

## 2015년 제주도 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 대상으로 한 VHS 및 RSIVD 모니터링

박현경 · 전려진<sup>1</sup> · 김승민 · 박명애<sup>2</sup> · 조미영<sup>2</sup> · 황성돈<sup>2</sup> · 박신후<sup>2</sup> · 정현도<sup>3</sup> · 정준범\*

제주대학교 해양의생명과학부, <sup>1</sup>제주대학교 수산백신연구센터, <sup>2</sup>국립수산과학원 수산생물방역과, <sup>3</sup>부경대학교 수산생명의학과

### Monitoring of VHS and RSIVD in Cultured *Paralichthys olivaceus* of Jeju in 2015

Hyun Kyung Park, Lyu Jin Jun<sup>1</sup>, Seung Min Kim, Myoung Ae Park<sup>2</sup>, Mi Young Cho<sup>2</sup>, Seong Don Hwang<sup>2</sup>, Shin Hoo Park<sup>2</sup>, Hyun Do Jeong<sup>3</sup> and Joon Bum Jeong\*

Faculty of Marine Biomedical Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>1</sup>Fish Vaccine Resarch Center, Jeju National University, Jeju 63333, Korea

<sup>2</sup>Aquatic Life Disease Control Division, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 46083, Korea

<sup>3</sup>Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

In this study, disease surveillance was performed to monitor the prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and red seabream iridovirus (RSIV) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in 2015. The fish samples were collected in March (60 farms), May (55 farms) and July (52 farms) from different farms in Jeju. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (VHSV) or PCR (RSIV) results showed that VHSV detected in 2 farms, but RSIV has not been detected in any farms. The sequences of the nucleocapsid protein (N) and glycoprotein (G) gene of the 2 VHSV isolates were successfully sequenced. Phylogenetic analysis was included VHSV isolates reported here together with a representative VHSV isolates available in GenBank. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSV isolates were closely related to the Japan and China genotype IVa which is clearly distinct from the North American genotype IVb.

Key words: *Paralichthys olivaceus*, VHSV, RSIV, Nucleocapsid protein, Glycoprotein

### 서 론

제주 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 양식 산업은 우리나라 해수어류 생산량의 약 50% 이상을 차지하는 중요한 산업이며, 최근에 양식 어류의 바이러스성 질병감염에 대한 보고가 점차 증가하고 있어 양식 산업 생산성에 큰 피해를 주고 있다. 우리나라 양식넙치에 질병을 일으키는 대표적인 주요 바이러스는 red seabream iridovirus (RSIV), lymphocystis disease virus (LCDV)와 같은 DNA 바이러스와 viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), viral nervous necrosis virus (VNNV), hiram rhabdovirus (HRV), marine birnavirus (MABV) 등과 같은 RNA 바이러스 질병들이 보고되고 있으며, 그 중 수산생

물질병관리법에서 정하는 전염병으로 방역조치 대상 질병인 VHSV 및 RSIV는 최근 우리나라 양식넙치에 빈번히 발생하여 바이러스성 질병에 대한 관심이 증가하고 있다(Cho et al., 2010).

VHSV 감염은 담수산 연어과 어류인 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 가장 광범위하게 퍼져 있는 전염성이 강한 질병으로 알려져 왔으나, 이후에 담수 및 해수로 사육중인 다른 연어과 어류나 다양한 어종에 감염되는 사례가 보고되고 있다(Mortensen et al., 1999). 우리나라의 경우 2000년대부터 동해안 지역의 넙치에서 처음 발병된 이후 수온이 낮아지는 겨울과 봄에 걸쳐 대량 폐사를 일으켜 양식 산업에 큰 경제적 손실을 유발하는 것으로 밝혀지면서(Takano et al., 2000; Isshiki et

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0176>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 49(2) 176-183, April 2016

Received 4 October 2015; Revised 27 January 2016; Accepted 19 March 2016

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3426 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: jeongjb@jejunu.ac.kr

al., 2001) 세계동물보건기구(World Organization for Animal Health, OIE)의 수산동물질병관리법에서 정하는 관리대상 전염병으로 지정되어 질병 발생 저하 및 방역을 위한 노력이 확대 요구되고 있다. 또한 VHSV는 *Rhabdoviridae*과 *Novirhabdovirus*속에 포함되며 단일 가닥의 RNA를 가진 6개의 gene 들은 nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), non-structural protein (NV) 및 RNA polymerase (L)의 순으로 구성된다(Schutze et al., 1999). Snow et al. (1999)과 Lumsden et al. (2007)은 VHSV의 N과 G 유전자 염기서열의 계통분류학적 분석을 토대로 크게 4가지 genotype으로 구분하고, 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 일반화되어 있다(Einer-Jensen et al., 2004; Dale et al., 2009; Kim et al., 2011).

RSIV의 경우 1990년 일본의 참돔(*Pagrus major*) 양식장에서 처음 발견되었으나, 최근에 한국, 중국, 동남아시아 지역에서 많은 피해가 보고되고 있다(Inouye et al., 1992; Matsuoka et al., 1996). 우리나라에서의 RSIV에 대한 감염은 1990년대 남해안 지역의 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)에서 처음 보고된 후, 다른 어종인 참돔이나 넙치 등과 같은 해수어에서도 발생하여 국내 양식 산업에서 비교적 잦은 빈도로 관찰된다(Do et al., 2005). 또한 RSIV의 질병 원인 바이러스는 *Megalocytivirus*에 속하며, 현재 계통분석에 의해 4개의 subgroups로 구분하여, subgroup I 은 RSIV, subgroup II 는 국내의 매년 돌돔 등에 심각한 폐사를 일으키는 RBIV, subgroup III 은 중국의 쏘가리(*Siniperca scherzeri*)에서 분리된 ISKNV가 대표적이며, subgroup IV 는 넙치(*P. olivaceus*)와 turbot(*Scophthalmus maximus*)으로부터 분리된 TRBIV로 알려져 있다(He et al., 2001; Do et al., 2004; Shi et al., 2004).

본 연구에서는 수산생물전염병의 방역조치 대상 질병인 VHS 및 RSIVD에 대한 질병발생 예방과 확산을 방지하기 위해 제주지역의 넙치양식장을 대상으로 바이러스성 질병 모니터링을 실시하여 질병예방 및 전파 방지 등 방역지도의 기초자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험어

실험에 사용된 실험어는 제주도(제주시/서귀포시)에 위치하는 넙치 양식장으로부터 2015년 3월(60개소), 5월(55개소), 7월(52개소)에 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 수집하였고, VHSV 및 RSIV에 의한 질병감염 실태를 조사하였다.

### Primer

RSIV의 검사를 위하여 방류수산생물 전염병검사 실시요령(국립수산과학원 예규 제 84호) 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'-GAGAGA-ACTGGCCCTGACTG-3')와 reverse primer (5'-ATGATCC-GTCTGGCTGACTC-3')를 Cho et al. (2007)의 방법에 따라 제작하였고, G-gene의 1,340 bp forward primer (5'-ACAGAT-CACTCAACGACCTC-3')와 reverse primer (5'-ATAGTGA-CGGCCAAAGACTC-3')는 full length open reading frames (ORFs)의 서열을 토대로 본 연구실에서 제작하여 PCR 방법에 사용하였다(Table 1).

### DNA 추출

RSIV 감염 진단을 위하여, DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하여 넙치의 비장 조직으로부터 total DNA를 분리하였다. 먼저 각 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 50 µL를 첨가하여 최종적으로 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -20°C에 보관하였다.

Table 1. PCR conditions and primer sequences for the detection of virus from the olive flounder *Paralichthys olivaceus* of Korea

Target <sup>a</sup>		Oligonucleotide sequence (5'-3')	PCR condition	Product size (bp)
N gene VHSV-N	F	GAGAGAACTGGCCCTGACTG	94°C(30")-55°C(45")-72°C(45")	444
	R	ATGATCCGTCTGGCTGACTC		
G gene VHSV-G	F	ACAGATCACTCAACGACCTC	94°C(30")-52°C(30")-72°C(1')	1,340
	R	ATAGTGACGGCCAAAGACTC		
RSIV	F	CTCAAACACTCTGGCTCATC	94°C(30")-58°C(60")-72°C(60")	570
	R	GCACCAACACATCTCCTATC		

<sup>a</sup>VHSV, viral haemorrhagic septicaemia virus; RSIV, red seabream iridovirus.

## 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  $\mu$ L를 첨가하여 homogenizer로

마쇄하였다. 균질화 된 샘플은 AVL buffer 560  $\mu$ L를 넣고 15초간 섞은 다음 실온에 10분간 반응 후, ethanol 560  $\mu$ L를 더하여 spin column에 옮겨 6,000 g에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500  $\mu$ L와 AW2 buffer 500  $\mu$ L를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 30  $\mu$ L를

Table 2. VHSV isolates used in this study for comparison of N gene

Virus isolate	Year	Origin	Host fish	Genotype	GenBank accession No.
15-E03(SW)	2015	Korea	Olive flounder	IV a	unpublished
15-E03(SD)	2015	Korea	Olive flounder	IV a	unpublished
US-mak-wa88	1988	USA	Coho salmon	IV a	X59241
JF00Ehil-JPN	2000	Japan	Olive flounder	IV a	AB490792
KRRV9822-JPN	1998	Japan	Olive flounder	IV a	AB179621
CA-NS04-01	2007	Canada	Brown trout	IV b	HQ168409
CA-NB04-01b	2007	Canada	Brown trout	IV b	HQ168408
MI03GL	2006	USA	Muskellunge	IV b	DQ427105
15-JUL-2009	2009	USA	Muskellunge	IV b	GQ385941
CA-NB00-01	2007	Canada	Brown trout	IV b	EF079895
ON41	2011	USA	Diporeia spp.	IV b	HQ415762
SE-SVA-14	2009	Sweden	Rainbow trout	I b	GQ325428
SE-SVA-1033	2009	Sweden	Rainbow trout	I b	FJ460591
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
Cod-Ulcus	1979	Denmark	Atlantic cod	I b	Z93414
DK-4p37	1997	North sea	Rainbow trout	I b	FJ460590
FR-07-71	1990	France	Rainbow trout	I a	D00687
07-71	1997	France	Rainbow trout	I a	AJ233396
Fil3	1983	Germany	Rainbow trout	I a	Y18263
DE-Fil3-wt	1983	Germany	Rainbow trout	I a	X73873
DK-3592B	1997	Denmark	Rainbow trout	I a	AF012093
KV010308-4	2010	Norway	Rainbow trout	III	FJ362514
BV060408-52	2010	Norway	Rainbow trout	III	FJ362510
FA281107	2010	Norway	Rainbow trout	III	EU481506
FS280208-V	2010	Norway	Rainbow trout	III	GU121102
FS280208-S	2010	Norway	Rainbow trout	III	GU121100
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

첨가하여 최종적으로 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 실험 전까지 -20℃에 보관하였다. RT-PCR은 3 µL의 viral RNA, 4 µL의 5× reaction buffer, 1 µL의 reverse transcriptase, 1 µL의 dNTP, 1 µL의 oligo (dT) primer 및 2.4 µL MgCl<sub>2</sub> 넣고 최종 volume이 20 µL가 되도록 nuclease freewater 첨가한 후, 25℃에서 5분, 42℃에서 1시간, 70℃ 15분간 반응시켜 합성하였다.

### PCR 및 sequencing

PCR은 microtube에 1 µM의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10× G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 µL가 되도록 하였고, PCR의 조건은 Table 1에 나타내었다. PCR 후 증폭 산물은 1×TAE buffer (40 Mm Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 µg/µL ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel상에서 전기영동한 후, UV 검출기에서 결과를 관찰하였다. PCR 증폭 산물은 Gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용해 정제하여, ToPo TA cloning® kit (Invitrogen, USA)로 cloning하였고, 염기서열 분석을 의뢰하였다 (Solgent, Korea).

### 계통학적 분석

염기서열 계통분석은 BioEdit program의 Clustal W (Thompson et al., 1994)를 사용하여 GenBank에 등록된 N gene의 34개의 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.

### 결과 및 고찰

우리나라 넙치 양식 산업의 주요 거점인 제주 지역은 1980년대부터 시작하여 제주 경제의 기간산업으로 성장하였으나, 최근에 고밀도 양식으로 인한 난치성 바이러스성 질병의 피해가 확산되고 있어 경제적 손실을 비롯한 많은 어려움을 겪고 있지만, 아직 질병발생의 사전예방 및 치료에 대한 역학조사 및 연구는 제한적이므로 질병에 대한 예방 및 방역관리의 필요성이 증가하고 있다.

이에 본 연구에서는 우리나라 넙치양식의 선두주자인 제주지역을 대상으로 수산생물전염병의 방역조치 대상 질병인 VHS

Table 3. VHSV isolates used in this study for comparison of G gene

Virus isolate	Year	Origin	Host fish	Genotype	GenBank accession No.
15-E03(SW)	2015	Korea	Olive flounder	IVa	unpublished
15-E03(SD)	2015	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

및 RSIVD에 대한 바이러스성 질병 모니터링을 실시하여, 병원체의 감염현황 및 검출된 바이러스의 계통분류학적 분석을 실시하여 질병예방 및 방역지도를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

전체 조사시료 중에서 검사 대상으로 선정한 2종의 바이러스가 검출된 시료는 총 2군데의 양식장에서 바이러스가 검출되었고, 검출율은 3.3%로 낮게 나타났다. 어류 바이러스가 검출된 개체 중에서 이들 바이러스가 차지하는 비중을 조사해본 결과, VHSV가 3월 2군데(3.3%)의 양식장에서 확인되었으며(Fig. 1, Table 4), 검출된 각 양식장의 30마리 넙치에 대한 검출률은 6.7%인 것으로 나타났다. 그 중 넙치의 크기가 15 cm 이하인 치어에서 발병하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 VHSV로 인해 넙치의 치어기에 많은 피해가 발생한다는 Kim et al. (2009)의 보고와 유사한 결과로 나타났다.

VHSV가 검출된 3월의 평균수온은 15°C 이하였으며, 수온이 10-15°C 이하의 저수온 환경에서 주로 피해가 확산되는 것

으로 보고한 내용과 일치하였다(Kim et al., 2003). 또한 수온이 낮아지는 봄에 발병하는 것으로 보아 어류의 스트레스에 의해 면역력 저하현상을 보여 질병발생에 큰 영향을 미치는 것으

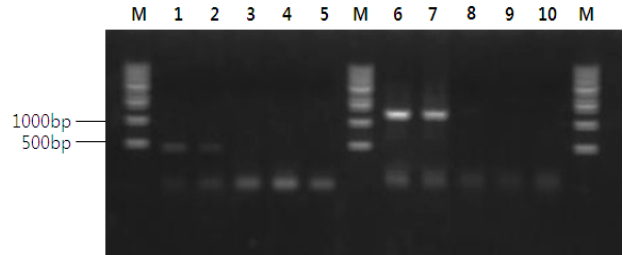


Fig. 1. Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, 15-E03(SW); Lane 2 and 7, 15-E03(SD); Lane 3 and 8, farm 1; Lane 4 and 9, farm 2; Lane 5 and 10, farm 3; M, 1 kb DNA ladder.

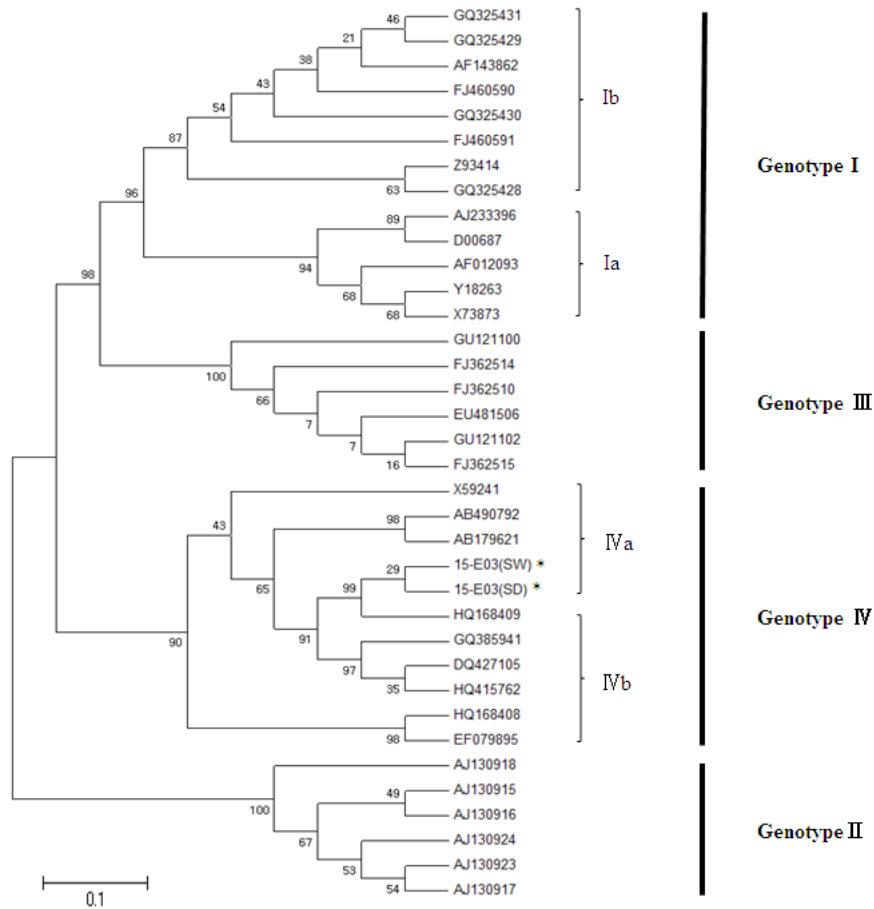


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 36 VHSVs based on the nucleotide sequences of the N gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSVs belong to the genotype IVa. Bootstrap values were transferred to the original maximum likelihood tree derived from the actual data. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide site. \*indicates VHSV isolates in this study.

로 생각된다.

국내 양식넙치의 RSIV에 대한 감염증은 연근해지역에서 서식하는 자연산 어류와 양식 넙치에서 검출이 되었으나(Cho et al., 2009), 최근 넙치에서의 RSIV에 대한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구의 RSIV의 감염검사 결과, 조사기간 동안 RSIV가 검출되지 않았고(Table 4), 전형적인 RSIV 감염 증상인 체색흑화, 몸 표면의 출혈, 비장과 신장의 비대가 육안적으로 관찰되지 않았다(data not shown). 이러한 결과는 Park et al. (2015)

의 연구와 동일한 결과를 나타냈으며, 제주지역에서의 RSIV는 연간 3회의 모니터링을 실시한 결과 모두 검출되지 않은 것으로 보아 질병에 대한 예방 및 대처에 대한 관리가 양호하다는 것으로 판단되며, 특정 질병에 대한 청정화 지역을 위한 지역화 및 구획화의 조건을 충분히 충족시킬 수 있을 것으로 사료된다.

최근 Kim (2015)은 two-step RT-PCR 방법을 사용하여 VHSV IVa를 검출한 바 있으며, 본 연구에서는 VHSV의 N gene (444 bp) 및 G gene (1,340 bp) primer set를 각각 사용한 RT-PCR 방법을 통해 검출하였다. 검출된 2개의 분리주는 15-E03 (SW)과 15-E03 (SD)로 표기하였고, N gene과 G gene 모두 검출되었으나 N gene에 비하여 G gene의 primer set를 사용하였을 때 검출 감도가 좋은 것을 확인하였다(Fig. 1). 검출된 2개의 VHSV 분리주는 GenBank에 등록된 34개의 분리주 N gene과 19개의 분리주 G gene의 염기서열을 기초로 비교 분석하였다.

N gene을 사용한 계통분류학적 분석 결과, 2개의 분리주 모

Table 4. Distribution of virus infection in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in 2015

Virus	Detection rate (%) (No. of positive / No. of farms)		
	March	May	July
VHSV	3.3(2/60)	0(0/55)	0(0/52)
RSIV	0(0/60)	0(0/55)	0(0/52)

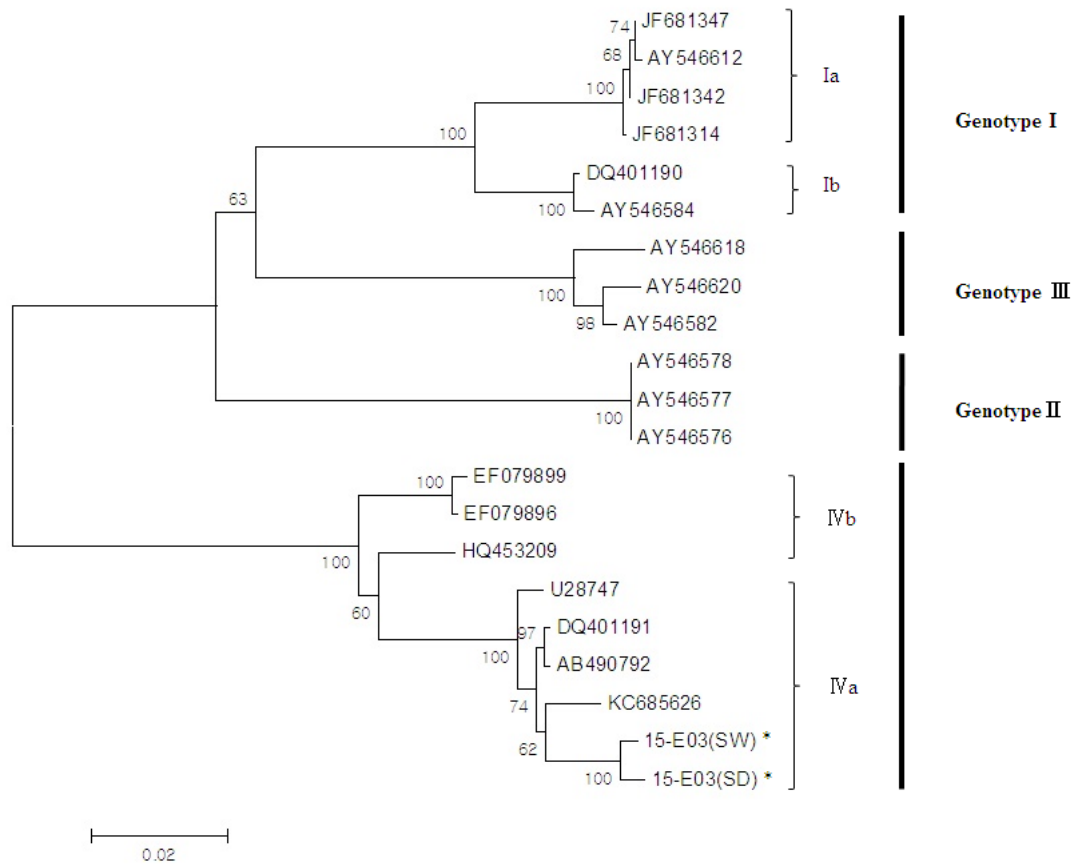


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 21 VHSVs based on the nucleotide sequences of the G gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSVs belong to the genotype IVa. Bootstrap values were transferred to the original maximum likelihood tree derived from the actual data. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide site. \*indicates VHSV isolates in this study.

두 genotype IV인 것으로 조사되었다(Fig. 2). VHSV genotype IV는 북미지역과 일본에서 분리되는 분리주가 포함된 IVa와 IVb subgroups로 구분되며, 2개의 분리주는 현재까지 국내의 VHSV에 대하여 보고된 것과 마찬가지로 모두 genotype IVa에 속한 것으로 분석되었다(Snow et al., 1999; Einer-Jensen et al., 2004; Lumsden et al., 2007). 또한, 본 연구에서 동정된 2개의 분리주는 일본에서 보고된 분리주(accession number: AB179621, AB490792)와 유전적으로 유사한 것으로 확인되었고(Nishizawa et al., 2002), 일본의 분리주와 본 연구에서 동정한 2개의 분리주의 염기서열을 비교한 결과 98.9-99%의 높은 상동성이 관찰되었으며(data not shown), 북미지역에서 분리된 genotype IVb 분리주와는 구분되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

G gene을 사용한 계통분류학적 분석결과, 2개의 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, 99.4-99.6% 및 99.5-99.6%로 각각 높은 상동성이 관찰되었다(data not shown).

본 연구에서 수행된 VHS 및 RSIVD에 대한 질병 모니터링은 질병예방 및 전파 방지 등 방역지도의 기초자료로 활용될 수 있으며, 본 연구를 통하여 VHS 발생 양식장에 대해서는 소독 및 이동제한과 같은 차단방역이 실시되었다. 양식어류에 대한 청정 지역화 및 구획화를 위해서는 향후에도 지속적인 질병 모니터링과 함께 효율적인 방역조치가 이루어져야 할 것이다.

## 사 사

이 논문은 2015년도 국립수산물품질관리원 수산과학연구소(R2015071)의 지원으로 수행된 연구이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## References

- Cho MY, Kim MS, Kwon MG, Jee BY, Choi HS, Choi DL, Park GH, Lee CH, Kim JD, Lee JS, Oh YK, Lee DC, Park SH and Park MA. 2007. Epidemiological study of bacterial diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2006 in Korea. *J Fish Pathol* 20, 61-70.
- Cho MY, Jee BY, Park GH, Lee CH, Lee DC, Kim JW, Park MS and Park MA. 2009. Monitoring of fish pathogens in wild marine fish of Korean coastal offshore water in 2008. *J Fish Pathol* 22, 75-83.
- Cho MY, Park GH, Jee BY and Kim JW. 2010. Statistical data on fish virus of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2007. *J Fish Pathol* 23, 155-162.
- Dale OB, Ørpetveit I, Lyngstad TM, Kahns S, Skall HF, Olesen NJ and Dannevig BH. 2009. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHSV) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis Aquat Org* 85, 93-103. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02065>.
- Do JW, Moon CH, Kim HJ, Ko MS, Kim SB, Son JH, Kim JS, An EJ, Kim MK, Lee SK, Han MS, Cha SJ, Park MS, Park MA, Kim YC, Kim JW and Park JW. 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology* 325, 351-363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.05.008>.
- Do JW, Cha SJ, Kim JS, An EJ, Lee NS, Choi JH, Lee CH, Park MS, Kim JW, Kim YC and Park JW. 2005. Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Dis Aquat Org* 64, 193-200.
- Einer-Jensen K, Ahrens P, Forsberg R and Lorenzen N. 2004. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Gen Virol* 85, 1167-1179. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.798200>.
- He JG, Deng M, Weng SP, Li Z, Zhou SY, Long QX, Wang XZ and Chan SM. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology* 291, 126-139. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2001.1208>.
- Inouye K, Yamano K, Maeno Y, Nakajima K, Matsuoka M, Wada Y and Sorimachi M. 1992. Iridovirus infection of cultured red seabream, *Pagrus major*. *Fish Pathol* 27, 19-27.
- Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T and Miyazaki T. 2001. An outbreak VHSV (viral haemorrhagic septicaemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis Aquat Org* 47, 87-99.
- Kim HJ. 2015. Validation of the sensitivities of one-step and two-step reverse-transcription PCR methods for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) IVa isolates from cultured olive flounder in Korea. *Aquaculture* 448, 359-364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.034>.
- Kim SM, Lee JI, Hong MJ, Park HS and Park SI. 2003. Genetic relationship of the VHSV (viral haemorrhagic septicaemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J Fish Pathol* 16, 1-12.
- Kim WS, Kim SR, Kim DW, Kim JO, Park MA, Kitamura SI, Kim HY, Kim DH, Han HJ, Jung SJ and Oh MJ. 2009. An outbreak of VHSV (viral haemorrhagic septicaemia virus) infection in farmed olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture* 296, 165-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.019>.
- Kim WS, Jung SJ, Kim JO, Kim DW, Kim JH and Oh MJ. 2011. Genetic positioning of Korean viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from cultured and wild marine fishes. *J Fish Pathol* 24, 19. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2011.24.1.001>.
- Lumsden JS, Morrison B, Yason C, Russell S, Yong K, Yaz-

- danpanah A, Huber P, Al-Hussinee L, Stone D and Way K. 2007. Mortality event in freshwater drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicaemia virus, Type IV. *Dis Aquat Org* 76, 99-111.
- Matsukoa S, Inonye K and Nakjima K. 1996. Cultured fish species infected by red seabream iridoviral disease from 1991 to 1995. *J Fish Pathol* 31,233-234.
- Mortensen HF, Heuer OE, Lorenzen N, Otte L and Olesen NJ. 1999. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res* 63, 95-106.
- Nishizawa T, Iida H, Takano R, Isshiki T, Nakajima K and Muroga K. 2002. Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis Aquat Org* 48, 143-148.
- Park HK, Kim SM, Lee DW, Jun LJ and Jeong JB. 2015. Monitoring of VHS and RSIVD in cultured *Paralichthys olivaceus* of Jeju in 2014. *JFMSE* 27, 879-889. <http://dx.doi.org/10.13000/JFMSE.2015.27.3.879>.
- Schutze H, Mundt E and Mettenleiter TC. Complete genomic sequence of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* 19, 59-65.
- Shi CY, Wang YG, Yang SL, Huang J and Wang QY. 2004. The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in China. *Aquaculture* 236, 11-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.004>.
- Snow M, Cunningham CO, Melvin WT and Kurath G. 1999. Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res* 63, 35-44.
- Takano R, Nishizawa T, Arimoto M and Muroga K. 2007. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 20, 186-192.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.