

# 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 의 선발육종 연구를 위한 microsatellite multiplex PCR법 개발

박철지, 남원식, 이명석, 강지윤, 김경길

국립수산과학원 육종연구센터

## Microsatellite multiplex PCR method for selective breeding studies in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)

Choul Ji Park, Won Shik Nam, Myeong Seok Lee, Ji-Yun Kang and Kyung Kil Kim

Genetics and Breeding Research Center, NFRDI, Gyeongsangnam-do Geoje, 656-842, Korea

### ABSTRACT

The multiplex PCR system including six microsatellites from *Haliotis discus hannai*, consisting of dinucleotide and trinucleotide repeat units, is developed. The six loci were coamplified in a single reaction employing dye-labeled primers. Alleles from these loci were sized using an internal standard by automated sample processing in an ABI3100 Genetic Analyser. Amplified alleles in profiles containing selected microsatellites were typed clearly, providing easily interpretable results. In this results suggest that the presented multiplex PCR system may be a useful tool in a selective breeding program of *H. discus hannai* in which genetic identification will allow different genotypes to be reared together from fertilization. This should have a great impact as it will make selective breeding more efficient. Moreover, it will be useful in a variety of applications, including strain and hybrid identification, parentage assignment, pedigree reconstruction, estimating genetic diversity and/or inbreeding.

**Keywords:** Abalone, Selective breeding, Microsatellite DNA marker, Multiplex PCR

### 서 론

선발육종 기술은 양식생물의 생산성 향상을 위한 가장 일반적이고 효과적인 접근 방법으로써 이 기술을 이용하여 생산성을 향상시킨 많은 연구 사례가 보고되고 있다 (Gjedrem, 1983, 1997, 2000; Argue *et al.*, 2002; Gjerde *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006). 특히, 전복류는 성장속도가 느려 출하 상품 크기까지 장기간의 양성 기간을 필요로 하는 생물로써 전복 양식산업 발전을 위해서는 전복의 성장률 향상을 위한 육종연구가 필수적이다. 이에 전복의 성장률 향상을 위한 다양한 육종연구가 국내외적으로 수행되

고 있다 (Hara and Kikuchi, 1992; Vinna, 2002; Park *et al.*, 2012). 일반적으로 전복을 포함한 패류 등은 후대 자손수가 많아 육상동물보다 선발육종 효과가 크다고 보고되고 있다 (Olesen *et al.*, 2003). Hara (1990) 는 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 의 선발육종을 위한 기초연구를 통하여 전복의 성장형질은 모패의 유전형질과 깊은 관계를 가지고 있다고 보고하였으며, Hara and Kikuchi (1992) 는 선발 2세대 18개월째 성장의 경우 대조구와 비교하여 2배 이상으로 성장이 향상되었다고 보고하였다. 이와 같이 북방전복은 선발을 통한 성장개선 효과가 높은 것으로 나타나 선발육종을 통하여 유전적으로 개량된 양식품종개발을 기대할 수 있다.

이러한 선발육종 연구를 체계적이며 과학적으로 수행하기 위해서는 가능한 동일한 환경에서 생물 사육관리가 이루어져 환경적 효과를 최소화하는 것이 필요하다. 그러므로 최근 선발육종 연구에서는 가능한 생물 초기단계인 수정난 또는 유생단계부터 혼합사육하여 환경적 효과를 최소화 하고 있으며, DNA를 이용한 친자확인기술을 통하여 가계 및 개체를 식별하여 유전능력평가를 실시하고 있다. 이러한 선발육종 방법은 개체 및 가계 식별이 불가능하여 가계 분리사육을 통해 유전능력

Received: November 24, 2014; Revised: December 20, 2014; Accepted: December 26, 2014

Corresponding author : Choul Ji Park

Tel: +82 (55) 639-5812 e-mail: choulji@korea.kr

1225-3480/24550

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.

평가를 실시했던 기존의 결과보다 정확하여 높은 육종효율의 결과를 얻을 수 있으며 높은 선발강도를 제공할 수 있다.

혼합사육을 통한 선발육종 연구는 가계 및 개체식별이 가능한 고변이 유전표식을 많이 필요로 한다. 그중 microsatellite DNA는 높은 변이를 나타내는 유전표식으로서 유전자지도, 개체식별 및 친자확인, 집단유전학 등의 많은 연구에 유용하게 활용하고 있다. Microsatellite 유전표식은 전복류에 있어 *H. discus hannai* (Li *et al.*, 2002, Sekino *et al.*, 2005, 2006; Hara and Sekino, 2005; Sekino and Hara, 2007; Sun *et al.*, 2007), *H. kamtschakana* (Miller *et al.*, 2001), *H. rubra* (Huang and Hanna, 1998; Evans *et al.*, 2000), *H. asinina* (Selvamani *et al.*, 2000), *H. diversicolor* (Ren *et al.*, 2008) 등과 같이 주요 양식전복종을 대상으로 개발되어 많은 유전학적 연구에 활용하고 있다. 또한 보다 정확한 유전학적 연구 및 유전자지도 작성 등의 연구를 위하여 많은 수의 microsatellite 유전표식을 지속적으로 개발하고 있다. 그러나 이렇게 많은 수의 microsatellite 유전표식을 이용하여 유전학적 분석을 하기 위해서는 비싼 실험비용과 많은 시간을 필요로 한다.

본 연구에서는 복방전복의 유전학적 연구의 효율적인 분석을 위하여 한번의 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭으로 다수의 microsatellite 유전표식에 대한 다중분석을 가능하게 하는 multiplex PCR법을 개발하여 실험비용 절감 및 시간절약을 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 Genomic DNA 추출

Multiplex PCR법 개발을 위하여 사용한 복방전복 시료는 2009년 9월 경남 거제도 남부면 다포리 어촌계 해녀들이 채취한 자연산 전복으로 총 77마리이며 평균 각장 88.91 mm, 평균 각폭 60.72 mm, 평균 중량 77.45 g 이다. 개발한 multiplex PCR 방법에 따른 친자확인 유용성을 확인하기 위하여 2010년 1:1 인공수정으로 20가계를 생산하여 유생단계부터 12개월간 혼합 사육관리한 복방전복 치패 500마리 (평균 각장 : 41.5 mm) 를 무작위로 선택하여 분석에 사용하였다.

시료의 total genomic DNA는 전복 외투막의 조직 일부를 절제하여 킬레이팅 수지법 (chelating resin method; Walsh *et al.*, 1991; Suenaga and Nakamura, 2005) 을 이용하여 추출하였다.

### 2. Microsatellite locus의 증폭 범위확인

Multiplex PCR 디자인을 위하여 Table 1에 나타난 12개 microsatellite locus (Park *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002;

Sekino *et al.*, 2005) 를 선택하였다. 12 microsatellite locus에 대한 PCR 증폭은 킬레이팅 수지법으로 얻어진 DNA 시료 10 ng, 10 mM Tris-Hcl (pH 8.8), 0.1% Triton X-100, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.5 U *f-Taq* DNA polymerase (Solgent), 0.5 pmol microsatellite primer pairs를 혼합하여 사용하였으며, PTC-200 Thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) 를 이용하여 95℃에서 10분간 initial denaturation 시킨 후, 95℃에 20초, 55℃에 30초, 72℃에 1분으로 35 cycle 반응시킨 다음 72℃에 30분간 final extension시켜 PCR 반응을 마쳤다.

PCR에 의해 증폭된 microsatellite DNA 단편은 size standard로 GeneScan 400HD ROX (ABI, USA), HiDi formamide와 혼합한 후 유전자형 분석기 (3100 genetic analyzer; ABI, USA) 를 통하여 분석을 하였으며 분석 후에 나타난 피크 정보를 GeneMapper v3.7 software를 이용하여 유전자형을 분석하여 각 microsatellite locus의 증폭범위를 확인하였다.

### 3. Multiplex design

12개의 microsatellite locus의 증폭범위를 확인하고 증폭 범위의 중복유무에 따라 Applied Biosystems (ABI) 의 3가지 형광표식 (6-FAM, HEX and NED) 을 붙였다. multiplex design을 위하여 기본적으로 증폭범위가 중복되지 않은 locus는 같은 fluorescent dye를 사용하였으며, 반면에 같은 증폭범위를 나타낸 locus는 서로 다른 fluorescent dye를 사용하여 실험하였다.

최적의 multiplex PCR 조건의 검토를 위하여 서로 다른 증폭범위의 microsatellite locus를 기준으로 8개의 primer pairs를 혼합하여 PCR 조건을 검토하였으며, 조건검토 시 증폭이 불안정하거나 증폭하지 않는 것은 제거하고 같은 증폭범위의 다른 primer pairs를 추가하여 분석하는 크로스체킹 방법으로 실험을 실시하였다. 또한 PCR 증폭온도, 각 primer pairs 간의 상호작용에 따른 정량조절을 실시하였다.

### 4. Multiplex PCR 법의 유용성

multiplex PCR의 유용성을 검토하기 위하여 20가계를 부화유생단계에서 10개월간 혼합사육한 복방전복 치패 500마리를 대상으로 친자확인 및 가계분석을 실시하였다. 친자확인용 개발된 multiplex PCR을 이용하여 얻어진 유전자형을 PAPA 2.0 (Package for the Analysis of Parental Allocation) 프로그램을 이용하여 결과를 얻었으며, 가계분석은 멘델의 분리비에 따른 관찰치와 기대치 간에  $\chi^2$ -test에 의한 유의차의 유무로 검토하였다.

**Table 1.** 12 microsatellite markers for multiplex design

| Locus          | Repeat type                | Primer sequences (5'-3')                                     | Accession No. |
|----------------|----------------------------|--|---------------|
| <i>Hdh145</i>  | (CA)7                      | F-TAGTTGTTGAACCTTTCTGTTG<br>R-TAGACAAACAGAAAACCTTCACC        | AB091480      |
| <i>Hdh512</i>  | (GA)23                     | F-CCGAGATGTTTACAGAGAGA<br>R-CACACTCGCTTTCTCACTCA             | AB091482      |
| <i>Hdh1321</i> | (CGCA)4(CA)18              | F-TTCTGAGATGAGACGCACCAC<br>R-TTGGCAGCAGGCGTCGTGT             | AB084076      |
| <i>Afa017</i>  | (AC)7N12(ACGC)4N4(ACGC)5   | F-CTGACTGTAACACCGTGTGCTAAT<br>R-GAGTGTATGCCACATGGTTCCTATT    | AB177906      |
| <i>Awb017</i>  | (CA)16                     | F-ACATGTCGTGATTGTTTCCCAC<br>R-TCCTGACCACATACTGTTACATTAG      | AB177912      |
| <i>Awb019</i>  | (GAGT)8                    | F-GACACGACGCTAGAAACAAACGATCA<br>R-GTACGATTCCCCACATGGGTACATTG | AB177913      |
| <i>Awb035</i>  | (TA)4AT(CA)44              | F-CTAAGCGCCCCTGCAGCTTCTGTT<br>R-CGCCTATGTCAATTTGGTCCCTTCG    | AB177919      |
| <i>Awb063</i>  | (CA)26(CACG)13(CA)4        | F-ACTATAGAATCAGCGTCAGTCCAGT<br>R-AGATTACTTCACTTATAGCGACGTAC  | AB177930      |
| <i>Awb074</i>  | (CACG)4N13(AC)2(GC)6(AC)21 | F-TGGTATCTCGGTGAGCAAAGGAGTC<br>R-TGTCAAATTTCTGTAGGCGAAGCGTC  | AB177933      |
| <i>Awb083</i>  | (ATC)8                     | F-GCTTAGAAGGGACATAACTCGCAATA<br>R-AATAGACATTCTACAAGCGAGGAAA  | AB177936      |
| <i>Awb098</i>  | (AC)13                     | F-ACATGGAAGTGCAGTCTAGAAAGC<br>R-TGATTATTTTCAGATCGCCGTCATA    | AB177937      |
| <i>Awb101</i>  | (AG)26                     | F-GCCTCCAAGCAGTGTAGAAGAATCC<br>R-CTCGCAGTATCTGAATAACGTTCCC   | AB177940      |

## 결과 및 고찰

### 1. Multiplex design

최적의 multiplex PCR 조건을 찾기 위하여 12개 microsatellite locus를 이용하여 각각의 증폭범위 및 유전적 특성을 확인하였다. 그 결과 Table 2에 나타낸 것과 같이 증폭 범위의 경우 *Hdh145*는 132-142 bp, *Hdh512*는 87-139 bp, *Hdh1321*는 261-371 bp, *Afa017*는 161-247 bp, *Awb017*는 205-249 bp, *Awb019*는 174-258 bp, *Awb035*는 153-217 bp, *Awb063*는 140-272 bp, *Awb074*는 154-260 bp, *Awb083*는 213-255 bp, *Awb098*는 167-189 bp, *Awb101*는 113-211 bp로 나타났으며, 대립유전자수는 *Hdh1321*이 35개로 가장 많았으며 *Hdh145* 및 *Awb083*이 7개로 가장 적은 것으로 나타났다. 12개 locus에 대한 관찰치 이형접합율 (observed heterozygosity) 의 범위는 0.219-0.915이며, 기대치 이형접합율 (expected heterozygosity) 의 범위는 0.696-0.961로 높게 나타났다.

이중 다른 locus의 증폭범위와 중복되지 않고 가장 낮은 사

이즈를 나타낸 것은 *Hdh512*였으며 가장 큰 사이즈를 나타낸 것은 *Hdh1321*이었다. 이렇게 중복되지 않은 2개의 locus를 기준으로 multiplex design 작업을 수행 하였다. 우선, 12개 locus 증폭범위의 중복유무에 따라 Table 2에 나타낸 것과 같이 3가지의 fluorescent dye (HEX, 6-FAM, NED) 를 붙였다. 즉, 증폭범위가 중복되지 않는 것을 기준으로 *Hdh145*, *Hdh074*, *Awb083*는 HEX fluorescent dye를 붙였으며, *Hdh512*, *Afa017*, *Awb017*, *Awb063*는 6-FAM fluorescent dye를 붙였고, *Hdh1321*, *Awb019*, *Awb035*, *Awb098*, *Awb101*는 NED fluorescent dye를 붙였다. Multiplex PCR 조건검토는 12개 locus의 크로스체킹 방법으로 실시하였다. 그 결과 12개 후보 microsatellite locus 중 6개 locus *Hdh145*, *Hdh512*, *Hdh1321*, *Awb017*, *Awb083* 및 *Awb098*의 조합이 최적 조건임을 확인하였다. 나머지 6개 locus *Afa017*, *Awb019*, *Awb035*, *Awb063*, *Awb074* 및 *Awb101*은 증폭이 불안정하거나 다른 locus의 증폭에 상호간섭 등의 영향으로 제외하였다.

6개 locus의 multiplex PCR 반응액은 DNA 시료 10 ng,

**Table 2.** Genetic characterization and dye label of 12 microsatellite markers

| Locus          | Allele Size Range (bp) | Number of alleles | Observed heterozygosity | Expected heterozygosity | Dye label |
|----------------|------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|
| <i>Hdh145</i>  | 132 - 142              | 7                 | 0.400                   | 0.696                   | HEX       |
| <i>Hdh512</i>  | 87 - 139               | 19                | 0.219                   | 0.930                   | 6-FAM     |
| <i>Hdh1321</i> | 261 - 371              | 35                | 0.853                   | 0.957                   | NED       |
| <i>Afa017</i>  | 161 - 247              | 10                | 0.833                   | 0.840                   | 6-FAM     |
| <i>Awb017</i>  | 205 - 249              | 12                | 0.880                   | 0.845                   | 6-FAM     |
| <i>Awb019</i>  | 174 - 258              | 16                | 0.825                   | 0.912                   | NED       |
| <i>Awb035</i>  | 153 - 217              | 30                | 0.718                   | 0.959                   | NED       |
| <i>Awb063</i>  | 140 - 272              | 27                | 0.525                   | 0.961                   | 6-FAM     |
| <i>Awb074</i>  | 154 - 260              | 17                | 0.800                   | 0.844                   | HEX       |
| <i>Awb083</i>  | 213 - 255              | 7                 | 0.700                   | 0.644                   | HEX       |
| <i>Awb098</i>  | 167 - 189              | 9                 | 0.783                   | 0.816                   | NED       |
| <i>Awb101</i>  | 113 - 211              | 30                | 0.915                   | 0.948                   | NED       |

**Table 3.** Percentages of offspring assigned to the correct parental pair in 20 families

| Marker No. | Locus          | Success rate | Marker combinations (success rate) |
|------------|----------------|--------------|------------------------------------|
| 1          | <i>Hdh1321</i> | 25.7%        | 1 (25.7%)                          |
| 2          | <i>Hdh512</i>  | 19.4%        | 1 + 2 (45.5%)                      |
| 3          | <i>Awb017</i>  | 11.4%        | 1 + 2 + 3 (78.5%)                  |
| 4          | <i>Hdh145</i>  | 5.5%         | 1 + 2 + 3 + 4 (88.9%)              |
| 5          | <i>Awb098</i>  | 6.3%         | 1 + 2 + 3 + 4 + 5 (99.4%)          |
| 6          | <i>Awb083</i>  | 2.5%         | 1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6 (100%)       |

10 mM Tris-Hcl (pH 8.8), 0.1% Triton X-100, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.5 U *f-Taq* DNA polymerase (Solgent) 에 *Hdh512*, *Hdh083* 및 *Awb098*의 primer 농도를 0.3 μM, *Hdh145*의 primer 농도를 0.5 μM, *Hdh1321* 및 *Awb017*는 0.2 μM로 만들어 졌으며, PCR 증폭은 PTC-200 Thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) 를 이용하여 95°C에서 10분간 initial denaturation 시킨 후, 95°C에 20초, 55°C에 30초, 72°C에 1분으로 35 cycle 반응시킨 다음 72°C에 30분간 final extension으로 시행하였다.

**2. Multiplex PCR을 이용한 친자확인 및 가계분석**

6개의 microsatellite locus를 이용한 multiplex PCR의 유용성을 검토하기 위하여 20가계를 부화유생단계부터 10개월간 혼합사육한 복방전복 치패 500마리에 대한 친자확인 및 가계분석을 실시하였다. 그 결과 Table 3에 나타난 것과 같이

각 유전표식에 따른 친자확인 성공률은 *Hdh1321* 25.7%, *Hdh512* 19.4%, *Awb017* 11.4%, *Hdh145* 5.5%, *Awb098* 6.3%, *Awb083*의 2.5% 순으로 나타났다. 또한 높은 친자확인 성공률 순으로 유전표식을 조합하여 분석한 결과 *Hdh1321*와 *Hdh512*의 2개조합은 45.5%, 3개 조합 (*Hdh1321*, *Hdh512*, *Awb017*) 의 경우 78.2%, 4개조합 (*Hdh1321*, *Hdh512*, *Awb017*, *Hdh145*) 의 경우 88.9%, 5개조합 (*Hdh1321*, *Hdh512*, *Awb017*, *Hdh145*, *Awb098*) 의 경우 99.4%, 6개조합 (*Hdh1321*, *Hdh512*, *Awb017*, *Hdh145*, *Awb098*, *Awb083*) 의 경우 100%의 친자확인 성공률을 나타내었다. 또한 20가계에 대한 가계분석을 위하여 6개의 microsatellite locus에 대한 멘델의 분리비를 분석한 결과, 대부분의 가계는 어미의 유전자형에 대한 관찰치와 기대치가 일치하였다 (Appendix I). 일부  $\chi^2$ -test에 의한 유의차를 나타내는 가계가 존재하였으나 가계당 분석개체수가 50개체 미만으로 분석개체 수에 따른 유출오차로 추정된다.

### 3. Multiplex PCR법 평가

양식생물의 사육관리 및 혈통에 대한 평가를 위하여 필요한 친자확인 및 가계추적 등에 가장 적합한 유전표식으로 microsatellite DNA가 알려져 있다 (Goldstein and Schlotterer, 1999). 본 연구에서 북방전복의 육종연구 및 유전학적 연구를 위하여 6개의 microsatellite multiplex PCR법 개발과 그 유용성을 검토하였다. 그 결과 microsatellite multiplex PCR 기술은 시간절약 및 비용 절감뿐만 아니라 대량의 샘플을 처리할 경우 실험과정의 간소화가 가능하여 handling errors를 줄일 수 있었다. 또한, 선택된 6개의 microsatellite locus는 multiplex PCR로 genotyping 분석 시에 명확한 대립유전자 pattern을 나타내고 있어 친자확인 분석시 높은 성공률을 나타내었으며, 가계분석에 있어서도 6개 locus 모두 멘델의 분리법칙을 따르고 있었다. 따라서 본 연구에서 개발된 multiplex PCR법은 북방전복의 선발육종을 위한 친자확인 및 가계 분석에 매우 유용한 기술이며, 더욱이 집단유전학 및 계통분류학 분석에도 유용하게 사용할 수 있을 것이라 생각된다.

### 요 약

북방전복 선발육종에 필요한 친자확인 및 가계분석을 효율적으로 실험하기 위하여 microsatellite multiplex PCR 기술을 개발하였다. 개발한 multiplex PCR 기술은 6개 microsatellite locus *Hdh145*, *Hdh512*, *Hdh1321*, *Awb017*, *Awb083* 및 *Awb098*을 한번의 PCR 증폭으로 다중분석이 가능하다. 이 기술은 높은 친자확인 성공률과 가계분석에 있어서도 모두 멘델의 분리법칙을 따르고 있다. 더욱이 대량의 시료처리를 필요로 하는 경우에 있어서도 시간절약 및 비용 절감뿐만 아니라 샘플 처리과정의 간소화가 가능하여 handling errors를 줄일 수 있다. 따라서 본 연구에서 개발된 multiplex PCR은 친자확인, 가계분석, 집단유전학 및 계통분류학 분석에 유용하게 사용할 수 있을 것이라 생각된다.

### 사 사

본 연구는 국립수산물과학원 (RP-2014-BT-052) 의 지원에 의해 연구 되었습니다.

### REFERENCES

Argue, B.J., Arce, S.M., Lotz, J.M. and Moss, S.M. (2002) Selective breeding of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to taura syndrome virus. *Aquaculture*, **204**: 447-460.

Evans, B., White, R.W.G., Elliott, N.G. (2000) Characterization of microsatellite loci in *Australian blacklip abalone (Haliotis rubra, Leach)*. *Molecular Ecology*, **9**: 1183-1184.

Gjedrem, T. (1983) Genetic variation in quantitative traits and selective breeding in fish and shellfish. *Aquaculture*, **33**: 51-72.

Gjedrem, T. (1997) Selective breeding to improve aquaculture production. *World Aquaculture*, **28**: 33-45.

Gjedrem, T. (2000) Generic improvement of cold-water species. *Aquaculture Research*, **31**: 25-33.

Gjerde, B., Terjesen, B.F., Barr, Y., Lein, I., Thorland, I. (2004) Genetic variation for juvenile growth and survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, **236**: 167-177.

Goldstein, D.B. and Schlotterer, C. (1999) *Microsatellites: Evolution and Application*. Oxford University Press. New York.

Hara, M. (1990) The effect of genetics on growth in three groups of abalone seeds. *Bulletin of the TohoKu National Fisheries Research Institute*, **52**: 73-77

Hara, M. and Kikuchi, S. (1992) Increasing growth rate of abalone, *Haliotis discus hannai*, using selection techniques. *NOAA Technical report*, **106**: 21-26.

Hara, M. and Sekino, M. (2005) Genetic difference between Ezo-awabi *Haliotis discus hannai* and Kuro-awabi *Haliotis discus discus* population: microsatellite-based population analysis in Japanese abalone. *Fisheries Science*, **71**: 754-766.

Hunang, B. and Hannna, P.J. (1998) Identification of three polymorphic microsatellite loci in blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach) and detection in other abalone species. *Journal of Shellfish Research*, **17**: 795-799.

Li, Q., Park, C., Kijima, A. (2002) Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Journal of Shellfish Research*, **21**: 811-815.

Lucas, T., Macbeth, M., Degnan, S.M., Knibb, W. and Degnan, B.M. (2006) Heritability estimates for growth in the tropical abalone *Haliotis asinina* using microsatellites to assign parentage. *Aquaculture*, **259**: 146-152.

Miller, K.M., Laberee, K., Kaukinen, K.H., Li, S., Withler, R.E. (2001) Development of microsatellite loci in pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Molecular Ecology Notes*, **1**: 315-317.

Olesen, I., Gjedrem, T., Bentsen, H.B., Gjerde, B. and Rye, M. (2003) Breeding programs for sustainable aquaculture. *Journal of Applied Aquaculture*, **13**: 179-204.

Park, C.J., Li, Q., Kobayashi, T., Kijima, A. (2003) Characterization novel microsatellite DNA marker in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Fish genetics and Breeding science*, **33**: 19-24.

Park, C.J., Lee, J.H., Noh, J.K., Kim, H.C., Park, J.W.,

- Hwang, I.J. and Kim, S.Y. (2012) Growth of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, using selection breeding techniques. *The Korean Journal Malacology*, **28**(4): 343-347.
- Ren, P., Wang, Z., Yao, C., Liu, Y., Ke, C. (2008) Development of 11 polymorphic microsatellite loci in the small abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve). *Molecular Ecology Resources*, **8**: 1390-1392
- Sekino, M., Saido, T., Fujita, T., Kobayashi, T., Takami, H. (2005) Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): a preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas. *Aquaculture*, **243**: 33-47.
- Sekino, M., Kobayashi, T., Hara, M. (2006) Segregation and Linkage Analysis of 75 Novel Microsatellite DNA markers in Pair Crosses of Japanese Abalone (*Haliotis discus hannai*) Using the 5'-Tailed Primer Method. *Marine Biotechnology*, **8**: 453-466.
- Sekino M. and Hara M. (2007) Individual assignment tests proved genetic boundaries in a species complex of Pacific abalone (genus *Haliotis*). *Conservation Genetics*, **8**: 823-841.
- Selvamani, M.J.P., Degnan, S.M., Paetkau, D., Degnan, B.M. (2000) Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reep population of the tropical abalone, *Haliotis asinina*. *Molecular Ecology*, **9**: 1184-1185.
- Suenaga, E. and Nakamura, H. (2005) Evolution of tree methods for effective extraction of DNA from human hair. *Journal of chromatography B*, **820**: 137-141.
- Sun X.Q., Zhen M.G., Yang G.P. (2007) Development of 15 polymorphic genic microsatellite DNA markers of Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 604-606.
- Viana, M.T. (2002) Abalone Aquaculture, An overview. *World Aquaculture*, pp. 34-39.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, **10**: 506-513.
- Zheng, H., Zhang, G., Liu, X. and Guo, X. (2006) Sustained response to selection in an introduced population of the hermaphroditic bay scallop *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819). *Aquaculture*, **255**: 579-585.

## Appendix I. Mendelian segregation of 6 microsatellite markers in 20 families

| Family<br>(No.individuals) | Locus   |          |          |          |               |         |          |                |          |          |          |          |
|----------------------------|---|----------|----------|----------|---------------|---------|----------|----------------|----------|----------|----------|----------|
|                            | Genotypic in offspring                                      |          |          |          |               |         |          |                |          |          |          |          |
|                            | Number of offspring observed in each family (Expted number) |          |          |          |               |         |          |                |          |          |          |          |
|                            | <i>Hdh145</i>   |          |          |          | <i>Hdh512</i> |         |          | <i>Hdh1321</i> |          |          |          |          |
| 1(27)                      | 136136  | 136140   |          |          | 096098        | 096116  | 098136   | 116136         | 301301   | 301311   | 301321   | 311321   |
|                            | 16(13.5)  | 11(13.5) |          |          | 7(6.75)       | 4(6.75) | 8(6.75)  | 8(6.75)        | 8(6.75)  | 9(6.75)  | 4(6.75)  | 6(6.75)  |
| 2(10)                      | 132136  |          |          |          | 098112        | 112116  | 116116   | 098116         | 289301   | 289311   | 301321   | 311321   |
|                            | 10(10)  |          |          |          | 3(2.5)        | 3(2.5)  | 4(2.5)   | 0(2.5)         | 5(2.5)   | 3(2.5)   | 2(2.5)   | 0(2.5)   |
| 3(18)                      | 136136  | 136142   |          |          | 098098        | 098104  | 098116   | 104116         | 301311   | 301323   | 311311   | 311323   |
|                            | 7(9)  | 11(9)    |          |          | 5(4.5)        | 3(4.5)  | 5(4.5)   | 5(4.5)         | 5(4.5)   | 5(4.5)   | 5(4.5)   | 3(4.5)   |
| 4(21)                      | 136136  | 136142   |          |          | 098112        | 098116  | 112116   | 116116         | 301301   | 301311   | 301327   | 311327   |
|                            | 7(10.5)   | 14(10.5) |          |          | 10(5.25)      | 3(5.25) | 4(5.25)  | 4(5.25)        | 4(5.25)  | 3(5.25)  | 4(5.25)  | 10(5.25) |
| 5(29)                      | 136136  | 136142   | 142142   |          | 112112        | 112116  | 112136   | 116136         | 301301   | 301327   | 301349   | 327349   |
|                            | 15(7.25)  | 7(14.5)  | 7(7.25)  |          | 8(7.25)       | 6(7.25) | 9(7.25)  | 6(7.25)        | 6(7.25)  | 9(7.25)  | 6(7.25)  | 8(7.25)  |
| 6(29)                      | 136136  | 136140   | 140140   |          | 100108        | 100116  | 108136   | 116136         | 301301   | 301303   | 303303   |          |
|                            | 8(7.25)   | 10(14.5) | 11(7.25) |          | 6(7.25)       | 9(7.25) | 5(7.25)  | 9(7.25)        | 14(7.25) | 9(14.5)  | 6(7.25)  |          |
| 7(26)                      | 132136  | 132140   | 136136   | 136140   | 100100        | 100112  | 100136   | 112136         | 289301   | 289303   | 301321   | 303321   |
|                            | 10(6.5)   | 4(6.5)   | 4(6.5)   | 8(6.5)   | 7(6.5)        | 4(6.5)  | 8(6.5)   | 7(6.5)         | 7(6.5)   | 4(6.5)   | 7(6.5)   | 8(6.5)   |
| 8(22)                      | 132132  |          |          |          | 104112        | 104136  | 112112   | 112136         | 289323   | 289327   | 301323   | 301327   |
|                            | 22(22)  |          |          |          | 5(5.5)        | 4(5.5)  | 6(5.5)   | 7(5.5)         | 5(5.5)   | 6(5.5)   | 4(5.5)   | 7(5.5)   |
| 9(25)                      | 132136  |          |          |          | 100104        | 100112  | 104136   | 112136         | 301323   | 301327   | 303323   | 303327   |
|                            | 25(25)  |          |          |          | 5(6.25)       | 7(6.25) | 4(6.25)  | 9(6.25)        | 3(6.25)  | 10(6.25) | 5(6.25)  | 7(6.25)  |
| 10(31)                     | 136136  | 136140   | 136142   | 140142   | 102112        | 102116  | 112116   | 116116         | 283301   | 283327   | 299301   | 299327   |
|                            | 6(7.75)   | 10(7.75) | 8(7.75)  | 7(7.75)  | 5(7.75)       | 7(7.75) | 9(7.75)  | 10(7.75)       | 6(7.75)  | 6(7.75)  | 10(7.75) | 9(7.75)  |
| 11(37)                     | 132136  | 132140   | 136136   | 136140   | 112112        | 112116  | 116116   |                | 301301   | 301327   | 301341   | 327341   |
|                            | 7(9.25)   | 10(9.25) | 9(9.25)  | 11(9.25) | 14(9.25)      | 9(18.5) | 14(9.25) |                | 6(9.25)  | 11(9.25) | 8(9.25)  | 12(9.25) |
| 12(38)                     | 132136  | 132140   | 136136   | 136140   | 112112        | 112116  | 116116   |                | 301301   | 301327   | 301349   | 327349   |
|                            | 6(9.5)  | 14(9.5)  | 6(9.5)   | 12(9.5)  | 7(9.5)        | 11(19)  | 20(9.5)  |                | 9(9.5)   | 12(9.5)  | 10(9.5)  | 7(9.5)   |
| 13(38)                     | 136136  | 136140   | 140140   |          | 112112        | 112116  | 112136   | 116136         | 301301   | 301321   | 301327   | 321327   |
|                            | 7(9.5)  | 22(19)   | 9(9.5)   |          | 9(9.5)        | 11(9.5) | 14(9.5)  | 4(9.5)         | 5(9.5)   | 11(9.5)  | 11(9.5)  | 11(9.5)  |
| 14(17)                     | 132140  | 136140   |          |          | 092112        | 112116  | 116116   | 092116         | 301327   | 301341   | 321327   | 321341   |
|                            | 10(8.5)   | 7(8.5)   |          |          | 7(4.25)       | 4(4.25) | 6(4.25)  | 0(4.25)        | 3(4.25)  | 7(4.25)  | 5(4.25)  | 2(4.25)  |
| 15(18)                     | 136136  | 136140   |          |          | 100100        | 100116  | 116116   |                | 301301   | 303303   | 301303   |          |
|                            | 8(9)  | 10(9)    |          |          | 8(4.5)        | 1(9)    | 9(4.5)   |                | 9(4.5)   | 9(4.5)   | 0(9)     |          |
| 16(23)                     | 132132  | 132136   |          |          | 112112        | 112136  | 136136   |                | 289289   | 289301   | 301321   | 238321   |
|                            | 18(11.5)  | 5(11.5)  |          |          | 7(5.75)       | 8(11.5) | 8(5.75)  |                | 7(5.75)  | 8(5.75)  | 8(5.75)  | 0(5.75)  |
| 17(22)                     | 136136  | 136142   | 142142   |          | 098108        | 098136  | 104108   | 104136         | 301311   | 301323   | 311349   | 323349   |
|                            | 13(5.5)   | 3(11)    | 6(5.5)   |          | 6(5.5)        | 8(5.5)  | 7(5.5)   | 1(5.5)         | 7(5.5)   | 1(5.5)   | 7(5.5)   | 7(5.5)   |
| 18(19)                     | 132132  | 132140   | 136140   | 132136   | 108112        | 108124  | 112136   | 124136         | 289301   | 289359   | 301315   | 315359   |
|                            | 6(4.75)   | 6(4.75)  | 7(4.75)  | 0(4.75)  | 4(4.75)       | 4(4.75) | 4(4.75)  | 7(4.75)        | 4(4.75)  | 4(4.75)  | 7(4.75)  | 4(4.75)  |
| 19(38)                     | 136140  | 138140   |          |          | 116116        | 116136  | 136136   |                | 301301   | 301311   |          |          |
|                            | 18(19)  | 20(19)   |          |          | 14(9.5)       | 7(19)   | 17(9.5)  |                | 12(19)   | 26(19)   |          |          |
| 20(12)                     | 132140  | 136140   |          |          | 112112        | 112136  | 116136   | 112116         | 301301   | 301321   | 301327   | 321327   |
|                            | 9(6)  | 3(6)     |          |          | 4(3)          | 4(3)    | 4(3)     | 0(3)           | 4(3)     | 1(3)     | 3(3)     | 4(3)     |

Appendix I. (Continued)

| Family<br>(No.individuals) | Locus   |          |         |         |               |          |         |         |               |          |         |         |
|----------------------------|---|----------|---------|---------|---------------|----------|---------|---------|---------------|----------|---------|---------|
|                            | Genotypic in offspring                                      |          |         |         |               |          |         |         |               |          |         |         |
|                            | Number of offspring observed in each family (Expted number) |          |         |         |               |          |         |         |               |          |         |         |
|                            | <i>Awb017</i>   |          |         |         | <i>Awb083</i> |          |         |         | <i>Awb098</i> |          |         |         |
| 1(27)                      | 209211  | 211213   |         |         | 235235        | 235238   | 235253  | 238253  | 171173        | 171185   | 173181  | 181185  |
|                            | 13(13.5)  | 14(13.5) |         |         | 10(6.75)      | 6(6.75)  | 5(6.75) | 6(6.75) | 9(6.75)       | 6(6.75)  | 6(6.75) | 6(6.75) |
| 2(10)                      | 209211  | 209219   | 211213  | 213219  | 235238        | 238238   |         |         | 167173        | 167185   | 171173  | 171185  |
|                            | 3(2.5)  | 3(2.5)   | 3(2.5)  | 1(2.5)  | 6(5)          | 4(5)     |         |         | 3(2.5)        | 3(2.5)   | 4(2.5)  | 0(2.5)  |
| 3(18)                      | 209213  | 211213   | 213213  | 209213  | 235238        | 235241   | 238238  | 238241  | 167173        | 167185   | 173181  | 181185  |
|                            | 5(4.5)  | 5(4.5)   | 8(4.5)  | 0(4.5)  | 5(4.5)        | 2(4.5)   | 3(4.5)  | 8(4.5)  | 6(4.5)        | 7(4.5)   | 3(4.5)  | 2(4.5)  |
| 4(21)                      | 209209  | 209213   | 213213  |         | 235235        | 235238   | 235250  | 238250  | 173173        | 173179   | 173185  | 179185  |
|                            | 4(5.25)   | 12(10.5) | 5(5.25) |         | 4(5.25)       | 4(5.25)  | 9(5.25) | 4(5.25) | 7(5.25)       | 5(5.25)  | 5(5.25) | 4(5.25) |
| 5(29)                      | 209213  | 213213   |         |         | 235235        | 235238   | 235250  | 238250  | 173173        | 173179   | 179179  |         |
|                            | 16(14.5)  | 13(14.5) |         |         | 7(7.25)       | 9(7.25)  | 7(7.25) | 6(7.25) | 6(7.25)       | 17(14.5) | 6(7.25) |         |
| 6(29)                      | 211211  | 211213   | 213213  |         | 235235        | 235238   |         |         | 173173        | 173179   | 179179  |         |
|                            | 8(7.25)   | 14(14.5) | 7(7.25) |         | 17(14.5)      | 12(14.5) |         |         | 8(7.25)       | 14(14.5) | 7(7.25) |         |
| 7(26)                      | 211211  | 211213   | 211249  | 213249  | 235238        |          |         |         | 171173        | 171179   | 173181  | 179181  |
|                            | 5(6.5)  | 7(6.5)   | 8(6.5)  | 6(6.5)  | 26(26)        |          |         |         | 9(6.5)        | 5(6.5)   | 9(6.5)  | 3(6.5)  |
| 8(22)                      | 211211  | 211249   |         |         | 235238        |          |         |         | 167173        | 167181   | 171173  | 171181  |
|                            | 11(11)  | 11(11)   |         |         | 22(22)        |          |         |         | 6(5.5)        | 5(5.5)   | 8(5.5)  | 3(5.5)  |
| 9(25)                      | 209211  | 211213   |         |         | 235238        | 235241   |         |         | 167173        | 167183   | 171173  | 171183  |
|                            | 13(12.5)  | 12(12.5) |         |         | 12(12.5)      | 13(12.5) |         |         | 5(6.25)       | 6(6.25)  | 9(6.25) | 5(6.25) |
| 10(31)                     | 209217  | 217227   |         |         | 235235        | 235238   | 235250  | 238250  | 167167        | 167181   |         |         |
|                            | 14(15.5)  | 17(15.5) |         |         | 9(7.75)       | 11(7.75) | 5(7.75) | 6(7.75) | 17(15.5)      | 14(15.5) |         |         |
| 11(37)                     | 217217  | 217219   |         |         | 235235        | 235238   | 235250  | 238250  | 167181        | 181181   |         |         |
|                            | 20(18.5)  | 17(18.5) |         |         | 8(9.25)       | 14(9.25) | 8(9.25) | 7(9.25) | 17(18.5)      | 20(18.5) |         |         |
| 12(38)                     | 211217  | 217217   |         |         | 235235        | 235238   | 235250  | 238250  | 167173        | 173181   |         |         |
|                            | 24(19)  | 14(19)   |         |         | 14(9.5)       | 10(9.5)  | 5(9.5)  | 9(9.5)  | 28(19)        | 10(19)   |         |         |
| 13(38)                     | 211217  | 213217   |         |         | 235235        | 235250   |         |         | 167173        | 167181   | 173181  | 181181  |
|                            | 19(19)  | 19(19)   |         |         | 22(19)        | 16(19)   |         |         | 9(9.5)        | 11(9.5)  | 6(9.5)  | 12(9.5) |
| 14(17)                     | 213213  | 213217   | 213221  | 217221  | 235235        | 235238   |         |         | 173181        | 181181   |         |         |
|                            | 6(4.25)   | 5(4.25)  | 2(4.25) | 4(4.25) | 13(8.5)       | 4(8.5)   |         |         | 8(8.5)        | 9(8.5)   |         |         |
| 15(18)                     | 209217  | 209219   | 213217  | 213219  | 235238        | 238238   |         |         | 171173        | 171183   | 173179  | 179183  |
|                            | 6(4.5)  | 1(4.5)   | 3(4.5)  | 8(4.5)  | 6(9)          | 12(9)    |         |         | 1(4.5)        | 3(4.5)   | 10(4.5) | 4(4.5)  |
| 16(23)                     | 211213  | 213219   |         |         | 235238        | 238238   |         |         | 167173        | 167179   | 171173  | 171179  |
|                            | 16(11.5)  | 7(11.5)  |         |         | 10(11.5)      | 13(11.5) |         |         | 9(5.75)       | 5(5.75)  | 4(5.75) | 5(5.75) |
| 17(22)                     | 211213  | 213213   |         |         | 235238        | 235241   | 238238  | 238241  | 167173        | 167179   | 173181  | 179181  |
|                            | 7(11)   | 15(11)   |         |         | 6(5.5)        | 5(5.5)   | 6(5.5)  | 5(5.5)  | 6(5.5)        | 3(5.5)   | 6(5.5)  | 7(5.5)  |
| 18(19)                     | 211217  | 211219   | 213217  | 213219  | 235238        | 238238   |         |         | 171173        | 171181   | 173179  | 179181  |
|                            | 6(4.75)   | 6(4.75)  | 4(4.75) | 3(4.75) | 12(9.5)       | 7(9.5)   |         |         | 2(4.75)       | 4(4.75)  | 7(4.75) | 6(4.75) |
| 19(38)                     | 209213  | 209217   | 211213  | 211217  | 235235        | 235238   |         |         | 173173        | 173181   | 173185  | 181185  |
|                            | 11(19)  | 11(19)   | 7(19)   | 9(19)   | 22(19)        | 16(19)   |         |         | 7(9.5)        | 7(9.5)   | 12(9.5) | 12(9.5) |
| 20(12)                     | 211211  | 211213   |         |         | 235235        | 235238   | 238238  |         | 173181        | 181181   |         |         |
|                            | 4(6)  | 8(6)     |         |         | 3(3)          | 5(6)     | 4(3)    |         | 9(6)          | 3(6)     |         |         |