

동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*) 의 CO-I 유전자를 이용한 분자계통학적 연구

방인석¹, 이용석

순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과
¹호서대학교 자연과학대학 생명과학과, 기초과학연구소

Molecular Phylogenetic Study of *Nesiohelix samarangae* Based on CO-I Gene

In Seok Bang¹ and Yong Seok Lee

Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University

¹Department of Biological Science and the Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 336-795

ABSTRACT

Previously, we have reported expressed sequence tags (ESTs) analysis on the land snail, *Nesiohelix samarangae* (Ns). Of these ESTs, we have identified four partial fragments of *N. samarangae* cytochrome oxidase I (NsCO-I) gene which lead to obtain an 852 bp partial cDNA. Since NsCO-I is one of the best-known molecular phylogenetic markers, we have attempted to conduct comparative *in silico* analysis by using the NsCO-I gene. The combined results from BLAST analyses, multiple sequence alignment and molecular phylogenetic study of NsCO-I cDNA indicate that *N. samarangae* has similarity to three land snails such as *Elona quimperiana*, *Euhadra herklotsi* and *Euhadra idzumonis*.

Key words: *Nesiohelix samarangae*, CO-I, Phylogenetic study

서 론

유전적 특성을 이용하여 다양한 종을 명확히 식별하기 위해서는 동정에 사용되는 유전자가 집단 간 차이 혹은 유전자 흐름이나 유전적 부동과 같은 유연관계 양상을 파악할 수 있는 민감도가 뛰어나야 한다 (Kim *et al.*, 2013). 미토콘드리아 DNA는 변이성이 높은 유전자 영역으로 종내 변이성이 종간 변이성에 비해 훨씬 낮은 특성을 갖고 있어 최근 종 식별에 유용하게 이용되고 있다 (Hebert *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007). 미토콘드리아 DNA 중 CO-I (cytochrome c oxidase

subunit I) 는 연체동물문을 비롯한 많은 문에서 DNA 바코드로 종 판별 마커로 사용되고 있으며 유전정보가 다량으로 축적되어있어 마커 개발이 쉽고 종 내 또는 종 간의 진화적 유연관계를 밝히는데 유용하다 (Hebert *et al.*, 2003). 미토콘드리아 CO-I 유전자의 전체 길이는 1,500 bp 내외이나 대부분의 동물계 DNA 바코드는 한 번의 염기분석으로 종 식별이 가능한 600 bp 내외만을 이용한다 (Hebert *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2010).

동양달팽이 (*Nesiohelix samarangae*) 는 국내 육산패류 중 가장 큰 국내 고유 종으로 1992년 이 등에 의해 웅성생식기의 미세구조가 밝혀진 이래 1993년 저정낭 (spermatheca), 1994년 눈 (eye) 등의 미세구조가 밝혀 졌다 (Lee *et al.*, 1992; Jeong, 1993; Jeong and Lee, 1994). 또한 1997년 이후에는 위 (stomach) 및 소화관 등의 기관에서 분비되어지는 cellulase를 면역세포화학, 세포화학, 조직화학 등의 방법들을 통해 밝히는 등 매우 활발한 연구가 진행되어져 왔던 것으로 주로 전자현미경 등을 통한 형태학적 연구가 되어왔다 (Jeong and Lee, 1997; Jeong and Lee, 1997; Jeong and Lee, 1998; Jeong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004; Kang *et*

Received: November 4, 2014; Revised: December 20, 2014;
Accepted: December 26, 2014

Corresponding author : Yong Seok Lee

Tel: +82 (41) 530-3040 e-mail: yslee@sch.ac.kr
1225-3480/24551

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

2	TTA	TAT	CAA	CAT	TTA	TTT	TGG	TTT	TTT	GGT	CAT	CCA	GAA	GTA	TAT	46
1	L	Y	Q	H	L	F	W	F	F	G	H	P	E	V	Y	15
47	ATT	TTA	ATT	TTA	CCA	GGG	TTT	GGA	ATT	GTA	TCA	CAT	ATT	TTA	GGA	91
16	I	L	I	L	P	G	F	G	I	V	S	H	I	L	G	30
92	AAT	CAT	AGA	GTT	AAA	CAG	CCA	TTT	GGA	ACT	CTT	GGT	ATA	ATT	TAT	136
31	N	H	R	V	K	Q	P	F	G	T	L	G	I	I	Y	45
137	GCA	ATG	ATT	TCA	ATT	GGT	GTA	TTA	GGT	TTT	ATT	GTT	TGA	GCA	CAT	181
46	A	M	I	S	I	G	V	L	G	F	I	V	W	A	H	60
182	CAT	ATA	TTT	ACT	GTA	GGA	ATA	GAT	GTA	GAT	ACT	CGT	GCT	TAT	TTT	226
61	H	I	F	T	V	G	I	D	V	D	T	R	A	Y	F	75
227	ACA	GCT	GCT	ACA	ATA	GTA	ATT	GCT	GTT	CCG	ACA	GGA	ATT	AAG	GTG	271
76	T	A	A	T	I	V	I	A	V	P	T	G	I	K	V	90
272	TTT	AGA	TGA	TTA	ATA	ACT	ATT	TAT	GGG	GTT	AAA	CAC	AAA	ATA	GAT	316
91	F	R	W	L	I	T	I	Y	G	V	K	H	K	I	D	105
317	GCA	GCT	ATA	TAT	TGA	GTT	ATA	GGG	TTT	ATT	TTT	TTA	TTT	ACA	TTA	361
106	A	A	I	Y	W	V	I	G	F	I	F	L	F	T	L	120
362	GGA	GGA	CTA	ACA	GGG	ATT	GTT	TTG	TCT	AAT	GCA	TCT	CTT	GAT	ATT	406
121	G	G	L	T	G	I	V	L	S	N	A	S	L	D	I	135
407	ATG	CTA	CAT	GAC	ACT	TAT	TAT	GTG	GTT	GCA	CAT	TTT	CAT	TAT	GTA	451
136	M	L	H	D	T	Y	Y	V	V	A	H	F	H	Y	V	150
452	TTA	TCA	ATA	GGG	GCT	GTA	TTC	GCA	ATT	TTT	GCT	GGT	TTT	GTA	TTT	496
151	L	S	I	G	A	V	F	A	I	F	A	G	F	V	F	165
497	TGA	TTT	CCT	GTA	ATA	ACA	GGA	TTA	TAT	TTA	AGT	GAT	ATT	TTA	GCA	541
166	W	F	P	V	I	T	G	L	Y	L	S	D	I	L	A	180
542	AAG	TGT	CAA	TTT	TTT	GTA	ATG	TTT	TTG	GCT	GTA	AAT	TTA	ACT	TTT	586
181	K	C	Q	F	F	V	M	F	L	A	V	N	L	T	F	195
587	TTT	CCT	CAA	CAT	TTT	TTA	GGC	TTA	TCT	GGT	ATA	CCT	CGA	CGG	TAC	631
196	F	P	Q	H	F	L	G	L	S	G	I	P	R	R	Y	210
632	TCA	GAT	TAC	CCT	GAT	GCA	TAT	TAT	GTG	TGG	AAT	CAA	ATC	TCA	TCA	676
211	S	D	Y	P	D	A	Y	Y	V	W	N	Q	I	S	S	225
677	TTT	GGA	TCT	TTA	ATA	AGA	GTG	TTT	GCA	GTT	TTA	TTA	TTT	ATA	ATA	721
226	F	G	S	L	I	R	V	F	A	V	L	L	F	I	I	240
722	ATT	GTA	TGG	GAA	GCA	ATT	ATT	AGT	CAA	CGA	CCT	TAT	ATT	TTT	AGA	766
241	I	V	W	E	A	I	I	S	Q	R	P	Y	I	F	R	255
767	GGC	AAA	GCA	TCA	TAC	TCT	CGA	GAA	TGA	GAA	ACA	AAT	CTT	CCA	CCT	811
256	G	K	A	S	Y	S	R	E	W	E	T	N	L	P	P	270
812	GAT	TTT	CAT	GGT	AAT	CTA	GAG	GTA	TCT	ATT	GGA	GTT	AAA	TA-	853	
271	D	F	H	G	N	L	E	V	S	I	G	V	K	X	284	

Fig. 1. The partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of NsCO-I.

al., 2010). 2008년 Min 등에 의해 cDNA library가 구축되고 EST 분석이 이루어진 이 후 유전자 관련 연구도 많은 진행이 이루어지고 있다 (Min, 2007). 특히 MT (metallothionein) 를 이용한 계통분류학적 연구도 진행되어진 바 있으며 최근 serpin의 두 가지 타입이 있다고 보고되었다 (Lee et al., 2008; Park et al., 2014).

본 연구에서는 EST 분석을 통해 밝혀진 서열을 이용하여 고유종인 동양달팽이 (*N. samarangae*) 의 CO-I (NsCO-I)

유전자의 서열을 밝히고 이를 이용한 계통분류학적 분류를 통하여 유연관계를 알아보고 분자 계통학적 분류 위치를 파악하는데 그 목적을 두고 있다.

재료 및 방법

1. 재료

동양달팽이 (*N. samarangae*) 는 복족강 (Gastropoda), 직



Fig. 2. Analysis of NsCO-I using CDART program.

복족아강 (Orthogastropoda), 유폐상목 (Pulmonata), 진유 폐목 (Eupulmonata), 달팽이과 (Bradybaenidae) 에 속하며 *Nesiohelix* 속에 속하는 분류학적 위치를 가지며 (Min *et al.*, 2004), 국내 육산패류 중 가장 대형 종에 속한다. 본 실험에 사용되었던 재료는 2007년 7월 충청남도 태안군 가의도에서 채집하여 3일간 굶긴 후 사용하였으며, 크기는 각고 32 mm, 각경 39 mm 였다.

2. 방법

패각과 소화관이 제거된 동양달팽이를 액체질소에 급속냉동한 후 deep freezer에 넣어 이틀간 보관한 후 막자사발을 이용하여 곱게 갈았다. Absolutely mRNA Purification Kit (Stratagene, CA, USA) 를 사용하여 정제된 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA와 cDNA Library Construction Kit (Stratagene, CA, USA) 를 이용하여 구축하였고, Gigapack Gold III (Stratagene, CA, USA) packaging system으로 packaging하였다.

3. 대량 염기서열의 생물정보학적 분석을 통한 CO-I 유전자 서열의 확보

구축된 동양달팽이의 cDNA library는 AB-3730XL (Applied biosystem) 자동서열분석기를 통해 random

sequencing 한 후 분석하여 염기서열을 결정하였다. EST (expressed sequence tags) 분석을 통해 얻어진 크로마토그램 파일은 phred 프로그램을 통해 phred score 20의 조건으로 base calling 하였으며, 각 read 별로 NR 데이터베이스 및 연체동물 전용 BLAST 서버 (<http://www.malacol.or.kr/~blast>) 의 BLASTn 프로그램을 이용하여 annotation 작업을 실시하였다 (Lee *et al.*, 2004). 분석 결과 찾아진 CO-I 서열들을 모두 모은 후 cap3 프로그램을 이용하여 assembly 작업을 수행한 후 Emboss package 의 sixpack 프로그램을 활용하여 orf 및 아미노산 서열을 추출하였다. 추출되었던 아미노산 서열은 NR 데이터베이스에 BLASTp 분석을 하여 유사서열들을 수집하였다.

4. Multiple alignment 및 phylogenogram 제작

유사서열들은 Clustalw 및 MEGA6 프로그램을 이용하여 multiple alignment 후 Maximum Likelihood 방식을 통하여 phylogenogram을 도식화하였다 (Tamura *et al.*, 2013).

결과 및 고찰

EST annotation을 통해 CO-I 으로 동정된 서열은 총 4개

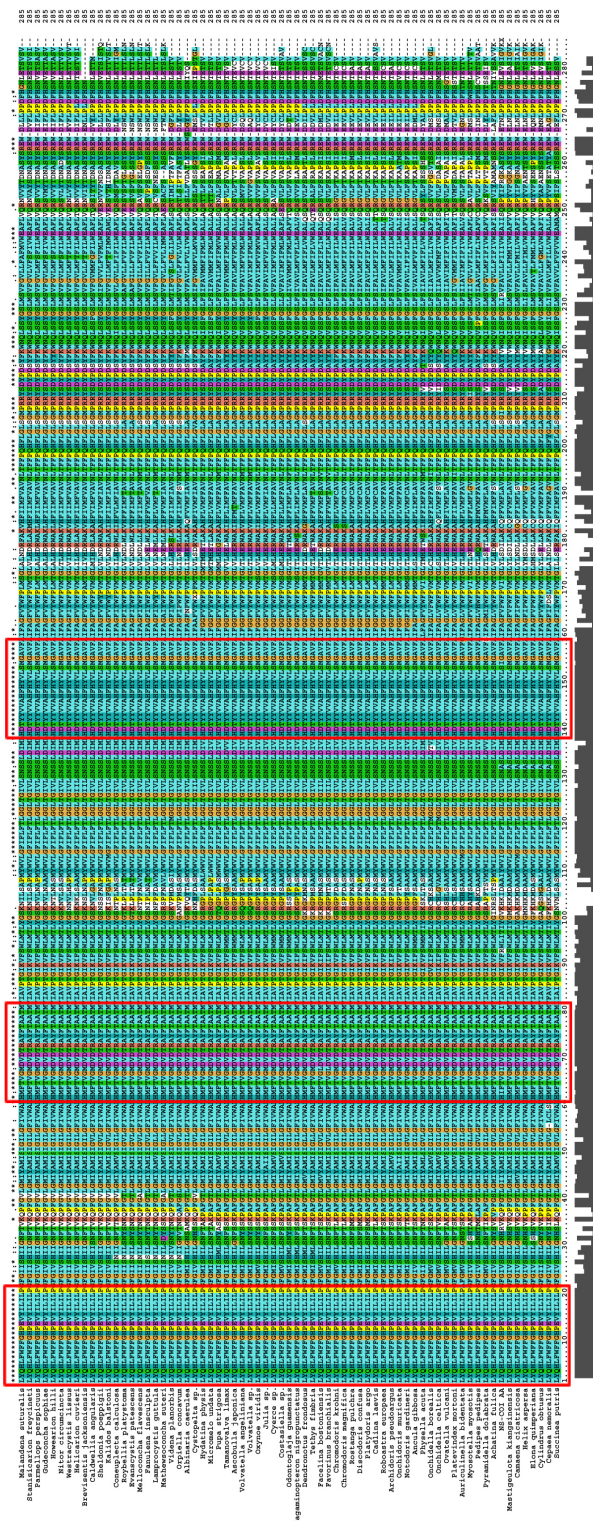


Fig. 3. Multiple sequence alignment of NsCO-I with known 68 reference sequences.

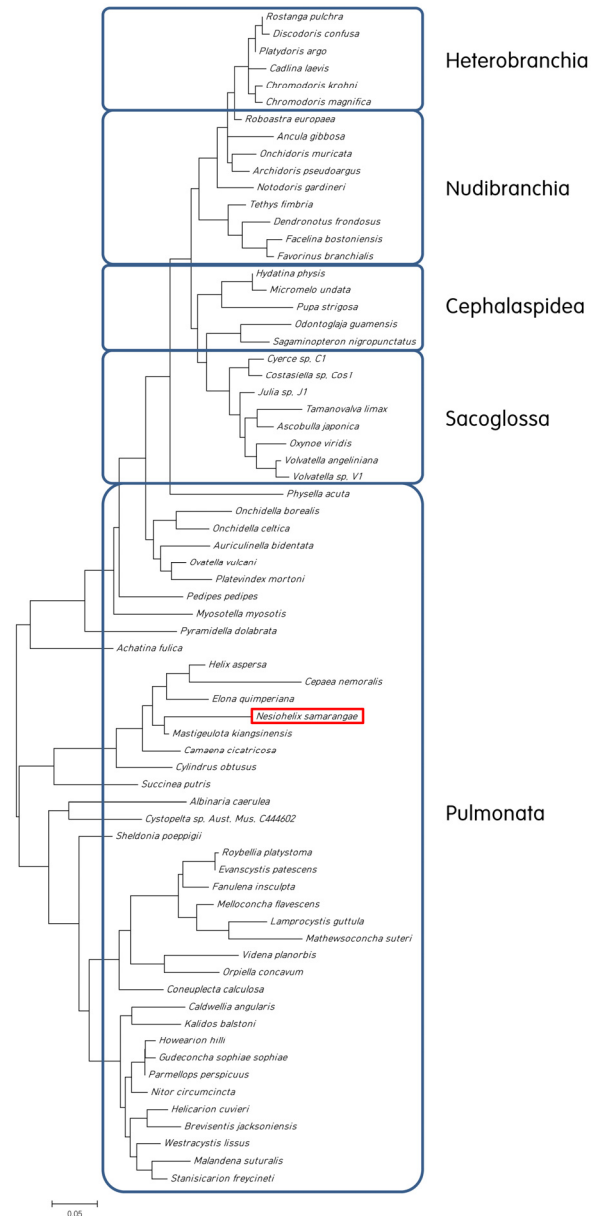


Fig. 4. Molecular phylogenetic analysis of NsCO-I by Maximum Likelihood methods using MEGA6.

의 클론이었다. 4개의 서열을 어셈블리하여 얻어진 contig에서 sixpack 프로그램을 통해 얻어진 284개의 아미노산 서열로 이루어진 NsCO-I 서열은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 3' 서열 위주의 partial 서열이었다. CDART (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool) 분석을 실시한 결과 Heme-Cu-oxydase I 도메인을 가지고 있는 것으로 분석되었다 (Geer *et al.*, 2002) (Fig. 2). 또한 염기서열을 NCBI NR 데이터베이스에 BLASTn 검색을 실시한 결과 육산달팽이인

Table 1. The dataset used for phylogenetic analysis of NsCO-I.

GI. NO.	Species	Category	GI. NO.	Species	Category
38489844	<i>Rostanga pulchra</i>		357017904	<i>Pedipes pedipes</i>	
38489836	<i>Discodoris confusa</i>		353336612	<i>Myosotella myosotis</i>	
38489830	<i>Platydorid argo</i>	Heterobranchia	226463922	<i>Pyramidella dolabrata</i>	
38489824	<i>Cadlina laevis</i>		669032150	<i>Achatina fulica</i>	
38489828	<i>Chromodoris krohni</i>		189916624	<i>Helix aspersa</i>	
118457474	<i>Chromodoris magnifica</i>		2155162	<i>Cepaea nemoralis</i>	
23578047	<i>Roboastra europaea</i>		38489862	<i>Elona quimperiana</i>	
38489814	<i>Ancula gibbosa</i>		688074910	<i>Mastigeulota kiangsinensis</i>	
38489822	<i>Onchidoris muricata</i>		722489554	<i>Camaena cicatricosa</i>	
38489816	<i>Archidoris pseudoargus</i>		386800511	<i>Cylindrus obtusus</i>	
322422813	<i>Notodoris gardineri</i>	Nudibranchia	357018007	<i>Succinea putris</i>	
38489826	<i>Tethys fimbria</i>		5835301	<i>Albinaria caerulea</i>	
38489838	<i>Dendronotus frondosus</i>		145652932	<i>Cystopelta sp. Aust. Mus. C444602</i>	
38489818	<i>Facelina bostoniensis</i>		145652912	<i>Sheldonia poeppigii</i>	
38489840	<i>Favorinus branchialis</i>		145652928	<i>Roybellia platystoma</i>	
118457507	<i>Hydatina physis</i>		145652961	<i>Evanscystis patescens</i>	
322422744	<i>Micromelo undata</i>		145652926	<i>Fanulena insculpta</i>	Pulmonata
7335677	<i>Pupa strigosa</i>	Cephalaspidea	145652922	<i>Melloconcha flavescens</i>	
118603252	<i>Odontoglossa guamensis</i>		145652924	<i>Mathewsoconcha suteri</i>	
116090329	<i>Sagaminopteron nigropunctatus</i>		145652920	<i>Videna planorbis</i>	
318067634	<i>Cyerce sp. C1</i>		145652940	<i>Orpiella concavum</i>	
318067644	<i>Costasiella sp. Cos1</i>		145652918	<i>Coneuplecta calculosa</i>	
318067630	<i>Julia sp. J1</i>		145652904	<i>Caldwellia angularis</i>	
318067628	<i>Tamanovalva limax</i>	Sacoglossa	145652916	<i>Kalidos balstoni</i>	
318067620	<i>Ascobulla japonica</i>		145652908	<i>Howearion hilli</i>	
318067626	<i>Oxynoe viridis</i>		145652910	<i>Gudeconcha sophiae</i>	
318067622	<i>Volvatella angeliniana</i>		145652906	<i>Parmellops perspicuus</i>	
318067624	<i>Volvatella sp. VI</i>		145652896	<i>Nitor circumcincta</i>	
380778659	<i>Physella acuta</i>		145652884	<i>Helicarion cuvieri</i>	
118603266	<i>Onchidella borealis</i>		145652894	<i>Brevisentis jacksoniensis</i>	
226453438	<i>Onchidella celtica</i>	Pulmonata	145652902	<i>Westracystis lissus</i>	
357017784	<i>Auriculinea bidentata</i>		145652898	<i>Malandena suturalis</i>	
357017854	<i>Ovatella vulcani</i>		145652892	<i>Stanisicarion freycineti</i>	
290967681	<i>Platevindex mortoni</i>				

Elona quimperiana (AY345051.1), *Euhadra herklotsi* (AB267550.1) 및 *Euhadra idzumonis* (AB267494.1) 서열과 E-value 0.0 조건하에서 83% 상동성을 보였다. BLAST 결과 유사한 서열은 총 980개로 분석되었으며 strain은 다르지만 같은 종인 서열들을 정리한 결과, 368 종의 CO-I 서열과 상동성이 있음을 알 수 있었다. NsCO-I 의 아미노산 서열을 NCBI NR 데이터베이스에 BLASTp 프로그램을 이용하여 분석한 결과 연체동물문에 해당하는 서열 68개를 정리할 수 있었다. 정리된 서열과 NsCO-I 서열들을 MEGA6 및 Clustalw 프로그램을 이용하여 다중서열분석을 실시한 결과 전반적으로 매우 유사도가 높았으며 이에 따라 보존된 서열들이 잘 관찰되었다 (Fig. 3). 아미노산 레벨에서 molecular phylogenetic 분석을 실시한 결과 Heterobranchia (이새류),

Nudibranchia (나새류), Cephalaspidea (두순류), Sacoglossa (낭설류), Pulmonata (유폐류) 등의 카테고리별로 잘 분류 되었다 (Fig. 4). 특히 NsCO-I 서열과 가장 가까운 묶이는 그룹은 *Mastigeulota kiangsinensis* (YP_009059485.1), *Helix aspersa* (AAR21554.2), *Cepaea nemoralis* (AAC09514.1), *Elona quimperiana* (AAR21551.15), *Camaena cicatricosa* (YP_009104591.1), *Cylindrus obtusus* (YP_006303184.1) 등의 육산달팽이들 이었다.

요 약

동양달팽이의 EST 서열 4개의 클론을 어셈블리하여 추출되

어진 NsCO-I (partial)서열의 코딩 영역은 852 bp, 284개의 아미노산으로 구성되어 있었다. BLAST 결과를 토대로 하여 유사도가 높은 68개의 서열을 추출 하였으며 MEGA6 프로그램을 통해 clustalW 엔진을 통해 다중서열정렬을 수행하고 molecular phylogenetic analysis를 수행한 결과 Heterobranchia, Nudibranchia, Cephalaspidea, Sacoglossa, Pulmonata 등의 카테고리별로 잘 분류 되었으며 *Mastigeulota kiangsinsensis*, *Helix aspersa*, *Cepaea nemoralis*, *Elona quimperiana*, *Camaena cicatricosa*, *Cylindrus obtusus* 등 육산패류들과 잘 묶인다는 사실을 확인 할 수 있었다.

사 사

이 연구는 국립생물자원관에서 추진하는 "자생 생물자원의 유전자 다양성 연구" 사업에서 지원하는 "주요 동물자원의 유전자(체) 다양성 연구(NIBR201403102)" 과제로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Geer, L.Y., Domrachev, M., Lipman, D.J., and Bryant, S.H. (2002) CDART: Protein Homology by Domain Architecture. *Genome Research*, **12**: 1619-1623.
- Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., and Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 14812-14817.
- Hebert, P.D., Ratnasingham, S., and deWaard, J.R. (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci* 270 Suppl 1: S96-99.
- Jeong, K.H. (1993) The Ultrastructure of the Spermatheca of the Pulmonate Snail *Nesiohelix samarangae*. *Korean Journal of Malacology*, **9**: 94-102.
- Jeong, K.H., and Lee, H. (1994) An Anatomical and Ultrastructural Study on the Eye of a Land Snail, *Nesiohelix samarangae*. *Korean Journal of Malacology*, **10**: 1-8.
- Jeong, K.H., and Lee, Y.S. (1997) Cytochemical and Immunocytochemical Study on the Cellulase Activity in the stomach of the Land Snail *Nesiohelix samarangae*. *The Korean Journal of Malacology* **13**(2): 161-173.
- Jeong, K.H., and Lee, Y.S. (1997) Histochemical and Ultrastructural Study on the stomach of a Land Snail *Nesiohelix samarangae*. *The Korean Journal of Malacology* **13**(2): 175-184.
- Jeong, K.H., and Lee, Y.S. (1998) Histochemical and Ultrastructural Study on the Digestive Tract of a Land Snail *Nesiohelix samarangae*. *The Korean Journal of Malacology*, **14**(2): 131-147.
- Jeong, K.H., Lee, Y.S., and Shim, Y.B. (1999) Cytochemical and Immunocytochemical Study on the Cellulase Activity in the Accessory Glands of the Digestive System of the Oriental Land Snail, *Nesiohelix samarangae*. *The Korean journal of malacology*, **15**(1): 81-92.
- Kang, J.-H., Yu, K., Kim, S.-K., Park, J.-Y., Kim, B.-S., and An, C.-M. (2010) Species Identification and Genetic Structure of Octopus minor from Korea and China on the Basis of Partial Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I. *The Korean journal of malacology*, **26**: 285-290.
- Kang, S.W., Jo, Y.H., Han, Y.S., Jeong, K.-H., and Lee, Y.S. (2010) Morphological and Ultrastructural Study on the Prostate of a Land Snail *Nesiohelix samarangae*, a *Stylommatophoran Pulmonate*. *The Korean journal of malacology*, **26**: 79-84.
- Kim, S., Kim, S.-J., Min, G.-S., Yang, E., Yoo, M., and Choi, J. (2007) Analysis of Genetic Variation in the Small Subunit Ribosomal RNA Gene of Euplotes Ciliates for Developing Species Diagnostic Molecular Marker. *Journal of the Korean Society of Oceanography*, **12**: 225-233.
- Lee, H.-S., Jeong, K.-H., and Park, J.-A. (1992) A Morphological Study on the Male Genital Organs of a Land Snail, *Nesiohelix samarangae*. *Korean Journal of Malacology*, **8**: 61-71.
- Lee, J.-S., Min, B.-J., Kang, S.W., Lee, J.B., Baek, M.K., Hwang, S.Y., Kim, S.H., Kho, W.-G., Choi, S.-H., Chae, S.-H., Park, H.-S., Han, Y.S., Lee, J.-S., Jeong, K.-H., and Lee, Y.S. (2008) Molecular Phylogenetic Study of *Nesiohelix samarangae* Based on Metallothionein Gene. *The Korean Journal of Malacology*, **24**: 73-80.
- Lee, Y.S., Kang, B.R., Shin, H.J., and Jeong, K.H. (2004) Histochemical and Ultrastructural Studies on the Salivary Gland of a Land Snail, *Nesiohelix samarangae*. *The Korean Journal of Malacology*, **20**(1): 7-16.
- Lee, Y.S., Yon, J.-O., Choi, S.-H., Jo, Y.-H., Kim, D.-S., Kim, D.-W., Kim, M.-Y., Byun, I.-S., Kang, B.-R., Jeong, K.-H., and Park, H.-S. (2004) Construction of BLAST server for mollusks. *Korean Journal of Malacology*, **20**: 165-169.
- Min, B.-J. (2007) Identification and expression pattern analysis of various genes from the expressed sequence tag project of *Nesiohelix samarangae*. *Department of Biology*,
- Min, D.-K., Lee, J.S., Koh, D.-B., and Je, J.-G. (2004) Mollusks in Korea. Min Molluscan Research Institute
- Park, S.Y., Jeong, J.e., Hwang, H.J., Wang, T.H., Park, E.B., Kim, Y.M., Lee, J.-S., Han, Y.S., Yang, S.-H., and Lee, Y.S. (2014) Identification and in silico analysis of two types of serpin genes from expressed sequence tags (ESTs) of the Oriental land snail, *Nesiohelix samarangae*. *The Korean journal of malacology*, **30**: 155-163.

Tamura, K., and Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**: 512-526.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725-2729.