

담수관상어 5종에서의 iridoviruses 검출과 분포 분석

류지효 · 정준범 · 김호열 · 전려진 · 조혜진 · 이준우* · 정현도†

부경대학교 수산생명의학과, *부산가톨릭대학 환경공학과

Detection and distribution of iridoviruses in five freshwater ornamental fish species

Ji Hyo Lyu, Joon Bum Jeong, Ho Yeoul Kim, Lyu Jin Jun, Hye Jin Cho,
June Woo Lee* and Hyun Do Jeong†

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

*Department of Environmental Engineering, Catholic University, Busan 609-757, Korea

The distribution of iridoviruses in five freshwater ornamental fishes, pearl gourami (*Trichogaster leeri*), dwarf gourami (*Colisa lalia*), silver gourami (*Trichogaster microlepis*), blue gourami (*Trichogaster trichopterus sumatrana*) and freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*), imported from Singapore was examined in 2004 and 2005. The presence of iridoviruses in 56 sample groups was determined using PCR technique and showed PCR positive in 11 sample groups. The proportion of fish infected by iridovirus was differed depending upon species; 31.8% (7/22) for pearl gourami, 18.2% (2/11) for dwarf gourami, 16.7% (1/6) for blue gourami, 9.1% (1/11) for silver gourami and 0% (0/6) for angelfish. In quantitative comparison of viral DNAs isolated from infected tissues, the DNA concentration of iridovirus in pearl gourami was higher than that in dwarf gourami. Although pearl gourami infected naturally by iridovirus showed 100% mortality in keeping experiment for 3 weeks, only 57% of those was positive in PCR. In the comparison of nucleotide sequences of the *Pst I* fragment known as the most variable genomic region, both iridoviruses isolated from pearl gourami and dwarf gourami showed identity more than 99% with infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) isolated from mandarinfish (*Siniperca chuatsi*).

Key words: Iridovirus, Freshwater ornamental fish, Pearl gourami, Dwarf gourami, Silver gourami, Blue gourami, Freshwater angelfish, ISKNV

Iridoviruses는 해산어종 뿐 아니라 freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*), gourami (*Trichogaster spp.*), swordtail (*Xiphophorus hellerii*), dwarf gourami (*Colisa lalia*), chromide cichlid (*Etroplus maculatus*), guppy (*Poecilia reticulata*), doctor fish (*Labroides dimidiatus*), mandarinfish (*Siniperca chuatsi*), mollies (*Poecilia latipinna*) 그리고 African lampeye (*Aplocheilichthys normani*) 등 다양한 담수 관상어종에서도 보고되고 있다 (Armstrong & Ferguson, 1989; Anderson *et al.*, 1993; Hedrick & McDowell, 1995; Rodger *et al.*, 1997; He *et al.*, 2001; Paperna *et al.*, 2001; Sudthongkong *et al.*, 2002a). 이러한 iridovirus에 의한 감염은 특히 싱가폴을 포함한 동남아시아로부터 수입한 관상어에서 많이 보고되었다 (Armstrong & Ferguson, 1989; Anderson *et al.*, 1993; Hedrick & McDowell, 1995; Sudthongkong *et al.*, 2002a). 현재 우리 나라는 관상어의 대부

*Corresponding Author : Hyun Do Jeong, Tel : 051-620-6143,
Fax : 051-628-7430, E-mail : jeonghd@pknu.ac.kr

분을 수입에 의존하고 있지만, 수입산 관상어는 어떠한 검역 절차도 없이 국내 시장으로 유입되고 있기 때문에, 질병 전이의 위험성은 매우 크다고 할 수 있다. 특히 국내 관상어에서 iridovirus에 의한 감염이 존재할 가능성 또는 감염 실태를 파악하는 것은 매우 시급한 사안이라 할 수 있다.

He 등 (2000)은 중국의 mandarinfish (*Siniperca chuatsi*)에 많은 피해를 입히는 virus를 분리하였고, infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)라고 명명하였다. 감염된 mandarinfish는 무기력증, 식욕 부진, 간에서의 점상출혈, 신장 및 비장 종대 등의 감염 증상을 나타내었고, 감염 조직에서는 이형 비대 세포가 관찰되었으며, 비대 세포의 cytoplasm에서는 약 150 nm의 많은 icosahedal viral particles가 나타났다 (He et al., 2001, 2002). *Iridoviridae family*는 형태적, 유전적 특성에 따라 *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus*, 그리고 *Megalocytivirus* 등 다섯 genera로 나뉘며 (Chinchar et al., 2005), International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)는 최근에 ISKNV를 *Megalocytivirus*로 지정하였다.

본 연구에서는 국내에서 유통되는 관상어 5종을 대상으로 PCR 방법을 사용하여 iridovirus 감염 실태를 파악하고, 유전자 염기서열 분석을 통해 담수 관상어에서 분리한 iridoviruses의 특성을 연구하고자 하였다. 또한 감염조직에서의 viral DNA 양이 어종에 따라 차이를 보이는지, 그리고 PCR 방법으로 자연감염이 확인된 관상어 group을 적정한 사육 환경으로 유지시켜 주었을 때, iridovirus에 의한 폐사가 발생하는지를

알아보고자 하였다.

재료 및 방법

Fish sampling

2003~2005년까지 pearl gourami (*Trichogaster leeri*), dwarf gourami (*Colisa lalia*), silver gourami (*Trichogaster microlepis*), blue gourami (*Trichogaster trichopterus sumatranus*) 그리고 freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*) 등 5종의 수입산 담수 관상어를 여러 번에 걸쳐서 국내 도매상에 도착한지 1일 이내에 구입하였고, PST-F/PST-R primer set를 사용하여 PCR 방법으로 iridovirus 감염을 조사하였다 (Table 1). PCR 분석 결과 sampling 한 3마리 중 1마리에서라도 양성 반응이 나타나면 그 sample group은 iridovirus에 감염된 group으로 분류하였다.

감염 조직 내 viral nucleic acids의 분리

감염어의 비장 1 mg을 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 350 µl에 넣어서 Pellet pestle [®] motor (Sigma-Aldrich)를 이용하여 분쇄시킨 후, 8000 × g, 10분간 원심분리하여, 상등액을 취하였다. 상등액에 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS) 40 µl와 10 mg/ml proteinase K (Roche, Mannheim, Germany) 10 µl를 첨가하여 37°C, 1시간 동안 반응시키고, 동량의 phenol-chloroform을 사용하여 2번 추출 후, 0.3 M sodium acetate 와 2배 volume의 ethanol을 사용하여 침전시켰다. 4°C, 12000 × g, 10분간 원심분리 후, pellet에 TE buffer 50 µl를 첨가하여 혼탁시켰고, spec-

Table 1. Primers used in this study

Target	Primer	Oligonucleotide sequences	Expected size	Reference
<i>Pst</i> I fragment	PST-F	5'-CTGCAGTGCAGACACATAC-3'	959 bp	Jeong et al.
	PST-R	5'-CTGCAGTTGCCGCTAAAC-3'		(2003)

trophotometer (BioPhotometer, Eppendorf)를 사용하여 DNA 양을 측정하였다. 추출된 DNA는 사용전까지 -80°C에서 보관하였다.

PCR

Iridovirus를 검출하기 위해 이전에 사용되었던 K1 region의 *Pst* I fragment 부위로부터 primer set를 제작하였다 (Table 1) (Jeong *et al.*, 2003; GenBank accession no. AF506370). PCR amplification은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer)를 사용하였다. Microtube에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) gelatin, 0.5% Tween-20, 200 μM의 각 dNTP, 1 μM의 각 primer, 1.25 U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 및 template DNA로서 추출된 viral nucleic acids를 첨가한 후, distilled water로 PCR 혼합물을 최종 volume이 50 μl가 되게 하였다. PCR amplification 조건은 다음과 같다. 94°C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 30 cycles를 반응시켰다. 그 후, 72°C에서 7분간 extension시켰다. PCR 후 증폭된 산물은 0.5 μg/ml Ethidium Bromide가 첨가된 1% agarose gel을 이용하고, 0.5 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 완충액으로 하여, 전기영동을 실시하였다. UV 검출기에서 나타나는 band를 관찰하여 그 증폭 여부와 검출 한계를 확인하였다.

감염 조직 내 virus 농도

PCR 방법으로 iridovirus에 의한 자연 감염이 확인된 pearl gourami, dwarf gourami 3마리씩의 비장 조직을 적출하고, 이것으로부터 viral nucleic acids를 분리하여 어종별로 취합시킨 후 DNA 양을 측정하였다. 측정된 sample의 DNA (1 ng)를 distilled water로 10배씩 단계 희석한 후, template으로 각각 사용하고 *PST*-F/*PST*-R primer set

를 사용하여 PCR을 실시하였고, UV 검출기를 이용하여 검출 한계를 확인하였다.

Keeping experiment

PCR에 의해 자연감염이 확인된 pearl gourami 29 마리를 구입하여 10마리는 PCR로서 iridovirus 감염 여부를 확인하였고, 나머지 19마리는 40ℓ 수조에 넣고 적정 수온인 28°C를 유지하면서 폐사가 일어나는지를 관찰하였다. 실험 기간 중, 환수시키기 1시간 전에 1일 1회 사료를 투여하였고, 50%의 사육수를 환수시켰다. 매일 폐사 정도를 확인하고, 폐사어의 비장으로부터 viral nucleic acids를 분리하여 PCR로서 iridovirus 감염 여부를 확인하였다. 자연 감염된 pearl gourami 33마리를 이후에 다시 구입하여 동일한 방법으로 12마리에 대해서 PCR 분석을 하였으며, 나머지 21마리는 keeping experiment에 사용하였다.

담수 관상어에서 분리된 iridovirus의 유전적 특성 분석

PCR products는 Prep-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정제하였고, 정제된 DNA는 TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cloning 한 후, Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 염기 서열을 밝혔다. 염기 서열은 MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)으로 비교, 분석하였다.

결 론

담수 관상어에서 iridovirus의 검출

2003년~2005년까지 국내 관상어 도매상에서

Table 2. Prevalence of iridoviruses in freshwater ornamental fish species imported from Singapore

Species	Numbers of	
	Test group	PCR positive
Pearl gourami (<i>Trichogaster leeri</i>)	22	7
Dwarf gourami (<i>Colisa lalia</i>)	11	2
Silver gourami (<i>Trichogaster microlepis</i>)	11	1
Blue gourami (<i>Trichogaster trichopterus sumatranaus</i>)	6	1
Freshwater angelfish (<i>Pterophyllum eimekei</i>)	6	0
Total	56	11

pearl gourami (*Trichogaster leeri*), dwarf gourami (*Colisa lalia*), silver gourami (*Trichogaster microlepis*), blue gourami (*Trichogaster trichopterus sumatranaus*), freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*) 등 5종의 담수 관상어를 원산지인 싱가폴로부터 도매상에 도착한지 1일 이내에 구입하여 iridovirus 감염 여부를 PCR로서 확인하였다 (Table 2). 총 56회 sampling을 실시하였고, 그 중 11 samples에서 PCR positive 반응이 나타났다. 담수 관상어 중 pearl gourami에서 7 (PCR positive groups) / 22 (total groups)으로 가장 높은 iridovirus 감염 빈도를 나타내었다. 그 다음으로는 dwarf gourami (2/11), blue gourami (1/6), silver gourami (1/11) 순으로 나타났다. Freshwater angelfish의 경우 6 groups 모두에서 iridovirus가 검출되지 않았다.

감염 조직 내 virus 농도 분석

Iridovirus에 감염된 담수 관상어 조직 내의 virus 농도를 추정하기 위해 자연 감염이 확인된 pearl gourami 와 dwarf gourami로부터 비장을 적출하였고, total nucleic acids를 분리한 후, 어종

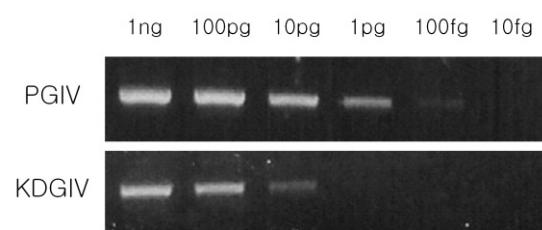


Fig. 1. Detection limit of the iridovirus DNA in the spleen homogenates of freshwater ornamental fishes infected naturally by iridovirus in PCR analysis with the PST-F/PST-R primer set. PGIV, iridovirus isolated from pearl gourami (*Trichogaster leeri*); KDGIV, iridovirus isolated from dwarf gourami (*Colisa lalia*).

별로 PCR detection limit를 비교한 결과, pearl gourami는 100 fg (1×10^{-4}) 그리고 dwarf gourami의 iridovirus DNA 검출 한계는 10 pg (1×10^{-2})으로 나타났다 (Fig. 1).

자연 감염어의 keeping experiment

Keeping experiment는 자연 감염이 확인된 pearl gourami (*Trichogaster leeri*)를 사용하여 2회 반복 실험하였다. 감염 확인을 위해서 10마리의 pearl gourami를 대상으로 PCR을 실시한 결과

Table 3. Keeping experiments of different batch of pearl gourami (*Trichogaster leeri*) infected naturally by iridovirus

Days	First experiment			Days	Second experiment		
	No. of dead fish	No. of PCR positive	Cumulative no. of PCR positive		No. of dead fish	No. of PCR positive	Cumulative no. of PCR positive
0	0	0	0/0	0	0	0	0/0
1	0	0	0/0	1	3	0	0/3
2	3	2	2/3	2	0	0	0/3
3	0	0	2/3	3	1	1	1/4
4	0	0	2/3	4	0	0	1/4
5	4	2	4/7	5	0	0	1/4
6	3	2	6/10	6	10	8	9/14
7	0	0	6/10	7	2	0	9/16
8	2	2	8/12	8	5	3	12/21
9	0	0	8/12	9	-	-	-
10	0	0	8/12	10	-	-	-
11	5	3	11/17	11	-	-	-
12	2	0	11/19	12	-	-	-

Table 4. The proportion (%) of the PCR positive fish to the total fish in sampled and dead pearl gourami (*Trichogaster leeri*) infected naturally by iridovirus in keeping experiments at 28°C

Experiment	Pearl gourami	No. of total fish	No. of PCR positive	Proportion (%) of PCR positive
First	Sampled	10	6	60.0
	Dead	19	11	57.9
Second	Sampled	12	7	58.3
	Dead	21	12	57.1

60% (6/10)에서 positive 반응이 나타났다 (Table 4). 동일한 group의 pearl gourami 19마리를 28°C로 유지시키며 둔 결과, 2일째부터 폐사가 발생하였으며 12일째 100% 폐사하였다 (Table 3). 폐사여 모두에 대해서 각각 PCR을 실시한 결과, 19마리 중 11마리에서 PCR positive를 보였다. 두 번째 실험에서는 다른 batch의 pearl gourami

를 구입하여 12마리를 PCR test 한 결과, 58.3% (7/12)에서 positive 반응을 보였고 (Table 4), keeping experiment에서는 1일째부터 폐사가 발생하여 8일째 100% 폐사하였다 (Table 3). 폐사여 중 57.1% (12/21)에서 PCR positive를 나타내었다.

담수 관상어로부터 분리된 **iridoviruses**의 염기 서열 비교

자연 감염된 pearl gourami와 dwarf gourami로부터 각각 분리한 **iridoviruses**의 *Pst I* fragment 부위를 sequencing하였고, 두 viruses는 서로

99.9%의 상동성을 보였다. NCBI의 BLAST에 등록된 유전자들과의 유사성을 검색한 결과, 중국의 mandarinfish에서 분리된 ISKNV와 두 viruses 모두 99% 이상의 매우 높은 상동성을 나타내었다. 해산어에서 분리된 RSIV 와의 비교에

	PST-R		
ISKNV	CTGCAGTTGCCGCTAAAC	ACTCTGGCTCATCTATGTCTCGTAGTCGTCCATTCCGCTGCCCCATCGTCAAGCAGTGTAAGTGGTGGAGTAACGTCT	100
PGIVC.....	100
KDGIVC.....	100
RSIVG.....	100
ISKNV	CGGTGTCCTGTCGGCAGCTCACATGAGACGCCCTACACAAGGCTGACTGTCAGATGAGATGCGCTGGCGTGCATGTGACGCTCTGCACAGGGTGAGGTT	200	
PGIV	200
KDGIV	200
RSIVT.....A.....	200
ISKNV	CAGCTTGTGACAGACACAATGGTACCATCATACAGCACCCTCCATGTTCAAGGACTTCGCTGCTGCGGCTACATGTAACACCTGCCATGTACA	300	
PGIV	300
KDGIV	300
RSIVAG.....G.....C.....A.....G.....	300
ISKNV	ACATGCTCTGCCAACAGGCTGTTGCTGCTGCCAACAAATCTCACATCAGTCTCGAGGTACCCGAGCTGAGGGTGGTGTCTGGTTGCAA	400	
PGIVC.....	400
KDGIV	400
RSIVC.....G.....A.....C.....	400
ISKNV	TTTCAGGTTAGAAGGTGGTGGCTATATGCCACAGTCAGCAACACAAGAAGTAGCAGAGTCGCATTGGTCCGCTAGGTATGTTCCAGTGG	500	
PGIVT.....	500
KDGIVT.....	500
RSIVAG.....C.....C.....G.....C.....ATG.....C.....A.....CA.....A.....	500
ISKNV	TCATATATGACATGAGGATTCAAATTTTATAACAAGTAAAGATGTTCACTGTCGTTGAGATAGGAGACGTGTTGGTGTAGTGTGCGTGACAACA	600	
PGIV	600
KDGIV	600
RSIV	...CC.....T.....G.....	600
ISKNV	TACCGCTGATGTACAACCGCGACCCGGGCAAGCCGTGGCGTTAAATAATACCACCCAAGGTGCGTCACGGTCACGGCGGTGCCTGACAACGGGATTA	700	
PGIV	700
KDGIV	700
RSIV	...T.....T.....A.....T.....C.....AG.....T.....T.....C.....C.....	700
ISKNV	TGAGACATTGCGCAGGTGCTTATAGTCGAGCCCAGATTTGGTGCCTGCGCTGCCTATTACACTGATCCACCCAGACATGTACAAGATGGA	800	
PGIV	800
KDGIV	800
RSIVC.....T.....A.....T.....	800
ISKNV	TTGTCAATTACCAAGGACATGGGCACACACATTGGCTCTGCCCTCACTACTTAATGCAGCGCAAATGCCAGTGGTTAATGCTGCGAGAGAACTCA	900	
PGIV	900
KDGIV	900
RSIVG.....C.....G.....C.....C.....A.....	900
ISKNV	TCTCATCGGGGGTCGCCCTCAGCCAATGACAATCATTGT	GTATGTCCTGCACTGCAG	959
PGIV	959
KDGIV	959
RSIVA.....C.....	959

Fig. 2. Comparison of the nucleotide sequences of the *Pst I* fragment of iridovirus isolated from pearl gourami (*Trichogaster leeri*) and dwarf gourami (*Colisa lalia*), respectively. Identical residues and primers used in PCR are represented as dots and boxes, respectively. PGIV, iridovirus isolated from pearl gourami; KDGIV, iridovirus isolated from dwarf gourami; ISKNV, infectious spleen and kidney necrosis virus (GenBank accession no. AF371960); RSIV, red sea bream iridovirus (GenBank accession no. BD143114).

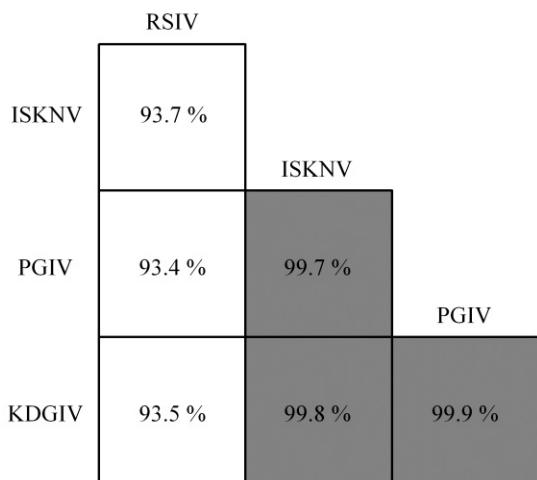


Fig. 3. Comparative analysis of the *Pst I* fragment of iridovirus PGIV, KDGIV, ISKNV and RSIV. The homology of nucleotide sequences is expressed as percent identity. PGIV, iridovirus isolated from pearl gourami (*Trichogaster leeri*); KDGIV, iridovirus isolated from dwarf gourami (*Colisa lalia*); ISKNV, infectious spleen and kidney necrosis virus (GenBank accession no. AF371960); RSIV, red sea bream iridovirus (GenBank accession no. BD143114).

서는 약 93%의 상동성을 나타내었다 (Fig. 2, 3).

고 찰

Rodger 등 (1997)은 대량 폐사가 발생한 freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*)를 병리조직학적으로 관찰하여 systemic iridovirus infection을 보고하였고, Gibson-Kueh 등 (2003)은 다양한 양식 해산어와 담수 관상어를 대상으로 systemic iridoviral disease의 병리적 특성을 보고하였다. Sudthongkong 등 (2002a)은 african lamprey (*Aplocheilichthys normani*)로부터 iridovirus를 분리하여 african lamprey와 pearl gourami (*Trichogaster leeri*)에 각각 인위 감염시켜 그 병원성을 확인한 바 있다. 외국의 경우, 담수 관상어에서의 iridovirus 감염이 많이 보고되고 있지만 국내에서는 그에 대한 연구가 매우 드문 실정이다.

관상어에서 iridovirus에 의한 감염은 싱가폴을

비롯한 동남아시아로부터의 수입 관상어에서 많이 보고되었으며 (Armstrong & Ferguson, 1989; Anderson *et al.*, 1993; Hedrick & McDowell, 1995; Sudthongkong *et al.*, 2002a), 본 연구에서는 5종의 수입 관상어를 대상으로 iridovirus의 감염 모니터링을 PCR 방법으로 조사하였다. PCR에 사용한 PST-F/PST-R primer set는 해산어로부터 분리된 iridoviruses, RSIV (accession no. BD143114)와 IVS-1 (Jeong *et al.*, 2003; accession no. AF506370), 그리고 담수어로부터 분리된 iridovirus, ISKNV (He *et al.*, 2001; accession no. AF371960), 모두에 대해서 검출이 가능하도록 제작하였다. 구입한 관상어 56 groups 중에서 11 groups (19.8%)에서 iridovirus의 감염이 확인되었고, 이것은 우리나라의 관상어종들에서도 iridovirus에 의한 감염은 이미 심각한 상황이라는 사실을 제시하고 있다. 더구나, 다양한 해산어에서 iridovirus에 의한 무증상적 감염이 매우 높은 비율로 존재하는 것으로 볼 때 (Jeong *et al.*, 2006), 담수 관상어에서도 그러한 무증상적 감염이 존재할 가능성이 있을 것으로 추정된다.

Inouye 등 (1992)은 4종의 해산어에 대한 iridovirus의 공격실험에서 어종에 따른 폐사율의 차이를 보고하였다. 본 연구에서 조사한 담수 관상어 5종 중 특히 pearl gourami에서 31.8%로 가장 높은 감염 빈도를 보였고, 그 다음으로 dwarf gourami, blue gourami, silver gourami 순서로 나타났다. 이것은 해산어와 마찬가지로 담수어에서도 어종에 따라 iridovirus의 병원성이 다를 수 있다는 것을 간접적으로 제시하고 있으며, 이후에 여러 관상어종에 대한 iridovirus의 공격실험을 통해 연구되어야 할 것이다. Freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*)에서도 iridovirus의 감염이 보고된 바 있지만 (Rodger *et al.*, 1997), 본 연구의 모니터링 실험에서는 iridovirus가 검출되지 않았다.

감염 비장 조직에 존재하는 iridovirus의 양적 비교 실험을 통해 어종간 차이가 나타남을 확인하였다. Dwarf gourami에 비해 pearl gourami에서

약 100배 정도 높게 virus가 검출되었으며, 이것은 모니터링에서 pearl gourami의 자연 감염 빈도가 매우 높게 나타난 것과 관련성이 있는 것으로 추정된다. 그렇지만 실험에 사용된 pearl gourami와 dwarf gourami의 감염 stage 차이로 인해서 virus의 양이 다르게 나타났을 가능성도 배제할 순 없으며, PCR 방법 외에 병리조직학적으로 enlarged cells의 관찰 혹은 어종별 병원성 비교 등과 같은 관련 실험이 뒷받침되어야 할 것이다.

감염 모니터링을 통해 담수 관상어에서 iridovirus의 존재를 검출하였고, 자연 감염된 관상어에서 iridovirus에 의한 폐사가 나타나는지를 알아보고자, 감염 빈도가 가장 높게 나타났던 pearl gourami에 대해 keeping experiments를 실시하였다. 두 번의 반복 실험에서 자연 감염이 확인된 pearl gourami 모두 각각 12일과 8일 이내에 100% 폐사되었지만, 폐사어 모두에서 iridovirus가 검출되지는 않았고, sampled group과 keeping group 모두 57.1~60.0% 사이의 PCR positive 비율을 나타내었다. 비록 Klinger 등 (1996)은 iridovirus에 감염된 gourami (*Trichogaster*)에서의 폐사율이 낮거나 (0.5~10%) 중간 (50%) 정도로 다양하게 나타난다고 하였으나, 폐사어의 60% 정도에서만 PCR positive가 나온 원인에 대해서는 앞으로 연구가 있어야 할 것이다. 다만 이러한 차이 발생에 대한 원인으로 추정될 수 있는 것은 폐사 후 sampling 할 때까지의 경과시간, PCR의 reproducibility, 감염되지 않은 건강한 어류를 사육하는 control group과는 다른 수질환경 (즉, 폐사어에 의한 유기물 증가) 등을 들 수 있을 것이다. 본 연구실에서 감염되지 않은 pearl gourami를 여러 번 같은 조건으로 두었을 때는 폐사가 나타나지 않았다 (data not shown).

Sudthongkong 등 (2002b)은 african lampreye iridovirus (ALIV), dwarf gourami iridovirus (DGIV)를 sea bass iridovirus (SBIV), brown-spotted grouper with sleepy disease iridovirus (GSDIV),

red sea bream iridovirus (RSIV) 등과 ATPase gene 부위를 비교했을 때, 유전적으로 매우 유사하다고 보고하였으며, 특히 ALIV와 DGIV의 single origin 가능성을 제시하였다. 본 연구에서 iridovirus에 의해 자연 감염된 pearl gourami와 dwarf gourami로부터 각각 분리한 PGIV와 KDGV는 *Pst I* fragment 부위의 염기서열을 밝혀서 GenBank에 등록된 유전자들과의 유사성을 검색하였으며, 담수어인 mandarinfish에서 만 그 존재가 확인된 ISKNV와 염기서열상 거의 동일하다는 것을 밝혔다.

본 연구 결과는 우리나라의 담수 관상어종들 사이에서 iridovirus에 의한 감염이 이미 심각한 상황에 이르렀으며, 특히 외국으로부터의 질병 전이에 대한 검역의 필요성을 제시하고 있다.

요 약

2004~2005년까지 수입산 pearl gourami (*Trichogaster leeri*), dwarf gourami (*Colisa lalia*), silver gourami (*Trichogaster microlepis*), blue gourami (*Trichogaster trichopterus sumatrana*) 그리고 freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*) 등 5 어종을 대상으로 iridovirus 감염 실태를 PCR 방법을 사용하여 조사하였다. 채집한 56 samples 중 11 samples에서 PCR 양성 반응이 관찰되었고, pearl gourami에서 31.8% (7/22)로 가장 높은 감염 빈도를 나타내었다. 그 다음으로 dwarf gourami, blue gourami, silver gourami 순으로 나타났으며, freshwater angelfish에서는 iridovirus가 검출되지 않았다. 자연 감염된 관상어종의 비장으로부터 iridovirus의 핵산을 분리하여 검출한 계 PCR 방법으로 viral DNA의 양을 비교하였으며, dwarf gourami에 비해 pearl gourami에서 더 많은 viral DNA가 검출되는 것을 확인하였다. 자연 감염이 확인된 pearl gourami groups는 실험실 환경에서 100% 폐사하였고, 폐사어 중 57% 이상이 PCR 양성 반응을 나타내었다. *Pst I* fragment의 염기서열 비교에서 pearl gourami와

dwarf gourami에서 분리한 iridoviruses는 중국의 mandarinfish (*Siniperca chuatsi*)에서 분리된 infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) 와 99% 이상의 매우 높은 상동성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구 (B-2004-02)는 해양수산부 Marine Bio 21 Center 의 Marine Process Research Center로부터의 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Anderson, I.G., Prior, H.C., Rodwell, B.J. and Harris, G.O.: *Iridovirus-like virions in imported dwarf gourami (*Colisa lalia*) with systemic amoebiasis*. Aust. Vet. J., 70: 66-67, 1993.
- Armstrong, R.D. and Ferguson, H.W.: *Systemic viral disease of the chromide cichlid *Etreplus maculatus**. Dis. Aquat. Org., 7: 155-157, 1989.
- Chinchar, G., Essbauer, S., He, J.G., Hyatt, A. and Miyazaki, T.: Family iridoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., editors. *Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses eight report of the international committee on the taxonomy of viruses*. San Diego: Academic Press, 145-161, 2005.
- Gibson-Kueh, S., Netto, P., Ngoh-Lim, G.H., Chang, S.F. and Ho, L.L.: *The pathology of systemic iridoviral disease in fish*. J. Comp. Pathol., 129: 111-119, 2003.
- He, J.G., Wang, S.P., Zeng, K., Huang, Z.J. and Chan, S.M.: *Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin-fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky)*, in China. J. Fish Dis., 23: 219-222, 2000.
- He, J.G., Deng, M., Weng, S.P., Li, Z., Zhou, S.Y., Long, Q.X., Wang, X.Z. and Chan, S.M.: *Complete genome analysis of the mandarin-fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus*. Virology, 291: 126-139, 2001.
- He, J.G., Zeng, K., Weng, S.P. and Chan, S.-M.: *Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)*. Aquaculture, 204: 11-24, 2002.
- Hedrick, R.P. and McDowell, T.S.: *Properties of iridoviruses from ornamental fish*. Vet. Res., 26: 423-427, 1995.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M.: *Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major**. Fish Pathol., 27: 19-27 (in Japanese with English abstract), 1992.
- Jeong, J.B., Jun, L.J., Yoo, M.H., Kim, M.S., Komisar, J.L. and Jeong, H.D.: *Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea*. Aquaculture, 220: 119-133, 2003.
- Jeong, J.B., Jun, L.J., Park, K.Y., Kim, K.H., Chung, J.K., Komisar, J.L. and Jeong, H.D.: *Asymptomatic iridovirus infection in various marine fishes detected by a 2-step PCR method*. Aquaculture, 255: 30-38, 2006.
- Klinger, R., Francis-Floyd, R., Slaughter, J. and Watson, C.: *Iridovirus in gouramis*. University of Florida, Instituet of Food and Agricultural Sciences. Florida Cooperative Extension Service, FA-30, 1996.
- Paperna, I., Vilenkin, M. and de Matos, A.P.: *Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish*. Dis. Aquat. Org., 48: 17-25, 2001.
- Rodger, H.D., Kobs, M., Macartney, A. and

- Frerichs, G.N.: Systemic iridovirus infection in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Liechtenstein). J. Fish Dis., 20: 69-72, 1997.
- Sudthongkong, C., Miyata, M. and Miyazaki, T.: Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. Dis. Aquat. Org., 48: 163-173, 2002a.
- Sudthongkong, C., Miyata, M. and Miyazaki, T.: Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. Arch. Virol., 147: 2089-2109, 2002b.

Manuscript Received : November 07, 2006

Revision Accepted : November 20, 2006

Responsible Editorial Member : Jung-Woo Park
(Ulsan Univ.)