

자연산 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)에서 검출된 노랑머리 바이러스 Genotype 8의 계통분류학적 특성

장광일 · 김보성 · 오윤경 · 황지연 · 권문경 · 김수미*

국립수산물품질관리원 수산방역과

Phylogenetic Characteristics of Yellow Head Virus (YHV) Genotype 8 Isolated from *Fenneropenaeus chinensis* in Korea

Gwang Il Jang, Bo Sung Kim, Yun Kyeong Oh, Jee Youn Hwang, Mun Gyeong Kwon and Sumi Kim*

Aquatic Disease Control Division, National Fishery Products Quality Management Service (NFQS), Busan 46083, Korea

Yellow head virus (YHV) is a rod-shaped positive-sense single-stranded RNA virus, classified into the genus *Okavirus*, family *Roniviridae*, and order *Nidovirales*. In this study, 200 fleshy prawns (*Fenneropenaeus chinensis*) collected from the vicinity of Narodo in Goheung-gun, Korea, were screened for the presence of yellow head complex viruses and related genotype such as YHV genotype 8. The detection rate of YHV genotype 8 among the 200 fleshy prawns, determined using nested RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), was 39.0%. Phylogenetic analysis of the ORF1b gene of YHV showed that eight distinct genetic lineages were detected. The four strains of YHV genotype 8 obtained in this study formed a robust clade with the YHV genotype 8 group that was first isolated from fleshy prawns in China suspected to have acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND).

Keywords: *Fenneropenaeus chinensis*, Yellow head disease (YHD), Yellow head virus (YHV) genotype 8, Phylogenetic analysis

서론

노랑머리병(yellow head disease, YHD)을 유발하는 yellow head virus (YHV)는 표면에 돌기가 있는 핵산단백질(nucleo-capsid)로 둘러싸인 간상형의 positive-sense ssRNA 바이러스로 *Okavirus* (genus), *Roniviridae* (family) 및 *Nidovirales* (order)에 속한다(Wongteerasupaya et al., 1995, Nadala et al., 1997). 현재까지 yellow head complex를 구성하는 유전형들(genotypes)은 YHV genotype 1부터 YHV genotype 8까지 알려져 있다(Mohr et al., 2015; Dong et al., 2017; Li et al., 2019). Yellow head complex 중 노랑머리병을 유발하는 YHV genotype 1은 1990년도 초에 태국의 얼룩새우(*Penaeus monodon*)에서 처음 발견되어 태국에 막대한 경제적 손실을 야기하였다(Chantanachookin et al., 1993). 또한, 노랑머리병은 태국의 흰다리 새우(*P. vannamei*) 양식장뿐만 아니라 멕시코의 캘리포니아만의 Pacific blue shrimp (*P. stylirostris*) 양식장까지 확산되

었다(Castro-Longoria et al., 2008; Senapin et al., 2010). 따라서, 세계동물보건기구(World Organization for Animal Health, OIE)에서는 새우류에 치명적인 질병을 유발하며, 전 세계적으로 막대한 경제적 손실을 발생시키는 YHV genotype 1을 신고대상질병(notifiable disease)으로 지정하였다. Gill associated virus (GAV)로 알려진 YHV genotype 2는 1994년 호주의 건강한 얼룩새우(*P. monodon*)에서 처음 보고되었다(Spann et al., 1997; Wijegoonarardane et al., 2008). GAV(=YHV 2)의 독성은 YHV genotype 1보다는 낮지만, GAV를 이용한 공격 실험에서는 새우의 폐사를 유발하여 mid-crop mortality syndrome (MCMS)으로 불리고 있다(Spann et al., 1997; Callinan and Jiang, 2003). Yellow head complex에 속하는 다른 유전형 YHV genotype 3에서 genotype 6은 호주, 아프리카 및 아시아 지역의 건강한 얼룩새우(*P. monodon*)에서 발생하였으나, 질병과의 상관관계는 현재까지 알려져 있지 않다(Wijegoonarardane et al., 2008). 또한, YHV genotype 7은 2012년에 호주

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 3031 Fax: +82. 51. 720. 3039

E-mail address: sumikim@korea.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0698>

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 698-702, October 2021

Received 26 August 2021; Revised 27 September 2021; Accepted 12 October 2021

저자 직위: 장광일(연구사), 김보성(연구사), 오윤경(주무관), 황지연(연구관), 권문경(연구관), 김수미(주무관)

의 새우 종묘장에서 처음 보고되어 새우의 폐사를 유발하였으나, 현재까지 YHV genotype 7에 대한 질병과의 연관성은 명확하게 밝혀지지 않았다(Mohr et al., 2015; Yang et al., 2016). Dong et al. (2017)은 2012년 중국 Hebei 지방 양식장에서 급성간체장괴사병(AHPND)이 의심되는 대하(*F. chinensis*)로부터 YHV genotype 8을 처음 분리하여 전체염기서열을 분석하였다(Dong et al., 2017). 분석된 YHV genotype 8의 전체 염기서열 길이는 약 26.8 kb였으며, 20 kb 정도의 open reading frame (ORF1), 435 bp 정도의 ORF2와 약 4.9 kb의 ORF3가 있음을 발견하였다. 그리고 ORF1은 ORF1a와 ORF1b로 구분되어 있으며, ORF1b 부분을 이용하여 계통분류학적 분석한 결과 YHV genotype 1-7과는 확연히 구별되는 새로운 유전형임을 보고하였다(Dong et al., 2017). 또한, YHV genotype 8은 질병과의 뚜렷한 연관성이 현재까지 밝혀지지 않았다(Dong et al., 2017; Li et al., 2019). 그리고 국내에서는 Kim et al. (2020)이 2019년 충남 지역에서 채집한 자연산 대하 및 서남해에 위치한 흰다리새우 양식장에서 채집한 흰다리새우의 ORF1b 부분을 이용하여 계통분류학적 분석을 수행한 결과 YHV genotype 8과 같은 clade를 형성하였으며, 국내에서 처음으로 흰다리새우에서 YHV genotype 8이 검출되는 것을 확인하였다(Kim et al., 2020).

본 연구에서는 우리나라 전라남도 고흥군 나로도 섬 주변 해역에서 채취한 자연산 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)의 yellow head complex 감염 유무 확인 및 대하의 YHV genotype 8이 노랑머리병을 유발하며 병원성을 가지는 YHV genotype 1 및 genotype 2 group과의 계통분류학적 관계를 분석하였다.

재료 및 방법

시료채취 및 RNA 추출

2020년 4월 전라남도 고흥군 나로도 섬 주변 해역에서 자연

산 대하(*Fenneropenaeus chinensis*) 200마리를 채집하여 개체별로 분석하였다. 채집한 시료는 10°C 이하로 유지하면서 실험실로 운반하여 대하의 배다리(pleopods)를 개체별로 채취하여 -80°C에 보관하였다. 개체별로 채취한 시료는 2 mm zirconia와 5 mm stainless beads가 들어있는 튜브(Watson, Tokyo, Japan)에 넣은 후 DEPC (diethyl pyrocarbonate) treated water 200 µL를 첨가하여 FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA)를 이용하여 5분간 조직을 마쇄하였다. 마쇄된 시료로부터 RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 개체별로 RNA를 추출하여 -80°C에 보관 후 다음 실험에 사용하였다.

RT-PCR, nested RT-PCR, 염기서열 분석 및 계통분류학적 분석

노랑머리 바이러스관련 유전자 증폭은 세계동물보건기구(OIE, 2019)에서 권장하는 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 전형적인 노랑머리병을 유발하는 노랑머리 바이러스 genotype 1 (YHV 1)을 검출하기 위해 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 방법인 OIE Protocol 1에 따라 수행하였다(Table 1). YHV1과 gill-associated virus (GAV)를 검출하기 위해서는 nested RT-PCR 방법인 OIE Protocol 2에 따라 수행하였다(Table 1). 그리고 yellow head complex YHV1에서 YHV7을 검출하기 위해 nested RT-PCR 방법인 OIE Protocol 3에 따라 수행하였다(Table 1; OIE, 2019).

배다리(pleopods)로부터 추출된 RNA는 AccuPower® Rock-etscrip RT-PCR Premix (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA 합성 및 RT-PCR을 one-step으로 수행하였다. One-step RT-PCR의 PCR 산물을 주형으로 AccuPower® hot-Start PCR Premix (Bioneer Co.)을 이용하여 nested PCR을 다음과 같이 수행하였다. OIE Protocol 1은 10F/144R primers를 이용하여 one-step RT-PCR을 수행하였다 (Table 1; OIE,

Table 1. PCR primers used in this study

Methods	Primers	Sequences	Amplicon size	Reference
OIE Protocol 1 (RT-PCR)	10F	5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'	135 bp	Wongteerasupaya et al. (1995)
	144R	5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3		
OIE Protocol 2 (nested RT-PCR)	1st	GY1 5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'	794 bp	Cowley et al. (2004)
		GY4 5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'		
	2nd	GY2 5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'	277 bp (YHV1)	
	Y3 5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'	or	406 bp (GAV)	
	G6 5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'			
OIE Protocol 3 (nested RT-PCR)	1st	YC-F1a 5'-ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC-3'	358 bp	Wijegoonawardane et al. (2008)
		YC-R1b 5'-TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC-3'		
	2nd	YC-F2a 5'-CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA-3'	146 bp	
	YC-R2a 5'-RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT-3'			

PCR, polymerase chain reaction; OIE, World Organization for Animal Health; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

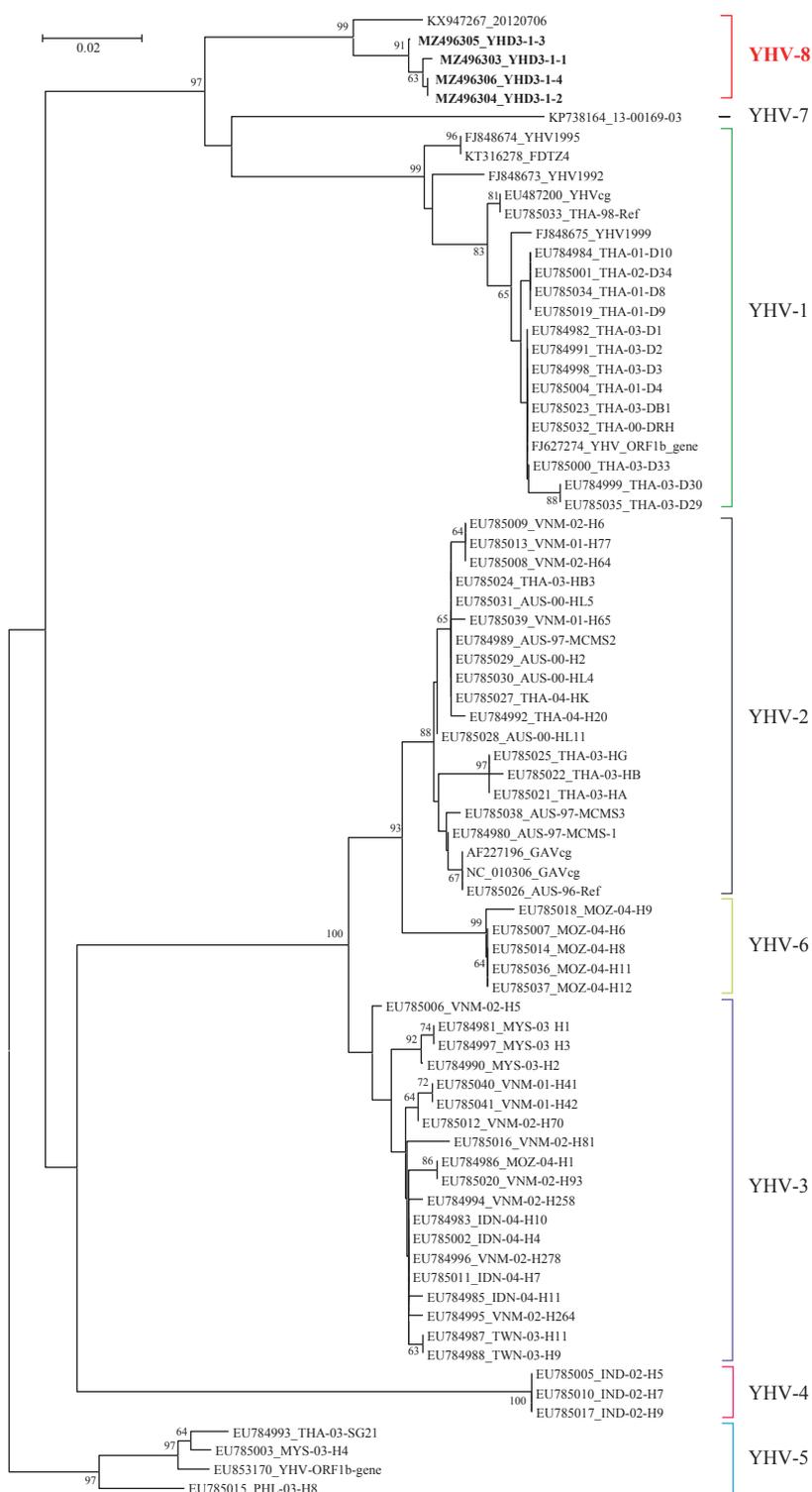


Fig. 1. Phylogenetic tree of 77 YHV genotype 1 to 8 nucleotide sequences over the 360 bp of the ORF1b region. The phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method using MEGA software (version X; <http://www.megasoftware.net>). Bootstrap values were calculated with 1000 replicates of the alignment. Percentage bootstrap values (1000 replicates) >60% are shown. Bar, 0.02 expected nucleotide substitutions per site. All reference sequences were acquired from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). GenBank accession numbers of the sequences are shown before the name of the virus.

2019). OIE Protocol 2의 first PCR은 GY1과 GY4 primers를 사용하였고 nested PCR은 GY2, Y3와 G6 primers를 사용하였다(Table 1; OIE, 2019). OIE Protocol 3의 first PCR은 YC-F1와 YC-R1 primers를 사용하였고 nested PCR은 YC-F2와 YC-R2 primers를 사용하였다(Table 1; OIE, 2019). PCR 증폭산물은 QIAxcel Advanced 자동전기영동장치(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 확인하였다. 얻어진 PCR 산물은 국내의 염기서열 분석기관인 솔젠트(주)(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 획득한 염기서열의 계통분류학적 분석은 MEGA X (Kumar et al., 2018) 프로그램의 neighbor-joining 방법 및 1,000회의 bootstrap을 시행하여 완성하였다.

본 연구에서 획득한 4개의 대표 YHV genotype 8 염기서열들은 GenBank database에 등록하였으며 등록번호(accession number)는 MZ496303-MZ496306이다.

결과 및 고찰

Yellow head complex 검출

2020년 4월 전라남도 고흥군 나로도 섬 주변 해역에서 자연산 대하(*Fenneropenaeus chinensis*) 200마리를 채집하여 노랑머리 바이러스 관련 유전자 검출 여부를 조사하였다. OIE Protocol 1 및 OIE Protocol 2 방법을 이용하여 분석한 결과 전형적인 노랑머리병을 유발하는 노랑머리 바이러스 genotype 1 (YHV1) 및 gill-associated virus (GAV, YHV genotype 2)는 200마리 모두에서 검출되지 않았다. 하지만 yellow head complex YHV1에서 YHV7을 검출할 수 있는 OIE Protocol 3 방법인 nested PCR을 이용하였을 때 200마리 중 78마리에서 PCR 양성 결과를 보여 39.0%의 검출률을 보였다. NIFS (2019) 연구 결과에 따르면 2018년 충남에서 채집한 자연산 어미 대하에서 31.3%의 YHV genotype 8 검출률과 2019년 전남 고흥의 자연산 대하에서 68.0%의 검출률을 보였다(NIFS, 2019). 그리고 Kim et al. (2020)은 2019년 충남에서 채집한 자연산 어미 대하에서 100%의 YHV genotype 8 검출률과 흰다리새우에서 8.9%의 YHV genotype 8 검출률을 보였다. 78개의 PCR 산물 중 4개의 대표 염기서열을 분석하여 GenBank database에 blast 검색한 결과 노랑머리바이러스의 open reading frame 1b (ORF1b)와 97.1-97.4%의 상동성을 보였다.

노랑머리 바이러스 genotype 8 (YHV 8)의 계통분류학적 특성

본 연구에서 획득한 YHV의 ORF1b 영역 염기서열 4개 (MZ496303-MZ496306)와 GenBank database에 등록된 73개 YHV의 ORF1b 염기서열과의 계통분류학적 특성을 분석한 결과 YHV genotype 1에서 genotype 8까지 8개 group을 형성하는 것을 확인하였다(Fig. 1).

본 연구에서 획득한 4개 염기서열들은 2012년에 중국 Hebei

지방의 양식 대하(*F. chinensis*)에서 처음 분리된 YHV genotype 8 염기서열(KX947267)과 강한 monophyletic group을 형성하였다(Fig. 1; Liu et al., 2014; Dong et al., 2017). Dong et al. (2017)은 YHV genotype 8 group의 계통분류학적 분석을 실시한 결과 YHV genotype 1 group과 같은 clade를 형성하며 YHV genotype 2 group에서 YHV genotype 7 group들과는 뚜렷하게 구별되는 것을 확인하였다. 본 연구의 YHV genotype 8 group은 YHV genotype 1 group뿐만 아니라 YHV genotype 7 group과 같은 clade를 형성하여 Dong et al. (2017) 결과와는 차이를 보였다. 하지만, YHV genotype 2, YHV genotype 3 및 YHV genotype 6 group은 하나의 monophyletic group을 형성하였으며, YHV genotype 4 group과 YHV genotype 5는 paraphyletic group으로 구별되었다(Fig. 1).

Mohr et al. (2015)는 호주 북부지역의 Joseph Bonaparte Gulf 주변에서 잡은 어미 얼룩새우(*P. monodon*)를 부화장으로 옮긴 후 폐사가 발생하여 원인 분석을 한 결과, 폐사된 얼룩새우로부터 기존에 알려진 YHV genotype 1에서 YHV genotype 6 group들과는 구별되는 새로운 YHV genotype 7 group을 처음으로 발견하였으나, 폐사체에서 분리된 YHV genotype 7이 질병 유발 및 세균 감염과의 관계는 밝혀내지 못했다. YHV genotype 2인 gill-associated virus (GAV)는 야생 및 양식 얼룩새우에 낮은 수준의 감염성을 보이며 1994년 호주에서 처음 발견된 이후, 베트남과 태국의 양식장에서도 검출되었다(Spann et al., 1997; Wijegoonawardane et al., 2008). YHV genotype 3에서 YHV genotype 6 group들은 건강한 얼룩새우에서 아시아, 호주, 동아프리카 지역에서 발생하였으며, 질병과의 연관성은 밝혀지지 않았다(Wijegoonawardane et al., 2008).

결론

본 연구에서 자연산 대하(*F. chinensis*)에서 검출된 YHV genotype 8의 계통분류학적 특성을 살펴본 결과, 중국의 대하 양식장에서 처음 분리되어 보고한 yellow head complex group 중 YHV genotype 8 group과 강한 clade를 형성하였다. 중국의 대하 양식장에서 관찰된 대하는 간췌장 위축, 내장의 공복 및 하얗게 된 복부 근육의 임상증상이 관찰되었고, YHV genotype 1의 전체염기서열과 YHV genotype 8의 전체염기서열이 가장 유사하다는 것을 밝혔다(Liu et al., 2014; Dong et al., 2017). 하지만, 본 연구에서 채취한 자연산 대하에서는 뚜렷한 임상증상이 관찰되지 않는 점으로 보아 노랑머리병을 유발하는 YHV genotype 1 또는 genotype 2와는 직접적인 관련이 없는 것으로 여겨진다. 그리고 아시아 및 세계 여러 국가의 새우 양식장에서 노랑머리병 발생 사례가 OIE에 꾸준히 보고 되고 있어 국내에서도 다양한 새우류의 yellow head complex 뿐만 아니라 YHV genotype 8의 병원성 및 질병과의 연관성을 명확하게 밝히는 연구가 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

사 사

이 논문은 국립수산물품질관리원의 수산생물 방역기술 개발 및 프로그램 운영 과제(R2021071)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

- Callinan RB and Jiang L. 2003. Fatal, virus-associated peripheral neuropathy and retinopathy in farmed *Penaeus monodon* in eastern Australia. II. Outbreak descriptions. *Dis Aquat Organ* 53, 195-202. <https://doi.org/10.3354/dao053195>.
- Castro-Longoria R, Quintero-Arredondo N, Grijalv-Chon JM and Ramos-Paredes J. 2008. Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp *Penaeus stylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus van namei*. *J Fish Dis* 3, 953-956. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00978.x>.
- Chantanachookin C, Boonyaratpalin S, Kasornchandra J, Direkbusarakom S, Ekpanithanpong U, Supamataya K, Sriurairatana S and Flegel TW. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis Aquat Org* 17, 145-147. <https://doi.org/10.3354/dao017145>.
- Cowley JA, Cadogan LC, Wongteerasupaya C, Hodgson RAJ, Spann KM, Boonsaeng V and Walker PJ. 2004. Differential detection of gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand by multiplex RT-nested PCR. *J Virol Methods* 117, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.018>.
- 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. *Arch Virol* 162, 1149-1152. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3203-2>.
- Kim SR, Gunasekara CWR, Wimalasena SHMP and Shin GW. 2020. Detection and genetic characteristic of yellow-head virus genotype 8 (YHV-8) cultured *Litopenaeus vanamei*, in Korea. *J Fish Pathol* 33, 77-81. <https://doi.org/10.7847/jfp.2020.33.1.077>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Li C, Ren Y, Dong X, Wang C and Huang J. 2019. Extraction of assembling complexes of viral capsomers from shrimp tissue infected with yellow head virus genotype 8 (YHV-8). *J Fish Dis* 42, 613-616. <https://doi.org/10.1111/jfd.12929>.
- Liu Q, Huang J, Yang HL, Yang B, Wang HL, Wang QT, Liu F and Zhang QL. 2014. Detection of a new genotype of yellow-head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanol Limnol Sin* 45, 703-709. <https://doi.org/10.11693/hyhz20130500045>.
- Mohr PG, Moody NJ, Hoad J, Williams LM, Bowater RO, Cummins DM, Cowley JA and St JCM. 2015. New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis Aquat Org* 115, 263-268. <https://doi.org/10.3354/dao02894>.
- Nadala ECB, Tapay LM and Loh PC. 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 31, 141-146. <https://doi.org/10.3354/dao031141>.
- NIFS (National Institute of Fisheries and Science). 2019. Report of National Institute of Fisheries Science. NIFS, Busan, Korea.
- OIE (World Organisation for Animal Health). 2019. Infection with yellow head virus genotype 1. In: Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Retrieved from <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-manual-online-access/> on Mar 30, 2021.
- Senapin S, Thaowbut Y, Gangnonngiw W, Chuchird N, Sriurairatana S and Flegel TW. 2010. Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand. *J Fish Dis* 33, 421-430. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01135.x>.
- Spann KM, Cowley JA, Walker PJ and Lester RJG. 1997. A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis Aquat Org* 31, 169-179.
- Wijegoonawardane PKM, Cowley JA, Phan T, Hodgson RA, Nielsen L, Kiatpathomchai W and Walker PJ. 2008. Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology* 380, 213-225. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.005>.
- Wongteerasupaya C, Vickers J, Sriurairatana S, Nash GL, Akarajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakorn A, Ithyachumnarnkul B and Flegel TW. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21, 69-77. <https://doi.org/10.3354/dao021069>.
- Yang HL, Qiu L, Liu Q, Wan XY, Liu S, Zhu LL, Yang B, Zhang QL 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. *Lett Appl Microbiol* 63, 103-110. <https://doi.org/10.1111/lam.12591>.