

AFLP 분석에 의한 멸종위기어류 미호종개, *Iksookimia choii*의 유전 다양성

이일로 · 이윤아 · 신현철¹ · 남윤권² · 김우진³ · 방인철*

(순천향대학교 해양생명공학과, ¹순천향대학교 생명과학과,
²부경대학교 양식학과, ³국립수산과학원 생명공학연구소)

Genetic Diversity of an Endangered Fish, *Iksookimia choii* (Cypriniformes), from Korea as Assessed by Amplified Fragment Length Polymorphism. Lee, Il-Ro, Yoon-A Lee, Hyunchur Shin¹, Yoon Kwon Nam², Woo-Jin Kim³ and In-Chul Bang* (Department of Marine Biotechnology & ¹Biology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea; ²Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea; ³Biotechnology Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea)

Genetic diversity and population genetic structure within or among three stream populations (Gab, Baegkok and Ji streams) of Korean endangered natural monument fish, *Iksookimia choii*, were assessed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). AFLP analysis using three primer combinations generated 104 to 106 AFLP bands, and percent polymorphic bands were similar in those three populations ranging 21.5 to 24.5%. Heterozygosity and genetic diversity within or among populations were quite low for all of these populations with average values ranging from 0.067 to 0.084 and from 0.076 to 0.087, respectively. Analyses of pairwise distance and genetic similarity among three populations of *I. choii* also revealed the similar results with very low genetic differentiation one another. Although pairwise *Fst* values were very low, our data clearly indicated distinct genetic differentiation among the three populations. This is the first report concerning the genetic diversity and differentiation of this species, and provides basic genetic information that should facilitate attempts to conserve this species.

Key words : endangered fish, *Iksookimia choii*, AFLP, genetic diversity, genetic differentiation

서 론

미호종개, *Iksookimia choii*는 *Cobitis choii*로 최초 기재되었으며 (Kim and Son, 1984), Nalbant (1993)에 의해 *Iksookimia* 속으로 다시 분류되었다. 1993년부터 본 종에 대한 대략적인 분포지역이 밝혀졌으나, 그 서식 지역이 매우 좁은 것으로 알려져 왔으며, 법적으로 본 종의

보호를 위해 환경부 멸종위기 보호대상종으로 지정하여 보호하고자 하였음에도 불구하고 지속적인 서식지의 파괴와 함께 최근 그 개체 수는 점차 감소하고 있는 것으로 보고되었다(홍, 2004). 이에 따라 환경부에서는 2005년 2월 멸종위기 I급 야생동식물로 지정하였고, 문화재청에서는 2005년 3월 17일자로 천연기념물 제454호로 지정한 바 있다.

많은 담수어류는 서식지 분단(Habitat fragmentation),

* Corresponding author: Tel: 041) 530-1286, Fax: 041) 530-1638, E-mail: incbang@sch.ac.kr

오염, 외래종의 도입 및 남획 등으로 인해 멸종위협을 받고 있다(Changeux and Pont, 1995; Ricciardi and Rasmussen, 1999; Penczak and Kruk, 2000). 이러한 멸종위기 담수어류의 보전을 위해서는 대상종의 유전 다양성, 근교약세(Inbreeding depression) 분석, 집단 유전적 구조 및 복원 후 유전 다양성 변화 추정 등과 같은 유전학적 연구가 매우 중요하다(Stow *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Danancher *et al.*, 2008).

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 분석 방법은 유전 다양성을 조사하는 방법 중 하나로, random amplified polymorphic DNA (RAPD)의 간편성과 restriction fragment length polymorphism (RFLP)의 재현성의 장점을 조합한 방법이다(Vos *et al.*, 1995). 이들 장점 때문에 많은 유용 동식물들에서 유전자 표지를 발굴하기 위해 사용하고 있으며(Jones *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2006), 특히 멸종 위기종의 집단 유전학적 연구에 이용되고 있다(Travis *et al.*, 1996; Palacios and Gonzalez-Candelas, 1999; Drummond *et al.*, 2000; Schmidt and Jenssen, 2000).

이에 본 연구에서는 멸종위기에 처한 미호종개의 복원을 위한 기초 연구로 AFLP기법을 이용하여 본 종의 미소 서식처로 확인된 갑천, 백곡천 및 지천 3집단의 유전 변이 및 다양성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험어 채집

본 실험에 사용한 미호종개, *Iksookimia choui*는 문화재청과 환경부의 승인을 얻은 후 2006년 8월에 채집하였으며, 갑천(대전광역시 서구 도안동), 백곡천(충북 진천군 백곡면 사송리), 지천(충남 청양군 장평면 구룡리)에서 족대(망목, 4×4 mm)를 사용하여 각각 15개체씩 채집하였다. 채집된 미호종개는 전장 7.7±1.0 cm, 체중 2.1±1.0 g이었다.

2. Genomic DNA의 분리

미호종개의 genomic DNA는 꼬리지느러미 일부를 절단하여 TNES-Urea buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8.0; 0.5% SDS; 8 M urea)를 이용하여 추출하였다(Asahida *et al.*, 1996). 상기 시료를 포함하는 완충용액에 proteinase K (Sigma, USA)를 100 µg mL⁻¹의 농도로 첨가하여 55°C에서 12시간 동안 반응

시켰고, phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 처리하여 단백질을 제거하였으며, 2-propanol로 DNA를 침전시켰다. 침전시킨 DNA는 70% 에탄올을 이용하여 세척하고 1X TE (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA; pH 8.0)로 용해시켰다. 준비한 시료는 흡광광도계 측정과 0.7% agarose gel 전기영동을 통해서 DNA의 양과 질을 확인한 후 실험에 이용하였다.

3. AFLP 지문 분석

총 2 µg의 DNA를 EcoR I 제한효소(Promega, USA) 10 unit로 37°C에서 4시간 절단한 후 절단 정도를 전기영동 상으로 확인하였고 에탄올 침전을 이용하여 절단한 DNA를 회수하였다. 두 번째 제한효소 반응을 위해서 Mse I 제한효소(Promega, USA) 2 unit를 첨가하여 65°C에서 4시간 동안 반응시켰으며, 절단 산물을 다시 순수 분리한 후 EcoR I/Mse I adapter를 첨가하여 ligation 반응을 실시하였다. Ligation된 DNA 5 µL를 대상으로 각각 10 pM의 EcoR I primer 및 Mse I primer (Invitrogen, USA), 1 unit Taq DNA polymerase (Intron, Korea), 0.6 mM dNTP, 10×PCR 용액을 첨가하여 1차 PCR preamplification 반응을 수행하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 30초, 56°C에서 60초, 72°C에서 60초간의 cycle을 총 20회 반복하였다. PCR 1차 반응 산물을 TE 완충용액으로 50배 희석한 후 희석산물 5 µL를 대상으로 EcoR I selective primer와 Mse I selective primer를 이용하여 상기와 동일하게 2차 PCR 조성물을 제조하였다. 이때 PCR 반응은 touchdown PCR법을 이용하여 94°C에서 30초, 65~56°C(회당 0.7°C씩 감소)에서 30초, 72°C에서 60초간 12회 순환 반응을 실시 후 annealing 온도를 56°C에서 30초로 고정하여 총 24회를 반복 수행하였다. 최종 증폭 산물 20 µL에 6 µL의 formamide loading dye (95% formamide, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF)를 첨가한 후 94°C에서 5분간 가열하고 이중 3 µL를 취하여 5% denaturing polyacrylamide gel을 이용하여 1,600 V에서 3시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동된 DNA 단편들은 silver staining kit (Promega, USA)를 이용하여 염색 후 관찰하였다.

4. 유전 다양성 분석 및 통계처리

Gel 상에서 각 위치에 확인된 DNA band의 유무에 따라 0 또는 1로 표시하여 matrix code를 작성한 후, TFPGA (ver. 1.3; <http://iubio.bio.indiana.edu.au/tfpga/>) 프로그램을 사용하여(Miller, 1997) 미호종개 각 집단별 및 전체

의 평균 이형접합율(heterozygosity)과 평균 유전 다양성(genetic diversity)을 구하였다.

각 집단별의 유전적 유사도(genetic similarity)는 Nei and Li (1979)의 공식을 이용하였고, 집단간 유전적 거리(pairwise genetic distance)와 각 집단간의 Hardy-Weinberg 평형(HWE)을 검정하기 위한 유전적 분화도(genetic differentiation, F_{st})는 Arlequin 프로그램(ver. 2.000, Stefan *et al.*, 2000)을 사용하였다. F_{st} 수치에 대한 유전적 검정(*P)은 무작위 대립유전자 치환(random allelic permutation) 과정을 10,000번 이상 반복하여 수행하였다. 또한 각 개체간의 유사도 matrix를 UPGMA(Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means)로 분석하여 각각을 군집화(clustering)하고 이를 토대로 dendrogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

1. 유전 다양성

하천 수계 집단 별 15개체를 대상으로 AFLP를 수행한 결과 3개의 primer 조합(E/ACT-M/CAT, E/ACT-M/CAC, E/ACG-M/CAC)에서 총 110개의 유효 밴드가 검출되었으며 primer 조합당 평균 37개로 나타나, 어름치(*Hemibarbus mylodon*, 이, 2005)의 53개보다는 적게 나타났다(Fig. 1). 집단별 다형성 밴드 비율은 갑천 24.5%, 백곡천 21.5%, 지천 22.1%로 갑천 집단이 가장 높게 나타났으나 집단간 큰 차이가 없었으며, 미호종개 전체 다형성 밴드의 비율은 30.9%로 분석되었다. 이러한 다형성 밴드 비율은 이(2005)가 보고한 어름치의 17.0%보다 높게 나타났으며, 멸종위기종인 잉어과 어류 *Gymnocypris przewalskii*의 다형성 비율(69.5~77.3%) 보다는 낮게 나타났다(Chen *et al.*, 2005).

정확한 집단유전을 추정하기 위해서는 교배방식, 효과적인 집단 크기, 집단 구조의 실존 수준 등의 다양한 변수 인자들이 고려되어야 하며(Mohammadi and Prasanna, 2003; Mendelson and Shaw, 2005; Singh *et al.*, 2006), 이러한 많은 변수 인자들 중에서 채집 전략을 위해서는 개체수 및 유전자좌 수를 선택적 인자로 이용할 수 있다(Bonin *et al.*, 2007). Krauss (2000)는 AFLP 자료분석을 통한 정확한 다양성 추정을 위해서는 집단별로 최소한 30개체가 필요하다고 하였으나, Nybom (2004)은 식물 AFLP 논문 27건을 분석한 결과 집단별 평균 14.5개체를 사용한 것으로 보고한 바 있다. 본 연구에서는 집단별 15

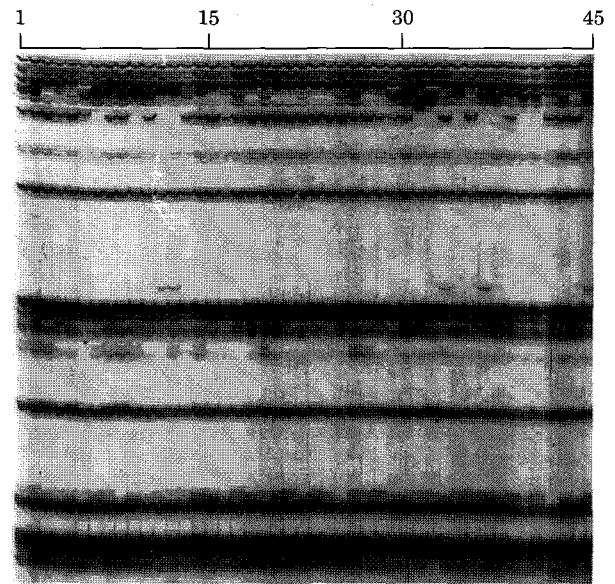


Fig. 1. AFLP fingerprint patterns of three *I. choii* populations generated with a primer combination of E/ACT-M/CAT. Lanes 1~15, Gab stream population; lanes 16~30, Baekgok stream population; lanes 31~45, Ji stream population.

Table 1. Summary on the profiles of AFLP analysis for three populations of *I. choii*.

Information of AFLP marker	Gab stream	Baekgok stream	Ji stream	Total
No. of samples	15	15	15	45
Total No. of bands	106	107	104	110
Total No. of polymorphic band	26	23	23	34
Polymorphism (%)	24.5	21.5	22.1	30.9
Average genetic similarity	0.931	0.936	0.942	0.942
Average genetic similarity	0.084	0.079	0.067	0.086
Average genetic diversity*	0.087* ±0.046	0.079 ±0.043	0.076 ±0.042	0.088 ±0.046

* Mean ± SD.

개체씩을 분석하였는데, 이는 본 종이 멸종위기종인 동시에 천연기념물이기 때문에 실험을 위한 충분한 수의 시료 채집과 허가가 매우 제한적이기 때문이었다. 추후 분석 시료 수에 따른 결과의 유의성 검토를 통해 추가 실험 여부를 결정하여야 할 것으로 판단된다.

집단별 평균 이형접합율(heterozygosity)은 0.06~0.08 범위였으며, 유전적 유사도는 갑천 0.931, 백곡천 0.936,

Table 2. Pairwise distance (above the diagonal) and pairwise genetic differentiation (below the diagonal) between the three populations of *I. choii* based on the AFLP analysis.

	Gab stream	Baekgok stream	Ji stream
Gab stream	—	0.018	0.017
Baekgokstream	0.120*	—	0.021
Ji stream	0.105*	0.132*	—

*P<0.01.

지천 0.942로 갑천 집단의 유사도가 가장 낮았으나 집단 간 차이는 거의 없었다. 또한 전체 평균 유사도는 0.942로 분석되어 유전 다양성이 매우 낮게 나타났다(Table 1). 이 결과는 어름치(이, 2005)에서 보고된 평균 유사도 0.969보다는 유전 다양성이 다소 높은 경향을 보였지만 다른 어류들과 비교시(꼬치동자개, 0.811; 칼납자루, 0.77~0.80; 임실납자루, 0.893; 납자루, 0.81~0.86; 미발표자료) 매우 낮은 수치로서 본 종이 미소 서식처를 가지는 멸종위기 어류 종들의 특징을 잘 보여주고 있다.

2. 집단의 유전적 구조

집단간 분화도(*Fst*) 값은 백곡천과 지천 사이가 0.132로 가장 높았고, 백곡천과 갑천 사이가 0.120, 갑천과 지천 사이가 0.105로 갑천과 지천 사이가 가장 낮게 나타났으며, 이러한 결과는 어름치(이, 2005)의 집단간 분화도는 0.039~0.104의 범위로 보고되어 어름치의 집단간 분화도 최고값과 미호종개 집단의 결과가 비슷한 수준으로 분석되었다. 집단간 분화도는 모든 집단간들이 유의적인 차이를 보여(P<0.01) 집단간 유전적 분화가 진행되고 있음을 알 수 있다(Table 2). 또한 집단간 분화도 값이 모두 0.05~0.15 사이의 값을 나타내어 Wright(1978)의 제안에 따르면 이 값은 집단간 분화 수준이 보통임을 나타내었다.

집단간 유전적 거리는 백곡천과 지천 사이가 0.0207, 백곡천과 갑천 사이가 0.0175 그리고 갑천과 지천 사이가 0.0167로 집단간 분화도와 같은 경향을 보이며 집단간에 큰 차이는 없는 것으로 분석되었다(Table 2). 유전적 거리에 따른 3집단의 UPGMA dendrogram을 작성한 결과, 뚜렷한 집단의 분화는 관찰되지 않았으나 일부 집단의 개체들에서 분류되는 양상을 나타내고 있어(Fig. 2), 집단간 분화도와 유사한 경향을 보이며 유전적 분화가 진행되고 있음을 시사하고 있다.

본 연구에서 미호종개의 유전 다양성은 매우 낮은 것

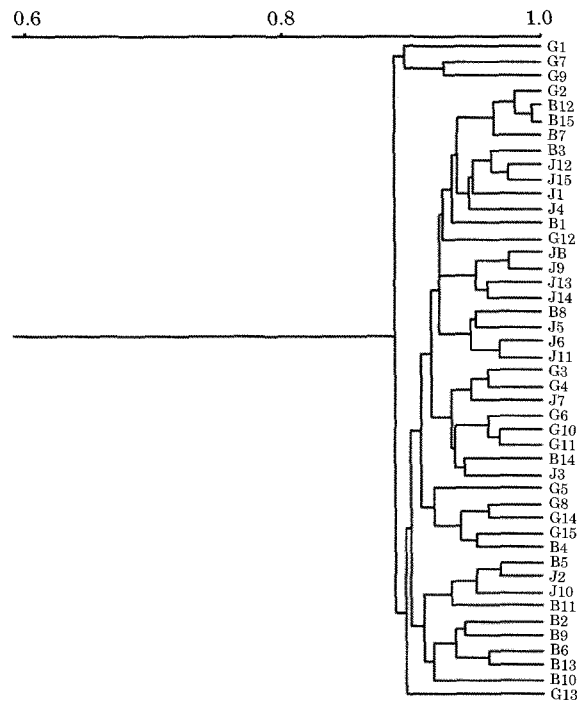


Fig. 2. A representative dendrogram showing the phylogenetic relationships among three populations of *I. choii* based on genetic distance data. Dendrogram was constructed by the UPGMA clustering method. G1-15, Gab stream population; B1-15, Baekgok stream population; J1-15 lane, Ji stream population.

으로 분석되었다. Ward *et al.* (2003)는 유전 다양성의 감소와 지리적 격리에 따른 genetic drift에 의한 멸종의 위험을, Frankham *et al.* (2002)은 서식지의 협소성과 환경 변화에 따른 서식환경의 악화가 진행됨에 따라 집단 크기의 고립과 감소의 현상을 보고한 바 있어, 본 종에 있어서도 미소 서식처와 급격한 서식지의 감소로 인해 집단의 고립과 감소 위기에 처해 있으며, 집단 크기의 고립과 감소는 진화 잠재력의 감소를 가속시키고, 근친교배를 통해 위험에 빠뜨리는 것을 확대시킨다는 보고와 일치하여 멸종의 위험을 암시하였다(Taylor, 2003).

미호종개의 분포를 볼 때 2003년까지는 금강 지류하천, 미호천 본류와 지류하천 전체에 분포함으로써 하천 수계간 유전자의 교류가 있었을 것으로 판단되나(홍, 2004), 최근 수질오염 및 서식처 파괴 등으로 인해 3~4개소의 미소 서식처에서만 확인되고 있다. 이와 같이 본 종은 서식처 분단을 통해 집단간 유전자 교류가 차단됨으로써 실험한 일부 집단에서 분화가 진행된 것으로 사료된다. 따라서 이후 본 종의 복원 시 집단간 분화가 진행되고

있는 점을 감안하여 유전 다양성 유지를 위한 체계적인 보존 대책이 수립되어야 할 것으로 판단된다. 또한 정밀한 유전 다양성 분석 및 집단 내 유전 다양성 회복을 위한 교배지침 작성을 위해 microsatellite marker에 의한 분석도 필요하리라 판단된다.

적 요

우리나라 멸종위기종 미호종개 3집단(갑천, 백곡천, 지천)의 유전 다양성 및 유전적 구조를 AFLP분석을 통해 조사하였다. 3종의 primer 조합형을 이용한 AFLP 분석에서 각 집단으로부터 106, 107, 104개의 밴드가 생성되었으며, 집단 내 다형 밴드의 출현 빈도는 3개 집단에서 21.5~24.5%로 유사하게 나타났고, 이형접합율(0.067~0.084) 및 유전적 다양도(0.076~0.087)는 매우 낮은 값을 보였다. 집단간 유전적 거리 및 유전적 상동성 분석 역시 유사한 결과를 나타내어 본 연구에서 분석한 미호종개 3개 집단은 유전적으로 매우 밀접한 근연관계를 나타내었다. 비록 pairwise F_{st} 값은 매우 낮았지만 3집단은 유전적 분화가 진행되고 있었다. 본 연구는 미호종개의 유전적 다양성 및 분화에 대해 처음으로 보고된 연구이며, 미호종개의 보존을 위한 유전적 기초 정보를 제공해 준다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업 연구개발과제의 지원에 의하여 이루어졌음. 또한 미호종개 3집단의 채집을 도와주신 보령민물생태관의 조성장 대표님께 감사드립니다.

인 용 문 헌

- 이윤아, 2005. 멸종위기에 처한 어름치(*Hemibarbus mylodon*)의 유전 다양성 분석. 2005학년도 순천대학교 일반대학원 박사학위 청구논문.
- 홍영표, 2004. 멸종위기종 미호종개의 현황과 보존. 2004년 한국어류학회 추계학술 대회 요약집. p. 59-72.
- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.* **62**: 727-730.
- Bonin, A., D. Ehrlich and A. Manel. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol. Ecol.* **16**: 3737-3758.
- Changeux, T. and D. Pont. 1995. Current status of the riverine fishes of the French Mediterranean basin. *Biol. Conserv.* **72**: 137-158.
- Chen, D., C. Zhang, C. Lu, Y. Chang and J. Chang. 2005. Amplified fragment length polymorphism analysis to identify the genetic structure of the *Gymnocypris przewalskii* (Kessler, 1987) population from the Qinghai Basin, China. *J. Appl. Ichthyol.* **21**: 178-183.
- Danancher, D., J.I. Izquierdo and E. Garcia-Vazquez. 2008. Microsatellite analysis of relatedness structure in young of the year of the endangered *Zingel asper* (Percidae) and implications for conservation. *Freshw. Biol.* **53**: 546-557.
- Drummond, R.S.M., D.J. Keeling, T.E. Richardson, R.C. Gardner and S.D. Wright. 2000. Genetic analysis and conservation of 31 surviving individuals of a rare New Zealand tree, *Metrosideros bartlettii* (Myrtaceae). *Mol. Ecol.* **9**: 1149-1157.
- Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, Univ. Press, Cambridge.
- Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. Van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maesti, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez and R. Aert. 1997. Reproducibility testing RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* **3**: 381-390.
- Kawamura, K., M. Kubota, M. Furukawa and Y. Harada. 2007. The genetic structure of endangered indigenous populations of the amago salmon, *Oncorhynchus masou ishikawae*, in Japan. *Conserv. Genet.* **8**: 1163-1176.
- Kim, I.-S. and Y.-M. Son. 1984. *Cobitis choii*, a new cobitid fish from Korea. *Kor. J. Zool.* **27**: 49-55.
- Kim, W.J., Y.-A. Lee and I.-C. Bang. 2007. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for the endangered Korean freshwater fish *Hemibarbus mylodon*. *Mol. Ecol. Notes* **7**: 516-518.
- Krauss, S.L. 2000. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Mol. Ecol.* **9**: 1241-1245.
- Li, Z., J. Li, Q. Wang, Y. He and P. Liu. 2006. The effects of selective breeding on the genetic structure of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* populations. *Aquaculture* **258**:

- 278-282.
- Mendelson, T.C. and K.L. Shaw. 2005. Use of AFLP markers in surveys of arthropod biodiversity. *Methods Enzymol.* **395**: 161-177.
- Miller, M. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. <http://www.Marksgeneticsoftware.net/TFPGA.htm>.
- Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.* **43**: 1235-1248.
- Nalbant, T.T. 1993. Some problems in the systematics of genus *Cobitis* and its relatives (Pisces: Ostariophysii, Cobitidae). *Rev. Roum. Biol, Biol. Anim.* **38**: 101-110.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**: 3321-3323.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* **13**: 1143-1155.
- Palacios, C. and F. Gonzalez-Candelas. 1999. AFLP analysis of the critically endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae). *J. Hered.* **90**: 485-489.
- Penczak, T. and A. Kruk. 2000. Threatened obligatory riverine fishes in human-modified polish rivers. *Ecol. Freshw. Fish.* **9**: 109-117.
- Ricciardi, A. and J.B. Rasmussen. 1999. Extinction rates of north American freshwater fauna. *Conserv. Biol.* **13**: 1220-1222.
- Schmidt, K. and K. Jenssen. 2000. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproduction components. *Am. J. Bot.* **87**: 678-689.
- Singh, M., K. Chabane, J. Valkoun and T. Blake. 2006. Optimum sample size for estimating gene diversity in wild wheat using AFLP markers. *Gen. Res. Crop Evol.* **53**: 23-33.
- Stefan, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Univ. of Geneva.
- Stow, A., K. Zenger, D. Briscoe, M. Gillings, V. Peddemors, N. Otway and R. Harcourt. 2006. Isolation and genetic diversity of endangered grey nurse shark (*Carcharias taurus*) populations. *Biol. Lett.* **2**: 308-311
- Taylor, A.C. 2003. Assessing the consequences of inbreeding for population fitness: past challenges and future prospects. *In: Reproductive Science and Intezgrated Conservation* (ed. W.V. Holt, A.R. Pickard, J. Rodger & D.E. Wildt). p. 67-81. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Travis, S.E., J. Maschinski and P. Keim. 1996. An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Mol. Ecol.* **5**: 735-745.
- Vos, P., R. Hodggers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- Ward, R.D., K.E. Jorstad and G.B. Maguire. 2003. Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) introduced to Western Australia. *Aquaculture* **219**: 169-179.
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations; Vol 4: Variability within and among natural populations. Univ. of Chicago Press, Chicago.

(Manuscript received 26 February 2008,
Revision accepted 15 March 2008)