

삼배체와 이배체 굴, *Crassostrea gigas*의 형태 및 생리학적 특성 비교

김수경, 심나영, 이원영, 최민섭, 최은희, 임현정

국립수산과학원 서해수산연구소

Morphological and physiological comparison between triploid and diploid Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*

Kim Su Kyoung, Shim Na Young, Lee Won Young, Choi Min Seop, Choi Eun Hee and Lim Hyun Jeong

West Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Incheon 400-420, Korea

ABSTRACT

The morphological relations and physiological characteristics of the triploid and diploid oysters (*Crassostrea gigas*) in Taean area, west coast of Korea, were investigated from May 2012 to April 2013. Morphometric analysis indicated that the triploid oysters have the same shell length to shell height ratio but higher shell depth to shell height ratio than diploids. Consistent with morphological characteristics, triploid oysters showed greater values of fatness, condition index and RNA/DNA ratio during the period of experiment. The DNA concentration in adductor muscle and mantle of triploid were either lower or equal to the nucleic acids of diploid. However, RNA/DNA ratio were significantly higher than diploid. It appears that RNA/DNA ratio could be a useful indicator of health condition of triploid and diploid oysters when taken in correlation with the morphological indices.

Key words: oyster, *Crassostrea gigas*, triploid, diploid, RNA/DNA ratio, morphometrical analysis

서 론

국내 굴 생산량의 대부분을 차지하는 *Crassostrea gigas* 종은 남해안에서는 수하식, 서해안에서는 바닥식, 말목식, 포장판식 및 간이수하식 등의 방법으로 양식이 되어왔다(Hur *et al.*, 2008). 최근에는 프랑스, 미국, 캐나다 및 호주 등의 국가에서 대량으로 행해지는 기술인 수평망식 굴 양식법이 2008년 도입되어(Lim *et al.*, 2011) 서해안을 중심으로 발전하면서 삼배체를 이용한 개체굴 양식이 성행하고 있다. 삼배체의 특성은 생식세포가 발달하지 않음으로 체세포 성장이 활성화 되어 산란기를 갖는 이배체보다 더 빠르게 성장한다

는 다수의 연구보고가 있다(Nell, 2002). 또한 산란기가 없음으로 연중 판매 및 소비가 가능하여 생산성이 향상되는 것은 이미 잘 알려져 있다(Allen Jr. and Downing, 1986; Hawkins *et al.*, 1994). 그러나 이러한 생리적인 특성의 차이 이외에도 적절한 양성 환경이 아닌 곳에서는 삼배체와 이배체의 성장의 차이가 없다는 보고가 있으며 일본의 저위도 지역인 히로시마 지역과 같은 따뜻한 곳에서는 삼배체의 성장이 빠른 반면 호주의 Tasmania와 같은 고위도(42-43°S) 지역에서는 삼배체와 이배체의 성장차이가 없다는 보고가 있다(Maguire *et al.*, 1994; Akashige and Fushimi, 1992). 서해안의 환경특성은 조석간만의 차이로 매일 일정시간 공기 중에 노출되어 남해안의 굴보다 작고 출하까지 걸리는 시간이 긴 것이 특징으로 이러한 환경이 삼배체 성장에 미치는 영향을 조사할 필요가 있다.

패류의 건강도를 판정하는 기법으로 형태학적(전장, 체중, 연체부지수, condition index), 생리·생화학적(단백질, 글리코젠, RNA/DNA) 그리고 면역학적 방법(hemocyte, phagocytosis) 등이 다양하게 적용되어 왔다. 그중 조직 내 RNA/DNA 비는 패류뿐만 아니라 어류, 갑각류, 플랑크톤 등

Received: August 29, 2013; Accepted: September 26, 2013
Corresponding author : Hyun Jeong Lim
Tel: +82 (32) 745-0720 e-mail: hylim@nfrdi.go.kr
1225-3480/24489

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.

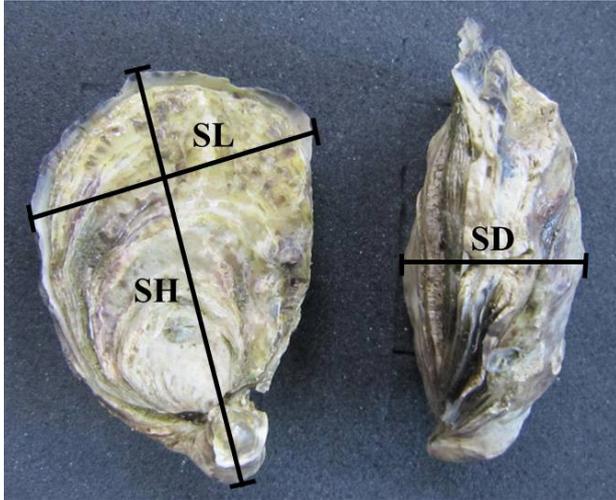


Fig. 1. Morphological measurement factors. SL; shell length, SH; shell height, SD; shell depth

과 같은 생물의 성장과 관련하여 건강을 나타내는 지표로 사용이 되어왔다(Wright and Martin, 1985; Westerman and Holt, 1994; Kim *et al.*, 2012; Ning *et al.*, 2013; Mugnier *et al.*, 2013). 그러나 삼배체와 이배체 조직 내 핵산의 비로 건강도를 판정한 논문은 어류에서는 연구발표가 있으나 패류에서는 전무한 상태이다(Greenlee *et al.*, 1995; Suresh and Sheehan *et al.*, 1998b). 본 연구에서는 동시간대의 노출선에서 서식하는 자연산 굴과 삼배체 양식굴의 형태 성장 및 생리학적 특성을 조사하여 산란기를 거치지 않는 삼배체의 월별 건강도 변화를 핵산의 비로 조사하였고, 형태학적 차이를 이배체와 비교분석하여 향후 서해안 양식 굴 생산성을 향상시키기 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료처리

본 연구에 사용된 굴은 씨에버(seaever.co.kr)에서 2011년 4배체 수컷과 2배체 암컷으로 삼배체 굴을 생산하여 입식한 종패로서 충남 태안군 이원지역의 수평망식으로 양식되어온 1년산 삼배체 굴과 의항지역의 자연산(1-2년산) 이배체 굴의 형태학적 특성과 차이를 비교분석 하였다. 이원지역은 조건대로서 모래와 갯벌로 이루어져 수년간 수평망 굴양식이 집중적으로 이루어지는 곳으로서 자연산 굴이 서식할 수 있는 기질이 충분하지 않아 매년 자연산 굴 수확이 이루어지고 있는 인근 의항지역의 굴과 비교를 하였다. 조사기간은 2012년 5월부터 2013년 4월까지로 매월 충남 태안군 이원지역의 수평망 삼배체 양식지로부터 50마리, 의항지역의 이배체 굴을 50마리씩 샘플을 취하여 각장, 각고, 각폭, 전중, 육중을 Fig. 1과 같이 측정하여 연체부지수(fatness = 육중량/전중량 × 100),

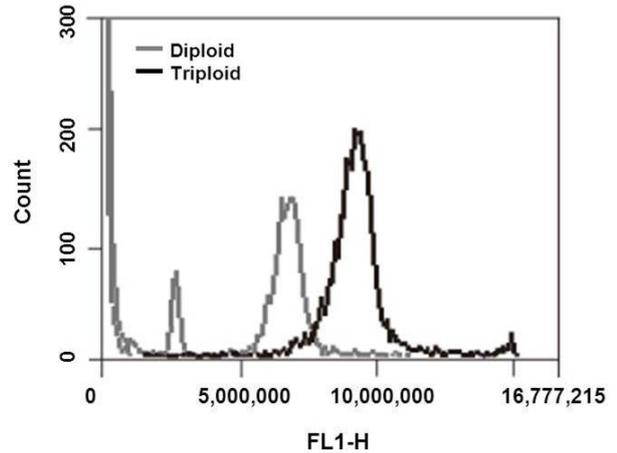


Fig. 2. Flow cytometrical DNA analysis of triploid and diploid oysters.

condition index(CI = 건조 육중량 × 100/건조 패각중량), 각고에 대한 각장의 비율(SL/SH), 각고에 대한 각폭의 비율(SL/SD)을 계산하였다.

2. 삼배체 및 이배체 판별

무작위적으로 채취한 샘플의 패각근 조직을 잘게 잘라 Yang *et al.* (2000)의 분석방법에 따라 1 ml의 nucleus isolation buffer (10% DMSO) + 3ul SYBR green 용액으로 핵을 추출한 후 20 μm 물러가제로 걸러 이물질 제거하고 Flow cytometry (Accuri C6, USA)로 삼배체와 이배체의 DNA 양을 조사하여 판별하였다.

3. RNA/DNA 및 단백질 함량 정량분석

패각근 및 외투막의 핵산함량 측정은 Kim *et al.* (2005)의 방법에 따라 형광광도법으로 EtBr (ethidium bromide, Sigma)을 dye로 하여 microplate reader (Varioskan FL, Thermo Sci.) emission 355 nm, excitation 590 nm에서 RNA, DNA 양을 측정하였으며 단백질 함량은 핵산 측정 후 시료 10 μL에 50 μL의 Coomassie Brilliant Blue (G-250)를 혼합하고 증류수로 총량이 250 μL가 되게 하여 흡광도 595 nm에서 측정하였다.

결 과

1. 삼배체 및 이배체 판별

시험에 사용된 굴의 혈구를 분리하여 flow cytometry로 배수체 판별을 한 결과는 Fig. 2와 같다. 이배체 굴과 수평망식으로 양식을 한 삼배체 굴의 DNA의 비는 1: 1.40으로 차이가 나타나 이배체와 삼배체 구별을 확인하였다.

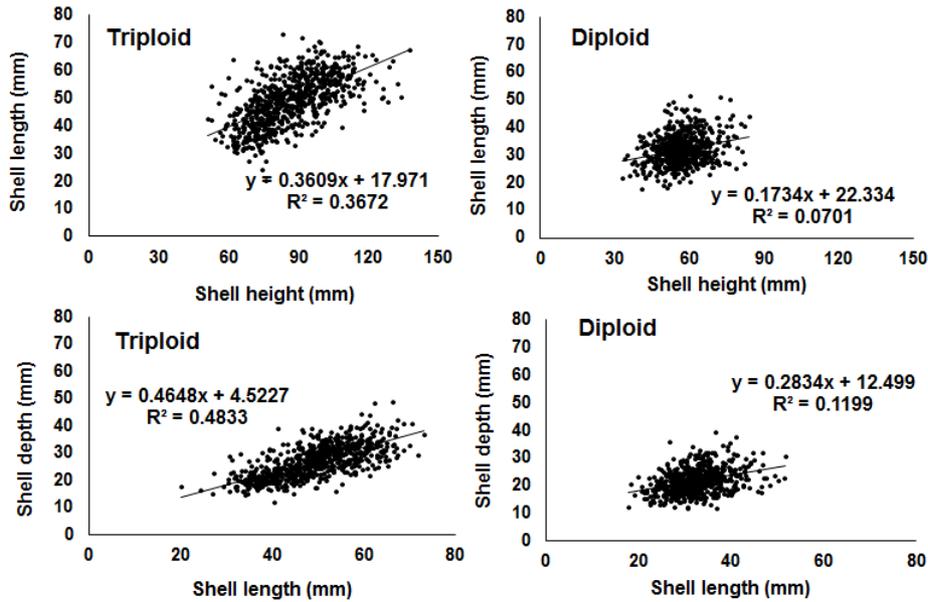


Fig. 3. Morphological correlation of diploid and triploid oyster.

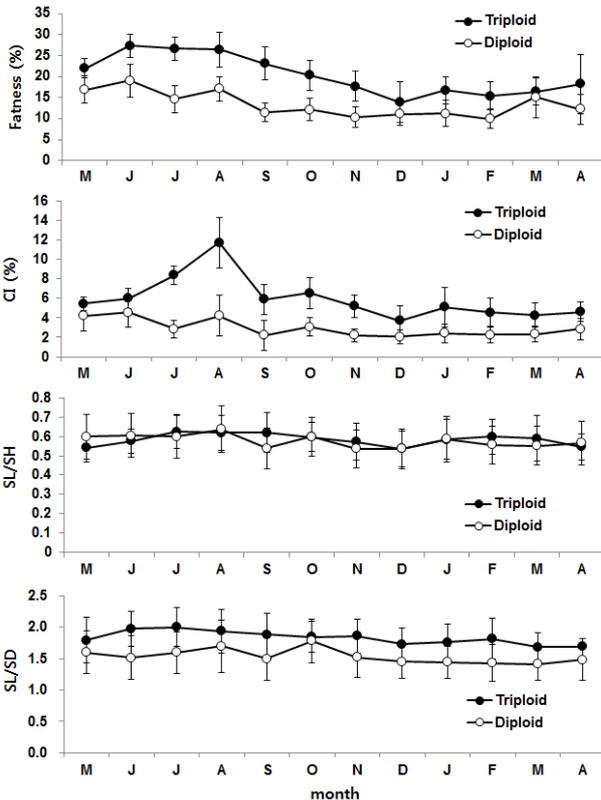


Fig. 4. Monthly changes of fatness, condition index and morphological ratio of triploid and diploid oysters. Blocked line indicate standard deviation.

2. 형태학적 특성

수평적 상대성장의 지표인 삼배체 굴의 SL/SH 비율은 $y = 0.3609x + 17.971$ ($R^2 = 0.3672$), 이배체의 경우는 $y = 0.1734x + 22.334$ ($R^2 = 0.0701$)로 조사되었다 (Fig. 3). 수직적 상대성장을 나타내는 각장에 대한 각폭의 비율은 삼배체의 경우 $y = 0.4648x + 4.5227$ ($R^2 = 0.4833$), 이배체의 경우 $y = 0.2834x + 12.499$ ($R^2 = 0.1199$) 였다.

삼배체와 이배체 굴의 월별 연체부지수는 최대값이 삼배체의 경우 6월에 $27.4 \pm 2.7\%$, 이배체는 19.0 \pm 4.0%로 나타났으며 최소값은 삼배체는 12월에 $13.9 \pm 4.8\%$, 이배체는 이듬해 2월에 $10.0 \pm 2.4\%$ 로 조사되었으며 그 이후부터는 다시 서서히 증가하였다 (Fig. 4). 건조 패각중량에 대한 건조 육중량의 비로 표시되는 CI는 연체부지수와는 다르게 최대 값이 삼배체는 8월 $11.7 \pm 2.6\%$, 이배체는 6월 $4.6 \pm 1.5\%$ 로 약 2.5 배의 차이를 보였다. 최소값은 삼배체와 이배체 모두 12월에 각각 3.7 ± 1.6 과 $2.0 \pm 0.7\%$ 였다. 수평적인 성장비를 나타내는 SL/SH의 비는 삼배체와 이배체 각각 0.54-0.63, 0.53-0.64로 큰 차이를 보이지 않고 일정한 비를 유지하였으나 수직적 성장을 나타내는 SL/SD의 경우는 삼배체가 1.68-1.98로 이배체 1.41-1.78 보다 높은 비를 보였다.

3. 폐각근 조직 내 핵산 및 단백질 함량

굴 폐각근 핵산비와 농도의 변화를 보면 삼배체의 경우 RNA/DNA의 비가 5월 5.48 ± 1.31 에서 9월에 4.15 ± 1.32 로 비교적 일정한 값을 보이다가 11월 12.4 ± 3.89 로 증가, 이

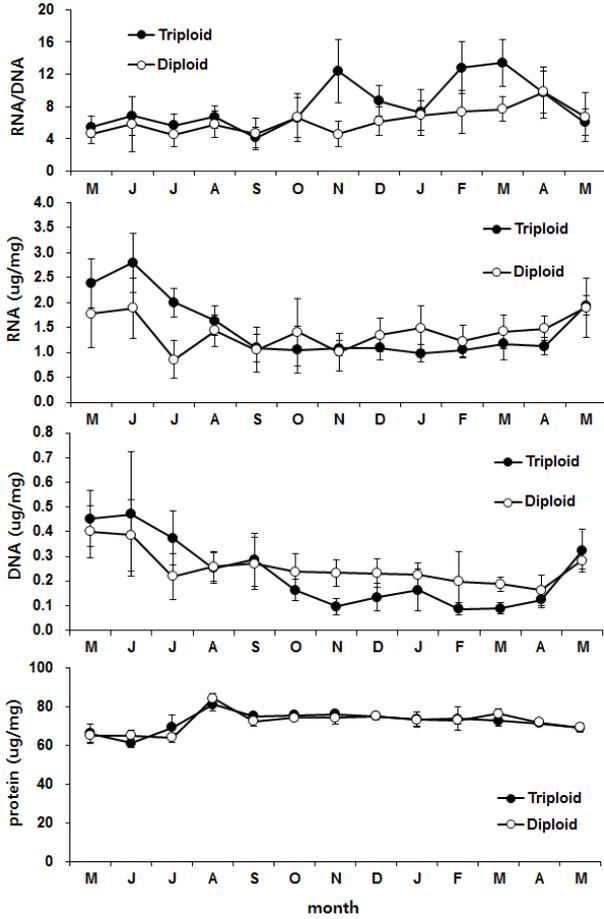


Fig. 5. Monthly changes of nucleic acid ratio and concentration in adductor muscle of triploid and diploid oysters, *Crassostrea gigas*. Blocked line indicate standard deviation.

듬해 1월에 7.26 ± 2.85 로 다시 감소한 후 2월에 13.42 ± 2.88 로 재상승하는 경향을 보였다 (Fig. 5). 이와는 대조적으로 이배체의 경우는 5월에 4.65 ± 1.31 에서 소폭 증감을 반복 하면서 이듬해 4월까지 9.81 ± 2.60 으로 계속 증가하는 것으로 조사되었다. RNA의 농도는 삼배체와 이배체 모두 6월에 가장 높은 값인 $2.80 \pm 0.59 \mu\text{g/mg}$, $1.88 \pm 0.60 \mu\text{g/mg}$ 이었으나 점차 감소하여 이듬해 4월에 $1.12 \pm 0.17 \mu\text{g/mg}$, $1.48 \pm 0.25 \mu\text{g/mg}$ 에 달하였다. 9월까지는 삼배체의 RNA 농도가 이배체보다 높았으나 그 이후는 이배체 폐각근에서 더 높은 농도를 보였다. DNA의 농도 또한 RNA와 동일한 변화 경향을 보여 6월에 삼배체 $0.47 \pm 0.25 \mu\text{g/mg}$, 이배체 $0.39 \pm 0.15 \mu\text{g/mg}$ 이었으며 이듬해 4월에 삼배체 $0.12 \pm 0.03 \mu\text{g/mg}$, 이배체 $0.16 \pm 0.06 \mu\text{g/mg}$ 까지 감소한 후 5월이 되어서 다시 증가하는 것으로 분석되었다. 폐각근 내 단백질 함량은 삼배체와 이배체 모두 동일한 양상으로 변화하였으며 함

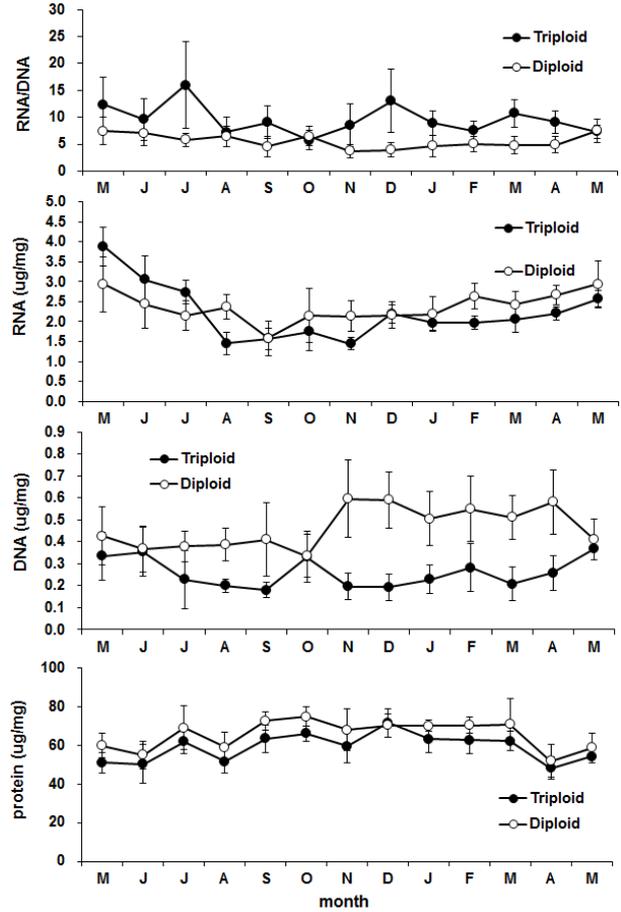


Fig. 6. Monthly changes of nucleic acid ratio and concentration in mantle of triploid and diploid oysters, *Crassostrea gigas*. Blocked line indicate standard deviation.

량의 차이를 보이지 않았다. 가장 단백질 함량이 높았던 시기는 8월로 삼배체와 이배체 각각 $81.1 \pm 2.26 \mu\text{g/mg}$ 과 $84.3 \pm 3.13 \mu\text{g/mg}$ 였다.

4. 외투막 조직 내 핵산 및 단백질 함량

외투막내 RNA/DNA비는 삼배체의 경우 주기적으로 증감을 반복하는 경향을 보였으나 이배체의 경우는 변화의 폭이 적고 유사한 비를 보였다 (Fig. 6). 삼배체의 경우 가장 높은 비는 7월 16.0 ± 8.1 이었고 그 후 9월 9.1 ± 3.0 , 12월 13.0 ± 5.9 , 이듬해 3월 10.7 ± 2.6 로 증가하였고 가장 낮은 비는 10월에 5.8 ± 1.7 이었다. 이배체의 경우는 가장 낮은 비는 11월에 3.7 ± 1.2 였고 가장 높은 시기는 삼배체와 같이 5월에 7.5 ± 2.5 였다. RNA 농도는 삼배체와 이배체가 동일한 변화양상을 보였으나 8월 이전까지는 삼배체가 이배체보다 더 높은 값을, 그 이후는 이배체가 더 높은 값을 갖는 것으로 조사되었다.

삼배체의 경우 가장 높은 RNA 농도는 5월에 $3.88 \pm 0.67 \mu\text{g}/\text{mg}$ 였고 이배체 또한 5월과 이듬해 5월에 $2.93 \pm 0.69 \mu\text{g}/\text{mg}$, $2.93 \pm 0.51 \mu\text{g}/\text{mg}$ 였다. DNA의 농도는 전 기간 이배체가 삼배체보다 더 높았으며 삼배체의 경우는 0.18-0.35 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 범위에서 변화하였고 이배체의 경우는 0.34-0.60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 변화를 보였다. 외투막내 단백질 함량의 변화는 삼배체 이배체 모두 동일한 변화 양상을 보였으나 이배체의 단백질 함량이 다소 높아 51.80-70.64 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 삼배체는 48.23-71.44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 범위로 변화하였다.

토 론

삼배체 굴이 성 성숙에 적은 에너지를 소비함으로 더 많은 에너지가 체세포 성장에 활용을 하며 에너지 소비율이 환경스트레스에 더 잘 견딜 수 있어 이배체보다 성장이 빠르다고 알려져 있다 (Allen and Downing, 1986; Nell and Perkins, 2005). 그러나 삼배체의 생존율에 관해서는 여름철 고수온기에 대응력이 뛰어나 생존율이 이배체보다 높다 (Boundry *et al.*, 2008) 라는 결과와 오히려 이배체보다 낫다는 상반된 연구결과가 있다 (Nell, 2002; Garnier-Gere *et al.*, 2002). 본 연구에서도 체세포 성장과 관련한 조사를 보면 동일해역에서 1년간 성장한 이후 삼배체가 이배체보다 월별 평균 각고는 20-43% 크고, 각장은 12-44%, 각폭은 2-32%, 전중 25-75% 까지 더 큰 것으로 나타났다. 월별 건강도 변화를 파악한 연체부지수와 CI의 변화를 Fig. 2에서 보면 삼배체가 이배체보다 매우 높은 값을 보였다. 이배체의 생식주기와 관련하여 볼 때 연체부지수는 생식소 성숙기에 높은 값을 보였으며 산란기와 더불어 겨울철까지 이배체, 삼배체 모두 지속적으로 감소하였다. CI는 삼배체가 주 산란기인 8월에도 이배체와는 달리 높은 값을 보였다. 이는 삼배체의 생식주기를 조사한 국립수산물학원 연구보고서 (2012) 에서와 같이 삼배체 생식소낭에는 소수의 성숙된 난과 정자가 존재하나 방출 흔적을 볼 수 없어 성 성숙 및 산란과 관련된 에너지 소비가 크지 않아 폐각에 대한 건조 육중량의 비인 CI가 8월에도 $11.7 \pm 2.3\%$ 로 가장 높게 나타난 것이 주목할 사항이다. 그 후 산란기 이후 동절기로 들어서면서 해수온의 하강과 더불어 플랑크톤 현존량 감소에 따라 CI 값이 낮게 유지된 것으로 추정되었다. 형태학적인 비를 보면 각고에 대한 각장의 비율에서 삼배체와 이배체의 차이가 없어 가로와 세로 성장 비율이 동일하였으나 각폭에 대한 각장의 비율에서 삼배체가 이배체보다 높은 값을 보여 이배체는 더 알팍하고 삼배체는 더 두툽한 형태를 보였다. 이러한 형태학적 특성과 관련하여 본 연구기간동안 삼배체의 연체부지수와 CI의 값이 큰 이유를 설명할 수 있다.

패류의 삼배체의 DNA 핵산량을 flow cytometry 방법으로 분석한 논문에서 보면 삼배체 핵에는 별도의 크로모솜이 포함

되어 있어 이배체보다 1.5배의 DNA 함량이 존재한다 (Allen Jr., 1983; Chaiton and Allen, 1985). 반면 어류의 삼배체 핵산을 분석한 연구논문에 의하면 백색 근육 조직세포 (white muscle tissue) 내에서 삼배체의 경우는 동일한 조직 무게당 세포수와 핵의 숫자가 이배체의 경우보다 적은 것으로 조사되었다 (Fankhauser, 1941, 1945; Swarup, 1959; Benfey and Sutterlin, 1984; Small and Benfey, 1987; Greenlee *et al.*, 1995; Suresh and Sheehan, 1998a). 본 연구에서도 굴 조직을 flow cytometry로 분석한 결과와는 달리 어류 삼배체를 연구한 결과와 동일하게 폐각근과 외투막에서 삼배체가 이배체보다 전반적으로 낮은 RNA와 DNA 농도를 보였다 (일부 5-7월 제외). 이러한 결과가 세포에서 DNA를 직접 추출하여 분석하는 flow cytometry 방법과 본 연구에서 별도로 핵산을 추출하지 않고 EtBr을 염기사이에 삽입시켜 형광광의 증폭으로 보는 Microplate fluorescence 측정 방법과의 차이에 의한 가능성이 있으며, 또한 위의 발표된 논문들과 같이 삼배체가 단백질 합성과 관련된 RNA 양의 증가 및 그에 따른 biomass의 증가로 인하여 근육조직의 단위무게로 환산된 DNA 양이 적게 측정되는 두 개의 가능성이 있다. 그러나 삼배체에서 각 핵산의 농도가 낮음에도 불구하고 상대적인 비인 RNA/DNA가 연체부지수 및 CI의 차이와 동일하게 이배체보다 더 높게 나타나 세포의 크기가 더 크며 ribosomal RNA의 합성이 더 활발한 것으로 추정이 가능하였다 (Suresh and Sheehan, 1998b). 또한 외투막에서 폐각근보다 더 높은 비와 주기적인 증감패턴을 보였는데 Wright and Hetzel (1985)의 연구와 같이 RNA/DNA 비가 높아 폐각형성의 주원료인 단백질이 신속하게 합성된다는 것을 감안하면 연중 성장이 비교적 주기적으로 일어난다고 보여진다. 삼배체의 세포내 DNA 양의 감소가 생리적 또는 기능적으로 영향을 미치며 세포 또는 핵의 수 감소가 단백질 합성과 같은 생명현상을 어떻게 보상하는지에 관한 연구가 보고되어 있지 않음으로 더 정밀한 연구가 필요하지만 형태학적 특성과 비교하여 볼 때 삼배체가 이배체보다 더 높은 condition index와 RNA/DNA 비를 보임으로 생리적 또는 기능적 저하가 존재하지 않을 것이라 추정 가능하였다.

참굴을 연구한 Li *et al.* (2009)의 연구에서 폐각근, 외투막, 아가미의 연간 단백질 함량의 변화를 보면 폐각근에서의 단백질 함량이 계절에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았으나 ($p > 0.05$) 외투막과 아가미 조직에서보다 더 높은 함량을 보였다. 이와 동일하게 본 연구에서도 폐각근내 단백질 농도가 계절에 상관없이 일정한 농도를 유지하였고 외투막에서의 농도보다 높은 값을 보였으며 RNA/DNA의 변화와 유사한 경향을 보였다. 이는 폐각근이 생리학적 기능을 수행하기보다 영양소 저장 및 기능적인 역할을 담당하는 것이 원인으로 추정되었

다 (Evseev *et al.*, 1996).

본 연구에서 형태학적 특성은 삼배체와 이배체의 경우 각고에 대한 각장의 비율이 일정하였으나 각폭의 비율이 삼배체가 이배체보다 높아 더 두툽한 형태를 갖는 것으로 나타났다. 형태학적 건강도를 판정하는 요인인 연체부지수와 condition index 또한 삼배체가 이배체보다 뚜렷하게 높은 값을 보였다. 생리·생화적 건강도 판정요소인 RNA/DNA의 비 역시 이배체 굴에서 보이는 생식소 성숙과 관련된 폐각근 및 외투막에서의 핵산비의 감소현상이 나타나지 않아 삼배체가 조사 기간 동안 높은 건강도와 체세포 성장과 관련하여 향후 이배체보다 더 빠른 성장이 이루어질 것이라는 예측이 가능하였다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물품질관리원 연구사업 “갯벌참굴 양식생산성 향상 연구 (RP-2013-AQ-146) 의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

Akashige, S. and Fushimi, T. (1992). Growth, survival and glycogen content of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**: 1063-1071.

Allen Jr., S.K. (1983). Flow cytometry: Assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture*, **33**:317-328.

Allen Jr., S.K. and Downing, S.L. (1986). Performance of triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **102**: 197-208.

Benfey, T.J. and Sutterlin, A.M. (1984). The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology*, **24**: 333-338.

Evseev, G.A., Yakovlev, Y.M. and Li, X. (1996). The anatomy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) (Bivalvia: Ostreidae), *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, **37**:239-255.

Chation, J.A. and Allen Jr, S.K. (1985). Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, **48**: 35-43.

Hawkins, A.J.S., Day, A.J., Gerard, A., Naciri, Y., Ledu, C., Bayne, B.L. and Heral, M. (1994). A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous european flat oyster, *Ostrea edulis* L., *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **184**: 21-40

Hur, Y.B., Min, K.S. Kim, T.E. Lee, S.J. and Hur, S.B. (2008) Larvae growth and biochemical composition change of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, larvae during artificial seed production. *Journal of Aquaculture*, **21**(4): 203-212 (in Korean).

Frankauer, G. (1941). Cell size, organ and body size in triploid newts (*Triturus viridescens*). *Journal of Morphology*, **68**: 161-177.

Fankhauser, G. (1945). The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *Quarterly Review of Biology*, **20**: 20-78.

Garnier-Gere, P.H., Naciri-Graven, Y., Bougrier, Heral, M., Kotoulas, G., Haqwkins, A., and Gerard, A. (2002). Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Molecular Ecology*, **11**: 1499-1514.

Greenlee, A.R., Kersten, C.A. and Cloud, J.G. (1995). Effects of triploidy on rainbow trout myogenesis in vitro. *Journal of Fish Biology*, **46**: 381-388.

Kim, S.K., Rosenthal, H., Clemmesen, C., Park, K.Y., Kim, D.H., Choi, Y.S. and Seo, H.C., (2005) Various methods to determine the gonadal development and spawning season of the purplish washington clam, *Saxidomus purpuratus* (Sowerby). *Journal of applied Ichthyology*, **21**: 101-106.

Kim, S.K., Choi, E.H., Han, H.S. and Lim, H.J. (2012). Ecophysiological characteristics changes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, after spawning season in off-bottom culture. *Korean Journal of Malacology*, **28**(3): 215-223.

Li, Y., Qin, J.G., Li, X. and Benkendorff, K. (2009). Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture*, **286**: 64-71.

Lim, H.J., Lee, T.S., Cho, P.G., Back, S.H., Byun, S.G. and Choi, E.H. (2011). The production efficiency of cupped oyster, *Crassostrea gigas* Spat according to clutch and growth comparing diploid and triploid oysters in off-bottom culture for tidal flat utilization. *Korean Society of Fisheries and Aquatic Science*, **44**(3): 259-266.

Maguire, G.B., Boocock, B., Kent, G.N., Gardner, N.C. (1994). Studies on triploid oysters in Australia: IV. Sensory evaluation of triploid and diploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Tasmania. *In*: Nell, J.A., Maguire, G.B. (Eds.), Evaluation of triploid Sydney Rock Oysters (*Saccostrea commercialis*) and Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) on Commercial Leases in New South Wales and Tasmania, Final Report to FRDC, September, 1994, NSW Fisheries, Port Stephens Research Centre, Taylors Beach, NSW and University of Tasmania, Launceston, Tas., pp. 178-193.

Mugnier, C., Justou, C., Lemonnier, H., Patrois, J., Ansquer, D., Goarant, C. and Lecoz, J.R. (2013). Biological, physiological, immunological and nutritional assessment of farm-reared *Litopenaeus stylirostris* shrimp affected or unaffected by vibriosis. *Aquaculture*, **388-391**: 105-114.

Nell, J.A. (2002). Farming triploid oysters. *Aquaculture*, **210**: 69-88.

Nell, J.A. and Perkins, B. (2005). Studies on triploid

- oysters in Australia: farming potential of all triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port Stephens, New South Wales, *Australia Aquaculture Research*, **36**: 530-536.
- NFRDI (2012). Research for aquaculture productivity improvement of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in tidal flat. 2/2 Technical report of NFRDI, 607-624.
- Ning, J., Li, C., Yang, G., Wan, A. and Sun, S. (2013). Use of RNA:DNA ratios to evaluate the condition and growth of the copepod *Calanus sinicus* in the southern Yellow Sea. Deep-Sea Research II. (in progress).
- Small, S. A. and Benfey, T.J. (1987). Cell size in triploid salmon. *Journal of Experimental Zoology*, **241**: 339-342.
- Suresh, A.V. and Sheehan, R.J. (1998a). Muscle fiber growth dynamics in diploid and triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, **52**: 570-587.
- Suresh, A.V. and Sheehan, R.J. (1998b). Biochemical and morphological correlates of growth in diploid and triploid rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, **52**: 588-599.
- Swarup, H. (1959). Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Journal of Genetics*, **56**: 143-155.
- Yang H., Gallivan T., Guo X. and Allen S., 2000. A method for preserving oyster tissue samples for flow cytometry. *Journal of shellfish Research*, **19**: 835-839.
- Westerman, M. and Holt, G.J. (1994). RNA:DNA ratio during the critical period and early larval growth of the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Marine Biology*, **121**: 1-9.
- Wright, D.A. and Hetzel, E.W. (1985). Use of RNA:DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecological Progress Series*, **25**: 199-206.
- Wright, D.A. and Martin, F.D. (1985). The effect of starvation on RNA-DNA ratios and growth of larval striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of Fish Biology*, **27**(4): 479-485.