

급성 폐사 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 으로부터 *Perkinsus olseni*의 확산 기작

남기웅¹, 정희도², 송재희², 최광식³, 박경일¹

¹군산대학교 해양과학대학 해양생명응용과학부 수산생명의학전공

²국립수산과학원 갯벌연구소

³제주대학교 해양과학대학 해양의생명과학부 해양생명과학전공

Dissemination of *Perkinsus olseni* is affected by the viability of *Ruditapes philippinarum*

Ki-Woong Nam¹, Hee-Do Jeung², Jae-Hee Song³, Kwang-Sik Choi³ and Kyung-Il Park¹

¹Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, 558 Daehakno, Gunsan 54150, Republic of Korea

²Tidal Flat Research Institute, National Fisheries Research Institute, Gunsan 54014, Republic of Korea

³Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju Special Self-Governing Province 63243, Republic of Korea

ABSTRACT

This study was conducted in order to elucidate the dissemination mechanism of *P. olseni* using field and laboratory experiments. For this purpose, we quantified the level of *P. olseni* infection in buried (healthy) and surfaced (gapped) *R. philippinarum* from a clam bed on Wi-do Island on the west coast of Korea. In addition, the levels of internal and released *P. olseni* cells from artificially infected (and later dead) *R. philippinarum* were monitored for 8 days using the RFTM-2 M NaOH lysis method. Our results indicate that *P. olseni* cells in buried *R. philippinarum* was $2,655,625 \pm 1,536,936$ cells/clam; the level in gapped *R. philippinarum* was considerably lower, $28,203 \pm 24,889$ cells/clam ($p < 0.05$). In the laboratory experiment, the *P. olseni* cells remained in the host tissue 2 days after death was approximately 50% lower than the level of infection measured in living clams. The level dropped to 20% 4 days after death and to 1.5% 6 days after death; eight days after death, *P. olseni* cells were undetectable since the *R. philippinarum* flesh had completely decomposed. The level of released cells on the day of death was only 0.05% of the internal level in live *R. philippinarum*; however, the level increased to 2.3% 5 days after death then gradually decreased and no released cells were detected 8 days after death. Therefore, our laboratory experiment suggest that the low level of *P. olseni* infection observed in gapped *R. philippinarum* at Wi-do Island could be caused by lysis of the most of *P. olseni* cells during the decomposition of dead *R. philippinarum* tissues. Until the end of decomposition of *R. philippinarum*, 6.68% of the total amount of *P. olseni* was released within 8 days. Our study showed that the amount of *P. olseni* cells from dead host is a considerably higher level than naturally released from healthy *R. philippinarum*, suggesting that death of the host plays an important role in the dissemination of *P. olseni*.

Key words: *Perkinsus olseni*, Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, dissemination

Received: November 13, 2015; Revised: December 22, 2015; Accepted: December 30, 2015

Corresponding author : Park, Kyung-Il

Tel: +82 (63) 469-1882 e-mail: kipark@kunsan.ac.kr
1225-3480/24594

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

바지락, *Ruditapes philippinarum*은 성장이 빠르고 환경 변화에 대한 적응력이 뛰어나기 때문에 한국에서 굴, 홍합과 함께 산업적으로 매우 중요한 수산자원이다 (Eugenia *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2001). 그러나 한국 서해안의 갯벌에 서식하는 바지락은 거의 대부분 원생동물성 기생충인 *P. olseni*에 의해 감염되어 있으며, 그 감염도가 매



Fig. 1. A gapped *R. philippinarum* on Wi-Island, west coast Korea

우 심각한 것으로 알려져 있다 (Park and Choi, 2001; Park et al., 2005). 이 충체는 바지락의 조직내에서 심각한 염증과 변식량의 저하를 유발하며 (Hamaguchi et al., 1998; Park et al., 2006; Waki et al., 2012), 연중 바지락 체내 *P. olseni*의 감염도는 바지락의 폐사 시기에 증가하고 (Park et al., 2005), 바지락 치폐의 폐사를 유발함이 보고된 바 있다 (Waki et al., 2012). 이러한 사실에 비추어 볼 때 *P. olseni*는 바지락의 폐사에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치고 있는 것으로 판단된다.

기생충은 숙주의 사망으로 인한 숙주 조직의 붕괴가 발생하면 숙주의 체외로 탈출한다 (Bushek et al., 2002; Moodie, 2005). 특히 *Perkinsus* spp.의 생활사 중 hypnospore (prezoosporangium)는 숙주 조직의 분해로 인한 무산소 환경에 영양체가 노출될 경우 형성되기 때문에 숙주의 사망은 *P. olseni*의 확산을 유발하는 것으로 알려져 있다. 숙주의 사망과 충체 확산의 연관성에 관하여 Ragone Calvo et al. (2003)에 따르면 *P. marinus*의 경우 해수 중 최대 밀도를 나타내는 시기가 숙주인 *C. virginica*의 대량폐사가 발생하는 시기와 일치함을 보고함으로써 숙주 폐사에 의해 *P. marinus*가 확산됨을 확인하였다. 그러나 현재까지 *P. olseni*의 확산에 대하여 숙주인 바지락의 폐사가 미치는 영향에 관해서는 알려진 바 없다.

따라서 본 연구는 위도 지역 바지락 양식장에서 저질에 노출되어 gapped 한 채 사망한 바지락과 저질에 잠입해 있는 바지락내의 *P. olseni*의 감염도를 비교하고, 이와 유사한 실험을

실험실내에서 재현함으로써 숙주의 사망에 따른 *P. olseni*의 양식장내 확산 기작을 이해하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. 양식장의 잠입 바지락과 노출 바지락 체내의 *P. olseni*의 감염도 비교

전라북도 부안군 위도에 위치한 바지락 양식장에서 서식중인 바지락 중 저질에 잠입해있는 바지락과 저질 표면으로 올라온 후 폐각을 5 mm 정도 벌린 채 사망한 바지락을 각각 20개 채씩 채집하였다 (Fig. 1). 이 후 실험실로 옮겨 각장, 각고, 습중량 및 condition index (CI) 등을 측정하였으며, 육질부는 RFTM (Ray's Fluid Thioglycollate Medium) - 2M NaOH lysis 방법을 이용해 *P. olseni*의 감염도를 측정하였다. CI는 습중량/폐각중량 x 10의 식으로 측정하였다.

2. 인위감염을 통한 폐사 바지락의 *Perkinsus olseni* 감염도 변화

1) *Perkinsus olseni* 영양체 준비

본 연구에 사용한 *P. olseni*는 충청남도 홍성군 바지락 양식장에서 채집한 바지락의 혈림프내에서 분리하였으며, monoclonal culture를 수행하여 *P. olseni* (KHS-1)를 확보하였다. *P. olseni* (KHS-1)는 실험 전까지 5% cryo-MEM (Minimum Essential Medium, DMEM:F12 with 10% FBS with 5% DMSO)에 동결보존 하였으며, *P. olseni* (KHS-1)를 MEM (DMEM:F12 with 10% FBS)에 재배양하여 영양체를 확보하였다.

2) *Perkinsus olseni* 인위 감염 실험용 바지락

본 연구에 사용한 바지락은 충남 태안군 소원면 파도리의 바지락 양식장에서 채집하였고, 군산대학교 해양수산교육연구센터의 어류기생충학 실험실에서 1달간 수온 20℃와 염분 30 psu에서 순치시킨 다음 실험에 이용하였다. 이 기간 동안 매일 1시간씩 Shellfish diet 1800® (Reed Mariculture Inc, USA)를 1 x 10⁷ cell/mL/day의 농도로 공급하였다.

3) 인위감염 및 폐사 바지락으로부터 방출된 *P. olseni* 정량

16개의 바지락을 각 개체별로 독립된 수조 (100 ml)에 넣은 다음, *P. olseni*를 3 x 10⁷ cell/clam 농도로 조절된 멸균 해수 0.5 ml를 후폐각근에 주입하고, 매일 해수로 방출되는 *P. olseni*를 정량하였다. 수조에는 aeration을 실시하였다. 실험도중 폐사한 개체들이 발생하면 이 개체의 각장, 각고를 측정하고 육질부를 분리한 다음 습중량을 측정하였으며, 이 후 이 육질부를 다시 개별 수조에 넣고 폐사 순서에 따라 2마리씩 4

Table 1. Mean shell size, condition index and *P. olseni* infection in buried and gapped *R. philippinarum* in mid August, 2012 on Wi-do Island, west coast of Korea

Clams	N	Shell length (mm)	Shell height (mm)	# of <i>Perkinsus olseni</i> / clam	# of <i>Perkinsus olseni</i> / GTWW
Gapped	20	37.75 ± 3.57	25.34 ± 3.37	28,203 ± 24,889	17,005 ± 15,007
Buried	20	37.75 ± 2.59	24.01 ± 4.22	2,655,626 ± 1,536,936	767,324 ± 390,155
P-value		P > 0.05	P > 0.05	P < 0.01	P < 0.01

개 그룹 (Group-A-D) 으로 나눈 후, Group-A는 폐사 당일부터 2일간 해수중으로 방출된 *P. olseni* 양을 매일 정량하였으며, 마지막 날에는 바지락 체내의 총체를 정량 하였다. 동일한 방법으로 Group-B는 폐사 후 4일간, Group-C는 폐사 후 6일간, Group-D는 폐사 후 8일간 해수 중으로 방출된 *P. olseni* 양을 매일 정량하였으며, 마지막 날에는 바지락 체내의 총체를 정량하였다. 해수 중으로 방출된 *P. olseni* 수는 폐사 후 경과한 날짜별로 grouping 한 후 정량하였다.

4) *P. olseni*의 정량

*P. olseni*의 정량은 RFTM방법과 Choi's 2M NaOH lysis 방법을 사용하였다 (OIE, 2006). 바지락 사육수는 3,000 rpm 으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 하층의 pellet 을 RFTM (with penicillin / streptomycin) 에 넣었으며, 바지락은 개각하여 연체부를 RFTM에 넣고 실온의 암실에서 15 일간 배양하였다. 배양 후 3,000 rpm 으로 20분간 원심 분리 하여 상층액을 제거하고 2M NaOH를 10 ml 첨가 후 30분간 50°C에서 배양하여 바지락의 연체부를 제거 하였다. 이 작업은 3-4회 반복하였으며, 휴면포자는 혈구계수관 (Marienfeld, Germany) 을 이용하여 정량하였다. 총체 수는 바지락 1개체 (# of *P. olseni* cells/clam) 또는 습중량 (# of *P. olseni* cells/gram tissue wet weight (GTWW)) 단위로 표기하였다.

3. 통계분석

각 group 간 *P. olseni*의 농도의 차이는 SPSS. 12.0.1패키지의 T-test 또는 One-way ANOVA를 실시한 다음 Duncan의 사후분석을 95%의 신뢰수준에서 평가하였다.

실험 결과

1. 양식장의 잠입 바지락과 gapped 바지락 체내의 *P. olseni*의 감염도 비교

잠입 바지락은 저질 표층에서 3-5 cm 깊이에 잠입한 상태였으나, gapped 바지락의 경우 표층에서 패각이 약 0.2-0.4 cm의 폭으로 벌어져 있는 상태였고 자극을 주어도 반응이 없었

다. 위도의 바지락 양식장에서 채집된 gapped 바지락과 잠입 바지락의 각장과 CI는 서로 유사하였다 (P > 0.05). 그러나 *P. olseni* 감염도는 잠입 바지락에서 평균 2,655,626 cell/clam 또는 767,324 cell/GTWW이 검출되었으나, gapped 바지락의 경우 평균 28,203 cell/clam 또는 17,005 cell/GTWW 만 이 검출되었다 (Table 1).

2. 실험실내 생존 바지락과 폐사 바지락의 *P. olseni* 감염도 비교

1) 생존 바지락의 *P. olseni* 감염도

P. olseni 에 인위 감염된 바지락은 인위감염 당일 평균 857,000 cell/clam 을 해수 중으로 방출하였으며, 감염 2일째 부터 4일째까지 매일 약 200,000 cell의 *P. olseni*가 방출된 것으로 나타났다 (Fig. 2). 인위감염 3일째에 2개체가 사망하였고, 4일째에 6개체가 사망함으로써 전체 바지락 중 누적 폐사율이 50%가 되었으며, 이 날 생존한 채 남아 있는 8개 바지락의 평균 *P. olseni* 감염도는 19,800,000 cell/clam 였다 (Table 2).

2) 폐사 바지락의 체내 *P. olseni* 잔존량과 해수 중 방출

Group-A는 인위감염 3일 째 사망한 2개체였으며, 나머지

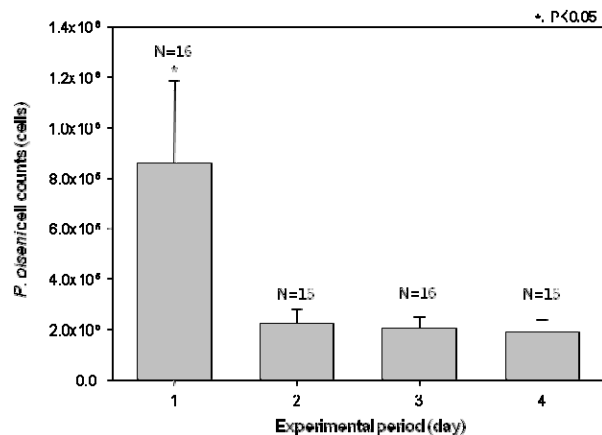


Fig. 2. Released *P. olseni* cells from live *R. philippinarum* after inoculation.

Table 2. Changes in the number of *P. olseni* cells remained in the dead *R. philippinarum*

Sample	(Live clam)	Group-A	Group-B	Group-C	Group-D
Sampling period including death day	0	2	4	6	8
N	8	2	2	2	2
Mean # of <i>P. olseni</i> per clam	19,800,000	10,668,750	1,662,500	300,000	0
STD	5,779,129	822,012	1,184,404	442,264	0
% of remained cells to total # of <i>P. olseni</i> in live clams	100	53.9	8.4	1.5	0

STD: standard deviation

그룹은 인위감염 4일 째 사망한 6개체를 2개체씩 나누어 구성하였다. Group-A의 체내 잔존 *P. olseni*의 수는 10,668,750 cell/clam 였고, Group-B는 1,662,500 cell/clam 로 감소하였으며, Group-C는 300,000 cell/clam 로 감소하는 등 시간이 경과할수록 급격히 감소하였다. 더욱이 Group-D는 육질부가 대부분 분해되었으며 이들 내에서 *P. olseni*는 더 이상 검출되지 않았다 (Table 2).

Table 3는 폐사 바지락이 해수중으로 방출한 *P. olseni* 량을 정량한 결과이다. Group A-D 에 속한 개체들이 폐사 당일 방출한 총체 수는 9,375 cell/clam 였으며, 폐사 2일째는 65,625 cell/clam 로 증가하였고, 폐사 3일 째에는 Group B-D에 속한 개체들에게서 147,917 cell/clam 이 방출되었다. 폐사 5일 째에는 Group C-D에 속한 개체들에게서 평균 459,375cell/clam 이 해수중으로 방출되어 최대 방출량을 기록하였다. 그러나 이후 해수로의 총체 방출량은 급격히 감소하여 폐사 7일째 Group-D로부터 방출된 총체의 수는 87,500 cell/clam 에 불과하였고, 폐사 8일 째에는 총체가 검출되지

않았다. 이러한 방출량의 변화는 인위감염 4일 째까지 생존하였던 바지락의 평균 체내 감염도 19,800,000 cell/clam 와 비교하여 폐사 첫째 날은 0.05%에 불과하였으며, 폐사 5일째까지는 지속적으로 증가하여 최대치를 나타내긴 하였으나 2.3%에 불과하였다. 조사 8일 동안 체외로 방출된 *P. olseni*는 총 1,334,375 cell 였으며, 이는 생존 시 바지락이 보유하였던 총 총체의 6.68%에 달하였다. 본 실험에 사용된 생존 바지락과 폐사 바지락의 각장과 CI는 서로 유사하였다 (Table 4).

고 찰

본 연구는 한국 서해안 조간대에서 서식중인 바지락의 주요 기생충인 *P. olseni*의 확산 기작에 관한 연구로써, 숙주 폐사에 따른 숙주내 *P. olseni*의 잔존량, 체외 방출 시기, 방출 기간 및 방출량 등을 조사한 결과이다. 조사 결과 숙주 폐사 후 체내 잔존 총체는 생존시 총체량과 비교하여 조사기간 동안 급격히 감소하여 8일째에는 전혀 검출되지 않았으며, 같은 기간

Table 3. Changes in the number of *P. olseni* cells released from dead *R. philippinarum*

Sample	Group-A, B, C, D		Group-B, C, D		Group-C, D		Group-D		Total <i>P. olseni</i> cells
Sampling period including death day	1	2	3	4	5	6	7	8	
N	8	8	6	6	4	4	2	2	
Mean # of <i>P. olseni</i> per clam	9,375	65,625	147,917	295,833	459,375	268,750	87,500	0	1,334,375
STD	12,939	74,026	150,917	357,567	365,629	337,500	123,744	0	
% of released cells to total # of <i>P. olseni</i> in live clams (Ca. 20 million cells)	0.05	0.33	0.74	1.48	2.30	1.34	0.44	0	6.68

STD: standard deviation

Table 4. Mean dimensions and tissue wet weights of *R. philippinarum* used in the laboratory experiment

Clams	Shell Length (mm) ± STD	Shell height (mm) ± STD	Shell thickness (mm) ± STD	Tissue wet weight (g) ± STD	Shell weight (g) ± STD	CI ± STD
Live	38.35 ± 2.45	26.35 ± 2.16	18.45 ± 1.94	2.23 ± 0.85	7.18 ± 2.53	3.21 ± 0.84
Dead	37.55 ± 3.23	25.85 ± 2.24	18.60 ± 1.68	2.18 ± 0.81	6.98 ± 2.43	3.20 ± 0.88

STD: standard deviation

동안 체외로 방출된 총체량은 폐사 5일째까지는 증가하다 이후 급격히 감소하여 8일째에는 방출개체가 소멸하였다. 방출된 총체량 역시 생존 시 보유하고 있던 총체량에 비해서는 매우 미미한 수준이었다.

이러한 결과는 2012년 여름, 전라북도 위도에서 발생한 바지락의 대량 폐사 시 폐사 바지락내 *P. olseni* 총체의 수가 건강한 바지락에 비해 현저히 낮았던 이유가 숙주 폐사 시 숙주 조직의 분해 (disintegration) 과정에서 *P. olseni*의 영양체 역시 분해되었기 때문으로 판단된다. 본 연구에서 조사된 바와 같이 바지락 사망 후 경과 일수에 따른 *P. olseni* 총체 수를 생존시 총체 수와 비교한 결과 폐사후 2일 째에는 생존한 바지락의 50% 수준에 불과하였으며, 4일 째에는 약 20%, 6일 째는 약 1.5%로 감소하였다. 이러한 결과는 본 연구진이 위도 지역을 방문하여 조사한 gapped 바지락내 총체 수가 생존 바지락의 2%수준에 불과하였으며 이 때가 폐사 발생 후 약 5일정도 경과한 시점였음을 고려하면 실험실내 실험과 현장의 결과가 매우 유사한 결과로 판단된다.

일반적으로 숙주의 체내에서 기생하는 총체의 경우 숙주의 급성 폐사시에는 기생충의 차기 생활사로의 전환을 위한 숙주 탈출의 기작이 원활히 이루어지 않고 대부분 사멸한다 (Eaton, 2008; Mandal, 2011). 최근 우리나라 서해안에서 발생하고 있는 여름철 고수온기의 바지락 대량폐사 현상은 30℃이상의 수온이 수 일간 유지될 경우 발생하며 다수의 바지락이 갯벌위로 올라온 후 재잠입하지 못하고 폐사하는 경향을 나타낸다. 따라서 숙주 조직내 *P. olseni*의 영양체는 숙주조직이 분해될 때 무산소 상태에서 hypnospore로 전환 될 수 있지만 (Auzoux-Bordenave, 1995), 2012년 위도의 바지락 대량폐사는 여름철 폭염에 의해 발생한 것으로 폐사 발생 3일 만에 폐사율이 67%-89%에 달하는 급성 폐사에 해당하였고 (Song, 2015), 이와 더불어 *Perkinsus* spp.의 감염은 숙주 조직의 분해를 유발하는 병리적 특성을 갖고 있어 (Ray, 1954; Chu *et al.*, 1993, Park *et al.*, 2006), *P. olseni*의 영양체가 hypnospore로 전환되는데 소요되는 시간보다 조직의 분해 속도가 더 빨랐을 것으로 추정된다.

한편, 실험실내 실험에서 인위적으로 *P. olseni* 감염된 후 사망한 바지락 사육수내의 *P. olseni*의 량을 측정된 결과 폐사

당일에는 폐사 직전 보유하고 있던 총 총체 수의 0.05%를 방출하였으며, 2일 째에는 0.33%로 증가하였고 이러한 방출량은 5일째에 2.3%로 최대 방출량을 보인 후 점차 감소하여 폐사 8일 째에는 방출된 총체가 전혀 검출되지 않았다. 따라서 폐사한 개체로부터 숙주의 폐사 후 7일째까지 방출된 누적 *P. olseni* 수는 숙주의 생존 시 숙주 체내에 있었던 총체량의 6.8%에 달하였다. 이러한 결과는 Park *et al.* (2005) 등이 보고한 바와 같이 건강한 바지락에서 feces를 통하여 방출되는 총체의 수가 1-2cell/day 에 불과하였음을 감안하면 폐사한 개체로부터의 총체 방출은 수계에서 총체 전파에 가장 중요한 전파 방식인 것으로 판단된다. 이러한 전파 방식은 기존에 알려진 *P. marinus*의 전파 방식과 매우 유사한 결과이다. 현재까지 숙주인 대서양굴 (*C. virginica*)의 폐사 시 방출되는 *P. marinus*의 량이 측정된 바는 없으나, *P. marinus*는 숙주가 사망하면 영양체 단계에서 prezoosporangia 단계로 전환된 후 다수의 유주자를 방출할 수 있는 기회를 갖기 때문에 해수내 *P. marinus*의 출현 빈도가 최대가 되는 시기는 굴의 대량 폐사 시기와 유사하다고 알려져 있다 (Perkins 1966; Ragone-Calvo *et al.*, 2003). 이와 더불어, 숙주의 폐사 이외에도 생존 숙주의 경우 feces나 pseudofeces를 통하여 수천 개의 총체가 방출되는 것으로 보고된 바 있어 *P. marinus*의 경우 건강한 숙주라 하더라도 다수의 총체가 체외로 확산되는 것으로 판단된다 (Bushek *et al.*, 2002). 그러나 바지락에 기생하는 *P. olseni*의 경우에는 생존한 개체보다는 폐사한 개체의 총체 유출이 병원체의 확산에 주요하게 작용함이 본 연구를 통하여 확인되었다.

결론적으로, 바지락의 대량 폐사 시 *P. olseni*의 확산은 폐사 후 8일 이내에 이루어지며, 이러한 숙주 체외로의 방출은 숙주의 생존 시 갖고 있었던 총체 수의 6.68%에 달하였다. 따라서 이러한 정보는 *P. olseni*의 확산을 최소화하는데 폐사 숙주의 신속한 제거가 유용한 방법임을 시사하고 있다.

사 사

본 연구는 국립수산물학원 갯벌연구소의 연구비지원 (R2015006) 하에 수행되었습니다.

REFERENCES

- Auzoux-Bordenave, S., Vigario, A.M., Ruano, F., Domart-Coulon, I. and Doumenc, D. (1995) In vitro sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*, **14**: 469-475.
- Bushek, D., Ford S.E. and Chintala, M.M. (2002) Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*, **51**: 217-225.
- Chu, F.-L., La Peyre, J.F. and Burrenson, C.S. (1993) *Perkinsus marinus* infection and potential defense related activities in eastern oysters *C. virginica*: salinity effects. *Journal of Invertebrate Pathology*, **62**: 225-232.
- Chung, E.Y., Hur, S.B., Hur, Y.B. and Lee, J.S. (2001) Gonadal maturation and artificial spawning of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae), in Komso Bay, Korea. *Journal of Fisheries Science and Technology*, **4**: 208-218.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.S. and Soudant, P. (2009) Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, **297**: 10-24.
- Eaton, C.D. (2008) Co-evolution. in; Encyclopedia of ecology. (ed. by Sven Erik Jorgensen and Brian D. Fath, 1st Edition). pp. 659-663, Elsevier B.V., Oxford.
- Eugenia, R., Pazo, J.P., Garcia, A. and Fernandez Cortes, F. (1992) Reproductive cycle of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve 1850) in ria of Vigo (NW Spain). *Scientia Marina*, **56**(1): 61-67.
- Hamaguchi, M.N., Suzuki, N., Usuki, H. and Ishioka, H. (1998) *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam Tapes (= *Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. *Journal of Fish Pathology*, **33**: 473-480.
- Lee, Y.H., Chang, Y.J., Lim, H.K. and Chung, G.S. (1996) Comparison of growth and survival rate in Shortnecked clams, *Ruditapes philippinarum* from different seeding production area. *Aquaculture*, **9**: 223-232.
- Mandal, F.B. (2011) Human parasitology. PHI Learning Private Limited, New Delhi.
- Moodie, E. (2005) Microsporidia (microsporans). *In*: Marine parasitology. (ed. by L. Rohde). pp 30-46, CSIRO, Australia.
- OIE. (2006) Infection with *Perkinsus olseni*. *In*: Manual of diagnostic test for aquatic animals 2006. pp 335-342. OIE. Paris.
- Park, K.I. and Choi, K.S. (2001) Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture*, **203**: 9-22.
- Park, K.-I., Figueras, A. and Choi, K.-S. (2006) Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture*, **251**: 182-191.
- Park, K.I, Park, J.K. Lee, J. and Choi, K.S. (2005) Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **66**: 255-263.
- Park, K.-I., Yang, H.-S., Kang, H.-S., Cho, M., Park, K.-J. and Choi, K.-S. (2010) Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. *Journal of Invertebrate Pathology*, **105**: 261-269.
- Perkins, F.O. (1996) The structure of *Perkinsus marinus*. (Mackin, Owen, and Collier, 1950) Levine, 1978, with comments on the taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* sp. *Journal of Shellfish Research*, **15**: 67-87.
- Ragone-Calvo, L.M., Dungan, C.F., Roberson, B.S. and Burrenson, E.M. (2003) Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms*, **56**: 75-86.
- Ray, S.M. (1954) Studies of pathogenesis of *Dermocystidium marinum*. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, **45**: 164-167.
- Song, J.H. (2015) Strategy for the sustainable development of Manila clam farming industry. *Aqua Culture*, **9**: 70-74.
- Waki, T., Shimokawa, J., Watanabe, S., Yoshinaga, T. and Ogawa, K. (2012) Experimental challenges of wild Manila clams with *Perkinsus* species isolated from naturally infected wild Manila clams. *Journal of Invertebrate Pathology*, **111**: 50-55.