

북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 의 mitochondrial DNA 영역별 유전적 변이성 분석

박철지, 남원식, 이정호, 노재구, 김현철, 박종원, 황인준, 김성연

국립수산과학원 육종연구센터

Analysis of genetic divergence according to each mitochondrial DNA region of *Haliotis discus hannai*

Choul-Ji Park, Won Sick Nam, Jeong-Ho Lee, Jae Koo Noh, Hyun Chul Kim, Jong won Park, In Jun Hwang and Sung Yeon Kim

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

ABSTRACT

The seven mitochondrial DNA regions (ND2, ND5, ND4, ND4L, ND6, ND1 and 12SrRNA) of *Haliotis discus hannai* were examined to estimate the availability as a genetic marker for the study of population genetic. The region with the highest genetic variation was ND4 (Haplotype diversity = 1.0000, Nucleotide diversity = 0.0108). On the other hand, ND2 and ND1 regions have significantly appeared genetic divergence between clusters (divergence of 90% and 87%). Also, pairwise F_{ST} between clusters within ND2 and ND1 regions showed high values; 0.4061 ($P = 0.0000$), 0.4805 ($P = 0.0000$) respectively. Therefore we can infer that it is the most efficient and accurate way to analyze the region of ND4 with the highest variation in addition to the regions of ND2 and ND1, which formed clusters with high bootstrap value, for study of population genetic structure in this species.

Keywords: mitochondrial DNA, genetic diversity, *Haliotis discus hannai*

서 론

전 세계의 전복류는 약 70여종이 알려져 있으며 열대지역을 비롯하여 온대 및 아열대지역의 연안에 많이 서식하고 있다 (Lindberg, 1992). 우리나라에서도 5종 (*Haliotis discus hannai*, *H. discus discus*, *H. madaka*, *H. gigantea* and *H. diversicolor supertexta*) 이 서식하고 있다. 이중 주요 양식생산 및 자원관리 대상 품종은 북방전복 (*H. discus hannai*) 으로 2012년 양식 생산량이 6,584톤이고 생산금액은 약 2,500억원에 달하여 산업적으로 매우 중요한 품종으로

자리매김을 하였다 (KNSO, 2013). 최근에는 성장속도가 느린 북방전복의 속성장 품종개발을 위한 육종연구가 이루어지고 있으며, 또한 자연 생태계의 자원보전과 조성을 위해서 매년 전복 종묘의 방류사업이 전국적으로 실시되고 있다. 더욱이 이러한 육종연구 및 방류사업을 과학적이며 체계적으로 수행하기 위해서 유전학적 이론 및 방법 등이 많이 도입되어지고 있으며, 유전학적인 연구를 정확히 수행하기 위해서는 각각의 분석에 적합한 분자 유전마커 개발이 필수적이다.

Mitochondrial DNA (mtDNA) 는 진화속도가 빠르고, 모계유전을 하며, 유전자재조합을 하지 않는 특징을 가지고 있기 때문에 집단간의 유전적 차이를 분석함에 있어 매우 적합한 유전마커라고 보고되어지고 있다 (Brown *et al.*, 1979; Lansman *et al.*, 1981). 전복류에 있어 mtDNA는 분류학적 연구, 계통발생학적 연구, 진화적 연구 및 집단유전학 연구 등 다양한 연구분야에 활용되어지고 있다 (Hamm and Burton, 2000; Conod *et al.*, 2002; Estes *et al.*, 2005; Degnan *et al.*, 2006; Imron *et al.*, 2007; Gruenthal and Burton, 2008; Margaret *et al.*, 2011). 이러한 전복류의 mitogenome은 13개의 protein-coding genes, 2개의

Received: December 2, 2013; Revised: December 19, 2013;
Accepted: December 24, 2013

Corresponding author : Choul Ji Park

Tel: +82 (55) 639-5812 e-mail: choulji@korea.kr
1225-3480/24503

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.

ribosomal RNA, 22개의 tRNA와 control region으로 총 38 개의 영역으로 구성되어 있다 (Maynard *et al.*, 2005; Van Wormhoudt *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2011). 이렇듯 다양한 영역이 존재함에도 불구하고 지금까지 집단유전학 및 계통분 류학 등의 연구에 CO1, CO2, CO3, ND3 및 16SrRNA (ribosomal RNA) 등의 영역만을 한정하여 사용하여 왔으며, 이러한 영역들은 낮은 변이성으로 인해 종내 집단간의 차이를 확인 할 수 없거나, 종간의 계통 지리학적 관계에서도 확실한 차이를 나타내지 못할 수도 있다 (Sweijd *et al.*, 1998; Hamm and Burton, 2000; Conod *et al.*, 2002; Elliott *et al.*, 2002; Ben *et al.*, 2005).

본 연구는 우리나라의 주요양식 품종인 북방전복을 대상으로 지금까지 전복류에서는 사용되지 않았던 mtDNA의 protein coding 영역 ND2, ND5, ND4, ND4L, ND6 및 ND1의 6개 영역과 protein non-coding 영역인 12SrRNA (ribosomal RNA) 을 포함해 총 7개 영역을 이용하여 (1) 각 영역의 유전적 변이성 및 (2) 개체간 유전적 유연관계 등을 분석하여 각 영역 별 특성을 파악하고 이러한 특성을 고려하여 유전학적 분석에 적합한 분자유전마커의 개발을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

1. 분석시료

실험에 사용한 북방전복은 여수에서 2008년 10월에 채집한 자연산 전복으로 각장 12 cm 이상의 성체 10마리를 선택하여 사용하였다.

2. DNA 추출 및 PCR 증폭

DNA 추출은 TNES-urea법 (White and Densmore, 1992) 을 사용하였으며, PCR에 사용한 mtDNA의 7개 영역 의 primer는 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 에 등록되어 있는 *H. discus hannai* (No. EU_595789) 의 염기서열을 이용하여 설계하였다 (Table 1). PCR 증폭은 얻어진 DNA 시료, 10 × PCR Gold Buffer, MgCl₂ solution, 10 mM dNTP, AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) 그리고 Table 1의 각 영역 별 primer를 이용하였으며, 증폭된 PCR 반응액은 ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) 를 이용하여 염기서열을 확인하였다. 각 영역 의 PCR 증폭으로 결정된 염기서열은 Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) 를 이용하여 정렬하였다.

3. 유전적 변이성

mtDNA의 7개 영역에서의 유전적 변이 (Appendix 1) 의 확인은 MEGA ver.5.10 (Tamura *et al.*, 2011) 를 사용하여 분석하였으며, 유전적 변이성을 나타내는 Haplotype diversity (h) 및 Nucleotide diversity (π) 는 Arlequin ver.3.11 (Excoffier *et al.*, 2006) 을 사용하여 분석하였다. 또한 각 영역에서 개체간 유연관계는 MEGA ver.5.10를 사용 하였으며 neighbor-joining 방법 (Saitou and Nei, 1987) 으 로 계통도 (dendrogram) 를 작성하였다. 각 영역내에서 형성 된 클러스터간의 유전적 차이의 정도는 Pairwise F_{ST} 값으로

Table 1. Primers used in amplification of *H. discus hannai* mitochondrial DNA

region	Primer name	Primer Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Position
ND2	HdND2-F1	GGGTAAACAGGGCTGCTAA	57.3	1454-1473
	HdND2-R1	CCCGCCAAGGGATAATAGA	56.7	2276-2294
ND5	HdND5-F3	TAGCAGCAGGCAGTCACCTA	59.3	7129-7148
	HdND5-R3	TATGGGAGGATTACGGTTGG	57.3	7845-7864
ND4	HdND4-F2	CACCCCATAGCCCTAAACAA	57.3	8448-8467
	HdND4-R2	CGGTTTGAGTTCCTCTTTGG	57.3	9078-9097
ND4L	HdND4L-F1	CCCAAGACCAAAACAACACC	57.3	9227-9246
	HdND4L-R1	CCTTCAACCTTCGGCTTACA	57.3	9614-9633
ND6	HdND6-F2	GTCGCCCTAACCTACTTCA	59.3	10921-10940
	HdND6-R2	CCTCGGTTCCGTTATGATCT	57.3	11618-11637
ND1	HdND1-F1	AAACCCCACTACCATCACCA	57.3	11548-11567
	HdND1-R1	TGCGTATTTTGTGCTCCTG	55.3	12237-12256
12SrRNA	Hd10s-F1	CTTTCTTCCGACCACTTCA	57.3	14620-14639
	Hd10s-R1	TAAGCTGTTGGGCTCATGC	56.7	15357-15375

Table 2. Genetic variation of *H. discus hannai* mitochondrial DNA

region	N	Number of haplotypes	Number of polymorphic sites	Haplotype diversity h ± SD	Nucleotide diversity π ± SD
ND2	10	10	16	1.0000 ± 0.0447	0.0054 ± 0.0034
ND5	10	9	16	0.9778 ± 0.0540	0.0057 ± 0.0036
ND4	10	10	30	1.0000 ± 0.0447	0.0108 ± 0.0063
ND4L	10	4	3	0.5333 ± 0.1801	0.0018 ± 0.0018
ND6	10	9	14	0.9778 ± 0.0540	0.0079 ± 0.0049
ND1	10	9	13	0.9778 ± 0.0540	0.0053 ± 0.0034
12SrRNA	10	5	4	0.8000 ± 0.1001	0.0022 ± 0.0017

N: sample size, SD: standard deviation.

나타내었으며 클러스터 간의 유의적 차이의 유무를 확인하였다.

결 과

1. 유전적 변이성

mtDNA의 7개 영역 (ND2, ND5, ND4, ND4L, ND6, ND1 및 12SrRNA) 의 유전적 변이성을 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 각 영역별 Haplotype 개수는 4개에서 10개사이로 나타났으며 ND4L 영역이 4개로 가장 낮은 개수를 나타냈고 ND2와 ND4에서 10개로 가장 높은 개수를 나타냈다. Haplotype diversity (h) 값에 있어서도 ND4L 영역이 0.5333 ± 0.1801 로 가장 낮은 값을 나타냈으며, 다음으로 12SrRNA 영역이 0.8000 ± 0.1001 로 낮게 나타났다. 그 외의 ND1, ND5 및 ND6 영역은 0.9778 ± 0.0540 으로 높은 값을 나타냈으며, ND2와 ND4는 1.0000 ± 0.0447 로 가장 높은 값을 나타내었다.

Polymorphic sites의 개수에 있어서도 ND4L 영역에서 3개로 가장 낮게 나타났으며 다음으로 12SrRNA 영역이 4개, ND1 영역이 13개, ND6 영역이 14개, ND2 및 ND5 영역에서 16개, ND4 영역에서 30개 순으로 나타났다. 또한 Nucleotide diversity (π) 값에서도 ND4L 영역이 0.0018 ± 0.0018 로 가장 낮은 값을 나타내었고, 다음으로 12SrRNA 영역이 0.0022 ± 0.0017 로 낮게 나타났으며, ND1 영역 0.0053 ± 0.0034 , ND2 영역 0.0054 ± 0.0034 , ND5 영역 0.0057 ± 0.0036 , ND6 영역 0.0079 ± 0.0049 및 ND4 영역 0.0108 ± 0.0063 순으로 나타났다.

이상, 위의 mtDNA의 7개 영역별 유전적 변이성을 살펴본 결과 Haplotype diversity (h) 및 Nucleotide diversity (π) 값은 ND4L 영역에서 가장 낮은 유전적 변이성 값을 나타내었으며 반면, ND4 영역에서는 다른 영역들과 비교하여 가장 높

은 유전적 변이성 값을 나타내었다.

2. 유전적 유연관계

mtDNA의 7개 영역 (ND2, ND5, ND4, ND4L, ND6, ND1 및 12SrRNA) 에 있어 10개체 간 유전적 유연관계를 neighbor-joining 방법을 이용하여 Fig. 1에 나타내었다.

각 영역에 있어 형성된 클러스터 개수 및 신뢰도를 보면, ND2 영역에서는 2개로 90%의 높은 신뢰도를 나타내어 명확한 클러스터의 구분이 가능하였으며, ND5 영역에서는 3개로 각각 63% 및 74%, ND4 영역에서는 2개로 65%, ND6 영역에서는 3개로 각각 66% 및 67%, ND1 영역에서는 2개로 87%, 12SrRNA 영역에서 2개로 65%로 확인되었다. 반면 ND4L 영역에서는 클러스터가 형성되지 않았다. ND2, ND6, ND1 및 12SrRNA 영역에서는 hd4, hd7, hd8, hd10의 4개의 개체가 하나의 클러스터에 포함되는 동조성이 관찰되었다.

각 영역에서 형성된 클러스터 간의 유전적 차이정도를 알아보기 위해서 Pairwise F_{ST} 값 구하여 Table 3에 나타내었다. ND2, ND4, ND1 및 12SrRNA의 4개 영역에서 형성된 각각의 2개 클러스터간의 유의적 차이를 확인하여 보면 ND2, ND1 및 12SrRNA 영역에서의 클러스터간은 유의적으로 차이가 있는 것으로 나타났으며, ND4 영역에서의 2개 클러스터간은 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 3개의 클러스터를 형성한 ND5 및 ND6 영역에 있어서도 클러스터간의 유의적 차이는 나타나지 않았다.

고 찰

Mitochondrial DNA는 모계유전을 하며, 유전자 재조합을 하지 않는 반수체이다. 그렇기 때문에 유전적 병목효과 (bottleneck effect) 와 같은 집단의 유전적 조성을 변화시키는 요인에 있어 그 영향을 파악하기 쉬우며, 집단의 유전적 구

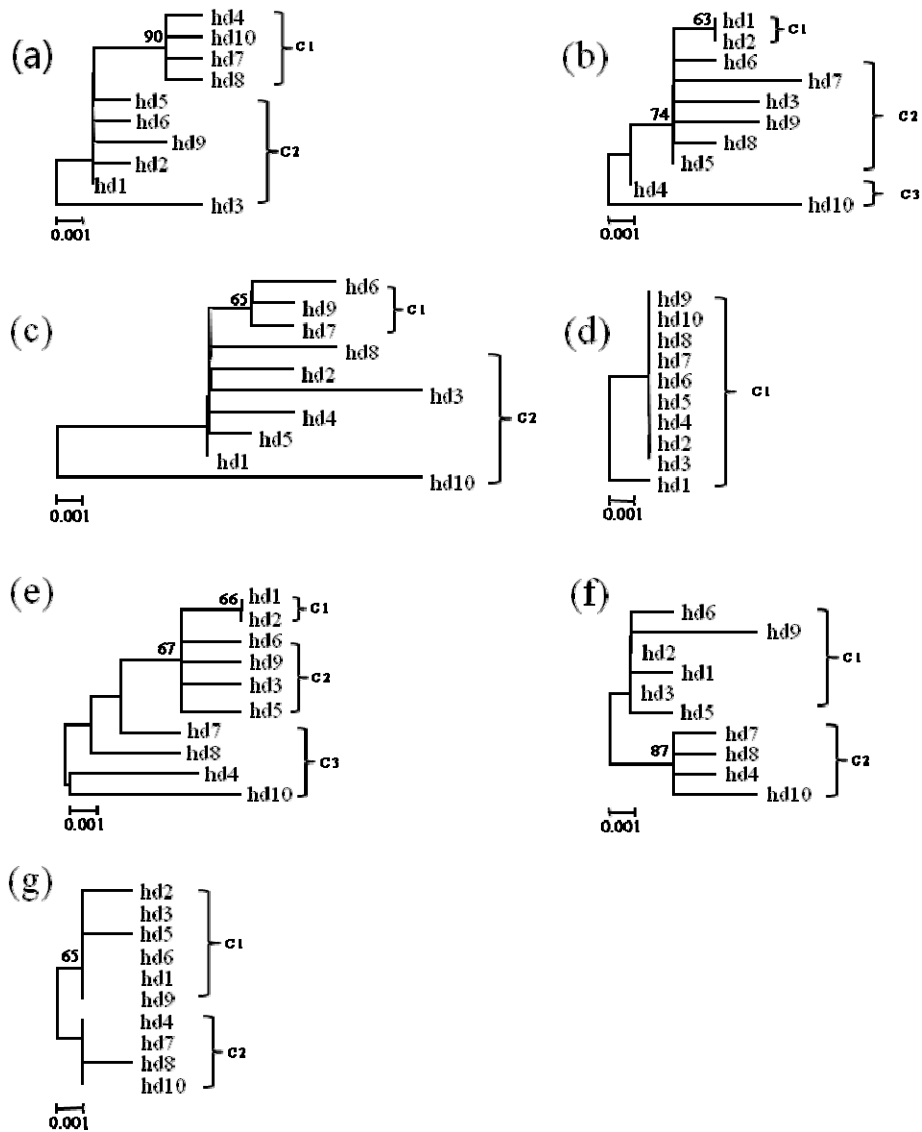


Fig. 1. Neighbour-joining tree based on overall haplotypes of each mitochondrial DNA regions. Bootstrap support, based on 1000 replications, is shown above branches(> 60%). (a) :ND2, (b) :ND5, (c) :ND4, (d) :ND4L, (e) :ND6, (f) :ND1, (g) :12SrRNA. Bracket Cn means cluster number.

Table 3. Pairwise F_{ST} between clusters of *H. discus hannai* mitochondrial DNA

ND2	ND5	ND4	ND6	ND1	12SrRNA
C1:C2 = 0.4061 (0.0000)	C1:C2 = 0.0680 (0.1892)	C1:C2 = 0.0795 (0.3153)	C1:C2 = 0.3143 (0.0721)	C1:C2 = 0.4805 (0.0000)	C1:C2 = 0.6215 (0.0090)
	C2:C3 = 0.2711 (0.0541)		C2:C3 = 0.2963 (0.0180)		
	C1:C3 = 0.4052 (0.0991)		C1:C3 = 0.3376 (0.0451)		

() = P value, Cn means cluster number

조를 분석할 경우에도 매우 뛰어난 분자유전마커로 사용되어 지고 있다 (Brown *et al.*, 1979; Lansman *et al.*, 1981; Moritz *et al.*, 1987; Brykov *et al.*, 1996).

전복류의 유전학적 연구에 있어 mtDNA를 이용하여 유전적 변이성을 분석한 연구의 경우, 대부분이 CO1, CO2, CO3, ND3 및 16SrRNA (ribosomal RNA) 등의 몇몇 한정된 영역만을 이용하고 있다 (Wormhoudt and Roussel 2011; Margaret *et al.*, 2011; Conod *et al.*, 2002; Imron *et al.*, 2007). 이와 같이 CO1 영역과 같은 protein coding 영역은 종내 유전적 변이를 해석하는데 적합한 반면, 12SrRNA 및 16SrRNA 등의 리보솜 RNA 영역은 비교적 진화속도가 느리며 종간의 계통분석에 적합한 것으로 알려져 있다 (Lee, 2003; Lessios *et al.*, 2003; Duran *et al.*, 2004; Kamarudin *et al.*, 2010; Sekino *et al.*, 2012).

본 연구에서는 지금까지 전복류에서 분자유전마커로서 사용되지 않았던 mtDNA의 protein coding 영역 ND2, ND5, ND4, ND4L, ND6, ND1의 6개 영역과 protein noncoding 영역인 12SrRNA 영역에 대하여 primer를 설계하였고, 각 영역별 유전적 변이성 및 개체간의 유연관계를 분석하여 영역별 특성을 파악하였다. 그 결과 ND4 영역은 10개의 Haplotype를 나타내었으며, Haplotype diversity (h) 및 Nucleotide diversity (π) 값에 있어서도 다른 영역과 비교하여 가장 높은 값을 나타내어 유전적 변이성이 높은 것으로 확인 되었다. 하지만 ND4 영역의 2개 클러스터 간의 유전적 차이는 65%의 신뢰도로 명확히 구분되지는 않았다. 그러나 ND4 영역보다 낮은 유전적 변이성을 나타낸 ND2, ND1 및 12SrRNA 영역에서 형성된 2개의 클러스터 간에는 유의적 차이가 인정되어 명확한 구분을 할 수 있었다.

이러한 결과는 변이성이 높으면 개체나 집단간의 유전적 차이가 명확하게 나타날 수 있다는 생각과는 다르게 변이성이 너무 높으면 집단 유전학적 분석에 있어서 오류를 범할 수 있음을 시사하고 있으며, 반면 12SrRNA 영역에서의 클러스터 간의 유의적 차이는 인정되었으나 이러한 차이는 변이성이 너무 낮아 하나 또는 두개의 염기치환만으로도 크게 차이가 나는 것으로 잘못 해석할 수 있는 위험성을 시사하고 있다. 따라서 유전적 변이성이 가장 높은 ND4 영역과 영역내의 클러스터 간의 유전적 차이가 명확한 ND2 및 ND1 영역을 복합적으로 활용할 경우 북방전복의 집단유전학 및 계통분류학 분석에 유용한 분자유전마커로 사용할 수 있을 것이라 생각된다.

요 약

본 연구는 우리나라의 주요양식 품종인 북방전복을 대상으로 지금까지 전복류에서는 사용되지 않았던 mtDNA의 protein coding 영역 ND2, ND5, ND4, ND4L, ND6, ND1

의 6개영역과 protein noncoding 영역인 12SrRNA (ribosomal RNA) 을 포함해 총 7개 영역을 이용하여 각 영역의 유전적 변이성 및 개체간 유전적 유연관계 등을 분석하여 각 영역별 특성을 파악하고 이러한 특성을 고려하여 유전학적 분석에 적합한 분자유전마커를 개발하였다. 유전적 변이성은 ND4 영역 (Haplotype diversity = 1.000, Nucleotide diversity = 0.010823) 이 가장 높게 나타났으며, 개체간의 유전적 차이는 ND2 및 ND1 영역이 각각 90% 및 87%로 유의적으로 명확히 구분할 수 있었다. 따라서 유전적 변이성이 가장 높은 ND4 영역과 영역내의 클러스터 간의 유전적 차이가 명확한 ND2 및 ND1 영역을 복합적으로 활용할 경우 북방전복의 집단유전학 및 계통분류학 분석에 유용한 분자유전마커로 사용할 수 있을 것이라 생각된다.

사 사

본 연구는 국립수산물연구원 (RP-2013-BT-109) 의 지원에 의해 연구 수행되었습니다.

REFERENCE

- Ben, T.M., Lyndal J.K., Joanne M.M., Eliza S.J. and Peter J.H. (2005) Mitochondrial DNA Sequence and Gene Organization in the Australian Blacklip Abalone *Haliotis rubra* (Leach). *Marine Biotechnology*, **7**: 645-658.
- Brown, W.M., George, M.J.R. and Wilson, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**: 1967-1971.
- Brykov, V.A., Polyakova, N., Skurikhina, L.A. and Kukleysky, A.D. (1996) Geographical and temporal mitochondrial DNA variability in populations of pink salmon. *Journal of Fish Biology*, **48**: 899-909
- Conod, N., Bartlett, J.P., Evans, B.S. and Elliott, N.G. (2002) Comparison of mitochondrial and nuclear DNA analyses of population structure in the blacklip abalone *Haliotis rubra* Leach. *Marine and Freshwater Research*, **53**: 711-718.
- Degnan, S.A., Imron, Geiger D.L. and Degnan, B.M. (2006) Evolution in temperate and tropical seas: disparate patterns in southern hemisphere abalone (Mollusca: Vetigastropoda: Haliotidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**: 249-256.
- Duran, S., Palacin, C., Becerro, M.A., Turon, X. and Giribet, G. (2004) Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology*, **13**: 3317-3328.
- Elliott, N.G., Bartlett, J., Evans, B. and Sweijd, N.A. (2002) Identification of Southern Hemisphere abalone (*Haliotis*) species by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Journal of Shellfish Research*, **21**: 219-226.

- Estes, J.A., Lindberg, D.R. and Wray, C. (2005) Evolution of large body size in abalones (*Haliotis*): patterns and implications. *Paleobiology*, **31**: 591-606.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. (2006) Arlequin ver 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology University of Berne, Switzerland.
- Gruenthal, K.M. and Burton, R.S. (2008) Genetic structure of natural populations of the California black abalone (*Haliotis cracherodii* Leach, 1814), a candidate for endangered species status. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **355**: 47-58.
- Hamm, D.E. and Burton, R.S. (2000) Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **254**: 235-247.
- Imron, Jeffrey, B., Hale, P., Degnan, B.M. and Degnan, S.M. (2007) Pleistocene isolation and recent gene flow in *Haliotis asinina*, an Indo-Pacific vetigastropod with limited dispersal capacity. *Molecular Ecology*, **16**: 289-304.
- Kamarudin, K.R., Hashim, R. and Usup, G. (2010) Phylogeny of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) as inferred from 16S mitochondrial rRNA gene sequences. *Sains Malaysiana*, **39**(2): 209-218.
- KNSO (2013) KOSIS Statistical DB. Korea National Statistical Office, Daeseon, Korea
- Lansman, R., Shade, R.O., Shapira, F. and Avise, J.C., (1981) The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *Journal of Molecular Evolution*, **17**: 214-226.
- Lee, Y.H. (2003) Molecular phylogenies and divergence times of sea urchin species of Strongylocentrotidae, Echinoida. *Molecular Biology and Evolution*, **20**: 1211-1221.
- Lessios, H.A., Kane, J. and Robertson, D.R. (2003) Phylogeography of the pantropical sea urchin *Tripneustes*: contrasting patterns of population structure between oceans. *Evolution*, **57**: 2026-2036.
- Lindberg, D.R. (1992) Evolution, distribution and systematics of Haliotidae. *In*: Abalone of the World: Biology Fisheries and Culture. (ed. by Shepherd, M.J., Tegner, S.A., Guzman del Proo, S.A.). pp. 3-18. Blackwell Scientific. London.
- Margaret, W., Marie, L.H., David, R.S. and Neil, J.G. (2011) Low to moderate levels of genetic differentiation detected across the distribution of the New Zealand abalone, *Haliotis iris*. *Marine Biology*, **158**: 1417-1429.
- Maynard, B.T., Kerr, L.J., McKiernan, J.M., Jansen, E.S. and Hanna, P.J. (2005) Mitochondrial DNA sequence and gene organization in Australian backup abalone *Haliotis rubra* (leach). *Marine Biotechnology*, **7**: 645-658.
- Moritz, C., Dowlin, T.E. and Brown, W.M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**: 269-92.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4): 406-425.
- Sekino, M., Sato, S., Hong, J.S. and Li, Q. (2012) Contrasting pattern of mitochondrial population diversity between an estuarine bivalve, the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*, and the closely related Pacific oyster *C. gigas*. *Marine biology*, **159**: 2757-2776.
- Sweijd, N.A., Bowie, R.C.K., Lopata, A.L., Marinaki, A.M., Harley, E.H. and Cook, P.A. (1998) A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *Journal of Shellfish Research*, **17**: 889-895.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**: 2731-2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and 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.
- Van Wormhoudt, A., Le Bras, Y. and Huchette, S. (2009) *Haliotis marmorata* from Senegal; a sister species of *Haliotis tuberculata*: morphological and molecular evidence. *Biochemical Systematics and Ecology*, **37**: 747-755.
- Van Wormhoudt, A., Roussel, V., Courtois, G. and Huchette, S. (2011) Mitochondrial DNA Introgression in the European Abalone *Haliotis tuberculata tuberculata*: Evidence for Experimental mtDNA Paternal Inheritance and a Natural Hybrid Sequence. *Marine Biotechnology*, **13**: 563-574.
- White, P.S. and Densmore, L.D.III. (1992) Mitochondrial DNA isolation. *In*: Molecular Genetic Analysis of Populations (ed. by Hoelzel, A.R.). pp. 29-58. University Publishers, Oxford.
- Xin, Y., Ren, J. and Liu, X. (2011) Mitogenome of the small abalone *Haliotis diversicolor* Reeve and phylogenetic analysis within Gastropoda. *Marine Genomics*, **4**: 253-262.

Appendix 1. Absolute variable and deletion sites for seven mtDNA regions

		(a)														(b)																	
sample	bp	1	1	2	3	3	4	4	4	4	4	5	5	6	6	7	1	1	1	2	2	3	3	3	4	4	4	4	5	6			
		3	8	9	7	0	3	2	2	4	4	4	6	9	2	5	0	1	7	2	6	6	7	7	3	4	7	0	3	5	6	4	0
hd1		G	C	G	A	G	A	T	G	A	A	T	G	T	A	G	T	A	C	A	G	T	G	G	A	G	T	A	A	G	G	C	A
hd2		.	.	A
hd3		C	C	C	C	C	G	.	.	A	G	.
hd4		.	.	.	G	C	.	A	A	G	
hd5		G	A	
hd6		C	A	.	.	A	
hd7		A	.	.	G	C	C	.	A	A	.	.	G		
hd8		.	.	G	A	C	A	.	.	C		
hd9		.	A	A	A	A	A	.	.	
hd10		.	.	G	C	G	.	.	G	A	.	.	C	A	.	G	.	.	G	.	.	T	.

		(c)																													
sample	bp	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5		
		5	6	8	3	5	8	9	9	4	4	5	9	0	0	1	2	5	6	6	7	0	3	4	5	6	1	2	3	6	
hd1		G	C	C	A	T	C	A	G	A	C	A	G	A	G	A	C	A	C	C	T	A	G	T	G	G	G	T	T	T	A
hd2		C	C	.	.	.
hd3		.	.	.	C	A	.	.	G	.	.	C	G	.
hd4		G	T
hd5		T
hd6		T	C	.	A
hd7		G	C
hd8		A	.	T	A
hd9		C	A
hd10		.	T	.	G	.	T	G	A	.	T	G	.	.	.	G	G	A	C	C	.	.	.

		(d)			(e)											(f)											(g)								
sample	bp	1	2	3	1	1	1	1	2	2	3	3	3	4	4	4	1	2	3	3	4	4	4	5	5	5	1	1	4						
		2	8	0	2	7	0	4	6	8	1	6	5	6	8	0	3	5	1	8	8	9	6	2	4	5	6	9	2	6	6	6	2	5	7
hd1		C	C	A	G	C	A	T	C	A	A	A	C	G	G	G	A	G	G	A	C	A	C	C	A	A	A	G	G	T	G	G	G	G	G
hd2		T	A	.	.	A	.	.		
hd3		T	.	.	.	G	A	A		
hd4		T	-	.	.	A	G	C	.	.	C	A	.	A	A	A	A	A	.	.	.		
hd5		T	.	.	.	G	G	.	.	.	T	A	.	.	.	A	.	.		
hd6		T	-	.	.	G	.	.	.	T	T	A		
hd7		T	.	.	.	G	C	T	A	.	.	G	A	A	A		
hd8		T	.	.	A	.	G	C	A	.	A	.	G	A	A	A	.	A	.	.		
hd9		T	.	.	.	G	.	.	.	G	G	G	A	A		
hd10		T	.	.	A	.	G	C	.	G	A	A	.	A	.	G	G	.	.	A	A	A	.	.	.	

(a) :ND2, (b) :ND5, (c) :ND4, (d) :ND4L, (e) :ND6, (f) :ND1, (g) :12SrRNA