

PCR 기법을 이용한 바지락포자충 *Perkinsus* 진단 기술개발

박경일¹ · 박영미 · 이제희 · 최광식*

제주대학교 해양과학대학 해양생산과학부

Development of a PCR Assay for Detection of the Protozoan Parasite *Perkinsus*

Kyung-Il Park¹, Young-Mi Park, Jehee Lee and Kwang-Sik Choi*

Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University,
1 Ara 1-Dong Jeju-City Jeju-Do 690-756, Korea

Abstract - Detection of protozoan parasites *Perkinsus* sp. and *P. atlanticus* was developed in this study using a specific polymerase chain reaction (PCR) to diagnose the presence of those organisms that causes extensive mortalities of marine shellfishes. The PCR was conducted together with fluid thioglycollate medium (FTM) method and 2 M NaOH lysis method. For the test, Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, were collected from four coastal locations in Korea including Wando Island, Gimnyeong, Sungsan and Sogwipo in Jeju. In addition, trophozoites of *Perkinsus* sp. cultivated *in vitro* and the granular ark clam, *Tegillarca granosa*, taken from Gangjin on the south coast of Korea, were used as positive and negative controls, respectively. Expected DNA bands were detected in the samples from Wando Island, Sungsan and the *in vitro* cultured *Perkinsus* sp. when the probes specific for the genus *Perkinsus* and *P. atlanticus* were used. The samples were also positively diagnosed by the FTM and 2 M NaOH methods. In contrast, the Manila clams from Gimnyeong and Sogwipo, and the granular arks clams from Gangjin showed no detectable signs of infection with the PCR, the FTM method and the 2 M NaOH lysis method. On the other hand, being amplified by *P. atlanticus* specific primer, it is suggested that the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Korean Manila clam is *P. atlanticus*. Finally the PCR-based assay developed in the present study can be used in detection of *Perkinsus* infection and discrimination of *Perkinsus* species in quarantine stations or laboratories due to the high sensitivity and specificity as well as its rapid detection.

Key words : *Perkinsus atlanticus*, *Ruditapes philippinarum*, PCR, diagnosis, fluid thioglycollate medium, Korea

서 론

¹ 현주소 : 스페인 Santiago de compostela 대학교 양식연구소
* Corresponding author: Kwang-Sik Choi, Tel. 064-754-3422,
Fax. 064-756-3493, E-mail: skchoi@cheju.ac.kr

*Perkinsus*는 해산 연체동물 체내에 기생하는 원생동물로서 북미, 유럽, 오세아니아, 아시아 등지에서 상업적

으로 중요한 굴, 바지락, 가리비 등의 폐사를 일으키는 기생생물이다(Kinne 1983). *Perkinsus*는 형태적 특성에 의한 분류학상, 정복합체동물문(Phylum, Apicomplexa)에 속하며(Levine 1978), 독소플라즈마증(*Toxoplasma gondii*), 설사증(*Cryptosporidium* spp.), 말라리아(*Plasmodium* spp.) 등 인간에게 위대한 생물들이 이 문에 속해 있어 비교적 많은 연구가 이루어져 왔다(Sunila et al. 2001). 그러나 최근들어 분자생물학적 기법에 의한 *Perkinsus*의 계통학적 연구 결과 *Perkinsus*가 편조류(Siddall et al. 1997), Dinozoa(Cavalier-Smith 1999) 또는 Perkinsozoa(Noren et al. 1999) 등에 속하는 것으로 보고되어 이들의 분류학적 위치에 대한 다양한 이견이 보고되고 있다. 현재까지 *P. marinus*, *P. atlanticus*, *P. olsoni*, *P. qugwadi* 그리고 *P. andrewsi* 등 총 5종이 학계에 보고된 상태이며(Blackbourn 1998; Coss et al. 2001), 최근에는 유럽산 바지락, *R. decussatus*에서 위(僞) *Perkinsus* (*Pseudoperkinsus*)가 보고되기도 하였다(Figueras et al. 2000).

*Perkinsus*가 주요 수산양식 패류 기생생물로 주목받기 시작한 것은 미국산 굴(*Crassostrea virginica*)의 대량 폐사 원인 생물로 *P. marinus*가 보고된 1950년대 초반부터이다(Ray and Mackin 1954; Andrews 1996; Bureson and Ragone Calvo 1996). 이를 계기로 *P. marinus* 생활사(Mackin and Boswell 1956), 미세구조(Perkins 1996), 지리적 분포(Wilson et al. 1990), 계절에 따른 감염도의 변화(Crosby and Roberts 1990), 진단 기술(Fisher and Oliver 1996), 피해 경감을 위한 대책(Krantz and Jordan 1996) 등의 연구가 집중적으로 진행되었다. 한편 *P. atlanticus*는 지중해 및 대서양에 분포하는 바지락(*R. decussatus*, *R. philippinarum*)의 폐사 원인 생물로 알려져 있으며, 이들의 현미경적 특성(Azevedo 1989), 숙주의 면역 기작(Ordas et al. 2000), 병리조직학적 연구(Chagot et al. 1987) 등이 보고된바 있다.

우리나라의 경우 바지락에 기생하는 *Perkinsus* sp.가 Choi and Park (1997)에 의해 보고되었으며, Park et al. (1999)은 이를 바지락포자충으로 명명 하였다. 이후 Park et al. (GenBank 기탁번호: AF438150, AF473840)은 우리나라 바지락에서 추출한 바지락포자충의 DNA 염기서열을 분석한 결과 유럽산 바지락의 폐사 원인 생물로 규명된 *P. atlanticus*와 동일종임을 확인하였다. 또한 국내 바지락포자충의 분포 조사를 통하여 남, 서해안의 주요 바지락 서식지에 분포하는 바지락의 대부분은 바지락포자충에 감염되어 있고 그 감염도가 매우 심각함을 보고한 바 있다(Park and Choi 2001). 조사결과

Perkinsus 감염에 따른 병리조직학적 소견 역시 심각한 것으로 확인되었으며(Choi et al. 1998; Park 1999), 이는 1990년대부터 지속되고 있는 우리나라 바지락 생산량의 급격한 감소가 바지락포자충에 의해 유발됐을 가능성을 시사하였다(Korea Fisheries Association 2000). 한편 바지락포자충은 우리나라 뿐만 아니라 일본 히로시마와 구마모토(Hamaguchi et al. 1998) 및 중국 발해만 지역에 서식하는 바지락에서도 검출됨으로써(Liang 2001) 바지락포자충은 황해 전역 및 태평양 연안에도 분포하고 있음이 확인 되었다.

바지락포자충의 진단은 조직학적 현미경관찰 방법과 Ray's fluid thioglycollate medium (FTM) (Ray 1952; Bushek et al. 1994; Choi and Park 1997) 방법이 가장 보편적으로 이용되고 있다. 그러나 이와 같은 진단 방법에 대한 가양성(false-positive) 또는 가음성(false-negative)이 보고되고 있으며, 종 특이적인 진단 방법이 아니라는 단점이 있다(Rodriguez and Navas 1995; Robledo et al. 1998; Almeida et al. 1999). 한편, Choi et al. (1991)과 Dungan and Roberson (1993)은 *P. marinus*에 대한 다중 또는 단일 항체를 개발하였으나 항원 제조시 이용된 항원 단백질에만 반응하는 항체의 특성에 따라 기생충의 생활사 중 특정 단계의 기생충만을 검출할 가능성이 있고, 기존의 병리조직학적 방법 및 FTM 방법과 마찬가지로 종 특이성이 결여된 진단방법이라는 문제점이 제기되었다. 이 같은 문제점을 보완하기 위하여 Robledo et al. (1998)은 *P. marinus*에 특이적인 PCR (Polymerase chain reaction)-probe를 개발함으로써 분자생물학적 기법에 의한 종 특이적이며 생활사에 관계없이 신속하게 진단 할 수 있는 *Perkinsus* 진단 기술을 개발 하였다. *Perkinsus*는 빠른 전염성과 높은 치사율 때문에 국제수역사무국(OIE, Office International Des Epizooties)은 *Perkinsus*에 감염된 수산물의 국제 간 교역을 금하고 있으며, 우리나라에서도 이식 및 관상용 수산물의 병·충해 검사와 관련하여 해양수산부는 1999년부터 수·출입 이전 *Perkinsus*의 검사를 의무화하고있다. 따라서 바지락포자충에 대한 신속하고도 종 특이적이며 민감도 높은 진단기술의 개발이 시급한 실정이다.

이 연구는 바지락에 분포하는 *Perkinsus*의 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단하기 위하여 PCR을 이용한 진단 기술을 개발 보고하고자 한다. 또한 PCR probe의 정확도 및 민감도를 확인하기 위하여 기존의 RFTM과 2M NaOH 진단방법을 병행하여 바지락포자충의 감염을 진단 보고하고자 한다.

Table 1. Primer sequences, predicted sizes of PCR Protocols A and B, and target species of *Perkinsus*. Y = C, T; R = A, G

Protocol	Primers (5' to 3')	Product size (bp)	Locus	Target species (Accession number)
A	AF: GAGATGGGATCYCCGCTTTGTTT AR: GAATCGCGTGATCRAGGAACACG	532	ITS 1, 2 5.8S rRNA	<i>P. marinus</i> (AF149876), <i>P. atlanticus</i> (AF140295), <i>P. olseni</i> (U07701), and <i>P. andrewsi</i> (AF102171)
B	BF: CATTATCGAGGTCTGTGGTGACG BR: ACGATAGGTCTGCTGAGCAAGC	661	NTS	<i>P. atlanticus</i> (AF140295)

재료 및 방법

1. 시료

이 연구에 사용된 바지락(*R. philippinarum*)은 전남 완도, 제주 성산, 제주 서귀포, 제주 김녕 등지에서, 대조 생물로 쓰인 꼬막(*Tegillarca granosa*)는 전남 강진에서 채집하였다. DNA 분석을 위하여 각 개체는 멸균된 채집 도구와 용기를 이용하여 개별적으로 채집 및 보관되었다. 또한 개발된 PCR probe의 positive control로 *Perkinsus* trophozoite를 *in vitro* 상태로 배양하였다. 이를 위하여 Ordas and Figueras (1998)의 방법에 따라 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Ham's F-12 (1:2)에 HEPES buffer와 Foetal Bovine Serum (FBS)을 첨가하여 배양액을 제조하였다. *Perkinsus*의 trophozoite는 바지락의 혈림프액(Hemolymph)에서 추출하였으며, 이를 배양액에 접종한 후 25°C 멸균 상태에서 배양하였다. 림프액은 현재 바지락포자충의 감염도가 가장 높은 지역 중의 하나로 알려진 완도 지역에서 채집된 바지락에서 추출하였다.

2. Primer design

바지락포자충의 primer는 Table 1과 같이 Protocol A와 B로 구분하였으며, Protocol A는 *Perkinsus* 속에 속하는 4종(*P. marinus*, *P. atlanticus*, *P. olseni*, *P. andrewsi*)의 internal transcribed spacer-1, 2(ITS-1, 2)와 5.8S rRNA를 비교하여 동질성이 가장 높은 부분에서 universal primer set을 선택하였다. Protocol B는 *P. atlanticus*의 nontranscribed spacer(NTS)내 *P. atlanticus*에 특이적인 부분을 증폭하도록 제작하였다.

3. DNA 추출

PCR probe를 이용한 바지락포자충의 감염을 진단하기 위하여 각 바지락과 꼬막의 아가미 25 mg과 *in vitro*

배양된 *Perkinsus* sp. trophozoite를 멸균된 기구를 이용하여 취한 후 DNA 분리 kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 한편, 실험에 이용된 바지락의 잔여 아가미 조직과 꼬막 조직은 바지락포자충의 감염 여부를 확인하기 위하여 FTM 분석 및 Choi's 2M NaOH 진단에 이용하였다.

4. PCR

PCR 반응액은 50 µl 당 5 µl의 reaction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 1% Triton x-100), 200 µM dNTP, 1 µM의 primer, 0.5 µl의 Taq DNA polymerase (Promega, Madison, Wisconsin), 200 ng µl의 DNA template를 첨가하여 제작하였다. PCR은 MiniCycler™ (MJ Research, MS, USA)을 이용하였으며, 94°C에서 2분간 denaturation, 52°C에서 1분간 primer annealing, 72°C에서 1분간 DNA extension의 cycle로 30회 반복시키고 최종 72°C에서 5분간 extension시켰다. PCR 생성물은 1%의 agarose에 ethidium bromide를 0.5 µg ml⁻¹의 농도가 되도록 첨가한 후 전기영동하여 확인하였다.

5. Ray's FTM 및 2 M NaOH에 의한 *Perkinsus* 감염 진단

바지락 및 대조 생물의 *Perkinsus* 감염 여부를 PCR probe에 의한 진단과 비교하기 위하여 Ray의 FTM 방법을 적용하였다(Ray 1952). 이를 위하여 DNA 분석에 이용된 아가미를 제외한 모든 조직을 FTM 배양액에 투입하여 실온의 암실에서 일주일간 배양하였다. 감염 여부는 FTM에서 배양된 조직을 Lugol's iodine에 염색한 뒤 현미경 하에서 Mackin의 감염도(Mackin's infection scale, Mackin 1962)에 따라 감염 정도를 구분하였으며, 현미경 검사가 완료된 시료는 2 M NaOH 용액에 넣어 50°C에서 30분간 처리한 후 원심분리하여 용액을 제거하고 현미경을 이용하여 바지락포자충의 유무를 확인하였다(Choi *et al.* 1989).

Table 2. Diagnosis of *Perkinsus* sp. using FTM and PCR Protocol A and B (+ positive infection, - negative infection).

Clam	<i>T. granosa</i> (Negative control)				<i>In vitro Perkinsus</i> sp. (Positive control)				Gimnyeong			
	Mackin's scale	NaOH	PCR-A	PCR-B	PCR-A	PCR-B	Mackin's scale	NaOH	PCR-A	PCR-B		
1	0	-	-	-	+	+	0	-	-	-		
2	0	-	-	-	+	+	0	-	-	-		
3	0	-	-	-	+	+	0	-	-	-		

Clam	Sogwipo				Sungsan				Wando			
	Mackin's scale	NaOH	PCR-A	PCR-B	Mackin's scale	NaOH	PCR-A	PCR-B	Mackin's scale	NaOH	PCR-A	PCR-B
1	0	-	-	-	2	+	+	+	3	+	+	+
2	0	-	-	-	2	+	+	+	4	+	+	+
3	0	-	-	-	3	+	+	+	5	+	+	+

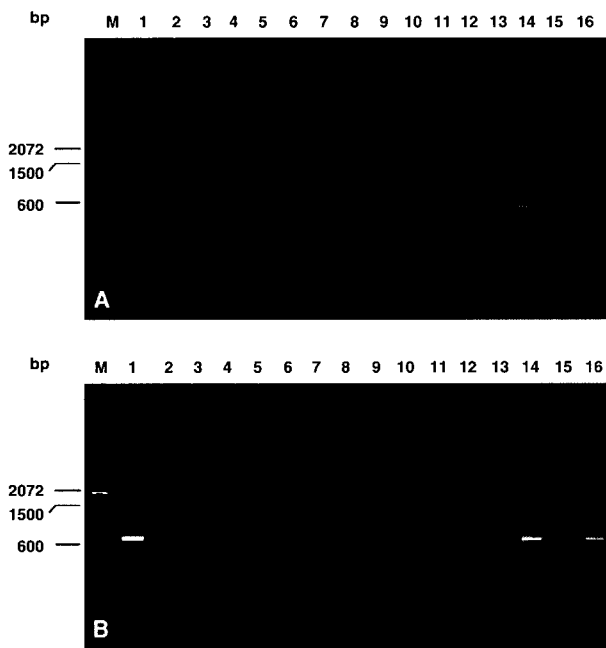


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of amplified products of the PCR-based diagnostic assay for *Perkinsus*. A: PCR amplification in the ITS and 5.8S rRNA regions of *Perkinsus*. Lanes; M, molecular weigh marker (100-bp ladder); 1-*in vitro* cultivated *Perkinsus* sp.; 2-4, *T. granosa*; 5-7, Manila clams from Gimnyeong; 8-10, Manila clams from Sogwipo; 11-13, Manila clams from Sungsan; 14-16, Manila clams from Wando Island. B: PCR amplification in the NTS region of *Perkinsus* sp. Lanes; M, molecular weigh marker (100-bp ladder); 1-*in vitro* cultivated *Perkinsus* sp.; 2-4, *T. granosa*; 5-7, Manila clams from Gimnyeong; 8-10, Manila clams from Sogwipo; 11-13, Manila clams from Sungsan; 14-16, Manila clams from Wando Island.

결 과

Fig. 1과 Table 2는 PCR을 이용하여 해산 연체동물에 기생하는 *Perkinsus* 속에 속하는 종과 *P. atlanticus*를 특이적으로 진단한 결과를 보여주고 있다. Protocol A를 이용한 분석 결과, 예상된 532 bp의 증폭된 band가 전남 완도산, 제주 성산산 바지락에서 나타났다. 또한 *in vitro* 배양된 바지락포자충에서도 동일한 크기의 DNA band가 확인되었다. 그러나 대조구로 이용된 꼬막과 제주 서귀포산, 제주 김녕산 바지락에서는 band가 확인되지 않았다(Fig. 1-A, Table 2). Protocol B의 경우 그 크기가 661 bp로 증폭된 DNA가 전남 완도산, 제주 성산산 바지락과 *in vitro* 배양된 바지락포자충에서 확인되었으나, 대조구인 꼬막과 제주 서귀포산, 제주 김녕산 바지락에서는 나타나지 않았다(Fig. 1-B, Table 2). 즉 PCR을 이용한 바지락포자충 진단 결과는 Protocol A와 B가 동일하였다.

Fig. 2는 FTM에서 배양된 바지락포자충의 휴면포자(hypospores)로 Lugol's iodine에 염색되어 검은색이나 갈색을 띠어 바지락 육질부와 쉽게 구분되었다. Mackin's scale을 이용한 감염도 측정 결과 전남 완도산 바지락의 감염도가 3~5로써 바지락 조직의 25~100%가 바지락포자충에 덮혀 있으며 이는 감염도가 매우 중함(heavy)을 의미하였다(Fig. 2-A, Table 2). 제주 성산 바지락의 경우, 감염도는 2~3을 나타내 바지락포자충 휴면포자가 1cm² 당 125개체 이상 바지락 조직의 25% 미만이 바지락포자충에 덮혀 있었으며 중간정(moderate)의 감염도를 의미하였다. 그러나 대조구인 꼬막이나 제주 서귀포, 제주 김녕산 바지락의 경우 바지락포자충이 관찰되지 않았다(Table 2). 2M NaOH를 이용한 진단 역

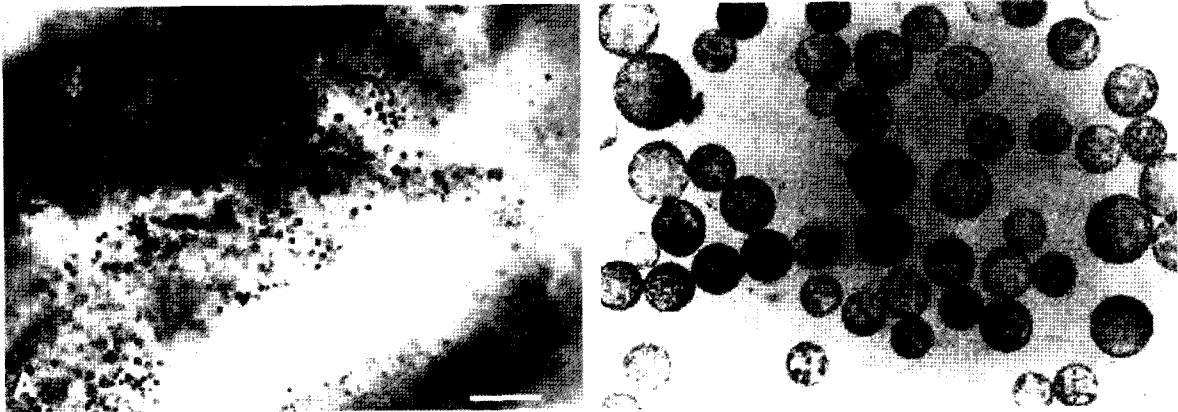


Fig. 2. *Perkinsus* hyhnospores incubated in FTM. A: Hyhnospores stained with Lugol's iodine (bar = 1 mm, 40 \times); B: Hyhnospores purified using the 2 M NaOH method (bar = 100 μ m, 200 \times).

시 FTM 기법에서 양성 판정을 받은 개체들에서만 바지락포자충 휴면포자가 현미경 하에서 확인되었다(Fig. 2-B).

고 찰

이 연구에서는 해산 연체동물에 서식하는 기생성 원생동물인 바지락포자충 *Perkinsus*의 감염을 신속하고 종 특이적이며 민감도가 높은 방법으로 진단할 수 있도록 DNA PCR을 통한 진단 기술을 개발하고 이를 기존의 진단 기법인 FTM과 2 M NaOH 방법과 병행하여 실시하였다. 기생생물에 의한 질병연구에 있어 우선적으로 선행되어야 할 과제는 해당 기생생물의 생활사에 대한 기초적인 연구이다. *Perkinsus*의 경우 숙주 내에서는 영양체 단계(trophozoites 또는 schizogony)로 존재하며, 이 분법에 의해 증식한다. 이때 숙주에 의한 방어 기작의 일환으로써 영양체 주변에 다수의 혈구가 집중된 결절이 관측되기도 한다. 한편 숙주가 사망함으로써 조직이 분해되어 무산소 상태가 형성되면 성숙한 영양체는 그 크기가 증가되면서 휴면포자 단계(hyhnospore 또는 prezoosporangia)가 되며, 이후 해수에 유리되면 유주자 단계(zooospore)가 되어 해수 중으로 방출되면서 유영생활을 하는데, 이 때 다른 숙주를 감염시키는 것으로 알려져 있다(Mackin and Boswell 1956; Auzoux-Bordenave *et al.* 1995). 새로운 숙주로 전이된 유주자는 편모와 apical complex가 소실되면서 다시 미숙한 영양체로 변이되는 것으로 추정되고 있다(Perkins 1996).

이와 같은 생활사의 특성을 이용하여 현재까지 개발된 *Perkinsus* 진단 방법으로는 병리조직학적 방법, FTM에 의한 hyhnospore 형성 방법, 항체를 이용한 면역진

단 방법, 그리고 DNA probe를 이용한 진단 방법 등이 이용되고 있다. 이들 방법 중 가장 보편적으로 *Perkinsus* 감염 진단에 이용되는 방법은 조직병리학적 방법과 FTM 방법이다. 조직병리학적 방법을 이용하면 영양체 단계의 *Perkinsus*를 현미경을 이용하여 진단할 수 있으며 이 단계에서 *Perkinsus*의 형태적 특징인 세포내 공포와 핵 및 초 미세 구조(Perkins 1996) 등을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 세포학적인 숙주의 반응기작 등을 관찰할 수 있다(Choi *et al.* 1998; Park 1999; Lee *et al.* 2001). 한편 FTM 방법은 thioglycollate가 함유된 배양액을 무산소 환경에서 시료를 배양시켜 각기 다른 생활사의 기생충을 휴면포자 단계로 유도한 후 iodine으로 염색한 후 현미경을 이용하여 진단하는 기술이다(Stein and Mackin 1957; Fisher and Oliver 1996). Mackin (1962)은 iodine 염색 후 염색 정도를 판단함으로써 반정량적(semi-quantitative) 감염도를 측정하는 기술을 개발하였으며, Choi *et al.* (1989)은 2 M NaOH를 이용하여 숙주의 조직을 제거하고 *Perkinsus*를 순수 분리한 후 현미경을 이용하여 계수함으로써 정량적인 감염도 측정을 가능케 하였다. 2 M NaOH 방법은 순수 분리된 *Perkinsus*를 원심분리하여 농축시킨 후 현미경을 이용하여 검사하므로 일반적인 FTM 진단 방법보다 민감도가 높은 것으로 보고되고 있다(Rodriguez and Navas 1995).

최근 들어 Liang *et al.* (2001)과 Park and Choi (2001)는 2 M NaOH 방법을 이용하여 중국 발해만 연안과 우리나라 전 연안에서 서식하는 바지락에서 *Perkinsus*를 검출하여 계수함으로써 각 지역별 감염도를 객관적으로 비교할 수 있게 되었으며, Choi *et al.* (in press)은 일본 Ariake 만에 서식하는 바지락의 각 부위별 감염도를 조

사하여 최적의 진단 부위를 제시한 바 있다. 이 같이 Choi의 2 M NaOH 방법은 현재까지 유일하게 정량적으로 *Perkinsus*를 진단하는 방법으로써 그 응용 분야가 확대되고 있다. 하지만 상기 방법들은 *Perkinsus* 내 종 특이성 (species-specificity)이 결여되어 있는 진단법이라는 문제점이 있으며 (Robledo *et al.* 1998), 특히 일부 편조류인 *Alexandrium* sp., *Ceratium lineatum*, *Hercapsa niei*, *Gyrodinium* spp., *Gymnodinium* spp. *Protoperdinium* spp., *Scropsiella* spp.가 FTM에 의하여 가양성 (false-positive)으로 진단된다는 보고가 있다 (Almeida *et al.* 1999). 이와 같은 단점을 보완하기 위하여 단일 항체 또는 다중 항체를 이용한 진단법이 개발되었으나 항체는 항원 단백질에만 반응하므로 기생생물의 생활사에 따른 단백질의 변화가 있을 경우 검출하지 못하는 단점이 있을 수 있으며 (Choi *et al.* 1991), FTM 방법과 마찬가지로 각 *Perkinsus* 종간 교차반응이 관찰됨으로써 종 특이적인 진단이 불가능한 것으로 보고되고 있다 (Dungan and Roberson 1993; Romestand *et al.* 2001). Robledo *et al.* (1998)는 PCR을 이용하여 *P. marinus*를 특이적으로 진단하는 방법을 개발하였으며, 이때 민감도는 약 20% 정도 FTM 방법보다 우수함을 보고한 바 있어 종 특이적이며 민감도를 향상시킨 방법으로 평가되고 있다.

이 연구에 이용된 PCR 기법은 최근 분자생물학의 발달과 더불어 미생물이 가진 특이 유전자를 이용하여 진단함으로써 특히 신속하고 고도로 민감하며 특이적으로 진단 할 수 있기 때문에 질병 진단분야에서 널리 사용되고 있는 방법이다 (Ryu *et al.* 1995). 이 기법을 이용하기 위해서는 먼저 적절한 primer가 제작되어야 한다. 이 연구에서는 *Perkinsus* 속 4종의 ITS 1, 2와 5.8S rRNA 중 일부를 공통적으로 증폭시킬 수 있는 primer를 제작함으로써 숙주내에 기생하는 *Perkinsus*의 감염을 보다 폭 넓게 진단하고자 하였으며, 또한 *P. atlanticus*에 특이적인 primer를 NTS에서 제작함으로써 종 단위의 진단도 가능하도록 하였다. 분석 결과 PCR protocol A와 B에 의해 증폭된 밴드가 확인됨으로써 우리나라 바지락에서 검출되는 바지락포자충은 유럽산 바지락의 폐사 원인 생물인 *P. atlanticus*과 동일종인 것으로 여겨진다.

우리나라 바지락에서 발견된 바지락포자충의 분류학적 위치에 관하여 Park *et al.* (in preparation)은 숙주 특이성과 형태적 특성 등을 근거로 *P. atlanticus*와 분류적으로 동일종이거나 근연종일 것으로 보고한 바 있으며, Hamaguchi *et al.* (1998) 또한 일본 히로시마와 구마모토 연안의 바지락에서 발견된 *Perkinsus* sp.에 대한 DNA 염기서열 분석을 실시하여 *P. atlanticus*와 매우 유사한

것으로 보고한 바 있다. 한편 Park *et al.*은 우리나라 완도산 바지락에서 분리한 *Perkinsus* sp.의 genomic DNA 내 NTS, ITS-1, 5.8S rRNA, ITS-2의 염기서열을 분석하여 *P. atlanticus*로 보고함에 따라 우리나라 바지락에서 검출되는 바지락포자충의 분류학적 위치가 규명되었다 (GenBank 기탁번호: AF438150, AF473840).

PCR 기법을 이용한 바지락포자충 진단 결과 대조구와 제주도 서귀포산, 제주도 김녕산 바지락을 제외한 전 시료에서 양성감염을 나타내는 밴드가 확인됨으로써 *in vitro* 배양된 *Perkinsus*의 trophozoite와 전남 완도산 바지락, 제주도 성산산 바지락이 바지락포자충에 감염되어 있음이 확인되었다. 한편 동시에 실시된 FTM과 2 M NaOH 기법 역시 대조구로 이용되었던 꼬막과 제주 서귀포산, 제주 김녕산 바지락을 제외한 모든 시료에서 바지락포자충이 확인됨으로써 PCR과 동일한 검출결과를 나타냈다. 따라서 본 조사에서 개발된 PCR 진단 기술은 기존의 바지락포자충 진단 기법과 함께 바지락포자충 진단에 이용될 수 있는 것으로 판단되었다. 한편 이 조사 결과는 Park and Choi (2001) 및 Choi *et al.* (2000)의 보고 결과와 일부 상이하게 나타났다. 이들의 조사 결과에 의하면 제주 서귀포 지역의 바지락포자충 감염률은 14~70%인 것으로 보고되었으나 본 조사에서는 모두 음성으로 나타났다. 이는 본 조사에 이용된 시료의 수가 충분하지 못한 점과 계절에 따른 감염의 변이가 원인으로 사료된다. 수온과 염분은 바지락포자충의 발현에 있어 주된 환경인자로 알려져 있으며 최근 바지락 서식 지역의 저질 특성과도 연관이 있는 것으로 추정됨에 따라 채집시기에 따른 물리적 환경 변화에 의해 바지락포자충의 감염률 변화가 본 조사결과에 영향을 미쳤을 가능성도 제기 된다 (Ahn and Kim 2001; Park and Choi 2001). 한편, 제주 김녕 연안에 서식하는 바지락은 1997년과 2000년 FTM 방법에 의해 실시된 조사와 마찬가지로 PCR을 이용한 본 조사에서도 바지락포자충 비 감염 지역으로 판정됨에 따라 바지락포자충의 생태학적 특성을 비교 연구하는데 중요한 지역으로 확인되었다 (Choi and Park 1997; Park and Choi 2001).

적 요

이 연구에서는 해산 연체동물의 폐사를 유발하는 기생성 원생동물인 *Perkinsus*를 신속하고 특이적으로 검출하기 위하여 PCR 진단법을 개발하였다. 이를 위해 *Perkinsus* 속 4종을 공통적으로 증폭하거나 *P. atlanticus*만을 특이적으로 증폭할 수 있는 두 가지의 primer

를 제작 하였다. PCR 분석은 기존 *Perkinsus* 진단법인 fluid thioglycollate medium (FTM) 방법과 2 M NaOH 기법을 병행하여 실시하였다. 실험구로서 전라남도 완도산, 제주도 김녕산, 제주도 서귀포산, 제주도 성산산 바지락과 *in vitro* 배양된 바지락포자충이 이용되었으며, 대조구로서 전라남도 강진에서 채집된 꼬막, *T. granosa*를 사용하였다. 실험 결과 *Perkinsus* 특이성 DNA band가 전남 완도산과 제주도 성산산 바지락, *in vitro* 배양된 바지락포자충에서 확인되었으나, 대조구였던 꼬막과 제주도 서귀포산, 제주도 김녕산 바지락에서는 나타나지 않았다. 이 같은 진단 결과는 FTM과 2 M NaOH 진단 결과와 일치하였다. 한편 *P. atlanticus*에 특이적인 primer에 의해 증폭된 band가 확인됨에 따라 국내산 바지락에서 검출되는 바지락포자충은 *P. atlanticus*와 동일 종임이 확인되었다. 결론적으로, 본 연구를 통하여 개발된 PCR을 이용한 진단법은 해산 연체동물내 *Perkinsus* 속 기생충과 *P. atlanticus*의 감염을 신속하고도 종 특이적으로 진단할 수 있어 수·출입 수산물의 검역과 바지락포자충의 생태학적 특성을 규명하는데 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 연구는 제주대학교 해양과학대학에 지원된 한국학술진흥재단의 BK21 지역우수대학 사업의 지원으로 이루어졌습니다. 또한 공동 저자인 박영미는 제주대학교 BK21 연구조교 프로그램의 지원을 받았으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Ahn K-J and K-H Kim. 2001. Effect of temperature and salinity on *in vitro* zoosporulation of *Perkinsus* sp. in Manila clams *Ruditapes philippinarum*. Dis. Aquat. Org. 48:43-46.
- Almeida M, F Berthe, A Thebault and MT Dinis. 1999. Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. Aquaculture. 177:325-332.
- Andrews JD. 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in the Chesapeake Bay 1950-1984. J. Shellfish Res. 15:13-16.
- Auzoux-Bordenave S, AM Vigarario, F Ruano, I Domart-Coulon and D Doumenc. 1995. *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. J. Shellfish Res. 14:469-475.
- Azevedo C. 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. J. Parasitol. 75:627-635.
- Blackbourn J, SM Bower and GR Meyer. 1998. *Perkinsus gugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yesoensis*, cultured in British Columbia, Canada. Can. J. Zool. 76:942-953.
- Burreson EM and L Ragone Calvo. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. J. Shellfish Res. 15:171-34.
- Bushek D, SE Ford and SK Allen Jr. 1994. Evaluation of methods using Ray's thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Ann. Rev. Fish Dis. 4:201-217.
- Cavalier-Smith T. 1999. Zooflagellate phylogeny and the systematics of protozoa. Biol. Bull. 196:393-396.
- Chagot D, M Comps, V Boulo, F Ruano and H Grizel. 1987. Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. Aquaculture. 67:260-261.
- Choi D-L, J-N Kwon and S-W Park. 1998. Infection and rapid detection of *Perkinsus* sp. in cultured babyneck clam, *Ruditapes philippinarum* from western coast of Korea. J. Fish Pathol. 11:69-76.
- Choi K-S and K-I Park. 1997. Report on occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. Korean J. Aquacult. 10:227-237.
- Choi K-S, DH Lewis, EN Powell, PF Frelrier and SM Ray. 1991. A polyclonal antibody developed from *Perkinsus marinus* hypnospores fails to cross-react with other life stages of *P. marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) tissues. J. Shellfish Res. 10:411-415.
- Choi K-S, EA Wilson, DH Lewis, EN Powell and SM Ray. 1989. The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. J. Shellfish Res. 8:125-131.
- Choi K-S and K-I Park. 2001. Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in West Ariake Sound, Japan. J. Shellfish Res. (in press)
- Coss CA, JA Robledo, GM Ruiz and GR Vasta. 2001. Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from

- the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay, *J. Eukaryotic Microbiol.* 48:52-61.
- Crosby MP and CF Roberts. 1990. Seasonal infection intensity cycle of the parasite *Perkinsus marinus* (and an absence of *Haplosporidium* spp.) on oysters from a South Carolina salt marsh. *Dis. Aquat. Org.* 9:149-155.
- Dungan CF and BS Roberson. 1993. Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Dis. Aquat. Org.* 15:9-22.
- Figueras A, G Lorenzo, MC Ordas, M Gouy and B Novoa. 2000. Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene of *Perkinsus atlanticus*-like isolated from Carpet shell clam in Galicia, Spain. *Mar. Biotechnol.* 2:419-428.
- Fisher WS and LM Oliver. 1996. A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J. Shellfish. Res.* 15:109-117.
- Hamaguchi M, N Suzuki, H Usuki and H Ishioka. 1998. *Perkinsus* protozoan infection in Short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. *Fish Pathol.* 33: 473-480.
- Kinne O. 1983. Diseases of marine animals. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.
- Korea Fisheries Association. 2000. Korean Fisheries Yearbook. Korea Fisheries Association, Seoul, Korea.
- Krantz GE and SJ Jordan. 1996. Management alternatives for protecting *Crassostrea virginica* fisheries in *Perkinsus marinus* enzootic and epizootic areas. *J. Shellfish Res.* 15:167-176.
- Levine ND. 1978 *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan Phylum Apicomplexa. *J. Parasitol.* 64: 549.
- Lee M-K, B-Y Cho, S-J Lee, J-Y Kang, H-D Jeong, S-H Huh and M-D Huh. 2001. Histopathological lesions of Manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. *Aquaculture.* 201:199-209.
- Liang YB, XC Zhang, LI Wang, B Yang, Y Zhang and CL Cai. 2001. Prevalence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* along northern coast of Yellow Sea in China. *Oceanol. Limnol. Siniga.* 32:502-511.
- Mackin JG. 1962. Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas* 7:132-229.
- Mackin JG and JL Boswell. 1956. The life cycle and relationships of *Dermocystidium marinum*. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 46:112-115.
- Noren F, φ Moestrup, A-S Rehnstam-Holm. 1999. *Parvilucifera infectans* Noren et Moestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *Eur. J. Protistol.* 35: 233-254.
- Ordas MC and A Figueras. 1998. In vitro culture of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus*. *Dis. Aquat. Org.* 33:129-136.
- Ordas MC, A Ordas, C Beloso and A Figueras. 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 597-609.
- Park K-I. 1999. Occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and development of diagnostic methods. M.Sc. thesis, Cheju National University.
- Park K-I and K-S Choi. 2001. Spatial distribution and infection intensity of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Aquaculture.* 203:9-22.
- Park K-I, Choi K-S and Choi J-W. 1999. Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Komsoe Bay, Korea. *J. Korean Fish. Soc.* 32:303-309.
- Perkins FO. 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on the taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *J. Shellfish Res.* 15:67-87.
- Ray SM. 1952. A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier in Oyster. *Science.* 116:360-361.
- Ray SM and JG Mackin. 1954. Studies of pathogenesis of *Dermocystidium marinum*. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 45:164-167.
- Robledo JAF, JD Gauthier, CA Coss, AC Wright and GR Vasta. 1998. Species-specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycollate assay. *J. Parasitol.* 84:1237-1244.
- Rodriguez F and JI Navas. 1995. A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture.* 132:145-152.
- Romestand B, J Torrelles and P Roch. 2001. Production of monoclonal antibodies against the Protozoa, *Perkinsus marinus*: estimation of parasite multiplication in vitro. *Aquat. Living Resour.* 14:351-357.
- Ryu P-Y, Chung J and Oh J-S. 1995. Polymerase chain

- reaction of mycobacterial DNA by FTC-2000 capillary PCR machine. *J. Korean Soc. Microbiol.* 30:415-424.
- Siddall ME, KS Reece, JE Graves and EM Burreson. 1997. 'Total evidence' refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology.* 115: 165-176.
- Stein JE, JG Mackin. 1957. An evaluation of the culture method used in determining the intensity of *Dermocystidium marinum* infection in the oyster *Crassostrea virginica*. Texas A & M Res. Found. Project 23, Tech. Rept. 22:1-5.
- Sunila I, RM Hamilton and CF Dungan. 2001. Ultrastructural characteristics of the in vitro cell cycle of the protozoan pathogen of oysters, *Perkinsus marinus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:348-361.
- Wilson EA, EN Powell, M Alison Craig, TL Wade and JM Brooks. 1990. The distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf coast oysters: Its relationship with temperature, reproduction and pollutant body burden. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 75:533-550.

(Received 5 March 2002, accepted 11 April 2002)