

## AFLP 분석에 의한 한국과 일본의 납자루 *Acheilognathus lanceolatus*의 유전 변이와 집단 구조

윤영은 · 김치홍<sup>1</sup> · 김근용 · 石鍋壽寬<sup>2</sup> · 방인철\*

순천향대학교 해양생명공학과, <sup>1</sup>국립수산물과학원 중앙내수면연구소, <sup>2</sup>일본 칸논자키 자연박물관

**Genetic Variation and Population Structure of the Slender Bitterling *Acheilognathus lanceolatus* of Korea and Japan as Assessed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis by Young-Eun Yun, Chi-Hong Kim<sup>1</sup>, Keun-Yong Kim, Toshihiro Ishinabe<sup>2</sup> and In-Chul Bang\*** (Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea; <sup>1</sup>Central Inland Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Gapyeong 477-815, Korea; <sup>2</sup>Nature Museum and Institute, Kannonzaki, Yokosuka-shi 239-0818, Japan)

**ABSTRACT** Genetic variation and population structure of the slender bitterling *Acheilognathus lanceolatus* of Korea (the Han, Geum, Dongjin, Seomjin and Nakdong Rivers) and Japan (the Katsura River) were assessed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. Five combinations of selective primers generated 345~374 DNA fragments, of which 55~131 were polymorphic. The Nakdong River population had the highest genetic diversity and the Han River population had the lowest genetic diversity. Dendrogram based on the distance matrix revealed that individuals from each population consistently clustered together and bifurcated into two distinct clades (or population groups) composed of the Han, Geum, Dongjin and Seomjin River populations and of the Nakdong and Katsura River populations, supported with high bootstrap values. The pairwise genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) estimates showed that the six populations were genetically well differentiated ( $P < 0.01$ ). The analysis of molecular variance (AMOVA) after partitioning the six populations into two population groups revealed very strong biogeographic structuring between them with 25.49% of total variance ( $P < 0.01$ ). Taken together, the AFLP markers clearly divided six *A. lanceolatus* populations into two population groups.

**Key words :** *Acheilognathus lanceolatus*, AFLP, genetic variation, population structure

### 서 론

납자루 *Acheilognathus lanceolatus*는 납자루아과(Acheilognathinae)에 속하는 담수어로 한국의 서해와 남해로 유입하는 하천과 일본의 Honshu(本州)에서 Kyushu(九州)에 걸쳐 넓게 분포하고 있다(김과 박, 2002; Hashiguchi *et al.*, 2006).鈴木와 田(1990)은 한국과 일본의 *A. lanceolatus* 간의 발생 실험에서 완숙란의 형태와 부화 시간의 차이, 혼인색 차이 등에서 다른 종으로 구분될 가능성이 높으나, 이들 집단 간에 완전한 교배가 이루어졌으며 자어들의 생존율이 높

아 그 분화 정도가 아종 수준일 것으로 추정하였다. 그러나 납자루아과의 종들 간에는 교잡으로 인한 자연잡종의 출현이 보고되었고(Hashiguchi *et al.*, 2006; 윤, 2009), *A. lanceolatus*는 근연한 *Tanakia limbata*를 비롯한 *Acheilognathus*속, *Rhodeus*속 및 *Tanakia*속의 여러 종들과도 교잡하여 번식 능력이 있는 잡종을 생산할 수 있어(Kawamura and Hosoya, 2000), *A. lanceolatus* 집단 간의 교배 여부만으로 이들 종분화 정도를 판단하는 것은 어려운 실정이다. 따라서 이들 집단 간의 계통발생적 관계를 파악하기 위해 유전 정보를 바탕으로 하는 집단유전학적 연구의 필요성이 대두되고 있다.

현재까지 *A. lanceolatus*에 관한 연구로는 미토콘드리아 12S ribosomal RNA 유전자의 핵산 서열 분석을 통한 근연 종과의 계통발생학적 연구와(Okazaki *et al.*, 2001) 미토콘드

\*교신저자: 방인철 Tel: 82-41-530-1286, Fax: 82-41-530-1638, E-mail: incbang@sch.ac.kr

리아 cytochrome *b* 유전자의 핵산 서열 분석을 통한 일본 서부 집단 간 비교 연구가 수행되었다(Hashiguchi *et al.*, 2006). 그러나 이러한 연구들에서는 한국 집단이 포함된 적이 없으며, 더욱이 핵 DNA를 이용한 집단유전학적 연구와 이에 따른 이들의 유전 변이와 집단 구조를 밝힌 연구는 전무하다.

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 분석은 종 내뿐만 아니라 종 간 수준에서도 고도의 다형성을 나타내기 때문에 (Vos *et al.*, 1995; David *et al.*, 2001), 이러한 분석을 활용한 유전 변이 분석은 집단유전학적 연구에 널리 활용되고 있다. 특히 이 분석 기법은 최근 지리적인 격리에 따른 어류 집단의 유전적 분화 연구에 활용되고 있으며 (Chen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007), 한국의 독종개 *Cottus koreanus* (변 등, 2009), 감돌고기 *Pseudopungtungia nigra* (김 등, 2009), 어름치 *Hemibarbus mylodon* (이 등, 2008a)와 같이 멸종위기에 처한 담수 어류종들을 대상으로 유전적 변이 분석에 활용된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 한국의 5개 수계와 일본의 1개 수계에서 서식하는 *A. lanceolatus*를 채집하여 이들의 유전 변이와 집단 구조를 AFLP 분석을 통하여 파악하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어 채집과 genomic DNA 추출

본 실험에 사용된 *A. lanceolatus* 개체들은 2007년 5월부터 2007년 8월까지 한국의 한강(강원도 횡성군 횡성읍과 충청북도 음성군 소이면)과 금강(충청남도 청양군 장평면), 동진강(전라북도 정읍시 덕천면), 섬진강(전라북도 임실군 관촌면), 낙동강(경상남도 함양군 유림면)의 수계에서 족대(4×4 mm)와 유인어망을 사용하여 채집하였다. 일본 *A. lanceolatus* 개체들은 Katsura River [桂川 수계, Kyoto Prefecture Nantanshi (京都府 南丹市)]에서 채집하였다. 이들 6개 집단에서 각 10개체를 대상으로 꼬리지느러미를 절단하여 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다.

### 2. AFLP 분석

AFLP 분석은 Vos *et al.* (1995)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 처음 2개의 제한효소(*EcoRI*와 *MseI*; New England Biolabs, Beverly, MA, USA)를 사용하여 genomic DNA를 절단한 후, 그 절단된 DNA를 순수 분리하고 *EcoRI*와 *MseI* adapter를 첨가하여 ligation 반응을 수행하였다. Ligation 반응이 완료된 DNA를 10배 희석한 후, 1차 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 실시하였다.

PCR 조건은 95°C 30초, 56°C 60초, 72°C 60초의 순환반응을 총 20회 반복하였으며, 그 PCR 산물을 50배 희석한 후, 5개의 선택적 프라이머 조합(E/AAG-M/CAA와 E/ACG-M/CGT, E/ACA-M/CAT, E/ATT-M/CCT, E/AGT-M/CTT; Vos *et al.*, 1995)을 사용하여 2차 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C 30초, 65°C에서 56°C까지 회당 0.7°C씩 감소시키며 30초, 72°C 60초의 순환반응을 12회 실시한 후, 결합 온도를 56°C로 고정하여 순환반응을 총 24회 반복하였다. 최종 PCR 산물은 6% denaturing polyacrylamide gel에 전기영동한 후, SILVER SEQUENCE™ Staining Reagents (Promega, Madison, WI, USA)로 염색하여 확인하였다.

### 3. 데이터 분석

PCR 단편들은 밴드의 유무에 따라 각각 1과 0로 치환하여 matrix를 작성한 후, Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005)을 사용하여 집단의 평균 유전적 다양성(genetic diversity)을 계산하였다. 유전적 거리(genetic distance)에 근거하여 계통도(dendrogram)는 비가중산술평균결합(unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA) 방법으로 NTSYS-pc 2.02i (Rohlf, 1998)를 사용하여 작성하였다. 또한 집단 그룹들 간과 집단 간, 집단 내 유전 변이는 Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005)의 analysis of molecular variance (AMOVA) 분석(Excoffier *et al.*, 1992)을 통해 파악하였다.

## 결 과

본 연구에서는 한국의 *A. lanceolatus* 5개 집단(한강과 금강, 동진강, 섬진강, 낙동강)과 일본의 1개 집단(Katsura River)을 대상으로 유전 변이를 분석하기 위해 5개의 선택적 프라이머 조합을 이용하여 AFLP 분석을 수행하였다. 검출된 집단별 유효 밴드 수와 다형성 밴드 수, 평균 유전적 다양성 값을 Table 1에 나타내었다. 집단별 유효 밴드 수는 345~374개이었으며, 다형성 밴드 수는 55(15.0%)~131(24.9%)개이었다. 평균 유전적 다양성은 집단별로 0.043~0.123 수준을 보였으며, 한강 집단이 0.043로 가장 낮았고 낙동강 집단이 0.123로 가장 높았다.

AFLP 분석을 통해 얻어진 유전적 거리에 근거하여 작성된 계통도 상에서 한국 5개 수계와 일본 1개 수계에서 채집된 각각 10개의 *A. lanceolatus* 개체들은 각 수계별로 함께 분기하였다(Fig. 1). 한편 계통도 상에서 나타난 이들 집단 간의 계통적 유연관계에서 한국의 한강과 금강, 동진강, 섬진강 집단이 97%의 bootstrap 값으로 지지되는 하나의 단계통군(또는 집단 그룹)을 형성하였고, 한국의 낙동강과 일본의 Katsura River 집단이 97%의 bootstrap 값으로 지지되는

**Table 1.** Summary of results for PCR bands generated by AFLP analysis using five different combinations of selective primers for each ten *Acheilognathus lanceolatus* individuals from six river systems

Population	No. of individuals	Total no. of scorable fragments	Total no. of polymorphic fragments	Average genetic diversity
Han River	10	367	55 (15.0%)	0.043 ± 0.024
Geum River	10	363	96 (26.4%)	0.082 ± 0.044
Dongjin River	10	374	75 (35.0%)	0.069 ± 0.037
Seomjin River	10	368	86 (20.4%)	0.075 ± 0.066
Nakdong River	10	345	131 (24.9%)	0.123 ± 0.066
Katsura River	10	349	113 (32.4%)	0.092 ± 0.062

**Table 2.** The pairwise genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) inferred from polymorphic DNA fragments generated by AFLP analysis between *Acheilognathus lanceolatus* populations from six river systems

Population	Han R.	Geum R.	Dongjin R.	Seomjin R.	Nakdong R.	Katsura R.
Han R.	—	0.590*	0.666*	0.677*	0.681*	0.761*
Geum R.		—	0.593*	0.428*	0.523*	0.652*
Dongjin R.			—	0.588*	0.621*	0.682*
Seomjin R.				—	0.501*	0.629*
Nakdong R.					—	0.459*
Katsura R.						—

Symbol "\*" indicates significant support for  $F_{ST}$  values ( $P < 0.01$ ).

**Table 3.** Results of the hierarchical analyses of molecular variance (AMOVA) based on AFLP analysis for *Acheilognathus lanceolatus* populations from six river systems. The percentage of variance (%) and probability estimated from permutation ( $P$ ) are given at hierarchical level

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	%	$P$
Among population groups	1	581.625	13.243	25.49	< 0.01
Among populations within groups	4	913.925	21.085	40.58	< 0.01
Within populations	54	951.900	17.628	33.93	< 0.01
Total	59	2447.450	51.956	100	

또 다른 단계통군을 형성하였다. 또한 유전적 분화도 ( $F_{ST}$ )는 모든 집단 간에 유의적 차이를 보였으며 ( $P < 0.01$ ), 집단 간의 유전적 분화도 ( $F_{ST}$ ) 값은 금강과 섬진강 집단 간에 0.428으로 가장 낮았고 한강과 Katsura River 집단 간에 0.761로 가장 높았다 (Table 2).

한편 계통도와 유전적 분화도 값을 바탕으로 *A. lanceolatus* 집단을 한강/금강/동진강/섬진강 집단 그룹과 낙동강/Katsura River 집단 그룹으로 구획한 후, 이들 집단 그룹 간과 집단 그룹 내의 집단 간의 분화도 정도를 AMOVA 테스트를 통해 분석하였다 (Table 3). 이들 두 집단 그룹은 25.49%의 총 변이 ( $P < 0.01$ )을 보였으며, 각 집단 그룹 내의 집단 간의 변이는 40.58%, 집단 내 개체 간의 변이는 33.93%로 나타났다.

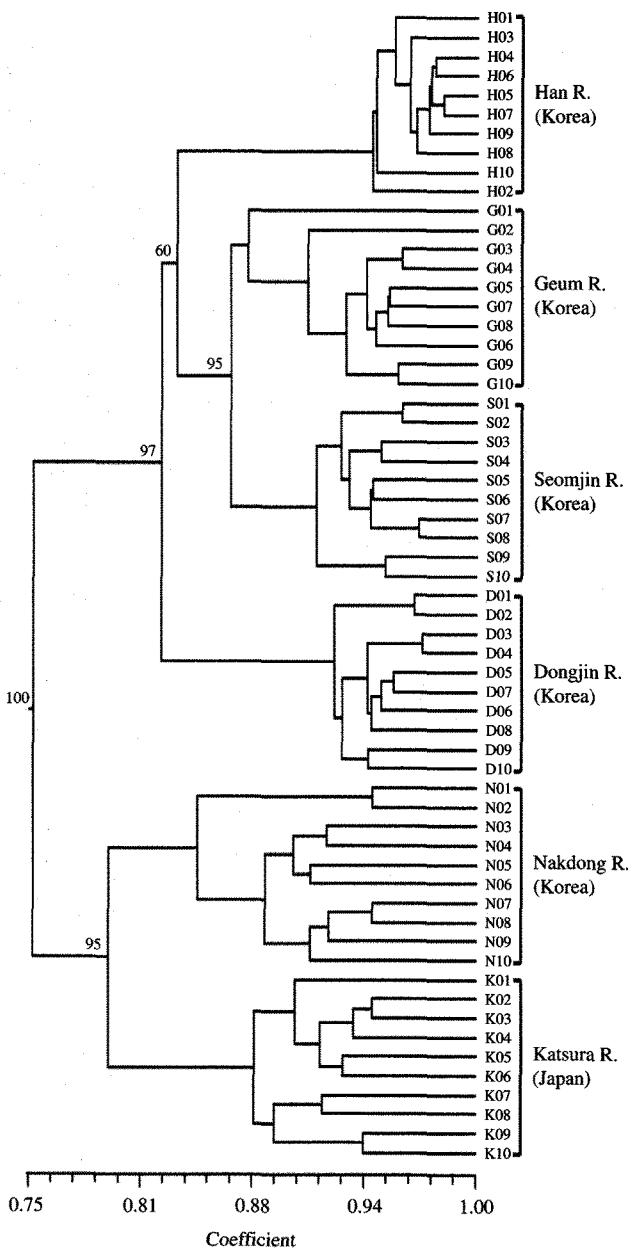
## 고 찰

본 연구에서는 한국과 일본의 *A. lanceolatus* 집단 간의 유

전 변이와 집단 구조를 파악하기 위해 AFLP 분석을 수행하였다. 검출된 집단별 다형성 값은 15.0~24.9%로 중국 고유종인 *Schizothorax prenti* (87.1%; Song *et al.*, 2006)와 한국의 멸종위기종인 *P. nigra* (64.1%; 김 등, 2009) 보다 낮았다. 또한 근연종인 칼납자루 *Acheilognathus koreensis* (37.6%; 김, 2003) 보다 낮았다.

한편 AFLP 분석을 통해 얻어진 유효 밴드에 근거한 *A. lanceolatus* 집단 간의 평균 유전적 다양성은 한강과 금강, 동진강, 섬진강 집단은 0.043~0.082의 값을 보였다. 이는 멸종위기에 처한 *H. mylodon* (0.036~0.043; 이 등, 2008a)와 *Cobitis choii* (0.076~0.087; 이 등, 2008b)와 유사한 수준이었다. 또한 낙동강과 Katsura River 집단은 0.092~0.123의 값을 보여 조사된 다른 집단보다 높았으나, *P. nigra* (0.104~0.170)보다 낮은 수준이었다 (김 등, 2009).

한국과 일본의 *A. lanceolatus* 집단은 계통수 상에서 각 수계별로 유집되었으며, 이들 모든 집단 간의 유전적 분화도는  $P < 0.01$ 의 신뢰구간에서 유의적으로 지지를 받았고, AMOVA 분석에서는 집단 간의 유전 변이 수준은 높으나



**Fig. 1.** Dendrogram generated using the UPGMA method inferred from polymorphic AFLP markers of *Acheilognathus lanceolatus* individuals from the Han (H01-H10), Geum (G01-G10), Dongjin (D01-D10), Seomjin (S01-S10), Nakdong (N01-N10) and Katsura (K01-K10) River systems. Bootstrap values greater than 50% are indicated at each branch node.

집단 내의 변이 수준은 낮게 나타났다. 이러한 결과들은 *A. lanceolatus* 개체들이 채집된 수계들이 자기 독립된 집단을 형성하고 있으며 이들 집단 간에는 유전자 흐름이 제한적임을 시사한다. Hashiguchi *et al.* (2006)은 cytochrome *b* 유전자의 핵산 서열 분석을 통해 일본 서부의 *A. lanceolatus* (*T. lanceolata*로 보고) 집단 간의 생물지리적 분단 경향을 보임

을 밝혀, 본 연구의 결과와 잘 일치하고 있다.

한편 *A. lanceolatus*의 계통도 상에서 한국의 한강과 금강, 동진강, 섬진강 집단과 한국의 낙동강과 Katsura River 집단은 각각 높은 bootstrap 값으로 지지되는 단계통군을 형성하였으며, AMOVA 테스트에서 한강/금강/동진강/섬진강과 낙동강/Katsura River 집단 그룹 간에 25.49%의 총 변이 ( $P < 0.01$ )를 보여 유전적으로 명확하게 구분되었다. 이러한 결과는 이들 집단 그룹 간의 유전적 분화도 수준은 매우 높으며 이들의 최초 분화 이후 유전자 흐름은 매우 제한적이었음을 강하게 시사한다. 한편鈴木와 田(1990)은 한국 웅천천 집단(한강/금강/동진강/섬진강 집단 그룹)과 일본 집단(낙동강/Katsura River 집단 그룹) 간에는 완속란의 형태와 부화 시간의 차이, 혼인색 차이 등에서 다른 종으로 구분될 가능성이 높음을 시사하였다. 우리의 결과는 이러한 형태적, 발생적 차이들이 AFLP 분석을 통한 이들 집단 그룹 간의 유전적 변이 수준과 잘 일치하고 있음을 보여주고 있다. 따라서 각 집단 그룹은 적어도 하나의 독립된 ESU (evolutionarily significant unit)로 취급되어야 할 것이다(Fraser and Bernatchez, 2001; Moritz, 2002).

한편 담수 어종들 중에서 고유종들의 생물지리적 분포 양상을 토대로 김(1997)은 한반도를 서한아지역과 남한아지역, 동북한아지역의 3개 구계로 구분하였다. 지형학적으로 고황하강과 고야무르강의 영향 및 남령-태백-소백-노령 산맥들이 이들 구계들을 나누는 주요 분단분포(vicariance) 장벽으로 작용한다. 서한아지역에는 본 연구의 조사 지역인 한강과 금강, 동진강이 포함되고, 남한아지역은 섬진강과 낙동강이 포함된다. 이러한 생물지리학적 구계는 AFLP 분석에 의한 *C. splendidus*의 유전 변이(Song *et al.*, 2010)에 관한 연구와도 잘 일치한다.

그러나 *A. lanceolatus* 집단 간의 계통도와 AMOVA 분석 결과는 남한아지역에 속하는 섬진강 집단은 서한아지역의 한강과 금강, 동진강의 집단과 유전적으로 더욱 밀접하게 근연하고 남한아지역에 속하는 낙동강 집단은 일본의 Katsura River 집단과 근연한 결과를 보여, 김(1997)의 생물지리적 구계와 차이를 보였다. 양(2004)은 *A. koreensis*의 계수·계측형질 비교에서 금강과 섬진강, 탐진강 집단과 낙동강 집단 간에는 두장(head length)에 대한 문장(snout length)과 양안간격(interorbital width)의 백분비에서 뚜렷한 차이들을 보여 잘 구분되었으며, 우리의 결과와 일치한다.

본 연구에서는 AFLP 분석을 통해 한국과 일본의 *A. lanceolatus*의 유전적 변이와 집단 구조를 파악하였다. 앞으로 *A. lanceolatus*의 집단 구조와 생물지리적 분포 구계를 더욱 명확하게 밝히기 위해서는 본 연구에서 포함되었던 한국 집단 이외에 웅천천과 탐진강을 비롯한 다른 집단과 일본과 중국에 분포하는 집단의 표본을 추가로 확보하여 비교해야 할 것이다. 이와 더불어 cytochrome *b*와 같은 유전자의 핵산

서열 분석을 통한 일본과 중국 집단과의 계통발생학적, 계통지리학적 연구가 필요할 것으로 여겨진다. 또한 한국 한강과 금강, 만경강, 섬진강 집단과 한국 낙동강과 일본 집단 간의 형태 형질에 기초한 분류학적 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

## 요 약

납자루 *Acheilognathus lanceolatus*의 유전 변이와 집단 구조를 알아보기 한국의 5개 집단(한강과 금강, 동진강, 섬진강, 낙동강)과 일본의 1개 집단(Katsura River)을 대상으로 AFLP 분석을 수행하였다. 5개의 선택적 프라이머 조합에 의해 검출된 집단별 유효 밴드의 수는 345~374개였으며, 다형성 밴드 수는 55 (15.0%)~131 (24.9%)개였다. 평균 유전적 다양성은 낙동강 집단이 가장 높은 값을 보였고 한강 집단이 가장 낮은 값을 보였다. 계통도 상에서 각 수계별로 채집된 개체는 각 집단별로 함께 분기하였으며, 이들은 높은 bootstrap 값으로 지지되는 2개의 단계통군 또는 집단 그룹으로 나누어졌다. 한편 유전적 분화도( $F_{ST}$ )는 모든 집단 간에 유의적 차이를 보였다( $P < 0.01$ ). 집단 그룹 간의 유전적 변이 수준을 알아보기 위해 AMOVA 분석을 실시한 결과 총 25.49%의 변이( $P < 0.01$ )을 보여 이들 집단 그룹은 유전적으로 명확히 구분되었다.

## 인 용 문 헌

- 김근식 · 윤영은 · 강연중 · 양상근 · 방인철. 2009. 금강과 만경강에 서식하는 멸종위기 어류 감돌고기 *Pseudopungtungia nigra*의 AFLP에 의한 유전 다양성 및 집단구조 한국어류학회지, 21: 76-80.
- 김동준. 2003. 칼납자루, *Acheilognathus koreensis*와 임실납자루, *A. somjinensis*의 분자계통학적 연구. 순천향대학교 석사학위논문, 48pp.
- 김익수. 1997. 한국동식물도감 제37권 동물편(담수어류). 교육부, 629pp.
- 김익수 · 박종영. 2002. 한국의 민물고기. 교학사, 463pp.
- 변화근 · 김근식 · 송하윤 · 방인철. 2009. 한국산 독종개속 어류 개체군들의 형태 변이 및 AFLP분석을 통한 유전 변이. 한국어류학회지, 21: 67-75.
- 양 현. 2004. 칼납자루 *Acheilognathus koreensis*와 임실납자루 *A. somjinensis*의 생태와 분류. 전북대학교 박사학위 논문, 100pp.
- 鈴木伸洋 · 田祥麟. 1990. 熊川川 水系産 납자루의 個體發生. 한국어류학회지, 2: 77-87.
- 윤영은 · 이일로 · 박상용 · 강연중 · 김응오 · 양상근 · 남윤권 · 방인철. 2009. RAG-1 유전자의 염기서열 분석에 의한 각시붕어 *Rhodeus uyekii*와 떡납줄갱이 *R. notatus* 잡종의 동정. 한국양식학회지, 22: 79-82.
- 이윤아 · 윤영은 · 남윤권 · 방인철. 2008a. AFLP 분석에 의한 어류 치 *Hemibarbus mylodon*의 유전다양성. 한국양식학회지, 21: 196-200.
- 이일로 · 이윤아 · 신현철 · 남윤권 · 김우진 · 방인철. 2008b. AFLP 분석에 의한 멸종위기어류 미호종개, *Iksookimia choii*의 유전 다양성. 한국하천호수학회지, 41: 97-102.
- 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.
- David, L., P. Rajasekaran, J. Fang, J. Hillel and U. Lavi. 2001. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers. Mol. Genet. Genomics, 266: 353-362.
- Excoffier, L., P. Smouse and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131: 479-491.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinform. Online, 1: 47-50.
- Fraser, D.J. and L. Bernatchez. 2001. Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units. Mol. Ecol., 10: 2741-2752.
- Hashiguchi, Y., T. Kado, S. Kimura and H. Tachida. 2006. Comparative phylogeography of two bitterlings, *Tanakia lanceolata* and *T. limbata* (Teleostei, Cyprinidae), in Kyushu and adjacent districts of western Japan, based on mitochondrial DNA analysis. Zool. Sci., 23: 309-322.
- Kawamura, K. and K. Hosoya. 2000. Masculinization mechanism of hybrids in bitterlings (Teleostei, Cyprinidae). J. Hered., 91: 464-473.
- Moritz, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. Syst. Biol., 51: 238-254.
- Okazaki, M., K. Naruse, A. Shima and R. Arai. 2001. Phylogenetic relationships of bitterlings based on mitochondrial 12S ribosomal DNA sequences. J. Fish Biol., 58: 89-106.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.02i. Exeter Software, Setauket, New York.
- Song, J., Z. Song, B. Yue and W. Zheng. 2006. Assessing genetic diversity of wild populations of Prenant's schizothoracin, *Schizothorax prenanti*, using AFLP markers. Environ. Biol. Fish., 77: 79-86.
- Song, H.-Y., K.-Y. Kim, M. Yoon, Y.K. Nam, D.S. Kim and I.-C. Bang. 2010. Genetic variation of *Coreoleuciscus splendidus* populations (Teleostei; Cypriniformes) from four major river

- drainage systems in South Korea as assessed by AFLP markers. *Genes Genomics*. (accepted)
- Vos, P., R. Hodgers, 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.
- Wang, W., L. Chen, P. Yang, L. Hou, C. He, Z. Gu and Z. Liu. 2007. Assessing diversity of populations of topmouth culter (*Culter alburnus*) in China using AFLP markers. *Biochem. Syst. Ecol.*, 35: 662-669.