

퍼킨서스편모충(*Perkinsus olsenii*) 유주자 (Zoospore)의 미세구조 관찰

김현중, Dinesh Gajamange, 최민순, 최광식¹, 박경일

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과, ¹제주대학교 해양과학대학 해양의생명과학부

Ultrastructure of *Perkinsus olsenii* zoospores parasitizing the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea

Hyun-Joong Kim, Dinesh Gajamange, Min-Soon Choi, Kwang-Sik Choi¹ and Kyung-Il Park

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Republic of Korea

¹Department of Marine Biomedical Science, College of Ocean Science, Jeju National University, 66 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Republic of Korea

ABSTRACT

Protozoan parasites belonging to the genus *Perkinsus* elicit severe inflammatory responses and are associated with mass mortality of commercially important marine shellfish worldwide. In the present study, we examined the external features of *P. olsenii* zoospores in detail using light and scanning electron microscopy. Our study showed that the zoospores have an oval body with a long anterior flagellum and a short posterior flagellum. The anterior flagellum has a unilateral array of mastigonemes. Mean body dimensions were $3.37 \pm 0.33 \mu\text{m} \times 1.72 \pm 0.22 \mu\text{m}$. The average length of the anterior and posterior flagella was $16.34 \pm 1.52 \mu\text{m}$ and $8.25 \pm 1.39 \mu\text{m}$, respectively. Zoospores of *P. olsenii* found in Korean waters have shorter and narrower bodies, longer anterior flagella, and shorter posterior flagella than zoospores of *Perkinsus* spp. found in the mollusks of North America and Europe.

Key words: *Perkinsus olsenii*, Manila clam, zoospore, flagella, mastigoneme, Korea

서론

*Perkinsus*는 1950년대 미국의 대서양굴 (*Crassostrea virginica*)의 폐사 원인 생물로 규명된 이래 북미, 유럽, 아시아, 오세아니아에서 굴, 바지락, 가리비, 전복 등 수산업적으로 매우 중요한 패류의 대량폐사를 유발하는 원인생물로 보고되고 있다 (Ray and Mackin, 1954; Andrews, 1996; Burreson and Ragone Calvo, 1996). 1950년대 초반 *P. marinus* (Mackin et al., 1950)가 미국 Louisiana에 서식하는 대서양굴 (*C. virginica*)에서 최초로 보고된 후 현재까지 *P. olsenii* (Lester and Davis, 1981), *P. atlanticus* (Azevedo, 1989), *P. qugwadi* (Blackbourn et al., 1998), *P.*

andrewsi (Coss et al., 2001), *P. chesapeaki* (McLaughlin et al., 2000), *P. mediterraneus* (Casas et al., 2004), *P. honshuensis* (Dungan and Reece, 2006), *P. beihaiensis* (Moss et al., 2008) 등이 학계에 보고되고 있다. *Perkinsus* spp. 감염의 주요 증상은 숙주의 아가미, 소화맹낭, 외투막을 중심으로 염증을 유발하고 숙주의 영양 상태를 저하시켜 궁극적으로 폐사시킨다 (Park and Choi, 2001; Choi et al., 2005). 이로 인해 세계동물보건기구 (OIE)에서는 *Perkinsus* spp.를 패류의 중요 질병으로 지정하고 *Perkinsus* spp.에 감염된 수산물의 국제간 이동을 제한하고 있다.

국내 *Perkinsus* 연구는 Choi and Park (1997)이 남해안에 서식하는 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)에서 *Perkinsus* sp.가 발병함을 학계에 처음 보고하였고, 서해와 남해에 서식하는 대부분의 바지락 (*R. philippinarum*)이 감염되어 있는 결과를 발표 하였으며 (Park and Choi 2001), Park et al. (2005)은 계통분류학적 연구 결과 호주와 유럽에서 발견되는 *P. olsenii*와 동일종으로 판단하였다. *P. olsenii*는 우리나라뿐만 아니라 황해를 연결하고 있는 중국 연

Received: March 22, 2012 ; Accepted: March 29, 2012
Corresponding author: Kyung-Il Park
Tel: +82 (63) 469-1882 e-mail: kipark@kunsan.ac.kr
1225-3480/24427

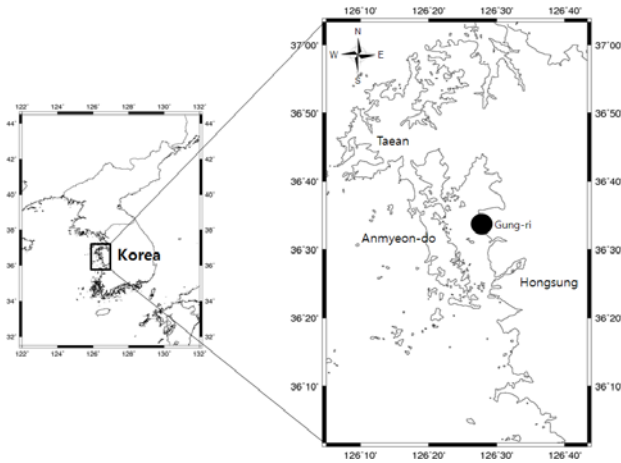


Fig. 1. Map showing sampling location.

안 및 일본 중남부 해역에 서식하는 대부분의 바지락에서 검출되고 있으며, 바지락의 염증과 번식량의 저하를 유발하기 때문에 산업적으로 매우 중요한 질병체이다 (Hamaguchi *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2006).

*Perkinsus*속 기생체의 생활주기는 크게 영양체 (trophozoite), 휴면포자 (hypnospore), 유주자 (zoospore)로 나뉘어지며, 유주자는 한 쌍의 편모를 이용한 강한 운동성을 갖고 있어 새로운 숙주에 감염되는 것으로 알려져 있다 (Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995). 현재까지 *Perkinsus* spp.의 유주자 미세구조에 관한 연구는 투과전자현미경을 이용한 세포 내부의 구조와 형태 및 크기에 관한 연구가 주로 이루어져왔고, 이를 바탕으로 한 분류학적 특성 연구가 수행되었다 (Azevedo, 1989; Perkins, 1996; Blackburn *et al.*, 1998). 그러나 *Perkinsus* spp.의 영양체와 휴면포자의 외형은 구형으로 단순한 반면 유주자는 복잡한 형태적 특징을 띠기 때문에 유주자의 외형적 특징은 분류학적 특성을 파악하는데 유용한 대상이나 *Perkinsus* 속 (genus)에 속하는 *Labyrinthomyxa* sp., *P. olseni*와 *P. qugwadi*의 극히 대략적인 외형적 특성만이 보고됨으로써 *Perkinsus*속에서 속하는 생물의 외형적 특성에 대한 자료는 현재 매우 빈약한 실정이다 (Perkins, 1968; Azevedo, 1989; Blackburn *et al.*, 1998).

따라서 본 연구는 우리나라 서해안에서 검출되고 있는 *P. olseni* 유주자의 외부형태에 관한 특성을 광학현미경과 주사전자현미경을 이용해 관찰함으로써 이 총체의 외형적 미세구조를 이해함을 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

1. 시료채집

본 연구에 사용된 *P. olseni*의 숙주인 바지락 *R.*

*philippinarum*은 충청남도 홍성군 조간대 (36°34'53.40"N, 126°26'46.57"E)에서 채집하였다 (Fig. 1). *P. olseni*의 유주자 발생은 아래와 같은 방법을 이용하였다.

2. 휴면포자 유도

*P. olseni*가 가장 많이 감염되는 부위인 아가미를 적출한 다음, 이를 Ray's Fluid Thioglycollate Medium (RFTM)에 넣고 실온의 암실에서 48시간동안 배양하여 숙주의 조직 내 영양체 상태이던 *P. olseni*를 휴면포자로 유도시켰다.

3. 유주자 유도

Lugol's Iodine으로 휴면포자의 유무가 확인된 경우 *P. olseni*가 농밀히 분포하는 아가미만을 선택하여 Petri dish (Ø 9 cm)에 옮기고 면도칼을 이용하여 잘게 분쇄한 후 여과 멸균해수 (25 ppt) 5 ml와 혼합하였다. 이를 망목이 100 µm인 Muller Gauze를 이용해 여과하여 입자가 큰 아가미 조직을 제거하고 여과된 용액은 다시 망목이 50 µm인 Muller Gauze를 이용하여 직경 50 µm 이상인 휴면포자를 분리하였다. 이후 1,000,000 cell/ml 농도의 휴면포자 5 ml를 원심분리 (45× g) 한 후 여과멸균해수 (25 ppt)로 5 차례 씻어내어 아가미 찌꺼기를 제거하고 휴면포자만을 순수 분리하였다. 분리된 휴면포자를 Petri dish (Ø 9 Cm)에 여과 멸균해수 (25 ppt) 15 ml, 항생제 20 µl (Park and Choi, 2001)와 섞고 20°C의 암실에서 배양하여 유주자의 방출을 유도하였다. 휴면포자의 세포분열과정과 유주자의 형성 과정은 6시간 간격으로 광학현미경하에서 관찰하였다.

4. 주사전자현미경 관찰

유주자 방출이 완료 되었을 때 방출된 유주자를 2.5% Glutaraldehyde에서 2시간동안 고정 시켰다. 고정된 시료를 Cover slip에 200 µl를 분주한 후 실온에서 2시간동안 방치시켜 유주자가 Cover slip에 부착되도록 하였다. 그 후 50%, 60%, 70%, 80%, 90% EtOH에서 각각 1시간동안 탈수 과정을 거친 후 100% EtOH에서는 1시간 간격으로 2번, 그 후 100% EtOH에서 12시간의 탈수 과정을 거쳐 유주자 내부의 수분을 제거한 후 실온에서 시료를 건조하였다. 건조된 시료를 광학 현미경 (BH-2, OLYMPUS)과 전자현미경 (JSM-5410, JEOL)을 이용하여 관찰 하였다. 주사 전자 현미경 관찰용 시료의 경우 ion sputter를 이용하여 5-6 nm 두께의 백금으로 코팅하였다. 유주자의 크기 측정은 Image analysis program (Motic 2.0)을 이용하였다.

결과 및 고찰

순수 분리한 휴면포자를 20°C의 해수에서 배양한지 2일째

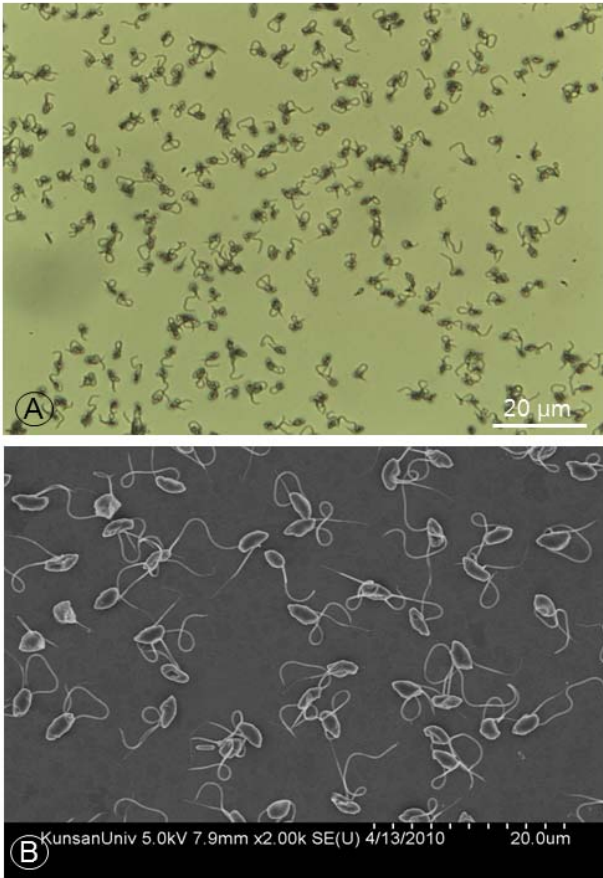


Fig. 2. Light (x400, A) and SEM (x2,000, B) micrographs of free mature zoospores with 2 flagella adhered on a glass slide.

에 핵이 휴면포자 외곽으로 편재되는 현상이 관찰되었고, 배양 4일째부터 세포분열을 시작하여 유주자낭으로 발전하였다. 배양 5일째 50% 이상의 세포가 유주자낭으로 진행되었으며, 배양 8일째에 90%이상의 세포에서 유주자가 방출되었다.

방출된 유주자를 유리판 위에 고정시킨 후 광학 현미경과 전자현미경을 통해 관찰한 결과 몸체에 2개의 편모로 구성되어 있는 유주자의 기본적인 외부 형태를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2A, B). 이와 같은 방법은 전자현미경 관찰을 위한 탈수 과정 시 원심분리를 이용할 경우 대부분의 편모가 유실되는 현상이 나타내는데 이러한 단점을 보완하며 원심분리 방법보다 용이하게 탈수 및 전처리 과정을 수행할 수 있는 방법으로 판단된다. 유주자를 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 유주자 몸체의 전단부는 날카롭고 후면은 둥근 형태였으며, 1개의 장편모와 1개의 단편모로 구성되어 있었다 (Fig. 3). 유주자의 평균 체장은 $3.37 \pm 0.33 \mu\text{m}$, 체폭은 $1.72 \pm 0.22 \mu\text{m}$ 이었다. 본 연구에서 확인된 *P. olseni* 몸체의 특징을 기존의 *Perkinsus* spp. 유주자의 형태와 비교하였을 때 몸체의 형태

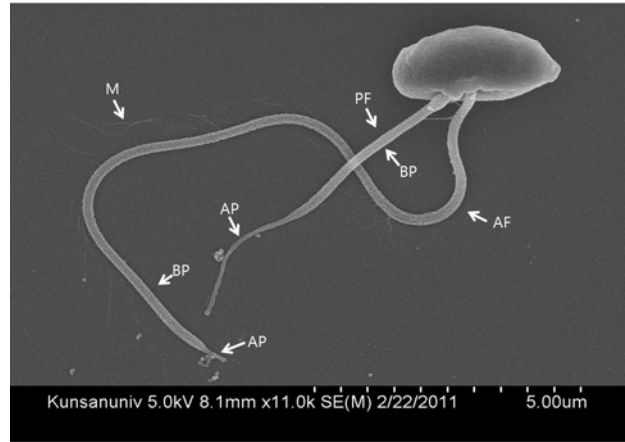


Fig. 3. Zoospore showing the anterior (AF) and posterior (PF) flagella. Note each flagellum consists of long basal portion (BP) and short apical portion (AP). The anterior flagellum bore a row of long mastigonemes (M).

는 Blackbourn *et al.* (1998) 이 보고한 *P. qugwadi*와 가장 유사한 형태로 유주자 몸체의 전단부는 날카로운 형태를 띠고 후면부는 전단부에 비해 둥근 형태를 취하고 있었다. 반면, Azevedo (1989) 와 Coss *et al.* (2001) 은 유럽의 *R. decussatus*에 기생하는 *P. olseni*와 북미 *Macoma balthica*에 기생하는 *P. andrewsi*의 경우 몸체가 전단부와 후면부 모두 둥근 형태를 띤다고 보고 하여 본 연구에서 조사된 총체와는 몸체의 형태가 일부 상이한 것으로 확인되었다. 유주자 몸체의 크기는 북미에서 검출되고 있는 *P. chesapeakei* ($3.73 \pm 0.48 \mu\text{m} \times 2.41 \pm 0.36 \mu\text{m}$), *P. marinus* ($4-6 \mu\text{m} \times 2-3 \mu\text{m}$), *P. qugwadi* ($4.5 \pm 1.0 \mu\text{m} \times 2.04 \pm 0.5 \mu\text{m}$), *P. andrewsi* ($4.4 \pm 0.6 \mu\text{m} \times 2.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$) 와 유럽에서 검출된 *P. atlanticus* ($4.5 \pm 0.6 \mu\text{m} \times 2.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$) 와 *P. mediterraneus* ($4.4 \pm 0.18 \mu\text{m}$) 와 비교하였을 때 본 연구에서 측정된 *P. olseni*의 몸체는 그 크기가 작으며, 인근 일본과 중국에서 확인된 *P. honshuensis* ($5-7 \mu\text{m} \times 2-3 \mu\text{m}$) 및 *P. beihaiensis* ($3-5 \mu\text{m}$, 장축) 와 비교하여서도 소형인 것으로 나타났다 (Table 1).

몸체 중앙의 주름부위 (groove) 에서 전편모의 기저부분이 관찰되었고, 후편모는 전편모의 바로 뒤쪽 주름부위에 기저부분이 위치하고 있었다 (Fig. 4A). 이와 같은 주름은 *P. qugwadi*에서도 관찰된 바 있다 (Blackbourn *et al.*, 1998). 본 연구를 통하여 확인된 장편모는 $16.34 \pm 1.52 \mu\text{m}$, 단편모는 $8.25 \pm 1.39 \mu\text{m}$ 로 측정되었으며 (Table 1), 전편모의 경우 기존 연구와 비교하여 길며 단편모는 짧은 것으로 나타났다. 전편모의 경우 *P. atlanticus*는 $12.7 \pm 2.4 \mu\text{m}$, *P. qugwadi*는 $9.67 \pm 2.07 \mu\text{m}$ 로써 본 조사 결과보다 짧았으며, 특히 *P. chesapeakei*의 경우 $5.51 \pm 1.19 \mu\text{m}$ 로 매우 짧은

Table 1. Dimensions of zoospores of *P. olseni* in the present study and other *Perkinsus* spp. reported from previous studies. TEM: transmission electron microscope, LM: light microscope

Species	Host	Country	Body length (μm)	Body width (μm)	Anterior flagellum (μm)	Posterior flagellum (μm)	Method	Sources
			Mean \pm SD Range N	Mean \pm SD Range N	Mean \pm SD Range N	Mean \pm SD Range N		
<i>P. olseni</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Korea	3.37 \pm 0.33 2.7-4.2 50	1.72 \pm 0.22 1.2-2.3 50	16.34 \pm 1.52 13.2-21.1 50	8.25 \pm 1.39 6-12.4 50	SEM	Present study
<i>Labyrinthomyxa</i> sp.	<i>Macoma balthica</i>	USA	- 3-5 -	- 2-3 -	- 13-17 -	- 7-9 -	SEM	Perkins (1968)
<i>P. marinus</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	USA	- 4-6 -	- 2-3 -	- 10-18 -	- 5-10 -	TEM	Perkins and Menzel (1996)
<i>P. atlanticus</i> (= <i>olseni</i>)	<i>R. decussatus</i>	Portugal	4.5 \pm 0.6 - 25	2.9 \pm 0.4 - 25	12.7 \pm 2.4 - 20	10.7 \pm 3.2 - 17	SEM/TEM	Azevedo (1989)
<i>P. qugwadi</i>	<i>Patinopecten yessoensis</i>	Canada	3.86 \pm 0.31 - 7	2.47 \pm 0.29 - 7	9.01 \pm 1.2 - 5	7.95 \pm 1.2 - 2	TEM	Blackboun <i>et al.</i> (1998)
<i>P. chesapeakei</i>	<i>Mya arenaria</i>	USA	3.73 \pm 0.48 2.2-4.7 -	2.41 \pm 0.36 1.4-2.5 -	5.51 \pm 1.19 - -	3.0 \pm 0.65 - -	TEM	Malaughlin <i>et al.</i> (2000)
<i>P. andrewsii</i>	<i>Macoma balthica</i>	USA	4.4 \pm 0.6 - 10	2.0 \pm 0.5 - 10	- - -	- - -	TEM	Coss <i>et al.</i> (2001)
<i>P. mediterraneus</i>	<i>Ostrea edulis</i>	Spain	4.4 \pm 0.18 - 50	- - -	- - -	- - -	TEM	Casas <i>et al.</i> (2004)
<i>P. honshuensis</i>	<i>Venerupis (R.) philippinarum</i>	Japan	- 5-7 -	- 2-3 -	- - -	- - -	LM	Dungan and Reece (2006)
<i>P. olseni</i>	<i>Austrovenus stutchburyi</i>	New Zealand	4.5-6 100	2.5-4 100	- -	- -	LM	Dungan <i>et al.</i> (2007)
<i>P. beihaiensis</i>	<i>C. ariakensis</i>	China	- 3-5 -	- - -	- - -	- - -	LM	Moss <i>et al.</i> (2008)

것이 특징이었다. *P. marinus*의 경우 본 연구과 유사한 10-18 μm 였다. 후편모 (단편모) 의 경우 *P. atlanticus*는 10.7 \pm 3.2 μm 로써 본 연구 결과보다 길었으나 *P. marinus* (6-10 μm) 와 유사하였다. *P. chesapeakei*의 경우 장편모와 마찬가지로 타 종에 비해 현저히 짧은 후편모 (3.0 \pm 0.65 μm) 를 보유하고 있었다.

전편모와 후편모는 각각 basal portion과 apical portion으로 구성되어 있었다 (Fig. 3). 전편모의 두께는 기저부분이 0.2 μm 였으며 basal portion에서는 이 같은 두께가 일정하게 유지되다 말단으로부터 0.4 μm 앞 지점에서 시작된 apical portion에서 편모의 두께가 급격히 감소한 후 종결되

었다 (Fig. 3). 후편모의 경우 몸체와 붙은 기저부를 포함하는 basal portion은 전편모와 동일한 두께를 나타냈으나, 후편모의 경우 apical portion은 약 3 μm 로 전편모에 비해 다소 길었으며 완만히 감소하다가 종결되었다. 이는 Perkins (1968) 가 보고한 바와 매우 유사한 결과로써 *P. marinus*의 경우에도 전편모의 apical portion이 후편모의 그것보다 급격히 종결되는 것으로 보고되었다. Azevedo (1989) 역시 *P. atlanticus*의 유주자도 본 연구 결과와 매우 유사한 형태를 갖고 있음을 보고하였으나 후편모의 apical portion이 약 6.7 μm 로 전체 후편모 길이의 약 67%를 차지하였으나 본 연구에서 확인된 *P. olseni*의 경우 약 40% 이내로 그 비율이 낮았

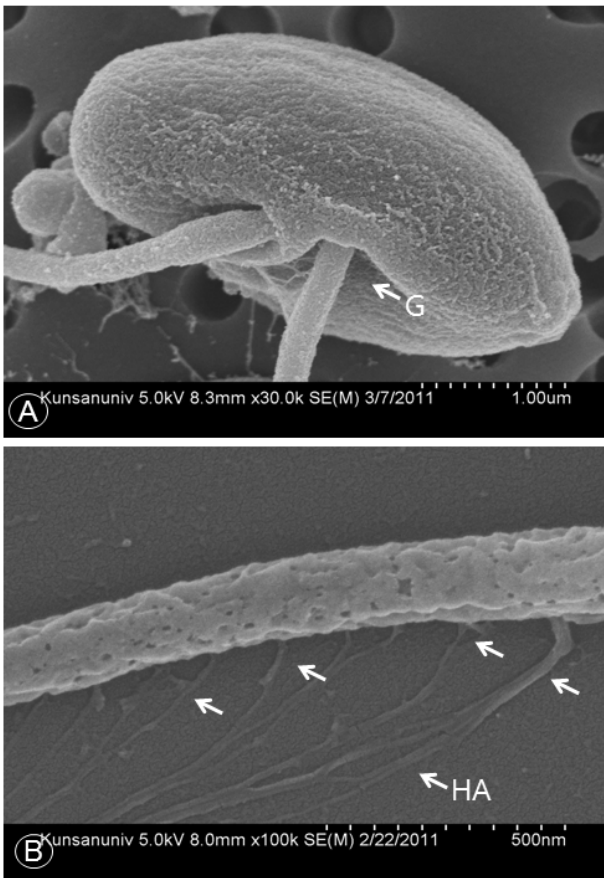


Fig. 4. SEM micrographs of the body (A) showing the insertion point of the flagella, and anterior flagellum with mastigonemes consisting of spur-like structure (arrows) and hair-like appendages (HA). G, groove

다. 유주자 몸체의 장축과 단축, 장편모와 단편모의 길이에 대한 상관관계를 분석한 결과 체폭, 장편모 및 단편모와 양의 상관관계를 나타냈으며, 장편모는 단편모와 양의 상관관계를 나타내었다 (Table 2).

전편모에서 확인되는 편모털은 편모상에 분포하는 미세한 털로 편모의 표면적을 높여 충체의 추진력을 향상시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Ringo, 1967; Bouck, 1972). 본 연구에서 관찰된 *P. olseni* 전편모의 경우 다수의 편모털이

분포하고 있었으며 편모털은 편모의 한쪽 면에서만 관찰되었다 (Fig. 4B). 편모털의 평균 길이는 $1.375 \pm 0.103 \mu\text{m}$ 였으며, spur와 같은 형태의 기저부분이 $0.21 \pm 0.11 \mu\text{m}$ 간격으로 배열되어 있었고 여기에 다수의 미세한 편모털이 부착된 형태를 띠고 있었다. 현재까지 *P. olseni* (Ordas and Figueras, 1998), *P. qugwadi* (Blackbourn et al., 1998) 및 *Perkinsus* sp. (Perkins, 1968; Coss et al., 2001)에서 편모털이 확인된 바 있으며, 이들 중 *P. qugwadi*와 *Macoma balthica*에 기생하는 *Perkinsus* sp.의 경우 본 조사에서 관찰된 바와 같이 편모털에 spur 및 미세한 편모털이 부착됨을 보고하였다.

본 연구를 통하여 우리나라 서해안 및 남해안 일대의 바지락에 기생하는 *P. olseni* 유주자의 미세구조를 관찰하였다. 특히 주사전자현미경을 이용한 유주자 외부구조에 관한 관찰은 아시아 권역에 분포하는 *P. olseni* 경우 최초의 보고로써 그 의의가 있다. 연구결과 우리나라에서 확인된 *P. olseni* 유주자의 외형적 특징은 미국과 유럽에서 검출되는 타종 (他種) 과 비교하여 소형이며 동일종인 유럽과 뉴질랜드의 *P. olseni*와 비교하여도 몸체가 작고 전편모의 길이가 현저히 긴 것으로 나타났다. 또한 전편모의 basal portion : apical portion의 비율 역시 유럽에서 확인된 *P. olseni*와 차이가 있음이 확인되었다. 그러나 편모털의 존재와 편모털의 구조 및 편모 기저부의 형태는 타 연구 결과와 상당히 유사한 것으로 조사되었다. 이러한 형태적 특성은 지리적 원근성 및 숙주의 차이에 의한 기생충-숙주간 상호작용의 변화에 의한 결과로 판단된다.

요 약

Perkinsus spp.는 국내를 비롯한 전 세계에 걸쳐 수산업적으로 중요한 이매패류에 감염되어 대량폐사를 유발하는 대표적인 기생충이다. 본 연구에서는 바지락에서 검출되는 *P. olseni*의 유주자를 광학현미경과 주사전자현미경을 이용해 미세구조를 관찰한 결과 *P. olseni*의 유주자는 타원형의 몸체에 1개의 장편모와 1개의 단편모로 구성되어 있었으며, 장편모에는 섬모털을 보유하고 있었으며, 섬모털은 편모의 한쪽 면에만 분포하고 있었다. 유주자의 평균 체장은 $3.37 \pm 0.33 \mu\text{m}$, 체폭은 $1.72 \pm 0.22 \mu\text{m}$ 이었으며, 장편모는 $16.34 \pm 1.52 \mu\text{m}$

Table 2. Correlations among zoospore body size, anterior and posterior flagella.

	Body width	Anterior flagellum	Posterior flagellum
Body length	*	**	**
Body width			
Anterior flagellum			*

*: p<0.05, **: p<0.01

m, 단편모는 $8.25 \pm 1.39 \mu\text{m}$ 으로 측정되었다. 이는 유럽과 미국에서 보고된 *Perkinsus* spp.와 비교 하였을 때 몸체의 크기는 작지만 편모의 길이는 긴 것으로 확인되었다.

사 사

본 연구는 한국연구재단의 일반연구 (2010-0013304) 에 대한 연구비 지원으로 이루어졌습니다.

References

- Andrews, J.D. (1996) Histology of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *Journal of Shellfish Research*, **15**(1): 13-16.
- Auzoux-Bordenave, S., Vigario, A.M., Ruano, F., Domart-Coulon, I. and Doumenc, D. (1995) *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*, **14**: 469-475.
- Azevedo, C. (1989) Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology*, **75**(4): 627-635.
- Blackbourn, J., Bower, S.M. and Meyer, G.R. (1998) *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, **76**: 942-953.
- Bouck, G.B. (1972) Architecture and assembly of mastigonemes and related structures. In; *Advances in Cell and Molecular Biology*. (ed. by Dupraw E. J.). Vol 2: pp. 237-271. Academic Press Incorporated, New York.
- Burreson, E.M. and Ragone Calvo, L.M. (1996) Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oyster in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research*, **15**: 17-34.
- Casas, S.M., Grau, A., Reece, K.S., Apakupakul, K., Azevedo, C. and Villalba, A. (2004) *Perkinsus mediterraneus* n. sp. a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, **58**: 231-244.
- Choi, K.-S. and Park, K.-I. (1997) Report on occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Journal of Aquaculture*, **10**: 227-237.
- Choi, K.-S., Park, K.-I., Cho, M. and Soudant, P. (2005) Diagnosis, pathology, and taxonomy of *Perkinsus* sp. isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Journal of Aquaculture*, **18**: 207-214.
- Coss, C.A., Robledo, J.A., Ruiz, G.M. and Vasta, G.R. (2001) Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of species-specific PCR-based diagnostic assay. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48**: 52-61.
- Dungan, C.F. and Reece, K.S. (2006) *In vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. Parasites from Japanese Manila clam *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**: 316-326.
- Hamaguchi, M., Suzuki, N. and Usuki, H. (1998) *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes* (= *Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. *Fish pathology*, **33**: 473-480.
- Lester, R.J.G. and Davis, G.H.G. (1981) A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone, *Haliotis ruber*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **37**: 181-187.
- Liang, Y.B., Zhang, X.C., Wang, L.J., Yang, B., Zhang, Y. and Cai, C.L. (2001) Prevalence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, along the Northern coast of the Yellow Sea in China. *Chinese Journal of Oceanologia et Limunologia Sinica*, **32**: 502-511.
- Mackin, J.G., Owen, H.M. and Collier, A. (1950) Preliminary note on occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp., in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science*, **111**:328-329.
- McLaughlin, S.M., Tall, B.D., Shaheen, A., Elsayed, E. and Faisal, M. (2000) Zoosporulation of a new *Perkinsus* species isolated from the gills of the softshell clam *Mya arenaria*. *Parasite*, **7**: 115-122.
- Moss, J.A., Xiao, C.F., Dungan, C.F. and Reece, K.S. (2008) Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp. a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of southern China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **55**: 117-130.
- Odars, M.C. and Figueras, A. (1998) *In vitro* culture of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **33**: 129-136.
- Park, K.-I. and Choi, K.-S. (2001) Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture*, **203**: 9-22.
- Park, K.-I., Figueras, A. and Choi, K.-S. (2006) Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture*, **251**: 182-191.
- Park, K.-I., Park, J.-K., Lee, J. and Choi, K.-S. (2005) Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **66**: 255-263.
- Perkins, F.O. (1968) Fine structure of zoospores from *Labyrinthomyxa* sp. parasitizing the clam *Macoma balthica*. *Chesapeake Science*, **9**: 198-208.
- Perkins, F.O. (1996) The structure of *Perkinsus marinus*

- (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* sp. *Journal of Shellfish Research*, **15**: 67-87.
- Ray, S.M. and Mackin, J.G. (1954) Studies on transmission and pathogenicity of *Dermocystidium marinum*. Texas A&M Research Foundation Project 23, Technical Report. 1-11.
- Ringo, D.L. (1967) Flagellar motion and fine structure of the flagella apparatus in *Chlamydomonas*. *Journal of Cell Biology*, **33**: 543-571.