

マイクロサテライト DNA マーカーからみたアワビ人工種苗の遺伝的変異性

原 素之^{*1}・関野正志^{*2}

Genetic variation in artificial seed of Japanese abalone, *Haliotis discus* based on microsatellite DNA

Motoyuki HARA^{*1}, and Masashi SEKINO^{*2}

Abstract For evaluating the efficacy of the developed microsatellite DNA markers to detect changes of genetic diversity in artificial seed populations and to estimate the impact into natural populations due to stocking practice, we analyzed genetic variations within and between four artificial seed populations and four natural populations of Japanese abalone *Haliotis discus* containing Ezo-awabi and Kuro-awabi. All of 9 microsatellite loci screened in this study showed polymorphisms with highly variations. Marked reductions of genetic variability in artificial seed populations compared with the natural populations were observed in terms of number of microsatellite alleles. Significant differentiation was between the Ezo-awabi and Kuro-awabi, between the artificial seed populations and natural populations, and between the artificial seed populations. We conclude that, based on the decreased genetic variability observed in all the artificial seed populations examined, bottlenecked effects occurred when each artificial seed population was founded.

Key words: artificial seed, bottlenecked effect, genetic diversity, *Haliotis discus*, microsatellite DNA

アワビ類は市場価値や漁獲量からみて最も重要な沿岸資源の一つであるが、近年の漁獲量の減少は著しく1970年頃の最盛期と比べ半分以下に低下している。アワビ類では1980年代の種々の種苗生産技術の開発によって、人工種苗を大量にかつ安定的に生産できるシステムが確立され、各地に人工種苗の生産施設が建設されるようになり、多くの人工種苗の生産が可能になった。これらの大部分は、天然アワビ漁場に放流されており、栽培漁業関係者の努力により、毎年2000万尾以上の人工種苗が全国数百ヶ所の漁場に放流されている（栽培漁業種苗生産統計2004）。その結果、地先市場での漁獲アワビに占める人工種苗の割合が、5割以上となって

いる地区も出現している。このことは、漁場での混合率に差はあるものの放流された人工種苗が数年間漁場に留まり漁獲サイズまで成長していることを意味している。アワビの漁獲サイズは9~12cm程であるが、4~7cmとされている生物学的最小形からみても（市来, 1980）、放流された人工種苗放流は、漁場において新しく添加された資源だけではなく、再生産を通しての定着資源になる可能性が十分に考えられる。

一方、人工種苗の生産では施設規模や生産コストの点から実際の種苗生産に使われる親貝数に限界があり、天然漁場で発生した集団と比較すると遺伝的変異性が低いことが報告されている（木島ら, 1992; Hara and

2005年11月30日受理 (Received: November 30, 2005)

*1 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1(National Research institute of Aquaculture, 422-1 Minamiise, Mie, 516-0193, Japan)

*2 東北区水産研究所 〒985-0000 宮城県塩竈市新浜町2-27-5 (Tohoku National Fisheries Research Institute, 3-27-5, Shiogama, Miyagi, 980-0000, Japan)

Sekino, 2002)。遺伝的変異性の減少は環境の変化に対する適応力を低下させる可能性を高めることから (Allendorf, 1986), 人工種苗の継続的な放流による遺伝学的影響への関心が持たれている。しかし, アワビでは遺伝的分析法の変異性の問題などから, 人工種苗の天然漁場への影響調査への試みは殆ど行われていない。そこで, 本課題では高変異マーカーとして知られているマイクロサテライトDNAマーカーを開発し, それらを用いてアワビ天然発生集団と比較しながら人工種苗の遺伝的変異性および遺伝的特性を把握し, 今後の人工種苗放流の天然漁場への影響を調査するために有効な遺伝マーカーの開発を行った。

材料と方法

アワビの試料

天然集団として, 北海道奥尻と岩手県広田の地先から採集したエゾアワビ, 三重県鳥羽および徳島県牟岐地先から採集したクロアワビを用いた。これらのアワビには, 人工種苗と判断される貝殻にグリーンマークがないことを確かめた。人工種苗としては, 岩手県内, 三重県内および兵庫県内のアワビ種苗生産場で生産されたアワビ種苗を用いた。これらのサンプリング情報はTable 1に示した。DNAは各個体の足筋肉部からフェノール・クロロホルム法 (Sambrook *et al.*, 1989)により抽出した。

マイクロサテライトDNAマーカーの単離

マイクロサテライトDNAライブラリーは北海道奥尻産のエゾアワビから抽出したDNAを用い, Sekino and Hara (2001)の方法に従い調整した。このDNAライブラリーから白色コロニーを無作為に拾い出し,

GFX Micro Plasmid 抽出キット (Amerham Bioscience)を用いて, プラスミドDNAを抽出, 精製した。(CA)_nまたは(CT)_nの陽性クローンについて, サイクルシーケンス法を用いて, 塩基配列を決定した。シーケンス反応には, 5' Cy 5 標識したKS primerおよびReverse primerとシーケンスキット(Thermo Sequence fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGPT, Amersham)を使用し, シーケンスには蛍光DNAシーケンサー(ALF express, Pharmacia)を使用した。得られた塩基配列のデータから, プライマー設計ソフト(Primer Premier, Premier Biosoft International)によって, CAリピートを挟む領域で, 最適なプライマーを設計した。

設計プライマーは, 北海道奥尻産の集団を用いて, PCR反応で増幅の可否を調べた。PCR反応は, 20 pmolsのCy 5で蛍光標識した各プライマーセット, 100 μMのdNTP, 0.5ユニットのampliTaq Gold, Taqに添付された10倍希釈バッファーと50ngのDNAテンプレートを加え, 10~15 μLの容量で行った。反応条件は, プレヒーティングが95°Cで12分, 合成反応が95°Cで30秒, 各プライマーのアニール温度で45秒, 75°Cで45秒を35-42サイクルし, 最後に72°Cで5-7分のDNA伸長反応を行った。

アリルは標準サイズマーカー(100~300bp, Pharmacia)との比較により, PCR産物のサイズを決めた。

統計的処理

各集団におけるアリル数, ヘテロ接合体率の観察値(H_o)と期待値(H_e)は遺伝解析ソフトCERVUS version 2.0を使って計算した。アリル数は分析個体数に依存するため, アリル数の比較には遺伝解析ソフトFSTATで求めたAllelic Richnessを用いた(Goudet,

Table 1. Sampling sites, date of sampling, and sample size of the 10 Japanese abalone populations

Sampling site (Prefecture)	Source of populations*1	Population abbreviation	Date sampled	Sample size
Okushiri (Hokkaido)	NE	KO	Jul.,1999	96
Taro (Iwate)	NE	KT	Nov.,2000	96
Ijika (Mie)	NK	KL	Aug.,1999	68
Mugi (Tokushima)	NK	KM	Aug.,2000	96
Iwate-1 (Iwate)	AE	T	Apr.,1999	48
Iwate-2 (Iwate)	AE	X	Apr.,2000	48
Mie-1 (Mie)	AK	H	Nov.,1999	48
Hyogo-1 (Hyogo)	AK	KH	Nov.,1999	48

For geographical positions of populations, see Fig.1

*1 E:Ezo-awabi distributed region; K:Kuro-awabi distributed region

2001)。それぞれの集団の各座における Hardy-Weinberg 平衡の適合は、Markov-chain 法を用いた Fisher's exact テストで確率を求め、Bonferroni 補正 (Rice, 1989) し有意性の検討を行った。

集団間の異質性を調べるため F_{ST} とその確率を用いた (Weir and Cockerham, 1984)。これらの値は遺伝解析ソフト ARLEQUIN (Schenider and Kueffer, 1997) を用いて計算した。さらに、各集団の遺伝的類縁関係をみるため、Cavalli-Sforza (Nei *et. al.*, 1983) の遺伝的距離 (D_A) を求め、近隣結合法 (NJ法, Saito and Nei, 1987) によって TREEVIEW ソフト (Page, 1996) を用いて類縁図を作成した。

結果および考察

マイクロサテライト DNA マーカーの遺伝的変異性

エゾアワビ DNA からマイクロサテライト DNA 領域を単離し、それらの領域について PCR プライマーを設計し、増幅性や変異性を検討した結果、集団の遺伝的変異性を安定的に分析できるマーカーとして、9 つのマイクロサテライトマーカー座が開発された。Table 2 にマイクロサテライト DNA 領域の反復の型、プライマーの配列、アニール温度および GenBank 登録番号を示した。

エゾアワビ DNA から設計した 9 つの PCR プライマーはクロアワビにおいても問題なく PCR 産物が増幅された。エゾアワビの天然 2 集団、人工種苗 2 集団、クロアワビの天然集団 2 集団および人工種苗 2 集団のアリル頻度を Appendix A に、そして、Table 3 にそれらの遺伝的変異性を示した。全ての集団の全ての座においてアリル数が 2 以上あり多型を示し、各座の変異の程度は大きく異なっていた。遺伝マーカーの性能を表す指標の一つとなる変異性では、天然集団の平均アリル数 (A) で 9.0~9.7、平均ヘテロ接合体率 (He) で 0.556~0.633 と、藤尾ら (1989) が報告しているアロザイムマーカーの変異性 (A : 2.9, He : 0.21) と比較して明らかに高かった。

集団間の遺伝的違い

エゾアワビとクロアワビ、および人工種苗と天然集団間における遺伝的違いについて調べた。エゾアワビとクロアワビの集団間では、アリル頻度に特徴ある頻度組成が示された。また、各集団の座当りの Allelic Richness は 5.7 から 8.3、ヘテロ接合体率の観察値 (H_o) と期待値 (H_e) の平均はそれぞれ 0.495~0.649 と 0.525~0.649 であった。これらの遺伝的変異性を表す指標においては違いが認められなかった。人工種苗と天然集

Table 2. Microsatellite primer sequences developed from Ezo-awabi *Haliotis discus Hannai**1

Locus	Repeat motif(5'-3')	Primer sequence (5'-3')	Anneal (°C)	Gen Bank accession
<i>Hd527</i>	(CTCA) ₉	F-tgt aaa gac cct cgt cat ttg ga R-agc agc tga cac gcc gtg ata t	55	AB178064
<i>Hd535</i>	(CTCA) ₁₄	F-ttt aac tct aca tgc cga ag R-tac tgt cag tcc aca tag gat	58	AB178065
<i>Hd553</i>	(CTCA) ₆	F-ttg cta aaa gcg gcg taa aac a R-tgc cac cac tac gac ata caa aga	58	AB178066
<i>Hd601</i>	(CGCA) ₅ (CA) ₉	F-ttg ctc cca aag gaa aga ac R-atg ttt aca att ctg tat gtt cag ct	58	AB178069
<i>Hd604</i>	(AAT) ₁₉	F-gtg tca gtt ctc caa aca ctt R-gaa aag gac tca aca agc ag	55	AB178070
<i>Hd680</i>	(CTCA) ₅	F-cac tta ggg ctt tcc tcc cac att R-tga gtg gct atg caa aca acc atg	55	AB178073
<i>Hd715</i>	(CTCA) ₅	F-gaa gcc cat ttc tgg tgt cc R-cgt tct gtt cat acg cat agt g	55	AB178074
<i>Hd731</i>	(ATG) ₁₄	F-gtt tat tgt tgt gcc aaa ccg a R-ggt tta att caa agt gac gga	58	AB178077
<i>Hd1147</i>	(AGGCG) ₅	F-tat ttc agc ctg att aac cct gtg R-acg ctt act caa ctt ggc act tac	58	AB178083

*1 A total of 25 microsatellite markers were developed, of which 9 markers were used (see text)

Table 3. Basic statistics of within-population genetic variability estimated for the 4 wild and the 4 artificial populations

Locus	Wild population				Artificial pseed Opulation				
	Ezo-awabi		Kuro-awabi		Ezo-awabi		Kuro-awabi		
	KO (n=96)	KT (n=96)	L (n=96)	KM (n=96)	T (n=48)	X̄ (n=48)	H (n=48)	KH (n=48)	
<i>Hd527</i>	A/ <i>Arich</i>	4/3.8	4/3.2	3/2.7	3/2.5	2/2.0	3/2.9	3/3.0	3/3.0
	<i>Ho/H_E</i>	0.135/0.139	0.083/0.081	0.147/0.163	0.167/0.172	0.083/0.118	0.208/0.191	0.021/0.063	0.104/0.101
	<i>P</i>	0.386	1.000	0.417	0.580	0.151	1.000	0.013*	1.000
<i>Hd535</i>	A/ <i>Arich</i>	15/13.1	20/16.2	20/18	18/15.4	12/11.9	10/9.9	14/13.9	13/13.0
	<i>Ho/H_E</i>	0.882/0.894	0.896/0.913	0.868/0.922	0.802/0.911	0.854/0.868	0.917/0.842	0.872/0.892	0.936/0.892
	<i>P</i>	0.695	0.784	0.727	0.031*	0.415	0.126	0.250	0.112
<i>Hd553</i>	A/ <i>Arich</i>	7/5.6	6/5.4	5/5	5/4.5	4/4.0	3/3.0	6/6.0	6/6.0
	<i>Ho/H_E</i>	0.245/0.278	0.458/0.499	0.632/0.673	0.708/0.634	0.479/0.412	0.688/0.470	0.583/0.620	0.625/0.741
	<i>P</i>	0.137	0.596	0.404	0.549	0.828	0.0003**	0.037*	0.0023**
<i>Hd601</i>	A/ <i>Arich</i>	16/12.7	14/11.9	16/13.8	19/14.9	10/9.9	7/7.0	10/8.9	14/13.7
	<i>Ho/H_E</i>	0.583/0.582	0.677/0.706	0.638/0.795	0.781/0.793	0.667/0.763	0.638/0.666	0.604/0.639	0.833/0.826
	<i>P</i>	0.070	0.054	0.159	0.956	0.0049**	0.044*	0.980	0.464
<i>Hd604</i>	A/ <i>Arich</i>	16/14.2	14/13	13/12.7	14/12.5	10/10.0	9/7.0	13/12.9	12/11.9
	<i>Ho/H_E</i>	0.823/0.854	0.833/0.895	0.868/0.896	0.842/0.906	0.771/0.832	0.717/0.782	0.854/0.899	0.854/0.864
	<i>P</i>	0.421	0.100	0.903	0.564	0.518	0.321	0.489	0.178
<i>Hd680</i>	A/ <i>Arich</i>	6/4.7	6/5.4	7/6	7/5.9	5/5.0	4/4.0	5/4.9	6/5.9
	<i>Ho/H_E</i>	0.632/0.62	0.552/0.627	0.485/0.525	0.51/0.553	0.625/0.692	0.500/0.641	0.250/0.282	0.500/0.509
	<i>P</i>	0.949	0.584	0.440	0.677	0.436	0.068	0.020*	0.776
<i>Hd715</i>	A/ <i>Arich</i>	9/8.2	9/7.3	9/8.6	8/7.3	7/6.9	8/7.8	6/6.0	5/5.0
	<i>Ho/H_E</i>	0.490/0.52	0.458/0.456	0.544/0.547	0.448/0.514	0.563/0.661	0.833/0.737	0.458/0.478	0.479/0.406
	<i>P</i>	0.328	0.979	0.202	0.027*	0.123	0.613	0.470	0.962
<i>Hd731</i>	A/ <i>Arich</i>	9/7.7	8/7.7	5/5	7/5.9	6/6.0	6/6.0	3/3.0	5/5.0
	<i>Ho/H_E</i>	0.798/0.758	0.719/0.786	0.559/0.665	0.596/0.617	0.681/0.790	0.652/0.697	0.625/0.608	0.609/0.651
	<i>P</i>	0.849	0.200	0.244	0.992	0.014*	0.212	0.022*	0.027*
<i>Hd1147</i>	A/ <i>Arich</i>	5/4.5	5/4.7	3/3	4/3.4	4/4.0	4/4.0	3/3.0	3/3.0
	<i>Ho/H_E</i>	0.688/0.723	0.75/0.733	0.294/0.338	0.292/0.33	0.708/0.708	0.689/0.728	0.188/0.241	0.542/0.645
	<i>P</i>	0.726	0.713	0.302	0.317	0.247	0.490	0.011*	0.411
Mean	A/ <i>Arich</i>	9.7/8.3	9.6/8.3	9.0/8.3	9.4/8.0	6.7/6.6	6.0/5.7	7.0/6.8	7.4/7.4
	<i>Ho/H_E</i>	0.586/0.596	0.603/0.633	0.559/0.614	0.572/0.603	0.603/0.649	0.649/0.639	0.495/0.525	0.609/0.626

1) Probability value of Hardy-Weinberg equilibrium testing obtained by a test analogous to Fisher's exact test with the Markov-chain method (Markov-chain, 100000; dememorization, 100000) is shown. Significance is determined by adding *(uncorrected significance level, $P < 0.05$) and ** (corrected significance level for eight simultaneous test, $P < 0.006$). A, number of alleles; Arich, allelic richness; He, unbiased expected heterozygosity.

団の比較では、前者でロットによる大きな振れや低頻度のアレルの喪失傾向がみられた。そして、Allelic Richnessでは、人工種苗が5.7~7.4と天然集団の8.0~8.3と比較して有意に低かった ($P < 0.05$)。平均ヘテロ接合体率では、 H_o と H_e ではともに違いが認められなかったが、クロアワビ人工種苗Hの H_e では明らかに低い値を示し、ロットによる違いが検出された。これらの結果は、エゾアワビについてアロザイムを用いて解析した結果と矛盾しなかった (木島ら, 1992; 古殿ら, 1995)。人工種苗における遺伝的変異性の減少は、限られた親によって生産させることによるビン首効果が大きな原因になると推察されている (Allendorf and Phelps, 1980)。さらに、変異性の減少はヘテロ接合体率よりもアレル数に大きな影響を与えるとされており (Allendorf, 1986)、今回分析した人工種苗のアレル数の減少もビン首効果が大きな要因と思われる。ビン首効果による集団の有効な大きさの縮小は、まずアレル数の減少に表れ、さらに集団が縮小するとヘテロ接合体の減少に繋がると予測されることから、これらの2つの指標が集団を管理する上で重要と思われる。

殆どの座においてホモ接合体過剰傾向がみられたが、天然集団では各座において H_o と H_e での大きな差はなく、ヌルアレルの存在の可能性は低いと考えられた。さらに、Hardy-Weinberg平衡から有意にずれたと推定された座は、人工種苗において36のうち11で、天然集団ではKMに2つ存在した ($P < 0.05$)。しかし、Bonferroni補正を行うと人工種苗において3座のみが有意と認められた ($K=9$, $P < 0.006$)。これらのことは、今回分析に用いた9つの遺伝マーカーは集団を遺伝的観点から管理する解析ツールとして有効であることを示唆している。

集団間の遺伝的関係

集団間の遺伝的違いを調べるために F_{ST} 値を求めTable 4に示した。クロアワビ天然集団間(LとKM)を除く全ての組合せ集団間で遺伝的に有意な違いが認められた ($P < 0.001$)。人工集団間の F_{ST} 値は天然集団間の値に比べて高く、さらにエゾアワビとクロアワビの間で人工種苗および天然集団において高かった。エゾアワビとクロアワビ、および人工種苗と天然集団の遺伝的関係をみるためにCavalli-Sforzaの遺伝的距離(D_A)を用いて近隣結合法により類縁図を描き、Fig. 1に示した。この遺伝的類縁関係図からエゾアワビとクロアワビが大きく分かれることがわかる。近年、エゾアワビの種苗生産は順調なものクロアワビでは病気が原因とされる大量斃死が頻発しており (Momoyama 1999)、一部のクロアワビ生息域ではエゾアワビ人工種

苗の放流が続けられていることから、これらのマーカーはクロアワビ生息域でのエゾアワビの影響を調べるために有効と思われる。さらに、集団間の類縁関係は近接した天然集団と人工種苗が他の集団と比べて近い関係であることがわかる。すなわち、分析に使用した人工種苗では集団間での明らかな遺伝的違いがあるものの、種苗生産には地域の天然親貝を使用していることから地域の遺伝的組成を反映してと考えられる。

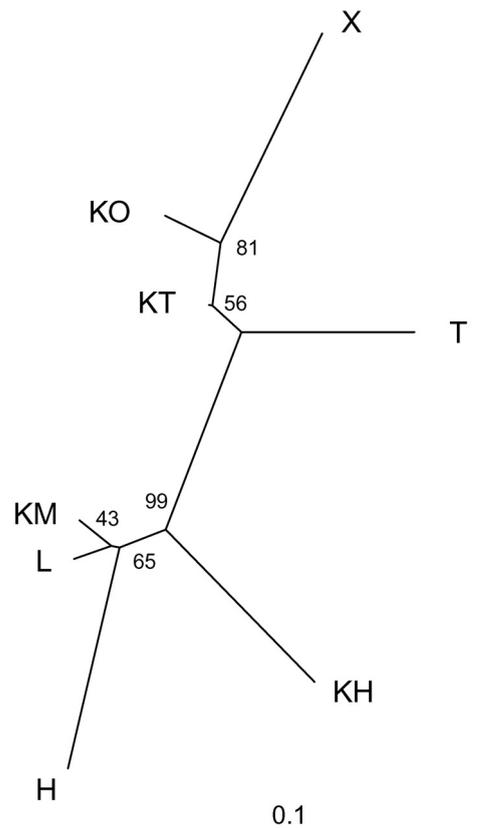


Fig. 1. Unrooted neighbor-joining tree based on modified Cavalli-Sforza chord distance (D_A). The numbers refer to percentage bootstrap values generated from 1000 replications of resampled loci.

Table 4. Pairwise multilocus F_{ST} (θ) calculated for the 4 artificial and the 4 natural abalone populations based on 9 microsatellites*¹ (above diagonal), and genetic distances modified Cavalli-Sforza chord (D_A) between the 8 abalone populations (below diagonal).

Population	Ezo-awabi habitat population				Kuro-awabi habitat population			
	KO	KT	L	KM	T	X	H	KH
KO	-	0.008(0.000)**	0.108(0.000)**	0.111(0.000)**	0.028(0.000)**	0.032(0.000)**	0.167(0.000)**	0.096(0.000)**
KT	0.030	-	0.064(0.000)**	0.069(0.000)**	0.020(0.000)**	0.025(0.000)**	0.111(0.000)**	0.055(0.000)**
L	0.140	0.098	-	-0.002(0.878)	0.062(0.000)**	0.094(0.000)**	0.026(0.000)**	0.038(0.000)**
KM	0.133	0.096	0.023	-	0.064(0.000)**	0.099(0.000)**	0.026(0.000)**	0.039(0.000)**
T	0.078	0.076	0.141	0.127	-	0.047(0.000)**	0.120(0.000)**	0.067(0.000)**
X	0.084	0.092	0.191	0.180	0.133	-	0.143(0.000)**	0.083(0.000)**
H	0.208	0.148	0.078	0.080	0.192	0.235	-	0.069(0.000)**
KH	0.166	0.127	0.087	0.094	0.173	0.218	0.136	-

*¹ Probability value associated with the θ is given in parenthesis. Significant departure of the θ value from zero is determined by adding ** (significance level for 45 simultaneous tests: $P < 0.0011$).

ま と め

開発されたアワビの9つのマイクロサテライトDNAマーカーは、既存のアロザイムマーカーと比較して遺伝的変異性が高いことから、人工種苗間および人工種苗と天然集団間の遺伝的変異性を高感度に調べることが可能になった。これらの遺伝マーカーを用いて、人工種苗と天然集団の遺伝的組成が大きく異なること、低頻度のアレルの多くが消失すること、エゾアワビとクロアワビで異なることが示された。10%の遺伝的変異性の減少は適応に関連する形質に影響を与えるという報告がある (Allendorf and Ryman, 1987)。今後、放流種苗の天然漁場への遺伝的影響をできるだけ少なくするためには、放流漁場に近接した水域から採集した親を使い、集団の有効な大きさが適切に維持されるよう放流種苗の遺伝的組成や変異性を監視しながらの種苗生産体制が必要と考えられる。

謝 辞

本研究は、水産総合研究センター交付金プロ研「生態系保全型増殖システム確立のための種苗生産・放流技術の開発 (平成13~15年度) によって行ったもので、本研究の推進のためご指導およびご助言をいただいた評価委員、プロジェクトリーダーおよびチームリーダーの皆様には感謝します。特に、アワビサブチームリーダーの堀井豊博士にはいろいろな面でのご支援を頂き厚くお礼申し上げます。

文 献

- Allendorf F.W., 1986: Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biol.*, **5**, 181-190.
- Allendorf F.W. and Stevan R.P., 1980: Loss of genetic variation in hatchery stock of cutthroat trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **109**, 537-543.
- Goudet J., 2001: FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Fujio Y., Oniwa K., Yuzawa A., and Takahashi K., 1989: Genetic variability and population structure in abalone. In: *Genetic Assessment Project Report in 1985-1988*, Japan Fisheries Resource Conservation Association, 459-476.
- Hara M. and Sekino M., 2002: Development of

- techniques for genetic monitoring in released populations of Pacific abalone, *Haliotis discus* using microsatellite markers. *Second international symposium on stock enhancement and sea ranching*, Book of abstract, **74**.
- 市来忠彦, 1980: 長崎県宇久島沿岸におけるクロアワビの成長. 長崎水試研報, **6**, 11-21.
- Kijima A., Ikeda M., and Fujio Y., 1992: Genetic characteristic of the artificial seed populations of abalone. *FISH Fish Genetics and Breeding Sciences*, **18**, 53-63.
- Momoyama K., Nakatsugawa T., and Yurano N., 1999: Mass mortalities of juvenile abalone, *Haliotis* spp., caused by amyotrophia. *Pathology*, **34**, 7-14.
- Nei M., Tajima F., and Tateno Y., 1983: Accuracy of estimated phylogenetic tree from molecular data, II: gene frequency data. *J. Mol. Evol.*, **19**, 153-170.
- Page R.D.M., 1996: Treeview: an application to display phylogenetic tree on personal computers. *Comp. Appl. Bio. Sci.*, **12**, 357-358.
- Saito N. and Nei M., 1987: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- Schneider S., Kueffer J.M., Roessli D., and Excoffier L., 1997: ARLEQUIN Version 1.1: a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Univ. of Geneva, Switzerland.
- Sekino M. and Hara M., 2001: Microsatellites DNA loci in Japanese abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). *Mol. Ecol. Note*, **1**, 8-10.
- Rice W. R., 1989: Analyzing table of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Weir B. S. and Cockerham C. C., 1984: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.

Appendix A
Allele frequency distributions of 9 microsatellite loci for eight Japanese abalone samples

Locus	Allele	Natural population						Artificial population										
		KO	KT	L	KM	T	X	H	KH	KO	KT	L	KM	T	X	H	KH	
<i>L527</i>	109	0.036	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	
	111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.021	0.846	0.677	0.441	0.453	0.750	0.656	0.240	0.333	
	115	0.927	0.958	0.912	0.906	0.938	0.896	0.968	0.948	0.027	0.057	0.110	0.083	0.156	0.000	0.063	0.073	
	119	0.016	0.016	0.000	0.005	0.063	0.094	0.000	0.031	0.085	0.198	0.346	0.391	0.073	0.073	0.323	0.563	0.354
	123	0.021	0.021	0.081	0.089	0.000	0.010	0.011	0.000	0.005	0.047	0.059	0.068	0.000	0.000	0.021	0.083	0.135
	127	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.010	0.044	0.005	0.021	0.000	0.031	0.031	0.000
<i>L535</i>	152	0.011	0.031	0.007	0.000	0.000	0.010	0.043	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	164	0.005	0.005	0.015	0.052	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	
	168	0.032	0.021	0.044	0.052	0.000	0.000	0.021	0.085	0.000	0.000	0.007	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	
	172	0.000	0.031	0.022	0.005	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	
	174	0.000	0.000	0.007	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.068	0.022	0.010	0.052	0.053	0.032	0.010	
	176	0.194	0.094	0.125	0.172	0.250	0.021	0.160	0.170	0.005	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.021	0.000	
	180	0.059	0.078	0.051	0.099	0.073	0.188	0.053	0.096	0.000	0.005	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	
	184	0.075	0.120	0.125	0.115	0.135	0.000	0.085	0.043	0.000	0.005	0.015	0.000	0.031	0.011	0.000	0.000	
	186	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.036	0.015	0.016	0.104	0.021	0.000	0.125	
	188	0.140	0.120	0.103	0.099	0.125	0.250	0.074	0.096	0.635	0.505	0.294	0.323	0.437	0.532	0.436	0.365	
	192	0.102	0.125	0.088	0.068	0.104	0.219	0.064	0.202	0.089	0.172	0.316	0.302	0.188	0.191	0.436	0.073	
	196	0.091	0.130	0.074	0.083	0.042	0.063	0.223	0.000	0.021	0.052	0.110	0.068	0.000	0.000	0.021	0.094	
	200	0.124	0.083	0.088	0.073	0.021	0.063	0.085	0.106	0.063	0.042	0.074	0.052	0.073	0.085	0.011	0.104	
	202	0.000	0.016	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.021	0.066	0.073	0.000	0.000	0.021	0.042	
	204	0.070	0.052	0.110	0.078	0.146	0.073	0.011	0.064	0.005	0.010	0.015	0.026	0.083	0.000	0.011	0.010	
	206	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.021	0.000	0.000	0.000	0.010	
	208	0.065	0.057	0.037	0.010	0.000	0.083	0.085	0.032	0.010	0.000	0.015	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	
	210	0.000	0.005	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.021	0.022	0.021	0.000	0.000	0.011	0.052	
212	0.022	0.005	0.037	0.047	0.010	0.000	0.000	0.021	0.010	0.036	0.007	0.010	0.021	0.000	0.000	0.052		
214	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000		
216	0.005	0.000	0.029	0.000	0.000	0.031	0.011	0.000	0.005	0.005	0.007	0.010	0.000	0.000	0.000	0.010		
220	0.005	0.005	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031		
222	0.000	0.000	0.015	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
224	0.000	0.010	0.007	0.000	0.000	0.000	0.074	0.043	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000		
232	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000		
240	0.000	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
250	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000		

