

순환여과시스템을 이용한 바지락 *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) 의 번식 생리에 관한 연구: I. 가온에 의한 성 성숙 유도

이희중, 박경일¹, 최광식

제주대학교 해양과학대학 해양생명과학과, ¹군산대학교 수산과학대학 수산생명의학과

Conditioning of Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) using recirculation system: I. Induction of the gametogenesis using water temperature elevation

Hee-Jung Lee, Kyung-Il Park¹ and Kwang-Sik Choi

School of Marine Biomedical Science (BK 21 PLUS), Jeju National University, 66 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Republic of Korea

¹Department of Aquatic Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan, Republic of Korea

ABSTRACT

Gonad maturation of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* was induced in this study using a recirculation system over 8 weeks in early spring. Clams used in the experiment were collected in 15th April 2010 from the west coast of Korea, as the surface water temperature remained 11°C. To induce gametogenesis and subsequent maturation seawater temperature was elevated 1°C per day over 10 days to reach 20°C. For the experiment, clams were raised in 120 L quadrangle tank maintained with re-circulated seawater system over 57 days. Water quality parameters including the water temperature, salinity dissolved oxygen, ammonium ion and nitrate levels in the tanks were monitored daily. Mixture of concentrated microalgae including *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova* and *Thalassiosira weissflogii* was supplied to clams twice a day, and quantity of the daily ration was adjusted as 3% of clam body dry weight. Histology was applied to examine gonad maturation. Daily monitoring of the water quality parameters indicated that the recirculation system supplied suitable environment to Manila clam; the nitrogenous components stayed below toxic levels (< 0.2 mg/L). At the beginning of the study, clams were mostly in early developing stage. As the seawater temperature reached 20°C, 10 days after the experiment, 20% of clams reached late development at 12 days. First ripe clams were observed at 42 days and 40% of clams were in ripe and ready for spawning at the end of study, 57 days after the experiment. In this study, gametogenesis of Manila clam was successfully induced by elevating water temperature and supplying commercially produced microalgae in a recirculation tank system.

Key word: *Ruditapes philippinarum*, gametogenesis, recirculation system, gonad development

서론

Received: June 16, 2014; Revised: June 20, 2014;
Accepted: June 23, 2014

Corresponding author : Kwang-Sik Choi

Tel: +82 (64) 754-3422 e-mail: skchoi@jejunu.ac.kr
1225-3480/24522

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.

바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 은 조간대를 비롯하여 조하대까지 널리 분포하는 이매패류로 그 생산량은 굴 (*Crassostrea gigas*), 지중해담치 (*Mytilus galloprovincialis*) 다음으로 높아 수산업적 가치가 매우 높다 (Park and Choi, 2004). FAO의 통계에 따르면 2006년의 세계 이매패류 생산량의 65%가 양식에 의한 것임을 보고한바 있다 (Prado *et al.* 2010). 우리나라 바지락 생산량은 1990년

60,000 톤을 기점으로 점차 감소하여, 2010년 23,000 톤을 생산하는데 그치고 있다 (KOSIS, 2003). 반면에, 우리나라 바지락 수요는 꾸준히 증가하고 있어 국내 생산량이 수요를 충족시키지 못하고 있다. 2007년을 기준으로 중국 및 북한에서 바지락이 수입되고 있으며, 북한에서 수입되고 있는 양이 80%를 차지한다 (Yang *et al.*, 2010). 국내의 바지락 생산량 감소 원인은 생리적으로인 (Keino *et al.* 2005; Yan *et al.*, 2006), 질병 요인 (Park and Choi, 2001; Allam *et al.*, 2002; Ngo *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2006; Tun *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2010) 및 어장 관리적 요인 (Lee *et al.*, 1996) 에 인한 것으로 추정된다. 우리나라 바지락 양식은 주로 바지락 양식환경에서 발생하는 치패를 증묘로 사용하고 있으며, 바지락 생산량이 감소함에 따라 자연 증패의 생산도 줄어들고 있는 실정이다 (Uddin *et al.* 2010). 이렇듯 자연적으로 발생하는 치패의 양은 감소하고 있는 상황에서 바지락의 생산량을 늘리기 위해서는 이매패류의 증묘생산을 통해 우량증묘를 확보하여 양성하는 방법과, 외국으로부터 모패를 들여와 자연 발생장에 발생시키는 방법이 대두되고 있다. 이매패류의 인공증묘 양식을 위해서는 건강한 모패의 Conditioning, 산란 유도, 유생의 양정기술 그리고 치패 양성 기술이 필요하다 (Yan *et al.*, 2006). 이중, 모패의 Conditioning은 인위적인 먹이 공급 및 온도조절을 통해 실내 수조 환경에서 이매패류의 생식소 발달을 앞당기는 일로, 원하는 시기에 산란 및 증패를 생산하는데 쓰인다 (Helm and Bourne 2004). 인공증묘생사는 치패를 발생시키는데 계절의 영향을 받지 않으며, 건강한 모패를 통해 치패가 생산되어 유전적 결합에 따른 생산량의 저하를 없앨 수 있는 장점이 있다 (Ojea *et al.* 2008; Prado *et al.* 2010). 유럽 및 미국, 일본의 경우 1960년대부터 이매패류 증묘생산에 관한 연구를 시작 하여 현재 미국의 서부 해안의 80%, 프랑스 10-20%가 인공증묘생산을 통해 생산되고 있다 (Hur *et al.* 2008).

국내의 경우 바지락 인공증묘 생산에 관한 연구는 다수가 있었으나, 증묘생산을 위한 모패의 conditioning 에 관한 연구는 제한적인 실정이다. 따라서 이 연구의 목적은 순환 시스템 하에서 일정량의 먹이공급과 수온 조절을 통해 바지락의 성 성숙을 유도하여 바지락 인공증묘 생산에 기초적인 데이터를 제시하는데 있다.

재료 및 방법

실험에 쓰인 바지락은 총 600개체로 2010년 4월15일 충청남도 홍성군 궁리에서 채집되었고 크기는 35-45 mm였다. 채집 당시 수온은 11°C였으며 채집된 바지락은 실험실로 옮겨와 11°C로 설정된 해수에 3일간 순치 시켰으며, 이시기에 먹이공급은 실시하지 않았다. 순치기간 종료 후 하루에 1°C씩 상승시

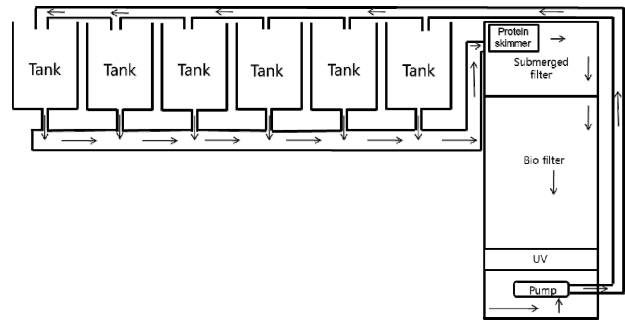


Fig. 1. Schematic diagram of the integrated recirculation system used in this study.

켜 10일 후 20°C에 이르게 하였으며, 실내 수조와 순환여과 시스템을 이용하여, 8주 실험 기간 동안 20.5 ± 1°C 를 유지하였다.

1. 사육수조 및 부속 시설

이 연구에 사용된 순환여과 시스템은 사육조 6개와 여과조, 냉각기, 단백질 스키머, 온도 조절 장치로 구성되었다 (Fig 1). 사육조는 60 × 40 × 50 cm³크기로 120 L 용량 (수량 100 L) 이며, 사육수의 유수량 (flow rate)은 5-6 L/min (4-5회전/day) 로 유지하였다. 여과조는 1650 L 용량 (수량 1000 L) 250 × 60 × 110 cm³ 크기로 침전조 및 생물학적 여과조, UV 살균조로 나뉘어져 있다. 침전조는 70 × 60 × 110 cm³ 이며, 생물학적 여과조는 1400 × 60 × 110 cm³ 크기로 여과효율이 800 m²/m³인 바이오 피치 (삼지테크) 를 2/3 가량 채웠다. UV 살균조 크기는 400 × 60 × 110 cm³ 며 UV는 G36T5L (Sanky Denki) 를 사용하였다. UV 살균조 내에는 2 KW 히터 (아이애크) 가 포함되어있고, 1시간에 1°C를 상승시킬 수 있다. 냉각기는 (DA-1500B, 대일) 를 사용하였으며 사육조 내의 수온을 1시간에 1°C 하강시킬 수 있다. 단백질 스키머의 용량은 60 L로서 크기는 30 × 60 × 30 cm³ 이다. 해수는 5 μm 필터 (Chisso) 로 2회 통과시킨 후 최종 3 μm 필터 (Chisso) 에 통과 시킨 해수를 사용하였으며, 해수의 교환은 NH₄⁺ 농도가 3 mg/L 이상 관측 시 1/2 환수를 실시하였다. 11°C에서 3일간 적응을 마친 후 수온조절기를 이용하여 1일 1°C씩 올렸으며, Helm and Bourne (2004) 가 제시한 바지락에 있어 가장 활발한 먹이 섭이율을 보이는 20-22°C 수온을 유지하며 바지락을 순치 시켰다.

2. 수질 관리

사육수의 수온 및 염분, DO (Dissolved Oxygen) 는 YSI model 85 (YSI) 를 이용하여 매일 측정하였고, pH 및 NH₄⁺, NO₂ 는 Aqua Kit (Aqua-VBC) 를 이용하여 3-5일 간격으로 측정하였다.

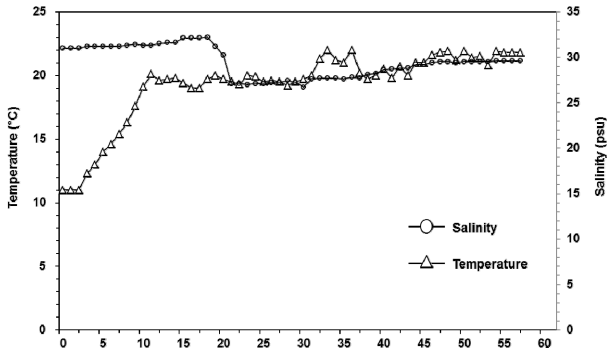


Fig. 2. Water temperature and salinity recorded during the course of study.

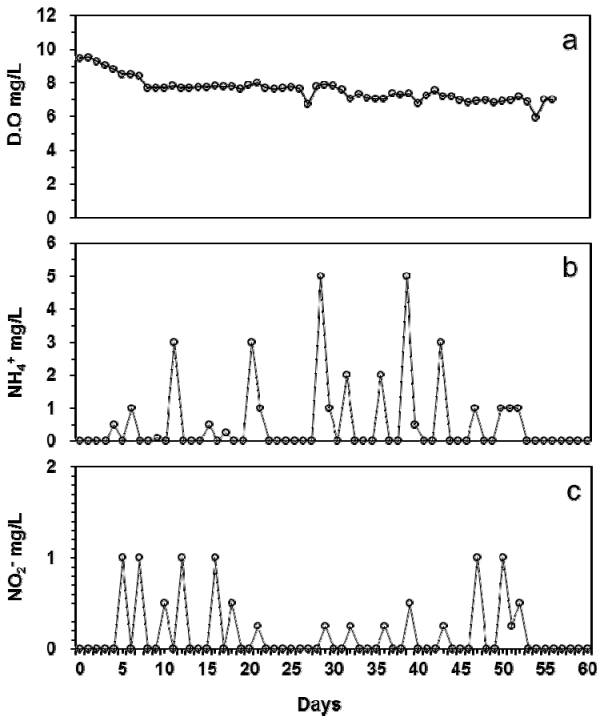


Fig. 3. Daily recorded dissolve oxygen (D.O., mg/L, a), ammonium (mg/L, b) and nitrogen dioxide (mg/L, c).

3. 먹이공급

먹이는 *Tetraselmis* (30%), *Isochrysis* (20%), *Pavlova* (20%) 및 *Thalassiosira weissflogii* (30%) 등이 1 ml/2 × 10⁹ Cells로 농축되어 있는 Shellfish Diet (Reed Mariculture Store, San Jose, CA)를 이용하여, 2.2 × 10⁷ cells/clam/day가 되도록 공급하였으며, 공급 비율은 바지락 육질 건조 중량의 3%였다. 먹이 공급 시 해수는 차단하였으며 Instant algae가 바닥에 가라앉는 것을 방지하기 위해 수조에 기포발생기 (PD-40, 펠그린) 와 5 W 수중 모터 (영일전기) 를 이용하여 수류를 발생시켰다.

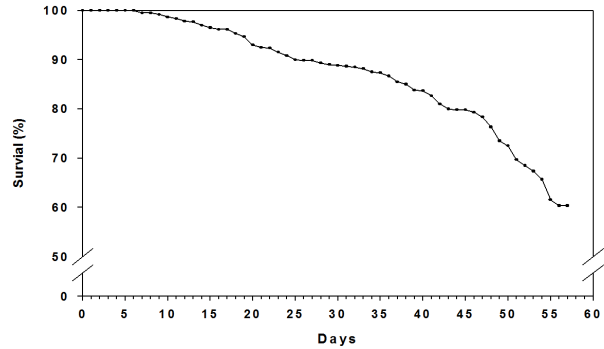


Fig. 4. Survival rate of clam used in the study.

4. 조직학적 관찰

시료채집은 매주 1회 임의로 20개체를 선별, 실험에 사용하였다. 채집된 바지락은 조직학적 관찰방법을 이용하여 생식소 발달 단계 측정하였다. 조직학적 관찰을 위해 바지락의 외투강, 생식세포, 소화맹낭 및 아가미 등이 포함되도록 3 mm 두께로 각 개체마다 일정하게 절취하였고, 그 외 나머지 조직은 체 조직 성분 분석을 위해 -75°C에 냉동 보관하였다. 절취된 바지락 조직은 Davison's solutin에 24-48 시간 고정하였다. 고정이 완료된 시료는 70% 알콜을 이용하여 탈수한 뒤 파라핀으로 포매하였다. 포매된 조직은 마이크로톰을 이용하여 6 μm 두께로 절단하여 Harris' Hematoxylin과 Eosin Y (Ngo *et al.*, 2003) 로 염색하였다. 제작된 조직 시료는 광학 현미경을 이용하여 생식소 발달 단계를 관찰하였다. 바지락 생식소 발달 단계는 (Drummond *et al.*, 2006) 의 방법에 따라 광학현미경 하에서 휴지기 (resting stage), 초기 발달기 (early developing stage), 후기 발달기 (late developing stage), 완숙기 (ripe stage) 로 구분하였다 (Fig. 2, 3).

결 과

실험기간 동안 수온은 처음 채집되었을 당시 수온인 11°C에 3일간 순치 후 10일동안 1°C씩 올려 20°C에 바지락을 순응시켰으며, 실험 종료 시까지 20.5 ± 1°C를 유지하였다. 염분은 실험 시작 후 20일까지 31.4 ± 0.5 psu를 유지하였으며, 21일째부터 실험 종료 시까지 28.8 ± 1.0 psu로 유지하였다 (Fig. 4). 실험기간 동안 해수의 용존 산소량은 5.9-9.8 mg/L의 범위를 보였으며, pH는 7.3-8.6, NH₄⁺ 0.1-5.0 mg/L, NO₂⁻ 0.3-1.0 mg/L의 범위를 보였다 (Fig. 5, 6). 실험 시작 0일부터 6일까지 바지락의 생존율은 100%였으며, 7일부터 48일까지 82.1%의 누적 생존율을 보였고 최종 60.3%의 누적 생존율을 보였다. 실험에 이용된 바지락은 총 150개체로, 각장 39.6-41.3 mm의 범위였고, 육중량은 3.694 ± 0.7-5.990 ± 1.0 g였다.

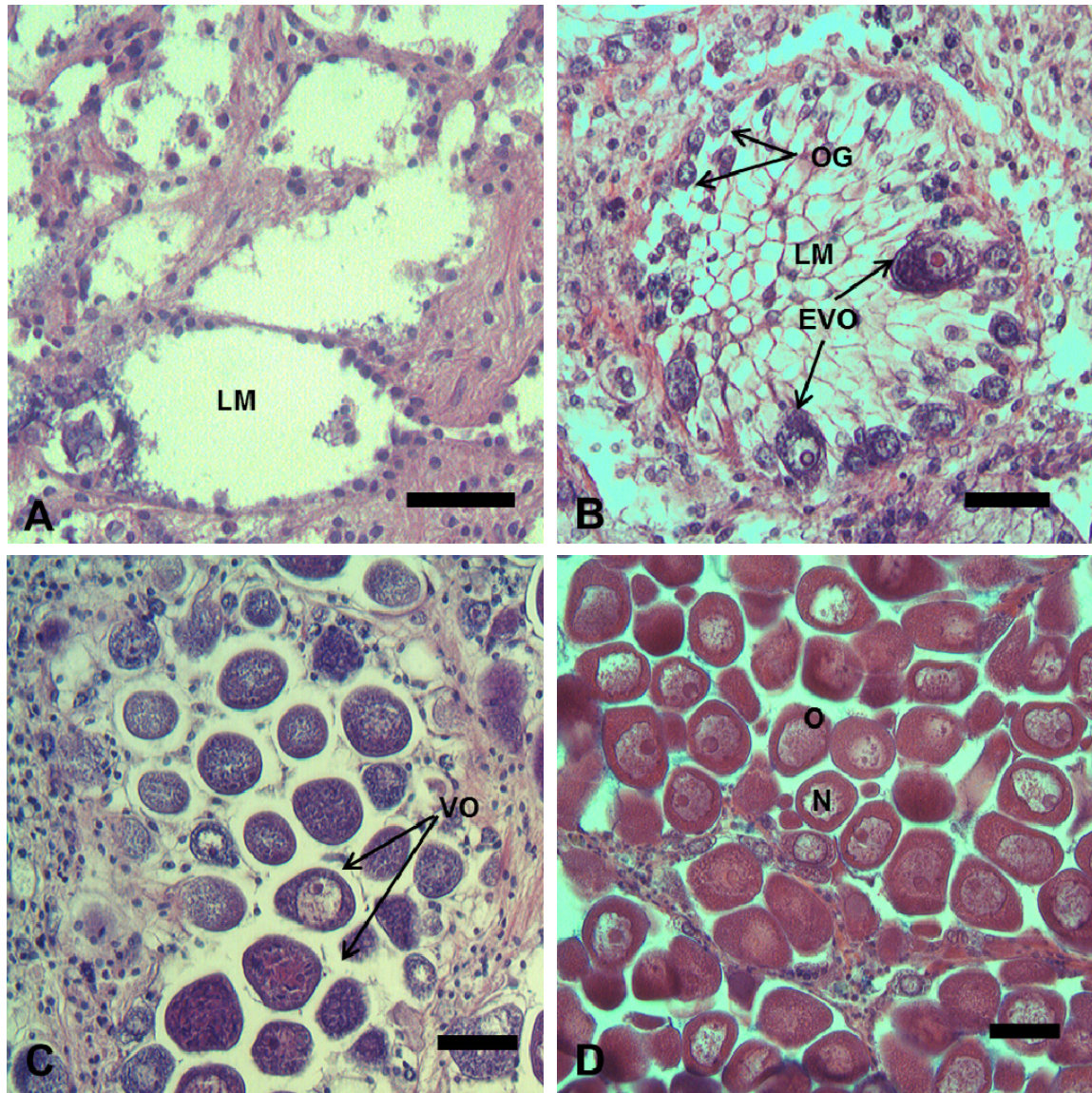


Fig. 5. Photomicrographs of ovaries. **A**, resting stage: lumen (LM); **B**, early development stage: ovary containing small oogonia (OG), early vitellogenic oocytes (EVO); **C**, late development stage: vitellogenic oocytes (VO); **D**, mature stage: ripe oocytes (O), nuclear (N). Scale bars = 50 μ m

조직학적 관찰을 이용한 바지락의 생식소발달은 시간이 지남에 따라 암컷과 수컷의 변화양상이 뚜렷하게 나타났다 (Fig 7). 실험 시작 당시 모든 암컷, 수컷 바지락은 초기 발달 단계 (100%) 을 보였다. 현장수온 11°C에서 Conditioning 적정 수온인 20°C에 도달한 실험시작 12일 후 바지락의 암컷 과 수컷에서 후기 발달 단계 (22.2%) 가 관찰되었다. 20°C에 수온이 다다른 이후 실험 종료 시까지 수온은 20.5 ± 0.9°C로 유지 되었다.

100%의 후기발달 단계가 관찰 시점은 실험 시작 후 37일

후였으며, 산란에 가입할 수 있는 완숙기 단계는 42일에 암컷 23.1%, 수컷 28.6%가 관찰되었다. 실험 종료 시 산란에 가입할 수 있는 완숙 단계의 바지락은 암컷 36.4%, 수컷은 50%로 관찰되었으며 수컷이 암컷보다 13.6%정도 많이 성 성숙이 유도되었다.

고 찰

1. 사육시설 및 수질관리

Helm and Bourne (2004) 에 의하면 바지락의 생식소 발

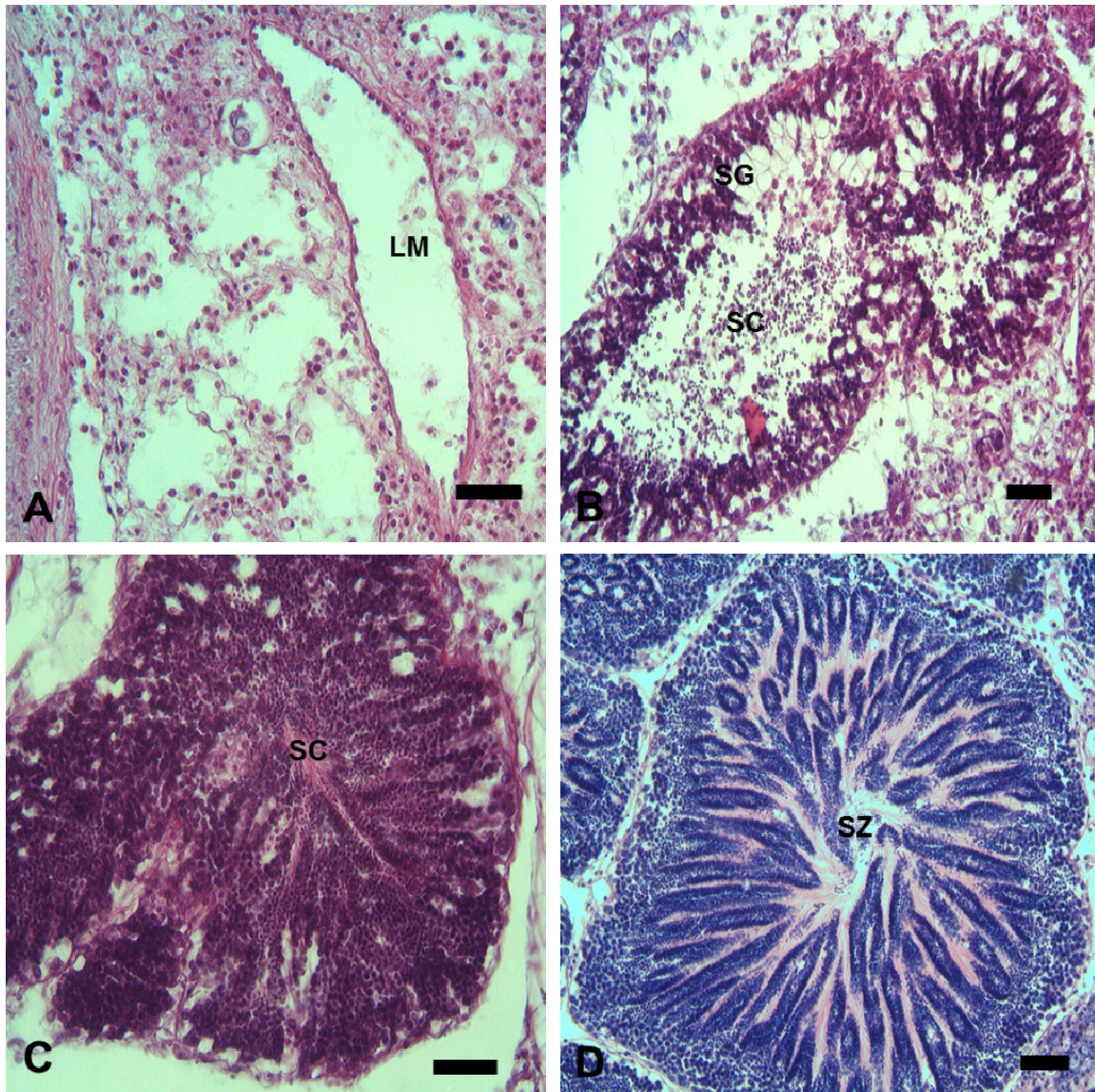


Fig. 6. Photomicrographs of testes. **A**, resting stage; lumen (LM); **B**, early development stage: testis containing spermatogonia (SG) and spermatocytes (SC); **C**, late development stage; **D**, mature stage: mature testes filled with activated spermatozoa (SZ). bars = 50 µm

달을 가속화시키기 위해서는 수온을 한번에 높이기보다는 서서히 증가시키는 것이 효과적임을 보고하였고, Conditioning에 있어 가장 적절한 수온의 범위는 22-24°C, 염분의 범위는 25-34 PSU임을 보고한바 있다. 실험 초기 수온은 11°C로 채집 당시 수온과 동일시하기 위해 설정하였으며, 이후 1°C/day 상승시켰다. 이번 연구 기간 동안 수온의 범위는 20.6 ± 2.9°C였고 염분은 29.4 ± 1.8 psu로 측정되어 Helm and Bourne (2004) 보고하였던 생리적 요인을 충족시킨 것으로 사료된다. Shin *et al.* (2001) 는 바지락의 용존 산소 반수치

사농도 (Lethal concentration for 50%, LC₅₀) 에 관한 연구에서 바지락의 용존 산소 LC₅₀은 2.5 mg/ L로 보고한 바 있다. 또한, Isla Molleda (2007) 는 순환시스템 상의 용존 산소 범위는 5.0-7.0 mg/ L, 총 암모니아 범위는 3.0 mg/ L이하, 아질산의 범위는 1.0 mg/ L 이하로 보고한바 있는데, 이번 실험기간 동안 용존 산소는 평균 7.6 ± 0.7 mg/L, 총 암모니아는 평균 1.7 ± 1.5 mg/ L, 아질산은 평균 0.6 ± 0.3 mg/ L, pH는 평균 8.0 ± 0.2로 측정된 결과로 미루어 보아 실험기간 동안 공급된 해수는 바지락의 사육수로서 적합하였던

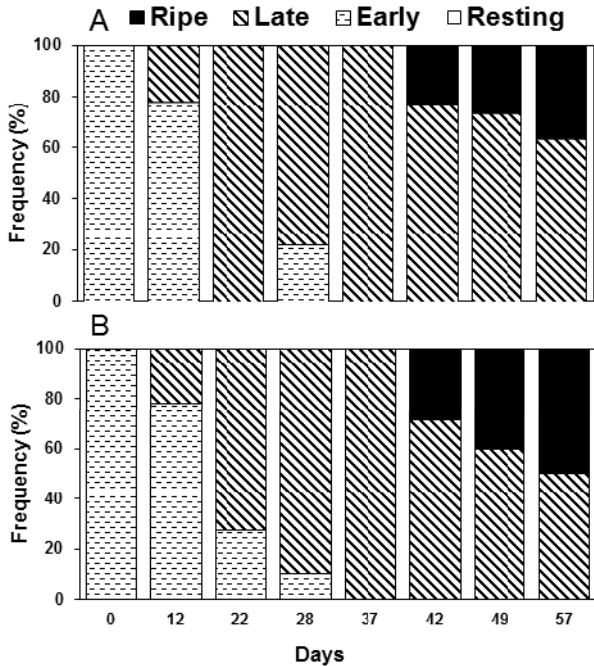


Fig. 7. Frequency distribution of reproductive stage (A), Female (B) Male.

것으로 사료된다.

2. 생식소 발달 단계의 변화

이매패류의 생식소 발달은 수온과 먹이 조건에 따라 변화한다 (Park and Choi 2004; Marina and Alejandro 2007; Yang *et al* 2010). 이번 실험기간 동안 산란에 가입할 수 있는 완숙기 단계로 유도된 바지락은 암컷 36.4%, 수컷 50%로 관찰되었다. Mzighani (2005) 는 탄자니아 Dares Salaam 해변에 서식하고 있는 *Anadara antiquata* 집단을 매월 채집하여 집단의 크기에 따른 Fecundity 및 성 성숙시기에 관한 연구를 실시하였는데, 완숙기에 들어간 수컷의 패각 길이는 31 mm인 반면에 암컷은 35 mm였다. 저자는 이처럼 수컷이 먼저 성적으로 성숙하는 이유로 암컷이 산란하는 많은 양의 난이 수정할 수 있어야하기 때문에 아마도 수컷이 성적으로 먼저 성숙하는 것으로 사료되어짐을 보고하였다. 이번 연구 결과 역시 수컷이 암컷에 비해 최종적으로 13.6% 더 많은 개체가 완숙기 단계로 성 성숙이 유도되었는데, 일반적으로 자웅이체 이매패류의 산란의 시작은 변함없이 수컷의 방정에서부터 시작되는데, 이러한 원인은 정자의 수명이 난자의 수명보다 빠르며, 수정을 하는데 있어 경쟁을 해야 하기 때문으로 남자보다 먼저 성숙하고, 먼저 산란하는 것으로 사료된다 (Helm and Bourne 2004).

Chung *et al* (2002) 는 곰소만에서 채집된 바지락을 80일 간 6종의 플랑크톤 (*Isochrysis galbana* 10%, *Chaetoceros gracilis* 10%, *Chlorella ellipsoidea* 10%, *Nanochloris oculata* 10%, *Tetraselis tetrathele* 30%, *Nitzschia sp* 30%) 먹이를 사육조에 300,000 cells/ml이 되도록 계속 공급하여, 수온에 따른 생식소 발달 변화에 대한 연구를 실시하였다. 실험결과 22°C에 사육된 바지락에서는 30일 후 후기 발달 단계의 바지락이 관찰되었고, 50일부터 완숙한 개체가 출현하여 60일 후에는 70%가 완숙기 단계였으며, 30%는 부분 산란기 가입하였다. 위의 연구 결과와 비교하였을 때 이번 연구에서는 완숙기 단계로 30%가 낮게 유도되었는데, 이러한 결과는 사육 수온 및 실험에 먹이생물로 사용되었던 먹이생물에 기인한 것으로 사료된다. 이 연구에서는 수온을 11°C 에서 20°C 로 상승 시킨 후 같은 온도 조건 하에서 conditioning 하였다. 이에 따라 이 연구에서는 Chung *et al.* (2002) 의 실험과 같이 산란 임계온도인 22°C 이상 수온을 상승시키지 않아, 성 성숙도가 낮은 것으로 사료된다. 또한 성 성숙에 있어 먹이는 수온과 같이 매우 중요한 환경요인이나, 이 연구에서는 상업적으로 생산된 먹이를 제공하여 Chung *et al.* (2002) 의 연구와 비교 시, 상대적으로 낮은 완숙율이 관찰된 것으로 사료된다.

Frias and Segovia (2010) 는 참굴의 Conditioning을 목적으로 인스턴트 algae *Tetraselmis* 3600 (Reed Mariculture Store) 와 *Isochrysis* 1800 (Reed Mariculture Store) 을 혼합한 Mixture를 참굴 건 중량에 대한 2% 무게로 72일간 공급하여 16-24°C, 20°C, 24°C 수온에서 나타나는 성 성숙변화를 조직학적 방법을 이용하여 관찰하였다. 60일 후 16-24°C 집단에서는 48.4%의 완숙한 개체가 관찰되었으며, 24°C 집단은 약 40%, 20°C 집단에서는 20% 미만으로 관찰되었다. Buchanan *et al* (1998) 은 8주간 순환 여과시스템에서 Live한 algal paste를 공급하여 *Crassostrea virginica*를 사육하였다. 수온은 일주일간 15°C에 순응시켰으며, 이후 2일 마다 2°C 씩 상승시켜 최종 25°C에 사육하였다. 실험 결과, 실험시작 7일 후 대부분의 대서양 굴은 휴지기 또는 초기 발달단계였고, 실험 종료시점인 8주후 80%의 대서양 굴에서 완숙기 단계로 성 성숙이 일어났다. 이번 실험결과 역시 60일동안 20.5 ± 1°C 의 온도 범위를 보였는데, 바지락에 있어 적정 Conditioning 온도는 20.5°C 보다는 높게 설정되어야 할 것으로 판단된다. 또한 먹이 역시 상업적인 인스턴트 Algae보다는 살아있는 식물플랑크톤을 배양하여 먹이는 것이 좋을 것으로 판단된다.

결과적으로 순환여과시스템을 이용하여 성적으로 초기발달 단계에 있던 바지락을 8주간 20.5 ± 1°C에서 인스턴트 algae를 건 중량의 4%를 공급하여 Conditioning을 시킨 결과 최종 40%의 바지락이 성 성숙을 하여, 순환여과시스템 상에서도 성

성숙을 유도 할 수 있다는 것이 입증되었다.

사 사

이 논문은 2014년 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 수행되었음.

REFERENCES

- Allam B, Paillard C, Ford SE. (2002) Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Diseases of Aquatic organisms*, **48**: 221-231.
- Buchanan, J.T., Roppolo, G.S., Supan, J.E., Tiersch, T.R. (1998) Conditioning of Eastern oyster in a closed, recirculating system. *Journal of shellfish research*, **17**(4): 1183-1189.
- Chung E.Y., Lee J.S., Lee C.H., Hur S.B. (2002) Reproductive cycle of natural population and artificial control of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* by the conditions of water temperature-feeding and starvation. *Korean journal of malacology*, **18**(2): 83-91. [in Korean with English abstract]
- Drummond L, Mulcahy M, Culloty S. (2006) The reproductive biology of Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture*, **254**: 326-340.
- Frias R and Segovia M. (2010) Gonad development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in a recirculating system: First step toward the development of conditioning and maturation protocols. *Journal of shellfish research*, **29**(2): 303-308.
- Helm M.M. and Bourne N. (2004) Hatchery operation: Broodstock conditioning, spawning, and fertilization. In: A. Lovatelli, editor. Hatchery culture of bivalve: A practical manual, FAO fisheries technical paper. pp. 1-471, Rome, Italy.
- Hur Y.B., Min K.S., Kim T.E., Lee S.J., Hur S.B. (2008) Larvae growth and biochemical composition change of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, larvae during artificial seed production. *Journal of the Korean Aquaculture Society*, **21**(4): 203-212. [in Korean with English abstract]
- Isla Molleda, M. (2007) Water quality in recirculating aquaculture system for Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) culture. pp. 1-54, The United Nations University, Iceland.
- Keino H, Sugiyama I, Nishizawa T, Suzuki T. (2005) The study of relationship between burrowing behavior and energy consuming process of Japanese littleneck clam (*Ruditapes philippinarum*) at the stormy conditions in winter. *Fisheries engineering*, **42**(1): 1-7. [in Japanese with English abstract]
- KOSIS. (2003) Statistic Database for Reclamation Extent. Retrieved from <http://kosis.kr/wnsearch/totalSearch.jsp>
- Lee Y.H., Chang Y.J., Lim H.K., Chung G.S. (1996) Comparison of growth and survival rate in Shortnecked clams, *Ruditapes philippinarum* from different seeding production areas. *Journal of aquaculture*, **9**(3): 223-232. [in Korean with English abstract]
- Marina D and Alejandro P.C. (2007) Influence of temperature on gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) with special reference to ingested food and energy balance. *Aquaculture*, **264**: 398-407.
- Mzighani S. (2005) Fecundity and population structure of cockles, *Anadara antoquata* L. 1758 (Bivalvia: Arcidae) from a sandy/muddy beach near Dares Salaam, Tanzania. *Western indian ocean journal of marine science*, **4**(1): 77-84.
- Ngo T.T.T., Berthe F.C., Berthe, Choi K.S. (2003) Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **56**(3): 259-267.
- Ojea J, Pazos A.J., Martinez D, Novoa S, Garcia-martinez P, Sanchez J.L., Abad M. (2008) Effects of temperature regime on broodstock conditioning of *Ruditapes decussates*. *Journal of shellfish research*, **27**(5): 1093-1100.
- Prado S, Romalde J.L., Barja J. (2010) Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary microbiology*, **145**: 187-197.
- Park K.I. and Choi K.S. (2001) Spatial distribution and infection intensity of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Aquaculture*, **203**: 9-22.
- Park K.I. and Choi K.S. (2004) Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) I. Quantifying eggs. *Aquaculture*, **241**: 667-687.
- Park K.I., Figueras A., Choi K.S. (2006) Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalve): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture*, **251**: 182-191.
- Park K.I., Yang H.S., Kang D.H., Choi K.S. (2010) Density dependent growth and mortality of Manila clam *Ruditapes philippinarum* reared in cages in Gomso-bay, Korea. *Korean journal of malacology*, **26**(1): 91-95. [in Korean with English abstract]
- Shi Y.K., Kim Y, Chung E.Y., Hur S.B. (2001) Effect of the dissolved oxygen concentration on the physiology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Bulletin of the Korean fisheries society*, **34**(3): 190-193.
- Tun K.L., Shimizu Y.S., Yamanoi H, Yoshinaga T, Ogawa K. (2008) Seasonality in the infection and invasion of *Marteilioides chungmuensis* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of aquatic organisms*, **80**(2): 157-165.

Experimental induction of gametogenesis of Manila clam

- Uddin, M.J., Yang, H.S., Choi, K.S., Kim, H.J., Hong, J.S., Cho, M. (2010) Seasonal changes in *Perkinsus olseni* infection and gametogenesis in Seonjaedo Island in Incheon, off the west coast of Korea. *Journal of the world aquaculture society*, **41**(S1), 93-101.
- Yan X, Zhang G, Yang F. (2006) Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philinarum* larvae. *Aquaculture*, **253**: 350-358.
- Yang H.S., Park K.J., Choi K.S. (2010) Pathologic survey on the Manila clam *Ruditapes philinarum* (Adams and Reeve 1850) from Haeju off the western coastal Yellow sea. *Ocean science journal*, **45**(2): 93-100.