

## Pearl Gourami (*Trichogaster leeri*)로부터 분리한 Iridovirus의 유전적 특성과 병원성 분석

김호열 · 정준범 · 전려진 · 윤소혜 · 조혜진 · 정현도\*

부경대학교 수산생명의학과

Genomic Characterization and Pathogenicity of Iridovirus Isolated from Pearl Gourami (*Trichogaster leeri*). Ho Yeoul Kim, Joon Bum Jeong, Lyu Jin Jun, So Hye Yoon, Hye Jin Cho and Hyun Do Jeong\*. *Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

**Abstract** In the survey of the samples infected by iridovirus, we found the natural outbreak of iridovirus disease in the ornamental fish, pearl gourami (*Trichogaster leeri*) in Korea. It was characterized by the appearance of enlarged cells and necrosis in the observation of the imprinted spleen cells under iridovirus. To determine the infection of iridovirus more accurately, PCR using 2 different primer sets for MCP and ATPase gene used for the diagnosis of iridovirus infection was done and found the produced fragments matched with the size of expectation. Partially determined nucleotide sequences of the MCP gene of the iridovirus isolated in this study showed very high homology (99.6%) with that of ISKNV as a reference strain. In challenge experiment with the iridovirus isolated from the moribund of pearl gourami, the pathogenicity of the isolated iridovirus was confirmed and suggested the potential of the risk associated the transfer of iridovirus from the ornamental fishes to the marine culturing fishes.

**Key words :** ISKNV, iridovirus, pearl gourami, ornamental fish

### 서 론

국내의 양식 해산어에서 많은 피해를 입히고 있는 대표적인 바이러스성 질병은 iridovirus의 한 종인 red sea bream iridovirus (RSIV)라는 원인체에 의한 red sea bream iridoviral disease (RSIVD)로서 매우 급성적이고, 전염성이 강한 어류 질병으로 밝혀져 있다[8]. 최근에 와서 iridovirus의 유전자 map에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으며, lymphocystis disease virus-1 (LCDV-1), tiger frog iridovirus (TFV), Singapore grouper iridovirus (SGIV), grouper iridovirus (GIV), orange-spotted grouper iridovirus (OSGIV), red sea bream iridovirus (RSIV), rock bream iridovirus (RBIV) 그리고 infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) 등에 대한 전체 유전자 염기서열이

이미 밝혀져 있다 [3,4,5,11,15,17,19].

Iridoviruses 간의 유전적 특성 비교 연구에서, 대만의 농어, 홍콩의 점농어, 그리고 일본의 돌돔에서 분리한 iridoviruses의 genome에 대한 제한효소 절단조각의 pattern이 매우 유사하여 single origin에 대한 가능성이 제시되었다 [12]. 그러나 여러 다른 지역의 해산어에서 분리한 iridovirus virion들이 크기 등에서 모두 차이가 있는 것으로 알려져 있어 [7], 해산어 iridovirus 뿐만 아니라 담수어에서 나타나는 iridovirus까지도 많은 변이를 나타낼 수 있는 가능성이 존재한다.

최근 중국이나 일본 등으로부터 우리나라로 수입되는 수산물에서의 규제 대상 질병들에 대한 연구는 체계적으로 실행되고 있지만, 제도적인 규제 없이 무분별하게 수입되는 담수 관상어에 대한 질병 조사

\* Corresponding author

Phone: +82-51-620-6143, Fax: +82-51-628-7430

E-mail: jeonghd@pknu.ac.kr

는 전무한 상황이다. 더구나 대형 할인마트, 수족관, 아쿠아리움 등의 증가와 더불어 그에 따른 관상어의 수요도 많아지고 있으며, 고가의 어종들이 대부분인데 비해서, 질병에 의한 폐사가 발생했을 때 전문적인 연구에 의한 진단이나 대책 마련에 있어서는 매우 열악한 조건하에 있다. 또한 담수 관상어에 대한 진단 및 질병 대책 마련은 양식 어류에 대한 질병 전이의 위험성 제고라는 측면에서도 매우 중요한 사안이라 할 수 있다.

일본의 dwarf gourami (*Colisa lalia*)와 African lampeye (*Apocheilichthys normani*)를 대상으로 관상어 iridovirus의 병원성이 보고된 이후 [16], 이스라엘에서도 담수 관상어 iridovirus에 대한 보고가 있었으며 [13] 이들은 이스라엘의 gourami (*Trichogaster* spp.), swordtail (*Xiphophorus hellerii*), platy (*Xiphophorus maculatus*), mollies (*Poecilia latipinna*) 그리고 scalare (*Pterophyllum scalarae*) 등의 여러 담수 관상어에서 발생한 iridovirus를 전자현미경적으로 관찰하여 보고하였다. 이러한 외국의 담수 관상어 iridovirus 감염증에 대한 피해 보고에도 불구하고 우리나라의 담수 관상어에 대한 iridovirus 감염증에 대한 연구 및 보고는 전무한 실정이다. 특히 우리나라의 담수 관상어는 동남아시아의 싱가포르에서 많이 수입하고 있으며, 최근에는 중국으로부터도 담수관상어의 수입이 증대되고 있다. 이와 같은 국내의 무분별한 담수 관상어 수입 실태와 외국의 담수어 iridovirus 감염 상황으로 미루어 볼 때, 국내의 담수 관상어에서도 상당한 수가 iridovirus에 감염되어 있을 거라고 추정되므로, 우리나라에서 유통되고 있는 iridovirus의 감염 실태를 파악하기 위한 기초자료가 준비되어 있어야 한다.

본 연구에서는 국내 도매상으로부터 담수 관상어인 pearl gourami (*Trichogaster leeri*)를 구입하여 iridovirus에 의한 감염을 조직학적 관찰과 PCR로서 확인하였고, 유전자 분석을 통해 수입된 pearl gourami로부터 분리한 iridovirus의 근원 (source)에 대한 분류학적 접근을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### Fish sampling

2004년 1월에 국내 관상어 도매상으로부터 pearl

gourami (*Trichogaster leeri*) (b.w. 4.5 g)를 구입하였다. Iridovirus 감염을 광학 현미경적 관찰과 PCR로서 확인하였고, 감염이 확인된 pearl gourami의 비장은 사용전까지 -70°C에 보관하였다.

### 병리 조직학적 관찰

Pearl gourami의 간 조직을 약 5mm의 두께로 잘라 부완액 (Bouin's solution), 10%중성 포르말린 (BNF), zenker solution에 1차 고정하고, 24시간 동고정액에 2차 고정을 실시하였다. 2차 고정 후 24시간에 수세하고, 70%에서 100% 순차 농도 알코올에 탈수를 하였다. 자일렌 (xylene)을 사용하여 파라핀 친화를 시키고, 파라핀 포매 후 microtome (Reichert-Jung 820, Leica)을 사용하여 약 5 $\mu$ m 두께의 박편을 얻었다. 이것을 Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 비장 조직을 slide glass에 imprinting시켰으며, H & E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### Viral nucleic acids의 분리

감염어의 비장 1 mg을 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 350  $\mu$ l에 넣어서 Pellet pestle<sup>®</sup> motor (Sigma-Aldrich)를 이용하여 분쇄시킨 후, 8000 × g, 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS) 40  $\mu$ l와 10 mg/ml proteinase K (Roche, Mannheim, Germany) 10  $\mu$ l를 첨가하여 37°C, 1시간 동안 반응시키고, 동량의 phenol-chloroform을 사용하여 2번 추출 후, 0.3 M sodium acetate와 2배 volume의 ethanol을 사용하여 침전시켰다. 4°C, 12000×g, 10분간 원심분리 후, pellet에 TE buffer 50  $\mu$ l를 첨가하여 현탁시켰고, 추출된 DNA는 사용전까지 -70°C에서 보관하였다.

### PCR

Pearl gourami로부터 iridovirus를 검출하기 위해 GenBank에 등록되어 있는 ISKNV와 RSIV의 MCP gene과 ATPase 등을 기초로 2개의 primer sets를 제작하여 PCR test에 사용하였다 (Table 1). 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (w/v)

**Table 1.** PCR primers used in this study

Target region	Primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size of amplicons	GenBank accession number
MCP gene	M1F	GCATGTATGCTGTTTAGACA	1830 bp	AB018418 (He et al., 2001)
	M1R	GAGCATCAAGCAGGCGATCT		
ATPase gene	A3F	CAAACCACAGCGCGGCAAGT	563 bp	AB007367 (Kurita et al., 1998)
	A3R	AGTAGCGCACCATGTCTCTCC		

gelatin, 0.5% Tween-20, 200  $\mu$ M의 각 dNTP, 1  $\mu$ M의 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 혼합물 최종 volume이 50  $\mu$ l가 되게 하였다. PCR amplification 조건은 다음과 같다. 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 30 cycles를 반응시켰다. 그 후, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 extension시켰다. PCR 후 증폭된 산물은 0.5  $\mu$ g/ml Ethidium Bromide가 첨가된 1% agarose gel을 이용하고, 0.5 $\times$  TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 완충액으로 하여, 전기영동을 실시하였다. 대조구로는 2000년도에 해산어로부터 분리된 iridovirus Sachun strain을 사용하였다[9].

### 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 염기서열을 밝혔다. 염기서열은 Clastal W program (Thompson et al., 1994)을 사용하여 multiple alignment하고, MEGA2 program (Version 2.1. Department of Biology, Arizona State University, Tempe, AZ, USA)으로 계통적 분석을 실시하였다.

### 공격 실험

Iridovirus의 감염이 확인된 pearl gourami의 비장 조직을 분쇄하여 그 조직 분쇄물을 접종액으로 사용하였다. 평균 체중 4 g의 pearl gourami를 구입하여

PCR로서 iridovirus에 감염되지 않은 것을 확인한 후 실험어로 사용하였다. Iridovirus 감염조직 분쇄물을 1 mg/fish, 10  $\mu$ g/fish, 0.1  $\mu$ g/fish 그리고 0.001  $\mu$ g/fish 농도로 각 group별 15마리씩 사용하여 근육 주사하였다. 25 $^{\circ}$ C의 수온을 유지하였고, 공격 실험 후 20일간 폐사를 관찰하였다. 환수 2시간 전 사료를 투여하였고, 1일 1회 사육수를 환수시켰다. 매일 폐사 정도를 확인하고, 폐사어의 비장으로부터 total nucleic acids를 분리하여 PCR 및 병리 조직학적 관찰로서 iridovirus 감염 여부를 확인하였다.

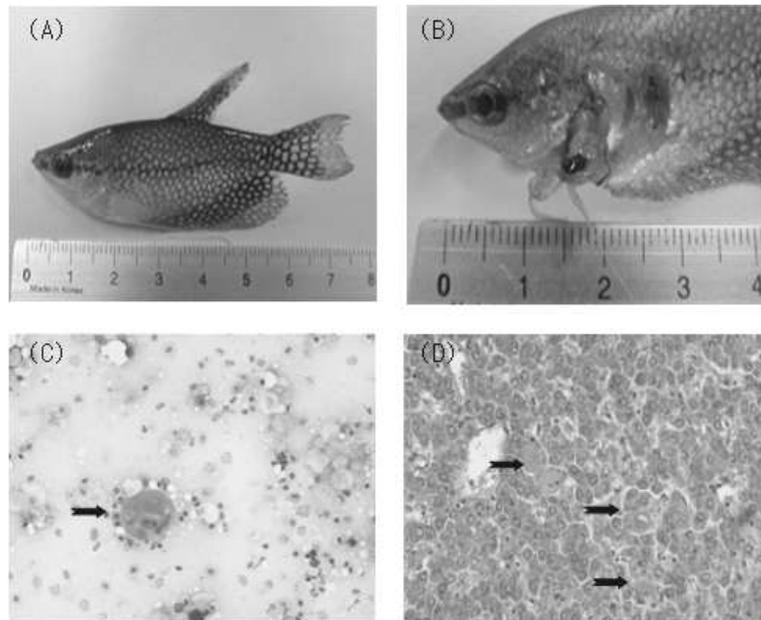
## 결 과

### 감염어의 병리 조직학적 관찰

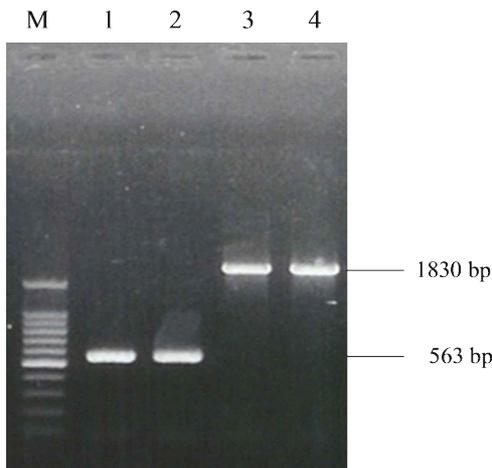
2004년 1월에 국내 관상어 도매상에서 구입한 pearl gourami (*Trichogaster leeri*)는 외견상 체색후화를 나타내었고, imprinting시킨 비장과 고정시킨 간 조직을 광학현미경으로 관찰한 결과, iridovirus 감염의 특징적 증상인 비정형거대세포가 관찰되었다 (Fig. 1).

### Iridovirus의 염기서열 비교

Pearl gourami로부터 iridovirus의 검출을 위해 PCR 방법을 사용하였으며, GenBank에 등록되어 있는 MCP gene과 ATPase gene 등으로부터 primer sets를 제작하여 실험에 사용하였다 (Table 1). 병리 조직학적으로 iridovirus에 감염된 것으로 추정되는 pearl gourami의 spleen에서 분리된 total DNA를 template으로 사용하고 2개의 primer sets 각각을 사용하여 PCR을 실시한 결과, ATPase gene과 MCP gene 모두에서 대조구 (iridovirus Sachun)와 마찬가지로 각각 563 bp, 1830 bp에 이르는 특이적인 bands가 나타났다 (Fig. 2). 각각의 PCR bands는 모두 정제하여 cloning 시킨 후 염기서열을 밝혀서 분석하였고, GenBank에 등록되어 있는 reference iridoviruses의 ATPase gene,



**Fig. 1.** Pearl gourami (*Trichogaster leeri*) infected by iridovirus in natural conditions. (A), Pearl gourami showing the dark body coloration; (B), swelled spleen; (C), enlarged cell (arrow) in the imprinted spleen; (D), enlarged cells (arrow) in the liver. Hematoxylin and Eosin (H & E) stain, × 400.



**Fig. 2.** Amplification of DNA of iridoviruses using PCR with A3F/A3R (Lane 1, 2) and M1F/M1R (Lane 3, 4) primer set, respectively. Template for Lane 1 and 3 is the total DNA isolated from the spleen of pearl gourami (*Trichogaster leeri*) infected by iridovirus. Template for Lane 2 and 4 is the total DNA isolated from the spleen of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) infected by iridovirus Sachun. M, 100 bp DNA ladder.

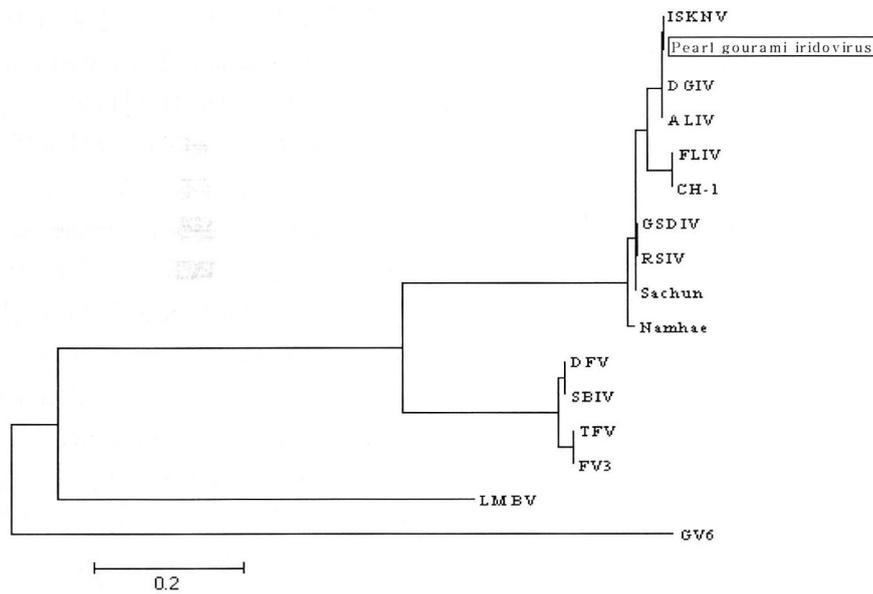
MCP gene과의 유사성을 비교하였다. Pearl gourami에서 분리된 iridovirus의 MCP gene과 ATPase gene 부위의 염기서열을 분석한 결과, 홍콩의 mandarin-fish (*Siniperca chuatsi*)에서 분리된 ISKNV와 99% 이상의 매우 높은 상동성을 나타내었고, 그 외 해산어

**Table 2.** Similarities (%) of the nucleotide (amino acids) sequences of the ATPase and MCP gene between pearl gourami (*Trichogaster leeri*) iridovirus of this study and other reference iridoviruses

Host	Virus <sup>a</sup>	Homology with pearl gourami iridovirus (%)	
		ATPase gene	MCP gene
Freshwater fish	ISKNV	99.8 (100)	99.6 (99.5)
	DGIV	92.2 (100)	98.2 (99.3)
	ALIV	95.7 (98.9)	98.4 (99.5)
	GV6	ND	57.0 (52.1)
	DFV	ND	57.0 (52.1)
	LMBR	95.9 (99.4)	52.9 (26.9)
Seawater fish	SBIV	95.3 (99.4)	94.4 (98.4)
	GSDIV	95.9 (99.4)	94.4 (98.4)
	FLIV	ND	93.7 (98.0)
	RSIV	94.8 (98.9)	94.5 (98.3)
	Sachun	95.3 (99.3)	94.5 (98.2)
	Namhae	95.9 (98.9)	94.5 (98.0)
	CH-1	96.0 (98.3)	93.8 (98.2)
Amphibian	TFV	63.2 (52.6)	93.8 (46.5)
	FV3	62.9 (46.2)	93.8 (46.5)

ND: no data in GenBank.

<sup>a</sup> ISKNV, infected spleen kidney necrosis virus; DGIV, dwarf gourami iridovirus; ALIV, african lampeye iridovirus; GV6, guppy iridovirus; DFV, doctorfish virus; LMBV, large mouse bass ranavirus; SBIV, seabass iridovirus; GSDIV, grouper sleepy disease iridovirus; FLIV, flounder iridovirus; RSIV, red sea bream iridovirus; Sachun, iridovirus Sachun; Namhae, iridovirus Namhae; CH-1, iridovirus CH-1; TFV, tadpole edema virus; FV3, frog virus 3.

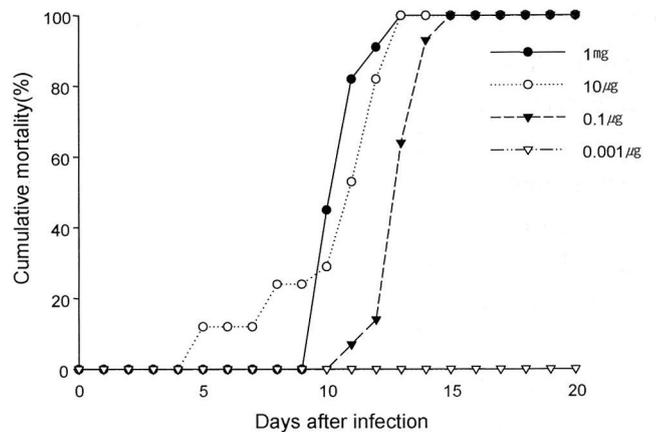


**Fig. 3.** Phylogenetic tree of MCP genes of various iridoviruses. Phylogenetic relationship was inferred using MEGA2 program. Branch lengths are proportional to the nucleotide differences.

유래 iridoviruses인 RSIV, Sachun strain과는 90% 이상의 상동성을 나타내었다 (Table 2). 이러한 결과는 pearl gourami에서 분리한 iridovirus와 reference iridoviruses의 MCP gene 염기서열을 비교하여 분류학적 관계를 계통수로서 나타낸 것과 일치하였다 (Fig. 3). 즉, mandarinfish에서 분리된 ISKNV와 pearl gourami에서 분리된 iridovirus는 가장 유사했으며, 다른 관상어에서 분리된 DGIV 및 ALIV와도 매우 유사하게 나타났다.

**Pearl gourami에 대한 병원성 분석**

Iridovirus 감염이 확인된 pearl gourami의 비장 조직을 사용하여 pearl gourami에 대한 공격 실험을 실시하였으며, 감염 비장 분쇄물을 1 mg/fish, 10 µg/fish, 0.1 µg/fish 그리고 0.001 µg/fish의 4가지 농도로 15마리씩 pearl gourami에 근육 주사하였다 (Fig. 4). 1 mg/fish group에서는 주사 후 10일째 첫 폐사어가 나타났고, 13일째에 100%의 누적 폐사율을 나타내었다. 10 µg/fish group에서는 주사 후 5일째부터 폐사어가 나타났으며, 13일째에 100%의 누적 폐사율을 나타내었다. 0.1 µg/fish group에서는 주사 후 11일째부터 폐사어가 나타났으며, 15일째에 100% 폐사하였다. 가장 저농도인 0.001 µg/fish group에서는 폐사어가 나타나지 않았다.



**Fig. 4.** Cumulative mortality of pearl gourami (*Trichogaster leeri*) challenged by muscular injection with different amount of the spleen homogenate prepared from the pearl gourami of natural outbreaks.

**고 찰**

담수 관상어에서 lymphocystis disease virus (LCDV)에 대한 보고가 처음 이루어진 이후 [14], 담수 관상어에 대한 iridovirus 감염증에 대한 연구는 활발히 이루어져 왔으며, 특히 외래 담수 관상어의 iridovirus 감염증에 대한 연구는 지난 몇 년간 캐나다와 미국, 동남아시아 등의 여러 지역에서 보고되었고, 경제적 손실 또한 심각한 실정이다 [1,2,6]. 이러한 외국의 담수관상어에서 iridovirus 감염증에 대한 피

해 보고에도 불구하고 우리나라의 담수관상어에 대한 iridovirus 감염증에 대한 연구 및 보고는 전무한 실정이다. 특히 대부분의 담수관상어를 수입에 의존하고 있는 우리나라의 실정으로 볼 때, iridovirus 감염증에 대한 위험성은 더욱 크다고 할 수 있다.

본 연구에서는 국내 관상어 도매상에서 구입한 pearl gourami (*Trichogaster leeri*)로부터 iridovirus의 감염을 PCR로서 확인하였으며, PCR positive인 sample의 비장 조직을 H & E 염색하여 조직병리학적으로 관찰한 결과 iridovirus 감염의 가장 특징적 증상 중 하나인 비대세포가 관찰되었다. Iridovirus 감염의 정확한 진단을 위한 PCR test에서 positive 결과로서 나타난 ATPase gene과 MCP gene 부위의 amplicon을 이용한 염기서열 비교에서 pearl gourami로부터 분리된 iridovirus는 이전에 mandarinfish (*Siniperca chuatsi*)에서 분리된 ISKNV와 99.6% 이상의 매우 높은 상동성을 나타내었다 (Table 2).

Pearl gourami에서 분리된 iridovirus의 병원성을 알아보기 위해서 PCR positive 반응을 나타내는 pearl gourami의 비장 분쇄물을 100배씩 단계 희석하여 건강한 pearl gourami에 근육 주사를 통해 농도별로 감염 test를 실시하였으며, 가장 낮은 농도인 0.001  $\mu$ g/fish group에서는 폐사가 나타나지 않았지만, 나머지 1 mg/fish, 10  $\mu$ g/fish 그리고 0.1  $\mu$ g/fish groups의 실험어는 주사 후 15일 이내에 100% 폐사하였다. 이것은 pearl gourami에서 분리된 ISKNV가 높은 병원성을 가진다는 것을 제시하고 있다. 현재 국내 관상어 시장에서 경제적 손실을 야기시킬 수 있는 것으로 나타난 ISKNV 감염과 분포에 대한 체계적인 분석과 자료는 되어 있지 않다. 담수 관상어에 대한 iridovirus의 감염은 iridovirus 감염에 민감한 양식어류로의 전이 가능성이란 더욱 큰 잠재적인 위험성을 내포하고 있으므로, 담수 관상어에 대한 체계적인 질병 관리가 체계적으로 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서는 대표적인 관상어인 pearl gourami에서의 iridovirus 감염을 PCR과 병리 조직학적인 관찰로서 국내 최초로 확인하였고, 더구나 감염된 iridovirus가 mandarinfish에서만 보고된 ISKNV라는 것 뿐 아니라 그 병원성까지 확인하여 국내 양식 산업에 대한 위험성 제고를 하게 하였다.

## 요 약

본 연구에서는 비장 내의 비대해진 세포 존재와

조직 괴사라는 병리조직학적 관찰에 의하여 우리나라의 pearl gourami (*Trichogaster leeri*)에서 iridovirus에 의한 자연 감염이 나타남을 확인하였다. 이러한 iridovirus 감염을 더욱 정확하게 진단하기 위해서 iridovirus 감염 진단에 주로 사용되는 MCP와 ATPase gene 부위에서 2 primer sets를 제작하여 PCR을 실시한 결과, PCR 생성물은 기대한 size와 부합하게 나타났고, MCP gene 부위의 염기서열은 reference strain인 ISKNV와 매우 높은 유사성 (99.6%)을 보였다. 공격 실험을 통하여 pearl gourami에서 분리된 iridovirus의 병원성을 확인하였고, 무분별한 관상어 관리에 의하여 관상어로부터 양식어류에로의 질병 전이가 나타남으로서 일어날 수 있는 국내 양식 산업에 대한 위험성을 제시하였다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부 Marine Bio 21 Center의 Marine Process Research Center로부터의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Anderson, I. G., Prior, H. C., Rodwell, B. J. and Harris, G. O. 1993. Iridovirus-like virions in imported dwarf gourami (*Colisa lalia*) with systemic amoebiasis. *Aust. Vet. J.* **70**, 66-67.
- Armstrong, R. D. and Ferguson, H. W. 1989. Systemic viral disease of the chromide cichlid *Etroplus maculatus*. *Dis. Aquat. Org.* **7**, 155-157.
- Do, J. W., Moon, C. H., Kim, H. J., Ko, M. S., Kim, S. B., Son, J. H., Kim, J. S., An, E. J., Kim, M. K., Lee, S. K., Han, M. S., Cha, S. J., Park, M. S., Park, M. A., Kim, Y. C., Kim, J. W. and Park, J. W. 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology* **325**, 351-363.
- He, J. G., Deng, M., Weng, S. P., Li, Z., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z. and Chan, S. M. 2001. Complete genome analysis of the mandarinfish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology* **291**, 126-139.
- He, J. G., Zeng, K., Weng, S. P. and Chan, S. M. 2002. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture* **204**, 11-24.
- Hedrick, R. P. and McDowell, T. S. 1995. Properties of iridoviruses from ornamental fish. *Vet. Res.* **26**, 423-427.
- Hyatt, A. D., Gould, A. R., Zupanovic, Z., Cunningham, A. A., Hengstherger, S., Whittington, R. J., Kattenbelt, J. and Coupar, B. E. 2000. Comparative studies of piscine

- and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.* **145**, 301-331.
8. Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M. 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.* **27**, 19-27 (in Japanese with English abstract).
  9. Jeong, J. B., Jun, L. J., Yoo, M. H., Kim, M. S., Komisar, J. L. and Jeong, H. D. 2003. Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture* **220**, 119-133.
  10. Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I. and Aoki, T. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.* **33**, 17-23.
  11. Lu, L., Zhou, S. Y., Chen, C., Weng, S. P., Chan, S. M. and He, J. G. 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology* **339**, 81-100.
  12. Miyata, M., Matsuno, K., Jung, S. J., Danayadol, Y. and Miyazaki, T. 1997. Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J. Fish Dis.* **20**, 127-134.
  13. Paperna, I., Vilenkin, M. and de Matos, A. P. 2001. Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Dis. Aquat. Org.* **48**, 17-25.
  14. Rasin, K. 1927. Príspevek k pathogenesi Lymphocytis johnstonei Woodcock. I. Biologické spisy Vysoké Zverolekarské Brno. **6**, 11-38 (Biological Abstract 1931, No. 24008).
  15. Song, W. J., Qin, Q. W., Qiu, J., Huang, C. H., Wang, F. and Hew, C. L. 2004. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis. *J. Virol.* **78**, 12576-12590.
  16. Sudthongkong, C., Myata, M. and Miyazaki T. 2002. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis. Aquat. Org.* **48**, 163-173.
  17. Tidona, C. A. and Darai, G. 1997. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. *Virology* **230**, 207-216.
  18. Tompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Clustal W : Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
  19. Tsai, C. T., Ting, J. W., Wu, M. H., Wu, M. F., Guo, I. C. and Chang, C. Y. 2005. Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. *J. Virol.* **79**, 2010-2023.