었기에 돌발적 병발병률이 높은 것으로 파악되었다(Table 3, Figs. 3, 4). 확인된 *Xanthomonas* sp.가 어떠한 종인지 정확한 확인을 하기 위해 더 많은 토양샘플을 채취하여 균분리를 진행하였다.

이 후 *Xhc*의 전형적인 특징을 관찰하고 형태학적으로 색, 크기, 형태와 비슷한 형태를 구분하여 연노랑, 노랑 그리고 진노랑을 띄고 반짝이며 점액질이며 동그란 균종을 크기별로 Small(1~2mm), Middle(2~4mm), Big(4mm~ over) (ISTA, 2014)기준으로 107 개의 균을 4 개 그룹으로 육안 동정하였다(Table 4, Fig. 4).

Table 1. Morphological standard of the colonies isolated from the soil cultivating carrot in Jeju Island.

No. of group	Morphological standard
1	Light pink, Convex, Mucoid.
2	Light yellow, Convex, Mucoid.
3	Pink, Convex, Mucoid.
4	Deep Pink, Convex, Mucoid.
5	White, Clear, Watery, Cloud shape.
6	Pale yellow, Convex, Dry.
7	Pale pink, Convex, Dry.
8	Cream, Convex, Dry.
9	Watery Apricot, Convex,
10	Cream, Cloud shape, Dry.
11	Red, Round, Convex, Mucoid.
12	Pale orange, Round, Convex, Dry.
13	Deep yellow, Round, Convex, Dry.
14	Light pink, Dry, Round, Convex, Mucoid.
15	yellow, Convex, Mucoid.
16	Dark orange, Convex, Dry.
17	Watery yellow, Flat, Dry.
18	Cream, Flat, Net, Dry.

Table 2. Blast result of bacterial isolates from the soil cultivating carrot in Jeju Island.

No. of isolates	Primer	Scientific Name	E Value	Accession no.	Identity
15A1-9	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	2e-132	AB795020.1	100%
15A1-9	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	3e-120	CP011256.1	97%
15A2-7	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	5e-148	AB795020.1	98%
15A2-7	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	3e-145	CP011256.1	97%
15A3-3	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	2e-161	AB795020.1	99%
15A3-3	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	2e-147	CP011256.1	97%
15A4-6	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	4e-153	AB795020.1	98%
15A4-6	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	8e-146	CP011256.1	97%
15A5-1	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	3e-159	AB795020.1	99%
15A5-1	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	8e-146	CP011256.1	97%
15A6-1	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	1e-148	AB795020.1	97%
15A6-1	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	2e-147	CP011256.1	97%
15A7-1	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	2e-147	AB795020.1	99%
15A7-1	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	2e-132	CP011256.1	96%
15A8-1	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	1e-139	AB795020.1	99%
15A8-1	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	5e-128	CP011256.1	97%
15A9-1	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	3e-155	AB795020.1	99%
15A9-1	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	4e-148	CP011256.1	97%
15A10-1	3SF	-	-	-	-
15A10-1	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	4e-124	CP011256.1	98%
15A11-2	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	2e-136	AB795020.1	98%
15A11-2	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	6e-127	CP011256.1	96%
15A12-1	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	2e-141	AB795020.1	99%
15A12-1	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	5e-128	CP011256.1	97%
15A13-1	3SF	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	4e-144	AB795020.1	98%
15A13-1	3SR	<i>Xanthomonas campestris</i>	5e-133	CP011256.1	98%

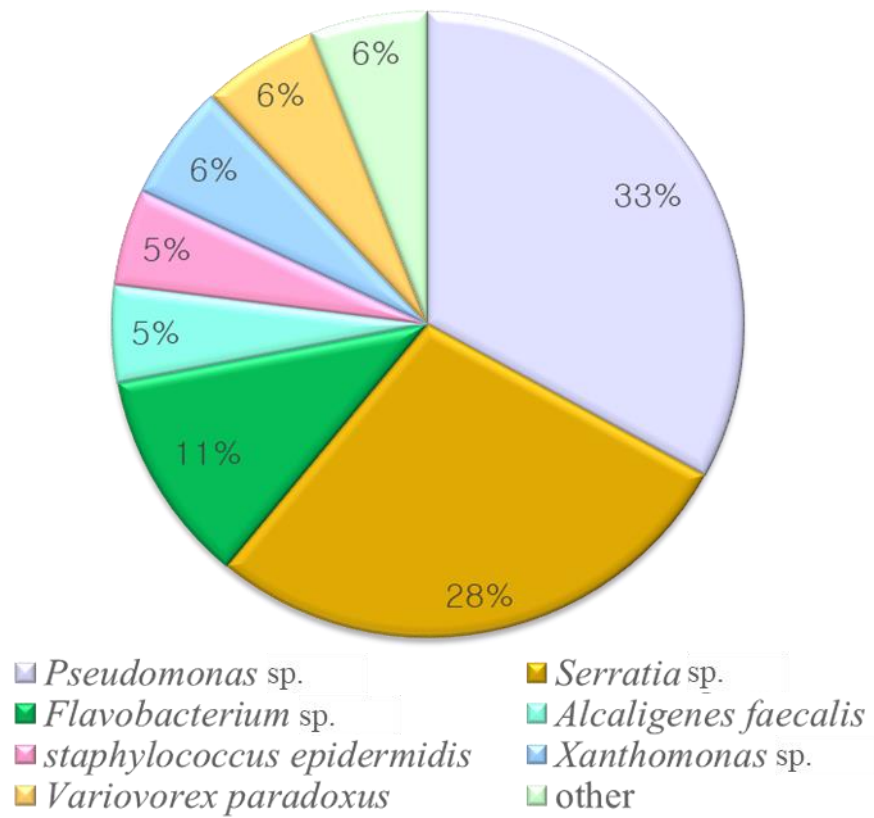


Fig. 3. Biodiversity of bacterial isolates from the soil cultivating carrot in Jeju Island.

Table 3. Morphological standard of the bacterial colonies showing the typical characteristics like *Xhc* on mKM medium.

No. of group	Morphological standard
1	Yellow, Small [*] , Convex, Muroid.
2	Yellow, Big, Convex, Muroid.
3	Light Yellow, Small, Convex, Muroid.
4	Light Yellow, Middle, Convex, Muroid.

^{*}Small (1~2mm), Middle (2~4mm), Big (4mm~ over).

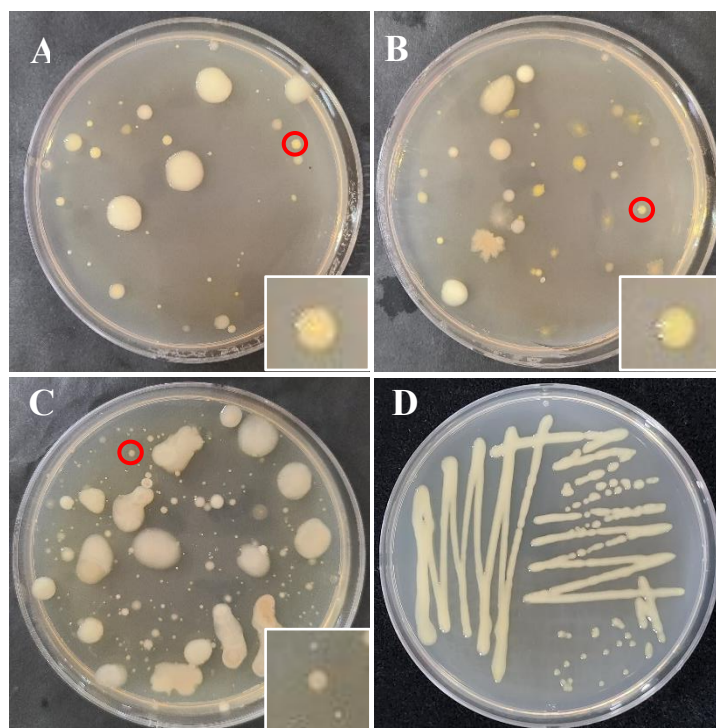


Fig. 4. Bacterial colonies (A-C) and single colony by streaking (D) on mKM medium from the carrot cultivating soil in Jeju Island. Red circles were selected as candidates for diagnosis by molecular biological analysis and the square boxes on right sides of each figure are magnified parts around red circles.

3. 분리균의 분자생물학적 동정

3-1. 분리 세균의 DNA 추출과 PCR 증폭

육안 동정의 경우 표현형적인 기술의 필요성이 인정되기는 하지만 온도, pH 조건, 공기조건, 다양한 항생제나 효소 등에 따라 균총의 색깔, 크기, 형태들이 달라질 수 있다는 점에서 합리적인 양의 노력과 시간 내에 변별력 있는 표현형적인 특성을 찾아내기가 어렵다(Kim and Jang, 2012). 그리하여 육안으로 균총의 특성을 관찰한 후 정확한 동정을 위해 분리한 세균의 DNA 염기서열 분석을 통한 동정을 수행하였다.

먼저 제주 당근 토양에서 발견되는 세균들의 다양성을 확인하기 위하여 서로 다른 특징을 가진 균 51 개를 모두 universal primer 를 사용하여 total DNA 추출을 하였고, 전기영동으로 확인하였다(Fig. 5). 전기영동 확인 결과 15-2 균에서 *Xanthomonas* sp.가 확인되었고, 분리균의 형태학적 특징이 노란색의 동그랗고 점액질인 특징을 가진 것을 확인하였다(Table 2).

이후 *Xhc*의 존재가능성을 염두해두고 *X. hortorum* 균총의 전형적인 특징을 가진 노란색의 점액질이며 볼록한 모양의 전형적인 형태를 확인하여(Saddler and Bradbury, 2015) *Xhc* 특징이 아닌 균들은 배제하고 *Xhc*의 전형적인 특징의 균총들 107 개를 선별하여 구분기준을 마련하고 그 기준에 따라 44 개의 균들에 대하여 Total DNA 추출을 시행하였다.

채집균주 total DNA의 분자생물학적 동정을 위하여 먼저 universal primer 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')로 ITS

염기 서열 부분을 PCR 을 수행하여 증폭하였다(Fig. 6). total DNA 추출을 시도한 44 개의 균들 중 *Xhc* 특이적으로 증폭시키는 350 bp 크기의 specific primer 3S(Forward: 5'-CATTCCAAGAAGCAGCCA-3', Reverse: 5'-TCGCTCTTAACACCGTCA-3')로 증폭한 결과 13 개의 균이 350 bp 에서 증폭되었다(Fig. 7).

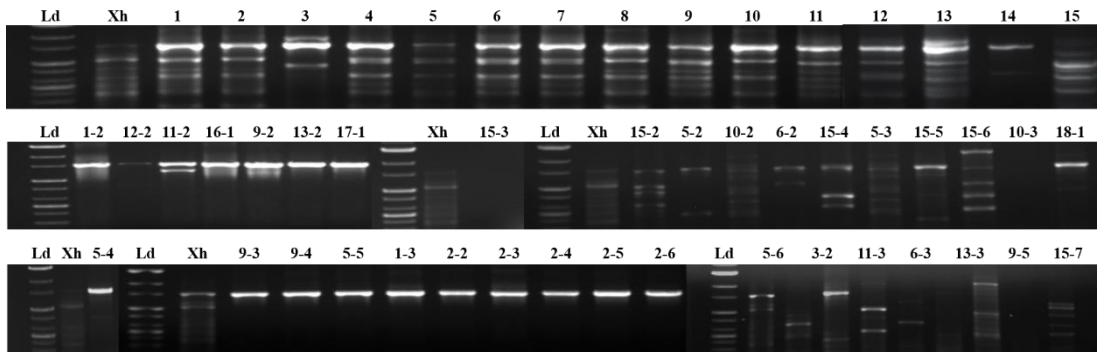


Fig. 5. Electrophoresis images of PCR product of bacterial isolates from the soils cultivating carrot in Jeju Island. The total DNA were amplified with universal primers 27F and 1492R. Ld: 1-kb DNA ladder (BIOFACT, Co. Ltd.), Xh: *X. hortorum* pv. *carotae*, the rest lanes: bacterial isolates.

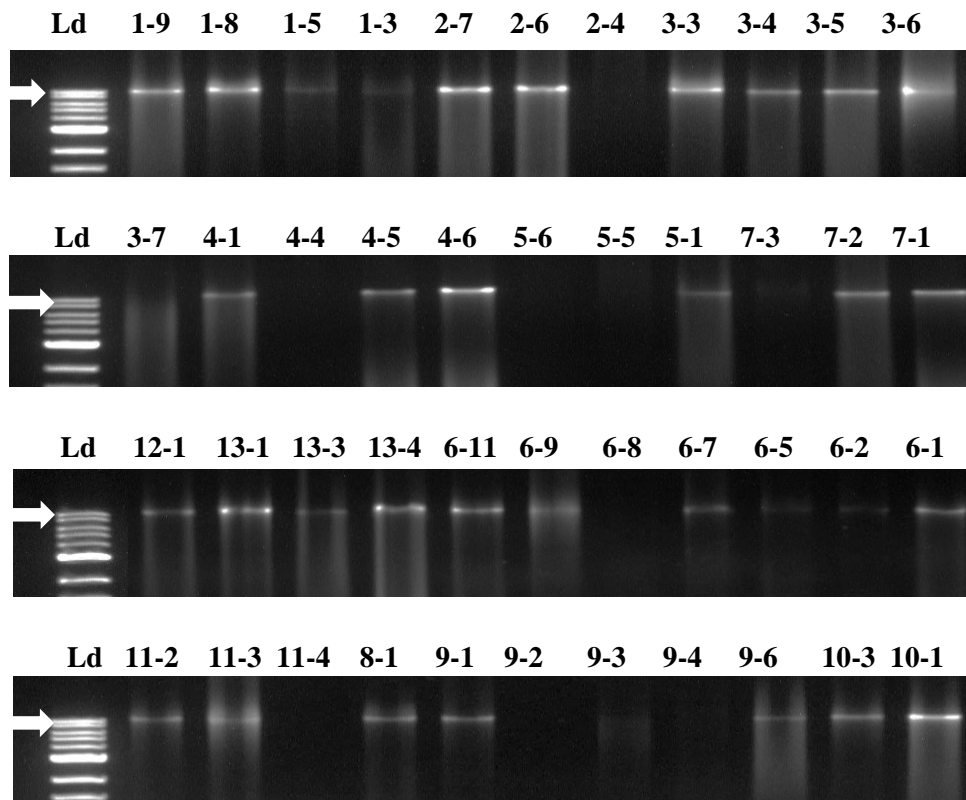


Fig. 6. Electrophoresis images of the total DNA product of bacterial isolates from the soils cultivating carrot in Jeju Island. The total DNA were amplified with universal primer 27F and 1492R. Ld: 1-kb DNA ladder (BIOFACT, Co. Ltd.), arrow = 10 kb.

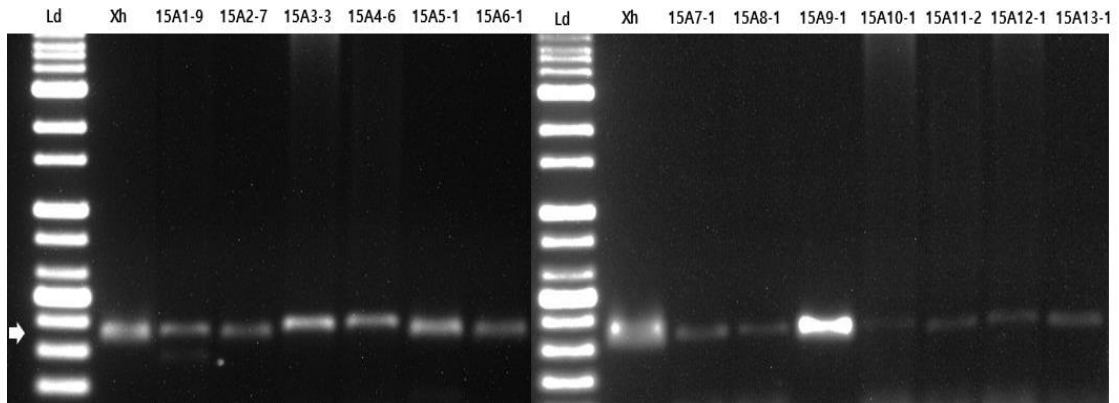


Fig. 7. Gel electrophoresis images of PCR products of bacterial isolates from the carrot cultivating soil in Jeju Island using specific primer 3SF and 3R. Ld: 1-kb DNA ladder (BIOFACT, Co. Ltd.) Xh: *X. hortorum* pv. *carotae*, lane 15A1-9~15A13-1: bacterial isolates from the carrot cultivation soil in Jeju Island. Arrow = 350 bp.

3-2. 분리 세균의 DNA sequence 분석과 NCBI 비교분석 결과

증폭된 13개의 보다 정확한 동정을 위해 증폭한 DNA 부분을 sequencing하였다. 분석전문업체인 NCBI의 Blast를 이용하여 분석하였더니 15A10-1균주를 제외하고 12개 균주의 모두 *Xhc*로 동정되었다(Table 5). 동정된 균 중 15A9-1의 chromatogram을 확인하였고(Fig. 8A) 15A9-1은 BLAST를 통해 accession number AB795020와 query sequence가 100% 동일함을 확인하였으며(Fig. 8B), *Xhc*를 특이적으로 증폭시키는 프라이머 3S를 통해 15A9-1이 *Xhc*와 동일함을 확인하였다(Fig. 8C).

PCR 기법은 세균의 16S나 23S rRNA를 증폭하여 염기서열을 분석하는데 이용하는 방법으로 분류 동정에서 흔히 쓰인다. 본 연구에서 인공 배지에서 형태적으로 *Xhc*와 유사한 특성을 나타내는 세균의 DNA 염기 서열을 분석한 결과 *Xhc* 뿐만 아니라 *X. comperstris*로 동정되었다(Table 4). 이는 다른 연구에서도 *Xhc*로 식별된 대부분의 균주가 *Xhc*가 아닌 다른 종의 *Xanthomonas*으로 동정되는 경우가 보고되었다(Dupas et al., 2023; Morinière et al., 1995; Ritchie and Dittapongpitch, 1991). 게다가 *Xhc*균주는 한동안 구분되어진 pathovar 외에도 이미 비병원성 균주를 군집화하는 것으로 알려진 *X. abericola* 및 *X. campestris*로 그룹화되어 있었다(Merda et al., 2017; Hong et al., 2020).

Table 4. Blast result of bacterial isolates from the soil cultivating carrot in Jeju Island.

No. of isolates	Primer	Scientific Name	E-value	Accession no.	Identity (%)
15A1-9	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	1e-93	AB795020.1	100
15A2-7	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	1e-131	AB795020.1	100
15A3-3	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	6e-148	AB795020.1	100
15A4-6	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	7e-142	AB795020.1	99
15A5-1	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	2e-133	AB795020.1	100
15A6-1	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	4e-143	AB795020.1	100
15A7-1	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	2e-142	AB795020.1	100
15A8-1	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	7e-137	AB795020.1	99
15A9-1	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	3e-141	AB795020.1	100
15A10-1	3S	<i>Xanthomonas campestris</i>	4e-124	CP011256.1	98
15A11-1	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	4e-134	AB795020.1	98
15A12-1	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	7e-137	AB795020.1	99
15A13-1	3S	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	1e-139	AB795020.1	98

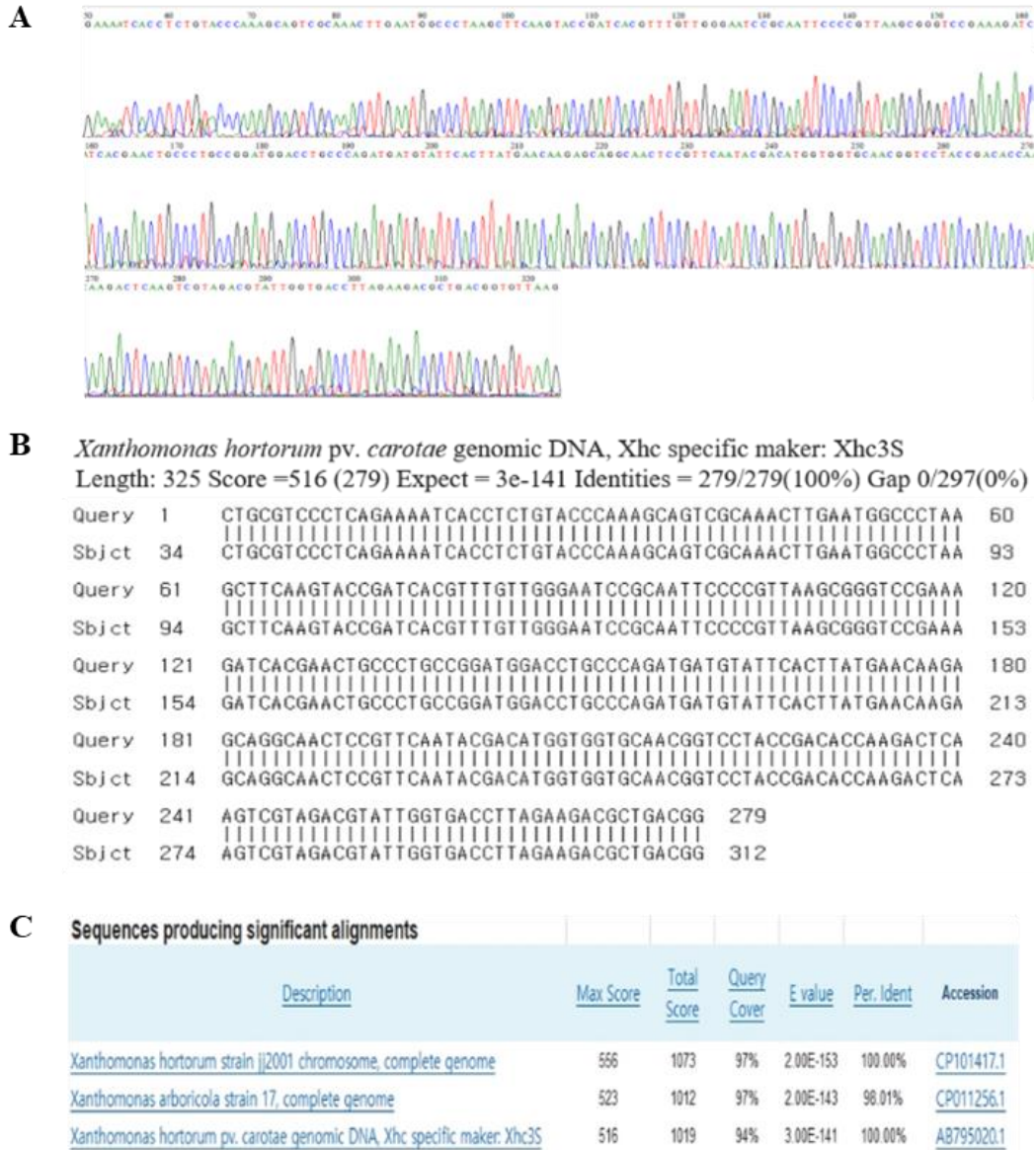


Fig. 8. Bacteria identification of the of bacterial isolates from the soils cultivating carrot in Jeju Island. (A) Representative chromatogram of DNA 15A9-1 sequence among the isolates. (B) Representative sequence alignment between the query sequence of the isolates DNA 15A9-1 with accession number AB795020. (C) BLAST analysis of DNA 15A9-1 in specific primer 3S for amplifies of the *X. hortorum* pv. *carotae* .

3-3. Phylogenetic tree 작성 결과

*Xhc*는 1931년 캘리포니아에서 *Pseudomonas carotae*라는 이름으로 발견되었다(Kendrick, 1934). 이후 1939년 새로운 분류체계를 제한하여, *Pseudomonas*속에서 노란색의 콜로니를 형성하는 균종을 *Xanthomonas*속이라는 이름으로 재분류하였다(Dawson, 1939). 박테리아 분류학에서 “pathova”라는 용어가 1978년에 만들어졌고, *Xanthomonas* pv. *carotae*가 *X. comperstris*종으로 포함되었다(Young et al., 1978).

Xanthomonas comperstris pv. *carotae*는 1993년에 DNA-DNA 교잡(DNA-DNA hybridization) 연구 방법을 통해 최종적으로 *X. hortorum*종으로 구분되었다(Palleroni and Bradbury, 1993; Amann et al., 1995). 따라서 이러한 계통적 위치와 속명의 변화에 의해 *Xhc*와 *X. comperstris* 간의 유사성이 매우 높다고 할 수 있다(Dia et al., 2022; Dupas et al., 2023).

Multilocus Sequence Analysis(MLSA)는 1998년부터 분류학적 목적을 위해 속과 종 간의 계통발생적 관계를 추론하는 방법으로 세균을 보다 정확한 동정을 하는데 이용되고 있다(Andreas et al., 2003). MLSA 체계는 서로 다른 부분의 유전자 시퀀스 혹은 부분 유전자 집합 등을 기반으로 하여 연구 간의 다중적 비교를 한다. 실제로 *Xhc*로 동정된 결과 중 MLSA로 동정한 결과 그 중 한균주만 *Xhc*로 동정되었다(Catara et al., 2021).

비록 본 연구에서는 MLSA체계를 활용하여 비교하지는 않았지만 분리한 균 15A1-9~15A13-1의 13개 염기서열의 계통적 위치를 확인하여 제주 토양에서 분리해 낸 균주들이 *Xhc*임을 확인하기 위하여 NCBI에 등재되어 있는 *Xhc* 균주 및 *X.campanstris* 균주 중 10개의 염기서열을 임의 선정하였다. 이후 농촌진흥청에서 분양 받은 *Xhc* JJ 2001 1개 균주 포함 총 24개의 Sequence를 Alignment 하였고 MEGA (version 11)

software을 사용하여 Phylogenetic tree 로 분석 결과 24개의 균주는 2그룹으로 나뉘었다.

제주 당근 토양에서 분리한 *Xhc* 13개 균주 모두 농촌진흥청에서 분양 받은 균주 *Xhc* JJ2001와 NCBI BLAST에 등록된 균주 *Xhc* 3S가 하나의 그룹으로 묶인 것을 확인하였고 이는 동일한 *Xhc* 로 판단하였다(Fig. 9).

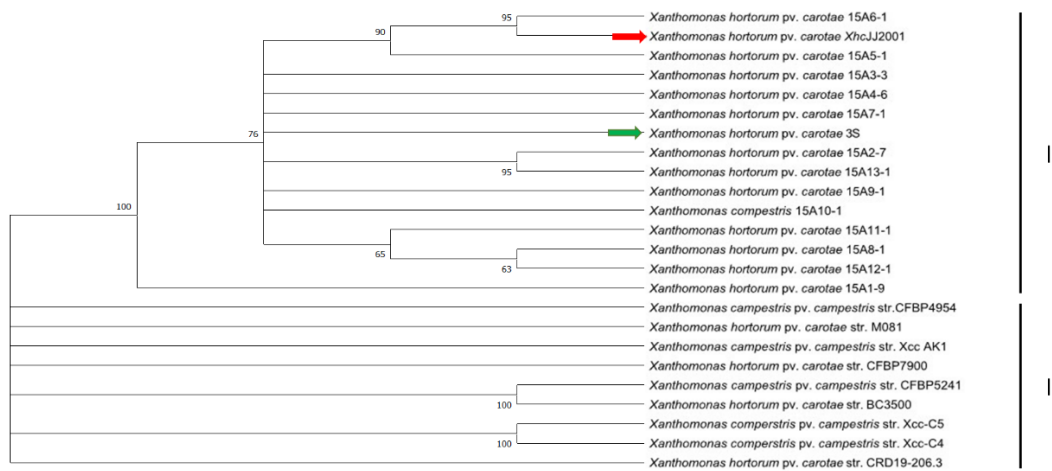


Fig. 9. Phylogenetic tree of the bacterial isolates from the soils cultivating carrot in Jeju Island. There were two groups; Group I were consisted with mostly the bacterial isolates from the soil cultivating carrot in Jeju Island (15A-1~15A-13) including strain *XhcJJ2001* from National Institute of Agricultural Sciences (rad arrow) and strain *Xhc3S* (green arrow) registered in NCBI including strain. Group II were the bacterial strains registered as *Xhc* in NCBI.

4. 코흐의 법칙을 통한 병원균 검정 결과

본 연구에서는 비록 MLSA를 통한 동정을 실시하지 않았지만 *Xhc* 특이적 primer를 이용하여 증폭된 유전자 산물을 blast를 통한 동정이 이루어졌고, 당근 잎에 형성되는 병징을 25일 동안 관찰하고 발병부위를 확인하여 코흐의 법칙에 의해 병징 부위에서 세균을 분리하였다.

접종 후 25일 무처리구의 당근 잎에는 병반이 나타나지 않았지만(Fig. 10A) 비교구로 사용한 농촌진흥청에서 분양 받은 *Xhc* 현탁액을 접종한 당근 잎(Fig. 10B)과 본 연구에서 분리한 15A9-1균주를 접종한 잎(Fig. 10C)에서는 당근 세균잎마름병의 전형적인 병징이 관찰되었다. *Xhc*에 특이적으로 350 bp 크기의 유전자를 증폭하는 프라이머를 사용하여 PCR 증폭된 DNA를 1.2 % agarose gel에서 전기영동 하였더니 분리 균주 15A9-1와 분양 받은 균주 *Xhc* JJ2001 모두 350 bp 에서 증폭됨을 확인하였다 (Fig. 10D).

코흐의 법칙에 따라 제주 당근 주재배지인 조천읍에 당근 세균잎마름병의 전형적인 병징을 확인한 후 당근 재배 토양에서 *Xhc*를 분리배양 했으며, 순수배양한 병균을 건강한 당근 생체에 접종하여 당근 세균잎마름병과 동일한 병징이 관찰되었고 재분리하여 *Xhc*와 동일한 350 bp 에서 확인하였다.



Fig. 10. Photographs of carrot leaves (A) H₂O treated control, (B) inoculated with *Xhc* JJ2001 and (C) inoculated with the bacterial strain 15A9-1 from the soil cultivating carrot in Jeju Island. The photographs were taken at 25 days after inoculation. (D) Gel electrophoresis images of PCR products of bacterial isolates re-isolated from the artificial infected carrot leaves using specific primer 3S (Forward: 5'-CATTCCAAGAAGCAGCCA-3', Reverse: 5'-TCGCTCTTAACACCGTCA-3'). Ld: 1-kb DNA ladder (BIOFACT, Co. Ltd.), 1: *Xhc* JJ2001, 2: bacterial isolate 15A9-1. Arrow = 350 bp.

V. 적 요

본 연구는 제주도 당근 재배지 토양에서 분리한 세균 중 국내검역대상 병이었던 당근 세균잎마름병을 일으키는 식물병원세균인 *Xhc*를 인공배지에서 균총의 형태적 동정 및 DNA염기 서열 분석을 통한 분자생물학적 동정으로 그 존재를 확인하였다. 본 연구에서는 비록 MLSA를 통한 동정을 실시하지 않았지만 *Xhc*특이적 primer를 이용하여 증폭된 유전자 산물을 blast를 통한 동정이 이루어졌으며 또한 코흐의 법칙에 의한 결과를 통해 분리한 세균이 *Xhc*로 동정된 것을 확인할 수 있었다.

따라서 제주도 당근 재배지 토양에서 분리한 세균 중 국내검역대상 병이었던 당근 세균잎마름병을 일으키는 식물병원세균인 *Xhc*를 인공배지에서 균총의 형태적 동정 및 DNA염기 서열 분석을 통한 분자생물학적 동정으로 그 존재가 확인되었다. 본 연구 결과는 제주도 토양 내 *Xhc*의 존재 가능성을 시사하고 앞으로의 당근 세균잎마름병 방제 수단을 강구하는데 매우 필요한 자료로서 가치가 있다고 본다.

VI. 참고 문헌

- 유영봉 그리고 현공남, 1995, 제주 신선당근의 대일 수출경쟁력에 관한 경제분석. 사회발전연구 11 기. 제 D 집. pp119-149.
- 제주동부농업기술원. 2021. <https://agri.jeju.go.kr/dongbu/local/status.htm>. 농림축산식품부 농업경영체등록정보통계.
- Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Reviews*. 59(1): 143-169.
- Andreas, K., Helge, K., Thomas, B., Thomas, F., Sebastian, S., Herbert, S. 2003. Multilocus sequence analysis of *Porphyromonas gingivalis* indicates frequent recombination. *Microbiology*. 149(2): 2407-2415.
- Arnaud, G. 1920. Une maladie bactérienne du lierre (*Hedera helix* L.). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 171, 121-122.
- Bastas, K. K., Butt, H. and Gur, A. 2021. Seedborne bacteria of orange and black colour carrots in Turkey. *International Journal of Phytopathol*. 10: 203-214.
- Brown, N.A. 1918. Some bacterial diseases of lettuce. *Journal of Agricultural Research*, 13, 367-388.
- Brown, N.A. 1923. Bacterial leaf spot of geranium in the eastern United States. *Journal of Agricultural Research*, 23, 361-372.
- Burkholder, W.H. and Guterman, C.E.F. 1932. Synergism in a bacterial disease of *Hedera helix*. *Phytopathology*, 22, 781-784.

- Catara, V., Cubero, J., Pothier, J. F., Bosis, E., Bragard, C., Đermić, E. et al. 2021. Trends in Molecular Diagnosis and Diversity Studies for Phytosanitary Regulated *Xanthomonas*. *Microorganisms* 2021, 9, 862.
- Coenye, T., Gevers, D., De Peer, Y.V., Vandamme, P., and Swings, J. 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS microbiology reviews*, 29(2), 147-167.
- Dia, N. C., Morinière, L., Cottyn, B., Bernal, E., Jacobs, J. M., Koebnik, R., et al. 2022. *Xanthomonas hortorum* – beyond gardens: Current taxonomy, genomics, and virulence repertoires. *Molecular Plant Pathology*. 23(5): 597-621.
- Dowson, W. J. 1939. On the systematic position and generic names of the Gram-negative bacterial plant pathogens. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, 2. 00: 177-193.
- Dowson, W. J. 1943. On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. *Transactions of the British Mycological Society*, 26, 4–14.
- Dupas E., Durand K., and Jacques M.A. 2023. Analysis of the worldwide diversity of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*, the agent of bacterial blight of carrot, reveals two distinct populations. bioRxiv. France.
- Du Toit, L. J., Derie, M. L., Christianson, C. E., Hoagland, L., and Simon, P. W. 2014. First report of bacterial blight of carrot in Indiana caused by *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*. *Plant Dis*. 98(5): 685.
- Dye, D. W. and Lelliott, R. A. 1974. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 8th edition: 243-249. Eds. R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. Williams & Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
- Gilbertson, R. L. 2002. Bacterial leaf blight of carrot. in: Compendium of

- Umbelliferous Crop Diseases. *American Phytopathological Society*, pp 11-12. St. Paul, MN.
- Goodfellow, M. and O'Donnell, AG., Handbook of New Bacterial Systematics. London; Academic Press, 1993.
- Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., et. al. 2001. US DOE Joint Genome Institute; Initial sequencing and analysis of the human genome. *ature*.409.6822: 860-921.
- Hornsby, R. L., Jensen, A. E., Olsen, S. C., and Thoen, C. O. 2000. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. *Veterinary Microbiology*, 73(1), 51-60.
- Hong, Y.S., Choi., I.G. Lee., Y.J. Lim., Park. S.W., Nam. B.W., et al. 2020. Investigation of Prohibited Seed-Borne Plant Pathogenic Bacteria in Korea. *Res. Plant Dis*. 26(3): 134-143.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2014. Detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* on *Daucus carota* (carrot). International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. Switzerland. EU.
- Kendrick, J. B. 1934. Bacterial blight of carrot. *J. Agric. Res.* 49: 493-510.
- Kim, Y. S., and Jang, S. J. 2012. Basic Concepts of Bacterial Taxonomy. *orean Journal of Clinical Microbiology*, 5(3): 79-87.
- Konstantinidis, K.T., and Tiedje, J.M. 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7), 2567-2572.
- Kuan, T.L., Minsavage, G.V., and Gabrielson, R.L. 1985. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* in carrot seed. *Plant Dis*. 69: 758-760.

- Kwon, M., Ryu, K., Kim, J., and Shin, G. 2007. Occurrence pattern of pests in carrot fields and effect of plant debris removal after harvest at highland area. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, (4): 316-321.
- Lee, S., Park, J., Lee, O. M., and Shin, Y. G. 2013. Plant quarantine isolated cultivation system in Korea and results of recorded in 2005-2012. *orean Journal of Agricultural Science*, 0(4), 281-287.
- Lindau, G. 1894. Der Epheukrebs. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten*, 4(1), 1-3.
- Meng, X. Q., Umesh, K. C., Davis, R. M., and Gilbertson, R. L. 2004. Development of PCR- based assays for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, the carrot bacterial leaf blight pathogen, from different substrates. *Plant Dis.* 88(11):1226-1234.
- Merda, D., Briand, M., Bosis, E., Rousseau, C., Portier, P., Barret, M. et al. (2017). Ancestral acquisitions, gene flow and multiple evolutionary trajectories of the type three secretion system and effectors in *Xanthomonas* plant pathogens. *Molecular ecology*, 26(21), 5939-5952.
- Morinière, L., Burlet, A., Rosenthal, E. R., Nesme, X., Portier, P., Bull, C. T., et al. 2020. Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol *et al.* 2000 emend. Timilsina *et al.* 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin *et al.* 1995. *Systematic and Applied Microbiology*. 43(4): 126087.
- Myung. I. S., Yoon. M. J., Lee. J. Y., Kim. G. D., Lee. M. H., Hwang. E. Y. et al. 2014. First Report of Bacterial Leaf Blight of Carrot Caused by *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in Korea. *Plant Dis.* 98(2):275.

- Niederhauser, J.S. 1943. A bacterial leaf spot and blight of the Russian dandelion. *Phytopathology*, 33, 959–961.
- Nishiyama, K., Fukunishi, T., Terada, T., and Ezuka, A. 1979. Bacterial blight of carrot *Daucus carota* var. *sativa* caused by *Xanthomonas carotae* a bacterial disease new to Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*. 45(5): 683-688.
- Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43, 606–609.
- Palleroni, N.J., Hildebrand, D. C., Schroth, M. N., and Hendson, M. 1993. Deoxyribonucleic acid relatedness of 21 strains of *Xanthomonas* species and pathovars. *Journal of Applied Bacteriology*. 75(5), 441–446.
- Palomo, J. L., Shima, M., Monterde, A., Navarro, I., Barbé, S., and Marco-Noales, E. 2021. First Report of Bacterial Leaf Blight Caused by *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* on Carrots in Spain. *Plant Disease* 105, 2712.
- Park, Y. B., Kim, Y. D., and Moon, J. S. 2001. Selection of the Optimum Varieties of Carrots in Jeju Island. *Journal of Bio-Environment Control*. 10 (2), 136-139.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J. and Stead, D. 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 264–274.
- Pfleger, F. L., Harman, G. E., and Marx, G. A. 1974. Bacterial Blight of Carrots: Interaction of Temperature, Light and Inoculation Procedures on Disease Development of Various Carrot Cultivars. *Phytopathology*. 64(5):746-749.
- Pushkarev, D., Neff, N. F., and Quake, S. R. 2009. Single-molecule sequencing of an individual human genome. *Nature biotechnology*, 27(9), 847-850.

- Ritchie, D. F., and Dittapongpitch, V. A. N. L. A 1991. Copper- and Streptomycin-resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Dis.* 75(7): 733-736.
- Saddler, G. S., and Bradbury, J. F. 2015. *Xanthomonas*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1-53.
- Scott, J. C., and Dung, J. K. 2020. Distribution of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* populations in naturally infested carrot seed lots. *Plant Disease*, 104(8), 2144-2148.
- Starr, M.P. and Burkholder, W.H. 1942. Lipolytic activity of phytopathogenic bacteria determined by means of spirit blue agar and its taxonomic significance. *Phytopathology*, 32, 598–604.
- Stone, G.E. and Smith, R.E. 1898. A disease of the cultivated Geranium. Massachusetts Agricultural Experiment Station Annual Report Botany, 10, 164.
- Stone, G.E. 1907. Massachusetts Agricultural Experiment Station Annual Report Botany. *Bacterial disease of lettuce*. 19, 163–164.
- Umesh, K. C., Davis, R. M., and Gilbertson, R. L. 1998. Seed contamination thresholds for development of carrot bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*. *Plant disease*, 82(11), 1271-1275.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45, 472–489.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., et al. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Evol Microbiol.* 37(4): 463-464.

Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G., and Robbs, C.F. 1978.

A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21(1), 153–177.

Young, J.M., Park, D.C., Shearman, H.M. and Fargier, E. 2008. A multilocus

sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 366–377.