

# 以微隨體DNA研究粗首鱻 (*Zacco pachycephalus*) 的保育遺傳

## Conservation Genetics of *Zacco pachycephalus* by Microsatellite DNA Locus Analyses

黃美慈<sup>1</sup> 曹先紹<sup>2</sup> 于宏燦<sup>1,\*</sup>

Mei-Tzu Huang<sup>1</sup>, Eric Hsien-Shao Tsao<sup>2</sup> and Hon-Tsen Yu<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>台灣大學生命科學系 台北市羅斯福路四段1號

<sup>2</sup>台北市立動物園 台北市新光路二段30號

<sup>1</sup>Department of Life Science, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

<sup>2</sup>Taipei City Zoo, Taipei, Taiwan

\*通訊作者

\*Corresponding author

### 摘要

粗首鱻是廣泛分布於台灣北部及西半部河川的特有種魚類，東部花東地區原本並沒有分布，現在花東地區溪流內的粗首鱻是人為放流的結果。我們利用8個微隨體基因座(microsatellite loci)，對來自全省不同溪流的粗首鱻族群進行歸類分析(assignment analysis)，可以獲得97%的正確率，顯示不同溪流的粗首鱻間已有一定的分化，並可以微隨體基因座作為分子標記，正確判別出粗首鱻個體的來源溪流。同樣對淡水河三大支流進行歸類，只有81%的正確率，顯示同一溪流中的次族群間遺傳分化不高，或者存在著頻繁的基因交流。以歸類分析追蹤東部的粗首鱻個體來源，發現東部的粗首鱻族群源自北部及中部溪流的多次放流。由粗首鱻的研究結果可知，利用微隨體基因座加上歸類分析方法，可有效地分析出淡水魚個體的可能來源，對保育工作尤其是淡水魚類保育及放流的管理而言，是很有用的工具。

### Abstract

*Zacco pachycephalus* (Günther) is a common minnow endemic to freshwater streams in the northern and western Taiwan, and has been recently introduced to streams in the eastern Taiwan. We applied eight microsatellite DNA loci to make an assignment test to determine the genetic relationships

of its populations among the streams with the success rate of 97%. This suggested that there was significant differentiation in the populations among the streams. When the assignment test was applied to individual fish from three tributaries of the Tamshui River, the success rate was 81%, indicating a low genetic differentiation among the populations in the same river. When the test was applied to the individual fish from the streams of the eastern Taiwan, it was able to identify their source populations in the northern and western Taiwan. Accordingly, the microsatellite DNA locus analysis is an effective method for determining genetic differentiation of stream fish and also for identifying source populations of introduced populations. The analysis is useful for conservation and management of freshwater fishes.

**關鍵詞：**粗首鱨、歸類分析、保育遺傳學、微隨體DNA

**Key words :** *Zacco pachycephalus*, assignment test, conservation genetics, microsatellite DNA

收件日期：92年7月30日

接受日期：92年12月2日

Received: July 30, 2003

Accepted: December 2, 2003

## 緒 言

溪哥是鯉科(Cyprinidae)鱨屬(*Zacco*)魚類的俗名，在台灣有兩個種：粗首鱨(*Zacco pachycephalus*)及平頷鱨(*Zacco platypus*)。粗首鱨為台灣特有種，分布在台灣西部海拔1,200m以下的淡水溪流，原本並未分布在台灣東部的溪流，然而近年來在東部溪流也發現粗首鱨的行蹤。平頷鱨廣泛分布於東亞沿海中海拔河段，包括中國大陸、日本及韓國，在台灣則侷限在北部的溪流(Wang *et al.* 1997; Wang *et al.* 1999)。粗首鱨與平頷鱨的外型極為相似，皆為流線形的體型，體長為10-20 cm(最大可達30 cm)，體側有約10條的橫帶，成熟雄魚體色會轉為泛紅，臀鰭變長延伸至尾鰭基部，嘴部出現追星。這兩種溪哥主要的不同點在於嘴裂的深度，粗首鱨嘴裂深度可達眼睛中線至眼睛後緣，平頷鱨嘴裂較淺，僅達眼睛前緣至1/3左右。由於兩種

魚外型相似，在台灣統稱為溪哥。外表形態雖然相似，但粗首鱨和平頷鱨在淡水河及雙溪共域，卻沒有見到大量的雜交個體，種間應有一定的生殖隔離產生。

粗首鱨以高屏溪為界，可分為兩個形態型，分別稱為粗首鱨北型及粗首鱨南型(馬國欽 私人通訊)，兩型在外表形態上沒有明顯的差別，但在同功異構酶(allozyme)上有顯著的差異(Wang *et al.* 1999)。平頷鱨依據體側花紋也可分為兩個形態型，分別稱為平頷鱨台灣型及平頷鱨日本型(馬國欽 私人通訊)。平頷鱨台灣型體側花紋為橫帶狀，外表形態類似中國大陸產的平頷鱨；平頷鱨日本型體側花紋呈片狀，與日本及韓國產的平頷鱨外形相似。依據釣魚人士的敘述，平頷鱨日本型最近幾年才出現在淡水河流域，且族群量有漸多的趨勢，顯示平頷鱨日本型個體可能非台灣的原生淡水魚。粒線體D-loop(馬國欽 私人通訊)與微隨體DNA(microsatellite DNA)(黃

2003)的研究也顯示，平頷鱧日本型的基因歧異度較台灣型高，且與日本的平頷鱧有相近的粒線體基因型，因此在台灣的日本型個體可能是日本平頷鱧經人為放流而來。放流行為對淡水魚族群的影響很大，淡水魚族群由於基因交流較少，多半呈現族群內基因歧異度不高但族群間分化程度甚高的狀況(Angers and Bernatchez 1998; Hedrick *et al.* 2001)，放流行為相當於人為加入外來族群個體，增加基因交流的頻率，對淡水魚族群的自然遺傳組成及結構會造成嚴重的影響。近年來，原本無溪哥分布的台灣東部溪流出現族群量不低的粗首鱧族群，即為放流影響族群分布的明顯例證，而平頷鱧日本型的出現及擴張也顯示了外來族群對原生族群的影響。放流行為的掌控及限制是必須的，要做好放流行為的管控，必須能鑑定出外來的個體，並釐清個體的來源。

歸類分析(assignment test)可依據多個基因座(loci)的資料，計算個體來自不同族群的或然率，將個體歸類至可能的來源族群中。歸類分析廣泛的應用在族群遺傳研究、自然資源管理、保育遺傳研究以及法醫鑑定各方面(Davies *et al.* 1999; Eldridge *et al.* 2001; Roques *et al.* 1999)。常用的歸類分析方法包括貝氏分布方法(Bayesian method)、頻率決定方法(frequency method)及遺傳距離決定方法(distance method) (Cornuet *et al.* 1999; Rannala and Mountain 1997)。多型性越高的分子標記，能夠提供越高的解析力，常用來進行歸類分析的分子資料有同功異構酶、RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RAPD (random amplified polymorphic DNA)及微隨體DNA (Davies *et al.* 1999)。

微隨體(microsatellite)是基因體中常見的片段，由1-6 bp大小的重複單元重複5-100次組成，由真菌到脊椎動物，幾乎所有生物的基因體內皆有微隨體DNA的出現。微隨體在

基因體中的含量豐富，變異性高，屬於共顯性遺傳且多為中性演化，這些特點使它成為族群遺傳、遺傳疾病、親屬關係鑑定等研究的重要工具(Goldstein and Schlotterer 2000)。一般作為分子標記的微隨體序列包含兩個部分：重複序列(repeat sequences)以及兩端非重複的序列(flanking regions)。由基因體中選殖出微隨體基因座後，自兩端非重複序列部分設計適當的引子，即可利用這些引子自基因體中以PCR技術放大出微隨體基因，並判讀個體的基因型。一個個體的基因型包含兩個對偶子，且不同對偶子間的差異主要是來自重複次數的不同，因此取PCR產物進行電泳分離即可判讀出個體的基因型。

微隨體DNA多型性很高，能作到個體層次的判別(Waits *et al.* 2001)，因此本研究利用微隨體基因座的資料，對不同族群的粗首鱧個體進行歸類分析，檢驗不同溪流中個體的基因差異程度，並建立一套有效的方法，對未知來源的個體加以鑑定。

## 材料與方法

### 一、樣本採集

以垂釣的方式在全省各地12個流域共採得302條粗首鱧(表1)，採得之魚體在解剖後立即取下內臟及肌肉組織，置於液態氮中保存，或者置於70%酒精中收藏於-20°C。由於我們詳細分析淡水河三條支流新店溪、基隆河和大漢溪的族群，所以大多數的樣本來自這三條河流，在其餘的河川進行代表性的採樣，而不一一分析流域內的細節。

### 二、DNA的萃取

取30 mg的保存於低溫酒精中的組織，剪碎放進1.5 ml的離心管中，以1 ml的STE buffer洗三次後加入150  $\mu$ l的lysis buffer及300  $\mu$ g的proteinase K，55°C水浴兩小時以

表1. 採樣地點和樣本數

Table 1. Sampling localities and sample sizes

Drainage & abbreviation	River or locality	Sample size
Tamsui River (TS)	Luofu Bridge (Shihmen Reservior)	6
	Pinglin	2
	Jinggualiao River	4
	Gupoliao River	3
	Sanshuitan	7
	Kuolai	13
	Wulai	11
	Xinxian	3
	Tonghou River (upper reach)	13
	Tonghou River (lower reach)	25
	Zhongyangxincun (down from Bitan)	11
	Bitan (up from Bitan)	13
	Gunagxing (Pingguang River)	14
	Shuangshikou	13
	Badu	1
	Ruifang	9
	Houtong	13
	Dongshige	9
Houlong River (HL)	Sheliaojiao	10
Dadu River (DD)	Puli	10
Putzu River (PZ)	Niuchou River	10
Tzenwen River (TW)	Nanhua Reservoir	6
Kaoping River (KP)	Sandimen	9
	Ailiao River	10
Fangshan River (FS)	Fangshan River	9
Lanyang River (LY)	Lanyang River	10
Hsiukuluan River (SKL)	Chungling Primary School	12
	Zhuoxi	10
Lichia River (LC)	Lichia River	12
Chihpen River (CP)	Chihpen River	12
Taimali River (TML)	Connecting cannel	12
Total		302

上，再加入150  $\mu$ g的RNase A水浴30分鐘，然後以phenol/chloroform的萃取法(Sambrook *et al.* 1989)進行DNA萃取，最後加入1 ml的95%酒精將DNA沉澱出來。沉澱出來的DNA以70%的酒精清洗兩次以去除鹽類，接著以真空離心的方式將酒精抽乾，將得到的DNA沉澱物溶至0.1X TE buffer中，儲藏於-20°C。

### 三、PCR引子

我們自粗首鱧基因體中篩選出的8個微隨體基因座，並設計出引子(黃 2003)。引子的序列及基因座的基本特徵列於表2。

### 四、聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)

以標記有螢光物質FAM, HEX, 或TAMRA的引子進行聚合酶連鎖反應。反應物包括 50-200 ng 樣本 DNA、1X *Tag* polymerase buffer、0.4-1.2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mg)、0.4-0.8  $\mu$ l dNTP (2.5 mM)、0.1-0.3  $\mu$ l primers (10  $\mu$ M)、0.5U *Tag* polymerase (Promega)，補水至總體積為10  $\mu$ l。將反應物放置於溫度控制器(PTC-100, MJ RESERCH)中進行反應，反應流程如下：95°C 5分鐘；95°C 30秒，黏合溫度 30秒，72°C 30-40秒，重複25-30次；72°C 10分鐘。

### 五、基因型判讀

將PCR反應產物置於96孔盤中，以酒精沉澱方式進行純化，純化後的產物加入

**表2.** 八個微隨體基因座的基本資料(Ta:引子的最佳黏合溫度; Ho:異型合子觀測值; He:異型合子期望值)

**Table 2.** General characters of 8 microsatellite loci for *Z. pachycephalus* (Ta: annealing temperature; Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity)

Locus	Repeat motif	Primer sequences	Ta(°C)	Ho	He
Z128A	(GT) <sub>14</sub>	L 5'-TGCCTGATGACTCACTGCTT R 5'-CGTACACCTTCAGCTCTCTGC	64	0.457	0.749
ZD181	(GA) <sub>18</sub>	L 5'-GTCAGTCAGACCCTCACACT R 5'-CATTTTGTGTTGTCACAGTCG	60	0.550	0.753
ZD366	(GT) <sub>5</sub> AT(GT) <sub>8</sub> (GA) <sub>5</sub> (n) <sub>43</sub> (GT) <sub>15</sub>	L 5'-GTTTTTCTAGTCCTCGTTCC R 5'-GCAGTCATGTCATATTTCCG	60	0.778	0.883
ZD992	(CT) <sub>12</sub>	L 5'-CTCGCTCATATTTCTACCCA R 5'-ATTTTCCACAGTTTGTGACGC	60	0.646	0.770
ZD1021	(GT) <sub>15</sub>	L 5'-GATGATGATGGGATAGATGC R 5'-TGGGAATCAAACCTACAGAGC	60	0.553	0.742
ZD582	(GT) <sub>13</sub>	L 5'-ACTTTCTGTGTGTGTATAAATGC R 5'-GTGTTATTGTGCCTTGTGG	60	0.477	0.642
ZD331	(GT) <sub>3</sub> GC(GT) <sub>16</sub> (GA) <sub>7</sub>	L 5'-CAACACAATCACCATCCCCT R 5'-CAACGCATTACAACCTCTCTG	60	0.675	0.827
ZD657	(CA) <sub>6</sub> (TC) <sub>8</sub> (TA) <sub>22</sub>	L 5'-AATGACCTTGGTTGTGTAGC R 5'-AACAGGCATAAAGTGAATAGAGA	60	0.695	0.868

loading solution及ET-400標記(Amersham)作產物分子大小判讀依據，以MegaBASE 500自動定序儀及Genetic profiler 2.0軟體(Amersham)判讀其基因型。每條魚的基因型判讀結果見黃(2003)。自動定序基因型的圖譜存於台大動物所的資料庫中，歡迎有興趣者連絡通訊作者借用參考。

#### 六、哈溫平衡的檢測

若族群中的個體符合自由交配，且族群量夠大，可以忽略選汰壓力及突變的影響時，族群中的基因型頻率會維持一個特定的比例，我們稱這種狀態為哈溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium) (Hartl 2000)。歸類分析方法假設族群處於哈溫平衡狀態。利用GENEPOP程式(Raymond and Rousset 1995) (<http://www.cfe.cnrs-mop.fr/>)，以Fisher's exact test檢測不同的基因座-族群對是否符合哈溫平衡。

#### 七、 $F_{ST}$ 的計算

在本研究中，使用  $F$  statistics (Weir and Cockerham 1984)無偏估值中的 $F_{ST}$ 值作為族群的分化指數。

Weir and Cockerham(1984)提出的無偏估值，是以對偶子頻率求得變方後，再以此變方來估算族群內對偶子的相似度及遺傳結構。將族群內的均方(mean square)期望值分為三個部分：族群間( $\delta^2_P$ )、族群內( $\delta^2_I$ )及對偶子間( $\delta^2_G$ )。而代表不同層次的族群結構係數公式為：

$$F_{IT} = (\delta^2_P + \delta^2_I) / (\delta^2_P + \delta^2_I + \delta^2_G)$$

$$F_{ST} = \delta^2_P / (\delta^2_P + \delta^2_I + \delta^2_G)$$

$$F_{IS} = \delta^2_I / (\delta^2_I + \delta^2_G)$$

$F_{ST}$ 的估算由MSA程式計算，並利用1000次的random permutation進行顯著性的檢定。此檢定將基因型資料作隨機的置換，以模擬無族群分化的狀態，每次的重新置換都可求出新的

$F_{ST}$ 值，將此數值與觀測值作比對，計算模擬數值大於或等於觀測值的比例，即為支持族群無分化假說的比例。

#### 八、歸類分析

利用電腦軟體GENECLASS (Cornuet *et al.* 1999)，以Bayesian方法進行歸類分析(Rannala and Mountain 1997)。過去的研究顯示，Bayesian method的正確率是所有歸類分析方法中最高的(Cornuet *et al.* 1999)，且族群的分化程度越高( $F_{ST}$ 值越大)，歸類的正確率會越高，若要分析 $F_{ST}$ 值大於0.3的族群，只需使用5個基因座及各族群10個樣本，即可達到將近100%的正確率(Cornuet *et al.* 1999)。Bayesian方法假設族群符合哈溫平衡，且基因座間處於連鎖平衡，此時在j基因座中基因型k/k'出現的機率在族群i的機率會等於

$$[(n_{ijk}+1)/(K_j+1)][(n_{ijk}+1)/K_j]/(n_{ij}+2)(n_{ij}+1) ;$$

若k=k' (即同型合子的情況)

$$2[(n_{ijk}+1)/K_j] [(n_{ijk}+1)/K_j]/(n_{ij}+2)(n_{ij}+1) ;$$

若k ≠ k' (即異型合子的情況)

$n_{ijk}$ 及 $n_{ijk}$ ：在族群i中，基因座j對偶子k及k'的個數

$n_{ij}$ ：在族群i中，基因座j所含對偶子總和，族群數為n者，其 $n_{ij}$ 為2n

$K_j$ ：在所有族群中，基因座j所含對偶子之種類

利用上列式子估算出個體出現於某族群的機率之後，以兩個方式判定個體可能的來源族群：(一)直接歸類。認定或然率最高的族群為個體的來源族群。(二)排除式歸類。以模擬1000次的方式檢驗個體來自某一族群的可能性，個體若是出現在此族群的可能性小於顯著水準，就代表該族群不可能是個體的來源族群。以此方式排除不可能的族群，未排除之族群即為可能的來源族群。因此個體可被歸類至不只一個族群，也可能無法歸類為任一族群。此方式旨在免除第二類的錯誤，採用的顯著水



表4. 歸類分析結果 (族群代號如表1)

**Table 4.** Results of the assignment tests for *Z. pachycephalus* (population abbreviations are the same as in Table 1)

(a) 全省12個族群的歸類分析結果(表內數字代表個體數)

(a) Self-classification of individuals in 12 populations (number of individuals)

		Original population											
		TS	HL	DD	PZ	TW	KP	FS	LY	SKL	LC	CP	TML
Reference population	TS	166											
	HL		10	1									
	DD	1		8									
	PZ				10								
	TW			1		6							
	KP						19						
	FS							9					
	LY								10				
	SKL	2								22			
	LC	1									11		1
	CP											12	
	TML										1		11

(b) 淡水河三大支流的歸類分析結果

(b) Self-classification of individuals in 3 tributaries of Tamsui River

		Original population		
		DH	HT	KL
Reference population	DH	4	10	1
	HT	2	111	8
	KL		11	23

(c) 東部族群個體歸類至西部族群的分析結果

(c) The individuals in eastern populations assigned to other populations

		Original population			
		SKL	LC	CP	TML
Reference population	TS	13	1	1	
	HL	2			
	DD	5	10	10	10
	PZ				2
	TW				
	KP				
	FS				
	LY	2	1	1	

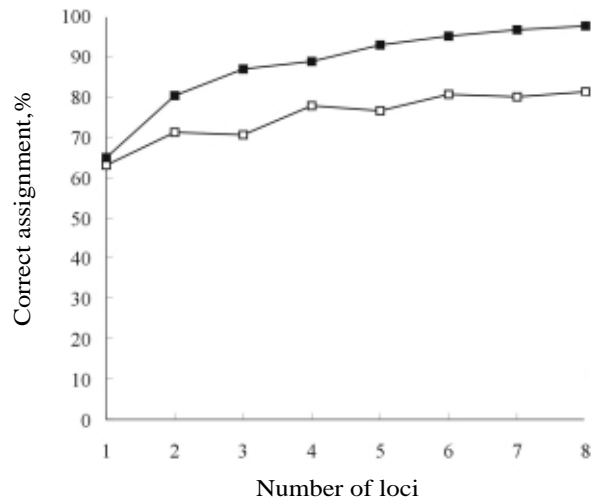


圖1. 歸類分析的正確率與所使用微隨體基因座數目的關係。

Fig. 1. Relationships between the percent correct assignment and number of loci for 12 drainages (solid squares) and the Tamsui River (open squares) of Taiwan.

及曾文溪；還有1個來自於利嘉溪被誤歸為太麻里溪，以及1個來自太麻里溪誤歸為利嘉溪。

(二) 淡水河三大支流：對淡水河的粗首鱘作歸類分析，結果如表4(b)。共170個個體中，有32個個體被誤歸，正確率為81%。大漢溪6個個體中有2個個體被誤歸至新店溪；新店溪132個個體中有10個被誤歸至大漢溪，11個被誤歸至基隆河；基隆河32個個體中，有8個被誤歸至新店溪，1個被誤歸至大漢溪。

### 五、排除式歸類

(一) 全省12個粗首鱘族群：以模擬的方式模擬個體可能出現在不同族群內的機率，並以5%的顯著水準作檢驗。在5%的顯著水準之下，個體可被正確歸類回來源族群(出現於其他族群的可能性均小於顯著水準者)的比例為62.9%。

(二) 淡水河三大支流：以模擬方式進行分析，在5%的顯著水準之下，個體可正確歸類回來源族群的比例為11.2%。大部分的個體都被歸類至兩個以上的族群，且以直接歸類方式進行歸類，正確率也在90%以下，故使用這8個微隨體基因座，無法對淡水河不同支流中的個體作正確歸類。

### 六、東部族群的來源

東部族群係人工放流而來，以直接歸類法分析東部溪流中溪哥可能的放流來源。分析結果如表4(c)。秀姑巒溪的22個粗首鱘樣本有13個可歸類至淡水河，5個個體可歸類至大肚溪，另外2個個體歸類至後龍溪，2個個體歸類至蘭陽溪。利嘉溪和知本溪的12個個體中，各有10個個體可歸類至大肚溪，1個個體歸類至淡水河，還有1個個體歸類至蘭陽溪。太麻里溪12個個體中，有10個個體可歸類至大肚溪，另外2個個體歸類至朴子溪。

## 討 論

歸類分析的正確率與所使用的基因座數目及族群間的分化程度相關，所使用的基因座數目越多，族群間的分化程度越高，歸類分析的正確率越高。以8個微隨體基因座對全省分布的粗首鱨進行分析，歸類的正確率高達97%，顯示粗首鱨以流域為界，微隨體基因型有明顯的區分，不同溪流族群間已有一定的分化，利用8個微隨體基因座，即可有效的分辨個體來自哪一個溪流。以同樣的方式分析淡水河流域中三大支流中的粗首鱨個體，正確率只有81%。此現象可能因為三支流間分隔產生的時間不長，或者是基因交流頻繁所導致。由於新店溪、基隆河及大漢溪在下游的匯流處，因鹽度過高及污染因素，並沒有粗首鱨的分布(馬國欽 私人通訊)，這三個支流間若有基因交流頻繁的現象，可能是洪水將個體帶到匯流處，或者是頻繁的人為放流所導致。

利用微隨體基因型判讀加上歸類分析方法，我們可以有效的判別未知個體的來源，研究族群間基因交流的概況，並推測外來個體的可能起源。東部的粗首鱨族群是近年來才出現的，針對東部的粗首鱨個體進行歸類分析，追溯其可能的來源。分析結果顯示，放流來源主要是淡水河及大肚溪，但也有些個體來自北部及中部其他的溪流。由此推測，東部的粗首鱨族群可能是多次放流的結果。值得注意的是，並沒有任何個體被歸類至南部的高屏溪及枋山溪族群，東部溪流的放流來源來自北部和中部，皆屬於粗首鱨北型。

以高變異度的分子標記加上歸類分析方法，可以有效的鑑定出個體的來源，操作容易且準確性高。除了可鑑定外來個體的來源外，在漁業資源管理上，可利用歸類分析方法，鑑定所捕獲魚隻的來源地，以掌控不同

魚群(stock)的資源概況(Roques *et al.* 1999)，野生動物資源也可利用類似的方式進行管理。而在保育遺傳研究方面，也可利用歸類分析方法，研究族群間的相互遷移行為，評估外來個體侵入造成的影響(Davies *et al.* 1999; Eldridge *et al.* 2001)，以對不同族群間的人為放流行為作適當的管理與限制。

然而歸類分析的前提是必須有原始族群基因頻率的基礎資料，故我們建議對台灣境內淡水魚類建立基本的遺傳資料是目前保育遺傳措施的第一要務。

## 謝 誌

本研究承蒙農委會補助方得以進行，馬國欽協助採樣及DNA之萃取等，特予感謝。

## 引用文獻

- 黃美慈。2003。台灣溪哥的族群遺傳研究-微隨體基因座的應用。國立台灣大學動物學研究所碩士論文。
- Angers, B., and L. Bernatchez. 1998. Combined use of SMM and non-SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellite. *Molecular Biology and Evolution* 15: 143-159.
- Cornuet, J. M., S. Piry, G. Luikart, A. Estoup, and M. Solignac. 1999. New method employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153: 1989-2000.
- Davies, N., F. X. Villablanca, and G. K. Roderick. 1999. Determining the source of individuals: Multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *Trends*

- in *Ecology and Evolution* 14: 17-21.
- Eldridge, M. D. B., J. E. Kinnear, and M. L. Onus. 2001. Source population of dispersing rock-wallabies (*Petrogala lateralis*) identified by assignment tests on multilocus genotypic data. *Molecular Ecology* 10: 2867-2876.
- Goldstein, D. B., and C. Schlotterer. 2000. *Microsatellite: Evolution and applications*, 2 edn. Oxford University Press, New York.
- Hedrick, P. W., K. M. Parker, and R. N. Lee. 2001. Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered Sonoran topminnow. *Molecular Ecology* 10: 1399-1412.
- Hartl, D. L. 2000. *A primer of population genetics*, 3 edn. Sinauer Associates, Ins., Sunderland.
- Rannala, B., and J. L. Mountain. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 9197-9221.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): A population genetics software for exact test ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Roques, S., P. Duchesne, and L. Bernatchez. 1999. Potential of microsatellites for individual assignment: The North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case study. *Molecular Ecology* 8: 1703-1717.
- Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory, New York.
- Waits, L. P., G. Luikart, and P. Taberlet. 2001. Estimate the probability of identity among genotypes in natural populations: Cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10: 249-256.
- Wang, H. Y., S. C. Lee, and M. J. Yu. 1997. Genetic evidence to clarify the systematic status of the genera *Zacco* and *Candidia* (Cypriniforms: Cyprinidae). *Zoological Studies* 36: 170-177.
- Wang, H. Y., M. P. Tsai, M. J. Yu, and S. C. Lee. 1999. Influence of glaciation on divergence patterns of the endemic minnow, *Zacco pachycephalus*, in Taiwan. *Molecular Ecology* 8: 1879-1888.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.