

<Note>

양식동남아산 뱀장어 (*Anguilla bicolor pacifica*)의 *Heterosporis anguillarum* 감염

김진도 · 도정완 · 최혜승 · 조혜인 · 이남실¹ · 김영대^{2,*}

국립수산과학원 병리연구과, ¹국립수산과학원 전략연구단, ²한국수산자원관리공단

The Infection of *Heterosporis anguillarum* in Cultured Shortfin Eel (*Anguilla bicolor pacifica*)

Jin-Do Kim, Jeong-Wan Do, Hye-Sung Choi, Hye-in Jo,
Nam-Sil Lee¹ and Young-Dae Kim^{2,*}

Pathology Division, Aquaculture Research Institute,
National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-705, Korea

¹New strategy Research Center, NFRDI, Busan, Korea

²Korea Fisheries Resource Agency, Western Branch, Gunsan 573-030, Korea

Abstract - Shortfin eel (*Anguilla bicolor pacifica*) is a species of commercial importance and its production is greatly affected due to the infection by *Heterosporis anguillarum*. In this study, we evaluated the effect of *H. anguillarum* infection on the growth of Shortfin eel. A disease that trunk muscle of cultured shortfin eel, *Anguilla bicolor pacifica*, were irregular and resulted in death, breakout of the commercial eel culture farm.

We observed that the trunk muscle of infected eels were irregular and represented white or yellowish externally. Histopathologically, a great numbers of large or small spores and sporophorocysts were also observed in degenerated muscle layer.

The cloning of specific gene of *H. anguillarum*, encoding small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA) was amplified by the polymerase chain reaction(PCR) from the muscle lesion of diseased eel. The size of clone gene is well matched with the size of small subunit ribosomal RNA of *H. anguillarum* and thus confirming the infection by *H. anguillarum*.

Key words : eel, *H. anguillarum*, histological change, small subunit ribosomal RNA(SSU-rRNA)

서 론

국내에서 양식되고있는 극동산 뱀장어 (*Anguilla japonica*) 종묘의 어획량이 최근에 남획으로 인해 감소하였다. 이에 뱀장어 양식업계에서는 대체품종으로서 동남아 지

역에서 수집되는 *Anguilla bicolor bicolor*, *A. bicolor pacifica* 및 *A. marmorata*의 실뱀장어를 수입하여 양식을 하였다. 그러나 이들은 극동산과는 다른 생태적 특성을 지니고 있어 사육초기에 감모가 많이 발생하여 손실이 크다.

양식어업인 및 연구자들이 여러 방면의 사육기술개발 및 질병 예방 등에 많은 노력을 기울이고 있으며, 동남아산 뱀장어의 질병에 관한 연구로는 Anguillid herpesvirus에 관한 보고 외에 아직 국내에서는 이에 관한 연구 자

* Corresponding author: Young-Dae Kim, Tel. 010-2616-3981,
Fax. 063-443-3934, E-mail. kyd@fira.or.kr

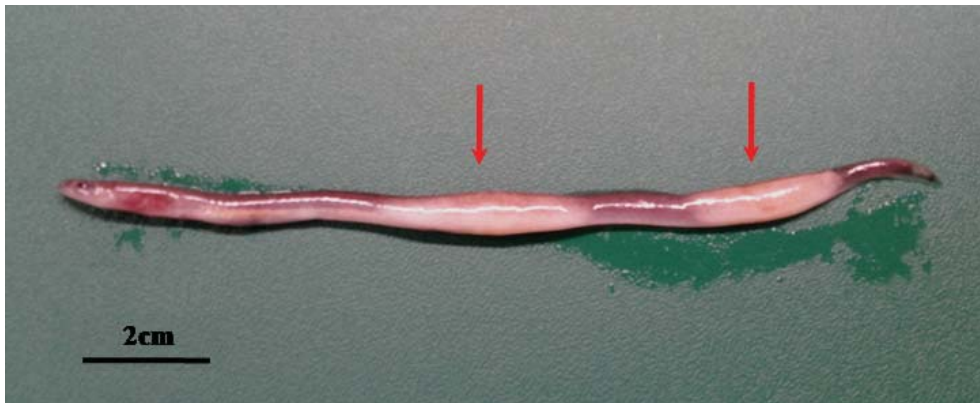


Fig. 1. The young eel, *A. bicolor pacifica*, infected with *H. anguillarum*.

료가 없다 (Park *et al.* 2012).

뱀장어에 나타나는 일명 “요철병”이라고 불리는 질병은 근육 내에 미포자충인 *H. anguillarum*이 감염되어 몸쪽 근육에 요철현상을 발생시킨다 (Kim *et al.* 2006). 이 포자충에 감염된 뱀장어는 성어에서는 폐사율은 낮으나 근육에 생긴 요철현상 때문에 상품가치가 저하되며, 치어에서는 만성적으로 나타나서 폐사율이 높다 (Park and Oh 2011).

본 질병은 1930년대에 일본의 노지 양만장에서 사육 중이던 유럽산 뱀장어에서 최초로 발견되었으며, 원인충은 *Plistophora anguillarum*으로 보고되었다 (Hoshina 1951). 이후 *H. anguillarum*으로 명명되게 되었다 (Lom and Dykova 1992, 2002).

뱀장어 (*A. japonica*)에서는 전자현미경적 관찰 (Hashimoto and Takinami 1976; Lom *et al.* 2000), 병리조직학적 변화 (Suh and Chun 1988), 자연감염 (Joh *et al.* 2007) 등에 관한 보고가 있다.

본 연구는 동남아산 뱀장어에 감염되어 폐사를 일으킨 미포자충인 *H. anguillarum*임을 확인하고, 감염어의 병리조직학적 변화 및 분자생물학적 동정을 실시하였다.

재료 및 방법

병어의 채집은 사육 중이던 10 cm 전후의 뱀장어 치어가 몸통 근육이 함몰되어 요철현상을 나타내면서 하루에 10마리 이상의 폐사개체가 나타난 뱀장어 양식장으로부터 증상이 심한 개체를 무작위로 채집하였다. 증상을 나타내는 병어는 수면 위를 힘없이 유영하다가 순환여과식 수조의 찌꺼기 수거장치에 주로 모여 있어 이들을 수시로 쉽게 채집할 수 있었다. 또한 채집된 대부분의 시료어

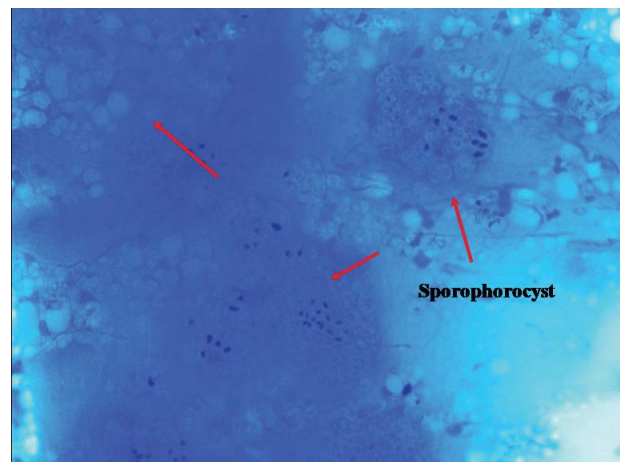


Fig. 2. The small or large spore stained with Löffler's methylene blue solution.

는 육안적으로 관찰하였을 때 몸통부위의 요철현상이 심하게 나타났다 (Fig. 1). 이들 몸통부위 근육에 이상이 있다고 판단된 10마리의 뱀장어 치어를 채집하여 개체별로 근육의 요철부위만을 메스를 사용하여 잘라서 Homogenizer로 마쇄하였다. 그 마쇄액을 면봉으로 취하여 슬라이드 글라스에 도말, 고정한 후, Löffler's methylene blue 액으로 2분간 염색하였다. 염색된 슬라이드 표본으로 광학현미경 200배 배율 하에서 포자충을 확인하였다. 또한 병어의 근육조직 내에 조직학적 병화를 관찰하기 위해 실험어로부터 조직을 절취하여 Bouin액에 고정한 다음, 상법에 따라 파라핀으로 포매된 조직을 5~7 μm 두께로 연속절편하고, H-E 대비염색하여 광학현미경으로 관찰하였다 (Zeiss, Germany).

감염이 확인된 포자충의 동정을 위해서는 이전의 보고된 논문을 참고로 하여 *H. anguillarum*이 공통적으로 가

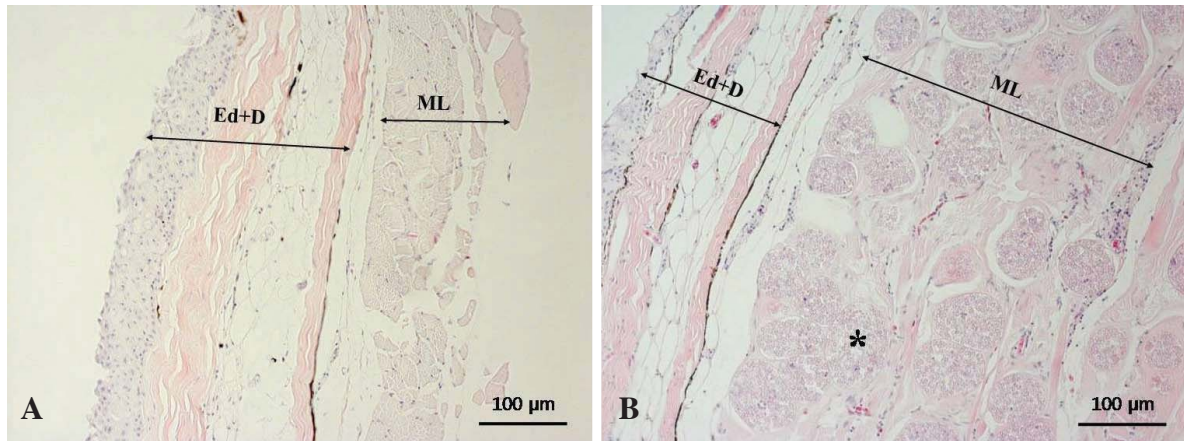


Fig. 3. The normal (A) and abnormal (B) histological features in skin and muscle of sampled eel, *A. bicolor pacifica*. Ed+D: epidermis+dermis, ML: muscle layer, *: the largest sporophorocyst.

지는 유전자인 SSU-rRNA를 증폭하기 위해 primer를 제작하여 동정을 진행하였다(Hung *et al.* 1998).

감염된 뱀장어의 근육조직 50 µg과 DEPC 300 µL를 섞어서 Homogenizer로 마쇄한 후, 원심분리(8,000 rpm, 1 min)하여 상층액 100 µL를 DNA 추출에 이용하였다.

DNA의 추출은 Roche kit를 이용하였다. 먼저 상층액 100 µL에 Lysis buffer 200 µL, Proteinase K 40 µL를 넣어 55°C Heat block에서 1시간 동안 반응시키고 Binding buffer 200 µL를 분주하여 Vortex한 후 다시 72°C Heat block에 10분간 반응시켰다.

다음에 Isopropanol 100 µL 분주하여 충분히 섞어서 Column tube에 분주하여 8,000 rpm, 1분간 원심분리 한 후, 그 용출액은 제거하였다. 다시 새로운 튜브에 Column을 꽂고 Inhibitor Remover buffer 500 µL를 분주하여 원심분리(8,000 rpm, 1 min)한 후 Wash buffer 500 µL를 넣어 원심분리를 2회 반복하여 용출액은 제거하였다. E-tube에 Column을 꽂고 70°C에 예열된 Elution buffer 50 µL를 분주 후 원심분리(8,000 rpm, 1 min)를 진행하여 DNA Product를 얻었다. 이렇게 추출된 근육 조직의 DNA를 Template로 하여 Bioneer-PCR premix를 이용하여 PCR을 진행하였다. 실험에 사용된 primer는 다음과 같다.

18F(5'-CACCAGGTTTCATTCTGCC-3'),1537R:(5'-TTA TGATCCTGCTAATGGTTC-3')/V1:(5'-CACCAGGTTG ATTCTGCCTGAC-3'),1392R:(5'-GAGACGGGCGGTGT GTACAAAGAAC-3')/H1:(5'-ACTTAGACGAAGACGG GTACGG-3'),

H2:(5'-CACTHACCTHTTCTTHACCTTCC-3') 세가지 Set이며 PCR의 조건은 다음과 같다. 18F, 1537R Primer를 이용하여 94°C-2 min, /94°C-0.5 min, 50°C-0.5 min, 72

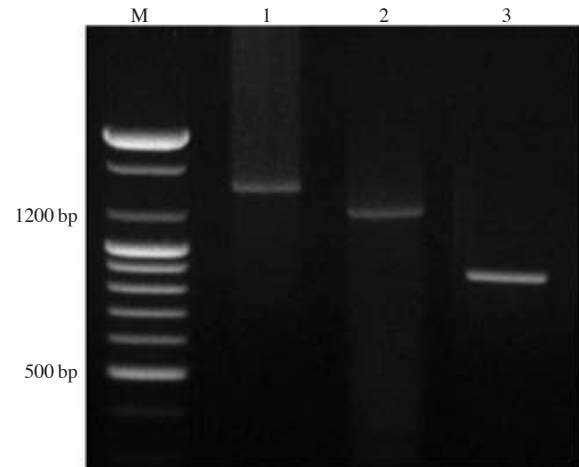


Fig. 4. PCR amplification of *H. anguillarum*-infected shortfin eel, *A. bicolor pacifica*. M: marker, Lane 1: primers 18F and 1537R, Lane 2: primers V1 and 1392R, Lane 3: primers H1 and H2 used PCR resulted.

°C-2 min, /72°C-5 min - 40 Cycles 조건으로 V1, 1392R과 H1 ,H2 Primer의 경우 94°C-2 min, /94°C-1 min, 55°C-1 min, 72°C-3 min, /72°C-5 min - 40 Cycles 의 조건으로 PCR을 진행한 후 1.2% Agarose gel에 PCR product를 로딩하여 확인하였다.

PCR product를 gel elution (Roche kit)한 후 pGEM-T Easy Vector에 Cloning하였으며 Plasmid Kit (Bioneer)를 이용하여 Plasmid를 추출하였다. 서열의 분석은 Solgent 사에 의뢰하였으며, 그 결과에 의해 *H. anguillarum* Small subunit ribosomal RNA gene (Gene bank Accession No. AB 623036)의 서열과 함께 Bioedit Clust W 프로그램을 이용하여 비교분석하였다.

Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	GTGGACGCTAGTCTCATAGGTTAAGCCATGCATGTGTAGGCGAAGCATT TTTGTGGAGCGG 59 -----AGCCATGCATGTGTAGGCGAAGCATT TTTGTGGAGCGG 37 -----AGCCATGCATGTGTAGGCGAAGCATT TTTGTGGAGCGG 37
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	CGGAAGGCTCAGTAACGGGCGTCTATTTGATCTTCTGAGACGGACAACCTCTGTAACCGG 119 CGGAAGGCTCAGTAACGGGCGTCTATTTGATCTTCTGAGACGGACAACCTCTGTAACCGG 97 CGGAAGGCTCAGTAACGGGCGTCTATTTGATCTTCTGAGACGGACAACCTCTGTAACCGG 97
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	AGGCCAATACGTCAAGGCACGGTTACCCCTGTGTGGTGGTGTGCCGAAAGCATTGCGCGG 179 AGGCCAATACGTCAAGGCACGGTTACCCCTGTGTGGTGGTGTGCCGAAAGCATTGCGCGG 157 AGGCCAATACGTCAAGGCACGGTTACCCCTGTGTGGTGGTGTGCCGAAAGCATTGCGCGG 157
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	AAGAGTAAGGAGCCATCCCATCAGTTAGTAAGTAGGGTAAGGGCCTACTTAGACGGAAGAC 239 -----AGAC 4 AAGAGTAAGGAGCCATCCCATCAGTTAGTAAGTAGGGTAAGGGCCTACTTAGACGGAAGAC 217 AAGAGTAAGGAGCCATCCCATCAGTTAGTAAGTAGGGTAAGGGCCTACTTAGACGGAAGAC 217 ****
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	GGGTACGGGGAATTGTGGTTTGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCAAGTCC 299 GGGTACGGGGAATTGTGGTTTGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCAAGTCC 64 GGGTACGGGGAATTGTGGTTTGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCAAGTCC 277 GGGTACGGGGAATTGTGGTTTGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCAAGTCC 277 *****
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	AAGGACAGCAGCAGGCGCGAAAATTACCGAAGCCTCCGGTGAAGGCGGTAGTAAGGAGAC 359 AAGGACAGCAGCAGGCGCGAAAATTACCGAAGCCTCCGGTGAAGGCGGTAGTAAGGAGAC 124 AAGGACAGCAGCAGGCGCGAAAATTACCGAAGCCTCCGGTGAAGGCGGTAGTAAGGAGAC 337 AAGGACAGCAGCAGGCGCGAAAATTACCGAAGCCTCCGGTGAAGGCGGTAGTAAGGAGAC 337 *****
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	GTGGAACCGATGAGGAGGTAAAGAATGCTCTGGTAAACAGGAGGTCAAGACTGGTGCCAGC 419 GTGGAACCGATGAGGAGGTAAAGAATGCTCTGGTAAACAGGAGGTCAAGACTGGTGCCAGC 184 GTGGAACCGATGAGGAGGTAAAGAATGCTCTGGTAAACAGGAGGTCAAGACTGGTGCCAGC 397 GTGGAACCGATGAGGAGGTAAAGAATGCTCTGGTAAACAGGAGGTCAAGACTGGTGCCAGC 397 *****
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	ATCCGCGGTAAATACCACTCCTGGAGTGTCTATGATGATTGCTGCAGTTAAAGAGTTTCT 479 ATCCGCGGTAAATACCACTCCTGGAGTGTCTATGATGATTGCTGCAGTTAAAGAGTTTCT 244 ATCCGCGGTAAATACCACTCCTGGAGTGTCTATGATGATTGCTGCAGTTAAAGAGTTTCT 457 ATCCGCGGTAAATACCACTCCTGGAGTGTCTATGATGATTGCTGCAGTTAAAGAGTTTCT 457 *****
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	AGTCGGGCTGCGTGA CTGGCGTGA AAGGCCCTCTTTCAAGGGGGGCACAGCGCGGGGAAA 539 AGTCGGGCTGCGTGA CTGGCGTGA AAGGCCCTCTTTCAAGGGGGGCACAGCGCGGGGAAA 304 AGTCGGGCTGCGTGA CTGGCGTGA AAGGCCCTCTTTCAAGGGGGGCACAGCGCGGGGAAA 517 AGTCGGGCTGCGTGA CTGGCGTGA AAGGCCCTCTTTCAAGGGGGGCACAGCGCGGGGAAA 517 *****
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	GCAGAGGATAAGGAGCGTTTTGGGGCCAGGTTATTAAGCGACGAGAGGTGAAATTTGATG 599 GCAGAGGATAAGGAGCGTTTTGGGGCCAGGTTATTAAGCGACGAGAGGTGAAATTTGATG 364 GCAGAGGATAAGGAGCGTTTTGGGGCCAGGTTATTAAGCGACGAGAGGTGAAATTTGATG 577 GCAGAGGATAAGGAGCGTTTTGGGGCCAGGTTATTAAGCGACGAGAGGTGAAATTTGATG 577 *****
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	ACTCGCTTAGGAGGACAGAGGCGAAAAGCGCTGGCCAGGGGCGAATCCGATGATAAAGGA 659 ACTCGCTTAGGAGGACAGAGGCGAAAAGCGCTGGCCAGGGGCGAATCCGATGATAAAGGA 424 ACTCGCTTAGGAGGACAGAGGCGAAAAGCGCTGGCCAGGGGCGAATCCGATGATAAAGGA 637 ACTCGCTTAGGAGGACAGAGGCGAAAAGCGCTGGCCAGGGGCGAATCCGATGATAAAGGA 637 *****
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	CGTAGGCTAGAGGATCGAAGACGATTAGAGACCGTTGTAGTTCTAGCAGTAAACGATGCC 719 CGTAGGCTAGAGGATCGAAGACGATTAGAGACCGTTGTAGTTCTAGCAGTAAACGATGCC 484 CGTAGGCTAGAGGATCGAAGACGATTAGAGACCGTTGTAGTTCTAGCAGTAAACGATGCC 697 CGTAGGCTAGAGGATCGAAGACGATTAGAGACCGTTGTAGTTCTAGCAGTAAACGATGCC 697 *****

Fig. 5. Comparison of *H. anguillarum* Small subunit ribosomal RNA (Gene bank Accession Number AB623036) sequences and H1/H2 , 18F/1537R, V1/1392R PCR products sequences.

Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	GATGCCGTGGTGCCTGCCGCGACGCGGAGGAGAAAATTGAGTAGGGCCCTGGGGAGAGTA GATGCCGTGGTGCCTGCCGCGACGCGGAGGAGAAAATTGAGTAGGGCCCTGGGGAGAGTA GATGCCGTGGTGCCTGCCGCGACGCGGAGGAGAAAATTGAGTAGGGCCCTGGGGAGAGTA GATGCCGTGGTGCCTGCCGCGACGCGGAGGAGAAAATTGAGTAGGGCCCTGGGGAGAGTA *****	779 544 757 757
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	CACGCGCAAGCGAGAAAATTTAAAGGAAAATTGACGGAAGAACCCACAAGGAGTGGAGTGT CACGCGCAAGCGAGAAAATTTAAAGGAAAATTGACGGAAGAACCCACAAGGAGTGGAGTGT CACGCGCAAGCGAGAAAATTTAAAGGAAAATTGACGGAAGAACCCACAAGGAGTGGAGTGT CACGCGCAAGCGAGAAAATTTAAAGGAAAATTGACGGAAGAACCCACAAGGAGTGGAGTGT *****	839 604 817 817
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	GCGGCTTAATTTGACTCAACGCGGGACAGCTTACCAGGCCCGACGACCGCACGAGTGTG GCGGCTTAATTTGACTCAACGCGGGACAGCTTACCAGGCCCGACGACCGCACGAGTGTG GCGGCTTAATTTGACTCAACGCGGGACAGCTTACCAGGCCCGACGACCGCACGAGTGTG GCGGCTTAATTTGACTCAACGCGGGACAGCTTACCAGGCCCGACGACCGCACGAGTGTG *****	899 664 877 877
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	TACACGATAGGTCGAAGAGTGGTGCATGGCCGTTAACGACAAGTGGGGTGA CCTTTGGGT TACACGATAGGTCGAAGAGTGGTGCATGGCCGTTAACGACAAGTGGGGTGA CCTTTGGGT TACACGATAGGTCGAAGAGTGGTGCATGGCCGTTAACGACAAGTGGGGTGA CCTTTGGGT TACACGATAGGTCGAAGAGTGGTGCATGGCCGTTAACGACAAGTGGGGTGA CCTTTGGGT *****	959 723 937 937
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	TAAGTCCGGGAAGTAGTGAGACCCTGCTGTCCGGCGGACAGGACAGGTGCTCAAAGCAC TAAGTCCGGGAAGTAGTGAGACCCTGCTGTCCGGCGGACAGGACA----- TAAGTCCGGGAAGTAGTGAGACCCTGCTGTCCGGCGGACAGGACAGGTGCTCAAAGCAC TAAGTCCGGGAAGTAGTGAGACCCTGCTGTCCGGCGGACAGGACAGGTGCTCAAAGCAC *****	1019 769 997 997
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	AGGAAGGAAGGGTCAAGAACAAGGTCAGTGATGCCCTTAGATGGCGTGGGCTGCACGCGCA AGGAAGGAAGGGTCAAGAACAAGGTCAGTGATGCCCTTAGATGGCGTGGGCTGCACGCGCA AGGAAGGAAGGGTCAAGAACAAGGTCAGTGATGCCCTTAGATGGCGTGGGCTGCACGCGCA *****	1079 1057 1057
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	CTACAGTGGTACAGAAAAGAAATCGCGGAGAGACAATGGTATCGGGAGGGAATGAGCTTT CTACAGTGGTACAGAAAAGAAATCGCGGAGAGACAATGGTATCGAGAGGGAATGAGCTTT CTACAGTGGTACAGAAAAGAAATCGCGGAGAGACAATGGTATCGAGAGGGAATGAGCTTT *****	1139 1117 1117
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	GCAAGAGGGCTCAGGAACGAGGAATTGCTAGTAATCGCGGGCTCATTAAAGACGCGATGAAT GCAAGAGGGCTCAGGAACGAGGAATTGCTAGTAATCGCGGGCTCATTAAAGACGCGATGAAT GCAAGAGGGCTCAGGAACGAGGAATTGCTAGTAATCGCGGGCTCAT----- *****	1199 1177 1162
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	ACGTCCCTGTTCTTTGTACACACCGCCCGTCTTATCGAAG-ATGGAGTCAGGCGCGAAC ACGTCCCTGTTCTTTGTACACACCGCCCGTCTTATCGAAGAATGGAGTCAGGCGCGAAC *****	1258 1237
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	AAGCGAGAGCGAGTGAGTGACAGGGTTCTAGATGTGATACAAGTCGTAACAAGGTAGCTGT AAGCGAGAGCGAGTGAGTGACAGGGTTCTAGATGTGATACAAGTCGTAACAAGGTAGCTGT *****	1318 1297
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	AGGAGAACCTGTAGCTGGATCAGCGCGATGTTTGCAGATTGTGTTTTTGTGATAGCCCTG AGGAGAACCTGTAGCTGGATCAGCGCGATGTTTGCAGATTGTGTTTTTGTGATAGCCCTG *****	1378 1357
Heterosporis H1/H2 18F/1537R V1/1392R	CGCAAGGGATCTTTGGCTCGCTGTGCGATGAAGGCGCAGCGGAGGGCGAAAATGTGCAGG CGCAAG----- *****	1438 1363

Fig. 5. Continued

결과 및 고찰

폐사되기 전의 병어는 몸통부분의 요철현상이 심하였으며 그 부분의 근육을 마쇄하여 Löffler's methylene blue 액으로 염색하여 관찰한 결과, 수많은 포자가 확인되었다 (Fig. 2). 근육 내에 형성된 포자낭 (sporophorocyst)을 확인하기 위하여 조직표본을 제작하여 관찰한 결과, 근육층 내 상피 (epidermis)와 진피 (dermis)의 변화는 정상조직과 감염조직 사이에 변화가 거의 없는 데 반하여, 감염어의 경우, 근육층 (muscle layer) 내에 많은 수의 포자낭 형성이 관찰되었다 (Fig. 3). 포자낭 내에 형성된 포자는 크기가 일정하지 않았으며, 대형 (6~9 µm)과 소형 (3~5 µm)으로 구분되었다 (Kim *et al.* 2006). 시스트를 둘러싼 근섬유는 피사로 인한 단백질 변성이 진행되어 호산성의 붉은 염색성을 나타내는 유리질화, 균질화된 형태로 관찰되었다. 또한 근섬유 주변에는 많은 수의 포자가 흩어져 있었는데 이는 시스트가 파괴되면서 포자가 빠져나온 것으로 추측되었다. 어류의 미포자충은 조직표본의 관찰이나 전자현미경적 미세조직상을 관찰하여 종을 동정하고 있다 (Lom *et al.* 2000). *H. anguillarum*의 경우, 감염어에 Xenoma를 형성하지 않으며, Sphorophorus vesicle (SPVs)가 근육과 분리되어 있다고 알려져 있다 (Lom 1992; Bruno *et al.* 2006). 그러나 최근에 이들에 관한 유전자 정보가 확립되어, 본 연구에서 병어의 근육 내에 형성된 시스트 덩어리를 사용하여 PCR을 실시한 결과, *H. anguillarum*이 가지는 특정 유전자인 Small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA)를 증폭할 수 있었다. Primer 18F과 1537R을 이용하여 PCR을 실시하여 1366 bp (Lane1)의 산물을 얻었고 V1과 1392R를 이용하여 PCR을 실시하여 1200 bp (Lane 2)의 산물을 얻었으며 H1과 H2를 이용하여 PCR을 실시한 결과, 800 bp (Lane 3)의 산물을 얻을 수 있었다. 본 연구에서 동남아산 뱀장어에 감염된 포자충은 *H. anguillarum*임을 동정할 수 있었다 (Fig. 4). 보다 더 정확한 동정을 위하여 PCR product를 Cloning하여 Sequencing을 실시한 결과, *H. anguillarum* Small subunit ribosomal RNA 서열과 일치하였다 (Tsai *et al.* 2002).

기준이 된 서열은 *H. anguillarum* Small subunit ribosomal RNA gene (Gene bank Accession No. AB623036)이며 이를 토대로 PCR product의 각각의 서열과 alignment 하여 비교해 본 결과 서열이 일치하였다. 서열비교에 사용한 프로그램은 Bioedit의 Clust W를 이용하였으며 총 4개의 서열을 비교한 결과 18F/1537R과 V1/1392R의 서열은 23 bp부터 일치하고 있으며 H1/H2서열은 237 bp부터 일

치하게 나타났다. 또한 H1/H2 primer의 PCR product의 경우 나머지 두 product와 공통적인 서열을 가지고 있었으며 이는 800 bp 정도 일치함을 볼 수 있었다. 위의 결과에 의해 본 연구에서 조사된 포자충은 *H. anguillarum*으로 동정을 할 수 있었다 (Fig. 5).

최근, 국외의 한 연구에 의하면 파충류인 가터뱀 (*Thamnophis sirtalis*)의 근육 내에도 본 포자충이 감염된 예가 있으므로 타 어종 및 유사 동물에 대한 감염의 발견 및 인위감염 등에 의한 숙주의 범위 및 그 유해성에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다 (Richter *et al.* 2014). 뱀장어는 국내의 주요 양식대상 종이므로 본 포자충에 감염된 종묘 및 성어의 이동 시에는 질병의 확산속도가 빠를 수 있으므로 그 예방에 대한 대책이 필요하다. 그러므로 본 연구에서와 같이 원인충에 대한 PCR 방법에 의한 신속 정확한 진단을 실시한다면 사전에 감염의 확산을 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

포자충의 구제를 위한 치료약제에 관한 연구가 시도되었으나, 약제의 가격이 비싸고 치료기간이 길어 효율성이 낮은 것으로 평가되고 있다 (Kano and Fukui 1982a, b). Buchmann *et al.* (1992)은 극동산 뱀장어의 면역반응에 관한 연구에서 감염이 되지 않는 뱀장어는 선천적인 조건 및 양어지 내에서의 항원에 대한 노출로 약한 체액성 면역성을 가진다고 설명하였다. 이는 본 포자충의 감염에 의한 폐사율이 낮은 점, 감염 증상이 천천히 나타나는 등의 사실과 일치한다고 생각된다.

적 요

최근 뱀장어 양식장에서 사육 중이던 동남아산 뱀장어에 몸통 근육의 요철현상을 나타내면서 폐사를 일으키는 질병이 발생하였다. 병어의 몸통 근육 내 환부는 흰색 또는 황색으로 변해있었다. 병리조직학적인 변화는 근조직 내에 수많은 포자와 크고 작은 시스트들이 변형된 근육 근섬유 내에 관찰되었다. 병어의 근육 환부를 취하여 PCR을 실시하여 *H. anguillarum*이 가지는 특정 유전자인 Small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA)를 증폭하였다. 좀 더 정확한 동정을 위해 PCR product를 Cloning 후 Sequencing하여 서열들을 분석한 결과 *H. anguillarum*의 Small subunit ribosomal RNA (Gene bank accession number: AB623036) 서열과 일치하게 나타남을 확인할 수 있었다. primer 18F과 1537R의 PCR product는 약 1366 bp 길이가 일치하였으며, V1과 1392R를 이용한 PCR product는 1200 bp가 일치하게 나타났다. 또한 H1과 H2의 PCR product

의 경우는 800 bp 정도 일치하였으며 이의 서열은 나머지 2개의 product가 공통적으로 가지고 있는 서열이었다. 이를 토대로 본 연구에서는 동남아산 뱀장어에 감염된 포자충은 *H. anguillarum*임을 동정할 수 있었다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원 연구비 지원 (RP-2014-AQ-132)으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Bruno DW, B Nowak and DG Elliot. 2006. Guide to the identification of fish protozoan and metazoan parasites in stained tissue sections. *Dis. Aquat. Org.* 70:1-36.
- Buchmann K, K Ogawa and CF Lo. 1992. Immune Response of the Japanese Eel (*Anguilla japonica*) against Major Antigens from the Microsporean *Pleistophora anguillarum* Hoshina, 1951. *Fish Pathol* 27:157-161.
- Hashimoto K and T Kooichi. 1976. Electron Microscopic Observations of the *Pleistophora anguillarum*, a Microsporidian Parasite of the Eel. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher.* 42:411-419.
- Hoshina T. 1951. On a new microsporidian, *Pleistophora anguillarum* n.sp. from the muscle of the eel, *Anguilla japonica*. *J. Tokyo Univ. Fisher.* 38:35-46.
- Hung H-W, C-F Lo, C-C Tseng, S-E Peng, C-M Chou and G-H Rou. 1998. The Small Subunit Ribosomal RNA Gene Sequence of *Pleistophora anguillarum* and The Use of PCR Primers for Diagnostic Detection of the Parasite. *J. Euk. Microbiol.* 45:556-560.
- Joh S-J, Y-K Kwon, M-C Kim, M-J Kim, H-M Kwon, J-W Park, J-H Kwon and J-H Kim. 2007. *Heterosporis anguillarum* infections in farm cultured eels (*Anguilla japonica*) in Korea. *J. Vet. Sci.* 8:147-149.
- Kano T and F Haruo. 1982a. Studies on Pleistophora Infection in Eel, *Anguilla japonica*-I. Experimental Induction of Microsporidiosis and Fumagillin Efficacy. *Fish Pathol.* 16: 193-200.
- Kano T, T Okauchi and H Fukui. 1982b. Studies on Pleistophora Infection in Eel, *Anguilla japonica*-II. Preliminary Tests for Application of Fumagilla. *Fish Pathol.* 17:107-114.
- Kim J-H, S-W Park, C-I Park, M-J Oh, S-J Jung and M-D Hur. 2006. Infection and parasitic diseases of fish and shellfish. Life Science Publishing Co.
- Lom J, I Dyková, CH Wang, CF Lo, GH Kou. 2000. Ultrastructural justification for the transfer of *Pleistophora anguillarum* Hoshina, 1959 to the genus *Heterosporis* Schubert, (1969) *Dis. Aquat. Org.* 43:225-231.
- Lom J and I Dyková. 1992. Protozoan Parasites of Fishes. Elsevier Science Publishers. pp. 147-149.
- Lom J. 2002. A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Syst. Parasitol.* 53:81-99.
- Park S-W and M-J Oh. 2011. Microsporida. pp. 293-294. in *The Pathology of Aquatic Life*. Bioscience. Seoul.
- Park S-W, E-B Jung and D-W Kim. 2012. Outbreak of Anguillid herpesvirus-I (AngHV-I) infection in cultured shortfin eel (*Anguilla bicolor*) in Korea. *J. Fish Pathol.* 25:151-158.
- Suh J-W and S-K Chun. 1988. The infection experiment of Pleistophora to eels, *Anguilla japonica* and the histopathological investigation of infection development. *Bull. Korean Soc. Fish Pathol.* 1:51-57.
- Tsai S-J, G-H Kou, C-F Lo and C-H Wang. 2002. Complete sequence and structure of ribosomal RNA gene of *Heterosporis anguillarum*. *Dis. Aquat. Org.* 49:199-206.

Received: 20 October 2014

Revised: 27 November 2014

Revision accepted: 28 November 2014