

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta tropického zemědělství



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta tropického
zemědělství**

**Populační genetika vlka obecného (*Canis lupus*)
v Eurasii**

Bakalářská práce

Praha 2016

Vedoucí bakalářské práce:
Mgr. Barbora Černá Bolfíková, Ph. D.

Vypracovala:
Alžběta Báčová

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma „Populační genetiky vlka obecného (*Canis lupus*) v Eurasii“ vypracovala samostatně a všechny použité literární prameny jsem řádně uvedla v referencích.

V Praze dne 12. 4. 2016

Alžběta Báčová

Poděkování

Tímto děkuji vedoucí mé práce Mgr. Barboře Černé Bolfíkové, Ph. D. za trpělivost, odborné vedení a velmi cenné rady v průběhu zpracování celé práce, Ing. Mileně Smetanové a Ing. Silvii Neradilové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

Dále děkuji Hnutí DUHA Olomouc a Mgr. Miroslavu Kutalovi, Ph. D. za zasílání vlčích vzorků, bez kterých by má práce nemohla být.

V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině a všem mým přátelům, kteří mě podporovali během celého studia.

Abstrakt

Vlk obecný (*Canis lupus*) je největší psovitou šelmou obývajícím severní polokouli Země. Kvůli nadměrnému pronásledování však byl na většině svého území na přelomu 19. a 20. století téměř vyhuben. Oblasti jeho výskytu se v té době rapidně zmenšily. Koncem 20. století, zejména díky lepší legislativní ochraně v mnoha státech Evropy, se jeho stavy začaly zvyšovat a vlk se tak začal pozvolna navracet do svého původního areálu, který je především v oblasti západní Evropy vysoce fragmentovaný. Sledováním genového toku mezi populacemi se snažíme odhadnout místa původu zakladatelů jednotlivých populací či sledovat trasy migrujících jedinců. V posledních patnácti letech se vlk začal vracet i do české krajiny. Pomocí mikrosatelitových markerů byla vyhodnocena přítomnost vlka na území České a Slovenské republiky v oblasti Beskyd. Při porovnání DNA zkoumaných vzorků s DNA karpatských vlků bylo zjištěno, že obě skupiny patří do jedné subpopulace v rámci Evropy. Při detailnějším rozdělení byla naznačena strukturovanost i v rámci subpopulace.

Klíčová slova: *Canis lupus*, genetická variabilita, populace, příbuznost, mitochondriální DNA, mikrosatelity

Abstract

The grey wolf (*Canis lupus*) is the largest canine carnivore living on northern hemisphere of the Earth. Excessive persecution of *Canis lupus* at the turn of 19th and 20th century has caused nearly extermination of this animal species in the most parts of its natural habitat. Natural habitat got rapidly smaller at that time. At the end of 20th century number of individuals of *Canis lupus* has increased and the grey wolf has started to return to its natural habitat due to better legal protection. Its natural habitat is very fragmented especially in Western Europe. The origin of founders of wolf populations is estimated and the tracks of migrating individuals are followed, by monitoring the gene flow. In last fifteen years the grey wolf has started to return back to Czech countryside. Usage of microsatellites proved its presence in Beskyd Mountains, Czech and Slovakia republic. Comparing DNA samples of *Canis lupus* with those of Carpathian wolves showed the same origin of both groups within Europe. Detailed research points to deeper structure even within subpopulation.

Keywords: *Canis lupus*, genetic variability, population, relatedness, mitochondrial DNA, microsatellites

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle literární rešerše.....	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	Populační genetik.....	3
3.1.1	Populace.....	3
3.1.2	Genetické markery.....	3
3.1.3	Mikrosatelitní DNA.....	4
3.1.4	MtDNA.....	5
3.1.5	Polymerázová řetězová reakce - PCR.....	6
3.2	<i>Canis lupus</i>	7
3.2.1	Charakteristiky.....	7
3.2.2	Rozšíření.....	8
3.2.3	Vývoj populací.....	9
3.2.4	Vliv klimatu a potravy na genetickou stukturu populací.....	11
3.2.5	Fragmentace.....	13
3.2.6	Dnešní populace v Evropě.....	14
3.2.6.1	Iberijská populace.....	15
3.2.6.2	Sierra Morena.....	16
3.2.6.3	Alpská populace.....	17
3.2.6.4	Apeninská populace.....	18
3.2.6.5	Dinársko-balkánská.....	19
3.2.6.6	Skandinávská populace.....	21
3.2.6.7	Karelsko-finská populace.....	22
3.2.6.8	Baltská populace.....	24
3.2.6.9	Karpatská a středoevropská populace.....	25

3.2.6.9.1	Polsko	25
3.2.6.9.2	Středoevropská populace – Německá část	26
3.2.6.9.3	Karpatská populace	27
3.2.7	Vlci na území České republiky.....	29
3.2.7.1	Výskyt v minulosti	29
3.2.7.2	Současný výskyt	29
4	Cíle praktické části	32
5	Materiál	32
6	Metodika	34
7	Výsledky	37
8	Diskuze	41
9	Závěr.....	43
10	Reference	44

Seznam obrázků

Obrázek 1: Mikrosatelitové alely. (Chinese Academy of Fishery Science, 2016).....	5
Obrázek 2: Mitochondriální DNA. (National Human Genome Research Institute, 2016) 6	
Obrázek 3: Trasa vlka z německé Lužice. (© BfN (Federální agentura ochrany přírody, Německo) a LUPUS Wildlife Consulting).	8
Obrázek 4: Rozšíření vlka obecného ve světě. Žluté jsou oblasti výskytu, červená je oblast vyhubení. (IUCN, 2016).....	9
Obrázek 5: Rozdělení evropské populace vlků do deseti částí podle geografického rozšíření. (Chapron <i>et al.</i> , 2014)	15
Obrázek 6: <i>Canis lupus signatus</i> . (Fernando DM, 2014).....	16
Obrázek 7: Populace na Pyrenejském poloostrově (2005). Horní Iberijská populace, níže populace v Sierře Moreně. (Álvares <i>et al.</i> , 2005)	17
Obrázek 8: Rozšíření vlka obecného v Alpách. (Marucco, 2011)	18
Obrázek 9: Apeninská populace přecházející v populaci alpskou v roce 2010. (Boitani <i>et al.</i> , 2010).....	19
Obrázek 10: Dinárskou-balkánská populace. (WWF, 2016).....	20
Obrázek 11: Skandinávská populace v roce 2015. (Rovdata, 2015).....	21
Obrázek 12: Trasa jedince označeného GPS lokalizátorem v roce 2003. (Aspi <i>et al.</i> , 2009)	23
Obrázek 13: Čtyři subpopulace (S1-S4) vlků v Polsku založené na mtDNA. V pravé části frekvence haplotypů v rámci populace. (Czarnomska <i>et al.</i> , 2013)	25
Obrázek 14: Rozšíření vlků v Německu 2013/2014. (Reinhardt <i>et al.</i> , 2015)	27
Obrázek 15: Středoevropská populace. (Naturschutzbund Deutschland, 2014).....	27
Obrázek 16: Distribuce vlčích smeček pojmenovaných Bukowy, Grapa, Groń, Czort a Halny v polských a slovenských Karpatech a Slezských Beskydech v letech 1996 – 2003. (Nowak <i>et al.</i> , 2008)	28
Obrázek 17: Vlk zachycený fotopastí na Šumavě na začátku roku 2015. (Hnutí DUHA, 2015a)	30
Obrázek 18: Fotopast zachytila vlče několikrát během července a srpna 2014. (©AOPK ČR, 2014)	31

Obrázek 19: Lokality nálezů vzorků na mapě.	32
Obrázek 20: Izolační kit.	34
Obrázek 21: Lokality vyizolovaných vzorků.	37
Obrázek 22: Při $K=2$ došlo ke zřetelnému rozdělení sledované skupiny jedinců. Zelená značí vlčí genotyp, červená psí.	38
Obrázek 23: Při $K=3$ je naznačena struktura vlčí populace. Psí část zůstává stejná.	38
Obrázek 24: Při $K=4$ došlo k rozdělení psí populace na dvě plemena (Československý vlčák, Německý ovčák. Vlčí populace přibližně stejná jako při $K=3$	38
Obrázek 25: Výsledný graf z programu Structure Harvester (Earl Dent & von Holdt, 2012) zobrazující podporu pro klastry vymezené programem STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000). Jednoznačně největší je při $K=2$	39
Obrázek 26: Výsledný graf znázorňující genetické rozdíly mezi jedinci. ČV= Československý vlčák, NO= Německý ovčák.	40

Seznam tabulek

Tabulka 1: Tabulka se vzorky a podrobnějšími informacemi. Sloupec „izolace“ vypovídá o úspěšnosti izolace (1=úspěšné, 0= neúspěšné).....	33
Tabulka 2: Tabulka vyizolovaných vzorků.	37
Tabulka 3: Populační charakteristiky. N_a (počet alel), H_o (pozorovaná heterozygotita), H_e (očekávaná heterozygotita), F_{is} (koeficient inbreedingu), procentuální zastoupení privátních alel v genomu (číslo je průměrem jednotlivců populace), počet privátních alel v genomu (číslo je průměrem jednotlivců populace).	39

Seznam zkratek

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ATE	vymývací pufr
BfN	Das Bundesamt für Naturschutz
AOPK ČR	Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky
CHKO	chráněná krajinná oblast
IUCN	Mezinárodní svaz ochrany přírody (International Union for Conservation of Nature)
mtDNA	mitochondriální DNA
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid (redukováná forma)
PCR	polymerázová řetězová reakce
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSR	mikrosatelity
WAG	Wolf Alpine Group
WWF	Světový fond na ochranu přírody (World Wide Fund for Nature)

1 Úvod

Vlk obecný (*Canis lupus*) je psovitá šelma žijící ve smečkách s pevnou sociální hierarchií. Původně obýval téměř celou severní polokouli. K velkým poklesům stavů došlo na většině evropského území v první polovině 20. století (Mech & Boitani, 2010). Avšak ke konci téhož století se populace začaly pozvolna rozrůstat a tento trend má většina evropských populací dodnes. To se bohužel netýká populace v Sierře Moreně a Karélii (Kaczensky et al., 2012).

S rostoucím počtem záznamů o výskytu vlků na území České republiky, se začínáme ptát, odkud k nám vlci přicházejí. Z neinvazivně sebraných vzorků (trus, moč) je možné vyizolovat jadernou či mitochondriální DNA a porovnat stejné typy DNA z jiných částí střední Evropy (Německo, Polsko, Slovensko) a podle podobnosti tak určit původ jedince.

Součástí každé jaderné DNA jsou mikrosatelity. Tyto mikrosatelity jsou krátké sekvence nukleotidů, jež se pravidelně několikrát opakují a nekódují žádný gen. Jsou však účinným nástrojem pro genetiky, protože fungují jako genetické markery a hojně se využívají při odhalování genového toku v dávné či recentní minulosti (De Groot et al., 2015). K tomuto účelu také slouží mitochondriální DNA, která má ale v porovnání s mikrosatelity rychlejší evoluční vývoj (Perez-Sweeney et al., 2003).

Na velikost a rozšiřování populací má vliv mnoho faktorů např. potrava, klima (Pilot et al., 2006), fragmentace krajiny lidskou činností (Lehman et al., 1992) i poslední doba ledová (Hewitt, 1996; Taberlet et al. 1998), která má za následek vymření vlků haploskupiny 2 na území Severní Ameriky (Pilot et al., 2010).

Dnešní Evropská populace čítá přibližně 32 000 jedinců (Mech & Boitani, 2004) a Chapron et al. (2014) ji podle geografického rozšíření rozdělil do deseti subpopulací.

Tato práce se podrobněji zabývá jednotlivými subpopulacemi a genovým tokem mezi nimi a také faktory, které tento tento tok ovlivňují.

2 Cíle literární rešerše

- Zjištění parametrů populačních charakteristik vlků obecných v oblasti Eurasie.
- Zhodnocení míry genetické variability populací a zjištění rozdílů mezi areály s fragmentovaným výskytem a spojitým výskytem vlků.
- Zjištění strukturovanosti populací v rámci celého areálu výskytu v Evropě a Asii.

3 Literární rešerše

3.1 Populační genetika

Populační genetika se zabývá uplatněním mendelovských a jiných genetických principů v populacích organismů. Vysvětluje přírodní genetickou rozmanitost, kterou dokumentuje a analyzuje. Můžeme také říct, že genetika populací zkoumá statiku a dynamiku genového fondu populací na základně alelových četností (Relichová, 2009).

3.1.1 Populace

Zprvu je velmi důležité přesně definovat vlastní pojem populace. Nejčastěji používaná definice ji popisuje jako skupinu jedinců určitého druhu, žijící v geograficky vymezeném areálu, kde se jedinci opačného pohlaví náhodně páří. Univerzální definice populace je však obtížná a může se lišit pro různé skupiny organismů, například jiná definice platí pro asexuální druhy. Jedinci v populaci se navzájem geneticky liší, přesto tento vnitrodruhový polymorfismus obvykle nepřesahuje polymorfismus mezidruhový.

3.1.2 Genetické markery

Jiang (2013) definuje genetické markery jako fragmenty DNA, které odhalují mutace či variace používající se k detekování polymorfismu mezi odlišnými genotypy nebo alelami pro konkrétní úseky DNA v populaci nebo genovém poolu. Identifikace jedinců, kryptických druhů či formulace fylogenetických hypotéz je možná především díky odlišným rychlostem substituce či evoluce různých genetických markerů (Solé-Cava, 2001). Hlavními technologiemi získání genetických markerů jsou izoenzymatické markery nebo markery, které jsou založené na fragmentaci DNA. Můžeme je klasifikovat do dvou skupin podle použité metody a to do skupiny DNA hybridizace (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism, minisatelity) nebo amplifikace (RAPD – Random Amplified Polymorphism DNA, AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism, SSR - mikrosatelity). Výběr metody záleží na několika kritériích. Pro studování jedinců, čeledí a populací jsou vhodné a užitečné markery, které se vyvíjejí rychleji. Naopak markery s pomalejší mutací je záhodno používat při studii druhů nebo supraspecifických taxonů (Grisolia & Moreno-Cotulio, 2012). Niegel (1996) rozděluje

použití genetických markerů v ochránářské oblasti do dvou způsobů. První způsob je založen na předpokladu, že genetické markery jsou používány k indikaci úrovně proměnlivosti a jejich rozptýlení v populacích určitých druhů – v genetické struktuře. Druhým způsobem je míra procesů, jako je migrace, které generují patrné efekty v rámci předlohy genetické proměnlivosti. Bruford *et al.* (1996) vyzdvihuje použití genetických markerů v malých populacích, speciálně v rámci ohrožených druhů. Jak dále uvádí, sekvence obsahují mnoho informací a materiál pro analýzy lze sbírat neinvazivními metodami. Ideální DNA markery by podle Jianga (2013) měly splňovat následující požadavky: vysoký stupeň polymorfismu, distribuce v celém genomu, dobře rozpoznatelné funkce alel (snadno rozpoznatelné), nízké náklady používání, neškodlivý efekt na fenotyp, vysoká dostupnost a schopnost duplikace kvůli sdílení dat mezi laboratořemi, kodominance projevu – rozlišení homozygotů a heterozygotů, snadné kopírování a žádný pleiotropní efekt.

3.1.3 Mikrosatelitní DNA

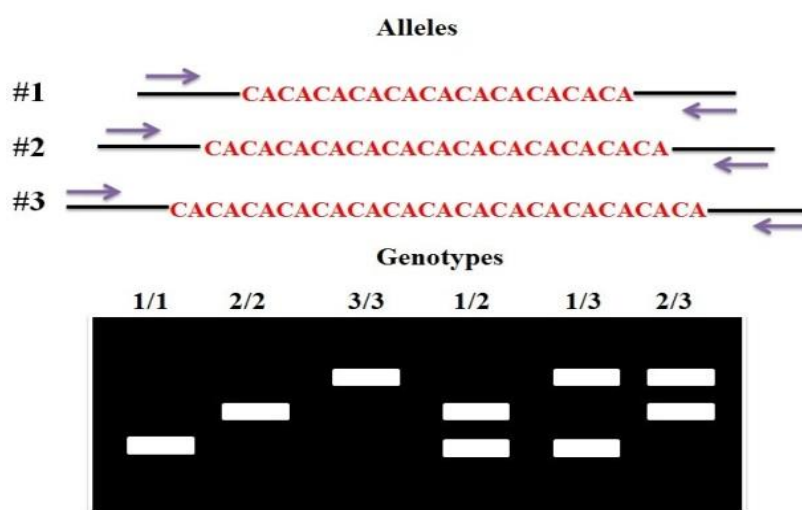
Mikrosatelity (Obrázek 1), jakožto lokusy DNA specifické obsahem mnohonásobných repetitivních dinukleotidů až hexanukleotidů daného sekvenčního motivu (Flegr, 2005), jsou nezbytnou součástí každého eukaryotického i prokaryotického genomu a mezi genetickými markery jsou populární (Kelkar *et al.*, 2010) i pro ekologické studie a využití v chovu (Awise, 2004).

Díky jejich hojnosti v rámci genomu je výhodné je využít k detekci míry neutrální genetické variability (Awise, 2004). Mají mnoho potřebných a specifických vlastností. Jiang (2013) zmiňuje například značnou úroveň polymorfismu alel. Obrovskou výhodou je získání dat neinvazivními metodami (vzorky trusu, moči). Získané vzorky nám umožňují zařadit testovaného jedince do populace (De Groot *et al.*, 2015), u které dokážeme určit i původ jednoho či více zakladatelů (Vilà *et al.*, 2003). Když tedy určíme populaci a jejího zakladatele, určíme i stupeň genového toku nejen mezi sousedními populacemi s čímž souvisí i detekce jevu tzv. bottleneck (= efekt hrdla láhve) v dávné či recentní minulosti (Lucchini *et al.*, 2004; Aspi *et al.*, 2006). Dále se v literatuře uvádí odhad efektivní velikosti populace (Aspi *et al.*, 2006) a detekce

stupně hybridizace (např. Godinho *et al.*, 2011; Hindrikson *et al.*, 2013; Randi *et al.*, 2014).

V rámci čeledi Canidae bylo rozpoznáno více než 30 000 lokusů, z nichž je 118 specifických pro vlky obecné (De Groot *et al.*, 2015).

Existují genomové knihovny, které jsou schopné najít v rámci studovaného druhu či taxonu konkrétní lokusy, které obsahují mikrosatelity, a podle sekvencí ohraničujících danou repetici z obou stran proběhne příprava dvojice specifických PRC primerů. Právě díky nim je možná amplifikace satelitu u daného druhu či u druhů příbuzných. Tato analytická metoda je velmi vhodná pro použití vnitropopulačně i vnitrodruhově (Flegr, 2005). Nevýhodou je složitost sdílení výsledků mezi laboratořemi (De Groot *et al.*, 2015), laboratoře v případě nutnosti musejí sdílet referenční vzorky, podle kterých si kalibrují jejich vlastní výsledky.

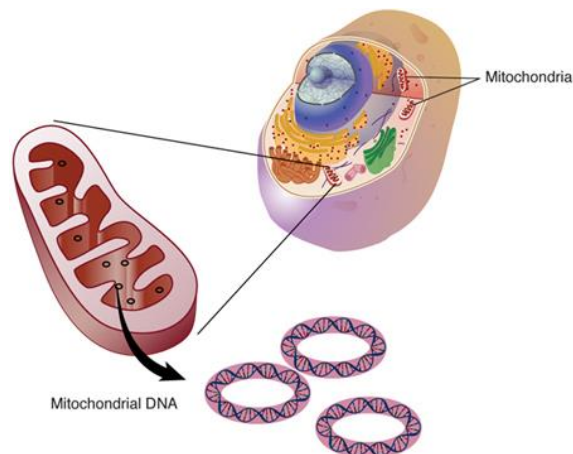


Obrázek 1: Mikrosatelitové alely. (Chinese Academy of Fishery Science, 2016)

3.1.4 MtDNA

V mitochondriích se nachází malé cirkulární molekuly DNA – mitochondriální DNA (mtDNA) (Obrázek 2). Snadno se izolují a jsou děděny maternálně (Frankham *et al.*, 2002). Jak uvádějí Hruban & Majzlík (2002), jejich genetická variabilita vzniká pouze mutacemi, protože zde nedochází k rekombinaci a samotná mtDNA obsahuje minimální počet nekódujících sekvencí. U obratlovců čítá jedna molekula kolem 15 000 párů bází (Hruban & Majzlík, 2002). Mitochondriální DNA je haploidní a má rychlejší

evoluční vývoj (Perez-Sweeney *et al.*, 2003) v porovnání s jadernými sekvencemi. V populačních studiích je hojně využíván kontrolní úsek, obzvláště jeho část zvaná D-loop, zatímco geny NADH komplexu, ribozomální geny a cytochromové geny jsou vhodnější ke studiu mezidruhových vztahů (Perez-Sweeney *et al.*, 2003).



Obrázek 2: Mitochondriální DNA. (National Human Genome Research Institute, 2016)

3.1.5 Polymerázová řetězová reakce - PCR

Anglicky Polymerase Chain Reaction je způsob množení vybraného úseku DNA v bezbuněčném systému. V podstatě DNA klonujeme. Využíváme změny teploty, primerů a DNA polymerázy. DNA polymeráza přiřazuje volné nukleotidy na denaturované vlákno. Primery použijeme dva. První, který označujeme jako kódující, jímž začíná 5'-konec genu a při procesu PCR pak ve směru transkripce probíhá prodlužování komplementárního vlákna. Druhý primer se označuje jako antikódující a činnost DNA polymerázy ukončuje.

Celý proces probíhá ve třech krocích – denaturační, renaturační a polymerační. Denaturační krok zahrnuje denaturaci vlákna DNA vlivem teploty 95°C. Dojde k rozvolnění vodíkových můstků a vlákna se od sebe oddělí. Následně proběhne renaturační krok a tzv. annealing. Teplota reakční směsi (DNA, primery, volné nukleotidy, DNA polymeráza, ionty) se krátce sníží na 40-60°C. Vodíkovými můstky se na komplementární úseky DNA napojí primery. Primery v běžné PCR jsou dlouhé 20 – 25 nukleotidů. Poslední krok – polymerační probíhající při 70 °C obsahuje vlastní syntézu, kdy termostabilní DNA-polymeráza prodlužuje primery podle sekvence řetězce, na který primer přisedl a syntetizuje tak další kopie řetězce.

Nadbytek složek PCR reakční směsi, která se skládá ze čtyř deoxyribonukleotidů (dA, dT, dC, dG), dále z primerů, DNA polymerázy a dalších potřebných iontů, dovoluje cykly opakovat, přičemž můžeme pozorovat, jak množství klonovaných kopií narůstá geometrickou řadou. Po 30 - ti cyklech, které trvají jen 2-3 hodiny se 1 klonovaná molekula zmnoží až milionkrát. Tato technika a její rozvoj byly to značné míry podmíněny izolací termostabilních DNA – polymeráz z mnoha různých druhů termofilních bakterií, protože právě tyto enzymy vydrží opakované zahřívání a to je důležité do dalších cyklů, kdy je nemusíme znovu přidávat do reakčních směsí.

3.2 *Canis lupus*

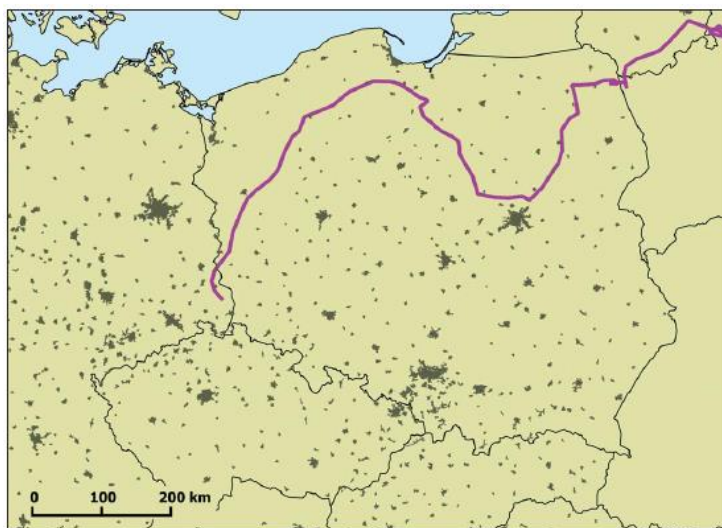
3.2.1 Charakteristiky

Canis lupus Linneaus, 1758 patří do čeledi Canidae, rodu *Canis* a v Evropě jej uvádíme jako největší psovitou šelmu (Hell *et al.*, 2001).

Je obecně známo, že vlci nejsou samotářští a žijí ve smečkách s pevnou sociální organizací a hierarchií. Smečka čítá v průměru 7 jedinců, s rozsahem 2 – 15 jedinců, a její velikost je úměrná hojnosti kořisti, velikosti území a schopnosti se reprodukovat. Smečka jako celek funguje při ochraně teritoria, reprodukci a hlavně při lovu. Zvířata, která stojí na vrcholu hierarchie a mají největší privilegia při krmení a reprodukci (z celé smečky se jako jediní mohou pářit), nazýváme alfa samcem a alfa samicí. Mladí jedinci mají dvě možnosti další existence. Buď mohou ve věku okolo dvou let, kdy začínají být sexuálně aktivní, smečku opustit a jít si hledat nové teritorium a partnera k reprodukci, nebo zůstat se smečkou, podílet se na výchově dalších mláďat alfa páru a snažit se dosáhnout vyššího postu v rámci hierarchie. V Evropě jsou velké smečky spíše vzácnější (Boitani, 2000).

Je zřejmé, že právě díky migraci mladých jedinců, kteří se rozhodnou opustit smečku nebo jsou z ní dokonce vyhnáni, dochází k rozšiřování území populace. Pokud se migrující jedinec spáří s jedincem ze sousední populace, dojde k promíchání genomu obou populací. Vlci jsou velmi mobilní šelmy a pravidelně se pohybují na dlouhé vzdálenosti (Van Camp & Glukie, 1979; Fritts, 1983; Mech, 1987). Již několikrát byla zjištěna trasa jedince, která měřila několik tisíc kilometrů. Wabakken *et al.* (2001)

zdokumentoval samici, která se vydala na trasu dlouho 1 092 km z jihovýchodního Norska do severovýchodního Finska. Vzdálenost 1500 km urazil sledovaný jedinec v roce 2009 z německé Lužice přes Polsko, Litvu až do Běloruska (Kluth & Reinhardt, 2013). Typické rozpětí vzdáleností se pohybuje spíše ve stovkách kilometrů (Mech, 1987).



Obrázek 3: Trasa vlka z německé Lužice. (© BfN (Federální agentura ochrany přírody, Německo) a LUPUS Wildlife Consulting).

3.2.2 Rozšíření

Původní areál rozšíření se rozprostíral přes téměř celou severní polokouli Země. Historický rozsah jeho výskytu se rozprostíral po celé Holarktidě – od tundry přes zelené pláně až po poušť (Nowak, 2003). Díky obrovskému rozsahu obývaného areálu ho řadíme k nejrozšířenějším velkým savcům světa, samozřejmě s výjimkou člověka (Mech & Boitani, 2004; Sillero–Zubiri, 2009). Bohužel, z důvodu jeho pronásledování a nadměrného lovu jeho stavy poklesly a v několika oblastech např. střední a západní Evropa, Mexiko a USA, byl dokonce vyhuben. Jeho areál rozšíření se zmenšil o celou jednu třetinu. Centra jeho nynějšího výskytu se nacházejí v málo osídlených severských oblastech Kanady, Aljašky, severní části USA, severní, východní i jižní Evropy a také severní a střední Asie (Obrázek 4) (Mech & Boitani, 2010).

Celková globální populace (bez nové populace v africké části, jejíž početnost zatím není známá (Gaubert *et al.*, 2012)) čítá přes 170 000 jedinců. Počet vlků, kteří se pohybují na území severní a střední Asie (asijská část Ruska a přilehlé státy bývalého sovětského bloku, Čína, Mongolsko) se pohybuje okolo čísla 66 000. Blízký východ

(mezi Tureckem, Egyptem, Íránem a Afghánistánem) obývá 8 000 – 13 000 vlků. V Indii a Pákistánu se pohybuje 1 200 až 2 200 jedinců, v Severní Americe je to přes 60 000 jedinců a v Evropě (včetně evropské části Ruska) počítáme s populací o velikosti 32 000 jedinců (Mech & Boitani, 2004).



Obrázek 4: Rozšíření vlka obecného ve světě. Žluté jsou oblasti výskytu, červená je oblast vyhubení. (IUCN, 2016)

3.2.3 Vývoj populací

Je sice obecně přijímán fakt, že vnitrodruhová genetická diferenciace je ovlivněna glaciální minulostí, a to velmi podstatně (Hewitt, 1996; Taberlet *et al.*, 1998), ale populačně genetickým procesům, které se vyskytovaly v průběhu pleistocénních dob ledových, stále úplně přesně nerozumíme (Pilot *et al.*, 2010). U mnoha vyhynulých druhů jsou pozorovány odlišné linie mitochondriální DNA. Tyto linie se v rámci svého geografického rozšíření nepřekrývají, což považujeme za důsledek izolace v odlišných refugiích během posledního glaciálního maxima, které datujeme do let 21 000 – 17 000 př. n. l. (Avice *et al.*, 1998).

Jako názorný příklad se uvádí vlk obecný (*Canis lupus*). Pilot *et al.* (2010) na základě vytvořeného fylogenetického stromu definuje dvě haploskupiny, 1 a 2. Tyto

haploskupiny byly separovány v pěti mutačních krocích a to: tři tranzice, jedna transverze a jedna inserce/delece.

Obě haploskupiny však nemají stejné rozšíření. Leonard *et al.* (2007) poukázala na rozdílnosti v distribuci mtDNA haplotypů ve vzorcích vlků, kteří žili v době pleistocénu na území východní Beringie. Tito vlci patřili do odlišné haploskupiny, která se ale v DNA současných vlků Severní Ameriky nevyskytuje. Tato haploskupina odpovídala haploskupině 2. Morfologická a isotopická data naznačují, že Beringijští vlci byli specializovaní lovci a mrchožrouti tehdejší megafauny – předpokládá se predace hlavně na koních *Equus lambei* a bizonu (*Bison bison*), a jejich vyhynutí poukazuje na následné vyhynutí vlků této haploskupiny. Ani jeden z šestnácti mtDNA haplotypů, které byly izolovány ze vzorků dvaceti pleistocénních vlků pocházejících z východní části Beringie, nebyl nalezen ve vzorcích dnešních severoamerických vlků. Místo toho byla objevena užší příbuznost s eurasijskými vlky v pozdním pleistocénu. Hofreiter (2007) se domnívá, že s odkazem na tuto skutečnost můžeme předpokládat, že vlci žijící v době Pleistocénu napříč severní Eurasíí a Amerikou mohli tvořit souvislou a téměř panmiktickou populaci, která se od dnešní populace žijící na stejném místě lišila nejen geneticky, ale pravděpodobně i ekologicky. Stiller *et al.* (2006) a Lucchini *et al.* (2004) tuto teorii podporují. Ve svém výzkumu zjistili, že vlci žijící během pozdního pleistocénu na území dnešní Belgie lovili koně a velké turovitě, což se shoduje s potravou beringijských vlků. Expanze v dobách ledových společně se změnami v rozmístění vhodných habitatů přispěly k hlavnímu nedostatku fylogeografické struktury.

V období interglaciálů vlčí populace expandovaly na nová vhodná území (*Vilà et al.*, 1999). Je pozoruhodné, že vlci žijící v pozdním pleistocénu jsou sice geneticky jednotní, ale za to se liší morfologicky hlavně ve tvaru lebky a opotřebením zubů (Leonard *et al.*, 2007). Nyní se tedy haploskupina 1 vyskytuje jak v Severní Americe, tak i v Evropě, ale haploskupinu 2 můžeme najít pouze v Evropě.

Abychom mohli vymezit vztah mezi dnešními a starověkými aljašskými vlky, Leonard *et al.* (2007) porovnala jejich sekvence mtDNA se sekvencemi dnešních vlků po celém světě. Vyhodnotila, že žádný z těchto haplotypů identifikovaných ze starověkých materiálů nebyl nalezen mezi vlky dnešní doby, kteří tedy nejsou jejich

přímými potomky. Téměř všichni dnešní holarktičtí vlci sdílejí ty samé předky, zatímco starověcí severoameričtí vlci jsou fylogeneticky spojováni s odlišnou skupinou dnešních evropských vlků, což naznačuje evoluční obrat mezi vlky v Severní Americe. Genetická diverzita starověkých vlků je také vyšší než jejich moderních protějšků, předpovídající skutečnost, že populace v pozdním pleistocénu byla větší než současná (Leonard *et al.*, 2007).

3.2.4 Vliv klimatu a potravy na genetickou strukturu populací

V předchozí kapitole bylo zmíněno rozsahlé geografické rozšíření a schopnost migrace vlků na velké vzdálenosti. Vilà *et al.* (1999) zmínil předpoklad, že schopnost migrace na velké vzdálenosti kombinovaná se schopností k osídlení více typů prostředí naznačuje vysokou rychlost genového toku, čímž dochází k redukci genetické diferenciace mezi lokálními populacemi. Tento předpoklad byl potvrzen, když studie založené na mtDNA odhalily absenci velkých genetických rozdílů a na místo toho byly zaznamenány malé místní populace, které byly vytvořeny recentním genovým tokem. Pilot *et al.* (2006) prokázala, že ekologické procesy mohou silně ovlivnit velikost genového toku mezi populacemi. Tyto populace jsou tedy ovlivňovány klimatem, typem prostředí a složením vlčí potravy. Studie mikrosatelitové variability vlků obecných ze severozápadní části Kanady odhalila populační genetickou strukturu, která se shoduje s migrační cestou hlavního druhu potravy místních vlků - karibu (*Rangifer tarandus*) (Carmichael *et al.*, 2001). Pilot *et al.* (2006) zkoumala mtDNA a lokusy mikrosatelitů ve vzorcích vlků ve východní Evropě (evropská část Ruska, Slovensko, Bulharsko, Řecko a evropská část Turecka) a nenašla žádné jasné geografické schéma pro distribuci haplotypů. Oba subtypy se rozprostíraly přes celý studovaný areál. Díky tomuto zjištění odhaduje, že vlci ve východní Evropě nemají žádné geograficky rozlišené subpopulace, které by mohly být vzájemně monofyletické v rámci mtDNA haplotypů, což naznačuje, že zde nejsou žádné evolučně významné skupiny.

Při testování vlivu zeměpisné polohy na genetickou diferenciaci mezi místními vlčími populacemi se ukázala silná závislost mtDNA a mikrosatelitní DNA na zeměpisné šířce. To se ovšem netýká zeměpisné délky. Při dalším testování byla prokázána význačná korelace s dvěma sety environmentálních proměnných a to typem vegetace a

průměrnou teplotou prostředí. Pokud ale vezmeme v úvahu zeměpisné souřadnice jako proměnné, typ vegetace je stále značně korelován, ale teplota už ne. Pokud se vzala v úvahu kombinace vlivu typu vegetace a teploty, tyto proměnné byly značně korelovány s genetickou distancí a vysvětlují tak 43 % genetických změn vlivem geografické vzdálenosti (Pilot *et al.*, 2006).

Korelace mezi složením potravy a genetickou vzdáleností nebyla prokázána. Přesto ale, když se frekvence pouze jednoho druhu kořisti – jelena lesního (*Cervus elaphus*) vzala v potaz, korelace byla významná marginálně a 20 % genetických změn bylo vysvětlováno právě tímto faktorem. Byla pozorována pozitivní selekce jelena lesního a velmi účinná odezva, která zvýšila jeho hustotu (Okarma, 1995; Jędrzejewski *et al.*, 2000). Hojnost tohoto druhu ve složení vlčí potravy byla v korelaci s genetickou strukturou, a právě tento fakt podle Pilot *et al.* (2006) naznačuje, že rozlišnosti ve strategii lovu kořisti různé velikosti může vést k lokální potravní specializaci a tím pádem i ke genetické diferenciaci mezi vlky.

Jak už jsem psala v předchozí kapitole, mladí vlci zůstávají u svých smeček přibližně dva roky, během této doby pozorují lov starších jedinců a asistují jim. V Severní Americe se tímto způsobem učí vybírat si specifickou kořist, jako to viděli u starších jedinců a tak si tedy podle hojnosti kořisti vybírají prostředí, kde se kořist vyskytuje a šance vlků na přežití se tím zvyšuje (Gese & Mech, 1991). Hypotéza, že vlk je citlivý na prostředí je podporována situací, kdy jedním z nejběžnějších způsobů formování smečky je znám jako „budding“, jehož výsledkem je založení smečky poblíž té rodičovské (Mech & Boitani, 2003; Jędrzejewski *et al.*, 2004), což podporuje výběrovost podobných habitatů příbuznými jedinci (Pilot *et al.*, 2006). Po přidání zeměpisných souřadnic jako proměnných v regresní analýze to byl pouze typ vegetace, který koreloval s genetickou vzdáleností. Pilot *et al.* (2006) tedy přišla na vysvětlení, že kombinace vlivu teploty, dešťových srážek, typu vegetace a frekvence výskytu jelena lesního má vliv na genetickou variabilitu vlků v této lokaci a můžeme ji vysvětlovat z 54 % těmito faktory, pokud je zvážíme společně se zeměpisnými souřadnicemi. Na tyto proměnné se klade větší důraz než na zeměpisnou vzdálenost.

Padesát tři procent genetické variability je vysvětlováno vlivem typu vegetace a 47 % genetických změn je vysvětlováno vlivem genetické vzdálenosti. Na druhou

stranu, jestliže společně analyzujeme vliv typu vegetace a teploty, pak s genetickou vzdáleností nejsou v korelaci. Vliv typu vegetace tedy více vysvětluje genetické změny než vliv zeměpisné vzdálenosti. Mnohem podstatnější vliv má ale teplota a složení vlčí potravy. Tady je korelace s genetickou vzdáleností význačná a společně vysvětlují 98 – 99 % genetických změn, zatímco ostatní proměnné nejsou význačné (Pilot *et al.*, 2006).

Je důležité, že genetické vzdálenosti mezi vlčími populacemi korelují se zeměpisnou šířkou a s environmentálními proměnnými i při analýze mikrosatelitů. Tento fakt indikuje, že u tohoto schéma nezávisí na typu markeru a na způsobu vymezení skupiny. Populační genetická struktura podle mikrosatelitní DNA je ale méně zřetelná a vymezuje méně subpopulací než je tomu v případě analýzy mitochondriální DNA (Pilot *et al.*, 2006).

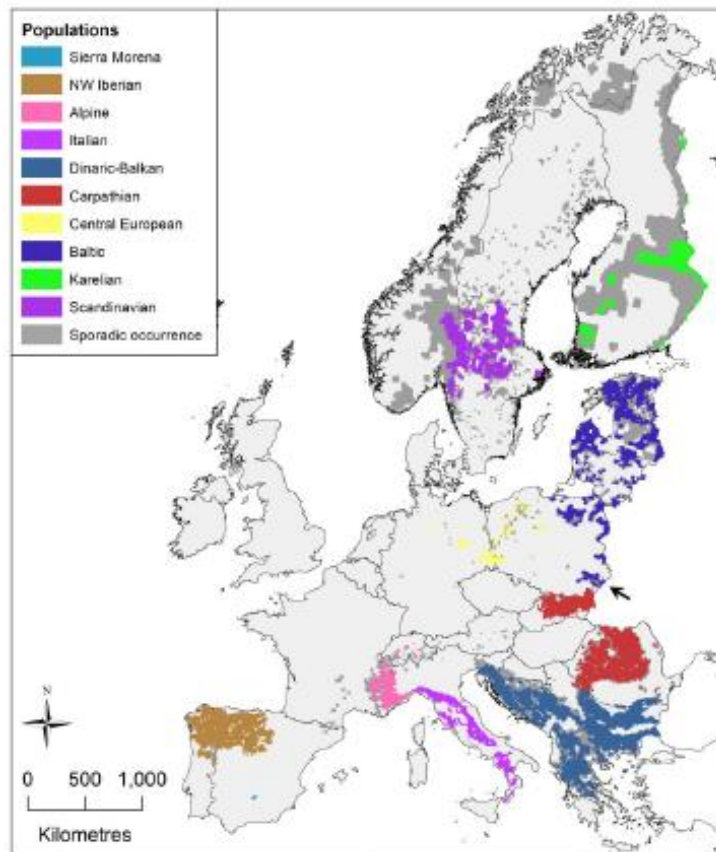
3.2.5 Fragmentace

S ohledem na předchozí kapitolu je nutné uvést další významný faktor, který ovlivňuje strukturu a velikost vlčích populací po celém světě. Na fragmentaci krajiny má vliv lidská činnost. Genetické rozdělení, které mezi dnešními populacemi pozorujeme, reflektuje vliv rozvoje zemědělství a lidské expanze (Lehman *et al.*, 1992). K fragmentaci krajiny může dojít několika způsoby. Výstavbou nových silnic, vykácením velké lesní plochy, vypálením lesů v důsledku letních požárů a založením nových osad v dříve neosídlených oblastech (Thurber *et al.*, 1994, Wydeven *et al.*, 2001, Theuerkauf *et al.*, 2003; Whittington *et al.*, 2004; 2005; Jaeger *et al.*, 2005; Kaartinen *et al.*, 2005; Theuerkauf *et al.*, 2007). Velkým ohrožením pro volně žijící populace vlků jsou i například rekreační aktivity a zimní sporty (Arlettaz *et al.*, 2007). Jsou to právě mladí jedinci, kteří nemusejí být schopni dostat se přes fragmentovanou krajinu a proto je pro ně snazší zůstat se svou rodnou smečkou (Wayne *et al.*, 1995).

3.2.6 Dnešní populace v Evropě

Genetické rysy dnešní globální populace byly ovlivněny poslední dobou ledovou, po které v Severní Americe vyhynuli vlci haploskupiny 2. To se ovšem netýká Evropy, kde se vyskytuje jak haploskupina 1 tak i haploskupina 2 (Pilot *et al.*, 2010). Haploskupina 1 se nachází hlavně na Pyrenejském poloostrově a je predominantní ve východní Evropě. Na rozdíl od haploskupiny 2, která je fixována na Apeninském poloostrově. Nález haplotypu w10, který sdílí jak populace z Pyrenejského ostrova, tak i populace z východní Evropy, naznačuje přítomnost haploskupiny 1 v již vymřelé přechodné populaci mezi střední a západní Evropou. Opakem k těmto odhadům jsou haplotypy všech starověkých vlků ze střední a západní Evropy, které spadají do let 44 000 – 1 400 př. n. l. Ty řadíme do haploskupiny 2. Tento fakt může reflektovat historickou predominanci haploskupiny 2 ve střední a západní Evropě po dobu 40 000 let před a po poslední době ledové a následnou predominanci haploskupiny 1 (Pilot *et al.*, 2010). Před fragmentací populací způsobenou lidskou činností vlci v Evropě nevykazovali žádnou fylogeografickou strukturu a populace byly propojeny velkým genovým tokem, který dovozoval široké rozptýlení mtDNA haplotypů (Vilà *et al.*, 1999; Randi *et al.*, 2000).

Nyní lze obecně říci, že východní Evropu obývají velké, relativně propojené populace, zatímco v západní části najdeme několik menších izolovanějších populací. Za evoluční zdroje diferenciovanosti považujeme bottleneck efekt a genetický drift (Pilot *et al.*, 2014).



Obrázek 5: Rozdělení evropské populace vlků do deseti částí podle geografického rozšíření. (Chapron *et al.*, 2014)

3.2.6.1 Iberijská populace

Tato populace se vyskytuje na severu Španělska a Portugalska a v západní části Evropy je největší (Boitani, 2003). Má (stejně jako Apeninská) velmi redukovanou genetickou diverzitu v důsledku několika jevů zvaných bottleneck (Vilà *et al.*, 1999; Randi *et al.*, 2000), které se většinou odehrály před 5 600 – 3 200 lety, tedy v době pozdního evropského neolitu (Pilot *et al.*, 2014). Silný genetický drift zde mohl vyústit ve fixaci konkrétní haploskupiny (Pilot *et al.*, 2010). Populace je izolovaná a pocházejí odtud haplotypy lu1, lu3, lu4 (Vilà *et al.*, 1999), W19 a W20 (Randi *et al.*, 2000). V roce 2005 tato populace čítala přes 2 300 jedinců (Salvatori & Linnell, 2005) a i nyní má stoupající trend díky legislativní ochraně (Ramírez *et al.*, 2006; Echegaray & Vilà, 2009; Caniglia *et al.*, 2014). Efektivní velikost populace je 50 jedinců a vykazuje znaky nedávného bottlenecku (Sastre *et al.*, 2011). Význam této populace tkví v její historii. Právě Pyrenejský poloostrov byl v Pleistocénu nejdůležitějším refugiem pro boreální

taxu v západní Evropě (Hewitt, 2000), takže se předpokládá, že místní populace vlků zahrnuje i starší genealogické linie (Leonard, 2014).

Pilot *et al.* (2014) zjišťovala velikost efektivní populace, která obývala toto území před 150 lety. Došla k číslu 59 jedinců, což je v relativně dobré shodě s výsledky Sastre *et al.* (2011), který stanovil efektivní velikost nynější populace na 50 jedinců (rozmezí 43-54). Pro dobu před 60 000 lety bylo toto číslo spočítáno na 10 000 jedinců (Pilot *et al.*, 2014).

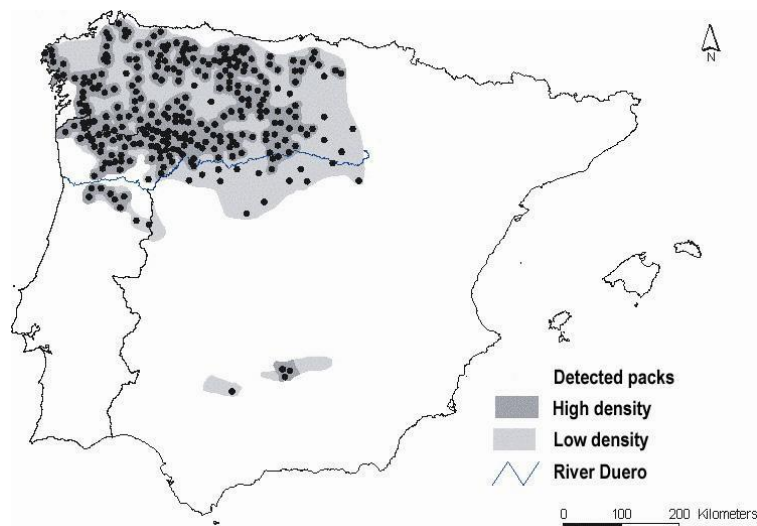
V této populaci rozeznáváme dva poddruhy: *Canis lupus signatus* (Obrázek 6) a *Canis lupus deitanus*.



Obrázek 6: *Canis lupus signatus*. (Fernando DM, 2014)

3.2.6.2 Sierra Morena

Téměř vymřelá populace je příkladem špatně dodržovaného zákona. Ve Španělsku začali být vlci chráněni v roce 1986 (López-Bao *et al.*, 2015). V roce 1988 se v oblasti Sierry Moreny pohybovalo 6-10 smeček (Blanco *et al.*, 1990) a o 24 let později Kaczensky *et al.* (2012) uvádí pouhou jednu smečku. Populace bude zřejmě první, která vymře během moderní doby vlivem nadměrného lovu člověkem. Příčinou tohoto faktu je nerespektování zákonů o ochraně druhů (López-Bao *et al.*, 2015). Prostředí této oblasti je přitom vhodnější než jiné oblasti Pyrenejského poloostrova (Llaneza *et al.*, 2012).

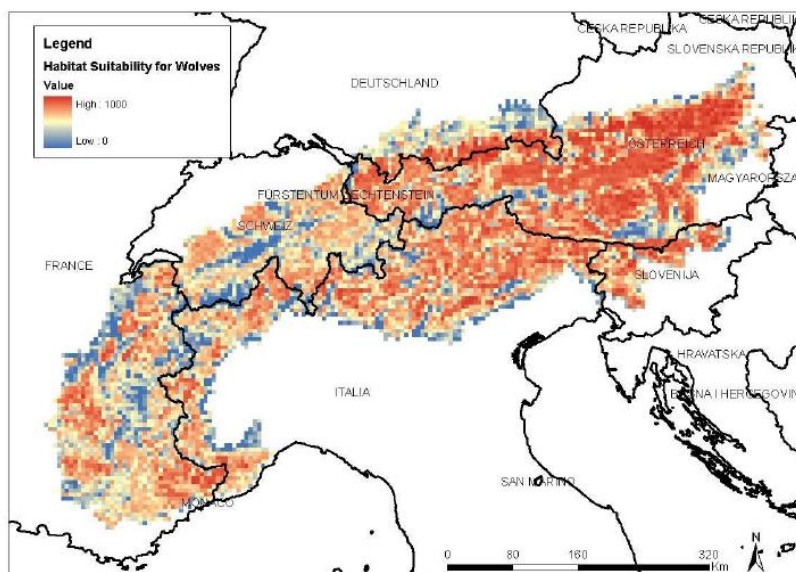


Obrázek 7: Populace na Pyrenejském poloostrově (2005). Horní Iberijská populace, níže populace v Sierre Moreně. (Álvares *et al.*, 2005)

3.2.6.3 Alpská populace

V 80. letech 20. století (Lucchini *et al.* 2002; Valiére *et al.*, 2003) se severní subpopulace apeninské populace začala oddělovat a osidlovat nová území jihovýchodních Alp. Území nebylo kolonizováno jedním párem, nýbrž několika geneticky nepříbuznými jedinci. Tento proces byl ovlivněn mírným bottleneckem a genový tok mezi Alpami a Apeninským poloostrovem byl zmírněn. V roce 2007 byla genetická diverzita (heterozygotnost, alelická bohatost (v genomu alpských vlků se objevilo na jeden lokus přibližně o dvě alely méně, než u apeninských vlků) a počet privátních alel) podstatně nižší než v apeninské populaci a celkově vlci v alpské populaci nebyli v genetické rovnováze (Fabbri *et al.*, 2007). Úroveň genetické diverzity právě expandující populace může v budoucnu záviset na úspěšně migrujících jedincích z dalších čtyř populací: apeninské, dinársko-balkánské, karpatské a středoevropské (Fabbri *et al.*, 2013). Fabbri *et al.*, (2013) už zaznamenala několik jedinců z Chorvatska, kteří se usadili ve východní části alpské populace. Ačkoli tuto populaci Linnell *et al.* (2007) určil jako samostatnou, je dostatečně autonomní a navíc má stoupající trend (Marescot *et al.*, 2011; Marucco *et al.*, 2009), stále je úzce spojena s populací apeninskou (Fabbri *et al.*, 2007). V roce 2012 bylo v Alpách zaznamenáno 35 smeček a 6 párů. Největší koncentrace je v západní oblasti mezi Itálií a Francií (WAG, 2014). V této populaci se vyskytuje haplotyp W14 (Randi *et al.*, 2000), který je unikátní pro

apeninskou populaci. Každá z objevených alel, která byla v Alpách objevena, byla také detekována v apeninské populaci (Fabbri *et al.*, 2007).



Obrázek 8: Rozšíření vlka obecného v Alpách. (Marucco, 2011)

3.2.6.4 Apeninská populace

Vlci v Itálii osídlili území jižně od řeky Pád na začátku minulého století. Snižování jejich počtu probíhalo až do 70. let 20. století, kdy přibližně sto jedinců bylo rozděleno do dvou fragmentovaných oblastí na středozápadě Apenin (Zimen & Boitani, 1975). Vlci začali (nejen) v Itálii expandovat v 80. letech minulého století hlavně díky efektivnější právní ochraně a podstatné změně ekologických podmínek v horách – např. snížení hustoty obyvatel a zvýšení počtu divokých kopytníků (Breitenmoser, 1998; Wabakken *et al.*, 2001; Boitani, 2003). Do roku 2003 se apeninská populace odhadovala na více než 600 jedinců (Boitani, 2003). Kaczynsky *et al.* (2013) odhaduje populaci na 600-800 jedinců se stoupajícím trendem. Jak uvádí Fabbri *et al.* (2007), rozdíl mezi jižní a severní + střední částí populace najdeme v počtu heterozygotů. Jižní část je v souladu s Hardy-Weinbergovým zákonem, na rozdíl od střední a severní části, kde se projevuje mírný deficit heterozygotů. Z nedávných studií je zřejmé, že heterozygotnost autosomálních mikrosatelitů a SNP markerů byla přibližně o 25 % nižší než v ostatních populacích (Fabbri *et al.*, 2007; Sastre *et al.*, 2011) a tím se tedy liší od světových populací (von Holdt *et al.*, 2011). V severní části se vyskytuje sedm privátních alel, které nebyly migrujícími vlky rozšířeny do Alp (Fabbri *et al.*, 2007).

V této populaci se můžeme setkat s jevem, kdy dochází k hybridizaci se zdivočelými domácími psy. Této problematice se věnuje mnoho prací např. Randi *et al.*, 2014; Iacolina *et al.*, 2010.

I pro tuto populaci počítala Pilot *et al.* (2014) hodnoty efektivní velikosti populací před 150 a 60 000 lety. Prvním výsledkem je 71 jedinců a před 60 000 lety se v Itálii vyskytovalo 4 500 jedinců. Zároveň mezi touto a iberijskou populací pozorovala největší genetické rozdíly v porovnání s ostatními populacemi v Evropě.

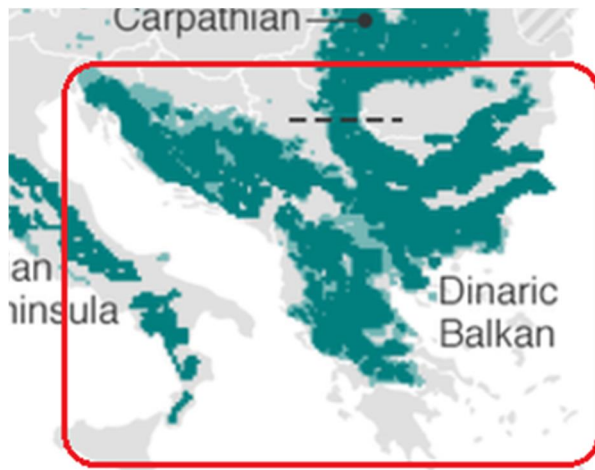


Obrázek 9: Apeninská populace přecházející v populaci alpskou v roce 2010. (Boitani *et al.*, 2010)

3.2.6.5 Dinársko-balkánská

Populace v Dinárských horách se ocitla na pokraji vyhynutí v pozdních 80. letech minulého století (Huber *et al.*, 1999, 2002) a Kusak (2002) v 90. letech odhadnul populaci o padesáti jedincích. Během posledních deseti let bylo pozorováno zvýšení počtu a v roce 2008 se velikost populace odhadovala na 200 jedinců obývajících 32,4 % chorvatského území (Oković, 2008) a v roce 2013 podle Fabbri *et al.* (2013) 250 jedinců. Tato populace má jednu v nejvyšších genetických rozmanitostí k roku 2010 a je tedy cenným zdrojem genetické diverzity, která by skrze migrující jedince mohla pomoci obnovit mnoho populací (např. apeninskou), u kterých je variabilita

redukována (Gomerčić *et al.*, 2010). V tomto případě vypadá nadějně výprava mladého jedince, který se vydal ze Slovinska přes Itálii do Alp, kde se v roce 2012 úspěšně usadil a celkově urazil cestu dlouhou 1176 km (Ražen *et al.*, 2015).



Obrázek 10: Dinárskou-balkánská populace. (WWF, 2016)

Chorvatské haplotypy mají nejvíce společného s haplotypy z Bulharska (W16, W3, W9) a z Alp (W2, W4, W5). Haplotyp s označením WCRO6 s frekvencí 27 % zatím nebyl pozorován v žádné jiné populaci na světě (Gomerčić *et al.*, 2010). Vilà *et al.* (1999) objevil haplotyp lu-3, který sdílí populace v Chorvatsku, Portugalsku, Řecku, Švédsku, evropské části Ruska a Turecku. Bylo zjištěno, že jaderná diverzita hodnocena z hlediska mikrosatelitů byla značně vyšší než mtDNA diverzita (Gomerčić *et al.*, 2010).

Tato populace není jen v Chorvatsku, nýbrž i ve Slovinsku a Bosně a Hercegovině, kde je dokumentován genový tok (Štrbenac *et al.*, 2005, 2008), který pravděpodobně pokračuje do Srbska, Černé Hory, Albánie, Makedonie, Řecka a Bulharska. Celá dinársko-balkánská populace se do roku 2007 odhaduje na 5000 jedinců (Linnell *et al.*, 2007) a rozprostírá se od Slovinska až po severní část Řecka (Milenković *et al.*, 2010). Tvoří hranici mezi východními a západními populacemi (Djan *et al.*, 2014).

Několik předchozích studií naznačuje, že si vlci na území Balkánu zachovali značnou část historické proměnlivosti na celoevropské úrovni (Randi *et al.*, 2000; Lucchini *et al.*, 2004; Gomerčić *et al.*, 2010).

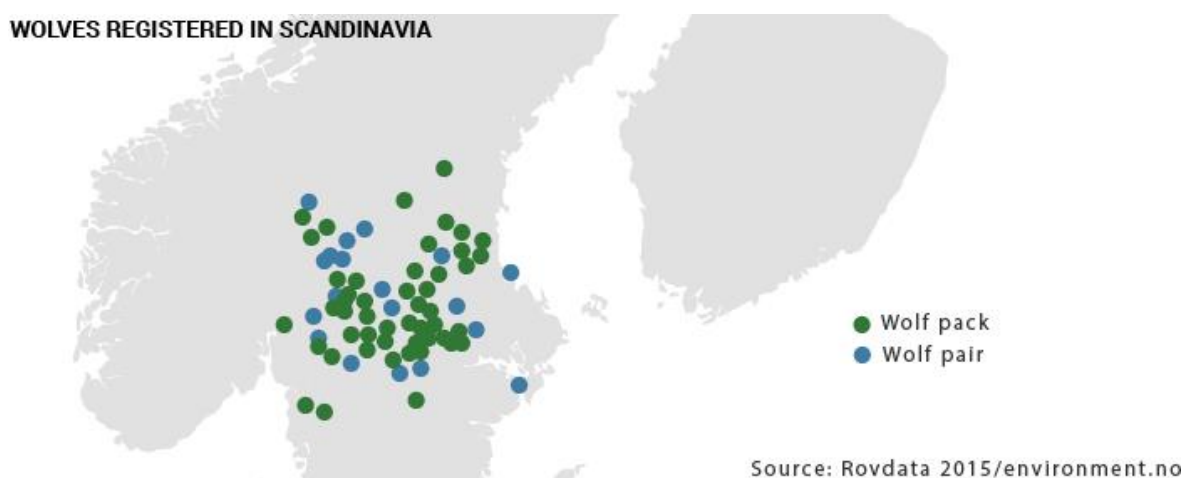
Výzkum Djan *et al.* (2014) založený na analýze mtDNA objevil rozdělení do dvou subpopulací, a to východní (Srbsko a Makedonie) a západní (Chorvatsko a Bosna a Hercegovina). Toto rozdělení může být důsledkem rozličné demografické historie nebo

rozdílného pronásledování. Žádný z výsledků nepotvrdil expanzi populace, spíše naopak byl objeven nedávný bottleneck (Djan *et al.*, 2014).

3.2.6.6 Skandinávská populace

Populace na Skandinávském poloostrově prakticky vymřela během 60. let minulého století do té doby, než začal být vlk chráněn. Ve Švédsku to bylo v roce 1966, v Norsku v roce 1973 (Wabakken *et al.*, 2001). Dnes je ztraceno přibližně 40 % alelické diverzity (Flagstad *et al.*, 2003). Vilà *et al.* (2003) předpokládá, že dnešní populace pravděpodobně pochází z velmi malého počtu jedinců, kteří sem přišli z východu. Kvůli malému počtu zakladatelů čelila tato populace několika inbredním depresím (Liberg *et al.*, 2005). Za zmínku určitě stojí i dvě varianty expanze na jižní část Skandinávie. Tou první je migrace po pevnině kolem Botnického zálivu a tou druhou je přechod přes zamrzlé Baltské moře v místě nejužšího průlivu, kdy je mezi Švédskem a Finskem asi 150 km (Linnell *et al.*, 2005). Flagstad *et al.* (2003) ve svém výzkumu objevili tři haplotypy W1, W3 a W4. W4 byl objeven v jednom případě na severu Švédska v roce 1979. Největší početnost má haplotyp W1, který se vyskytuje i ve vzorcích z 19. století.

Od roku 2000 počet jedinců stoupá. V roce 2001 zde bylo 11 smeček (Vilà *et al.*, 2003), v roce 2010 31 smeček (Liberg *et al.*, 2012) a o čtyři roky později to bylo již 43 smeček (cca 400 jedinců)(Svensson *et al.*, 2014).



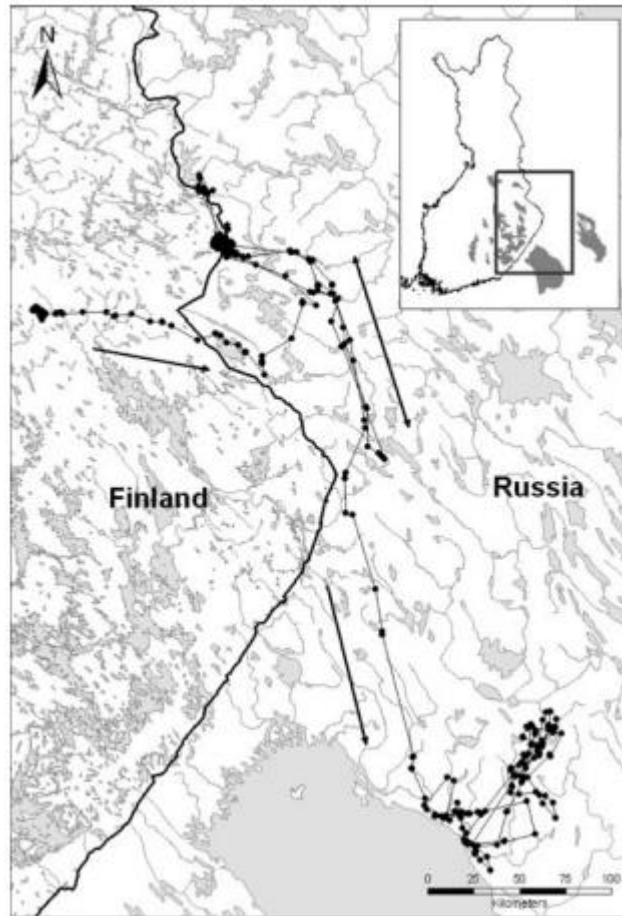
Obrázek 11: Skandinávská populace v roce 2015. (Rovdata, 2015)

Ordiz *et al.* (2015) se zabýval vlivem různých faktorů na rekolonizaci území ve Skandinávii. Největší vliv byl v letech 1190 - 2012 pozorován u lidského faktoru (hustota silnic), vnitrodruhového faktoru (pozitivní vliv má předchozí přítomnost vlka, naopak negativní vliv má vzrůstající vzdálenost jiných vlčích teritorií) a kompetiční faktor (negativní vliv hustoty osídlení území medvědy).

3.2.6.7 Karelsko-finská populace

Tato populace se nachází na území Finska a při rusko-finských hranicích a je složena ze dvou subpopulací, mezi kterými je význačná genetická diferenciac. Příčinu diferenciac můžeme hledat v historii, když byly za sovětské éry mezi těmito zeměmi postaveny ploty, z nichž některé ještě dnes existují (Aspi *et al.*, 2009). Neznamená to ale, že by migrace mezi těmito subpopulacemi vůbec neexistovala (Obrázek 12) (Kojola *et al.*, 2006).

Ve Finsku výzkum Aspiho *et al.* (2006) zjistil, že populace v té době byla pouze na 8 % z historické velikosti. I navzdory nedávným demografickým bottleneckům byla zjištěna velká genetická variabilita. V roce 2006 se efektivní velikost populace odhadovala na 40 jedinců (Aspi *et al.*, 2006). Finská populace není od ostatních populací plně izolována a genový tok ze sousedních populací může zvýšit efektivní velikost populace a zachovat tak genetickou diverzitu navzdory bottleneckům (Aspi *et al.*, 2006). Předpokládá se spojení s nejbližší populací, kterou je karelská na hranicích s Ruskem (Aspi *et al.*, 2009). Další nejbližší populací je skandinávská, která je od hranic finské populace vzdálená přes 600 km západně. I přes tuto velkou vzdálenost bylo zaznamenáno několik migrací a výzkum těchto populací naznačil, že jedinci jsou geneticky diferenciování (Ellegren, 1999; Sundqvist *et al.*, 2001; Flagstad *et al.*, 2003; Vilà *et al.*, 2003; Seddon *et al.*, 2005). Odhad počtu v roce 2003 byl stanoven na 150-165 jedinců, kteří jsou rozděleni do třinácti smeček a dalších pět smeček žije na hranicích Ruska a Finska (Kojola & Määttä, 2004).



Obrázek 12: Trasa jedince označeného GPS lokalizátorem v roce 2003. (Aspi *et al.*, 2009)

V jižní části Finska vlci nejčastěji loví losy (*Alces alces*), zatímco ve východnějších a severnějších částech polodomestikované soby (*Rangifer tarandus*) (Pulliainen, 1965; Gade-Jørgensen & Stagegaard, 2000; Kojola *et al.*, 2006).

V roce 2005 se na území Karélie pohybovalo 300-350 jedinců (Danilov, 2005). Navzdory nedávným bottleneckům, i tady byla zjištěno relativně velké množství genetických variací (Aspi *et al.*, 2009). Aspi *et al.* (2006) uvádí jako nezbytnost migrace karelských vlků do oblasti Finska, aby se zachovala genetická diverzita místní subpopulace, protože s ohledem na její efektivní velikost ji nemůžeme považovat za dlouhodobě soběstačnou. Na druhou stranu výzkumy naznačují, že efektivní velikost karelské subpopulace nemusí být o moc větší než právě finské a pokud budou počty jedinců této populace nadále klesat, bude nezbytné, aby to byli spíše finští vlci, kteří se vydají na území Karélie (Aspi *et al.*, 2009).

Genetická diverzita obou těchto subpopulací se přibližně shoduje se zbylými populacemi vlků ve východní Evropě a pro zachování obou populací je důležité až nezbytné, aby se zvýšila míra migrace mezi nimi (Aspi *et al.*, 2009).

3.2.6.8 Baltská populace

Do baltské populace řadíme vlky žijící na území Litvy, Lotyšska, Estonska, Ruska (Kaliningrad a západní části kontinentálního Ruska), východního Polska, severní Ukrajiny a Běloruska o celkové velikosti 3600 jedinců (Jędrzejewski *et al.*, 2010). Populace nacházející se v této oblasti jsou velmi významné i pro velké šelmy obecně. Dochází tu ke spojování východních (ruských a běloruských populací) a střeoevropských populací, které mohou navazovat až na západní populace (Valdman, 2006). Právě do Estonska přimigrovali vlci z důvodu potravní nabídky, hlavně losa (*Alces alces*) a zajíce běláka (*Lepus timidus*) (Lõugas & Maldre, 2000). Regiony obsahují víceméně diferenciované subpopulace s vysokou genetickou diverzitou a několika náznaky nedávných bottlenecků (Lucchini *et al.*, 2004; Jędrzejewski *et al.*, 2005a; Sastre *et al.*, 2011).

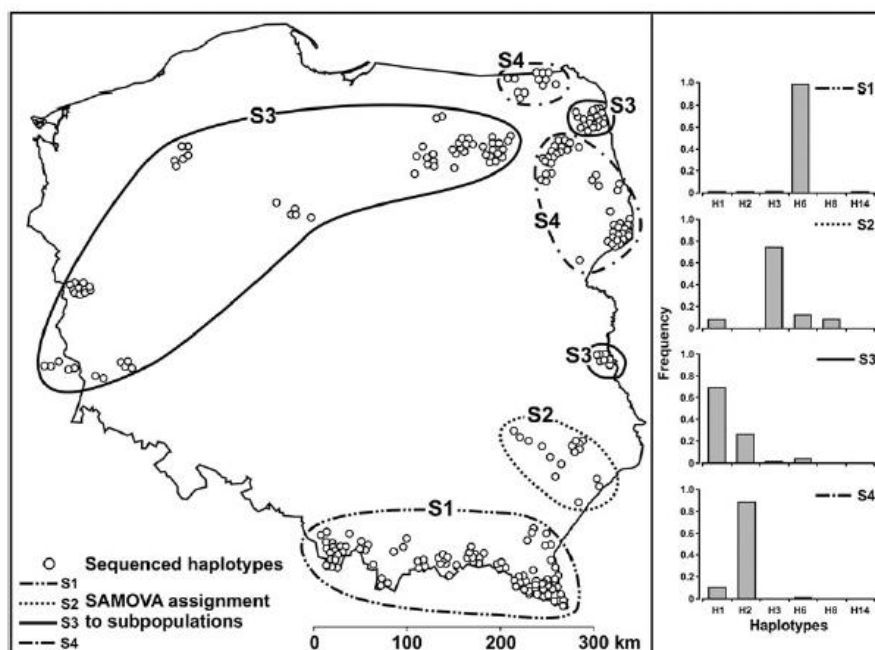
V Litvě byla početnost heterozygotů menší, než se původně očekávalo podle Hardy-Weinbergova zákona. Analýza odhalila pět haplotypů mtDNA a jejich vysokou diverzitu. Haplotypy W1-LT a W2-LT byly rozšířeny přes celou zemi, ale W3-LT, W5-LT a W10-LT byly objeveny spíše v severnějších a severovýchodnějších oblastech (Baltrūnaitė *et al.*, 2013). Historicky tu můžeme pozorovat velkou expanzi koncem druhé světové války a krátce po ní (1948), kdy se počet jedinců vyšplhal až na 1723. O to výraznější bylo jejich pronásledování a už v roce 1954 počet rapidně klesl na neuvěřitelných 320. V letech 1960-1975 však litevská populace dosáhla na své dno s ne více než 200 jedinci. V 80. letech minulého století se populace začala zotavovat a počty jedinců rostly. V roce 2003 se vlci vyskytovali na 70 % rozlohy země, ale tento údaj byl v roce 2004 snížen na cca 60 % (Balčiauskas, 2008).

Centrální část Litvy byla osídlena velmi řídko a byly zaznamenány migrace ze severozápadní části do Lotyšska, z východní Litvy do Lotyšska a Běloruska, a z jižní Litvy pouze do Běloruska (Balčiauskas, 2008).

3.2.6.9 Karpatská a středoevropská populace

3.2.6.9.1 Polsko

Polsko, představující západní hranici relativně nepřetržitého výskytu rozsáhlých populací různých druhů (např. rys, vlk a los), může být klíčovou oblastí pro porozumění historického a současného genového toku ve střední Evropě. Právě na území tohoto státu se setkávají obě vlčí haploskupiny (Pilot *et al.*, 2010). Czarnomska *et al.*, (2013) identifikovala šest mtDNA haplotypů (H1, H2, H3, H6, H8, H14), které byly všechny známy z předchozích studií (Vilà *et al.*, 1999; Randi *et al.*, 2000; Jędrzejewski *et al.*, 2005b; Pilot *et al.*, 2006). Haplotypy H1, H2, H3 a H8 spadají do haploskupiny 1, která je rozšířená v severovýchodní a střední Evropě a na Pyrenejském poloostrově. Do haploskupiny 2, která dominuje jihovýchodní Evropě a Itálii, patří haplotypy H6 a H14 (Pilot *et al.*, 2010). Czarnomska *et al.* (2013) stanovila na území Polska i čtyři subpopulace podle největší shody klastrů (Obrázek 13).



Obrázek 13: Čtyři subpopulace (S1-S4) vlků v Polsku založené na mtDNA. V pravé části frekvence haplotypů v rámci populace. (Czarnomska *et al.*, 2013)

V jižní oblasti Polska – Karpatech převládá haploskupina 2 (subpopulace S1 – karpatská) (97 % vlků). V dalších oblastech Polska dominuje haploskupina 1 (vždy nad 88 %). Subpopulace S2 spadá do oblasti od jihovýchodního Polska přes Bělorusko a

severní Ukrajinu až do Ruska. S3 a S4 se jeví jako část subpopulace, která se táhne ze severovýchodního Polska do Ruska a přesahuje i na západ do Německa (Pilot *et al.*, 2006). Nynější území ve střední Evropě, kde se tyto dvě linie setkávají, vykazuje následky nahrazení jedné haploskupiny (2), která byla predominantní v několika předchozích tisíciletích, druhou haploskupinou (1) (Leonard *et al.*, 2007; Pilot *et al.*, 2010). Výsledky Czarnomske *et al.*, (2013) naznačují velmi omezený genový tok mezi Karpaty a zbytkem Polska. Genetická struktura je ovlivněna i stupněm právní ochrany zvířat v jednotlivých zemích. V této oblasti je to pouze Německo (Ansorge *et al.*, 2006), Česká republika, Polsko kde jsou vlci na seznamu ohrožených druhů. Bohužel tomu tak není na Slovensku a Ukrajině, kde jsou vlci i nadále loveni (Czarnomska *et al.*, 2013).

Mikrosatelitní data vykazují přítomnost silné genetické struktury mezi vlky karpatskými a polskými nížinnými (Czarnomska *et al.*, 2013).

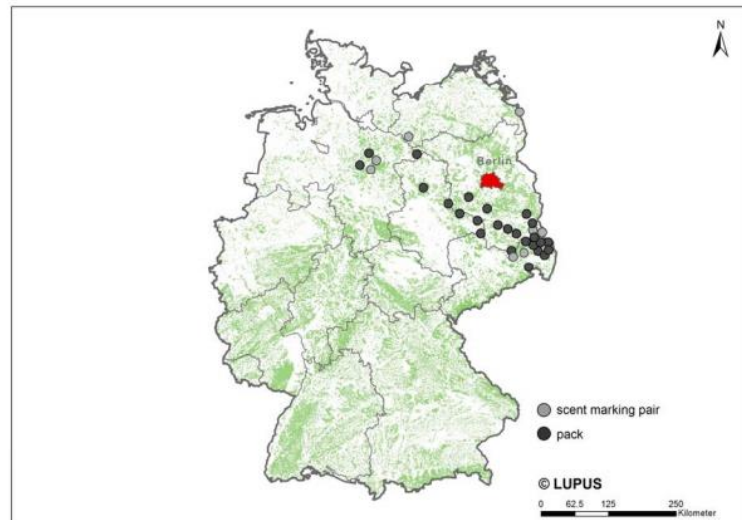
Genetická diferenciacie mezi karpatskými a polskými nížinnými vlky tedy byla prokázána jak mikrosatelity, tak i mtDNA (Czarnomska *et al.*, 2013) a lze ji zdůvodnit hlavně environmentálními podmínkami. Asociace mezi těmito podmínkami a genetickou variabilitou může vyústit v rozvoj různých adaptací k rozdílným habitatům. Jędrzejewski *et al.* (2012) poukazuje na tři druhy kořistí, které souhlasí se třemi geneticky oddělenými populacemi. V severovýchodním Polsku vlci loví čtyři druhy kopytníků – losy, srnce, jeleny a prasata, zatímco ve východním Polsku je preferován spíše srnec a v jihovýchodní části je nejvíce loven jelen (Jędrzejewski *et al.*, 2012).

Co však určuje bariéru mezi karpatskou populací a zbytkem Polska? Huck *et al.* (2011) se domnívá, že onou bariérou, která omezuje rozšíření a pohyb vlků je urbanizovaná a hustě osídlená oblast v jižní části Polska podél Karpat.

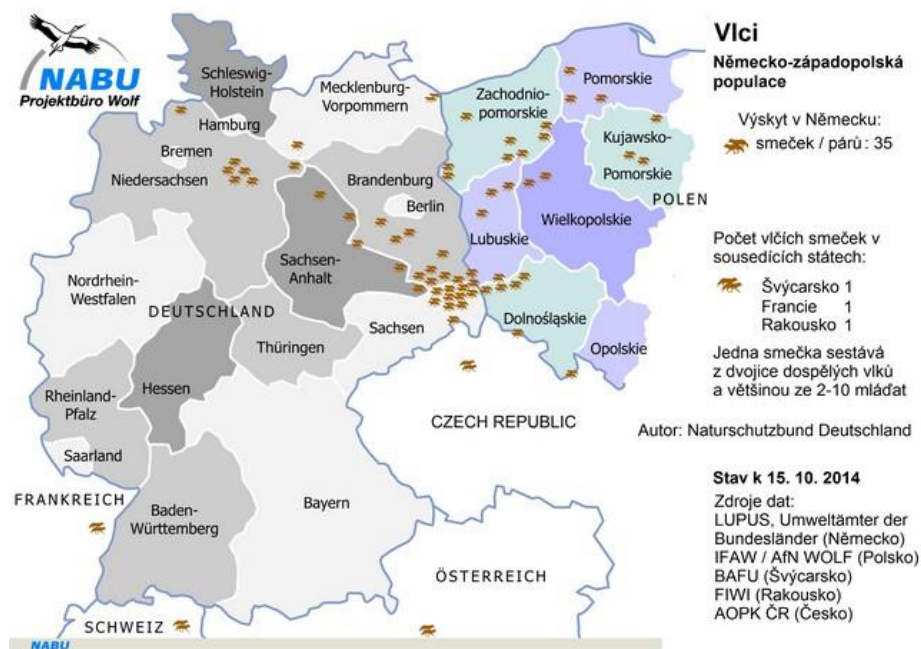
3.2.6.9.2 Středoevropská populace – Německá část

Předpokládá se, že populace vlků, žijících v severovýchodní části Německa pochází z Polska (subpopulace S3) (Ansorge *et al.*, 2006). První důkaz o trvalejším výskytu a reprodukci vlčí smečky byl zjištěn v roce 2000 (Kluth *et al.*, 2002). Druhá smečka se zde usídlila v roce 2005 jako reflexe rapidní rekolonizace. Na přelomu let 2013 – 2014 bylo v Německu zaznamenáno celkem 25 smeček, 8 párů a několik dalších

jedinců (Reinhardt *et al.*, 2015). Právě odtud pochází pár, který na Kokořínsku u Doks v létě 2014 vyvedl mladé a trvale toto území osídlil.



Obrázek 14: Rozšíření vlků v Německu 2013/2014. (Reinhardt *et al.*, 2015)



Obrázek 15: Středoevropská populace. (Naturschutzbund Deutschland, 2014)

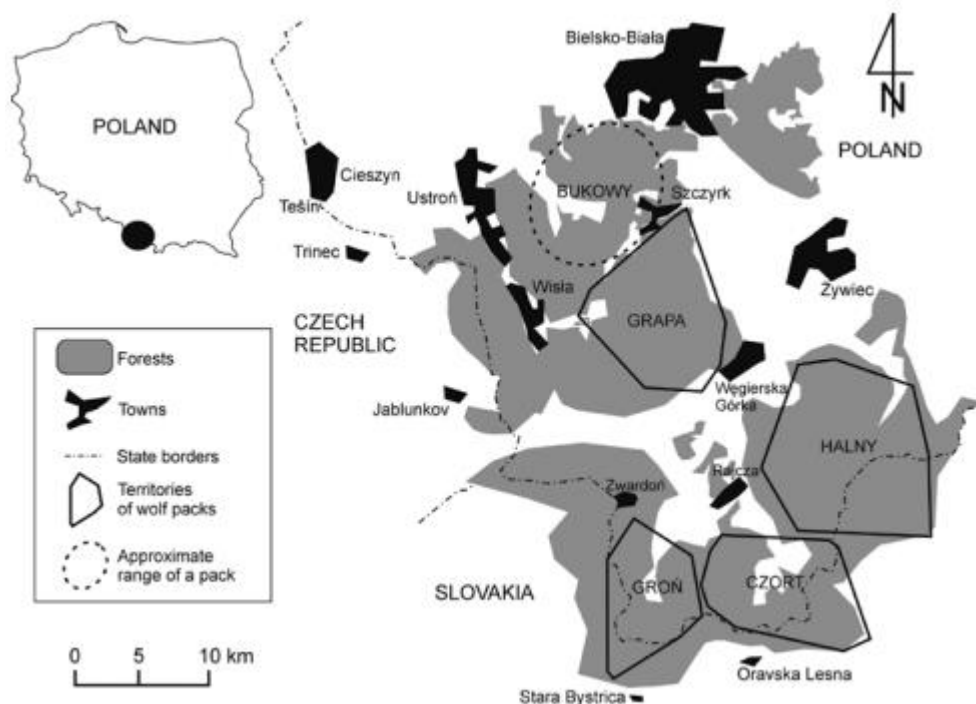
3.2.6.9.3 Karpatská populace

Obecně je tato populace málo dokumentována. Existuje pouze velmi omezený počet zdrojů, z nichž ve většině se autoři zabývají polskou částí Karpat a ostatní oblasti jsou často opomíjeny a zmíněny jen velmi okrajově. Drtivá většina zdrojů, které by připadaly v úvahu, jsou starší deset a víc let, což v současné situaci, kdy vlčí populace

ve střední Evropě expandují a zabydlují nová území, není zcela aktuální. Mohou kvůli tomu vznikat nedorozumění a uvádění třeba již ne zcela aktuálních informací vede k nepřesnostem.

Karpatská populace se nachází na území Slovenska, jižní části Polska, Ukrajiny a Rumunska. Počet jedinců je odhadován na tři až čtyři tisíce, přičemž největší část vlků žije na Ukrajině a v Rumunsku (Linnell *et al.*, 2007). Východní část této populace plynule navazuje na populace v Rusku a Asii. Tento fakt platí obecně pro populace východní Evropy (Boitani, 2003).

Několik jedinců z této populace pravidelně migruje do Maďarska (Farago, 1992) a České republiky (Boitani, 2003).



Obrázek 16: Distribuce vlčích smeček pojmenovaných Bukowy, Grapa, Groń, Czort a Halny v polských a slovenských Karpatech a Slezských Beskydech v letech 1996 – 2003. (Nowak *et al.*, 2008)

Vlci ve Slezských Beskydech (SB) a Żywiecki Beskydech (ZB) se i přes dostatečné množství potravy liší v dynamice populace (Nowak *et al.*, 2005). Z důvodu rozvoje infrastruktury, cestovního ruchu a výstavby nových silnic se tento region stává čím dál tím více izolovanějším od zbytku této populace (Nowak *et al.*, 2008).

3.2.7 Vlci na území České republiky

3.2.7.1 Výskyt v minulosti

Až do třicetileté války byl vlk běžnou součástí naší fauny. Následně se však jeho stavy začaly postupně snižovat až do roku 1874, kdy byl údajně zastřelen poslední vlk v Čechách (Anděra & Červený, 2009). Na Moravě a ve Slezsku se poslední zástřely vlka datují do let 1907 a 1914 (Andreska & Andresková, 1993; Anděra & Červený, 2009). Není ovšem pravda, že by se po těchto událostech vlk na území České republiky nevyskytoval vůbec. Jeho výskyt byl ovšem náhodný, méně častý a jednalo se o migrující jedince z okolních populací (karpatská na Slovensku a středoevropská v Německu a Polsku) (Anděra & Červený, 2009).

Bartošová (1998) a Anděra *et al.* (2004) stanovují polovinu 90. let jako počátek návratu této šelmy do české krajiny, konkrétněji pohoří Beskydy a později se vlk začal objevovat i na Šumavě (Bufka *et al.*, 2005).

3.2.7.2 Současný výskyt

Flousek *et al.* (2014) se zabýval současným výskytem vlka v severní a severozápadní části České republiky. První záznamy na tomto území se začínají objevovat od roku 2010 a to z území Českého Švýcarska a Krušných hor z důvodu expandující populace v německém Sasku a západním Polsku. Výskyty byly ale sporadické (Flousek *et al.*, 2014).

Mnoho záznamů o výskytu vlka v oblasti Broumova není. Přímé pozorování v zimě 1978 Rybář (1982) považuje za méně důvěryhodné a je to prakticky jediný záznam o minulosti vlků na Broumovsku (Flousek *et al.*, 2014). Ovšem na podzim roku 2015 se objevily dvě fotografie Václava Klímy, na kterých je vidět zvíře v mlze nápadně připomínající vlka. V té době však fotopasti v okolí nic podobného nezaznamenaly. O měsíc později se však tak stalo a odborníci se shodli, že se se stoprocentní jistotou jedná o vlka (Hnutí DUHA, 2015b).

V oblasti Jeseníků prováděli výzkum Kutal & Duhonský (2014). Zde se mezi lety 2009 a 2013 podařilo vlka (nebo známky jeho pobytu) zpozorovat pouze dvakrát. V prvním případě v roce 2009 šlo o stopní dráhu a ve druhém případě v roce 2012 se

jednalo o přímé pozorování (Kutal & Duhonský, 2014). Velmi dobrou zprávu z této oblasti přinesl snímek z fotopasti, který byl pořízen na počátku roku 2016. Zprávu o tom podali odborníci z Hnutí DUHA Olomouc ve spolupráci s Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR – Správou CHKO Jeseníky, Lesy ČR a Českým svazem ochránců přírody (Hnutí DUHA, 2016b).

Mezi lety 2003 a 2012 bylo na území Beskyd a Západních Karpat získáno 50 údajů o místním výskytu vlka obecného. Věrohodné údaje o výskytu však byly občasné, spíše sporadické (Kutal *et al.*, 2014). Současně tu probíhal monitoring pomocí neinvazivní genetiky. Hulva *et al.*, (2014) izoloval DNA z nalezených vzorků trusu i moči. Celkem bylo objeveno 23 jedinců. Na silnici u obce Krhová u Valašského Meziříčí byl v červenci 2012 nalezen mrtvý jedinec. Analýza DNA potvrdila, že se jednalo o mladou samici vlka. Téměř po sto letech to byl bohužel jediný věrohodný důkaz o přítomnosti vlka v této oblasti (Hulva *et al.*, 2014).

Oblast Karpat se nachází na pomezí populací balkánské a východoevropských. Z tohoto důvodu by mohly Karpaty představovat disperzní koridor pro migraci mezi populacemi a docházelo by tím i k promíchávání haploskupin, které by ve výsledku mohlo přinést zvýšení genetické variability (Hulva *et al.*, 2014).

Sporadické výskyty vlka obecného byly zaznamenány i na Šumavě. V roce 2015 a na začátku roku 2016 byl na fotopastech zaznamenán hned několikrát. Jedná se zřejmě spíše o jedince, kteří k nám přišli z Rakouska či Německa a přes Šumavu pouze procházejí. Není žádný důkaz o založení smečky v této oblasti (Hnutí DUHA, 2015c).



Obrázek 17: Vlk zachycený fotopastí na Šumavě na začátku roku 2015. (Hnutí DUHA, 2015a)

Záznam o zástřelu posledního vlka v roce 1874 pochází právě ze Šumavy, konkrétně z revíru Lipka na Vimpersku (Anděra & Červený, 2009).

Z výše uvedených údajů je zřejmé, že výskyt vlka v České republice je spíše sporadický a dlouho dobu se jednalo pouze o migrující jedince, kteří přes území ČR pouze přecházeli. Zlom nastal v roce 2014, kdy pár, který přišel na CHKO Kokořínsko do okolí Doks vyvedl mladé a trvale se zabydlel v Máchově kraji. Tato smečka se podle záznamů z fotopastí v létě 2015 rozrostla o minimálně další dva přírůstky. Oficiální zprávu na svých stránkách zveřejnilo Hnutí DUHA Olomouc (Hnutí DUHA, 2016).



Obrázek 18: Fotopast zachytila vlče několikrát během července a srpna 2014. (©AOPK ČR, 2014)

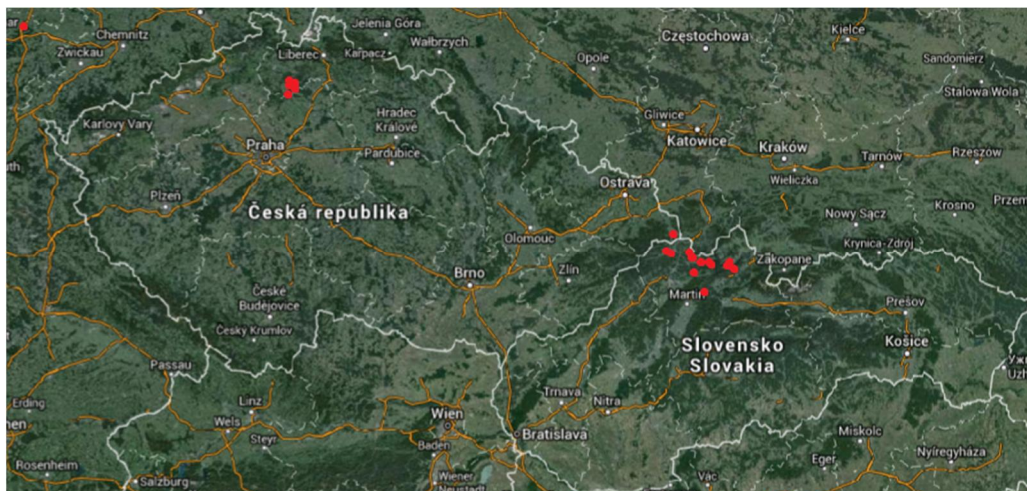
4 Cíle praktické části

- Vyhodnocení přítomnosti vlků v oblastech západních Karpat, Kokořínska a případných nových oblastí výskytu.

5 Materiál

Vzorky byly sebrány neinvazivními metodami během monitoringu velkých šelem ve vybraných oblastech. Zpravidla se jednalo o trus, který byl sebrán dobrovolníky Vlčích hlídek, které jsou školeny a organizovány Hnutím DUHA v Olomouci. Trus může být konzervován dvěma způsoby. Prvním je zmražení a druhým je uložení v ethanolu.

K dispozici bylo 28 vzorků, které jsou vypsány v tabulce 1. U pěti vzorků bohužel nebylo známo místo ani datum nálezů. Na obrázku 19 je mapa České republiky s vyznačenými lokalitami nálezů.



Obrázek 19: Lokality nálezů vzorků na mapě.

Tabulka 1: Tabulka se vzorky a podrobnějšími informacemi. Sloupec „izolace“ vypovídá o úspěšnosti izolace (1=úspěšné, 0= neúspěšné).

Jedinec	Rok	Měsíc	místo	izolace
V015				0
V215				0
V217	2015		2 Dolní Lomná, Moravskoslezské Beskydy, ČR	1
V228				0
V233				0
V245	2015		6 Šútovská dolina, Malá Fatra, Slovensko	0
V251	2015		2 Riečnica, Slovensko	1
V254	2015		2 Kysucká vrchovina, Slovensko	1
V261	2015		6 NPR Břehyně, Kokořínsko, ČR	0
V300	2015		8 Velká Rača, Slovensko	0
V302				0
V303	2015		9 Rheinmattal, Německo	0
V335	2015		8 Velká Rača, Slovensko	1
V342	2015		8 Lalikovci, Slovensko	0
V375	2016		1 Hradčanské stěny, Kokořínsko, ČR	0
V637	2016		1 Hradčanské stěny, Kokořínsko, ČR	0
G015	2015		8 Velká Rača, Slovensko	1
G016	2015		8 Velká Rača, Slovensko	0
G045	2016		1 Podbezdězí, Česká republika	0
F039	2016		1 okolí Bezdězu, Česká republika	0
F040	2016		1 okolí Bezdězu, Česká republika	0
D778	2015		1 Okrouhlica, Kysucká vrchovina, Slovensko	1
D841	2014		3 Bzinská Hol'a, Oravská Magura, Slovensko	0
D939	2014		6 Žobrák, Malá Fatra, Slovensko	0
D940	2014		3 Okrouhlica, Kysucká vrchovina, Slovensko	0
D974	2015		3 Kysucké Beskydy, Slovensko	0
D1003	2015		3 Oravská Magura, Slovensko	0
D1004	2015		3 Oravská Magura, Slovensko	0

6 Metodika

Laboratorní část obsahovala izolaci DNA, namnožení vybraných úseků pomocí PCR a práci s počítačovými programy GeneMarker, STRUCTURE a GenAlEx.

Zmražený trus byl okrájen po vnějších stranách, kde jsou zachyceny buňky sliznice. Na vahách bylo naváženo 180 – 200 mg každého vzorku. Dále jsme postupovali podle návodu, který je přiložen v izolačním kitu. Pro tento výzkum jsem použila kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) (Obrázek 21). Posledním krokem je vymytí DNA, která se zachytila na membráně. Použili jsme 200 μ l pufru ATE. V případě chceme-li koncentrovanější extrakt, použijeme pouze 100 μ l pufru ATE. Změnou pH dojde k uvolnění DNA z membrány.



Obrázek 20: Izolační kit.

Před vlastní PCR je potřeba k vyizolované DNA přidat primery a další složky reakční směsi, jako jsou nukleotidy, polymeráza a další (PCR směs). K 0,7 μ l DNA přidáme 3 μ l Primer mixu a 3 μ l Master mixu, které jsou komerčně dostupné v sadě Canine Genotypes Panel 1.1. (ThermoFisher Scientific). Primer mix obsahuje primery pro všech 18 autozomálních lokusů a jeden pohlavně vázaný – konkrétně: AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTTh260, AHTk253, INU005, INU030, Amelogenin, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTTh171 a REN247M23. Jeden z páru primerů je označen fluorescenčním obarvením na svém konci. Master mix obsahuje chlorid hořečnatý, deoxynukleosidtrifosfáty a

Phusion Hot Start DNA Polymerase. Tyto komponenty jsou uchovávány v teplotě -20 °C (Instruction Manual Canine genotypes Panel 1.1 F-860S/L).

Byl použit termocykler Mastercycler Eppendorf Gradient, na němž byl navolen následující program:

- 1) 98 °C; 3 min
- 2) 98 °C; 15 s
- 3) 60 °C; 75 s
- 4) 72 °C; 30 s
- 5) zpět ke kroku 2; opakovat 29krát
- 6) 72 °C; 5 min

Po namnožení zředíme 0,5 µl PCR produktu 7 µl formamidu a 0,5 µl GeneScan™ – 500 LIZ® Size Standard. Liz500 je standard určený pro dimenzování fragmentů DNA v rozmezí 35 – 500 bp a poskytuje 16 jednovlákných fragmentů. Každý fragment DNA je označen vlastním fluoroforem, což má při denaturačních či nativních podmínkách za následek jediný peak. Následně proběhne denaturace vláken při inkubaci v 95°C po dobu 5 minut. Tyto produkty byly odeslány na fragmentační analýzu na Přírodovědeckou fakultu Univerzity Karlovy v Praze.

Zpětně zasláná data jsou odečítána manuálně v programu GeneMarker®. Vzorky, které se nepodařilo vyizolovat, jsem vyřadila. Výsledky byly zaokrouhleny podle předchozích prací. V té mé je použit dataset ze článku Smetanová *et al.* (2015). Do tohoto datasetu jsem přidala své vzorky, které se podařilo vyizolovat a pustila je v programu STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000).

Program STRUCTURE 2.3.4. jsem nastavila takto:

- Number of individuals: 66
- Number of loci: 18
- Missing data value: 0
- Data files stores data for individual in a single line
- ID for each individual
- Putative population origin for each individual

Length of burn-in period nastaveno na 100 000, což tvoří počet opakování nutných pro ustálení analýzy, které jsou posléze umazány a Number of MCMC Reps after burnin na 900 000, což tvoří finální počet opakování v analýze. Počet zadaných klastrů (K) byl nastaven od $K=1$ do $K=4$. Pro každý klastr byla analýza opakována třikrát. Výsledky analýzy byly zviditelněny v programu Structure Harvester (Earl Dent & von Holdt, 2012).

K získání populačních charakteristik byl použit program GenALEX 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). V tomto programu můžeme zjistit mnoho podrobnějších charakteristik. Pro svůj výzkum jsem zvolila počet alel (N_a), pozorovaná heterozygotita (H_o), očekávaná heterozygotita (H_e) a počty privátních alel.

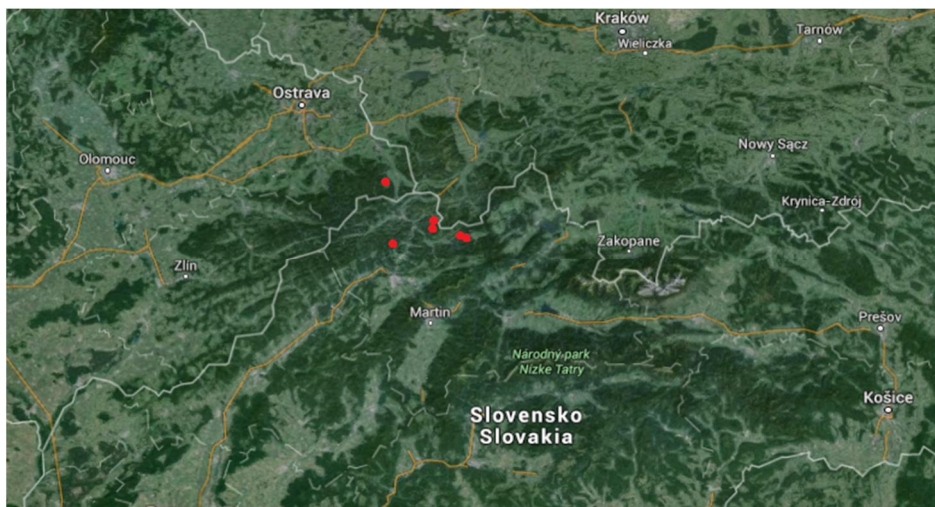
Pro vypočtení indexu inbreedingu (F_{is}) byl použit program Genepop (Raymond & Rousset, 1995).

7 Výsledky

Mikrosatelity se podařilo amplifikovat pouze u 6 z 28 vzorků. V tabulce 2 a na obrázku 22 jsou vytáhnutы informace z předchozí tabulky.

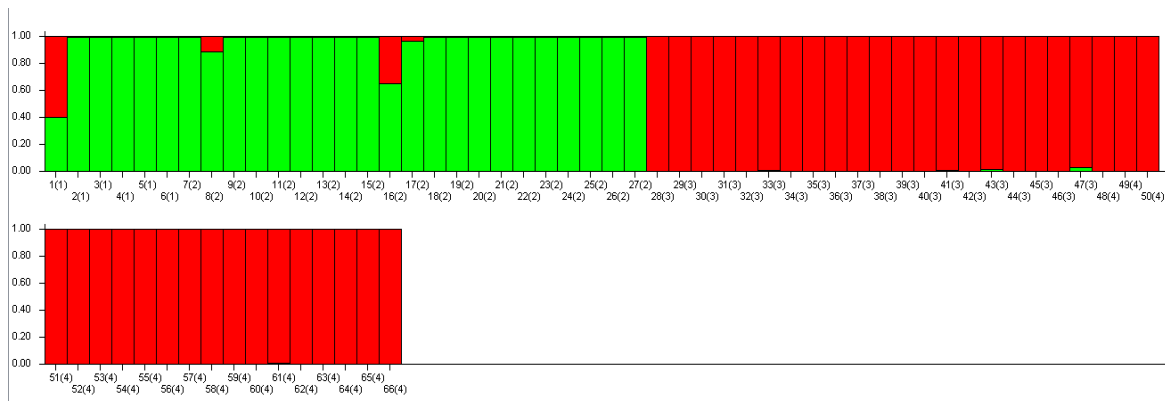
Tabulka 2: Tabulka vyizolovaných vzorků.

Jedinec	Jedinec	rok	měsíc	místo			
1	V217	2015		2 Dolní Lom	Moravskoslezské Beskydy		
2	D778	2015		1 Okrouhlic	Kysucká vrchovina		
3	G015	2015		8 Velká Rač	Kysucké Beskydy		
4	V251	2015		2 Riečnica	Kysucká vrchovina		
5	V254	2015		2 Riečnica	Kysucká vrchovina		
6	V335	2015		8 Velké Rač	Kysucké Beskydy		

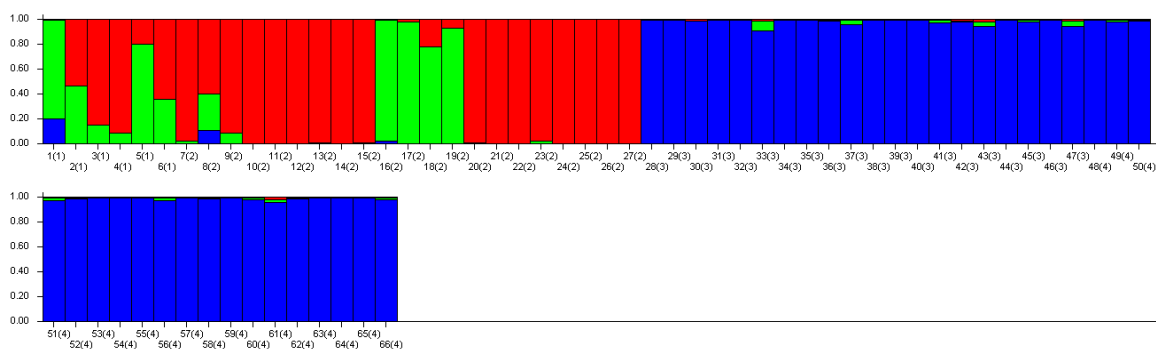


Obrázek 21: Lokality vyizolovaných vzorků.

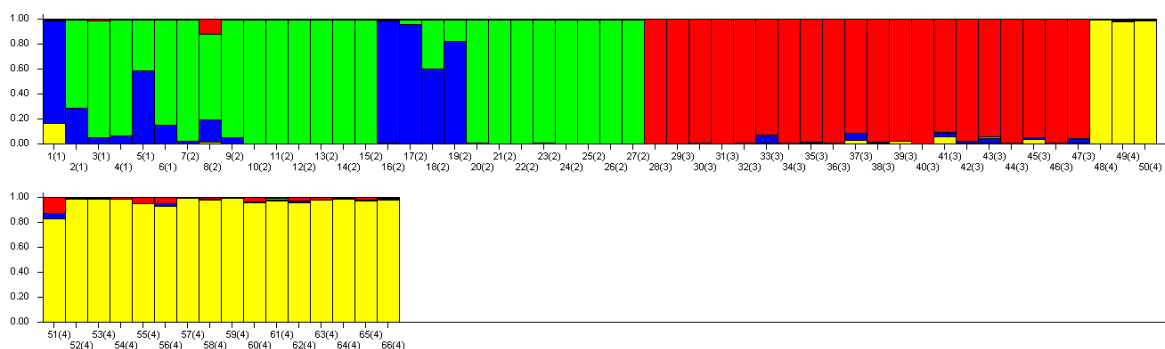
Obrázek 23 potvrzuje, že zkoumané vzorky jsou vlčí. Při $K=2$ došlo k jasnému rozdělení psů a vlků. Populace 1 je šest zkoumaných vzorků. Populace 2 jsou vzorky vlků z datasetu Smetanová et al. (2015), odkud je i populace 3 a 4. Tady se jedná o psy plemen Československý vlčák a Německý ovčák.



Obrázek 22: Při $K=2$ došlo ke zřetelnému rozdělení sledované skupiny jedinců. Zelená značí vlčí genotyp, červená psí.

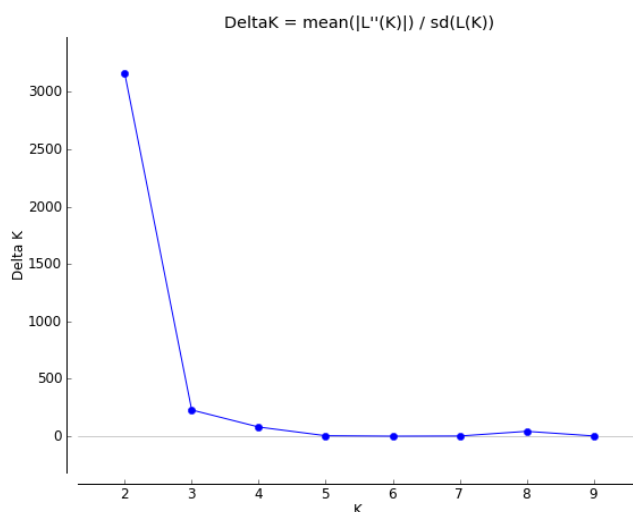


Obrázek 23: Při $K=3$ je naznačena struktura vlčí populace. Psí část zůstává stejná.



Obrázek 24: Při $K=4$ došlo k rozdělení psí populace na dvě plemena (Československý vlčák, Německý ovčák). Vlčí populace přibližně stejná jako při $K=3$.

Při nastavení $K=3$ (Obrázek 24) a $K=4$ (Obrázek 25) je naznačena další struktura sledované populace.



Obrázek 25: Výsledný graf z programu Structure Harvester (Earl Dent & von Holdt, 2012) zobrazující podporu pro klastry vymezené programem STRUCTURE 2. 3. 4. (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000). Jednoznačně největší je při K= 2.

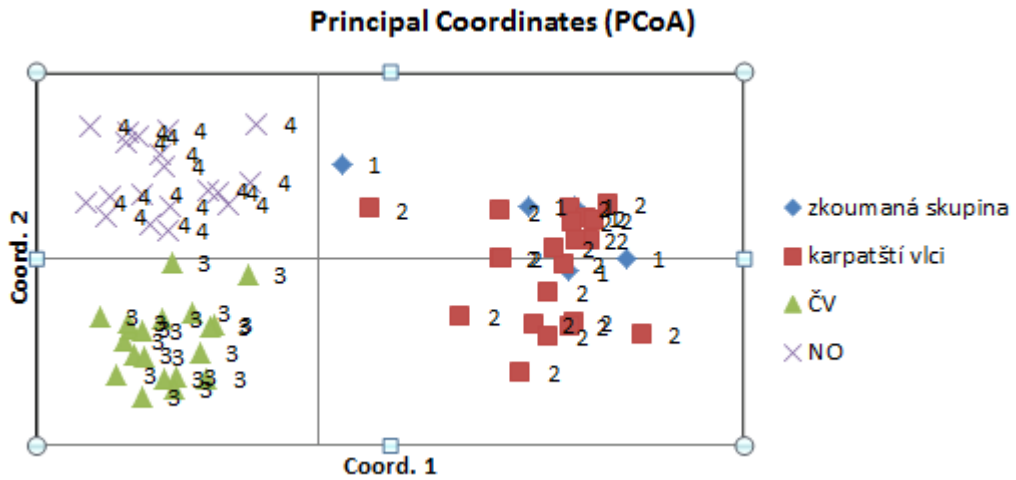
Structure Harvester (Earl Dent & von Holdt, 2012) vygeneroval největší podporu pro K=2. Pro K=<3; 9> je graf téměř shodný (Obrázek 26).

Tabulka 3: Populační charakteristiky. Na (počet alel), Ho (pozorovaná heterozygotita), He (očekávaná heterozygotita), Fis (koeficient inbreedingu), procentuální zastoupení privátních alel v genomu (číslo je průměrem jednotlivců populace), počet privátních alel v genomu (číslo je průměrem jednotlivců populace).

Populace	Na	Ho	He	Fis	% zastoupení priv. Alel	Poč. privátních alel
1	4.778	0.6083	0.712	0.2517	0.8890	16
2	6.389	0.6517	0.693	0.0818	1.8330	33
3	4.389	0.5546	0.547	0.0128	0.5000	9
4	4.444	0.6008	0.584	-0.0027	0.7780	14

V tabulce 3 jsou výsledky analýzy sledované populace v programu GenALEx 6. 5. Zadaná čísla jsou průměrem jednotlivců námi vymezené populace. Populace karpatských vlků má přibližně dvojnásobný počet jak privátních alel, tak alel obecně oproti námi sledované populaci č. 1. Při porovnání heterozygotnosti pozorované a očekávané nejsou rozdíly markantní. Větší rozdíl je zpozorován ve zkoumané první populaci. I přes to lze statisticky říci, že se zde neprojevila významná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Všechny lokusy jsou 100% polymorfni u všech populací. Největší stupeň inbreedingu (Fis – index inbreedingu) pro změřen pro zkoumanou populaci. Hodnoty jsou přibližně trojnásobné (viz tabulka 3) oproti karpatské populaci. Nejmenší inbreeding byl naměřen ve sledované populaci

Německých ovčáků. Na obrázku 27 je znázorněn graf, který vypovídá o genetické podobnosti zadaného datasetu. Koordináta 1 vysvětluje 21,93 % variability, zatímco koordináta 2 vysvětluje 7,74 %.



Obrázek 26: Výsledný graf znázorňující genetické rozdíly mezi jedinci. ČV= Československý vlčák, NO= Německý ovčák.

8 Diskuze

Při PCR bylo úspěšně amplifikováno 21 % vzorků. K amplifikaci nedošlo u DNA, která byla zřejmě velmi fragmentovaná a degradovaná. To může být způsobeno stářím vzorku, na který působily vnější podmínky, jako je nevhodná teplota a vlhkost. U neinvazivních metod je nízká výtěžnost a velká pravděpodobnost degradace DNA obvyklá (Taberlet *et al.*, 1999). V našem případě se primery amplifikovaly spíše na kratší lokusy, což svědčí o fragmentaci námi vyizolované DNA.

Analýza v programu Structure u výsledků pro $K=2$ označila všechny námi zkoumané jedince jako vlky, avšak u jedince číslo jedna z Dolní Lomné je viditelný překryv s populací domácích psů. Z obrázku 22 znázorňujícího variabilitu zkoumaných vzorků je taktéž zřejmá genetická podobnost našeho vzorku č. 1 s datasetem psů ze studie Smetanové *et al.* (2015), což podporuje teorii, že by se mohlo jednat o hybrida psa a vlka. Abychom vyhodnotili tohoto jedince jako hybrida, je potřeba celou analýzu zopakovat od extrakce DNA a analyzovat tohoto jedince metodami přímo navržené pro testování hybridních kategorií jako je např. NewHybrids (Anderson *et al.*, 2000). Rozdělení analyzovaného datasetu na dva klastry, oddělující vlky a psy, mělo největší podporu v programu Structure Harvester, což odpovídá výsledkům práce Smetanové *et al.* (2015).

Genetická strukturovanost vlčích populací je viditelná při analýze vyššího počtu klastrů. Abychom však dokázali korelovat tuto strukturu například s geografickými bariérami či environmentálními podmínkami, je potřeba v další práci použít metody krajinné genetiky.

Czarnomska *et al.* (2013) sledovala střet dvou populací na polském území. V jižní části Polska, která sousedí s lokalitami nálezů našich vzorků (Obrázek 13, subpopulace S1), bylo zjištěno nižší procentuální zastoupení privátních alel a to 0,091. V porovnání s naší populací 1 a 2 je to velmi málo. Vyšší zastoupení privátních alel v našem datasetu může být však způsobeno čistě náhodně vzhledem k omezenému počtu analyzovaných jedinců. Některé alely tak mohly být zaznamenány pouze u jednoho jedince, přestože v celkové populaci mohou být běžné.

Stejně jako v práci Smetanové *et al.* (2015) byl u vlčích populací zjištěn větší počet alel, vyšší heterozygotnost a nižší stupeň inbreedingu. Mezi zkoumanou populací

a kontrolní populací nebyly rozdíly příliš významné. Analýza hlavních koordinát (PCoA) také naznačuje překryv námi zkoumaných a kontrolních vzorků.

Velkou nevýhodou této analýzy je malý počet amplifikovaných vzorků a proto nelze s velkou pravděpodobností stanovit konkrétní prognózy a závěry pro populaci v této oblasti. Dále je nemožné porovnat naše data s oficiálními daty z předchozích výzkumů karpatské populace na Slovensku, protože taková ještě nebyla publikována. To znemožňuje objektivní porovnání.

9 Závěr

Z literární rešerše vyplývá, že fragmentovanost evropské populace se směrem z východu na západ kontinentu zvyšuje, a její jednotlivé části jsou izolované. Avšak díky stoupajícímu trendu téměř všech populací (mimo populaci v Sierře Moreně a Karélii) (Kaczensky *et al.*, 2012), který je způsoben lepší právní ochranou ve většině evropských zemí, vlci osidlují nová území. V budoucnu by tak mohlo dojít ke stabilnějšímu propojení některých populací, čímž by se velmi snížilo riziko inbreedingu a zvýšila by se genetická variabilita. Takovýto potenciál má například dinársko-balkánská populace s alpskou či karpatskou populací. Nejizolovanější populací se zdá být iberijská populace.

Výskyt vlka obecného (*Canis lupus*) v oblasti západních Karpat můžeme potvrdit na základě nálezu vzorku trusu, jehož původ byl určen jako vlčí. Vzorky z Kokořínska bohužel nebyly v mé práci amplifikovány, ale zde již existuje mnoho spolehlivých důkazů, hlavně předchozích genetických analýz trusu a snímků z fotopastí.

V oblasti slovenských Karpat je další výzkum vlků velmi doporučen. Zjištění populačních charakteristik pro karpatskou a středoevropskou populaci, které se nevztahují pouze k Polsku (Czarnomska *et al.*, 2013), ale jsou komplexní pro každou populaci, bude velmi prospěšné i pro budoucí českou populaci. Právě Česká republika leží na území, na němž by se mohly tyto dvě populace v budoucnu propojit.

10 Reference

- Álvares F, Barroso I, Blanco JC, Correia J, Cortés Y, Costa G, Llaneza L, Moreira L, Nascimento J, Palacios V, Petrucci-Fonseca F, Pimenta V, Roque S, Santos E. 2005. Wolf status and conservation in the Iberian Peninsula. International Congress Frontiers of Wolf Recovery. Colorado: Colorado Springs, p 66-67.
- Anděra M, Červený J, Bufka L, Bartošová D, Koubek P. 2004. Současné rozšíření vlka obecného (*Canis lupus*) v České republice. *Lynx* 35: 5–12.
- Anděra M, Červený J. 2009. Velcí savci v České republice: Rozšíření, historie a ochrana. 2. Šelmy (Carnivora). Praha: Národní muzeum. 216p.
- Anderson EC, Williamson EG, Thompson EA. 2000. Monte Carlo evaluation of the likelihood for Ne from temporally-spaced samples. *Genetics* 156: 2109-2118.
- Andresková E. 1993. Tisíc let myslivosti. Vimperk: Tina. 442p.
- Ansorge H, Kluth G, Hahne S. 2006. Feeding ecology of wolves *Canis lupus* returning to Germany. *Acta Theriologica* 51: 99-106.
- AOPK ČR. 2014. Obrázek mladého vlčete na Kokořínsku. Available at http://www.denik.cz/z_domova/vlci-z-brehyne-se-rozmnozuj-narodila-se-nejmene-tri-vcata-20140904-k209.html: Accessed 2016-03-20.
- Arlettaz R, Patthey P, Baltic M, Leu T, Schaub M, Palme R, Jenni-Eiermann S. 2007. Spreading free-riding snow sports represent a novel serious threat for wildlife. *Proceedings of the Royal Society Britain* 274: 1219-1224.
- Aspi J, Roininen E, Kiiskilä J, Roukonen M, Kojola I, Bljudnik L, Danilov P, Heikkinen S, Pulliainen E. 2009. Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. *Conservation Genetics* 10: 815-826.
- Aspi J, Roininen E, Ruokonen M, Kojola I, Vilà C. 2006. Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Molecular Ecology* 15: 1561-1576.
- Avise JC, Walker D, Johns GG. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceeding of the Royal Society B* 265: 1707-1712.

- Awise JC. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution, 2nd Edition. Sunderland: Sinauer. 684p.
- Balčiauskas L. 2008. Wolf numbers and distribution in Lithuania and problems of species conservation. *Annales Zoologici Fennici Journal* 45: 329-334.
- Baltrūnaitė L, Balčiauskas L, Åkesson. 2013. The genetic structure of the Lithuanian wolf population. *Central European Journal of Biology* 8: 440-447.
- Bartošová D. 1998. Osud vlků v Beskydech je nejistý. *Veronica* 12: 1-7.
- Blanco JC, Rodríguez A, Cuesta L, Reig S, del Olmo JC. 1990. El lobo en Sierra Morena. Blanco JC, Cuesta L, Reig S editors. *El lobo (Canis lupus) en España. Situación, problemática y apuntes sobre su ecología*. Madrid: Instituto para la Conservación de la Naturaleza, p61-68. (ex López-Bao *et al.*, 2015)
- Boitani L. 2000. Action Plan for the conservation of the wolves (*Canis lupus*) in Europe. Strasbourg: Council of Europe Publishing. 86p.
- Boitani L, Ciucci P, Raganella-Pelliccioni E. 2010. Ex-post compensation payments for wolf predation on livestock in Italy: a tool for conservation? *Wildlife Research* 37: 722-730.
- Breitenmoser U. 1998. Large predators in the Alps: the fall and rise of man's competitors. *Biological Conservation* 83: 279-289.
- Bruford M, Cheeseman D, Coote T, Green H, Haines S, O'Ryan C, Williams T. 1996. Microsatellites and their application to conservation genetics. Smith T, Wayne R editors. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford: Oxford University Press, p278-297.
- Bufka L, Heurich M, Engleder T, Wölfl M, Červený J, Scherzinger W. 2005. Wolf occurrence in the Czech-Bavarian-Austrian border region – review of the history and current status. *Silva Gabreta* 11: 27-42.
- Caniglia R, Fabbri E, Galaverni M, Milanese P, Randi E. 2014. Noninvasive sampling and genetic variability, pack structure, and dynamics in an expanding wolf population. *Journal of Mammalogy* 95: 41-59.
- Carmichael LE, Nagy JA, Larter NC, Strobeck C. 2001. Prey specialization may influence patterns of gene flow in wolves of the Canadian Northwest. *Molecular Ecology* 10: 2787-2798.

- Czarnomska SD, Jędrzejewska B, Borowik T, Niedzialkowska M, Stronen AV, Nowak S, Myslajek RW, Okarma H, Konopiński M, Pilot M, Śmietana W, Caniglia R, Fabbri E, Randi E, Pertoldi C, Jędrzejewski W. 2013. Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics* 14: 573-588.
- Danilov IP. 2005. Game animals of Karelia. Ecology, resources, management, protection. Moskva: Nauka. 338p.
- De Groot AG, Nowak C, Skrbinšek T, Fumagalli L, Godinho R, Harms V, Jansman HAH, Liberg O, Marucco F, Myslajek RW, Nowak A, Pilot M, Randi E, Reinhardt I, Śmietana W, Szewczyk M, Taberlet P, Vilà, Muñoz-Fuentes V. 2015. Decades of population genetic research reveal the need for harmonization of molecular markers: the grey wolf *Canis lupus* as a case study. *Mammal Review* 46: 44-59.
- Djan M, Maletić V, Trbojević I, Popović D, Veličković N, Burazerović J, Ćirović D. 2014. Genetic diversity and structuring of the grey wolf population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation. *Mammalian Biology* 79: 277-282.
- Earl Dent A, von Holdt BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Echegaray J, Vilà C. 2009. Noninvasive monitoring of wolves at the edge of their distribution and the cost of their conservation. *Animal Conservation* 13: 157-161.
- Ellegren H. 1999. Inbreeding and relatedness in Scandinavian grey wolves *Canis lupus*. *Hereditas* 130: 239-244.
- Fabbri E, Caniglia R, Kusak J, Galov A, Gomerčić T, Arbanasić H, Huber D, Randi E. 2013. Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps. *Mammalian Biology* 79: 138-148.
- Fabbri E, Miquel C, Lucchini V, Santini A, Caniglia R, Duchamp C, Weber JM, Lequette B, Marucco F, Boitani L, Fumagalli L, Taberlet P, Randi E. 2007. From the

- Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology* 16: 1661-1671.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Farago S. 1992. Current status of the wolf (*Canis lupus*) in Hungary. Promberger C, Schröder W editors. Proceedings of the workshop: Wolves in Europe – current status and prospects. Německo: European Wolf Network, p45-49.
- Fernando DM. 2014. Obrázek *Canis lupus signatus*. Available at <http://www.fotonatura.org/galerias/general/511768>: Accessed 2016-03-20.
- Flagstad Ø, Walker CW, Vilà C, Sunqvist A-K, Fernholm B, Hufthammer AK, Wiig Ø, Koyola I, Ellegren H. 2003. Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular Ecology* 12: 869-880.
- Flegr J. 2005. *Evoluční biologie*. Praha: Academia. 560p.
- Flousek J, Kutal M, Benda P, Klitsch M, Kafka P, Kuna P, Pavel V, Pudil M, Tejrovský V. 2014. Současný výskyt rysa ostrovida (*Lynx lynx*) a vlka obecného (*Canis lupus*) v severním a severozápadním pohraničí České republiky. Kutal M, Suchomel J a kol editors. *Velké šelmy na Moravě a ve Slezsku*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, p91-97.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe D A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. New York: Cambridge University Press. 617p.
- Fritts SH. 1983. Record dispersal by a wolf from Minnesota. *Journal of Mammalogy* 64: 1169 – 1175.
- Gade-Jørgensen I, Stagegaard R. 2000. Diet composition of wolves *Canis lupus* in east-central Finland. *Acta Theriologica* 45: 537-547.
- Gaubert P, Bloch C, Benyacoub S, Abdelhamid A, Pagani P, Djagoun C, Couloux A, Dufour S. 2012. Reviving the african wolf *Canis lupus lupaster* in north and west Africa: A mitochondrial lineage ranging more than 6,000 km wide. Available at <http://journals.plos.org/articles/>: Accessed 2016-02-19.

- Gese EM, Mech LD. 1991. Dispersal of wolves (*Canis lupus*) in north-eastern Minnesota. *Canadian Journal of Zoology* 69: 2946-2955.
- Godinho R, Llaneza L, Blanco JC, Lopes S, Álvares F, García EJ, Palacios V, Cortés Y, Ferrand N. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 20: 5154-5166.
- Gomerčić T, Sindičić M, Galov A, Arbanasić H, Kusak J, Kocijan I, Gomerčić MD, Huber D. 2010. High Genetic Variability of the Grey Wolf (*Canis lupus*) population from Croatia as revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Zoological Studies* 49: 813-823.
- Grisolia AB, Moreno – Cotulio VR. 2012. Molecular Markers and Genetic Diversity in Neotropical Felids. Available at: <http://www.intechopen.com/books/analysis-of-genetic-variation-in-animals/molecular-markers-and-genetic-diversity-in-neotropical-felids>: Accessed 2016-02-01.
- Hell P, Slamečka J, Gašparík J. 2001. Vlk vo slovenských Karpatoch a vo svete. Bratislava: PaRPRESS. 182p.
- Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hewitt GM. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hindrikson M, Remm J, Männil P, Ozolins J, Tammeleht E, Saarma U. 2013. Spatial genetic analyses reveal cryptic population structure and migration patterns in a continuously harvested grey wolf (*Canis lupus*) population in north-eastern Europe. *PLoS ONE* 8: e75765.
- Hnutí DUHA. 2015a. Obrázek z fotopasti. Available at <http://www.selmy.cz/clanky/vraceji-se-vlci-na-sumavu-unikatni-ulovek-fotopasti-rozsiruje-povedomi-o-bohatstvi-divociny-na-sumave/>: Accessed 2016-03-20.
- Hnutí DUHA. 2015b. Vlka na Broumovsku zachytila fotopast. Available at <http://monitoring.selmy.cz/informacni-zdroje/clanky-na-selmy-cz/tiskove-zpravy/vlka-na-broumovsku-zachytila-fotopast/>: Accessed 2016-03-21.

- Hnutí DUHA. 2015c. Vracejí se vlci na Šumavu? Available at <http://www.selmy.cz/clanky/vraceji-se-vlci-na-sumavu-unikatni-ulovek-fotopasti-rozsiruje-povedomi-o-bohatstvi-divociny-na-sumave/>: Accessed 2016-03-21.
- Hnutí DUHA. 2016a. Vlčí smečka na Doskesku se rozrostla i loni. Available at <http://www.selmy.cz/tiskove-zpravy/vlci-smecka-na-dokesku-se-rozrostla-i-loni/>: Accessed 2016-03-21.
- Hnutí DUHA. 2016b. Po deseti letech se do Jeseníků vrátil vlk. Available at <http://www.selmy.cz/tiskove-zpravy/po-deseti-letech-se-do-jeseniku-vratil-vlk/>: Accessed 2016-03-21.
- Hofreiter M. 2007. Pleistocene extinctions: haunting the survivors. *Current Biology* 17: R609-R611.
- Hruban V, Majzlík I. 2002. *Obecná genetika*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. 316p.
- Huber D, Kusak J, Frković A, Gužvica G. 2002. Causes of wolf mortality in Croatia in the period 1986-2001. *Veterinarski Arhiv* 72: 131-139.
- Huber D, Kusak J, Kovačić D, Frković A, Radović J, Štahan Ž. 1999. Temporary wolf management plan for Croatia. Zagreb, Croatia: State institute for Nature Protection. 1p.
- Huck M, Jędrzejewski W, Borowik T, Jędrzejewska B, Nowak S, Mysłajek RW. 2011. Analyses of least cost paths for determining effects of habitat types on landscape permeability: wolves in Poland. *Acta Theriologica* 56: 91-101
- Hulva P, Černá Bolfíková B, Smetanová M, Kutal M. 2014. Monitoring vlka obecného v Západních Karpatech pomocí neinvazivní genetiky. Kutal M, Suchomel J a kol editors. *Velké šelmy na Moravě a ve Slezsku*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, p119-122.
- Chapron G, López-Bao JV. 2014. Conserving carnivores: Politics in play. *Science* 343: 1199-1200.
- Chapron G, Wikenros C, Liberg O, Svensson L, Åkesson M, Månsson J, Zimmermann B, Milleret C, Wabakken P, Sand H. 2015. Population estimates for the Scandinavian wolf population and sample-based monitoring – development of

- a new method. Available at <http://www.slu.se/Documents/externwebben/nj-fak/ekologi/forskning/skandulv%20dokument/Chapron%20et%20al%202015%20Population%20estimates%20for%20the%20Scandinavian%20wolf%20populati on%20and%20sample-based%20monitorig%20-%20development%20of%20a%20new%20method.pdf>: Accessed 2016-03-15.
- Chinese Academy of Fishery Science. 2016. Obrázek mikrosatelitových alel. Available at <http://genomics.cafs.ac.cn/ssrdb/index.php?do=about>: Accessed 2016-03-20.
- Iacolina L, Scandrua M, Gazzola A, Cappai N, Capitani C, Mattioli L, Vercillo F, Apollonio M. 2010. Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: a contribution to the study of wolf-dog hybridization patterns. *Mammalian Biology* 75: 341-347.
- IUCN. 2016. Obrázek rozšíření vlka obecného. Available at <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=3746>: Accessed 2016-03-20.
- Jaeger JAG, Bowman J, Brennan J, Fahrig L, Bert D, Bouchard J, Charbonneau N., Frank K, Gruber B, Tluk von Toschanowitz K. 2005. Predicting when animal population are at risk from roads: an interactive model of roads avoidance behavior. *Ecological Modeling* 185: 329-348.
- Jędrzejewski W, Jędrzejewska B, Andersone-Lilley Z, Balčiauskas L, Mannil P, Ozolins J, Sidorovich V, Bagrade G, Ornicans A, Nowak S, Zunna A. 2010. Synthesizing wolf ecology and management in Eastern Europe: similarities and contrasts with North America. Musiani M, Boitani L, Paquet PC, editors. *The world of wolves: new perspectives on ecology, behaviour and management*. Calgary: University of Calgary Press, p207-233.
- Jędrzejewski W, Branicki W, Veit C, Medugorac I, Pilot M, Bunevich AN, Jędrzejewska B, Schmidt K, Theuerkauf J, Okarma H, Gula R, Szymura L, Förster M. 2005a. Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. *Acta Theriologica* 50: 3-22.
- Jędrzejewski W, Niedzialkowska M, Hayward MW, Goszczyński J, Jędrzejewska B, Borowik T, Bartoń KA, Nowak S, Harmuszkiewicz J, Juszczyk A, Kalamarz T, Kloch A, Koniuch J, Kotiuk K, Mysłajek RW, Nedzyńska M, Olczyk A, Teleon M, Wojtulewicz M. 2012. Prey choice and diet in wolves related to differentiation

- of ungulate communities and corresponding wolf subpopulations in Poland. *Journal of Mammalogy* 33: 1480-1492.
- Jędrzejewski W, Niedzialkowska M, Myslajek RW, Nowak S, Jdrzejewska B. 2005b. Habitat selection by wolves *Canis lupus* in the uplands and mountains of southern Poland. *Acta Theriologica* 50: 1-22.
- Jędrzejewski W, Schmidt K, Jędrzejewska B, Theuerkauf J, Kowalczyk R, Zub K. 2004. The proces of wolf pack splitting in Białowieża Primeval Forest, Poland. *Acta Theriologica* 49: 275-280.
- Jiang G. 2013. Molecular Markers and Marker_Assisted Breeding in Plants. Available at <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding-from-laboratories-to-fields/molecular-markers-and-marker-assisted-breeding-in-plants/>: Accessed 2016-01-24.
- Kaartinen S, Kojola I, Colpaert A. 2005. Finnish wolves avoid roads and settlements. *Annales Zoologici Fennici* 42: 523-532.
- Kaczensky P, Chapron G, von Arx M, Huber D, Andrén H, Linnell JDC. 2012. Status, management and distribution of large carnivores – bear, lynx, wolf & wolverine – in Europe, part 2. Available at http://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/carnivores/pdf/task_1_part2_species_country_reports.pdf: Access 2016-02-29.
- Kelkar YD, Strubczewski N, Hile SE, Chiaromonte F, Eckert K, Makova KD. 2010. What is a Microsatellite: A Computational and Experimental Definition Based upon Repeat Mutational Behavior at A/T and GT/AC Repeats. Available at <http://gbe.oxfordjournals.org/>: Accessed 2015-12-04.
- Kluth G, Gruschwitz M, Ansorge H. 2002. Wölfe in Sachsen – 2002. *Naturschutzarbeit in Sachsen* 44: 41-46. (ex Ansorge et al., 2006)
- Kluth G, Reinhardt I. 2013. *Mit Wölfen leben: Informationen für Jäger, Förster und Tierhalter in Sachsen und Brandenburg*. Dresden: Sächsisches Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft. 37p. (ex Kutal et al., 2014)
- Kojola I, Aspi J, Hakala A, Heikkinen S, Ilmoni C, Ronkainen S. 2006. Dispersal in an expanding wolf population in Finland. *Journal of Mammalogy* 87: 281-286.

- Kojola I, Määttä E. 2004. Suupetojen lukumäärä ja lisääntyminen vuonna 2003. Riistantutkimuksen tiedote 9: 1-7. (ex Kojola et al., 2006)
- Kusak J. 2002. Conditions for life of wolves (*Canis lupus*) in Croatia [Ph.D.]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, 239p.
- Kutal M, Duhonský D. 2014. Současný výskyt rysa ostrovida (*Lynx lynx*) a vlka obecného (*Canis lupus*) v širší oblasti Jeseníků. Kutal M, Suchomel J a kol editors. Velké šelmy na Moravě a ve Slezsku. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, p98-100.
- Kutal M, Váňa M, Machalová L, Bojda M. 2014. Výskyt rysa ostrovida a vlka obecného v letech 2003-2012 v CHKO Beskydy a širším okolí. Kutal M, Suchomel J a kol editors. Velké šelmy na Moravě a ve Slezsku. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, p108-113.
- Lehman N, Wayne RK, Allard MW, Honeycutt RL. 1992. Mitochondrial DNA Variability of the Gray Wolf: Genetic Consequences of Population Decline and Habitat Fragmentation. *Conservation Biology* 6: 559-569.
- Leonard JA, Vilà C, Fox-Dobbs K, Koch PL, Wayne RK, Van Valkenburgh B. 2007. Megafaunal extinctions and the disappearance of a specialized wolf ecomorph. *Current Biology* 17: 1146-1150.
- Leonard JA. 2014. Ecology drives evolution in grey wolves. *Evolutionary Ecology Research* 16: 461-473.
- Liberg O, Andren H, Pedersen H-C, Sand H, Sejberg D, Wabakken P, Åkesson M, Bensch S. 2005. Severe inbreeding depression in a wild wolf *Canis lupus* population. *Biology letters* 1: 17-20.
- Liberg O, Aronson Å, Sand H, Wabakken P, Maartman E, Svensson L, Åkesson M. 2012. Monitoring of wolves in Scandinavia. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 23: 29-34.
- Linnell JDC, Brøseth H, Solberg E, Brainerd SM. 2005. The origins of the southern Scandinavian wolf *Canis lupus* population: potential for natural immigration in relation to dispersal distances, geography and Baltic ice. *Wildlife Biology* 11: 383-391.

- Linnell JDC, Salvatori V, Boitani L. 2007. Guidelines for population level management plans for large carnivores. Large Carnivore Initiative for Europe report prepared for the European Commission. Rome: Large Carnivore Initiative for Europe. 85p.
- Llaneza L, López-Bao JV, Sazatornil V. 2012. Insights into wolf presence in human-dominated landscapes: the relative role of food availability, humans and landscape attributed. *Diversity and Distributions* 18: 459-469.
- López-Bao JV, Blanco JC, Rodríguez A, Godinho R, Sazatornil V, Alvares F, García JE, Llaneza L, Rico M, Cortés Y, Palacios V, Chapron G. 2015. Toothless wildlife protection laws. *Biodiversity and Conservation* 24: 2105-2108.
- Lõugas L, Maldre L. 2000. The history of theriofauna in the Eastern Baltic Region. *Folia Theriologica Estonica* 5: 86-101
- Lucchini V, Fabbri E, Marucco F, Ricci S, Boitani L, Randi E. 2002. Non invasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology* 11: 857-868.
- Lucchini V, Galov A, Randi E. 2004. Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Molecular Ecology* 13: 523-536.
- Marescot L, Pradel R, Duchamp C, Cubaynes S, Marboutin E, Choquet R, Miquel C, Gimenez O. 2011. Capture-recapture population growth rate as a robust tool against detection heterogeneity for population management. *Ecological Applications* 21: 2898-2907.
- Marucco F, Pletscher DH, Boitani L, Schwartz MK, Pilgrim KL, Lebreton J-D. 2009. Wolf survival and population trend using non-invasive capture-recapture techniques in the Western Alps. *Journal of Applied Ecology* 46: 1003-1010.
- Marucco F. 2011. Distribution habitat suitability and connectivity of wolves (*Canis lupus*) in the Alps. Valdieri: Umweltbundesamt Österreich. 23p.
- Mech LD, Boitani L. 2004. Grey wolf (*Canis lupus*). Sillero-Zubiri C, Hoffmann M, Macdonald DW editors. *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs*. Švýcarsko, Velká Británie: IUCN Publications Service Units, p124–129.
- Mech LD, Boitani L. 2010. *Canis lupus*. Available at: <http://www.iucnredlist.org>: Accessed 2016-02-19.

- Mech LD, Peterson RO. 2003. Wolf – prey relations. Mech LD, Boitani L, editors. Wolves: Behavior, Ecology, and Conservation. Chicago: University of Chicago Press, p131-157.
- Mech LD. 1987. Age, season, distance, direction, and social aspects of wolf dispersal from a Minnesota pack. Chepko-Sade BD, Tang Halpin Z editors. Mammalian dispersal patterns. Chicago: University Chicago Press, p55-74.
- Milenković M, Jojić Šlpetić V, Blagojević J, Tatović S, Vujošević M. 2010. Skull variation in Dinaric-Balkan and Carpathian gray wolf populations revealed by geometric morphometric approaches. Journal of Mammalogy 91: 376-386.
- National Human Genome Research Institute. 2016. Obrázek mitochondriální DNA. Available at <http://www.genome.gov/Glossary/index.cfm?id=129>: Accessed 2016-03-20.
- Naturschutzbund Deutschland. 2014. Obrázek středoevropské populace – německé části. Available at <http://www.selmy.cz/clanky/vlci-a-my-jak-jsem-se-v-ceske-krajine-setkala-s-vlky/>: Accessed 2016-03-20.
- Niegel JE. 1996. Estimation of effective population size and migration parameters from genetic data. Niegel JE editor. Molecular genetic approaches in conservation genetics. New York: Oxford University Press, p329-346.
- Nowak RM. 2003. Wolf evolution and taxonomy. Mech LD, Boitani L editors. Wolves: Behavior, Ecology, and Conservation. Chicago: The University of Chicago Press, p239-258.
- Nowak S, Myslajek RW, Jędrzejewska B. 2005. Patterns of wolf *Canis lupus* predation on wild and domestic ungulates in the Western Carpathian Mountains (S Poland). Acta Theriologica 50: 263-276.
- Nowak S, Myslajek RW, Jędrzejewska B. 2008. Density and demography of wolf, *Canis lupus* population in the western-most part of the Polish Carpathian Mountains, 1996 – 2003. Folia Zoologica 57: 392-402.
- Okarma H. 1995. The trophic ecology of wolves and their predatory role in ungulate communities of forest ecosystems in Europe. Acta Theriologica 40: 335-386.
- Oković P. 2008. Report about the status of wolf population in Croatia in 2008. Zagreb: State institute for Nature Protection. (ex Gomerčić *et al.*, 2010)

- Ordiz A, Milleret C, Kindberg J, Månsson, Wabakken, Swenson JE, Sand H. 2015. Wolves, people, and brown bears influence the expansion of the recolonizing wolf population in Scandinavia. *Ecosphere* 6: 1-14.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Perez-Sweeney BM, Rodrigues FP, Melnick D. 2003. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. Cullen Jr. L, Rudran R, Valladares-Padua C, Santos AJ et al – Curitiba, editors. Métodos de estudos em Biologia da Conservação e Manejo da vida silvestre. Sao Paulo: Fundação O Boticário de Proteção à Natureza. 667p. (ex Grisolia & Moreno-Cotulio, 2012)
- Svensson L, Wabakken P, Kojola I, Maartmann E, Strømseth TH, Åkesson M, Flagstad Ø. 2014. Varg i Skandinavien och Finland: Slutrapport från inventering av varg vintern 2013-2014. Available at <http://www.slu.se/Documents/externwebben/centrumbildningarprojekt/Viltskadecenter-dokument/VSC-publikationer/VSC%20Rapporter/VSC%20Rapporter%202014/Varg-i-Skandinavien-o-Finland-2013-14-svensk-web.pdf>: Accessed 2016-03-15. (ex Chapron *et al.*, 2015).
- Pilot M, Branicki W, Jędrzejewski W, Goszczyński J, Jędrzejewska B, Dykyy I, Shkvryra M, Tsingarska E. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2873414/>: Accessed 2016-02-21.
- Pilot M, Greco C, von Holdt BM, Jędrzejewska B, Randi E, Jędrzejewski W, Sidorovich VE, Ostrander EA, Wayne RK. 2014. Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in European wolves. Available at <http://eprints.lincoln.ac.uk/13004/>: Accessed 2016-03-05.
- Pilot M, Jędrzejewski W, Branicki W, Sidorovich VE, Jędrzejewska B, Stachura K, Funk SM. 2006. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology* 15: 4533-4553.
- Pulliainen E. 1965. Studies on the wolves (*Canis lupus*) in Finland. *Annales Zoologici Fennici* 2: 215-259.

- Ramírez O, Alet L, Enseñat, Vilà C, Canche Z, Riuz A. 2006. Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conservation Genetics* 7: 861-878.
- Randi E, Hulva P, Fabbri E, Galaverni M, Galov A, Kusak J, Bigi D, Černá Bolfíková B, Smetanová M, Caniglia R. 2014. Multilocus Detection of Wolf × Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection. *PLoS One* 9: e91412.
- Randi E, Lucchini V, Christensen MF, Mucci N, Funk SM, Dolf G, Loeschcke V. 2000. Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: Detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology* 14: 464-473.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86: 248-249.
- Ražen N, Brugnoli A, Castagna C, Groff C, Kaczensky P, Kljun F, Knauer F, Kos I, Krofel M, Luštrik R, Majić A, Rauer G, Righetti D, Potočnik H. 2015. Long-distance dispersal connects Dinaric-Balkan and Alpine grey wolf (*Canis lupus*) populations. *European Journal of Wildlife Research* 62: 137-142.
- Reinhardt I, Kluth G, Nowak S, Myslajek RW. 2015. Standards for the monitoring of the Central European wolf population in Germany and Poland. Bonn: Bundesamt für Naturschutz. 43p.
- Relichová J. 2009. Genetika populací. Brno: Masarykova univerzita/Nakladatelství pro Přírodovědeckou fakultu. 187p.
- Rovdata. 2015. Obrázek skandinávské populace. Available at <http://www.environment.no/topics/biodiversity/species-in-norway/large-carnivores/wolf/>: Accessed 2016-03-20.
- Rybář P. 1982. Závěrečná zpráva o 1. Etapě zoologického inventarizačního průzkumu 1981 – 1982 [MS]. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny. (ex Kutal *et al.*, 2014)
- Salvatori V, Linnel J. 2005. Report on the conservation status and threats for wolf (*Canis lupus*) in Europe. Strasbourg: Council of Europe. 24p.

- Sastre N, Vilà C, Salinas M, Bologov VV, Urios V, Sánchez A, Francino O, Ramírez O. 2011. Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations. *Conservation Genetics* 12: 701-712.
- Seddon JM, Parker HG, Ostrander EA, Ellegren G. 2005. SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population. *Molecular Ecology* 14: 503-512.
- Sillero-Zubiri C. 2009. Family Canidae (Dogs). *Handbook of the Mammals of the World*. Vol. 1. Wilson DE, Mittermeier RA, editors. Carnivores. Barcelona: Lynx Editions. p352–447.
- Smetanová M, Černá Bolfíková B, Randi E, Caniglia R, Fabbri E, Galaverni M, Kutal M, Hulva P. 2015. From Wolves to Dogs, and Back: Genetic Composition of the Czechoslovakian Wolfdog. *PLoS ONE* 10: e0143807.
- Solé-Cava AM. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. Matioli S. R., editors. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 171-192. (ex Grisolia & Moreno-Cotulio, 2012)
- Stiller M, Green RE, Ronan M, Simons JF, Du L, He W, Egholm M, Tothberg JM, Keates SG, Ovodov ND, Antipina EE, Baryshnikov FG, Kutmin YV, Vasilevski AA, Wuenschell GE, Termini J, Hofreiter M, Jaenicke-Després V, Pääbo S. 2006. Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. *Proceedings of National Academy of Science* 103: 13578-13584.
- Sundqvist A-K, Ellegren H, Olivier M, Vilà C. 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology* 10: 1959-1966.
- Štrbenac A, Huber D, Kusak J, Majić-Skrbinšek A, Frković A, Štahan Ž, Jeremić-Martinko J, Desnica S, Štrbenac P. 2005. Wolf management plan for the Republic Croatia. Zagreb: State Institute for Nature Protection, 112p.
- Štrbenac A, Huber D, Kusak J, Oković P, Sindičić M, Jeremić J, Frković A, Gomerčić T. 2008. Large carnivore conservation in Croatia bulletin. Zagreb: State Institute for Nature Protection. (ex Kaczensky *et al.*, 2012)

- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Taberlet P, Waits LP, Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 323–327.
- Theuerkauf J, Gula R, Pirga B, Tsunoda H, Eggermann J, Brzezowska B, Rouys S, Radler S. 2007. Human impact on wolf activity in the Bieszczady Mountains, SE Poland. *Annales Zoologici Fennici* 44: 225-231.
- Theuerkauf J, Jędrzejewski E, Schmidt K, Gula R. 2003. Spatiotemporal segregation of wolves from humans in the Białowieża Forest (Poland). *Journal of Wildlife Management* 67: 706-716.
- Thurber JM, Peterson RO, Drummer TD, Thomas SA. 1994. Gray wolf response to refuge boundaries and roads in Alaska. *Wildlife Society Bulletin* 22: 61-68.
- Valdman H. 2006. Lynx (*Lynx lynx*) and wolf (*Canis lupus*) in the baltic region: Diets, Helminth parasites and genetic variation [Ph.D]. Tartu: University of Tartu, 96p.
- Valiére N, Fumagalli L, Gielly L, Miquel C, Lequette B, Poulle L-M. 2003. Long distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation* 6: 83-92.
- Van Camp J, Glukie R. 1979. A cerods long distance move by a wolf (*Canis lupus*). *Journal of Mammalogy* 60: 236 – 237.
- Vilà C, Amorim IR, Leonard JA, Posada D, Castroviejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall KA, Ellegren H, Wayne RK. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology* 8: 2089-2103.
- Vilà C, Sundqvist A-K, Flagstad Ø, Seddon J, Björnerfeldt S, Kojola I, Vasulli A, Sand H, Wabakken P, Ellegren H. 2003. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: 91-97.
- Von Holdt BM, Pollinger JP, Earl DA, Knowles JC, Boyko AR, Parker H, Geffen E, Pilot M, Jędrzejewski W, Jędrzejewska B, Sidorovich V, Greco C, Randi E, Musiani M, Kays R, Bustamante CD, Ostrander EA, Novembre J, Wayne RK. 2011. A

- genomewide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolflike canids. *Genome Research* 21: 1294-1305.
- Wabakken P, Sand H, Liberg O, Bjarvall A. 2001. The recovery, distribution, and population dynamics of wolves on the Scandinavian peninsula, 1978-98. *Canadian Journal of Zoology* 79: 710-725.
- WAG – Wolf Alpine Group. 2014. Wolf population status in the Alps: Pack distribution and trends up to 2012. Available at <http://www.lcie.org>: Accessed 2016-02-29.
- Wayne RK, Lehman N, Fuller TK. 1995. Conservation genetics of the Gray wolf. Carbyn LN, Fritts SH, Seip DR editors. *Ecology and Conservation of Wolves in a Changing World*. Edmonton: Canadian Circumpolar Institute, p399-408.
- Whittington J, St. Clair CC, Mercer G. 2004. Path tortuosity and the permeability of roads and trails to wolf movement. *Ecology and Society* 9: 4.
- Whittington J, St. Clair CC, Mercer G. 2005. Spatial responses of wolves to roads and trails on mountain valleys. *Ecological Applications* 15: 543-553.
- Wydeven AP, Mladenoff DJ, Sickley TA, Kohn BE, Thiel RP, Hansen JL. 2001. Road density as a factor in habitat selection by wolves and other carnivores in the Great Lakes Region. *Endangered Species UPDATE* 18: 110-114.
- WWF. 2016. Obrázek dinársko-balkánské populace. Available at <http://www.bbc.com/news/magazine-33017511>: Accessed 2016-03-20.
- Zimen E, Boitani L. 1975. Number and distribution of wolves in Italy. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 40: 102-112.