

PCR 기법을 이용한 2009년 우리나라 서해안과 남해안 바지락, *Ruditapes philippinarum*의 *Perkinsus olseni* 감염에 관한 보고

이남실 · 황지연[†] · 최동림 · 박명애

국립수산과학원 병리연구과

Survey of *Perkinsus olseni* infection in Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in 2009 on the west and south coast of Korea using PCR technique

Nam-Sil Lee, Jee-Youn Hwang[†], Dong Lim Choi and Myoung Ae Park

Division of Pathology, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea

Prevalence of a protozoan parasite *Perkinsus olseni* in Manila clam *Ruditapes philippinarum* was surveyed from July to December 2009 on the west and south coast of Korea. *P. olseni* infection was diagnosed using two primer sets, *P.olseni* NTS Forward/*P.olseni* NTS Reverse set and *PolsITS-140F*/*PolsITS-600R* set in polymerase chain reaction(PCR).

The results using *PolsITS-140F* and *PolsITS-600R* primer set was retained up to 60% at all stations from July to December, except for Padori. Especially, Goheung showed 100% prevalence from October to December. The results about comparison of the 4 station's DNA sequences which were analyzed from PCR products(457bp) using *PolsITS-140F* and *PolsITS-600R* primer set, there were only 2base differences at Sunjedo.

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

패류의 다양한 질병은 상업적 이유로 많이 연구되어지고 있으며, 그 중에서도 퍼킨수스 감염증은 아시아 수역의 해산 이매패류에서 흥미로운 연구대상이 되고 있다(Choi, 2005; Choi and Park, 2010). 퍼킨수스 감염증(*Perkinsosis*)은 굴, 바지락, 전복을 포함한 다양한 패류에서 *Perkinsus sp.*의 감염으로 나타나는 유행성질병이다. Mackin *et al.*(1950)에 의해 *Perkinsus marinus*가 첫 보고된 이래, *P. olseni*(Lester and Davis, 1981)를 비롯하여 *P. atlanticus*(Azevedo, 1989), *P.*

qugwadi(Blackbourn *et al.*, 1998), *P. andrewsi*(Coss *et al.*, 2001), *P. chesapeakei*(McLaughlin *et al.*, 2000), *P. mediterraneus*(Casas *et al.*, 2004)와 같은 종이 보고되었고, 최근에는 *P. honshuensis*와 *P. beihaensis* 2종의 신종이 아시아 지역에서 발견되어 보고된 바 있다(Dungan and Reece, 2006; Moss *et al.*, 2008).

*P. olseni*는 *P. marinus* 와 함께 국제수역사무국(OIE)에서 수산동물질병 관리대상(Aquatic animal health code)으로 지정하고 있는 항목으로 바지락 및 그 외의 이매패류와 복족류; *Tapes decussatus*, *Tapes philippinarum*, *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Tridacna maxima*, *Tridacna crocea*, *Pitar*

[†]Corresponding Author : Jee-Youn Hwang, Tel : 051-720-2494,
Fax : 051-720-2498, E-mail :
jyhwang@nfrdi.go.kr

rostrata, *Crassostrea gigas*, *C. ariakensis*, *C. sikamea*, *Pinctada margaritifera*, *P. martensii*, *Haliotis rubra*, *H. laevigata*, *H. scalaris*, *H. cyclobates* 등을 대상으로 하는 넓은 숙주역을 가지고 있으며, 우리나라를 비롯하여 호주, 일본, 포르투갈, 우루과이 등의 태평양 지역에서의 발병이 보고되고 있다(Park and Choi, 2001; Goggin *et al.*, 1995; Hamaguchi *et al.*, 1998; Azevedo, 1989; Cremonete *et al.*, 2005). 특히 *P. atlanticus*의 경우 *P. olsenii*와 유전적으로 매우 유사한 것으로 보고되고 있어(Murrell *et al.*, 2002), 최근에는 두 종을 동일종으로 나타내고 있다(Park *et al.*, 2006).

Perkinsosis를 진단하는 데는 다양한 방법이 사용되고 있는데, Ray's Fluid Thioglycollate Medium(RFTM) 배양 분석법, 조직학적 방법, PCR 분석법, Perkinsus-specific antibody에 대한 Immuno Probe 사용법 등의 다양한 방법이 이용되고 있다. 이 들 방법 중 감염여부 검사에 대한 신속한 방법으로 PCR 분석법이 매일 실시하는 모니터링에 편리하게 사용할 수 있는 방법이다. PCR 검사에 있어서는 *Perkinsus* genus specific 과 *P. olsenii* species specific 한 방법을 구분하여 검사에 정밀성을 높이고 있다(OIE, 2009).

이에 본 논문에서는 지금까지 *Perkinsus* 감염에

대한 모니터링에 사용하던 primer set (Robledo *et al.*, 2000)을 사용한 분석결과와 OIE(2009)에서 새롭게 지정하고 있는 *Perkinsus olsenii* specific primer set (Moss, 2007)을 사용한 PCR 검사결과와의 차이를 확인하고 비교함과 동시에 2009년 7월부터 12월까지의 *Perkinsus olsenii* 검출율과 유전적 분석에 대한 결과를 함께 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료채취 와 deoxyribonucleic acid(DNA) 추출
2009년 6월부터 12월까지 매 월 남해안의 고흥, 나로도와 서해안의 선재도, 파도리의 네 지점(Fig.1)에서 시료를 채취하였다. 단, 나로도에서는 8월과 10월에, 파도리에서는 10월에 시료채집이 이루어지지 않았다. 매 달 채취된 바지락울 30개체씩 개체별로 nucleic acid 추출을 위해 아가미와 외투막 부분을 microtube(약 0.1g/microtube)에 취하였다. DNA는 High Pure PCR Template preparation Kit(Roche, Germany)를 사용하였으며 동사의 제시 방법에 따라 추출하였다. 추출한 DNA는 냉동보관(-20°C)하였다가 분석에 사용하였다.

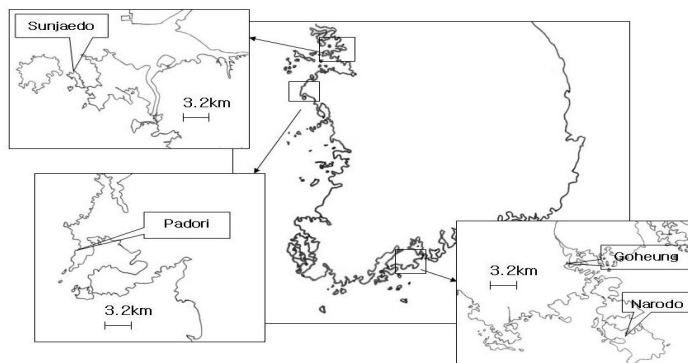


Fig. 1. Location of the 4 sampling site.

Polymerase chain reaction(PCR)분석

분리된 DNA를 대상으로 매달 개체별로 증폭산물 690bp로 확인되는 *P. olseni* NTS Forward (5'-ATG CTA TGG TTG GTT GCG GAC C-3')와 *P. olseni* NTS Reverse (5'-GTA GCA AGC CGT AGA ACA GC-3')(Robledo *et al.*2000) set와, 증폭산물 457bp로 확인되는 PalsITS-140F primer(5'-GAC CGC CTT AAC GGG CCG TGT T-3')와 PalsITS-600R primer(5'-GGR CTT GCG AGC ATC CAA AG-3')(Moss,2007) set의 2종류를 사용하여 PCR을 실시, 분석하였다. PCR에는 Premix(Bioneer, Korea)를 사용하였으며 전자의 경우는 94°C, 5분의 변성(denature)과정을 거친 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30cycles 반복 하고, 72°C에서 7분의 최종 연장 단계(elongation)를 거친 후 4°C에서 냉각시켰다. 후자의 경우는 95°C에서 4분 변성을 거친 후, 95°C에서 1분, 62°C에서 1분, 62°C에서 3분으로 40 cycles 을 실시하였으며, 65°C에서 10분간 최종 연장 단계를 거쳐 4°C에서 냉각을 실시하였다. PCR 산물의 확인은 1% agarose gel(EtBr 함유)에 흘린 후 자외선(UV)등으로 조사하여 에티뉼브로마이드(EtBr)의 발광 형태로 확인하였다.

염기서열 분석

PalsITS-140F와 PalsITS-600R의 primer set을 이용하여 실시한 PCR을 통해 얻어진 네 지점의 457bp 크기의 bands를 각각 gel 상에서 잘라내어 Gel, PCR, Cleanup SV kit(GeneAll, Korea)를 사용하여 DNA

purification을 실시한 후 얻어진 DNA를 cloning kit(T-blunt PCR Cloning Kit, SolGent, Korea)를 이용하여 대장균 클론개체를 얻었다. 얻어진 대장균을 LB 배지에 배양하여 Plasmid를 얻어내고(AccuPrep Plasmid Mini Extraction kit, Bioneer, Korea), 이 plasmid를 전문업체((주)솔젠트)에 의뢰하여 염기서열 분석 데이터를 얻었다. 얻어진 데이터는 분석 소프트웨어 (Genetix)를 이용하여 염기서열 비교를 실시하였다.

결 과

2009년도 7월부터 12월의 우리나라 서해와 남해의 네 지점의 바지락 채굴지에서 채취한 바지락에 대한 *P.olseni*의 검출율은, 690bp 결과를 통한 결과가 고흥지역에서 가장 높았으나 457bp의 결과는 고흥과 선재도에서 유사하게 86.4~100%의 검출율로 확인되었으며, 나로도가 690bp의 결과에서 11월에 10%로 검출된 것이 457bp로 확인했을 때는 70%로 나타나 두 가지의 프라이머 sets 사용으로 검출율에 차이가 나타남을 확인하였다. 전체적인 경향으로는 파도리에서 검출율이 가장 낮았다. 특히 457bp의 결과에서는 파도리의 7, 8, 12월을 제외한 네 지점의 검사기간 전체 결과에서 60%를 넘는 검출율을 나타내어 지속적인 감염상태를 확인할 수 있었다(Table 1, Fig.2). 네 지점에서 의 PalsITS-140F와 PalsITS-600R을 사용한 PCR 증폭산물의 염기서열을 비교한 결과, 선재도의 결과에서 두 군데의 염기차이를 나타내는 것 이외에는 모두 같은 것으로 확인되었다(Fig.3).

Table 1. Results of prevalence from July to December 2009 at the 4 sampling sites.

	Narodo		Goheung		Sunjeddo		Padori	
	690bp	457bp	690bp	457bp	690bp	457bp	690bp	457bp
July	73(22/30)	96.7(29/30)	80(24/30)	96.7(29/30)	59(13/22)	86.4(19/22)	33(10/30)	53.3(16/30)
August	-	-	80(24/30)	93.3(28/30)	30(9/30)	93.3(28/30)	13(4/30)	56.7(17/30)
September	13(4/30)	93.3(28/30)	60(18/30)	93.3(28/30)	73(22/30)	100(30/30)	3(1/30)	86.7(26/30)
October	-	-	57(17/30)	100(30/30)	63(19/30)	93.3(28/30)	-	-
November	10(3/30)	70(21/30)	87(26/30)	100(30/30)	63(19/30)	100(30/30)	27(8/30)	86.7(26/30)
December	37(11/30)	100(30/30)	53(16/30)	100(30/30)	47(14/30)	96.7(29/30)	0(0/30)	40(12/30)

data : % (positive reaction sample number/total sample number)

- : No samples.

Bolic type : Peak value

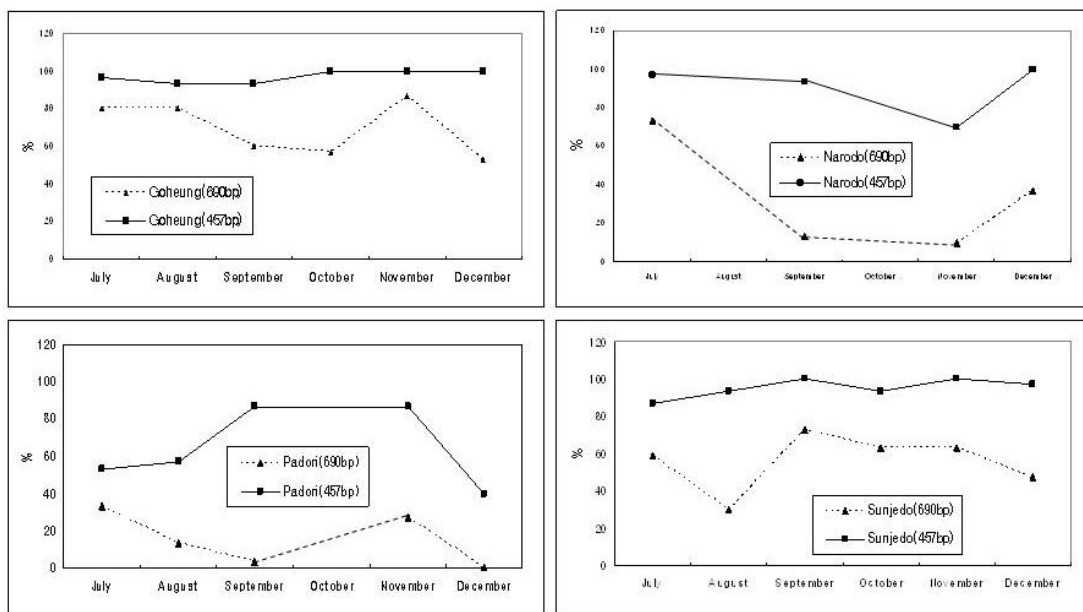


Fig. 2. Monthly detection rates of *P. olseni* using PCR method with different 2 primer sets from July to December 2009.

```

Goheung-ITS.gnu      1: GACCGCCTTAACGGCCGTGTTAGGTGATTATCTCCTA TGAACCATGTACTAGTCACAGTATCCAAATCCTTTTGGATT 80
NArodo-ITS.gnu      1: GACCGCCTTAACGGCCGTGTTAGGTGATTATCTCCTA TGAACCATGTACTAGTCACAGTATCCAAATCCTTTTGGATT 80
Padori-ITS.gnu      1: GACCGCCTTAACGGCCGTGTTAGGTGATTATCTCCTA TGAACCATGTACTAGTCACAGTATCCAAATCCTTTTGGATT 80
Sunjaedo-ITS.gnu    1: GACCGCCTTAACGGCCGTGTTAGGTGATTATCTCCTA TGAACCATGTACTAGTCACAGTATCCAAATCCTTTTGGATT 80
*****

Goheung-ITS.gnu      81: TTGGTATTTCAAAACGAAATCCAAACTCTCAACGATGGATGCC TCGGCTCGAGAA TCGATGAAAGGACGCAGCSAAGTGC 160
NArodo-ITS.gnu      81: TTGGTATTTCAAAACGAAATCCAAACTCTCAACGATGGATGCC TCGGCTCGAGAA TCGATGAAAGGACGCAGCSAAGTGC 160
Padori-ITS.gnu      81: TTGGTATTTCAAAACGAAATCCAAACTCTCAACGATGGATGCC TCGGCTCGAGAA TCGATGAAAGGACGCAGCSAAGTGC 160
Sunjaedo-ITS.gnu    81: TTGGTATTTCAAAACGAAATCCAAACTCTCAACGATGGATGCC TCGGCTCGAGAA TCGATGAAAGGACGCAGCSAAGTGC 160
*****

Goheung-ITS.gnu      161: GATAAGCACTGCGATTTCAGAAATCCGTAACCAAGTAGAAA TCCAACGCATACTGCACAAAGGGGATCCTTCCTCTTT 240
NArodo-ITS.gnu      161: GATAAGCACTGCGATTTCAGAAATCCGTAACCAAGTAGAAA TCCAACGCATACTGCACAAAGGGGATCCTTCCTCTTT 240
Padori-ITS.gnu      161: GATAAGCACTGCGATTTCAGAAATCCGTAACCAAGTAGAAA TCCAACGCATACTGCACAAAGGGGATCCTTCCTCTTT 240
Sunjaedo-ITS.gnu    161: GATAAGCACTGCGATTTCAGAAATCCGTAACCAAGTAGAAA TCCAACGCATACTGCACAAAGGGGATCCTTCCTCTTT 240
*****

Goheung-ITS.gnu      241: GTACATACATATCAGTGTGCTCTCTTCCGATACAAACATTTGTTGT TAACGCAACTCAGTGC TTGTA TCCCGCTT 320
NArodo-ITS.gnu      241: GTACATACATATCAGTGTGCTCTCTTCCGATACAAACATTTGTTGT TAACGCAACTCAGTGC TTGTA TCCCGCTT 320
Padori-ITS.gnu      241: GTACATACATATCAGTGTGCTCTCTTCCGATACAAACATTTGTTGT TAACGCAACTCAGTGC TTGTA TCCCGCTT 320
Sunjaedo-ITS.gnu    241: GTACATACATATCAGTGTGCTCTCTTCCGATACAAACATTTGTTGT TAACGCAACTCAATGCT TTGTA TCCCACTT 320
*****

Goheung-ITS.gnu      321: GGACTAACTCTTCGAGATAAGTTCGTATA GTGCGCTTGTAAGGCAAGCGTATTAATTGCAAGGCTATAATCTCGTATT 400
NArodo-ITS.gnu      321: GGACTAACTCTTCGAGATAAGTTCGTATA GTGCGCTTGTAAGGCAAGCGTATTAATTGCAAGGCTATAATCTCGTATT 400
Padori-ITS.gnu      321: GGACTAACTCTTCGAGATAAGTTCGTATA GTGCGCTTGTAAGGCAAGCGTATTAATTGCAAGGCTATAATCTCGTATT 400
Sunjaedo-ITS.gnu    321: GGACTAACTCTTCGAGATAAGTTCGTATA GTGCGCTTGTAAGGCAAGCGTATTAATTGCAAGGCTATAATCTCGTATT 400
*****

Goheung-ITS.gnu      401: GTAGCCCTCCGAGAGGAGGACCGCCGTGAGTGTCTTTGGATGCTCGCAAGCCC 457
NArodo-ITS.gnu      401: GTAGCCCTCCGAGAGGAGGACCGCCGTGAGTGTCTTTGGATGCTCGCAAGCCC 457
Padori-ITS.gnu      401: GTAGCCCTCCGAGAGGAGGACCGCCGTGAGTGTCTTTGGATGCTCGCAAGCCC 457
Sunjaedo-ITS.gnu    401: GTAGCCCTCCGAGAGGAGGACCGCCGTGAGTGTCTTTGGATGCTCGCAAGCCC 457
*****
    
```

Fig. 3. Results of DNA sequences about 457bp of *P. olseni* ITS region using PolITS-140F/PolITS-600R primer set at 4 stations.

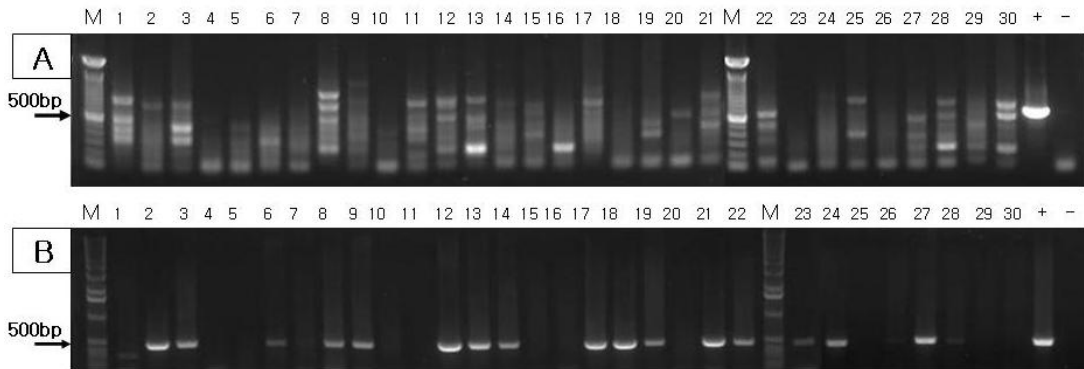


Fig. 4. A comparison of gel loading images between 690bp(A) and 457bp(B) PCR products of Padori samples in July. (M; marker, number(1~30); sample numbers, +; positive control, -; no sample negative control)

고찰

일반적으로 *P. olsenii*의 발병은 15°C 이상으로 수온이 올라가는 봄부터 발생하여 수온이 10°C 이하로 내려가는 겨울은 발병률이 감소하며(Villalba *et al.*, 2005), 염도와 관련성도 아직 명확하지 않으나 실험적으로 25psu(practical salinity units)까지가 상한으로 나타나며 15psu 아래에서도 저항성을 나타내는 것으로 보고하고 있다(La Peyre M *et al.*, 2006). Burreson & Calvo(1996)도 여름철 높은 수온과 염도가 *Perkinsus*의 증식, 숙주의 방어능과 생리활성에 영향을 주어 높은 유병율과 감염도를 가져오는 것으로 보고하였다. 본 조사에서는 퍼킨스증의 발병 정도와 감염도와의 상관없이 PCR 검사를 통한 검출율을 조사하였으며, 그 결과는 7월부터 소폭 증가하기 시작하여 12월까지 계속적으로 높게 유지되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 Park *et al.*(2006)이나 Uddin *et al.*(2010)에서 보고하고 있는 여름보다 가을에 감염도가 높게 나타난다는 내용과 일치하며, 여기에는 여름 장마 후 염분농도의 하강과 산란 후 스트레스의 영향이 있었을 것으로 설명하고 있다. 또한, 서해의 두 지점과 남해의 두 지점을 각각 비교했을 때, 파도리 보다는 선재도가, 나로도보다는 고흥에서 검출율이 높았으며, 네 지점 중에서는 파도리의 검출율이 가장 낮았다(Table 1, Fig. 2). 이러한 결과는 내만 안쪽보다는 외해를 접하는 쪽이 낮은 검출율을 나타내어, 내만과 외만의 환경해수의 차이가 감염율에도 영향을 줄 것으로 추정된다. 퍼킨스증은 병적 증상을 나타내지 않고 숙주 내에 장기간 잠복되어 있다가 환경에 따라 발병하는 경우가 많은 것으로 설명하고 있다(OIE, 2009). 본 결과에서도 나타나는 것처럼 항시 내재하는 *Perkinsus*가 환경조건에 따라 발병상황이 달라질 수 있으므로 계속적으로 환경조건과 검출율의 모니터링이 진행되어야 할 것이다.

조사에 사용된 690bp의 산물을 생산하는 primer

set의 경우 *P. olsenii*의 NTS(nontranscribed spacer) region을 대상으로 디자인 된 것으로, NTS region은 ITS(internal transcribed spacer) region 과 비교하여 *Perkinsus* sp. 내에서의 종특이성을 나타내는 경향이 높은 것으로 보고하고 있다(Marsh *et al.*, 1995, Robledo *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2005). 그러나 새로이 국제수역사무국(OIE)에서는 NTS region 내의 다양성에 관한 정보가 부족하여 결과의 정확성이 떨어질 우려가 있어 개정한 *P. olsenii*에 대한 종특이적인 Primer set은 NTS region 보다 유전적 정보가 잘 알려진 ITS region을 대상으로 만들어졌고 감도가 높은 것으로 설명하고 있다(OIE, 2009). 본 연구 결과에서도 높은 감도를 확인 할 수 있었으며 EtBr로 감작시킨 gel 상의 사진도 690bp의 분석결과보다 457bp의 분석 결과에서 밴드가 명확하게 나타났다(Fig.4). 두 결과의 검출감도에서는 명확한 차이를 나타내었지만 검출 경향은 네 지점에서 유사한 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

실제 *Perkinsus* 모니터링에서 중요한 것은 검출여부보다 실제 감염정도, 즉 *Perkinsus* cell/개체, 또는 *Perkinsus* cells/g tissue 등을 분석하거나 그렇지 못할 경우 RFTM 결과를 Mackin의 Scale 에 따라 semi-quantitative 하게 정량을 하기도 한다. 그러나 매달 모니터링을 실시하면서 개체별로 감염Cell 수를 세거나, 배양과정을 거치는 것은 시간적인 소모가 많아 현실적으로 활용하기는 어려운 실정이다. 본 모니터링에서는 정량적인 분석부분을 도입하지는 못하였지만 감염여부의 확인은 바지락 조직에서 직접 추출한 DNA를 대상으로 P_{olsITS-140F}와 P_{olsITS-600R}로 실시한 PCR 결과로 확인 가능하였다. 그러나 기생체 감염의 모니터링에서 정량적인 부분을 무시할 수 없으므로, 이후 분석방법에서 realtime-PCR 법과 같은 방법을 병행할 수 있는 primer set을 제작하여 분석한다면 신속한 정량분석의 결과를 얻는데 도움이 될

것으로 사료된다.

PolsITS-140F와 PolsITS-600R로 실시한 PCR 결과로 생성된 457bp의 네 지점에서의 염기서열을 비교한 결과 선재도에서 두 군데의 염기차이가 나타난 것 이외에는 동일하게 나타나 이 부분의 유전적 차이는 확인되지 않았다. Choi(2005)에 따르면 형태학적으로나 유전적으로 우리나라 바지락에서 나타나는 *Perkinsus* 종은 Norén et al.(1999)의 분류에 따른 *P. olseni*로 설명하고 있다. 국내에서 검출되는 *P. olseni* 사이의 유전적 다양성에 대한 설명은 아직 미비하다. PCR의 감도가 높은 부위와 유전적 변형이 많은 부위는 다를 수 있으므로 유전적 차이에 대한 분석은 이후 따로 행해져야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 내용은 2009년 하반기, 우리나라 남해안(고흥, 나로도)과 서해안(선재도, 파도리)의 네 지점에서 시료채취 한 바지락에서의 *Perkinsus olseni* 감염에 대한 모니터링 결과로, 이전에 국제수역사무국(OIE)의 manual에서 지정하던 *P. olseni*에 대하여 특이적인 primer set으로 사용한 PCR 분석 결과와 2009년에 새로이 지정하는 *P. olseni*에 대하여 특이적인 primer set을 사용한 분석 결과를 비교하고, 결과를 통한 *P. olseni*의 검출율을 조사하였다. 특히 2009년에 새로이 지정된 PolsITS-140F와 PolsITS-600R의 primer set을 사용한 결과는 신속한 검출여부 분석에 적합한 것으로 생각되었다. *P. olseni*의 검출경향은 파도리에서 가장 낮았으며, 고흥에서 가장 높았다. 파도리의 7월, 8월 그리고 12월의 결과를 제외하고는 전 지점에서 7월에서 12월까지 지속적으로 높은 검출율을 나타내었다. PolsITS-140F와 PolsITS-600R의 primer set을 이용한 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과, 선재

도의 결과에서 두 군데의 염기차이를 나타내는 것 이외에는 모두 같은 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 연구지원 RP-2010-AQ-052에 의하여 운영되었습니다.

참고문헌

- Azevedo, C.: Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. J. Parasitol., 75:627-635, 1989.
- Blackbourn, J., Bower, S.M. and Meyer, G.R.: *Perkinsus qugwadi* sp. nov.(incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. Can. J. Zool., 7:942-953, 1998.
- Burreson, E.M. and Calvo, L.M.R.: Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. J. Shellfish Res., 15:17-34, 1996.
- Casas, S.M., Grau, A., Kimberly, S.R., Apalupakul, K., Azevedo, C. and Villalba A.: *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea, Dis. Aquat. Org., 58:231-234, 2004.
- Choi, K.S. and Park, K.I.: Review on the Protozoan Parasite *Perkinsus olseni*(Lester and Davis 1981) Infection in Asian Water. Coastal Environmental and

- Ecosystem Issues of the East China Sea, Eds., A. Ishimatsu and H.-J. Lie, pp.269-281. 2010.
- Choi, K.S., Park K.I., Cho M. and Soudant P.: Diagnosis, Pathology, and Taxonomy of Perkinsus sp. Isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *J. Aquaculture*, 18:207-214, 2005.
- Coss, C.A., Robledo, J.A.F., Ruita, G.M. and Vasta, G.R.: Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Balthic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 48:52-61, 2001.
- Cremonte, F., Balseiro, P. and Figueras, A.: Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.*, 64:85-90, 2005.
- Dungan, C.F. and Reece K.S.: In vitro propagation of two Perkinsus spp. Parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and Description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 316-326, 2006
- Goggin, D.L. and Lester, R.J.G.: Perkinsus, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 46:639-646, 1995.
- Hamaguchi, M., Suzuki, N., Usuki, H. and Ishioka, H.: Perkinsus protozoan infection in short-necked clam tapes (= *Ruditapes philippinarum*) in Japan. *Fish Pathol.*, 33:73-480, 1998.
- La Peyre, M., Casas, S. and La Peyre, J.: Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three Perkinsus species. *Dis. Aquat. Org.*, 71:59-74, 2006.
- Lester, R.J.G. and Davis, G.H.G.: A new Perkinsus species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone, *Halotis ruber*. *J. Invert. Pathol.* 37:181-187, 1981.
- Mackin, J.G., Owen, H.M. and Collier, A.: Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea nigrinica* (Gmelin). *Science*, 111:328-329, 1950.
- Marsh, A.G., Gauthier, J.D. and Vasta, G.R.: A semi-quantitative PCR assay for assessing Perkinsus marinus infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Parasitol.*, 81:577-583, 1995.
- McLayghlin, S.M., Tall, B.D., Shaheen, A., Elsayed, E.E. and Faisal, M.: Zoosporulation of a new Perkinsus species isolated from the gills of the softshell clam *Mya arenaria*. *Parasite*, 7:115-122, 2000.
- Moss, J.A.: Characterization of exotic pathogens associated with the suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Ph.D. Dissertation. Virginia Institute of Marine Science. College of William and Mary, Gloucester Point, Virginia USA. p.230, 2007.
- Moss, J.A., Xiao, J., Dungan, C.F. and Reece, K.S.: Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new Perkinsus sp. parasite in oysters of southern China. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55:117-130, 2008.
- Murell, A., Kleenan, S.N., Barker, S.C. and Lester, R.J.G.: Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus Perkinsus. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 22:258-265, 2002.
- Norén, F., Moestrup Ø. and Rehnstam-Holm A.-S.:

- Parivulucifera infectans Noren et Moestrup gen. et sp. nov.(Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. Eur. J. Protistol., 35, 233-254,1999.
- OIE: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, World organization for animal health, Paris, 2009.
- Park, K.-I., Ngo, T.T.T., Choi, S.-D., Cho, M. and Choi, K.-S.: Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. J. Inv. Pathol. 93:81-87, 2006.
- Park, K.-I. and Choi, K.-S.: Spatial distribution of the protozoan parasite *Pekinsus* sp. found in Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. Aquaculture, 203:9-22, 2001.
- Park, K.I., Park, J.K., Lee, J. and Choi, K.S.: Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manilaclam *Ruditapes philippinarum*. Dis. Aquat. Org., 66:255-263, 2005.
- Robledo J.A.F., Coss C.A. and Vasta G.R.: Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. J. Parasitol., 86:972-978, 2000.
- Uddin, M.J., Yang, H.S., Choi, K.S., Kim, H.J., Hong, J.S. and Cho, M.: Seasonal Changed in *Perkinsus olseni* Infection and Gametogenesis in Manil Clam, *Ruditapes philippinarum*, From Seonjaedo Island in Incheon, off the West Coast of Korea. J. World Aquaculture society, 41:93-101, 2010.
- Villalba, A., Casas, S.M., Lopez, C. and Carballal, M.J.: Study of pekinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia(NW Spain) II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. Dis. Aquat. Organ., 65:257-267, 2005.

Manuscript Received : July 5, 2010

Revised : August 19, 2010

Accepted : August 20, 2010