



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

rDNA sequence 비교를 통한 한국과  
일본 유래 *K. septempunctata*의  
구분 maker 개발 가능성에 대한 연구

제주대학교 대학원

해양생명과학과

마 정 인

2017 年 2 月

rDNA sequence 비교를 통한 한국과  
일본 유래 *K. septempunctata*의  
구분 maker 개발 가능성에 대한 연구

지도교수 이 제 희

마 정 인

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2017년 2월

마정인의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	<u>          관창          </u>	
위      원	<u>          이 제 희          </u>	
위      원	<u>          신삼필          </u>	

제주대학교 대학원

2017년 2월

# ABSTRACT

*Kudoa septeempunctata*, is a MYXOSPOREAN parasite that infect trunk muscles of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). To dates, Olive flounder aquafarm industry has been suffering a huge economic loss caused by this parasitic infection. Reason findings demonstrated that this parasite can infect to humans and cause food poisoning. Therefore detection of *K. septeempunctata* at the initial stage of the infection is useful to develop proper disease management strategies. *K. septeempunctata* has three distinct genotypes, ST1, ST2 and ST3, which could be distinguished by presence of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions situated between small-subunit rRNA and large subunit rRNA. Typically, ST1 and ST2 genotypes can be identified in Japan, while ST3 known to be found in Korea. This study was focused to develop the PCR based method to distinguish *K. septeempunctata* local difference using ITS sequences. PCR primers were designed based on rDNA sequences of *K. septeempunctata* followed by PCR was preformed using genomic DNA extracted from *K. septeempunctata* infected olive flounders obtained from Korea and Japan. According to the cloning results, rDNA sequence difference of the Korean and Japanese originated *K. septeempunctata* were confirmed. Therefore we suggest, this method is reliable for distinguish the *K. septeempunctata* local difference.

# CONTENTS

ABSTRACT .....	i
CONTENTS .....	ii
Table .....	iii
Figure .....	iv
1. INTRODUCTION .....	1
1.1 점액포자충 .....	1
1.2 <i>Kudoa septempunctata</i> .....	2
1.3 ITS .....	4
1.4 연구목적 .....	6
2. MATERIAL AND METHOD .....	8
2.1 Fish and sample .....	8
2.2 Primer design .....	8
2.3 Cloning .....	9
2.4 Detection .....	9
3. RESULT .....	10
3.1 <i>K. septempunctata</i> rDNA alignment .....	10
3.2 ICG kit detection result .....	10
3.3 Real time PCR detection result .....	11
4 DISCUSSION .....	17
5 SUMMARY .....	18
REFERENCE .....	19
감사의 글 .....	25

## Table

Table 1. PCR primer

## Figure

**Figure 1.** *Kudoa septempunctata* ITS sequence Alignment.

**Figure 2.** Infection rate data of *K.septempunctata* in 0.6kg group and 1.5kg group.

# 1. INTRODUCTION

## 1.1

점액포자충은 주로 무척추동물 및 어류에 기생하는 기생충으로, 숙주에 대한 기관 특이성이 매우 강하다(Oh, 2011). 포자는 1개의 이분엽핵 또는 2개의 단핵을 가진 포자원형질, 극사가 나선상으로 들어있는 극낭, 2~6개의 포자 각을 가지고 있다(Oh, 2011).

점액포자충과 방선포자충의 2강으로 분류하였지만, 서로 다른 숙주에서 포자를 만든 방선포자충은 점액포자충의 지렁이 내에 기생 중 이므로 방선포자충강은 없어지게 되었다. 담수산 점액포자충은 빈모류와 어류의 다른 2종의 숙주를 필요로 하는 생활사를 가지고 있다고 말할 수 있다. 따라서 빈모류를 점액포자충의 중간 숙주라는 용어를 사용하지 않고 교대숙주라 부르고 있다(Oh, 2011).

Myxozoa에 속하는 점액포자충은 약 1,300종이 보고 되어졌으며, 대부분이 어류에 기생하는 기생충이다(Egusa, 1988). 대부분이 숙주인 어류에 대해서 큰 해는 없으나 일부는 양식어나 자연산 어류에 치명적인 피해를 일으키기도 하고 식품 가치를 상실시켜 산업적 피해를 주는 것도 있다(Egusa, 1988). 포자의 크기는 10 $\mu$ m 전후이므로 현미경으로 관찰하여야 한다. 포자형성과정에서 cyst가 형성되는데 육안으로 확인할 수 있는 1cm 전후 크기도 있다.

1980년대 중반에 Myxozoa의 분류학적 위치가 크게 변경됐다(Lom et al., 2006). 점액포자충의 포자는 1개 또는 5~6개의 극낭세포, 포자각세포, 포자원형질세포로 구성된 다세포체이며 각 세포가 기능적으로 분화되어 있으므로 원생동물이 아니라고 하였으며 분자생물학적 계통분석에서도 후생동물인 것이 확인되었다(Anderson et al., 1998; Okamura et al., 2002; Schlegel et al., 1996).

다른 하나는 생활환의 규명이다. 점액포자충은 포자를 어류에 접종하여도 감염되지 않는다. 선회 병의 원인인 점액포자충 *Myxobolus cerebralis*의 포자는 실지렁이가 먹고 그 체내에서 방선포자충으로 변태한 후 어류에 감염되는 것을 1984년에 처음 보고하였다(Wolf and Markiw, 1984). 이후 20종이나 점액포자충을 연구한

모두 수생 빈모류인 실지렁이 류에서 변태하여 어류에 감염되는 2상성 생활환이 증명되었다(Kent et al., 2001; Yokoyama et al., 1993). 방선포자충의 포자는 3개의 극낭, 3개의 포자 각 및 5~6개에서 수십 개의 원형질세포로 이루어지며 정형적인 포자 각이 후단에 신장하여 자루나 도리골 변하므로 점액포자류의 포자와는 형태학적으로 현저한 차이가 있다.

## 1.2 *Kudoa septempunctata*

*K. septempunctata*는 Myxozoa문 *Kudoa*속 에 속하는 점액포자충류의 1종이다. 점액포자충은 일반적으로 어류와 환형동물을 교호 숙주로 하는 이상성 생활환을 가지며, *K. septempunctata*도 비슷한 생활환을 갖는 것으로 추정하고 있다. 현재까지 넙치에서 기생하는 *Kudoa*는 *Kudoa lateolabracis*, *K. septempunctata*, *Kudoa thyrsites*, *Kudoa yasunagai*, *Kudoa shiomitsui*가 보고되었다(Cho and Kim, 2003; Grabner et al., 2012; Matsukane et al., 2010; Whipps et al., 2004; Yokoyama et al., 2004).

2011년 일본 후생노동성 약사식품위생심의회 식품위생분과의 발표에 의하면, 전국적으로 식후 수 시간 내에 일관성 구토 및 설사를 일으키고 가벼운 증세로 끝나는 감염사례로서, 기존에 알려진 병원물질이 불 검출되거나 검출한 병원물질과 증상이 일치하지 않아 원인불명으로 처리되는 사례가 보고되기 시작하였다(Matsukane et al., 2010).

이와 같은 유증사례에 대하여 원인 검토 및 예방책에 대하여 일본국립의약품식품 위생연구소, 국립감염증연구소 등에서 연구를 실시하고 있다.

넙치를 통한 유증사례에 대해서 식중독 균 등 이미 알려진 다양한 병원물질에 대해서 조사한 결과 대부분 음성이었다. 병원인자를 망라한 genome 해석의 결과, *Kudoa* 속 점액포자충인 *K. septempunctata*가 유의적으로 많이 존재하고 있음이 판명되었고, 고감도 RT-PCR 조사에서도 *K. septempunctata*의 DNA가 검출되었다. 또한 환자의 토사물에서도 유전학적 검사법으로 *Kudoa* 속 점액포자충의 DNA가 검출되었고 그 중 대부분은 염기서열분석결과 *K. septempunctata*임이 판명되었

(Iwashita et al., 2013; Kawai et al., 2012).

*Suncus murinus*에 대량의 *K. septempunctata* 포자를 포함한 넙치의 살점과 정제한 *K. septempunctata* 포자를 경구 투여한 경우 *Kudoa*가 관찰되었다(Kawai et al., 2012).

수유기의 마우스에 고농도로 정제한 *K. septempunctata* 포자를 경구 투여한 경우, 수용성 설사, 장관액체 정유가 확인되었다. 또한 사람의 장관세포 배양 계를 이용한 *K. septempunctata* 포자의 장관독성 평가에서도 장관세포층의 물질 투과성의 향진을 보였다(Kawai et al., 2012).

이와 같은 내용을 종합해 보면, 사람에게 있어 *K. septempunctata* 감염은 설사 증세를 일으키는 원인이 될 가능성을 강하게 보여주고 있다. 더불어 증세가 일괄성이며 예후가 양호한 것으로 보아 *K. septempunctata* 포자가 장기간에 걸쳐 사람의 몸속에서 머무를 가능성은 낮다고 사료된다(Takahiro et al., 2013).

이러한 *K. septempunctata*는 냉장상태에서 적어도 1주일 정도는 포자의 병원성이 유지되지만 15~20℃에서 4시간 이상 보관하면 병원성이 소실되며 조건에 따라서는 냉장조건하에서도 *K. septempunctata* 포자가 병원성이 소실될 가능성도 있는 것으로 보고되고 있다(Takahiro et al., 2014). 가열처리에서는 중심온도 75℃에서 5분 이상 가열함으로써 *K. septempunctata* 포자는 활성을 잃는다(Takahiro et al., 2014).

2013년 일본 농림수산성은 기생충 *K. septempunctata*의 식품안전에 관한 리스크 프로파일 시트를 작성하여 공개하였다. 또한 후생노동성은 식중독이 의심되는 경우의 검사법을 지방자치단체 등에 통지하였으며 검사결과 근육 1g당 *Kudoa* 포자수가  $1.0 \times 10^6$  개를 초과한 경우에는 식품위생법 제 6조 위반으로 취급하도록 하였다.

2011년도 수입식품 등 모니터링계획에서는 한국의 특정 양식업자의 양식 넙치 등에 대해 모니터링검사 빈도를 30%로 상향 실시하도록 각 검역소에 통지하였다. 또한 한국 특정 양식업자의 양식 넙치는 식품위생법 제 26조 제 3항에 따른 2012년도 검사명령 대상 식품으로 수입신고 시마다 검사를 실시하도록 검역소에 통지한 바 있다.

일본에서는 대일 수출 한국산 양식넙치에서도 신종 *K. septempunctata*의 기생을 보고하고 있으며, 일본으로부터 한국산 넙치에 대해 *Kudoa*충 검사 강화와 함께 한

활 넙치 소비 위축으로 활 넙치 수입량이 2011년 5월 대비 2012년 5월에는 수량 10%, 금액 18.9%가 감소하고 있다(일본 재무성 무역통계자료). 이에 따라 대일 수출넙치에서 Kudoa충이 원인일 것으로 추정되는 식중독 발생으로 한국산 넙치에 대한 검사 강화가 필요한 실정이다.

이러한 점은 일본에서는 우리나라 수출광어에 대한 명령검사 등의 강화 조치를 통해 일종의 자국산 양식업을 보호하기 위한 무역장벽으로 활용 할 수 있어 양식현장의 큰 문제로 대두될 가능성이 있다. 하지만 이 신종 Kudoa충에 대해서는 아직 감염경로, 감염 시기, 치료 대책 등에 대한 연구가 이루어지지 않아서 근본적인 대책을 수립하는데 많은 어려움이 있다.

### 1.3 ITS Gene

핵과 독립적으로 존재하는 미토콘드리아 genome은 rRNA, tRNA, cytochrome oxidase subunit, cytochrome b, ATPase subunit, NAOH dehydrogenase complex subunit 등의 아주 제한된 유전자를 가지고 있으며, 그 크기는 핵 DNA에 비해 매우 작고, 또 핵 DNA보다 많은 개수를 가지고 있어 실험실 분석에 좋은 재료로 평가되고 있다(Bae et al., 1995). 동물의 경우 미토콘드리아 DNA는 핵 DNA보다 10배 정도 진화속도가 빠르며 비교적 간단한 분석 방법에 의해 분석이 가능하므로 다른 어떤 방법보다 분류군내의 변이와 진화를 추정하는데 적합한 장점을 가지고 있다(cho et al., 2003). 동물뿐만 아니라 미생물에서도 미토콘드리아 DNA는 계통분석에 적합한 도구로 인식되고 있다. Magee 등은 의학적으로 중요한 몇몇 균주로부터 rDNA에 다양한 restriction endonuclease로 처리한 restriction fragment length polymorphism(RFLP)의 pattern을 기초로 한 분석으로 *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*는 각 종간에 서로 다른 digestion pattern을 나타낸다고 보고하였다(Magee et al., 1987). Benedicte 등은 Tuber속 15균주에서, Michael 등은 *Lentinula*속과 *Collybia dryophila*, *Collybia maculata*, *Clitocybula abundans*, *Pleurotus ostreatus*의 균주에 대해 RFLP의 pattern을 서로 비교해서 분류에 이용하였다(Michael et al., 2001). 그리

Kerrigan 등은 *Agaricus bisporus*을 random amplified polymorphic DNA(RAPD)와 같은 분자적 기술을 이용하여 RFLP와 마찬가지로 pattern을 상호 비교 분석함으로써 진화과정에서 발생한 DNA염기서열의 변화에 대한 계통적인 정보를 얻을 수 있음을 보고하였다(Kerrigan et al., 1993). 그러나 이러한 pattern은 동일한 종에 속하는 개개의 균주들 사이의 유연관계를 결정하기에는 유용하게 사용될 수 있는 유의차를 나타내지만 균주간의 구별은 불가능할 뿐만 아니라 염기서열을 결정함으로써 얻은 결과보다 정확하지도 않은 점이 한계로 지적되었다.

원핵세포의 리보솜 RNA 유전자의 전사단위는 16S, 23S, 5S 순으로 되어 있으나, 진핵생물에서는 18S, 5.8S, 28S의 순으로 되어 있으며, 그 18S, 5.8S, 28S rDNA는 차례로 2개의 internal transcribed spacer(ITS)로 분리 연결되어있다. 초기에는 5.8S 부위에 대한 sequences의 비교가 분류의 근거로 주로 이용되었다. 그렇지만 이 부위는 염기수가 120개 전후로 길이가 상당히 짧고, 매우 보존적인 부위이기 때문에 관련된 종들 사이에서는 거의 동일한 sequence를 나타내므로 이들 상호간의 구별을 위한 분류에서는 사용될 수 없는 난점이 있었다. 이후 분자생물학적인 실험기법의 발달과 더불어 Nishida 등은 *Taphrina* 속, *Saitoella* 속 그리고 다른 고등균류사이에서의 계통분석에 18S rDNA 염기서열을 이용하였고, Hendriks 등은 의학적으로 중요한 *Candida*속내의 계통분석에, Swann 등은 담자균류의 분류에 18S 및 28S rDNA는 통계적으로 신뢰성이 있는 정보를 가지고 있으며, 염기보존이 높은 부분, 중간 정도의 부분, 변이가 심한 부분이 공존하므로 계통 분화를 논하는데 적합한 수단으로 취급되었다(Swann et al., 1993). 그러나 18S와 28S는 각각 1600bp와 3300~4800bp로 그 전 염기서열을 결정하는 것은 많은 시간과 노력을 요구하고, 부분염기서열은 보다 광범위한 계통발생학적 진화관계를 가지는 속간의 비교에는 대상으로 하는 염기서열의 부족으로 분류지표로 이용될 수 있는 정보량이 적은 난점이 지적되었다. Annett 등은 *Suillus sensu lato* 종으로 인식된 38종을 포함한 47개 분리 균으로부터 ITS염기서열을 분석하여 계통발생학적 분류체계를 결정하였고, Bae 등은 ITS2 부위의 염기서열에 대한 fingerprint 분석에 의해 느타리버섯 종간의 관계를 규명했으며, Moncalvo 등은 ITS 부위와 25S rDNA염기서열에서 *Ganoderma*속을, Daniel 등은 *Morchella esculenta*와 *Morchella conica*의 비교에 ITS sequences를 이용하였다(Daniel et al., 1997). 특히, O'Donnell은 다

지역으로부터 분리된 *Fusarium sambucinum*의 86균주에 대한 ITS sequence를 비교함으로써 종 특이적인 probe를 개발하였고, Morton 등은 *Verticillium alboatrum*과 *Verticillium dahliae*의 ITS sequences를 결정하여 이 결과를 토대로 probe의 개발에까지 연결시키고자 하였다(O'Donnell et al., 1992). 이상과 같은 일련의 보고에서 저자들은 한결같이 ITS를 유용한 계통분류의 수단으로 간주하고 있을 뿐만 아니라, 속 및 종 수준의 신속동정에 적합한 probe의 개발 가능성을 강하게 암시하였다. ITS는 가운데의 5.8S를 포함하여 500bp 정도로, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 그 분자진화속도가 빨라 염기서열의 다양성을 요구하는 종, 속의 분류에 적합하다. 더구나, 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 각각의 비교가 가능하며, 이러한 풍부한 정보량과 간편성으로 동일 속 내의 종간 및 속간의 유연관계의 연구에 유용한 수단이 되어왔다.

#### 1.4. 연구 목적

*Kudoa*는 Yoshiko에 의하면, 한국에서 발견되는 *K. septempunctata*와 일본에서 검출되어지는 *K. septempunctata*의 genotype이 다르다고 보고되어지고 있다(Takeuchi et al., 2015).

넙치에서 발견되는 *K. septempunctata*의 genotype은 ST1, ST2, ST3 3가지가 있다고 알려져 있다. 이 중 ST1, ST2는 보편적으로 일본에서 발견된다고 알려져 있으며, ST3는 한국에서 발견된다고 알려져 있다(Takeuchi et al., 2015). 이들은 Cox I 유전자에 의해서 처음 구분 되었다(Takeuchi et al., 2015). Cox I 유전자는 미토콘드리아 내에 존재하는 유전자로서, 유전자 지문의 기능이 있어 흔히 계통학적인 종 구분을 위해 사용하는 유전자이기도 하다(Curtin et al., 2005). Cox I을 이용한 genotype의 경우 PCR 방법이 아닌 single nucleotide polymorphism (SNP)방법을 이용하는데, 이는 PCR 방법보다 좀 더 높은 테크닉이 요구된다. 반면, PCR의 경우 SNP보다 단순한 테크닉이 요구되기 때문에 좀 더 손쉽게 수행 할

있다.

넙치 (*Paralichthys olivacues*)는 국내 해산여류 양식의 절반을 차지하는 주요한 양식 기반사업으로 제주와 전남지역에서 대부분이 생산되고 있다(통계청, <http://kostat.go.kr>). Kim and Kang(2011)에 따르면 2008년 국내 넙치 양식장 수는 642개로 이 중 제주 229개, 완도군 199개로 파악되고 있으며 제주지역의 넙치 양식장 수는 전국 대비 35.7%를 차지하고 있다고 보고하였는데, 2013년을 기준으로 300개 이상의 넙치 양식장이 등록되어 전국대비 점유율은 더욱 늘고 있는 실정이다(Ko and Park 2013). 현재 생산되는 넙치의 대부분은 국내에서 소비되며, 생산량의 10%정도가 수출되고 있는데, 최근 내수 소비부진 및 수출실적 악화로 인해 넙치 양식어가에서 어려움을 겪고 있다. 특히 넙치 수출은 일본으로 편중되어 있는데, 국내산 양식넙치에서 *K. septempunctata*의 감염이 보고되면서 검역 등 식품 위생안전관리 강화로 일본 수출에 막대한 피해를 입고 있다(농산물 무역정보, <http://www.kati.net/>). 본 연구에서 제주도 내 넙치 양식장 중 *K. septempunctata*가 의심되는 양식장을 대상으로 체중에 따른 *K. septempunctata*의 감염률 차이를 비교하여 입식이나 관리에 따른 감염율과 감염 시기를 추정해 보려한다.

이에 따라 한국 유래 *K. septempunctata*의와 일본유래 *K. septempunctata*의 rDNA를 비교하여 지역적 차이로 인한 유전적 차이의 유무와 *K. septempunctata*의 감염 시기 추정에 관한 기초연구를 하려 한다.

## 2. MATERIAL & METHOD

### 2.1 Fish and sample

2016 8월 26일에 제주 지역의 넙치 양식장 중 사전 조사에서 *K. septempunctata*의 감염이 확인된 한 곳의 양식장에서 1.5kg 가량의 성어가 있는 모든 수조에서 무작위로 실험어 46미를 선별하였고, 0.6kg 가량의 육성어 또한 p과 동일한 방법으로 75미 선별하였다. 양식장에서 구입한 넙치는 유수식 수조에 입식 후 실험에 사용하였다.

일본 양성 sample은 일본검역소에서 real time PCR 법으로 양성 판정된 근육을 사용하였다.

### 2.2 Primer design

National Center for Biotechnology Information(LC028894.1)에 등록된 *K. septempunctata*의 rDNA sequence를 이용하여 primer design을 수행하였다. ITS 전체를 sequencing 하기 위하여 18S에서 forward primer를 design 하고 28s에서 reverse primer를 design하여 PCR을 수행하였으며, primer design에는 PRIMER3 program을 이용하였다.

PCR primer	primer name	sequence	Target gene
ITS cloning	Ks 18S F1	GCTACTGGAGGGCAAGTCTG	ITS
	Ks 18S F2	ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG	
	Ks 28S R1	GCCCTTTTGCTCTACTCGTG	
	Ks 28S R2	CGTTCCTTGACTGTGGTTT	
For detection	(JP Official) Kudoa F1 (JP Official)	CATGGGATTAGCCCGGTTTA	18S
	Kudoa R1	TTTCGGCTTTGGGGAGAGT	

**Table 1.** PCR primer

### 2.3 Cloning

양식장에서 후생성공정법으로 양성 판정된 넙치의 등 근육과 1.5kg group에서 ICG kit를 통해  $10^5$ 이상으로 양성 판정된 넙치의 등 근육에서 51mg을 QIAamp<sup>®</sup>DNA Mini kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 genomic DNA extraction를 수행하여 실험에 사용 하였다. Prove reading 기능이 있는 Prime Taq Polymerase kit(133-833)를 사용하여 PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 95℃ 5분간 hold 후, 95℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 60초를 35 cycle 반복하는 조건으로 반응시켰다. PCR에서 확인된 PCR 산물은 Topcloner<sup>™</sup> TA-Blunt kit(FC0036, Enzymonic)를 이용하여 cloning을 수행하였고, 분리된 plasmid의 sequence를 확인하였다(GENOTECH, Korea).

### 2.4 Detection

1.5kg group과 0.6kg group을 대상으로 *K. septe mpunctata*의 감염 확인을 위한 sampling을 수행하였다. 감염확인 방법으로는 ICG kit와 Real-time PCR을 사용하였으며(일본 수산청), 현미경 검사 또한 진행하였다. ICG kit 검사법의 경우 ICG kit(ARK checker IC<sup>®</sup> *Kudoa septe mpunctata* M. Lot# AIK 16005)를 이용하였으며 Sampling 시 넙치의 등 근육을 미량 적출하여 lysis tube에 넣은 후, tube 안에서 근육 조직을 으깨어 lysis 용액으로 만들어 ICG kit에 사용하였다. ICG kit 검사법으로  $10^5$ 이상으로 감염된 개체로 확인된 sample의 경우, 등 근육을 1 x PBS가 담긴 petridish에 담아 분쇄 액을 제작하였다. 분쇄 액을 15%, 30% percoll이 증층된 15ml tube에 증층하여 13500rpm 15min centrifuge를 수행하였고, 상층 액을 제거한 후 1 x PBS에 희석하여 현미경으로 관찰하였다. Real time PCR의 조건은 95℃ 10분, 95℃ 15초 60℃ 60초 45cycle로 하여 실험을 수행하였으며, Standard curve는  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  copy를 이용하였다(일본 수산청).

## 3. RESULT

### 3.1 *K. septempunctata* rDNA alignment

5.8s 포함 한국 유래 *K. septempunctata*의 ITS sequence와 일본 유래 *K. septempunctata*의 ITS sequencing 결과 총 1426bp로 확인되었다. ITS sequence alignment결과 한국 유래 *K. septempunctata*와 일본 유래 *K. septempunctata*의 ITS1과 5.8S 에서는 유의적인 차이가 확인되지 않아 두 국가 유래 *K. septempunctata*의 구별이 어려웠지만, ITS 2에서는 23bp가량의 유의적인 차이를 확인하여 한국유래 *K. septempunctata*와 일본 유래 *K. septempunctata*를 구분할 수 있는 가능성을 확인 하였다(Fig.001).

### 3.2 ICG kit detection result

16년 9월에 sampling한 넙치 개체 중 1.5kg group 46미를 검사한 결과 14미가 감염 개체로 판명되어 감염률 30.4%를 확인하였다. 감염 확인 14미 중 ICG kit protocol에 의해  $10^5$ 이상으로 감염된 개체는 4미였으며  $10^5$ 이상으로 감염된 개체는 전체 검체미수 대비 약 8.7%, 감염미수 대비 약 28.6%을 확인하였다. 0.6kg group에서는 검사 개체 55미 중 32미가 감염 개체라고 판명되어 58.2%의 감염률을 확인하였다. 이 중 ICG kit protocol에 의해  $10^5$ 이상으로 감염된 개체는 10미였으며  $10^5$ 이상으로 감염된 개체는 검체미수 대비 약 18%, 감염미수 대비 약 31.2% 정도였다(Fig.002).

### 3.3 Real time PCR detection result

16 9월에 sampling한 넙치 개체 중 1.5kg group 46마리의 genomic DNA를 이용하여 검사한 결과 14마리가 감염 확인되어 감염률 30.4%를 확인 하였다. 감염 확인된 14마리 중  $10^5$ 이상으로 감염 확인된 개체는 4마리였으며 전체 검체 미수 대비 8.7%, 감염개체 대비 28.6%를 확인하였다. 0.6kg group 55마리의 genomic DNA를 이용하여 검사한 결과 33마리가 감염 확인되어 감염률 60.0%가 확인 하였다. 감염 확인된 33마리 중  $10^5$ 이상으로 감염 확인된 개체는 10마리였으며 전체 검체 미수 대비 18.2%, 감염개체 대비 30.3%를 확인하였다. (Fig.002).

KOREA	ATGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATCTGTCAGGTTTATCCGGTAACGAGCGAGACCA
JAPAN	ATGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATCTGTCAGGTTTATCCGGTAACGAGCGAGACCA
	*****
KOREA	CGATCTTTAATTGATTACGGTTAAAATGTCTTGACCGATCTTAAAGAGACCACCGGATTG
JAPAN	CGATCTTTAATTGATTACGGTTAAAATGTCTTGACCGATCTTAAAGAGACCACCGGATTG
	*****
KOREA	AAGCCGGGGGAAGCGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTCGATGTTCTGGGCTGCAC
JAPAN	AAGCCGGGGGAAGCGTGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTCGATGTTCTGGGCTGCAC
	*****
KOREA	GTGTGCTACAATGATAGTGACAACGAGTACCTGCTCTGAGAGGGGTGGGAAATCTTAAAA
JAPAN	GTGTGCTACAATGATAGTGACAACGAGTACCTGCTCTGAGAGGGGTGGGAAATCTTAAAA
	*****
KOREA	ATCGCTATCTTGCTTTGGACTGAGCCTTGTAAATAATTGCTCACGAAAGAGGAATTCCTCG
JAPAN	ATCGCTATCTTGCTTTGGACTGAGCCTTGTAAATAATTGCTCACGAAAGAGGAATTCCTCG
	*****
KOREA	TAAGCGGGGTCATCAGCTCGTGTGAATAAGTCTCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTC
JAPAN	TAAGCGGGGTCATCAGCTCGTGTGAATAAGTCTCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTC
	*****
KOREA	GCTACTACCGACTGGATGTTGCTTCGAAATGTTAGGACTTGCGGCGTCTCGACGCTGCGG
JAPAN	GCTACTACCGACTGGATGTTGCTTCGAAATGTTAGGACTTGCGGCGTCTCGACGCTGCGG
	*****
KOREA	GGAATAGTTTTATGTAATTTCTGGAGGAAGTAAATGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
JAPAN	GGAATAGTTTTATGTAATTTCTGGAGGAAGTAAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
	***** *****
KOREA	ACCTGCGGAAGGATCATCAATGAATTGTTCAACTTGTAGAGTAGTTGATTGTTAAAGTGT
JAPAN	ACCTGCGGAAGGATCATCAATGAATTGTTCAACTTGTAGAGTAGTTGATTGTTAAAGTGT
	*****
KOREA	TGTTGTAGTGTAGTGTGAAGTGAAGTGAAGTGGATGGTAAAGTGTGTTTATTATC
JAPAN	TGTTGTAGTGTAGTGTGAAGTGAAGTGAAGTGGATGGTAAAGTGTGTTTATTATC
	*****
KOREA	ATTAAACATTAAGTGATTTTTAATCACTCTAATTATAATGACTATAAATTAGCGAATATCA
JAPAN	ATTAAACATTAAGTGATTTTTAATCACTCTAATTATAATGACTATAAATTAGCGAATATCA
	*****

KOREA JAPAN AATAACCACGTTTGACTGACTTGTATATTTACACACATATTGTGTGGTGCACCGTTATT  
AATAACCACGTTTGACTGACTTGTATATTTACACACATATTGTGTGGTGCACCGTTATT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GTATTAATGTGATTGTTTATTTAAAATGTTAAGTTACAATTTACAATTAATTACAATA  
GTATTAATGTGATTGTTTATTTAAAATGTTAAGTTACAATTTACAATTAATTACAATA  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GCCGGCTGGCGCTTATGCGCTAGATGTCCTGGTGAAGTGGTATCAGATTTCTAATTC  
GCCGGCTGGCGCTTATGCGCTAGATGTCCTGGTGAAGTGGTATCAGATTTCTAATTC  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN CATACTCTACTTTGTGGAGTGTGGAGTGTGAATGAATGTGTTGACTGTTGATGGATG  
CATACTCTACTTTGTGGAGTGTGGAGTGTGAATGAATGTGTTGACTGTTGATGGATG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TTGATGTTAGAGTTTTGGTAGTTAAGTTTTGAGGTGCCGTGCGCTTGAAGTATTGTAT  
TTGATGTTAGAGTTTTGGTAGTTAAGTTTTGAGGTGCCGTGCGCTTGAAGTATTGTAT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TTATAAATAAAAAATTTGACAACCGTTAGCGGTGGATCACTCGGTTGTTGATCGATGAAG  
TTATAAATAAAAAATTTGACAACCGTTAGCGGTGGATCACTCGGTTGTTGATCGATGAAG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN AACGCGCCAACCTGCGATAAGTAGTGCATTGCGAGCGCCTAGTGAGTCATTGAAATTTT  
AACGCGCCAACCTGCGATAAGTAGTGCATTGCGAGCGCCTAGTGAGTCATTGAAATTTT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GAATGCAAATTCATGCTGGATCTAAACCAGCATATGCTGTTGAGTGTCTGACTAA  
GAATGCAAATTCATGCTGGATCTAAACCAGCATATGCTGTTGAGTGTCTGACTAA  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN AACTACACAATGTGATCAAAGTATGTTGTTGATGGAGATGTGTATGTTGTGACGTAGTAC  
AACTACACAATGTGATCAAAGTATGTTGTTGATGGAGATGTGTATGTTGTGACGTAGTAC  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TTTGCGCCGCGCAGCAGTGTTCGGTAGTTGTTGGATGTGATCATGTATATTATGTAT  
TTTGCGCCGCGCAGCAGTGTTCGGTAGTTGTTGGATGTGATCATGTATATTATGTAT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN ATTGTATATATGAGAGTGTTCAGTGGGTAAGCGCGAGGTTAAAGTGTGTTGAATTACA  
ATTGTATATATGAGAGT-----TAAGCGCGGGTTAAAGTGTGTTGAATTCCA  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TACTCTACTTTGTTGGAGTGTGGAGTGTGAATGAATGTGTTGAATGTTGATGGATGTT  
TACTCTACTTTGTTGGAGTGTGGAGTGTGAATGAATGTGTTGAATGTTGATGGATGTT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GATGCAAGTTTGTGTTGGTGTGGTGTGGTGTATTTAGTTGAGTCTGATTAAATAATCAATT  
GATGCAAGTTTGTGTTGGTGTGGTGTGGTGTATTTAGTTGAGTCTGATTAAATAATCAATT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TTATGATTTATGTTATGTGGTCTGGGGAGAGTGTCTCATGGAGGGGTGAAATTTAAAGATT  
TTATGATTTATGTTATGTGGTCTGGGGATAGTGTCTCATGGAGGGGTGAAATTTAAAGATT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GATATTGTTTCAGTGAAAGTGTATATGTGGTGTGGTGTGAGTGTAGTGTAGTAAAGATGT  
GATATTGTTTCAGTGAAAGTGTATATGTGGTGTGGTGTGAGTGTAGTGTAGTAAAGATGT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
GATGTTGGTGGAAATGTAATGTTGATTGACTATAGTAATATAGTAATATAGTAATATGTA  
GATGTTGGTGGAAATGTAATGTTGATTGACTATAGTAATATAGTAATATAGTAATATGTA  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
AGCCATTGGACTGTTGAGGGTACTTCATATCTTAATCGTGCTGATGGTGATGATGAAAG  
AGCCATTGGACTGTTGAGGGTACTTCATATCTTAATCGTGCTGATGGTGATGATGAAAG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
TGATGGTGACAAACACGGCTTTTGTAGCAGATTG-----GAGTTTGTAGTGTTGAATA  
TGATGGTGACAAACACGGCTTTTGTAGTTGGAGTTGGAGTTTGTAGTGATGTTGAATA  
\*\*\*\*\* \* \*\* \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
GTTGAATGATGTGGGATGTGAAGCGTGTAAAGTATTGAAGTAGAGGGAATGTAGATAT  
GTTGAATGATGTGGGATGTGAAGCGTGTAAAGTATTGAAGTAGAGGGAATGTAGATAT  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
GATATCACGAGTAACCAAAAATAAAATACACGTTAATAGATAATAGATAATAGATAATAA  
GTTATCACGAGTAACCAAAAATAAAATACACGTTAATAGATAATAGATAATAGATAATAA  
\* \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
TAGATATTA-----TTATATTATTATTAAATGATGTAACACTACTAATCTTGTGACCT  
ATATTAGATATTAGATATTATATTATTATTGATGTAACACTACTAATCTTGTGACCT  
\*\* \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
AGGACGAAATGTAACGGCCTGCTGAACCTAAGCATATCAGTAAGCAGAGGAAAAGAAAAC  
AGGACGAAATGTAACGG-----CTTAAGCATATCAGTAAGCAGAGGAAAAGAAAAC  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
AACTGTGATTCCTTAGTAACCTGCGAGTGAAGCGGAAAAGCCCATCGTTTAACTTTCCT  
AACTGTGATTCCTTAGTAACCTGCGAGTGAAGCGGAAAAGCCCATCGTTTAACTTTCCT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
GGACCATGGACAGGACGAAATGTAAACGGTATGGATAGGTTTTCTACCAACAAAGTCTGGT  
GGACCATGGACAGGACGAAATGTAAACGGTATGGATAGGTTTTCTACCAACAAAGTCTGGT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
CAAAGTCTCCGGATTGAGGTGCCAAAGAGGGTGACAGCCCGTGTGTGATCAGACTTGA  
CAAAGTCTCCGGATTGAGGTGCCAAAGAGGGTGACAGCCCGTGTGTGATCAGACTTGA  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
TATGTTGGGTATGTGACCGATTCCGAGAGTCGGTTGTTGGGACTGCAACCTAAAGTAG  
TATGTTGGGTATGTGACCGATTCCGAGAGTCGGTTGTTGGGACTGCAACCTAAAGTAG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
GTGGTAACTCCACCAAGGCTAAATATTGACACGAAACCGATAGCGAACAAAGTACTGTG  
GTGGTAACTCCACCAAGGCTAAATATTGACACGAAACCGATAGCGAACAAAGTACTGTG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
AAGGAAAGTTGAAAAGAACTCTGAAAAGAGAGTTAAAAGTACGTGAAACCGCTAACGGGG  
AAGGAAAGTTGAAAAGAACTCTGAAAAGAGAGTTAAAAGTACGTGAAACCGCTAACGGGG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
AAGCGGAAGGCAGTGTGAGATTGAGTGAGTGAGTCGGCTCAAACCTATTTCAAATGAGA  
AAGCGGAAGGCAGTGTGAGATTGAGTGAGTGAGTCGGCTCAAACCTATTTCAAATGAGA  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN  
TTGTGTGTTGAGTGGAATGTGAGTTTGTAGTAGGCTAGCTTTGCTTGTGCGTCAGGGCTA  
TTGTGTGTTGAGTGGAATGTGAGTTTGTAGTAGGCTAGCTTTGCTTGTGCGTCAGGGCTA  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TTGGCACTAAAGAGGTTAAATGGCTAGCAGTTTTGGCTTTCACAGCCAATGATTTATTGT  
 TTGGCACTAAAGAGGTTAAATGGCCAGCAGTTTTGGCTTTCACAGCCAATGATTTATTGT  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TGGCGTGGATGCGGCTGGTCATCCGCTCTTTGTGCTGATATGTGTGTGGAAGCGTTGG  
 TGGCGTGGATGCGGCTGGTCATCCGCTCTTTGTGCTGATATGTGTGTGGAAGCGTTGG  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TGATGATTGTGCGTTGGTGTGCTGTTGGTGGTTCGTTCTGGTCACAGTGTGGCTACGTGC  
 TGATGATTGTGCGTTGGTGTGCTGTTGGTGGTTCGTTCTGGTCACAGTGTGGCTACGTGC  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GGACAAGTCATGTGGTAGTTCAACAACCAATGCTAGATCCTGGCGTGATACCCAACCTTC  
 GGACAAGTCATGTGGTAGTTCAACAACCAATGCTAGATCCTGGCGTGATACCCAACCTTC  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN CGACCCGCTTTGAAACACGGACCAAGGAGGCAGAATCTATAGCGAGTTGGAGGGTGAAA  
 CGACCCGCTTTGAAACACGGACCAAGGAGGCAGAATCTATAGCGAGTTGGAGGGTGAAA  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN ACCCGACGGCGCAGTGAAAGCGAGAGATGAGAACTGGGGCCTCGGCTCTCAGTGCATCA  
 ACCCGACGGCGCAGTGAAAGCGAGAGATGAGAACTGGGGCCTCGGCTCTCAGTGCATCA  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TCGGCCAGTCATCATTGGGTGATTGAGTTGAGCTTTAGATGCTGGACCCGAAAGATGG  
 TCGGCCAGTCATCATTGGGTGATTGAGTTGAGCTTTAGATGCTGGACCCGAAAGATGG  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TGAACATGCGTGAGCAGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGAAGCGATT  
 TGAACATGCGTGAGCAGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGAAGCGATT  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TGACGTGCAAATCGATCGTTAGACTTGCATAGGGGCGATAGACTAATCGAACCATCTA  
 TGACGTGCAAATCGATCGTTAGACTTGCATAGGGGCGATAGACTAATCGAACCATCTA  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GTAGCTGGTCCCTTCGAAATATCCCTCAGGATATCTGAGACAAGTGGGAGACAGTTTCA  
 GTAGCTGGTCCCTTCGAAATATCCCTCAGGATATCTGAGACAAGTGGGAGACAGTTTCA  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TCGGGTAGAGCGAATGATTAGAGGAATCGGGGATATATTACTCTCGACCTATTCTCAAAC  
 TCGGGTAGAGCGAATGATTAGAGGAATCGGGGATATATTACTCTCGACCTATTCTCAAAC  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TTCCAACCGGTGAGAGTGCTGTTTCTGATTATTTTGAATGGCACGAGGAATGTTT  
 TTCCAACCGGTGAGAGTGCTGTTTCTGATTATTTTGAATGGCACGAGGAATGTTT  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TGTCTCAAGTGGGCCATTTTTGGTAAGCAGAACTGGCGATGCGGGATGAACCGAGAGTTG  
 TGTCTCAAGTGGGCCATTTTTGGTAAGCAGAACTGGCGATGCGGGATGAACCGAGAGTTG  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN AGCTAAGGTGCCTAAGGACACGTTGATAGATACCACAAAAGGAGTCGGTCGATAAAGACA  
 AGCTAAGGTGCCTAAGGACACGTTGATAGATACCACAAAAGGAGTCGGTCGATAAAGACA  
 \*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GCAGGACGGTGGCCCTGAAAGTAGGAATCCGCTAAGGAATTGTCTAAAACTCACCTGCC  
GCAGGACGGTGGCCCTGAAAGTAGGAATCCGCTAAGGAATTGTCTAAAACTCACCTGCC  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GAATCGACCGGCCCTGAAATGGATGGCGCTGAAGCGTGTACCAGTGTGCTCGACCTCTAC  
GAATCGACCGGCCCTGAAATGGATGGCGCTGAAGCGTGTACCAGTGTGCTCGACCTCTAC  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN CACGAGAGATGATGGTAGGGGTAGAAGGGCGCGCGGTAGCGAAAAAGTACAAAGTGA  
CACGAGAGATGATGGTAGGGGTAGAAGGGCGCGCGGTAGCGAAAAAGTACAAAGTGA  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN AACTTGTATGGAGCTGCCGTCCGTGTAGATCTTGGTGGTAGTAGCAATTATAAAGTGAA  
AACTTGTATGGAGCTGCCGTCCGTGTAGATCTTGGTGGTAGTAGCAATTATAAAGTGAA  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN AACCTTTTAGCCGAAGTGGAGAAGGGTCCACGTGAACAGCAGTTGGACGTGGGTTAGT  
AACCTTTTAGCCGAAGTGGAGAAGGGTCCACGTGAACAGCAGTTGGACGTGGGTTAGT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN CGGTCTAAGCGAAGCCTAACGGTATTTAAAGCCAACCTTTACTTATTTTCGCAAGGGG  
CGGTCTAAGCGAAGCCTAACGGTATTTAAAGCCAACCTTTACTTATTTTCGCAAGGGG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TGATTGAGAGTTGGAATCCGCGAAAGGAATCAGGTTAATATTCTGAACCGGGCAATGG  
TGATTGAGAGTTGGAATCCGCGAAAGGAATCAGGTTAATATTCTGAACCGGGCAATGG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN AGACGCTGCTCTTTTATTGTTTGTGATTTGATTGAGTTGGTGAATAATAGAGAGCAGCT  
AGACGCTGCTCTTTTATTGTTTGTGATTTGATTGAGTTGGTGAATAATAGAGAGCAGCT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TAGCGGTAAAGCAAGCAATCTCAGAGACGTTGACATCTATGGCGGGGAGAATTATCTTTT  
TAGCGGTAAAGCAAGCAATCTCAGAGACGTTGACATCTATGGCGGGGAGAATTATCTTTT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN CTGCATAACAGGCAACAACCTTGAATCGAGTCGTTCCGAGATAAGGTAAAAAGCCTGG  
CTGCATAACAGGCAACAACCTTGAATCGAGTCGTTCCGAGATAAGGTAAAAAGCCTGG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN AAGAGCACCGCAACTATTGCAGTGTCCGAGTGTAGGTGTCCGCCCTTGAAATCCGAGG  
AAGAGCACCGCAACTATTGCAGTGTCCGAGTGTAGGTGTCCGCCCTTGAAATCCGAGG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN GAGTGGATAAATTTTCATGCCCGTCCGTACCGAATCCGCATCAGGTCTCCTAGGTGAGCAG  
GAGTGGATAAATTTTCATGCCCGTCCGTACCGAATCCGCATCAGGTCTCCTAGGTGAGCAG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN CCTCTGGCACTGGAACAATGTAGGTAAGGGAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAACCTTTGGG  
CCTCTGGCACTGGAACAATGTAGGTAAGGGAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAACCTTTGGG  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN AAAAGGATTGGCTCTAAGGACCGGGCCAATCGAGCTAGTATTGCCTAGGCTAGTGGGGGT  
AAAAGGATTGGCTCTAAGGACCGGGCCAATCGAGCTAGTATTGCCTAGGCTAGTGGGGGT  
\*\*\*\*\*

KOREA JAPAN TTGACTGGGGTTGTCTTGTGATGCTCTATCGTCAAAAAGTAGAGTGTATTGAGGCACAC  
TTGACTGGGGTTGTCTTGTGATGCTCTATCGTCAAAAAGTAGAGTGTATTGAGGCACAC  
\*\*\*\*\*

```

KOREA      TTTGGTTATTTCAACGCTGGCCATGGAATGCCGGCGTGAGTTTTGTTGTGTTGAGTAAAT
JAPAN      TTTGGTTATTTCAACGCTGGCCATGGAATGCCGGCGTGAGTTTTGTTGTGTTGAGTAAAT
*****

KOREA      GTCAAAAGTTTGTTCGATATGGCGAGCTTCTTTACGAGTGGCAAGCATCGGTCAGCTTAG
JAPAN      GTCAAAAGTTTGTTCGATATGGCGAGCTTCTTTACGAGTGGCAAGCATCGGTCAGCTTAG
*****

KOREA      AACTGTTACCAACTTGGGGAATCCGACTGTTTAATTAACAAGCATTGCGATGGCCCT
JAPAN      AACTGTTACCAACTTGGGGAATCCGACTGTTTAATTAACAAGCATTGCGATGGCCCT
*****

KOREA      AATGGGTGTTGACGCAATGTGATTCTGCCAGTGCTCTGAATGTCAAAGTGGGAAACG
JAPAN      AATGGGTGTTGACGCAATGTGATTCTGCCAGTGCTCTGAATGTCAAAGTGGGAAACG
*****

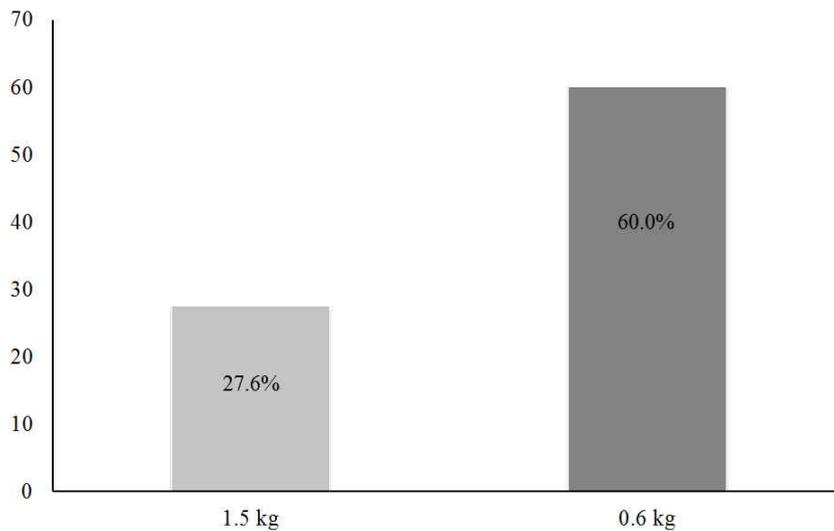
KOREA      CAACCAAGCACGGGTAAACGGCGGAGTAACTATGACTCTTTAAAGGTAGCCAAATGCCT
JAPAN      CAACCAAGCACGGGTAAACGGCGGAGTAACTATGACTCTTTAAAGGTAGCCAAATGCCT
*****

KOREA      CGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATCAACGATATCCCACTGTCCCTACCTAC
JAPAN      CGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATCAACGAGATTCCCACTGTCCCTACCTAC
*****

KOREA      CATCCAGCGAAACCACAGTCAAGGGAACG
JAPAN      CATCCAGCGAAACCACAGTCAAGGGAACG
*****

```

**Figure 1.** *Kudoa septempunctata* ITS sequence Alignment. 18s are shaded with gray color, 28s are shaded black color in the sequence.



**Figure 2.** Infection rate data of *K.septempunctata* in 0.6kg group and 1.5kg group.

## 4. DISCUSSION

*K. septempunctata* ST1, ST2, ST3 와 같은 3가지 genotype을 가지고 있다고 알려져 있다. 기존 연구에 따르면, ST1형, ST2형의 경우는 일본 에서 주로 발견되며 ST3는 한국 유래 넙치에게서 주로 발견된다고 보고 되어있다(Takeuchi et al., 2015). 이처럼 *K. septempunctata*의 genotype은 지역 편중적으로 보고되고 있어, *K. setpempunctata*의 genotype을 이용하여 *K. septempunctata*의 감염지역을 추정 할 수 있는 maker 개발이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 한국 유래 *K. septempunctata*와 일본 유래 *K. setpecmpunctata*의 ITS sequence를 비교하여 *K. septempunctata*의 지역분포와 유전적 차이에 대해 확인해 보았다. *K. septempunctata*의 rDNA sequence를 이용하여 비교한 결과, 5.8s 포함한 ITS sequecne는 총 1426bp 였으며, 그 중 ITS1과 5.8s는 각각 1bp, 0bp 차이를 보여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면, ITS2 sequence에서 한국 유래 *K. septempunctata*와 일본 유래 *K. septempunctata*가 23bp 가량의 유의적인 차이를 보여 ITS1 이나 5.8s에 비해 ITS2 더 적합하다고 판단된다. 결과적으로 rDNA 서열을 이용하여 한국 유래 *K. septempunctata*와 일본 유래 *K. septempunctata*의 rDNA sequence의 차이를 확인하였다.

하지만 현재까지는 *K. septempunctata*의 genotype의 분포 규명에 관한 보다 자세한 연구가 수행되지 않아 *K. septempunctata*의 식중독 유발 독성이 지역적 편중 유무를 확정할 수 없다고 판단되며, 추후 이에 대한 연구를 수행하여 지역적 편중 유무를 확인하고 이에 따른 식중독 유사증상이 나타나는지 확인해야 할 것으로 사료된다.

1.5kg group에서는 감염률이 30.4%에 그친 데에 반해, 0.6kg group에서는 감염률이 60.0%로 약 2배 정도 더 높은 감염률을 보였다. 같은 양식장에서 실험을 위해 동일한 시기에 구입한 2 group의 넙치들에 대해 감염률의 차이가 있다는 것은

입식 시기에 따라 *K. septempunctata*의 감염률 또한 영향을 받는 것이라고 추정 된다. 제주도 양식장에서는 넙치 치어를 1년에 두 차례에 걸쳐 입식 하는데, 주로 봄과 늦여름에서 초가을 정도로 나누어 입식하게 된다. 보통 입식되는 치어들은 보통 생후 3~4개월 정도의 치어들로 1.5kg group은 15년 4월에 부화하여 같은 년도 8월에 양식장에 입식된 개체이고, 0.6kg group은 15년 9월에 부화하여 같은 년도 12월에 양식장에 입식된 개체이다. 피부나 아가미와 같이 외부 물리적 방어할 수 있는 조직기관들이 성어와 대비하였을 때 매우 연하여 감염이 더 수월할 것이라고 추정된다. 1.5kg group과 0.6kg group의 입식 시기는 각각 8월, 12월로 대략 3개월 정도 차이가 나며, 감염률은 2배 가량 차이를 보이고 있다.

1.5kg group에서는 ICG kit 확인 감염률이 30.4%이고 real time PCR 확인 감염률 역시 30.4%로 두 검사 방법 간의 결과 차이는 없는 것으로 여겨진다. 또한 사람에게서 식중독을 유발하는 수치로 알려진  $10^6$  copy 이상으로 감염 확인된 개체의 비율은 감염 확인 미수 대비 28.6% 정도로 0.6kg group에서  $10^5$  이상으로 감염 확인된 개체의 비율이 30.3%로, 식중독을 유발하는 수치로 비교를 해 보았을 때도 1.5kg보다 0.6kg group이 더 높은 감염률을 보여 0.6kg group이 1.5kg group에 비하여 *K. septempunctata*의 감염 확률이 높다고 여겨진다.

이러한 결과에 따라 입식시기가 다르기 때문에 입식 시기에 따라 감염률이 다를 수 있다는 가능성이 있다. 따라서 향후 입식시기에 따른 꾸준한 모니터링과 같은 연구를 통해 규명하는 것이 필요하다고 사료된다.

## 5 SUMMARY

본 연구에서는 한국 유래 *K. septempunctata*와 일본 유래 *K. septempunctata*의 유전적 차이를 확인하기 위하여 ITS sequence를 비교하였고, 비교 결과 한국 유래와 일본 유래 *K. septempunctata*의 차이를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 향후 한국 유래 *K. septempunctata*와 일본 유래 *K. septempunctata*를 구별할 수 있는 방법 개발에 기초적인 연구가 될 것으로 추정한다.

## REFERENCE

- Adlard R.D., Bryant M.S., Whipps C.M., Kent M.L. 2005. Multivalvulid myxozoans from Eastern Australia: three new species of *Kudoa* from scombrid and labrid fishes of the Great Barrier Reef, Queensland, Australia. *J. Parasitol.* 91, 1138-1142.
- Arai Y., Matsumoto K. 1953. On a new sporozoa, *Hexacapsula neothunni* gen. et sp. nov., from the muscle of yellowfin tuna, *Neothunnus macropterus*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 18, 293-298.
- Bae S.C., Takahashi E., Zhang Y.W., Ogawa E., Shigesada K., Namba Y., Satake M., Ito Y. 1995. Cloning, mapping and expression of PEBP2  $\alpha$ C, a third gene encoding the mammalian Runt domain. *Gene.* 159, 245-248.
- Blaylock R.B., Bullard S.A., Whipps C.M. 2004. *Kudoa hypoepicardialis* n. sp. (Myxozoa:Kudoidae) and associated lesions from the heart of seven perciform fishes in the northern Gulf of Mexico. *J. Parasitol.* 90, 584-593.
- Burger M.A.A., Cribb T.H., Adlard R.D. 2007. Patterns of relatedness in the Kudoidae with descriptions of *Kudoa chaetodoni* n. sp. and *K. lethrini* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida). *Parasitology* 134, 669-681.
- Burger M.A.A., Barnes A.C., Adlard R.D. 2008. Wildlife as reservoirs for parasites infecting commercial species: host specificity and a redescription of *Kudoa amamiensis* from teleost fish in Australia. *J. Fish Dis.* 31, 835-844.

- Diamant A., Ucko M., Paperna I., Colorni A., Lipshitz A. 2005. *Kudoa iwatai* (Myxosporidia: Multivalvulida) in wild and cultured fish in the Red Sea: redescription and molecular phylogeny. J. Parasitol. 91, 1175-1189.
- Egusa S., Takahashi Y., Itami T., Momoyama K. 1988. Histopathology of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. Fish Pathology. 23, 59-65.
- Eiras, J.C. Saraiva, A. Cruz, C. 2014. Synopsis of the species of *Kudoa* Meglitsch, 1947 (Myxozoa: Myxosporidia: Multivalvulida). Syst. Parasitol. 87, 153-180.
- Gilchrist J.D.F. 1923. A protozoal parasite (*Chloromyxum thyrssites* sp. n.) of the cape seafish, the “snoek” (*Thyrssites atun*, Euphr.). Trans. R. Soc. S. Afr. 11, 263-273.
- Guarino A., Canani R.B., Casola A., Pozio E., Russo R., Bruzzese E., Fontana M., Rubino A. 1995. Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhoea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. J. Infect. Dis. 171, 976-983.
- Harada T., Kawai T., Sato H., Yokoyama H., Kumeda Y. 2012. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Int. J. Food Microbiol. 156, 161-167.
- Holzer A.S., Blasco-Costa I., Sarabeev V.L., Ovcharenko M.O., Balbuena J.A. 2006. *Kudoa trifolia* sp. n. —molecular phylogeny suggests a new spore morphology and unusual tissue location for a well-known genus. J. Fish Dis. 29, 743-755.

Kawai T., Sekizuka T., Yahata Y., Kuroda M., Kumeda Y., Iijima Y., Kamata Y., Sugita-Konishi Y., Ohnishi T. 2012. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. Clin. Infect. Dis. 54, 1046-1052.

Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL. El-Matbouli M., Desser SS., Devlin RH., Feist SW., Hedrick RP., Hoffmann RW., Khattra J., Hallett SL., Lester RJ., Longshaw RJ., Palenzeula O., Siddall ME., Xiao C., 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. J Eukaryot Microbiol. 48, 398-413.

Kerrigan R.W., Royer J.C., Baller L., Kohli Y., Horgen P.A., Anderson J.B. 1993. Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. Genetics Soc America. 133, 225-236.

Kristmundsson A., Freeman M.A. 2014. Negative effects of *Kudoa islandica* n. sp.(Myxosporea: Kudoidea) on aquaculture and wild fisheries in Iceland. Int. J. Parasitol. Parasite Wildl. 3, 135-146.

Kudo G., Barnett H.J., Nelson R.W. 1987. Factors affecting cooked texture quality of Pacific whiting, *Merluccius productus*, fillets with particular emphasis on the effect of infection by the myxosporeans *Kudoa paniformis* and *K. thyrsites*. Fish. Bull. 85, 745-755.

Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Mista C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel J. 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environ Health Perspect. 111, 455-460.

Li Y.C., Sato H., Tanaka S., Ohnishi T., Kamata Y., Sugita-Konishi Y. 2013. Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporea: Multivalvulida) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). Parasitol. Res. 112, 1991-2003.

Lom J., Arthur J.R. 1989. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. J. Fish Dis. 12, 151-156.

Lom J., Dykova I. 2006. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia Parasitologica, 53, 1-36.

Maeno Y., Nagasawa K., Sorimachi M. 1993. *Kudoa intestinalis* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from the intestinal musculature of the striped mullet, *Mugil cephalus*, from Japan. J. Parasitol. 79, 190-192.

Maree AO., Curtin RJ., Chubb A., Dolan C., Cox D., O'Brien J., Crean P., Shields DC., Fitzgerald DJ. 2005. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. J Thromb Haemost. 3, 2340-2345.

Magee BB., D'Souza TM., Magee PT. 1987. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. Journal of Bacteriology. 169. 1639-1643.

Meng F., Yokoyama H., Shirakashi S., Grabner D., Ogawa K., Ishimaru K., Sawada Y., Murata O. 2011. *Kudoa prunusi* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the brain of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844) cultured in Japan. Parasitol. Int. 60, 90-96.

Moran J.D.W., Whitaker D.J., Kent M.L. 1999. A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and-commercial fisheries. *Aquaculture* 172, 163-196.

Nath S.K., Desjeux J.F. 1990. Human intestinal cell lines as in vitro tools for electrolyte transport studies with relevance to secretory diarrhoea. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 8, 133-142.

Ohnishi T., Kikuchi Y., Furusawa H., Kamata Y., Sugita-Konishi Y. 2013. *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 137-142.

O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics.* 22, 213-220.

Swann E.C., Taylor J.W. 1993. Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia.* 85, 923-936.

Takeuchi F., Ogasawara Y., Kato K., Sekizuka T., Nozaki T., Sugita-Konishi Y., Ohnishi T., Kuroda M. 2016. Genetic variants of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease. *J Fish Dis.* 39, 667-672.

Weil M., Oberwinkler F. 2001. Phylogenetic relationships in Auriculariales and related groups-hypotheses derived from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycological Research.* 105. 403-415.

Whipps C.M., Grossel G., Adlard R.D., Yokoyama H., Bryant M.S., Munday

- B.L., Kent M.L. 2004. Phylogeny of the Multivalvulida (Myxozoa: Myxosporea) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. J. Parasitol. 90, 618-622.
- Whipps C.M., Kent M.L. 2006. Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea). J. Eukaryot. Microbiol. 53, 364-373.
- Wipf D., Munch J.C., Botton B., Buscot F. 1996. DNA polymorphism in morels: complete sequences of the internal transcribed spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). Appl Environ Microbiol. 62. 3541-3543.
- Wolf K., Markiw ME. 1984. Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science, 225, 1149-1452.
- Yokoyama. H., Ogawa K., Wakabayashi H. 1993. Some biological characteristics of actinosporeans from the oligochaete *Branchiura sowerbyi*. Dis. Aquat. Org. 17, 223-228.
- Yokoyama H., Whipps C.M., Kent M.L., Mizuno K., Kawakami H. 2004. *Kudoa thyrsites* from Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass: causative myxozoans of postmortem myoliquefaction. Fish Pathol. 39, 79-85.
- , 박성우(2011). 수산생명 질병학 2판. 서울: (주)바이오사이언스출판사. p232-233

## 감사의 글

실험실에 들어왔던 게 엇그제 같은데 벌써 석사 졸업을 준비하고 있다는 사실이 믿기지 않을 정도로 시간이 빠르게 지나가버렸습니다. 외국인 선배들이 많은 실험실에서 영어 한마디 제대로 하지 못했던 제게 늘 영어를 가르쳐 주고 학부 졸업실험부터 석사 생활까지 늘 도움을 주었던 thiunuwan에게 이 page에나마 감사의 말을 전하고 싶습니다. 그 이외에도 늘 친절하게 이것저것 도움을 많이 준 Niroshana, Sanjaya, Uma, Saranya, Wanqang 박사님께도 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 학부시절부터 늘 사소한 것 하나 하나, 저 때문에 늘 병원을 뛰어와 주었던 숙영언니, 항상 함덕에 있어 소식이 뜸한 후배를 세심하게 챙겨준 민영언니, 은영언니, 지현언니, 학부부터 지금까지 늘 걱정해 주고 실험을 알려주던 성도오빠, 석사동기인 Nadee와 Sachit, 석사 졸업 준비 틈틈이 Kudoa에 대해 조언해 주시던 신상필 박사님, 그리고 학부부터 석사 졸업까지 무사히 저를 지도해 주신 지도 교수님이신 이제희 교수님께도 감사의 말을 전하고 싶습니다.

학교 밖에서 실험실 생활 동안 생긴 고민을 같이 의논해 주었던 철홍 오빠, 경필오빠, 종경 오빠에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다.

함덕에서 학부 시절부터 저의 무한한 ‘사고’를 뒷수습해 주시며 저의 무사 졸업을 위해 심혈을 기울이신 임봉수 박사님, 정형복 박사님께 감사하다는 말로는 부족할 만큼 감사하다는 말을 드리고 싶습니다. 또한 늘 같은 관심사를 가지고 많은 이야기를 나누고 Sri Lanka에 돌아가서도 도움을 아낌없이 주는 viraj에게도 정말 고맙다는 말 전하고 싶습니다.

함께 무한한 사고를 쳐 주고, 박 터지게 싸우고, 함께 고생한 타칭 강 여사님이신 선혜에게도 감사의 말과 미래에도 ‘마찬가지’라는 말을 ‘꼭’ 전해 주고 싶습니다.

마지막으로, 인천에서 항상 응원해 주시던 외할머니, 부모님과 남동생, 미국에서 철없는 동생 사고 수습해주는 충호 오빠, 만나면 싸우기만 하는 광호 오빠, 인천에서 늘 격려의 말을 아끼지 않으셨던 이완 선생님, 군대에서도 항상 안부를 물어왔던 정협이, 제주도에서 항상 석사 때려치우라는 경록오빠, 지윤오빠, 준규오빠와 먼 곳에서 응원해 주시던 장형식 과장님, 깨알 같은 연락으로 늘 웃음을 주었던 닭돌기 수정이와 주연이, 상임이, 항상 곁에서 한결 같이 내 편이 되어준 남자친구 경훈오빠와 하늘에서 지켜보고 있을 누리, 안개, 자두, 현지에게 정말 감사하다고, 고맙다고 전하고 싶습니다.