

청자갈치(*Bothrocara hollandi*)의 근육에 기생하는 점액포자충 *Myxobolus aeglefini* (Myxozoa: Myxobolidae)

전찬혁* · 김정호 †

강릉원주대학교 해양자원육성학과, *강릉원주대학교 동해안생명과학연구소

Myxobolus aeglefini (Myxozoa: Myxobolidae) infection in muscles of porous-head eelpout (*Bothrocara hollandi*)

Chan-Hyeok Jeon* and Jeong-Ho Kim†

Department of Marine Bioscience, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea
*Research Institute of East Sea Life Sciences, Gangneung-Wonju National University,
Gangneung, 210-702, Korea

A specimen of porous-head eelpout *Bothrocara hollandi* (Zoarcidae: Perciformes) caught from the East Sea was found to harbour a myxosporean parasite. Numerous whitish pseudocysts were scattered throughout the body musculature of this individual specimen. Fresh myxosporean spores were found from the squashed pseudocysts under light microscopy. They were subspherical in frontal view with a length of 11.9 (11.0~13.5) μm , width of 11.6 (10.7~13.6) μm , and thickness of 7.8 (6.9~8.8) μm . Two polar capsules were almost equally pyriform with a length of 4.4 (3.2~5.3) μm and width of 3.3 (2.4~4.2) μm . Morphometric and host ecology analysis revealed that this myxosporean parasite could be identified as *Myxobolus aeglefini* Auerbach 1906. Phylogenetic analysis based on 18S rDNA sequences also revealed that *M. aeglefini* was clustered with *M. albi* and *M. groenlandicus* in the same branch, sharing 97.7% and 96.9% sequence similarities with *M. albi* and *M. groenlandicus*, respectively.

Key words: *Myxobolus aeglefini*, Myxosporea, *Bothrocara hollandi*, Porous-head eelpout

청자갈치 (*Bothrocara hollandi*)는 농어목 (Order Perciformes) 등가시치과 (Family Zoarcidae)에 속하며 우리나라의 동해 수심 200 m 이상의 심해에 서식하는 심해성 어류로서 중층~저층을 유영하면서 해당 수층에 존재하는 다양한 갑각류, 연체동물 등을 섭식하는 것으로 알려져 있다 (Anderson, 1994; Choi et al., 2009). 아직까지 식용으로 소비되고 있

지는 않으며 생태학적 특성 및 자원량의 변화 등에 대해 연구가 진행되고 있다 (Choi et al., 2009).

점액포자충은 점액포자충문 (Phylum Myxozoa)에 속하는 다세포성 기생생물로서 현재까지 2,000여종 이상이 알려져 있으며, 드물게 양서류나 파충류에 기생하기도 하지만 거의 대부분은 어류에 기생한다 (Lom and Dykova, 2006; Mackenzie and Kalavati, 2014). 척추동물인 어류와 무척추동물인 환형동물을 교대숙주로 이용하는 독특한 생활사를 가지고 있으며, 각각의 숙주에서 형태가 서로

†Corresponding author: Jeong-Ho Kim
Tel: +82-33-640-2851, Fax: +82-33-640-2340
E-mail: jhkim70@gwnu.ac.kr

다른 점액포자 (Myxosporea)와 방선포자(Actinospore)를 생산하는 이상성 생활환 (biphasic life cycle)을 가진다 (Lom and Dykova, 2006). 이러한 생활사는 담수산 어류에 기생하는 점액포자충의 경우 약 30여종의 생활사가 밝혀져 있으나, 해수산 어류에 기생하는 점액포자충은 2012년을 기준으로 5종만이 알려져 있다 (Mackenzie and Kalavati, 2014).

대부분의 점액포자충은 숙주인 어류에 대한 병원성이 거의 없지만, 종에 따라서는 감염된 어류의 상품가치를 떨어뜨리거나 감염된 어류의 폐사를 유발하는 등 문제가 되는 경우도 다수 알려져 있어 수산양식업상 중요한 기생충으로 간주되고 있다 (Lom and Dykova, 2006). 양식대상 어종 및 상업적으로 중요한 어종에 기생하여 대량 폐사를 일으키거나 상품가치를 떨어뜨리는 점액포자충은 비교적 잘 연구되어 병원성, 생활사 등 생물학적 특성이 많이 알려져 있으나, 그렇지 않은 점액포자충은 거의 연구되어 있지 않다. 본 연구는 경상북도 울진군 후포 수산시장에서 구입한 청자갈치의 근육에서 발견된 점액포자충을 형태학적 관찰을 통하여 동정하였고, 분자생물학적 방법을 이용하여 계통분석을 실시하였다.

재료 및 방법

어류 채집 및 점액포자충 분리

2013년 7월 경상북도 울진군 후포 수산시장에서 청자갈치를 구입하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 청자갈치는 냉장보관하여 실험실로 옮겨 체장과 체중을 측정 후 해부하였다. 외관상 이상이 확인된 개체는 해당 부위를 조심스럽게 절개해 내어 슬라이드 글라스 위에서 약간의 멸균 생리식

염수와 함께 잘게 마쇄한 후 커버 글라스를 덮어 광학현미경하에서 관찰하였다. 점액포자충의 성숙한 포자가 관찰된 시료는 상법에 의해 wet mount 표본을 제작하여 형태학적 관찰을 수행하였다.

점액포자충의 형태학적 동정

발견된 점액포자충은 형태학적 동정을 실시하였다. 점액포자충의 성숙한 포자가 확인된 시료는 해당 부위를 절제해 내어 멸균한 생리식염수로 현탁액을 만든 후 wet mount 표본을 만들어 광학현미경 (CME, Leica, Germany)으로 관찰하였다. 형태학적 관찰은 Lom and Arthur (1989)의 방법에 따라 포자길이 (L=length of the spore), 포자 폭 (W=width of the spore), 포자 두께 (T=thickness of the spore). 극낭 길이 (PL=polar capsule length), 극낭 폭 (PW=polar capsule width)을 LAS 4.0 software (Leica, Germany)를 사용하여 μm 단위로 측정하였다. 총 50개의 포자를 측정, 각 부위 측정값의 평균을 계산하였다.

DNA 추출 및 PCR

100% 에탄올로 고정한 포자 현탁액을 500 μL 의 lysis buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.2% SDS, 0.4 mg/ml proteinase K) 에 다시 부유시킨 후 60°C에서 하룻밤동안 방치한 후, phenol-chloroform 법으로 게놈 DNA를 추출하였다 (Wasko et al., 2003). 추출한 DNA는 Nanodrop 1000 (Thermo, Japan)을 이용하여 100 ng/ μL 로 정량한 후 MX5와 MX3 primer를 사용하여 (Andree et al., 1999) (Table 1), 18S ribosomal DNA 유전자를 증폭하였다. PCR 반응은 1X Taq buffer (Bioneer, Korea), 2.5 mM NaCl₂, 0.2 mM dNTPs (Bioneer, Korea), 2 μM primer, 5U Taq DNA polymerase (Bioneer,

Table 1. PCR primers used in the amplification and sequencing of the 18S rDNA gene

Primer name	Sequence (5'-3')	Reference
MX5	CTGCGGACGGCTCAGTAAATCAGT	Andree et al. 1999
MX3	CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA	
MC5	CCTGAGAAACGGCTACCCATCCA	Molnár et al. 2002
MC3	GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA	
MYXGEN4f	GTGCCCTTGAATAAATCAGAG	Diamant et al. 2004
ACT1R	AATTCACCTCTCGCTGCCA	Hallett and Diamant, 2001

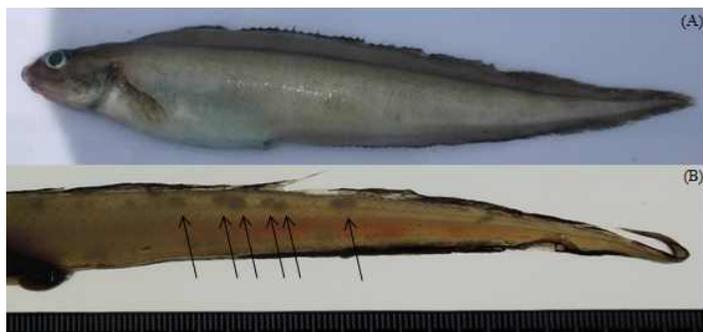


Fig. 1. Morphological visualisation of pseudocyst of *Myxobolus aeglefini* in *Bothrocara hollandi*. (A) non-infected *Bothrocara hollandi* (B) infected *Bothrocara hollandi*. Arrows indicate the pseudocyst of *Myxobolus aeglefini*.

Korea)와 혼합하여 PCR machine (PTC-200, Bio-Rad, USA)을 이용하여 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 2분을 35 cycle 반복하는 조건하에서 수행하였다.

시퀀싱 및 계통수 분석

PCR 증폭산물은 *AccuPrep* gel purification kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 agarose gel로부터 밴드를 정제한 후 MC5와 MC3 그리고 MYXGEN4f와 ACT1R primer를 사용 (Diamant et al., 2004; Hallett and Diamant, 2001; Molnár et al., 2002) (Table 1), ABI Prism 3730 XL DNA analyzer (PE applied biosystems, USA)로 시퀀싱을 수행하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 Blast search (NCBI, USA)를 이용하여 Genbank에 등재된 유사종들의 sequences data와 조합한 뒤, PHYLIP phylogeny program (version 3.67 package) (Felsenstein, 2007)을 이용하여 consensus tree를 제작하였다.

결과 및 고찰

총 10 마리의 청자갈치를 구입하였으며 평균 체장은 23.7 cm, 평균 체중은 56.1 g이었다. 이들 개체를 육안으로 관찰한 결과 1개체의 체측 근육에서 유백색의 불투명한 시스트가 관찰되었다 (1/10, 10%) (Fig. 1). 이 시스트를 마쇄하여 제작한 현탁액을 현미경으로 관찰한 결과, 원형에 가까운 점액포자충의 성숙 포자가 관찰되었다 (Fig. 2). 2개의 극낭은 서양배 모양을 하고 크기는 동일하며 성숙포자의 전면에 위치하였다. 극사는 극낭 내에 4~5회 감겨 있었다. 성숙 포자의 길이는 평균 11.9 (11.0~13.5) μm , 폭은 11.6 (10.7~13.6) μm , 두께는

7.8 (6.9~8.8) μm 이었다. 극낭의 길이는 평균 4.4 (3.2~5.3) μm 이었으며, 폭은 평균 3.3 (2.4~4.2) μm 이었다 (Table 2).

본 연구에서 발견된 점액포자충은 성숙포자의 형태학적 특징이 정면에서 보았을 때에 타원형 혹은 원형을 하고 있으며, 측면에서 보았을 때에 양면이 볼록한 모습을 하고 있는 점, 서양배 모양을 한 2개의 극낭이 존재하는 점 등이 기존에 알려진 *Myxobolus* 속의 점액포자충과 일치하였다 (Lom and Dykova, 1992). *Myxobolus* 속에 속하는 점액포자충은 현재까지 800여종 이상이 알려져 있으나 (Eiras et al., 2005; 2014), 청자갈치에 기생하는 *Myxobolus* 속 점액포자충은 *M. aeglefini* 이외에는 알려져 있지 않으며, 다른 속에 속하는 점액포자충도 청자갈치에서는 알려져 있지 않다.



Fig. 2. Fresh mature spores of *Myxobolus aeglefini* isolated from *Bothrocara hollandi*. Wet mount. Scale bar = 10 μm .

Table 2. Morphometric comparison of spore dimensions of *Myxobolus aeglefini* and other related *Myxobolus* species

Species	Host	Infection site	SL	SW	ST	PCL	PCW
<i>Myxobolus aeglefini</i> (This study)	<i>Bothrocara hollandi</i>	Muscle	11.9 (11.0~13.5)	11.6 (10.7~13.6)	7.8 (6.9~8.8)	4.4 (3.2~5.3)	3.3 (2.4~4.2)
<i>Myxobolus aeglefini</i> Auerbach, 1906	<i>Melanogrammus aeglefini</i>	Head cartilage	10.8~11.7	9.9~10.4	7.2~9.0	4.5~5.0	-
<i>Myxobolus albi</i>	<i>Pomatoschistus microps</i>	Gill arch cartilage	8.3 (8.3~10.0)	9.1 (7.7~10.0)	6.6 (5.8~7.4)	3.9 (3.0~4.8)	2.8 (2.0~3.3)
<i>Myxobolus groenlandicus</i>	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Hypertrophic cartilage	10.3±0.7 (8.5~11.0)	10.1±0.7 (9.1~11.2)	6.2±0.8 (4.9~7.1)	4.4±0.4 (4.0~5.1)	2.5±0.6 (2.1~4.1)

All measurements are given as the mean in micrometres followed by the range in parentheses.

SL: Spore length, SW: Spore width, ST: Spore thickness, PCL: Polar capsule length, PCW: Polar capsule width

*Myxobolus aeglefini*는 1906년 haddock (*Melanogrammus aeglefini*)에서 처음 발견, 명명되었으며 (Auerbach, 1906), 이후 북대서양에 서식하는 Atlantic cod (*Gadus morhua*), dab (*Limanda limanda*), European hake (*Merluccius merluccius*), lumpfish (*Cyclopterus lumpus*), European plaice (*Pleuronectes platessa*) 등에서 발견된 바 있다 (Nielsen et al., 2002). 또한, Yokoyama and Wakabayashi (2000)에 의해 동해에서 어획된 청자갈치에서 *Myxobolus aeglefini*가 발견되어 기재된 바 있다.

본 연구에서 발견된 *Myxobolus* 속 점액포자충의 성숙포자의 각 부위를 측정하여 기존에 보고된 청자갈치의 *M. aeglefini*와 비교한 결과를 Table 2에 나타내었다. 각 부위의 측정 결과를 Yokoyama and Wakabayashi (2000)의 측정 결과와 비교하였을 때, 본 연구에서 측정한 포자의 평균 폭이 다소 넓었으며 극낭의 평균 측정값은 다소 넓고 짧은 경향을 나타내었으나 크게 벗어나지 않았다. Yokoyama and Wakabayashi (2000)는 숙주의 학명을 *Allolepis hollandi*로 기재하였으나 이는 *Bothrocara hollandi*의 동종이명으로서 현재에는 통용되고 있지 않은 학명이다 (Anderson and Fedorov, 2004). 따라서 본 연구에서 발견된 점액포자충은 형태학적으로 보아 *Myxobolus* 속에 속하며, 각 부위의 측정치 평균값이 *M. aeglefini*의 측정치 평균값과 매우 유사하였으며 동일한 숙주에서 발견되었으므로 *M. aeglefini*로 동정하였다.

*Myxobolus aeglefini*의 계통분류학적 위치를 분

석하기 위하여 18S rDNA를 PCR법으로 증폭한 후 시퀀싱을 수행하였다 (Genbank accession number: KR029786). 이후 동일한 *Myxobolus*속에 속하며 형태학적 특징이 유사한 점액포자충의 시퀀스를 포함하여 계통수를 작성, *M. aeglefini*의 계통분류학적 위치를 조사하였다.

Yokoyama and Wakabayashi (2000)은 *M. aeglefini*의 18S rDNA 시퀀스 분석을 하지 않아 일본에서 발견, 기재된 *M. aeglefini*와 본 연구에서 기재된 *M. aeglefini*의 18S rDNA 시퀀스의 상동성 비교는 불가능하였다. *M. aeglefini*의 18S rDNA의 시퀀스는 계통수 분석 결과, 동일한 *Myxobolus* 속 내의 *M. albi*, *M. groenlandicus*, *M. acanthogobii*와 같은 cluster내에 위치하였으며 (Fig. 3), *M. albi* 및 *M. groenlandicus*와 각각 97.7%와 96.9%의 상동성을 나타내었다 (Data not shown). *M. albi*는 common goby (*Pomatoschistus microps*), lump fish (*Cyclopterus lumpus*)에서 보고된 바 있으며 성숙한 포자는 *M. aeglefini*와 매우 유사한 형태이지만 각 부위의 측정값이 *M. aeglefini*와 비교하여 다소 작은 편이다 (Table 2). *M. groenlandicus*는 greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*)에서 발견되었으며 각 부위의 측정값은 *M. aeglefini*와 비교하여 다소 작은 편이지만 외관상 *M. aeglefini*와 매우 유사하다 (Buchmann et al., 2012). 18S rDNA 시퀀스의 상동성 및 성숙 포자의 형태학적 특징의 유사성으로 볼 때 *M. aeglefini*, *M. albi*, *M. groenlandicus*는 동종이명일 가능성이 있으며, 차후 보다 심도있는 분석

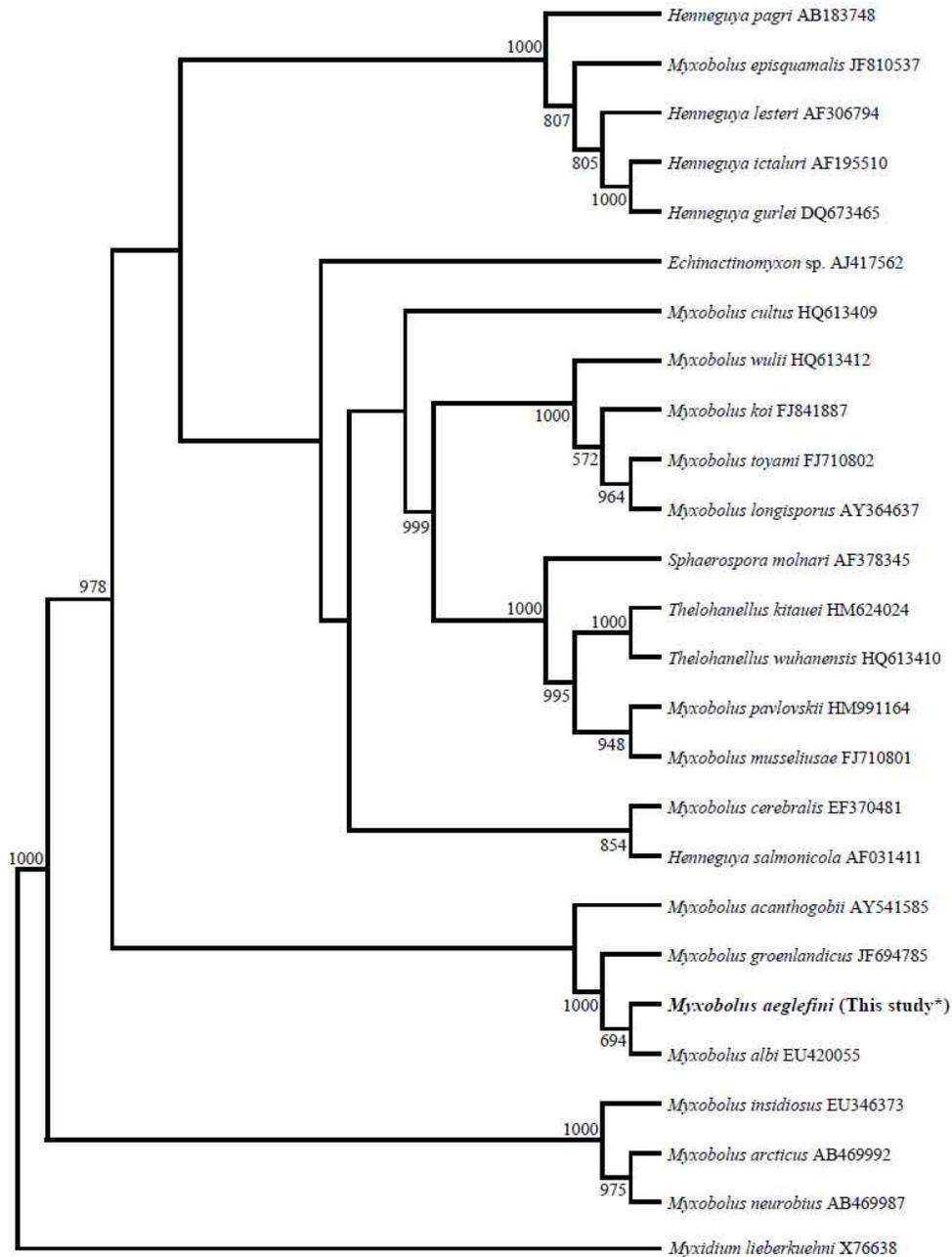


Fig. 3. Phylogenetic tree of aligned 18S rDNA gene sequences of selected *Myxobolus* species including *Myxobolus aeglefini*. 26 Genbank sequences were used for phylogenetic analysis and *Myxidium lieberkuehni* was used as the outgroup. Analysis performed using PHYLIP phylogeny program (version 3.67 package). The bootstraps values were determined with the CONSENSUS program.

이 필요하다.
청자갈치의 근육에 기생하는 *M. aeglefini*의 병

원성에 대해서는 알려져 있지 않다. 기존에 보고된 다른 어종에 기생하는 *M. aeglefini*의 경우, 연골조

직에 기생하는 것으로 보고되어 있으며, *M. albi* 및 *M. groenlandicus* 역시 각각 연골조직에 기생하는 것으로 알려져 있다 (Buchmann et al., 2012; Nielsen et al., 2002; Picon-Camacho et al., 2009). 그러나, 본 연구에서 발견된 *M. aeglefini*는 청자갈치의 체측 근육에서 발견되었으며, Yokoyama and Wakabayashi (2000)도 청자갈치의 골격근에서 *M. aeglefini*를 보고하고 있어 청자갈치에서는 기생부위가 다른 것으로 생각된다. 또한, *M. aeglefini*에 감염된 개체가 폐사하는지의 여부도 알려져 있지 않아 병원성에 대해서는 차후 연구되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

동해안에서 어획된 청자갈치 (*Bothrocara hollandi*)의 체측 근육에 유백색의 불투명한 시스트를 형성하고 있는 점액포자충이 발견되었다. 시스트를 마쇄하여 광학현미경으로 관찰해본 결과, 원형에 가까운 점액포자충의 성숙 포자가 관찰되었다. 성숙 포자의 평균 길이는 11.9 (11.0~13.5) μm , 평균 폭은 11.6 (10.7~13.6) μm , 평균 두께는 7.8 (6.9~8.8) μm 이었다. 극낭의 평균 길이는 4.4 (3.2~5.3) μm 이었으며, 평균 폭은 평균 3.3 (2.4~4.2) μm 이었다. 감염숙주와 성숙포자의 형태학적 특징, 각 부위의 측정값으로부터 본 연구에서 발견된 점액포자충은 *Myxobolus aeglefini* Auerbach 1906으로 동정하였다. 또한 18S rDNA sequences를 이용한 계통분석 결과 *M. albi*와 *M. groenlandicus*와 같은 분지에 속하는 것이 확인되었으며 각각 97.7%와 96.9%의 상동성을 나타내었다.

References

- Anderson, M.E.: Systematics and osteology of the Zoarcidae (Teleostei: Perciformes). Ichthyol. Bull. J.L.B. Smith Inst. Ichthyol. 60: 120, 1994.
- Anderson, M.E. and Fedorov, V.V.: Family Zoarcidae Swainson 1839. Eelpouts. Calif. Acad. Sci. Annotated Checklists of Fishes 34: 58, 2004
- Auerbach, M.: Ein *Myxobolus* im Kopf von *Gadus aeglefinus*. Zool. Anz. Leip., 30: 568-570, 1906.
- Andree, K.B., Székely, C., Molnár, K., Gresoviac, S. J. and Hedrick, R.P.: Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bivalvulidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. J. Parasitol., 85: 68-74, 1999.
- Buchmann, K., Skovgaard, A. and Kania, P.W.: *Myxobolus groenlandicus* n. sp. (Myxozoa) distorting skeletal structures and musculature of Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* (Teleostei: Pleuronectidae). Dis. Aquat. Org., 98: 133-141, 2012.
- Cavin, J.M., Donahoe, S.L., Frasca, S. Jr., Innis, C.J., Kinsel, M.J., Kurobe, T., Naples, L.M., Nyaoke, A., Poll, C.P. and Weber, E.P.III.: *Myxobolus albi* infection in cartilage of captive lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). J. Vet. Diagn. Invest., 24: 516-524, 2012.
- Choi, J.H., Hong, B.K., Jun, Y.Y., Kim, J.N., Choi, Y.M. and Yoo, O.H.: Feeding comparison of three deep-sea fish, *Lumpenella longirostris*, *Malacocottus gibber* and *Bothrocara hollandi*, in the East Sea. J. Kor. Fish. Soc., 42: 151-156, 2009.
- Diamant, A., Whipps, C.M. and Kent, M.L.: A new species of *Sphaeromyxa* (Myxosporea: Sphaeromyxina: Sphaeromyxidae) in devil firefish, *Pterois miles* (Scorpaenidae), from the northern Red Sea: Morphology, ultrastructure, and phylogeny. J. Parasitol., 90: 1434-1442, 2004.
- Eiras, J.C., Molnár, K. and Lu, Y.S.: Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). Syst. Parasitol., 61: 1-46, 2005.
- Eiras, J.C., Zhang, J. and Molnár, K.: Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. Syst. Parasitol., 88: 11-36, 2014.
- Felsenstein, J.: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.67. Dept of Genetics, Univ of Washington, Seattle, 2007.
- Hallett, S.L. and Diamant, A.: Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. Dis. Aquat. Org., 46: 197-212, 2001.
- Kabata, Z.: Notes on a new host of *Myxobolus aeglefini*. Parasitology., 27: 165-168, 1956.
- Lom, J. and Arthur, J.R.: A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. J. Fish Dis., 12: 151-156, 1989.
- Lom, J. and Dykova, I.: Protozoan parasites of fishes, Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 26, Amsterdam, The Netherlands, pp. 204-205, 1992.

- Lom, J. and Dykova, I.: Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol.*, 53: 1-36, 2006.
- Molnár K, Eszterbauer E, Székely C, Dán Á. and Harrach B.: Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. *J. Fish Dis.*, 25: 643-652, 2002.
- Mackenzie, K. and Kalavati, C.: Mxysporean parasites of marine fishes: their distribution in the world's oceans. *Parasitology.*, 141: 1709-1717, 2014.
- Nielsen, C.V., Koie, M., Székely, C. and Buchmann, K.: Comparative analysis of 18S rRNA genes from *Myxobolus aeglefini* Auerbach, 1906 isolated from cod (*Gadus morhua*), Plaice (*Pleuronectes platessa*) and dab (*Limanda limanda*), using PCR-RFLP. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, 22: 201-205, 2002.
- Picon-Camacho, S.M., Holzer, A.S., Freeman, M.A., Morris, D.J. and Shinn, A.P.: *Myxobolus albi* n. sp. (Myxozoa) from the Gills of the Common Goby *Pomatoschistus microps* Krøyer (Teleostei: Gobiidae). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 56: 421-427, 2009.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliverira, C. and Foresti, F.: Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas.*, 138: 161-165, 2003.
- Yokoyama, H. and Wakabayashi, S.: *Myxobolus aeglefini* found in the skeletal muscle of porous head eelpout *Allolepis hollandi* from the Sea of Japan. *Fish. Sci.*, 66: 963-966, 2000.

Manuscript Received : Apr 8, 2015

Revised : Aug 3, 2015

Accepted : Aug 10, 2015