

Veterinarski fakultet
Sveučilište u Zagrebu

Filogenetska analiza životinja iz reda zvijeri usporedbom kontrolnih
regija mitohondrijske DNA

Maja Maurić i Lana Pađen, studentice II. godine

Izvedeno na Zavodu za biologiju

Voditelj: Tomislav Gomerčić, dr. vet. med., Martina Đuras Gomerčić, dr. vet. med.

Zagreb, 2005.

**Filogenetska analiza životinja iz reda zvijeri usporedbom kontrolnih regija
mitohondrijske DNA**

Maja Maurić i Lana Pađen

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Maurić, M., L. Pađen: Filogenetska analiza životinja iz reda zvijeri usporedbom

kontrolnih regija mitohondrijske DNA

SAŽETAK

Cilj ovog rada je kvantificirati evolucijski odnos životinjskih vrsta, reda zvijeri, korištenjem kontrolne regije mitohondrijske DNA. U analizi je uspoređeno 17 kontrolnih regija različitih životinja koje žive u Hrvatskoj; četiri vuka (*Canis lupus*), četiri pasa (*Canis lupus familiaris*), četiri euroazijska risa (*Lynx lynx*), tri lisice (*Vulpes vulpes*), dva smeđa medvjeda (*Ursus arctos*) i jednog jazavac (*Meles meles*). Korištene su sekvence iz genske baze podataka, GenBank, koje su kompjuterskim programima uspoređene i opisane, na temelju čega je napravljen filogenetsko stablo. Stablo pokazuje klasičnu sistematiku vrsta. Pronađena su specifična mjesta u kontrolnim regijama, bitna za razlikovanje vrsta zvijeri. Ovim radom su ustanovljene teoretske osnove za razvijanje metode lančanom reakcijom polimeraze za identifikaciju različitih vrsta zvijeri iz hrvatskih šuma na temelju minimalnih količina tkiva.

Ključne riječi: mitohondrijska DNA, filogenetsko stablo, zvijeri

Uvod

Republika Hrvatska je jedna od rijetkih zemalja u čijim šumama još možemo naći sve tri velike zvijeri: vuka (*Canis lupus*), euroazijskog risa (*Lynx lynx*) i smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*). Vuk i euroazijski ris su ugrožene i zakonom zaštićene vrste. U hrvatskim šumama žive još neke vrste iz reda zvijeri: lisica (*Vulpes vulpes*), te jazavac (*Meles meles*).

Životinjska mitohondrijska DNA (mtDNA) posjeduje nekoliko važnih svojstava: prisutna je u svim tkivima, ima mali genom jednostavne strukture, nema nekodirajućih dijelova (introna), ima različitu stopu evolucije u svojim pojedinim dijelovima, što omogućuje rješavanje filogenetskih pitanja na različitim taksonomskim razinama (ZHANG i HEWITT, 1996.). MtDNA je mala, kružna, dvolančana DNA molekula između 15 000 i 20 000 parova baza. Sadrži 37 gena, od čega 22 tRNA gena, 2 rRNA gena, 13 gena koji kodiraju za proteine uključene u transport elektrona i oksidativnu fosforilaciju, te nekodirajući dio veličine 1000 parova baza koji zovemo kontrolnom regijom i u kojoj započinje replikacija i transkripcija mitohondrijskog genoma. U kontrolnoj regiji mtDNA nalazi se D – petlja (D – loop), trolančana struktura koja nastaje tijekom replikacije, a često se taj naziv upotrebljava i kao sinonim za kontrolnu regiju (TABERLET, 1996., WHITE i sur., 1998.). MtDNA podložna je brzjoj evoluciji. Dijelovi kontrolne regije evoluiraju četiri do pet puta brže od ostatka molekule mtDNA, što kontrolnu regiju čini jednom od najvarijabilnijih dijelova mtDNA (TABERLET, 1996., PAGE i HOLMES, 1998.). Kontrolna regija ne kodira za sintezu proteina i zbog toga ne podliježe prirodnoj selekciji te je zbog toga pogodna za filogenetska istraživanja.

Uspoređivanjem više kontrolnih regija različitih porodica zvijeri, htjeli smo pronaći specifična mjesta pomoću kojih bismo mogli razlikovati spomenute životinjske vrste. U ekološkim istraživanjima i gospodarenju s određenim životinjskim vrstama važno je odrediti kojoj vrsti pripada određeni uzorak, kao što je izmet, dlaka, krv ili komad tkiva. U gospodarenju smeđim medvjedom u Republici Hrvatskoj, za praćenje dinamike populacije

medvjeda, materijal za dobivanje DNA za genetičku identifikaciju jesu uzorci svježeg izmeta medvjeda (DEČAK i sur., 2005.) Plan upravljanja risom i vukom u Hrvatskoj također se temelji na poznavanju, praćenju i određivanju veličine populacija tih životinja. (FIRŠT i sur., 2005., FRKOVIĆ i sur., 2005.)

JOHNSON i sur. (2004.) su uspoređujući kontrolne regije mtDNA definirali metodu za određivanje prisutnosti risa na određenom području. GOERLITZ i sur. (2003.) su na temelju mtDNA odredili iz kojih dijelova svijeta u Kalifornijski zaljev tijekom zime dolaze kitovi.

Cilj ove studije je ustanoviti molekularne razlike između životinjskih vrsta i time postaviti teoretske osnove za razvijanje neinvazivnih metoda za razlikovanje vrsta iz uzoraka s malom količinom DNA.

Comment [T1]: par primjera

Materijal i metode

Za filogenetsku analizu koristili smo sekvence mitohondrijske DNA (mtDNA), uzete iz genske baze podataka, GenBank, koja se nalazi na internet adresi:

www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/. U radu smo koristili četiri mtDNA vuka, četiri mtDNA psa, četiri mtDNA euroazijskog risa, tri mtDNA lisice i po jednu mtDNA jazavca i medvjeda.

U tablici 1. navedena je vrsta životinje, identifikacijski broj u genskoj bazi, te zemljopisno područje iz kojeg potječu uzorci čije su sekvence korištene u ovom radu.

Tablica 1. Podaci o korištenim sekvencama preuzetim iz GenBank baze

oznaka životinje	identifikacijski broj GenBank baze	područje iz kojeg potječe uzorak	referenca
vuk1	AY570180.1	Iran	ARDALAN i sur., 2004.
vuk2	AY570181.1	Iran	ARDALAN i sur., 2004.
vuk3	AY570178.1	Iran	ARDALAN i sur., 2004.
vuk4	AY570179.1	Iran	ARDALAN i sur., 2004.
ris1	AY034815.1	Švedska	HELLBORG i sur., 2002.
ris2	AY034813.1	Švedska	HELLBORG i sur., 2002.
ris3	AY034814.1	Švedska	HELLBORG i sur., 2002.
ris4	AY034816	Švedska	HELLBORG i sur., 2002.
pas1	AY570154	Iran	ARDALAN i sur., 2004.
pas2	AY570158	Iran	ARDALAN i sur., 2004.
pas3	AY570153	Iran	ARDALAN i sur., 2004.
pas4	AY570152	Iran	ARDALAN i sur., 2004.
lisica1	AF098155	Kanada	KOOP i sur., 1998.
lisica2	D83639	Japan	OKUMURA i sur., 1996.
lisica3	AJ585358	Irska	STATHAM i sur., 2003.
jazavac	AJ585349	Irska	STATHAM i sur., 2003.
medvjed1	AB013045	Japan	MATSUHASHI i sur., 1999.
medvjed2	AB055141	Japan	MATSUHASHI i sur., 1999.

Korištenjem programskog dodatka u Microsoft Wordu, MBCS1.2, smo sekvence mtDNA pretvorili u fasta format, da bi ih mogli koristiti u daljnjoj obradi.

Koristeći programe BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 5.0.6. (HALL, 1999.) i ClustlW Multiple alignment (THOMPSON i sur., 1994.), sekvence različitih životinja smo usporedili međusobnim poravnanjem (multiple alignment). Budući da za sekvencioniranje kontrolnih regija nisu korištene iste početnice, kontrolne regije nisu započinjale na istoj sekvenci niti su na istoj završavale. Da bi mogli uspoređivati sekvence morali smo krajeve kontrolnih regija odrezati, tako da sve započinju i završavaju na istom mjestu.

Sekvence smo rezali tako da smo ih kopirali u program Notepad i uz pomoć opcija Edit i Find uklonili baze koje ne trebamo. Tako dobivene sekvence ponovno smo stavili u program BioEdit Sequence Alignment i opet ih, uz pomoć ClustalW Multiple alignment, međusobno poravnali. Koristeći program Mega2.1 (KUMAR i sur., 2001.) izračunato je kolika je sličnost između pojedinih sekvenci kontrolnih regija te je na temelju toga napravljeno filogenetsko stablo životinjskih vrsta, čije smo mtDNA sekvence obrađivali.

Rezultati

Evolucijska analiza šest životinjskih vrsta temeljena na usporedbi 263 baza kontrolne regije mitohondrijske DNA (mtDNA) prikazana je u tablici 2. U tablici su poravnate sekvence 18 životinja te su vidljive različitosti i sličnosti između njih.

Kontrolna regija vuka i psa pokazuje najveću sličnost, a specifično mjesto po kojem se razlikuju je 123. mjesto gdje sva četiri psa imaju bazu gvanin dok svi vukovi na tom mjestu imaju bazu adenin.

Parovi baza od mjesta 88. do 98. i 120 do 125. su dva niza sekvenci po kojima se lisice razlikuju od ostalih životinja, a međusobno te dijelove imaju jednake.

Dva specifična mjesta po kojima se risovi razlikuju od ostalih životinja su od 149. do 156. mjesta i od 120. do 125. mjesta. Risovi se međusobno razlikuju samo na dva mjesta u jednoj bazi i to na 104. i 196. mjestu.

Kod medvjeda je vidljiva dugačka specifična sekvenca koja ga razlikuje od ostalih životinja a nalazi se u rasponu od 105. do 128. mjesta.

Kontrolna regija kod jazavca je najrazličitija u usporedbi s ostalim životinjama i podudara se većim dijelom samo u drugom dijelu kontrolne regije, od 150. do 263. mjesta, a taj dio pokazuje u svih obrađenih vrsta veću konzerviranost.

Tablica 2. Poravnate sekvence kontrolnih regija obrađenih životinja

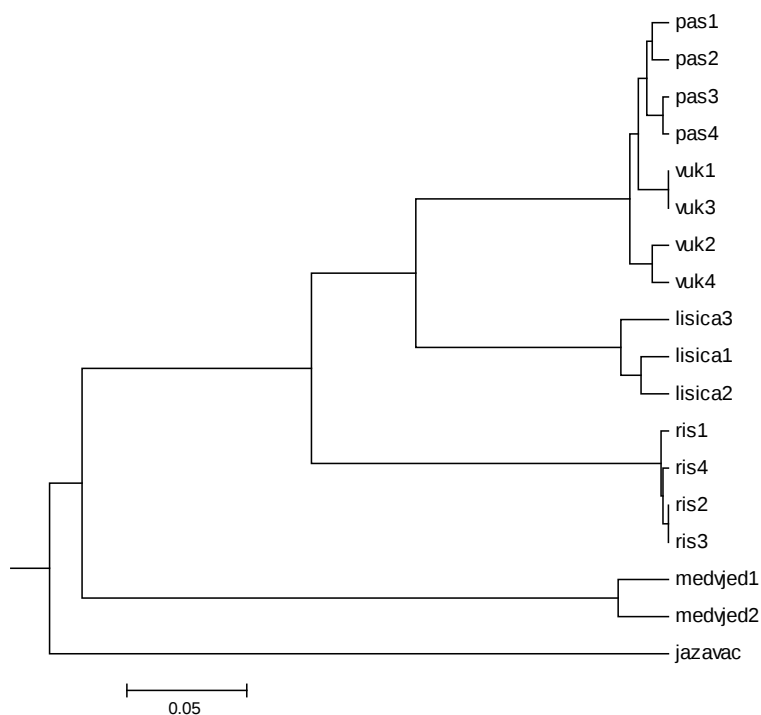
	10	20	30	40	50	60	70
vuk1	TTTGCCC-CATGCATAT-A-AGCATGTACATAATA	TTATATC-CT-TACATA-GGACATACTT--ACTCA					
vuk2				T-.....		T.A--.....	
vuk3							
vuk4				T-.....		TCA--.....	
pas1						T.A--.....	
pas2						T.A--.....	
pas3						T.A--.....	
pas4						T.A--.....	
lisica1	.A.....		TAC.....	A-A.....		-A.....	AT-GT.T
lisica2	.A.....	A.....	T.....	TAT.....	A-A.....		GT.AT-GT.T
lisica3	.A.....		T-G.....	TAC.....	A-A.....		AT-GT.T
ris1	.AGT.....	A.....	T.....	GT.GT.....	ATA.....		A.AGTG..T
ris2	.AGT.....	A.....	T.....	GT.GT.....	ATA.....		A.AGTG..T
ris3	.AGT.....	A.....	T.....	GT.GT.....	ATA.....		A.AGTG..T
ris4	.AGT.....	A.....	T.....	GT.GT.....	ATA.....		A.AGTG..T
medvjed1	.CCC...CT...T...	CG-T...TA.TGGCG.GCCCC..GCA.A..AGC.T.T...					T.AC-G..TG
medvjed2	.CCC...CT...T...	CG-T...TA.TGGCG.GCCCC..GCA.A..AGC.T.T...					GT.AC-G..TG
jazavac	..CAATT-...A...T.A.C.AT.CC....GC..T..C.CAGTACGC..C.TCTTC.C.C.CCTATG.AC						

	80	90	100	110	120	130	140
vuk1	ATCTCACAA--TTTCAC-TGATCTAT-CAA-----CAG--TAATCAAA---TGCATAT-CAC						
vuk2	T.....	T..G.....	G-----				
vuk3							
vuk4	T.....	T.....	G..G-----				
pas1	T.G-----	T-----					
pas2	.C...T.G-----				G.....		
pas3			T-----				
pas4	T.....		T-----				
lisica1	T.....	AAT.....	CTATC.G-G.G-----		CATG.C-----		CG.....
lisica2	T.....	AAT.....	CTATC.G-G.G-----		CATG.C-----		CG.....
lisica3	T.....	AAT.....	CTGTC.G-G.G-----		TATG.C-----		CG.....
ris1	..GTG..T-----	AT..-CTTG..C.AG.G-----			CC.TC-----		G.CC...A
ris2	..GTG..T-----	AT..-CTTG..C.AG.G-----			CC.TC-----		G.CC...A
ris3	..GTG..T-----	AT..-CTTG..C.AG.G-----			CC.TC-----		G.CC...A
ris4	..GTG..T-----	AT..-CTTG..C.AG.G-----			CC.TC-----		G.CC...A
medvjed1	G...T...TA-----	AGG..T.ACGT.CCGA..GCTTATT			G-CGTATGGTCTG		AAGC..GT.T
medvjed2	G...T...TA-----	AGG..T.ACGT.CCGA..GCTTATT			G-CGTATGGTCTG		CAAGC..GT.T
jazavac	G..GTG..T	ACTGGT..GC.CCATG.ATATA.GCATGTACAT.TAG.GG.TG.TATGACAT.AG.G..T					

	150	160	170	180	190	200	210
vuk1	TTAGTCCAAT--AAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTA-ATGTCCTCT						
vuk2							
vuk3							
vuk4							
pas1							
pas2							
pas3							
pas4							
lisica1		A..T.....				A..G.A.....	
lisica2		A..T.....				T.A..G.A.....	
lisica3		G..-A..T.....				A..G.A.....	
ris1	C.....	GA--GGAA.....	TG.T.....		G...T.....	A.CG...A.....	
ris2	C.....	GA--GGAA.....	TG.T.....		G...T.....	A.CG...A.....	
ris3	C.....	GA--GGAA.....	TG.T.....		G...T.....	A.CG...A.....	
ris4	C.....	GA--GGAA.....	TG.T.....		G...T.....	T.A.CG...A.....	
medvjed1	..CACTT.G.CCGG.A...	G.....	G.....		G.....	GA..CG...A.....	
medvjed2	..CACTT.G.CCGG.A...	G.....	G.....		G...T.....	GA..CG...AT.....	
jazavac	..CACTT.GATC.C.A...	G.....	A.....		T.....	TA..AC-G.A.A.....	

	220	230	240	250	260
vuk1		TCTCGCTCCGGGCCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTG			
vuk2					
vuk3					
vuk4					
pas1					
pas2					
pas3					
pas4					
lisica1		TC.....T.....G.....			
lisica2		TC.....T.....G.....			
lisica3		GTC.....T.....G.....			
ris1		CTC.....T.....A.C.G.....			
ris2		CTC.....T.....A.C.G.....			
ris3		CTC.....T.....A.C.G.....			
ris4		CTC.....T.....A.C.G.....			
medvjed1		GG-GGT.....T.....GT.....			
medvjed2		G-..T.....T.....GT.....T.....			
jazavac		CG-..T.....T.....AC.....			

ružičasto - specifično mjesto za razlikovanje vuka i psa od ostalih obrađenih vrsta
 plavo - specifično mjesto za razlikovanje vuka i psa
 smeđe - specifična mjesta za razlikovanje lisice od ostalih obrađenih vrsta
 žuto - specifična mjesta za razlikovanje euroazijskog risa od ostalih obrađenih vrsta
 zeleno - specifična mjesta za razlikovanje lisice od ostalih obrađenih vrsta
 crveno - specifična mjesta za razlikovanje smeđeg medvjeda od ostalih obrađenih vrsta



Slika 1. Filogenetsko stablo obrađenih životinja

Slika 1. pokazuje grafički evolucijski odnos dobiven na temelju usporedbe kontrolnih regija mtDNA. Životinje koje su bliže, međusobno su sličnije i obrnuto. Psi su vrlo slični s vukovima, dok se nešto više razlikuju od lisica. Ris i medvjed dosta se razlikuju od psa, vuka i lisice. Jazavac se najviše izdvojio i pokazuje najveće razlike u usporedbi s ostalim vrstama životinja.

Rasprava

Kontrolne regije vukova i pasa međusobno su najbližije što se poklapa sa evolucijom pasa i njihovom morfološkom sličnošću s vukovima. Dobiveno filogenetsko stablo se poklapa sa klasičnim filogenetskim stablima koja su dobivena na temelju morfologije, embriologije, paleontologije itd. Veliku sličnost na molekularnoj razini pokazuju lisica i vuk što se podudara sa njihovom klasifikacijom i pripadanju istoj porodici kanida (Canidae).

Risovi su međusobno vrlo slični, međusobno se razlikuju samo u dvije baze, što se može objasniti povjешću risje populacije u Skandinaviji koja je proživjela pojavu "uskog grla" a time i smanjenu genetsku raznolikost (HELBORG i sur., 2002.)

Ovakva različitosti na molekularnom nivou između životinjskih vrsta danas se intenzivno koristi u evolucijskim istraživanjima a primjenjuju se u ekologiji, zaštiti i gospodarenju pojedinim divljim vrstama. Tako su PALOMARES i sur. (2002.) ove spoznaje primijenili za istraživanje iberijskog risa, CIUCCI i sur. (2003.) su istraživali i uspoređivali vukove i pse. Filogenetski položaj tuljana, Pinnipedia, na temelju molekularnih razlika istraživali su COREY i sur. (2004.).

Ova istraživanja pokazuju i izrazitu važnost u konzervacijskoj genetici jer ukazuju na genetske sličnosti, tj. stupanj razlike, između pojedinih populacija ali i unutar same populacije. Tako TABERLET i BOUVET (1994.) i RANDI i sur. (1994.) svojim istraživanjima malih populacija smeđeg medvjeda u Europi upućuju na opasnost od

izumiranja pojedinih populacija zbog prevelike genetske sličnosti i križanja u srodstvu te daju teoretske osnove za eventualno premještanje životinja između različitih populacija.

Utvrdjivanje molekularnih razlika između životinja je preduvjet za razvijanje metode lančane reakcije polimeraze kojom bi se na temelju minimalne količine tkiva mogle razlikovati pojedine vrste životinja, a time i određivati prisustvo vrsta na pojedinom području. Na temelju molekularnih razlika iberijskog risa od ostalih vrsta PALOMARES i sur. (2002.) razvijaju metodu određivanja prisutnosti i rasprostranjenosti iberijskog risa na Pirinejskom poluotoku.

Zaključci

1. Na temelju uspoređenih sekvenci pronađene su razlike između životinjskih vrsta.
2. U sekvencama mitohondrijske DNA postoje specifična mjesta prema kojima se vrste mogu razlikovati
3. Dobiveno filogenetsko stablo poklapa se s klasičnom sistematikom zvijeri.

Zahvala

Zahvaljujemo se našim mentorima Tomislavu Gomerčiću, dr. vet. med. i Martini Đuras Gomerčić, dr. vet. med. na strpljenju, stručnom i tehničkom vodstvu pri izradi ovog rada.

Literatura

- ARDALAN, A., P. SAVOLAINEN, M. HOUSHMAND, S. R. MIRAEI - ASHTIANI (2004.): Partial D – loop nucleotide sequence of wolf mitochondrion. Iz EMBL-Nucleotide sequence database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).
- CIUCCI, P., V. LUCCHINI, L. BOITANI, E. RANDI (2003.): Dewclaws in wolves as evidence of admixed ancestry with dogs. Can. J. Zool. 81, 2077–2081.

- COREY, S. D., I. DELISLE, I. STIRLING, D. B. SINIFF, C. STROBECK (2004.): A phylogeny of the extant Phocidae inferred from complete mitochondrial DNA coding regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33, 363–377.
- DEČAK, Đ., A. FRKOVIĆ, M. GRUBEŠIĆ, Đ. HUBER, B. IVIČEK, B. KULIĆ, D. SERTIĆ, Ž. ŠTAHAN (2005.): Plan gospodarenja smeđim medvjedom u Republici Hrvatskoj. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, Uprava za lovstvo, Ministarstvo kulture, Uprava za zaštitu prirode. Hrvatska.
- FIRŠT, B., A. FRKOVIĆ, T. GOMERČIĆ, Đ. HUBER, I. KOS, D. KOVAČIĆ, J. KUSAK, A. MAJIĆ – SKRBINŠEK, D. SPUDIĆ, M. STARČEVIĆ, Ž. ŠTAHAN, A. ŠTRBENAC (2005.): Plan upravljanja risom u Hrvatskoj. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Hrvatska.
- FRKOVIĆ, A., Đ. HUBER, J. KUSAK, A. ŠTRBENAC, B. KRSTINIĆ, A. MAJIĆ-SKRBINŠEK, S. DESNICA, J. JEREMIĆ-MARTINKO, P. ŠTRBENAC, N. SKROZA, D. ŠARIĆ, I. PULIĆ (2005.): Plan upravljanja vukom u Hrvatskoj. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Hrvatska.
- GOERLITZ, D. S., J. URBAN, L. ROJAS – BRACHO, M. BELSON, C. M. SCHAEFF (2003.): Mitochondrial DNA variation among Eastern North Pacific gray whales (*Eschrichtius robustus*) on winter breeding grounds in Baja California. *Can. J. Zool.* 81, 1965–1972.
- HALL, T. A. (1999.): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- HELLBORG, L., C. W. WALKER, E. K. RUENESS, J. E. STACY, I. KOJOLA, H. VALDMANN, C. VILA, B. ZIMMERMANN, K. S. JAKOBSEN, H. ELLEGREN (2002.): Differentiation and levels of genetic variation in northern European lynx

- (*Lynx lynx*) populations revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. Conservation Genetics 3, 97-111.
- JOHNSON, W. E., J. A. GODOY, F. PALOMARES, M. DELIBES, M. FERNANDES, E. REVILLA, S. J. O'BRIEN (2004.): Phylogenetic phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. Journal of Heredity 95, 19–28.
- KOOP, B. F., S. CROCKFORD, M. BURBIDGE, A. BYUN, U. RINK (1998.): Polyphiletic origin of dogs. Iz EMBL-Nucleotid sequence database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).
- KUMAR, S., K. TAMURA, I. B. JAKOBSEN, M. NEI (2001.): MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- MATSUHASHI, T., R. MASUDA, T. MANO, M. C. YOSHIDA (1999.): Microevolution of the mitochondrial DNA control region in the Japanese brown bear (*Ursus arctos*) population. Mol. Biol. Evol. 16, 676-684
- OKUMURA, N., N. ISHIGURO, M. NAKANO, A. MATSUI, M. SAHARA (1996.): Intra and interbreed genetic variations of mitochondrial DNA major noncoding regions in Japanese native dog breeds (*Canis familiaris*). Anim. Genet. 27, 397–405.
- PAGE, R. D. M., E. C. HOLMES (1998.): Molecular evolution a phylogenetic approach. Oxford University press. Oxford.
- PALOMARES, F., J. A. GODOY, A. PIRIZ, S. J. O'BRIEN, W. E. JOHNSON (2002.): Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for Iberian lynx. Molecular ecology 11, 2171–2182.
- RANDI, E., L. GENTILE, G. BOSCAGLI, D. HUBER, H. U. ROTH (1994.): Mitochondrial DNA sequence divergence among some west European brown bear (*Ursus arctos* L.) populations. Lessons for conservation. Heredity. 73, 480-489.

- STATHAM, M. P. D. TURNER, C. O'REILLY (2003.): Use of mitochondrial D – loop amplification and restriction analysis for Mustelids in Ireland. Iz EMBL-Nucleotid sequence database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).
- TABERLET, P., J. BOUVET (1994): Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proc Biol Sci.* 22, 195-200.
- TABERLET, P. (1996.): The use mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. U: *Molecular genetics approaches in conservation* (T. B. Smith, R. K. Wayne, urednici). Oxford University press. New York, Oxford. str. 125–142.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON (1994.): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- WHITE, P. S. O. L. TATUM, H. TEGELSTROM, L. D. DENSMORE III (1998.): Mitochondrial DNA isolation, separation and detection of fragments. U: *Molecular genetic analysis of population* (A. R. Hoelzel, urednik). Oxford University press. New York. str. 65–101.
- ZHANG D-X, G. M. HEWITT (1996.): Nuclear intergrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in ecology and evolution* 11, 247–251.

Maurić, M., L. Paden: Phylogenetic analysis of carnivore comparing the control region of the mitochondrial DNA

ABSTRACT

The objectives of this study were to quantify the evolutionary relationship of carnivore species using control region of mitochondrial DNA sequence variation. In analysis we compared 17 control regions of different animals who live in Croatia; 4 grey wolf (*Canis lupus*), 4 dog (*Canis lupus familiaris*), 3 fox (*Vulpes vulpes*), 4 lynx (*Lynx lynx*), 2 bears (*Ursus arctos*), 1 badger (*Meles meles*). We took these sequences from gene database on Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/) and with computer programs compared control regions, describe patterns and made phylogenetic tree. This tree showed a typically classic systematic of species. We found specific places in control regions for differentiation carnivore species. In the future, using this specific locus is possible to design primers for PCR reactions, so we can distinguish different carnivore species in Croatian forest.

Key words: mitochondrial DNA, phylogenetic tree, carnivores
