

서해안 굴, *Crassostrea gigas*의 건강도 평가를 위한 Condition index와 혈구 apoptosis 분석

임현정, 임매순¹, 이원영, 최은희, 윤주현, 박승윤, 이승민, 김수경

국립수산과학원 서해수산연구소, ¹충청남도 수산관리소

Condition index and hemocyte apoptosis as a health indicator for the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* cultured in the western coastal waters of Korea

Hyun Jeong Lim, Mae Soon Lim¹, Won Young Lee, Eun Hee Choi, Ju Hyun Yoon,
Seung Yoon Park, Seung Min Lee and Su Kyoung Kim

West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Incheon 400-420, Korea
¹Fisheries Management Office, Chungcheongnam-do, Boryeong, 335-943, Korea

ABSTRACT

A significant production decrease has been witnessed for the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* farmed in the western coastal waters of Korea, presumably by the loss of physiological viability. We evaluated the viability in terms of health indicators, the condition indices and hemocyte apoptosis rates of the oysters inhabiting two representative farming sites, Incheon and Taean each with different environmental variables. In our monthly measurements for the whole year 2013, the indicators were location specific. The condition indices of Incheon were highly variable, 1.67-8.58%, while those of Taean were less, 2.28-5.57%. The condition indices decreased during the spawning seasons, July and September in common. The two oysters exhibited also differed in the apoptotic activities of hemocyte, highly active, 4.03-30.15% for Incheon oysters and less active, 2.87-17.48% for Taean oysters. One thing we could identify was the two measurements were adverse during the critical seasons of spawning, reminiscent of being a useful tool for a health indicator for the oysters. Similar trend was also observed in the time when change in temperature was extreme. The findings in this study are highly indicative of health indicators for the oyster aquaculture.

Key words: oyster, *Crassostrea gigas*, condition index, hemocyte, apoptosis

서 론

굴 (*C. gigas*) 은 전세계적으로 양식 생산량이 449만톤 (2010년 기준), 36억달러에 달하는 중요한 해산양식종이며 (FAO, 2012). 국내에서도 2012년 기준 연간 29만톤 내외로

생산되는 대표적 양식종이다. 특히 서해안에서는 갯벌을 활용한 바다식 방법 등을 이용하여 남해안 굴에 비하여 작고 수분 함량이 적은 굴을 생산하여 고유의 소비자층을 형성하고 있다 (Lim *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2012). 그러나 최근 서해안의 굴 양식 생산량은 2008년 42,000톤에서 2012년 20,215톤으로 감소하는 등 지속적 하향세를 나타내고 있다 (MIFAFF, 2012). 이에 본 연구는 서해안 굴 생산성을 향상시키기 위한 방안을 마련하기 위한 첫 단계로 서해안의 대표적 굴 생산지에서 굴의 계절적 건강도 변화를 파악하였다.

현재, 굴의 성장과 생리 상태를 파악하는 데에는 폐각 및 연체부의 성장, haemolymph 내의 혈구를 이용한 세포면역학적 반응의 분석 방법이 가장 일반적으로 이용된다. 폐각과 연체부의 건조 중량으로 측정하는 condition index는 수확한 굴의 질적 가치를 판단하는 지표로 양식어업인들에게 매우 유용하

Received: September 15, 2014; Revised: September 18, 2014; Accepted: September 23, 2014
Corresponding author : Su Kyoung Kim
Tel: +82 (32) 745-0730 e-mail: sk6333@korea.kr
1225-3480/24529

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.

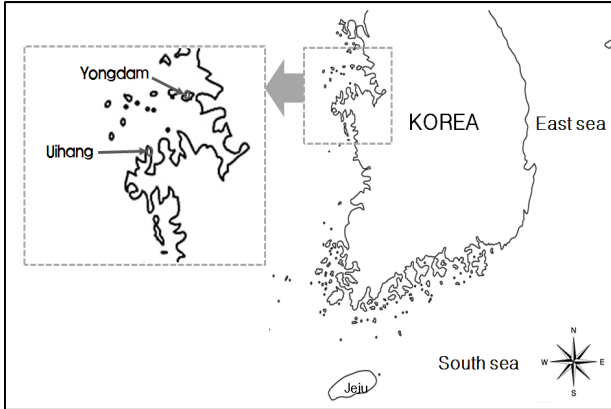


Fig. 1. Experimental sites of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* collection.

고 일반적인 지표로 사용된다 (Orban *et al.*, 2002; Filgueira *et al.*, 2014). Haemolymph는 굴과 같은 무척추 동물에서 산소, 영양염 및 이온 물질을 수송하는 역할 외에 체액 내의 혈구에 의한 식작용 등 세포 방어 기작을 담당한다 (Cheng, 1981; Cherkasov *et al.*, 2007). Flow cytometry를 이용한 혈구의 분석은 Hegaret 등 (2003a, 2003b)에 의하여 패류의 표준 적용방법이 마련되는 등 다양한 목적에 활용되기 위한 연구의 진행이 있었다. 패류에서 혈구의 기능에 관한 연구는 광학현미경 (La Peyre *et al.*, 1995a), 전자현미경 관찰 (La Peyre *et al.*, 1995b) 및 flow cytometry (Allam *et al.*, 2002; Goedken and Guise, 2004; Hégarret *et al.*, 2003a, 2003b; Freitas Rebelo *et al.*, 2013)를 이용하여 다양한 종에서의 면역학적 기능에 관한 연구들이 진행되어 보고된 바 있다. 혈구의 면역학적 기능을 평가하기 위하여는 생존율(viability), phagocytosis, adhesion rate, release of reactive oxygen species (ROS) 및 apoptosis 등을 주로 분석한다 (Goedken and Guise, 2004; Delaporte *et al.*, 2007; Bugge *et al.*, 2007). 이들 항목 중 생존율, phagocytosis, adhesion rate 및 ROS에 관해서는 비교적 많은 연구자들의 실험 결과가 보고되어 있으나 apoptosis는 다른 항목에 비하여 연구가 미미한 실정이다. Apoptosis는 유해한 세포의 선택적 소실을 일으켜 개체의 항상성을 유지하는 중요한 조절 기구로 작용하므로 인간을 비롯한 포유류 연구에서는 암 세포, 바이러스 감염, 약물, 방사선 등에 손상된 세포를 사멸토록 만드는 질병 관련 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Hyun *et al.*, 2008; Estevez-Calvar *et al.*, 2013). 패류에서도 또한 apoptosis 연구는 *Perkinsus marinus*에 의한 Dermo disease와 증극속 등에 장기간 노출되었을 때의 영향 등 질병과 관련된 연구들이 주를 이루고 있다 (Cherkasov *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2010; Foster *et al.*, 2011).

Apoptosis 분석은 정상, 괴사 단계의 세포 비율을 함께 파악할 수 있어 혈구의 전반적 상태를 알 수 있다는 장점을 지니며, 외부 환경의 스트레스에 인한 programmed cell death가 진행되고 있는 세포의 비율 확인이 가능하다. 이에 본 연구에서는 서해안 2개 지역 자연산 굴의 월별 condition index와 혈구의 apoptosis 변화를 관찰하여 두 요인간 상관관계, 계절적 변동 패턴의 유무 등을 파악하고 이 요인들을 조합하여 굴 건강도를 평가하는 지표로서의 사용 가능성을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시험 어장 및 시료 채집

자연산 굴은 인천 옹진군 영흥면 용담리 (이하 용담으로 표기)와 충남 태안군 소원면 의항리 (이하 의항으로 표기)에서 채집하였다 (Fig. 1). 채집 기간, 시기 및 수량은 2013년 1월부터 12월까지 매월 1회 50개체의 굴을 채취하였다. 이외에 어장 환경을 이해하기 위하여 매월 현장에서 수온, 염분, pH, Dissolved Oxygen (DO)를 YSI 6000 microprobe system (Yellow Spring, YSI Life Science, OH, USA)으로 측정하였다. 또한 식물플랑크톤과 chl. a양 조사를 위하여 해수를 2 L 채수하여 1 L는 식물플랑크톤 분석에, 1 L는 chl. a 분석에 사용하였다. 식물플랑크톤과 chl. a는 해양환경공정시험법 (MOMAF, 2005)에 따라 분석하였다.

2. Condition index 분석

매월 30개체씩 굴의 크기 (각고, 각장, 각폭)와 중량 (전중량, 육중량)을 계측한 뒤 condition index를 분석하였다. 크기는 버어니어캘리퍼스 (cd-20CPX, Mitutoyo Corp., Japan)로, 중량은 전자저울 (HH320, Ohaus Corp., USA)로 소수점 둘째자리까지 측정하였으며, condition index는 Lawrence and Geoffrey (1982)의 방법에 따라 측정하였다. 연체부 및 패각의 건조 중량은 Lutz *et al.* (1980)의 방법을 준용하여 80°C dry oven (MOV-2125, Sanyo, Japan)에서 48-72시간 동안 일정한 중량이 될 때까지 건조시킨 후 측정하였다.

*Condition Index (CI) = 연체부 건조량 (g) × 100 / 패각 건조중량 (g)

3. 혈구의 apoptosis 분석

혈구의 apoptosis는 매월 10개체씩 flow cytometry (C6 accury, BD Science, USA)를 이용하여 Hughes *et al.* (2010)의 방법을 준용하여 분석하였다. 모든 분석은 14 μL/min의 flow rate로 30초간 진행하였다. 혈구는 21-gauge needle과 1 mL syringe를 사용하여 폐각근에서 300 μL씩

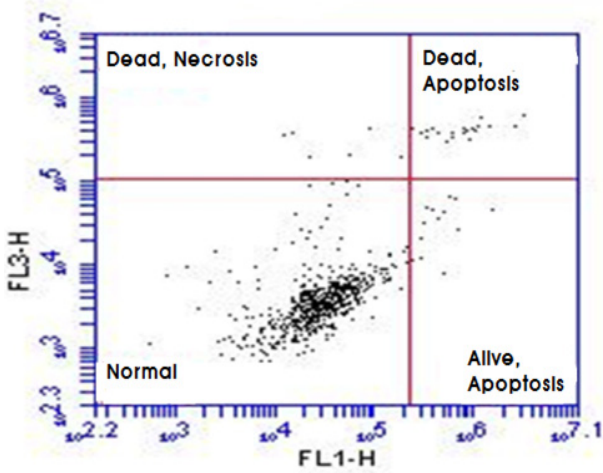


Fig. 2. The plot of apoptosis analysis using Pacific oysters, *C. gigas* hemocytes.

채취하였다. 채취된 혈구는 삼투압과 응집을 막기 위하여 0.2 μm 여과해수 300 μL에 혈구 100 μL를 혼합하여 ice위에 두고 사용하였으며 실험에 사용하기 전 광학현미경하에서 존재의 유무 및 상태를 확인하였다. Apoptosis는 여과해수에 혼합된 혈구를 200 g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하는

과정을 2회 거친 뒤 1 X annexin binding buffer 100 μL와 annexin V 5 μL, PI 2 μL를 넣고 15분간 incubation시킨 후 FL1-FL3 density plot에서 분석하였다 (Fig. 2).

4. 통계 분석

굴의 CI와 apoptosis 값의 월별, 지역별 유의차 분석은 OriginPro 8 SRO (ver 8, Origin Lab. Corp., USA) 를 사용하여 one-way ANOVA test로 분산분석한 후 Tuckey test (5% 유의 수준) 로 집단별 차이를 분석하였다.

결 과

1. 어장 환경

두 지역의 수온은 용담이 3.4-28.22℃, 의항이 5.5-27.40℃로 굴의 서식에 적합한 범위를 나타내었다. 수온의 상승은 용담 지역이 다소 빨랐으며, 수온 변화의 폭 또한 용담이 다소 컸으나 조사기간 내 굴의 대량 폐사가 발견되지는 않았다. 염분은 용담이 26.55-33.59 psu, 의항이 26.20-32.26 psu였으며 평균적으로 용담이 약간 낮은 값을 나타내었다. 조사 기간 동안 굴의 대량 폐사를 야기할 만한 급격한 염분의 변화는 관찰되지 않았다. pH는 용담이 7.08-8.22, 의항이 7.62-8.32의 범위를 나타내었다. 해수 중 용존산소는 용담이 5.61-14.40

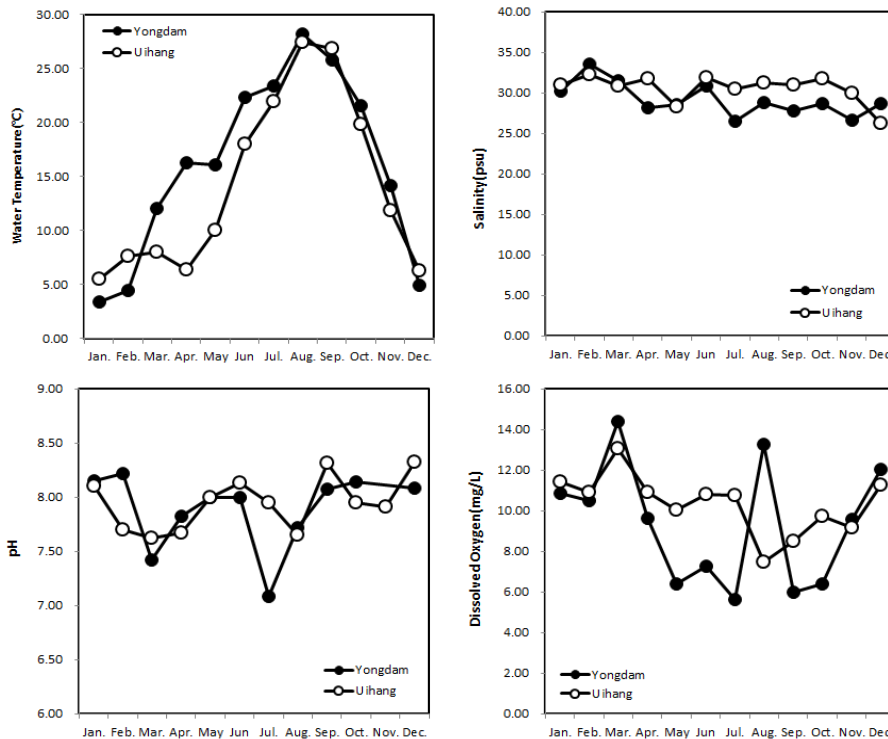


Fig. 3. Monthly changes of water temperature, salinity, pH and dissolved oxygen in Yongdam, Incheon and Uihang, Taean.

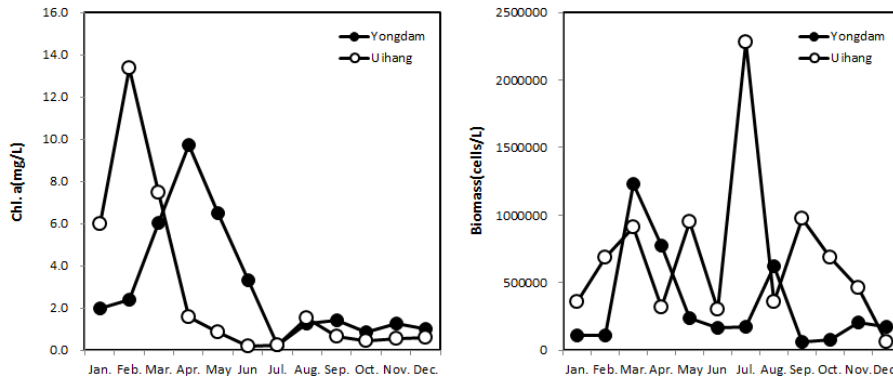


Fig. 4. Monthly changes of chl. a and biomass in seawater of Yongdam, Incheon and Uihang, Taean.

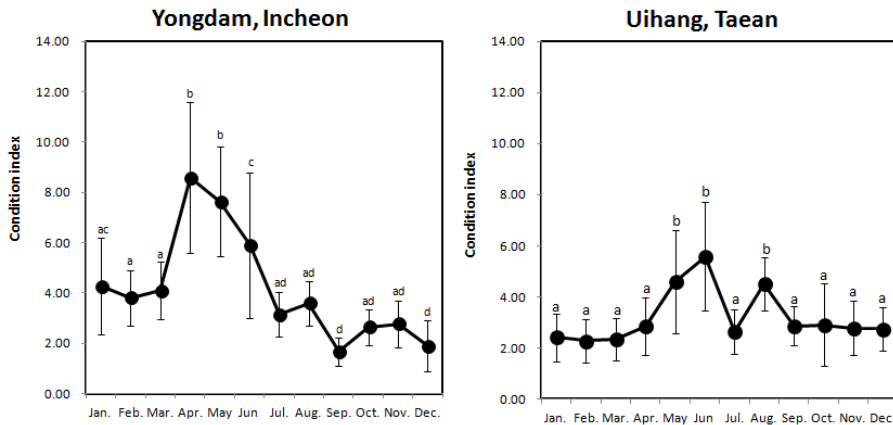


Fig. 5. Monthly changes of condition index in Pacific oysters, *C. gigas* by habitat. Values (mean \pm SE of 30 individuals) with different letters on the bar are significantly different ($p < 0.05$).

mg/L, 의항이 7.45-13.06 mg/L로 조사되었다 (Fig. 3). 이상의 결과, 수온, 염분, pH 및 용존산소는 용담 지역 굴 어장이 의항 지역에 비하여 다소 변동의 폭이 큰 것으로 조사되었다.

해수 내 chl. a의 농도는 용담이 0.24-9.72 mg/L (평균 3.01 mg/L) 였으며, 의항이 0.18-13.38 mg/L (평균 2.79 mg/L) 였다. 용담 어장의 chl. a 농도는 4월에 최대, 7월에 최소값을 나타내었으며, 의항 어장의 chl. a 농도는 2월에 최대값을 나타낸 이후 6월까지 지속적 감소를 나타내었고, 8월에 약간의 증가가 있었으나 이후 내내 0.5 mg/L 내외의 값을 유지하였다. 해수 내 biomass는 용담 어장이 6.18×10^4 - 123.2×10^4 cells/L (평균 33.0×10^4 cells/L), 의항 어장이 6.21×10^4 - 227.8×10^4 cells/L (평균 69.6×10^4 cells/L) 의 농도로 의항 어장이 다소 높은 경향을 나타내어 chl. a 농도와 일치하지 않는 경향을 나타내었다 (Fig. 4).

2. Condition index

두 지역 굴의 CI는 용담이 1.67-8.58, 의항이 2.28-5.57의 범위였다 (Fig. 5). 용담 굴의 월별 CI는 4월에 급증하여 가장 높은 값을 나타내었으며 이후 7월과 9월에 급격한 감소를 보였다. 의항 굴의 CI는 5월, 6월 및 8월이 다른 달보다 유의적으로 높았으며 ($p < 0.05$) 7월과 9월에 급격한 감소가 관찰되었다. CI값의 변동을 보아 용담과 의항 두 지역 모두 7월과 9월에 산란이 있었던 것으로 추정되며, 특히 용담 굴은 CI의 감소가 더욱 많아 산란 활동이 단기간에 집중적으로 있었던 것으로 판단된다. 두 지역의 CI값을 비교해보면 1월에서 5월까지 용담이 높았으며, 첫 번째 산란기를 지난 8월부터는 10월, 11월을 제외하고 의항에서 높았다 ($p < 0.05$).

3. 혈구의 apoptosis

PI와 annexin V에 반응시킨 혈구를 flow cytometry

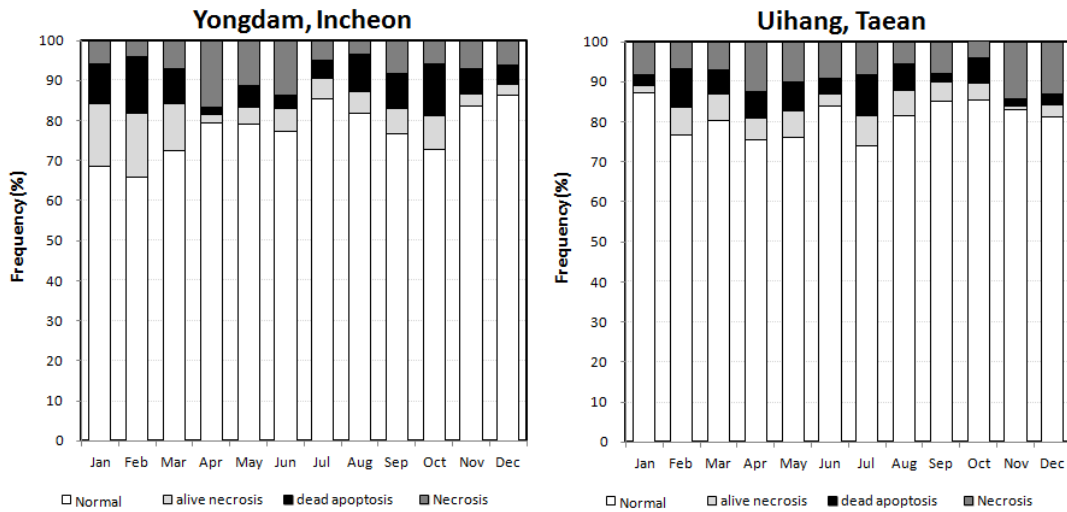


Fig. 6. Ratio of normal, apoptotic and necrotic hemocyte in Pacific oyster, *C. gigas* by habitat. Normal and alive apoptosis represent living hemocytes; dead apoptosis and necrosis represent dead hemocytes.

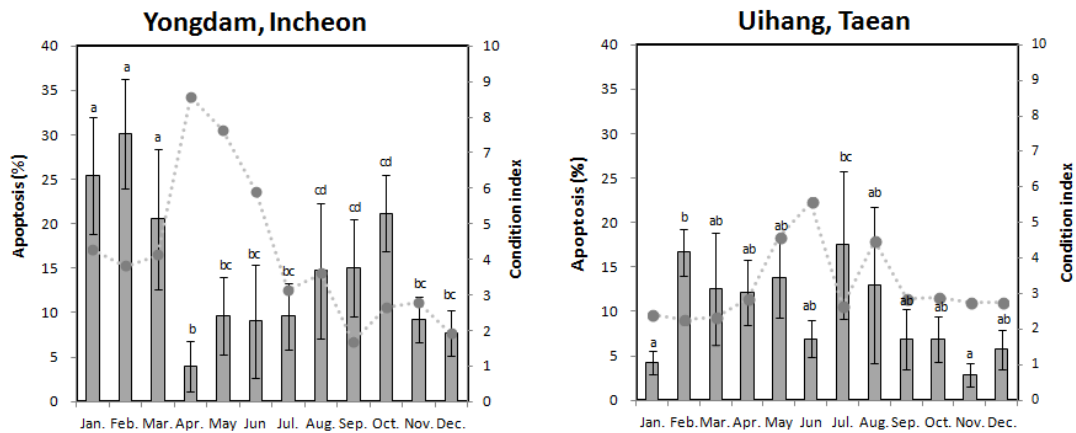


Fig. 7. Monthly changes of hemocyte apoptosis in Pacific oysters, *C. gigas* by habitat. Values (mean \pm SE of 30 individuals) with different letters on the bar are significantly different ($p < 0.05$). Dot lines represent condition index.

FL1-FL3 plot에서 관찰하여 정상, 괴사, programmed cell death가 진행되고 있는 apoptosis와 apoptosis로 인하여 사멸한 네 가지 상태로 분류하였다. 살아있는 혈구의 비율은 정상 세포와 programmed cell death가 진행되고 있는 apoptosis 세포를 종합하여 계산하였다. 그 결과, 용담산 굴 혈구의 생존율은 81.25-90.45% (평균 84.65%) 였으며, 의항산 굴은 81.01-89.84% (평균 85.61%) 로 비슷한 수준을 나타내었다 (Fig 6). Apoptosis는 programmed cell death가 진행되고 있는 세포와 이미 죽은 세포의 두 종류로 나눌 수 있었으며, 본 실험에서는 두 상태를 종합하여 apoptosis로 분류하였다. 그 결과, 용담산 굴의 apoptosis 비율은 4.03-30.15%였으며, 의항산 굴은 2.87-17.48%였다. 용담산 굴의 경우, CI가

낮았던 1월, 2월, 3월과 10월에 유의하게 apoptosis가 높았으며, 반대로 CI가 높았던 4월에는 apoptosis가 가장 낮은 것으로 조사되었다 ($p < 0.05$). 마찬가지로 의항산 굴에서도 CI가 낮았던 7월에 apoptosis가 가장 높았으며, CI가 높았던 6월에 apoptosis는 낮은 경향을 나타내었다 (Fig. 7).

토 론

Condition index는 어장 내 생물 현존량 및 수확된 생물량 간의 유의한 상관관계가 보고된 이래 패류 어장의 양식 수용력을 평가하기 위한 모니터링 프로그램 항목으로 지정되어 사용되는 등 실용적이고도 유용한 지표이다 (BAP, 2013;

Filgueira *et al.*, 2013; Smaal *et al.*, 2013). 이에 본 연구에서도 지역별, 계절적 굴의 비만도를 파악하기 위하여 CI를 분석한 결과, 용담에서는 4월에, 의항에서는 산란 직전인 6월에 최대값에 달하였다. 굴의 소비가 가장 많은 11월-2월에는 용담이 1.90-4.27 (평균 3.19), 의항이 2.28-2.77 (평균 2.55)의 범위로 조사되어 Kim 등 (2013b)의 결과와도 일치하는 경향을 나타내었다. 일반적으로 굴의 판매가를 높이기 위해서는 겨울철 CI 값이 높아야하나 두 어장의 굴은 봄철 혹은 산란 직전 CI 값이 높게 나타났으며 이는 어장내 chl. a의 변동과 높은 상관관계를 나타내었다. 특히, 두 지역 4월 CI값은 매우 다른 양상을 나타내었는데 이는 chl. a 농도와 매우 직접적인 상관관계를 나타내었다. 즉, 의항 지역의 chl. a 농도는 2월에 최대값을 나타낸 이후 급격한 감소를 나타내어 4월 이후 2.0 mg/L 이하로 유지된 반면, 용담에서는 3월-6월까지 chl. a 농도가 4.0 mg/L 이상으로 유지되어 두 지역의 CI변동과도 매우 밀접한 관계를 지니고 있음을 보여 주었다 (Fig. 4, 5). 양식 굴의 생산성은 수온, 염분, 용존산소, 먹이생물 등의 환경 요인에 의하여 좌우되며, 양식 굴의 성장과 질병 이외의 폐사는 환경 요인 중 수온과 먹이생물의 영향을 가장 많이 받는다고 보고되고 있다 (Cherkasov *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2013a). 이에 본 연구에서는 식물플랑크톤의 biomass와 chl. a 농도를 병행하여 조사하였으나 CI 값은 biomass보다 chl. a의 농도와 밀접한 관계를 지니는 것으로 파악되었다. 두 어장의 biomass 조사 시 종 구성과 우점종을 분석한 결과, biomass값이 높은 시기에는 종 구성의 다양성이 낮아지고, 특정 종의 비율이 증가하는 것으로 조사되었다 (미발표자료). 따라서 biomass의 증가가 패류의 먹이 섭취 증가로 반드시 연결되지는 않는 것으로 판단되며, 향후 굴 수확시기, 즉 겨울철 chl. a 농도를 높이기 위한 방안 마련 연구가 요구된다.

패류는 외부 환경 변화, 질병, 기생 생물 등의 스트레스 요인에 대하여 개방혈관계 내에서 순환하는 헤모사이트로 세포성 면역 반응을 한다 (Cheng, 1981). 패류의 혈구는 granulocyte, hyalinocyte 및 hemoblast cell의 세 그룹으로 대별된다. Hemoblast cell은 성숙하여 agranulocyte가 되고, 이것이 성숙하여 점차 사이즈가 커지며 과립을 축적하여 granulocyte로 발달하는 것으로 알려져 있다 (Freitas Rebelo *et al.*, 2013). 혈구의 본질적 면역 반응은 granulocyte가 담당하며 (Janeway, 1994; Foley and Cheng, 1975) 수온의 급변 등 스트레스 요인이 발생하면 granulocyte의 사세포 비율이 증가하므로 granulocyte의 비율은 패류의 면역력 상태를 알아보는 좋은 하나의 지표가 된다 (Hegaret *et al.*, 2003a). 따라서 본 실험에서는 granulocyte를 대상으로 apoptosis를 분석하였다.

굴은 광온, 광염성 종으로 수온에 대한 내성은 $-1.8-35^{\circ}\text{C}$ 까지 생존이 가능하나 수온 4°C 이하, 염분 10 psu 이하에서는 폐사율이 증가하며 정상적 생식이 불가능하다 (Mann *et al.*, 1991). 또한 수온 $8-15^{\circ}\text{C}$ 에서는 폐사 개체가 발견되지 않는 반면 30°C 이상에서는 폐사율이 급증하는 것으로 보고된 바 있다 (Shpigel *et al.*, 1992). 이밖에 급격한 수온의 상승은 서식 생물의 미토콘드리아 기능 장애와 에너지 요구량 증가를 초래하여 주변 스트레스 요인에 대한 민감성을 증대시킨다고 보고되고 있다 (Sokolova *et al.*, 2004; Cherkasov *et al.*, 2007). 본 연구에서도 급격한 수온의 변화가 있었던 시기에는 대체적으로 apoptosis가 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다 (영흥 2월, 의항 5월 등). 또한 수온의 급변 시기 외에 CI가 급격히 낮아지는 시기에 역으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 산란기의 CI와 apoptosis간 역상관관계가 명확하게 관찰되었다 (Fig. 7). 이는 생식소가 발달하게 되면 생식소 조직의 유지를 위해 에너지 요구량이 증가하므로 외부 스트레스 요인이 발생하더라도 혈구의 면역 반응 활동을 위해 에너지를 전용할 수 없는 때문으로 여겨진다. 본 연구에서는 기존의 혈구 면역 반응 지표로 이용되는 viability, phagocytosis나 ROS 대신 apoptosis를 분석 항목으로 사용하였다. 이는 본 연구진의 선행 연구나 타 연구자들의 실험에서 상기 항목의 장기적 변동을 모니터링하는 경우, 일정한 경향의 파악이 어려웠기 때문이다 (Fisher *et al.*, 1996; Delaporte *et al.*, 2006). Viability의 경우, 여러 연구에서 스트레스 요인이 발생하더라도 일정한 값을 유지하는 것으로 보고하고 있다 (McCormick-Ray and Howard, 1991; Hegaret *et al.*, 2003a). Phagocytosis에 관해서는 다양한 연구 결과가 발표되었으나 어떤 외인성 요인 혹은 내인성 요인들과 관련되어 반응하는지에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다 (Delaporte *et al.*, 2006). 또한 수온, 에너지 보유 정도 등 상황에 따라 반응 패턴이 다양하게 보고되고 있으며, phagocytosis 활동의 산물로 여겨지는 ROS양과 phagocytosis간 상관관계가 명확하지 않은 경우도 빈번하여 결과 해석에 어려움을 겪는 경우가 종종 발생했다. 따라서 본 연구에서는 혈구의 apoptosis 분석을 통한 건강도 평가 지표를 정립하고자 하였다. 그러나 본 연구에서 분석한 apoptosis 값 또한 두 지역간 계절적 변화 패턴이 일치하지 않아 apoptosis를 일으키는 요인이 장기간에 걸친 계절적 변동이 아닌 짧은 기간 동안의 스트레스 요인에 기인함을 확인할 수 있었다. 이처럼 혈구의 면역 반응 정도에 따른 건강도 평가는 혈구의 반응 값을 이해할 수 있는 다양한 요인의 조사가 병행되어야 한다. 이에 본 실험에서는 condition index와의 비교 검토를 실시하였고 그 결과, 두 항목간 뚜렷한 역상관관계를 관찰할 수 있었다. 이 결과는 굴의 혈구를 이용한 건강도 평가

지표를 정립해 감에 있어 condition index와의 종합 검토가 매우 유용함을 시사해 준다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 연구사업“갯벌참굴 양식생산성 향상 연구 (RP-2014-AQ-99)” 의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., and Ford, S.E. (2002) Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, **13**: 141-158.
- BAP. (2013) Best aquaculture practices standards, guidelines. Mussel farms. <http://www.gaalliance.org>
- Bugge, D.M., Hegaret, H., Wikfors, G.H., and Allam, B. (2007) Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) hemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, **23**: 188-196.
- Cheng, T.C., (1981) Bivalves. *In*: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate Blood Cells*: Academic Press, London, pp. 233-299.
- Cherkasov, A.S., Grewal, S., and Sokolova, I.M. (2007) Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Therm. Biol.*, **32**: 162-170.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., and Samain, J.F. (2006) Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture*, **254**: 571-582.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Degremont, L., Boudry, P., and Samain, J.F. (2007) Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **353**: 45-57.
- Estevez-Calvar, N., Romero, A., Figueras, A., and Novoa B. (2013) Genes of the mitochondrial apoptotic pathway in *Mytilus galloprovincialis*. *PLOS ONE*, **8**(4): 1-13.
- FAO, (2012) Fishstat. FAO Fishery and Aquaculture Global Statistics.
- Filgueira, R., Comeau, L.A., Landry, T., and Mallet, A. (2013) Bivalve condition index as an indicator of aquaculture intensity: a meta-analysis. *Ecol. Indic.*, **25**: 215-229.
- Filgueira, R., Guyondet, T., Comeau, L.A., and Grant, J. (2014) Physiological indices as indicators of ecosystem status in shellfish aquaculture sites. *Ecol. Indic.*, **39**: 134-143.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., and Edwards, P. (1996) Hematologic and serologic variability of Eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. *J. Shellfish Res.*, **15**: 555-564.
- Foley, D.A., and Cheng, T.C. (1975) A quantitative study of phagocytosis by haemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **25**: 189-197.
- Foster, B., Grewal, S., Graves, O., Hughes, F.M., and Sokolova I.M. (2011) Copper exposure affects hemocyte apoptosis and *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Fish & Shellfish Immunology*, **31**: 341-349.
- Freitas Rebelo, M., Souza Figueiredo, E., Mariante, R.M., Nobrega, A., Barros, C.M., and Allodi, S. (2013) New Insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLOS ONE*, **8**: 1-6.
- Goedken, M., and Guise, S. (2004) Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunology*, **16**: 539-552.
- Hegaret, H., Wikfors, G.H., and Soudant, P. (2003a) Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation : I. Haemocyte types and morphology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **293**: 237-248.
- Hegaret, H., Wikfors, G.H., and Soudant, P. (2003b) Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation : II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **293**: 249-265.
- Hughes, F.M., Foster, B., Grewal, S., and Sokolova, M. (2010) Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish & Shellfish Immunology*, **29**: 247-257.
- Hyun, M.S., Woo, W.H., Hur, J.M., Kim, D., and Mun, Y.J. (2008) The role of ROS and p38 MAP kinase in Berberine-induced apoptosis on human hepatoma HepG2 cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **51**(2): 129-135.
- Janeway, C.A. (1994) The role of microbial pattern recognition in self/nonself discrimination in innate and adaptive immunity. *In*: Hoffmann, J.A., Janeway, C.A., Natori, S. (Eds.), *Phylogenetic Perspectives in Immunity, The Insect Host Defence*, RG Landes, Austin, TX: pp. 115-122.
- Kim CW, Oh H.J. and Shin Y.K., (2013a) Effects of water temperature on the mass mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Gamak Bay. *Korean J. Malacol.*, **29**: 245-250.
- Kim, S.K., Shim, N.Y., Lee, W.Y., Choi, M.S., Choi, E.H., and Lim, H.J. (2013b) Morphological and physiological comparison between triploid and diploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Korean J. Malacol.*, **29**(3): 217-223.
- Kobayashi M., Hormann E.E., Powell E.N, Klinck J.M. and Kusaka K. (1997) A population dynamics model

- for the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **149**: 285-321.
- La Peyre, J.F., Chu F.L., Movern J.A. (1995a) Hemocytic and humoral activities of eastern and pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol.*, **5**: 179-190.
- La Peyre, J.F., Chu F.L., Vogelbein W.K. (1995b) In vitro interaction of *Perkinsus marinus* merozoites with eastern and pacific oyster hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, **19**: 291-304.
- Lawrence, D.R. and Geoffrey, I.S. (1982) The determination and use of condition index of oysters, *Estuaries Research Federation.*, **5**(1): 23-27.
- 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, *Kor J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**(3): 259-266.
- Lim, H.J., Back, S.H., Lim, M.S., Choi, E.H., and Kim, S.K. (2012) Regional variations in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* growth and the number of larvae occurrence and spat settlement along the west coast, Korea. *Korean J. Malacol.*, **28**(3): 259-267.
- Lutz, R.A., Incze, L.S., Porter, B., and Stotz, J.K. (1980) Seasonal variation in the condition of raft-cultured mussels (*Mytilus edulis* L.). *Proc. World Maricul. Soc.*, **11**: 262-268.
- Mann, R., Burreson E.M., Baker P.K. (1991) The decline of the Virginia oyster fishery in Chesapeake bay: Considerations for introduction of a non-endemic species, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of shellfish research*, **10**: 379-388.
- McCormick-Ray, M.G. and Howard, T. (1991) Morphology and mobility of oyster hemocytes: Evidence for seasonal variations. *Journal of Invertebrate pathology*, **58**: 219-230.
- MIFAFF. (2012) Food, agriculture, forestry and fisheries statistical yearbook, MIFAFF. 477p.
- MOMAF. (2005) Standard methods for the examination of sea water, sediment and marine organism. Ministry of Maritime Affairs & Fisheries. 389p.
- Orban, E., Di Lena, G., Nevigato, T., Casini, I., Marzetti, A. and Caproni, R. (2002) Seasonal changes in meat condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultures in two different Italian sites. *Food Chem.*, **77**: 57-65.
- Shpigel, M., Barber B.J., Mann, R., (1992) Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **161**: 15-25.
- Smaal, A.C., Schellekens, T., van Stralen, M.R., and Kromkamp, J.C. (2013) Decrease of the carrying capacity of the Oosterschelde estuary (SW Delta, NL) for bivalve filter feeders due to overgrazing? *Aquaculture.*, **404-405**: 28-34.
- Sokolova, I.M., Evans, S., and Hughes, F.M. (2004) Cadmium-induced apoptosis in oyster haemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J. Exp. Biol.*, **207**: 3369-3380.