

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta tropického
zemědělství**

Hybridizace a introgrese mezi psem (*Canis lupus familiaris*) a
vlkem obecným (*Canis lupus*)

Bakalářská práce

Praha 2020

Vypracovala:

Zuzana Nováková

Vedoucí práce:

Mgr. Barbora Černá Bolfíková, Ph.D.

Konzultant:

Ing. Alžběta Báčová

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Hybridizace a introgrese mezi psem (*Canis lupus familiaris*) a vlkem obecným (*Canis lupus*) vypracovala samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedla v referencích.

V Praze dne 14. 5. 2020

.....

Zuzana Nováková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé práce Mgr. Barboře Černé Bolfíkové, Ph. D. za neobyčejnou trpělivost, odborné vedení, cenné rady a podporu v průběhu zpracovávání celé práce, konzultantce Ing. Alžbětě Báčové za velkou ochotu a pomoc při úpravách práce a realizaci její praktické části. Ing. Mileně Smetanové děkuji za ochotu, pomoc a příjemný čas strávený v laboratoři.

Dále chci poděkovat mé rodině, všem mým přátelům (spolužákům) a zejména mému partnerovi za to, že mě během celého studia podporovali a učinili tak pro mě tato léta výjimečnými.

Abstrakt

Hybridizace a introgrese mezi psem (*Canis lupus familiaris*) a vlkem obecným (*Canis lupus*)

Hybridizace mezi vlky a psy probíhala již od dob, kdy docházelo k jejich vzájemné divergenci. Současný vliv člověka frekvenci hybridizace značně umocňuje a z dříve přirozeného jevu se stává jev antropogenní. Při příliš vysoké frekvenci může být vážně narušena genetická integrita vlčích populací, což může vést až k úplné extinkci mnoha alel, a tedy nenávratné ztrátě genetické variability, která je u některých populací vlků nízká už v současnosti. Hybridizace vlky neohrožuje pouze z hlediska narušení genomu, ale také z hlediska narušení jejich soužití s člověkem. Hybridní jedinci prozatím nejsou definováni zákony, proto může být problematický jejich management. Složitost identifikace hybridních jedinců celou záležitost ještě více komplikuje, jelikož fenotypové znaky mohou identifikovat hybrida na morfologické úrovni, ale na úrovni genetické se o hybrida jednat nemusí. Na druhou stranu, jedinci, kteří jsou na první pohled čistokrevní, mohou být nositeli alel z cizího genomu. Vědci z různých vědních oborů usilují o zavedení managementu, který by omezil antropogenní interferenci této problematiky, avšak vzhledem ke složitosti celé problematiky, neexistuje jasné stanovisko, jak s hybridy nakládat.

Klíčová slova: hybridizace vlka, vlčí populace, vlkopes, introgrese psa

Author's abstract

Hybridization between a dog (*Canis lupus familiaris*) and a Gray wolf (*Canis lupus*)

Hybridization between wolves and dogs has been occurring since their mutual divergence. The current human influence greatly enhances the frequency of hybridization and the previously natural phenomenon becomes an anthropogenic phenomenon. If the frequency is too high, the genetic integrity of wolf populations can be severely affected, which can lead to the complete extinction of many alleles, and thus the irreversible loss of genetic variability that is already low in some wolves' populations. Hybridization threatens wolves not only in terms of disrupting their genome, but also in terms of disrupting their coexistence with humans. Hybrid individuals are not yet defined by law, therefore, their management is difficult. The complexity of identifying hybrid individuals further complicates the matter, as morphological traits may identify hybrids at the phenotypic level, but at the genetic level they may not be of hybrid origin. On the other hand, individuals who are purebred at first sight may be carriers of hybrid alleles. Researchers from various disciplines are working to introduce management that would reduce the anthropogenic interference of this issue. However, due to complexity of the whole issue, there is no simple solution, how to run the management of hybrids.

Key words: wolf-dog hybridization, wolf population, wolfdog, dog introgression

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle literární rešerše	3
3	Literární rešerše	4
3.1	Mezidruhá hybridizace.....	4
3.2	Hybridizace vlka a psa se šlechtitelským záměrem	6
3.2.1	Domestikace psa.....	6
3.2.2	Československý vlčák.....	8
3.2.3	Další plemena s vlčím původem	9
3.3	Antropogenní hybridizace psa a vlka ve volné přírodě	11
3.3.1	Ztráta přirozeného prostředí a kontaktní zóny	11
3.3.2	Psi ve volné přírodě	12
3.3.3	Způsob života, směr reprodukčních událostí	13
3.3.4	Asymetrický genový tok.....	14
3.3.5	Zachování genetické integrity	15
3.4	Ochránářství a management	16
3.4.1.	Preventivní opatření	16
3.4.2.	Proaktivní opatření	17
3.4.3.	Reaktivní opatření	17
3.5	Apeninská populace vlků	19
3.5.1	Provincie Grosseto.....	20
3.5.2	Alpy.....	21
3.5.3	Zhodnocení hrozby	22
3.6	Identifikace a monitoring hybridů	24
3.6.1	Morfologické rozdíly.....	24

3.6.2	Invazivní a neinvazivní vzorky, molekulární metody	26
4	Cíle praktické části.....	29
5	Materiál	29
6	Metodika	30
7	Výsledky.....	33
8	Diskuse	35
9	Závěr	38
10	Reference	40

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Československý vlčák vlevo, Saarloosův vlčák vpravo (autorství: chovatelská stanice československých vlčáků “s Divokou krví”).....	10
Obrázek 2 - Managementové intervence k omezení šíření hybridizace (Donfrancesco et al. 2019)	18
Obrázek 3 - Distribuce vlka obecného v Itálii (Fabbri et al. 2007). Jsou zde uvedeny regiony, ze kterých pocházejí vlci monitorovaní v Alpách – NAps (severní Apeniny), CAps (centrální Apeniny) a SAps (jižní Apeniny). Šipky označují směry první generace migrujících vlků a v rámečcích je uveden jejich počet, pohlaví a procento.	22
Obrázek 4 - Melanistické černé zbarvení srsti (National Geographic - Black Wolf's Secret Life 2010).	25
Obrázek 5 - Pátý prst na zadní končetině (BBC UK, 2004).	25
Obrázek 6 - Jednonukleotidový polymorfismus (By SNP model by David Eccles (gringer), CC BY 4.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2355125).	28
Obrázek 7 - Mikrosatelity (Boland et al. 1998)	28
Obrázek 8 - Izolační kit (foto: Báčová, 2016).	30
Obrázek 9 - Výsledky fragmentační analýzy v programu Geneious.....	31
Obrázek 10 - Výsledky v programu Structure 2.3.4. Čísla v závorkách označují teoretickou příslušnost vzorků k populaci, 1 označuje vlky a 2 psy.....	33
Obrázek 11 - Výsledky v programu NewHybrids.....	34
Obrázek 12 - Rozšíření vlka obecného v ČR v letech 2000-2019 (zdroj NDOP AOPK ČR).	35

Seznam zkratek

ATE	vymývací pufr
AOPK	Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky
CSV	Československý vlčák
FCI	Fédération Cynologique Internationale
mtDNA	mitochondriální DNA
NDOP	Nálezová databáze ochrany přírody
NIS	non-invasive sample (neinvazivní vzorek)
OWAD	Objektivní akceptace vlka v člověkem pozměněné přeshraniční krajině
PCR	polymerázová řetězová reakce
ŠOP SR	Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky
WD	wolf-dog

1 Úvod

Vlk obecný (*Canis lupus*) je psovité šelma, která původně obývala téměř celou severní polokouli. Po několik posledních století byl ale velmi nepochopeným a zároveň nežádoucím tvorem v krajině, neboť lidé dlouho nemohli nalézt způsob, jak soužití s ním bezkonfliktně propojit s vlastní zemědělskou činností – s chovem hospodářských zvířat. Proto byl vlk dlouhou dobu intenzivně pronásledován a loven, až byl z některých oblastí zcela vyhuben (Mech & Boitani 2010). Dlouhou dobu potom ochranáři budovali sociální toleranci vůči vlkům a prosazovali legislativní opatření, která by jejich úsilí podpořila. V současnosti se vlčím populacím daří opět rozrůstat, což se projevuje i jejich návratem do oblastí, ze kterých původně vymizeli. Lidé je začínají vnímat jako přirozenou součást přírody, kterou je třeba zachovat. Důvěru v přirozenost vlka však současně ohrožuje vliv antropogenních jevů, jejichž možné důsledky významně ovlivňují vnímání vlka, ačkoliv se o nich dá zatím pouze spekulovat. V našem případě se zaměříme na jev zvaný antropogenní hybridizace, což je jev, který označuje vyšší frekvenci páření vlků se psy v člověkem pozměněné krajině.

Hybridizace mezi vlky a psy není nic nového, jelikož k ní docházelo přirozeně již od dob domestikace (Pilot et al. 2018; Freedman & Wayne 2017), ale zvýšená frekvence výskytu hybridů upoutala pozornost vědců natolik, aby při zkoumání (ne)přirozenosti tohoto jevu zahrnuli i hledisko lidského počínání v přírodě.

S expanzí lidských obydlí se významně rozrostla i populace psa domácího (*Canis lupus familiaris*), a to v řádech milionů po celém světě. V roce 2012 byl celkový počet psů na světě odhadován na 525 milionů jedinců a k roku 2018 byl odhad až 900 milionů, avšak tato čísla mohou být značně zkreslena populací volně žijících psů (toulavých a ferálních), jejichž počty lze stanovit jen obtížně (Atitwa 2018).

Právě volně žijící psi představují nejintenzivnější zdroj introgrese do vlčí populace (Pilot et al. 2018), protože nejsou nijak kontrolováni. Avšak zůstává otázkou, zda hybridizace mezi vlky a psy, a vlastně mezi divokými a domestikovanými jedinci

obecně, je neškodná, do jaké míry ji lze pokládat za přirozenou a zda není zdrojem událostí, které by mohly negativně ovlivnit existenci divoce žijících druhů.

2 Cíle literární rešerše

- Objasnit význam hybridizace mezi vlkem a psem.
- Popsat jak a proč k hybridizaci dochází a jaké jsou její důsledky.
- Popsat metody, kterými lze hybridizaci detekovat.

3 Literární rešerše

3.1 Mezidruhová hybridizace

Hybridizace je přirozený biologický proces, při kterém dochází k rozmnožování mezi dvěma příbuznými taxony, u nichž nebyla vytvořena dostatečná reprodukčně-izolační bariéra. Antropogenní hybridizace je definována jako hybridizace způsobená lidskou činností, ať už záměrně nebo náhodně, jež často vede k odstranění bariér mezi jinak izolovanými populacemi, u kterých dochází k postupné introgresi genů, což může vést až ke ztrátám evolučních adaptací (Rhymer & Simberloff 1996; Allendorf et al. 2001). Hybridizace tedy může hluboce ovlivnit genetické složení, fitness jedince i evoluci druhů (Gompert & Buerkle 2016). Zvyšující se zalidnění s sebou nese i změny v přírodních habitatech a nárůst počtu domestikovaných druhů, což má za následek zmenšení populací jejich divokých příbuzných (Pilot et al. 2018). Takové změny mohou zvýšit frekvenci hybridizace a mohou vyústit v rozsáhlou introgresi „domestikovaných“ genových variant do genomu divokých populací. Obecně jsou tyto introgrese považovány za maladaptivní, neboť vniknutí nepřirozených genů může zvýšit riziko vyhynutí nativní populace způsobením outbreední deprese (Edmands 1999; Gilk et al. 2004), ovšem mohou poskytnout i nové variace alel, které budou výhodné pro nově osídlená nebo měnící se prostředí (Pilot et al. 2018).

Antropogenní hybridizace tedy není pouze fenoménem posledních let, ale je doprovodným jevem domestikace a utváření kulturní krajiny. Týká se velkého množství druhů napříč celým světem a všemi ekosystémy, v říši živočichů (např. Barilani et al. 2005; Dierking et al. 2014) i rostlin (např. Broeck et al. 2005; Lamont et al. 2003). Co se živočichů týče, jde většinou o to, že domácí zvířata nejsou dostatečně zabezpečena a mohou se volně pohybovat a přicházet do kontaktu s divokými druhy, např. křížení mezi domácí severoamerickou kachnou (*Oxyura jamaicensis*) a divokou kachnou bělohlavou (*Oxyura leucocephala*) (Munoz-Fuentes et al. 2007) nebo křížení mezi kočkou domácí (*Felis catus*) a divokou kočkou evropskou (*F. silvestris*) (Lecis et al., 2006). Antropogenní hybridizací se však nerozumí pouze křížení mezi divokými a domestikovanými zvířaty, nýbrž i mezi dvěma divokými druhy, kdy jeden z nich je

původní a druhý uměle introdukovaný. Takovým příkladem je hybridizace mezi původním jelenem evropským (*Cervus elaphus*) a jelenem sikou (*C. nippon*) (Biedrzycka et al. 2012), který do Evropy přišel až z dálného východu (McCullough et al. 2009). Dalším příkladem je i hybridizace mezi vlky (*Canis lupus*) a kojoty (*C. latrans*) (např. Bohling & Waits 2015; vonHoldt et al. 2011; vonHoldt et al. 2016), případně mezi šakaly (*C. aureus*) a psy (*C. lupus familiaris*) (Galov et al. 2015).

Antropogenní hybridizace mezi divokými druhy a jejich domestikovanými protějšky je ústředním problémem v ochranářské biologii. Vlk obecný (*C. lupus*) a jeho domestikovaná forma, pes domácí (*C. lupus familiaris*), představují jeden z nejznámějších a nejsložitějších případů tohoto jevu. Díky šlechtitelským záměrům jsou u nich případy antropogenní hybridizace dobře zdokumentovány (Gottelli et al. 1994; Freedman et al. 2014; vonHoldt et al. 2016) a to i ve volné přírodě (Randi 2008). Páření mezi psy a vlky je zajímavé především z hlediska morfologických, ekologických a behaviorálních rozdílů, které mohou ovlivňovat jednak hybridizační vzorce a jednak fitness hybridů (Fan et al. 2016; vonHoldt et al. 2017; vonHoldt et al. 2010). Jejich úzká příbuznost umožňuje využít psa jako model a při genomových studiích vlků těžit z rozsáhlých genomových dat dostupných ze souboru čistokrevných psů, což umožňuje zkoumat např. i genetiku náchylnosti k chorobám nebo evoluční biologii vlků (Lindblad-Toh et al. 2005; vonHoldt et al. 2010, 2011). Z toho důvodu může být studium wolf-dog (WD) hybridů klíčové pro pochopení úlohy hybridizace při speciaci a adaptaci, v ochraně divoce žijících živočichů a managementu živočichů ferálních (Pilot et al. 2018) a může tak ovlivnit všeobecné znalosti o problematice antropogenní hybridizace pro širokou škálu dalších živočichů.

3.2 Hybridizace vlka a psa se šlechtitelským záměrem

3.2.1 Domestikace psa

V této kapitole se budeme zabývat plemeny, při jejichž vzniku sehrál důležitou roli vlk. Abychom ale mohli blíže hovořit o hybridizaci mezi vlkem a psem, je nutné si nejdříve připomenout, kdy a proč se vůbec začali vlci a psi lišit a proč byli odděleni do samostatných taxonů. Díky genetickým analýzám dnes víme, že jediným předkem psa je vlk (Wayne 1993; Garcia-Moreno et al. 1996; Hedrick et al. 1997; Morell 1997). Je však třeba si uvědomit, že stejně jako pes, i vlk prošel desítkami tisíc let evolučního vývoje a stará linie, která vlky a psy spojovala zanikla, a proto nelze tvrdit, že vlk, jak ho známe dnes, je přímým předkem (Andreska 1991). Vlci a psi sdílejí společnou evoluční historii, během které docházelo k opakujícím se křížením již od raných stádií domestikace (Freedman & Wayne 2017). Výsledkem této evoluce jsou starodávná plemena psů, která si zachovala alely vlčích předků a současně většina eurasijských vlků získala alely psí (jako výsledek dávné introgrese), což může při molekulárních analýzách způsobit nejasnosti kvůli zachovalým polymorfismům předků napříč nedávno odlišenými taxony (Fan et al. 2016; vonHoldt et al. 2010; Pilot et al. 2018).

Pes domácí je nejstarším (tedy prvním) domestikovaným živočichem a s vlkem obecným se rozdělili přibližně před 10-40 tisíci lety (Druzhkova et al. 2013; Freedman et al. 2014; Freedman & Wayne 2017; Pang et al. 2009; Savolainen et al. 2002; Wang et al. 2016). Domestikace je trvalý vícegenerační vztah, ve kterém lidé převezmou značnou kontrolu nad reprodukcí a péčí o živočicha (Zeder 2012). Jde tedy o dlouhodobý proces doprovázený postupným hromaděním drobných změn jak u zvířete, tak u člověka (Zeder et al. 2006). K domestikaci psa došlo pravděpodobně komezální cestou, kdy si zvíře ztrácí plachost v důsledku pravidelného stravování zbytků potravy v okolí jejich obydlí (Zeder 2012). Vlč se původně vyskytoval téměř po celé severní polokouli, zejména v Eurasii. Práce Savolainena et al. (2002) poukazuje na to, že by všechny psí populace mohly mít společný původ a autoři se domnívají, že jeho kořeny jsou ve východní Asii, protože zdejší populace psů vykazuje největší diverzitu genů. Naproti tomu existují i studie, které určily jako první místo domestikace Evropu (např. Thalmann et al. 2013; Verginelli et al. 2005), Blízký východ

(např. Vonholdt et al. 2010; Gray et al. 2010) nebo centrální Asii (např. Shannon et al. 2015). Studie Pang et al. (2009) a Ding et al. (2012) se shodly, že na domestikaci se podílelo několik stovek vlků pocházejících z jedno místa, odkud se pak (již jako psi) rozšířili po celém světě. Podobný závěr vyvodili i v práci Botigué et al. (2017), kde se zabývali původem domestikace ve střední Evropě. Vilá et al. (1997) však zmiňuje, že k domestikaci psa mohlo dojít v různých částech světa vícekrát nezávisle na sobě, k čemuž se přiklánějí i novější studie (např. Frantz et al. 2016).

Stejně komplikované, jako určit primární oblast domestikace, je i její časové zařazení. Vilá et al. (1997) ji pomocí výpočtů molekulárních hodin datoval až do období před více než 100 000 lety. Výsledky mnoha dalších studií (založené většinou na archeologických nálezích) se však shodují spíše na rozmezí před 40 000 – 15 000 lety (např. Druzhkova et al. 2013; Freedman et al. 2014; Pang et al. 2009; Thalmann et al. 2013), tedy v době, kdy se lidé ještě živilí sběrem plodů a lovem (Freedman et al. 2014).

Jedním z nejzásadnějších rozdílů mezi vlkem a psem, jsou geny podmiňující krotké chování psa (Cagan & Blass 2016). Sekvenováním genomů psů byly objeveny oblasti vyselektované pravděpodobně během domestikace, a více než polovina z nich nese geny, které se podílejí na vývoji nervové soustavy a mají svou funkci v mozku (Axelsson et al. 2013). Domníváme se, že mutace právě těchto genů mohly způsobit změny chování během domestikace. Podobnou studii provedl i Freedman et al. (2016), který v genomu objevil 68 oblastí, v nichž se nacházejí geny ovlivňující chování, mozkové funkce, metabolismus tuků nebo pigmentaci. Mezi důležité látky ovlivňující mozkovou aktivitu řadíme např. katecholaminy plnicí funkci hormonů a neurotransmiterů. Patří sem např. adrenalin a noradrenalin, které se uplatňují např. při stresové zátěži organismu.

Důležitým rozdílem je i schopnost trávení škrobu, které souvisí s vývojem všežravosti u psů (společně s přechodem člověka od sběračství a lovu k zemědělství), zatímco vlci zůstávají výhradními masožravci. Za efektivnějším trávením škrobu stojí pankreatický enzym alfa-amyláza, který je kódovaný genem AMY2B a zajišťuje rozklad na disacharid maltózu (Arendt et al. 2014). Psi mají pro tento gen oproti vlkům více

kopíí (asi 7x), což působí i výraznější genovou expresí (asi 28x) a tím pádem vyšší aktivitu amylázy. Tato adaptace se však může lišit v závislosti na plemeni a prostředí, které je pro něj typické. Například u většiny severských psů, kteří příliš nepřicházejí do kontaktu se zemědělskou výrobou, je počet kopíí nižší (Freedman et al. 2014; Arendt et al. 2014).

3.2.2 Československý vlčák

K divergenci mezi vlkem a psem došlo před relativně nedávnou dobou a nebyly u nich plně rozvinuty reprodukčně izolační mechanismy (Harrison & Larson 2014; Randi 2008), které by bránily páření. Opakované křížení vlků a psů s vlčími předky (volně nebo v rámci plemenářské činnosti) může vést ke vzniku zcela nových hybridních plemen s proměnlivým chováním a fenotypy (Randi et al., 2014).

Československý vlčák (CSV) je unikátní plemeno psa, které vzniklo hybridizací mezi německými ovčáky a karpatskými vlky v padesátých letech 20. století v rámci vojenského experimentu. Byli používáni k ochraně hranic Československa během studené války a v současné době jsou v oblibě mezi chovateli po celém světě (Smetanová et al. 2015). Na vzniku plemene se v rozpětí 25 let podíleli dohromady 4 vlci – Brita, Argo, Šarik a Lejdy. U kříženců první generace bylo pozorováno dominantnější chování i exprese vlčího fenotypu, což s sebou přineslo značné problémy při výcviku, neboť hybridí jsou nepoddajní a mnohdy agresivnější než vlci. I v druhé generaci křížení hybrida a psa bylo potomstvo ze 70-75 % podobnější vlku. Teprve až ve třetí generaci křížení se psem vybrali jedince, kteří byli vhodní i k výcviku (Hartl & Jehlička 2002). (Smetanová et al. 2015).

Šlechtění Československých vlčáků bylo prováděno zpětným křížením hybridů se psy, takže jejich genom je převážně psiho původu. To dokládá i genomická studie Caniglia et al. (2018), kde bylo použito 170 000 SNP ke genotypování dvanácti CSV. Při bayesovské analýze klastrů byly CSV jasně odděleny od obou rodičovských populací, avšak další metody pomohly na základě referenčních genomů identifikovat přes 300 genů vlčího původu a více než 2000 genů psiho původu. Geny vlčího původu obvykle

souvisely s fenotypovými znaky, zatímco geny psího původu obvykle hrály roli ve vývoji nervové soustavy a s domestikacími procesy. Celkový podíl vlčího původu udávaly genetické i rodokmenové analýzy okolo 30 % na jedince. Oddělení CSV od rodičovských populací podpořila i analýza mikrosatelitových markerů a mtDNA (Smetanová et al. 2015). Analýza Y chromozomu 32 samců CSV (Smetanová et al. 2015) odhalila výhradně psí haplotypy. Ovšem existuje i starší studie, která v genomu CSV (na chromozomu Y) odhalila i haplotypy vlčí (Čílová et al. 2011). Genetická diverzita CSV je oproti jiným plemenům nehybridního původu vyšší, což je zřejmě důsledek smíchání genofondu psa a vlka (Caniglia et al. 2018)

3.2.3 Další plemena s vlčím původem

Mezi další představitele vlčáků se řadí vlčák Saarloosův (např. Voorbij et al. 2014). Stejně jako Československý vlčák vznikl křížením německého ovčáka a samice vlka (původem ze Sibiře). Jeho zakladatelem je nizozemský chovatel Lendert Saarloos, který se o zkřížení vlka a psa pokoušel již od první poloviny 20. století. není dodnes jasné, kolik vlčic bylo k vytvoření plemene použito. Nicméně Saarloosovy osobní záznamy zmiňují minimálně 6 vlčic, z nichž 5 s největší pravděpodobností k plemenitbě použil. V Nizozemsku bylo plemeno uznáno v roce 1975 a v roce 1983 byl uznán i FCI. Vzhledově se velmi podobá Československému ovčáku (viz obrázek 1). Pro toto plemeno však neexistují podrobnější genetické analýzy.



Obrázek 1 - Československý vlčák vlevo, Saarloosův vlčák vpravo (autorství: chovatelská stanice československých vlčáků "s Divokou krví")

Další plemena vzniklá křížením vlka a Německého ovčáka jsou například Lupo Italiano z Itálie (Verardi et al. 2006) a Kunming dog z Číny (Wang et al. 2013), kteří se na rozdíl od předešlých zmíněných plemen vyznačují nápadným černým melírováním a celkově tmavším zbarvením.

3.3 Antropogenní hybridizace psa a vlka ve volné přírodě

3.3.1 Ztráta přirozeného prostředí a kontaktní zóny

Populace vlků byly v posledních několika stoletích značně zmenšeny a fragmentovány v důsledku přímé eradikace a ztráty přirozených stanovišť (Boitani 2003). Pronásledování a cíleně hubeni byli po několik staletí a v některých oblastech tak byli zcela vyhubeni. Ovšem evropské populace vlků v poslední době vykazují velmi pozitivní demografické trendy (až na výjimky) a rozšiřují se v mnoha oblastech původního výskytu (včetně ČR), zejména v opuštěných zemědělských oblastech, kde se obnovuje přirozená vegetace (Falcucci et al. 2007). Rekolonizace s sebou však nese některá úskalí, která mohou ovlivnit intenzitu hybridizace.

- Při rekolonizaci se často uplatňuje efekt malého množství zakladatelů a může tak docházet ke zvýšené introgresi při rozšiřování populace (Dufresnes et al. 2019). Rozšiřující se populace tedy nesou větší hybridizační riziko než populace stabilní. Dynamika hybridizace a introgrese v takové populaci se bude měnit v čase a maxima dosáhne již v raných fázích kolonizace, které budou následovány rozšířením hybridů a zpětným křížením do divoké populace (Randi et al. 2014).
- Rostoucí populace vlků se nevyhnutelně rozšíří i do oblastí, kde je může mnohostranně ovlivnit lidmi vyvíjená činnost jako je zemědělství, doprava apod (Randi et al. 2014). Jak vyplývá z historie, člověk se s návratem vlka do zemědělských oblastí velmi špatně vyrovnává, neboť většinou chovatelé hospodářských zvířat ztratili tradiční chovatelské postupy, včetně odborných znalostí a ochoty chránit svá stáda před volně žijícími predátory (Fritts et al. 2003; Naughton-Treves et al. 2003; Gazzola et al. 2008). Tento faktor s sebou nese jen riziko nelegálního odlovu a narušení sociální struktury vlčí smečky v důsledku konfliktu s chovateli hospodářských zvířat, ale i snižování počtu vlků např. v důsledku srážky s autem a jiných nehod nesoucích lidské přičinění. V obou případech situace vede ke zmenšení populace, čímž se vracíme k bodu 1, kdy je při nízkém počtu jedinců hybridizace intenzivnější.

- Přírodní hybridní zóny (okrajové části populace s nižší hustotou jedinců) jsou ohniskem genetické diverzity, kde jsou genomy filtrovány pomocí přirozené selekce, během které jsou vystavovány adaptačním procesům a mohou eventuálně vést ke speciaci hybridů (Larsen et al. 2010; Miller et al. 2012). Avšak v dnešní době je díky člověku krajina velmi členitá a periferní oblasti mohou vznikat v zónách blízkých lidským obydlím, čímž se zvyšuje i pravděpodobnost setkání a páření s domácími psy (Randi et al. 2014).

Z výše uvedených bodů vyplývá, že prostorová a časová dynamika hybridizace a zpětného křížení je tedy podmíněna krajinnými prvky, antropogenními faktory, počáteční populační hustotou vlka a psa a mírou kolonizace.

3.3.2 Psi ve volné přírodě

Pravděpodobnost křížení mezi vlkem a psem může být v současné době vyšší než v minulosti, neboť psí populace se oproti minulosti společně s tou lidskou výrazně zvětšila. Míra hybridizace je lokálně vyšší v antropogenním prostředí, kde je běžný výskyt toulavých psů (Kusak et al. 2018; Caniglia et al. 2013), což je dobře viditelné například ve východních zemích (Gruzie, Bulharsko, Řecko aj.), kde se mimo toulavých psů hojně vyskytují i volně pobíhající velcí pastevečtí psi (Dufresnes et al. 2019).

Psy, kteří se mohou pohybovat ve volné přírodě, můžeme dle Donfrancesco et al. (2019) rozdělit na tři základní skupiny:

- Toulaví psi – Opuštění psi, kteří přežívají na ulicích a jsou relativně zvyklí na lidi, protože s nimi byli (a stále jsou) v kontaktu.
- Volně pobíhající psi – Psi, kteří mají majitele, ale nejsou dostatečně zajištěni proti útěku a mohou se volně pohybovat po pozemcích.
- Ferální psi – Divocí psi narození ve volné přírodě, kteří se lidem vyhýbají nebo je v případě kontaktu mohou ohrozit.

Domácí a toulaví psi mohou mít různý původ (hlídací, lovečtí, pastevečtí aj. různá plemena nebo kříženci), avšak původ ferálních psů je často nejasný. Netvoří stabilní strukturované populace, takže jejich výskyt v přírodě je více méně náhodný (Randi et al. 2014). Ferální psi ovšem představují skupinu s největším podílem na introgresi, což značně komplikuje identifikaci hybridů, jelikož u ferálních psů je úroveň příměsi vlčích genů neznámá (narozdíl od čistokrevných psů, u kterých je úroveň příměsi známá) (Pilot et al. 2018).

3.3.3 Způsob života, směr reprodukčních událostí

Vlk je společenské zvíře, což je z evolučního hlediska i jeden ze základních předpokladů pro věrné, oddané chování psa vůči člověku, kterého by nebylo, pokud by vlci odjakživa žili samotářsky (Hartl & Jedlička 2002). Základním společenstvím vlků je smečka, která je obvykle v době rozmnožování tvořena jednou jedinou rodinou. Rodina zahrnuje jeden rodičovský alfa pár, vlčata a mladé zatím neosamostatněné vlky (Mech & Nelson 1990). Neosamostatnění vlci buď zatím nenalezli partnera nebo volné teritorium, a tak pomáhají rodičům uživit a vychovat další vrh štěňat. Teritorialita je jedna ze základních vlastností divokých šelem a zároveň účinně reguluje počty těchto zvířat v krajině (např. Mech 1994; Mech et al. 1998). Vlčí pár, který nemá teritorium zpravidla nemá ani mláďata. Na územích, kde hlavní zdroj vlčí kořisti pravidelně migruje (např. sobi nebo sajgy), se obvykle rodiny shlukují do větších smeček (max 15 členů), které migrující stáda sledují (např. Boitani 1986; Carbyn et al. 1993). Tyto tendence lze sledovat s klesajícím trendem od severu k jihu, kdy v severnějších zeměpisných šířkách mladí vlci častěji zůstávají se svými rodinami a utvářejí početné smečky a v jižnějších oblastech se rodiny dříve rozpadají a vlci žijí pouze v párech nebo zcela osaměle. Mladí vlci migrují i stovky kilometrů (např. Wabakken et al. 2001), než naleznou vhodné teritorium a partnera pro založení smečky (Rothman & Mech 1979; Fritts & Mech 1981; Ballard et al. 1987). K rozmnožování vlků dochází v době hárání vlčice, tj. jedenkrát ročně v jarním období (např. Mech 1970; Servin-Martinez 1997). Pokud v době říje není k dispozici vlčí partner, může se vlčice (případně i vlčí samec) uvolit k páření se psem. Z vysoké

frekvence hybridizace vyplývá, že hybridi dokážou účinně soutěžit o partnery s čistokrevnými vlky, což determinuje přetrvávání vysoké úrovně introgrese (Salvatori et al. 2019)

3.3.4 Asymetrický genový tok

Hybridizace mezi vlky a psy se zdá být velmi asymetrická, neboť k páření dochází častěji mezi vlčí samicí a psím samcem (Randi et al. 2014). Toto tvrzení však nemusí být zcela pravdivé, protože páření mezi vlkem a psí fenou nemohlo být zdokumentováno tolik jako v opačných případech, jelikož tito hybridy se většinou nenavracejí do vlčí populace. Mladí vlci velmi rádi zkoumají nové prostředí a jeho možnosti, obzvláště při kolonizaci nových oblastí, a tak nelze vyloučit ani vyšší frekvenci tohoto typu páření (Randi et al. 2014).

Podkladem k tvrzení o asymetrii hybridizace jsou výsledky analýzy hybridních genomů, které obsahovaly zpravidla vlčí haplotypy mtDNA (Godinho et al. 2011; Randi 2008; Randi 2011; Vila & Wayne 1999). Nebyla tedy potvrzena introgrese do mateřské linie. Paternálně a maternálně děděné alelické varianty jsou proto důležitým nástrojem pro zkoumání asymetričnosti hybridizace, která je mimochodem klíčová i pro strategii rozšiřování a rekolonizační procesy (Ding et al. 2012). Asymetrická hybridizace může vznikat z těchto důvodů (Dufresnes et al. 2019):

- Vlčí samice jsou vůči psím samcům méně agresivní, zatímco vlčí samci silnou agresivitu zachovávají (pokud nejde o hárající fenu).
- Vlčí samice vyvíjejí mnohem větší aktivitu při hledání partnera.
- Psí samci jsou takřka permanentně fyziologicky připraveni k reprodukci.

Mnohé důsledky někteří vědci interpretují jako negativní, nicméně většina z nich se dá vyložit i z pozitivního hlediska a je to jeden z důvodů, proč je tato problematika tak komplexní a komplikovaná, a proč je tak těžké ustanovit a realizovat řešení.

3.3.5 Zachování genetické integrity

Některé psovitě šelmy mezi sebou hybridizují v přírodě přirozeně a vytváří nové taxony, avšak hybridizace s volně pobíhajícími psy může ohrožovat genetickou integritu populací vlka nebo dokonce přežití vzácných druhů jako je vlk etiopský (*Canis simensis*). Introgrese cizích genů může ochromit přirozenou genetickou rozmanitost (Brumfield 2010), narušit druhově specifickou epistatickou rovnováhu, vyhladit či pozměnit lokální adaptace (Fraser et al. 2011) a tím dovést populaci (Beaumont et al. 2008) či celý druh (Seehausen et al. 2007) na pokraj genetického vymření. Ovšem škodlivé účinky genetické introgrese nejsou doposud příliš prozkoumané (Ding et al. 2012). Vzhledem k tomu, že vlčí populace si zatím udržují genetickou diferenciaci od psů, předpokládáme, že hybridizace při nízké frekvenci nijak výrazně jejich genetickou integritu nenarušuje (Pilot et al. 2018).

Introgrese domestikovaných genů by však mohla mít i příznivý dopad na fitness divokých jedinců (Anderson et al. 2009; Coulson et al. 2011; Feulner et al. 2013). Hybridizace by mohla významně kompenzovat ztrátu genetické variability způsobené demografickými problémy (Smetanová et al. 2015), ale kontrastuje to s možným škodlivým dopadem na populaci o malé velikosti a inbreeding (Grant et al. 2005; Pickrell et al. 2009). Integrita genomu nemusí být nutně narušena, ale není jisté, jaký dopad bude mít z evolučního hlediska (Gavrilets & Vose 2005). Rizikové mohou být nově založené smečky (většinou v rámci reexpanze a návratu na původní stanoviště), pokud nemají dostatečný kontakt s dalšími populacemi. V případě, že se původní (zdrojová) kolonie dostatečně rychle nerozšíří a nové kolonie od nich zůstanou izolovány, nebude zajištěn dostatečný genový tok a bude docházet k významným ztrátám genetické variability. Nízká genetická variabilita zároveň sníží adaptační potenciál populace a zvýší míru inbreedingu (Hedrick & Kalinowski 2000). Hybridizační události u takové populace by mohly buď celý proces urychlit, nebo naopak zastavit. Nicméně Anderson et al. (2009) a Coulson et al. (2011) ve svých studiích zmiňují, že introgrese psích alel většinou maladaptivní důsledky nemá.

3.4 Ochránářství a management

Antropogenní hybridizace mezi divokými druhy a jejich domestikovanými protějšky je jedním z výrazných problémů ochránářské biologie (Dufresnes et al. 2019). Pokud budeme vycházet z obav o behaviorální projevy hybridů, může být hybridizací vážně narušena sociální tolerance vůči vlkům (Salvatori et al. 2019), která byla ochránářskou komunitou po mnoho let usilovně budována. Pro ochranu vlků byl vybudován legislativní rámec, ale žádný z příslušných právních dokumentů nikterak nedefinuje hybridy (Allendorf et al. 2001; Pielt et al. 2015; Trouwborst 2014; Wayne & Shaffer 2016) a nelegální lov vlků se tím pádem snadno může zvrhnout v legální lov hybridů, a to zejména v oblastech, kde sociální tolerance vůči vlkům klesá. Provést spolehlivou identifikaci hybrida je totiž velmi obtížné, a tak mohou být údajní hybridy zabíjeni jen na základě domněnek.

Hlavní managementové problémy týkající se vlků – tedy zmírňování konfliktů s člověkem a antropogenní hybridizace - by měly být řešeny současně. Ekologické složitosti této problematiky je třeba efektivně vysvětlit všem zúčastněným stranám, aby dále nedocházelo k nedorozumění, špatnému vnímání a špatnému jednání (Donfrancesco et al. 2019). Ačkoliv se vědci shodli na tom, že pro efektivní management by měla být zavedena preventivní, proaktivní a reaktivní opatření (viz obrázek 8), při realizaci a uvedení do praxe se jejich názory opět rozcházejí (Donfrancesco et al. 2019).

3.4.1. Preventivní opatření

Mezi hlavní preventivní opatření by mělo patřit snížení volně pohybujících se psů (Lorenzini et al. 2014) a tedy apelovat zejména na lidi, aby své domácí mazlíčky lépe zabezpečili a omezili svobodu jejich pohybu. Omezení zdroje hybridizace – tj. volně pohybujících se psů – stačí pouze v případě nízké frekvence tohoto jevu. Pokud bude frekvence vyšší, je třeba kromě preventivních opatření i kontrola hybridů, aby se zamezilo další introgresi (např. Bohling & Waits 2011). Preventivním opatřením by však měla být celková osvěta, zaměřená nejen na vlastní zodpovědnost vůči domácím

psům, ale také na vlky jako součást přirozeného ekosystému a na možné důsledky nezodpovědného řízení.

3.4.2. Proaktivní opatření

Proaktivní kroky směřují spíše k vlkům než k lidem a týkají se posílení jejich přirozeného životního standardu. Jedním z kroků je například posílení sociální soudržnosti vlčí smečky pomocí snížení úmrtnosti vlků zapříčiněné člověkem. Pokud budou mít vlci dostatek vlastních partnerů, nemuseli by se tak často ubírat k páření se psy. Dalším krokem by mohlo být zamezení přístupu k antropogenním zdrojům potravy, ke kterým hybridy údajně často směřují svůj jídelníček – mohlo by to snížit jejich schopnost přežít ve volné přírodě (Salvatori et al. 2019).

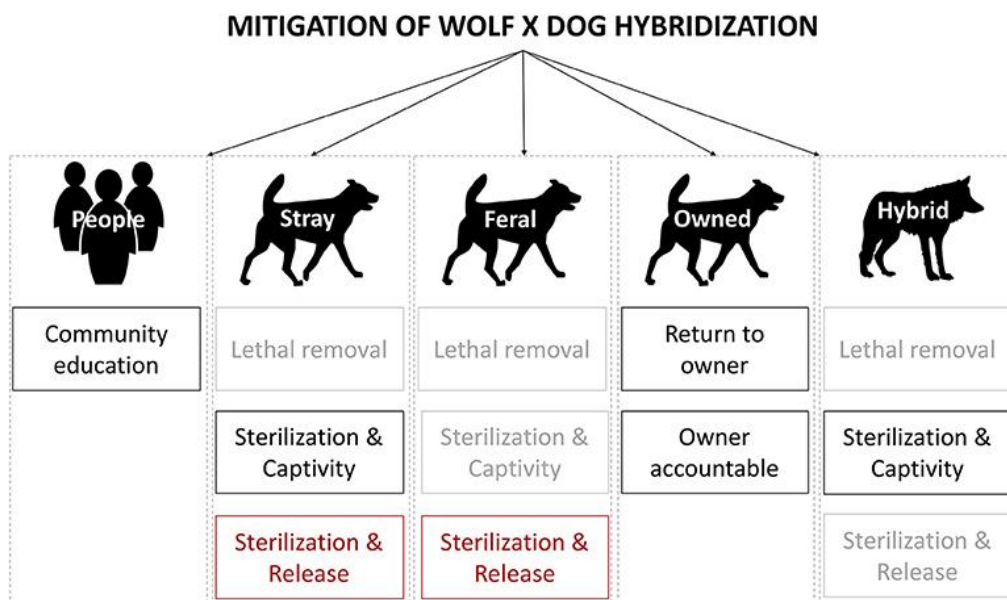
3.4.3. Reaktivní opatření

Reaktivní opatření jsou ze všech tří kategorií intervencí využívána nejběžněji. Jelikož jde o to vyřadit hybridy z rodičovské generace, jedná se zpravidla o letální řešení. Toto opatření by se však mohlo snadno stát problematickým v oblasti ochránářství vlků, pokud pro míru hybridního původu nebude stanoven referenční rámec. Jiným řešením by mohla být sterilizace, díky které by nemusela být narušena sociální struktura smečky, avšak není řešením v celém rozsahu problémů a je navíc nákladnější a složitější než eutanazie.

Část vědecké komunity v Evropě je ohledně přijímání reaktivních intervencí velmi skeptická, protože jsou dlouhodobě považovány za triviální, aniž by probíhala nějaká osvěta v podobě intervencí proaktivních (Lorenzini et al. 2014), a protože jejich účinnost je limitovaná (např. Godinho et al. 2015; Pacheco et al. 2017).

Neexistují žádné experimentální studie, které by v kontextu hybridizace srovnávaly účinnost jednotlivých typů intervencí, což bude nejspíše důsledkem špatného zavádění intervencí na různých národních úrovních. Zatímco některé země řeší hybridizaci vlků a psů ve svých lokálních zákonech a řídicích plánech například způsoby v obrázku 2 (Německo, Norsko, Polsko, Slovensko, Švýcarsko, Slovinsko,

Španělsko, Lucembursko), jiné žádnou konkrétní strategii nemají (Rakousko, Itálie, Francie, Řecko, Chorvatsko, Bulharsko, Albánie, Makedonie, Rumunsko, Portugalsko, Srbsko) (Salvatori & Ciucci 2018).



Obrázek 2 - Managementové intervence k omezení šíření hybridizace (Donfrancesco et al. 2019)

Žádný zásah v managementu nebude účinný, pokud bude prováděn pouze na úrovni jedné nebo několika smeček. Měly by existovat koordinace mezi úřady zodpovědnými za management vlků na meziregionální úrovni. Dokud však nebude tento problém prioritní pro vnitrostátní zákonodárné orgány, nelze očekávat ani zlepšení strategií na regionální úrovni (Donfrancesco et al. 2019). Celonárodní program sběru vzorků zraněných či nalezených mrtvých těl vlků by poskytl další informace, které by však mohly být zkresleny úmrtností vlků v závislosti na heterogenitě krajiny (Ciucci et al. 2007) nebo chybným zaměněním za psa, který by měl být ze sběru vyloučen (Godinho et al. 2011). Proto se jako nejúčinnější metoda jeví dlouhodobý sběr neinvazivních vzorků (viz kapitola neinvazivní vzorky) v celém areálu vlčích populací (Caniglia et al. 2013). Po spolehlivé identifikaci hybridních jedinců s různým stupněm introgrese je pro jejich management rozhodující odhad jejich podílu v rodičovské generaci (Allendorf et al. 2001). Hybridizace mezi vlky a psy

je současně monitorována na iberském a apeninském poloostrově, ve Skandinávii, v pobaltských státech a v několika zemích východní Evropy (Andersone et al. 2002; Godinho et al. 2011; Vilá & Wayne 1999), za pomoci pozorování morfologických znaků a molekulárních technik.

3.5 Apeninská populace vlků

Pokud bychom si měli uvést konkrétnější případ antropogenní hybridizace mezi vlkem a psem, pak se nabízí populace vlků v Itálii, kde je hybridizace pozorována již několik desítek let. Stejně jako na mnoha jiných územích byli i vlci v Itálii pronásledováni a loveni kvůli predaci na hospodářských zvířatech. Míra nespokojenosti farmářů přerostla v neúnosný lovecký tlak, a tak byli vlci v průběhu 18. a 19. století téměř vyhubeni (Breitenmoser 1998) a až do druhé poloviny 20. století přežívali výhradně v malých fragmentovaných populacích na území centrální a jižní části Apeninského pohoří (Zimen & Boitani 1975). V 70. letech populace dosáhla nejvýraznějšího demografického poklesu, kdy se celkový počet vlků snížil asi na 100 jedinců. Pokles velikosti populace byl detekován i na genetické úrovni (Randi 2011). Pro nebezpečně nízký počet jedinců se po roce 1971 italská vláda rozhodla poskytnout vlkům plnou právní ochranu a začala se více zajímat o ekologii horských oblastí, což se projevila např. navýšením populace vysoké zvěře (Breitenmoser 1998; Wabakken et al. 2001; Boitani 2003). Díky těmto faktorům zažila vlčí populace v 80. letech velkou expanzi, při které bylo rekolonizováno mnoho původních oblastí včetně Alp. Avšak i přes úspěšné zvýšení počtu jedinců a rozšíření si italscí vlci stále nesou „handicap“, kdy došlo k výraznému efektu hrdla láhve (bottleneck effect) a dlouhodobé izolaci (Randi et al. 2014), a to nejen na mezipopulační úrovni v rámci Evropy, ale i na úrovni populací v rámci Apenin. Jedná se o handicap ve formě nízké genetické variability (pravděpodobně nejnižší ze všech evropských populací), podložený i vysokou mírou diferenciací mezi jednotlivými italskými populacemi, která vypovídá o velmi omezeném genovém toku (Fabbri et al. 2007).

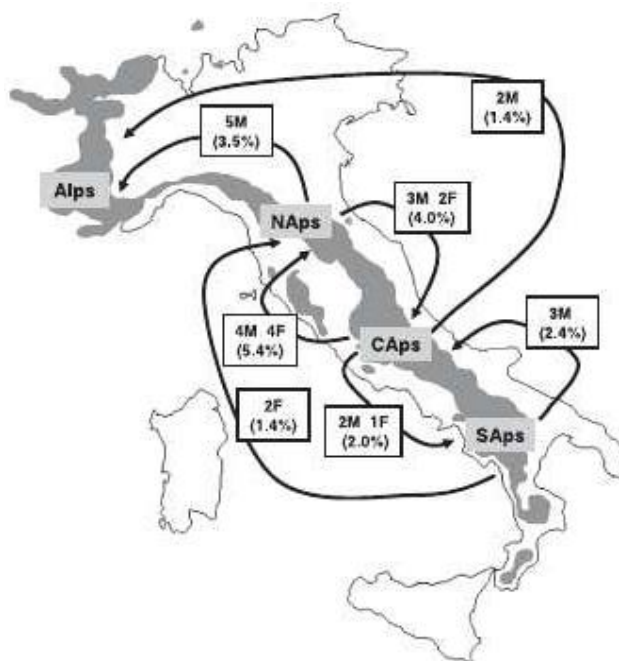
U populací o nízké početnosti, které byly založeny malým počtem zakladatelů (např. Středoevropská nížinná – Czarnomska et al. 2013), je riziko hybridizace větší. Italští vlci jsou zajímaví právě tím, že jsou v dlouhodobém kontaktu s velkou populací toulavých psů (Genovesi 2002), v době své nedávné expanze do širších oblastí Apenin a na území Alp, odkud se dále rozšiřují až do Francie, Švýcarska (Randi 2011) a dokonce i Španělska (Sastre et al. 2011). V současnosti se na území Itálie odhaduje na 1300-1800 vlků (Galaverni et al. 2016), kteří se však ve velké hustotě pohybují v zemědělských a zalidněných oblastech (Marino et al. 2016), kde přicházejí do styku právě s diskutovanými toulavými psy, jejichž počet dle starších odhadů dosahuje asi jednoho milionu (Dufresnes et al. 2019).

3.5.1 Provincie Grosseto

Jednou z typických oblastí je provincie Grosseto, kde dochází k největší dokumentované predaci na hospodářských zvířatech v celé Itálii (Marino et al. 2016), následované i nelegálním odlovem a trávením. Je pravděpodobné, že nejen zvýšený počet toulavých psů, ale i dlouhodobý odlov vlků, je důvodem zvýšeného lokálního výskytu hybridů (např. Fredrickson & Hedrick 2006; Muñoz-Fuentes et al. 2010; Rutledge et al. 2012). Salvatori et al. (2019) ve své práci analyzoval neinvazivní (n=215) a invazivní (n=25) vzorky psovitých šelem, aby vyhodnotil rozsah hybridizace mezi vlky a psy v provincii Grosseto a výsledky přenesl do celostátního měřítka. Ze 72 rozlišených genotypů bylo identifikováno 30,6 % jedinců smíšeného původu a po zvýšení počtu pozorovaných lokusů se odhadovaný počet zvýšil na 50 %. Ačkoli nebyl identifikován žádný hybrid první filialní generace, čtyři jedinci vykazovali původ ze zpětného křížení s vlčí populací a jeden dokonce ze zpětného křížení s psí populací. Další analýzy detekovaly zpětné křížení (backcrossing) i ve dřívějších generacích, což dokládá, že se nejedná o žádný novodobý jev (Freedman & Wayne 2017).

3.5.2 Alpy

Jiným příkladem jsou vlci v Alpách, kteří oblast Alp rekolonizovali teprve nedávno, a ačkoliv disponují ještě nižším počtem jedinců, menší genetickou variabilitou a větší diferenciací oproti ostatním italským populacím (Fabbri et al. 2007), vykazují jen velmi malý stupeň hybridizace se psy. Alpská populace vznikla migrací vlků ze severní části Apenin (viz obrázek 3), která však byla jednosměrná a genový tok byl tím pádem omezený (Fabbri et al. 2007). Všichni alpští jedinci totiž sdílejí jednu stejnou kontrolní oblast mtDNA – haplotyp W14 (pojmenováno v Randi et al. 2001), unikátní pro italské vlky a zároveň vykazují nejnižší počty heterozygotů a počet privátních alel. Alpská populace se tak jeví jako ideální jednotka ke zkoumání genetického dopadu hybridizace při procesu rekolonizace. V práci Iacolina et al. (2010) bylo zkoumáno 115 jedinců z alpské oblasti Arezzo a bylo identifikováno 5 jedinců smíšeného původu, z nichž 2 mohou být s jistotou klasifikováni jako hybridy, jejichž otcem byl psí samec, a zbylí tři jako výsledek jedné nebo více generací zpětného křížení. Avšak v poměru s celkovou velikostí populace je míra introgrese srovnatelná se stavem jiných evropských populací a tudíž zanedbatelná. Výskyt toulavých psů v Alpách zatím nebyl registrován a stejně tak ani výskyt vlka v blízkosti lidských sídel, takže ačkoli nelze lokální křížení vyloučit, je pravděpodobné, že k hybridizaci došlo ještě před kolonizací ve zdrojové populaci alpských vlků, tedy v populaci vlků Apeninských (Valiére et al. 2003; Fabbri et al. 2007).



Obrázek 3 - Distribuce vlka obecného v Itálii (Fabbri et al. 2007). Jsou zde uvedeny regiony, ze kterých pocházejí vlci monitorovaní v Alpách – NAps (severní Apeniny), CAps (centrální Apeniny) a SAps (jižní Apeniny). Šipky označují směry první generace migrujících vlků a v rámečcích je uveden jejich počet, pohlaví a procento.

3.5.3 Zhodnocení hrozby

Zatímco metody molekulární genetiky popisují hybridizaci mezi vlkem a psem jako lokální a vzácný jev (Randi & Lucchini 2002; Verardi et al. 2006), dostupnost stále preciznějších molekulárních metod zvýšila schopnost detekovat introgresivní hybridizaci (Galaverni et al. 2017) a hybridní jedince odhalila na většině území v Apeninách. Navzdory tomu byla hybridizace mezi vlky a psy na celostátní úrovni vyhodnocena jako hrozba malá (Randi et al. 2000; Randi & Lucchini 2002; Verardi et al. 2006; Lorenzini et al. 2014). Odhady posledních desetiletí se pohybovaly mezi pouhými 2 (Randi & Lucchini 2002) až 5 (Verardi et al. 2006) procenty hybridních jedinců, ovšem kvůli výsledkům z analýzy vzorků shromažďovaných více než 15 let bez jakékoliv časové či prostorové strukturovanosti. Nízká frekvence F1 a F2 hybridů oproti zpětným křížencům nasvědčuje tomu, že k hybridizaci docházelo již v počátcích expanze vlků z jádrových oblastí (Randi et al. 2014) a jedinci vykazující příměs psích

alel tak nemusí nutně pocházet z recentních křížení, neboť „podezřelé“ alely mohou být v jejich genomu obsaženy již po mnoho let. Stejně tak haplotypy sdílené mezi vlky a psy nemusí být bezprostředními ukazateli nedávného křížení (Icolina et al. 2010) a mohou poukazovat pouze na společné předky a dávné hybridizační události.

Až na pár výjimek (provincie Grosseto) byla doposud většina vědeckých prací zabývajících se se hybridizací mezi vlkem a psem, zaměřena pouze na jednu nebo více smeček (Salvatori et al. 2019) a neměla tudíž správnou vypovídající hodnotu pro celostátní měřítko. Přestože tedy hybridizace mezi vlkem a psem v Itálii není považována za významnou hrozbu, tvoří velké úskalí v ochraně a managementu vlků, neboť na hybridy se zde nevztahuje žádná právní ochrana. Útoky na hospodářská zvířata jsou nejčastěji přisuzovány právě hybridům kvůli nestandardnímu chování, ale většinou jsou tato obvinění založena na (často chybném) hodnocení fenotypových znaků a na nepodložených důkazech, čímž jsou vlci vystavováni velkému tlaku chovatelů hospodářských zvířat, lovců a místní komunity (Dufresnes et al. 2019). Chybějící regule v managementu hybridů tvoří právní skulinu, která částečně legalizuje lov vlků (Dufresnes et al. 2019). Je třeba predikovat dynamiku a dopady hybridizace skrze objektivní hodnocení, které bude založené na adekvátním vzorkování o dostatečné frekvenci, a to na lokální i celostátní úrovni v reálném čase (Salvatori et al. 2019), neboť stanovení míry hybridizace je zásadní pro vývoj managementu a sociálního vnímání vlka jako takového (Dufresnes et al. 2019).

3.6 Identifikace a monitoring hybridů

Aby bylo možné účinně čelit potenciálnímu dopadu antropogenní hybridizace, je třeba řešit řadu technických otázek. Především jak spolehlivě odhalit křížence nedávných generací (F1-F3) a zpětné křížence (Salvatori et al. 2019), a jak odhadnout a sledovat jejich podíl v rodičovské generaci (Allendorf et al. 2001). Ačkoli anomální fenotypové znaky mohou indikovat hybridizaci, jejich genetické determinanty (podmíněnost) jsou většinou neznámé (Randi et al. 2014). Kromě toho se očekává, že hybridizace ovlivní fenotyp hybridních jedinců v závislosti na dominanci a kvantitativní povaze uvažovaných znaků (Mallet 2008; Paterson et al. 2010). Studium hybridizace a introgrese v přirozených populacích tedy poskytuje příležitost identifikovat lokusy spojené s fenotypovými rysy, adaptacemi a selekcí (Galaverni et al. 2017), které by tím pádem mohly být genetickým základem pro fitness hybridů (Gompert & Buerkle 2012).

3.6.1 Morfologické rozdíly

Vnější rozdíly mezi vlkem a psem nemusí být na první pohled zcela patrné, zvláště pokud se jedná o psí plemena šlechtěná pro divoký (vlčí) exteriér. Jako potenciální ukazatele hybridizace byly navrženy znaky, jako jsou bílé drápy (ve srovnání s obvyklým černým nebo tmavě šedým divokým fenotypem), nebo ostruha na zadních nohách (paspárek, reliktní pátý prst, preaxiální polydaktylie - viz obrázek 5), ale jejich genetické determinanty jsou zatím neznámé nebo nejisté (Ciucci et al. 2003; Caniglia et al. 2013; Randi et al. 2014). U některých fenotypových variant jsou dobře známy i jejich genetické determinanty, například mutace pro barvu černé srsti, kterou vidíte na obrázku 4 (Candille et al. 2007). Tento znak je kódován delecí 3-bp v genu pro β -defensin CDB103, který byl pravděpodobně zanesen do genomu severoamerických vlků dávnou hybridizací se psy (Anderson et al. 2009).



Obrázek 4 - Melanistické černé zbarvení srsti (National Geographic - Black Wolf's Secret Life 2010).



Obrázek 5 - Pátý prst na zadní končetině (BBC UK, 2004).

Přestože jsou některé anomální fenotypové znaky ověřeny pomocí fenotyp-genotypové asociace, mohou do značné míry odrážet pouze dávné události introgrese (hybridizace v průběhu evoluce) a nelze je proto spolehlivě použít jako samostatné kritérium pro identifikaci hybridů za účelem jejich managementu (Lorenzini et al. 2014; Galaverni et al. 2017). Pomocí kamer nelze dobře rozpoznat

morfologické detaily, jako jsou paspárky či depigmentované drápy - ty lze pozorovat spíše u mrtvých nebo uspaných jedinců, což dále omezuje využití těchto znaků při zkoumání populací ve větším měřítku (Salvatori et al. 2019).

3.6.2 Invazivní a neinvazivní vzorky, molekulární metody

Vyšší prostorové a časové rozlišení pro hodnocení hybridizace vlků a psů lze zajistit zavedením systematického intenzivního odběru neinvazivních vzorků v místním měřítku (Salvatori et al. 2019). Základem monitoringu populace vlků pro účely sledování hybridizace je sběr vzorků, v menší míře pak záznamy z fotopastí. Vzorky dělíme na neinvazivní (dále jen NIS – non-invasive samples) a invazivní, dle toho, zda mohou či nemohou být odebrány bez přímého kontaktu se zvířetem. Při zkoumání populací velkých šelem obecně převažují vzorky neinvazivní – tedy trus, moč nebo srst, aby nedocházelo k rušení populace. Tyto vzorky ovšem poskytují jen omezené množství DNA o nízké kvalitě (Pilot et al. 2018), a proto jsou pro spolehlivější výsledky analýzy vhodnější vzorky invazivní – tedy různé tkáně a krev.

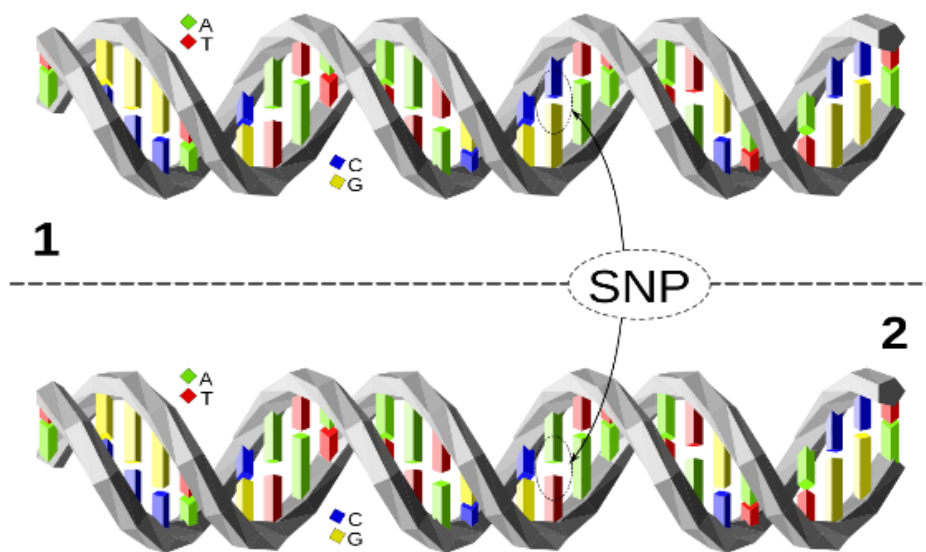
Genetická divergence mezi vlčími populacemi a mezi vlky a psy navzájem poskytuje kvalitní základ pro získání velkého množství molekulárních markerů, které lze použít při analýze k identifikaci (VonHoldt et al. 2010), avšak identifikovat rodičovské linie hybridů pro konkrétní lokalitu není jednoduché a složení referenčních rodičovských vzorků může navíc zásadně ovlivnit výsledky analýzy (Scandura et al. 2001). Proto se vždy používá referenční panel vzorků z různých psích plemen a vlků, charakteristických pro danou lokalitu (Randi et al. 2014).

Nízká kvalita a kvantita DNA z NIS omezuje jak typ, tak počet markerů, které by mohly být použity (např. celogenomové SNP) (Waits & Paetkau 2005; Beja-Pereira et al. 2009). Přestože nově dostupné genomické nástroje mají velký potenciál pro použití při genotypování NIS, generování dat o celém genomu z nekvalitní DNA je velmi náročné a nákladné (Perry et al. 2010). Proto se pro analýzu DNA, která pochází z NIS, používají jen vzácně, zatímco informativní uni- a bi- parentální genetické markery, včetně mikrosatelitů (STRs), jsou využívány tradičně (Adams et al. 2007;

Caniglia et al. 2014; Pacheco et al. 2017). Vytvoření nových molekulárních markerů s vysokou diskriminační silou (tj. Ancestry Informative Markers, AIM) použitelných na NIS umožňuje řešit hybridizaci mnohem účinněji než v minulosti (vonHoldt et al. 2013; Randi et al. 2014; Godinho et al. 2015; Galaverni et al. 2017). Odběr NIS se tak stává účinným přístupem k hodnocení stupně hybridizace v populacích divokých psovitých šelem ve velkém měřítku (Monzón et al. 2014; Pacheco et al. 2017).

Frekvenci hybridizace lze určit použitím vysoce rozlišujících autosomálních markerů (např. Verardi et al. 2006), ale důležitější je sledovat směrodatnost párování jedinců (které pohlaví kterého druhu se jakou měrou podílí na produkci hybridů), což vyžaduje použití nelineárních markerů – tedy markery pro zkoumání haplotypů mtDNA (zděděné výhradně po matce) a Y-chromozomů (zděděné výhradně po otci). Y-chromozomové markery se v posledních letech používají zejména ke studiu rekolonizace a pohlavní předpojatosti savců.

Všechny markery využívané k analýzám jsou zpravidla založeny na sledování takzvaných SNP (snipů) – jednonukleotidových polymorfismů znázorněných na obrázku 6 (Meadows et al. 2006) nebo na opakování jednoduchých sekvencí – mikrosatelitů znázorněných na obrázku 7 (Van Hooft et al. 2002; Yannic et al. 2008).



Obrázek 6 - Jednonukleotidový polymorfismus (By SNP model by David Eccles).

Unique sequence	Repeat units	Unique sequence
---GGTAGCCAA	A A A A (A) _n	CGATCCA---
---TCGCATGCA	CA CA (CA) _n	ATTCGCA---
---TTAGCATCAG	CAG (CAG) _n	CCAGTGA---
---AATGGTACCGG	(CCGG) _n	GTCACGT---
---CGATGATCCAAG	(CCAAG) _n	TTACGTA---

Obrázek 7 - Mikrosatelity (Boland et al. 1998)

4 Cíle praktické části

- Osvojit si laboratorní metody pro analýzu živočišných vzorků, zejména zpracování DNA.
- Analyzovat dataset vzorků a zhodnotit možný výskyt hybridů.

5 Materiál

Dataset obsahuje 130 vzorků, které byly sebrány na území České republiky, Slovenska a Polska. V České republice sběr uskutečnily vlčí hlídky pod vedením Hnutí DUHA, AOPK a v rámci projektu OWAD. Na Slovensku sběr proběhl v rámci projektu Sčítání velkých šelem pro ŠOP SR (Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky). Většinou se jednalo o trus, výjimečně i tkáň. Pro srovnání byly zařazeny vzorky bukálních stěrů čistokrevných psů z různých domácích i zahraničních výstav. Vzorky byly zpracovávány výzkumnou skupinou zabývající se genetikou velkých šelem na Karlově univerzitě, České zemědělské univerzitě a Ostravské univerzitě. Osobně jsem se na laboratorním zpracování vzorků z tohoto datasetu nepodílela a izolaci DNA jsem prováděla na jiných živočišných vzorcích.

6 Metodika

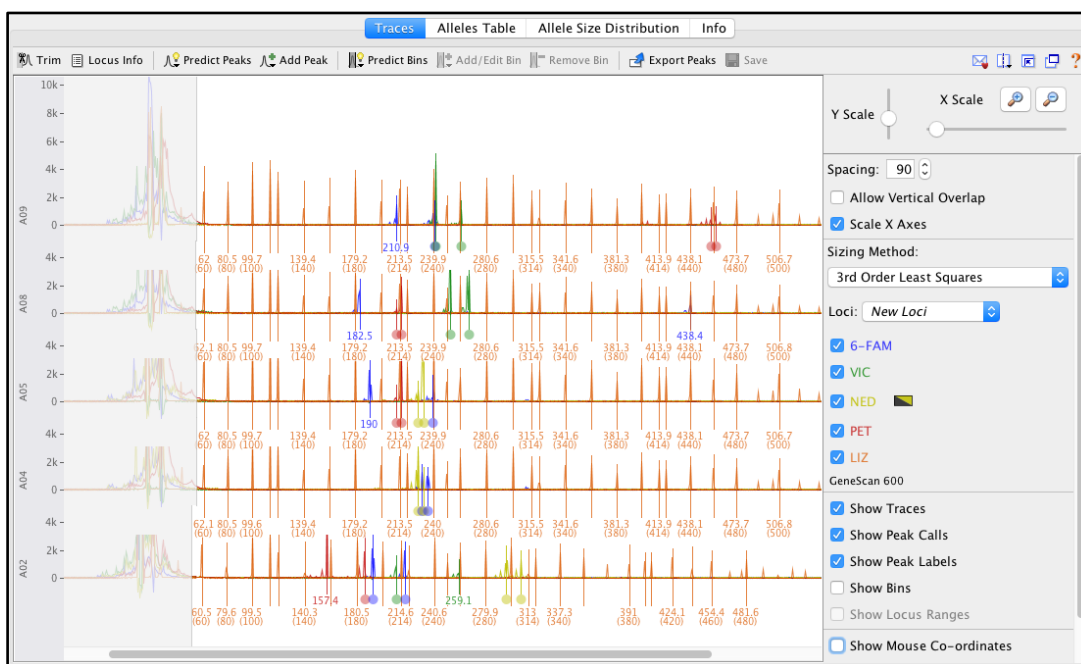
V laboratorní části byl k izolaci DNA z trusu použit izolační kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) (viz obrázek 8). Pro izolaci DNA z tkáně byl použit DNeasy Blood Tissue Kit (Qiagen). Posledním krokem izolace je vymývání DNA změnou pH, která byla zachycena na membráně, přes kterou se filtrují nečistoty. Běžně se používá 200 μ l pufru ATE, ale pro větší výtěžek DNA jsme vymývání provedli opakovaně (2-3 krát) s použitím 50 μ l ATE.



Obrázek 8 - Izolační kit (foto: Báčová, 2016).

Po izolaci jsme získaný roztok DNA a pufru ATE podrobili měření na spektrofotometru (Nanodrop, ThermoFisher Scientific), abychom zjistili koncentraci nukleových kyselin. Pro PCR reakci je nezbytně nutné přidat do reakční směsi další složky, jako jsou Multiplex PCR polymeráza (Qiagen), fluorescenčně značené primery a voda. V mé práci bylo zkoumáno 18 autozomálních lokusů: FH2088, FH2054, FH2087, CXX279, REN169O18, FH2097, INRA21, FH2001, REN169D01, FH2096, FH2137, INU055, AHTk211, VWF, FH2140, CPH5, REN64E19, FH2010. Každý lokus je ohraničen „forward“ a „reverse“ variantou primeru, z nichž jedna je fluorescenčně označena.

Během PCR se cílové lokusy amplifikují a vznikne PCR produkt. K tomuto PCR produktu je přidán formamid, který DNA zakonzervuje, a žebřík 500 LIZ® Size Standard (ThermoFisher Scientific). Výsledné produkty byly zaslány k fragmentační analýze na Přírodovědeckou fakultu Univerzity Karlovy v Praze. Zpětně byla zaslána data, která se editovala poloautomaticky v programu Geneious (viz obrázek 9).



Obrázek 9 - Výsledky fragmentační analýzy v programu Geneious.

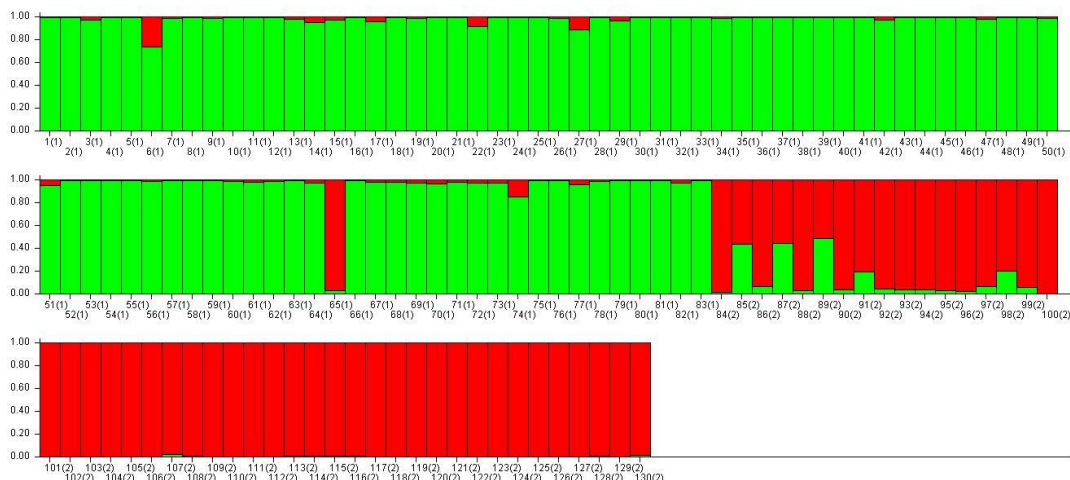
Obdržený dataset jsem analyzovala pomocí programu Structure 2.3.4. (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000), který vychází z takzvané Bayesovské klastrovací analýzy, která funguje na základě rozdělení pravděpodobností pro sledovaný parametr populace, a to z hlediska frekvence alel. Tento program jsem nastavila takto:

- Number of individuals: 130
- Ploidy of data: 2
- Number of loci: 18
- Missing data value: 0
- Data files stores data for individual in single line
- ID for each individual
- Putative population origin for each individual

Length of burn-in period jsem nastavila na 200 000, což je počet opakování nutných pro ustálení analýzy, které jsou posléze umazány a Number of MCMC Reps after burnin na 800 000, což tvoří finální počet opakování v analýze. Počet klastrů byl nastaven od $K=1$ do $K=2$, při čemž analýza byla pro každý klastr opakována dvakrát. Rozdělení na dva klastry je dostačující, protože nás zajímá rozdělení na vlky a psy, nikoli hlubší struktura populace v rámci sledovaného datasetu.

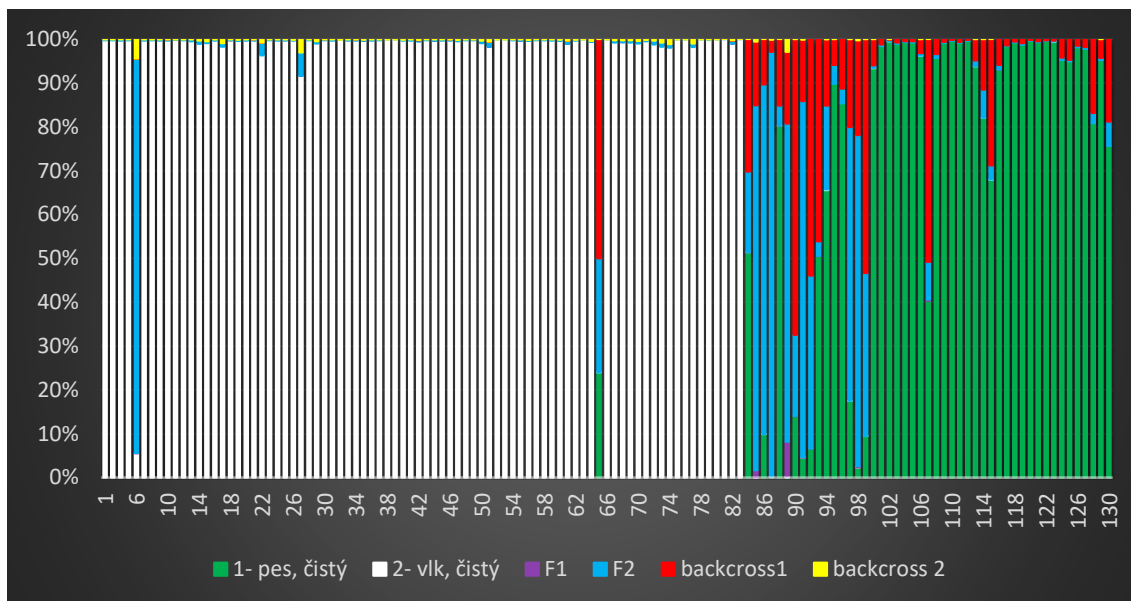
K podrobnější analýze potenciálně hybridních vzorků byl použit program NewHybrids, který testuje přímo zadané hybridní kategorie. Data pro tento program musejí být upravena tak, aby data s chybějící hodnotou byla označena číslem -1 a všechna ostatní čísla byla o 100 větší.

7 Výsledky



Obrázek 10 - Výsledky v programu Structure 2.3.4. Čísla v závorkách označují teoretickou příslušnost vzorků k populaci, 1 označuje vlky a 2 psy.

Na obrázku číslo 10 vidíme výsledky z programu Structure. Každý sloupec představuje jednoho jedince a každá barva zařazení do testovaného klastru. Zelená barva zobrazuje genom vlčí a červená barva genom psí. Teoreticky zde tedy máme 83 vlků a 47 psů. Vidíme však, že námi určená příslušnost k psí či vlčí populaci a převažující barva klastru se ne vždy shoduje. U vzorku 6 a 65 vidíme jiné než očekávané plné zařazení do vlčího klastru. U vzorku 65 se jedná o záměnu psího vzorku za vlčí. Vzorek 6 vykazuje 25% příslušnosti ke psům, mohlo by se jednat o potenciálního hybridu. Dvojitá příslušnost je vidět u vzorků 84 až 92, které patří psům z Polska. Menší nesrovnalost vidíme i u vzorků 93 až 99, ačkoli se jedná o vzorky psů se známým původem.

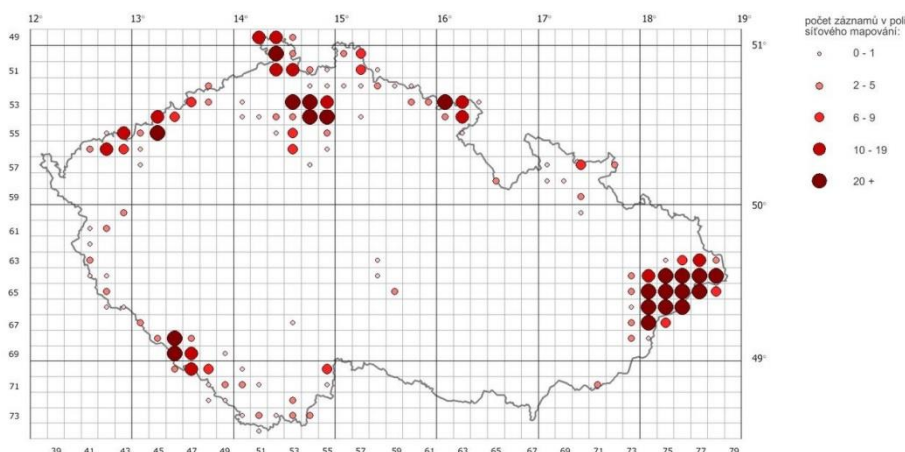


Obrázek 11 - Výsledky v programu NewHybrids.

Pro podrobnější výsledky byl použit program NewHybrids, který vyhodnotil i podíl jednotlivých hybridních kategorií (viz. obrázek 11). Bílá barva značí čistý vlčí původ, zelená čistý psí původ, fialová hybrida první filiální generace (F1), modrá hybrida druhé filiální generace (F2), červená zpětné křížení do populace psů (B1) a žlutá zpětné křížení do populace vlků (B2). Vzorek číslo 6 se v tomto případě jeví jako hybrid F2. Podezřelý původ se potvrdil i u vzorku číslo 65, kde je podezření ze zpětného křížení.

8 Diskuse

Riziko hybridizace na území s nízkou denzitou vlka a velkým počtem toulajících se psů je významně větší (Anderson et al. 2002). Vlci v České republice představují okrajovou zónu výskytu střeoevropské nížinné (severní Čechy), karpatské (Beskydy) a alpské populace (Šumava)(Hulva et al. 2018). Ve všech lokalitách výskytu se však jedná pouze o malé populace čítající pár desítek jedinců (viz obrázek 12), takže mohou být toulavými psy potenciálně ohroženy. ČR již přijala některé intervence v Programu péče o vlka obecného, které jsou zaměřeny na F1, F2 a B1 hybridy a jedince s netypickými fenotypovými znaky. V případě, že bude identifikován hybrid, bude z populace odstraněn (opatření typu reaktivní intervence). V lokalitách s vyšší frekvencí hybridizace v rámci proaktivní intervence proběhne kontrola, odchyt a případné odstranění toulavých psů.



Obrázek 12 - Rozšíření vlka obecného v ČR v letech 2000-2019 (Program péče o vlka 2020 - NDOP AOPK ČR).

Během projektu „Monitoring velkých šelem v EVL Beskydy“ byl nalezen vzorek trusu, u nějž byla genetickou analýzou prokázána vysoká pravděpodobnost hybridního původu (Krojerová et al. 2014) a dalším takovým případem byl jedinec sražený u Rumburka, jehož vzorek se nachází i v našem datasetu pod číslem 6.

Analýza v programu Structure pro K=2 rozdělila všechny námi zkoumané jedince do populace vlků a psů, avšak u několika vzorků je příslušnost nejasná. Vzorek číslo 6

a 65 vykazují podobnost se psy, přestože před analýzou byly identifikovány jako vlci. Aby bylo možné s větší jistotou vyhodnotit tyto jedince jako hybridy, analyzovali jsme vzorky v programu navrženém přímo pro testování hybridních kategorií. Program NewHybrids podezřelý původ vzorků číslo 6 a 65 potvrdil, avšak pro jistotu tvrzení by bylo třeba u obou vzorků znovu provést izolaci DNA, PCR a analýzu, abychom si mohli být jistí, že podezřelý původ nevznikl z příčiny chybování při laboratorních postupech.

V obou programech byly podezřele vyhodnoceny i vzorky 84 až 99. U vzorků 84 až 92 se údajně jedná o psy z Polska, ovšem dle analýzy bude jejich původ mnohem komplikovanější a pravděpodobně i z velké části vlčí. Pro zkoumání této skupiny by však měl být vytvořen jiný dataset, který bude obsahovat více vzorků z dané lokality, zejména známých vzorků, aby byl vytvořen silnější referenční rámec zaměřený na místní populace. Vzorky 93 až 99 patří čistokrevným psům, takže jejich kombinované zařazení může být výsledkem chybování při laboratorních postupech, kdy mohlo dojít ke kontaminaci, špatné amplifikaci primerů při PCR nebo ke špatnému čtení píků z chromatogramu. Zvláštní výsledky mohou být ovlivněny i nerovnoměrným zastoupením vlčích a psích vzorků, což může částečně ovlivnit výsledné referenční hodnoty. V neposlední řadě může být kombinovaný původ výsledkem ancestrálního polymorfismu (Tsuda et al. 1997) – tedy sdílením polymorfismu, který zdědili od společného předka, což je vzhledem k provázanosti obou populací i velmi pravděpodobné.

Zásadní chyby mohou vznikat, pokud není striktně dodržován pracovní postup, jelikož může snadno kontaminaci nebo jinému znehodnocení vzorku. Někdy mohou být vzorky poškozené již před sběrem a odesláním do laboratoře např. v důsledku intenzivního slunečního záření, sucha nebo deště. Chyby při amplifikaci může působit například nulová alela (null allele), což je nefunkční alela v mikrosatelitním lokusu, vzniklá v důsledku genetické mutace, která nemůže být při PCR amplifikována na detekovatelné úrovni (Dakin & Avise 2004). Dalším (podobným) typem chyby je allelic dropout, při které dochází přednostně k amplifikaci některých alel před jinými, takže některé alely mohou být amplifikovány nedostatečně (Hunt 2009).

Ve studii Donfrancesco et al. (2019) bylo shrnuto vnímání vědecké komunity vůči hybridizaci a introgresi mezi vlkem a psem, včetně několika důležitých otázek týkajících se managementu. Většina odborníků se shodla, že hybridy by měli být definováni dle jejich genetického profilu na základě stanovení prahové hodnoty a management by měl být řízen pouze kompetentními formálními institucemi a orientován především na zachování genetické integrity vlka, aby evoluční a ekologické procesy byly vymaněny z antropogenní interference. Dále se shodli na implementaci preventivních a proaktivních intervencí a aplikaci reaktivní intervence pouze v oblastech s malými regenerujícími se populacemi vlků. Většina se přiklání i k odchytu a sterilizaci ve výjimečných případech. Odborníci se však neshodují v nakládání se sterilizovanými jedinci, zejména nesouhlasí s jejich vypouštěním zpět do volné přírody (Gese & Terletzky 2015). Pokud jde o management psů, odborníci se shodli, že volně pobíhající psi by neměli být usmrcováni. Toulaví a ferální psi, odchycení ke sterilizaci, by neměli být pouštěni zpět do přírody, neboť působí škody na volně žijících zvířatech a domácí psi by měli být navráceni majitelům, kteří za ně budou nést právní odpovědnost.

Ačkoli se vědci přiklánějí k tomu, aby byl management zaměřen hlavně na řešení problému narušení genetické integrity vlka, k reaktivním zásahům a usmrcování se více přiklánějí ekologové než genetici.

9 Závěr

Z literární rešerše vyplývá, že hybridizace mezi vlkem a psem je velmi komplikovaná a je třeba na ni nahlížet ze všech možných úhlů pohledu. Ačkoli by mohla vážně narušit integritu vlčího genomu (Randi et al. 2014), může být zároveň řešením nízké genetické variability (Donfrancesco et al. 2019). Žádné studie zatím nepotvrdily ani nevyvrátily možný negativní dopad hybridizace z biologického hlediska, jelikož se většinou jedná o změny, které by se projevily až po delším časovém období (v rámci evoluce). Vzhledem ke společné evoluční minulosti vlků a psů, ve které se rozešli v podstatě nedávno (Harrison & Larson 2014; Randi 2008), nelze ani říct, kde je hranice přirozenosti tohoto jevu. Proto se víc než starost o genetickou integritu, nabízí mnohem aktuálnější problém, a tím je narušení ochranných programů. Většinou je páření mezi vlky a psy vnímáno jako nepřirozený jev s negativními důsledky (zejména laickou veřejností), což je často posilováno i nenávisť vůči vlkům, kteří páchají škody na stádech hospodářských zvířat. Hybridi mohou posloužit jako záminka pro „legalizované“ zabíjení vlků, a proto se jedná o problém, který je třeba řešit na konkrétních místech v reálném čase.

Identifikace hybridů pouze podtrhává složitost hybridizace, protože na základě fenotypových znaků je identifikace většinou nespolehlivá (Donfrancesco et al. 2019) a na základě genetické analýzy velmi náročná, drahá, a navíc mnohdy sporná. Pro mapování hybridizace je třeba provádět pravidelné a celoplošné vzorkování, pokud možno neinvazivní cestou. Nevýhoda neinvazivních vzorků spočívá mimo malého množství nekvalitní DNA v tom, že i když jsou identifikovány jako hybridní, dohledat jejich původního nositele je prakticky nemožné.

Přestože by identifikace a řízení mohlo probíhat na základě fenotyp-genotypové asociace, nebyl zatím stanoven žádný oficiální standard, dle kterého by mohlo být provedeno oficiální rozhodnutí, že se jedná o hybrida nebo o čistokrevného jedince. S dalšími studiemi přicházejí nová fakta o tom, jak úzce jsou vlci a psi příbuzní, a jak moc je jejich historie provázaná, společně s důvody, proč by někteří vlci mohli být nositeli psích genů (a naopak), přestože nevznikli z nedávných hybridizačních událostí.

Zůstává tak na vědecké komunitě a kompetentních orgánech, která fakta a domněnky budou přijata a nejvíce diskutována, neboť právě jimi bude řízen směr managementu hybridů.

10 Reference

Adams JR, Lucash C, Schutte L, Waits LP. 2007. Locating hybrid individuals in the red wolf (*Canis rufus*) experimental population area using a spatially targeted sampling strategy and faecal DNA genotyping. *Molecular Ecology* **16**:1823–1834.

Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Animal Conservation* **16**:613-622.

Anderson TM et al. 2009. Molecular and Evolutionary History of Melanism in North American Gray Wolves. *Science* **323**:1339-1343.

Andersons Ķ, Lucchini V, Ozoliņš J. 2002. Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammalian Biology* **67**:79-90.

Andreska J. 1991. Lovy bez psů, záhada paleolitu. Čtení o psech, čtení pro dobrou pohodu. Magazín. Praha. Magnet-Press. ISSN 80-85434-00-8.

Arendt M, Fall T, Lindblad-Toh K, Axelsson E. 2014. Amylase activity is associated with AMY2B copy numbers in dog: implications for dog domestication, diet and diabetes. *Animal Genetics* **45**:716-722

Atitwa SCh. 2018. How Many Dogs Are There In The World? WorldAtlas. Available at: www.worldatlas.com (accessed January 2018).

Axelsson E, Ratnakumar A, Arendt M-L, Maqbool K, Webster MT, Perloski M, Liberg O, Arnemo JM, Hedhammar Å, Lindblad-Toh K. 2013. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* **495**:360-364.

BBC UK. 2014. Obrázek pátého prstu na zadní končetině vlka. Available at https://newsimg.bbc.co.uk/media/images/40023000/jpg/_40023501_wolf_ciucci_203.jpg.

Ballard WB, Whitman JS, Gardner CL. 1987. Ecology of an exploited wolf population in south-central Alaska. *Wildlife Monographs*, no. 98. The Wildlife Society, Bethesda.

Barilani M et al. 2005. Detecting hybridization in wild (*Coturnix c. coturnix*) and domesticated (*Coturnix c. japonica*) quail populations: enduring truths and challenges associated with population structure and gene flow. *Biological Conservation* **126**:445-455.

Beja-Pereira A, Oliveira R, Alves PC, Schwartz MK, Luikart G. 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* **9**:1279–1301.

Biedrzycka A, Solarz W, Okarma H. 2012. Hybridization between native and introduced species of deer in Eastern Europe. *Journal of Mammalogy* **93**:1331-1341

Bohling J & Waits L. 2011. Assessing the prevalence of hybridization between sympatric *Canis* species surrounding the red wolf (*Canis rufus*) recovery area in North Carolina. *Molecular Ecology* **20**:2142-2156.

Bohling JH & Waits LP. 2015. Factors influencing red wolf–coyote hybridization in eastern North Carolina, USA. *Biological Conservation* **184**:108-116.

Boitani L. 1986. *Dalla parte del lupo*. Milano: L'airone di G. Mondadore Associati Spa.

Boitani L. 2003. Wolf conservation and recovery. *Wolves: Behavior, Ecology and Conservation* (edit by Mech LD, Boitani L). 317-340. University of Chicago Press, Chicago.

Boland CR et al. 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research* **58**:5248–5257.

Botigué LR et al. 2017. Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic. *Nature Communications* **8**:16082.

Breitenmoser U. 1998. Large predators in the Alps: The fall and rise of man's competitors. *Biological Conservation* **83**:279-289.

Broeck VA, Villar M, van Bockstaele E, Vanslycken J. 2005. Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives: evidence and consequences for native poplar populations. *Annals of Forest Science* **62**:601-613.

Candille SI, Kaelin CB, Cattanach BM, Yu B, Thompson DA, Nix MA, Kerns JA, Schmutz SM, Millhauser GL, Barsh GS. 2007. A -Defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dogs. *Science* **318**:1418-1423.

Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M, Manghi L, Boitani L, Sforzi A, Randi E. 2013. Black coats in an admixed wolf × dog pack is melanism an indicator of hybridization in wolves? *European Journal of Wildlife Research* **59**:543-555.

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.

Caniglia R et al. 2018. Wolf outside, dog inside? The genomic make-up of the Czechoslovakian Wolfdog. *BMC Genomics* **19**:533.

Cagan A & Blass T. 2016. Identification of genomic variants putatively targeted by selection during dog domestication. *BMC Evolutionary Biology* **16**.

Carbyn LN, Oosenbrug SM, Anions DW. 1993. Wolves, bison and the dynamics related to the Peace Athabaska Delta in Canada's Wood Buffalo National Park. Canadian Circumpolar Institute, University of Alberta, Edmonton.

Ciucci P, Lucchini V, Boitani L, Randi E. 2003. Dewclaws in wolves as evidence of admixed ancestry with dogs. *Canadian Journal of Zoology* **81**:2077-2081.

Ciucci P, Chapron G, Guberti V, Boitani L. 2007. Estimation of mortality parameters from (biased) samples at death: are we getting the basics right in wildlife field studies? A response to Lovari et al. (2007). *Journal of Zoology* **273**:125-127.

Coulson T, MacNulty DR, Stahler DR, vonHoldt B, Wayne RK, Smith DW. 2011. Modeling Effects of Environmental Change on Wolf Population Dynamics, Trait Evolution, and Life History. *Science* **334**:1275-1278.

Czarnomska SD et al. 2013. Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics* **14**:573-588.

Čílová D, Vejl P, Sebkova N, Castkova M, Jurkovicova P, Kadlecova V. 2011. Microsatellite analysis of X and Y gonosome variability in the czechoslovakian and sarloos wolfdog breeds. *Journal of Veterinary Behavior* **6**:60-61.

Dakin E & Avise J. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**:504–509.

Dierking J, Phelps L, Praebel K, Ramm G, Prigge E, Borcharding J, Brunke M, Eizaguirre C. 2014. Anthropogenic hybridization between endangered migratory and commercially harvested stationary whitefish taxa (*Coregonus spp.*): enduring truths and challenges associated with population structure and gene flow. *Evolutionary Applications* **7**:1068-1083.

Ding ZL, Oskarsson M, Ardalan A, Angleby H, Dahlgren LG, Tepeli C, Kirkness E, Savolainen P, Zhang Y-P. 2012. Origins of domestic dog in southern East Asia supported by analysis of Y-chromosome DNA. *Heredity* **108**:507-514.

Donfrancesco V et al. 2019. Unravelling the Scientific Debate on How to Address Wolf-Dog Hybridization in Europe. *Frontiers in Ecology and Evolution* **7**:175.

Donnelly F, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.

Druzhkova A, Thalmann O, Trifonov VA, Leonard JA, Vorobieva NV, Ovodov ND, Graphodatsky AS, Wayne RK. 2013. Ancient DNA Analysis Affirms the Canid from Altai as a Primitive Dog. *Plos One* (e57754) DOI: 10.1371/journal.pone.0057754.

Dufresnes Ch, Remollino N, Stoffel C, Manz R, Weber JM, Fumagalli L. 2019. Two decades of non-invasive genetic monitoring of the grey wolves recolonizing the Alps support very limited dog introgression. *Scientific Reports* **9**:148.

Eccles D (gringer). 2014. Obrázek jednonukleotidového polymorfismu. Available at <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2355125>.

Edmands S & Buerkle CA. 1999. Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence: enduring truths and challenges associated with population structure and gene flow. *Evolution* **53**: 1757-1768.

Fabbri E et al. 2007. From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology* **16**:1661-1671.

Falcucci A, Maiorano L, Boitani L. 2007. Changes in land-use/land-cover patterns in Italy and their implications for biodiversity conservation. *Landscape Ecology*. **22**:617-631.

Fan Z et al. 2016. Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves. *Genome Research* **26**:163-173.

Feulner PGD, Gratten J, Kijas JW, Visscher PM, Pemberton JM, Slate J. 2013. Introgression and the fate of domesticated genes in a wild mammal population. *Molecular Ecology* **22**:4210-4221.

Frantz LA et al. 2016. Genomic and archeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science* **352**:1228-1231.

Freedman AH et al. 2014. Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs. *PLoS Genetics* (e1004016) DOI:10.1371/journal.pgen.1004016.

Freedman AH et al. 2016. Demographically-Based Evaluation of Genomic Regions under Selection in Domestic Dogs. *PLOS Genetics* **12** (e1005851) DOI: 10.1371/journal.pgen.1005851.

Freedman AH & Wayne RK. 2017. Deciphering the origin of dogs: From fossils to genomes. *Annual Review of Animal Biosciences* **5**:281–307.

Fritts SH Mech LD. 1981. Dynamics, movements, and feeding ecology of newly protected wolf population in northwestern Minnesota. *Wildlife Monographs*, no. 80. The Wildlife Society, Bethesda.

Fritts SH, Stephenson RO, Hayes RD, Boitani L. 2003. Wolves and humans. *Wolves: Behavior, Ecology and Conservation* (edit by Mech LD, Boitani L). 289-316. University of Chicago Press. Chicago.

Galaverni M, Caniglia R, Fabbri E, Milanesi P, Randi E. 2016. One, no one, or one hundred thousand: how many wolves are there currently in Italy? *Mammal Research* **61**:13-24.

Galaverni M, Caniglia R, Pagani L, Fabbri E, Boattini A, Randi E. 2017. Disentangling Timing of Admixture, Patterns of Introgression, and Phenotypic Indicators in a Hybridizing Wolf Population. *Molecular Biology and Evolution* **34**:2324-2339.

Galov A, Fabbri E, Caniglia R, Arbanasić H, Lapalombella S, Florijančić T, Bošković I, Galaverni M, Randi E. 2015. First evidence of hybridization between goldenjackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers. *Royal Society Open Science* **2**:108-116.

Garcia-Moreno J, Matocq MD, Roy MS, Geffen E, Wayne RK. 1996. Relationship and genetic purity of the endangered Mexican wolf based on analysis of microsatellite loci. *Conservation Biology* **10**:376-389.

Gavrilets S, Vose A. 2005. Dynamic patterns of adaptive radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**:18040-18045.

Gazzola A, Capitani C, Mattioli L, Apollonio M. 2008. Livestock damage and wolf presence. *Journal of Zoology* **274**:261-269.

Genovesi P. 2002. Piano d'azione nazionale per la conservazione del Lupo (*Canis lupus*). Quaderni Conservazione Natura 13 Min. Ambiente — INFS, Ozzano dell'Emilia, Italy.

Gese EM & Terletzky PA. 2015. Using the “placeholder” concept to reduce genetic introgression of an endangered carnivore. *Biological Conservation* **192**:11-19.

Gilk SE, Wang IA, Hoover CL, Smoker WW, Taylor SG, Gray AK, Gharrett AJ. 2004. Outbreeding Depression in Hybrids Between Spatially Separated Pink Salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, Populations: Marine Survival, Homing ability, and Variability in Family Size. *Environmental Biology of Fishes* **69**:287–297.

Godinho R, Llaneza L, Blanco JC, Lopes S, Alvares F, Garcia EJ, Palacios V, Cortés Y, Talegon J, Ferrand N. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* **20**:5154–5166.

Godinho R, Lopez-Bao JV, Castro D, Llaneza L, Lopes S, Silva P, Ferrand N. 2015. Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining noninvasive samples with ancestry informative markers. *Molecular Ecology Resources* **15**:317–328.

Gompert Z & Buerkle CA. 2016. What, if anything, are hybrids: enduring truths and challenges associated with population structure and gene flow. *Evolutionary Applications* **9**:909-923.

Gottelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum GD, Roy MS, Girman DJ, Garcia-Moreno J, Ostrander EA, Wayne RK. 1994. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology* **3**:301-312.

Grant PR, Grant BR, Petren K. 2005. Hybridization in the recent past. *The American Naturalist* **166**:56-67.

Gray MM, Sutter NB, Ostrander EA, Wayne RK. 2010. The IGF1 small dog haplotype is derived from Middle Eastern grey wolves. *BMC Biology* **8**:16.

Hartl K & Jedlička J. 1996. Československý vlčák. Loba ve spolupráci s Klubem chovatelů Československého vlčáka. Praha.

Harrison RG & Larson EL. 2014. Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries. *Journal of Heredity* **105**:795-809.

Hedrick PW, Miller PS, Geffen E, Wayne RK. 1997. Genetic evaluation of the three captive Mexican wolf lineages. *Zoo Biology* **16**:47-69.

Hedrick PW & Kalinowski ST. 2000. Inbreeding Depression in Conservation Biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **31**:139-162.

Hulva P et al. 2018. Wolves at the crossroad: Fission-fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe. *Diversity and Distributions* **24**:179-192.

Hunt JL. 2009. Loss of Heterozygosity. Pages 50-55 in Tubbs RR, Stoler MH, editors. *Cell and Tissue Based Molecular Pathology*. Churchill Livingstone, Philadelphia.

Iacolina L, Scandura 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.

Krojerová J, Barančková M, Homolka M, Koubek P. 2014. Monitoring velkých šelem v EVL Beskydy. Závěrečná zpráva, ÚBO AV ČR, Brno.

Kusak J, Fabbri E, Galov A, Gomerčić T, Arbanasić H, Caniglia R, Galaverni M, Reljić S, Huber D, Randi E. 2018. Wolf-dog hybridization in Croatia. *Veterinarski Arhiv* **88**:375-395.

Lamont BB, He T, Enright NJ, Krauss SL, Miller BP. 2003. Anthropogenic disturbance promotes hybridization between *Banksia* species by altering their biology: evidence and consequences for native poplar populations. *Journal of Evolutionary Biology* **16**:551-557.

Larsen PA, Marchán-Rivadeneira MR, Baker RJ. 2010. Natural hybridization generates mammalian lineage with species characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 11447–11452.

Lecis R, Pierpaoli M, Biró ZS, Szemethy L, Ragni B, Vercillo F, Randi E. 2006. Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. *Molecular Ecology* **15**:119-131.

Lorenzini R, Fanelli R, Grifoni G, Scholl F, Fico R. 2014. Wolf–dog crossbreeding: “Smelling” a hybrid may not be easy. *Mammalian Biology* **79**:149-156.

Mallet J. 2008. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**:2971-2986.

Marino A, Braschi Ch, Ricci S, Salvatori V, Ciucci P. 2016. Ex post and insurance-based compensation fail to increase tolerance for wolves in semi-agricultural landscapes of central Italy. *European Journal of Wildlife Research* **62**:227-240.

McCullough DR, Jiang Z-G, Li C-W. 2009. Sika deer in Mainland China. *Sika Deer*. New York: Springer-Verlag **93**:521–539.

Meadows JRS, Hanotte O, Drögemüller C, Calvo J, Godfrey R, Coltman D, Maddox JF, Marzanov N, Kantanen J, Kijas JW. 2006. Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep. *Animal Genetics* **37**:444-453.

Mech LD. 1970. The wolf: The ecology, and behavior of an endangered species. Natural History Press, Garden City, New York.

Mech LD & Nelson ME. 1990. Non-family wolf (*Canis lupus*) packs. The Canadian Field-Naturalist **104**:482-483.

Mech LD. 1994. Buffer zones of territories of gray wolves as regions of intraspecific strife. Journal of Mammalogy **75**:199-202.

Mech LD, Adams LG, Meier TJ, Burch JW, Dale BW. 1998. The wolves of Denali. University of Minnesota Press, Minneapolis.

Miller W et al. 2012. Polar and brown bear genomes reveal ancient admixture and demographic footprints of past climate change. Proceedings of the National Academy of Sciences **109**: E2382-E2390.

Ministerstvo životního prostředí. 2020. Program péče o vlka.

Monzón J, Kays R, Dykhuizen DE. 2014. Assessment of coyote-wolf-dog admixture using ancestry-informative diagnostic SNPs. Molecular Ecology **23**:182–197.

Morell V. 1997. The origin of dogs: running with the wolves. Science **276**:1647-1648.

Muñoz-Fuentes V, Darimont ChT, paquet PC, Leonard JA. 2010. The genetic legacy of extirpation and re-colonization in Vancouver Island wolves. *Conservation Genetics* **11**:547-556.

Muñoz-Fuentes V, Vilá C, Green AJ, Negro JJ, Sorenson MD. 2007. Hybridization between white-headed ducks and introduced ruddy ducks in Spain: evidence and consequences for native poplar populations. *Molecular Ecology* **16**:629-638.

National Geographic. 2010. Black Wolf's Secret Life. Obrázek černého vlka. Available at <https://howlingforjustice.files.wordpress.com/2011/03/black-wolf-alaska-kw.jpg>.

Naughton-Treves L, Grossberg R, Treves A. 2003. Paying tolerance: rural citizens attitudes toward wolf depredation and compensation. *Conservation Biology* **17**:1500-1511.

Pacheco C, López-Bao JV, García EJ, Lema FJ, Llana L, Palacios V, Godinho R. 2017. Spatial assessment of wolf-dog hybridization in a single breeding period. *Scientific Reports* **7**:42475.

Pang JF et al. 2009. mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular Biology and Evolution* **26**:2849-2864.

Paterson S et al. 2010. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution. *Nature* **464**:275-278.

Perry GH, Marioni JC, Melsted P, Gilad Y. 2010. Genomic-scale capture and sequencing of endogenous DNA from feces. *Molecular Ecology* **19**:5332–5344.

Pickrell JK, Coop G, Novembre J, Kudaravalli S, Li JZ, Absher D, Srinivasan BS, Barsh GS, Myers RM, Feldman MW, Pritchard JK. 2009. Signals of recent positive selection in a worldwide sample of human populations. *Genome Research* **19**:826-83.

Piett S, Hager HA, Gerrard C. 2015. Characteristics for evaluating the conservation value of species hybrids. *Biodiversity Conservation* **24**:1931-1955.

Pilot M et al. 2014. Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in European wolves. “Smelling” a hybrid may not be easy. *Heredity* **112**:428-442.

Pilot M, Greco C, vonHoldt BM, Randi E, Jędrzejewski W, Sidorovich VE, Konopiński MK, Ostrander EA, Wayne RK. 2018. Widespread, long-term admixture between grey wolves and domestic dogs across Eurasia and its implications for the conservation status of hybrids. *Evolutionary Applications* **11**:1-19.

Randi E, Lucchini V, Christensen MF, Mucci N, Funk SM, Dolf G, Loeschcke V. 2001. Mitochondrial DNA Variability in Italian and East European Wolves: Detecting the Consequences of Small Population Size and Hybridization. *Conservation Biology* **14**:464-473.

Randi E, Luchcini V, Christensen MF, Mucci N, Funk SM, Dolf G, Loeschcke V. 2001. Mitochondrial DNA Variability in Italian and East European Wolves: Detecting the

Consequences of Small Population Size and Hybridization. *Conservation Biology* **14**:464-473.

Randi E & Lucchini V. 2002. Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conservation Genetics* **3**:29-43.

Randi E. 2008. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology* **17**:285-293.

Randi E. 2011. Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Review* **41**:99-111.

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 x Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection. *PLoS ONE* **9**:99-111.

Rhymer JM & Simberloff D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual review of ecology and systematics* **27**:83–109.

Rothman & RJ, Mech LD. 1979. Scent-marking in lone wolves and newly formed pairs. *Animal Behavior* **27**:750-760.

Rutledge LY, White BN, Row JR, Patterson BR. 2012. Intense harvesting of eastern wolves facilitated hybridization with coyotes. *Ecology and Evolution* **2**:19-33.

Salvatori, V & Ciucci P. 2018. "Wolf-dog hybridization: issues on detection and management across Europe," in Wolf-human coexistence in the Alps and in Europe. Page 67 in Marucco F, Maiolini C, Gandolfi M, Boitani L, editors. Book of the International Final Conference of the LIFE WOLFALPS.

Salvatori V, Godinho R, Braschi Ch, Boitani Ciucci P. 2019. High levels of recent wolf × dog introgressive hybridization in agricultural landscapes of central Italy. *European Journal of Wildlife Research*. **65**(5).

Sastre N, Vilá 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.

Savolainen P, Zhang Y, Luo J, Lundeberg J, Leitner T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* **298**:1610-1613.

Scandura M, Apollonio M, Mattioli L. 2001. Recent recovery of the Italian wolf population: a genetic investigation using microsatellites. *Mammalian Biology* **66**:321–331.

S divokou krví – chovatelská stanice. 2010. Obrázek Československý x Saarloosův vlčák.

Available at

http://img17.rajsce.idnes.cz/d1703/10/10115/10115949_81d8010c805c8e046ba416d4750428c8/images/DSC_0978.jpg?ver=2.

Servín-Martínez J. 1997. El periodo de apareamiento, nacimiento y crecimiento del lobo Mexicano (*Canis lupus baileyi*). *Acta Zoológica Mexicana* **71**:45-56.

Shannon LM et al. 2015. Genetic structure in village dogs reveals a Central Asian domestication origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**:13639-13644.

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* (e0143807) DOI: 10.1371/journal.pone.0143807.

Thalmann O et al. 2013. Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science* **342**:871-874.

Tsuda K, Kikkawa Y, Yonekawa H, Tanabe Y. Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: Evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. **72**:229-238.

Trouwborst A. 2014. Exploring the legal status of wolf-dog hybrids and other dubious animals: International and EU law and the wildlife conservation problem of hybridization with domestic and alien species. *Review of European, Comparative and International Environmental Law* **23**:111-124.

Valiére N, Fumagalli L, Gielly L, Miquel Ch. 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 Hooft WF, Groen AF, Prins HHT. 2002. Phylogeography of the African buffalo based on mitochondrial and Y-chromosomal loci: Pleistocene origin and population expansion of the Cape buffalo subspecies. *Molecular Ecology* **11**:267-279.

Verardi A, Lucchini V, Randi E. 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology* **5**:2845-55.

Verginelli F, Capelli C, Coia V, Musiani M, Falchetti M, Ottini L, Palmirota R, Tagliacozzo A, De Grossi Mazzorin I, Mariani-Constantini R. 2005. Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and South-East European wolves. *Molecular Biology and Evolution* **22**:2541-2551.

Vilá C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt RL, Crandall KA, Lundeberg J, Wayne RK. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* **276**:1687-1689.

Vilà C & Wayne RK 1999. Hybridization between wolves and dogs. *Conservation Biology* **13**:195–198.

von Holdt BM, Stahler DR, Bangs EE, Smith DW, Jimenez MD, Mack CM, Niemeyer CC, Pollinger JP, Wayne RK. 2010. A novel assesment of population structure and gene flow in

grey wolf populations of the Northern Rocky Mountains of the United States. *Molecular Ecology* **19**:4412-4427.

vonHoldt BM et al. 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* **464**:898–902.

vonHoldt BM et al. 2011. A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids. *Genome Research* **21**:1294-1305.

vonHoldt B, Pollinger JP, Dent AE, Parker HG, Ostrander EA, Wayne RK. 2013. Identification of recent hybridization between gray wolves and domesticated dogs by SNP genotyping. *Mammalian Genome* **24**:80–88.

vonHoldt BM, Kays R, Pollinger JP, Wayne RK. 2016. Admixture mapping identifies introgressed genomic regions in North American canids. *Molecular Ecology* **25**:2443-2453.

vonHoldt BM, Heppenheimer E, Petrenko V, Croonquist P, Rutledge LY. 2017. Ancestry-Specific Methylation Patterns in Admixed Offspring from an Experimental Coyote and Gray Wolf Cross. *Journal of Heredity* **108**: 341–348.

Voorbij AM, Leegwater PA, Kooistra HS. 2014. Potuitary Dwarfism in Saarloos and Czechoslovakian Wolfdogs is Associated with a Mutation in LHX3. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **28**:1770-1774.

Wabakken P, Sand H, Liberg O, Bjärvall A. 2001. The recovery, distribution, and population dynamics of wolves on the Scandi-navian peninsula, 1978–98. *Canadian Journal of Zoology* **79**: 710–725.

Waits LP & Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* **69**:1419–1433.

Wang G, Gheng L, Fan R, Irwin DM, Tang S, Peng J, Zhang Y. 2013. Signature of Balancing Selection at the MC1R Gene in Kunming Dog Populations. *PLoS One* (e55469) DOI: 10.1371/journal.pone.0055469.

Wang G et al. 2016. Out of southern East Asia: the natural history of domestic dogs across the world. *Cell Research* **26**:21-33.

Wayne RK. 1993. Molecular evolution of the dog family. *Trends in Genetics* **9**:218-224.

Wayne RK & Ostrander EA. 2007. Lessons learned from the dog genome. *Trends in Genetics* **23**:557–567.

Wayne RK & Shaffer HB. 2016. Hybridization and endangered species protection in the molecular era. *Molecular Ecology* **25**:2680-2689.

Yannic G, Basset P, Hausser J. 2008. Phylogeography and recolonization of the Swiss Alps by the Valais shrew (*Sorex antinorii*), inferred with autosomal and sex-specific markers. *Molecular Ecology* **17**:4118-4133.

Zeder MA. 2012. The Domestication of Animals. *Journal of Anthropological Research* **68**:161-190.

Zeder MA, Emshwiller E, Smith BD, Bradley DG. 2006. Documenting domestication: the intersection of genetics and archeology. *Trends in Genetics* **22**:139-155.

Zimen E & Boitani L. 1975. Number and distribution of wolves in Italy. *Zeitschrift für Säugetierkunde* **40**: 102–112.

