



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](#)

博士學位論文

한국의 양식 넙치에서 발생하는
여윌병의 원인 분석

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

金承鎬

2016년 2월

한국의 양식 넙치에서 발생하는 여웬병의 원인 분석

指導教授 鄭 竣 範

金 承 鎔

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2016 年 2 月

金承鎔의 理學博士 學位論文을 認准함

심사위원장 송준복 (서명)
위 원 허문수 (서명)
위 원 강봉조 (서명)
위 원 전려진 (서명)
위 원 김준범 (서명)

濟州大學校 大學院

2016 年 2 月

THESIS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

Analysis of the cause of emaciation disease
in cultured olive flounder, *Paralichthys*
olivaceus in Korea

Seung Min Kim

(Supervised by professor Joon Bum Jeong)

Department of Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2016

목 차

목 차.....	i
Summary.....	V
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF TABLES.....	xii
제 1장. 제주도 여壼증상 넙치로부터 분리한 점액포자충의 특성 분석.....	1
1.1. 서 론.....	1
1.2. 재료 및 방법.....	3
1.2.1. 바이러스성 및 세균성 질병검사.....	3
1.2.2. 여壼증 진단을 위한 primer set 제작.....	5
1.2.3. 실험어.....	9
1.2.4. DNA 분리.....	11
1.2.5. PCR 및 DNA sequencing.....	11
1.2.6. 병리조직학적 분석.....	11
1.3. 결 과.....	12
1.3.1. 외부 및 내부증상.....	12
1.3.2. PCR 진단법 개발 및 적용.....	13
1.3.3. 양식장별 감염률.....	15
1.3.4. 개체별 감염률.....	15
1.3.5. 크기별 감염률.....	19
1.3.6. Fish weight (index).....	20
1.3.7. 병리조직학적 검사.....	21
1.3.8. 염기서열 분석.....	23
1.4. 고 찰.....	25

제 2장. 2014-2015년도 한국산 양식 넙치에 대한 여윌증 감염 조사.....	28
2.1. 서 론.....	28
2.2. 재료 및 방법.....	30
2.2.1. 2014년도 양식넙치 여윌증 모니터링.....	30
2.2.2. 2015년도 양식넙치 여윌증 모니터링.....	32
2.2.3. DNA 분리.....	33
2.2.4. PCR.....	33
2.2.5. Cohabitation test.....	34
2.2.6. 병리조직학적 검사.....	36
2.3. 결 과.....	37
2.3.1. 2014년도 양식장 시기별 감염률.....	37
2.3.2. 2014년도 크기별 감염률.....	39
2.3.3. 2015년도 양식장 시기별 감염률.....	39
2.3.4. 검출된 넙치의 병리조직학적 검사.....	42
2.3.5. Cohabitation test	44
2.4. 고 찰.....	48
제 3장. 여윌증 넙치, <i>Paralichthys olivaceus</i> 의 비특이적 면역반응 및 혈액학적 분석....	50
3.1. 서 론.....	50
3.2. 재료 및 방법.....	52
3.2.1. 실험어.....	52
3.2.2. DNA 분리.....	52
3.2.3. PCR.....	52
3.2.4. 혈액분석 및 비특이적 면역 반응.....	53

3.2.5. 통계학적 분석	54
3.3. 결 과	55
3.3.1. PCR	55
3.3.2. 혈액학적 검사	57
3.3.3. 비특이적인 면역 분석	60
3.4. 고 찰	62
제 4장. 여壼증의 원인규명을 위한 계통분석학적 동정	64
4.1. 서 론	64
4.2. 재료 및 방법	66
4.2.1. 실험어	66
4.2.2. 현미경 검사	66
4.2.3. Primers 제작	66
4.2.4. DNA 분리	68
4.2.5. PCR 및 sequencing	68
4.2.6. 계통학적 분석	68
4.3. 결과 및 고찰	71
4.3.1. 계통학적 분석	71
4.3.2. 포자 관찰	77
제 5장. 감염넙치의 각 내부장기에 대한 <i>Parvicapsula</i> sp.의 양적 분석	79
5.1. 서 론	79
5.2. 재료 및 방법	81
5.2.1. 실험어	81
5.2.2. DNA 분리	81

5.2.3. PCR	81
5.2.4. Real-time PCR	83
5.2.5. 병리조직학적 검사	83
5.3. 결 과	84
5.3.1. PCR	84
5.3.2. Real-time PCR의 검량선	86
5.3.3. Real-time PCR을 이용한 장기별 감염 농도	88
5.3.4. 병리 조직학적 검사	91
5.4. 고 찰	93
종합요약	95
참고문헌	99
감사의 글	107

Summary

The olive flounder industry, a representative species of domestic aquaculture industry, has shown steady and continuous growth since artificial seedling production technique was developed in National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI) early 1980's. As it is a species with aquaculture history longer than 30 years, the study of its diseases has a wide variety compared with that of other species. But in Korea, researches on diseases of cultured fishes have been limited and focused only on several specific diseases (Kim et al., 2006; Cho et al., 2008; Kim et al., 2010), and there are few researches on diseases of which the causes are not known.

Recently about 20cm long olive flounders in farms on Jeju Island had been increasingly thinner and perished within 1~3 weeks. Unlike Japan, where the causes of emaciation disease were found, there's no report on its causes in Korea.

In this study, to identify emaciation infection in cultured olive flounders in Korea, a primer set useful for aquaculturing olive flounder was developed and a test method was established and applied to the fields. In addition, the features of emaciation were identified using PCR, microscopy, histopathological examinations, molecular phylogenetic systematic, real-time PCR etc. and experiments were performed to determine the causes of emaciation.

To analyze the causes of emaciation of olive flounders with emaciation symptoms in Korea, a primer set identical with MM18Sf/MM18Sr primer set was developed. The MM18Sf/MM18Sr primer set had been made from small subunit ribosomal DNA gene (SSU rDNA) of *E. leei* reported as the cause of emaciated turbot in Japan. In the PCR test, for which DNA was taken from intestinal tissue of emaciated olive flounders in Korea, all of them showed negative reactions. We made the EM-F/EM-R primer set from the base sequences of the *Myxidium* sp., which is registered in GenBank (NCBI, USA). The primer set was applied to emaciated olive flounders in Korea, and the response was positive. Therefore we came to use it for examining emaciated olive flounders in Korea.

To observe the infected area in the emaciated olive flounders, PCR was performed on extracted kidneys, intestines, spleens, brains, livers and gills. Whereas the causes were found mostly in intestines in Japanese report on emaciation, in this study PCR was positive not only in intestines but also in kidneys. In case of significantly emaciated fishes, it was positive in all internal organs except gills. Detection frequency was in order of kidneys, intestines and spleens.

To identify the infection situation of emaciation disease, 216 olive flounders out of 24 farms were investigated in the period of 2010 to 2013. Most of the infected fishes showed significant emaciation in abdominal area. The weight of emaciated fish was 30~40% lower than that of uninfected fish and 33 (50%) out of 66 farms were positive in infection test. Yearly infection rates were so high with 8 out of 21 farms (38%) in 2010, 12 out of 25 farms (48 %) in 2011, 2 out of 4 farms (50%) in 2012 and 11

out of 16 farms (63.1%) in 2013 that they can cause serious damage to farms.

The tissue sections of organs were observed with optical microscope, and many spores of circular or oval shape were detected in kidneys and intestines of emaciated olive flounders. In other organs except for kidneys and intestines, some spores were observed, but it was difficult to examine because the number of detected spores was small compared with that in kidneys and intestines or no specific histological abnormalities were observed. Therefore, histopathologic emaciation examination should be performed mainly in kidneys and intestines.

According to gene sequencing analysis of PCR products, the gene homology between pathogens detected in emaciated olive flounders was more than 99%. According to gene comparison analysis using the GenBank database, it showed partial agreement with the gene sequences of Myxosporean sp. and was found to be a new species not registered in GenBank.

To investigate the outbreak trend of emaciation infection in wider range, total 900 fish were systematically examined in April, May, Sept., Nov., Dec., 2014 and the infection rate was checked. In 2015, the same examination was conducted in March, May, July and October with the different fish number. As a result, the infection rate was 18.3%~71.6% in 2014 and 16.3%~90.3% in 2015, higher than in 2014. In addition, according to the infection trend analysis depending on the sample size, the infection occurred in any size and the size of 11~30cm showed the highest infection rate. In periodic infection rate, Sept. and Dec. in 2014 and March, July and October in 2015 showed relatively higher infection rate. The reason for the high infection rate was not identified yet, but it is assumed that it might be related with marine environment of Jeju Island region. It might also be related with the fact that olive flounder seedlings are brought in from other regions to Jeju Island.

To identify whether emaciation disease could be transmitted within a same fishes or among the other fishes (red sea bream, black sea bream), two groups were built after PCR infection test a donor group showing positive reactions and a recipient group showing negative reactions. The test result showed that infection occurred within olive flounders, the same fishes, but was not observed in red sea bream and black sea bream, the other species. This result, in relation to species specificity, is estimated that emaciated disease causes infection only to olive flounder of the same fishes not to those of different fishes because factors such as host environment and living conditions do not fit for fish of different fishes. However, up to now, more investigation is required and in the future, a more detailed study is required to find out infection occurs to fish of different species. Moreover, according to the result of the histological examination of the renal tissue after cohabitation, the same spores as those where emaciation is generally observed were observed for the same group (recipient group) detected in PCR and for red sea bream and black sea bream of different fishes, the PCR result and spores were not observed.

To establish diagnosis index of emaciation disease, hematologic analysis was performed and non-specific immune response to emaciated and non-emaciated fish was observed. The result of the hematological analysis shows that hematocrit and GPT (farm-B) displayed higher experimental values than control values, and that GPT, GLU, total glucose, total cholesterol, and total protein exhibited lower experimental values than control values. As a result of measuring Lysozyme, NBT and MPO which are non-specific immune responses, lower experimental values were observed in three experiments. It is assumed that the stress by emaciation cause and the damage of internal organs destroy the primary defense system.

According to phylogenetic systematics analysis, all of 4 isolates belong to *Parvicapsula petuniae* and gene homology with the 4 isolates identified in Korea was 99.7%~99.76 %. In addition, according to the result of the gene comparative analysis using GenBank database, *P. petuniae* and high homology of 92% were observed for 18S rRNA and emaciation occurring domestically has been identified as *Parvicapsula* sp.

For morphological identification, according to the result of the microscopic inspection of the fish species suffering from emaciation, the spores were classified into two forms. One form was where two spores gathered in the same or different direction and spores with lengths of 16~18 μ m And widths of 4~5 μ m Were observed. Also, spores with two polar capsules gathered on one side were observed. The other form was a form of small spores with lengths of 5~8 μ m and widths of 7~9 μ m And a form with one polar capsule and lacking part of spore was observed. In this result, spores morphologically similar to *P. anisocaudata* and *P. pseudobranchicola* n. sp. occurring in a olive flounder farm has been observed and spores typically observed only in *Parvicapsula* sp. have been confirmed. Therefore, emaciation occurring domestically has been identified as *Parvicapsula* sp. in the same way shown by phylogenetic analysis result.

Real-time PCR we analyzed the number of pathogens in tissues of *Parvicapsula* sp. and the order of infection. Through Histopathologic examination we checked its correlation with the results of real-time PCR. Infection concentration of *Parvicapsula* sp. in tissues was investigated. The highest infection concentration was observed in kidney with $2.6 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^7$ copies/mg, followed by intestines, spleens, brains and livers. With the result we could identify more infected cases that were not detected on PCR. It is assumed that minimum infection concentration for PCR examination of *Parvicapsula* sp. is 10^3 copy/mg.

To check the result of real-time PCR of *Parvicapsula* sp. we performed correlation analysis through Histopathologic examination. A number of spores were observed in all of the organs, and the presence or absence of infecting spores corresponds with the results of real-time PCR. As Histopathologic examination is accurate but unfavorable in immediacy, it is difficult to respond to infection outbreaking immediately. Real-time PCR is assumed to be more useful for the *Parvicapsula* sp.

examination, with which it is easy to diagnose latency and initial stage of infection.

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. The small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) gene of *Enteromyxum leei* which was reported to be a causative agent of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) emaciation disease in Japan.6
- Fig. 2. (A) Total DNA separated from the gut of *Paralichthys olivaceus* having emaciation disease and PCR results obtained from a reference primer set made by using SSU rDNA gene of *Enteromyxum leei*. 1-8; A: Total DNA separated from the gut of *P. olivaceus* having emaciation disease, 9-15; B: Total DNA separated from the gut of *P. olivaceus* having emaciation disease, (B) 1-3; DNA of *E.leei* provided by Japan, M; 100 bp DNA ladder.8
- Fig. 3. Location of the Jeju olive flounder sampling station.10
- Fig. 4. The external (A) and internal (B) signs of the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*).12
- Fig. 5. PCR amplification from nucleic acids of internal organs from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*) in the level stages of infection. Lanes 1, 7, 13 and 19, Kidney; lane 2, 8, 14 and 20, Intestine; lanes 3, 9, 15 and 21, Spleen; lanes 4, 10, 16 and 22, Liver; lanes 5, 11, 17 and 23, Brain; lanes 6, 12, 18 and 24, Gill; M, 1kb DNA ladder.14
- Fig. 6. Gel electrophoresis of the products amplified with the primer set EM-F/R from the extracted sample of the kidney of affected olive flounder cultured in emaciated disease. Lane1, Farm-A (June, 2010); lane 2, Farm-B (October, 2011); lane 3, Farm-C (October, 2012); lane 4, Farm-D (November, 2011); lane 5, Farm-E (October, 2012); lane 6, Farm-F (November, 2012); lane 7, Farm-G (July, 2013); lane 8, Farm-N (December, 2010); lane 9, Farm-O (December, 2010); M, 1kb DNA ladder; N, negative control; P, positive control.16
- Fig. 7. Monitoring of the index content in the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*). ○: Uninfected olive flounder, ●: infected olive flounder.20
- Fig. 8. Histological findings of kidney (A, ×200 and B, ×400) and intestine (C, ×200 and D, ×400) from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*). Note microsporean spores both in emaciated disease the glomerulus (arrows) and in the gut epithelium (arrows). H & E stain. Bar = 20µm.22
- Fig. 9. Comparison analysis of the DNA nucleotide sequences of pathogens detected form the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*). Primers used in PCR are in boxes.24
- Fig.10. Location of the Jeju olive flounder sampling station.30
- Fig.11. Experimental transmission of emaciation disease to olive flounder (*P. olivaceus*), red sea bream (*P. major*) and black sea bream (*A. schlegelii*) by cohabitation with infected olive flounder.35

Fig.12. Gel electrophoresis of the products amplified with the primer set EM-F/R from the extracted sample of the kidney of affected olive flounder cultured in emaciated disease. Lanes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 and 14, positive samples; Lanes 2 and 9, negative samples; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.	38
Fig.13. Gel electrophoresis of the products amplified with the primer set EM-F/R from the extracted sample of the kidney of affected olive flounder cultured in emaciated disease. Lanes 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 and 13, positive samples; Lanes 1, 2, 7 and 13, negative samples; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.	41
Fig.14. Histological features of kidneys (A and B $\times 100$) from the emaciated olive flounder (<i>P. olivaceus</i>). Note microsporean spores in emaciated disease the glomerulus (arrows). H & E stain. Bar = 20 μ m.	43
Fig.15. Cumulative mortality (%) of normal olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) after cohabitated with the emaciated olive flounder.	45
Fig.16. Histological findings of kidney (A, $\times 200$ and B, $\times 400$) from the recipient olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) cohabitated with the emaciated olive flounder. Note microsporean spores in emaciated disease the glomerulus (arrows). H & E stain. Bar = 20 μ m.	45
Fig.17. Cumulative mortality (%) of normal red sea bream (<i>P. major</i>) after cohabitated with the emaciated olive flounder (<i>P. olivaceus</i>).	46
Fig.18. Cumulative mortality (%) of normal black sea bream (<i>A. schlegelii</i>) after cohabitated with the emaciated olive flounder (<i>P. olivaceus</i>).	46
Fig.19. Results of PCR using EM-F/R primers on extracted kidney DNA of olive flounder. Lane1 to lane3, control; lane 4 to lane 6, Farm-A; lane 7 to lane 9, Farm-B, lane 10 to lane 12, Farm-C; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.	56
Fig.20. Analysis of hematocrit (A), GPT (B), GOT (C) in the serum of olive flounder (<i>P. olivaceus</i>). * Significant difference between control group and emaciation group based on the <i>t</i> -test ($p < 0.05$).	58
Fig.21. Analysis of glucose (D), Total cholesterol (E), Total protein (F) in the serum of olive flounder, (<i>P. olivaceus</i>). * Significant difference between control group and emaciation group based on the <i>t</i> -test ($P < 0.05$).	59
Fig.22. Analysis of lysozyme activity (A), myeloperoxidase activity (B), nitroblue tetrazolium (C) in the serum of olive flounder, (<i>P. olivaceus</i>). *Significant difference between control group and emaciation group based on the <i>t</i> -test ($P < 0.05$).	61
Fig.23. PCR analysis of LSU and SSU rDNA sequences. Lanes 1 and 5 PP1F-W3R; lanes 2 and 6 PPNF-W3R; lanes 3 and 7 EMF-EMR; lanes 4 and 8 W3F-W3NR; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.	72

Fig.24. Phylogenetic tree of showing the genetic relatc relationships 49 myxosporeans based on the nucleotide sequences of the SSU, internal transcribed spacer (ITS) region (ITS1, 5.8S rRNA, ITS2), and LSU gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea emaciation belong to the *parvicapsula* sp.73

Fig.25. Comparison analysis of the DNA nucleotide sequences of pathogens detected from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*). Primers used in PCR are in boxes.74

Fig.26. A hypothetical sequence of developmental stages of emaciation. A: first stage of shizont visible with microscopy (×1000, bar=10μm); B~C: Sporont (×1000, bar=10μm), E~G: Sporonts (×400, bar=10μm); H: Pansporoblast (×400, bar=10μm); I~K: Spore in frontal view (×400, bar=10μm); L: Atypical smaller spore (×400, bar=10μm); N~O: triactinospores (×1000, bar=20μm).78

Fig.27. PCR amplification from nucleic acids of intermal organs from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*) in the level stages of infection. Lanes 1, 6 and 11, Kidney; lane 2, 7 and 12 Intestine; lanes 3, 8 and 13, Spleen; lanes 4, 9 and 14, Brain; lanes 5, 10 and 15, Liver; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.85

Fig.28. Standard curve derived from 10-fold (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5) serially diluted plasmid DNA containing a partial 28S rDNA.87

Fig.29. Micrographs of the kidney (A: EM-A ×100, E: EM-B ×200 and I: EM-C ×100), intestine (B: EM-A ×200, F: EM-B ×200 and J: EM-C ×200), spleen (C: EM-A ×200,G: EM-B ×200 and K: EM-C ×200) and liver (D: EM-A ×200, H: EM-B ×200 and L: EM-C ×200) from olive flounder (*P. olivaceus*) with control and *Parvicapsula* sp. Note the serous tissue destruction and many spore in the internal organs (arrow). H&E stain Bar= 20μm.92

LIST OF TABLES

Table 1. Culture mediums used in this study.....	4
Table 2. Oligonucleotide primers and conditions used in PCR amplification	4
Table 3. PCR primers used for the detection of new pathogen	8
Table 4. Prevalence of emaciation disease in cultured olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) of Jeju from 2010 to 2013	17
Table 5. Prevalence of causative agent of the emaciated disease according to the size of olive flounder (<i>P. olivaceus</i>).....	19
Table 6. Sample information employed for the investigation of emaciation infection in rearing olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) of Korea in 2014.....	31
Table 7. Sample information employed for the investigation of emaciation infection in rearing olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) of Korea in 2015.....	32
Table 8. Monitoring of emaciation disease for olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) farms in 2014.....	38
Table 9. Monitoring of emaciation disease for olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) farms in 2015.....	41
Table 10. Results of experiments testing for transmission of emaciated disease to olive flounder (<i>P. olivaceus</i>), red sea bream (<i>P. major</i>) and black sea bream (<i>A. schlegelii</i>) by close association with infected olive flounder	47
Table 11. Sequences of the oligonucleotide primers used for PCR amplification and sequencing	67
Table 12. Myxosporean species, host, site of infection, country and GenBank accession numbers used for phylogenetic analyses	69
Table 13. List of primers used for the detection of <i>Parvicapsula</i> sp. from olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) by PCR and real-time PCR.....	82
Table 14. PCR, histological examination and real-time PCR using kidney, intestine, spleen, brain and liver of olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) in Korea. P, positive; N, negative.....	89
Table 15. PCR, histological examination and real-time PCR using kidney, intestine, spleen, brain and liver of olive flounder (<i>P. olivaceus</i>) in Korea. P, positive; N, negative.....	90

제 1장 제주도 넙치양식장에서 발생하는 원인불명 여윌증에 대한 분자생물학적 방법 및 조직병리학적 진단

1.1 서론

여윌증은 1990년 일본의 자주복(*Takifugu rubripes*) 양식장에서 처음 발견되었으나, 최근에는 해산 양식 어류인 참돔(*Pagrus major*), 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 등에서도 여윌 증상을 보이는 질병이 확인되어, 양식어민들에게 많은 피해가 발생하고 있다. 이 질병에 감염된 어류는 안구함몰, 두부돌출 및 어체중 감소 등의 증상을 나타내다가 폐사에 이르게 된다고 보고하였다(Tun et al., 2000). Tun et al. (2002)의 연구에 따르면, 이러한 여윌 증상을 나타내는 어류의 장에서 3종의 점액포자충이 발견되었으며, *Enteromyxum fugu*, *Enteromyxum leei* 및 *Leptotheca fugu*인 것으로 보고하였다. 자주복 여윌증의 원인은 명확하게 밝혀지지 않았지만, 앞서 동정된 점액포자충들이 한 종 또는 두 종 이상이 감염되었을 때 동일한 증상이 나타나는 것으로 확인되었다(Ogawa and Yokoyama, 2001). Yasuda et al. (2005)은 조직병리학적 분석을 통해 장 상피세포에서 다량의 포자를 관찰하였고, 상피의 탈락 및 파괴를 초래한다고 조사하였으며, 3종의 점액포자충에 대한 primers를 제작한 후 PCR 방법을 사용하여 원인체를 진단하였다.

제주 양식산업의 대표적 품종인 넙치는 전국 양식넙치 생산량의 50%이상을 차지하고 국내 전체 넙치 수출량의 95%를 점유하고 있는 실정이다. 그러나 제주 양식 넙치의 질병에 의한 연간 피해액이 700억원대에 이르며 해마다 급증하고 있다. 대표적인 폐사 원인으로서는 바이러스성 질병인 viral hemorrhagic septicemia (VHS) 와 Scuticociliatida에 의한 기생충성 질병이 높은 비율을 차지하고 있으며, 세균성 질병인 연쇄구균병과 에드워드병 외에도, 원인불명으로 인한 폐사가 심각한 수준인 것으로 밝혀졌다.

국내의 여윌증은 2007년부터 제주도 넙치 양식장에서 약 20cm급 크기 전후에서 발생하고 있으며, 1~3주 동안 발병하여 폐사를 야기시키고 있다. 일본의 자주복과는 달리, 국내 넙치의 여윌증 발병에 대한 원인은 아직 보고되어 있지 않은 상황이며, 원인불명 질병에 의한 피해를 최소화하기 위해서는 신속한 진단법을 마련하여 질병이 확산되는 것을 미연에 방지하는 것은 매우 중요한 점이라 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 제주지역에서 여윌증상을 보이는 넙치를 대상으로, 여윌증의 원인을 밝혀내기 위해 분자생물학적 분석 및 조직병리학적 분석을 실시하였으며, 또한 여윌증의 감염현황을 파악하기 위해 2010~2013년까지 모니터링을 실시하여 감염률을 조사

하였다.

1.2 재료 및 방법

1.2.1 바이러스성 및 세균성 질병 검사

국내의 넙치 양식장에서 발생하는 여윌증의 원인체를 밝혀내기 위해, 여윌증상을 보이는 넙치를 대상으로 바이러스성 및 세균성 질병에 대한 일반적인 검사방법에 따라 진단하였다(Table 1 and 2). 그 결과 바이러스성 질병의 경우, 여윌 증상을 보이는 넙치에서 한건의 발생률도 관찰되지 않아(data not shown), 여윌증의 원인체가 바이러스성 질병이 아닌 것으로 조사되었으며, 세균성 질병의 경우 *Vibrio* sp. *Streptococcus* sp. *Edwardsiella* sp.가 검출되었으나 여윌 증상을 보이는 넙치에서 공통적으로는 관찰되지 않았다(data not shown). 하지만, 검출된 세균에 의해 여윌 증상을 보일 가능성이 있어, 검출된 세균들을 사용하여 인위감염 실험을 실시한 결과, 분리된 세균들이 여윌증 발병에 직접적인 영향이 없는 것으로 조사되었다.

Table 1. Culture mediums used in this study

Fish	Target organs	Medium	Incubation temperature (°C)
Olive flounder	Kidney, Spleen, Liver	TSA, TCBS, SS, BAP	25

Table 2. Oligonucleotide primers and conditions used in PCR amplification

Primer	Oligonucleotide sequences (5'-3')	PCR condition	Product size (bp)	Reference																
VHSV-F	GAGAGAAGCTGGCCCTGACTG	94 °C (30")-57 °C (45")72 °C (45")	444	Cho et al.,(2007)																
VHSV-R	ATGATCCGTCTGGCTGACTC				VNNV-F	CGGATACGTTGTTGTTGACG	94 °C (30")-55 °C (45")72 °C (45")	758	VNNV-R	CAACAGGCAGCAGAATTTGA	MBV-F	GCACCACGAAGGTACGAAAT	94 °C (1')-55 °C (1')-72 °C (1')	597	MBV-R	CTACGTTGCCGTTTCCTGAT	RSIV-F	GTGACTGCACACCAATGGAC	94 °C (30")-58 °C (45")72 °C (45")	698
VNNV-F	CGGATACGTTGTTGTTGACG	94 °C (30")-55 °C (45")72 °C (45")	758																	
VNNV-R	CAACAGGCAGCAGAATTTGA				MBV-F	GCACCACGAAGGTACGAAAT	94 °C (1')-55 °C (1')-72 °C (1')	597	MBV-R	CTACGTTGCCGTTTCCTGAT	RSIV-F	GTGACTGCACACCAATGGAC	94 °C (30")-58 °C (45")72 °C (45")	698	RSIV-R	GGCTTTCTCAATCAGCTTGC				
MBV-F	GCACCACGAAGGTACGAAAT	94 °C (1')-55 °C (1')-72 °C (1')	597																	
MBV-R	CTACGTTGCCGTTTCCTGAT				RSIV-F	GTGACTGCACACCAATGGAC	94 °C (30")-58 °C (45")72 °C (45")	698	RSIV-R	GGCTTTCTCAATCAGCTTGC										
RSIV-F	GTGACTGCACACCAATGGAC	94 °C (30")-58 °C (45")72 °C (45")	698																	
RSIV-R	GGCTTTCTCAATCAGCTTGC																			

¹⁾ VHSV, viral hemorrhagic septicaemia virus; VNNV, viral nervous necrosis virus; MBV; marine birnavirus; RSIV, red sea bream iridovirus.

1.2.2 여웬증 진단을 위한 primer set 제작

일본의 터봇 여웬증의 원인체로 보고된 *E. leei*의 small subunit ribosomal DNA gene (SSU rDNA)으로부터 제작된 MM18Sf/MM18Sr primer set (1,589 bp)를 동일하게 제작하였고(Table 3 and Fig. 1) 국내의 여웬증상 넙치의 장 조직으로부터 DNA를 분리하여 PCR 실험을 실시한 결과, 모두 PCR 음성반응을 나타내었다(Fig. 2). 국내에서 발생하는 여웬증을 진단하기 위해 GenBank (NCBI, USA)에 등록된 점액포자충(*Myxidium* sp.)의 염기서열로부터 degenerated primers를 제작하였고, 여웬증상 넙치로부터 DNA를 분리하여 PCR을 실시한 결과 양성 반응을 확인하였으며, DNA sequencing을 통한 염기서열 분석 후 국내 넙치의 여웬증 진단을 위한 새로운 EM-F/EM-R primer set를 제작하였다(Table 3).

MM18sf →

Species	Accession	Sequence	Position
Olive flounder	DQ127260	GTGGTTGATCTGCCAGTGGTATATAGTGTGTCTAAAAGACTAAGCCATGCATGTCCAGTTGACATGCAATTT---GATGAAATGCGAAGCGCTCAGTA	97
Red sea bream	AB245447	-----	97
Roach bream	DQ199798	-----	97
Two-banded sea bream	AF411934	-----	97
Tiger puffer	AY520574	-----	97
Gilt-head bream	DQ448298	-----	79
Turbot	AF411935	-----T-----T-----A-----G-----AGC-----	99
Pacific whiting	AF034840	-----T-----A-----T-----C-----A-----AAA-----	79
Tubenous	AF031413	-----T-----A-----T-----C-----A-----AAA-----	81
Yellowtail	AF034838	-----A-----T-----A-----AAA-----	80
DQ127260	AB245447	AAATGAGTTATAGTGTATATGATGAGTATAGATAGTGGATAAAGTGTGTAATGTAGAGCTAATAGGTGATAA-TATGCAATTTACTAGGTAGAAACCAACAA	198
DQ199798	AF411934	-----A-----	197
AY520574	DQ448298	-----A-----	198
AF411935	AF034840	-----AA-----AGCCA-----T-----A-----AGC-----A-----CCCGGAC-----TG-----TG-----G-----T	194
AF031413	AF034838	-----T-----CG-----G-----CA-----GAGCCA-----A-----AGC-----A-----C-----GCGAC-----TG-----G-----G-----T	173
AF034838	AF034838	-----T-----CG-----G-----CA-----GAGCCA-----A-----AGC-----A-----C-----GCGAC-----TG-----G-----G-----T	150
DQ127260	AB245447	GT-----TGAATGTAGGTAAATC-GGAAATGATATGGGCGCAAGCCGA	287
DQ199798	AF411934	-----T-----	287
AY520574	DQ448298	-----T-----	287
AF411935	AF034840	T.ATTAGTA-AAACAA-----AAAGATTGA-----A-----C-----TT-----AT-----AG	283
AF031413	AF034838	T.ATTAGTCTAACCAACT---GACTTTGTCG-----TTTGA-----GTAA-----C-----GT-----AT-----A-----CAT-----T-----TTT-----T	248
AF034838	AF034838	T.ATTAGTCTAACCAACTTTGTCTTTTGTATGATAAAATAGAAAATGTAGAAAATTTTGA-----ATAA-----C-----GT-----TT-----A-----ACATATGATTT---	278
DQ127260	AB245447	CGATAATTCGATGAGTTTCTGC---TGTATTAAGTAGTGGAGTTCCTTTGCTGACCAAGGTGTTAAAGGATAAGCGGGAAATTAAGGTTTGGATTCCGG	334
DQ199798	AF411934	-----	334
AY520574	DQ448298	-----	334
AF411935	AF034840	-----G-----A-----TGACCC-----C-----G-----AG-----G-----TG-----G-----C-----G-----G-----C-----	348
AF031413	AF034838	-----G-----A-----TGACCC-----C-----G-----AG-----G-----TG-----G-----C-----G-----G-----C-----	345
AF034838	AF034838	-----G-----A-----TGACCC-----C-----G-----AG-----G-----TG-----G-----C-----G-----G-----C-----	375
DQ127260	AB245447	AGAGGGAGCTGAGAAAGGCTACGCATCTAAAGAAAGGCAAGAGGCGGCGCAAAATACCCAAATCCAGATTGGGAGGTGATGAGAGAAATACCGGAGT	434
DQ199798	AF411934	-----	434
AY520574	DQ448298	-----	434
AF411935	AF034840	-----T-----	448
AF031413	AF034838	-----T-----	445
AF034838	AF034838	-----C-----	475
DQ127260	AB245447	TAAAGTTT---TAGGTAAAGTATGAGATGAGCAATAATTAATACGTTTGTGAGTATGATATTGGAGGGCAAGTGTGGTGGCAGCAGCGCGGTAATTTGCA	532
DQ199798	AF411934	-----C-----	533
AY520574	DQ448298	-----	532
AF411935	AF034840	-----G-----AA-----G-----TG-----C-----G-----G-----C-----A-----G-----C-----G-----C-----	516
AF031413	AF034838	AG-----A-----A-----A-----T-----TC-----G-----C-----C-----A-----G-----C-----G-----C-----	544
AF034838	AF034838	AG-----G-----ATA-----T-----TC-----G-----C-----C-----A-----G-----C-----G-----C-----	545
AF034838	AF034838	AG-----A-----AAT-----TC-----G-----C-----C-----A-----G-----C-----G-----C-----	573
DQ127260	AB245447	GCCTGAAATAGTGTATATGAAATTTGCTGCAGTTAAAAGCTGTAAGTTGAATTAAGAAAG---GATATTGTGAGATGTTGTTTATATGAAATAAATATT	628
DQ199798	AF411934	-----	628
AY520574	DQ448298	-----	628
AF411935	AF034840	-----T-----A-----TTTT-----G-----GA-----GTC-----C-----ACGC-----AGTGG-----TG-----TG-----	652
AF031413	AF034838	-----G-----A-----A-----T-----G-----C-----G-----AGCTGTT-----GA-----G-----CA-----A-----C-----AGGT-----TGGTGGTC	637
AF034838	AF034838	-----G-----A-----A-----T-----G-----C-----G-----AGCTGTT-----GA-----G-----CA-----A-----C-----AGGT-----TGGTGGTC	637
DQ127260	AB245447	CTGATTGAATTTCTTTTATAGTAAAGAGCTAGTAATGAAATTCACCTTTTGTGTGTAGTGCCTTGGGAGTGTGCCTTGAATAAAGGAAAGTGCAT	728
DQ199798	AF411934	-----	728
AY520574	DQ448298	-----	728
AF411935	AF034840	AGT-----GA-----C-----G-----AC-----C-----T-----TA-----A-----G-----A-----A-----G-----C-----T-----A	751
AF031413	AF034838	G-----GGGG-----CG-----GCGATG-----GG-----A-----A-----C-----GTGG-----C-----AG-----C-----A	730
AF034838	AF034838	G-----GGGG-----CG-----GCGATG-----GG-----A-----A-----C-----GTGG-----C-----AG-----C-----A	731
AF034838	AF034838	GA-----GGGG-----C-----G-----T-----TAG-----G-----G-----A-----C-----GTA-----C-----A-----A	753
DQ127260	AB245447	AGAAAGCTCAGCTGAAATGTAGTAGATGAGTAAATAGGTAAGGCAATAGGTAAGGCAATAGGTTGGTTTGGATTGGT-----GTGTAGATTAAAAGGAGAT	821
DQ199798	AF411934	-----	821
AY520574	DQ448298	-----	821
AF411935	AF034840	-----A-----AT-----A-----ATAA-----AT-----A-----A-----A-----GCT-----C-----T-----C-----	840
AF031413	AF034838	G-----G-----TAGG-----TA-----A-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----	822
AF031413	AF034838	G-----G-----ATA-----T-----TA-----A-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----	823
AF034838	AF034838	G-----G-----AATG-----T-----A-----A-----T-----AT-----GTA-----TGAAT-----G-----T-----A-----TAGCAATAG	852

DQ127280	TTGAGGGGTTAGTACTTGGTGGGAGGAGGTBAATTTGTAACCCACCAAGACTGACTAATGGGAAAAGGTTGCGCAAGACTGTTTTGATTAAATCAAG	821
AB248447	821
DQ139798	821
AF411834	822
AY620574	821
DQ448298	804
AF411835A.....T.....A.....A.....	840
AF034840C.....G.....C.....T.....A.....A.....GGA.....A.....	822
AF031418G.....G.....C.....T.....A.....A.....A.....G.....	823
AF034838G.....G.....C.....T.....A.....A.....GGA.....G.....	882
DQ127280	AACGAAAGTTGGAGGTTGGAAGAGATGATACCGTGGTAGTTCCACACAGTAAACAAATGCCAACTTGAATTCAGCGTGTATATAATGATATAAGTTGGCT	1021
AB248447A.....	1021
DQ139798	1021
AF411834	1022
AY620574A.....	1021
DQ448298	1004
AF411835A.....T.....T.....T.....T.....A.....T.....A.....G-T.....A.....GC.....T.....A.....TG	1039
AF034840A.....C.....T.....T.....T.....A.....GGA.....T.....CC.....GT.....A.....CC.....G.....GC	1020
AF031418A.....A.....C.....TT.....T.....T.....A.....GGA.....T.....CC.....GT.....A.....ACC.....G.....GC	1021
AF034838A.....A.....C.....TT.....T.....T.....G.....A.....GGA.....T.....CC.....G.....A.....T.....CC.....G.....GC	1081
DQ127280	TGTCGGGAAACG--AAGTCTTGGGGTGTGGGGATAGTATAGTTGGCAAGTGTGAAATTTAAAGAGATTGACGGAAAGGGACCCACCAAGAGTGGAGCGCTG	1119
AB248447	1119
DQ139798	1119
AF411834	1120
AY620574	1119
DQ448298	1102
AF411835C.....G.....TT.....T.....T.....A.....GG.....GG.....C.....GT.....T.....C.....TA.....	1139
AF034840C.....G.....T.....AT.....G.....TC.....T.....C.....G.....GGGAC.....GGT.....A.....T.....	1118
AF031418C.....A.....T.....AT.....G.....TC.....T.....G.....GGGTAC.....GCG.....A.....T.....	1119
AF034838C.....T.....A.....T.....TA.....T.....C.....G.....C.....AC.....AAA.....A.....T.....	1189
DQ127280	CGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCAACAGGTCGGGACATGATAGGATTGACAGAAATGACAGATCTTTGATGATAGCGTGGATTGGTGGTGCAT	1219
AB248447	1219
DQ139798	1219
AF411834	1220
AY620574	1219
DQ448298	1202
AF411835T.....C.....T.....A.....C.....T.....A.....C.....G.....T.....AA.....	1239
AF034840T.....T.....A.....T.....G.....C.....G.....TT.....A.....	1217
AF031418T.....T.....A.....T.....G.....C.....G.....TT.....A.....	1219
AF034838T.....T.....A.....T.....C.....C.....G.....-.....A.....	1287
DQ127280	GGCGTTCTTAGTTGGTGGAGTATCTGTCAAGTTAATTCGGGTAAAGAGGAGAGACCAATCTTAATTGATTAGATTCGCACTTATTTGGGATTGAT	1319
AB248447	1319
DQ139798	1319
AF411834	1320
AY620574	1319
DQ448298	1302
AF411835C.....G.....TG.....T.....CT.....G.....T.....TA.....C.....	1339
AF034840T.....G.....T.....GG.....TGA.....T.....GTC.....GACC.....	1314
AF031418T.....GG.....TAA.....T.....GTC.....GACC.....	1316
AF034838GG.....T.....GAATAT.....T.....GTC.....ATTC.....A.....	1354
DQ127280	CTTAGAGAGACTACCAAGTTCAACTGGGGAAAGTGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTGGATGTTCTGGGTCGCACGGCGGTACCAATGGCAGCA	1419
AB248447	1419
DQ139798	1419
AF411834	1420
AY620574	1419
DQ448298TG.....CA.....	1402
AF411835A.....C.....GGAG.....T.....GCC.....T.....T.....AT.....TG	1439
AF034840A.....C.....GGAG.....G.....GCC.....C.....T.....T.....A.....TG	1414
AF031418A.....C.....GGAG.....T.....GCC.....C.....T.....T.....A.....TG	1416
AF034838A.....A.....GGA.....T.....GCC.....C.....T.....T.....A.....TG	1454
DQ127280	GCAAAATAGTGTGTTGCTGGAAAGAGTGAAGTAAATGAA--TTGCTGTGCTGATGGGATTGAGCCTTGTAAATTATTGCTGATGAAAGTGGAAATTCCTC	1517
AB248447	1517
DQ139798	1517
AF411834	1518
AY620574	1517
DQ448298	1500
AF411835	A.....A.....ACC.....AA.....T.....G.....C.....GG.....A.....T.....GC.....A.....A.....T.....	1538
AF034840	A.....CA.....CC.....GCTD.....G.....G.....AT.....GGG.....T.....G.....AA.....C.....T.....C.....TT.....C.....A.....C.....A.....	1514
AF031418	A.....CA.....CC.....GCTD.....G.....GAGT.....GGG.....T.....G.....AA.....C.....T.....C.....TT.....C.....A.....C.....A.....	1516
AF034838	A.....CG.....CC.....GCTD.....G.....TG.....GT.....GGG.....T.....A.....AA.....CA.....T.....C.....TT.....A.....C.....A.....	1554
DQ127280	GTAAGGGCAAGTCAACTTGTGTTGAATACGTCTGTGCCCTTGTACACAGGGGGTGGCTAGTACCG	1658
AB248447	1658
DQ139798	1658
AF411834	1659
AY620574	1658
DQ448298	1548
AF411835G.....A.....C.....	1609
AF034840G.....G.....C.....	1592
AF031418G.....G.....C.....	1594
AF034838G.....G.....C.....	1602

Fig. 1. The small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) gene of *Enteromyxum leei* which was reported to be a causative agent of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) emaciation disease in Japan.



Fig. 2. (A) Total DNA separated from the intestine of *Paralichthys olivaceus* having emaciation disease and PCR results obtained from a reference primer set made by using SSU rDNA gene of *Enteromyxum leei*. 1-8; A: Total DNA separated from the gut of *P. olivaceus* having emaciation disease, 9-15; B: Total DNA separated from the gut of *P. olivaceus* having emaciation disease, (B) 1-3; DNA of *E. leei* provided by Japan, M; 100 bp DNA ladder.

Table 3. PCR primers used for the detection of new pathogen

Primer	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Expected sizes	Function
MM18S-F	CTGGTTGATTCTGCCAGTGGTC	1,589 bp	Detection of <i>E. leei</i> (Palenzuela et al., 2002)
MM18S-R	CGGTACTAGCGACGGGCG		
28S-F	CTAGGGGAATCCGACTGT	313 bp	House keeping gene (28S ribosomal RNA)
28S-R	ATCAAAGTCAAGC		
EM-F	CAACCGCAATGTGTTTACTC	812 bp	Detection of new pathogen (in this study)
EM-R	CCAAACAACCTGCCACAATG		

1.2.3 실험어

제주도 양식 넙치를 대상으로 여윌증 원인체의 감염 현황을 조사하기 위해, 2010년부터 2013년까지 4년 동안 양식 넙치를 대상으로 2010년에 21회(6, 7, 8, 11, 12월), 2011년 25회(3, 7, 8, 10, 11월), 2012년 4회(7, 10, 11월), 2013년 16회(1, 3, 7, 8, 11, 12월)에 걸쳐 동·하절기 및 중복된 양식장을 포함하여 24개소 양식장에서 66회의 샘플링을 실시하여 총 216마리를 대상으로 실험을 수행하였고(Fig. 3), 확보된 샘플은 육안상 여윌증상을 보이며 폐사가 발생하여 의뢰를 맡긴 양식장과 무작위로 넙치를 제공받은 양식장을 대상으로 감염조사를 실시하였다. 실험 전 수질측정기 YSI Model 650XL (YSI, USA)을 사용하여 수온측정을 실시하였고, 실험실로 운반된 어류의 외부 및 내부증상을 확인하고, 어체의 전장 및 무게를 측정하였다.

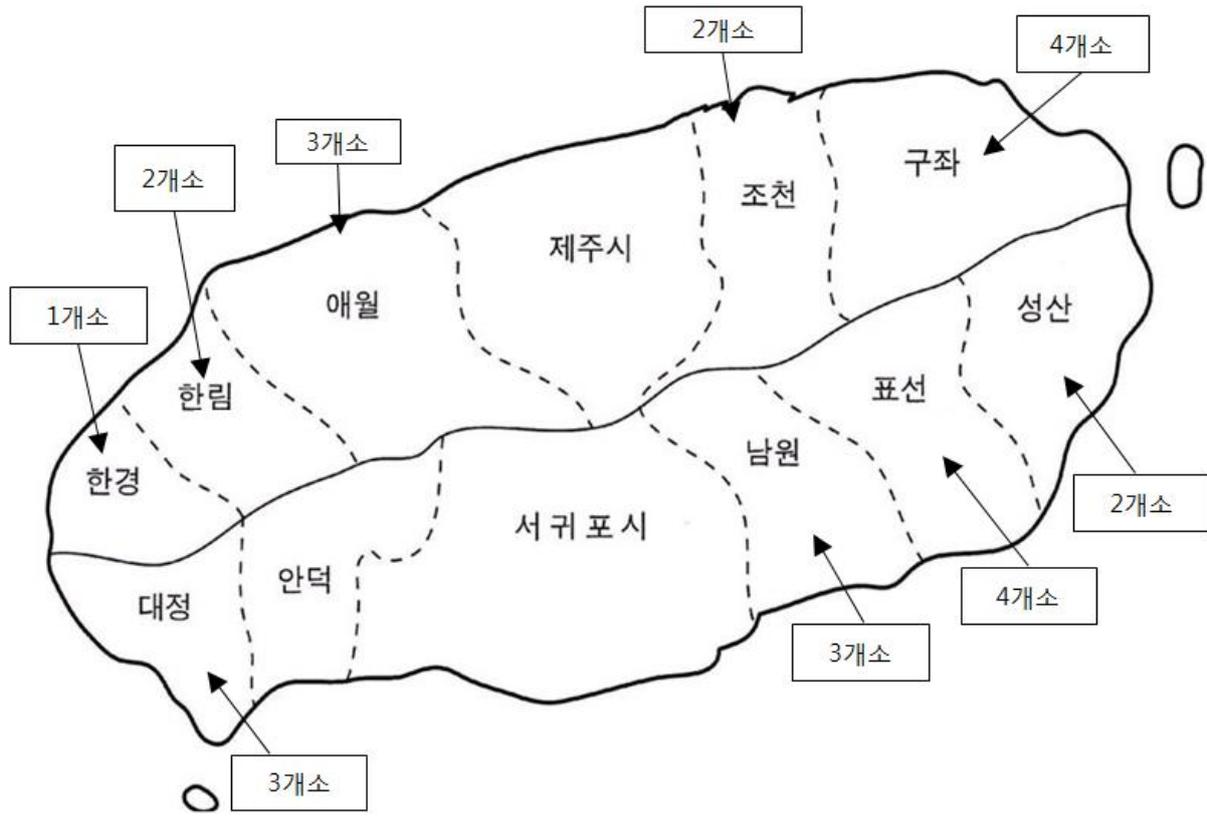


Fig. 3. Location of the Jeju olive flounder sampling station.

1.2.4 DNA 분리

여壼증상을 보이는 넹치로부터 간, 비장, 신장, 장, 뇌 및 아가미 등의 장기들을 적출하였고, DNA를 분리하기 위하여 DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하였다. 먼저 각 조직의 10mg에 ATL buffer 180 μ L와 proteinase K 20 μ L를 첨가하여 56 $^{\circ}$ C에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 μ L를 넣어 섞은 다음 ethanol 200 μ L를 더하여 spin column에 옮겨 6,000 \times g에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 μ L와 AW2 buffer 500 μ L를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 50 μ L를 첨가하여 최종적으로 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

1.2.5 PCR 및 DNA sequencing

PCR은 microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 \times G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ L가 되게 하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 35 cycles를 반응시켰다. 그리고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension시켰다. PCR 후 증폭 산물은 1 \times TAE buffer (40 Mm Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ L ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기 영동한 후, UV 검출기에서 band를 관찰하였다. PCR 증폭 산물은 gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 회수한 후, ToPo TA cloning[®] kit (Invitrogen, USA)로 cloning하여 염기서열 분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

1.2.6 병리조직학적 분석

병리조직학적 분석을 위해 여壼 증상을 보이는 넹치로부터 간, 비장, 신장, 장, 뇌 및 아가미 조직을 적출하여 Bouin's solution에 24시간 동안 고정한 후 70% EtOH를 사용하여 탈수하였다. 이후 파라핀 침투를 시키고(Leica EG 1150HC, Germany) 포매기(Leica Jung 820, Germany)를 사용하여 포매를 실시하였다. 이 후 마이크로톰으로 4~5 μ m 두께의 절편을 잘라 유리 슬라이드에 부착시켜 건조시켰다. 제작된 조직표본은 haematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색을 실시한 후 광학현미경(Zeiss LT60, Germany)으로 검경하였다.

1.3 결 과

1.3.1 외부 및 내부증상

여름중에 감염된 넙치의 대부분은 복부 부위가 심각하게 여위는 것으로 관찰되었고, 일부 체색흑화 및 해부 시 간 출혈 등의 증상이 관찰되었으나, 일본의 넙치에서 보고된 안구함몰이나 두부돌출과 같은 증상은 보이지 않았다(Fig. 4A& B).

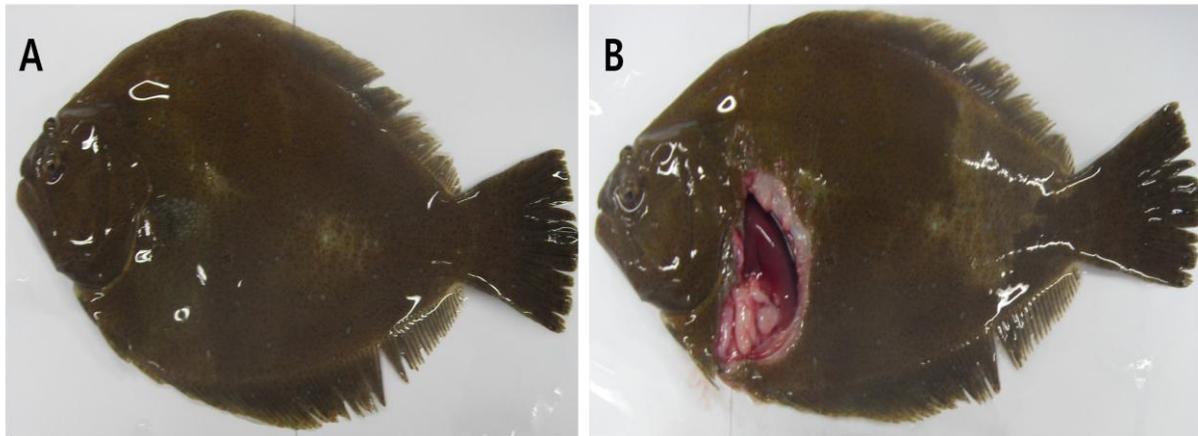


Fig. 4. The external (A) and internal (B) signs of the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*).

1.3.2 PCR 진단법 개발 및 적용

제주도 넙치 양식장에서 여윌 증상을 보이는 넙치를 대상으로 새롭게 제작한 specific EM primer set를 이용하여 PCR을 실시한 결과, 일본의 여윌증에 대한 연구에서는 원인체가 주로 장에서 검출되는 것으로 보고하였으나, 본 연구에서는 넙치의 장뿐만 아니라 신장에서 양성의 결과를 나타낸다는 것을 확인하였다(Fig. 5). 여윌증에 감염된 다양한 넙치를 대상으로 PCR을 수행한 결과, 여윌증 원인체의 검출 정도가 신장, 장, 비장의 순서로 높은 것을 확인하였으며, 병원체의 주요 감염 표적장기는 신장 및 장 부위인 것으로 추정되었다. 또한, 심각한 경우에는 아가미를 제외한 모든 검사대상 조직에서 PCR 양성 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 5).

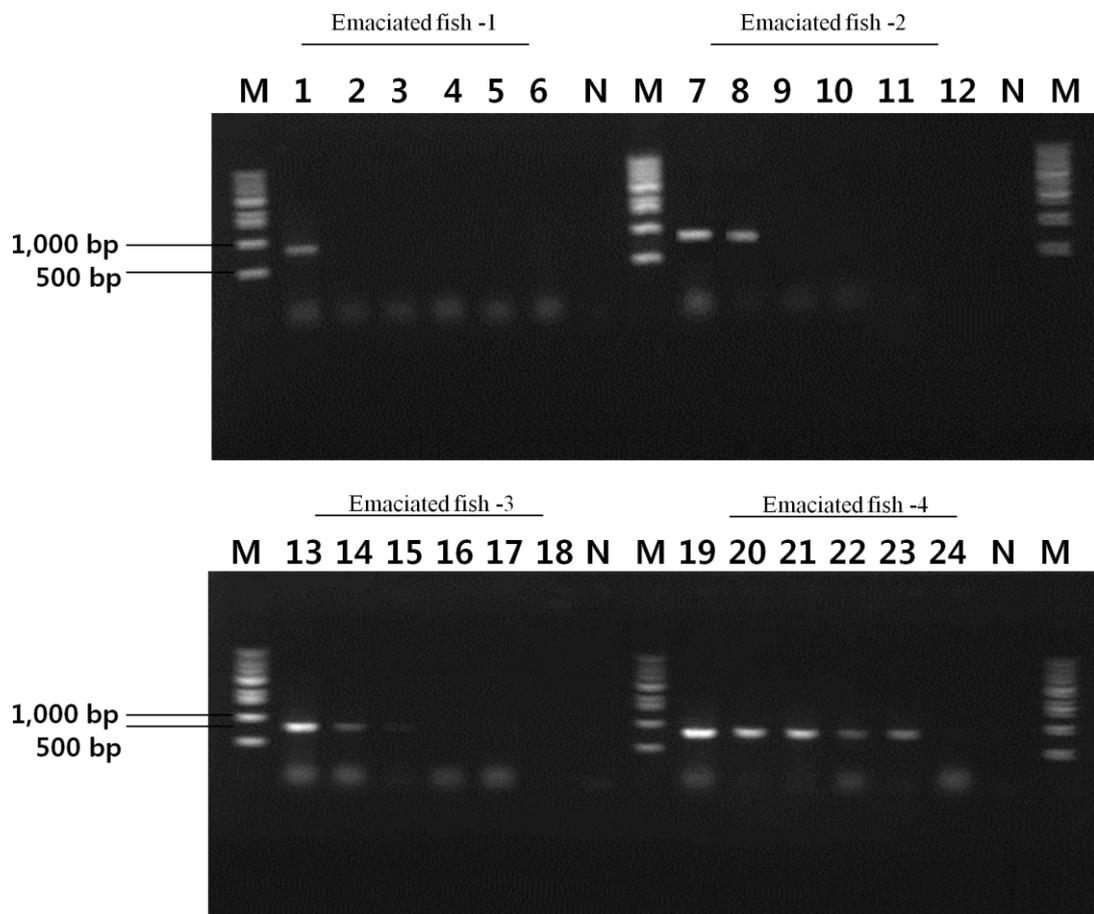


Fig. 5. PCR amplification from nucleic acids of internal organs from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*) in the level stages of infection. Lanes 1, 7, 13 and 19, Kidney; lane 2, 8, 14 and 20, Intestine; lanes 3, 9, 15 and 21, Spleen; lanes 4, 10, 16 and 22, Liver; lanes 5, 11, 17 and 23, Brain; lanes 6, 12, 18 and 24, Gill; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.

1.3.3 양식장별 감염률

2010년 6월부터 2013년 12월까지 총 66회에 걸쳐 216마리의 넙치를 대상으로 여윌증 원인체의 감염현황을 조사한 결과, 66회에 걸친 조사기간 동안의 대상 양식장 중에서 50% (33회)에서 여윌증 양성임을 확인하였다(Table 4). 그 중, 양식장별 감염률은 2010년도 21개소 중 8개소(38%), 2011년도 25개소 중 12개소(48%), 2012년도 4개소 중 2개소(50%), 2013년도 16개소 중 11개소(60%)에서 양성임을 확인하였다(Fig. 6, Table. 4).

1.3.4 개체별 감염률

총 넙치 216마리 중 93마리(43%)에서 여윌증 감염 양성임을 확인하였다. 그 중, 개체별 감염률은 2010년도 60마리 중 17마리(28.3%), 2011년도 75마리 중 32마리(42.6%), 2012년도 24마리 중 8마리(33.3%), 2013년도 57마리 중 36마리(63.1%)의 감염률을 관찰하였다(Table 4).

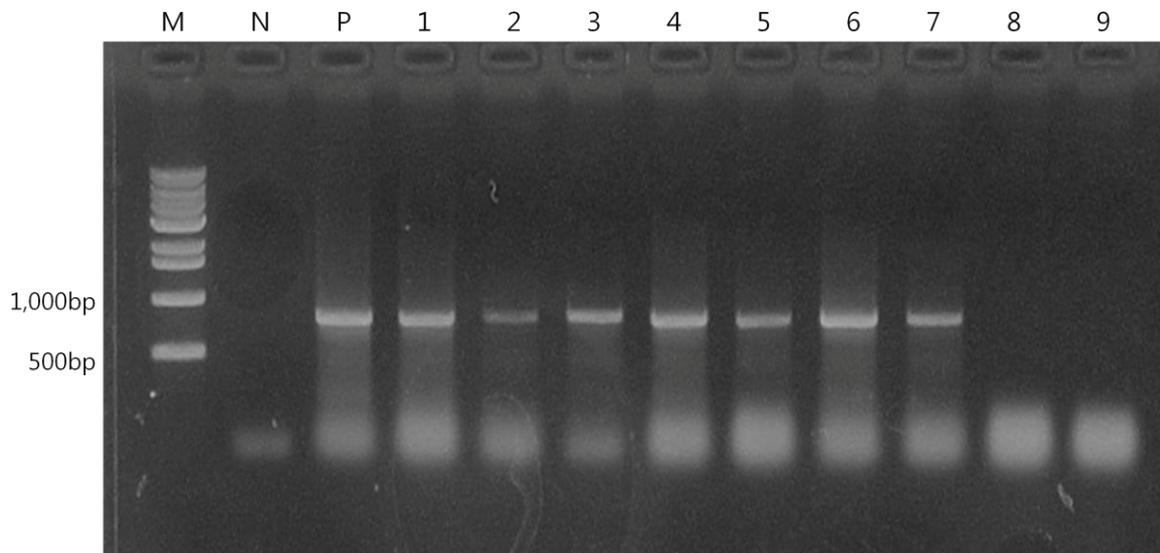


Fig. 6. Gel electrophoresis of the products amplified with the primer set EM-F/R from the extracted sample of the kidney of affected olive flounder cultured in emaciated disease. Lane1, Farm-A (June, 2010); lane 2, Farm-B (October, 2011); lane 3, Farm-C (October, 2012); lane 4, Farm-D (November, 2011); lane 5, Farm-E (October, 2012); lane 6, Farm-F (November, 2012); lane 7, Farm-G (July, 2013); lane 8, Farm-N (December, 2010); lane 9, Farm-O (December, 2010); M, 1kb DNA ladder; N, negative control; P, positive control.

Table 4. Prevalence of emaciation disease in cultured olive flounder (*P. olivaceus*) of Jeju from 2010 to 2013

Year	Month	Water temp. (°C)	Farm & no. of fish	Infection rate (%) (positive no. / total no.)				
				Fish			Farm	
				PCR test	Total	Histological examination	PCR test	Total
2010	June	18.5	A(6)*, B(3)	33.3% (3/9)		44.4% (4/9)	50% (1/2)	
	July	19.5	C(3), D(3), E(3), F(3), G(3)	0% (0/15)		0% (0/15)	0% (0/5)	
	August	20	E(3)*, H(3)*	66.6% (4/6)	28.3% (17/60)	66.6% (4/6)	100% (2/2)	38% (8/21)
	November	18.1	I(6)*	83.3% (5/6)		NT	100% (1/1)	
	December	15	A(1)*,D(1), J(1), K(3), L(3)*M(3)*, N(2), O(3), P(3), Q(1)*, R(3)	20.8% (5/24)		NT	36.3% (4/11)	
2011	May	15	S(6)*	100% (6/6)		NT	100% (1/1)	
	July	19.5	A(3)*,M(3),T(3) ,U(3)*,V(3)*,W(3), X(3)	28.5% (6/21)	42.6% (32/75)	33.3% (7/21)	28.5% (3/7)	48% (12/25)
	August	21.5	A(3), B(3)*,M(3), T(3)*, V(3)*,W(3), X(3),	33.3% (7/21)		NT	28.5% (3/7)	
	October	20	A(3), B(3)*,C(1)*, M(3)*,V(3), X(3), W(3),Y(2)	33.3% (7/21)		42.8% (9/21)	37.5% (3/8)	

	November	18.5	T(3)*, D(3)*	100% (6/6)		NT	100% (2/2)	
	July	20	D(9), F(3)	0% (0/12)		NT	0% (0/2)	
2012	October	21	E(6)*	33.3% (2/6)	33.3% (8/24)	33.3% (2/6)	100% (1/1)	50% (2/4)
	November	18	F(6)*	100% (6/6)		100% (6/6)	100% (1/1)	
	January	14.8	J(6)	0% (0/6)		NT	0% (0/1)	
	May	16	Q(4)*	100% (4/4)		100% (4/4)	100% (1/1)	
	July	19.7	G(4)*, Q(4)*	87.5% (7/8)		100% (8/8)	100% (2/2)	
2013	August	22	E(5)*, K(5)*	80% (8/10)	63.1% (36/57)	NT	100% (2/2)	60% (11/16)
	September	21	S(2)*	100% (2/2)		100% (2/2)	100% (1/1)	
	November	18.8	K(3)*, J(4)*, U(4)*	63.6% (7/11)		NT	100% (3/3)	
	December	15.6	C(1), J(3)*, Q(3), R(3), V(3)*, Y(3)	50% (8/16)		62.5% (10/16)	33.3% (2/6)	
Total					43% (93/216)			50% (33/66)

* : Positive

NT: not tested

1.3.5 크기별 감염률

2010~2013년도까지 총 66번의 샘플링 중 11~20cm가 23개소, 21~30cm 27개소, 31~40cm 16개소로 분류되었으며, 크기별 감염 현황 결과, 11~20cm 23개소 중 16개소(69.5%), 21~30cm 27개소 중 12개소(44.4%), 31~40cm 16개소 중 5개소(31.2%)의 검출률을 나타내었다(Table 5).

Table 5. Prevalence of causative agent of the emaciated disease according to the size of olive flounder (*P. olivaceus*).

Fish species	Fish size (cm)	No. of farms	
		Distribution	Infection rate
Olive flounder	11~20	23	69.5% (16/23)
	21~30	27	44.4% (12/27)
	31~40	16	31.2% (5/16)

1.3.6 Fish weight (index)

PCR에서 양성반응과 음성반응을 나타낸 넙치를 대상으로 체장에 따른 체중을 관찰한 결과, 여웬증에 감염된 넙치가 여웬증이 발병하지 않는 넙치보다 30~40% 낮은 체중이 관찰되었다(Fig. 7).

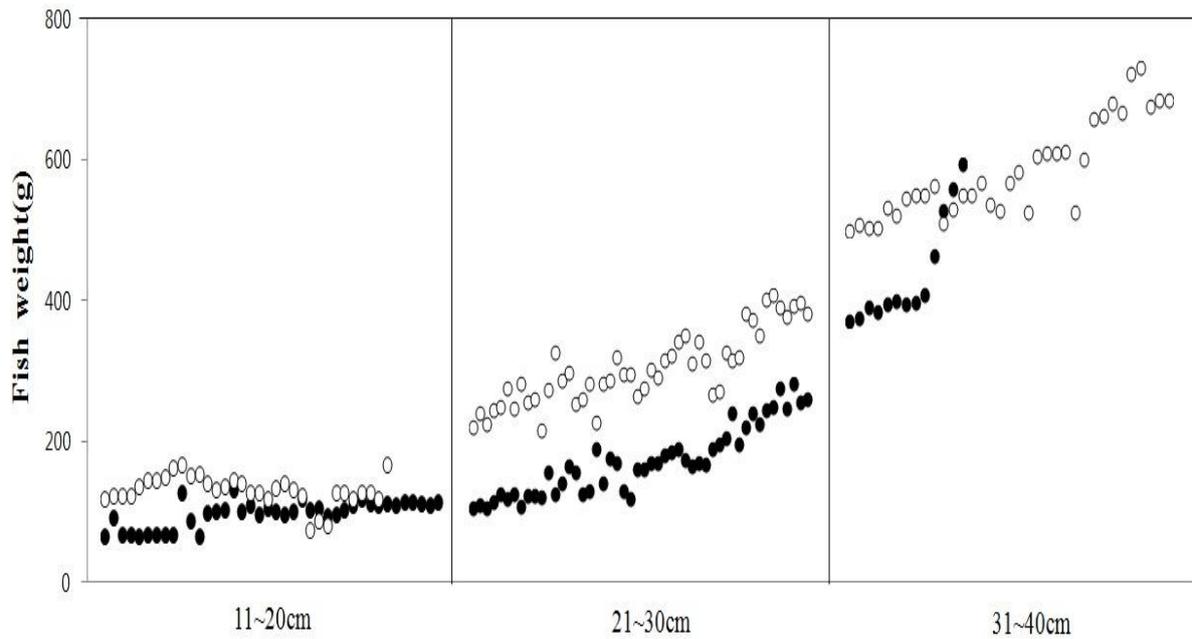


Fig. 7. Monitoring of the index content in the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*). ○: Uninfected olive flounder, ●: infected olive flounder.

1.3.7 병리조직학적 검사

각 장기의 조직 절편을 광학현미경으로 관찰한 결과, 여壼증에 감염된 녁치의 신장과 장 부위에서 원형 또는 난원형의 포자가 다수 관찰되었고, 장 부위보다 신장 부위에서 더 많은 수의 포자가 관찰되었으며, 기부골질, 사구체, 핵 등의 파괴와 변형체(plasmodium)가 일부 관찰되었다(Fig. 8A and B). 감염된 장 상피 부위에서는 포자가 관찰되었지만 변형체는 관찰되지 않았으며, 심한 경우 조직의 탈락 및 파괴가 나타났다(Fig. 8C and D). 신장 및 장을 제외한 다른 장기에서는 일부 포자가 관찰되었지만, 포자의 수가 신장, 및 장에 비해 적은 수가 관찰되었거나 특이적인 조직학적 이상소견이 관찰되지 않았다(data not shown).

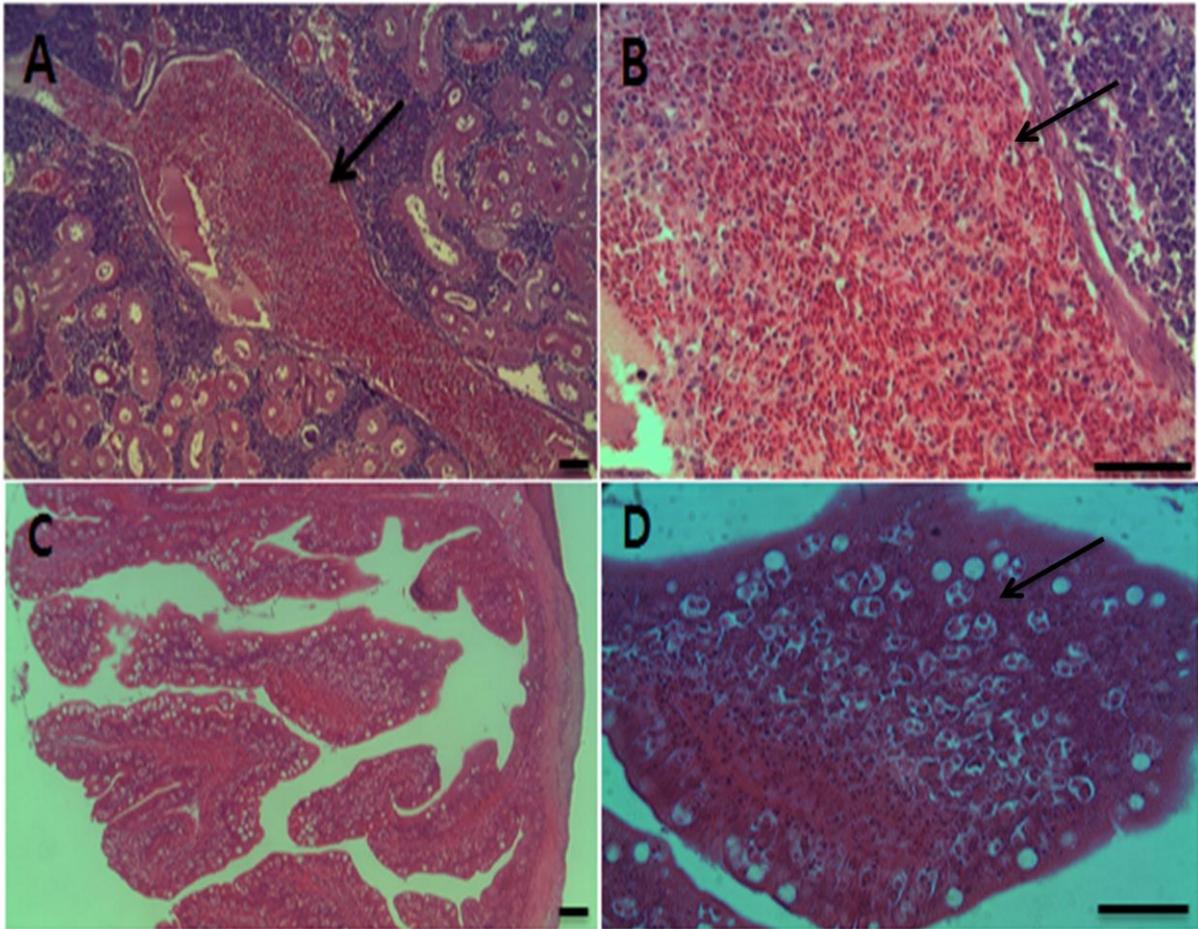


Fig. 8. Histological findings of kidney (A, $\times 200$ and B, $\times 400$) and intestine (C, $\times 200$ and D, $\times 400$) from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*). Note microsporean spores both in emaciated disease the glomerulus (arrows) and in the gut epithelium (arrows). H & E stain. Bar = $20\mu\text{m}$.

1.3.8 염기서열 분석

검출된 PCR products에 대한 유전자 염기서열을 분석한 결과, 다른 시기에 제주도의 다양한 양식장의 여웬증상 넙치로부터 검출된 병원체들 간의 유전자 상동성은 서로 99% 이상인 것으로 나타났고(Fig. 9), 제주도의 넙치양식장에서 발생하는 여웬증의 원인체는 모두 동일한 기생충 종인 것으로 확인되었다. GenBank database를 활용한 유전자 비교 분석을 실시한 결과, 일부 염기서열인 150 bp가 *Myxobolus* sp. (Accession No. JN616264.1) 및 *Cystodiscus axonis* (Accession No. JN977605.1)와 부분적으로 86% 및 88%의 유사성을 각각 나타내었으며, 아직 GenBank에 등록되지 않은 미등록 종인 것으로 조사되었다.

	EM-F →		
2010	CAACCGCAATGTGTTACTCT	TTAGTACTACAACAACACAAATATTGTAGGAAGTGTAGTGTAAAGTACGTGGACCGGTGAGTCAGCAATGATTGGCCGG	100
2011	G.....	100
2012	100
2013	100
2010	ACTGCACACAGCGTGAGCTGTTGCAGAGACCCAGCTGGAGTTTGACTGAGCAGGCAACTGCTTGTGATGAACAGTAGTGGATAATGTTGGATACATGTT		200
2011	A.....	200
2012T.....	200
2013	200
2010	GGTGCACATAATGTAGTAATATTATTATTTATTGACGCTGACAAAAACAACAAAAACAACCTGTTAACGGTGGATCACTCGGTCGTGTGCGAT		300
2011	300
2012	300
2013T.....	300
2010	GAAGACGTGGCAAAATGCGATAATTAATGCGATTGCAATGCCTTGAGTGCATTGAACTTTGAATGCAATGGCGCGGACTTTTAGTCGTGCATGT		400
2011	G.....	400
2012	400
2013	400
2010	TTGGTTGAGAGTCATAAATCTATCGAGTTATTTATAACAATACTGTTAGCCCGCTGTTTACAACGGGTTGATGAAATGTGACCGGTTGGCGCTGTGAT		500
2011	500
2012T.....A.....A.....A.....	500
2013	500
2010	GTTTACTTGTAAGCATTGCGAGACATCAACGTATTGTCTAACAAATAACTTTATGCGAACATGCAATTGTTAATGATTGATGTGTGGCTGTCGTGCAAAC		600
2011	600
2012C.....	600
2013A.....	600
2010	GACAAGTCTGCATGATGGTTTTGGAACAATTGGTCTTTGTAGGCATCATTAGTTTTGTATGCATACAAACAAGTGTATTGGTACGTTGGGTCTCTTA		700
2011	700
2012	700
2013	700
2010	TTGGGATAGACAAGCTGATAGTGAGTTTGTGGTGTGCAAGATTGGTGGTGTTCGAATGTGCATTGTCTCTGAACGCTAACTTTGGTTACATTGTGG		800
2011	800
2012T.....	800
2013	800
	← EM-R		
2010	CAGGTTGTTTGG		812
2011		812
2012		812
2013		812

Fig. 9. Comparison analysis of the DNA nucleotide sequences of pathogens detected from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*). Primers used in PCR are in boxes.

1.4 고찰

본 연구에서는 일본의 여윌증에 대한 연구방법 및 결과들을 국내의 여윌증 연구를 위하여 적용해 보았고, 우리나라의 여윌증 원인체는 일본에서 보고된 여윌증 원인체와 형태학적으로는 유사하지만, 분자유전학으로는 전혀 다른 종이라는 것을 밝혀내었다. 먼저 분자생물학적 진단방법을 적용하고자 일본 여윌증의 원인체인 *E. leei*의 primer set (Palenzuela et al., 2002)를 제작한 후 국내 여윌증상 넙치의 장을 이용하여 PCR을 실시하였지만 음성 반응을 나타내었다. 이러한 결과는 Choi et al. (2012)의 보고와 일치하였으며, 국내에서 발병하는 넙치의 여윌증 원인체는 일본에서 보고된 primer set를 사용한 PCR에서는 검출되지 않는다는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 국내 양식넙치의 여윌증 진단을 위한 primer set (EM-F/EM-R)를 처음으로 개발하였고(Table 3), 여윌증상을 나타내는 넙치를 대상으로 한 PCR 실험에서 명확한 band가 나타나는 것을 확인하였으며(Fig. 5 and 6), 향후 국내의 넙치에서 여윌증의 감염 진단이 필요한 경우, 이와 같은 방법이 유용하게 활용될 것으로 여겨진다.

여윌증에 대한 모니터링을 실시한 결과, 여윌증에 감염된 넙치의 대부분은 복부 부위에 심각한 여윌이 관찰되었으며(Fig. 4A), 여윌증에 감염된 넙치가 여윌증이 발병하지 않는 넙치보다 30~40% 낮은 체중이 관찰되었고(Fig. 7), 간혹 육안상 복부부위가 여윌이 없는 넙치에서도 감염이 발생하여 여윌증은 감염 후 여윌는 것으로 판단된다.

양식장별 감염률은 2010년도 21개소 중 8개소(38%), 2011년도 25개소 중 12개소(48%), 2012년도 4개소 중 2개소(50%), 2013년도 16개소 중 11개소(60%)에서 양성임을 확인하였다(Table 2). 그 중 양식장에서 여윌증 발생이 의심되어 분석을 의뢰해온 양식장의 경우에는 71.4% (25개소/35개소)의 높은 검출율을 보였고, 무작위로 여윌증 모니터링을 실시한 양식장의 경우에는 25.8% (8개소/31개소)의 낮은 검출율을 나타내었다(data not shown). 또한, 검출된 양식장은 이후의 감염 발생률이 높은 것으로 확인되었고, 향후에는 발병경로, 기회감염성, 숙주의 감수성 등 질병에 대한 전반적인 연구가 뒤따라야 할 것이다.

여윌증 원인체에 의한 연도별 감염률은 2010년도 60마리 중 17마리(28.3%), 2011년도 75마리 중 32마리(42.6%), 2012년도 24마리 중 8마리(33.3%), 2013년도 57마리 중 36마리(63.1%) 등으로 나타났고, 조사 기간 중 수온에 따른 감염률은 여름철부터 겨울철까지 다양하게 나타나는 것으로 조사되었다(Table 4). 제주도의 양식장은 대부분 연중 17°C 내외의 지하해수를 혼합 사용하여 여름철에도 사육수온을 23°C 내외, 겨울철에는 14°C 이상을 유지하고 있어(Oh et al., 1998), 여윌증이 연중 발생하는 원인으로서는 제주도의 시기적인 수온변동이 크지 않은 것도 연관성이 있을 것으로 추정된다.

현재까지 어류에서 보고되는 여웬증 원인체에 대한 생활사가 밝혀진 바는 없으며, 감염되는 어류의 크기 및 감염경로 등에 대해서도 조사가 부족한 실정이다. 본 연구에서 넙치의 크기별 감염현황을 조사한 결과, 11~20cm가 23개소 중 16개소(69.5%), 21~30cm가 27개소 중 12개소(44.4%), 31~40cm가 16개소 중 5개소(31.2%)에서 검출률을 나타내었다 (Table 5).

이전 연구들에서는 sharpsnout sea bream *Puntazzo puntazzo*, red sea bream *Pagrus major*, red drum *Sciaenops ocellatus*이 *Myxidium leei*에 감염되었을 때 공통적으로 장 조직에서 포자를 관찰할 수 있었다고 보고하였다(Le Breton and Marques, 1995; Diamant, 1998; Athanassopoulou et al., 1999). 또한, Myxosporaea에 감염된 스페인의 turbot, *Scophthalmus maximus* 에서도 포자를 소화관이나 장에서 확인할 수 있었으며 이러한 결과는 turbot의 성장에 영향을 미쳤을 것이라 제시하였다(Beaman et al., 1999). Bartholomew et al. (1989)은 *Ceratomyxa shasta* 에 감염된 연어과 어류에서도 포자형태의 기생충을 장 조직에서 관찰할 수 있었다고 보고하였는데 이와 같이 유럽의 여러 연구결과에서 점액포자충에 감염된 어류는 주로 장에서 감염이 이루어지는 것으로 보고되었다. 또한, 일본에서 발생하는 여웬증의 원인 기생충도 장과 담낭에서 확인되었다고 보고하였다(Tun et al., 2002). 이러한 결과는 우리나라 여웬증과 조직학적으로 유사한 경향을 보여주고 있으며, 여웬증에 심하게 감염된 넙치의 경우, 전 장관의 상피, 점막고유층, 근층 등에서 포자가 관찰되는 부분과도 일치하였다. 그러나, 감염부위에 있어서 유럽 및 일본에서는 장 조직을 주요한 감염 조직으로 보고하였지만, 본 연구결과에서 국내 넙치의 여웬증 원인체는 장 조직보다 신장 조직에서 더욱 높게 감염되는 것으로 조사되어(Fig. 8), 외국에서의 보고와 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 기생충성 질병으로 잘 알려진 *Ichthyobodo* sp., *Cryptocaryon* sp., *Myxobolus* sp., *Miamiensis* sp., *Myxidium* sp. 등과 조직학적으로 비교했을 때, 대부분 다른 형태가 관찰되어 새로운 기생충 종인 것으로 추정되며, 향후에는 여웬증에 대한 형태학적 동정에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

PCR에서 검출된 샘플을 대상으로 염기서열을 분석한 결과, 국내 넙치의 여웬증 원인체들 간의 DNA nucleotide sequences의 상동성은 99% 이상인 것으로 나타났다(Fig. 9). 그리고, GenBank에 등록된 *Myxobolus* sp. 및 *Cystodiscus axonis* 의 일부 염기서열과 80% 정도의 상동성이 있는 것으로 확인되어 아직 GenBank database에 등록되지 않은 새로운 기생충 종인 것으로 판명되었고, 향후에는 이 병원체에 대한 DNA walking과 같은 분자생물학적 분석을 통한 더욱 세부적인 연구가 뒤따라야 할 것이다.

본 연구에서는 국내의 양식넙치에서 발생하는 여웬증에 대하여 분석하였으며, 기존에

일본에서 보고된 결과와 비교했을 때, 장 조직에서 형태학적으로 유사한 포자가 관찰된 것은 동일하지만, 아직 GenBank에 등록되지 않은 새로운 기생충 종인 것으로 조사되었다. 그리고, 국내의 넙치 양식장에서 많은 문제를 야기시키는 여웬증에 대한 진단법을 처음 개발하여 제시하였고, 제주도 내에서 양식되는 유사한 크기의 넙치에서 발생할 수 있는 여웬증을 추정할 수 있는 기초 자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 여웬증과 같이 양식장에서 새로운 질병 유입에 대한 위험성을 낮추기 위해서는 지속적인 질병 예찰 및 감시가 필요할 것으로 판단되며, 향후에는 여웬증 원인 기생충의 동정에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

제 2장 2014~2015년도 제주도 양식 넙치에 대한 여윌증 감염 조사

2.1 서론

1990년대부터 각종 해수어의 양식이 활발하게 이루어져 각국에서 종묘 수입이 성해지자 방역체계가 미비한 상태에서 수입종묘와 같이 질병도 함께 도입되어 우리나라에 없었던 기생충이 유행하기 시작하였으며(Chun, 2006), 질병의 발병 양상 또한, 양식 초창기에는 고수온기에 기생충 및 세균에 의한 단독 감염이 주를 이루었으나 최근에는 수온과 상관없이 연중 다양한 병원체가 혼합감염의 형태로 질병을 일으키고 있어 수산생물의 대량 폐사를 유발시키기도 한다(Kim et al., 2006). 최근 들어 외래 질병의 유입 가능성이 증가하면서 질병을 전반적으로 모니터링하거나 질병과의 상관관계를 규명하고자 하는 연구가 점차 증가하고 있는 추세이다(Cho et al., 2009; Jung et al., 2012; Song et al., 2013). 그러나 현재까지 국내 양식 어류에 대한 질병 조사는 대부분 특정 질병을 중심으로 조사되어 왔으며(Kim et al., 2006; Cho et al., 2008; Kim et al., 2010), 원인불명의 질병에 대해서는 연구가 미미한 실정이다.

최근 제주도 내 양식장의 약 20cm 전후 크기의 넙치에서 여윌어가는 원인불명의 질병이 발생하여, 최초 발병증상을 보인 이후 1~3주 동안 폐사가 되는 사례가 증가하고 있으며, 이 질병에 감염된 넙치는 체색흑화, 어체중 감소 및 간 출혈 등의 증상을 나타낸다(Kim et al., 2015). Kim et al. (2015)의 연구에 따르면, 주변 국가인 일본의 터봇 여윌증의 원인체로 보고된 *E. leei*의 primer set (1,589 bp)를 제작하여(Palenzuela et al., 2002) 국내 여윌증 넙치를 대상으로 PCR실험을 실시한 결과, 음성반응이 관찰되어 동일한 원인체가 아닌 것으로 확인되었다. 또한, Kim et al. (2015)은 GenBank (NCBI, USA)에 등록된 점액포자충(*Myxidium* sp.)의 염기서열로부터 degenerated primers를 제작하여, 여윌증상 넙치로부터 DNA를 분리한 후 PCR을 실시한 결과 양성반응이 나타났고, DNA sequencing을 통해 염기서열을 분석한 결과 일부 염기서열이 점액포자충과 일치하였으나 아직 GenBank에 등록되지 않은 새로운 기생충 종인 것으로 보고하였다(Kim et al., 2015). 하지만, 국내에서 발생하는 여윌증 원인체의 발병 동향에 대한 연구는 아직 보고되어 있지 않은 실정이며, 양식 어류에 대한 질병 모니터링은 시기별 질병 관리에 유용한 자료를 제공하여, 자국내 특정 질병에 대한 기초 자료로서 매우 중요한 역할을 하며(OIE, 2008), 양식생물에서 발생하는 질병에 대하여 효과적인 방제 대책을 수립하기 위해서는 양식장별 질병 발생

현황에 대한 정확한 모니터링을 수집하는 것이 선행되어야 한다.

따라서, 본 연구에서는 2014~2015년도에 제주 지역 60개소 넙치 양식장을 대상으로 여
웬증 감염현황을 파악하기 위하여, Kim et al. (2015)이 보고한 primer set를 사용한 PCR법을
통해 시기별, 어체 크기별 발생 현황에 대한 기초자료로 제공하고자 감염률을 조사하였
으며, 또한 cohabitation test를 통하여 동일한 어종 및 타 어종으로의 전이가 발생하는지를
확인하고자 하였다.

2.2 재료 및 방법

2.2.1 2014년도 양식넙치 여윌증 모니터링

여윌증 감염현황 조사를 위해, 2014년도에 4, 5, 9, 11, 12월에 모니터링을 수행하였으며, 1년간 총 5회 실시하였다. 조사 지역 양식장은 Fig. 10과 같이 제주도의 제주시와 서귀포시 해역의 넙치를 양식하는 6개소 양식장을 대상으로 질병여부와 상관없이 각각의 양식장에서 넙치를 무작위로 3마리씩(5~600g 이내)을 수거하여 1회에 180마리씩 총 900마리를 조사하였고, 수온측정은 수질측정기 YSI Model 650XL (YSI, USA)를 사용하여 수온을 측정하였다(Table. 6).

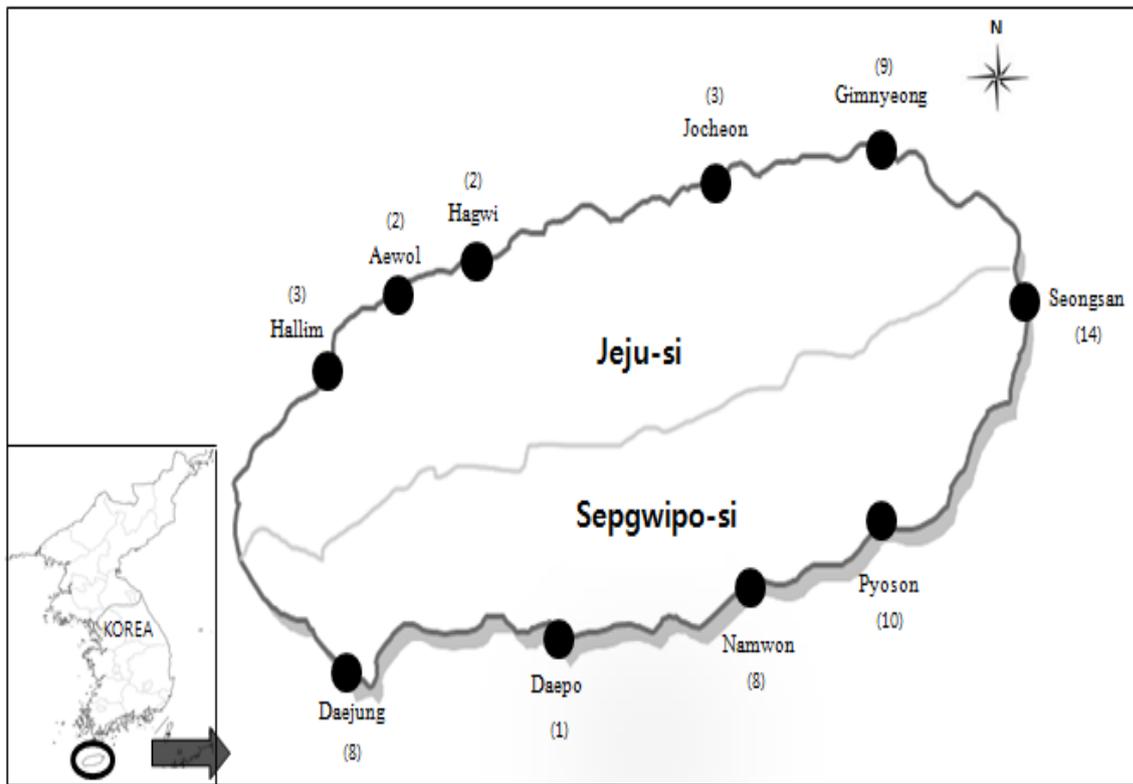


Fig. 10. Location of the Jeju olive flounder sampling station.

Table 6. Sample information employed for the investigation of emaciation infection in rearing olive flounder (*P. olivaceus*) of Korea in 2014

Year	Month	Fish species	Water temp. (°C)	Fishes	Farms	Fish size
2014	April	Olive flounder	16.4±0.4	30	10	<10cm
				54	18	11~20cm
				54	18	21~30cm
				42	14	>31cm
	May	Olive flounder	17.4±0.6	21	7	<10cm
				93	31	11~20cm
				33	11	21~30cm
	September	Olive flounder	20.9±1.3	33	11	>31cm
				0	0	<10cm
				18	6	11~20cm
				114	38	21~30cm
	November	Olive flounder	18.3±0.9	48	16	>31cm
3				1	<10cm	
6				2	11~20cm	
96				32	21~30cm	
December	Olive flounder	16.5±0.9	75	25	>31cm	
			0	0	<10cm	
			15	5	11~20cm	
			84	28	21~30cm	
Total				81	27	>31cm
				900	300	

2.2.2 2015년도 양식넙치 여웬증 모니터링

2015년도에는 3~4월 60개소, 5~6월 55개소, 7~8월 52개소, 10월 53개소 양식장을 대상으로 1개의 양식장 당 3마리씩 신장 조직을 1.5mL microtube에 모아 양식장별 감염 조사를 2014년도와 동일하게 실시하였다(Table 7).

Table 7. Sample information employed for the investigation of emaciation infection in rearing olive flounder (*P. olivaceus*) of Korea in 2015

Year	Month	Fish species	Water temp. (°C)	Farms	Fish size
2015	March& April	Olive flounder	15.5±1	15	<10cm
				23	11~20cm
				11	21~30cm
				11	>31cm
	May& June	Olive flounder	16.7±0.7	6	<10cm
				29	11~20cm
				13	21~30cm
	July& August	Olive flounder	20.5±1.7	7	>31cm
				3	<10cm
				20	11~20cm
				23	21~30cm
	October	Olive flounder	19.5±0.5	6	>31cm
4				<10cm	
16				11~20cm	
				14	21~30cm
				19	>31cm
Total				220	

2.2.3 DNA 분리

DNA를 분리하기 위하여 Kim et al. (2015)에 보고된 방법을 참고하여 신장부위를 대상으로 DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하여 DNA를 분리하였다. 먼저 ATL buffer 180 μ L와 proteinase K 20 μ L를 첨가하여 56 $^{\circ}$ C에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 μ L를 넣어 섞은 다음 ethanol (100%) 200 μ L를 더하여 spin column에 옮겨 6000 \times g에서 1분간 원심분리 하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 μ L와 AW2 buffer 500 μ L를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 50 μ L를 첨가하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2.2.4 PCR

PCR에 사용한 primer는 Kim et al. (2015)이 여傭증 진단을 위하여 제시하는 primers를 사용하였으며(Table 3), PCR은 microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 \times G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ L가 되게 하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 extension의 반응을 1회로 하여, 35회 반복하여 반응시켰다. 그리고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension시켰다. PCR 후 증폭 산물은 1 \times TAE buffer를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ L EtBr이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동한 후, UV 검출기를 이용하여, ultraviolet상에서 검출되는 산물의 크기를 관찰하였다. 증폭된 PCR 산물은 gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 회수한 후, Topo TA cloning[®] kit (Invitrogen, USA)로 cloning하여 염기서열을 확인하였다. 염기서열의 분석은 NCBI에서 제공되는 BLAST program 정보를 이용하여 상동성을 비교하였다.

2.2.5 Cohabitation test

감염어로부터 물을 통한 감염이 가능한지를 확인하기 위하여 Ishimatsu et al., (2007)의 방법을 사용하여 cohabitation 실험을 실시하였다. 먼저 PCR에 의해 여웬증 감염이 확인된 넙치를 donor group으로 하였고, 음성으로 판정된 넙치, 참돔, 감성돔을 recipient group으로 지정하여 두 가지 실험을 실시하였다. 첫 번째 실험에서는 여웬증에 걸린 넙치(16.3±0.4 cm, 40±5.23 g) 15마리와 여웬증이 감염되지 않은 넙치(16.7±0.9 cm, 53.4±8.47 g) 15마리를 이용하여 cohabitation 실험을 실시하였다(Fig. 11). 실험에 사용된 넙치는 100L 플라스틱 수조에 recipient group의 꼬리 지느러미를 조금 잘라내어 구별하였다. 두 번째 실험에서는 넙치 외 타 어종인 참돔(*Pagrus major*)과 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*)으로 여웬증의 전이가 이루어지는지를 조사하고자 하였다. 참돔 및 감성돔이 잡아먹히는 것을 방지하기 위하여 100L 수조 내에 플라스틱 그물망을 사용하여 구역을 나눈 후, 여웬증 감염이 확인된 넙치 10마리와 여웬증 음성 판정이 확인된 참돔(6.5±0.5 cm, 3.5±0.7 g)과 감성돔(17.3±1cm, 20.5±1.03 g)을 각각 10마리를 이용하여 cohabitation 실험을 실시하였다. 실험기간 동안의 사육 수온은 19±1℃를 유지시켜 주었으며 1일 1회씩 상업용 사료를 공급한 후, 사육수를 환수시켰다. 매일 폐사 정도를 확인하였고, 폐사어는 조직병리학적 관찰 및 PCR 방법을 사용하여 여웬증 감염 여부를 확인하였다.



여윌넙치 → 정상넙치(꼬리표시)



넙치



참돔



감성돔



넙치→참돔, 감성돔



사료공급, 환수, 폐사어 관찰

Fig. 11. Experimental transmission of emaciation disease to olive flounder (*P. olivaceus*), red sea bream (*P. major*) and black sea bream (*A. schlegelii*) by cohabitation with infected olive flounder.

2.2.6 병리조직학적 검사

여壼증에 감염된 넵치를 대상으로 신장부위를 적출하여 Bouin's solution에 24시간 동안 고정한 후 70% EtOH 탈수하였다. 이후 파라핀 침투를 시키고(Leica EG 1150HC, Germany) 포매기(Leica Jung 820, Germany)를 사용하여 포매를 실시한 후 마이크로톰으로 4~5 μ m 두께의 절편을 잘라 유리슬라이드에 부착시켜 건조시켰다. 제작된 조직표본은 haematoxylin 과 eosin (H&E)으로 염색을 실시한 후 광학현미경(Zeiss LT60, Germany)으로 검경하였다.

2.3 결 과

2.3.1 2014년도 양식장 시기별 감염률

본 연구에서는 국내 주요 넙치 양식 지역인 제주도를 대상으로 총 60개소 양식장으로 부터 4, 5, 9, 11, 12월에 양식 넙치 총 900마리에 대하여 여윌증 감염 현황을 조사하였다. 제주지역 넙치 양식장에 심각한 피해를 주고 있는 여윌증에 감염된 넙치는 개체에 따라 다소 차이가 있었으나, 전반적인 주요 외부증상은 체색흑화 및 복부 부위에 심각한 여윌 증상이 관찰되었고, 주요 내부증상은 간 출혈 및 간 위축 증상이 관찰되었다(data not shown).

제주지역 넙치 양식장에 심각한 피해를 주고 있는 여윌증에 대한 감염 현황을 조사한 결과, 60개소 양식장으로부터 채집한 180마리 중 2014년 4월 13개소의 26마리(14.4%), 5월 11개소의 12마리(6.6%), 9월 32개소의 44마리(24.4%), 11월 23개소의 36마리(20%), 12월 42개소의 78마리(43.3%)에서 PCR 양성반응을 나타내었다(Table 8 and Fig. 12). 또한, 시기별 감염률은 봄철부터 겨울철까지 다양한 감염률이 관찰되었으며(Table 8), 그 중, 수온이 떨어지기 시작하는 9월(가을)부터 12월(겨울)에 가장 높은 감염률이 관찰되었다(Table 8).

Table 8. Monitoring of emaciation disease for olive flounder (*P. olivaceus*) farms in 2014

Year	Month	Detection rate (%) by size(cm) group					
		>10	11~20	21~30	<31	Total	
						Fish	Farm
2014	April	10	22.2	44.4	0	14.4	21.6
		(1/10)	(4/18)	(8/18)	(0/14)	(26/180)	(13/60)
	May	14.2	9.6	54.5	9	6.6	18.3
		(1/7)	(3/31)	(6/11)	(1/11)	(12/180)	(11/60)
	September	-	100	55.2	31.2	24.4	53.3
			(6/6)	(21/38)	(5/16)	(44/180)	(32/60)
November	0	100	50	20	21.1	38.3	
	(0/1)	(2/2)	(16/32)	(5/25)	(38/180)	(23/60)	
December	-	100	75	62.9	42.2	71.6	
			(5/5)	(20/28)	(16/27)	(76/180)	(43/60)
Total		11.1	32.2	56.6	30.1	21.7	40.6
		(2/18)	(20/62)	(72/127)	(28/93)	(196/900)	(122/300)

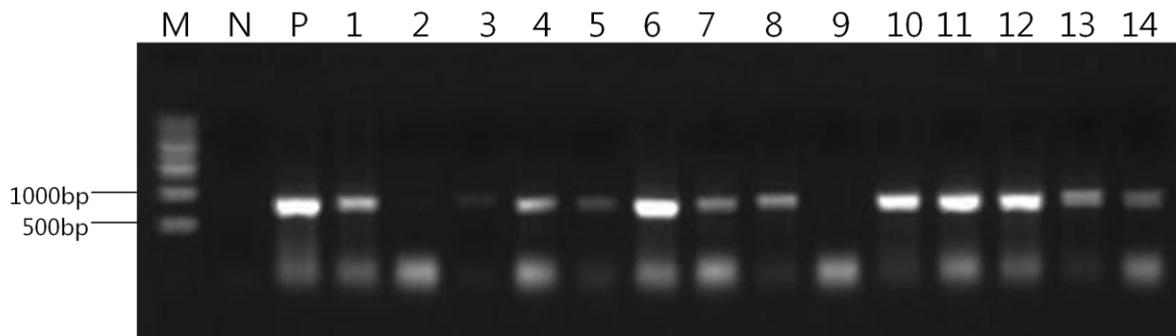


Fig. 12. Gel electrophoresis of the products amplified with the primer set EM-F/R from the extracted sample of the kidney of affected olive flounder cultured in emaciated disease. Lanes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 and 14, positive samples; Lanes 2 and 9, negative samples; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.

2.3.2 2014년도 크기별 감염률

검출된 유전자를 토대로 치어 사이즈부터 성어 사이즈까지 크기별 감염률을 조사한 결과, 4월에는 21~30cm의 그룹에서 18개소 중 8개소(44.4%), 11~20cm의 그룹에서 18개소 중 4개소(22.2%), 10cm이하의 그룹에서 10개소 중 1개소(10%), 31cm이상 그룹에서 14개소 중 0개소(0%) 순으로 높게 나타났으며, 5월에는 21~30cm의 그룹에서 11개소 중 6개소(54.5%), 10cm이하의 그룹에서 7개소 중 1개소(14.2%), 11~20cm의 그룹에서 31개소 중 3개소(9.6%), 31cm이상 그룹에서 11개소 중 1개소(9%) 순으로 높게 나타났지만, 4, 5월에는 31cm이상 그룹에서 낮은 검출률이 관찰되었다. 또한, 9월에는 11~20cm의 그룹에서 6개소 중 6개소(100%), 21~30cm의 그룹에서 38개소 중 21개소(55.2%), 31cm이상 그룹에서 16개소 중 5개소(31.2%) 순으로 높게 나타났으며, 11월에는 11~20cm의 그룹에서 2개소 중 2개소(100%), 21~30cm의 그룹에서 32개소 중 16개소(50%), 31cm이상 그룹에서 25개소 중 5개소(20%), 10cm이하의 그룹에서 1개소 중 0개소(0%) 순으로 높게 나타났으며, 12월에는 11~20cm의 그룹에서 5개소 중 5개소(100%), 21~30cm의 그룹에서 28개소 중 20개소(75%), 31cm이상 그룹에서 27개소 중 16개소(62.9%) 순으로 높게 나타났고, 4월부터 12월까지 실시한 역학 조사를 통하여 국내 여嵬증은 21~30cm사이에서 높은 감염률이 관찰되었지만, 모든 크기의 넙치 사이즈에서 감염이 발생하는 것을 확인하였다(Table 8).

2.3.3 2015년도 양식장 시기별 감염률

2015년 양식장별 여嵬증 감염 현황 결과, 3~4월에는 60개소 양식장 중 30개소(50%), 5~6월에는 55개소 양식장 중 9개소(16.3%), 7~8월에는 52개소 양식장 중 47개(90.3%), 10월에는 53개소 양식장 중 45개소(84.9%)에서 여嵬증이 검출되었다(Table 9 and Fig. 13). 또한, 크기별 감염률 조사 결과, 3~4월에는 21~30cm의 그룹에서 11개소 중 9개소(81.8%), 31cm이상 그룹에서 11개소 중 7개소(72.1%), 11~20cm미만 그룹에서 23개소 중 13개소(47.8%), 10cm이하의 그룹에서 15개소 중 0개소(0%) 순으로 높게 나타났으며, 5~6월에는 31cm이상 그룹에서 7개소 중 3개소(42.8%), 21~30cm의 그룹에서 13개소 중 3개소(23%), 11~20cm의 그룹에서 29개소 중 3개소(10.3%), 10cm이하의 그룹에서 6개소 중 0개소(0%) 순으로 높게 나타났다(Table 9). 또한, 7~8월에는 10cm이하의 그룹에서 3개소 중 3개소(100%), 11~20cm의 그룹에서 20개소 중 19개소(95%), 21~30cm의 그룹에서 23개소 중 20개소(86.9%), 31cm이상 그룹에서 6개소 중 5개소(83.3%) 순으로 높게 나타났으며, 10월에는 21~30cm이하의 그룹에서 14개소 중 13개소(92.8%), 31cm이상의 그룹에서 19개소 중 17개소(89.4%), 11~20cm의 그룹에서 16개소 중 14개소(87.5%), 10cm이하 그룹에서 4개소 중 1

개소(25%) 순으로 높게 났고, 3월부터 10월까지 실시한 역학조사를 통하여 2014년도와 동일하게 전 사이즈에서 감염이 발생하는 것을 확인하였으나, 2015년도에는 31cm이상에서 가장 높은 감염률이 관찰되었다(Table 9). 또한, 시기별 감염률은 2014년도와 동일하게 연중 감염이 발생하는 것으로 확인 되었으며(Table 9), 2014년도 보다 2015년에 더 높은 감염률이 관찰되었다. 그 중, 고수온기인 7~8월과 수온이 떨어지기 시작하는 10월에 가장 높은 감염률이 관찰되었다(Table 9).

Table 9. Monitoring of emaciation disease for olive flounder (*P. olivaceus*) farms in 2015

Year	Month	Detection rate (%) by size(cm) group				Total farm
		>10	11~20	21~30	<31	
2015	March & April	0 (0/15)	47.8 (13/23)	81.8 (9/11)	72.1 (8/11)	50 (30/60)
	May & June	0 (0/6)	10.3 (3/29)	23 (3/13)	42.8 (3/7)	16.3 (9/55)
	July & August	100 (3/3)	95 (19/20)	86.9 (20/23)	83.3 (5/6)	90.3 (47/52)
	October	25 (1/4)	87.5 (14/16)	92.8 (13/14)	89.4 (17/19)	84.9 (45/53)
	Total	14.2 (4/28)	55.6 (49/88)	73.7 (45/61)	76.7 (33/43)	59.5 (131/220)

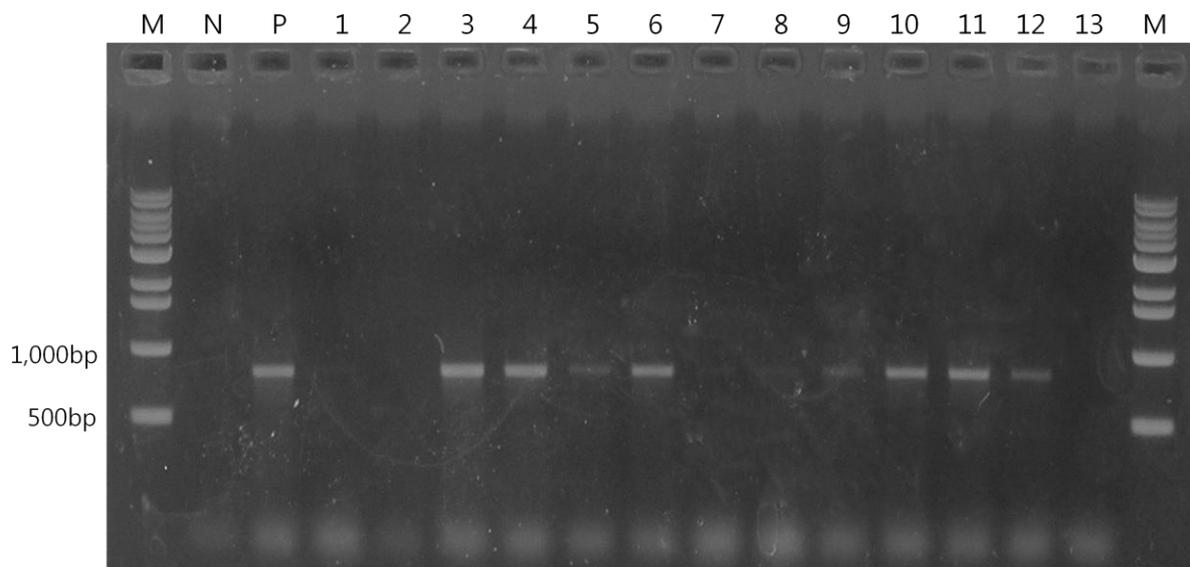


Fig. 13. Gel electrophoresis of the products amplified with the primer set EM-F/R from the extracted sample of the kidney of affected olive flounder cultured in emaciated disease. Lanes 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 and 13, positive samples; Lanes 1, 2, 7 and 13, negative samples; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.

2.3.4 검출된 넙치의 병리조직학적 검사

모니터링을 통해 검출된 넙치를 대상으로 조직학적 검사를 실시한 결과, 여嬴증에 감염된 넙치의 신장에서 부위에서 4~9 μ m 크기의 포자가 다수 관찰되었고, 심한 경우 조직의 탈락 및 파괴를 확인하였다(Fig. 14).

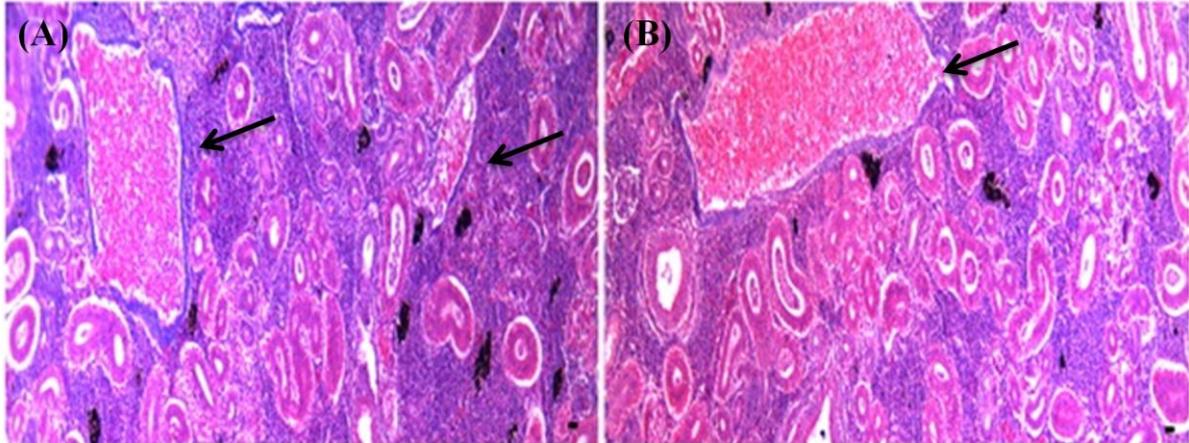


Fig. 14. Histological features of kidneys (A and B $\times 100$) from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*). Note microsporean spores in emaciated disease the glomerulus (arrows). H & E stain. Bar = 20 μ m.

2.3.5 Cohabitation test

넙치, 참돔, 감성돔을 대상으로 병원체의 전이에 대한 실험을 실시한 결과, 동일 어종의 경우에는 donor 넙치가 3일째에 100% 폐사하였고, recipient 넙치에서는 12일째에 100% 누적 폐사율이 관찰되었다(Fig. 15). 감염어로부터 유출된 병원체에 의해 감염된 recipient group에서의 폐사는 donor group에서 보다 7일 정도 후에 나타나기 시작하였으며, 폐사가 일어난 recipient group의 넙치를 PCR법으로 확인한 결과, 73.3%의 감염률이 관찰되었고(Table 10), 조직학적 검사 결과 신장부위에서 donor fish와 동일한 형태의 포자가 관찰되었다(Fig. 16). 참돔 및 감성돔으로의 병원체 전이에 대한 실험 결과, 실험 기간 중 3일째에 donor group에서 100% 누적 폐사율이 관찰되었고, recipient group에서는 실험종료일까지 폐사가 발생하지 않았으며(Fig. 17 and 18), PCR검사 결과에서 모두 음성인 것으로 판명되었다(Table 10). 조직학적 검사 결과에서도 모든 참돔 및 감성돔의 조직 부위에서 포자가 관찰되지 않았다(data not shown).

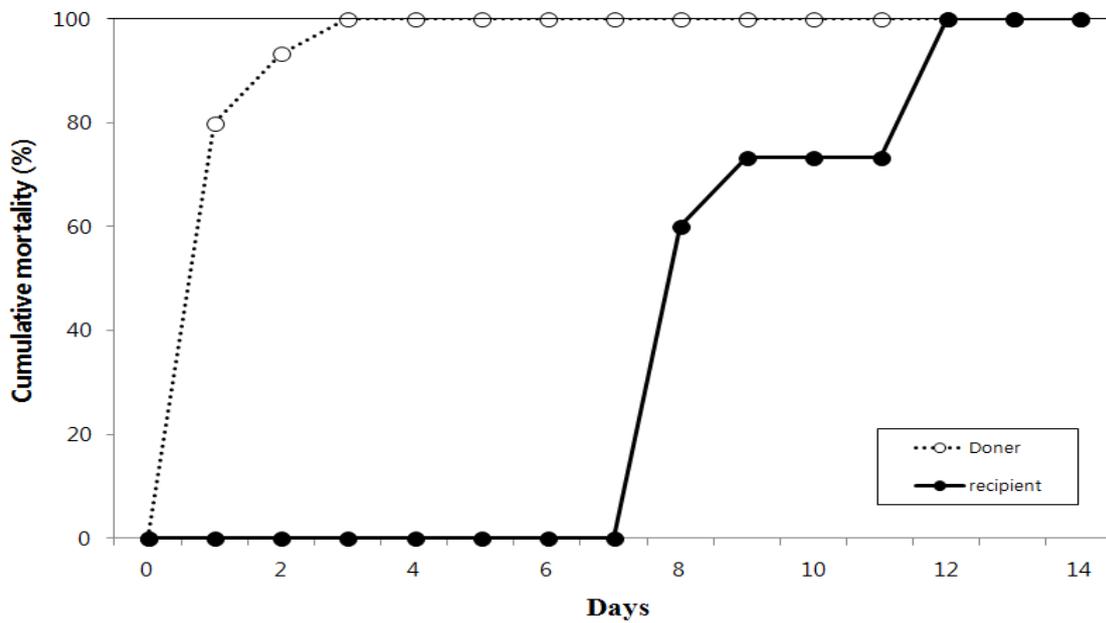


Fig. 15. Cumulative mortality (%) of normal olive flounder (*P. olivaceus*) after cohabitated with the emaciated olive flounder.

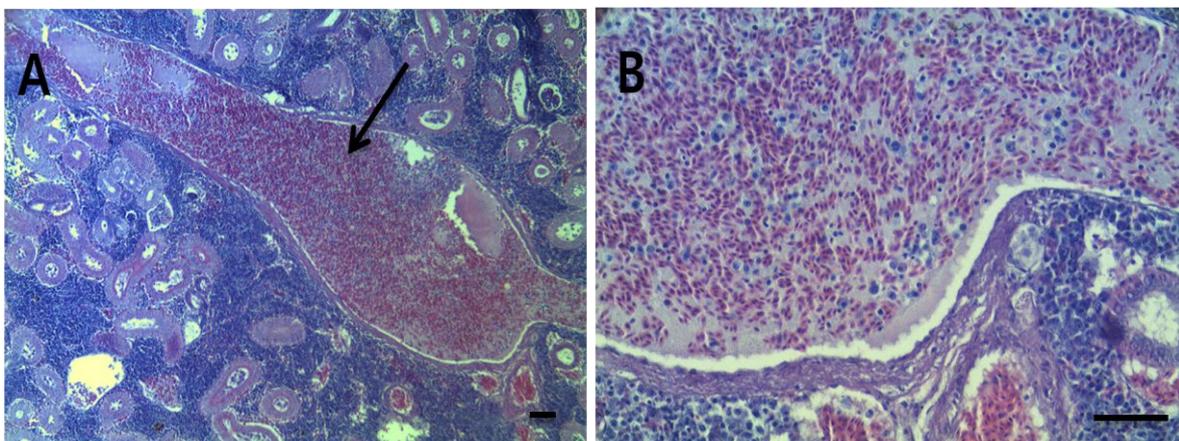


Fig. 16. Histological findings of kidney (A, x200 and B, x400) from the recipient olive flounder (*P. olivaceus*) cohabitated with the emaciated olive flounder. Note microsporean spores in emaciated disease the glomerulus (arrows). H & E stain. Bar = 20µm.

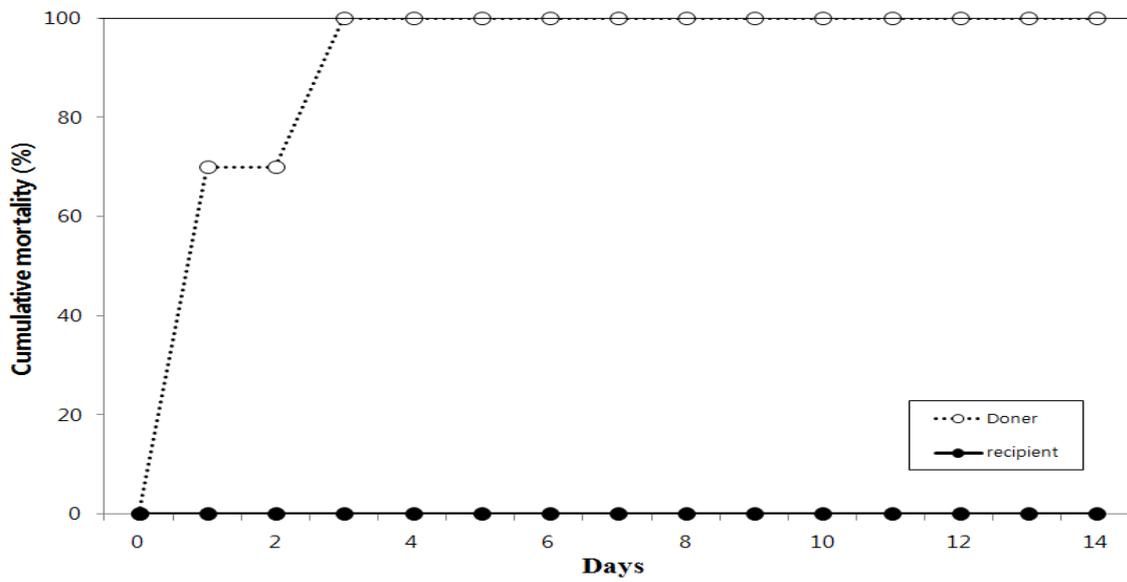


Fig. 17. Cumulative mortality (%) of normal red sea bream (*P. major*) after cohabitated with the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*).

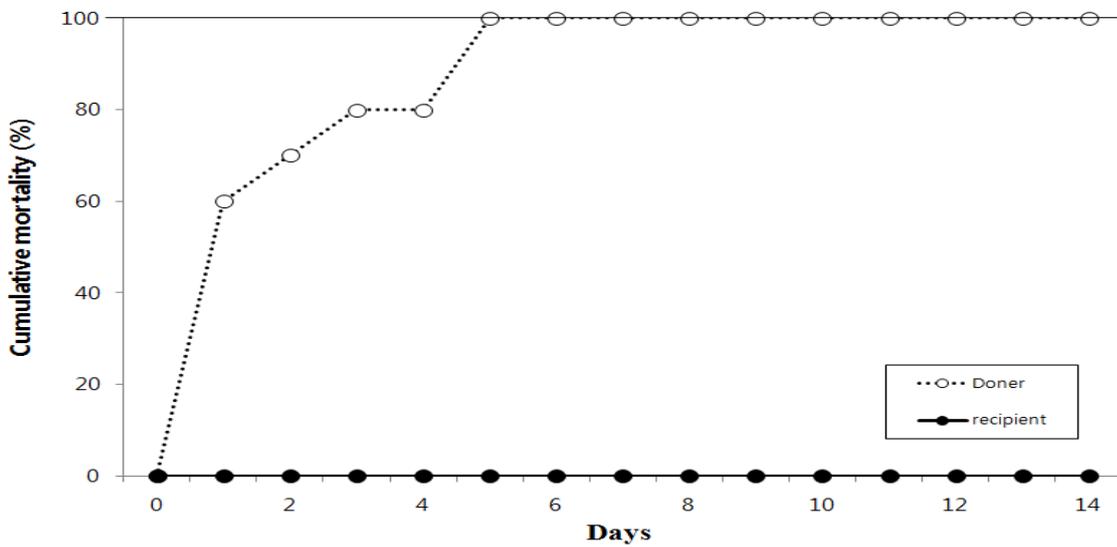


Fig. 18. Cumulative mortality (%) of normal black sea bream (*A. schlegelii*) after cohabitated with the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*).

Table 10. Experimental transmission of emaciated disease to olive flounder (*P. olivaceus*), red sea bream (*P. major*) and black sea bream (*A. schlegelii*) by close association with infected olive flounder

Infection rate (%) (positive no./total no.)					
Cohabitation 1		Cohabitation 2		Cohabitation 3	
Donor (olive flounder)	Recipient (olive flounder)	Donor (olive flounder)	Recipient (red sea bream)	Donor (olive flounder)	Recipient (black sea bream)
100% (15/15)	73.3% (11/15)	100% (10/10)	0% (0/10)	100% (5/5)	0% (0/10)

2.4 고찰

여윌증 발생동향을 파악하기 위해 2014년도에는 총 900마리를 대상으로 시기, 양식장, 개체 수, 크기 등의 체계적인 감염률을 조사하였고, 2015년도에는 2014년도에 많은 수의 감염률이 관찰되어 주기적인 여윌증 모니터링이 필요하다고 여겨져, 각 개체 수를 제외하고 2014년도와 동일하게 실험을 실시하였고, 여윌증의 수평감염을 관찰하기 위해 동일 어종 및 다른 어종의 *cohabitation* 실험을 실시하였다.

양식장별 감염 조사 결과, 2014년도에는 18.3%~71.6%의 감염률이 관찰되었고, 2015년에는 16.3%~90.3%의 높은 감염률을 관찰되었다. 이러한 결과는 해마다 여윌증 발병률이 증가하고 있는 것을 시사하고 있으며, 제주도 양식산업에 심각한 문제를 일으키는 것으로 조사되어, 추후에는 여윌증에 의한 피해를 최소화하기 위해서는 주기적인 모니터링을 실시하여 감염된 수조를 격리하는 등의 대처 방안이 필요할 것으로 여겨진다.

넙치 시료크기별 여윌증 발병 동향은 2014년도에 11~30cm 사이의 넙치에서 주로 발병하는 양상이 관찰되었고(Table 8), 2015년도에도 2014년 결과와 유사한 결과 값을 나타내었지만, 31 cm 이상에서도 높은 감염률을 관찰하였다(Table 9). 이러한 결과는 여윌증의 감염률이 성어에서도 상대적으로 증가하고 있는 것을 시사하고 있으나, 어체 크기별 병원체 감염률에 대한 비교는 채집된 시료의 특성에 따라 차이가 날 수 있으며, 이에 대한 연구사례가 적어 절대적인 비교가 불가능한 상태이나, 국내에서 발생하는 여윌증은 전 사이즈에서 감염이 발생하므로 추후에는 입식한 이후부터 성어가 될 때까지 질병 관리에 특별히 유의할 필요가 있을 것으로 판단된다.

Cho et al. (2012)은 양식 넙치를 대상으로 질병에 대한 통계적인 역학조사를 실시한 결과, 수온 변동이 심한 4월과 12월에 기생충 질병인 *Trichodina*, *Icthyobodo* 등이 높은 감염률을 보였고, 본 실험의 시기별 발생 동향 결과, 수온의 변동 폭이 큰 시기 전후인 2014년 9월, 12월, 2015년 3월, 7월, 10월에 상대적으로 높은 감염률을 나타내었으나, 전 시기에 감염이 발생하는 것으로 조사되었다. 이는 여윌증이 연중 발생하는 원인으로서 제주도의 시기적인 수온변동이 크지 않은 것도 연관성이 있을 것으로 추정된다.

여윌증의 동정을 위하여 어체에서 분리한 신장의 genomic DNA를 분리하여 28S rRNA 유전자(812 bp) 염기서열을 분석하여, NCBI에서 제공되는 BLAST program 정보를 이용하여 상동성을 비교하였다. 분석 결과, 부분적으로 *cystodiscus axonis*와 88%로 가장 높은 상동성을 나타내었고(Data not shown), 이는 Kim et al. (2015)에서 보고된 내용과 일치하였다. 하지만, 정확히 일치하는 유전정보는 없었으며, 현재까지 GenBank에 등록된 포자충 관련 유전 정보가 한정적이기 때문에 유전학적으로는 명확히 동정할 수 없으며 현재 여윌증의

동정을 위한 다양한 연구가 진행중에 있다.

일본에서 여웬증으로 알려진 *E. leei*에 감염된 어류를 donor fish로 사용하여 동일 어종 및 다른 어종을 대상으로 cohabitaiton test 실험을 실시하였으며 그 결과, 동일 어종 및 다른 어종으로 *E. leei*의 전이가 이루어졌다고 보고하였다(Diamant, 1997; Yasuda et al., 2002). 본 연구에서는 여웬증의 원인체를 동일한 어종인 넙치로 전이시켰을 때 여웬증상이 나타났으나 다른 어종인 참돔 및 감성돔으로는 전이는 일어나지 않아 일본의 연구 결과와는 대조적인 것으로 나타났으며(Fig. 15~18), 감염여부를 확인하기 위해 실시한 조직학적 검사 및 PCR 검사에서도 모두 동일한 결과가 확인되었다(Table 10&Fig. 16). 이러한 결과는 종 특이성과 관련하여 여웬증 원인체가 숙주의 환경, 생활조건 등의 요인들이 다른 어종과 맞지 않아 동일 어종의 넙치에만 감염이 이루어지고 다른 어종에는 감염이 이루어지지 않는 것으로 추정되고 있으나, 이는 향후 조사가 더 필요한 사항이며, 다른 어종에 감염이 발생하는지에 대한 세부적인 연구가 더 필요할 것으로 여겨진다.

본 연구의 자료는 제주도 내에서 양식되는 넙치에서 여웬증의 감염시기 및 역학조사를 위한 좋은 기초자료가 될 수 있을 것이며, 향후에는 여웬증의 원인체인 기생충의 생활사에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

제 3장 여윌증 낚치, *Paralichthys olivaceus*의 비특이적 면역반응 및 혈액학적 분석

3.1 서론

우리나라의 어류양식은 1980년대부터 발달하기 시작하여 현재 많은 연안의 지역에서 행해지고 있으며, 그 중 낚치양식은 해산어류양식에서 가장 큰 비중을 차지하고 널리 보급되어 경제적 가치가 증가하고 있으며, 특히 제주도의 경우 전국의 양식낚치 생산량의 약 50%를 생산하고 있다. 통계청의 자료에 따르면 2003년 수산물 생산량은 어업에서 2,487천톤, 양식에서 1,065천톤이 생산되었으며, 2013년 수산물 생산량은 어업에서 3,155천톤, 양식에서 73,108천톤으로 지난 10년 동안 어업생산량은 26% 증가한 반면 양식 생산량은 2000% 이상 증가를 보이고 있다(NFRDI, 2013).

하지만 낚치양식을 포함한 어류양식 산업은 바이러스, 세균, 진균, 기생충 질병이 만연하고 있으며, 이는 어류양식산업의 가장 큰 문제점 중 하나이다. 특히, 2007년 이후 제주도 낚치 양식장에서 복부가 만성적으로 여위어가면서 폐사를 일으키는 원인불명의 여윌증은 해마다 발병률이 증가하고 있는 추세이며, 이로 인해 경제적으로 많은 손실을 초래한 바 있다(Kim et al. 2011). 또한, 국내 여윌증 낚치를 대상으로 자주 출현하는 세균성 질병(*V. harveyi*, *E. tarda*)에 대하여 여윌증과의 상관관계를 조사한 결과, 두 균주가 여윌증 발병에 직접적인 영향이 없는 것으로 확인되었다(Choi et al., 2012).

대부분의 어류 양식장에서는 고밀도 양식 및 수질 악화 등에 의해 많은 스트레스를 받게 되며(Bonga, 1997), 이러한 스트레스는 양식 어류의 생산성을 감소시키는 역할을 한다. 즉, 스트레스를 받은 대부분의 어류는 체내 대사와 생리상태의 변화로 생산성 감소를 초래하며(Wardle, 1981), 면역기능을 감소시켜 질병에 대한 저항성을 떨어뜨리고(Pickering, 1992), 생체 내 대사와 혈액성상의 변화를 보인다고 보고된 바 있다(Barton and Iwama, 1991; Ryan, 1995; Park et al. 1999; Chang et al, 2006).

어류의 혈액은 여러 가지 환경적 요인 중, 특히 독성물질에 의해 그 구성성분이 변동되므로 어류의 생리적 영향 수준을 파악하는데 유용한 수단으로 활용하고 있으며, 어류의 혈청은 어류의 생리상태의 수준 및 체내 면역기능을 판단할 수 있는 지표로 사용될 수 있다(Davis and Parker, 1990; Sharma et al., 1976; Munck et al., 1984).

어류의 비특이적 방어는 병원균의 감염시 첫 번째 방어선으로 알려져 있으며, 선천적인 면역시스템의 활성화에 의해 병원균으로부터 저항할 수 있는 능력이 강화될 수 있음이

보고되고 있다(Anderson and Siwicki 1994). 그 중 어류의 식세포 활성화(Jorgensen et al. 1993a), 대식세포활성(Kajita et al. 1991), 라이소자임 활성화(Engstad et al. 1992; Jorgensen et al., 1993b)은 질병에 대한 면역 체계를 관찰할 수 있는 방법으로 질병에 대한 지표로 사용되고 있다(Chen and Ains-worth, 1992).

따라서 본 연구에서는 제주 넙치 양식장에서 문제로 대두되고 있는 여웬증에 대하여 감염어와 비감염어를 대상으로 혈액학적 분석 및 비특이적인 면역반응의 변동을 관찰하여 여웬증 감염어에 대한 지표를 제시하기 위해 실험을 실시하였다.

3.2 재료 및 방법

3.2.1 실험어

제주도내 3개소 양식장에서 전형적인 여윌증상을 보이는 양식 넙치(전장 19.8 ± 2 cm, 체중 70 ± 5 g)를 선별하여 실험어로 사용하였고, 여윌증 질병이력이 없는 1개소 양식장에서 외관상 건강한 넙치(전장 20 ± 3 cm, 체중 90 ± 10 g)를 선별하여 대조구로 사용하였다. 모든 실험은 Kim et al. (2015)이 보고한 방법에 따라 PCR을 통해 감염여부를 확인하였고, 각각 3마리씩 실험을 실시하였다.

3.2.2 DNA 분리

DNA를 분리하기 위하여 Kim et al. (2015)에 보고된 방법을 참고하여 신장부위를 대상으로 DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하여 DNA를 분리하였다. 먼저 ATL buffer 180 μ L와 proteinase K 20 μ L를 첨가하여 56 $^{\circ}$ C에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 μ L를 넣어 섞은 다음 ethanol (100%) 200 μ L를 더하여 spin column에 옮겨 6000 \times g에서 1분간 원심분리 하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 μ L와 AW2 buffer 500 μ L를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 50 μ L를 첨가하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

3.2.3 PCR

PCR분석은 Kim et al. (2015)이 여윌증 진단을 위하여 제시한 EM-F/EM-R primer set를 사용하였으며(Table 3), PCR은 microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 x G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Themal Cyclor Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ L 가 되게 하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 extension의 반응을 1회로 하여, 35회 반복하여 반응시켰다. 그리고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension시켰다. PCR 후 증폭 산물은 1 x TAE buffer를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ L EtBr이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동한 후, UV 검출기를 이용하여, ultraviolet 상에서 검출되는 산물의 크기를 관찰하였다.

3.2.4 혈액분석 및 비 특이적 면역반응

혈액은 heparin 처리 주사기를 사용하여 마취하지 않고 미부혈관에서 30초 이내에 채취하여, microhematocrit법으로 Ht (Hematocrit)치를 측정하고, 혈액학적 분석, Lysozyme, NBT (Nitroblue-tetrazolium) 및 MPO (Myeloperoxidase) 활성을 측정하기 위해 4°C, 3,000 × g로 10분간 원심 분리하여 그 상층액을 양식장별로 1.5mL microtube에 취한 후 사용하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 얻은 혈장은 분석 전까지 -80°C에 보관하였다.

혈액생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 혈액생화학적 변화를 측정하였다. 측정항목은 GPT (Glutamic pyruvic transaminase), GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase), 글루코스 (GLU; Glucose), 총 콜레스테롤 (Tchol; Total cholesterol), 총 단백질 (TP; Total protein)등 Ht을 포함하여 총 6항목을 측정하였다.

혈청 내 lysozyme의 활성은 Yeh et al. (2008)의 방법을 바탕으로 분석하였다. 먼저 0.05 M sodium phosphate acid buffer (pH 6.2)에 동결 건조된 *M. lysodeikticus* (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2mg/mL 농도의 현탁액을 만든다. 현탁액 200uL를 96-well plates에 분주하고, 어류에서 분리한 혈청 10uL를 혼합시킨 후, microplate reader (Thermo, USA)를 이용하여 530nm에서 1분과 5분에 흡광도 값을 측정하였다. lysozyme의 활성은 unit/mL로 나타내었으며, 흡광도 값이 0.001 감소한 값을 1 unit로 정의하였다.

혈청 내 MPO 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 기초로 분석하였다. 먼저 HBSS (Hanks balanced salt solution)를 96-well plates에 80uL씩 분주한 다음 혈청 20uL를 넣는다. 그 후 20mM TMB (3, 3' 5, 5-tetramethylbenzidine hydrochloride) 용액과 5mM H₂O₂용액을 넣는다. 2분간 반응시킨 후 4M H₂SO₄용액을 35uL 첨가한 후 microplate reader (Thermo, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈액내의 NBT 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 이용하여 호흡폭발 동안의 호중구(Neutrophils)에 의한 oxidative radical 생성량을 측정하였다. 우선 혈액(전혈)과 NBT solution (0.2%)을 1:1의 비율로 각각 50uL 를 glass tube에 옮긴 후, formazon 생성을 감소시키기 위해 dimethylformamide를 1 mL씩 넣는다. 그 후 2,000 × g에서 5분 동안 원심분리를 하여 최종적으로 상층액을 취한 후, NBT의 감소되는 범위를 분광광도계(Genesys 10UV, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 dimethyl formamide를 사용하였다.

3.2.5 통계학적 분석

SPSS (Ver.21) 통계분석 프로그램을 활용하여 t-test로 분석하였으며, $p < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

3.3 결 과

3.3.1 PCR

본 연구에서는 제주도 양식장에서 빈번히 발생하는 여壼증에 대한 진단지표를 확립하기 위하여 여壼증에 감염된 어류와 비감염된 어류를 대상으로 혈액학적 분석 및 비특이적인 면역반응에 대하여 실험을 실시하였다. 먼저, 육안상 여壼증상을 보이는 3개소 양식장과 여壼증 감염이력이 없고 육안상 여壼지 않는 1개소 양식장으로부터 각 3마리씩의 넙치를 수거하여 혈액을 채취한 후, 신장부위를 적출하여 PCR 검사를 통해 여壼증 감염 유무 확인하였다. 그 결과 3개소 양식장에서는 양성반응이 관찰되어 실험구로 사용하였으며, 1개소 양식장에서는 음성반응이 관찰되어 대조구로 사용하였다(Fig. 19).

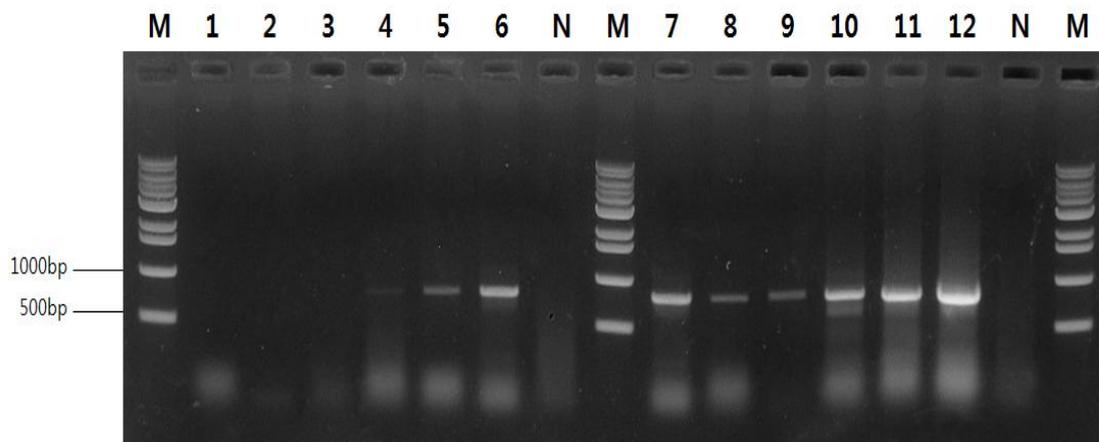


Fig. 19. Results of PCR using EM-F/R primers on extracted kidney DNA of olive flounder. Lane1 to lane3, control; lane 4 to lane 6, Farm-A; lane 7 to lane 9, Farm-B, lane 10 to lane 12, Farm-C; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.

3.3.2 혈액학적 검사

본 실험의 Ht 결과, 실험구 farm-A ($70\pm 5\%$), farm-B ($56\pm 3\%$), farm-C ($68\pm 2\%$) 그룹에서 대조구($39\pm 2\%$)보다 높은 수치를 나타내었고, 그 중 farm-A와 farm-B에서 대조구보다 유의적으로 높은 수치가 관찰되었다(Fig. 20A). GPT/GOT은 GOT의 farm-B를 제외한 GPT (control: $42.6\pm 14\text{U/L}$, farm-A: $12.3\pm 1.7\text{U/L}$, farm-B: $32.6\pm 6.4\text{U/L}$, farm-C: $3\pm 2.4\text{U/L}$), GOT (control: $11.5\pm 1.5\text{U/L}$, farm-A: $1.6\pm 0.4\text{U/L}$, farm-B: $32\pm 3\text{U/L}$, farm-C: $4\pm 2.6\text{U/L}$)에서 대조구보다 낮은 수치가 관찰되었지만, 모두 정상적인 범위를 나타내었다(Fig. 20B&C).

Glucose 결과, farm-A ($19\pm 1.8\text{g/dL}$)와 farm-B ($27\pm 6.08\text{g/dL}$)에서 대조구($36.6\pm 2.8\text{g/dL}$)보다 낮은 수치가 관찰되었으나, farm-C ($96\pm 17.5\text{g/dL}$)에서는 대조구에 비해 유의적으로 높은 수치가 관찰되었다(Fig. 21A). Total cholesterol은 대조구($236.6\pm 18.4\text{g/dL}$)보다 모든 실험구(farm-A: $136\pm 6.9\text{g/dL}$; farm-B: $67.3\pm 6.9\text{g/dL}$; farm-C: $42.6\pm 16.5\text{g/dL}$)에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내었으며(Fig. 21B), Total protein은 대조구($1.3\pm 0.15\text{g/dL}$)에 비해 모든 실험구(farm-A: $1.2\pm 0.1\text{g/dL}$, farm-B: $0.3\pm 0.05\text{g/dL}$, farm-C: $0.53\pm 0.1\text{g/dL}$)에서 낮은 수치가 관찰되었지만 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 21C).

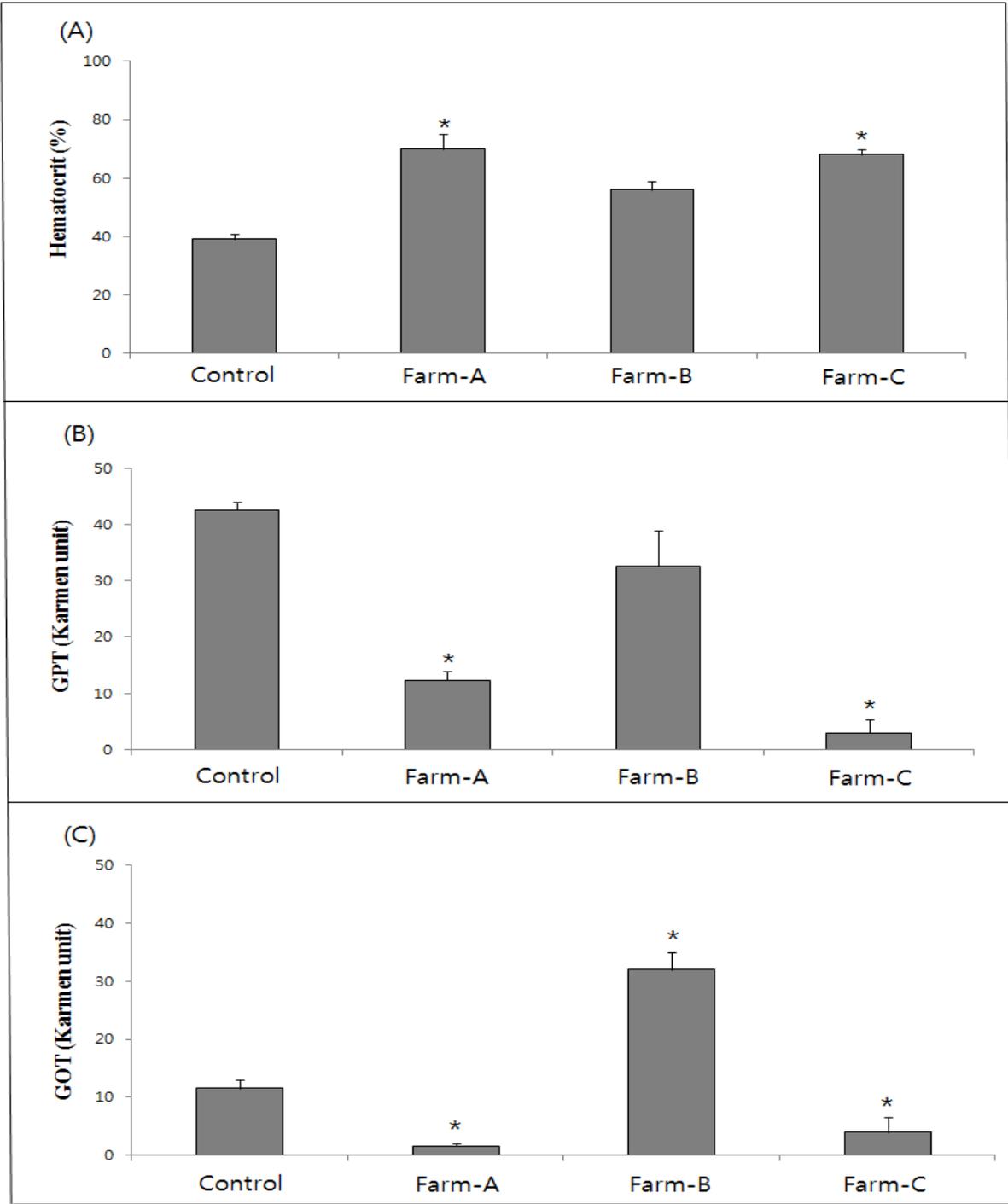


Fig. 20. Analysis of hematocrit (A), GPT (B), GOT (C) in the serum of olive flounder (*P. olivaceus*). * Significant difference between control group and emaciation group based on the *t*-test ($p < 0.05$).

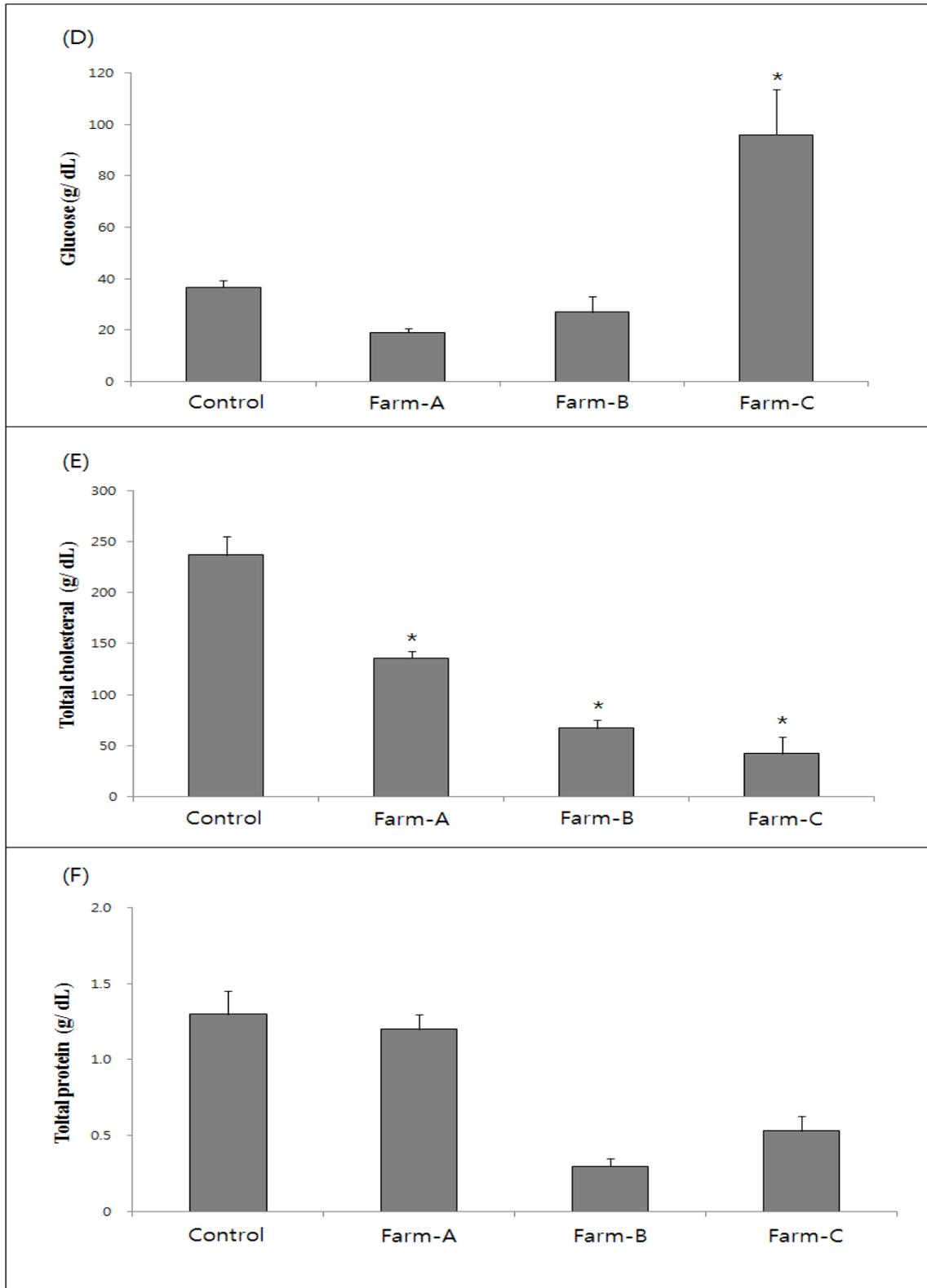


Fig. 21. Analysis of glucose (D), total cholesterol (E), total protein (F) in the serum of olive flounder, (*P. olivaceus*). * Significant difference between control group and emaciation group based on the *t*-test ($p < 0.05$).

3.3.3 비특이적인 면역 분석

어류의 혈청을 이용한 lysozyme 활성을 조사한 결과, 대조구(19.8 ± 0.2 U/L)에 비해서 모든 실험구(farm-A: 14.8 ± 0.3 U/L, farm-B: 17 ± 0.6 U/L, farm-C: 11.6 ± 0.3 U/L)에서 낮은 수치가 관찰되었고, 그 중 farm-C에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 22A). 또한, 비특이적 면역계 중 감염과 염증반응에 작용하는 MPO활성 결과는 lysozyme과 동일하게 대조구(absorbance 450nm, 2.2 ± 0.3)에 비해 모든 실험구(absorbance 450nm, farm-A: 1.97 ± 0.25 , farm-B: 1.38 ± 0.03 , farm-C: 0.75 ± 0.07)에서 낮은 수치가 관찰되었고, 그 중 farm-B, farm-C에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 22B). 세포성 면역의 역할을 하는 NBT 활성을 조사한 결과, 대조구(absorbance 540nm, 0.51 ± 0.1)보다 모든 실험구(absorbance 540nm, farm-A: 0.38 ± 0.13 , farm-B: 0.25 ± 0.08 , farm-C: 0.085 ± 0.004)에서 낮은 수치가 관찰되었고, 그 중, farm-B, farm-C에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 22C).

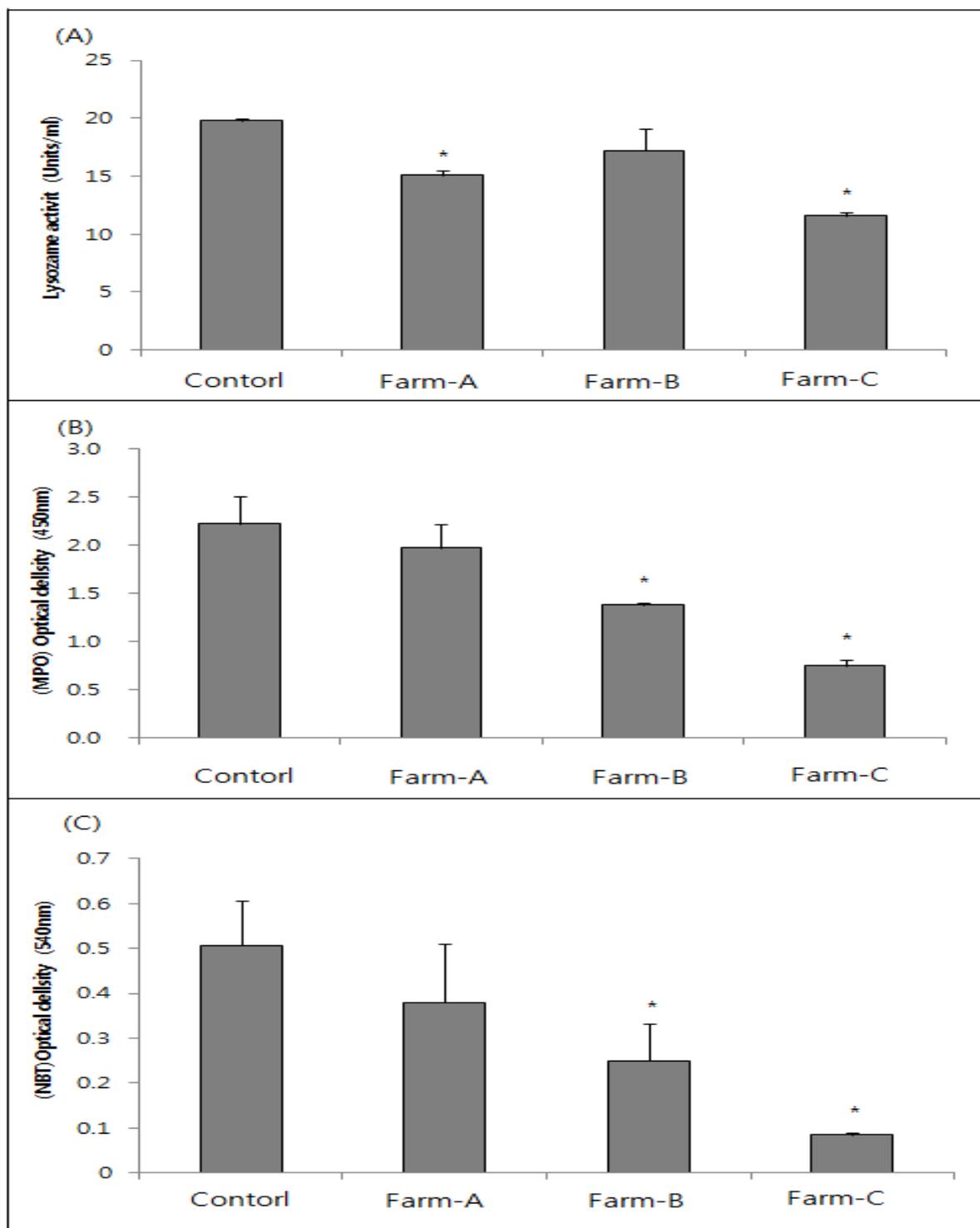


Fig. 22. Analysis of lysozyme activity (A), myeloperoxidase activity (B), nitroblue tetrazolium (C) in the serum of olive flounder, (*P. olivaceus*). *Significant difference between control group and emaciation group based on the *t*-test ($p < 0.05$).

3.4 고찰

어류가 질병에 노출되었을 때 일반적으로 Ht농도는 변동을 일으키며, 스트레스와 생리활성 지표로 사용된다(Chang et al., 1999). 해수어류에 있어 스트레스는 일반적으로 Ht를 증가시키고 혈액의 산성화 및 비장의 축소 등 다양한 영향을 미치는 것으로 보고하였다(Kim et al., 2010). 본 실험의 Ht결과, 실험구 그룹에서 대조구보다 높은 수치를 나타내었으며(Fig. 21A), 이러한 결과는 Choi et al. (2012)에서 보고된 내용과 일치하였고, 이는 여壼증 원인체의 침입으로 어체의 생리활성을 교란시켜 대조구보다 실험구에서 높은 수치가 나타난 것으로 판단된다.

GPT와 GOT는 어체의 생리상태가 좋지 않을수록 간에 장애가 일어나고 활성이 높아져 혈중 농도가 증가하는 것으로 보고되었다(Gordon, 1968; Casillas and Ames, 1985; Rao et al. 1990). 본 실험의 결과, GOT의 farm-B를 제외한 GPT, GOT에서 대조구보다 낮은 수치가 관찰되었지만, 모두 정상적인 범위를 나타내었다. 이러한 결과는 여壼증의 원인체가 간 조직과 직접적인 연관성이 없는 것으로 추정되며, 본래 GPT, GOT는 사람의 혈액검사시 기본항목으로서 생리적 및 환경적 조건에 따라 변화하기 때문에 어류에서도 비교 대상이 될 수 있는 안정된 수치가 필요할 것으로 사료된다(Fig. 20 B&C).

어류의 스트레스는 1, 2, 3차 반응으로 구분할 수 있으며(Wedeyer and McLeay, 1981), 혈액 중의 glucose는 1차 반응의 내분비계 활성의 증가로 분비된 catecholamine과 glucocorticoid에 의해 나타나는 스트레스 2차 반응의 가장 대표적인 지표로서 3차 스트레스 반응인 면역능저하를 유도하는 것으로 알려져 있다(Wedemeyer et al., 1990). 본 연구에서의 glucose 결과, farm-A와 farm-B에서 대조구보다 낮은 수치가 관찰되었으나, farm-C에서 대조구에 비해 높은 수치가 관찰되었다(Fig. 21A). 이러한 결과는 *Edwardsiella tarda*와 *Streptococcus iniae*를 단독 또는 혼합감염시켜 glucose농도를 측정 한 결과, 감염정도가 높은 혼합감염에서 감염정도가 낮은 단독감염보다 높은 수치가 나타난 값과 본 실험의 farm-C와 유사한 결과값을 나타내었다(Kwon and Jung, 2012). 하지만, farm-A, farm-B의 농도가 대조구보다 낮은 수치가 나타난 것은 감염 초기에 증상으로 glucosynthesis에 영향을 받은 것으로 추정된다.

어류의 혈액성상은 건강상태 및 스트레스 해석에 활용되며, 사료에 포함된 필수영양소 결핍에 따라 콜레스테롤이 변화한다고 보고된 바 있다(Garrido et al. 1990). 본 연구에서의 total cholesterol 측정 결과, 대조구보다 모든 실험구에서 cholesterol이 낮은 수치를 나타내고(Fig. 21B), 이러한 결과는 여壼증 감염으로 인한 사료섭취량이 떨어져 일시적으로 필수영양소 결핍에 따른 콜레스테롤이 떨어진 것으로 사료된다.

혈청 중의 total protein 농도는 오염물질에 의해 감소되며, 그 원인중 하나는 장관 손실에 따른 흡수 장애를 들 수 있으며(Mater et al., 1985; Yamawaki et al., 1986), 국내 여윌증에 감염된 어류는 장 조직의 탈락 및 파괴를 나타낸다(Choi et al., 2012). 본 연구에서의 total protein 실험 결과, 대조구에 비해 모든 실험구에서 낮은 수치가 관찰되었다(Fig. 21C). 이러한 결과는 Choi et al. (2012)에서 보고된 내용과 일치하였으며, 여윌증 감염으로 인한 장관 손실에 따른 흡수능력의 저하로 수치가 떨어진 것으로 판단된다.

Lysozyme은 자연계에 넓게 분포하는 효소로서 유포닌, 항바이러스, 세균, 항암작용 등에도 관여함으로써 고등동물의 방어기작에 주요한 역할을 하며(Jolles and Jolles, 1984), NBT는 체내에 침입한 세균, 바이러스, 기생충 등을 가수분해함으로써 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 증가시키며, 살균과 식균작용을 하는 많은 면역세포 중 60~70%를 차지하는 면역세포로 외부 침입에 대한 1차적인 방어 시스템이다. MPO는 감염과 염증반응에 작용하는 효소로, 감염된 숙주에 독성을 주어 침입한 항원을 사멸시킨다고 보고되었다(Palic et al., 2005).

어류의 혈청을 이용한 lysozyme 활성을 조사한 결과, 대조구에 비해서 모든 실험구에서 낮은 수치가 관찰되었고(Fig. 22A), 비특이적 면역계 중 감염과 염증반응에 작용하는 MPO활성 결과에서도 lysozyme과 동일하게 대조구에 비해 모든 실험구에서 낮은 수치가 관찰되었다(Fig. 22B). 또한, 세포성 면역의 역할을 하는 NBT 활성 조사에서도 lysozyme과 MPO가 동일 결과 값을 나타내었다(Fig. 22C). 이러한 결과는 어류의 면역반응 체계인 선천면역은 숙주방어에 잘 저항하도록 적응되어 있고, 혈류나 조직 속에서 자주 생존하면서 증식한 것으로 알려져 있으며, 포식세포에 의한 살해에 저항성이 있고, 포식세포 안에서 증식하여 숙주의 감염으로부터 보호하지만, 여윌증 원인체의 침투로 인한 면역학적 균형을 교란시켜 질병으로 발현하게 되어 1차적인 방어시스템이 파괴된 것으로 사료된다.

따라서, 여윌증 원인체에 의한 어체의 스트레스 및 내부장기의 손상으로 높은 폐사율을 나타낸 것으로 판단되며, 기생충성 질병의 대부분은 오염된 환경에서 많이 발생하므로 사육지 청결유지, 수용밀도를 낮추는 등 다양한 사육관리가 요구되며 추후에는 많은 연구자들이 여윌증에 대한 면역체계 지표를 제시하기 위해 다양한 실험을 실시하여야 할 것이다.

제 4장 여윌증의 원인규명을 위한 계통분석학적 동정

4.1 서론

전 세계적으로 어류에서 발견되는 포자충류의 대부분이 점액포자충류(Myxosporidea)와 미포자충(Microsporidia)류로 종류는 약 2,300여종으로 알려져 왔으며(Kaur, 2014), 어류의 체내 또는 조직에 기생하여 피해를 주는 점액포자충류는 성숙한 포자를 통해서 직접적으로 어류에 감염되어지고, 감염된 어류들은 대부분 cyst를 형성하고 있으나(Blaylock et al. 2004; Burger et al. 2007), 일부는 cyst를 형성하지 않아 진단의 어려움을 주고 있다(Matsukane et al. 2010).

점액포자충은 어류와 환형동물을 교대숙주로 이용하는 생활사를 가지고 있으며, 각각의 숙주에서 형태를 달리하는 점액포자충 및 방선포자를 생산하는 이상성 생활환(two-host life cycle)을 가지나, 생활사가 밝혀진 해수 점액포자충은 현재까지 5종(*Ceratomyxa auerbachii*, *E. llipsomyxa mugilis*, *E. gobii*, *Gadimyxa atlantica*, *Sigmomyxa sphaerica*)만 알려져 있다(Køie et al. 2004, 2007, 2008; Rangel et al., 2009). 또한, 해수 점액포자충은 넙치 근육에서 관찰되는 *Kudoa septempunctata*, 송어의 신장 및 방광에서 관찰되는 *Parvicapsula kabatai*, 넙치의 장관에서 관찰되는 *Enteromyxum leei* 등이 있으며, 해수 점액포자충은 담수 점액포자충에 비해 수중에 존재하는 밀도가 낮고 종이 다양하며(Cox and Goodwin 2013), 대부분 다양한 어종에 감염되어 숙주 특이성이 낮은 것으로 알려져 있어(Katharios et al. 2014), 해수 어류에 감염하는 점액포자충 생활사를 규명하는데 어려움이 있다.

점액포자충의 동정은 대부분의 경우 성숙한 포자의 형태를 관찰하는 형태학적 동정방법을 이용하고 있지만, 형태학적 동정방법은 인위적인 오류가 가능하고, 감염 강도가 낮을 경우 진단에 어려움을 가지고 있으며, 같은 종이라도 형태학적으로 동일하지 않을 수 있어 종이나 속 수준에서의 동정에는 형태학적 방법과 유전학적 상호 유연 관계를 조사하여 종을 분류하는 분자생물학적 방법을 병용한 분류가 이뤄지고 있다(Rholf and Wooten. 1988; Kim and Burgman, 1988). 또한, 분자생물학적 진단방법은 감도 및 특이성이 높아 점액포자충의 진단에 사용되고 있으며(Kent et al. 2001), rRNA의 염기서열을 분석하면 종 수준까지 명확한 동정이 가능하여 계통분석으로 이용할 수 있는 장점을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내의 넙치 양식장에서 급격하게 여윌며 폐사를 일으키는 원인 불명의 여윌증의 원인체를 밝혀내기 위해 Kim et al. (2015)이 보고한 특이적인 primer를 분석한 염기서열을 토대로 GenBank (NCBI, USA)에 등록된 점액포자충의 염기서열로부터 SSU rDNA 및 LSU rDNA primers를 각각 제작하여 염기서열을 분석하고 계통학적 분류를

실시하였으며, 형태학적 동정을 위해 여웁증이 발생한 어류를 대상으로 현미경 검경을 실시하였다.

4.2 재료 및 방법

4.2.1 실험어

여壼증 연구를 위한 시료는 2012년(EM-HM-12), 2013년(EM-MA-13), 2014년(EM-JJ-14) 및 2015년(EM-MS-15)에 제주지역의 넙치양식장으로부터 수집하였으며, 여壼증 진단용 EM-F/EM-R primers를 이용하여 감염여부를 확인한 후 실험을 실시하였다.

4.2.2 현미경 검사

현미경 관찰을 위해 국내 여壼증 감염부위인 신장부위를 해부용 칼로 절개하여 슬라이드 글라스에 도말 표본을 만들어 염색하지 않고 현미경으로 검경하거나, Barbara and David (2002)에 보고된 방법을 응용하여 다음과 같이 실행하였다. 50mL Tissue culture flask (Falcon, USA)에 Eagle's minimum essential medium (10% EMEM) 5mL과 암피실린 50uL를 첨가하여 18°C에서 24시간 배양기에 넣어둔 후, 슬라이드 글라스에 100μL을 가하여 광학현미경 (Zeiss LT60, Germany)으로 관찰하였다.

4.2.3 Primer 제작

SSU rDNA primers (18S rRNA, ITS1)은 EM-F/EM-R primers을 통해 알려진 염기서열을 바탕으로 GenBank에 등록된 염기서열과 비교한 결과 점액포자충과 유사성이 관찰되어 universal eukaryotic primers인 ERIB1-ERIB10와 MyxospecF-MyxospecR을 제작하여(Barta et al., 1997; Fiala, 2006) 보편적인 primers 조합(ERIB1-ERIB10, MyxospecF-MyxospecR, ERIB1-MyxospecR, MyxospecF-ERIB10)으로 PCR 실험을 실시한 결과, positive가 관찰되지 않아, GenBank에 등록된 다양한 점액포자충 대상으로 MEGA program version 4.0을 이용하여 primer table과 동일하게 제작하였다(Table 11).

LSU rDNA primers (ITS1, 5.8S, ITS2, 28S rRNA)은 Kim et al. (2015)이 보고한 EM-F/EM-R primers 제작하여 양성을 보인 샘플의 염기서열을 분석한 후, 이미 알려진 염기를 바탕으로 알려지지 않은 염기의 정보를 얻어내고자 DNA Walking SpeedUp™ Kit (seegene, USA.)를 사용하였으며, 병원체의 염기를 특이적으로 검출할 수 있는 W-3F/W-3NR primers를 제작하였다(Table 11).

Table 11. Sequences of the oligonucleotide primers used for PCR amplification and sequencing

Primers	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Expected sizes	Function
EM-F	CAACCGCAATGTGTTTACTC	812 bp	Detection of emaciation agent (Kim et al., 2015)
EM-R	CCAAACAACCTGCCACAATG		
PP1-F	ATCAGGGTTCGATTCCGGAG	1,809 bp	Sequencing of emaciation agent (in this study)
W3-R	GTCCACGTAGCTTACTACTAC		
PPN-F	GGTGGCGAGAGGTGAAATTC	1,155 bp	Sequencing of emaciation agent (in this study)
W3-R	GTCCACGTAGCTTACTACTAC		
W3-F	GCAAGATTGGTGGTGTTC	891 bp	Sequencing of emaciation agent (in this study)
W3N-R	AACGGCTGACTGATTACACC		

4.2.4 DNA 분리

DNA를 분리하기 위하여 Kim et al. (2015)에서 보고된 방법을 참고하여 신장부위를 대상으로 DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하여 DNA를 분리하였다. 먼저 ATL buffer 180 μ L와 proteinase K 20 μ L를 첨가하여 56 $^{\circ}$ C에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 μ L를 넣어 섞은 다음 ethanol(100%) 200 μ L를 더하여 spin column에 옮겨 6000 \times g에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 μ L와 AW2 buffer 500 μ L를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 50 μ L를 첨가하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

4.2.5 PCR 및 sequencing

PCR은 microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 \times G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Themal Cycler Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ L가 되게 하였다. SSU rDNA PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 1분 denaturation, 48 $^{\circ}$ C에서 1분 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 35 cycles를 반응시켰다. 그리고, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 post-extension 시켰고, LSU rDNA PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 35 cycles를 반응시켰다. 그리고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension시켰다. PCR 후 증폭 산물은 1 \times TAE buffer (40 Mm Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기 영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ L ethidium bromide 가 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기 영동한 후, UV 검출기에서 band를 관찰하였다. PCR 증폭 산물은 gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 회수한 후, ToPo TA cloning[®] kit (Invitrogen, USA)로 cloning하여 염기서열 분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

4.2.6 계통학적 분석

염기서열 분석은 BioEdit program의 Clustal W (Thompson et al. 1994)를 사용하여 GenBank에 등록된 45개의 분리주를 alignment 하였고(Table 12), alignment된 유전자들은 MEGA program version 4.0(Tamura et al., 2007)의 neighbor joining criteria를 수행하여 염기서열간의 유전적 거리와 계통 분석을 실시하였다.

Table 12. Myxosporean species, host, site of infection, country and GenBank accession numbers used for phylogenetic analyses

Myxosporean species	Host	Site	Country	Length of sequence	GenBank Accession No.
EM-HM12	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Kidney	Korea	3362	Unpublished
EM-MA-13	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Kidney	Korea	3362	KT321705
EM-JJ-14	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Kidney	Korea	3362	Unpublished
EM-MS-15	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Kidney	Korea	3362	Unpublished
<i>Parvicapsula asymmetrica</i>	<i>Cyclopterus lumpus</i>	Kidney	Norway	1587	AY584191
<i>Parvicapsula limandae</i>	<i>pleuronectid</i>	Kidney	Denmark	1260	EF429096
<i>Parvicapsula unicornis</i>	<i>Merluccius merluccius</i>	Kidney	Norway	1536	AY584190
<i>Parvicapsula petuniae</i>	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Urinary bladder	Norway	1706	KF874230
<i>Gadimyxa atlantica</i>	<i>Gadus morhua</i>	Kidney	Norway	1306	EU163421
<i>Gadimyxa arctica</i>	<i>Arctogadus glacialis</i>	Urinary bladder	Norway	1324	EU163426
<i>Gadimyxa</i> sp.	<i>Gadus morhua</i>	Urinary bladder	Norway	1316	EU163424
<i>Parvicapsula kabatai</i>	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Kidney	Canada	1480	DQ515821
<i>Parvicapsula spinachiae</i>	<i>pleuronectid</i>	Kidney	Denmark	1399	EF431928
<i>Zschokkella siegfriedi</i>	<i>Boreogadus saida</i>	Kidney	Norway	1695	KF874231
<i>Zschokkella hildae</i>	<i>Gadus morhua</i>	Kidney	United Kingdom	1839	FM957569
<i>Sinuolinea</i> sp.	<i>Scophthalmus maximus</i>	Kidney	Spain	1958	AF378346
<i>Sinuolinea arctica</i>	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Urinary bladder	Norway	1696	KF874232
<i>Parvicapsula irregularis</i>	<i>Hippoglossoide platessoides</i>	Urinary bladder	Norway	1761	KF874229
<i>Parvicapsula bicornis</i>	<i>pleuronectid</i>	Kidney	Denmark	1241	EF429097
<i>Sphaerospora testicularis</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Kidney	Italy	1760	HM230825
<i>Myxosporea</i> sp.	<i>mulloway</i>	Kidney	Australia	863	JQ868766
<i>Myxosporea</i> sp.	<i>Cynoscion nebulosus</i>	Urinary bladder	USA	1694	JX460904
<i>Sinuolinea</i> sp.	<i>Cynoscion nebulosus</i>	Urinary bladder	USA	1990	JX460906
<i>Latyspora scomberomori</i>	<i>Scomberomorus guttatus</i>	Kidney	Malaysia	1929	HM230826
<i>Schulmania aenigmatica</i>	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Urinary bladder	Norway	1653	KF874233

<i>Zschokkella lophii</i>	<i>Lophius litulon</i>	Urinary bladder	Japan	1717	DQ301509
<i>Zschokkella</i> sp.	<i>Diodon holocanthus</i>	Urinary bladder	Mexico	1954	DQ377705
<i>Cf. Latyspora</i> sp.	<i>Clupea harengus</i>	Kidney	Norway	1764	KF874234
<i>Myxidium incurvatum</i>	<i>Callionymus lyra</i>	Gall bladder	Atlantic	3097	FJ417064
<i>Sinuolinea phyllopteryxa</i>	<i>Phyllopteryx taeniolatus</i>	Kidney	Australia	1740	DQ645952
<i>Myxidium</i> sp.	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Gall bladder	Norway	1001	KF874237
<i>Ellipsomyxa syngnathi</i>	<i>Syngnathus rostellatus</i>	Gall bladder	Denmark	1706	GQ229234
<i>Coccomyxa colurodontidis</i>	<i>Colurodontis paxmani</i>	Gall bladder	Australia	1347	HM037790
<i>Auerbachia pulchra</i>	<i>Coryphaenoides rupestris</i>	Gall bladder	Atlantic	3104	FJ417047
<i>Kudoa</i> sp.	<i>Cynoscion nebulosus</i>	Muscle	USA	3204	FJ790312
<i>Kudoa thyrsites</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Muscle	Japan	3349	JQ302300
<i>Enteromyxum leei</i>	<i>Diplodus puntazzo</i>	Intestine	Italy	3216	FJ428227
<i>Enteromyxum scopthalmi</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Intestine	Spain	1609	AF411335
<i>Ceratomyxa shasta</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Intestine	USA	1643	AF001579
<i>Ceratomyxa aracuata</i>	<i>Lophius piscatorius</i>	Gall bladder	Scotland	1384	KJ419344
<i>Ceratomyxa longipes</i>	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Gall bladder	Scotland	1370	KJ419343
<i>Ceratomyxa arcuata</i>	<i>Lophius piscatorius</i>	Gall bladder	Scotland	1156	KJ419342
<i>Ceratomyxa auerbachii</i>	<i>Clupea harengus</i>	Gall bladder	Norway	1778	EU616732
<i>Ceratomyxa labracis</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Gall bladder	Spain	1763	AF411472
<i>Myxobolus pseudodispar</i>	<i>Rutilus rutilus</i>	Intestine	Hungary	1554	AF380145
<i>Myxobolus</i> sp.	<i>Labeo bata</i>	Intestine	USA	1866	MSU13828
<i>Myxobolus pseudodispar</i>	<i>Abramis brama</i>	Gall bladder	Hungary	1551	AF380144
<i>Myxobolus musculi</i>	<i>Barbus barbus</i>	Muscle	Hungary	1556	AF380141
<i>Myxobolus cyprini</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Muscle	Hungary	1554	AF380140

4.3 결과 및 고찰

4.3.1 계통학적 분석

여壼증의 SSU rDNA 및 LSU rDNA primer set를 각각 사용하여 PCR 방법을 통해 검출된 4개의 분리주를 EM-HM12, EM-MA-13(accession number:KT321705), EM-JJ-14, EM-MS-15로 표기하였고, SSU rDNA에 비하여 LSU rDNA의 primer set를 사용하였을 때 전체적으로 PCR 검출 감도가 높은 것으로 나타났다(Fig. 23). 그리고 GenBank database로부터 얻은 45개와 본 실험으로 얻은 전체염기서열은 점액포자충의 유전자 중 계통분석에 있어서 적절한 유전자로 보고된 자료를 사용하여 비교 분석하였다(Kodádková et al. 2014).

본 연구에서 분리한 4개의 분리주의 전체염기서열 계통분류학적분석 결과, 모두 *Parvicapsula* sp.에 속한 것으로 분석되었고(Fig. 24), 국내에서 동정한 4개의 분리주의 유전자 상동성은 99.7%~99.76%인 것으로 나타났다(Fig. 25). 또한, 국내에서 동정된 4개의 분리주는 노르웨이에서 보고된 분리주(accession number:KF874230)와 계통분류학적으로 유사한 것으로 관찰되었다(Fig. 24). 하지만, GenBank database에 등록된 *P. petuniae*는 18S rRNA만 등록되어 있을 뿐 다른 지역(ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA)에 대한 정보는 등록되어 있지 않아 본 연구에서 얻어진 3,362 bp를 지역별로 나누어 GenBank database를 활용한 유전자 비교 분석을 실시하였다. 그 결과, 5.8S rRNA를 포함한 ITS지역에서는 본 연구에서 분리한 분리주(969 bp)와 일부 염기서열인 130 bp가 *Myxobolus* sp. (Accession No. JN616264)와 13.4%의 상동성이 관찰되었고(data not shown), 28S rRNA의 유전자 비교분석 결과, 분리주(742 bp)와 염기서열인 360 bp가 *Zschokella* sp. (Accession No. FJ417081)와 48.5%의 비교적 낮은 상동성이 관찰되어(data not shown), 국내에서 발생하는 여壼증과 상관성이 없는 것으로 조사되었다. 또한, 18S rRNA로 분리한 분리주(1,651 bp)와 일부 염기서열인 1,538 bp가 *P. petuniae* (Accession No. JN616264.1)와 92%의 높은 상동성이 관찰되어(data not shown), 국내에서 발생하는 여壼증을 *Parvicapsula* sp.로 동정하였다.

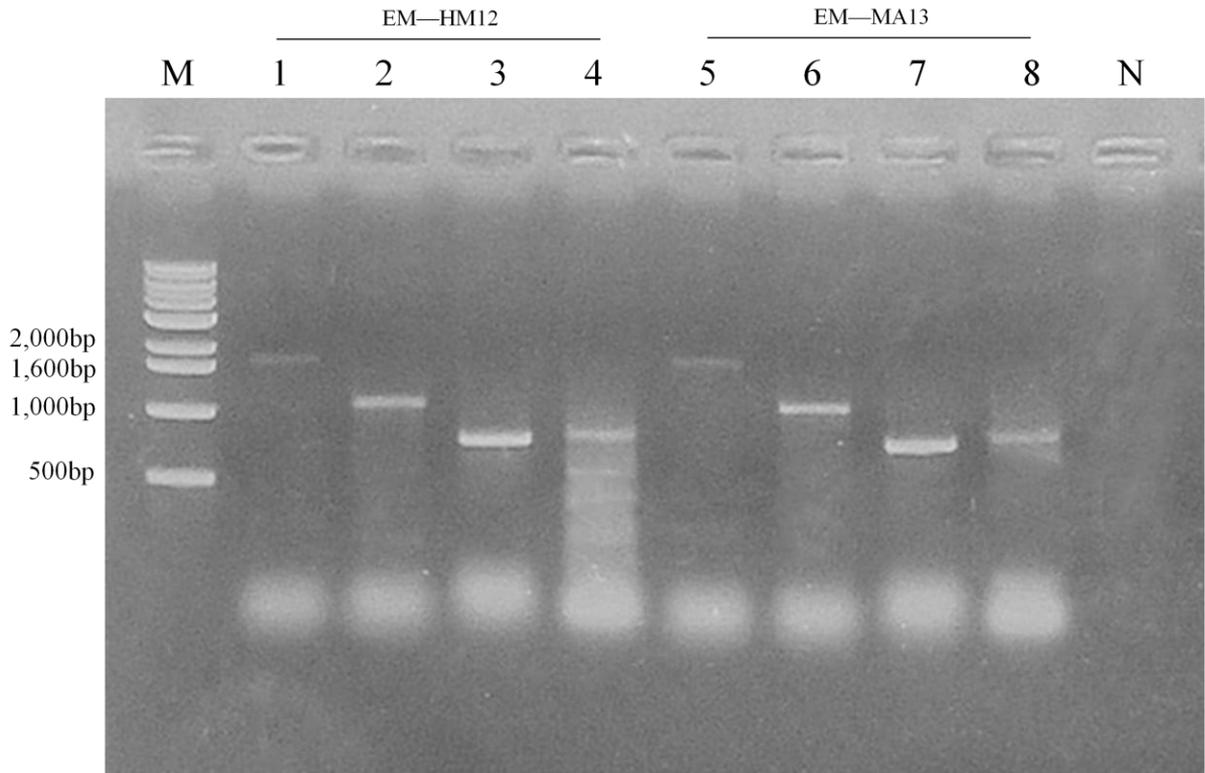


Fig. 23. PCR analysis of LSU and SSU rDNA sequences. Lanes 1 and 5 PP1F-W3R; lanes 2 and 6 PPNF-W3R; lanes 3 and 7 EMF-EMR; lanes 4 and 8 W3F-W3NR; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.

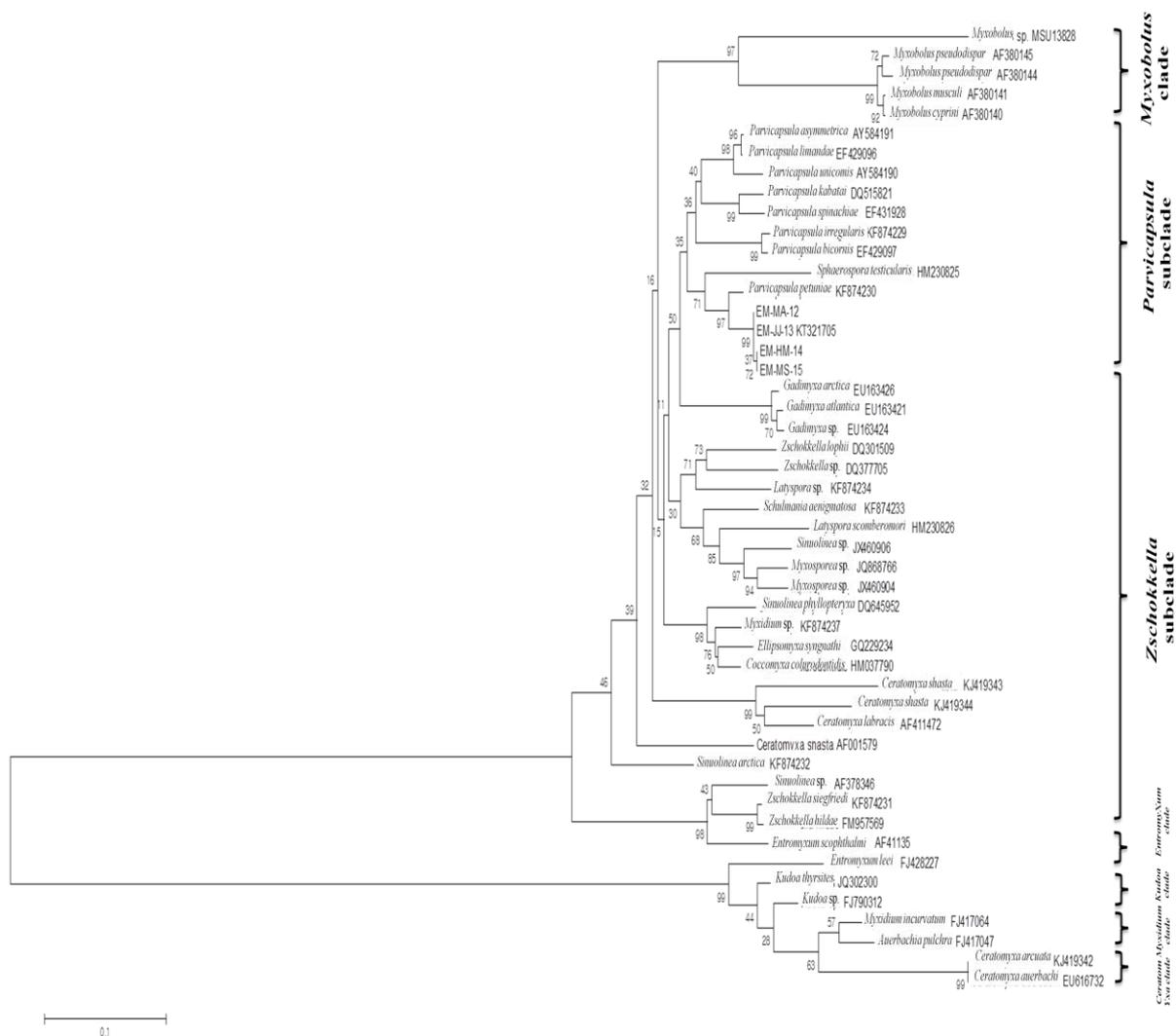


Fig. 24. Phylogenetic tree of showing the genetic relationships 49 myxosporeans based on the nucleotide sequences of the SSU, internal transcribed spacer(ITS) region (ITS1, 5.8S rRNA, ITS2), and LSU gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea emaciation belong to the *parvicapsula* sp.

	PP-1F →			
EM-HM-12	ATCAGGGTTCGATTCCGGAG	AGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACTTCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCAGACATTGGGAGGTAGT	100	
EM-MA-13	100	
EM-JJ-14	100	
EM-PC-15	100	
EM-HM-12	GACGAGAAATACCGAGCGGGATGTAACAATTCGCTATCGGAATGAACGTAACCTAAAACCTTTGCTGAGTAACAACCTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG		200	
EM-MA-13	200	
EM-JJ-14	200	
EM-PC-15	200	
EM-HM-12	CAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAGTAGTGTATTTCAAATTTGTCGGTTAAAACGCTCGTAGTCGGATTAGAGGAACGTTACATAGCCGGCAACTGCGC		300	
EM-MA-13	300	
EM-JJ-14	300	
EM-PC-15	300	
EM-HM-12	GCGGAATCGCGATAGCAGAACGCCGGGTGACGTTCTTTGTGGCAAGTCCCGGCTGTGGGCTCAATGCTTGTGGCCGGTCGTTGCTAAGCGTGCCTTG		400	
EM-MA-13	400	
EM-JJ-14	400	
EM-PC-15	400	
EM-HM-12	AATAAAGCAGAGTGCTCAAAGCAAGCGTAACGCTAGTATGTAATAGCATGGAACGAATACATGTTAGAGCAGGCCTGCTCAGTTGTTGGTGGGGTCCGGT		500	
EM-MA-13	500	
EM-JJ-14	500	
EM-PC-15	500	
EM-HM-12	TGAGCAGCGATGCTGTTGCTTCGGCAGACAACCGGTTGTTCCGCCGCCGCTGGCTGCGTGCTGCGGCGGAATCAGTTTACTGGCTTCGTGAAAAGTGCA		600	
EM-MA-13	600	
EM-JJ-14	600	
EM-PC-15	600	
EM-HM-12	GACAGAGCTGAGCAGCCTGTCGGTTAAGAGGGACATTTGAGGGCGTTAGTACTT	PP-NF →	GGTGGCGAGAGGTGAAATCTTAGACCCACCAAAGACTGACAAATG	700
EM-MA-13	700	
EM-JJ-14	700	
EM-PC-15	700	
EM-HM-12	CGAAAGCATTGCGCAAGAGTGTCTCATTGATCAAGAACGAAAGTTGGAGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCTAGTTCCATACAGTAAACGATGCCA		800	
EM-MA-13	800	
EM-JJ-14	800	
EM-PC-15	800	
EM-HM-12	ACACGCGATCAGTCTGAAGATATTTGATTGAGGTTGGTCGCCAGGAAAACCTGAAAGTGTCTGGTTCTGGGAGAGTACGGTCGCAAGGTTGAAATTT		900	
EM-MA-13	900	
EM-JJ-14	900	
EM-PC-15	900	
EM-HM-12	AAAGGAATTGACGGAAAGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGCAACTCACCAGTCCGACATCGGTAGGATTGACA		1000	
EM-MA-13	1000	
EM-JJ-14	1000	
EM-PC-15	1000	
EM-HM-12	GACTGATAGATCTTTCATGATTTGATGATTGGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGTGATCTGTCAGGTTTATTCGGTAACGAGCGAGACCCCG		1100	
EM-MA-13	1100	
EM-JJ-14	1100	
EM-PC-15	1100	
EM-HM-12	GTGTCTAGTTAATGGCCGGTACGGCAGGGTAACACCGAAGTGGACCCCGAGTGCAGTTGCGTCGGCGGTGGCTGTTATGCTTGTGGCTTTTGCA		1200	
EM-MA-13	1200	
EM-JJ-14	1200	
EM-PC-15	1200	

Fig. 25. Comparison analysis of the DNA nucleotide sequences of pathogens detected from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*). Primers used in PCR are in boxes.

EM-HM-12	GCAATGTCAACAGTCGAGCAAGTGTGGCGGCTGCAGTTAGATGTGCTGCGATCAGGGTAATCCAGTGTGACTCGGATACTAGACAGACAACCGGAGAACC	1300
EM-MA-13	1300
EM-JJ-14	1300
EM-PC-15	1300
EM-HM-12	AAGCCGGGGGAAGCGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTCGATGTTCTGGGCTGCACGCGCGCTACAATGGCAGTGACAGAAAAGGAGCTTAGTCGAA	1400
EM-MA-13	1400
EM-JJ-14	1400
EM-PC-15	1400
EM-HM-12	AGACTCGGCCAAACTGGAATCGCTGCTGATTGGGATTGAGCTTTGTAATAGCTCATGAAAGAGGAATTCCTCGTAAGCGCGAGTCACTAACTCGTGT	1500
EM-MA-13	1500
EM-JJ-14	1500
EM-PC-15	1500
EM-HM-12	TGAATACGTCTCTGCCCTTGTACACACGCCCGTCGCTACTACTGATTGAATGGTTTTTGAAGCGCAAGGATTGGCGGTCAATTAATGACCTGCCGAG	1600
EM-MA-13	1600
EM-JJ-14	1600
EM-PC-15	1600
EM-HM-12	AATCGCCCTAAAAAATCATTGAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATCAAAGTGTATCAACAAATAAT	1700
EM-MA-13G.....	1700
EM-JJ-14G.....	1700
EM-PC-15	1700
EM-HM-12	ATTGTTATAGTTGCTAAATTTGGTGGCGGCTAACCAACCGCAATGTGTTACTCTTAGTAGTACAACAACAATAATGTAGGAAGTGTAGTGTAAAGC	1800
EM-MA-13	1800
EM-JJ-14	1800
EM-PC-15	1800
EM-HM-12	TACGTGGACCGGTCAGTCAGCAATGATTGGCCGGACTGCACACAGCGTGAGCTGTTGCAGAGACCCAGCTGGGATTTGACTGAGCAGGCAACTGCTTGTC	1900
EM-MA-13A.....	1900
EM-JJ-14	1900
EM-PC-15	1900
EM-HM-12	GATGAACAGTAGTGATAATGTTGGATACATGTTGGTCGACATAATGTAGTAATATTATTATTTATTGACGCTGACAAAAACAACAAAAACAAC	2000
EM-MA-13T.....	2000
EM-JJ-14	2000
EM-PC-15A.....	2000
EM-HM-12	TGTTAACGGTGGATCACTCGGTTGTTGTCGATGAAGAACGTGGCAAAATCGGATAATTAATGCGATTGCAATGCCTTGTGAGTCATTGAAACTTTGA	2100
EM-MA-13	2100
EM-JJ-14	2100
EM-PC-15	2100
EM-HM-12	ATGCAAATGGCGCGGACTTTTAGTCGTGCATGTTTGGTTGAGAGTCATAAATCTATCGAGTTATTTATAACAATACTGTTAGCCCGCTTGTTCACAAAC	2200
EM-MA-13A.....	2200
EM-JJ-14	2200
EM-PC-15	2200
EM-HM-12	GGGTTGATGAAATGTAACGCGTGGCGCTGTGATGTTACTTGTAAAGCATTGCAGACATCAACGTATTGTCTAACAACTTTTATGCGAACATGCAA	2300
EM-MA-13G.....	2300
EM-JJ-14G.....A.....	2300
EM-PC-15G.....A.....	2300
EM-HM-12	TTGTTAATGATTGATGTGGCTGCTGCAACGACAAGTCTGTCATGATGGTTTTGGAACAATTGGTGCTTTGTAGGCATCATTAGTTTTGTATGCAT	2400
EM-MA-13	2400
EM-JJ-14	2400
EM-PC-15A.....	2400

Fig. 25. Continued.

		← EM-R	
EM-HM-12	ACAAACAAGTGTATTGGTACGTTGGGTCTCTTATTGGGATAGACAAGCTGATAGTGAGTTTGGTGTGT		2500
EM-MA-13		2500
EM-JJ-14		2500
EM-PC-15		2500
EM-HM-12	TTGTCTCTGAACGCTAACTTTGGTTACATTGTGGCAGGTTGTTTGGAAACAAGCCTTACTCAAAAATTGTTGGTACTTGCAATCTTAATAAGACTAGT	W3-F →	2600
EM-MA-13 A		2600
EM-JJ-14		2600
EM-PC-15		2600
EM-HM-12	TGCTAGATTCAATTTTACTCTGACCTCAGCCAAGCAAGAGTACTCGTGAACCTAAGCATATCAGTAAGCGAAGGAAAAAACAACCTGTGATCCCC		2700
EM-MA-13		2700
EM-JJ-14		2700
EM-PC-15		2700
EM-HM-12	TAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAAGCCCAACGTTGAAGCCTGTGAGGGCGTTGTGACGTGAGCAATAAAGACTTTTGGTTAGCAACCAGCATTCTGT		2800
EM-MA-13		2800
EM-JJ-14		2800
EM-PC-15 C..... T.....		2800
EM-HM-12	TAAAGTCGTCTGGATTGACGCGCCATGGAGGGTGACAGCCCGTTCGTGACAGAGTGCTGGTTGTGCAGATACGCAAGTACGACCAATGTTTAAAGAGAG		2900
EM-MA-13		2900
EM-JJ-14		2900
EM-PC-15		2900
EM-HM-12	TCGGGTGTTTGGGATTGCAACCTGAAGAGGGTGGTAAGCTCCACCTAAAGGCTAAATACAAGCAGAAACCGATAGCGAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGT		3000
EM-MA-13		3000
EM-JJ-14		3000
EM-PC-15		3000
EM-HM-12	TGAAAAGAACCTTGAAAAGAGAGTCAAAAGTACGTGAAACCGTTAACAGGGAAGCAGAAAGGGCGTGTGAGACGCGGGTTTTGGTCTTTAATTAGTTT		3100
EM-MA-13		3100
EM-JJ-14		3100
EM-PC-15		3100
EM-HM-12	TTATACGTAATTAAGATTGCAAACCGCGTGTGCGTCAGGTCACCTGATTGCTGGTCCACAACCAAGTGTGCTGGTCACATTCCGGTGTGTTTACAATG		3200
EM-MA-13		3200
EM-JJ-14		3200
EM-PC-15 T.....		3200
EM-HM-12	CCGGTTGTGGCTTGACCTTCGGGTTTGTGTGACTTGCGGTTGAGTTGAAATGAATAAAGACGACGGTAGGGGTCCTCGGAGTCCGCAAATGGCGCATT		3300
EM-MA-13 C.....		3300
EM-JJ-14 C.....		3300
EM-PC-15 C.....		3300
EM-HM-12	CAACTGTGTGCATGTGCGTTTCGCCGTGTACACATGATTGCGTGAATCAGTCAGCCGTT	← W3N-R	3362
EM-MA-13	... T.....		3362
EM-JJ-14	... T.....		3362
EM-PC-15	... T.....		3362

Fig. 25. Continued .

4.3.2 포자 관찰

본 연구에서는 계통학적 분석을 통해 국내에서 발생하는 여웬증이 *Parvicapsula* sp.에 속하는 것으로 조사되어, 형태학적 분석을 통해 *Parvicapsula* sp.의 전형적인 포자를 관찰하기 위해 추가적으로 실험을 실시하였다.

현미경을 통해 기생충 검경을 실시한 결과, PCR을 통해 양성반응이 관찰된 어류에서 원형의 핵을 가진 수많은 영양체가 관찰되었고(Fig. 26A~D), 검출된 다핵체(sporont) 형성 과정 일부분에 cyst wall을 형성하면서 세포질내의 전분과립 형태(Fig. 26E~G) 및 포자와 포자모세포를 생산하는 pansporoblast 형태가 관찰되었다(Fig. 26H). 또한, 최종적인 포자의 형태는 두 가지의 형태로 분류되었으며, 그 중 하나는 두 개의 포자가 같은 방향 및 다른 방향의 모습으로 모아진 형태이며, 길이는 16~18 μ m, 폭 4~5 μ m의 포자가 관찰되었고, 모두 한쪽으로 모아진 두 개의 극낭을 가지고 있는 포자가 관찰되었다(Fig. 26I~K). 또 다른 하나는 작은 포자의 형태인 길이 5~8 μ m, 폭 7~9 μ m가 관찰되었고, 한 개의 극낭과 포자의 일 부분이 없는 형태가 관찰되었다(Fig. 26L). 이러한 결과는 넙치 양식장에서 발생하는 *P. anisocaudata* 및 *P. pseudobranchicola* n. sp.와 형태학적으로 유사한 포자가 관찰되었고(Zhao et al., 2000; Karlsbakk et al., 2002; Cho et al., 2004), *Parvicapsula* sp.에서만 관찰되는 전형적인 포자가 확인되어(Fig. 26I~K), 국내에서 발생하는 여웬증은 계통학적 분석결과와 동일하게 *Parvicapsula* sp.인 것으로 조사되었다.

여웬증에 감염된 어류의 신장 부위에서 다수의 막대 형태의 triactinospores가 관찰되었고(Fig. 26J), triactinospores는 각각 길이 51 μ m와 140 μ m이며, 그 중 하나의 triactinospores는 긴 막대 모양에 앞뒤 부분이 뾰족하며 앞부분에서 검정 형태의 포자 원형질이 관찰되었고(Fig. 26K), 다른 하나의 triactinospores는 5개 caudal processes 및 위 부분에 다수의 포자 원형질이 관찰되었다(Fig. 26L). 이러한 결과는 장 상피에서 발견되는 *Myxobolus pseudodispar*와 유사한 결과가 관찰되었으나(Szekely et al., 1999), sporont, cyst wall 및 spore에서 다른 형태가 관찰되어 다른 종인 것으로 조사되었다. 또한, 포자의 형태를 통해 *Parvicapsula* sp.에 속하는 것으로 확인되어 비교를 실시한 결과, 현재까지 *Parvicapsula* sp.에 대한 triactinospores의 보고된 사례가 없어, 비교 분석할 수 없었으며, 추후에는 *Parvicapsula* sp.에 대한 형태학적 연구에서 triactinospores의 정확한 관찰이 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

본 연구에서 수행된 계통학적 분석 및 형태학적 분석을 통해 국내에서 발생하는 여웬증은 *Parvicapsula* sp.로 동정되었으며, 본 연구의 자료는 여웬증을 진단하는데 유용한 자료로 활용이 될 것으로 여겨진다.

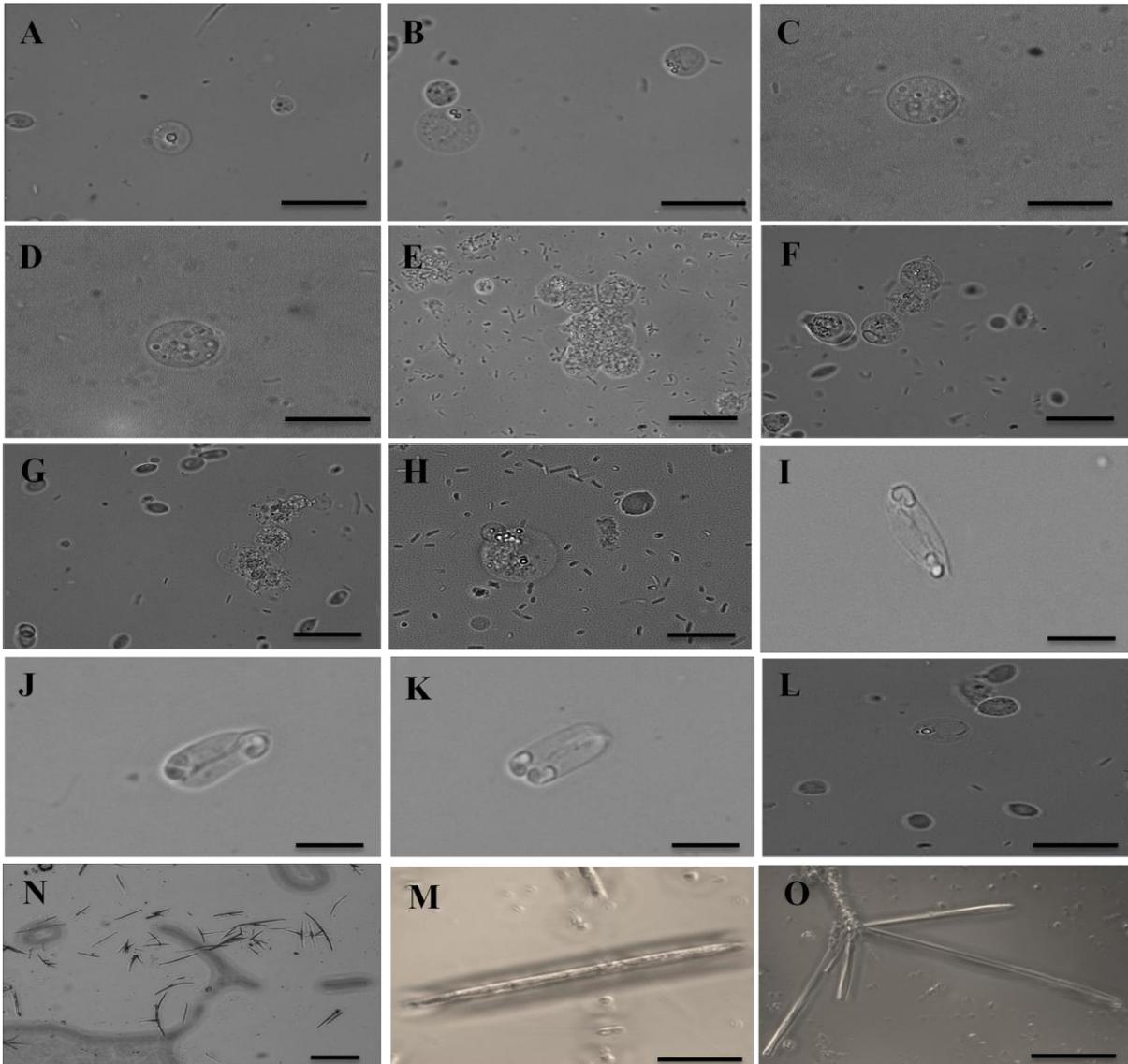


Fig. 26. A hypothetical sequence of developmental stages of emaciation. A: first stage of shizont visible with microscopy ($\times 1000$, bar= $10\mu\text{m}$); B~C: Sporont ($\times 1000$, bar= $10\mu\text{m}$), E~G: Sporonts ($\times 400$, bar= $10\mu\text{m}$); H: Pansporoblast ($\times 400$, bar= $10\mu\text{m}$); I~K: Spore in frontal view ($\times 400$, bar= $10\mu\text{m}$); L: Atypical smaller spore ($\times 400$, bar= $10\mu\text{m}$); N~O: triactinospores ($\times 1000$, bar= $20\mu\text{m}$).

제 5장 감염 넙치의 각 내부장기에 대한 *Parvicapsula* sp.의 양적 분석

5.1 서론

점액포자충문(Phylum Myxozoa) 점액포자충은 현재 담수어와 해수어에 모두 기생하며 일부 양서류, 파충류, 무척추동물 등에도 기생하는 것으로 보고되고 있다(Kent et al., 1994). 방출된 방선포자가 숙주에 접촉하면서 감염이 이루어지고 주로 뇌, 방광, 근육, 생식소, 담낭, 아가미, 장간막, 신경조직 등 다양한 장기에서 기생하는 것으로 알려져 있으며, 병원성에 따라 숙주인 어류에 폐사를 일으켜 양식산업에서 심각한 경제적 손실을 야기하고 있다. 이러한 점액포자충의 피해를 막기 위해 포르말린, 트리콜로로폰제, 황산동, 말라카이 트그린 등이 치료제로 사용되어 왔으나, 약제독성 및 효과가 미비하다는 이유로 제한하고 있으며(Feist and Longshaw, 2006), 점액포자충에 의한 질병은 현재까지 사육수를 소독하는 방법 외에는 별다른 대응방안이 없는 실정이다(Nam et al. 2006).

현재 점액포자충은 조기진단을 통해 질병의 전파를 막고 예방대책을 수립하기 위해 신속하고 높은 정확도로 진단할 수 있는 polymerase chain reaction (PCR)과 real-time PCR법을 많이 사용하고 있으며, 그 중 real-time PCR은 기존의 PCR법으로는 측정하기 불가능했던 정확한 정량이 가능하여 real-time PCR법의 선호도가 높은 편이다(Goldberg et al., 2003; Nerland et al., 2007). 또한, 점액포자충의 초기 성장 단계 또는 각 장기의 rDNA copy 수를 측정하기 위해 감도와 특이성이 높은 real-time PCR로 점액포자충성 질병을 진단하는데 유용하게 사용되고 있으며(Kelley et al. 2014), 그 중 SYBR Green 형광시료는 실시간으로 증폭된 핵산의 양을 정량하여 신속하게 질병의 유무 및 양을 검출할 수 있어서 국내외에서 많이 사용되고 있다.

최근 국내 양식 넙치에서 발생하는 여윌증은 *Parvicapsula* sp.인 것으로 조사되었으며, 분자생물학적 진단법인 PCR을 통해 장기별 감염률을 확인한 결과 신장, 장, 비장의 순서로 검출 정도가 높은 것으로 밝혀졌으며, 심한 경우 뇌, 간에서도 감염이 발생하는 것으로 보고 되었으나(Kim et al. 2015), 지금까지 *Pavicapsula* sp.에 감염된 어류에서 나타나는 질병진전 현상을 정량적이고 수치적인 비교 분석을 실시한 연구는 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내 넙치 양식장에서 매년 발병하는 *Pavicapsula* sp.에 대하여 real-time PCR을 통해 효율적인 검출, 정량적 분석 및 *Pavicapsula* sp.의 각 장기별 양적비교에 대하여 명확히 조사하였으며, 또한 병리조직학적 검사를 통해 real-time PCR 결과와

의 상관성을 관찰하였다.

5.2 재료 및 방법

5.2.1 실험어

제주도(제주시/서귀포시)에 위치한 양식장을 대상으로 직접 양식장을 방문하거나 *Pavicapsula* sp.의 검사를 의뢰한 양식장에서 산소포장 후 실험실로 이송하여 진단용 EM-F/EM-R primer set를 사용하여 신장 부위에서 음성을 보인 1마리(EM-A)와 양성을 보인 넙치 2마리(EM-B, EM-C)의 각 장기를 적출하여 real-time PCR 및 조직학적 검사를 통해 양적 비교를 실시 하였다. 또한, 자료의 신뢰도를 높이기 위해 추가적으로 PCR에서 양성을 보인 5마리(EM-D, EM-E, EM-F, EM-G, EM-H)를 선택하여 real-time PCR를 통해 비교 분석 하였다.

5.2.2 DNA 분리

양식장에서 제공받은 넙치로부터 신장, 장, 비장, 뇌 및 간 조직을 적출하였고, DNA를 분리하기 위하여 DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하였다. 먼저 각 조직의 10mg에 ATL buffer 180 μ L와 proteinase K 20 μ L를 첨가하여 56 $^{\circ}$ C에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 μ L를 넣어 섞은 다음 ethanol 200 μ L를 더하여 spin column에 옮겨 6,000 \times g에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 μ L와 AW2 buffer 500 μ L를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 50 μ L를 첨가하여 최종적으로 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

5.2.3 PCR

PCR 분석은 *Pavicapsula* sp.의 진단을 위하여 제시한 EM-F/EM-R primer set를 사용하였으며(Table. 13), PCR은 microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 \times G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Themal Cyclor Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ L가 되게 하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 extension의 반응을 1회로 하여, 35회 반복하여 반응시켰다. 그리고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension 시켰다. PCR 후 증폭 산물은 1 \times TAE buffer를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ L EtBr이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동한 후, UV 검출기를 이용하여, ultraviolet상에서 검출되는 산물의 크기를 관찰하였다.

Table 13. List of primers used for the detection of *Parvicapsula* sp. from olive flounder (*P. olivaceus*) by PCR and real-time PCR

Primer	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Expected sizes	Function
EM-F	CAACCGCAATGTGTTTACTC	812 bp	Detection of <i>Parvicapsula</i> sp. by PCR (Kim et al., 2015)
EM-R	CCAAACAACCTGCCACAATG		
EMRT-F	CGATACATGTTGGTCGAC	147 bp	Detection of <i>Parvicapsula</i> sp. by real-time PCR (in this study)
EMRT-R	CGAATCGCATTAATTATC		

5.2.4 Real-time PCR

Real-time PCR을 통해 *Parvicapsula* sp.에 감염된 넙치의 각 내부 장기별(신장, 장, 비장, 뇌, 간) 양적 비교를 관찰하기 위하여 28S rRNA부위로부터 RTEM-F (GGATACATGTTG GTCGAC), RTEM-R (CGAATCGCATTAATTATC)을 제작하였고(Table 13), 여윌증 DNA의 정량을 위해 LightCycler® Nano SW1.0 (Roche, USA)을 사용하였다. PCR 반응액 제조는 SensiMixPlus SYBR (Roche, USA) 10 μ L, forward와 reverse primer 각각 1 μ M, 주형 DNA로서 Plasmid DNA 또는 추출된 핵산을 첨가한 후 증류수로 PCR혼합물 최종량이 20 μ L가 되게 하였다. Real-time PCR의 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응한 후, 95 $^{\circ}$ C 20초 60 $^{\circ}$ C 20초, 72 $^{\circ}$ C 20초의 반응을 1 cycle로 하여 45 cycles를 반응시켰다.

표준검량곡선을 작성하기 위해 *Pavicapsula* sp.의 genomic DNA를 주형으로 하여 EM-F/EM-R를 사용해 PCR을 실시하였고, 생성된 PCR 결과물을 pGEM-T Easy vector (promega, USA)에 ligation 하여 Competent cell DH5 α 균주에 cloning시킨 후 plasmid DNA을 분리하였다. 분리된 plasmid는 10¹~10⁵ copies/ μ L로 10배씩 희석하여 real-time PCR시 표준검량곡선을 구하는데 사용하였으며, plasmid DNA는 2번씩 수행하였다.

5.2.5 병리조직학적 검사

Pavicapsula sp.에 감염된 넙치와 비감염된 넙치를 대상으로 신장, 장, 비장 및 간 조직을 적출하여 Bouin's solution에 24시간 동안 고정한 후 70% EtOH 탈수하였다. 이후 파라핀 침투를 시키고(Leica EG 1150HC, Germany) 포매기(Leica Jung 820, Germany)를 사용하여 포매를 실시하였다. 이 후 마이크로톰으로 4~5 μ m 두께의 절편을 잘라 유리슬라이드에 부착시켜 건조시켰다. 제작된 조직표본은 haematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색을 실시한 후 광학현미경(Zeiss LT60, Germany)으로 검경하였다.

5.3 결 과

5.3.1 PCR

Pavicapsula sp.에 감염된 녀치와 비감염된 녀치를 대상으로 신장, 장, 비장, 뇌, 간 부위를 적출하여 PCR을 실시한 결과, EM-A에서는 전 장기에서 음성이 관찰되었고, EM-B에서는 간을 제외한 모든 장기에서 양성인 관찰되었으며, 감염 정도가 심각한 EM-C에서는 전 장기에서 양성인 검출되었다(Table 14 & Fig. 27).

또한, 추가적으로 실시한 5마리에서는 EM-D 신장, EM-E 신장, 장, EM-F 신장, 장, 비장, EM-G 및 EM-H 신장, 장, 비장, 뇌, 간에서 검출되었고, *Pavicapsula* sp.에 감염된 샘플은 신장에서 검출 빈도가 높은 것으로 확인되었다(Table 15).

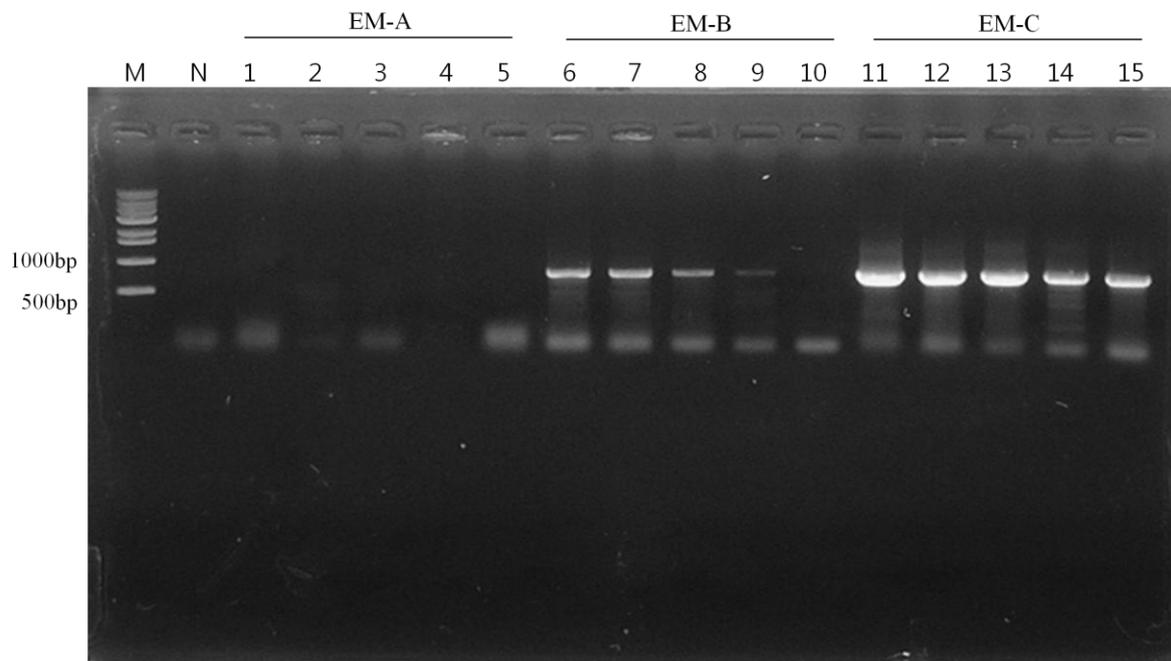


Fig. 27. PCR amplification from nucleic acids of internal organs from the emaciated olive flounder (*P. olivaceus*) in the level stages of infection. Lanes 1, 6 and 11, Kidney; lane 2, 7 and 12 Intestine; lanes 3, 8 and 13, Spleen; lanes 4, 9 and 14, Brain; lanes 5, 10 and 15, Liver; M, 1kb DNA ladder; N, negative control.

5.3.2 Real- time PCR의 검량선

본 연구에서는 *Pavicapsula* sp.에 감염된 어류로부터 812 bp의 PCR 산물을 확보할 수 있었으며, 이 PCR 산물의 클로닝을 이용하여 *Pavicapsula* sp.의 정량을 위한 절대표준농도 (absolute standard concentration)를 계산하여, *Pavicapsula* sp. 유전자의 클론으로부터 1.6×10^{11} copies/g 농도의 plasmid를 확보하였고 확보된 plasmid를 1/10로 연속 희석하여 표준 검량 곡선을 분석한 결과, plasmid DNA의 copy 수와 threshold cycle(C_T) 값 사이의 상관관계 계수인 r^2 은 0.995로 나타났다(Fig. 28).

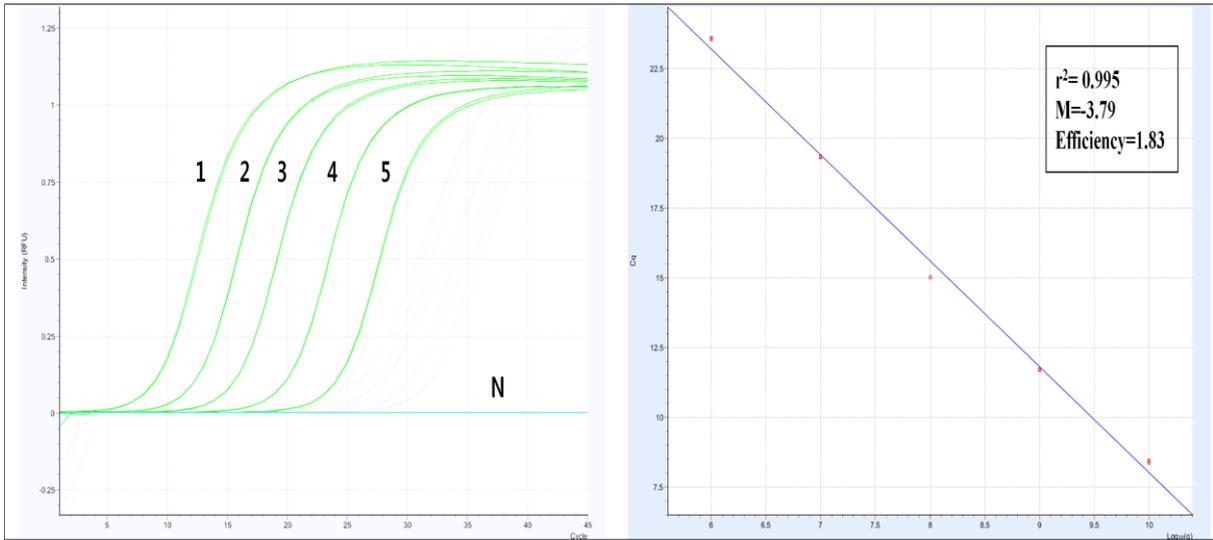


Fig. 28. Standard curve derived from 10-fold (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5) serially diluted plasmid DNA containing a partial 28S rDNA.

5.3.3 Real-time PCR을 이용한 장기별 감염 농도

Pavicapsula sp.에 감염된 넙치를 대상으로 PCR에서 양성을 보인 개체의 주요 장기(신장, 장, 비장, 간, 뇌)의 조직 내에 기생충의 copy를 확인한 결과, 신장, 장, 비장, 뇌, 간 순으로 높은 것을 확인하였다(Table 14&15). 그 중 비 감염된 EM-A sample에서는 전 장기에서 copy수가 관찰되지 않았으며, EM-B (kidney: 5.6×10^5 ; intestine: 2.4×10^5 ; spleen: 2×10^5 ; brain: 7.8×10^4 ; liver: 8.1×10^2)에서는 $10^2 \sim 10^5$ 의 copy가 관찰되었고, EM-C (kidney: 1.7×10^7 ; intestine: 3.9×10^6 ; spleen: 1×10^6 ; brain: 4.7×10^5 ; liver: 3.2×10^5)에서는 $10^2 \sim 10^7$ 의 copy가 관찰되었다(Table 14).

또한, 추가적으로 실시한 5마리에서도 위의 실험과 동일하게 신장, 장, 비장, 뇌, 간 순으로 copy가 높은 것을 확인하였으며, PCR 결과에서 검출되지 않은 부분까지 real-time PCR을 통해 검출되는 copy ($10 \sim 10^7$ copy)수를 확인하였다(Table 15).

Table 14. PCR, histological examination and real-time PCR using kidney, intestine, spleen, brain and liver of olive flounder (*P. olivaceus*) in Korea. P, positive; N, negative

Culture farm	Organ	Real-time PCR	PCR	Histological examination
EM-A	kidney	N	N	N
	intestine	N	N	N
	spleen	N	N	N
	brain	N	N	NT
	liver	N	N	N
EM-B	kidney	5.6×10^5	P	P
	intestine	2.4×10^5	P	P
	spleen	2×10^5	P	P
	brain	7.8×10^4	P	NT
	liver	8.1×10^2	N	P
EM-C	kidney	1.7×10^7	P	P
	intestine	3.9×10^6	P	P
	spleen	1×10^6	P	P
	brain	4.7×10^5	P	NT
	liver	3.2×10^5	P	P

NT: not tested

Table 15. PCR, histological examination and real-time PCR using kidney, intestine, spleen, brain and liver of olive flounder (*P. olivaceus*) in Korea. P, positive; N, negative

Culture farm	Organ	Real-time PCR	PCR
EM-D	kidney	2.6×10^3	P
	intestine	1.6×10^2	N
	spleen	2.2×10^1	N
	brain	1.2×10^1	N
	liver	3	N
EM-E	kidney	1.3×10^5	P
	intestine	3.9×10^3	P
	spleen	6.5×10^2	N
	brain	2.6×10^2	N
	liver	2.2×10^2	N
EM-F	kidney	2.7×10^4	P
	intestine	2.4×10^4	P
	spleen	2.9×10^3	P
	brain	9.4×10^2	N
	liver	2.8×10^2	N
EM-G	kidney	4.4×10^5	P
	intestine	1.1×10^5	P
	spleen	7.9×10^4	P
	brain	1.7×10^4	P
	liver	6.5×10^3	P
EM-H	kidney	9.5×10^6	P
	intestine	1.4×10^6	P
	spleen	2.7×10^5	P
	brain	3.1×10^4	P
	liver	5.6×10^3	P

5.3.4 병리조직학적 검사

여壼증에 감염된 어류를 대상으로 H&E 염색을 통한 조직 병리학적 분석을 실시하였다. Real-time PCR 결과에서 신장, 장, 비장, 뇌, 간 부위에서 중 감염된 EM-B sample과 높은 감염이 발생한 EM-C sample을 대상으로 real-time PCR 결과와 조직학적으로 양적 차이를 비교하였으며, 비감염어인 EM-A sample을 대조구로 사용하였다.

각 장기의 조직 절편을 광학현미경으로 관찰한 결과, PCR에서 음성반응이 관찰된 EM-A 그룹에서는 전 장기에서 정상적인 형태가 확인되었고(Fig. 29A~D), PCR에서 양성반응이 관찰된 EM-A,B 그룹에서는 전 장기에서 4~9 μ m 크기의 원형 또는 난원형의 포자가 다수 관찰되었다(Fig. 29 E~L). 그 중 신장부위에서는 기부골질, 사구체, 핵의 파괴와 일부 변형체(plasmodia)가 관찰되었으며, 장에서는 장 상피세포와 상피세포를 지지하는 결합조직, 비장에서는 동맥이 분지된 모세혈관과 혈구세포들의 변형체, 간 부위에서는 담관공 및 세동맥에서 포자가 형성되어 있는 것을 관찰하였고, 심한 경우 조직의 탈락 및 파괴가 관찰되었다(Fig. 29 E~L). 또한, 조직학적으로 양적 차이를 비교한 결과, 신장, 장, 비장, 간 순으로 많은 포자가 확인되었고, EM-B보다 EM-C에서 더 많은 포자가 관찰되었다.

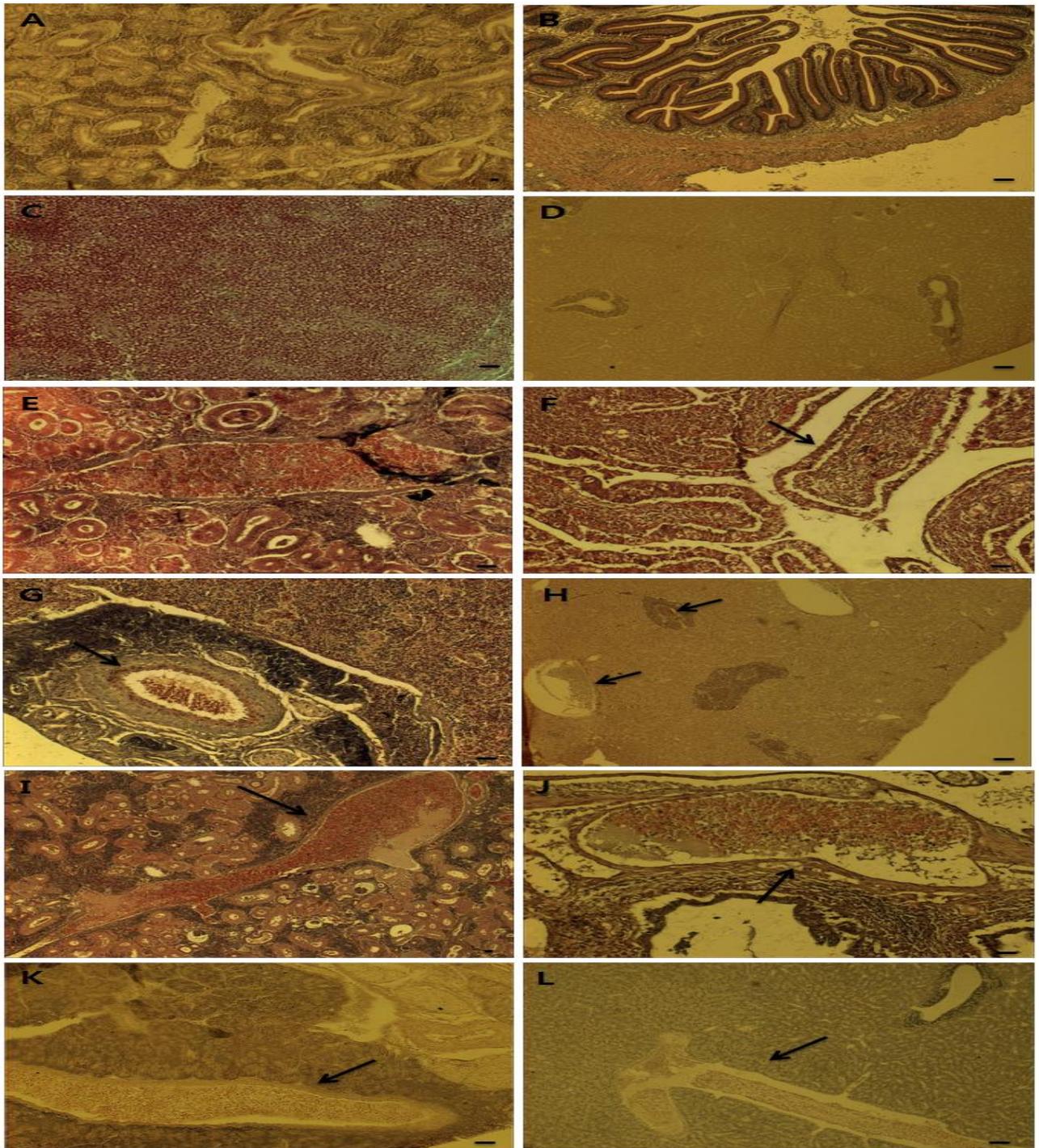


Fig. 29. Micrographs of the kidney (A: EM-A $\times 100$, E: EM-B $\times 200$ and I: EM-C $\times 100$), intestine (B: EM-A $\times 200$, F: EM-B $\times 200$ and J: EM-C $\times 200$), spleen (C: EM-A $\times 200$, G: EM-B $\times 200$ and K: EM-C $\times 200$) and liver (D: EM-A $\times 200$, H: EM-B $\times 200$ and L: EM-C $\times 200$) from olive flounder (*P. olivaceus*) with control and *Parvicapsula* sp. Note the serous tissue destruction and many spore in the internal organs (arrow). H&E stain Bar= 20 μ m.

5.3 고찰

전 세계적으로 어류 기생충에 의한 피해가 확산됨에 따라, 감염을 줄이기 위해 종묘생산 단계에서부터 노력을 기울이고 있지만 완전히 차단하는 것은 현재로서는 불가능한 것으로 알려져 있다. 또한, 기생충 검출을 위한 microscopy, immunoassay 및 western blotting 시험법은 감염초기 및 잠복성의 기생충 질병을 신속 진단하는데 어려움이 있으며, 이와 같은 단점을 보완하기 위해 PCR을 이용한 검출 방법을 사용하고 있지만(Kurita et al., 1998; Jeong et al., 2006), 일반적인 PCR은 주로 PCR 반응 후 agarose gel을 통해 확인하고 감염 정도의 양을 어렵잡기 어렵기 때문에 최근에는 신속하게 또는 정량적으로 검출하기 위해 real-time PCR 시험법을 사용하고 있다(Song et al. 2008; Jin et al. 2011).

본 연구에서는 real-time PCR을 통해 *Pavicapsula* sp.에 감염된 감염어의 각 조직 내 양적 증가 변화에 대한 분석을 실시하였고, 더불어 병리조직학적 검사를 통해 real-time PCR 결과값과의 상관관계를 확인하고자 하였다.

먼저 *Pavicapsula* sp.에 의한 감염 유무를 관찰하기 위해 EM-F/R primer set를 사용하여 PCR 방법을 통해 비감염어와 감염된 넙치를 분류하였다. 감염된 어류들은 대부분 신장, 장에서 검출되었으며, 심한 경우에는 비장, 뇌, 간에서도 검출이 되는 것으로 확인되었고 (Fig 27), 이러한 결과는 제 1장의 내용과 일치하였다.

Real-time PCR 실험을 위해 *Pavicapsula* sp.에 감염된 어류로부터 812 bp의 PCR 산물을 확보하여 클로닝 후 plasmid를 분리하여 절대표준농도를 계산한 결과 1.6×10^{11} copies/g을 확보하였고, *Pavicapsula* sp.의 정량분석을 위해 EMRT-F/R primer set를 제작하여 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 real-time PCR을 수행한 후 crossing point 값을 비교한 결과, (r^2)는 모두 0.99이상으로 재현성 뿐만 아니라 회귀성이 높음을 알 수 있었다(Fig. 28). 또한, 조직 내의 *Pavicapsula* sp.의 감염 농도를 살펴본 결과, 신장 부위에서 2.6×10^3 ~ 1.7×10^7 copies/mg로 다른 장기에 비해 가장 높은 수치를 나타내었으며, 감염된 넙치는 PCR 결과에서 검출되지 않는 부분까지 확인할 수 있었다(Table 14&15). 이러한 결과는 일반적인 PCR 통해 *Pavicapsula* sp.의 감염을 확인하기 위해서는 최소 10^3 이상의 copy가 존재해야 하는 것으로 판단되며, *Pavicapsula* sp.의 잠복성 및 감염초기의 질병을 신속하게 진단하는데 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Pavicapsula sp.에 대한 real-time-PCR 결과를 입증하기 위해 병리조직학적 검사를 통한 상관성 분석을 실시하였으나, 뇌에 대한 조직학적 검사는 PCR 및 real-time PCR 실험을 실시하여 뇌 조직의 부족으로 인해 실험을 실시하지 못하였으며, 나머지 장기인 신장, 장, 비장, 간 조직에 대한 검사를 실시하였다. 본 연구의 병리조직학적 검사 결과, 감염어의

전 장기에서는 다수의 포자가 관찰되었고(Fig. 29), 장기별 감염 포자의 수는 real-time PCR 결과와 일치하였다. 이러한 결과는 조직학적 검사를 실시하지 않은 뇌 부위에서도 real-time PCR에서 검출이 되었기 때문에 병리조직학적으로 관찰이 가능할 것으로 판단된다. 하지만, 병리조직학적 검사는 정확성이 우수하나 신속성이 떨어지기 때문에 질병 발생시 빠르게 대처할 수 없는 단점이 있으므로, *Pavicapsula* sp. 검사 시 잠복성 및 감염초기의 질병을 신속하게 진단할 수 있는 real-time PCR이 유용한 것으로 판단된다.

본 연구는 제주도 넙치양식장에서 심각한 문제를 일으키고 있는 여웬증에 대한 다양한 조사를 통해 *Pavicapsula* sp.로 동정하였으며, 현재까지 보고된 *Pavicapsula* sp.는 신장과 방광조직에서 감염이 이루어진다고 보고 되고 있어, 본 연구에서 실험을 실시하지 못한 방광조직에 대한 조사를 추가적으로 실시해야 될 것으로 여겨진다. 또한, 추후에는 *Pavicapsula* sp.의 피해를 줄이기 위해, 포자 배양기법을 개발하여 치료제 및 백신개발이 필요할 것으로 여겨진다.

종합요약

국내 양식 산업의 대표적 품종인 넙치는 1980년대 초 국립수산과학원에서 인공종묘 생산기술을 개발한 이후 지속적인 성장을 보여 왔으며, 30년이 넘는 긴 양식 역사를 가지고 있는 양식어종인 만큼 질병에 대한 연구도 다른 품종에 비해 다양한 편이다. 하지만, 국내 양식 어류에 대한 질병 조사는 대부분 특정 질병을 중심으로 조사되어 왔으며(Kim et al., 2006; Cho et al., 2008; Kim et al., 2010), 원인불명의 질병에 대해서는 연구가 미미한 실정이다.

최근 제주도내 양식장의 약 20cm 전후 크기의 넙치에서 여위어가는 원인불명의 질병이 발생하여, 1~3주 동안 폐사가 되는 사례가 증가하고 있으며, 일본에서 발병하는 여윌증과 달리, 국내 여윌증 발병에 대한 원인은 아직 보고되어 있지 않은 실정이다.

본 연구에서는 국내 넙치양식장에서 발병하는 여윌증에 대한 감염현황을 파악하기 위해 넙치양식 현장에서 유용하게 사용할 수 있는 primer set를 개발하여 검사법을 확립하고 현장에 적용하였으며, 여윌증의 원인체를 밝혀내기 위해 현미경 관찰법, PCR법, 병리조직학적 검사법, 분자계통분류학법, real-time PCR법 등의 다양한 연구를 통해 여윌증에 대한 특성을 파악하고 원인체 규명을 위한 실험을 실시하였다.

먼저 여윌증상을 보이는 국내의 넙치를 대상으로 여윌증의 원인체를 분석하기 위하여, 일본의 터봇 여윌증의 원인체로 보고된 *E. leei*의 small subunit ribosomal DNA gene (SSU rDNA)으로부터 제작된 MM18Sf/MM18Sr primer set를 동일하게 제작하여, 국내의 여윌증상 넙치의 장 조직으로부터 DNA를 분리하여 PCR 실험을 실시한 결과, 모두 음성반응을 나타내었다. 국내에서 발생하는 여윌증을 진단하기 위하여 EM-F/EM-R primer set를 개발하여, 국내 여윌증상 넙치에 대입시킨 결과 양성 반응이 확인되어 국내 넙치의 여윌증 진단에 사용하였다.

국내 여윌증상을 보이는 넙치를 대상으로 신장, 장, 비장, 뇌, 간, 아가미 조직을 적출하여 PCR을 실시한 결과, 일본의 여윌증에 대한 연구에서는 원인체가 주로 장에서 검출되는 것으로 보고하였으나, 본 연구에서는 장뿐만 아니라 신장에서도 양성 결과를 나타내었으며, 심각한 여윌 증상을 보이는 넙치에서는 아가미를 제외한 모든 장기에서 검출되었고, 검출 정도가 신장, 장, 비장 순으로 높은 것을 확인하였다.

여윌증의 감염현황을 파악하기 위해 2010년부터 2013년까지 총 24개소 양식장에서 216마리를 대상으로 감염조사를 실시한 결과, 여윌증에 감염된 넙치의 대부분은 복부부위에 심각한 여윌이 관찰되었으며, 여윌증에 감염된 넙치가 여윌증이 발병하지 않는 넙치보다 30~40% 낮은 체중이 관찰되었고, 총 66회 중 33회(33%)에서 여윌증 감염 양성임을 확인

하였다. 그 중, 연도별 감염률은 2010년도 21개소 중 8개소(38%), 2011년도 25개소 중 12개소(48%), 2012년도 4개소 중 2개소(50%), 2013년도 16개소 중 11개소(60%)로 높은 감염률을 관찰되었고, 이는 넙치 양식장에 심각한 문제를 일으키는 것으로 조사되었다.

각 장기의 조직 절편을 광학현미경으로 관찰한 결과, 여윌증에 감염된 넙치의 신장, 장 부위에서 원형 또는 난원형의 포자가 다수 관찰되었고, 신장 및 장을 제외한 다른 장기에서는 일부 포자가 관찰되었지만, 포자의 수가 신장 및 장에 비해 적은 수가 관찰되었거나 특이적인 조직학적 이상소견이 관찰되지 않았다.

검출된 PCR products에 대한 유전자 염기서열을 분석한 결과, 여윌증상 넙치로부터 검출된 병원체들 간의 유전자 상동성은 서로 99%이상인 것으로 나타났고, GenBank database를 활용한 유전자 비교 분석을 실시한 결과, 점액포자충과 부분적으로 일치하였으며, 아직 GenBank에 등록되지 않은 새로운 종인 것으로 조사되었다.

여윌증 발생동향을 보다 폭넓게 파악하기 위해 2014년도에는 4, 5, 9, 11, 12월에 총 900마리를 대상으로 체계적인 감염률을 조사하였고, 2015년도에는 3~4, 5~6, 7~8, 10월에 개체수를 제외하고 2014년도와 동일하게 실험을 실시하였다. 그 결과, 2014년도에는 18.3%~71.6%의 감염률이 관찰되었고, 2015년에는 16.3%~90.3%의 높은 감염률을 관찰하였다. 또한, 크기별 발병동향에서는 전 사이즈에서 발병하였고, 그 중 11~30cm에서 가장 높은 감염률이 관찰되었으며, 시기별 감염률에서는 2014년 9월, 12월, 2015년 3월, 7월, 10월에 상대적으로 높은 감염률이 관찰되었다. 이러한 결과는 해마다 여윌증 발병률이 증가하고 있는 것을 시사하고 있으며, 제주도 양식산업에 심각한 문제를 일으키는 것으로 조사되었다. 따라서, 추후에는 여윌증에 의한 피해를 최소화하기 위해서는 주기적인 모니터링을 실시하여 감염된 수조를 격리하는 등의 대처 방안이 필요할 것으로 여겨진다.

여윌증이 동일어종 및 다른 어종(참돔, 감성돔)끼리 전이가 발생하는지 관찰하기 위해 PCR을 통한 감염 유무를 확인 후 positive를 보인 donor group과 음성을 보인 recipient group으로 지정하여 실험을 실시한 결과, 동일 어종인 넙치에서는 감염이 발생하지만, 다른 어종인 참돔, 감성돔에서는 감염이 되지 않는 것으로 확인되었다. 이는 종 특이성과 관련하여 여윌증 원인체가 숙주의 환경, 생활조건 등의 요인들이 다른 어종과 맞지 않아 동일 어종의 넙치에만 감염이 이루어지고 다른 어종에는 감염이 이루어지지 않는 것으로 추정되고 있으나, 이는 현재까지 조사가 더 필요한 사항이며, 추후에는 다른 어종에 감염이 발생하는지에 대한 세부적인 연구가 더 필요할 것으로 여겨진다. 또한, cohabitation 후 신장 조직을 대상으로 조직학적 검사를 실시한 결과, PCR에서 검출된 동일 그룹(recipient group)에서 일반적으로 여윌증이 관찰되는 것과 동일한 포자가 관찰되었으며, 다른 어종

인 침범, 감염증에서는 PCR결과 및 포자가 관찰되지 않았다.

여윌증에 대한 진단지표를 확립하기 위하여 여윌증에 감염된 어류와 비감염된 어류를 대상으로 혈액학적 분석 및 비특이적인 면역반응을 관찰한 결과, 혈액학적 분석에서는 Hamatocrit와 GPT (farm-B)에서 대조구에 비해 실험구의 수치가 높게 나타났으며 GPT, GLU, total glucose, total cholesterol, total protein는 대조구보다 실험구에서 낮은 수치가 관찰되었다. 비특이적인 면역반응의 결과, Lysozyme, NBT, MPO 그룹에서 대조구보다 낮은 수치가 관찰되었다. 이는 여윌증 원인체에 의한 어체의 스트레스 및 내부장기의 손상으로 1차적인 방어시스템을 파괴하는 것으로 판단된다.

여윌증의 원인체를 밝혀내기 위해 EM유전자의 염기서열을 토대로 GenBank (NCBI, USA)에 등록된 점액포자충의 염기서열로부터 SSU rDNA 및 LSU rDNA primers를 각각 제작하여 계통학적 분류를 실시한 결과, 4개의 분리주 모두 *Parvicapsula* sp.에 속한 것으로 분석되었고 국내에서 동정한 4개의 분리주와 유전자의 상동성은 99.7%~99.76%인 것으로 나타났다. 또한, GenBank database를 활용한 유전자 비교 분석을 실시한 결과, 18S rRNA부분에서 *P. petuniae*와 92%의 높은 상동성이 관찰되어 국내에서 발생하는 여윌증은 *Parvicapsula* sp.로 동정되었다.

형태학적 동정을 위해 여윌증이 발생한 어류를 대상으로 현미경 검경을 실시한 결과, 포자의 형태는 두 가지의 형태로 분류되었으며, 그 중 하나는 두 개의 포자가 같은 방향 및 다른 방향의 모습으로 모아진 형태이며, 길이는 16~18 μ m, 폭 4~5 μ m의 포자가 관찰되었고, 모두 한쪽으로 모아진 두 개의 극낭을 가지고 있는 포자가 관찰되었다. 또 다른 하나는 작은 포자의 형태인 길이 5~8 μ m, 폭 7~9 μ m가 관찰되었고, 한 개의 극낭과 포자의 일부분이 없는 형태가 관찰되었다. 이러한 결과는 넙치 양식장에서 발생하는 *P. anisocaudata* 및 *P. pseudobranchicola* n. sp.와 형태학적으로 유사한 포자가 관찰되었고, *Parvicapsula* sp.에서만 관찰되는 전형적인 포자가 확인되어, 국내에서 발생하는 여윌증은 계통학적 분석결과와 동일하게 *Parvicapsula* sp.로 동정되었다.

Real-time PCR을 통해 *Parvicapsula* sp.의 감염된 조직 내 양적 변화에 대한 분석을 실시하였고, 더불어 병리조직학적 검사를 통해 real-time PCR 결과값과의 상관관계를 확인하였다. 각 조직 내의 *Parvicapsula* sp.의 양적 비교를 실시한 결과, 신장, 장, 비장, 뇌, 간 순서로 높은 copy수가 관찰되었고, 그 중 신장 부위에서 $2.6 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^7$ copies/mg가 관찰되었다. 이러한 결과는 PCR 결과에서 검출되지 않은 부분까지 확인할 수 있었으며, PCR을 통한 *Parvicapsula* sp.의 감염을 확인하기 위해서는 최소 10^3 copy가 존재해야 하는 것으로 여겨진다.

Parvicapsula sp.에 대한 real-time 결과를 입증하기 위해 병리조직학적 검사를 통한 상관성 분석을 실시한 결과, 전 장기에서는 다수의 포자가 관찰되었고, 장기별 감염 포자의 유무는 real-time PCR 결과와 일치하였다. 하지만, 병리조직학적 검사는 정확성이 우수하나 신속성이 떨어지기 때문에 질병 발생시 빠르게 대처할 수 없는 단점이 있으므로, *Parvicapsula* sp.의 검사 시 잠복성 및 감염초기의 질병을 신속하게 진단할 수 있는 real-time PCR이 유용할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Anderson DP and Siwicki AK. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *Prog Fish cult* 56, 258-261. <http://dx.doi.org/10.1577/1548-8640>.
- Athanassopoulou F, Prapas T and Rodger H. 1999. Diseases of *Puntazzo puntazzo* Cuvier in marine aquaculture systems in Greece. *J Fish Dis* 22, 215-218.
- Barbara AF and David JB. 2002. De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Letters to nature* 415, -926-928.
- Bartholomew JL, Smith CH, Rohovec JS and Fryer JL. 1989. Characterization of a host response to the myxosporean parasite, *Ceratomyxa shasta* (Noble), by histology, scanning electron microscopy and immunological techniques. *J Fish Dis* 12, 509-522. <http://dx.doi.org/j1365-2761.1989.tb00561.x>.
- Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkins-Barrow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous-Juchelka H. 1997. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Parasitol.* 83, 262–271.
- Barton BA and Iwama GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann Rev* 1, 3-26. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- Beaman HJ, Speare DJ, Brimacombe M and Daley J. 1999. Evaluating protection against *Loma salmonae* generated from primary exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), outside of the xenoma-expression temperature boundaries. *J Fish Dis* 22, 445–450. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00194.x>.
- Blylock RB, Bullard SA and Whipps CM. 2004. *Kudoa hypoepicardialis* n. sp. (Myxozoa:Kudoidae) and associated lesions from the heart of seven perciform fishes in the northern Gulf of Mexico. *J parasitology.* 90, 584-593. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-161R>.
- Bonga SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol* 77, 591-625.
- Burger J, Gochfeld M, Jeitner C, Burke S and Stamm T. 2007. Metal levels in flathead sole (*Hippoglossoides elassodon*) and great sculpin (*Myoxocephalus polyacanthocephalus*) from Adak Island, Alaska: potential risk to predators and fishermen. *Environmental Research.* 103, 62-69. <http://dx.doi.org/10.1645/j.envres.2006.02.005>.
- Canning EU and Okamura B. 2004. Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Adv. Parasitol.* 56, 43–131. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(03\)56002-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(03)56002-X).
- Casillas E and Ames W. 1985. Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard,

- from polluted areas of Puget Sound, Washington. J Fish Dis 8, 437-449.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tbd1277.x>.
- Chang YJ and Hur JW. 1999. Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by rapid changes in salinity of rearing water. J Fish Soc 32, 310-316.
- Chang CY, Min BH, Kim NN, Cho SH and Chang YJ. 2006. Expression of HSP90, HSP70 mRNA and changes of plasma cortisol and glucose during water temperature rising in freshwater adapted black porgy, *Acanthopagrus schlegli*. J Aqua 19, 315-322.
- Chen D and Ainsworth AJ. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanism of channel catfish *Ictalurus punctatus Rafinesque*. J Fish Dis 15, 295-304.
- Cho JB and Kim KH. 2004. Light and Electron Microscopical Observations of *Parvicapsula anisocaudata* (Myxosporidia: Parvicapsulidae) from urinary system of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol 17, 179-189.
- Cho MY, Kim MS, Kwon MG, Jee BY, Choi HS, Choi DL, Park GH, Lee CH, Kim JD, Lee JS, Oh YK, Lee DC, Park SH and Park MA. 2007. Epidemiological study of bacterial diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2006 in Korea. J Fish Dis 20, 61-70.
- Cho MY, Kim MS, Choi HS, Park GH, Kim JW, Park MS and Park MA. 2008. A statistical study on infectious diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J Fish Pathol 21, 271-278.
- Cho MY, Jee BY, Park GH, Lee CH, Lee DC, Kim JW, Park MS and Park MA. 2009. Monitoring of fish pathogens in wild marine fish of Korean coastal offshore water in 2008. J Fish Pathol 22, 75-83.
- Cho MY, Kim MS, Choi HS, Park GH, Kim JW, Park MS and Park MA. 2008. A statistical study on infectious diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J. Fish Pathol, 21, 271-278.
- Choi HS, Jun LJ, Kim SM, Jeong HD, Kim YK, Lim H, Yeo Ik and Jeong JB. 2012. Clinical features of fish with pathogens isolated from emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J Fish Dis 25, 67-76.
- Chun SK. 2005. *Paralichthys olivaceus*: disease and treatment. Kor susantimes 112-118.
- Chun SK. 2006. Fish parasitology. Kor susantimes 11-68.
- Cox AM and Goodwin KD. 2013. Sample preparation methods for quantitative detection of DNA by molecular assays and marine biosensors. Mar. Pollut. Bull. 73, 47-56.
- Davis KB and Parker NC. 1990. Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. Aquaculture 91, 349-358. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90199-9](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(90)90199-9).
- Diamant A. 1997. Fish-to-fish transmission of a marine myxosporean. Dis Aquat Org 30, 99-105.
- Diamant A. 1998. Red drum *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae), a recent introduction to Mediterranean

- mariculture, is susceptible to *Myxidium leei* (Myxosporea). *Aquaculture* 162, 33-39. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00307-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00307-4).
- Engstad RE, Robertson B and Frivold E. 1992. Yeast glucan induce increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunology* 2, 287-297. [http://dx.doi.org/10.1016/S1050-4648\(06\)80033-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1050-4648(06)80033-1).
- Feist SW and Longshaw M. 2006. Phylum Myxozoa, In: *Fish Diseases and Disorders, Protozoan and Metazoan Infections*, Vol. 1, P.T.K. Woo, (Ed.), 230-296, CABI, Wallingford, U.K.
- Fiala I. 2006. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Int. J. Parasitol.* 36, 1521–1534. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.016](http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.016).
- Garrido MA, Perez P, Titus JA, Valdayo MJ, Winkler DF, Barbieri SA, Wunderlich JR and Segal DM. 1990. Targeted cytotoxic cells in human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 144, 2891-2898.
- Goldberg MD, Qu Y, McMillin LM, Wolf W, Zhou L and Divakarla M. 2003. AIRS near-real-time products and algorithms in support of operational numerical weather prediction. *Geoscience and Remote Sensing, IEEE Transactions on*, 41, 379-389.
- Gordon RB. 1968. Distribution of transaminases (*Aminotransferases*) in the tissue of the Pacific salmon (*Oncorhynchus*) with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic oxaloacetictransaminase. *J Fish Res Bd can* 25, 1247-1268. <http://dx.doi.org/10.1139/f68-108>.
- Ishimatsu A, Hayashi M, Nakane M and Sameshima M. 2007. Pathophysiology of Cultured Tiger Puffer *Takifugu rubripes* Suffering from the Myxosporean Emaciation Disease. *Fish Pathology* 42, 211-217.
- Iijima Y, Nakanishi N, Furusawa H, Ohnishi T and Sugita KY. 2012. Inter-Laboratory validation and applications of quantitative real-time PCR for the detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J infect Dis* 65, 436-438.
- Jeong, JB, Kim HY, Kim KH, Chung JK, Komisar JL and Jeong HD. 2006. Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. *Aquaculture*, 255, 105-116.
- Jin CN, Kang HS, Moon YG, Lee CH, Lee YD, Lee JH, Song CB and Heo MS. 2007. Scuticociliatosis in flounder farms of Jeju Island. *J. Fish Pathol* 20, 93-98.
- Jin JW, Cho HJ, Kim KI, Jeong JB, Park GH and Jeong HD. 2011. Quantitative analysis of the clinical signs in marine fish induced by *Megalocytivirus* infection. *J. Fish Pathol.* 24, 53-64.
- Jolles P and Jolles J. 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Biochemm* 63, 165-189.
- Jorgensen JB, Lunde H and Robertsen B. 1993a. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon *Salmosalar*. *J Fish Dis* 16, 313-325.

- <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00865.x>.
- Jorgensen N, Glwercman A and Muller J. 1993b. Immunohistochemical markers of carcinoma of the testis also expressed in normal infantile germ cells. *Histopathology* 4, 373-378. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.1993.tb00138.x>.
- Jung SH, Jee BY, Kim JD, Seo JS and Kim JW. 2010. Efficacy of formalin bath against gill infections with *Pseudodactylogyus* spp. In cultured eel *Auilla japonica*. *J. Fish Pathol.* 23, 293-302.
- Jung SH, Choi HS, Jeung WD, Kim MS, Kwon MG, Seo JS, Hwang JY, Kim SR, Cho YR, Kim JD, Park MA, Jee BY, Cho MY and Kim JW. 2012. Monitoring of bacteria and parasites in cultured olive flounder, black rockfish, red sea bream and shrimp during summer period in Korea from 2007 to 2011. *J Fish Pathol* 25, 231-241. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2012.25.3.231>.
- Kajita Y, Sakai M, Kobayashi M and Kawaushi H. 1991. Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. *Fish Shellfish Immunol* 2, 155-157. [http://dx.doi.org/10.1016/S.1050-4648\(05\).80044-0](http://dx.doi.org/10.1016/S.1050-4648(05).80044-0).
- Karlsbakk E, Saether PA, Hostlund C, Fjellsoy KR and Nylund A. 2002. *Parvicapsula pseudobranchicola* n. sp. (Myxozoa), a myxosporidian infecting the pseudobranch of cultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Bull. Eur. Ass. Fish pathol.* 22, 381-387.
- Katharios P, Kokkari C, Sterioti A, Smyrli M and Kalatzis PG. 2014. *Enteromyxum leei* infection in parrotfish, *Sparisoma cretense*: Histopathological, morphological and molecular study. *Vet. Parasitol.* 199, 136-143.
- Kaur H. 2014. Myxozoan infestation in freshwater fishes in wetlands and aquaculture in Punjab (India). *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2, 488-502.
- Kelley GO, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Myklebust KA, Adkison MA, McDowell TS, Marty GD, Kahler AL, Bush AL, Gardner IA and Hedrick RP. 2004. Evaluation of five diagnostic methods for the detection and quantification of *Myxobolus cerebralis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16, 202-211.
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJG, Longshaw M, Palenzuela O, Siddall ME and Xiao CX. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 395-413.
- Kim IS and Lee GY. 1988. Taxonomic study of the cobitid fish, *Cobitis lutheri* Rendahl and *C. striata* Ikeda (Cobitidae) from Korea. *J. S. syst. zool.* 4, 91-102.
- Kim JW, Jung SH, Park MA, Do JW, Choi DL, Jee BY, Cho MY, Kim MS, Choi HS, Kim YC and Lee JS. 2006. Monitoring of pathogens in cultured fish of Korea for the summer period from 2000 to 2006. *J Fish Pathol* 19, 207-214.
- Kim JW, Cho MY, Park GH, Won KM, Choi HS, Kim MS and Park MA. 2010. Statistical data on

- infectious diseases of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2007. J Fish Pathol 23, 369-377.
- Kim WJ, Kim YS and Chang YJ. 2010. Comparison of hematological properties in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* on different growth stages and seasons. Dev Reprod 2, 131-141.
- Kim YK, Jeong JB, Lee MK, Park SI, Park MA, Choe MK and Yeo IK. 2011. Pathophysiology of olive flounder *Paralichthys olivaceus* suffering from emaciation. Fish Pathol 24, 11-18.
- Kim SM, Jun LJ, Park MA, Jeong HD and Jeong JB. 2015. Characterization of the myxosporean parasite isolated from emaciated olive flounders *Paralichthys olivaceus* on Jeju Island. J Fish Aquat 48, 337-345. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0337>.
- Kodádková A, Dyková I, Týmľ T, Ditrich O, and Fiala I. 2014. Myxozoa in high Arctic: survey on the central part of Svalbard archipelago. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(1), 41-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijipara.2014.02.001>.
- Køie M, Whipps CM and Kent ML. 2004. *Ellipsomyxa gobbii* (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) uses *Nereis* spp. (Annelida: Polychaeta) as invertebrate hosts. Folia Parasitol. 51, 14-18.
- Køie M, Karlsbakk E and Nylund A. 2007. A new genus *Gadimyxa* with three new species (Myxozoa, Parvicapsulidae) parasitic in marine fish (Gadidae) and the two-host life cycle of *gadimyxa atlantica* n. sp. J. Parasitol. 93, 1459-1467.
- Køie M, Karlsbakk E and Nylund A. 2008. The marine herring myxozoan *Ceratomyxa auerbachii* (Myxozoa: Ceratomyxidae) uses *Chone infundibuliformis* (Annelida: Polychaeta: Sabellidae) as invertebrate host. Folia Parasitol. 55, 100-104.
- Kumari J and Sahoo PK. 2005. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. Aquaculture 252, 121-127. <http://dx.doi.org/10.1016/J.aquaculture.2005.07.025>.
- Kurita J, Nakajima K, Hirono I and Aoki T. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). J. Fish Pathol. 33, 17-23.
- Kwon MG and Jung SH. 2012. Comparative study of pathogenicity following single or coinfection with *edwardsiella tarda* and *streptococcus iniae* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J Fish Pathol 24, 591-601.
- Le Breton A and Marques A. 1995. Occurrence of a histozoic *Myxidium* infection in two marine cultured species: *Puntazzo puntazzo* C. and *Pagrus major*. Bull Fish Pathol 15, 210-212.
- Mater KS, Mayer FL and Witt A. 1985. Waste transformer oil and PCB toxicity to rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Soc 114, 869-886. <http://dx.doi.org/10.1577/1548-8659>.
- Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y and Sugita-Konishi, Y. 2010. : *Kudoa septempunctata* n. Sp. (Myxosporaea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

- imported from Korea. Parasitol. Res. 107, 865-872. [http:// dx.doi.org/10.1007/s00436.010.1941.8](http://dx.doi.org/10.1007/s00436.010.1941.8).
- Munck A, Guyre PM and Holbrook J. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relationship to pharmacological action. Endocrinol 5, 5-34. [http://dx.doi.org/ 10.1210/edrv-5-1-25](http://dx.doi.org/10.1210/edrv-5-1-25).
- Nam YY and Heo GJ. 2004. Acute and Subacute Toxicity of Formalin in Blacktetra (*Gymnocorymbus ternet zi*). J. Biotechnonology. 5. 45-51.
- Nerland AH, Skår CK Eriksen TB and Bleie H. 2007. Detection of nodavirus in seawater from rearing facilities for Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae.
- NFRDI. 2013. Statistical yearbook of marine fisheries.
- Ogawa K and Yokoyama H. 2001. Emaciation disease of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes*. Bull Aquacult Suppl 5, 65-70.
- Oh SP, Kim DH, Lee JJ and Lee CH. 1998. Bacterial diseases in flounder farms of Cheju Island. J Fish Pathol 11, 23-27.
- OIE. 2008. Guidelines for aquatic animal health surveillance. In Aquatic animal health code (eleventh ed.). World organization for animal health Paris France, 245.
- Palenzuela O, Redondo MJ and Alvarez-Pellitero P. 2002. Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal patasite of turbot (*Scophthalmus maximus L.*) using morphological and ribosomal RNA sequence data. Parasitology 124, 369-370. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182001001354>.
- Park MY, Chang YJ and Kang DY. 1999. Physiological response of the cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to the sharp changes of water temperature. J Aquaculture 12, 221-228.
- Palic D, Andreasen CB, Menzel BW and Roth JA. 2005. Arapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas Rafiesque, 1820*). Fish Shellfish Immunol 19, 217-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2004.12.003>.
- Pickering AD. 1992. Rainbow trout husbandry: manage ment of the stress response. Aquaculture 100, 125-139. [http://dx.doi.org/ 10.1016/0044-8486\(92\)90354-N](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(92)90354-N).
- Rangel LF, Santos MJ, Cech G and Székely C. 2009. Morphology, molecular data, and development of *Zschokkella mugilis* (Myxosporaea, bivalvulida) in a polychaete alternative host, *Nereis diversicolor*. J. Parasitol. 95, 561-569.
- Rao PP, Joseph KV, Rao KJ. 1990. Histopathological and biochemical change in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. J Naturalist Conserv 2, 33-137.
- Rholf FG and Wooten, MC. 1988. Evolution of the restricted maximum likelihood method for estimating phylogenetic trees using simulated allele frequency data. Evolution 42, 581-595.
- Ryan SN. 1995. The effect of chronic heat stress on cortisol levels in the Antarctic fish *Pagothenia*

- borchgrevinki *Experientia*. 51, 768-774.
- Sharma KK, Sharma AL, Dwivedi KK and Sharma PK. 1976. Effect of raw and boiled garlic on blood cholesterol in butter fat lipidemia. *J Nutr* 13, 7-11.
- Song JH, Choo YJ and Cho JC. 2008. Quantification of White Spot Syndrome Virus(WSSV) in seawaters using Real-time PCR and Correlation analyses between WSSV and Environmental parameters. *J. Microbiology*. 44, 49-55.
- Song JY, Choi JH, Choi HS, Jung SH and Park MA. 2013. Monitoring of *Kudoa septempunctata* in cultured olive flounder and wild fish in Jeju Island during 2012. *J Fish Pathol* 26, 129-137.
- Song JY, Kim MJ, Choi HS and Jung SH. 2014. Monitoring *Kudoa septempunctata* in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in different regions of Korea in 2013. *J Fish aqua* 47, 611-621. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2013.26.3.129>.
- Szekely CS, Molnar E, Eszterbauer E, Baska F. 1999. Experimental detection of the actinospores of *Myxobolus pseudodispar* (Myxosporea: Myxobolidae) in oligochaete alternate hosts. *Dis Aqaq Org*. 38.3, 219-224.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
- Tetsuya Y, Yoshinori N, Takeshi K, Yutaka F, Hiroshi Y and Kazuo O. 2004. Molecular and Morphological Redescriptions of Enteric Myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb.n. (syn, *Myxidium fugu*) from Cultured Tiger puffer. *J Fish Pathol* 39, 137-143.
- Tun T, Yokoyama H, Ogawa K and Wakabayashi H. 2000. Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. *J Fish Pathol* 35, 145-156. <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.35.145>.
- Tun T, Ogawa K and Wakabayashi H. 2002. Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). *J Fish Pathol* 25, 63-72. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00333.x>.
- Wardle CS. 1981. Physiological stress in captive fish. *Aquaculture systems*/edited by AD Hawkins PP, 403-414.
- Wedmeyer G and McLeay DJ. 1981. Methods of determine the tolerance of fishes to environmental stressors in stress in fish. *Academic press* PP, 247-275.
- Wedmeyer GA, Barton BA and McLeay DJ. 1990. Stress and acclimation. *Fisheries Soc* PP, 451-489.
- Yamawaki K, Hashimoto W, Fujii K, Koyama J, Ikeda Y and Ozaki H. 1986. Hemochemical changes in carp exposed to low cadmium concentrations. *Bull Japanese Soc Fisheries* 52, 459-466.

- Yasuda H, Ooyama T, Iwata K, Tun T, Yokoyama H and Ogawa K. 2002. Fish-to-fish transmission of *Myxidium* sp. (Myxozoa) in cultured tiger puffer suffering from emaciation disease. *J Fish Pathol* 37, 29-33. <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.37.29>.
- Yasuda H, Ooyama T, Nakamura A, Iwata K, Palenzuela, O and Yokoyama H. 2005. Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol*, 40, 175-180.
- Yeh SP, Chang CA, Chang CY, Liu CH and Cheng W. 2008. Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol* 25, 19-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.11.011>.

감사의 글

박사학위 논문을 무사히 마치기까지 많은 분들의 도움이 있었기에 가능하였습니다. 그 중, 두 분에 대해서 먼저 말씀 드리고 싶습니다. 학부시절부터 현재까지 실험실 생활을 하면서 부족했던 저를 바른 길로 이끌어주시고, 때로는 엄한 아버지처럼 때로는 자애로운 어머니처럼 진정한 연구자의 길이 무엇인지 직접 보여주신 정준범 교수님과 전려진 박사님께 가장 먼저 감사의 말씀을 올립니다. 두 분께서 보여주신 가르침으로 앞으로 더욱 발전하는 연구자의 길을 걸어가겠습니다. 또한, 바쁘신 중에도 논문심사를 맡아주신 송춘복 교수님, 허문수 교수님, 강봉조 연구사님께 깊은 감사합니다. 논문에 대한 유익한 말씀과 충고가 많은 도움이 되었습니다.

연구실 생활을 시작하면서 가장 많이 저를 옆에서 봐준 우리 실험실 소속 (항상 열 받는다) 이송이, (나 안해요) 박현경, (사랑한다) 이다원, (바쁜 ROTC) 홍성훈, (형님~) 이명립, 항상 저에게 격려와 사랑으로 아껴주었던 맹진이형, 의리남 송헌이형, 원우형, 지훈이형, 준상이형, 의리남 동휘, 이번에 발표를 같이 한 준영이, 진이, 은아, 윤택, 혜원 등에게 고맙다는 말을 전합니다.

그리고 힘들고 지쳤을 때 언제나 마음의 휴식이 되어 주었던 (소개팅 성공률 제로) 이종경, (눈이 너무 높은) 김창수, (영원한 태권 친구) 이해원, (매일 피곤한) 신병옥, (연락 좀 해라) 조인국, (여친 생겨 좋아) 장대중, (결혼하고 싶은) 김송식, (보고 싶다) 이주형, (경찰청 사람들) 태호형, (어디 계세요?) 승일이형, 명오형, 병구형, (공부를 열정적으로 하시는) 윤현식형님, (6시 내 고향 생각) 심우태 등에게 고맙고 감사하는 말을 전합니다.

끝으로, 항상 힘이 되어주시고 끝 없는 사랑으로 저를 지켜봐 주신 우리 가족 김경숙 여사님, 김수정, 김수덕 김영훈, 권유빈(조카1), 권윤선(조카2), 김소미(막내 조카3)와 하늘에서 보고 계시는 우리아버지 김종철님에게 이 논문을 바칩니다.