

PCR-RFLP에 의한 제주 재래마 미토콘드리아 cytochrome *b* 유전자의 유전적 다형현상

한상현, 정용환, 오유성, 오문유

제주대학교 생물학과

Genetic Polymorphism of Mitochondrial Cytochrome *b* Gene in Jeju Native Horses Inferred from PCR-RFLP

Sang Hyun Han, Yong Hwan Jung, You Sung Oh, and Moon You Oh
Department of Biology, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract

We analyzed the mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome *b* (*CytB*) gene in Jeju native horses using polymerase chain reaction (PCR) mediated restriction fragment length polymorphism (RFLP). To acquire the complete sequences for the mtDNA *CytB*, we designed two primers based on those of previously reported mitochondrion genome of *E. caballus*. The amplified PCR products were digested with 7 restriction enzymes (*Bam*H I, *Hae*III, *Hind*II, *Msp*I, *Rsa*I, *Pst*I and *Taq*I). We found two polymorphic patterns digested by *Msp*I and *Rsa*I, respectively, and the frequencies showed different between two populations of Jeju native horses. The morphs of the *CytB* in Jeju native horses divided into three types. This result showed similar to the previous molecular reports, but the frequencies of variations and the polymorphic positions were different. These results showed that PCR-RFLP of the mtDNA *CytB* is useful for detecting polymorphism and verifying the lineage of Jeju native horses.

Key words: Jeju native horse, mtDNA *CytB*, polymorphism, RFLP

서론

기제목 (Perissodactyla)에는 현재 말과 (Equidae), 테이퍼과 (Tapiridae), 코뿔소과 (Rhinocerotidae)가 알려져 있다. 말 (*Equus caballus*)의 진화과정은 매우 복잡하고 다양하지만, 가축으로서의 이동과 진화의 추적은 인류사에 대한 연구와 더불어 활발히 진행되어 왔으며, 목 (order) 이하 과 (family), 속 (genus) 및 계통간의 유연관계의 정립을 위한 분자유전학 연구도 상당한 수준에 이르고 있다 (Irwin *et al.*, 1991; Xu and Arnason, 1994; Ishida *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996a, b).

미토콘드리아는 에너지 생합성을 담당하며, 포유류의 경우 약 16 kb 정도의 genome을 가지고 있다. 환상 이중나선구조인 미토콘드리아 DNA (mtDNA)는 미토콘드리아의 전자전달계에 관여하는 13 개의 polypeptide와 22 개의 tRNA, 2 개의 미토콘드리아 리보솜 RNA (rRNA)를 암호화하고 있다. 세포분열과는 별도로 자가복제하는 미토콘드리아는 하나의 세포 내에 수십에서 많게는 수 만개가 존재한다. 특히, 핵 DNA에 비해 염기치환에 의한 진화속도가 5-10 배정도 빠르고, 종 내에서 연속적인 변이가 나타난다는 면에서 진화 및 분자유전학 분야의 연구에 널리 이용되고 있다. 또한 핵 DNA가 Mendel의 유전방식을 따르는 것과는 달리, mtDNA는 모계유전을 한다는 특성이 보고되어 인류를 비롯한 많은 포유동물의 연구에 이용되고 있다 (Brown *et al.*, 1979; Brown, 1980; Anderson *et al.*, 1981; Cann and Wilson, 1983). mtDNA 중에서 cytochrome *b* (*CytB*) 유전자는 미토콘드리아 genome의 tRNA-Glu 과 tRNA-Thr 사이에 위치하고, 포유류에서 1,140 bp로 나타내며 총 389개의 아미노산 잔기로 이루어진 polypeptide를 암호화하고 있다. Cytochrome *b*는 미토콘드리아를 갖는 모든 생물에 존재하며, 보존적 서열의 존재도 확인되고 있다 (George, 1982; Howell and Gilvert,

1988; Finnerty and Block, 1995). 또한 mtDNA *CytB*에 대한 연구는 무척추동물에서 고등 포유류까지 광범위하게 연구되어 종간, 종내에서의 유전자 다양성 (gene diversity)을 이용하여 이들의 유연관계 및 진화를 추론하는 좋은 자료로 이용되고 있다 (Brown *et al.*, 1982; Palma and Spotorno, 1999; Lee *et al.*, 2000).

일반적으로 제주재래마는 몽골마를 기원으로 하는 것으로 추측되어지고 있다. 하지만 Hayashida (1958)는 일본과 인근의 재래마들이 두 개의 조상형을 가지며, 제주마는 일본 남부의 소형마와 유사하다고 보고하였다. 한편, 모색을 조절하는 유전자와 면역글로빈 유전자들의 다형연구를 통해 제주마가 중형마에 속하는 태국과 필리핀 재래마들과 매우 유사하다는 의견도 제시하였고 (Nozawa and Kondo, 1970), 체형을 척도로 제시한 연구에서는 *Equus* 속에서 몽골 야생마인 *E. przewalskii*와 가장 근연이라고 보고하였다 (Nozawa, 1971).

제주재래마에 대한 분자유전학 및 진화에 대한 연구는 동위효소 분석과 ϵ -globin 유전자의 분석, mtDNA genome에 대한 RFLP와 mtDNA D-loop 영역에 대한 SSCP, *CytB*에 대한 PCR-RFLP, DNA sequencing 등 다방면에서 보고되어 왔다 (Oh *et al.*, 1994, 1997; Ishida *et al.*, 1996; Kim, 1996; Oh and Jung, 2001). Kim (1996)은 ϵ -globin 염기서열 분석에서 제주재래마는 몽골야생마 (*E. przewalskii*)와 중국 유남성재래마와 유사하다고 보고하였다. MtDNA RFLP에서 Oh 등 (1994, 1997)은 제주재래마가 몽골야생마 (*E. przewalskii*)와 가장 근연이면서 두 가지 mtDNA 유형으로 구분되며, 인근 다른 지역의 말들과의 교잡과 이주의 가능성을 시사해주고 있다. 또한 D-loop에 대한 SSCP 분석에서는 쓰시마재래마와 제주재래마가 각각 둘 또는 셋으로 구분되며, 두 집단에서 가장 빈번하게 나타나는 유형들은 서로 구분된다고 보고하였다 (Oh and Jung, 2001). 한편, mtDNA *CytB*의 일부를 PCR로 증폭하여

RFLP 분석한 결과 3 가지 제한효소 인지부위에서의 다형현상을 근거로 mtDNA 분자를 4 유형으로 구분하였고, 여기서 제주재래마 집단 1 개체에서만 호마 (thoroughbred horse), 일본 재래마 3 집단, 몽골 야생마 등에서는 나타나지 않은 특이한 mtDNA 유형으로 구분되기도 하였다 (Ishida *et al.*, 1996).

하지만 아직까지도 제주재래마의 기원을 확실하게 입증할 수 있는 분자유전학 연구는 기초단계에 머물러 있는 실정이며, 제주마의 혈통정립에 필요한 유전자 수준의 표지인자 역시 마련되지 않고 있다. 더욱이, 현재 아시아 여러 지역에 흩어져 있는 재래마 집단 사이의 진화유전학적 역사에 대한 해석에 필요한 체계적이고 종합적인 비교분석도 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 mtDNA cytochrome *b* 유전자에 대한 제한효소 절편 길이의 다형현상의 분석을 통하여 제주재래마에 대한 유전적 표지인자를 찾고, 이를 기반으로 제주재래마의 유전양상의 진단과 현재까지 많은 논란의 여지를 안고 있는 제주재래마의 진화유전학 연구에 일조하고자 시행하였다.

재료 및 방법

혈액 채취 및 total genomic DNA의 분리

연구에 사용된 재료는 모계 유연관계를 알 수 없는 개체들을 무작위적으로 선정하고 경정맥에서 혈액을 채혈하여 사용하였다.

Total genomic DNA는 Standard method (Sambrook *et al.*, 1989)를 이용하여 buffy coat로부터 chromosomal DNA와 mtDNA를 함께 분리하였다. DNA 농도는 20 ~ 80 ng/ μ l 되게 하였고, 정제한 DNA를 다시 증류수로 10 배 희석하여 그 중 1 μ l를 PCR 반응을 위한 주형으로 사용하였다.

PCR을 이용한 *CytB*의 증폭

Total genomic DNA를 주형으로 PCR 방법

을 통하여 mtDNA *CytB*를 증폭하였다. *CytB* 전체 염기서열을 PCR반응으로 증폭하기 위해서 *E. caballus* 미토콘드리아 genome의 전체 염기서열 (Xu and Arnason, 1994; GenBank Accession NC_001640)을 바탕으로 하여 두 개의 oligonucleotide primer Cyt-H (5' -CATCGTTGTATTTCAACTATAAG-3')와 Cyt-L (5' -GGTTTACAAGACCAGGGTAATGTG-3')을 고안하였다. PCR 반응액은 멸균된 3차 증류수 30.5 μ l, 5 μ l의 10 \times PCR reaction buffer, 4 μ l dNTP 혼합액 (최종 농도 200 μ M)에 2.5 units의 *Taq* DNA polymerase (Promega, USA), 각각 3 μ l의 primer (100 nM)와 total genomic DNA를 2 μ l 첨가하여 반응하였다. 증폭은 GeneAmp PCR system 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer, USA)를 이용하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 최초 변성시킨 후, 94 $^{\circ}$ C-30초, 55 $^{\circ}$ C-30초, 72 $^{\circ}$ C-90초로 이어지는 cycle을 35회 반복 수행하고, 최종 cycle에서는 primer 신장을 위해 마지막에 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 유지하였다. 증폭된 산물은 4 μ l를 ethidium bromide (EtBr)가 포함된 1.2% agarose gel 상에서 전기영동 확인하였다. 확인된 PCR 산물은 low-melting point agarose (Sigma, USA) gel을 사용하여 페놀 추출과 에탄올 침전 과정을 거쳐 회수하였다.

제한효소 처리

MtDNA *CytB*의 다형성을 찾기 위해서 제한효소의 인지부위를 비교하였다. 증폭한 PCR 산물을 4 염기서열을 인지하는 *Hae*III, *Msp*I, *Rsa*I, *Taq*I 등과 6 염기서열을 인지하는 제한효소 *Bam*HI, *Hind*II, *Pst*I 등, 총 7 종의 제한효소를 처리하였다. 각각의 제한효소 처리는 공급자의 안내서를 따랐으며, 최소 16시간씩 반응시켰다. 제한효소로 절단한 DNA는 2% SeaKem agarose (Sigma, USA) gel 상에서 전기영동한 후, UV-transilluminator 상에서 확인하고 사진촬영 하였다.

1	<u>CATCGTTGTATTTC</u> AACTATAAGAACACCAATBACAAACATCCGGAAATCTCACCCACTAATTAATAATCATCAATCACTCTTTTATTGACCTACCAGCCC	100
	primer Cyt-H <u>MspI</u>	
101	CCTCAAAACATTTTCATCATGATGAAACTTCGGCTCCCTCTAGGAATCTGCCTAATCCTCAAATCTTAACAGGCCTATTCTAGCCATACACTACACATC	200
	<u>HaeIII</u>	
201	AGACACGACAACTGCCTTCTCATCCGTCACACTCAGTCCGAGAGCTTAACTACGGATGAATTATTGCTACCTCCATGCCAACGGAGCATCAATATTT	300
	<u>HindII</u>	
301	TTTATCTGCCTTCTCAITTCACGTAGGACGCGCCTCTACTACGCTCTTACACATTCTAGAGACATGAAACATTGGAATCATCCTACTTTTCACAGTTA	400
	<u>HaeIII</u>	
401	TAGCTACAGCAITTCATGGCTATGTCCTACCATGAGGCCAAATATCCTTTTGGAGGACCAACAGTCATCAGCAACCTCCTATCAGCAATTCCCTACATCGG	500
	<u>HaeIII</u>	
501	<u>TACTACCTCGTCGAGTGAATCTGAGGTGATTCTCAGTAGACAAGCCACCTTACCCGATTTTTTGCTTCCACTTCATCCTACCTTCATCATCACA</u>	600
	<u>RsaI</u> <u>TaqI</u>	
601	GCCCTGGTAGTCGTACATTACTATTCTTTCACGAAACAGGATCTAATAACCCCTCAGGAATCCCATCCGATATGGACAAAAATCCCATCCACCCATATT	700
	<u>RsaI</u>	
701	ATACAATTAAGACATCCTAGGACTCCTCCTCTGATCTTGCTCTACTAACTCTAGTATTATTCTCCCCGACCTCCTAGGAGACCCAGACAACACTACAC	800
801	CCCAGCTAACCTCTCAGCACTCCCCCTCATATTAACCAGAAATGGTACTTCCTGTTTGCCTACGCCATCCTACGCTCCATTOCCAACAACACTAGGCGGC	900
	<u>RsaI</u>	
901	GTATTAGCCCTAATCCTCTCCATCCTGATCCTAGCACTCATCCCCACCTCCACATATCAAACAACGAAGCATAATATCCGGCTCTCAGCCAAATGCG	1000
	<u>MspI</u> <u>HaeIII</u>	
1001	TATTCTGACTCTTAGTGGCAGACTTACTGACACTAACATGAATCGGCGGACBCCAGTGGAAACACCCATACGTAATTAATCCGCCAACTGGCCTCAATCCT	1100
	<u>HaeIII</u> <u>HaeIII</u>	
1101	CTACTTCTCCCTAATCTCATTTTTATACCCTCGCAAGCACCATCGAAAAACAATCTTCTAAAATGAAAGTCCCTGTAGTATATCGCACATTACCCTGG	1200
	<u>TaqI</u> primer Cyt-L	
1201	<u>TCTTGTAAACC</u>	

Figure 1. Nucleotide sequences of the mtDNA *CytB* and each partial sequences of tRNA-Glu and tRNA-Thr gene of *E. caballus* (NC_001640). Restriction sites of five enzymes and PCR primers indicate as under-lined sequences, respectively. The gray-boxed sequences are boundaries of the *CytB*. The nucleotide sequences were displayed from 5' to 3'.

제한효소 지도 작성 및 RFLP 분석

MtDNA *CytB*에 대한 제한효소 지도의 작성은 PCR 산물에 대한 제한효소 처리 결과 인지부위를 갖는 것으로 확인되는 제한효소들을 이용하여 기존에 보고된 thoroughbred horse의 미토콘드리아 genome의 *CytB* 염기서열 (Xu and Arnason, 1994)을 기준으로 작성하였다 (Fig. 1). 또한 mtDNA *CytB*에 대한 PCR-RFLP 양상에 대한 분석을 위한 morph type 결정 역시 thoroughbred horse의 *CytB*에 대한 제한효소 절편 양상을 기준으로 사용하였다. 각각의 제한효소에 절편 양상에서 morph type I은 기준 염기서열에 대한 절편 양상과 같은 것으로 설정하였고, 이와 다른 양상을 변이형으로 간주하였다.

결과 및 고찰

제주재래마의 total genomic DNA를 주형으로 mtDNA *CytB*를 PCR로 증폭한 결과 약 1.2 kb의 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 제한효소는 *E. caballus*에 대한 연구보고에서 다형현상을 나타낸 것들을 중심으로 하였으며, 이들 중 primer의 증폭 영역에 해당하는 tRNA-Glu와 tRNA-Thr 유전자 서열상에서 인지부위를 갖지 않는 것들로 선정하였다. 연구에 이용된 제한효소 7종 중 *HaeIII*, *MspI*, *RsaI*, *TaqI*, *HindII*는 인지부위를 갖는 반면, *BamHI*와 *PstI*는 인지부위가 없는 것으로 확인되었다. 인지부위를 갖는 제한효소들 중에서 6염기를 인지

하는 제한효소에서는 다형성이 발견되지 않은 반면, 4 염기를 인지하는 제한효소들은 모두 인지부위를 가지고 있었으며, *Msp* I (C/CGG)과 *Rsa* I (GT/AC)로 절단한 경우에서 절편 길이의 다형현상이 관찰되었다 (Table 1, Fig. 2). *Msp* I에 의해 생성된 절편은 두 가지의 유형으로 구분되었다. 이 중 *Msp* I-type I은 전체의 95%에서 42, 230, 939 bp의 밴드를 나타내었고, *Msp* I-type II는 5%의 개체에서 42, 129, 230, 810 bp의 밴드를 나타내었다 (Fig. 2a, Table 2). *Rsa* I-type I은 88.2%에서 네 개의 밴드가 나타나며, *Rsa* I-type II는 세 개의 밴드가 관찰되었다. *Msp* I morph의 경우 939 bp의 절편이 다시 129 bp의 절편과 810 bp의 절편으로

나누어진 것이며, *Rsa* I morph의 경우는 597 bp의 절편 내에 인지부위를 갖지 않는 경우와 절편 내에 인지부위를 갖기 때문에 233 bp와 364 bp로 제한절단된 것으로 확인되었다 (Fig. 2b, Table 2). 전체적으로 보면, 74 개체의 제주재래마 집단에서 mtDNA *CytB*에 대한 *Msp* I과 *Rsa* I 인지부위의 다형성의 유형은 대부분 thoroughbred horse와 같은 양상인 type I이 대부분이었고, 변이형을 나타내는 개체는 8.9%에 해당되었다. 두 효소 모두에 대해 다형성을 나타내는 개체는 관찰되지 않았다 (Table 2). 이로써 제주재래마 집단을 본 연구에 이용된 제한효소만을 기준으로 구분할 경우, 각각의 효소에 대한 변이형과 두 효소에 대해 모두 변

Table 1. The number and the length of fragments of mtDNA *CytB* in two populations of Jeju native horses

Restriction enzymes	Morph	Fragments number	Length of digested fragment ^a (bp)	Recognized sequences
<i>Hind</i> II	I ^b	2	249, 962	gty/rac
<i>Hae</i> III	I	7	8, 98, 105, 121, 159, 173, 547	gg/cc
<i>Msp</i> I	I	3	42, 230, 939	c/cgg
	II	4	42, 129, 230, 810	
<i>Rsa</i> I	I	4	113, 233, 364, 501	gt/ac
	II	3	113, 501, 597	
<i>Taq</i> I	I	3	66, 512, 623	t/cga

^a Calculated using NC_001640, ^b morph I is determined by restriction patterns of NC_001640.

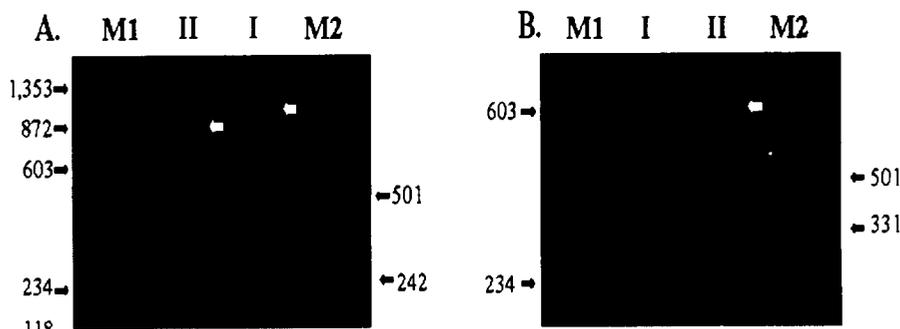


Figure 2. Two polymorphic band patterns found in PCR-RFLP in mtDNA *CytB* of Cheju native horses. RFLP patterns digested with *Msp* I (A) and with *Rsa* I (B). White arrows indicate the heteroplasmic bands. M1 and M2 are DNA size marker, Φ X174/*Hae*III digest and pUC19/*Msp*I digest, respectively.

이를 나타내지 않은 세 가지 유형으로 구분할 수 있을 것이다. 또한, 제주재래마 두 집단을 비교해볼 때, *Msp* I에 대한 변이형은 집단 2에서 10%로 더 높은 비율로 나타났고, *Rsa* I에서는 집단 1에서 더 높게 나타내었다 (Table 2).

Msp I과 *Rsa* I에 대한 다형성이 같은 비율로 관찰된 것은 이 두 효소의 인지부위에 해당하는 염기서열 내에서의 염기치환의 속도가 거의 유사하다고 할 수 있다. 또한, 각각의 제한효소 인지부위에서 하나의 염기에 대한 염기치환이 일어났다고 할 수 있고, 제한효소에 의한 절편의 밴드 중에서 heteroplasmic 양상의 것도 확인되었다. 이러한 결과들은 제주재래마의 집단 내에서도 현재 체세포 수준에서 변화에 의한 세포 내 mtDNA 분자들이 서로 다른 염기서열을 보유하고 있음을 시사한다. 즉, 세대를 거치는 동안 내부 변화의 과정을 거치고 있다고 할 수 있다.

Ishida 등 (1996)은 일본의 재래마 3 집단과 제주도, 몽골, thoroughbred horse 집단에 대한 *CytB* 유전자의 590 bp 단편에 대한 분석에서 *Aci* I, *Bam* H I, *Rsa* I에 대한 다형현상을 관찰하였고, 여기서 제주재래마 집단의 mtDNA *CytB*를 3 가지로 구분하였다. 하지만, 본 연구의 조사 결과에서 제주재래마의 두 집단에 대한 *Bam* H I 효소에 의한 절편 양상은 확인되지 않았다. 비록, 제주재래마 집단이 세 가지 morph type으로 구분된다는 사실이 Ishida 등 (1996)의 결과와 유사하지만, 변이형이 출현하는 제한

효소의 인지부위와 그 출현 비율에 있어서 상대적으로 현저한 차이를 보이고 있다. *Rsa* I 효소에 대한 다형성은 본 연구에서는 8.9%의 비율로 나타난 반면, Ishida 등 (1996)의 경우, 조사된 전체 140 개체에서 제주재래마 집단의 1 개체와 몽골재래마 집단의 3 개체에서만 관찰되었다. 이와 같이 두 연구 보고가 일치하지 않는 것은 조사 대상인 *CytB*의 증폭한 길이와 표본 선정의 차이에서 기인한 것으로 사료된다. 따라서 이와 같은 연구결과의 차이를 극복하기 위해서는, 보다 광범위한 표본 선정과 분자 수준에서 일관적인 척도를 기준으로 하는 집단유전학적 연구가 필요함을 시사하고 있다. 한편, mtDNA D-loop에 대한 SSCP 분석은 제주재래마의 D-loop이 3 가지 유형으로 구분됨을 보고하였다. SSCP에서 변이형으로 관찰된 D-loop 영역의 염기서열들은 모두 5'영역의 heavy strand replication site에서 해당하는 부위에서 염기치환이 발생한 것으로 확인되었으며 (Oh and Jung, 2000), morph type은 각각 90, 6.7, 3.3%의 비율로 나타나, 본 연구와 변이형의 비율이 유사함을 확인하였다.

본 연구를 통해서 mtDNA *CytB*의 PCR-RFLP 분석에서는 기존에 보고된 연구결과들과는 다소 다른 비율의 다형성을 관찰하였고, 또한 증폭산물 내에서 heteroplasmy 양상이 확인되었다. 이는 mtDNA 분자가 유전적으로 염기치환속도가 핵 DNA에 비해 대단히 빠르다는 면과 일치

Table 2. The polymorphic patterns and their frequencies found in the mtDNA *CytB* in two populations of Jeju native horses

Enzyme	Morphs	Population 1		Population 2		Population1+Population2	
		No. ^c	Frequency ^d (%)	No.	Frequency (%)	No.	Frequency (%)
<i>Msp</i> I	I	38	95	30	88.2	68	91.9
	II	2	5	4	11.8	6	8.1
<i>Rsa</i> I	I	36	90	32	94.1	68	91.9
	II	4	10	2	5.9	6	8.1
total		40		34		74	

^c Number of individuals, ^d percentage to total individuals in each populations.

한다고 할 수 있다. 하지만, 이와 같은 다형성과 heteroplasmy 양상을 정확히 판독하기 위해서는, 이를 뒷받침할 수 있는 mtDNA *CytB*에 대한 염기서열 분석과 분자 내의 이형성을 판정할 수 있는 SSCP, heteroduplex analysis 등의 여러 가지 연구들이 병행되어야 할 것으로 사료된다.

현재까지 제주재래마에 대한 연구보고에서 말의 미토콘드리아 전체 genome의 약 15% 정도에 해당하는 영역에만 중점적인 연구가 이루어졌다. 또한 핵 DNA의 경우, ϵ -globin을 비롯한 소수의 유전자에 대한 연구만이 이루어져 있으며, 이마저 다른 지역의 재래마 집단과의 비교연구는 전무한 실정이다. 또한, 연구에서 제외된 재래마 집단과 아직 정확한 분자생물학적 정보가 전무한 상고시대 말의 잔존에 대한 자료의 보충, 지금까지의 연구보고들에 대한 종합적인 비교분석이 이루어진다면 제주재래마의 기원과 순수 재래마의 혈통 정립에 크게 이바지할 수 있을 것이다. 계속하여, 아시아 인근의 다른 재래마 집단들과 공통된 기준을 바탕으로 한 비교분석이 이루어진다면 공통조상으로부터 현재에 이르는 아시아 재래마에 대한 진화의 역사를 구명할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrel, M.H.L. de Bruijin, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden, and I.G. Young, 1981. Sequence organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, Lond. 290: 457-465.
- Brown, W.M., 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 77: 3605-3609.
- Brown, W.M., J.G. George, and A.C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 76: 1967-1971.
- Brown, W.M., M.Jr. George, and A.C. Wilson, 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239.
- Cann, R.L. and A.C. Wilson, 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics* 104: 699-711.
- Finnerty, J.R. and B.A. Block, 1995. Evolution of cytochrome *b* in the Scombroidei (Teleostei): molecular insights into billfish (Isiophoridae and Xiphiidae) relationship. *Fichery Bulletin* 93: 78-96.
- George, M., 1982. Mitochondrial DNA evolution in old world monkeys. Ph.D. thesis. University of California, Berkely.
- Howell, N. and K. Gilbert, 1988. Mutational analysis of the mouse mitochondrial cytochrome *b* gene. *J. Mol. Biol.* 203: 607-618.
- Hayashida, S., 1958. Systematic studies on the Japanese native horse. *Zootch. Sci.* 36: 233-242.
- Hutchison, C.A., N.E. Newbold, S.S. Potter, and M.H. Edgell, 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251: 536-538.
- Irwin, D.M., T.D. Kocher, and A.C. Wilson, 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144.
- Ishida, N., T. Hasegawa, T. Oyunsuren, and H. Mukoyama, 1996. PCR-RFLP analysis of the cytochrome *b* gene in horse mitochondrial DNA. *Animal Genetics*

- 27: 359-363.
- Kim, G.O., 1996. Phylogenetic relationship in some species of Perissodactyla by epsilon-globin gene analysis and cytochrome-b gene polymorphism in Cheju native horses. Ph.D. thesis. Cheju National University, Jeju, Korea.
- Kim, G.O., S.J. Kim., and M.Y. Oh, 1999. PCR-RFLP of the cytochrome *b* genes in the Cheju native horses. *Korean J. Genetics* 21: 29-34.
- Lee, J.E., S.Y. Yang, and H.Y. Lee, 2000. Genetic relationships among six Korean *Rana* species (Amphibia: Ranidae) based on the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Korean J. Biol. Sci.* 4: 117-121.
- Nozawa, K., 1971. Origin of Japanese native farm animals. *Chem. Biol.* 9: 710-718.
- Nozawa, K. and K. Kondo, 1970. Gene constitution of Cheju native horses and its phylogenetic relationships with Japanese native horses. *SABRAO News Letter*, pp. 7-18.
- Oh, M.Y., M.H. Ko, G.O. Kim, Y.S. Oh, S.J. Kim, and S.S. Hong, 1994. Phylogenetic relationship of Cheju native horses by mitochondrial DNA analysis. *Mol. Cells* 4: 13-20.
- Oh, M.Y., M.H. Ko, G.O. Kim, Y.S. Oh, Y.H. Jung, S.J. Kim, S.S. Hong, and H. Kayano, 1997. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA in Cheju and Tsushima native horses and evolutionary relationships. *Korean J. Anim. Sci.* 39: 327-334.
- Oh, M.Y. and Y.H. Jung, 2001. Mitochondrial DNA polymorphism in Cheju and Tsushima native horses using SSCP analysis. *Korean J. Genetics* 23: 35-43.
- Palma, R.E. and A.E. Spotorno, 1999. Molecular systematics of marsupials based on the rRNA 12S mitochondrial gene: the phylogeny of didelphimorphia and of the living fossil microbiotheriid *Dromiciops gliroides* Thomas. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13: 525-535.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor University Press.
- Xu, X. and U. Arnason, 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* 148: 357-362.
- Xu, X., A. Jankle, and U. Arnason, 1996a. The complete mitochondrial DNA sequence of the greater Indian Rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*, and the phylogenetic relationship among Carnivora, Perissodactyla, and Artiodactyla (+ Cetacea). *Mol. Biol. Evol.* 13: 1167-1173.
- Xu, X., A. Gullberg, and U. Arnason, 1996b. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs. *J. Mol. Evol.* 43: 438-446.