

Kajian Molekuler Daerah D-Loop Parsial DNA Mitokondria Kuda (*Equus caballus*) Asli Tengger

(MOLECULER STUDY ON PARTIAL D-LOOP OF MITOCHONDRIAL DNA HORSE (*EQUUSCABALLUS*) FROM TENGGER)

Yuriadi ¹, Rini Widayanti², Aris Purwantoro², Charles Rangga Tabbu³

¹Bagian Ilmu Penyakit Dalam, ²Laboratorium Biokimia, ³Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gajah Mada.
Jl. Fauna no 2. Karangmalang, Yogyakarta
E-mail: riniwida@yahoo.co.uk Telp: (0274) 560865

ABSTRACT

Tengger's horse (*Equus caballus*) is a local Indonesian horse an originated from its ancestor in Java. As the population of Tengger's horse is almost extinct it is important to conserve and increase the horse population by in situ or ex situ conservation. The objective of this research was to study the molecular genetic of partial D-loop of Tengger's horse. Sequencing of PCR product, showed that the D-loop consisted of 319 nucleotides. The DNA was isolated from whole blood and amplified and sequenced using a published primer sets. The sequence was aligned and compared with horse D-loop sequences available in Genbank using Clustal W method in MEGA program version 4.0.2. Ten different nucleotide sites were found in Tengger horse from (nucleotide no. 9, 52, 64, 69, 102, 117, 133, 170, 187 and 293). The genetic distance analised using Kimura 2-parameter model ranged between 0,0% and 3,2%, with the average of 1,7%. The phylogenetic tree using neighbor joining method based on the sequence of nucleotide partial D-loop could not be used to differentiate among horse from Tengger and *E. caballus*.

Key words: Equus caballus, PCR, Tengger's horse, Sequence Controle Region D-Loop

PENDAHULUAN

Kuda (*Equus caballus*) lokal Tengger, kuda priangan dan kuda dieng menurut para ahli merupakan nenek moyang kuda di pulau Jawa. Namun keberadaan kuda-kuda ini mulai terancam punah. Populasi beberapa jenis kuda secara nasional pada tahun 1989 sebesar 683.000 ekor, dan diperkirakan kuda asli Jawa kurang lebih tinggal 54.640 ekor atau tinggal 0,8% (Direktorat Pembibitan, 2004).

Fenomena di atas menggambarkan bahwa kuda asli pulau Jawa memiliki resiko kepunahan yang sangat tinggi sehingga pengelolaannya perlu dilakukan secara hati-hati. Sehubungan dengan masalah tersebut perlu dilakukan tindakan untuk meningkatkan jumlah populasi kuda asli Indonesia yang langka ini yaitu melalui upaya konservasi *in situ* dan *ex situ*. Dalam upaya konservasi, identifikasi *E. caballus* yang akan dilestarikan sangatlah penting untuk dilakukan. Identifikasi terhadap spesias *E. caballus* di Indonesia selama ini hanya berdasar pada karakter morfologi

sedangkan kajian dari aspek genetika molekuler masih terbatas, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi genetik di dalam mengatasi masalah identifikasi *E. caballus* di Indonesia yang semakin langka ini. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji keragaman genetik kuda tengger berdasar sekuen *D-loop parsial* mitokondria dan diharapkan dapat sebagai penanda genetik kuda tengger terhadap kuda asli Indonesia lainnya sehingga usaha konservasi kuda asli Indonesia dapat berhasil guna.

Penelitian tentang eksplorasi molekuler untuk analisis genom sitoplasmik yaitu mitokondria berupa runutan utuh dari DNA telah dilakukan pada kuda liar dan kuda domestik di Sorraria (Bowling *et al.*, 2000; Kavar *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999, Oakenfull dan Reader 1998, Oakenfull *et al.*; 2000 dan Vila *et al.*, 2000). Oleh karena itu terbuka kesempatan untuk mengkaji bagian yang tidak penyandi protein (*D-loop*) mitokondria pada kuda lokal Indonesia.

Fragmen di dalam genom mitokondria banyak digunakan untuk penelitian mengenai hubungan inter spesies (beberapa galur kuda), seperti yang dilakukan oleh Luis *et al.*, (2002) pada kuda domestik Sorraia (kuda asli Portugis), Bowling *et al.*, (2000) dan Oakenfull *et al.*, (2000) yang mempunyai arti penting dalam usaha konservasi.

Fragmen bukan penyandi protein di dalam genom mitokondria sering dipakai dalam penelaahan keragaman genetik dan hubungan kekerabatan diantara spesies hewan (jenis-jenis kuda) adalah daerah *D-loop*. Daerah *D-loop* ini menarik untuk ditelaah karena dua dari ketiga domainnya memiliki mutasi yang tinggi sehingga runutan basa-basa nukleotidanya terjadi tidak saja pada tingkat inter spesies tetapi juga pada tingkat intra spesies. Penelaahan *D-loop* banyak dilakukan untuk kajian biologi populasi dan evolusi hewan (Sbisa *et al.*, 1997). Namun demikian penelaahan keragaman genetik daerah *D-loop* pada kuda tengger belum pernah dilakukan. Pemanfaatan keragaman genetik kuda tengger pada daerah *D-Loop parsial* diharapkan dapat membantu dalam melengkapi data yang kurang sehingga dapat membantu usaha konservasi.

METODE PENELITIAN

Sampel darah diambil dari 5 ekor kuda tengger yang berasal dari daerah Tengger, Jawa Timur. Darah sebanyak 5 ml diambil lewat *vena jugularis* dan diberi antikoagulan EDTA 10%.

DNA total hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 50 µl campuran pereaksi PCR terdiri dari 2,5 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 100-300 ng DNA cetakan, 10-20 pmol masing-masing primer dan 2 U *Taq polimerase* beserta bufernya. Primer untuk amplifikasi daerah *D-loop* menggunakan primer *Forward* yaitu 5'-CGCACATTACCCTGGTCTTG-3' dan *Reverse* 5'GAACCAGATGCCAGGTATG-3' berdasarkan Xu dan Arnason (1994).

Amplifikasi DNA dengan PCR pada penelitian ini menggunakan mesin GeneAmp[®] PCR system 2400 (Perkin Elmer). Amplifikasi *D-loop parsial* dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik untuk denaturasi, 51°C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72°C selama 1 menit untuk

pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dan diakhiri 5 menit pada 72°C, kemudian disimpan pada suhu 4°C.

Produk PCR dideteksi dengan cara dielektroforesis pada gel agarosa 1,2% dengan menggunakan buffer 1xTBE dalam piranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV (λ = 300nm) setelah gel diwarnai dengan ethidium bromide. Penanda DNA dengan ukuran 100 bp (RBC) digunakan sebagai penunjuk berat molekul.

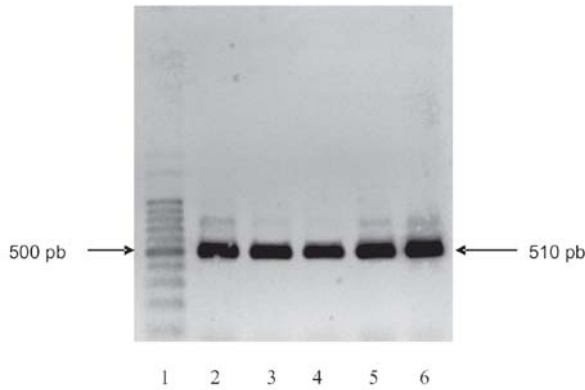
Produk PCR kelima sampel hasil amplifikasi selanjutnya dipergunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi *sequencing* DNA. Kondisi untuk reaksi *sequencing* adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94°C selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik, 51°C selama 45 detik, 72°C selama 1 menit; reaksi amplifikasi sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 5 menit pada 72°C. *Sequencing* DNA menggunakan primer *Forward* serta menggunakan alat *sequencing* DNA otomatis *ABI Prism versi 3.4.1* (USA).

Penjajaran berganda sekuen nukleotida *D-loop* parsial dianalisis dengan bantuan perangkat lunak program Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Analisis hasil berdasar sekuen nukleotida *D-loop* parsial menggunakan perangkat lunak MEGA versi 4.1. Jarak genetik dianalisis dengan metode Kimura-2 parameter (Kumar *et al.*, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi daerah *D-loop* mt-DNA menggunakan primer F dan R (Xu dan Arnason, 1994) dengan teknik PCR menghasilkan fragmen DNA sebesar 510 pb. Profil DNA hasil amplifikasi *D-loop* parsial disajikan pada Gambar 1.

Berdasarkan sekuen genom mt-DNA *E. caballus* (NC_001640) fragmen DNA pada penelitian ini terletak pada gen tRNA^{Thr} (nukleotida ke 16) sampai pada nukleotida ke 385 dari daerah *D-loop* (urutan nukleotida 15353-15862 dari genom mitokondria). Besarnya fragmen DNA yang teramplifikasi pada penelitian ini setelah diplotkan dengan data sekuen DNA mitokondria *E. caballus* (NC_001640) adalah 510 pb, yaitu terdiri 55 pb fragmen gen tRNA^{Thr}, 66 pb fragmen gen



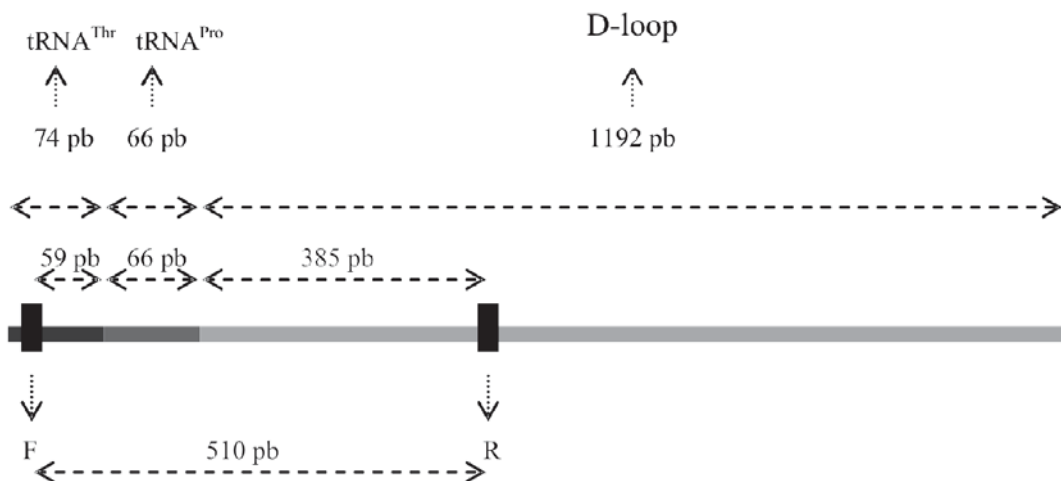
Gambar 1. Hasil PCR daerah D-Loop kuda Tengger menggunakan primer F dan R pada gel agarose 1,2%

Keterangan: 1. DNA ladder 100 pb (RBC), 2-6 produk PCR dengan primer F dan R (Xu and Arnason, 1989), 2. Produk PCR kuda Tengger 1, 3-6 berturut-turut produk PCR kuda Tengger 2, 3, 4, dan 5

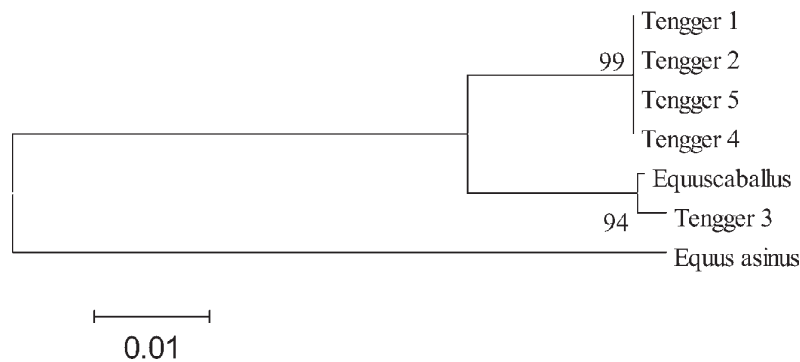
tRNA^{Pro} dan 385 pb fragmen daerah D-loop. Skema letak penempelan primer F dan R untuk mengamplifikasi daerah D-loop parsial disajikan pada Gambar 2.

Analisis keragaman nukleotida dilakukan setelah semua sekuen DNA kuda tengger dilakukan penjajaran berganda dengan spesies *Equus sp.* lainnya dari *Genbank*. Fragmen DNA daerah D-loop setelah dilakukan penjajaran berganda didapatkan sekuen sepanjang 319 nukleotida (basa ke 66-384 pada daerah D-loop) yang dapat dianalisis.

Hasil penjajaran semua spesies ini terjadi substitusi transisi dan transversi. Hasil perbandingan ke 319 nt kuda tengger hasil penelitian dengan spesies pembanding didapatkan 37 situs beragam (34 situs terjadi substitusi transisi dan 3 situs terjadi transversi) dan di antara sampel penelitian didapatkan 10 situs nukleotida beragam (semuanya terjadi



Gambar 2. Skema letak penempelan primer F dan R untuk mengamplifikasi daerah D-loop parsial kuda Tengger



Gambar 3. Filogram menggunakan metode Neighbor joining dari nukleotida daerah D- loop parsial (berukuran 319 nt) kuda Tengger dan beberapa spesies *Equus* lain

transisi) yaitu pada basa urutan ke 9, 52, 64, 69, 102, 117, 133, 170, 187 dan 293. Kesembilan situs beragam tersebut (kecuali basa urutan ke 293) dapat digunakan untuk membedakan kuda tengger 1, 2, 4 dan 5 dengan *E. caballus* pembanding, sedangkan kuda tengger 3 dapat dibedakan dengan *E. caballus* pembanding hanya pada situs ke 293. Urutan basa hasil *sequencing* (319 nt) kuda tengger dengan spesies *Equus sp* lainnya disajikan pada Tabel 1. Matriks perbedaan nukleotida dan jarak genetik seluruh kuda hasil penelitian dengan spesies pembanding disajikan pada Tabel 2. Berdasar jumlah

nukleotida yang hanya berbeda 9 nt antara kuda tengger 1,2,4, 5 dengan *E. caballus* dan hanya berbeda 1 nt antara kuda Tengger 3 dengan *E. caballus* pembanding menunjukkan bahwa kekerabatan kuda tengger dengan *E. caballus* pembanding dekat. Antara kuda tengger 1, 2, 4 dan 5 sama sekali tidak ada perbedaan, tetapi ke empat kuda tengger tersebut terhadap kuda tengger 3 terdapat perbedaan 10 nt.

Jarak genetik yang dihitung dengan metode Kimura-2 parameter antara kuda tengger dengan *E. caballus* pembanding berdasar sekuen nukleotida daerah D-loop parsial (319 nt) adalah

Tabel 1. Hasil sekuensing daerah D-loop parsial pada DNA mitokondria kuda Tengger

| | | | | | | | |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------|
| #Equuscaballus | CATAACACCA | TACCCACCTG | ACATGCAATA | TCTTATGAAT | GGCCTATGTA | CGTCGTGCAT | [60] |
| #Tengger_1 |T. | | | | | .A..... | [60] |
| #Tengger_2 |T. | | | | | .A..... | [60] |
| #Tengger_3 | | | | | | | [60] |
| #Tengger_4 |T. | | | | | .A..... | [60] |
| #Tengger_5 |T. | | | | | .A..... | [60] |
| #Equus_asinus | ..C..... | ..T.AG.TCA | ...A..... | CTC...T... | AC..... | .A..... | [60] |
| #Equuscaballus | TAAATTGTCT | GCCCCATGAA | TAATAAGCAT | GTACATAATA | TCATTTATCT | TACATAAGTA | [120] |
| #Tengger_1 | ...G...T. | | | | .T..... |G... | [120] |
| #Tengger_2 | ...G...T. | | | | .T..... |G... | [120] |
| #Tengger_3 | | | | | | | [120] |
| #Tengger_4 | ...G...T. | | | | .T..... |G... | [120] |
| #Tengger_5 | ...G...T. | | | | .T..... |G... | [120] |
| #Equus_asinus |TC | A..... | | | .T..... |G..... | [120] |
| #Equuscaballus | CATTATATTA | TTGATCGTGC | ATACCCCATC | CAAGTCAAAT | CATFTCCAGT | CAACACGCAT | [180] |
| #Tengger_1 | | ..A..... | | |C | | [180] |
| #Tengger_2 | | ..A..... | | |C | | [180] |
| #Tengger_3 | | | | | | | [180] |
| #Tengger_4 | | ..A..... | | |C | | [180] |
| #Tengger_5 | | ..A..... | | |C | | [180] |
| #Equus_asinus | ..C..... |A. | | |C | | [180] |
| #Equuscaballus | ATCACAGCCC | ATGTTCCACG | AGCTTAATCA | CCAAGCCGCG | GGAAATCAGC | AACCCCTCCCA | [240] |
| #Tengger_1 |A... | | | | | | [240] |
| #Tengger_2 |A... | | | | | | [240] |
| #Tengger_3 | | | | | | | [240] |
| #Tengger_4 |A... | | | | | | [240] |
| #Tengger_5 |A... | | | | | | [240] |
| #Equus_asinus |CA... | ..A..... | | | | ..T..CT... | [240] |
| #Equuscaballus | ACTACGTGTC | CCAATCCTCG | CTCCGGGCC | ATCCAACGCT | GGGGGTTTCT | ACAATGAAAC | [300] |
| #Tengger_1 | | | | | | | [300] |
| #Tengger_2 | | | | | | | [300] |
| #Tengger_3 | | | | | | ..G..... | [300] |
| #Tengger_4 | | | | | | | [300] |
| #Tengger_5 | | | | | | | [300] |
| #Equus_asinus | .T..... | | | ..T..... | | ..GG..... | [300] |
| #Equuscaballus | TATACCTGGC | ATCTGGTTC | [319] | | | | [319] |
| #Tengger_1 | | | [319] | | | | [319] |
| #Tengger_2 | | | [319] | | | | [319] |
| #Tengger_3 | | | [319] | | | | [319] |
| #Tengger_4 | | | [319] | | | | [319] |
| #Tengger_5 | | | [319] | | | | [319] |
| #Equus_asinus | | | [319] | | | | [319] |

Tabel 2. Matriks perbedaan nukleotida pada daerah D-loop parsial (319 nt) dan jarak genetik kuda Tengger menggunakan metode Kimura 2 parameter

| Nama | <i>E.caballus</i> | Tengger 1 | Tengger 2 | Tengger 3 | Tengger 4 | Tengger 5 | <i>E. asinus</i> |
|-------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|
| <i>E.caballus</i> | | 0.029 | 0.029 | 0.003 | 0.029 | 0.029 | 0.114 |
| Tengger 1 | 9 | | 0.000 | 0.032 | 0.000 | 0.000 | 0.111 |
| Tengger 2 | 9 | 0 | | 0.032 | 0.000 | 0.000 | 0.111 |
| Tengger 3 | 1 | 10 | 10 | | 0.032 | 0.032 | 0.111 |
| Tengger 4 | 9 | 0 | 0 | 10 | | 0.000 | 0.111 |
| Tengger 5 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | | 0.111 |
| <i>E. asinus</i> | 33 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | |

Keterangan: kiri bawah: jumlah nukleotida yang berbeda
Kanan atas: jarak genetik

paling kecil 0% dan paling besar 3,2%. Jarak genetik keseluruhan adalah 1,7%. Keadaan ini sangat berbeda dengan pendapat Sbisca *et al.* (1997), bahwa daerah D-loop dibagi menjadi 3 domain, domain 1 (berbatasan dengan tRNA^{Pro}) bersifat variatif, domain 2 (tengah) bersifat konservatif dan domain 3 bersifat variatif. Menurut Hoelzel *et al.*, (1994), di daerah D-loop ditemukan 5 posisi susunan urutan berulang (*repetitive sequence, RS*) 1 sampai dengan 5, RS1 dan RS2 berada pada ujung 5' D-loop sedangkan RS3, RS4 dan RS5 berada pada ujung 3' dari D-loop.

Pada penelitian ini kecilnya perbedaan daerah D-loop parsial (domain I) di antara kuda tengger dan *E. caballus* pembandingan menunjukkan bahwa urutan nukleotida tersebut sangat kecil keragamannya, hal ini sama dengan Widayanti (2008) pada *Tarsius bancanus*, dan Widayanti dan Solihin (2007) pada beberapa spesies *Tarsius*. Menurut Schmitz *et al.*, (2002), pada *T. bancanus* ditemukan urutan berulang pada posisi RS3 sebanyak 22 pb dengan pengulangan bervariasi dari 4 sampai 15, sedangkan menurut Fumagalli *et al.*, (1996) ukuran panjang nukleotida D-loop bervariasi disebabkan karena duplikasi atau delesi dari urutan berulang. Jadi, kemungkinan apabila pada penelitian ini dilakukan pengurutan nukleotida di posisi RS3 tersebut maka akan dapat membedakan antara *E. caballus* pembandingan dengan kuda tengger.

Analisis filogenetik pada penelitian ini menggunakan metode *Neighbor joining* dengan *bootstrap* 1000 kali dilakukan terhadap 319 nt yang menyusun daerah D-loop parsial dengan

spesies *Equus* lain sebagai pembandingan yang diambil dari Genbank. Gambar 3 menyajikan filogram berdasarkan sekuen nukleotida daerah D-loop parsial. Filogram yang dihasilkan terlihat adanya 2 cabang utama. Cabang I membentuk 2 sub cabang. Sub cabang 1 terdiri dari kelompok kuda tengger (1, 2, 4 dan 5) yang didukung dengan nilai *bootstrap* 99% dan sub cabang 2 terdiri dari *E. caballus* pembandingan dan kuda tengger 3 yang didukung dengan nilai *bootstrap* 94%. Cabang II terdiri dari *E. asinus*. Terpisahannya kuda tengger 3 dari kelompok kuda tengger lainnya dan berada pada sub cabang yang sama dengan *E. caballus* pembandingan menunjukkan bahwa daerah *D-loop parsial* ini tidak dapat digunakan sebagai penanda genetik antara kuda tengger dengan *E. caballus* pembandingan. Hal ini diperkuat dengan jarak genetik rata-rata yang hanya 1,7%.

SIMPULAN

Keragaman nukleotida pada daerah *D-loop parsial* (319 nt) kuda Tengger sangat kecil yaitu antara 1-10 nukleotida. Jarak genetik menggunakan metode Kimura dua parameter paling besar adalah 3,2% sehingga tidak dapat membedakan pada tingkat intra spesies.

SARAN

Perlu penelitian lanjutan pada bagian lain dari DNA mitokondria untuk mendapatkan penanda genetik untuk masing-masing kuda lokal asli Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Hibah Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan UGM 2008 (PHKA2) yang telah memberikan dana sehingga penelitian selesai sesuai dengan rencana.

DAFTAR PUSTAKA

- Bowling AT, Del Valle A, Bowling M. (2000). A Pedigree Based Study of Mitochondrial D-Loop DNA Sequence variation Among Arabian Horses. *Anim Genet* 31: 1-7.
- Cothran EG, Juras R, Macijauskienė V. 2005. Mitochondrial D-Loop Sequence Variation among 5 Maternal Lines of the Zemaitukai Horse Breed. *Genetics and Molecular Biology* 28(4): 677-681.
- Direktorat Pembibitan, (2004). Perkembangan dan Isu-Isu Bibit Ternak Nasional. Departemen Pertanian Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan. Disampaikan pada seminar pertemuan komisi bibit ternak Nasional pada tanggal 5-6 Oktober 2004 di Yogyakarta.
- Fumagalli L, Taberlet P, Favre L, Hausser J. 1996. Origin and Evolution of Homologous Repeated Sequences in the Mitochondrial DNA Control Region of Shrews. *J Mol Biol Evol* 13: 31-46.
- Kim KI, Yang YH, Lee SS, Park C, Ma R, Bouzat JL, Lewin HA. 1999. Phylogenetic Relationship of Cheju Horses to Other Horse Breeds as Determined by mtDNA D-Loop Sequence Polymorphism. *Anim Genet* 30: 102-108.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. Molecular evolutionary genetics analysis version 2.0. Pennsylvania State Univ : Ins of Molecular Evolutionary Genetics.
- Luis C, Silveira CB, Cothran EG, Oam MM. 2002. Variation in The Mitochondrial Control Region Sequence between the Two Maternal Lines of The Sorraia Horse Breed. *Genet Mol Biol* 25 (3).
- Oakenfull EA, Reader AO. 1998. Mitochondrial Control region and 12S rRNA Variation in Przewalski's Horse (*Equus Przewalskii*). *Anim Genet* 29: 456-459.
- Oakenfull EA, Lim HN, Reader AO. 2000. A Survey of equid Mitochondrial DNA: Implications for The Evolution, Genetic Diversity and Conservation of Equus. *Cons Genet* 1: 341-355.
- Sbisa E, Tanzariello F, Reyes W, Pesole A, Saccone GC. 1997. Mammalian Mitochondrial D-Loop region Structural Analysis, Identification of New Conserved Sequence and Their Functional and Evolutionary Implication. *Gene* 205:125-140.
- Schmitz J, Ohme M, Zischler H. 2000. The Complete Mitochondrial Genome of *Tupaia belangeri* and the Phylogenetic Affiliation of Scandentia to Other Eutherian Orders. *J Mol Biol Evol.* 17: 1334-1343.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1995. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, Position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673-4680.
- Villa C, Leonard JA, Gotherstrom A, Markland S, Sanberg K, Lieden K, Wayne RK, Ellegren H. 2000. Widespread Origin of Domestic Horse. *Line Ages Sciences.* 291:474.-477.
- Wartomo HS, Astuti M. 1993. Buku Pintar Peternakan. Grasindo. Jakarta.
- Widayanti R, Solihin DD. 2007. Kajian Penanda Genetik *Tarsius bancanus* dan *Tarsius spectrum* dengan Sekuen D-Loop Parsial dari DNA Mitokondria. *Biota* 12(3).
- Widayanti, R. 2008. Kajian molekuler daerah D-loop parsial pada DNA mitokondria *Tarsius bancanus*. *J Vet Med* 24(2): 86-91.
- Xu X, Arnason U. 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* 148 (2): 357-362.