

국내 양식 흰다리새우에서 검출된 노랑머리바이러스(YHV-8)의 유전학적 특성

김석렬* · Gunasekara CWR** · Wimalasena SHMP** · 신기욱**†

*국립수산물과학원 서해수산연구소, **전북대학교 수의학과

Detection and genetic characteristic of Yellow-head virus genotype 8 (YHV-8) Cultured *Litopenaeus vanamei*, in Korea

Seok-Ryel Kim*, Gunasekara CWR**, Wimalasena SHMP** and Gee-Wook Shin**†

*West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Taean 32132, Korea

**Biosafety Research Institute and College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan, 54896

This study was performed for screening yellow head virus(YHV) complex in 252 including 235 white leg shrimps (*Litopenaeus vannamei*) and 17 oriental shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) collected from 18 farms located in southwestern province of Korea. The virus complex was detected by nested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. In the assay, amplicons were resulted in RNAs extracted from 38 shrimps (21 white leg shrimps and 17 oriental shrimps) obtained from 7 farms. In phylogenetic analysis using sequences of ORF1b gene, all 38 sequences obtained in this study formed an independent lineage with YHV-8 genotype firstly isolated in China, belonged to an YHV-8 clade.

Key words: Yellow-head virus, genotype 8, *Litopenaeus vanamei*

1990년 태국 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*) 노지 양식장에서 처음 보고된 노랑머리병(yellow head disease, YHD)을 유발하는 병원체는 *Nidovirales*, *Roniviridae*, *Okavirus*에 속하는 yellow head virus (YHV)로 외막을 가지는 간상의 (+) ssRNA 바이러스이며 크기는 40-60 nm×150-200 nm이다 (Cowley *et al.*, 2012; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). YHD의 주요 임상증상으로는 감염된 개체의 등측 두흉갑에서 보이는 옅은 노란색의 체색변화이다. 그 증상과 함께 수일 내에 누적 폐사율이 100%에

달하여 새우 양식산업에서는 치명적인 질병으로 인식되고 있다(Chantanachookin *et al.*, 1993).

YHV는 유전형에 따라 8가지로 나뉘며(YHV-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), 이를 통틀어 yellow head complex 라고 한다. Yellow head complex 중 YHV 3, 4, 5 그리고 6 유전형은 임상증상이 없는 건강한 새우에서 분리되었지만 나머지 유전형의 경우 새우의 질병과 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다(Yang *et al.*, 2016). 이중, YHV 1은 전형적인 YHD를 유발하여 새우 양식산업에서 막대한 경제적 손실을 유발하기 때문에 세계동물보건기구(OIE)에서 갑각류의 중요 감염성 질병으로 등재되어 있다(OIE, 2019). 국내에서도 이 유전형은 법정수산물전염

†Corresponding author: Gee-Wook Shin
Tel: +82-63-270-3903, Fax: +82-63-270-3778
E-mail: shingw@chonbuk.ac.kr

병으로 지정하여 관리하고 있다(수산생물질병관리법). YHV 2는 gill-associated virus(GAV)로 아시아, 호주 그리고 서아프리카에서 mid-crop mortality syndrome을 유발하는 것으로 보고되었다. 그러나, YHV 7 및 YHV 8 유전형은 각각 임상증상을 보이는 홍다리 얼룩새우와 대하에서 처음 분리되었으나 폐사와의 직접적인 상관관계는 불분명하다(Mohr et al., 2015; Yang et al., 2016; OIE, 2019).

국내 양식산업에 의한 새우 생산량은 소비량에 비해 절대적으로 부족하여 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다. 새우 무역은 신종 병원체의 유입으로 인해 수입국 새우 양식산업의 발전을 저해할 수 있다. 따라서, 국내 미발생 감염병을 유발할 수 있는 신종 병원체의 유입 차단을 위해 검역 강화 그리고 국내 새우 양식장의 주기적인 예찰이 필요한 실정이다. 이러한 이유에서 본 연구는 국내 서남쪽 지역에 위치한 18곳의 흰다리새우(*Litopenaeus vanamei*) 양식장에서 새우를 수거하여 yellow head complex를 조사하였고 YHV의 유전형을 분석하였다.

국내 양식 새우에서 Yellow head complex를 조사하기 위해 2019년 서남해에 위치한 18곳 양식장으로부터 흰다리새우 235마리(전장: 16.5-20.5 cm, 체중: 12.1~25.7 g)와 자연산 대하 17마리(전장: 18.5-21.9 cm, 체중: 56.1~80.7 g)를 채집하여 냉장 상태로 밀봉하여 실험실로 수송 후 아가미를 적출하여 RNeasy PowerLyzer Tissue & cells kit를 사용하여 RNA를 추출하여 -80°C에 보관하였다. Yellow head complex의 검출은 OIE (2019)에서 추천하는

protocol 3의 nested RT-PCR을 위한 primer set 그리고 thermocycle condition에 준하여 수행하였다(Table 1). 새우 아가미로부터 추출한 RNA는 High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit(Applied Biosystem™, ThermoFisher SCIENTIFIC)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. First rounding PCR은 합성된 cDNA 3 µl, YC-F1ab 그리고 YC-R1ab primer pool (25 pmol)의 1 µl를 첨가한 AccuPower® Multiplex PCR Premix(Bioneer)의 20 µl reaction buffer에서 수행하였다. 그리고, second rounding PCR은 first rounding PCR product의 1 µl, YC-F2ab 그리고 YC-R2ab primer pool(25 pmol)의 0.35 µl 그리고, Accu Power® Multiplex PCR Premix(Bioneer)를 첨가한 20µl reaction buffer에서 수행하였다. 증폭산물의 확인은 1.5% agarose gel electrophoresis 후 UV light 하에서 육안으로 확인하였다. Nested PCR을 위한 양성 유전자는 증폭 target DNA가 삽입된 plasmid로 전남대학교 수산생명의학과에서 제공받아 사용하였다. 전기영동에서 확인된 146 bp의 증폭산물은 PCR gel purification kit를 사용하여 정제하였으며 YC-F2a, YC-R2a primer set를 사용하여 PCR을 수행, 염기서열 분석을 하였다. 염기서열들은 bioedit Ver.7.2.1를 사용하여 multiple alignments를 실시하였고, MEGA7 software에서 근린결합분석(neighbor-joining analysis; 5,000 rounds of bootstrap)을 통하여 phylogenetic analysis를 수행하였다.

Nested RT-PCR을 수행한 결과, 기존에 보고된 연구(Wijegoonawardane et al., 2008)와 동일하게 1

Table 1. Primer set used in this study

nRT-PCR	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
First PCR	YC-F1a	ATCGTCGTCAGCTACCGCAATACTGC	359
	YC-F1b	ATCGTCGTCAGYTAYCGTAACACCGC	
	YC-R1a	TCTTCRCGTGTGAACACYTTCTTRGC	
	YC-R1b	TCTGCGTGGGTGAACACCTTCTTGGC	
Second PCR	YC-F2a*	CGCTTCCAATGTATCTGYATGCACCA	147
	YC-F2b	CGCTTYCARTGTATCTGCATGCACCA	
	YC-R2a*	RTCDGTGTACATGTTTGAGAGTTTGT	
	YC-R2b	GTCAGTGTACATATTGGAGAGTTTTRT	

*These primers were used for sequencing amplicons.

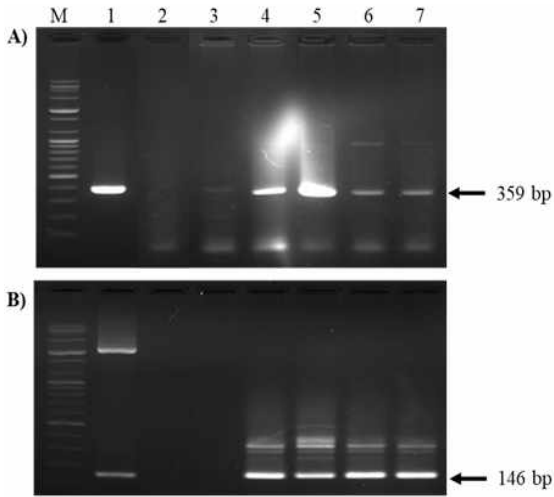


Fig. 1. Nested PCR assay for screening yellow head complex. A) First rounding PCR. B) Second rounding PCR. M: 100 bp DNA marker. Lane 1, positive control; Lane 2, negative control (without target DNA fragment). Lane 3-7; Shrimp samples.

차 PCR에서 359bp 그리고 2차 PCR에서 146bp의 주요 증폭산물과 200~500bp의 범위 내에서 다양한 크기의 비특이 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1). Wijegoonawardane et al.(2008)은 2차 PCR에서 관찰된 비특이산물은 사용된 template의 양과 관계있는 것으로 보고하였다. 한편, second rounding PCR의 positive control에서 대략 1,500bp의 다른 증폭산물이 보였다(Fig. 1B, Lane 1). 그러나, 그 증폭산물은 새우 아가미 조직을 사용한 현 PCR에서는 관찰할 수 없었다(Fig. 1B, Lane 3~7). 본 연구에서 사용된 positive control은 target DNA를 plasmid에 삽입한 것으로, 1,500 bp의 증폭산물은 비특이적 증폭산물로 추정된다.

Nested RT-PCR로 yellow head complex를 스크리닝 한 결과, 13 양식장에서 수집한 235 개체 중 7곳의 양식장 21 개체, 자연산 대하 17 개체에서 양성 반응이 확인되었다(Table 2). 증폭산물의 염기서열로 blast searching 결과 중국에서 분리된 YHV-8의 ORF1b와 95~98%의 identity를 보였으며 phylogenetic analysis를 수행한 결과 증폭산물 간의 평균 divergency는 0.004이었다. 그리고 증폭산물들의 염기서열들과 각 YHV의 genotype에 대해 평균 di-

Table 2. Prevalence of yellow head complex in shrimps

Farm	Species	No. of shrimp	No. positive (%)
Gochang A	<i>L. vannamei</i>	3	0 (0)
Gochang B	<i>L. vannamei</i>	4	1 (25.0)
Gochang C	<i>L. vannamei</i>	7	2 (28.6)
Gochang D	<i>L. vannamei</i>	8	3 (37.5)
Gochang E	<i>L. vannamei</i>	9	2 (22.2)
Boreyong A	<i>L. vannamei</i>	17	2 (11.8)
Boreyong B	<i>L. vannamei</i>	39	2 (5.1)
Gochang F	<i>L. vannamei</i>	14	2 (14.3)
Daecheon	<i>F. chinensis</i>	17	17 (100)
Gochang G	<i>L. vannamei</i>	13	1 (7.7)
Wando A	<i>L. vannamei</i>	38	0 (0)
Wando B	<i>L. vannamei</i>	13	1 (7.7)
Wando C	<i>L. vannamei</i>	20	2 (10.0)
Wando D	<i>L. vannamei</i>	50	3 (6.0)
Total		252	38 (15.1)

vergency를 조사한 결과, 각각 YHV-1과 0.101, YHV-2와 0.154, YHV-3와 0.193, YHV-4와 0.139, YHV-5와 0.121, YHV-6와 0.180, YHV-7과 0.150 그리고 YHV-8과 0.027이었다. 위와 같이 새우의 조직에서 yellow head complex를 스크리닝 결과, 얻어낸 증폭산물의 염기서열들은 YHV-8과 가장 가까운 근연관계가 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, phylogenetic tree에서도 증폭산물들은 기존에 보고된 YHV-8와 함께 독립된 cluster를 형성하였다(Fig. 2).

Yellow head complex 중 YHV-8는 2014년 중국에서 급성간췌장괴사증에 이환된 대하에서 처음 보고되었다(Liu et al., 2014). 한편, Yang et al.(2016)은 스크리닝한 시료 중 흰다리새우(2.7%), 징거미새우(*Macrobrachium rosenbergii*, 26.32%), 대하(75.0%)에서 검출되었으나 보리새우(*Marsupenaeus Japonicus*)에서는 검출되지 않았다고 보고하였다. 국내에서 YHV-8은 2018년 10월 충남 보령에서 채집된 자연산 어미 대하에서 (31.3%) 그리고 2019년 4월 전남 고흥에서 채집된 자연산 어미 대하 (68.0%)가 검출된 바 있다(NIFS, 2019). 본 연구에서는 충남 대천에서 채집한 어미 대하 17 마리 모두에서 검출되었다(17/17). 그러나, 흰다리새우에서 검출율은 8.9%(21/235)였다. 따라서, 대하는 YHV-8의

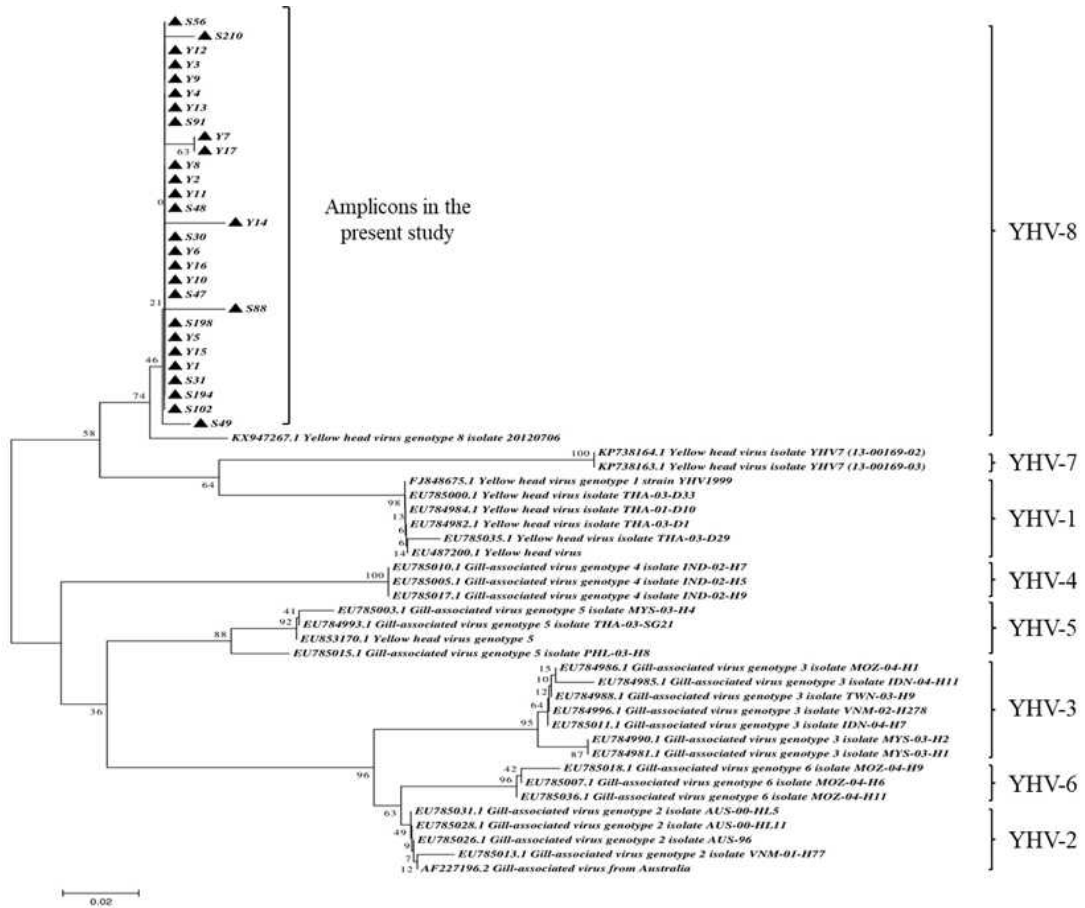


Fig. 2. Evolutionary relationships of *YHV* strains isolated from shrimp samples. The NJ tree was constructed based on the *ORF1b* region (147 bp) of twenty nine *YHV* strains obtained from the present study and reference strains from a database. Strains in the present study are marked with triangle.

주요 숙주(host)일 가능성이 높다.

흰다리새우에서 YHV-8의 검출은 중국에서 처음 보고되었으며(Yang et al., 2016), 국내에서는 본 연구가 최초이다. Yellow head complex 중 YHV-1과 YHV-2는 새우에서 명확한 임상증상을 나타내며, 폐사와 관여있는 것으로 알려져 있다(Cowley et al., 2012). YHV-1은 태국 홍다리얼룩새우에서 1990년대 처음 확인되어 OIE 주요 갑각류 전염성 질병으로 등록되어 있고 국내에서도 법정수산물 전염병으로 지정하여 관리하고 있다(수산물 질병관리법). YHV-2(genotype 2)는 gill-associated virus (GAV)로 알려져 있다. 한편, YHV-7은 *Vibrio harveyi*에 감염된 홍다리얼룩새우에서 보고되었

고, YHV-8은 급성간체장괴사증을 가지는 대하에서 검출되었다(Dong et al., 2017; Mohr et al., 2015; Yang et al., 2016, Zhu et al., 2016). 따라서, 이 두 유전형에 의한 새우의 질병 발생 및 폐사와의 직접적인 연관성은 불분명하다. 두 유전형에 의한 새우의 질병 발생 및 폐사와의 직접적인 연관성은 불분명하다. 본 연구에서 YHV-8이 검출된 38(흰다리새우 21마리 그리고 대하 17마리)개체들로부터 AHPND진단을 위한 AP4 primer를 사용한 PCR assay (Dangtip et al., 2015)를 수행한 결과 흰다리새우 8마리에서 양성을 보였으나 대하 17개체를 포함한 30마리에서는 음성반응을 보였다. 게다가, 두 질병의 단일 또는 복합으로 진단된 개체는 외관상

그 질병들과 연관한 뚜렷한 임상증상을 보이지 않았다(data not shown). 따라서, YHV-8의 감염은 AHPND와 무관하며 새우에서 뚜렷한 임상증상을 보이지 않는 것으로 생각된다.

기존에 국내 연안에서 포획된 자연산 대하와 더불어 현 연구에서 양식산 흰다리새우에서도 YHV-8가 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 국내에서는 YHV는 2013년도까지 보고된 바 없으나(Kim *et al.*, 2014) 2019년부터 자연산 및 양식산 새우에서 YHV-8이 검출되고 있다. YHV-8은 국내 검역·방역 및 OIE 등록 전염병이 아니어서 방역 조치 대상 질병이 아니지만 향후 역학 조사를 통한 YHV-8의 유입경로 및 양식산 흰다리새우에서의 질병 관여 역할을 규명해야 할 필요성은 있다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원(R2020012) 그리고 한국해양과학기술진흥원(Project No. 20190392)의 지원에 의해서 운영되었습니다.

References

Korean Law: Aquatic life disease control act. Act No. 15131. 2017.

Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusaratana, S., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S. and Flegel, T.W., 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Diseases of Aquatic Organisms*. 17: 145-157.

Cowley, J.A., Walker, P.J., Flegel, T.W., Lightner, D.V., Bonami, J.R., Snijder, E.J. and Groot, R.J., 2012. Family roniviridae. In: *Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier, Academic Press.

Dong, X., Liu, S., Zhu, L., Wan, X., Liu, Q., Qiu, L., Zou, P., Zhang, Q. and Huang, J. 2017. Complete genome sequence of an isolate of a novel genotype of yellow head virus from *Fenneropenaeus chinensis*

indigenous in China. *Archives of Virology*. 162: 1149-1152.

Kim, S.M., Choi, M.J., Kim, S.R., Kang S.K., Hwang, H.Y., Jang, I.K., Kim, J.W., Jee, B.Y., Shin, K.W. and Park, M.A. 2014. Monitoring of legally designated disease in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in Korea (2010~2013). *Journal of Fish Pathology*. 27: 91-97.

Liu, Q., Huang, J., Yang, H.L., Yang, B., Liu, S., Wang H.L., Wang, Q.T., Liu, F. and Zhang Q.L., 2014. Detection of a new genotype of yellow-head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanologia et Limnologia Sinica*. 45: 703-709

Mohr, P.G., Moody, N.J., Hoad, J., Williams, L.M., Bower, R.O., Cummins, D.M., Cowley, J.A. and StJ Crane, M., 2015. New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Disease of Aquatic Organisms*. 115: 181-186.

NIFS (National Institute of Fisheries and Science). 2019. Report of National Institute of Fisheries Science.

OIE. 2019. Infection with yellow head virus genotype I. In: *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Wijegoonawardane, P.K., Cowley, J.A., Phan, T., Hodgson, R.A., Nielsen, L., Kiatpathomchai, W. and Walker, P.J., 2008. Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology*, 380: 213-225.

Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Akrajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22: 45-50.

Yang, H.L., Qiu, L., Liu, Q., Wan, X.Y., Liu, S., Zhu, L.L., Yang, B., Zhang, Q.L., and Huang, J., 2016. A novel method of real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification developed for rapid and quantitative detection of a new genotype (YHV-8) of yellow head virus. *Letters in Applied Microbiology*. 63: 103-110.

Zhu, L.L., Zhang, Q.L., Wan, X.Y., Qiu, L., Ma, F. and Huang, J. 2016. Molecular epidemiology of a new yellow head virus strain in China. *Progress in Fishery Sciences*, 37: 68-77.