



강준치(*Erythroculter erythropterus*)에서 분리된 조충의 분자생물학적 동정

허아람 · 이남실 · 김광일* · 김나영* · 정승희** · 김명석†
국립수산과학원(연구원) · *국립수산과학원(연구사) · **국립수산과학원(과장)

Molecular Identification of Cestoda Isolated from *Erythroculter erythropterus*

Aram HEO · Nam-Sil LEE · KwangIl KIM* · Na Young KIM* · Sung-Hee JUNG** · Myoung Sug KIM†
National Institute of Fisheries Science(researcher) · *National Institute of Fisheries Science(researcher
officer) · **National Institute of Fisheries Science(director)

Abstract

The cestoda was isolated from abdominal cavity of dead *Erythroculter erythropterus* in Nakdong River, Chilgok, Korea at 2016. Abdominal cavity of *E. erythropterus* was filled with three or four cestodas. They were ivory color and long tapeworm shapes. Molecular identification of the cestoda was performed using analysis of the 18s rRNA gene sequence. Alignment analysis reveal that sequence similarities with *Digramma interrupta*(accession number : AF254122) was 99.6%. This report is the first case of *D. interrupta* infection in *E. erythropterus* in Korea.

Key words : *Erythroculter erythropterus*, cestoda, *Diramma interrupta*, PCR

I. 서론

강준치(*Erythroculter erythropterus*)는 잉어목 잉어과의 담수어류로 큰 강의 물살이 느린 곳과 호수에서 살고 지형이 평탄한 곳을 좋아하며 우리나라에서 한강(Park et al., 2004), 금강, 만경강(Lee et al., 2008), 아산호(Kim et al., 2008), 청평호(Choi, 2005) 등에 널리 분포하고 있고 낙동강의 아우점종으로 나타났다. 강준치는 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 피낭유충의 숙주로 알려져 있으나(Choi, 1976) 다른 기생충의 감염에 관하여는 알려져 있지 않다.

조충은 편형동물문에 속하는 기생충으로 어류를 포함한 척추동물이 중숙주가 되고, 어류에 많

은 *Ligula intestinalis*가 기생한 경우에 미꾸라지의 성장을 방해기도 한다(Burrough and Kennedy, 1979). 미국에서 폐사한 largescale sucker (*Catostomus macrocheilus*)는 2차적인 질병이나 감염의 증거 없이 *L. intestinalis*에 심하게 감염되어 있어(Shields et al., 2002), 조충이 어류 질병의 원인이 될 수도 있다. 조충은 긴 끈의 형태를 가지고 있어 tapeworm이라고 불리며, 두절부, 경부, 체절부의 3부분 중에서 두절부에 있는 침, 흡반, 흡엽 및 흡구 등 고착 또는 흡착에 필요한 기구가 분류상 중요한 형질이 된다(Park and Oh, 2001). 그렇지만 이러한 특징을 이용하여 종의 동정을 할 수 없는 경우도 있다(Beveridge and

† Corresponding author : 051-720-2491, fishdoc@korea.kr

* 이 논문은 국립수산과학원 수산과학연구사업(R2018064)의 지원에 의해 수행되었습니다.

Gregory, 1976; Rausch, 1993). 최근에는 조충의 일부 종에 대하여 분자생물학적인 동정 방법이 연구되고 있는데, *Bothriocephalus acheilognathi*를 18S와 28S rRNA로 동정하였고(Chaudhary et al., 2015), 4종류의 *Diphyllobothrium* 속 조충, *Diphyllobothrium latum*, *D. dendriticum*, *D. pacificum*, *D. nihonkaiense*를 multiplex PCR 법으로 동정하였다(Wicht et al., 2010). *Diphyllobothriidae* 과에 속하는 *Digramma* 속은 *Ligula* 속에서 분화 되었고, *Digramma* 속은 한 개 편절에 한 개의 생식기관이 있어 두 개가 있는 *Ligula* 속과 구별이 되지만(Cholodkovsky, 1915), *Dubinina* (1980)는 잉어에 기생하는 *Digramma*의 편절 당 생식기관의 수가 2개라고 보고하여 두 속 간의 구별에 어려움이 있다. 이런 동정에 어려움이 있기 때문에 Luo 등 (2003)은 ITS(interstitial transcribed spacer) rRNA와 28S rRNA 유전자의 5' end 유전자를 비교하여 *Digramma* 속과 *Ligula* 속을 구별하였다.

2016년에 낙동강 수계에서 강준치가 대량으로 폐사하였고 폐사한 강준치의 복강에 조충이 밀집되어 있었는데(Shon et al., 2016), 본 연구에서는 강준치의 복강에서 발견된 조충을 분자생물학적 방법으로 동정하여 보고하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 수집

검사에 제공된 강준치(4마리)는 2016년 2월에 경북 낙동강 칠곡보 하류에서 채집된 것으로, 평균체중 87.3g(73~113g), 평균전장 27.3cm(25.0~29.5g)였다. 강준치 4마리 중 1마리는 가슴 지느러미 뒷부분의 천공된 부분을 통하여 조충의 일부만이 몸 밖으로 나와 있었으며([Fig. 1a]), 부검하였을 때 모든 검사체의 복강에서 조충이 발견되었다.

2. Primer 설계

조충의 동정을 위해 18S rRNA 유전자를 증폭할 수 있는 primer를 *Ligula* 속 조충의 18S rRNA 유전자를 기초로 제작하였다. Ribosomal RNA 유전자는 진핵생물의 분자생물학적 분류에 주로 사용되는 유전자이다. National Center for Biotechnology International (NCBI) GenBank에 등록된 *L. intestinalis*의 유전자 염기서열정보를 이용하여 LGL-18s-F(5'-TTTCGGAAGGACATTACACG-3'), LGL-18s-R(5'-TGATCCACCGCATAGAGTTG-3') primer를 설계하였다.

3. DNA 추출 및 PCR을 통한 유전자 증폭

PCR(Polymerase Chain Reaction)을 위해 강준치의 복강에서 분리된 조충을 100% 에탄올에 고정하여 보관한 후, 조충 조직 50mg을 PBS에서 균질화하여 DNA를 추출하였다. DNA 추출은 QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN, USA)를 사용하였으며, 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였고 추출된 DNA는 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다. PCR mixture는 Accupower®PCRpremix(Bioneer, Korea)를 사용하여 primer set 각각 0.1 μM과 1 μM의 DNA, DEPC-D.W.를 넣어 전체부피가 20 μl 되도록 하여 PCR을 실시하였다. 반응 조건은 초기 변성단계 94°C 5분 뒤, 변성단계 94°C 30초, 결합 반응 55°C 30초, 증폭반응 72°C 40초를 총 30회 반복한 후 72°C에서 7분간 반응하였다. PCR product는 EtBr이 포함된 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

4. 시퀀싱 및 유전자 분석

PCR 증폭이 확인된 시료는 Solgent(Korea)에서 sequencing하여 염기서열을 비교분석 하였다. 유전자 염기서열 분석은 BioEdit ver.7.2.1과 MEGA ver.5.2를 사용하였으며, Forward/Reverse 각각의 primer로 얻은 raw sequence를 assembly하였다.

NCBI의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)을 활용하여 보고된 조충의 유전자와 sequencing 결과의 상동성을 분석하였다. 본 연구에서 확인된 조충의 18S rRNA 유전자는 MEGA 프로그램의 Maximum-likelihood(ML) 방법을 사용하여 계통 발생학적으로 분석하였다.

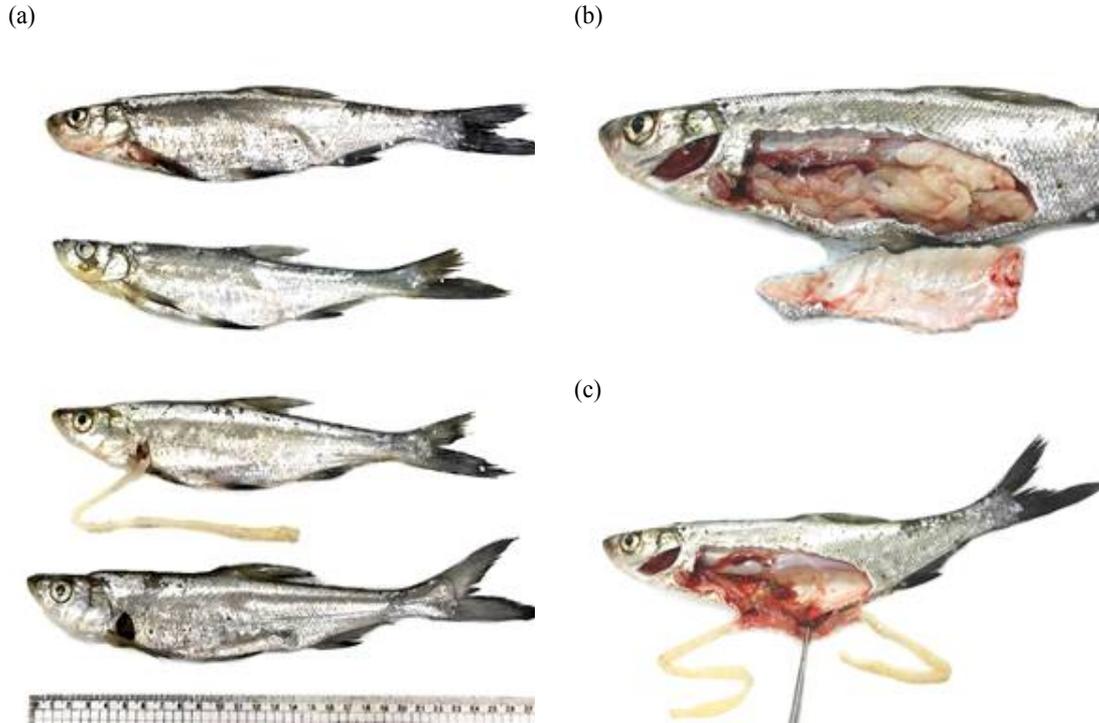
Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 조충의 형태학적 특성

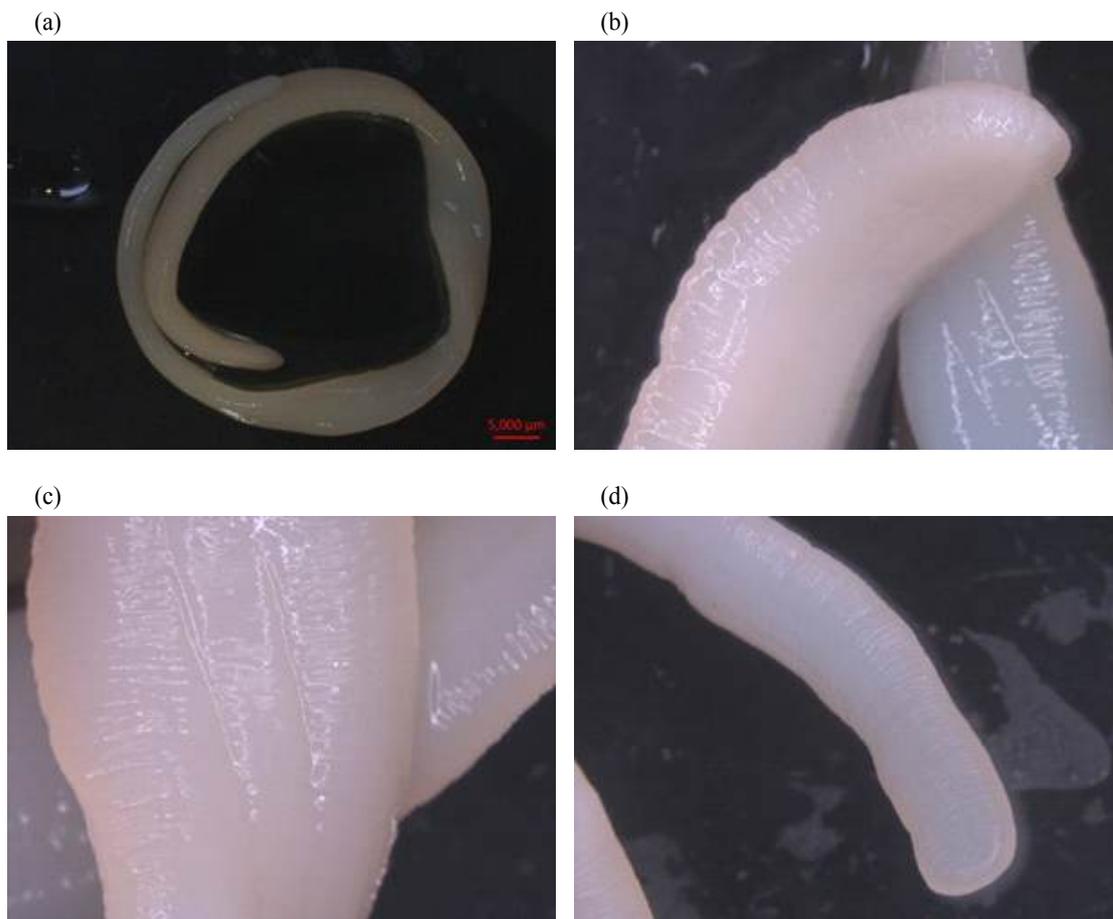
강준치의 복강 내에는 얼은 아이보리색의 가늘고 긴 밴드 형태의 조충이 3 또는 4마리씩 모든 장기를 감싸듯 복강을 가득 채우고 있었고(Fig. 1b), 장을 관통하여 기생하는 경우도 1마리 관찰

되었다(Fig. 1c). 조충의 길이는 11.0~41.5 cm(26.1±10.7 cm) 이었고 무게는 1~8g(3.9±2.0 g) 이었다. 조충의 외형을 관찰하기 위해 알코올에 고정된 조충 가운데에서 관찰이 용이한 짧은 개체를 선택하여 실체현미경으로 관찰하였다(Fig. 2a).

조충의 두부, 미부, 몸통을 관찰하였는데, 두부에는 흡반, 돌출부, 갈고리와 같은 기관이 없으며 끝은 가늘고 잘린듯한 미끈한 형태이며(Fig. 2d), 두부의 두절이나 몸통의 편절과 같은 체절이 몸 전체에서 관찰되지 않았으며, 몸통에는 얇은 주름이 가로로 관찰되었다(Fig. 2b~2d). 몸통의 가장 넓은 부분인 미부는 세로로 두 줄의 홈이 관찰되었고(Fig. 2c) 끝은 넓고 뾰족한 동물의 혀바닥 같은 형태였다(Fig. 2b).



[Fig. 1] The features of *Erythroculter erythropterus* infected with *Digramma interrupta*. (a) Appearance of *E. erythropterus* after death by cestodas infection. (b) Fish abdomen full of tapeworms (c) Abdominal cavity of fish after removing tapeworms. The tapeworm is penetrating the intestine of *E. erythropterus*.



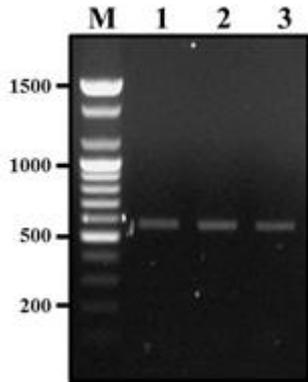
[Fig. 2] Morphology of cestoda isolated from *Erythroculter erythropterus* in Korea. (a) A whole cestoda shape (b) Tail (c) Body (d) Head. Tapeworms was observed under microscope.

2. 조충의 유전자 염기서열 분석

조충의 유전자 염기서열 분석에서, 18S rRNA 유전자를 대상으로 한 PCR에서 559bp 크기의 산물이 증폭되었고, 증폭된 PCR 산물의 염기서열 (accession number : MH935206)을 DNA의 blastn 분석을 실시하였다. 강준치에서 분리된 조충은 모두 *Digamma* sp.(accession number : AF354291) 18S rRNA 유전자와 519개의 염기서열 중 519개가 모두 일치하여 100%로 상동성이 가장 높았고, *D. interrupta*(accession number : AF254122)가 두 번째로 높은 99.6% 상동성을 보여 국내 강준치에

서 분리된 조충은 *Digamma* 속의 *D. interrupta*라고 할 수 있다.

강준치에서 분리된 조충은 18S rRNA 염기서열을 이용한 계통 발생학적 분석 결과에서도 어류에 기생하는 *Diphyllobothriidae* 중에서 *Digamma* 속 (genus)의 *D. interrupta*와 근연 관계를 보였다 ([Fig. 4]). *D. interrupta*는 이란과 중국이라는 분리지역에 유전적 차이를 보였는데, 국내에서 분리된 *Digamma* sp.는 중국에서 분리된 *D. interrupta*와 99.6%, 이란에서 분리된 것과 98.8% 유사하여 중국에서 분리된 *D. interrupta*와 유사하였다. 일본에서 분리된 *D. interrupta*의 유전적

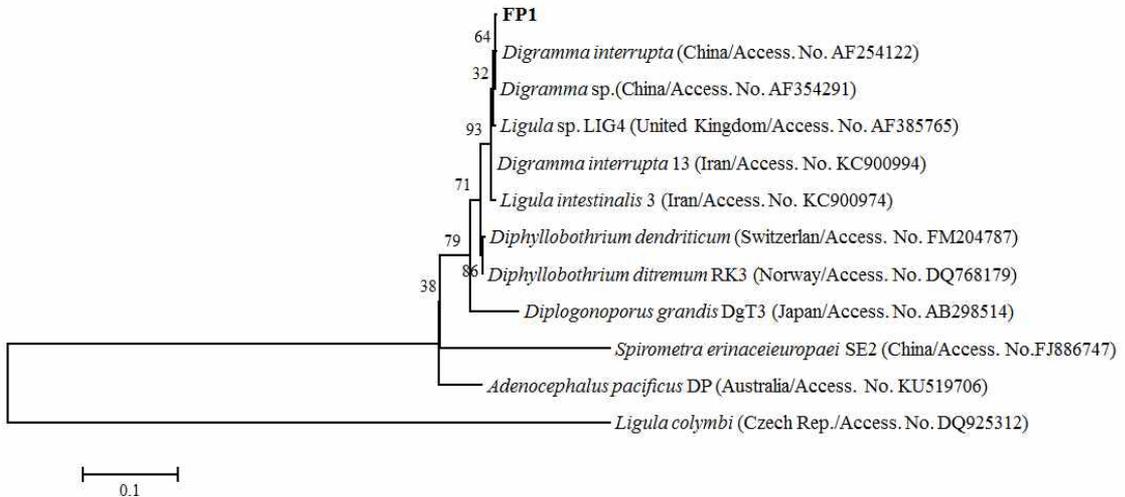


[Fig. 3] PCR amplification results using 18S rRNA gene primers in cestoda. Lane M indicates 1,000bp DNA ladder. Lane 1~3 are genomic DNA extracted from cestoda. The number determines the sort order of randomly selected three cestoda.

정보는 없어 이번 연구에서 유전적인 비교를 할 수 없었지만, 일본에서 *D. interrupta*가 황어 (*Tribolodon hakonensis*), 끄리속(*Opsariichthys*

platypus), 은붕어속(*Carassius* sp.), 잉어(*Cyprinus carpio*), 납자루속(*Acheilognathus* sp.), 중고기속(*Sacocheilichthys variegatus micriiculus*), 연어속(*Oncorhynchus* sp.)에서 보고되어(Nagasawa, 2015) 지리적으로 가까운 한국, 중국, 일본에 *D. interrupta*가 분포하는 것을 알 수 있었다.

*D. interrupta*는 이란에서 브림(*Abramis brama*) 558마리 가운데 67마리(16%)에 기생하고 있었고 *Alburnoides bipunctatus* 883 마리 가운데 418마리 (63%)에 *L. intestinalis*가 기생하고 있어 종 특이성이 있었다(Ahmadiara et al., 2013). 국내의 경우는 피라미에서 *L. intestinalis*가 복강에 기생한 것이 보고되었으나(Shin et al., 2016) *D. interrupta*가 보고된 예는 없다. 조충류 중에서 광절열두조충(*D. latum*)과 요나고열두조충(*D. yonagoense*)은 어류를 감염원으로 하여 사람에게 기생하지만(Chai, 2010) *D. interrupta*가 사람에게서 발견된 사례는 국내외에 없어 *D. interrupta*는 인수공통병원체가 아닌 것으로 생각된다.



[Fig. 4] Neighbor-joining phylogenetic analysis of Diphyllobothriidae family and 18S rRNA gene sequences associated with *Digamma* sp.. The isolation country of the Diphyllobothriidae family is indicated right side. The sequences were secured form NCBI GenBank and the representative name contains the accession number. The scale bar indicates the expected number of substitution per site.

이번 연구로 강준치에서 분리된 조충은 18S rRNA 유전자를 이용한 분석으로 *D. interrupta*로 동정되었고, 감염 경로에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

References

- Ahmadiara E, Hosseini SH, Jalousian F, Ebrahimzadeh Mousavi HA, Sakhaifar S and Gerami Sadeghaian A(2013). The study of the plerocercoid of diphyllbothriidae (cestoda, pseudophyllidea) in two cyprinid hosts, *Abramis brama* and *Alburnoides bipunctatus* from north and northwest of Iran. Iran J of Vet Med 7(2), 103~109.
(10.22059/ijvm.2013.35060)
- Beveridge I and Gregory GG(1976). The identification of *Taenia* species from Australian carnivores. Aust Vet J 52(8), 369~373.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1976.tb09491.x>
- Burrough RJ and CR Kennedy(1979). The occurrence and natural alleviation of stunting in a population of roach, *Rutilus rutilus* (L). J Fish Biol 15, 93~110.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1979.tb03574.x>
- Chai JY(2010). Fish-borne parasitic diseases. Hanyang Med Rev 30, 223~231.
(10.7599/hmr.2010.30.3.223)
- Chaudhary A, Chiary HR, Sharma B and Singh HS(2015) First molecular identification of invasive tapeworm, *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934(Cestoda: Bothriocephalidea) in India. Biolnvas Rec 4, 269~276.
<http://dx.doi.org/10.3391/bir.2015.4.4.07>
- Choi DW(1976). Clonorchis sinensis in Kyungpook province, Korea 2, Demonstration of metacercaria of Clonorchis sinensis from fresh-water fish. Korean J Parasitol 14(1), 10~16.
<http://dx.doi.org/10.3347/kjp.1976.14.1.10>
- Choi JS(2005). Fish fauna and community in Cheongpyeong reservoir. Korean J Limnol 38, 63~72.
- Cholodkovsky N(1915). Notes helminthologiques. Annual Museum Zoology Academy Science Imp 20, 164~166.
- Dubinina MN(1980). Tapeworms (Cestoda, Ligulidea) of the fauna of the USSR. Amerind.
- Kim BS, Park KH, Park YK, Joeng MH, You AS, Yang YJ, Choi JH, Kwon OK and Ahn YJ(2008). Assessment of the Health of Fish Species Collected in Agricultural Reservoirs, AsanHo and NamyangHo. The Korean Journal of Pesticide Science 12(1), 57~66.
- Lee WO, Kim KH, Kim JH and Hong KE(2008). Study of freshwater fauna and distribution of introduces species of Mankyeong river, Korea. Korean Journal of Ichthyology 20, 198~209.
- Luo HY, Nie P, Wang GT and Gao Q(2003). Is the genus Digamma synonymous to the genus Ligula (Cestoda: Pseudophyllidea)? Evidence from ITS and 5' and 28S rDNA sequence. Parasitology Research 89, 419~421.
- Nagasawa K(2015). A checklist of the cestodes of freshwater fishes of Japan(1889~2015). Bulletin of the Hiroshima University Museum 7, 89~115.
<http://doi.org/10.15027/39174>
- Park SD, Shin SS, Ahn SS, Ma SB and Hwang JS(2004). An assessment of ascending functions of the pool-and-Weir fishway at Jamsil weir in the Han River. Korea Water Resources Association 37(7), 541~552. (10.3741/JKWRA.2004.37.7.541)
- Park SW and Oh MJ(2001) Fish diseases. Jinsol ed. Seoul.
- Rausch RL(1993). The biology of Echinococcus. p. 27~56. In Compendium on Cystic Hydatid disease with special reference to the Xinjiang Uygur Autonomous region, the people's republic of China(F.L. Anderson, J. Chai., F. Liu, eds.). Brigham young university print services, Provo, Utah.
- Shields BA, Grovest KL, Rombaugh C and Bellmore R(2002). Ligulosis associated with mortality in largescale suckers. Journal of Fish Biology. 61, 448~455.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb01576.x>
- Shin JK, Kang BG and Hwang SJ(2016). Infestation Characteristics of Parasite (*Ligula intestinalis*) in Abdominal Cavity of Zacco platypus in the Small Stream of Korea. Korean Journal of Ecology and Environment 49(3), 215~227.

<https://doi.org/10.11614/KSL.2016.49.3.215>
Sohn WM, Na BK, Jung SG and Kim KH(2016).
Mass death of predatory carp, *Chanodichthys*
erythropterus, induced by plerocercoid larvae of
Ligula intestinalis (cestoda: Diphylobothriidae).
Korean J Parasitol 54, 363~368.
<https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.3.363>
Wicht B, Yanagida T, Scholz T, Ito A, Jimenez JA
and Brabee J(2010). Multiplex PCR for differential

identification of broad tapeworms (Cestoda:
Diphylobothrium) infecting humans. J Clin
Microbiol 48, 3111~3116. (10.1128/JCM.00445-10).

-
- Received : 27 September, 2018
 - Revised : 26 October, 2018
 - Accepted : 13 November, 2018