

2014년 제주도 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에 대한 VHS 및 RSIVD 모니터링

박현경 · 김승민 · 이다원 · 전려진* · 정준범†
(제주대학교 해양의생명과학부 · *제주대학교 수산백신연구센터)

Monitoring of VHS and RSIVD in cultured *Paralichthys olivaceus* of Jeju in 2014

Hyun-Kyung PARK · Seung-Min KIM · Da-Won LEE · Lyu-Jin JUN* · Joon-Bum JEONG†
(Faculty of Marine Biomedical Science, Jeju National University · *Fish Vaccine Resarch Center,
Jeju National University)

Abstract

The outbreak of viral diseases caused by viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and red seabream iridovirus (RSIV) have been reported in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. VHSV has been a serious viral disease that infects the olive flounders in South Korea. Clinical signs of VHSV infection are skin darkening, abdominal distension and haemorrhages. Outbreaks of fish iridoviral disease was first reported from red seabream, *Pagrus major* farms in Japan. Recently, iridovirus infection have occurred frequently from olive flounder farms in South Korea.

In this study, disease surveillance was performed to monitor the prevalence of VHSV and RSIV in olive flounder in 2014. The samples were collected from 60 different olive flounder farms in Jeju from April, May, September, November and December in 2014. RT-PCR (VHSV) or PCR (RSIV) results showed that VHSV were detected in 5 farms, but RSIV has not been detected in any farms. The migration of olive flounder was restricted for the quarantine in 5 farms of VHS outbreak. The nucleocapsid protein (N) gene and glycoprotein (G) gene sequences of the 5 Korean VHSV isolates were successfully amplified and sequenced. Phylogenetic analysis was performed using the VHSV sequences reported here together comparison with the nucleotide sequences available from the GenBank database. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSV belong to the genotype IVa and closely related to the strains from Japan and China.

Key words : *Paralichthys olivaceus*, VHSV, RSIV, Nucleocapsid protein(N), Glycoprotein(G) gene, Phylogenetic analysis

I. 서론

우리나라 넙치 양식 산업의 주요 거점인 제주 지역은 1980년대부터 시작하여 제주 경제의 기간

산업으로 성장하였으나, 최근에는 난치성 바이러스성 질병에 의한 대량폐사로 양식 생산 시스템의 혼란이 야기되고 있어 양식 산업에 많은 어려

† Corresponding author: 064-754-3426, jeongjb@jejunu.ac.kr

※ 이 논문은 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(수산백신연구센터).

움을 겪고 있다. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 비롯한 해수어류에 질병을 일으키는 바이러스는 viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), red seabream iridovirus (RSIV), viral nervous necrosis virus (VNNV), hiramе rhabdovirus (HRV) 등이 보고되고 있으며, 그 중 우리나라 양식넙치에 빈번히 발생하는 바이러스성 질병으로는 VHSV 및 RSIV에 의한 질병들이 보고되고 있다(Cho et al., 2010).

VHSV는 주로 유럽지역의 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)나 다른 담수어종에서 큰 피해를 주고 있는 바이러스 질병으로 알려져 왔으며, 이후에 담수 연어과 어류 및 유럽과 북미지역의 다양한 해산어류에서도 질병을 유발하는 병원체로 보고되었다(Mortensen et al., 1999). 감염이 확인된 어종으로는 담수 및 해수어류를 포함하여 약 90종에 이르는 것으로 확인되었고(OIE, 2013), 국내의 경우에는 2000년대 이후부터 겨울과 봄의 저수온기에 양식넙치에서 비교적 낮은 빈도로 검출되고 있으며, 감염된 어류에서 체색흑화, 복부팽만, 점상출혈 등의 증상이 관찰된다(Takano et al., 2000; Kim et al., 2003). 또한 VHSV는 nucleocapsid (N), glycoprotein (G) 유전자 염기서열의 계통분류학적 분석을 토대로 4가지 genotype으로 구분하고(Snow et al., 1999; Lumsden et al., 2007), 이들 유전형은 지리적 위치에 따라 Genogroup I (European freshwater and sea fish), Genogroup II (British Isles), Genogroup III (North Atlantic and North America), Genogroup IV (Pacific coast, Atlantic, Great Lakes, Japan and Korea)의 4가지의 유전형이 일반화 되어있으며(Dixon et al., 1997; Einer-Jensen et al., 2004; Dale et al., 2009), 우리나라는 Genogroup IV에 속하는 북미지역과 일본에서 분리되는 바이러스와 유사하다고 밝혀져 있다(Nishizawa et al., 2002; Kim et al., 2003; Lumsden et al., 2007).

RSIV에 의한 질병은 1990년 일본의 참돔(*Pagrus major*) 양식장에서 처음 발병된 후(Inouye

et al., 1992), 한국, 중국, 동남아시아 지역에서 보고되었으며, 25°C 이상의 여름철 고수온기에 발병하는 것으로 확인되었다(Matsuoka et al., 1996). 우리나라에서는 1998년 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 양식장에서 처음 보고된 후 다른 어종인 참돔 및 넙치 양식장에서도 발생하여 국내 양식 산업에 적지 않은 피해를 주고 있다(Do et al., 2005). 현재 계통분석에 의해 4개의 subgroups로 구분하고 있고, subgroup I은 RSIV를 포함하고 있으며, subgroup II는 국내 주요 병원체로서 매년 돌돔 등에 대량폐사를 일으키는 RBIV를 포함하고 있으며(Do et al., 2004), subgroup III은 중국의 쏘가리(*Siniperca scherzeri*)에서 분리된 ISKNV가 대표적이며(He et al., 2001), subgroup IV는 넙치(*P. olivaceus*)와 turbot (*Scophthalmus maximus*)으로부터 분리된 TRBIV로 알려져 있다(Shi et al., 2004).

본 연구에서는 제주지역의 넙치 양식장에서 발생하는 VHS 및 RSIVD에 대한 사전예방 및 확산 방지 등 방역체계 확립에 대한 기초자료를 제공할 목적으로 2014년도 4, 5, 9, 11 및 12월에 60군데 양식장을 대상으로 바이러스성 질병 모니터링을 실시하여 병원체의 감염현황을 조사하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

제주도(제주시/서귀포시)의 60군데 넙치 양식장으로부터 2014년 4, 5, 9, 11 및 12월에 넙치를 수집하였고, VHSV 및 RSIV에 의한 감염현황을 조사하기 위하여 각각의 양식장에서 무작위로 30마리(size 5~600g)를 수거하여 1회에 1,800마리씩 총 9,000마리를 조사하였다.

2. Primer

RSIV의 검출을 위하여 방류수산생물 전염병검

사 실시 요령(국립수산과학원 예규 제84호) 중 RSIVD 정밀검사법에 따라 primer set를 제작하여 PCR 방법에 사용하였다<Table 1>.

VHSV에 대한 primers는 지역 특이적인 계통분류학적 분석을 위해 N-gene의 444 bp forward primer (5'-GAGAGAAGCTGGCCCTGACTG-3')와 reverse primer (5'-ATGATCCGTCTGGCTGACTC-3')를 Cho et al., (2007)의 방법에 따라 제작하였고, G-gene의 1,340 bp forward primer (5'-ACAGATCACTCAACGACC TC-3')와 reverse primer (5'-ATAGTGACG GCCAAAGACTC-3')는 full length open reading frames (ORFs)의 서열을 토대로 본 연구실에서 제작하여 PCR 방법에 사용하였다<Table 1>.

3. DNA 추출

RSIV 감염 진단을 위하여, DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하여 넙치의 비장 조직으로부터 total DNA를 분리하였다. 먼저 각 비장 조직의 10 mg에 ATL buffer 180 µl와 proteinase K 20 µl를 첨가하여 56°C에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 µl를 넣어 섞은 다음 ethanol 200 µl를 더하여 spin column에 옮겨 6,000 g에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 µl와 AW2 buffer 500 µl를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 30 µl를 첨가하여 최종적으로 DNA를 분리하였다. 분리된

DNA는 실험 전까지 -20°C에 보관하였다.

4. RNA 추출 및 cDNA 합성

VHS에 대한 감염 진단을 위하여, 넙치의 신장을 적출하여 시중에 판매되고 있는 Viral RNA Mini kit (Qiagen Hilden, Germany)를 이용해 RNA를 분리하였다. 먼저 각 신장 조직의 10 mg에 nuclease freewater 140 µl를 첨가하여 homogenizer로 마쇄하였다. 균질화 된 샘플은 AVL buffer 560 µl를 넣고 15초간 섞은 다음 실온에 10분간 반응 후, ethanol 560 µl를 더하여 spin column에 옮겨 6,000 g에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 µl와 AW2 buffer 500 µl를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 30 µl를 첨가하여 최종적으로 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 실험 전까지 -20°C에 보관하였다. RT-PCR은 3 µl의 viral RNA, 4 µl의 5 x Reaction buffer, 1 µl의 reverse transcriptase, 1 µl의 dNTP, 1 µl의 Oligo(dT) primer 및 2.4 µl MgCl₂를 넣고 최종 volume이 20 µl가 되도록 nuclease freewater를 첨가한 후, 25°C에서 5분, 42°C에서 1시간, 70°C 15분간 반응시켜 합성하였다.

5. PCR 및 sequencing

PCR은 microtube에 1 µM의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 x G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq

<Table 1> PCR conditions and primer sequences for the detection of virus from the olive flounder of Korea

Target	Oligonucleotide sequences of primer		PCR condition	Product size (bp)
N gene VHSV-N	F	5'-GAGAGAAGCTGGCCCTGACTG-3'	94°C(30")-55°C(45")-72°C(45")	444
	R	5'-ATGATCCGTCTGGCTGACTC-3'		
G gene VHSV-G	F	5'-ACAGATCACTCAACGACCTC-3'	94°C(30")-52°C(30")-72°C(1')	1,340
	R	5'-ATAGTGACGGCCAAAGACTC-3'		
RSIV	F	5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3'	94°C(30")-58°C(60")-72°C(60")	570
	R	5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3'		

*VHSV, viral haemorrhagic septicaemia virus; RSIV, red seabream iridovirus.

DNA polymerase (Gene Pro Themal Cycler Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ l가 되도록 하였고, PCR의 조건은 <Table 1>에 나타내었다. PCR 후 증폭 산물은 1×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 gel상에서 전기영동 한 후, UV 검출기에서 결과를 관찰하였다. PCR 증폭 산물은 Gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용해 정제하여, ToPo TA cloning®kit (Invitrogen, USA)로 cloning하였고, 염

기서열 분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

6. 계통학적 분석

염기서열 계통분석은 BioEdit program의 Clustal W (Thompson et al., 1994)를 사용하여 GenBank에 등록된 N gene의 39개의 분리주<Table 2> 및 G gene의 19개의 분리주<Table 3>와 함께 alignment 하였다. Alignment된 유전자들은 MEGA program version 4.0 (Tamura et al., 2007)의 neighbor joining criteria를 수행하여 염기서열간의 유전적 거리와 계통 분석을 실시하였다.

<Table 2> VHSV Isolates used in this study for comparison of N gene

Virus isolate	Year	Origin	Host fish	Genotype	GenBank Accession No.
VHSV-S05	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
VHSV-DP05	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
VHSV-UR05	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
VHSV-DY11	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
VHSV-DJ12	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
US-mak-wa88	1988	USA	Oncorhynchus kisutch	IVa	X59241
JF00Ehil-JPN	2000	Japan	Olive flounder	IVa	AB490792
KRRV9822-JPN	1998	Japan	Olive flounder	IVa	AB179621
CA-NS04-01	2007	Canada	Brown trout	IVb	HQ168409
CA-NB04-01b	2007	Canada	Brown trout	IVb	HQ168408
CA-NB02-01	2007	Canada	Brown trout	IVb	HQ168407
CA-NB00-02	2007	Canada	Brown trout	IVb	HQ168406
MI03GL	2006	USA	Esox masquinongy	IVb	DQ427105
15-JUL-2009	2009	USA	Esox masquinongy	IVb	GQ385941
CA-NB00-01	2007	Canada	Brown trout	IVb	EF079895
Cod-Ulcus	1979	Denmark	Atlantic cod	I b	Z93414
SE-SVA-14	2009	Sweden	Rainbow trout	I b	GQ325428
SE-SVA-1033	2009	Sweden	Rainbow trout	I b	FJ460591
Heddam-1972	1972	Denmark	Rainbow trout	I	Z93412
UKMLA98/6HE1	2009	Britain	Rainbow trout	I b	GQ325431
DK-1p8	2009	Denmark	Rainbow trout	I b	GQ325430
DK-5e59	2009	Denmark	Rainbow trout	I b	GQ325429
96-43	2000	Britain	Atlantic herring	I b	AF143862
07-71	1997	France	Rainbow trout	I a	AJ233396
FR-07-71	1990	France	Rainbow trout	I a	D00687
KV010308-4	2010	Norway	Rainbow trout	III	FJ362514
BV060408-52	2010	Norway	Rainbow trout	III	FJ362510

2014년 제주도 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에 대한 VHS 및 RSIVD 모니터링

DK-4p37	1997	North sea	Rainbow trout	I b	FJ460590
FA281107	2010	Norway	Rainbow trout	III	EU481506
CH180308-N	2010	Norway	Clupea harengus	I b	GU066860
DK-3592B	1997	Denmark	Rainbow trout	I a	AF012093
FS280208-V	2010	Norway	Rainbow trout	III	GU121102
FS280208-S	2010	Norway	Rainbow trout	III	GU121100
Fil3	1983	Germany	Rainbow trout	I a	Y18263
DE-Fil3-wt	1983	Germany	Rainbow trout	I a	X73873
FR14-58	2000	France	Rainbow trout	I a	AF143863
ON41	2011	USA	Diporeia sp.	IVb	HQ415762
V230308-5	2010	Norway	Rainbow trout	III	FJ362515
860/94	1994	Scotland	Turbot	II	AJ130915
F13.02.97	1997	Ireland	Turbot	II	AJ130916
4p101	1997	Skagerrak	Whiting	II	AJ130918
H17/2/95	1995	North sea	Haddock	II	AJ130924
H16/7/95	1995	North sea	Cod	II	AJ130923
2p51	1996	Skagerrak	Norway pout	II	AJ130917

<Table 3> VHSV Isolates used in this study for comparison of G gene

Virus isolate	Year	Origin	Host fish	Genotype	GenBank Accession No.
VHSV-S05	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
VHSV-DP05	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
VHSV-UR05	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
VHSV-DY11	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
VHSV-DJ12	2014	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
CHN-PORV	2005	China	Olive flounder	IVa	KC685626
JF00Ehil-JPN	2000	Japan	Olive flounder	IVa	AB490792
JP990Obama25	1999	Japan	Olive flounder	IVa	DQ401191
Makah	1988	USA	Coho salmon	IVa	U28747
U13653	2005	Canada	Drum	IVb	HQ453209
CA-NB00-01	2000	Canada	Mummichog	IVb	EF079896
CA-NS04-01	2004	Canada	Brown trout	IVb	EF079899
DK-200070-4	2000	Denmark	Rainbow trout	I a	AY546612
DK-204022	2004	Denmark	Rainbow trout	I a	JF681347
DK-204038	2004	Denmark	Rainbow trout	I a	JF681342
DK-204062	2004	Denmark	Rainbow trout	I a	JF681314
JP96KRRV9601	1996	Japan	Rainbow trout	I b	DQ401190
DK-6p403	1999	Denmark	Herring	I b	AY546584
DK-1p52	1996	Baltic sea	Sprat	II	AY546576
DK-1p53	1996	Baltic sea	Herring	II	AY546577
DK-1p55	1996	Baltic sea	Sprat	II	AY546578
DK-4p168	1997	Skagerrak	Herring	III	AY546582
IR-F13.02.97	1997	Ireland	Turbot	III	AY546620
FR-L59X	1987	France	Eel	III	AY546618

III. 결과 및 고찰

우리나라의 대표적 양식 어종인 넙치는 최근에 국내 양식 현장에서 바이러스성 질병에 대한 관심이 증가하면서 바이러스성 병원체에 대해 많이 보고되고 있지만, 아직 국내의 바이러스성 질병 예방 및 치료에 대한 역학적 연구는 부족한 실정이며, 이로 인하여 예방 및 방역조치도 어려운 실정이다.

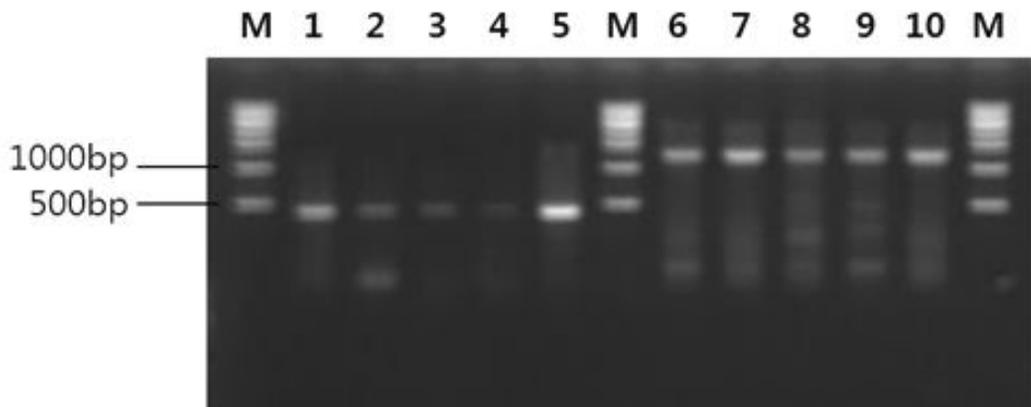
이에 본 연구에서는 우리나라 넙치 양식 산업의 주요 거점인 제주도의 60군데 넙치 양식장을 대상으로 2014년 4, 5, 9, 11 및 12월에 바이러스성 질병 모니터링을 실시하여, 방역 대상 질병인 VHS 및 RSIVD에 대한 감염현황 및 분리된 바이러스에 대한 계통분석학적 비교를 실시하여 질병 발생의 사전예방 및 방역체계 확립에 대한 기초 자료를 조사하고자 하였다.

VHS에 대한 감염검사 결과, 5월 3군데(5%), 11월 1군데(1.6%), 12월 1군데(1.6%) 등 총 5군데의 양식장에서 VHSV가 검출되었고([Fig. 1], <Table 4>), 검출된 각 양식장의 30마리 넙치에 대한 VHSV 검출율은 6.6~33.3%인 것으로 나타났다(data not shown). 그 중 넙치의 크기가 15cm 미만인 치어 및 30cm 이상인 성어에서도 검출되었

다. 이러한 결과는 넙치의 치어 뿐만 아니라 성어에서도 VHSV에 의한 피해가 발생한다는 Kim et al., (2009)의 사례 내용과도 일치하고 있다.

VHSV가 검출된 5월, 11월 및 12월의 평균수온은 16~18℃였으며, 14℃에서 VHSV의 최적 증식이 이루어지며, 6~18℃에서도 VHSV의 증식이 가능하다는 보고와 일치하였다(MEST, 2010). 수온의 변동이 심한 봄철과 겨울로 넘어가는 시기에 발병하는 것으로 보아 수온의 변동에 따른 어류의 스트레스로 인한 면역체계의 활성 저하가 감염 발생에 관여하는 것으로 여겨진다.

넙치에서의 RSIVD에 대한 감염은 남해안 및 동중국해에서 서식하는 자연산 어류와 양식 넙치에서 검출되었으나(Do et al., 2005; Lee et al., 2007), 최근에는 넙치에서의 RSIV의 검출에 대한 보고가 거의 전무한 실정이다. 본 연구의 RSIVD에 대한 모니터링 결과, 조사기간 동안 RSIV가 검출되지 않았고<Table 4>, 전형적인 RSIV에 의한 감염증상도 관찰되지 않았다(data not shown). 이는 제주지역에서의 RSIVD에 대한 예방 및 관리가 양호한 것으로 평가할 수 있으며, 특정 질병에 대한 청정화 지역을 증명할 수 있는 기초자료가 될 것으로 판단된다.



[Fig. 1] Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, VHSV-S05; Lane 2 and 7, VHSV-DP05; Lane 3 and 8, VHSV-UR05; Lane 4 and 9, VHSV-DY11; Lane 5 and 10, VHSV-DJ12; M, 1 kb DNA ladder.

<Table 4> Distribution of virus infection in cultured olive flounder in 2014

Pathogens	Detection rate (%) (No. of positive / No. of farms)				
	April	May	September	November	December
VHSV	0 (0/60)	5 (3/60)	0 (0/60)	1.6 (1/60)	1.6 (1/60)
RSIV	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)

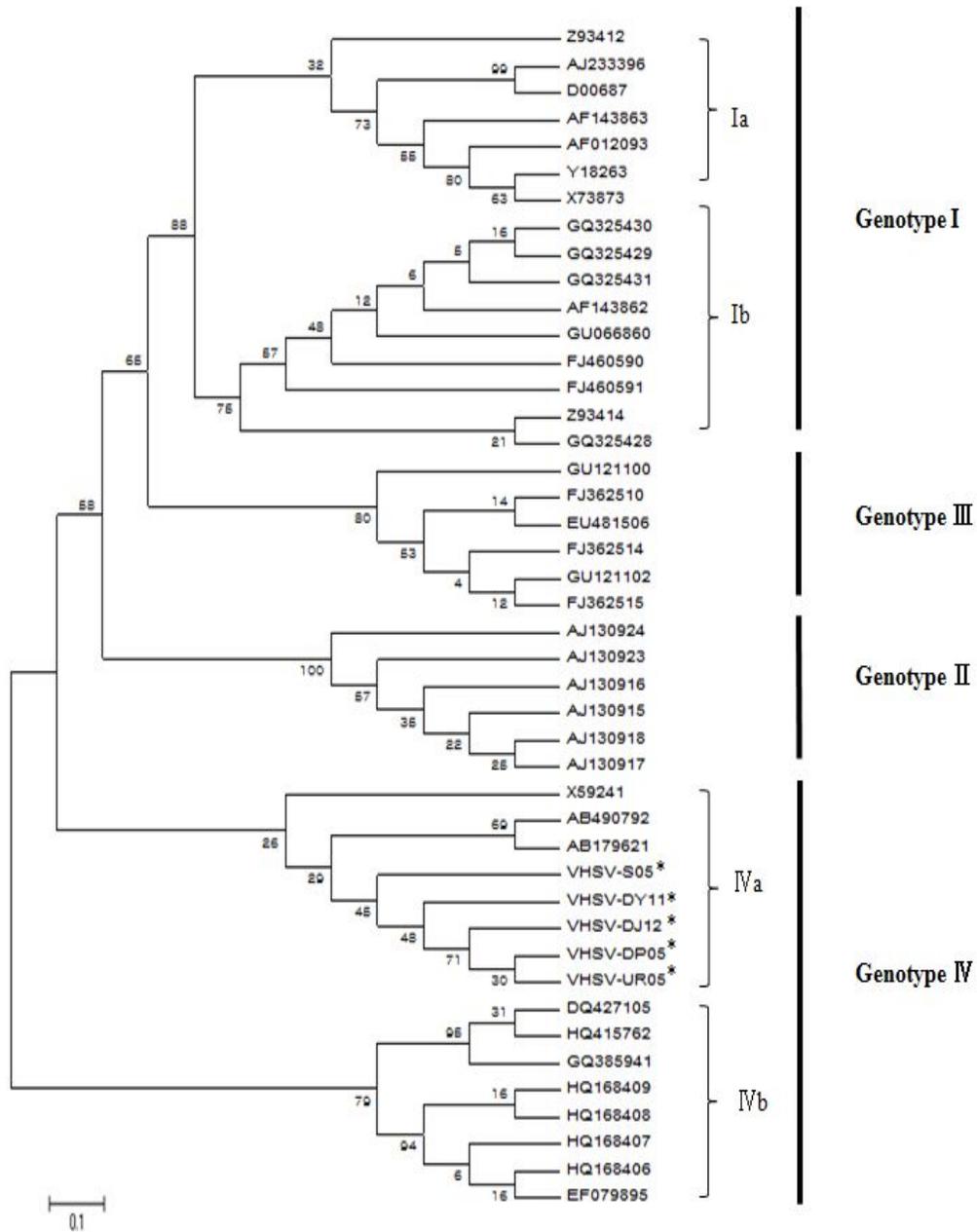
VHSV의 N gene (444 bp) 및 G gene (1,340 bp) primer set를 각각 사용한 RT-PCR 방법을 통해 검출된 5개의 분리주는 VHSV-S05, VHSV-DP05, VHSV-UR05, VHSV-DY11 및 VHSV-DJ12로 각각 표기하였고, N gene에 비하여 G gene의 primer set를 사용하였을 때 전체적으로 PCR 검출 감도가 높은 것으로 나타났다[Fig. 1]. 그리고 GenBank database로부터 얻은 39개의 N gene과 19개의 G gene의 염기서열은 Rhabdovirus의 유전자 중 계통분석에 있어서 적절한 유전자로 보고된 자료를 사용하여 비교 분석하였다(Bourhy et al., 1992).

N gene을 사용한 계통분류학적 분석 결과, 5개의 분리주는 모두 genotype IVa에 속한 것으로 분석되었다[Fig. 2]. VHSV genotype IV는 북미 지역과 아시아 지역의 분리주가 포함된 IVa와 IVb subgroups로 구분되며, 5개의 분리주는 국내에서 보고된 VHSV 유전형인 genotype IVa와 일치하는 것으로 조사되었다(Snow et al., 1999; Einer-Jensen et al., 2004; Lumsden et al., 2007). 또한, 국내에서 동정된 5개의 분리주는 일본에서 보고된 분리주(accession number: AB179621, AB490792)와 계통분류학적으로 유사한 것으로 확인하였다[Fig. 2]. 이는 Nishizawa et al., (2002)의 보고와 일치하였으며, 일본의 분리주와 특이적인 염기서열을 비교한 결과, 국내에서 동정한 5개의 분리주와

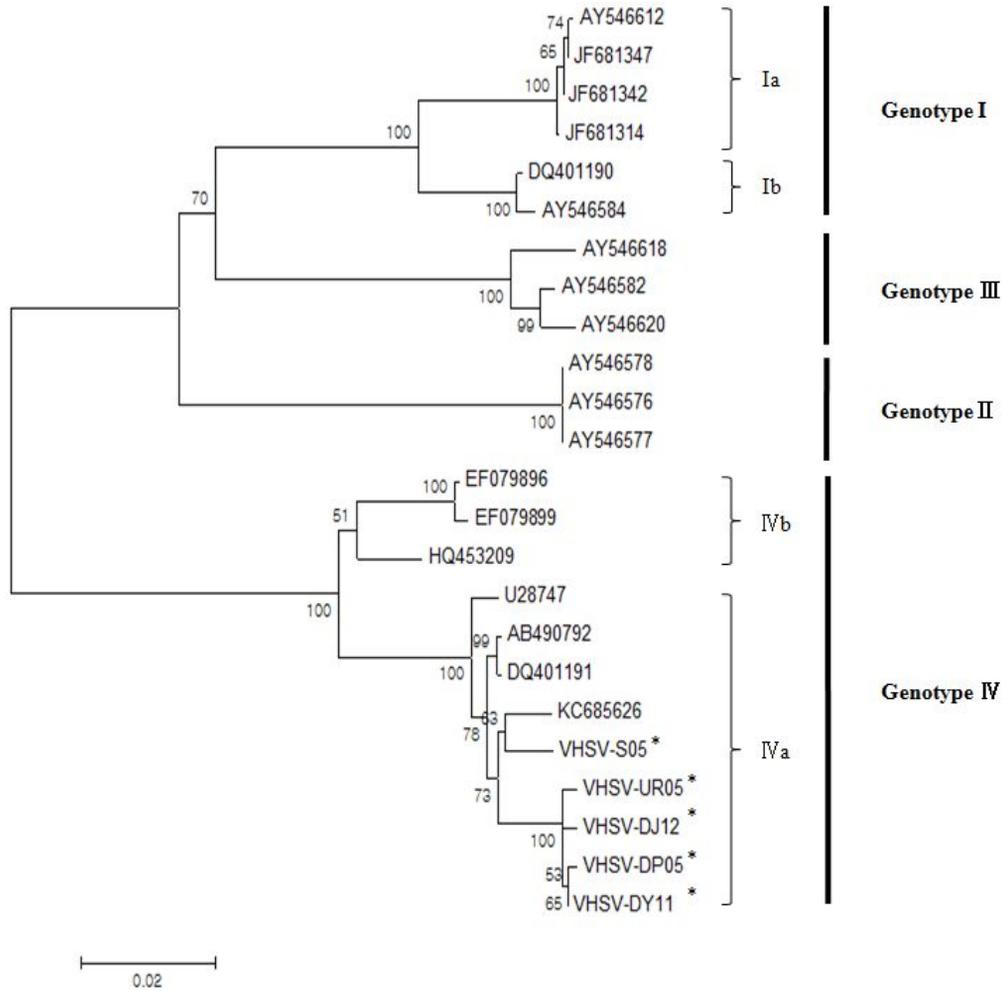
유전자의 상동성은 97.9~99%인 것으로 나타났으며(data not shown), 북미지역에서 분리된 genotype IVb 분리주와는 구분되는 것으로 확인되었다[Fig. 2].

G gene을 사용한 계통분류학적 분석 결과, 국내에서 동정된 5개 분리주 모두 N gene을 사용한 계통분류학적 분석결과와 동일한 경향을 보였다[Fig. 3]. 그 중, 중국에서 보고된 분리주(accession number: KC685626) 및 일본에서 보고된 분리주(accession number: AB490792, DQ401191)와 가장 가까운 것으로 확인되었으며[Fig. 3], 중국 및 일본 분리주의 염기서열들과 비교 분석한 결과, 99.5~99.8% 및 99.4~99.8%로 각각 높은 상동성이 관찰되었다(data not shown).

본 연구에서 수행된 VHS 및 RSIVD에 대한 감염 모니터링은 국내의 넙치양식장에 대한 바이러스성 질병발생의 사전예방 및 확산방지 등 방역 체계 확립에 대한 유용한 기초자료로 활용될 수 있으며, 본 연구를 통하여 VHSV가 검출된 5군데의 양식장은 질병전파 방지를 위하여 양식장 환경 소독조치 및 사육어의 이동제한 등과 같은 방역조치가 실시되었다. 양식어류에 대한 질병 모니터링은 지속적으로 수행되어야 할 사안이며, 보다 폭넓은 지역, 어종 및 병원체에 대한 질병 모니터링을 통하여 향후 질병 방역에 대한 체계적인 구축이 필요한 것으로 생각된다.



[Fig. 2] Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 44 VHSVs based on the nucleotide sequences of the N gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSVs belong to the genotype IVa. Bootstrap values were transferred to the original maximum likelihood tree derived from the actual data. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide site. * indicates VHSV isolates in this study.



[Fig. 3] Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 24 VHSVs based on the nucleotide sequences of the G gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSVs belong to the genotype IVa. Bootstrap values were transferred to the original maximum likelihood tree derived from the actual data. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide site. * indicates VHSV isolates in this study.

References

Bourhy, Herve · Kissi, Bachir · Lafon, Monique · Sacramento, Debora & Tordo, Noel(1992). Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe, *Journal of Clinical Microbiology* 30(9), 2419~2426.

Cho, Mi-Young · Kim, Myoung-Sug · Kwon,

Mun-Gyeong · Jee, Bo-Young · Choi, Hye-Sung · Choi, Dong-Lim · Park, Gyeong-Hyun · Lee, Chang-Hoon · Kim, Jin-Do · Lee, Joo-Seok · Oh, Yun-Kyeong · Lee, Deok-Chan · Park, Shin-Hoo & Park, Myoung-Ae(2007). Epidemiological study of bacterial diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2006 in Korea,

- Journal of Fish Pathology 20(1), 61~70.
- Cho, Mi-Young · Park, Gyeong-Hyun · Jee, Bo-Young & Kim, Jin-Woo(2010). Statistical data on fish virus of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2007, Journal of Fish Pathology 23(2), 155~162.
- Dale, Ole-Bendik · Ørpetveit, Irene · Lyngstad, Trude-Marie · Kahns, Soren · Skall, Helle-Frank · Olesen, Niels-Jorgen & Dannevig, Birgit-Helene (2009). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III, Diseases of Aquatic Organisms 85(2), 93~103.
- Dixon, P. F. · Feist, S. · Kehoe, E. · Parry, L. · Stone, D. M. & Way, K.(1997). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel, Diseases of Aquatic Organisms 30, 81~89.
- Do, Jeong-Wan · Moon, Chang-Hoon · Kim, Hyo-Jeong · Ko, Myoung-Seok · Kim, Sung-Bum · Son, Ji-Hee · Kim, Jong-Soo · An, Eun-Jeong · Kim, Min-Kyoung · Lee, Seung-Koo · Han, Myung-Shin · Cha, Seung-Ju · Park, Mi-Seon · Park, Myoung-Ae · Kim, Yi-Cheng · Kim, Jin-Woo & Park, Jeong Woo(2004). Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus, Virology 325(2), 351~363.
- Do, Jeong-Wan · Cha, Seung-Ju · Kim, Jong-Su · An, Eun-Jeong · Lee, Nam-Sil · Choi, Hee-Jung · Lee, Chan-Hwei · Park, Mi-Seon · Kim, Jin-Woo · Kim, Yi-Cheong & Park, Jeong-Woo(2005). Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea, Diseases of Aquatic Organisms 64(3), 193~200.
- Do, Jeong-Wan · Cha, Seung-Ju · Kim, Jong-Su · An, Eun-Jeong · Park, Mi-Seon · Kim, Jin-Woo · Kim, Yi-Cheong · Park, Myoung-Ae & Park, Jeong Woo(2005). Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses, Archives of Virology 150(2), 351~359.
- Einer-Jensen, Katja · Ahrens, Peter · Forsberg, Roald & Lorenzen, Niels(2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus, Journal of General Virology 85(5), 1167~1179.
- He, Jian-G · Deng, Min · Weng, Shao-P · Li, Zheng · Zhou, Song-Y · Long, Qin-X · Wang, Xun-Z & Chan, Siu-Ming(2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus, Virology 291, 126~139.
- Inouye, K. · Yamano, K. · Maeno, Y. · Nakajima, K. · Matsuoka, M. · Wada, Y. & Sorimachi, M.(1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*, Fish Pathology 27, 19~27.
- Kim, Su-Mi · Lee, Jae-Il · Hong, Mi-Ju · Park, Heon-Sik & Park, Soo-Il(2003). Genetic relationship of the VHSV (viral haemorrhagic septicaemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea, Journal of Fish Pathology 16(1), 1~12.
- Kim, Wi-Sik · Kim, Seok-Ryel · Kim, Du-Woon · Kim, Jong-Oh · Park, Myoung-Ae · Kitamura, Shin-Ichi · Kim, Heung-Yun · Kim, Do-Hyung · Han, Hyun-Ja · Jung, Sung-Ju & Oh, Myung-Joo (2009). An outbreak of VHSV (viral haemorrhagic septicaemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea, Aquaculture 296(1), 165~168.
- Lee, Wol-La · Kim, Seok-Ryel · Yun, Hyun-Mi · Kitamura, Shin-Ichi · Jung, Sung-Ju · Oh, Myung-Joo (2007). Detection of red sea bream iridovirus (RSIV) from marine fish in the Southern coastal area and East China Sea, Journal of Fish Pathology 20(3), 211~220.
- Lumsden, J. S. · Morrison, B. · Yason, C. · Russell, S. · Young, K. · Yazdanpanah, A. · Hurber, P. ·

- Al-Hussinee, L. · Stone, D. & Way, K.(2007). Mortality event in freshwater drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicaemia virus, Type IV, Diseases of Aquatic Organisms 76(2), 99~111.
- Matsuoka, S. · Inouye, K. & Nakajima, K.(1996). Cultured fish species infected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995, Journal of Fish Pathology 31(4), 233~234.
- MEST(Ministry of Education and Science Technology). 2010. Atlas of Fish Diseases.
- Mortensen, Helle-Frank · Heuer, Ole-Eske · Lorenzen, Niels · Otte, Lars & Olesen, Niels-Jorgen (1999). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea, Virus Research 63(1), 95~106.
- Nishizawa, T. · Iida, H. · Takano, R. · Isshiki, T. · Nakajima, K. & Muroga, K.(2002). Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes, Diseases of Aquatic Organisms 48(2), 143~148.
- OIE.(2013). World Organization for Animal Health.
- Sano, Motohiko · Ito, Takafumi · Matsuyama, Tomomasa · Nakayasu, Chihaya & Kurita, Jun(2009). Effect of water temperature shifting on mortality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* experimentally infected with viral haemorrhagic septicaemia virus, Aquaculture 286(3), 254~258.
- Shi, Cheng-Yin · Wang, Yin-Geng · Yang, Shao-Li · Huang, Jie & Wang, Qing-Yin(2004). The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China, Aquaculture 236(1), 11~25.
- Snow, Michael · Cunningham, Carey-O · Melvin, William-T & Kurath, Gael(1999). Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment, Virus Research 63(1), 35~44.
- Takano, R. · Nishizawa, T. · Arimoto, M. & Muroga, K.(2000). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Bulletin European Association of Fish Pathologists 20(5), 186~193.
- Tamura, K. · Dudley, J. · Nei, M. & Kumar, S.(2007). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, Molecular Biology and Evolution 24(8), 1596~1599.
- Thompson, J. D. · Higgins, D. G. & Gibson, T. J.(1994). Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Research 22(22), 4673~4680.
-
- Received : 08 June, 2015
 - Revised : 17 June, 2015
 - Accepted : 19 June, 2015