

マガキ属自然交雑個体の二対立遺伝子解析

岩崎健史¹・田中智美¹・飯塚祐輔¹・菱田泰宏²・蕭聖代³・荒西太士¹

A biallelic microsatellite DNA analysis for natural hybrid *Crassostrea* oysters

Takeshi Iwasaki¹, Tomomi Tanaka¹, Yusuke Iidzuka¹, Yasuhiro Hishida², Sheng-Tai Hsiao³,
and Futoshi Aranishi¹

Abstract: Pacific oyster *Crassostrea gigas* and Portuguese oyster *C. angulata* are morphologically related species that are sympatrically distributed at nearshore blackish areas in the subtropical zone of East Asia. Although these two species have thus far been known as inter-fertilizable under controlled conditions, molecular-based studies on mitochondrial DNA analysis verified obvious genetic differences between them. Huvet *et al.* (2004) reported a novel microsatellite DNA marker enabling to discriminate allelic sequence variants for *C. gigas* and *C. angulata*. In this study, we developed a rapid, reliable, and secure PCR-RFLP analysis of the biallelic microsatellite marker to diagnose hybrid oysters between *C. gigas* and *C. angulata* in wild stocks. An array of wild oyster specimens of *C. gigas* haplotypes and *C. angulata* haplotypes collected from Japan, Taiwan, and Korea were subjected to PCR amplification of the microsatellite marker and subsequent RFLP assay using FastDigest® *Bsp*1407I restriction enzyme, followed by microchip electrophoretic diagnosis of both PCR and RFLP products. It took about 2 hours for the whole process of our analysis, and the frequencies of biallelic variants observed in *C. gigas* and *C. angulata* haplotype stocks were at the equivalent level of those of the previous report. In addition, a high frequency of the allelic variants for *C. angulata* in *C. gigas* haplotype stock in Tokyo Bay suggests the occurrence of natural hybrid oysters between *C. gigas* and *C. angulata*.

Key words: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata*, natural hybrid, microsatellite locus, microchip electrophoresis

はじめに

マガキ属 *Crassostrea* のカキ類は世界最大の年間生産量を誇る水産経済動物種であり、特に東アジアの島嶼域ではマガキ *C. gigas* とポルトガルガキ *C. angulata* の 2 種が重要種とされている (FAO, 2003)。日本や韓国を原産とする温帯種の *C. gigas* は、100 年

以上に亘って主に日本から南北アメリカやヨーロッパ、オーストラリア、アフリカまで移植されており、現在では世界各地で生産されている (Chew, 1990; Matthiessen, 2000)。一方、亜熱帯種の *C. angulata* は、台湾の南西部の台西から布袋、七股周辺で採苗し、台西海域から布袋海域と澎湖湾で主に生産されており (森, 2009)、また南ヨーロッパでも 19 世紀末から

¹ 島根大学汽水域研究センター Coastal Lagoon Research Center, Shimane University, Matsue 690-8504, Japan.

² 大仁科技大學人文暨社會學院 College of Humanities and Social Sciences, Tajen University, Pingtung 908, Taiwan.

³ 台湾行政院農業委員會水產試驗所 Marine Fisheries Division, Fisheries Research Institute, Keelung 20246, Taiwan.

1970年代初頭まで生産されていた(Comps, 1988). このように*C. angulata*には台湾と南ヨーロッパで異所的に分布するユニークな特徴があったが, 現在では台湾が本種の起源であると証明されている(Boudry *et al.*, 1998; O'Foighil *et al.*, 1998). なお, ヨーロッパでは, 16世紀頃の貿易船によるアジアからポルトガルへの移植説が伝えられているそうである.

*C. gigas*は1793年にThunbergにより日本の在来種として, また*C. angulata*は1819年にLamarckによりポルトガルの在来種として, 主に分布域の違いにより別種に分類された. しかし, その後の形態分類(Ranson, 1948)や交配実験(Gaffney and Allen, 1993), アイソザイム分析(Mathers *et al.*, 1974; Mattiucci and Villani, 1983)では両種のシノニム説を提起していた. 一方, 天然環境での成長率が両種間で有意に差があるなど(Parache, 1989; Soletchnik *et al.*, 2002), 多くの異なる生理生態学的特徴も報告されている(Gouletquer *et al.*, 1999; Haure *et al.*, 2003). また, 近年飛躍的に発展している分子遺伝学的解析では, ミトコンドリアDNA(Boudry *et al.*, 1998; O'Foighil *et al.*, 1998; 飯塚, 2008; 岩崎, 2008)および核DNA(Huvet *et al.*, 2000)ともに両種間で有意な遺伝的差異が確認されており, 現在ではシノニム説は否定されている. 但し, 実験環境下では両種間のF1交雑個体の形成および正常な生存が観察されており, 種分化が不十分であることも事実である(Huvet *et al.*, 2001, 2002). さらに, 1970年代以降の積極的な*C. gigas*の人為的移植により(Ruano, 1997), 両種が同所的に分布するポルトガル南部の*Crassostrea*個体群では, 二対立遺伝子マイクロサテライトマーカーCG44座の分析で自然交雑個体の出現が報告されている(Huvet *et al.*, 2004). 本研究では, 両種が同所的に分布する東アジア島嶼域においてフィールド調査により自然交雑個体を探索するため, CG44座の迅速かつ簡便で高精度な分析方法を開発するとともに, その適用性を検討した.

試 料

日本の中海(島根県)と九州南部(鹿児島県, 宮崎県および沖縄県), 韓国の慶尚南道および台湾の屏東縣から採集した*Crassostrea*個体の内, ミトコンドリアDNAの調節領域(沖本, 2006), チトクロームc酸化還元酵素サブユニットI遺伝子(飯塚, 2008)または16SリボソームRNA遺伝子(岩崎, 2008)を指標とした分子分類により, *C. gigas*と同定された

20個体および*C. angulata*と同定された21個体を使用した. 各個体から閉殻筋を分離し, DNA調製に供するまで -20°C で冷凍保存した.

実験方法

DNA調製

全ゲノムDNAは, 凍結閉殻筋から尿素-SDS-Proteinase K法に従い調製した(Aranishi and Okimoto, 2004, 2005; Aranishi, 2006; Aranishi and Iidzuka, 2007). 閉殻筋約20 mgを200 μl の抽出溶液(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS, 4 M urea, 25 μg Proteinase K)に懸濁し, 55°C にて60分間攪拌加熱した. 25 μl の5 M NaClを添加して十分に混合した後, フェノール溶液(phenol:chloroform isoamyl:alcohol = 25:24:1)およびクロロホルム溶液(chloroform:isoamyl alcohol = 24:1)により精製し, 引き続きエタノールにより沈殿した. DNA沈殿をエタノールで洗浄して十分に乾燥した後, 10T0.1E溶液(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA pH 8.0)に再溶解した. なお, DNA溶液の濃度および純度はEppendorf社製BioPhotometerにより測定した.

PCR-RFLP解析

CG44座のPCR増幅は, MgCl_2 終濃度を3.0 mMに調整したPromega社製GoTaq Green Master Mix, 各0.5 μM のプライマーおよび10 ngのDNA溶液で反応した. プライマーの塩基配列は5' GAAGAATGT CATAGATTGATGG 3'および5' CATGCCTGTTTACC AGTATTC 3'である(Magoulas *et al.*, 1998). Techne社製TC-312サーマルサイクラーによるPCR条件は, 94°C で2分間の初期変性後, 94°C で10秒間の変性/ 53°C で20秒間の会合/ 72°C で30秒間の伸長を35回繰り返す, 72°C で2分間の最終伸長により終了した. RFLP解析は, 1 μl のPCR産物, 0.17 μl のFermentas社製FastDigest[®] Bsp1407I制限酵素および終濃度 $\times 1$ のFermentas社製FastDigest[®] bufferを含む10 μl の反応溶液により, 37°C で5分間反応した. PCR産物およびRFLP産物は, Invitrogen社製SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stainを含む島津製作所社製DNA-1000 Reagent Kitと混合し, マニュアルに従い島津製作所社製MCE-202マイクロチップ電気泳動装置MultiNAにより分析した.

結 果 考 察

二対立遺伝子 CG44 座は、5' 側から 93 bp の 5' 上流領域、CA 反復配列および 54 bp の 3' 下流領域の基本構造であり、*C. angulata* 型対立遺伝子のみ 5' 上流領域と CA 反復配列の間に *Bsp*1407I 制限酵素の認識部位を含む 21 bp の挿入領域が存在する (図 1)。東アジアの *C. gigas* および *C. angulata* から PCR 増幅された同座の平均鎖長は、それぞれ 288.3 ± 12.5 bp と 310.8 ± 19.8 bp であった (表 1)。塩基配列解読による CG44 座の平均鎖長は 256.5 ± 16.3 bp と 277.5 ± 15.8 bp と報告されており (Huvet *et al.*, 2004)、マイクロチップ電気泳動 MultiNA では再現的に約 12% の誤差が発生していた。なお、MultiNA では、同座のホモ接合体はシングルピーク、ヘテロ接合体はダブルピークとして正しく検出された (図 2)。次いで、PCR 産物の RFLP 解析では、*Bsp*1407I 制限酵素による未切断個体 (= *C. gigas* 型対立遺伝子) および切断個体 (= *C. angulata* 型対立遺伝子) が得られた (図 3)。主に南ヨーロッパの各 7 集団の *C. gigas* および *C. angulata* における *C. gigas* 型対立遺伝子の出現頻度は、それぞれ 0.867~0.984 および 0.068~0.145 と報告されており (Huvet *et al.*, 2004)、本研究での両種における出現頻度の 0.850 および 0.120 は既報の結果とほぼ一致していた (表 1)。

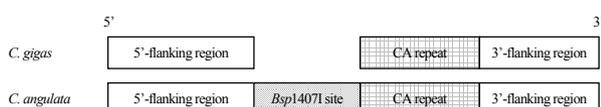


図 1. *Crassostrea gigas* および *C. angulata* の二対立遺伝子 CG44 座の構造模式図。

Fig. 1. Schematic taxon-specific structures of the biallelic CG44 locus of *Crassostrea gigas* and *C. angulata*.

表 1. *Crassostrea gigas* および *C. angulata* と松島湾集団および東京湾集団の個体数および二対立遺伝子 CG44 座の対立遺伝子数と鎖長

Table 1. Number of specimens and number and size of the biallelic CG44 locus of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* together with the oyster stocks of Matsushima Bay and Tokyo Bay

	<i>C. gigas</i> ¹	<i>C. angulata</i> ²	Matsushima Bay	Tokyo Bay
Number of specimens	20	21	10	10
Number of total alleles	20	25	11	10
Number of <i>gigas</i> alleles	17	3	11	6
Number of <i>angulata</i> alleles	3	22	0	4
<i>gigas</i> alleles/total alleles	0.850	0.120	1.000	0.600
Size of <i>gigas</i> alleles (bp)	288.3 ± 12.5		283.7 ± 7.8	276.1 ± 6.2
Size of <i>angulata</i> alleles (bp)		310.8 ± 19.8		313.8 ± 17.6

¹ Specimens were collected from Nakaumi Lagoon, Japan, and Kyongsang Nando, Korea.

² Specimens were collected from Southern Kyushu, Japan, and Pingtung County, Taiwan.

C. gigas と *C. angulata* の間の F1 交雑個体の形成は、実験環境下のみならず (Huvet *et al.*, 2001, 2002)、天然環境でも報告されている (Huvet *et al.*, 2004)。*C. gigas* の近縁種であるシカメガキ *C. sikamea* は、かつては *C. gigas* の地方品種であると考えられていたが (Imai and Sakai, 1961)、近年の分子遺伝学的解析により別種であると実証されている (Banks *et al.*, 1993; Aranishi and Iidzuka, 2007; 飯塚・荒西, 2008)。しかし、その両種間の F1 交雑個体は著しく低頻度ながらも実験環境下では形成される (Banks *et al.*, 1994; 薄, 2002)。また、天然環境では両種間の F1 交雑個体は発見されていないが、*C. sikamea* の種苗生産過程では交雑が発生するという説もある (Hedgecock *et al.*, 1993, 1999)。一方、実験環境下での *C. sikamea* とスミノエガキ *C. ariakensis* の間の F1 交雑個体の形成が、つい最近報告されている (Xu *et al.*, 2009)。このように *Crassostrea* 現生近縁種間における生殖隔離機構は未だ不明な点が多い。

Huvet *et al.* (2004) は、*C. gigas* と *C. angulata* の間の F1 交雑個体を検出するために既存の 8 種類のマイクロサテライトマーカーを検討し、両種間の変異が最大の CG44 座が実用的であると報告した。しかし、CG44 座の分析方法は、³²P 標識した PCR 産物の鎖長をポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定した後、*Bsr*GI 制限酵素 (*Bsp*1407I 制限酵素の isoschizomer) で処理した RFLP 産物の断片をアガロース電気泳動により確認するという煩雑かつ危険であり、また結果を得るまでに数日を要して実用性に乏しい。そこで本研究では、同等以上の分析精度を誇り、より迅速かつ安全で大量のフィールド試料にも簡便に対応できる CG44 座の分析方法を開発した。当該方法では、ポリアクリルアミドゲル電気泳動と同等の分析精度でありながら分析時間が著しく短いマイクロチップ電気泳動を採用し (Sinville and Soper, 2007)、放射標識の省略および PCR 産物と RFLP 産物の同時分析を可能として、大幅な工程の簡略化と時間短縮を実現した。また、再現性が高いマイクロチップ電気泳動では、一定比率の修正により PCR 産物の正確な鎖長が算出されるため CG44 座の CA 反復数が推定でき、一般的なマイクロサテライト解析へのデータの転用も可能である。さらに、Fermentas 社製 FastDigest[®] *Bsp*1407I 制限酵素を導入し、RFLP 解析が 2 時間から 5 分間に短縮できた。これらの改良により 24 検体程度の全分析工程が約 2 時

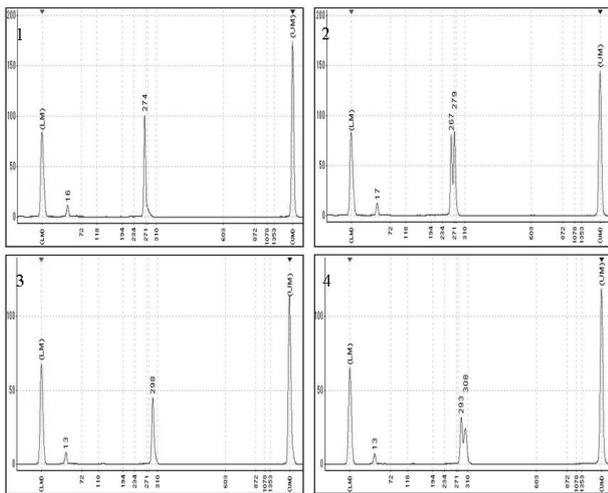


図2. *Crassostrea gigas* のホモ接合体 (1) とヘテロ接合体 (2) および *C. angulata* のホモ接合体 (3) とヘテロ接合体 (4) の二対立遺伝子 CG44 座のマイクロチップ電気泳動分析。

Fig. 2. Microchip electrophoretic diagnosis for PCR products of the biallelic CG44 locus of *Crassostrea gigas* homozygote (1), *C. gigas* heterozygote (2), *C. angulata* homozygote (3), and *C. angulata* heterozygote (4).

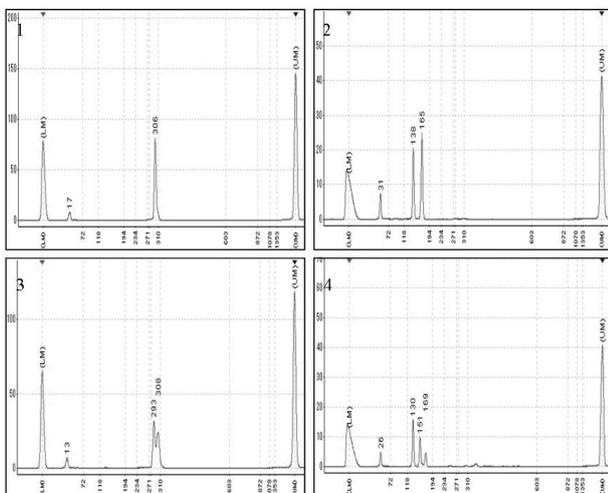


図3. *Crassostrea gigas* の *Bsp1407I* 切断前 (1) と切断後 (2) および *C. angulata* の *Bsp1407I* 切断前 (3) と切断後 (4) の二対立遺伝子 CG44 座のマイクロチップ電気泳動分析。

Fig. 3. Microchip electrophoretic diagnosis for PCR-RFLP products of the biallelic CG44 locus of *Crassostrea gigas* before (1) and after (2) digestion of *Bsp1407I* and those of *C. angulata* before (3) and after (4) digestion of *Bsp1407I*.

間で終了し、大量の検体を分析しなければならないフィールド研究に最適な分析方法となった。

最後に実際のフィールド試料により分析方法の適用性を実証した。宮城県松島湾の養殖 *C. gigas* を分析した結果、*C. gigas* 型対立遺伝子の出現頻度は 1.000 であった (表 1)。これは、仮に亜熱帯種の *C. angulata* が松島湾に移入されたとしても、夏季の海水温が低く成熟不能になることと関係しているかも知れない。次に、東京湾の天然 *C. gigas* を同様に分析した結果、*C. gigas* 型対立遺伝子の出現頻度は 0.600 と著しく低く、さらに *C. angulata* 型対立遺伝子の平均鎖長の 313.8 ± 17.6 bp は東アジアの *C. angulata* の平均鎖長と近似していた (表 1)。Huvet *et al.* (2004) は、ポルトガル南岸の Tavira に分布する *C. gigas* と *C. angulata* の混合集団において *C. gigas* 型対立遺伝子の出現頻度が 0.217 と有意に高い結果から (*C. angulata* の純集団における出現頻度は 0.068~0.145)、両種の自然交雑個体の出現を証明した。この基準に従えば、東京湾でも両種の自然交雑個体の存在が示唆される。なお、船舶の往来が頻繁な東京湾では、船体付着やバラストなどを介したヨーロッパやアジアからの二枚貝の移入事例が多数報告されている (岩崎, 2007)。

謝 辞

本研究の展開にあたり台湾行政院農業委員会水産試験所との共同研究をご提案頂いた財団法人かき研究所理事長の森 勝義博士並びに本論文の作成にあたりご助言を賜った島根大学汽水域研究センター研究員の横尾俊博博士に謹んで感謝する。また、本研究の一部は、建設技術研究開発費補助金「再生藻場における生物多様性モニタリング技術の開発」および島根大学重点プロジェクト「地域資源循環型社会の構築」により実施された。ここに記して深謝する。

引用文献

- Aranishi, F. (2006) A novel mitochondrial intergenic spacer reflecting population structure of Pacific oyster. *J. Appl. Genet.*, 47: 119–123.
- Aranishi, F. and Iidzuka, Y. (2007) Multiplex PCR diagnosis for *Crassostrea* oyster discrimination of *C. sikamea* and *C. gigas*. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 2: 173–177.
- Aranishi, F. and Okimoto, T. (2004) Genetic relationship between cultured populations of Pacific oyster revealed

- by RAPD analysis. *J. Appl. Genet.*, 45: 435–443.
- Aranishi, F. and Okimoto, T. (2005) Sequence polymorphism in a novel noncoding region of Pacific oyster mitochondrial DNA. *J. Appl. Genet.*, 46: 201–206.
- Banks, M. A., Hedgecock, D. and Water, C. (1993) Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2: 279–291.
- Banks, M. A., McGoldrick, D. J., Borgeson, W., and Hedgecock, D. (1994) Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. *Mar. Biol.*, 121: 127–135.
- Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F. and Gérard, A. (1998) Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 226: 279–291.
- Chew, K.K. (1990) Global bivalve shellfish introductions. *World Aquaculture*, 21: 9–22.
- Comps, M. (1988) Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. In: Fisher W.S. (ed.), *Disease processes in marine bivalve molluscs*. American Fisheries Society Special Publication 18. Bethesda, Maryland. pp. 23–37.
- FAO (2003) Review of the State of World Aquaculture. FAO Fisheries Circular, No. 886, Rev. 2, FAO, Rome, Italy. 95 pp.
- Gaffney, P.M. and Allen, S.K. (1993) Hybridization among *Crassostrea* species: a review. *Aquaculture*, 116: 1–13.
- Gouletquer, P., Wolowicz, M., Latala, A., Geairon, P., Huvet, A. and Boudry, P. (1999) Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, Spanish and Taiwanese origins. *Aquat. Living Res.*, 12: 271–277.
- Haure, J., Huvet, A., Palvadeau, H., Nourry, M., Pénisson, C., Martin, J.L.Y. and Boudry, P. (2003) Feeding and respiratory time activities in the cupped oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. *Aquaculture*, 218: 539–551.
- Hedgecock, D., Banks, M.A. and McGoldrick, D.J. (1993) The status of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* (Amemiya 1928) in U.S. commercial brood stocks. *J. Shellfish Res.*, 12: 215–221.
- Hedgecock, D., Li, G., Banks, M. A. and Kain, Z. (1999) Occurrence of Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the Ariake Sea, Japan. *Mar. Biol.*, 133: 65–68.
- Huvet, A., Balabaud, K., Bierne, N. and Boudry, P. (2001) Microsatellite analysis of 6-hour-old embryos reveals no preferential intra-specific fertilization between cupped oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata*. *Mar. Biotechnol.*, 3: 448–453.
- Huvet, A., Gérard, A., Ledu, C., Phélipot, P., Heurtebise, S. and Boudry, P. (2002) Is fertility of hybrids enough to conclude that the 2 oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species? *Aquat. Living Resour.*, 15: 45–52.
- Huvet, A., Fabioux, C., McCombie, H., Lapégué, S. and Boudry, P. (2004) Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 272: 141–152.
- 飯塚祐輔 (2008) 南九州における天然ガキの保全遺伝学的研究. 宮崎大学修士学位論文, 98 pp.
- 飯塚祐輔・荒西太士 (2008) 九州に分布するイタボガキ科カキ類のDNA鑑定. *Laguna*, 15: 69–76.
- Imai, T. and Sakai, S. (1961) Study of breeding of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J. Agr. Res.*, 12: 125–171.
- 岩崎敬二 (2007) 日本に移入された外来海洋生物と在来生態系や産業に対する被害について. *日本水産学会誌*, 73: 1121–1124.
- 岩崎健史 (2008) 日本におけるカキ礁生態系の比較遺伝学的研究. 宮崎大学卒業論文, 54 pp.
- Magoulas, A., Gjetvaj, B., Terzoglou, V. and Zouros, E. (1998) Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Anim. Genet.*, 29: 63–72.
- Mathers, N.F., Wilkins, N.P. and Walne, P.R. (1974) Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *C. gigas*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2: 93–96.
- Matthiessen, G.C. (2000) *Oyster Culture*. Fishing News Books Series, Blackwell Publishing, Ames.
- Mattiucci, S. and Villani, F. (1983) Allozyme study in oysters classified as *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca: *Ostreidae*). *Parasitologia*, 25: 21–27.

- 森勝義 (2009) 台湾澎湖のカキ養殖とその意義. *かき研究所ニュース*, 23: 2-16.
- O'Foighil, D., Gaffney, P. M., Wilbur, A. E. and Hilbish, T. J. (1998) Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Mar. Biol.*, 131: 497-503.
- 沖本宜音 (2006) マガキのミトコンドリアゲノム推定調節領域における比較遺伝学的解析. 長崎大学博士学位論文, 79 pp.
- Parache, A. (1989) Growth performance of oyster *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas* reared in Arcachon Bay between 1950 and 1986: first results. *Haliotis*, 19: 227-236.
- Ruano, F. (1997) Fisheries and farming of important marine bivalves in Portugal. In: Mackenzie, C.L. Jr. *et al.* (eds.), *The history, present condition and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe*, Vol. 3, Europe. US Department of Commerce, Seattle, Washington, pp. 191-200.
- Sinville, R. and Soper S.A. (2007) High resolution DNA separations using microchip electrophoresis. *J. Sep. Sci.*, 30: 1714-1728.
- Soletchnik, P., Huvet, A., Le, Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouilletquer, P. and Boudry, P. (2002) A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. *Aquat. Living Resour.*, 15: 243-250.
- 薄浩則 (2002) 遺伝資源としてのマガキ *Crassostrea gigas* の特性評価と保存に関する研究. 水産総合研究センター研究報告, 4: 40-104.
- Xu, F., Zhang, G., Liu, X., Zhang, S., Shi, B. and Guo, X. (2009) Laboratory hybridization between *Crassostrea ariakensis* and *C. sikamea*. *J. Shellfish Res.*, 28: 453-458.