

Article

Single Cell PCR과 현미경을 통한 바지락 및 백합 유생의 동정

정승원¹ · 김창수² · 유재원² · 김영옥¹ · 이진환³ · 홍재상^{4*}

¹한국해양연구원 남해특성연구부
(656-830) 경상남도 거제시 장목면 장목리 391

²한국연안환경생태연구소
(421-808) 경기도 부천시 삼정동 36-1 쌍용테크노파크 3차 801~803호

³상명대학교 자연과학대학 그린생명과학과
(110-743) 서울시 종로구 홍지동 7

⁴인하대학교 자연과학대학 해양과학과
(402-751) 인천 남구 용현동 253

Identification of *Ruditapes philippinarum* and *Meretrix lusoria* Larvae Using Single Cell PCR Analysis and Microscopic Observation

Seung Won Jung¹, Chang-Soo Kim², Jae-Won Yoo², Young-Ok Kim¹,
Jin Hwan Lee³, and Jae-Sang Hong^{4*}

¹South Sea Environment Research Department, KORDI
GeoJe 656-830, Korea

²Korea Institute of Coastal Ecology, Inc.
Bucheon 421-808, Korea

³Department of Green Life Science
College of Natural Sciences Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

⁴Department of Oceanography, College of Natural Sciences
Inha University, Incheon 402-751, Korea

Abstract : Single cell PCR analysis and light and scanning electron microscopic techniques were utilized to identify free living bivalve larvae in the coastal waters of Tae-an, on the west coast of Korea. Through DNA sequencing, venerid clam larvae were isolated and identified as *Ruditapes philippinarum* (99% similarity) and *Meretrix lusoria* (99%). Under microscopic observation, the D-veliger stage of *R. philippinarum* exhibited symmetrical shoulder angles and an elliptical ventral form. In contrast, *M. lusoria* displayed asymmetrical shoulder angles and a round ventral form in the umbonal stage. Size of the *R. philippinarum* larvae was $156 \pm 22 \mu\text{m}$ in length, $126 \pm 12 \mu\text{m}$ in height, $92 \pm 14 \mu\text{m}$ in width with a length: height ratio of 1.23. *Meretrix lusoria* was $202 \pm 44 \mu\text{m}$ in length, $161 \pm 35 \mu\text{m}$ in height, $96 \pm 38 \mu\text{m}$ in width with a length: height ratio of 1.25. Experimental results indicate that morphological and molecular characteristics provide evidence for the larval identification of these two venerid clam larvae species in nature.

Key words : Single cell PCR, bivalve larvae, *Ruditapes philippinarum*, *Meretrix lusoria*, microscopic observation

1. 서 론

바지락(*Ruditapes philippinarum*) 및 백합(*Meretrix lusoria*)은 백합목(Oder Veneroida), 백합과(Family Veneridae)에 속하는 중요 식용 이매패류로 한국, 일본열도, 필리핀 제도를 포함하여 중국, 인도차이나 반도 동부 연안에 이르기까지 아시아 대륙의 사질 및 니사질 조간대에 주로 서식하고 있다(Jayabal and Kalyani 1986; Chew 1989; Ho and Zheng 1994; Liu et al. 2006). 특히, 바지락은 북미 대륙의 태평양 연안, 하와이 제도, 이탈리아 등에서도 분포를 한다(Yap 1977; Chew 1990). 이는 1920년대 이후 일본에서 들여온 참굴의 이식용 종묘에 혼입되어 반출된 바지락에서 유래된 것으로 보고되고 있다(Chew 1990).

우리나라 서해 및 남해안 조간대 사질과 니질에 주로 분포하는 백합과의 패류들은 고급 품종으로 각광받고 있다(송 등 2008). 특히 식용 이매패 중에서 참굴(*Crassostrea gigas*) 다음으로 생산량이 많은 바지락은 주로 조간대에서 양식이 이루어지고 있으며, 연간 패류 총 생산량의 약 18%를 차지하는 중요 이매패류이나, 전체 생산량은 1990년대 초반 이후로 점차 감소하고 있으며, 특히 전체 패류 생산량의 50% 이상을 차지하는 서해안의 경우 지속적으로 생산량의 감소를 보이고 있다(해양수산부 2006). 우리나라 패류에 관한 연구는 산지별 특성, 서식환경, 이차생산 및 성장, 개체군 역학, 비만도 및 치패 출현, 폐사 현상 등 성체의 생산량 증대와 관련된 연구가 주를 이루고 있다(유 등 1978; 김 1986; 윤 1992; 조 등 1995; 김 2005; 송 등 2008). 그러나, 해양 무척추동물 개체군의 성체 분포가 부유 유생기와 매우 밀접한 연관성을 가짐에도 불구하고, 아직까지 이매패류의 유생 생태뿐만 아니라 유생 동정에 대한 연구도 매우 미비한 실정이다(허와 허 2000; Sastry 1965; Underwood and Fairweather 1989; Sekiguchi et al. 1995; Garland and Zimmer 2002). 이와 같이 부유 유생에 대한 연구가 전반적으로 부족한 원인은 바지락을 비롯한 이매패류의 부유유생 중 답류자

(trochophora stage) 및 변태기(pediveliger stage)가 각각 다르며 다른 이매패류와 크기 및 모양이 비슷하여 동정이 어렵기 때문이다. 그러나 유용 이매패류의 생산성 증대라는 측면에서는 부유유생 기간 동안의 이들의 환경요인의 변동에 따른 개체군 동태를 밝히는 것은 매우 중요하며 이를 위해 현미경적인 크기의 유생에 대한 정확한 동정은 필수조건이다. 따라서, 본 연구는 태안 갯벌형 바다목장 해역에서 출현한 이매패 유생을 채집하여 single cell PCR 및 미세 형태구조를 통한 종 동정을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

이매패 유생의 채집

태안 갯벌형 바다목장 해역 내 이매패류 유생의 채집은 태안군 고남면 소재 옷점 연안의 조하대 정점(36°24'38.99"N, 126°24'21.83"E)에서 채집하였다. 조사기간은 Chung et al. (2005) 및 Choi et al. (2005), 일본의 全國沿岸漁業振興開發協會 (1996) 등의 바지락의 봄철 산란의 보고에 맞추어 2006년 12월부터 2007년 7월까지 8개월 동안 월 2회, 대조기의 만조시에 실시하였다. 이매패 유생의 채집은 이들이 다양한 공간에 걸쳐 불균일한 패치상으로 분포하며, 각정기 및 성숙기 유생이 거의 항상 저층이나 해저 직상층에 분포함을 고려하여 망목 50 µm 크기의 Kitahara형 플랑크톤 네트로 수평 및 수직 정량 예인하였다. 채집 후 시료는 선상에서 80% 에탄올로 고정 후 냉장 보관하였다. 이렇게 채집된 이매패류의 부유 유생은 해부 현미경(SZX9, Olympus, Japan)에서 계수하였다(Table 1).

Single Cell PCR

시료는 실험실로 운반하여 Capillary method를 통하여 광학 현미경(Axioskop 40, Zeiss, Germany) 하에서 한 개체씩 분리하여 PCR tube에 보관하였다. 이때 PCR 비증폭 및 분석오류를 최소화하기 위하여 10회 반복 실험하였다. PCR tube에 보관된 유생들은 single cell PCR을 수행하기 위하여 lysis buffer[SDS(0.005%) and proteinase K

Table 1. Collection of free-living bivalve larvae in bi-weekly sampling periods

Year	2006					2007										
	Month	12	12	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7
Abundance ($\times 10^3$ ind./m ³)		0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	37	12	4	7	1
DNA analysis																
<i>R. philippinarum</i>		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	○	×	×	×
<i>M. lusoria</i>		×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	○	○	○	×
Morphological analysis																
<i>R. philippinarum</i>		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	○	×	×	×
<i>M. lusoria</i>		×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	○	○	×

(400 ng μl^{-1}) 5 μl 를 넣고 액체 질소(10분)와 60°C water bath(30분)간 동결 및 용해를 3회 반복하여 세포를 파괴하였다. 이후, proteinase K의 활성을 억제하고자 95°C 10분 동안 가열 후, 실험 전까지 Deep freezer(-80°C)에서 보관하였다(Kai et al. 2006).

바지락과 백합 유생에 대한 PCR은 이매패류 특이적 유전정보가 있는 Internal Transcribed Spacer(ITS) 부위를 증폭하였다(Heath et al. 1995). Primer는 ITS 부위 (Forward; 5'-dGTTTCCGTAGGTGAACCTG-3', Reverse; 5'-dCTCGTCTGATCTGAGGTCG-3')로 각각 0.3 μM , MgCl_2

(1.5 mM), dNTP (each 200 1.5 μM), 2.5 units의 Taq DNA polymerase (EX taq, Takara, Japan)와 PCR buffer를 넣어 총 부피를 50 μl 에 맞춰서 투입하여 thermal cyclor(TP-600, Takara, Japan)를 이용하여 증폭하였다. 이때 증폭 조건은 94°C(5 min) 1회, 94°C(30 sec) - 55°C (40 sec) - 72°C (50 sec) 30회, 72°C(7분)로 하였다. 증폭된 PCR 산물은 Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen, 28104)으로 정제하였다. 정제된 산물은 Thermo-Sequence™ 2.0 sequencing kit(USB, Ohio, USA)과 Dual Dye automated sequencer(Model 4200, LI-COR, USA)로

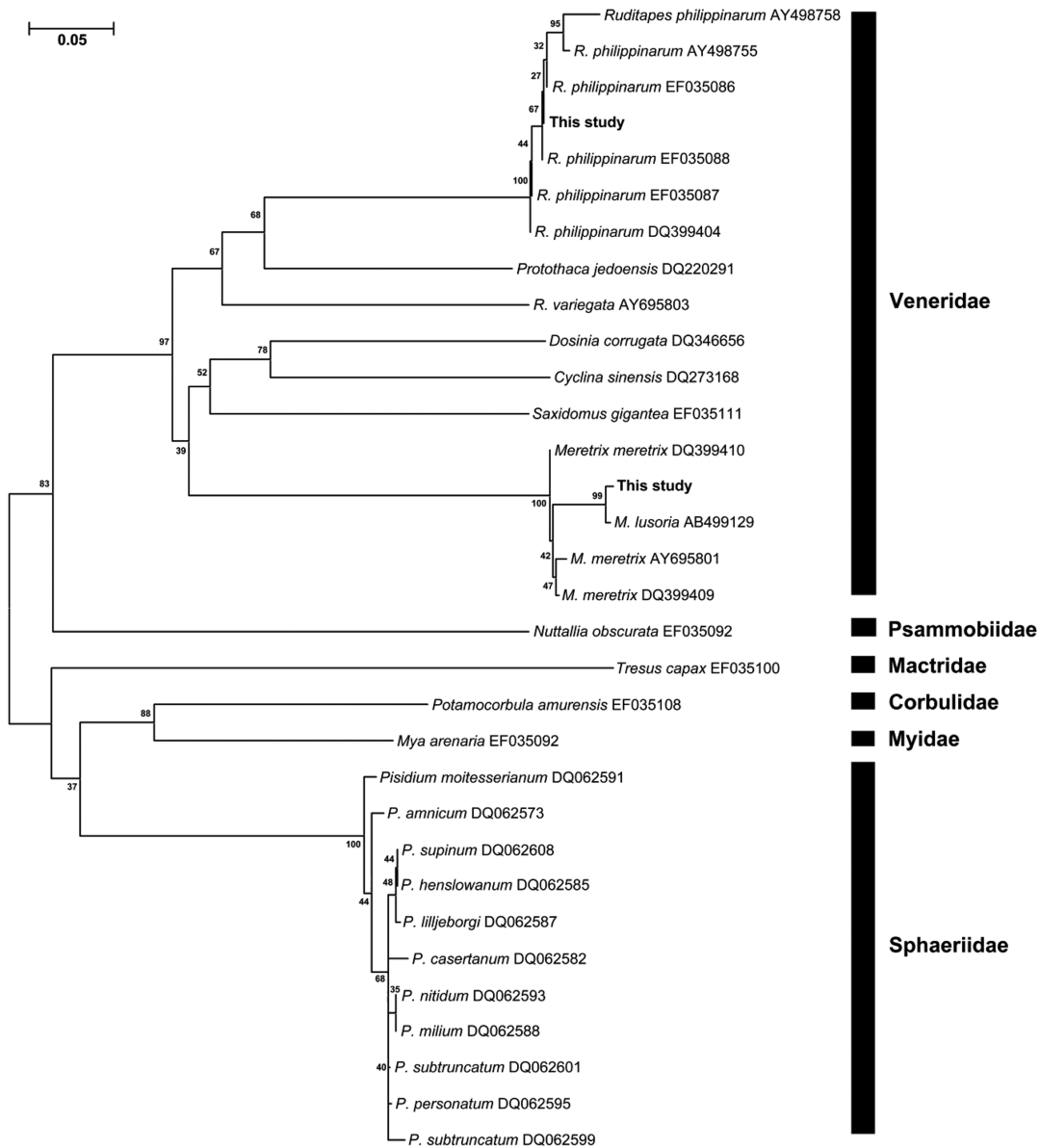


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method using the Kimura 2-distance model and ITS1 partial sequences, 5.8s rDNA complete sequences and ITS2 partial sequences based on the present study and Genbank database. The complete deletion option was selected for gaps/missing data. Numbers above branches represent percentages of 1,000 bootstrap replications; bootstrap values are shown above the internodes.

염기서열을 분석하였고, 얻어진 염기서열은 Genbank의 BLAST search를 통해 가장 근접한 종들을 찾아 database 하였다. 이렇게 정리된 database의 염기서열의 정렬은 clustal W 방법으로 Bio-edit 7.0.5.2(Hall 1999)을 통해 분석하였다. 계통수 분석은 neighbor-joining (NJ) algorithm으로, genetic distance는 Kimura 2-parameter distance model과 1000 replications의 bootstrap으로 분석하였다. Pairwise distance는 0.5 γ distributed rate로 Kimura 2-parameter model을 통해 분석하였다. 계통수 및 pairwise distance 분석은 MEGA 2.0 program을 이용하였다 (Charrel et al. 1999).

현미경 관찰

광학현미경(LM) 및 주사전자현미경(SEM) 관찰을 위하여 시료는 capillary를 통하여 이때패 유생을 분리하였다. 이렇게 분리된 시료는 Axioskop 40 광학현미경에서 MRc5 CCD camera로 촬영하였다. SEM 관찰을 위한 시료는 Osmium tetroxide와 saturated mercuric chloride 고정액(5:1 v/v)으로 10분간 고정 및 tert-butanol로 10분간 치환 후 Hexamethyldisilazane로 건조하였다. 이렇게 건조된 시료는 aluminum stub에 올려놓은 뒤 gold-palladium으로 코팅(MSC-101, Jeol, Japan) 후 주사전자현미경(5600LV, Jeol)으로 관찰하였다(Jung et al. 2010).

Table 2. Genetic distance of analyzed sequences of *Ruditapes philippinarum* and *Meretrix lusoria* larvae as estimated by the Kimura 2-parameter model. All results are based on pairwise analysis. G.D; genetic distance, S.E; standard error. Full genus names are shown in Fig. 1

Analyzed sequences	<i>R. philippinarum</i>		<i>M. lusoria</i>	
	G.D	S.E	G.D	S.E
<i>R. philippinarum</i> EF035087	0.00362	0.00363	0.47627	0.05524
<i>R. philippinarum</i> DQ399404	0.00362	0.00363	0.47627	0.05524
<i>R. philippinarum</i> EF035086	0.00000	0.00000	0.48368	0.05605
<i>R. philippinarum</i> AY498758	0.02202	0.00904	0.51250	0.05895
<i>R. philippinarum</i> EF035088	0.00000	0.00000	0.48368	0.05605
<i>R. philippinarum</i> AY498755	0.01092	0.00632	0.48290	0.05580
<i>R. variegata</i> AY695803	0.36571	0.04461	0.45930	0.05286
<i>P. jedoensis</i> DQ220291	0.30578	0.03990	0.44079	0.05148
<i>D. corrugate</i> DQ346656	0.40767	0.04821	0.41447	0.04895
<i>S. gigantean</i> EF035111	0.39465	0.04690	0.47225	0.05392
<i>C. sinensis</i> DQ273168	0.40428	0.04857	0.49120	0.05690
<i>M. lusoria</i> AB499129	0.48368	0.05605	0.00727	0.00516
<i>M. meretrix</i> DQ399410	0.45600	0.05335	0.03708	0.01182
<i>M. meretrix</i> AY695801	0.46319	0.05413	0.04870	0.01369
<i>M. meretrix</i> DQ399409	0.46319	0.05413	0.04092	0.01246
<i>P. amurensis</i> EF035108	0.55838	0.06195	0.59012	0.06520
<i>P. subtruncatum</i> DQ062601	0.52993	0.05958	0.57084	0.06433
<i>P. amnicum</i> DQ062573	0.53664	0.06006	0.57084	0.06433
<i>P. supinum</i> DQ062608	0.54493	0.06106	0.58036	0.06570
<i>P. personatum</i> DQ062595	0.52993	0.05958	0.57084	0.06433
<i>P. nitidum</i> DQ0625593	0.53768	0.06041	0.57932	0.06534
<i>P. moitessierianum</i> DQ062591	0.52229	0.05878	0.56439	0.06399
<i>P. henslowanum</i> DQ062585	0.54493	0.06106	0.58036	0.06570
<i>P. casertanum</i> DQ062582	0.55287	0.06193	0.58690	0.06603
<i>M. arenaria</i> EF035092	0.53565	0.05972	0.56625	0.06276
<i>T. capax</i> EF035100	0.65647	0.07409	0.71379	0.08360
<i>N. obscurata</i> EF035095	0.52866	0.05915	0.64821	0.07329
<i>P. milium</i> DQ062588	0.53768	0.06041	0.57932	0.06534
<i>P. subtruncatum</i> DQ062587	0.52993	0.05958	0.58594	0.06570
<i>P. lilljeborgi</i> DQ062587	0.55287	0.06193	0.57181	0.06466

3. 결 과

채집된 이매패류 유생의 개체수 및 PCR 분석 결과는 Table 1과 같다. 조사기간 중 바지락은 5월에 집중적으로 출현하였고, 백합 유생은 4월에서 6월까지 장기적으로 출현하였다. 분석된 시료의 1108 bp의 염기서열들은 바지락 (*Ruditapes philippinarum*, Accession number: EF035088) 과 99%의 상동성을 보였다(Fernández et al. 2000). 이를 가지고 백합과(Veneridae)를 구성하는 종들의 계통을 분석한 결과 *R. philippinarum*과 동일 계통을 형성하였다(Fig.

1). 또 다른 시료의 904 bp의 염기서열은 백합(*Meretrix lusoria*, AB499129)와 99% 상동성으로, 0.007의 유전거리를 가지고 있었다(Table 2).

형태학적 특징에서, 바지락 유생은 D-veliger stage로 직선상 인대(straight-hinge)를 띠고 있었으며, 백합 유생은 prodissoconch I, II가 형성된 후 edged 된 umbonal stage를 나타내고 있었다(Fig. 2). 바지락 유생의 평균 크기는 각장이 156±22 µm, 각고가 126±12 µm로 각장과 각고의 비율은 1.23을 나타내었다. 또한 각폭은 92±14 µm이었다 (Table 3). 백합 유생의 평균 길이는 각장이 202±44 µm,

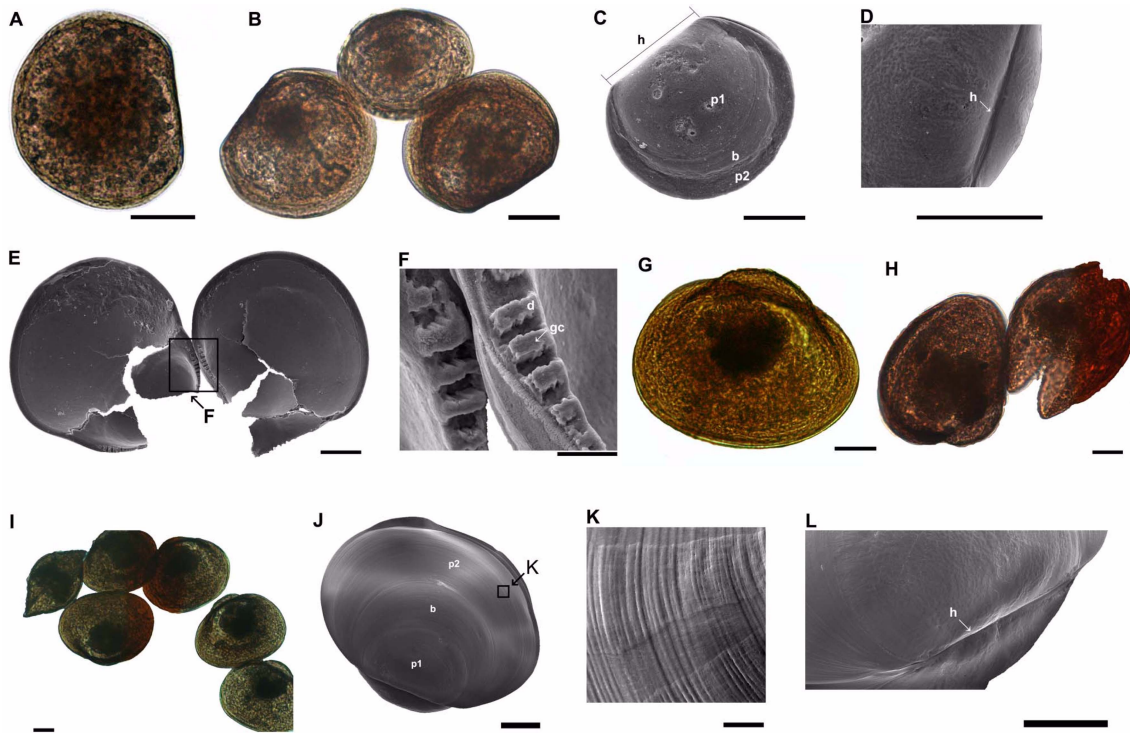


Fig. 2. Morphology of *Ruditapes philippinarum* in a D-veliger stage (A-F) and *Meretrix lusoria* in an umbonal stage (G-L) as observed by LM (A-B and G-I) and SEM (C-F and K-L). *R. philippinarum*. (A-B) External view ; (C) Lateral view, showing hinge (h), prodissoconch I shell (p1), prodissoconch II shell (p2), and prodissoconch I/II boundary (b); (D) Dorsal view, showing straight hinge (h); And, (E-F) Internal view, showing denticles (d). The crown of each denticle bears a groove (gc). *M. lusoria*. (G-I) External view ; (J) Lateral view, showing prodissoconch I shell (p1), prodissoconch II shell (p2), and prodissoconch I/II boundary (b); (K) Shell surface in area of prodissoconch II; and, (L) Dorsal view, showing edged hinge (h). (A-E, G-J and L) Scale bar: 50 µm; (F and K) scale bar: 10 µm.

Table 3. Morphological characteristics of isolated bivalve larvae (unit: µm)

Species	Length (n)	Height (n)	Width (n)	Length/Height	Morphological characters
<i>Ruditapes philippinarum</i>	156±22 (62)	126±12 (94)	92±14 (4)	1.23	D-shape: yellow color, symmetrical shoulder angles, elliptical ventral form, straight hinge shell
<i>Meretrix lusoria</i>	202±44 (43)	161±35 (33)	96±38 (9)	1.25	Umbonal shape: yellow color, asymmetrical shoulder angles, round ventral form, knobby umbone, edged hinge plate

각고가 $161 \pm 35 \mu\text{m}$, 각폭이 $96 \pm 38 \mu\text{m}$ 을 나타내었고, 각장과 각고의 비율이 1.25로 바지락 유생보다 크기가 컸다 (Table 3).

4. 고찰

Single-cell PCR 결과, 채집된 이매패류 유생은 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)과 백합(*Meretrix lusoria*)과 99% 이상의 높은 유전적 상동성을 가지고 있었다. 그러나, 바지락은 *R. variegata*(AY695803)의 genetic distance 와 0.37로 큰 유전적 차이를 보였다(Table 2). 이는 미토콘드리아 16s rRNA 계통분석시의 유전적 차이와도 유사하였다(Canapa et al. 2003). Canapa et al. (2003)은 *Ruditapes* 속의 종들은 다중계통(Polyphyletic lineage)으로 종간(種間)의 유전적 차이가 커서, 분류체계의 재정립이 필요하다고 주장하였다. 따라서 *Ruditapes* 속의 분류체계에 있어, 향후 심도 있는 연구가 제기되는 부분이다. 본 조사해역인 태안 갯벌형 바다목장은 바지락의 주 서식지이며, 백합도 채집됨을 감안할 때, 본 연구에서 분석된 염기서열은 바지락과 백합의 유생의 것이라 판단된다. 그러나, *Meretrix* species에 속하는 종 중 *M. lusoria*는 *M. petechialis*, *M. meretrix*의 genetic distance는 본 연구와 같이 (Table 2), 각각 0.0460과 0.0438로 차이가 거의 없을 뿐만 아니라, 유생의 형태도 유사하여, sister group 간의 정확한 분류기준이 마련되어야 한다(Liu et al. 2006; Pan et al. 2006; Chen et al. 2009).

이매패류 유생은 각장(length), 각고(height), 각폭(width) 및 각장과 각고의 비율, anterior와 posterior의 형태, umbo 모양 및 색깔, 그리고 접변(hinge)과 인대(ligament)의 형태에 의존하여 동정하고 있다. 특히 접변(hinge)의 이빨(denticle) 또는 인대의 생김새(ligament shape)는 유생의 동정에 중요한 분류학적 기준이 된다(Sakai and Sekiguchi, 1992; Evseev et al. 2001). 이매패 유생의 생활사는 수온에 따라 다르나 가리비류(*Aequipecten irradians concentricus*)의 경우 산란에서부터 답륜자기(trochophore stage)까지 약 24시간이 소요되며(Sastry 1965), 이후 prodissoconch I 과 II가 형성되는 D-veliger stage(L2) (Martel et al. 1995), metamorphosis를 준비하는 피면자기(pediveliger stage) (L3), CaCO₃ 침적에 의한 불투명한 larval shell이 형성되는 단계(L4)로 구분이 된다(Nichols and Black 1994). 채집된 바지락 유생은 D-veliger stage로 관찰된 개체들은 크기가 대부분 유사하여 동시적인 산란후의 부유 유생기를 거치고 있음을 판단할 수 있었다. 특히 접변중 이빨은 8-10개를 보여 Sakai and Sekiguchi (1992)가 보고한 D-shape상의 바지락 유생의 접변 이빨의 모양과 일치하였다. 기존 문헌에 따른 크기와 비교하면, Hur (2005)는

각장이 평균 $104 \mu\text{m}$ 라고 보고하였고, Holland and Chew (1974)는 $100-110 \mu\text{m}$ 로 보고하여 본 결과보다 $50 \mu\text{m}$ 이상 작았다. 이와 같은 차이는 비록 본 연구에서는 각 생활사별 크기를 측정하지는 못하였으나, 성장 상태, 지역 및 채집 시기에 따른 차이로 판단된다(Sakai and Sekiguchi 1992). Holland and Chew (1974)는 바지락의 경우 산란 후 12시간이 지나면 답륜자 유생이 되며, 48시간 후에는 유각이 완성되어 각장이 $100-110 \mu\text{m}$ 가 된다고 보고하였다. 이때의 유생은 Nano-Pico size의 식물플랑크톤을 섭식하며 3-5일이 지나면 각장이 $130-140 \mu\text{m}$ 가 되어 각정기로 들어가며, 2-4주일 지나면 변태기(Pediveliger stage)로 각장이 $180 \mu\text{m}$ 이상이 되며, 착저를 위해 저층에 분포한다고 보고하였다. 따라서, 본 조사해역에서 5월 초에 가장 높은 개체수를 보이다가 5월 중순에 개체수가 급감했던 점으로 미루어 볼 때(Table 1), 동시적인 산란과 함께 빠른 부유 유생 생활사를 가지고 있음을 판단할 수 있었다.

백합 유생은 4월과 6월에 출현하고 있음을 관찰하였으며, 4월의 유생은 각장 $196 \pm 30 \mu\text{m}$, 각폭 $153 \pm 19 \mu\text{m}$ 를 보였고, 6월의 유생 각장은 $219 \pm 12 \mu\text{m}$, 각폭은 $176 \pm 10 \mu\text{m}$ 로 각장과 각폭이 각각 $23 \mu\text{m}$ 의 차이를 보였다(해양수산부 2007). 이는 Sakai and Sekiguchi (1992)와 Hur (2005)의 평균 각장이 각각 $200 \mu\text{m}$ 와 $198 \mu\text{m}$ 로 본 연구와 유사 하였으나, 최 (1975)의 $163 \mu\text{m}$ 와는 차이를 보였다. 일반적으로 백합 유생은 D-veliger stage부터 착저(post settlement)까지 8일이 소요된다는 연구 결과에 비추어 볼 때(Liu et al. 2006), 태안바다목장 해역에서 백합은 동시적으로 산란하지 않고, 장기간에 걸친 산란이 일어남을 시사하고 있었다. 백합은 우리나라 남, 서해연안에서 수온이 $25-27^\circ\text{C}$ 사이의 8월에서 9월 사이에 주로 산란한다고 보고하였으나(유 2000), Chung (2007)에 의하면 산란은 6월에서 9월까지 지속되나 수온이 22°C 이상으로 상승하는 7-8월이 산란 성기로 나타났다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 4월에서 6월까지의 수온의 범위가 $15.9 \sim 22.5^\circ\text{C}$ 로 나타나고 있어 본 연구에 출현한 부유 자패는 6월 산란군에 속하는 것으로 보인다.

현미경을 통한 이매패류 부유유생의 종 동정은 가장 널리 이용되고 있는 방법이다(Garland and Zimmer 2002). 그러나 숙련된 전문가라 하더라도 형태가 유사한 유생들을 정확히 동정하기에는 어려움이 따르고 있다. 단적인 예로, 미국 동부 연안의 200여종 이상의 패류들이 서식하고 있으나(Gosner 1971), 각 유생의 형태를 파악한 종들은 1/4에 지나지 않는다(Lutz et al. 1982). 더욱이 한 속(genus)에 속하는 종들은 형태학적으로 유사성이 매우 높기 때문에 정확하게 동정하기에는 어려움이 따른다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 면역학, DNA 또는 RNA를 이용한 분자생물학적 방법이 도입되었다. 그 중 이매패류

를 대상으로 한 유전자 연구는 Rice (1990)에 의해 처음 시도된 후, 항체에 의한 중 판별기술(monoclonal antibody technique) 개발(浜口昌巳, 1999) 등 많은 연구자들에 의해 중 동정이 실시되었다(e.g. Hare et al. 2000). 이와 같이 이매패류 유생의 정확한 중 동정을 위한 다각적 방법론들의 도입은 형태학적 동정의 오류를 보완할 수 있으며, 나아가 형태, 분자, 면역학적인 중 특이적 분류체계를 구축하는데 기여할 수 있을 것이다.

5. 결 론

태안 갯벌형 바다목장해역에서 출현하는 이매패류 유생의 동정을 위하여 single cell PCR 및 현미경 관찰한 결과, 바지락(*R. philippinarum*)과 백합(*M. lusoria*) 유생으로 동정되었다. D-veliger stage의 바지락은 각장이 $156 \pm 22 \mu\text{m}$, 각폭 $126 \pm 12 \mu\text{m}$, 각고 $92 \pm 14 \mu\text{m}$ 를 나타낸 반면, umbonal stage의 백합 유생은 각장이 $202 \pm 44 \mu\text{m}$, 각폭이 $161 \pm 35 \mu\text{m}$, 각고가 $96 \pm 38 \mu\text{m}$ 를 나타내었다. 비록 본 연구에서는 2종의 유생이 선별되었으나, 바다목장해역 내 다양한 이매패류의 유생이 출현할 것으로 예상되어, 이를 규명하기 위해 장기간에 걸친 조사에 따라 정량 및 정성 분석의 연구가 필요하다. 또한 single cell PCR 기법은 배양이 어려운 micro-size 생물을 가지고 효과적인 동정을 할 수 있는 기술이라 판단되나 각 분류군에 맞는 동정 방법론 개발 등 다각적인 연구가 계속적으로 이루어져야 된다.

사 사

연구에 도움을 준 상명대학교 신상원님과 현장 조사에 참여한 주)한국연안환경생태연구소의 직원 여러분께 감사드립니다. 본 연구는 2007년도 국립수산물과학원의 “동·서·제주바다목장사업”의 일환으로 수행되었습니다(사업번호 TR-2008-RE-024).

참고문헌

김완수 (1986) 가로림만 바지락의 성장, 사망 및 생산. 석사학위논문, 충남대학교, 36 p
 김효진 (2005) 인천 선재도산 바지락, *Ruditapes philippinarum*의 환경 요인의 차이에 의한 성장과 산란 및 가입에 대한 비교 연구. 석사학위논문, 인하대학교, 63 p
 송재희, 김치홍, 박성우, 유진하, 조영조 (2008) 한국 서해안 백합 *Meretrix lusoria*의 생물학적 활성요인과 계절성. 한국양식학회지 **21**:111-122
 유성규 (2000) 천해양식. 구덕출판사, 부산, 626 p
 유성규, 정유정, 유효영 (1978) 연안산 중요 조개류의 증식에

관한 생물학적 연구. 6. 바지락의 산지별 특징. 부산수대연보 **18**:89-94
 윤성봉 (1992) 통영 안정리 인접 바지락 자원의 개체군 역학적 연구. 석사학위논문, 부산수산대학, 34 p
 조수근, 장창익, 손명호 (1995) 군산 연안 양식 바지락(*Tapes philippinarum*)의 형태와 성장에 관한 연구. 군산대학교 논문집 **7**:36-38
 최신석 (1975) 대합(*Meretrix lusoria*)과 가무락(*Cyclina sinensis*)의 초기발생 및 성장에 관한 비교연구. 한국수산학회지 **8**:185-195
 허영백, 허성범 (2000) 4종 조개류 유생의 발생과 성장. Journal of Aquaculture **13**:119-128
 해양수산부 (2006) 해양수산통계연보. 334 p
 해양수산부 (2007) 동·서·제주해역 바다목장화 개발 연구 용역. BSPM42400-1897-3, 562 p
 浜口昌巳 (1999) 瀬戸内海アサリ漁場生態調査のための種判別技術の開発. 農林水産技術會議研究成果334 「魚介類の初期生態解明のための種判別技術の開発」. 東京, pp 66-77
 全國沿岸漁業振興開發協會 (1996) 沿岸漁場整備開發事業 増殖場造成計劃指針 坪城8年度版 社團法人 全國沿岸漁業振興開發協會. 東京, 316 p
 Canapa A, Schiaparelli S, Marota I, Barucca M (2003) Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia). Mar Biol **142**:1125-1130
 Charrel RN, Micco DP, de Lamballerie X (1999) Convenient method to improve the graphical quality of phylogenetic trees computed by the MEGA program. Biotechniques **27**:702-704
 Chen A, Li Z, Feng G (2009) Phylogenetic relationships of the genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial COI gene sequences. Zoo Res **30**:233-239
 Chew KK (1989) Manila clam biology and fishery development in Western North America. In: Manzi JJ, Castagna M (eds) Clam mariculture in North America. Elsevier, Amsterdam, pp 243-261
 Chew KK (1990) Global bivalve shellfish introductions. World Aquac **21**:9-22
 Chung EY (2007) Oogenesis and sexual maturation in *Meretrix lusoria* (R1798) (Bivalvia: Veneridae) in Western Korea. J Shellfish Res **26**(1):71-80
 Chung EY, Hur YB, Shin MS, Kim YM (2005) Reproductive biology of the female manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) on the west coast of Korea. Kor J Malacol **21**:1-11
 Choi KH, Park GM, Chung EY (2005) Ovarian Maturation in Female *Ruditapes philippinarum* on the West Coast of Korea. Development and Reproduction **9**:123-134

- Evseev GA, Kolotukkina NK, Semenikhana OY (2001) Shell morphogenesis of several venerid bivalves. *J Shellfish Res* **20**:1127-1284
- Fernández A, García T, Asensio L, Rodríguez MÁ, González I, Céspedes A, Hernández PE, Martín R (2000) Identification of the Clam species *Ruditapes decussates* (Grooved Carpet Shell), *Venerupis pullastra* (Pullet Carpet Shell), and *Ruditapes philippinarum* (Japanese Carpet Shell) by PCR-RFLP. *J Agric Food Chem* **48**:3336-3341
- Garland ED, Zimmer CA (2002) Techniques for the identification of bivalve larvae. *Mar Ecol Prog Ser* **225**:299-310
- Gosner KL (1971) Guide to identification of marine and estuarine invertebrates, Cape Hatteras to the Bay of Fundy. John Wiley & Sons, New York, 693 p
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**:95-98
- Hare MP, Palumbi SR, Butman CA (2000) Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Mar Biol* **137**:953-961
- Heath DD, Rawson PD, Hilbish TJ (1995) PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada. *Can J Fish Aquat Sci* **52**:2621-2627
- Ho JS, Zheng GX (1994) *Ostrincola koe* (Copepoda, Mycicolidae) and mass mortality of cultured hard clam (*Meretrix meretrix*) in China. *Hydrobiologia* **284**:169-173
- Holland DA, Chew KK (1974) Reproductive cycle of the Manila clam (*Venerupis japonica*) from Food Canal, Washington. *Proc. Natl Shellfish Assoc* **64**:53-58
- Hur YB (2005) Comparison of development and larval growth of four venerid clams. *J World Aquac Soc* **36**:179-187
- Jayabal R, Kalyani M (1986) Biochemical studies in the hard clam *Meretrix meretrix* (L.) from Vellar estuary, east coast of India. *Indian J Mar Sci* **15**:63-64
- Jung SW, Joo HM, Park JS, Lee JH (2010) Development of a rapid and effective method for preparing delicate dinoflagellates for scanning electron microscopy. *J Appl Phycol* **22**:313-317
- Kai AKL, Cheung YK, Yeung PKK, Wong JTY (2006) Development of single-cell PCR methods for the Raphidophyceae. *Harmful Algae* **5**:649-657
- Liu BZ, Dong B, Tang BJ, Zhang T, Xiang JH (2006) Effect of stocking density on growth, settlement and survival of clam larvae, *Meretrix meretrix*. *Aquaculture* **258**:344-349
- Lutz R, Goodsell J, Castagna M, Chapman S and Newell C, Hidu H, Mann R, Jablonski D, Kennedy V, Siddall S, Goldberg R, Beattie H, Falmagne C, Chestnut A, Partridge A (1982) Preliminary observations on the usefulness of hinge structures for identification of bivalve larvae. *J Shellfish Res* **2**:65-70
- Martel A, Hynes TM, Buckland-Nicks J (1995) Prodissoconch morphology, planktonic shell growth, and site at metamorphosis in *Dreissena polymorpha*. *Can J Zool* **73**:1835-1844
- Nichols SJ, Black MG (1994) Identification of larvae: the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*), and Asian clam (*Corbicula fluminea*). *Can J Zool* **72**:406-417
- Pan BP, Wu Q, Zhang SP, Song LS, Bu WJ (2006) Molecular phylogeny of *Meretrix* (Mollusca, Bivalvia) based on 16S rRNA and ITS1 sequences. *Oceanol Limnol Sin* **37**:342-347
- Rice EL (1990) Nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA gene from the Atlantic sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *Nucleic Acids Res* **18**:5551
- Sakai A, Sekiguchi H (1992) Identification of planktonic late-stage larval and settled bivalves in a tidal flat. *Bull Jpn Soc Fish Oceanogr* **56**:410-425
- Sastry AN (1965) The development and external morphology of pelagic larval and post-larval stages of the bay Scallop, *Aequipecten irradians concentricus* say, reared in the laboratory. *Bull Mar Sci* **15**:417-435
- Sekiguchi H, Uchida M, Sakai A (1995) Post-settlement processes determining the features of bivalve assemblages in tidal flats. *Benthos Res* **49**:1-14
- Underwood AJ, Fairweather PG (1989) Supply-side ecology and benthic marine assemblages. *Trends Ecol Evol* **4**:16-20
- Yap WG (1977) Population biology of the Japanese littleneck clam, *Tapes philippinarum* in Kaneohe Bay, Oahu, Hawaiian Islands. *Pacif Sci* **31**:223-244

Received May 7, 2010

Revised Jun. 22, 2010

Accepted Aug. 28, 2010