

分子進化解析による *Crassostrea* 属の異所的種分化

荒西太士・沖本宜音・飯塚祐輔・工藤康介・平野琢也・大久保 誠

宮崎大学農学部水産科学講座

(2006年1月25日 受理)

Allopatric speciation of *Crassostrea* oysters based on molecular evolutionary mitochondrial DNA analysis

Futoshi ARANISHI, Takane OKIMOTO, Yusuke IIDZUKA, Kosuke KUDO,
Takuya HIRANO, Makoto OHKUBO

Division of Fisheries Science, Faculty of Agriculture, Miyazaki University

Summary : Oysters consist of more than 100 living species found everywhere in the world except in the north and south poles, and are now the most consumed bivalves worldwide. Among all the cultured aquatic animals, the global production of cultured cupped oysters belonging to the genus *Crassostrea* ranked first in 1996.

There are nine commercially important *Crassostrea* species, seven of which naturally occur in East Asia, whereas each one species is distributed in Europe and North America. Based on this unique geographical distribution of *Crassostrea* oysters, the present study was undertaken to investigate their evolutionary speciation by mitochondrial DNA analysis using the cytochrome oxidase *c* subunit I gene. Both the genetic distance and minimum evolution phylogenetic tree analyses verified the allopatric speciation of *C. virginica* distributed in North America and seven *Crassostrea* species in East Asia. In addition, results obtained from these analyses also indicated the parapatric speciation of *C. hongkongensis* and *C. belcheri* around the Leizhou Peninsula in South China. *Crassostrea* oysters have so far been subjected to both the allopatric speciation and parapatric speciation during their evolutionary history.

Key words : *Crassostrea*, Oyster, Speciation, Evolution, Cytochrome *c* oxidase subunit I gene.

緒言

カキ類（二枚貝綱翼形亜綱ウグイスガイ目イタボガキ科）は、極圏を除く世界中に分布する代表的な二枚貝類である（Matthiessen 2000）。潮間帯から潮下帯に生息するため採集が容易であり、さらに「海ミルク」と別称されるように栄養成分が豊富であることから、世界各地で重要な海産食糧資源となっている。カキ類の現生種は、100種以上と言われているが、それらのほとんどは

*Ostrea*属、*Crassostrea*属、*Saccostrea*属の3属に分類されている（Ahmed 1975）。*Ostrea*属は主に欧州や南北米、*Saccostrea*属は豪州などのオセアニアで食用とされている。一方、東アジアを中心に、大西洋の西岸や東岸にも分布する *Crassostrea*属は（Hedgecock 1995）、食用を目的とした養殖生産量が世界中で最も多い水棲動物である（FAO 2003）。

英名 cupped oyster と称される *Crassostrea* 属の

表 1. *Crassostrea*属 9 種および*Ostrea equestris*の分布とミトコンドリアCOI遺伝子の情報

種 名	英 名	分布域	COI遺伝子の GenBank登録番号
<i>Crassostrea gigas</i>	Pacific oyster	太平洋西岸 (日本~韓国~中国)	AF177226
<i>Crassostrea nippona</i>	Iwagaki oyster	太平洋西岸 (日本~韓国~中国)	AF300616
<i>Crassostrea ariakensis</i>	Suminoe oyster	太平洋西岸 (日本)	AY632559
<i>Crassostrea sikamea</i>	Kumamoto oyster	太平洋西岸 (日本)	AY632568
<i>Crassostrea hongkongensis</i>	Hongkong oyster	太平洋西岸 (中国)	AY632557
<i>Crassostrea belcheri</i>	Lugubrious oyster	太平洋西岸 (ベトナム~マレー半島)	AY038077
<i>Crassostrea iredalei</i>	Philippine oyster	太平洋西岸 (フィリピン~マレー半島)	AY038078
<i>Crassostrea angulata</i>	Portuguese oyster	大西洋東岸 (フランス~イベリア半島)	AF152567
<i>Crassostrea virginica</i>	Eastern oyster	大西洋西岸 (アメリカ)	AY905542
<i>Ostrea equestris</i>	Crested oyster	大西洋西岸 (アメリカ)	AY376609

カキ類は、現在では9種がアジアや欧州、北米、オセアニアなどで漁獲または養殖生産されている(表1)。これら9種のうち、7種は東アジアが原産であるのに対し(5種は日本~韓国~中国、2種はマレー半島)、欧州と北米には各1種しか分布しておらず、*Crassostrea*属の地理的拡散はユニークである。一方、*Crassostrea*属のような定着性の高い沿岸性二枚貝類は、その浮游幼生期に海水流動によってのみ棲息域を移動でき、かつ一定流速に達すると沈下し着底してしまうため分布域が拡大しにくい(菅原, 小金沢 1995)。さらに祖先種と推定される化石が世界各地で発見されていることなどから、*Crassostrea*属の現生種は祖先種から異所的に種分化したと推測されているが(Stenzel 1971)、その進化過程における地理的放散と種分化の関係については、未だほとんど解明されていない。そこで本研究では、漁獲対象種である*Crassostrea*属9種について、ミトコンドリアDNAのチトクロームc酸化還元酵素サブユニットI (COI) 遺伝子を対象とし、最小進化法(Minimum Evolution Method)に基づいて分子系統樹を作成して*Crassostrea*属の種分化を分子進化的に検討した。

方 法

*Crassostrea*属9種のミトコンドリアCOI遺伝子の部分塩基配列は、GenBank国際データベースから取得した(表1)。また、北米大陸東岸に分布している*Ostrea equestris*の当該遺伝子を外群として使用し、その塩基配列もGenBank国際データベースから取得した。なお、取得した塩基

配列長が種により異なっていたため、*C. gigas*のCOI遺伝子の第55塩基~第633塩基に相当する579塩基分に予め調整した後、解析に供した。塩基配列の多重整列解析は、クラスタルWプログラムを使用し(Thompson *et al.* 1994)、各塩基配列間の遺伝距離は、Kimuraの2変数法により算出した(Kimura 1980)。得られた遺伝距離から、MEGA version 2プログラムを使用して最小進化法によりME分子系統樹を作成した(Kumar *et al.* 2001)。なお、分子系統樹の信頼性は、1,000回のリサンプリングによるブートストラップ検定で評価した。

結 果

ミトコンドリアCOI遺伝子のタンパク質コード領域579塩基のクラスタル多重整列解析を行った結果、*C. gigas*から最も塩基変異が少なかったのは*C. angulata*で14塩基であり、一方、最も変異塩基が多かったのは*C. virginica*で121塩基であった(表2)。また*C. virginica*は、他の*Crassostrea*属8種のいずれとの間でも121~135塩基が変異しており、これら8種と外群とした*O. equestris*との場合の130~148塩基の変異とほぼ同レベルの塩基変異率を示した。しかし、*C. virginica*と*O. equestris*の間でも154塩基が変異していたことから、両種が同属あるいは近縁種である可能性はない。従って*C. virginica*は、本研究対象とした他の*Crassostrea*属とは遺伝的隔離が最大であるが、同所的に分布する*O. equestris*とも明瞭な遺伝的異質性があることが示唆された。さらに、これはKimuraの2変数法による遺伝距離の解析結果でも支持されていた。即ち、*C. virginica*を除く

Crassostrea属 8 種間の遺伝距離は0.2未満であったのに対し、*C. virginica*と他のCrassostrea属間の遺伝距離は0.24以上であり、さらに*C. virginica*と*O. equestris*間の遺伝距離は得られた解析結果のなかで最大値の0.33であった(表2)。

次に、*C. gigas*と*C. virginica*のミトコンドリアCOI遺伝子の塩基配列を比較して、アミノ酸配列の置換について検討した(図1)。比較解析した579塩基は、193残基のアミノ酸をコードしており、両種間では90残基の同義的置換および12残基の非同義的置換が認められた。非同義的置換では、

コドンの第1塩基のみの変異が3残基、第3塩基のみの変異が2残基であり、他の7残基はいずれも複数の塩基が変異しており、コドンの3塩基全てが変異している場合も3残基で認められた。その結果、アミノ酸の非同義的置換率は6.7%と算出された。イタボガキ科のカキ類に関する研究例では、ミトコンドリアCOI遺伝子の(本研究とは)異なる領域における298残基のアミノ酸の置換を比較解析した結果、*C. gigas*と他属の*Saccostrea kegaki*間におけるアミノ酸の非同義的置換率が7.7%であったと報告されており(Matsumoto

表2. Crassostrea属9種およびOstrea equestrisのミトコンドリアCOI遺伝子の変異塩基数(上段)およびKimuraの2変数法による遺伝距離(下段)

	<i>C. gigas</i>	<i>C. angulata</i>	<i>C. sikamea</i>	<i>C. hongkongensis</i>	<i>C. nippona</i>	<i>C. ariakensis</i>	<i>C. belcheri</i>	<i>C. iredalei</i>	<i>C. virginica</i>	<i>O. equestris</i>
<i>C. gigas</i>		14	62	69	84	83	97	92	121	139
<i>C. angulata</i>	0.0247		57	72	88	86	96	91	121	133
<i>C. sikamea</i>	0.1184	0.1079		78	86	86	90	95	124	146
<i>C. ariakensis</i>	0.1320	0.1388	0.1528		67	74	97	89	128	143
<i>C. nippona</i>	0.1655	0.1751	0.1712	0.1287		78	98	85	124	125
<i>C. hongkongensis</i>	0.1627	0.1699	0.1702	0.1438	0.1536		96	92	135	139
<i>C. belcheri</i>	0.1936	0.1915	0.1779	0.1949	0.1970	0.1912		96	130	148
<i>C. iredalei</i>	0.1813	0.1792	0.1893	0.1762	0.1667	0.1826	0.1898		128	132
<i>C. virginica</i>	0.2464	0.2466	0.2548	0.2659	0.2556	0.2833	0.2697	0.2649		154
<i>O. equestris</i>	0.2693	0.2774	0.3124	0.3042	0.2571	0.2946	0.3172	0.2748	0.3309	

<i>C. gigas</i>	A V L A G T S F S S L I R W S L Y N P G A K F L D P V T Y N A V V
<i>C. virginica</i>	A V L A G T S F S S L I R W S L Y T P G A K F L E P V V Y N A V V
<i>C. gigas</i>	T S H A L V M I F F F V M P V M I G G F G N W L I P L M L L V A D
<i>C. virginica</i>	T S H A L V M I F F F V M P V M I G G F G N W L I P L M L E V A D
<i>C. gigas</i>	M Q F P R L N A F S F W V L P G S L Y L M L M S N I V E N G V G A
<i>C. virginica</i>	M Q F P R L N A F S F W V L P G S L L L M L M S N M S E S G V G S
<i>C. gigas</i>	G W T I Y P P L S T Y S Y H G V C M D L A I L S L H L A G I S S I
<i>C. virginica</i>	G W T I Y P P L S T F S Y H G V C M D F A I L S L H L A G I S S I
<i>C. gigas</i>	F S S I N F M V T I S N M R S V G G H L L A L F P W S I K V T S F
<i>C. virginica</i>	F S S I N F M V T I S N M R S V G G H M L A L F P W S I K V T S F
<i>C. gigas</i>	L L L T T L P V L A G G L T M L L T D R H F N T S F F D
<i>C. virginica</i>	L L L T T L P V L A G G L T M L L T D R H F N T S F F D

図1. Crassostrea gigasとC. virginicaのミトコンドリアCOI遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の比較。

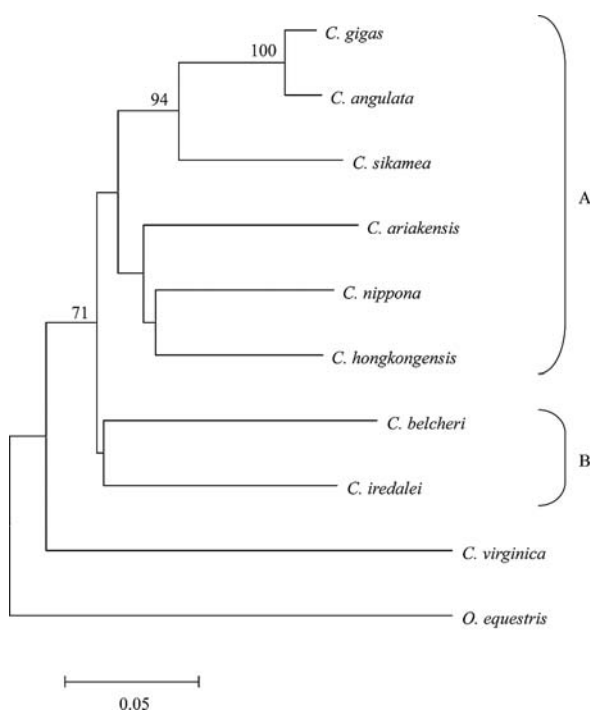


図2. ミトコンドリアCOI遺伝子における遺伝距離をもとにした*Crassostrea*属9種の最小進化分子系統樹. *Ostrea equestris*を外群とした. AおよびBは、それぞれクレードAおよびクレードBを示す. 節点上の数字は、50以上のブートストラップ検定値を示す.

2003), *C. gigas*と*C. virginica*間の6.7%は、属間差に相当するほどの高いレベルである.

Kimuraの2変数法により得られた遺伝距離から、*Crassostrea*属9種および*O. equestris*のイタボガキ科2属10種のME分子系統樹を作成した(図2). その結果、*C. virginica*は、他の*Crassostrea*属8種のみならず*O. equestris*とも明らかな遺伝的独立性を保持していた. さらに、これら8種の地理的拡散を検討したところ、クレードAは*C. angulata*以外の5種が日本から韓国を経て中国南部に至る北緯46~23度/東経146~114度付近の(日本海および黄海を含む)西太平洋から東シナ海沿岸に分布していた. 一方、クレードBの両種は通称tropical oystersと呼ばれ、マレー半島を中心に南シナ海からアンダマン海沿岸に分布していた(Klinbunga *et al.* 2000). 以上の結果より、ミトコンドリアCOI遺伝子の部分塩基配列から作成したME分子系統樹は、*C. angulata*以外の*Crassostrea*属における遺伝的差異および地理的拡散をよく反映していることが明らかとなった. なお、ミトコンドリアCOI遺伝子の部分塩基配列から、

最節約法(Maximum Parsimony Method)によるMP分子系統樹も作成したが、その樹形はME分子系統樹とほぼ同じであった.

考察

ミトコンドリアCOI遺伝子の部分塩基配列における*C. gigas*と*C. angulata*間の塩基変異率は2.4%しかなく、これは相対的に塩基変異率が低い*C. sikamea*と*C. angulata*間の9.8%や*C. gigas*と*C. sikamea*間の10.7%と比べても著しく低い値である(表2). 日本全国に分布している*C. gigas*と九州有明海のみ分布する*C. sikamea*は、現在は別種とされている(Hedgecock *et al.* 1999). しかし、最近まで貝殻形態やアイソザイム分析、交配実験などから*C. sikamea*は*C. gigas*の地方集団とされており(Imai & Sakai 1961; Numachi 1962; Fujio 1979)、ミトコンドリア遺伝子の解析で初めて別種であることが証明された(Banks *et al.* 1993). このような関係にある*C. sikamea*よりも、*C. angulata*は*C. gigas*との遺伝距離が小

さく、かつME分子系統樹のブートストラップ検定結果でも、*C. angulata*と*C. gigas*には種間レベルの遺伝的差異は認められなかった(図2). 故に、*C. angulata*の現生種は、*C. gigas*の地方集団あるいは*C. gigas*との交雑種であることが示唆された.

以前から、*C. angulata*は東アジアからヨーロッパに人為的に移植された*C. gigas*であるとの指摘があり(Menzel 1974; Numachi 1977)、その人為的移植は、16世紀後半~17世紀にかけて行われた日本とポルトガル間の朱印船貿易であるとされている(Mattoso 1993). その上、1967~1972年にフランス南部~イベリア半島の大西洋沿岸でイリドウィルスによる*C. angulata*の大量斃死が発生し、1973年には*C. angulata*がほぼ絶滅したため、*C. gigas*の種苗を大量に移植したという記録もある(Grizel & Heral 1991). そのため、1980年代前半には、アイソザイム分析により両種は別種ではないと報告され(Mattiucci & Villani 1983)、さらに、現在のイベリア半島では両種の交雑種と推定される個体群も確認されている(Boudry *et al.* 1998). これらの既往知見から、そもそも*C. angulata*は、*Crassostrea*属の進化過程で自然発

生した種ではなく、約400年前に人為的に分けられた*C. gigas*の地方集団であることは間違いない。本研究でも、*C. gigas*と*C. angulata*の現生種との間に種内レベルでの遺伝的差異しか

存在しないことが明らかとなったが、今後は*C. angulata*の遺伝特性をより詳細に解析し、その分類上の位置付けを検討する必要がある。

ミトコンドリアCOI遺伝子の部分塩基配列から作成したME分子系統樹において、地理的に他の*Crassostrea*属8種から隔離されている*C. virginica*が、最も早く分岐して独立したクレードを形成していた(図2)。この結果から、*C. virginica*と他の*Crassostrea*属8種は、異所的に種分化したことが示唆されたが、*C. virginica*はCOI遺伝子のみならずミトコンドリアDNA構造そのものが*C. gigas*などと異なっている。これまでにミトコンドリアDNAの全塩基配列が報告されている*Crassostrea*属は*C. gigas*(NC001276)と*C. virginica*(NC007175)の2種のみであるが、両者を比較すると以下の明瞭な構造的差異が認められる。

- ① 全長は*C. gigas*(18,224塩基対)の方が*C. virginica*(17,243塩基対)より長い。
- ② トランスファーRNA数は*C. gigas*(18)の方が*C. virginica*(23)より少ない。
- ③ リボゾームRNA数は*C. gigas*(3)の方が*C. virginica*(2)より多い。
- ④ 推定調節領域とされる300塩基対以上の非翻訳領域は*C. gigas*(3)の方が*C. virginica*(1)より多い。

さらに、ミトコンドリアDNAの全塩基配列は決定されていないが、DNA全長の制限酵素断片長多型解析の結果から、*C. nippona*は*C. gigas*とミトコンドリアDNAの構造がほぼ同じであると報告されている(Park & Kim 1995)。

脊椎動物におけるミトコンドリアDNAの構造は、魚類から哺乳類まで高い保存性があることがよく知られている。しかし、二枚貝類のミトコンドリアDNAの構造に関する研究は脊椎動物より著しく遅れており、既往知見がほとんどない(Boore 1999)。二枚貝類で全塩基配列が報告されている4属について、*Crassostrea*属を除いた3属を比較すると、属間での保存性は皆無であるのに対し、属内における種間では保存性が高い。例

えば、*Mytilus edulis*(NC006161, 16,740塩基対)と*Ruditapes philippinarum*(AB065375, 22,676塩基対)では、全長が約6,000塩基対も異なるなどミトコンドリアDNAに共通した構造的特徴が認められない。一方、*M. edulis*と*M. galloprovincialis*(NC006886, 16,774塩基対)では、全長も34塩基対しか変わらず、遺伝子の数や配置なども同じである。これらの既往知見から、上記①~④に示したミトコンドリアDNAに明瞭な構造的差異が存在し、かつミトコンドリアCOI遺伝子におけるアミノ酸の非同義的置換率が属間差に相当する高いレベル(図1)の*C. virginica*と*C. gigas*が同属に分類されていることは疑問である。

本研究対象とした*Crassostrea*属9種のうち、*C. gigas*の地方集団である*C. angulata*と、*C. gigas*や*C. nippona*などとは明瞭な遺伝的差異が認められる*C. virginica*を除いた7種は全て東アジアに分布している(表1)。これらの7種は、共通の祖先種からクレードA群の5種とクレードB群の2種に分化していた(図2)。そこで、両クレード群の現在の地理的拡散を検討すると、中国南部で珠江河口域に分布しているクレードA群の*C. hongkongensis*とベトナムのトンキン湾を北限として分布しているクレードB群の*C. belcheri*の分布境界が、中国南部の雷州半島~海南島で接している。そのため、東アジアにおける*Crassostrea*属の種分化は、まず雷州半島付近で側所的に祖先種から*C. hongkongensis*および*C. belcheri*に種分化したと推定された。クレードAは、さらに2つの小クレードに分岐していることから、*C. hongkongensis*から種分化した*C. gigas*が分布域を北に拡げ、九州の有明海域で*C. sikamea*に種分化したこと、また*C. hongkongensis*は中国南部から拡散せずに*C. ariakensis*が種分化した後、最後に*C. hongkongensis*の姉妹種と推定されている*C. nippona*が種分化し(Lam & Morton 2003)、両種は*C. gigas*と同じように北に拡散したことも推定された。しかし、*C. nippona*は、現在も中国南部~日本に広く分布しているが、*C. ariakensis*は、日本では有明海~八代海域でのみ現存が確認されている絶滅危惧種である(熊本県2004)。一方、*C. ariakensis*は、中国南部に広く分布している現生種の*C. rivularis*(Jinjiang

oyster)と同種であるとする報告もあり (Guo *et al.* 1999; Wang *et al.* 2004), 中国における *Crassostrea* 属の分類学的研究の進展が望まれる。また, *C. belchari* は, 分布域を南に広げ, その拡散過程で *C. iredalei* に種分化したと推定された。

本研究において, ミトコンドリア COI 遺伝子の部分塩基配列の分子系統解析により, *Crassostrea* 属 7 種 (*C. angulata* は *C. gigas* の地方集団であり同種) と *C. virginica* の異所的種分化が明らかとなった。さらに, *Crassostrea* 属 7 種のうち, *C. hongkongensis* と *C. belcheri* の側所的種分化が示唆された。現在, 当研究室では新たな分子系統解析マーカーとしてミトコンドリア DNA の 16S リボゾーム RNA 遺伝子やチトクローム *b* 遺伝子の解析を進めており, 本研究をさらに深化させ, 種分化年代の推定など *Crassostrea* 属の進化をより詳細に解明していく。

要 約

カキ類 (二枚貝綱翼形亜綱ウグイスガイ目イタボガキ科) は, 極圏を除く世界中に分布する重要な二枚貝食糧資源である。100 種以上と言われているカキ類の現生種のなかでも, *Crassostrea* 属は, 食用を目的とした養殖生産量が世界で最も多い水棲動物である。現在, 食用目的で漁獲や養殖生産されている *Crassostrea* 属 9 種のうち, 7 種は東アジアが原産であるのに対し, 欧州と北米には各 1 種しか分布せず, *Crassostrea* 属のユニークな地理的拡散と種分化の関係については不明な点が多い。本研究では, ミトコンドリア DNA のチトクローム *c* 酸化還元酵素サブユニット I 遺伝子を対象として, これら *Crassostrea* 属 9 種の種分化を分子進化的に検討した。当該遺伝子の塩基配列を多重整列して得られた遺伝距離および最小進化法 (Minimum Evolution Method) による分子系統樹の解析から, 北米に分布している *C. virginica* と東アジアに分布している *Crassostrea* 属 7 種の異所的種分化が明らかとなった。さらに, 中国最南部の雷州半島付近における *C. hongkongensis* と *C. belcheri* の側所的種分化も示唆された。本結果から, *Crassostrea* 属の進化は, 化石祖先種からは多地域起源説に従うが, 東アジアにおける現生種の種分化は単一起源説に従うことが推察された。

キーワード: *Crassostrea*, カキ, 種分化, 進化, チトクローム *c* 酸化還元酵素サブユニット I 遺伝子。

引用文献

- Armed, M. (1975) Speciation of living oysters. *Advanced in Marine Biology* **13**, 357-397.
- Banks, M. A., Hedgecock, D., Waters, C. (1993) Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **2**, 129-136.
- Boore, J. L. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* **27**, 1767-1780.
- Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F., Gerard, G. (1998) Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **226**, 279-291.
- FAO (2003) *Review of the State of World Aquaculture*. FAO Fisheries Circular No. 886 Rev. 2, FAO, Rome, 58 pp.
- Fujio, Y. (1979) Enzyme polymorphism and population structure of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agricultural Research* **30**, 32-42.
- Grizel, H., Heral, M. (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* **47**, 399-403.
- Guo, X., Ford, S. E., Zhang, F. (1999) Molluscan aquaculture in China. *Journal of Shellfish Research* **18**, 19-31.
- Hedgecock, D. (1995) The cupped oyster and the Pacific oyster. *Conservation of Fish and Shellfish Resources: Managing Diversity* (Thorpe, J., Gall, G., Lannan, J., Nash, C., eds.). Academic Press, London, pp. 115-137.
- Hedgecock, D., Li, G., Banks, M. A., Kain, Z. (1999) Occurrence of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the Ariake Sea, Japan. *Marine Biology* **133**, 65-68.
- Imai, T., Sakai, S. (1961) Study of breeding of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agricultural Research* **12**, 125-171.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide

- sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P., Yoosukh, W. (2000) Development of species-specific markers of the tropical oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Marine Biotechnology* **2**, 476-484.
- 熊本県 (2004) 熊本県の保護上重要な野生生物リストーレッドリストくまもと2004ー. 31 pp.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, B. I., Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.
- Lam, K., Morton, B. (2003) Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China. *Aquaculture* **228**, 1-13.
- Matsumoto, M. (2003) Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorpha (Bivalvia) from mtDNA COI sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**, 429-440.
- Matthiessen, G. C. (2000) *Oyster Culture*. Fishing News Books Series, Blackwell Publishing Professional, Ames. 176 pp.
- Mattiucci, S., Villani, F. (1983) Allozyme study in oysters classified as *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Ostreidae). *Parasitologia* **25**, 21-27.
- Mattoso, J. (1993) *Historia de Portugal*, Vol. 3. Circulo de leitores, Lisbon, pp. 340-341.
- Menzel, R. W. (1974) Portuguese and Japanese oysters are the same species. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* **31**, 453-455.
- Numachi, K. (1962) Serological studies of species and races in oysters. *The American Naturalist* **96**, 211-217.
- Numachi, K. (1977) Japanese species, breed and distribution. *Aquaculture in Shallow Seas: Progress in Shallow Sea Culture* (Imai, T., ed.). Amerind Publishing, New Delhi, pp. 123-126.
- Park, M. S., Kim, S. H. (1995) Mitochondrial DNA variation in oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg and *C. nippona* Seki) populations from Korea and Japan. *The Korean Journal of Systematic Zoology* **11**, 235-242.
- Stenzel, H. B. (1971) Oysters. *Treatise on Invertebrate Paleontology* (Moore, K. C., ed.). Geological Society of America and the University of Kansas, Boulder, pp. 953-1224.
- 菅原義雄・小金沢昭光 (1995) マガキ・カキ・ホタテガイ・アワビー生産技術と関連研究領域ー (菅原義雄・森 勝義・竹内昌昭・沼知健一・松谷武成共編). 恒星社厚生閣. 東京, pp. 1-17.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Wang, H., Guo, X., Zhang, G., Zhang, F. (2004) Classification of jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis. *Aquaculture* **242**, 137-155.