

참조기(*Larimichthys polyactis*)에서 분리된 *Neobenedenia* spp.에 대한 분자 생물 동정 및 계통수 분석

서한길*[†] · 김효원* · 김정현**

*국립수산물연구원 남해수산연구소, **국립수산물연구원 제주수산연구소

Molecular identification and phylogenetic analysis of *Neobenedenia* spp. isolated from small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*)

Han-Gill Seo*[†], Hyo-Won Kim* and Jung-Hyun Kim**

*South Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Yeosu, Korea

**Jeju Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Jeju, Korea

In this study, we determined the cause of a disease outbreak in small yellow croaker(*Larimichthys polyactis*) in Jeju island. The major external signs in the dead fish were hemorrhage of the skin. *Vibrio harveyi* were isolated from a few fishes and viruses were not detected from the diseased fish. However, flukes were confirmed on the skin and we conducted molecular identification and phylogenetic analysis of the isolated parasites. The obtained 28S rRNA sequence of our specimen(Accession No. OM333244) showed the highest homology with *Neobenedenia girellae*, while the COI sequence of our specimen showed the highest homology with *N. melleni*. Further sequence analysis with other genes and morphological observation are necessary for accurate identification.

Key words: small yellow croaker, *Neobenedenia* spp., 28S rRNA, COI

서 론

우리나라 연근해의 주요 어업자원 중 하나인 참조기는 농어목 민어과에 속하며 우리나라에서 선호도가 높은 고부가가치 어종이다. 봄에는 서해 연안에서 산란한 후 외해로 이동하며 겨울에는 제주도 서부 해역에서 월동하는 회유성 어종이며 수심 40~200 m에 서식한다(Kang et al., 2020). 우리나라 연근해 참조기 자원은 1974년 이후 과잉 어획으로 자원량이 감소하고, EEZ(exclusive economic zone)

선포로 어장이 축소되어 어획가능한 자원이 감소하였으며, 이후 증가와 감소를 반복하고 있다(Zhang et al., 1992). 2016년 기준 국내 참조기는 19,271톤이 생산되어 생산금액은 1,795억원이었으며, 2020년 기준 41,039톤이 생산되어 생산금액은 2,899억원으로 최근에 생산량과 생산금액이 모두 증가하고 있다. 하지만 기후변화와 남획 등으로 인하여 참조기 자원의 개체가 점차 소형화되고 있으며, 연근해 참조기 어획에 대한 대책 수립이 요구됨에 따라 기존의 양식시설을 활용한 참조기 양식이 증가하고 있는 실정이다. 2016년 10개소에서 36톤이 생산되었으며, 2020년에는 19개소에서 111톤이 생산되어 참조기의 양식 생산량은 꾸준히 증

[†]Corresponding author: Han-Gill Seo
Tel: +82-61-690-8996, Fax: +82-61-685-9073
E-mail: se852@korea.kr

가하고 있다(KOSIS, 2022).

해산어류의 양식은 안정적인 종묘생산 기술과 적합한 양식기술이 선행되어야 하지만, 연중 발생하는 질병과 사육환경의 급변으로 인하여 양식장 경영에 애로가 누적되고 있는 실정이다. 그 중에서도 기생충의 감염은 체표 또는 아가미 등에 부착하여 빈혈이나 이상유영을 일으키며, 궤양 등 상처를 통한 세균의 2차 감염으로 직·간접적 폐사를 유발하여 양식생산성을 하락시키기도 한다. 기생충 중에서도 단생흡충류인 *Benedenia* spp.는 방어류와 돌돔 등의 양식어류에 감염되어 큰 피해를 유발한다고 보고되어 있다(Bullard et al., 2000; Sepúlveda and Gonzalez, 2014). 또한 이 기생충은 숙주의 피부에 부착하여 점액 및 상피세포 등을 섭취하며, 상처를 통한 세균의 2차 감염 등을 유발하기도 한다(Kawato et al., 2019).

분자 생물 종 분류 및 동정을 위한 유전자 마커로는 ribosomal RNA(rRNA), mitochondrial DNA(mtDNA) 및 microsatellite DNA 등이 있다(Seo et al., 2015). rRNA는 18S, 5.8S 및 28S 유전자와 internal transcribed spacers(ITS) 및 external transcribed spacers(ETS)로 구성되어 있으며, 이 중에서 28S rRNA는 계통수 분석 및 종 동정 등에 사용되는 유전자 마커다(Olson and Littlewood, 2002). 또한 mtDNA는 고변이성 유전자로서 종의 진화적 유연관계를 분석하는데 용이하며 이 중에서 cytochrome c oxidase subunit I(COI)는 다양한 해양 무척추동물들의 유전자 연구에 사용되는 등 마커로 활용되고 있다

(Edmands et al., 1996).

본 연구에서는 사육중인 참조기에서 확인된 피부 기생충을 분리하였으며, 28S rRNA 및 COI 유전자 마커를 사용한 유전자 분석과 분자 생물 동정 및 계통수 분석을 수행하였다.

제주도에서 사육중인 참조기에서 체표 출혈과 안구 돌출 등의 외관상 이상 증상이 관찰되어(Fig. 1) 이들 중 일부 개체(n=4)를 냉장상태로 실험실로 운반하였으며, 임상검사와 더불어 세균, 바이러스 및 기생충에 대한 일반적인 질병검사를 실시하였다. 세균 검사를 위하여 신장조직을 무균적으로 적출 후 1.5% NaCl이 포함된 Tryptic Soy Agar(TSA)와 TCBS 평판배지에 도말한 뒤 25°C 항온배양기에 24시간 배양하였다. 일부 개체에서(n=2) 배양된 세균은 순수분리 하였으며, 16S rRNA PCR을 실시하였다(Table 1). PCR product는 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 band를 확인하였으며 증폭이 확인된 시료의 16S rRNA 염기서열 분석 결과 *Vibrio harveyi*로 동정되었다(Data not shown). 바이러스 검사는 신장과 비장 조직을 사용하여 HIRAE rhabdovirus(HRV), Viral hemorrhagic septicaemia virus(VHSV), Marine birnavirus(MBV) 및 Red seabream iridovirus(RSIV)를 대상으로 실시하였으며, 뇌 조직을 사용하여 Nervous necrosis virus(NNV)를 대상으로 실시하였다. 각 조직을 무균적으로 적출한 뒤, 마쇄 후 DNA 및 RNA를 추출하였다. RNA는 cDNA합성 후 PCR을 실시하였으며(Table 1), 모든 개체에서 바이러스는 검출되지 않



Fig. 1. Diseased fish showing hemorrhages on the skin (left) and exophthalmos (right).

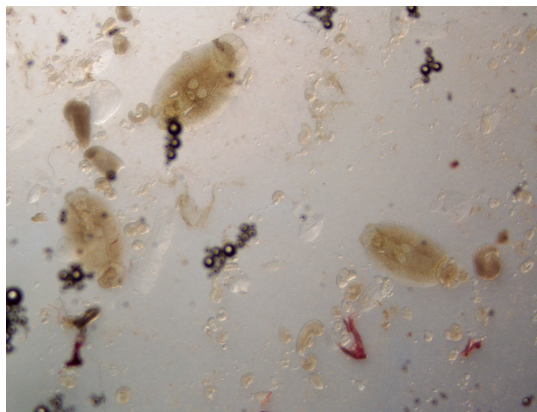
Table 1. Primer set used in this study for PCR

Target	Gene	Primer	Nucleotide sequence	References
Bacteria	16S rRNA	27F	5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3'	Kim et al. (2005)
		1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGAC-3'	
Virus	HRV	HRV-M-F	5'-TGAGGTAGAGCAAGCCAACA-3'	Seo et al. (2016)
		HRV-M-R	5'-ACATGACTGGCCGAAAAGAG-3'	
	VHSV	VN-For	5'-ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG-3'	Snow et al. (2004)
		VN-Rev	5'-GCGGTGAAGTGCTGCAGTTCCTCC-3'	
	MBV	MBV-F	5'-GCACCACGAAGGTACGAAAT-3'	Lee et al. (2006)
		MBV-R	5'-GTACGTTGCCGTTTCCTGAT-3'	
Virus	NNV	NNV-F2	5'-CGTGTCAGTCATGTGTCGCT-3'	Nishizawa et al. (1994)
		NNV-R3	5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'	
	RSIV	RSIV-1-F	5'-CTCAAACTCTGGCTCATC-3'	Kurita et al. (1998)
		RSIV-1-R	5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3'	
Parasite	28S rRNA	C1	5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3'	Chisholm et al. (2001)
		D2	5'-TGGTCCGTGTTTCAAGAC-3'	
	COI	JB3	5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3'	Leung et al. (2009)
		COX1	5'-AATCATGATGCAAAAGGTA-3'	

았다.

기생충 검사를 위하여 피부를 대상으로 현미경 표본을 제작 후 검경한 결과 *Neobenedenia* spp.로 추정되는 흡충을 다수 확인하였다(Fig. 2). 이후 분리한 충의 종 동정을 위하여 DNA를 추출하였고 28S rRNA 및 COI 유전자를 증폭할 수 있는 primer set를 사용하여 PCR을 실시하였다(Table 1). PCR product는 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 band를 확인하였으며, 증폭이 확인된 시료

는 염기서열 분석을 실시하여 종 동정을 실시하였다. 염기서열의 분석에는 BioEdit 및 MEGA 11 program을 사용하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 기존에 보고된 기생충 유전자와의 상동성 분석을 실시하였다. 28S rRNA 유전자를 사용한 동정 결과 (844bp) 포르투갈의 귀족 도미(Gilthead seabream, *Sparus aurata*)에서 분리된 *N.girellae*와 100% 상동

Fig. 2. Light microscopic observations of *Neobenedenia* spp. (left: x10, right: x50).

성이 확인되었으며, COI 유전자 동정 결과(875bp) 중국의 잭방어(Greater amberjack, *Seriola dumerili*)에서 분리된 *N. melleni*와 99.89% 상동성이 확인되었다. 본 연구에서 분리한 참조기 유래 *Neobenedenia* spp. 28S rRNA nucleotide sequence(844 bp)는 NCBI GenBank에 등재하였다(Accession No. OM333244).

분석이 완료된 염기서열은 MEGA 11 program의 근린결합분석(neighbor-joining analysis, 1000 rounds of bootstrap)을 통하여 계통수 분석을 실시하였으며 유전적 유연관계를 확인하였다. 본 연구에서 확보한 참조기 분리 *Neobenedenia* 28S rRNA 및 COI 유전자 염기서열은 GenBank에 등재되어있는 *Benedenia* 및 *Neobenedenia* 속 유전자 18종 및 8종과 비교분석을 각각 실시하였다. 28S rRNA 및 COI 유전자에 대한 계통분석을 수행한 결과 *N. girellae* 및 *N. melleni*와 각각 매우 근연한 것으로 확인되었다(Fig. 3, Fig. 4).

Neobenedenia 속 기생충은 *Benedenia* 속 기생충과는 질이 없다는 점에서 형태학적으로 구별되며, *Neobenedenia* 속 기생충은 전방 부착기관 및 생식기 모양 등에 따라 기존의 10종에서 6종으로 재분류되었다. 특히, *N. girellae*와 *N. pargueraensis*는 *N. melleni*의 동종이명으로 간주되었다(Whittington and Horton, 1996). 하지만 최근 연구에서 다수의 *Neobenedenia* 속 기생충에 대한 Histone 3, 28S rRNA 및 cytochrome b(cyt b) 유전자 분석 결과 *N. girellae*, *N. melleni*는 서로 다른 종이임이 밝혀졌으며, 기존에 다양한 어종에서 분리되어 Genbank에 등재되어 있는 *N. girellae* 및 *N. melleni*의 유전자 염기서열 정보들은 재정비가 필요하다고 하였다(Brazenor et al., 2018). 본 연구에서도 참조기 분리 28S rRNA와 COI 유전자 염기서열을 사용하여 계통수를 작성한 결과, *N. girellae* 및 *N. melleni*로 등재되어 있는 일부 염기서열들이 동일한 클러스터로 묶이는 현상을 보였다(Fig. 3, 4). 또한, *Neobenedenia*

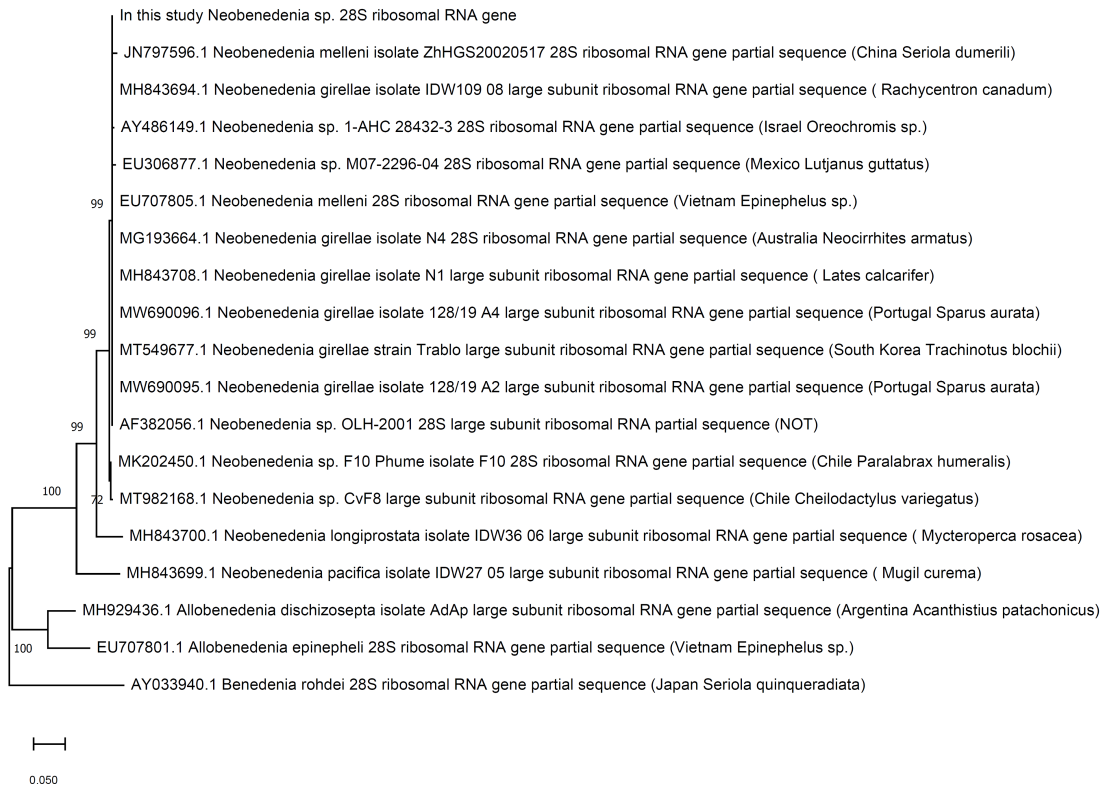


Fig. 3. Neighbor-joining analysis of *Neobenedenia* 28S rRNA sequences from small yellow croaker.



Fig. 4. Neighbor-joining analysis of *Neobenedenia* cytochrome c oxidase subunit I(COI) sequences from small yellow croaker.

속의 COI 유전자는 GenBank에 등재되어 있는 염기서열의 개수가 많지 않아 충분한 비교분석이 곤란하였다.

2019년 한국 무점매가리(*Snubnose pompano*, *Trachinotus blochii*)에서 분리된 피부흡충은 28S rRNA 및 cyt b 유전자 분석 결과 *N. girellae*로 동정되었다(Nam et al., 2021). 하지만 해당 보고는 수족관 내에서 사육중인 어류에서 분리된 것으로서 자연적 감염 또는 타 어류로부터의 감염인지 명확하지 않다고 하였다. 기존의 보고에 따르면 *N. girellae*는 숙주 특이성이 매우 낮아 넙치, 자주복, 참돔 등 다양한 어종에서 발견된다고 한다(Ogawa et al., 1995; Brazenor et al., 2018). 본 연구에서 최초로 확인된 참조기 분리 *N. spp.*는 참조기 단독 사육과정에서 확인되었으며, 다양한 어종에서 분리된다는 기존의 보고와 일치하였다.

본 연구결과, 참조기에서 최초로 분리된 *Neobenedenia*는 28S rRNA와 COI 염기서열만으로는 중수준에서 명확한 동정이 불가능하였으며, cyt b 등

의 다른 유전자 마커를 이용한 분자 생물 동정 또는 형태학적 동정이 추가로 필요할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원(고수온 대응 양식품종 교잡바리류 양성기술 연구, R2022004)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Brazenor A.K., Bertozzi T., Miller T.L., Whittington I.D. and Hutson K.S. DNA profiling reveals *Neobenedenia girellae* as the primary parasitic monogenean in global fisheries and aquaculture. Mol. Phylogenet. Evol., 129, 130-137, 2018.
- Bullard S.A., Benz G.W., Overstreet R.M., Williams Jr. E.H. and Hemdal J. Six new host records and an updated list of wild hosts for *Neobenedenia melleni* (MacCallum) (Monogenea: Capsalidae). Comp. Parasitol., 67, 190-196, 2000.

- Chisholm L.A., Morgan J.A.T., Adlard R.D. and Whittington I.D. Phylogenetic analysis of the Monocotylidae (Monogenea) inferred from 28S rDNA sequences. *Int J Parasitol.*, 31, 1253-1263, 2001.
- Edmands S., Moberg P.E. and Burton R.S. Allozyme and mitochondrial DNA evidence of population subdivision in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Mar Biol.*, 126, 443-450, 1996.
- Kang H.J., Ma J.Y., Kim H.J. and Kim H.J. Estimating length at sexual maturity of the small yellow croaker *Larimichthys polyactis* in the yellow sea of Korea using visual and GSI methods. *Korean J Fish Aquat Sci.*, 53(1), 50-56, 2020.
- Kawato S., Kobayashi K., Shirakashi S., Yanagi S., Fukuda Y., Yamashita H., Nozaki R., Hirono I. and Kondo H. Phylogenetic analysis with complete mitochondrial genome sequences of *Benedenia seriola* specimens derived from Japanese *Seriola* spp. *Fish Pathol.*, 54(2), 27-33, 2019.
- Kim S.M., Won K.M., Woo S.H., Li H., Kim E.J., Choi K.J., Cho M.Y., Kim M.S. and Park S.I. *Vibrios* isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. *J Fish Pathol.*, 18, 133-145, 2005.
- KOSIS (Korean Statistical Information Service). Statistic database for fisheries production and aquaculture production. Retrieved from <https://kosis.kr/index/index.do> on 2022.
- Kurita J., Nakajima K., Hirono I. and Aoki T. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, 33, 17-23, 1998.
- Lee D.C., Cho M.Y., Cha S.J., Park S.H., Park M.A. and Kim J.W. Monitoring of diseases in wild marine fish stocks collected in June 2006 by a trawl in the Southern Korean waters. *J Fish Pathol.*, 19, 215-225, 2006.
- Leung T.L.F., Donald K.M., Keeney D.B. and Koehler A.V. Trematode parasites of Otago Harbour (New Zealand) soft-sediment intertidal ecosystems: Life cycles, ecological roles and DNA barcodes. *N Z J Mar Freshwater Res.*, 43, 857-865, 2009.
- Nam U.H., Seo H.J., Hwang I. and Kim J.H. *Neobenedenia girellae* infection of aquarium-raised snubnose pompano (*Trachinotus blochii*) in Korea. *J. Fish Pathol.*, 33(1), 15-21, 2020.
- Nishizawa T., Mori K., Nakai T., Furusawa I. and Muroga K. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis Aquat Org.*, 18, 103-107, 1994.
- Ogawa K., Bondad-Reantaso M.G., Fukudome M. and Wakabayashi H. *Neobenedenia girellae* (Hargis, 1955) Yamaguti, 1963 (Monogenea: Capsalidae) from cultured marine fishes of Japan. *J. Parasitol.*, 81, 223-227, 1995.
- Olson P.D. and Littlewood D.T.J. Phylogenetics of the Monogenea evidence from a medley of molecules. *Int J Parasitol.*, 32(3), 233-244, 2002.
- Seo H.G., Do J.W., Jung S.H. and Han H.J. Outbreak of hirame rhabdovirus infection in cultured spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* on the western coast of Korea. *J Fish Dis.*, 39, 1239-1246, 2016.
- Seo H.G., Seo J.S., Ryu M.K., Lee E.H., Jung S.H. and Han H.J. Molecular identification and development of a PCR assay for the detection of a philometrid nematode in Rockfish *Sebastes schlegeli*. *Korean J Fish Aquat Sci.*, 48(5), 731-738, 2015.
- Sepúlveda F.A. and González M.T. Molecular and morphological analyses reveal that the pathogen *Benedenia seriola* (Monogenea: Capsalidae) is a complex species: Implications for yellowtail *Seriola* spp. aquaculture. *Aquaculture*, 418-419, 94-100, 2014.
- Snow M., Bain N., Black J., Taupin V., Cunningham C.O., King J.A., Skall H.F. and Raynard R.S. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis Aquat Org.*, 61, 11-21, 2004.
- Whittington, I.D. and Horton, M.A. A revision of *Neobenedenia Yamaguti*, 1963 (Monogenea: Capsalidae) including a redescription of *N. melleni* (MacCallum, 1927) Yamaguti, 1963. *J. Nat. History*, 30, 1113-1156, 1996.
- Zhang C.I., Kim Y.M., Yoo S.J., Kim C.K. and Ahn S.M. A study on fluctuations in biomass of small yellow coraker, *Pseudosciaena polyactis*, off Korea. *Bull Korean Fish Soc.*, 25(1), 37-44, 1992.

Manuscript Received : Mar 21, 2022

Revised : Apr 28, 2022

Accepted : May 25, 2022