

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Problematika vlčích hybridů z hlediska genetiky**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Mgr. Pavlína Suchá**

**Vedoucí práce: Ing. Jakub Vašek, Ph.D.**

**© 2017 ČZU v Praze**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Problematika vlčích hybridů z hlediska genetiky" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2017

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu bakalářské práce, Ing. Jakubovi Vaškovi, Ph.D., za odborné konzultace a za možnost praktické činnosti v genetické laboratoři. Také chci poděkovat rodině a blízkým přátelům za veškerou jejich podporu.

# Problematika vlčích hybridů z hlediska genetiky

## Souhrn

Křížení mezi divoce žijícími druhy živočichů a jejich domestikovanými protějšky může znamenat pro přirozené populace hrozbu. Ale velká genetická blízkost mezi křížícími se taxony činí identifikaci hybridů obtížným úkolem. Vývoj populací vlka obecného (*Canis lupus*) je obecně charakterizován výraznými výkyvy v početnosti v průběhu několika posledních stovek let. Dnešní expanze vlků do oblastí osídlených lidmi vede k několika problémům, obzvláště křížení mezi vlky a volně se potulujícími se psy je nyní předmětem studia mnoha výzkumných programů. Věrohodnými známkami hybridizace vlků a divoce žijících psů mohou být abnormální morfologické znaky, jako je netypické zbarvení srsti, paspárky, tělesné rozměry, nebo zubní abnormality. K identifikaci potencionálních hybridů je nezbytné zhodnocení morfologických, ale i genetických znaků. Největším rizikem hybridizace je kromě morfologických změn a změn v chování narušení genetické integrity vlčích populací.

**Klíčová slova:** vlk obecný, pes domácí, vlčí kříženci, hybridizace, molekulární znaky

# Wolf-dog hybrids from a genetic point of view

## Summary

Hybridization between wild species and their domestic counterparts may represent a major threat to natural populations. However, high genetic similarity between the hybridizing taxa makes detection of hybrids a difficult task. The natural history of populations of grey wolf (*Canis lupus*) has been characterized by a dramatic decline in number during the past few hundred years. Recent wolf expansion to humanized areas has led to several threats, particularly, hybridization between wolves and free-ranging dogs recently became a subject addressed in many research programmes. Anomalous morphological traits in wolves, such as typical color patterns, dewclaws, body proportions, or dental anomalies, might be reliable signs of hybridization with free-ranging dogs. To identify the potential hybrids the use of morphological, and also molecular markers is necessary. Except the morphological and behavioral changes the disturbance of genetic integrity is the greatest threat of hybridization.

**Keywords:** grey wolf, domestic dog, wolf-dog hybrids, hybridization, molecular traits

# Obsah

<b>1. Úvod – Psovití (<i>Canidae</i>)</b>	<b>7</b>
1.1 Taxonomie	7
1.2 Evoluce	7
1.3 Fylogeneze	10
<b>2. Vlk obecný (<i>Canis lupus</i>)</b>	<b>12</b>
2.1 Vlk obecný	12
2.2 Pes domácí	13
<b>3. Hybridizace</b>	<b>17</b>
<b>4. Metodika populačně-genetických studií</b>	<b>22</b>
4.1 Variabilita populací	22
4.2 Studium genetické variability populací	23
<b>5. Křížení psa a vlka</b>	<b>26</b>
5.1 Morfologické znaky křížení psa a vlka	26
5.1.1 Zbarvení srsti	27
5.1.2 Paspárky	31
5.2 Další výskyt vlčích kříženců	33
<b>6. Závěr</b>	<b>35</b>
6.1 Stav populací vlka obecného v Evropě a v ČR	35
<b>Seznam literatury</b>	<b>39</b>

## 1. Úvod - Psovítí (*Canidae*)

### 1.1 Taxonomie

Čeleď zahrnuje tyto současné i vyhynulé (označené+) rody:

Čeleď: *Canidae – psovítí* (von Waldheim, 1817)

Podčeleď: *Caninae* (von Waldheim, 1817)

Rod: *Alopex* – liška (Kaup, 1829), *Atelocynus* – pes (Cabrera, 1940), *Canis* (Linnaeus, 1758), *Cerdocyon* – pes (Smith, 1839), *Chrysocyon* – pes (Smith, 1839), *Cuon* – dhoul (Hodgson, 1838), +*Dusicyon* – pes (Smith, 1839), *Lycalopex* – pes (Burmeister, 1854), *Lycaon* – pes (Brookes, 1827), *Nyctereutes* – psík (Temminck, 1838), *Otocyon* – pes (Müller, 1835), *Speothos* – pes (Lund, 1839), *Urocyon* – liška (Baird, 1857), *Vulpes* – liška (Frisch, 1775) ([www.biolib.cz](http://www.biolib.cz); [www.helsinki.fi](http://www.helsinki.fi)).

Rod *Canis* zahrnuje tyto současné i vyhynulé druhy: *Canis adustus* – šakal pruhovaný (Sundevall, 1847), +*Canis antonii* (Zdansky, 1924), +*Canis appolloniensis* (Koufos&Koustopoulos, 1997), +*Canis armbrusteri* (Gidley, 1913), *Canis aureus* – šakal obecný (Linnaeus, 1758), +*Canis cautleyi* (Pilgrim, 1932), +*Canis chihliensis* (Zdansky, 1924), +*Canis dirus* – pravlk obrovský (Leidy, 1858), +*Canis edwardii* (Gazin, 1942), *Canis himalayensis* – vlk himalájský (Aggarwal, Kisivild, Ramadevi&Singh, 2007), *Canis latrans* – kojot préríjní (Say, 1823), *Canis lupus* – vlk obecný (Linnaeus, 1758), *Canis mesomelas* – šakal čabrákový (Schreber, 1775), *Canis rufus* – vlk rudohnědý (Audubon&Bachman, 1851), *Canis simensis* – vlček etiopský (Rüppell, 1840) ([www.biolib.cz](http://www.biolib.cz); [www.helsinki.fi](http://www.helsinki.fi)).

### 1.2 Evoluce

Po velkém vymírání plazů na konci období křídý došlo k uvolnění ekologických nik. Není bez zajímavosti, že v poměrně velkém počtu fylogenetických linií, které mají svůj původ v paleocénní radiaci placentálů, byly pouze dvě skupiny masožravců, ostatní byli hmyzožraví nebo byla jejich potrava rostlinná (Colbert, 1961). Těmito masožravci byli *Creodonta* a *Carnivora* (šelmy). Pro obě skupiny existuje fosilní záznam od středního paleocénu (šelmy již ze spodního), na rozdíl od šelem však skupina *Creodonta* koncem miocénu vymřela. Od šelem se *Creodonta* liší především denticí: u obou skupin se sice zadní zuby přeměnily v tzv. trháky, ale u šelem je to čtvrtý horní premolár a první spodní stolička (P<sup>4</sup>/M<sub>1</sub>), kdežto u

příslušníků skupiny *Creodonta* je to nahoře první nebo druhá stolička ( $M^1$  nebo  $M^2$ ), dole druhá nebo třetí stolička ( $M_2$  nebo  $M_3$ ) (Piveteau et al., 1978).

*Creodonta* se zástupci rodů *Oxyclaenus* nebo *Tricentes* z doby paleocénu, byli primitivní predátoři malého vzrůstu s dlouhou a mělkou lebkou. Ke zpracování masité potravy u nich ještě nebyl vyvinut trhákový komplex. Tělo bylo dlouhé a štíhlé, podobné dnešní cibetce nebo lasičce, štíhlé končetiny zakončeny ostrými drápy. Evidentně obývali lesy či nízký podrost, a pravděpodobně obratně šplhali po stromech nejen za účelem vyhledání potravy, ale i kvůli vlastní ochraně.

Jak již bylo zmíněno, během paleocénní radiace vznikly vedle skupiny *Creodonta* také šelmy (*Carnivora*). Obě skupiny se nepochybně vyvinuly z hmyzožravých předků (Roček, 2002). Šelmy jsou velmi diverzifikovanou skupinou (např. potrava je nejen živočišného původu, ale i rostlinná), takže se dnes za jeden z nejvýznamnějších diagnostických znaků považuje dentice, nikoliv jen vnější vzhled těla nebo způsob života (Roček, 2002). Z tohoto důvodu byly suchozemské šelmy (dříve zařazované některými autory pod název *Fissipedia*) a ploutvonožci (nebo také „vodní šelmy“, *Pinnipedia*) shrnuty do jediného řádu.

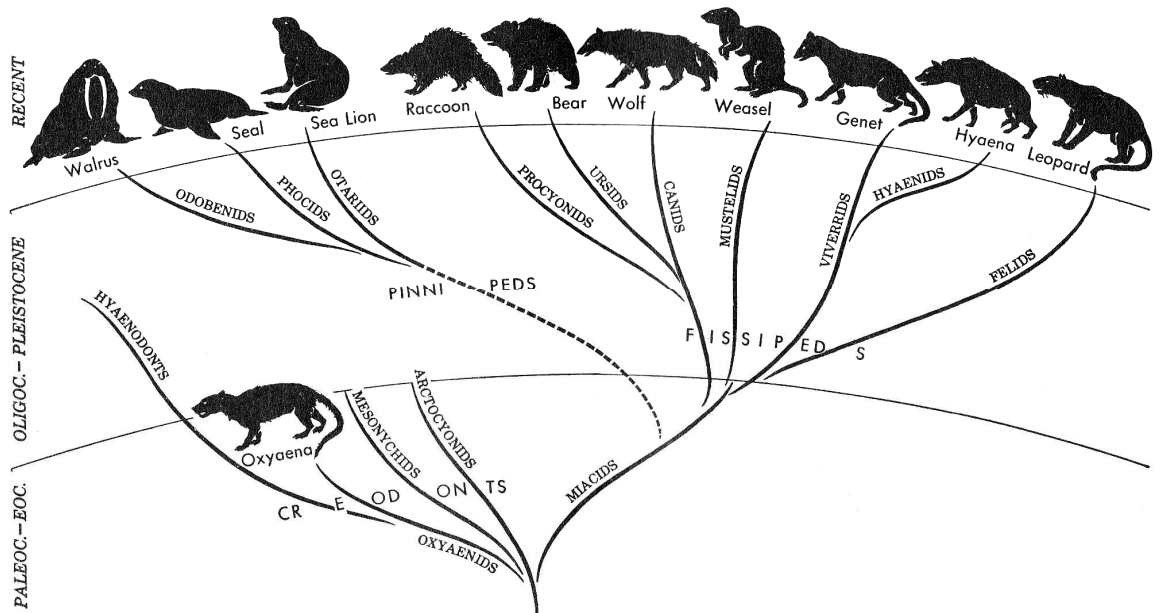


FIGURE 90. Evolution and relationships of the major groups of carnivores.

Obr.1: Evoluce a příbuzenské vztahy hlavních skupin šelem (*Carnivora*) (podle Colbert, 1961)

Charakteristickým znakem šelem je, že u nich často dochází k redukci klíční kosti a některých elementů končetin (např. redukce prvního prstu). Nejstarší šelmy jsou řazeny do



čeledi *Viverravidae*; jedná se o rod *Pappictidops* ze spodního paleocénu Číny a kompletněji zachovaný, ale mnohem pozdější rod *Viverravus*. S výjimkou čeledí *Amphicyonidae* a *Hemicyonidae* je možné všechny šelmy, které vznikly po konci eocénu, řadit k liniím, které přežily až do dnešní doby.

Za prvního společného prapředka psovitých šelem se považuje *Miacis* (Wang et al., 1999). Měl chrup typický pro psovité šelmy, velikost a stavbu těla podobnou lasici. Objevil se před 60-i miliony lety a před 20-i miliony lety vyhynul. Pro společný fylogenetický původ vlků, šakala a kojota svědčí nejen jeden předek, ale i to, že mají shodný počet chromozómů (78). Mohou se spolu pářit a dávat plodné potomstvo (Wang et al., 1999).

Z primitivních šelem čeledi *Miacidae* se vyvinula skupina nejstarších psovitých *Hesperocyonidae*. Ti existovali téměř před 40-i miliony let ke konci eocénu na území Severní Ameriky a Mexika a vyhynuli asi před 15-i miliony let ve středním miocénu. Pravděpodobně první psovitá šelma je rod *Prohesperocyon*, ke konci eocénu (zhruba před 37-i miliony let) se objevuje rod *Hesperocyon*. Za zmínku stojí druh *Hesperocyon gregarius*; z něj se v průběhu 3 milionů let vyvinulo několik nových druhů, ze dvou pak vznikly nové podčeledi: *Borophaginae* a *Caninae*. Dalšími druhy jsou např. *Sunkahetanka gerigensis*, *Osbornodon fricki*, *Ectopocynus antiquus* (Wang & Tedford, 2008).

*Borophaginae* se objevují před 32 miliony let ve středním oligocénu a vymizeli v pliocénu zhruba před 2 miliony let. Vyskytovali se rovněž pouze na americkém kontinentě. Nejstarším zástupcem podčeledi je rod *Archeocyon*, jež vážil méně než 2kg. Rod *Tomarctus* byl kdysi považován za předchůdce žijících šelem rodu *Canis*, ale oba tyto rody jsou si vývojově velmi vzdálené. Rod *Epicyon* byl v kohoutku vysoký okolo 90cm a vážil 30-75kg. Dalšími druhy jsou např. *Otarocyon cooki*, *Cynarctoides lemur*, *Borophagus diversidens* (Wang et al., 1999).

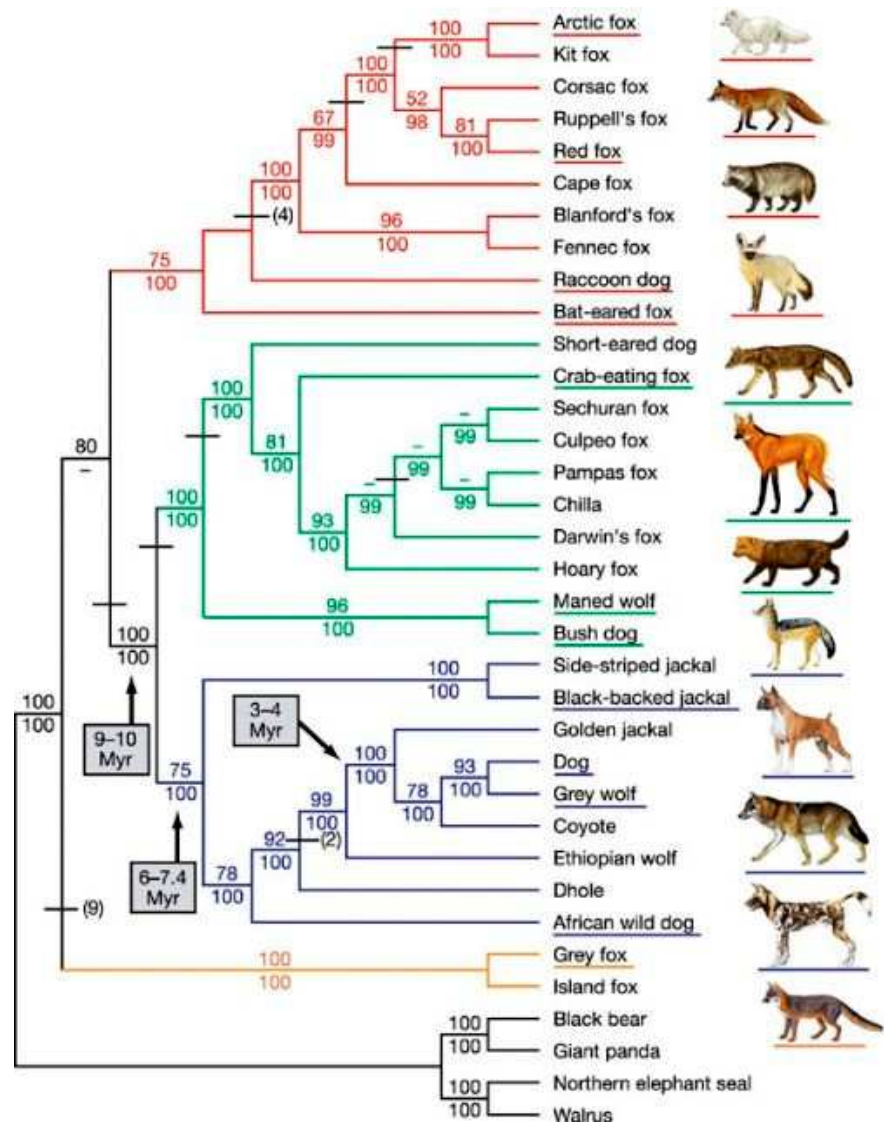
Jediná podčeleď s recentními zástupci, *Caninae*, je z doby spodního oligocénu před 30-i miliony let z území Severní Ameriky. Na konci miocénu před 6-i miliony let došlo ke spojení Asie a Severní Ameriky Beringovým mostem a to umožnilo migraci do Asie a do Evropy. Vytvoření Panamské šíje před 3-i miliony let pak umožnilo proniknutí některých zástupců podčeledi do Jižní Ameriky. Mezi první zástupce řadíme rod *Leptocyon*, jež se vyskytoval spolu s hesperocyonními a borophaginními druhy před 23-i miliony let. U tohoto rodu je zatím známo asi 11 druhů. Rod *Canis* se pak objevuje v pozdním miocénu.



Obr. 2: Velikostní srovnání některých zástupců podčeledí *Hesperocyoninae*, *Borophaginae* a *Caninae* ([www.thearcticwolfblog.wordpress.org](http://www.thearcticwolfblog.wordpress.org))

### 1.3 Fylogeneze

Na základě analýz DNA jsou šelmy řazeny do skupiny Laurasiatheria, jedné ze čtyř základních linií placentálních savců. Název naznačuje, že tato skupina pochází z Laurasie. V rámci řádu šelem patří psovitě šelmy mezi psotvárné (*Caniformia*) spolu s medvědovitými, ploutvonožci, lasicovitými a medvídkovitými. Psovitě šelmy zahrnují 35 známých druhů, které divergovaly během posledních 10-i miliónů let. Fylogenetická analýza, založená na sekvencích vybraných variabilních oblastí jaderné DNA u 30 zástupců psovitých šelem odhalila čtyři základní linie (obr. 3) (Lindblad-Toh et al., 2005). Bazální pozici na fylogenetickém stromu psovitých šelem má americký rod *Urocyon* (liška ostrovní a liška šedá), což představuje argument pro původ celé čeledi v Severní Americe asi před 10-i miliony let (Wayne et al., 1997). Dále lze rozlišit linii zahrnující lišku obecnou, jihoamerickou linii a linii zahrnující vlka obecného (Lindblad-Toh et al., 2005). V rámci vlčí linie rozlišujeme dvě skupiny, v první řadě se jedná o skupinu zahrnující šakala pruhovaného a čabakového, a další skupinu zahrnující vlka obecného a příbuzné druhy. Bazální pozice afrických šakalů naznačuje, že vlčí linie pochází z Afriky (Lindblad-Toh et al., 2005). Nejblíže příbuzným taxonem vlka je kojot prériový, dále šakal obecný a vlček etiopský (tyto tři druhy se mohou křížit s vlkem ve volné přírodě a dávat plodné potomstvo). Následuje dhoul a pes hyenovitý, druhy s denticí speciálně upravenou na řezání masa. Tato adaptace byla přítomna u společného předka skupiny a později u některých taxonů ztracena.



Obr. 3: Fylogenetické vztahy v rámci čeledi *Canidae* vypočítané na základě 15 kb jaderných exonů a intronů (Lindblad-Toh et al., 2005). Čtyři základní linie jsou vyznačeny různými barvami.

## 2. Vlk obecný (*Canis lupus*)

**2.1 Vlk obecný** – *Canis lupus* (Linnaeus, 1758) je podle seznamu IUCN řazen do kategorie „málo dotčený“ (IUCN, International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources = Mezinárodní svaz pro ochranu přírody a přírodních zdrojů).

Geografické rozšíření vlka obecného v minulosti zahrnovalo celou Evropu a většinu Asie kromě tropického jihovýchodu. V Severní Americe byl rozšířen také po celém území od Aljašky až po Mexiko. Původně obýval i mnohé ostrovy, například Velkou Británií nebo Japonsko. Osídlil různé typy prostředí včetně suché Arabské pouště, xerofytních mediteránních porostů, jehličnaté lesy a bažiny Sibíře i mrazivou tundru ostrova Ellesmere (Mech, 1970). Nyní je jeho výskyt značně omezen, jeho početní stavy radikálně poklesly a na mnoha místech byl zcela vyhuben. Přesto je na seznamu IUCN veden jako málo dotčený. S tím, že vlk zmizel z velké části svého původního areálu, bylo nenávratně ztraceno i mnoho jeho poddruhů. Dnes rozeznáváme poddruhy eurasijské a americké.

Mezi eurasijské poddruhy patří:

- Vlk polární – *Canis lupus albus* (Kerr, 1792)
- Vlk arabský – *C. l. arabs* (Pocock, 1934)
- Vlk stepní – *C. l. campestris* (Dwigubski, 1804)
- Vlk mongolský – *C. l. chanco* (Gray, 1863)
- Vlk eurasijský – *C. l. lupus* (Linnaeus, 1758)
- Vlk indický – *C. l. pallipes* (Sykes, 1831)
- Vlk iberský – *C. l. signatus* (Cabrerera, 1907)

Mezi americké poddruhy patří:

- Vlk arktický – *C. l. arctos* (Pocock, 1935)
- Vlk mexický – *C. l. baileyi* (Nelson & Goldman, 1929)
- Vlk kolumbijský – *C. l. columbianus* (Goldman, 1941)
- Vlk vancouverský – *C. l. crassodon* (Hall, 1932)
- Vlk Hudsonův – *C. l. hudsonicus* (Goldman, 1941)
- Vlk labradorský – *C. l. labradorius* (Goldman, 1937)
- *Canis lupus ligoni* (Goldman, 1937)
- Vlk lesní – *C. l. lycaon* (Schreber, 1775)
- *Canis lupus mackenzii* (Anderson, 1943)
- *Canis lupus manningi* (Anderson, 1943)

- Vlk preriiový – *C. l. nubilus* (Say, 1823)
- Vlk kanadský – *C. l. occidentalis* (Richardson, 1829)
- Vlk grónský – *C. l. orion* (Pocock, 1935)
- Vlk černý – *C. l. pambasileus* (Elliot, 1905)
- Vlk polární – *C. l. tundrarum* (Miller, 1912) ([www.biolib.cz](http://www.biolib.cz))

Nejisté je zařazení vlka egyptského (*C. l. lupaster*) ze severní Afriky, je otázkou, zda se jedná o poddruh vlka obecného, šakala obecného nebo o křížence.

Mezi eurasijské poddruhy patří i *Canis lupus italicus* (Altobello, 1921), původně považovaný za *Canis lupus lupus*. Jeho areál rozšíření zahrnuje severní část Apeninského poloostrova, početnost populace je zhruba několik stovek kusů (Pilot et al., 2010).

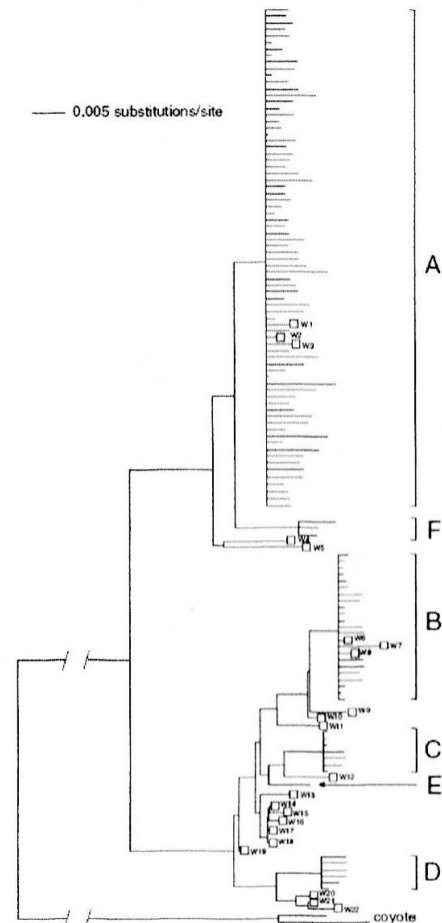
## 2.2 Pes domácí – *Canis lupus f. familiaris* (Linnaeus, 1758)

Z celé skupiny *Canidae* je pes jediným zástupcem, jež byl domestikován, ačkoli např. liška či mýval byli chováni jako kožešinová zvířata. Donedávna se diskutovalo o tom, kdo byl evolučním předkem psa domácího. S ohledem na velkou fenotypovou diverzitu by to mohl být jeden či více divokých druhů, mohl by to být vlk či šakal, nebo nějaké dosud neznámé vyhynulé druhy. I sám Charles Darwin se domníval, že psi pochází z několika druhů.

Dnes, vezmeme-li v úvahu studie chování, vokalizace, morfologie a zvláště molekulární biologie, se jasně ukazuje, že v podstatě jediným předkem psa je vlk (*Canis lupus*) a pes je tedy jedním z poddruhů vlka obecného. Vlk obecný se od psa liší o 0,04% sekvence (Lindbladh-Toh et al., 2005). Od vlka se pes liší i morfologicky – má kratší a širší čenich, více dopředu postavené oči, méně robustní zuby, menší a plošší bubínkovou výduť na lebce (Wang & Tedford, 2008).

První analýzy mtDNA ukázaly, že předkové psích plemen se od vlka oddělili asi před 135-ti tisíci lety (Vilà et al., 1997), jiné výzkumy tuto událost datují do doby před 76-ti až 121 tisíci lety (Okumura et al., 2006). Zřejmě se tak stalo ve východní Asii, kde byla zjištěna vysoká variabilita genů u studovaných plemen psů, což by ukazovalo na centrum domestikace (Savolainen et al., 2002), jiná analýza polymorfismu mtDNA provedená v roce 2009 tuto teorii nepotvrdila, a výsledky tohoto výzkumu ukázaly podobnou genetickou diverzitu i u psů žijících v okolí afrických vesnic nebo v Portoriku (Boyko et al., 2009). Další studie, která analyzovala již celý mitochondriální genom a ne jen vybrané úseky, znovu prokázala největší diverzitu v Asii a označila jako centrum domestikace psa jihovýchodní Asii na jih od řeky

Jang-c'-ťiang, přičemž počet předků je odhadován na nejméně 51 vlčic, které žily před 5,4 až 16,3 tisíci lety (Pang et al., 2009). Teorii o jihoasijském původu psa potvrzují i analýzy chromozomu Y, u kterého byla popsána největší diverzita právě u psů v jihovýchodní Asii. Podle těchto výzkumů pochází pes ze 13-i až 24 vlků-zakladatelů (Ding et al., 2011).

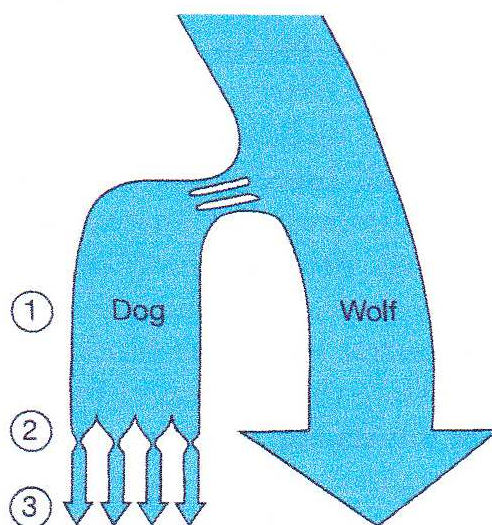


Obr. 4: Fylogenetický strom, znázorňující vztahy mezi populacemi psa a vlka, vypočítaný na základě částečné sekvence kontrolní oblasti mtDNA. Koncové větve znázorňují haplotypy, více jedinců může mít jeden haplotyp. Haplotypy vlků jsou označeny a uvedena informace o geografickém původu: W1 – Mongolsko, W2 – Mongolsko, W3 – Čína, W4 – Saudská Arábie, W5 – Mongolsko, W6 – Rumunsko, W7, Afghánistán, W8 – býv. Jugoslávie, W9 – Čína, W10 – Čína, W11 – Španělsko, W12 – Saudská Arábie, W13, W14, W15, W16 – Čína, W17 – Čína a Mongolsko, W18 – Čína, W19 – Mongolsko, W20 – Rumunsko, W21 – Itálie, W22 – býv. Jugoslávie (Savolainen et al., 2002).

Kosterní nálezy jsou s výsledky studií DNA poněkud v rozporu – nejstarší nalezená kostra přisuzovaná psovi je stará 33 tisíc let a pochází z ruského pohoří Altaj, lebka psa z jeskyně Goyet je stará 31,7 tisíc let (Germonpré et al., 2008), lebky psovitých šelem nalezené v Předmostí u Přerova s mamutí kostí v tlamě jsou z mladého paleolitu, asi 28 až 22 tisíc let staré (Germonpré et al., 2011), v Chauvetově jeskyni byly nalezeny stopy dítěte doprovázeného velkým psem/vlkem. Protože tyto kostry postrádají některé znaky charakteristické pro moderního domácího psa, v některých případech není jasné, jedná-li se skutečně o psa, nebo jen o ochočeného vlka. Výjimku tvoří lebka z jeskyně Goyet, která se od vlčích lebek liší tvarem a délkou čenichu a skutečně se podobá spíše psovi (Germonpré et al., 2008). Nesoulad mezi archeologickými nálezy a analýzou mtDNA současných psů se pokouší vysvětlit studie publikovaná v roce 2008, která zkoumala mtDNA u 11-i neolitických psů nalezených v Evropě. Analýza popsala haplotyp, který se u současných psů vůbec nevyskytuje, a velké zastoupení jiného haplotypu, který je u současných evropských psů přítomen jen u 5-i % populace. To by mohlo ukazovat na domestikaci psa i v Evropě s tím, že původní populace byla postupem času z větší části nahrazena psy původem právě z jihovýchodní Asie (Deguilloux et al., 2008).

S jistotou je existence psa domácího potvrzena v nálezech starých 12-14 tisíc let v Německu, v Turecku a v Izraeli (Morey, 2010; Davis & Valla, 1978). Nejstarší nalezené kostry psů v Číně jsou z období 5,8-10,5 tisíc let, v Severní Americe je nejstarší dobře zdokumentovaný náleze domácího psa 9 tisíc let starý.

Bohatým zdrojem informací o minulosti psa je projekt, jehož cílem bylo sekvenovat celý genom psa (přesně 2.385,199.138 párů bází DNA) a výsledky byly publikovány v roce 2005 (Lindblad-Toh et al., 2005). Byla použita DNA boxerky Tasha, která byla vybrána ze skupiny 120-i psů na základě nejnížší úrovně heterozygotnosti v testovaných lokusech. Práce umožnila přesnější rekonstrukci demografické minulosti psa, na které se výrazně podepsalo zmenšení populace (efekt hrdla láhve – bottleneck) v začátcích domestikace (před 7-i až 50-i tisíci generacemi) a pak série různě silných paralelních bottlenecků při vzniku jednotlivých plemen (před 50-i až 100 generacemi).



Obr. 5: Schéma vzniku psa z vlka. Šířka šípky naznačuje velikost populace, vyznačeny jsou bottlenecky na počátku domestikace a při vzniku plemen (Lindblad-Toh et al., 2005).

Genom psa tvoří 20.439 genů, to je ale jen 5% celé DNA. Genom psa je o 18% menší než genom člověka a o 6% menší než genom myši. Jen asi 0,2% DNA tvoří tzv. konzervativní část, která je společná pro všechny živočišné druhy.



### 3. Hybridizace

Obecně je hybridizace neboli křížení vzájemné oplozování organismů s různými genotypy. Hybrid neboli kříženec je potomek zástupců dvou různých větví fylogenetického stromu (ať se jedná o dva různé rody, druhy nebo poddruhy) pohlavních rostlin nebo živočichů.

V genetické terminologii existují definice:

**Hybrid** je obecně potomek dvou geneticky odlišných jedinců, pravděpodobně s velkou mírou heterozygotnosti;

**Genetický hybrid** je jedinec, který nese dvě různé alely stejného genu;

**Strukturní hybrid** je výsledek slučování gamet s odlišnou strukturou alespoň jednoho chromozomu;

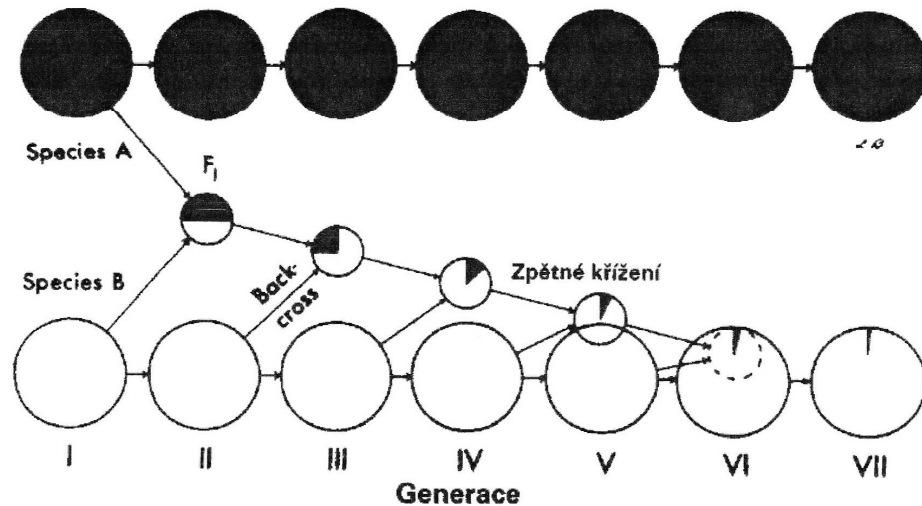
**Numerický hybrid** je výsledek slučování gamet, které mají odlišné haploidní číslo chromozomů;

**Permanentní hybrid** je člen populace, ve které existují pouze heterozygotní typy genotypu, protože všechny homozygotní kombinace ústí v neplodnost.

V zootechnické terminologii je rozlišuje **čistokrevný jedinec**, který vzniká pářením dvou jedinců stejného plemene a s prokazatelným původem několik generací zpět, a **kříženec**. Kříženec je buď **mezidruhový kříženec** (bastard), který vzniká pářením jedinců různých druhů, například psa a vlka, neboť všichni psovití rodu *Canis* se spolu mohou pářit a potomstvo takto vzniklé je dále plodné. Páření různých zoologických druhů, které jsou si fylogeneticky vzdálenější, je zpravidla neplodné, například mezek a mula. Dále se rozlišuje **meziplenný kříženec**, který vzniká pářením dvou jedinců různých plemen nebo i dvou různých meziplenných kříženců (v kynologii se vžil název „oříšků“).

Kříženci se vyznačují mozaikou přechodných znaků typických pro jednoho nebo druhého rodiče, velmi často se ale vyznačují množstvím znaků nových.

**Introgrese** je postupné vnesení genů jednoho druhu do druhého druhu sérií spontánních a následných zpětných křížení (obr. 6) ([www.old.botany.upol.cz](http://www.old.botany.upol.cz)).



Obr. 6: Graf znázorňující introgresi mezi dvěma druhy. Zpětné křížení F1 hybridů s druhem B vede v konečném důsledku k přijetí některých genů druhu A druhem B (www.old.botany.upol.cz).

Ke křížení taxonů dochází v přirozených podmínkách v oblastech překrytí jejich areálu výskytu, v tzv. hybridních zónách. Zejména u velmi početných druhů, jako je většina bezobratlých i někteří obratlovci. Případů může být celá řada, tak například allopatrické druhy ploštice *Sigara dorsalis* (Leach, 1817) a *Sigara striata* (Linnaeus, 1758) (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) vytváří na jihovýchodě Anglie přirozené hybridní zóny (Savage, 1989); taktéž cikády *Zyginidia pullula* (Boheman, 1845) a *Zyginidia ribauti* (Dworakowska, 1970) (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha) v severní Apeninách (Itálie) (Mazzoglio et al., 2009). Zajímavý je například i na našem území se vyskytující skokan zelený - *Rana kl. esculenta* (Linné, 1758). Skupina zelených skokanů je u nás zastoupena dvěma druhy: skokanem krátkonohým – *Rana lessonae* (Camerano, 1882) a skokanem skřehotavým – *Rana ridibunda* (Pallas, 1771) a jedním kleptonem, skokanem zeleným - *Rana kl. esculenta*. *Rana esculenta synklepton* je komplex tvořený druhy *Rana lessonae*, *Rana ridibunda* a kleptonem „*esculenta*“. Klepton je taxonomická kategorie používaná pro označení živočišných populací hybridogenních hybridů a gynogenetických forem. Skokan zelený není druh, jak ukázaly výzkumy, ale klepton, neboť vznikl křížením druhů *Rana lessonae* a *Rana ridibunda* a jeho populace se udržují modifikovanými hybridogenetickými mechanismy. Jeho existence je tedy závislá na existenci „rodičovských druhů“. *Rana esculenta synklepton* je příkladem neúplného

hybridogenního systému, tvořeného dvěma druhy a jedním kleptonem, kde mezi jednotlivými formami dochází ke složité výměně genomů a v omezené míře i k rekombinacím. U skokana zeleného rozeznáváme tři formy.

1. Skokan zelený mající  $3n$  (tři chromozomální sady), z toho jednu sadu od skokana krátkonohého „L“ a dvě sady od skokana skřehotavého „RR“. Tedy celkově má tento typ sady tři („LRR“). Protože převažují sady skokana skřehotavého, podobá se tato žába spíše jemu, a to jak velikostí, tak zbarvením.
2. Skokan zelený mající  $3n$ , z toho dvě sady od skokana krátkonohého „LL“ a jednu sadu od skokana skřehotavého „R“, výsledné  $3n = „LLR“$ . Protože zde převažují sady skokana krátkonohého, podobá se skokan zelený tohoto typu spíše skokanu krátkonohému.
3. Skokan zelený mající  $2n$ , jednu sadu od skokana krátkonohého a jednu od skokana skřehotavého, je ve znacích „uprostřed“ mezi oběma „rodičovskými“ druhy.

Jak je patrné, nemá skokan zelený „vlastní“ genetickou sadu – nemá tedy osobitou genetickou informaci. Je proto po genetické stránce plně závislý na skokanu skřehotavém a krátkonohém. (Zwach, 1990)

Ke křížení však velmi často dochází mezi druhy žijícími divoce a druhy původně chovanými v zajetí, které se do volné přírody dostaly ať už úmyslně nebo zcela náhodně. V obou případech rostou obavy, že vzájemné křížení těchto jedinců může u přirozených populací vést ke značným výkyvům početnosti a ke snížení biodiverzity. Je tedy potřeba v rámci populací hybridní jedince určit a vyhodnotit tak další rizika, jako je snížení genetické diverzity nebo inbrední deprese (Randí, 2008).

Příkladem mohou být orebice rodu *Alectoris*, které zahrnují sedm blízkých příbuzných druhů, jež jsou rozšířeny v Eurasii, v Číně a v jižní Arábii (Johnsgard, 1988). Mohou se navzájem křížit v parapatrických zónách na jihu Francouzských Alp, v Thrákii (Řecko) a ve střední Číně (Barilani et al., 2007a). Orebice rudá (*Alectoris rufa* (Linnaeus, 1758)) a orebice horská (*Alectoris graeca* (Meisner, 1804)) bývají obvykle předmětem lovu v areálu jejich výskytu, tj. na Pyrenejském poloostrově, ve Francii a v Itálii. Většina zdejších původních populací prošla v 2. polovině minulého století početnými výkyvy opět díky antropogenním změnám prostředí a nadměrnému lovu. Populační výkyvy byly v kontrastu s masivním vypouštěním orebic chovaných v zajetí, často spolu s orebicí čukar (*Alectoris chukar* (Gray,

1830)) nebo kříženců s orebicí čukar. Zde opět může docházet k mezidruhovému křížení a narůstat tak riziko introgresní hybridizace, což může přinést další pokles fitness přirozených populací (Randi, 2008).

Randi (2008) popisuje, že vzorky DNA orebic byly získávány v devíti různých oblastech napříč areálem rozšíření všech tří druhů. Na základě morfologických znaků a geografického původu byl určen druh, popř. kříženec. Výsledky genetických analýz u 671 orebic rudých (z pohoří Pyreneje, z Francie a Itálie), orebic horských (z Francie a Itálie), orebic čukar a kříženců genotypovaných na základě kontrolního úseku mtDNA (Randi a Lucchini, 1998) a osmi jaderných mikrosatelitů, odhalily poměrně intenzivní výskyt hybridizace (Barilani et al., 2007a.). Třicetdevět vzorků orebice rudé a horské (= 6,2 %) vykazovalo mtDNA haplotypy neodpovídající jejich fenotypu., což indikovalo introgresi mtDNA orebice čukar do mitochondriálního genomu těchto dvou populací. I další analýza jaderných mikrosatelitních lokusů popsala dalších 32 jedinců (= 5,1 %), kříženců orebice horské a orebice čukar ve Francii a v Itálii (Randi, 2008). Studium kontrolního úseku mtDNA a analýzou mikrosatelitních lokusů bylo v populaci 319-i orebic horských v Řecku identifikováno 28 (= 8,8 %) potencionálních kříženců (Barilani et al., 2007a). Vzhledem k malému počtu studovaných markerů, bylo možné popsat jen 1. a 2. generaci kříženců (F1 a F2), ale maximálně 90% jedinců vzniklých zpětným křížením (backcrosses) 1.generace (Randi, 2008).

Dalším příkladem je kočka divoká evropská (*Felis silvestris silvestris* (Schreber, 1775)), kočka divoká plavá (*Felis silvestris libyca* (Forster, 1780)) a kočka domácí (*Felis silvestris f. catus* (Ragni a Ragni, 1986)), což jsou tři rozdílné poddruhy kočky divoké (*Felis silvestris* (Schreber, 1777)) (Wozencraft 1993). Ta je v současnosti rozšířena v roztroušených populacích zasahujících od Ruska po Portugalsko, a od Skotska po Blízký Východ (Nowell & Jackson, 1996). Během 18. a 19. století docházelo u populací kočky divoké ke značným výkyvům, na mnoha místech byla vyhubena a díky odlesňování, chytání do pastí i lovu je její rozšíření ve většině střední a západní Evropy pouze ostrůvkovité (Randi, 2008). Během domestikace se příliš nezměnila velikost ani tvar těla u kočky domácí (kromě zjevných barevných mutací, jež jsou dnes chovateli koček selektovány), což činí identifikaci "čistých" exemplářů kočky divoké víceméně obtížnou (Randi, 2008).

Randi (2008) uvádí, že vzorky DNA byly získány a studovány z tkání odebraných z nalezených mrtvých či živě odchycených koček divokých, a u nichž byl druh určen jen na základě barevných znaků srsti. Vzorky DNA koček domácích, které pocházely od různých plemen a zahrnovaly volně žijící zvířata, byly sbírány náhodně v areálu rozšíření kočky

divoké v Itálii. Randi et al. (2001) popsal genetickou variabilitu u 336-i různých koček pocházejících z devíti evropských zemí na základě studia 12-i mikrosatelitních lokusů. Všechny tři druhy (resp.poddruhy) byly od sebe geneticky vzdálené. Další výzkumy popisují u koček divokých výskyt kříženců například v Itálii, v Bulharsku, v Belgii nebo v Portugalsku (Oliveira et al., 2007). Velmi časté křížení koček divokých a koček domácích bylo zaznamenáno v Maďarsku (Pierpaoli et al., 2003), početná skladba různých fenotypů a genotypů byla zdokumentovaná i ve Skotsku, kde zřejmě probíhala dlouhotrvající introgresní hybridizace (Beaumont et al., 2001). V jiné studii byly analyzovány vzorky DNA u 182 koček divokých evropských a koček domácích z různých evropských států na základě variability 27-i mikrosatelitních lokusů. Porovnáním jednotlivých haplotypů bylo popsáno 8% kříženců v italské populaci a 25-31% kříženců v maďarské populaci (Randi, 2008).

## 4. Metodika populačně-genetických studií

### 4.1 Variabilita populací

Genetická variabilita populace je dána počtem polymorfních genů a počtem alel každého polymorfního genu (Ernst, 2008). Protože např. pes domácí jako druh má 39 párů chromozomů, můžeme dostat teoreticky  $2^{39}$  možných kombinací vazbových skupin genů (tj. genů, které jsou na jednom chromozomu), což je zhruba 550 miliard kombinací. Ve skutečnosti je genetická variabilita ještě větší, protože do uvedené hodnoty není započítaný podíl mutací, ani výměny genetického materiálu mezi dvěma párovými chromozomy pomocí crossing-overu, který nastává v průběhu meiotického dělení (Dostál, 2007).

Polymorfismus genu pak umožňuje, že se v populaci vyskytují jedinci heterozygotní nebo homozygotní. Vztah mezi alelami může být různý; je-li alela nadřazená nad jinou alelou, jde o dominanci, v opačném případě se jedná o recesivitu. Je-li vliv obou alel rovnocenný, jde o vztah kodominance (Ernst, 2008).

Jedinci mohou nést pouze dvě různé alely daného genu. Skupina jedinců může být nosičem velkého počtu různých alel, které jsou zdrojem genetické diverzity (polymorfismu, genetické variability). Další faktory, jako je např. mutace, selekce, migrace, genetický drift, mohou měnit velikost genetické variability.

Podstatou **selekce** je, že se na tvorbě nové generace podílí jen vybraná část rodičů, aby se rychleji rozšířily žádoucí alely a nevýhodné alely byly eliminovány. Děje-li se tak působením přírodních faktorů, jedná se o přírodní selekci, rozhoduje-li o výběru rodičů člověk, jedná se o selekci umělou. Přírodní selekce působí ve všech ontogenetických fázích vývoje jedince, člověk však při šlechtění zvířat selektuje hlavně dospělé jedince (Urban, 2008). Selekcce tak zvyšuje nebo snižuje frekvenci alel. Výhodné alely v populaci přetrvávají, negativní postupně vymizí (recesivní alely mizí pomalu a úplně nevymizí téměř nikdy). Zda je alela prospěšná, škodlivá nebo neutrální závisí na podmínkách prostředí, velikosti populace nebo na genetickém pozadí („genetic background“). Alela, která je prospěšná v jedné populaci, se může jevit jako neutrální nebo škodlivá v jiné populaci, a proto se její význam pro danou populaci musí hodnotit ve vztahu k podmínkám prostředí (Hedrick, 2001).

**Mutace** jsou významné, neboť jsou hlavním zdrojem genetické variability (Urban, 2008). Velká většina mutací je naprosto náhodných. Mutací původního genu dojde ke vzniku kvalitativně odlišné části genu (Dostál, 2007). Mutace může ovlivnit genetickou odlišnost mezi populacemi. Rychlost mutace může být vyšší než rychlost migrace (Slatkin, 1995).

Tok genů je výměna genů mezi populacemi, většinou stejného druhu. Výměna genů je zprostředkovávána **migrací**. Migrace dovnitř a ven (imigrace a emigrace) z populace může změnit frekvenci alel, a tak i genetickou variabilitu populace (Su et al., 2003). Oba směry jsou jedním ze způsobů, jak člověk může ovlivňovat genetickou strukturu populací zejména při šlechtění zvířat (Urban, 2008).

**Genetický drift** je evoluční proces, při němž dochází z generace na generaci k náhodným změnám ve frekvenci jednotlivých alel v populaci (Allendorf et al., 2007). V malých populacích v důsledku malého počtu jedinců dochází k náhodnému kolísání genových frekvencí u jednotlivých generací, po určité době může dojít k fixaci jedné z alel a populace je pak tvořena pouze homozygoty jednoho typu a druhá alela se v populaci přestane vyskytovat. Která z alel bude „fixována“, je opět náhodný jev (Otová et al., 2012).

#### 4.2 Studium genetické variability populací

V rámci populace se jedná o studium genetické variability na úrovni proteinů a DNA pomocí tzv. **markerů**. Genetický marker je vysoce polymorfní znak, je snadno a jednoznačně detekovatelný (Knoll et al., 2002). **Molekulární markery** jsou nejmodernějším typem markerů, které jsou založeny na detekci pomocí **elektroforézy**, při které jsou makromolekuly (proteiny, DNA, RNA) separovány v gelu v elektrickém poli na základě velikosti nebo náboje. Prvními molekulárními markery byly proteiny, obvykle to byly enzymy. Mohly to být produkty alel téhož genu, tzv. allozymy, produkty alel různých genů, tzv. izoenzymy. Nevýhodou proteinových markerů je, že odhalují jen malou část skutečné variability v DNA sekvencích mezi jedinci.

První metody pro popsání variability v DNA sekvenci (**DNA markery**) se objevily v sedmdesátých letech minulého století – jednalo se o štěpení řetězce DNA na malé části specifickými enzymy a tyto segmenty DNA se separovaly na gelu a vizualizovaly radioaktivním značením a později fluorescenčními značkami. Tato technika se nazývá **polymorfismus délky restričních fragmentů** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, zkratka **RFLP**). Ve spojení s **polymerázovou řetězovou reakcí** (*Polymerase Chain Reaction*, zkratka **PCR**), která dokáže namnožit na miliony kopií specifický úsek DNA, došlo k revoluci v celé molekulární genetice. Vznikla tak široce používaná metodika PCR-RFLP pro odhalování bodových mutací v DNA (Kohoutová et al., 2012).

Tandemové repetitivní sekvence (*Short Tandem Repeats*, zkratka **STR**), také nazývané **mikrosatelity**, jsou třídou genetických markerů sestávajících se z tandemově opakovaných sekvencí o velikosti dvou až sedmi párů bází. Alely STR lokusu se mění podle počtu

opakování daného sekvenčního motivu. Jsou nejpoužívanějšími typy markerů v populačně-genetických studiích. **Multiplexová PCR** se používá k namnožení více STR lokusů najednou, detekce těchto lokusů je založena na kapilární nebo akrylamidové elektroforéze. Další metodou je určování **jednonukleotidových polymorfismů** (*Single Nucleotide Polymorphism*, zkratka **SNP**), které mají sice méně alel než mikrosatelity, ale jsou rovnoměrně rozmístěny po celém genomu (Urban, 2008). Mohou ležet uvnitř kódujících genů, ale častěji v nekódujících intronech nebo intergenových oblastech. Četnost jejich výskytu může kolísat mezi druhy a často závisí na množství dat o genomu a variabilitě daného druhu (Knoll et al., 2002).

Získané údaje o četnosti variant různých genů v populacích je zapotřebí vyjádřit určitým kvantitativním ukazatelem, který umožní srovnávat mezi sebou různé populace. K tomu se používá celá řada způsobů, z nichž nejčastěji jsou dvě míry genetické variability v populacích: polymorfismus a heterozygotnost.

**Polymorfismus** udává podíl polymorfních lokusů v populaci. Pro některé účely je polymorfismus dostačující mírou genetické variability v populacích, ale má určité nedostatky. Jeden vyplývá z toho, že četnost alel se pohybuje v širokém rozmezí, od vysokých hodnot až po velmi vzácné alely s nízkou četností. Polymorfismus tedy není přesnou mírou genetické variability také z toho důvodu, že hodnotí lokusy s velmi malou četností alel, kromě jedné alely, jako rovnocenné s těmi polymorfními lokusy, u kterých četnost několika alel má podobné hodnoty (Relichová, 2009).

Měřítkem vnitropopulační genetické diverzity je **heterozygotnost**, která do určité míry vypovídá o stavu inbreedingu populace. Heterozygotnost lze definovat pro jednotlivé lokusy, pro dané jedince nebo i pro celou populaci (Košťuková, 2009). Při odhadu heterozygotnosti populace se nejdříve stanoví četnost heterozygotních jedinců v každém lokusu a potom se vypočítá průměr pro všechny lokusy (Relichová, 2009). Odhad heterozygotnosti  $i$ -tého lokusu lze napsat jako  $h_i = n_{hi}/n$ , kde  $n$  je počet náhodně vybraných jedinců z dané populace a  $n_{hi}$  je počet jedinců z celkového počtu  $n$ , kteří jsou heterozygotní na  $i$ -tém lokusu (Košťuková, 2009). Čím je její hodnota vyšší, tím je populace životaschopnější, neboť disponuje větším počtem alel, tedy vyšší variabilitou možných genotypů (Ernst, 2008). Při vyjadřování míry genetické variability v populacích se dává přednost použití heterozygotnosti, která je spolehlivějším měřítkem. Její spolehlivost vyplývá z toho, že je mírou pravděpodobnosti, že dvě alely daného lokusu náhodně vybrané z genofondu populace se projeví jako rozdílné. To však platí pouze pro populace s náhodným oplozením. Také v populacích s určitým podílem příbuzenského křížení bude podíl homozygotů větší než v populaci s náhodným oplozením, při stejných četnostech alel v obou populacích (Relichová, 2009).



**Inbreeding** (příbuzenské křížení) je určitý druh nenáhodného oplození, při kterém dochází k oplození mezi příbuznými jedinci častěji, než by se dalo očekávat na základě náhodnosti. Inbreeding zvyšuje homozygotnost v populaci, protože příbuzní jedinci jsou po genetické stránce mezi sebou podobnější než jedinci nepříbuzní. Na rozdíl od výběrového oplození ovlivňuje inbreeding všechny geny. Důsledkem inbreedingu může být snížení vitality (inbrední deprese), snížení plodnosti a adaptability. Velikost inbreedingu se dá měřit srovnáním aktuálního podílu heterozygotních genotypů v populaci s podílem heterozygotů, kteří se vyskytovali v populaci při náhodném oplození. Toto kvantitativní vyjádření se nazývá **koeficient inbreedingu**, lze ho napsat jako  $F = (H_0 - H) / H_0$ , kde H je aktuální četnost heterozygotů,  $H_0$  četnost heterozygotů, kteří se v populaci vyskytovali při náhodném oplození (Relichová, 2009).

**Efektivní počet alel** (alelická diverzita) vyjadřuje, kolik alel v populaci je rovnoměrně zastoupených. Je tím větší, čím rovnoměrněji jsou alely zastoupeny. Lze napsat jako  $n_e = 1/\sum a_i^2$ , kde  $a_i$  je četnost alely (akela.mendelu.cz).

Zjišťování **genetické vzdálenosti** usnadňuje a zjednodušuje vzájemné srovnání populací. Genetická vzdálenost je tedy číselné vyjádření rozdílu mezi genofondy populací. Genetická vzdálenost mezi jedinci analyzovanými pomocí kodominantních markerů se určuje např. pomocí párové genetické vzdálenosti podle Nei (Nei et al., 1983) vycházející z frekvence sdílených alel. K popisu rozdělení genetické variability v rámci populací a mezi populacemi a oblastmi se jako vhodná jeví např. analýza molekulární variance (AMOVA) a F-statistika (Excoffier et al., 1992). Tyto metody říkají, jak moc jsou jednotlivé populace izolované, jestli nejsou v nějaké populaci některé alely fixované nebo naopak jsou všechny alely všude.

**Dendrogram**, vývojový (fylogenetický) strom znázorňuje vývojové vztahy taxonů formou větvičího se stromu. U dendrogramu obvyklého typu znázorňuje osa y absolutní nebo relativní čas, jednotlivé větve představují samostatné vývojové linie, společný kmen představuje linii společného předka (Svobodová et al., 2005).

## 5. Křížení psa a vlka

Vlci a psi se mohou spolu křížit a produkovat životaschopné a plodné potomky, protože mají shodné karyotypy. Tento proces se může skládat ze dvou fází. První fáze je křížení vlka se psem a vznik první filiální generace hybridů (F1). Ti se spolu mohou dále křížit a vznikne druhá filiální generace (F2). Ve druhé fázi se hybridy kříží s vlky nebo se psy a dojde tak ke zpětnému křížení. Dochází tak v populacích vlků nebo psů k introgresi (Randi, 2011).

Ke křížení nejčastěji dochází na místech, kde je velmi nízká populační hustota vlků a velké množství volně žijících psů (Andersone et al., 2002; Verardi et al., 2006). Obvykle jsou to okrajové části areálů výskytu vlka, velmi často to bývají oblasti nedávné kolonizace (Godinho et al., 2011; Verardi et al., 2006). To je případ i italské vlčí populace. Na konci 19. století zde přežíval pouze zlomek původní populace, ale od 70. let minulého století došlo hlavně díky zákonné ochraně a reintrodukcii divoce žijících kopytníků, tedy přirozené kořisti vlka, k poměrně výraznému růstu početnosti populace. V poslední době se odhaduje, že italská populace vlků čítá více než 600 jedinců (Boitani, 2003). Navzdory tomu je mnohonásobně převyšuje množství volně pobíhajících psů, jejich počet se odhaduje na více než milion jedinců (Genovesi & Dupré, 2000).

Hybridizace je hrozbou hlavně pro malé a fragmentované populace vlků. Introgresí by mohlo dojít k výrazným změnám v jejich genofondu, například k redukci nebo ke ztrátě specifických adaptací, a to pak mohlo vést až k jejich extinkci (Hindrikson et al., 2012). Ale výsledky mnoha studií ukazují, že genofondy vlků a psů zůstávají odlišné (Godinho et al., 2011; Hindrikson, et al., 2012; Khosravi et al., 2013).

### 5.1 Morfologické znaky křížení psa a vlka

Mnoho autorů předpokládalo, že různé morfologické znaky, jako je netypické zbarvení, paspárky, tělesné rozměry nebo změny v dentici, by mohly být věrohodnými známkami křížení vlků s volně se potulujícími psy (Boitani, 1992; Ciucci et al., 2003). Například Milenković et al. (2006) popsal některé atypické znaky, jako je neúplně vyvinutý trvalý zub P1, houbovitá kostní tkáň ve foramen infraorbitale, polokruhové linie zadní části čelní kosti u dospělců a rovněž i netypická přítomnost frontálního švu na lebce.

### 5.1.1 Zbarvení srsti

Vlci, kteří obývají různé typy habitatů, se od sebe liší hlavně zbarvením. Jsou uváděny odstíny srsti od bílé, světle hnědé, žlutohnědé, načervenalé a šedé až po černou, přičemž šedá je nejčastější barva srsti (Mech, 1970). Výskyt černé barvy srsti u vlků není nezbytně výsledkem křížení s volně se potulujícími psy, ale může být projevem kombinace vlčích alel v genech, jež determinují barvu srsti (Apollonio et al., 2004). Zbarvení u různých živočišných druhů závisí na jejich původu. U psů bylo během domestikace vyšlechtěno velké množství plemen, která mají zbarvení srsti tak pestré, že by jim to vůbec nedovolovalo přežít ve volné přírodě, protože by byli jednak velmi dobře pozorovatelní predátory a stali by se jejich snadnou kořistí, a na druhé straně by pro svoji pestrost nebyli schopni ulovit zvěř ke své potravě, protože by je pro jejich nápadnost snadno spatřila.

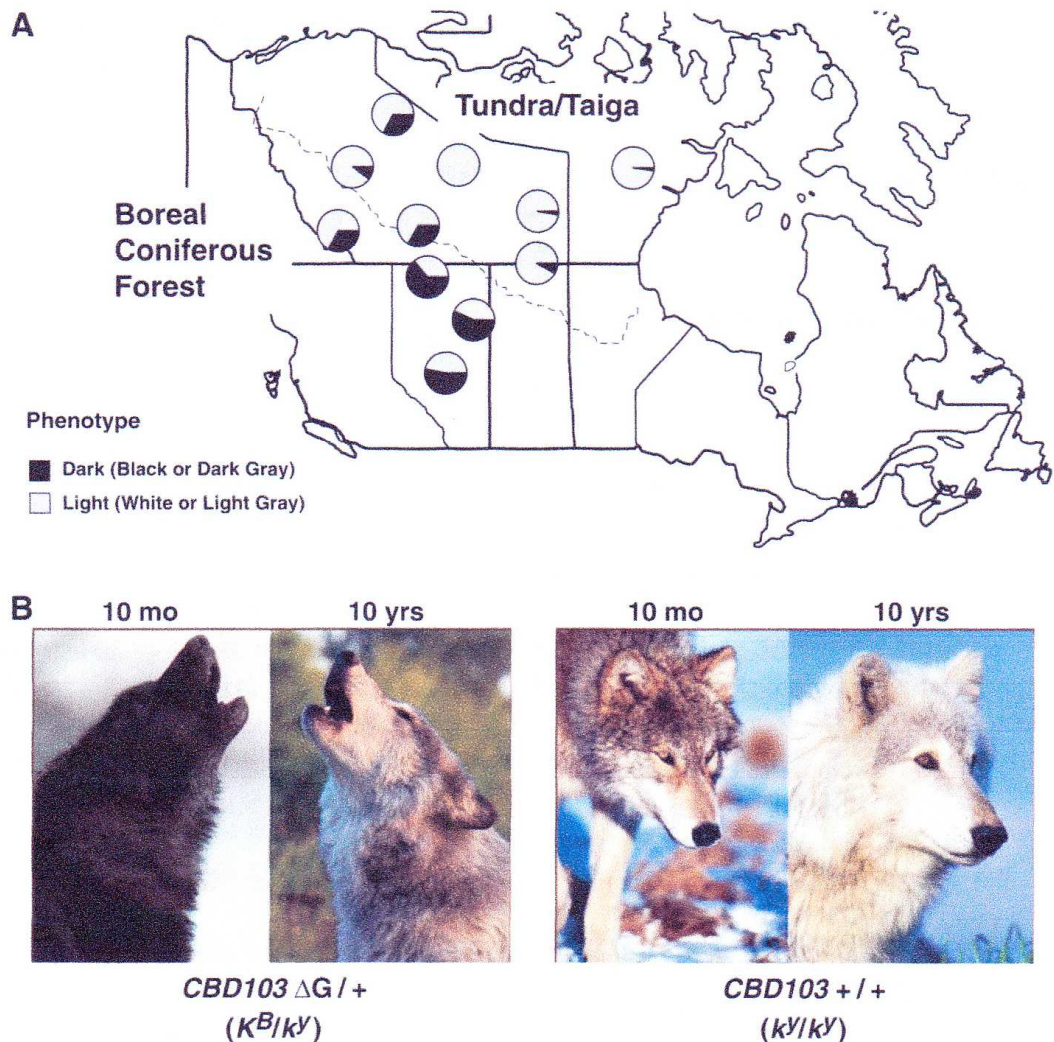
Zbarvení u psů kontroluje 13 genů ze 13-i lokusů, ty jsou označovány písmeny A, B, C, D, E, G, I, K, L, M, P, S a T (Sponenberg a Rothschild, 2001; Anderson et al., 2009). Některé z těchto genů mají jen dvě kvalitativně odlišné formy – alely, které jsou vůči sobě dominantní a recesivní. Jiné geny jsou vícealelické, a ty pak tvoří celé alelické série se vzájemnou dominancí a recesivitou mezi sebou. Vzájemné interakce mezi těmito geny dávají výsledné zbarvení. Základem zbarvení srsti je pigment melanin, který vzniká v cytoplazmě melanocytů. Důležitým článkem syntézy je tyrozin, který přechází enzymatickou oxidací na bezbarvý chromogen 3,4 – dioxyfenylalanin, jehož produkce je řízena recesivní alelou c. Takový jedinec je albín, to znamená, že má bílou srst, nepigmentovanou kůži, červené oči a sliznice, a také bílé drápy. Podmínkou plné pigmentace je přítomnost dominantní alely C. Důležitý je i gen E. Alela E kontroluje produkci černého eumelaninu, kdežto alela e kontroluje syntézu feomelaninu, který je žlutý nebo červený. Během nitroděložního či postnatálního vývoje se mění i množství produkovaného pigmentu. Některá mláďata se rodí zbarvená tak, jak zůstávají po celý život, u některých se naopak během života zbarvení mění. Gen A – Agouti signalling protein, ASIP – je to gen, který má celkem 5 různých alel. Název „agouti“ dostal od jihoamerického hlodavce, který má podobné zbarvení, jako známe u psů pod názvem vlkošedé nebo divoké. Alela A<sup>s</sup> kontroluje tvorbu tmavého, černého a hnědého pigmentu; alela A<sup>y</sup> kontroluje značné omezení tvorby tmavé pigmentace; alela A kontroluje vývoj již zmíněného vlkošedého zbarvení, často nazývaného jako „divoké“ jako je známe u vlků; alela a<sup>sa</sup> kontroluje zbarvení tvořící sedlo; alela a<sup>l</sup> kontroluje dvojí zbarvení. Gen E – Melanocortin 1 receptor, MC1R – kontroluje distribuci černého nebo hnědého pigmentu v srsti. Alela E<sup>M</sup> je zodpovědná za tvorbu tmavé masky; alela E umožňuje tvorbu tmavého pigmentu eumelaninu (černá nebo hnědá barva); alela e omezuje tvorbu tmavé pigmentace a

kontroluje tvorbu feomelaninu (červená nebo žlutá barva). Alela kontroluje pouze pigmentaci srsti, pigmentace nosu, kůže, pysků, sliznic a víček není ovlivněna, a proto tyto části zůstávají tmavé. Alely genu A se mohou projevit pouze, když je jedinec současně genotypu E-, alela E dovoluje normální distribuci pigmentu v srsti podle toho, jakého je jedinec genotypu v genu A.

Gen K – Beta-defensin 103, CBD103 – je dalším podstatným genem, popsáným teprve nedávno. Alela  $K^B$  kontroluje tvorbu tmavého pigmentu eumelaninu, potlačuje expresi genu A a stojí za dominantní dědičností černé barvy; alela  $k^{br}$  způsobuje žlhnání srsti; alela  $k^y$  kontroluje expresi genu A. Alela  $K^B$  je sekvenčně stejná jako alela  $k^y$  s tím rozdílem, že se liší 3bp delecí. Stejná delece 3bp byla popsána u 102 ze 104 vlků v Yellowstonském národním parku v USA a u 9 z 9 vlků z kanadské části Arktidy. Naopak, tato delece nebyla přítomna u 120 ze 120 šedě zbarvených vlků z Yellowstonského NP a u 22 z 22 bíle zbarvených vlků z kanadské Arktidy. Byla však popsána u 6 z 10 šedě zbarvených vlků z kanadské Arktidy, ačkoliv se předpokládalo, že šedá barva srsti zde může být výsledkem absence alely K a přirozenou kombinací alely A, nebo by mohla být zapříčiněna vlivem sekundárních faktorů, jako je například věk, kdy dochází ke snížení pigmentace chlupů, které obsahují pouze eumelanin. Byl zjišťován evoluční vývoj genu K sekvenováním osmi nekódujících segmentů úseku 150kb u 32 arktických vlků, 15-i vlků z Yellowstonského NP a také u 12-i psů genotypu  $k^y k^y$  (plemena akita inu, basenji, boxer, bulldog, dobrman, great dane) a 6-i psů genotypu  $K^B K^B$  (plemena curly coated retriever, dalmatin, great dane, labrador retriever, pudl, portugalský vodní pes). U všech testovaných zvířat bylo popsáno 52 bialelických polymorfismů, z toho 36 u vlků, a určena haplotypová struktura. Hodnota polymorfismu u všech vlčích amplikonů byla 1 SNP na 510 bp.

Protože přítomnost genu K podmiňuje i melanismus u kojotů, což bylo zjištěno analýzou 6-i černě a 61 šedě zbarvených jedinců (Anderson et al., 2009), daly se předpokládat 3 možné evoluční trendy: a/ delece 3 bp by mohla být relativně stará a vznikla u některého předka psovitých šelem před více než milionem let, tedy než došlo k odštěpení kojotů od vlků, b/ delece 3 bp se mohla objevit později u jednoho druhů a následovala pak její introgrese do dalších druhů, c/ delece 3 bp může představovat mutační hotspot, jež se opakovaně a nezávisle vyskytl u kojotů, vlků a psů. Další analýzou bylo zjištěno, že delece 3 bp (alela  $K^B$ ) se pravděpodobně objevila u jednoho druhu a později se rozšířila mezidruhovým křížením mezi vlky, psy i kojoty (Anderson et al., 2009). Pes byl domestikován před 15 – 40-i tisíci lety ve východní Asii, stáří alely  $K^B$  je nejméně 46 886 let. Nelze jistě říct, zda se frekvence této alely zvyšovala před nebo po domestikaci. Pokud by se vyskytovala u vlků

Starého světa ještě před domestikací, tak se pravděpodobně z genofondu „ztratila“ a znovu „se objevila“ v Severní Americe, a to zřejmě díky původním severoamerickým psům, jež doprovázeli člověka před 12 –14-i tisíci lety při přechodu přes Beringovu úžinu.



Obr. 7: Geografická lokalizace a fenotypový projev barvy srsti u vlků z kanadské Arktidy (A); změny zbarvení srsti způsobené věkem a odlišnými genotypy (každý pár obrázků ukazuje stejné zvíře ve věku 10 měsíců a 10 let) (Anderson et al., 2009).

Jsou i další studie zabývající se výskytem černého zbarvení u vlka obecného. Khosravi et al. (2014) popisuje analýzu dvou černě zbarvených vlků z Iránu. Byly získávány vzorky tkání 30-i vlků; šlo převážně o autem sražené nebo nelegálně zastřelené jedince. Dva z nich byli černého zbarvení – první, označen jako W13, byla dospělá samice zastřelená v červenci 2010; druhý, označen W16, byl juvenilní samec zastřelený v září 2010. Dále bylo analyzováno 28 vzorků psů, získaných od chovatelů, z přejetých nebo volně pobíhajících

zvířat. Další vzorky byly 4 vlčí kříženci pocházející z chovů ze západního Iránu, označeny jako H38 – H41. Pro porovnání craniometrických znaků bylo použito celkem 16 lebek vlků (zde u dvou černých jedinců proběhlo měření 18-i lebečních a 2 mandibulárních rozměrů a porovnání se 14-i lebkami, které pocházely z muzejních a soukromých sbírek). Dalším krokem byla extrakce DNA, analýza 15-i mikrosatelitních lokusů za použití PCR, sekvenování mtDNA (amplifikace kontrolního úseku 544bp) a zpracování dat.

Celkem bylo u psů, vlků a kříženců popsáno 187 alel; všechny mikrosatelitní úseky byly polymorfní (měly 5 až 17 alel na lokus, v průměru 9 alel na lokus. Mezi populacemi vlka a psa se lišil počet privátních alel; 34 vlčích a 14 psích. Bylo popsáno 25 haplotypů, z toho 12 u psů, 10 u vlků a 3 sdílené mezi vlky a psy, byl sestaven fylogenetický strom (obr.7). Dva zkoumaní černí jedinci (W13 a W16) měli na základě výsledků sekvenování mtDNA pozici na vlčím haplotypu.

Lebka dospívajícího samce (W16) se jevila na první pohled jako lebka psa, ale většina rozměrů odpovídala rozměrům lebky vlčí; lebka samice (W13) se od lebky vlka nelišila ani vizuálně ani na základě rozměrů.

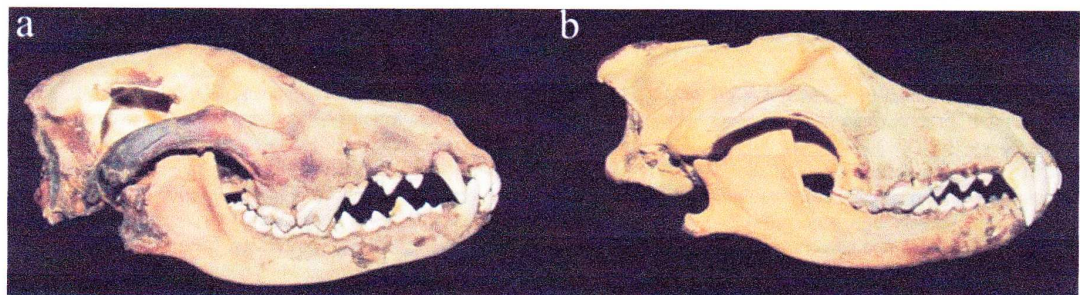


Fig. 3 Lateral view of the skull of two black wolves. Subadult male (W16; a) and adult female (W13; b)

Obr. 8: Boční pohled na lebky dvou černě zbarvených vlků z Iránu popsáných ve studii Khosravi et al. (2014).

### 5.1.2. Paspárky

Paspárky, pozůstatky prvního prstu zadní končetiny, jsou běžné u některých plemen psů (briard, pyrenejský horský pes), ale ne u vlků. Nikdy nebyly zaznamenány u žádného jedince vlka ani v Severní Americe ani v Eurasii. Pouze Teruelo a Valverde (1992) uvádí jeden případ ze Španělska z oblasti, kde je zvýšený výskyt vlků, potulujících se psů typu mastiff a zřejmě i jejich kříženců. U vlků, ale i u kojotů jsou paspárky považovány za znak

křížení se psy, ale doposud chyběla molekulární data, jež by tuto domněnku podpořily. Až později, Andersone et al. (2002) dokumentuje paspárky ve vrhu sedmi mlád'at kříženců z oblasti severního Lotyšska. Analýzou 16-i mikrosatelitních markerů, stanovením individuálních genotypů se ukázalo, že většina alel je běžných u psů, ale mtDNA haplotyp spíše odpovídal haplotypu typického pro populaci vlků v Lotyšsku.

Byla tedy nasnadě hypotéza, že paspárky u vlků jsou znakem získaným křížením se psy, než že by se jednalo o expresi fenotypové variability vlků.

Ciucci et al. (2003) zkoumal v letech 1993 – 2001 šest vlků z oblasti Toskánska (střední Itálie). Čtyři z nich byli nelegálně nebo náhodně zabiti, dva byli odchyceni živí jako součást radiotelemetrické studie. Tři z nich měli na obou zadních končetinách paspárky, šlo o první a jediné vlky s tímto znakem ze 206-i vzorků studovaných v letech 1986 – 2001 a 19-i živě odchycených jedinců od roku 1970 (Ciucci a Boitani, 1998). Oblast původu zkoumaných vlků je známá extenzivním chovem ovcí a v důsledku toho i velkým množstvím ovčáckých psů typu maremma, u nichž jsou paspárky většinou typickým znakem. Tři vlci byli označeni jako W520, W535 a W587. W535 byl 32kilogramů vážící 6-i měsíční samec chycený a označený radiotelemetrickým obojkem v listopadu 1993 v oblasti Provincie Siena, kde se pohybovala radiotelemtricky sledovaná smečka vlků. W520 byl 28 kilogramů vážící 9-i měsíční samec otrávený v únoru 1999 pocházející ze stejné oblasti, W587 byla v listopadu 2001 nelegálně zastřelená samice z Provincie Grosseto. Vzdálenost mezi těmito třemi oblastmi byla asi 20 až 60 kilometrů.

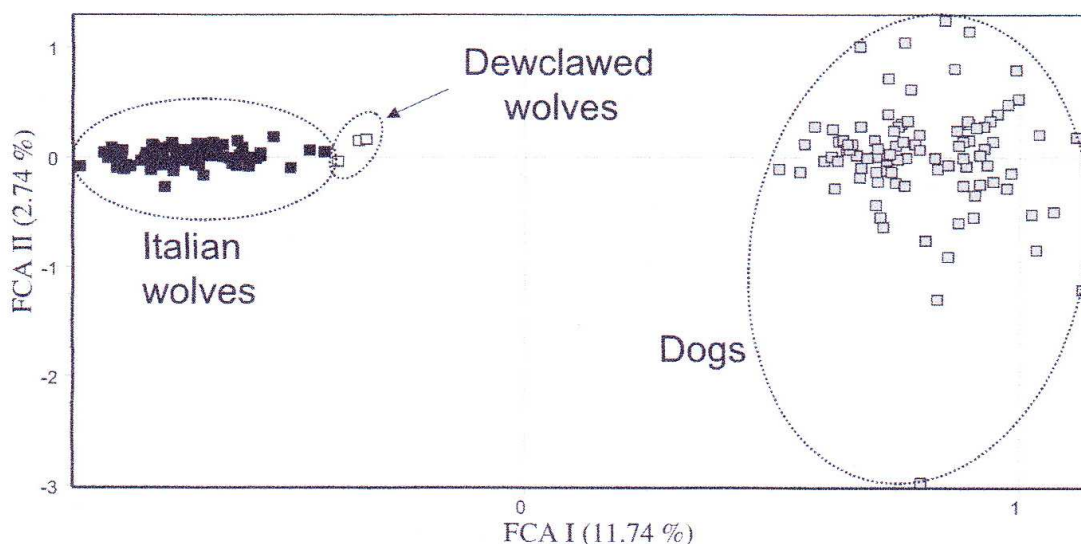
Nejdříve byl posouzen fenotyp a všichni tři jedinci odpovídali průměru standardní fenotypové variability italských vlků, kromě W520, u něhož byla lebka menší a prognátní. W587 byla pro studium lebečních rozměrů nepoužitelná. U všech vlků byl odebrán vzorek tkáně pro genetickou analýzu, extrakci DNA a genotypování mikrosatelitů postupem podle Randi a Lucchini (2002). Jako srovnávací populace byly rovněž použity vzorky 100 italských vlků a 95-i psů chovaných v domácnostech nebo volně se potulujících. Jednotlivé genotypy vlků s paspárky byly určeny podle 18-i lokusů na 16-i různých chromozomech. Psi a vlci vykazují odlišné multilokusové mikrosatelitní genotypy a domnělí kříženci mohli být identifikováni podle stejných postupů jaké popsali Randi a Lucchini, 2002; a Vilà et al., 2003. Pomocí dvou analýz (FCA – Factorial Correspondence Analysis; a Bayesian admixture analysis) byly genotypy zkoumaných vlků přiřazeny buď k populaci italských vlků, popř. k populaci psů. Dále byl stanoven podíl psích předků až do 2. generace a vypočítán jejich koeficient příbuznosti. U sameců W535 a W520 byl stanoven podíl vlčích předků na základě 4 mikrosatelitních markerů na Y chromozomech (viz.Sundqvist et al., 2001).

FCA analýza rozdělila populaci psů a italských vlků do dvou jasně oddělených clusterů, přičemž tři zkoumaní vlci měli krajní pozici vlčího clusteru (obr. 9).

Bayes.admix. analýzou byly rovněž populace psů a vlků jasně odděleny, tři zkoumaní vlci byli přiřazeni k vlčí populaci. Samci W535 a W520 sdíleli unikátní Y haplotyp, jež je typický pro populaci italských vlků, ale nevyskytuje se u psů. Všichni tři vlci sdíleli unikátní mtDNA haplotyp italské vlčí populace (viz. Randi et al., 2000). Alely mikrosatelitních lokusů byly u jedince W520 rovněž typické pro populaci italských vlků, ale alely W535 a W587 byly na některých úsecích sdílené s populací psů. Jedinec W587 vykazoval vysoký podíl psích předků ve 2. generaci ( $q=0,99$ ), jedinci W520 a W535 měli tento podíl nižší. Koeficient příbuznosti ( $r$ ) pro W535 a W520 dosahoval hodnoty 0,31, mohlo se jednat o příbuzné jedince 1. stupně. Heterozygotnost ( $H$ ) je u italské vlčí populace průměrně 0,44; u tří zkoumaných vlků byla v rozmezí 0,32 – 0,52, přičemž u W535 byla spíše podprůměrná, tj. 0,32.

Z obecného pohledu by se dalo říct, že mnohoprstost (polydaktylie) se u vlků objevuje na úrovni lokálních inbredních populací. Ale u tří zkoumaných italských vlků se v dané populaci nejednalo o vysoký stupeň inbreedingu. Výjimečná existence vlků s paspárky a jejich exkluzivní výskyt v oblasti s vysokou abundancí psů s tímto morfologickým znakem naznačuje, že tento znak je typický pro křížence a zpětné křížence vlků a těchto psů. Tři analyzovaní vlci vykazovali smíšený původ, šlo pravděpodobně o zpětné křížence. Mohlo se jednat o druhou (W587) nebo pozdější (W520, W535) generaci zpětných kříženců; některé alely byly sdílené se psy, docházelo pak k jejich „naředění“ s každou další generací potomků od počáteční hybridizace. Fenotypově se analyzovaní vlci od standardních jedinců nelišili, ovšem nebylo možné vzhledem k okolnostem zjistit, zda se paspárky nacházely například u rodičů nebo sourozenců. V Toskánsku tedy pravděpodobně proběhly v minulosti dvě křížení vlků se psy, což odráží i stav zdejších podmínek prostředí, tj. všudypřítomní velcí pastevečtí psi, nízká abundance vlků a sociální rozkol ve smečkách, nebo poměrně členitá krajina (Ciucci et al., 2003).





Obr. 9: Výsledky genotypování populace italských vlků, psů a dvou vlků s paspárky popsanych ve studii Ciucci et al. (2003).

## 5.2 Další výskyt vlčích kříženců

Adams a Waits (2007) zveřejnily výsledky studie, jejímž cílem bylo porovnat efektivitu dvou metod používaných pro analýzu genotypů získaných z trusu sledovaných zvířat a zároveň tak objasnit, zda ve sledované populaci dochází k hybridizaci, jež pochopitelně z hlediska ochrany diverzity není žádoucí. Jednalo se o reintrodukovanou populaci vlka rudohnědého (*Canis rufus*) v Severní Karolíně (USA). Ten byl reintrodukovan v roce 1987 a areál jeho rozšíření se postupem času zvětšil až na 6 tisíc km<sup>2</sup>. Takto rozsáhlé území se obtížněji monitoruje, přičemž největším nebezpečím se zde jeví přítomnost kojotů prérijních (*Canis latrans*), a to právě kvůli riziku hybridizace. V této studii ale nebyl našťastí popsán žádný kříženec vlka rudohnědého s kojotem prérijním.

Křížení probíhá i mezi dalšími psovitými šelmami rodu *Canis*. Jsou důkazy o křížení šakalů obecných (*Canis aureus*) s vlkem obecným (Freedman et al., 2014) a se psem domácím (Galov et al., 2015). K hybridizaci dochází i mezi psy a vysoce ohroženou populací vlčka etiopského (*Canis simensis*) (Gottelli et al., 1994).

Vilà et al. (2003) popsal výskyt hybridizace mezi psy a vlky u dvou jedinců z oblasti Østfold v jižním Norsku. S využitím uniparentálních a biparentálních genetických markerů určil původ vlčího samce, který vykazoval nezvyklé morfologické znaky. V mtDNA tohoto jedince byl objeven haplotyp H1 (Ellegren et al., 1996), který se vyskytuje i u skandinávských vlků, ale u psů chybí. Analýza mikrosatelitní DNA na Y chromozomu popsala alelu, která se

u skandinávských vlků nenachází, ale je přítomna u psů a u vlků z jiných severských oblastí. Otcem tedy mohl být pes, nebo vlk pocházející z jiné, než skandinávské oblasti. Jako další genetické markery zde byly použity autosomální mikrosatelity. Z výsledků vyplynulo, že se skutečně jedná o hybrida, který je výsledkem křížení samice vlka se samcem psa.

Na Pyrenejském poloostrově bylo pomocí analýzy 42 autosomálních mikrosatelitních markerů u 212 vlků, osm jedinců (4%) označeno jako hybridních. Analýzou jejich mtDNA bylo zjištěno, že všichni mají vlčí haplotypy a jsou tedy výsledkem křížení samic vlků se psy. Tři z těchto hybridů představují F1 generaci, další tři jsou výsledkem zpětného křížení s vlkem, zbylí dva jedinci jsou buď hybridy F2 generace nebo pochází ze zpětného křížení se psy (Godinho et al., 2011).

Hybridizace byla detekovaná i v Bulharsku (Randi et al., 2000), v Rumunsku a na západě Ruska (Vilà et al., 1997).

V Gruzii, v oblasti Kavkazu, bylo mezi 102 vlky nalezeno více než 13% hybridů. Důvodem je přítomnost velkého množství volně pobíhajících pasteveckých psů a taktéž vlků, kteří mají v této oblasti kontinuální areál rozšíření (Kopaliani et al., 2014). Po roce 2000 byly v Gruzii zaznamenány útoky vlků na člověka. Pokud by nešlo o mýty nebo jen účelová tvrzení (např. za účelem povolení odstřelu), je možné, že zde roli hraje právě hybridizace. Útočníky by nemuseli být plaší vlci, ale kříženci, u nichž by přirozený strach z lidí mohl být potlačen ([www.scienceworld.cz](http://www.scienceworld.cz)).

## 6. Závěr

Vývoj populací vlka obecného je charakterizován výraznými výkyvy v početnosti během několika posledních stovek let. Dnešní expanze vlků do oblastí osídlených lidmi vede k několika hrozbám, zvláště křížení mezo vlky a volně se potulujícími psy je nyní předmětem studia mnoha výzkumných programů. Křížení mezi psem vlkem bylo prokázáno na několika lokalitách v Evropě, důkazy hybridizace byly objeveny i v jihozápadní Asii. Míra hybridizace je ovlivněna množstvím volně se potulujících psů, například pasteveckých plemen. V oblasti Kavkazu proto dochází k častější hybridizaci než v Evropě. K detekci hybridizace není dostačující řídit se jen morfologickými znaky, ale současně s nimi vyhodnotit znaky molekulární. Záleží ale na volbě použitých genetických markerů, protože pokud nejsou dostatečné, mohou být konečné výsledky o rozsahu hybridizace podceňované. Bylo rovněž zjištěno, že ve volné přírodě dochází i ke zpětnému křížení hybridů s vlky, což představuje hrozbu hlavně pro nyní se rozšiřující evropskou populaci kvůli možnému narušení genetické integrity.

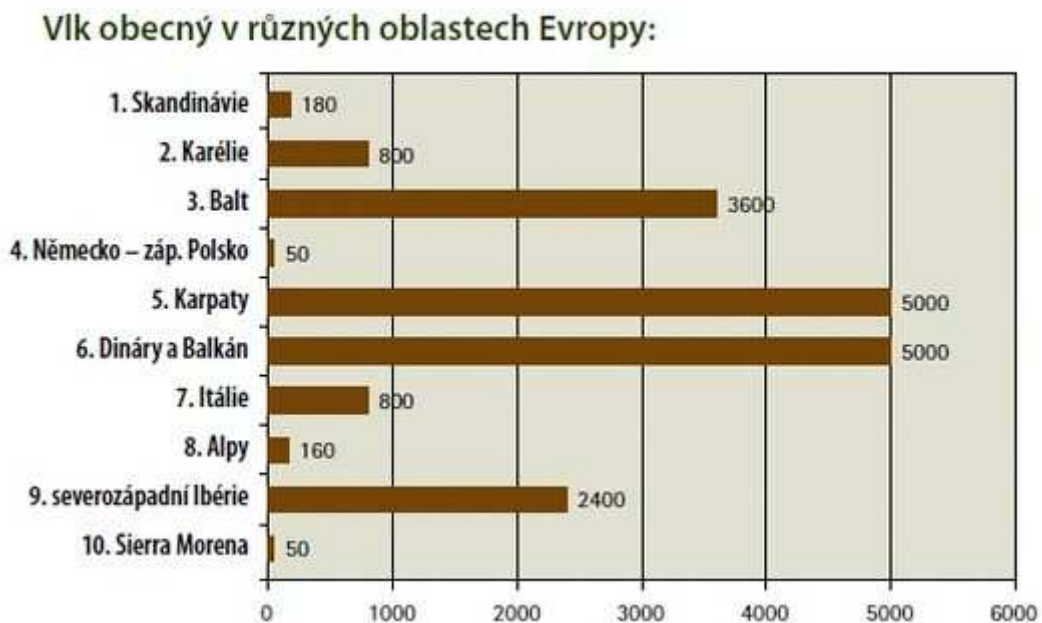
### 6.1 Stav populací vlka obecného v Evropě a v ČR

Navzdory národní i mezinárodní ochraně ve většině zemí zůstává vlk ohroženým zvířetem v téměř celém areálu výskytu, a to hlavně díky destrukci přirozeného prostředí, přímému pronásledování, náhodnému zabíjení nebo i křížení se psy. Možnost popsat morfologické, behaviorální a molekulární znaky by mohla pomoci mapovat rozšíření čistokrevných vlčích populací, nebo lokalizovat oblasti, kde je riziko introgrese a populace volně se pohybujících se psů by měly být pečlivě kontrolovány.

Vlci jsou vrcholoví predátoři, jež hrají zásadní úlohu v udržování struktury a funkce přirozených ekosystémů – přispívají k regulaci vztahů kořist-predátor, a mají pozitivní kaskádový efekt na dynamiku společenstev kopytníků a na populační hustotu menších predátorů. Jsou velmi pohybliví a mají rozlehlá teritoria, která mohou dosahovat velikosti až několik stovek kilometrů. Populace vlků expandují také přes hranice chráněných území a národních parků, a tím rostou konflikty s člověkem. Existují obavy z nadměrného zabíjení chovaného dobytka, ale dochází i k jakémusi soutěžení mezi vlkem a člověkem-lovcem.

Odhaduje se, že populace vlka v Evropě má asi 60 tisíc jedinců. Z toho 45 tisíc vlků obývá různé oblasti Ruska a Běloruska, 5,5 tisíc karpatskou oblast, 5,2 tisíc dinárskou a balkánskou oblast, 2,3 tisíce Pyrenejský poloostrov, 2 tisíce Pobaltí a severovýchodní Polsko, 500 Apeninský poloostrov a 200 Skandinávií. Díky zvýšené zákonné ochraně, kterou vlkům

poskytují mnohé evropské státy, se oblast jeho rozšíření poměrně rychle zvětšuje směrem na západ. Několik vlčích smeček například obsadilo vojenský prostor v saské Lužici, jen několik desítek kilometrů od českých hranic. Na většině evropského kontinentu se vyskytuje vlk obecný eurasijský (*Canis lupus lupus*), v Itálii však během poslední doby ledové před 18-tisíci lety vzniklo refugium evropských vlků, které se částečně odlišilo od zbytku populace (*Canis lupus italicus*) ([www.selmy.cz](http://www.selmy.cz))



Obr. 10: Početnost vlka v různých oblastech Evropy ([www.selmy.cz](http://www.selmy.cz)).

U nás byl vlk běžným zvířetem až do konce 17.století. Během 18.století byl značně pronásledován a jeho stavy poklesly, poslední vlk na našem území byl zastřelen 5.března 1914 u Bukovce, v Beskydech ([www.selmy.cz](http://www.selmy.cz))

Sporadicky se začali vlci na různých místech ČR znovu objevovat po 2.světové válce, jednalo se však o osamocená zvířata, u kterých nebylo jasné, zda se jedná o jedince migrující ze slovenských Karpat nebo uniklé ze zajetí. První věrohodné údaje o návratu vlků do ČR jsou až z roku 1994 z Beskyd. Příklad vlků do Beskyd souvisel se zvětšováním populace na Slovensku, k čemuž došlo díky jejich zákonné ochraně.

V celé Chráněné krajinné oblasti Beskydy se početní stavy vlků odhadovaly v roce 1994 na 2-3 jedince, v roce 1995 na 5 jedinců, v roce 1996 to bylo 5 dospělých a 6 mladých vlků. V letech 1997-1998 se jejich počet radikálně snížil v důsledku nelegálního lovu po obou

stranách česko-slovenské hranice. Od konce 90.let do roku 2002 je uváděn výskyt jedné až tří smeček, postupně se počet mírně zvyšoval a v roce 2009 byl považován za stabilní ([www.selmy.cz](http://www.selmy.cz)).

Opětovně byl výskyt vlka v Beskydech potvrzen až v létě roku 2013 pomocí fotopastí a častějších nálezů trusu a několika případů stržených kořistí. Pokles ve srovnání s 90.lety měl kromě pytláctví na svědomí zřejmě i legální lov vlků na Slovensku.

V březnu roku 2014 byla přítomnost vlka jasně potvrzena v nově rozšířené části Chráněné krajinné oblasti Kokořínsko-Máchův kraj díky snímkům z fotopastí. Během následujícího léta se pak pomocí těchto přístrojů podařilo zdokumentovat rozmnožování vlků v Čechách po více než 100 letech, když bylo zachyceno několik vlčat i s rodiči. Ze získaných vzorků trusu byla provedena analýza DNA, která potvrdila příbuzenské vztahy těchto vlků s populací v Německu a v Polsku.

V roce 2016 je potvrzena vlčí smečka čítající minimálně čtyři jedince na Broumovsku a velmi pravděpodobný výskyt vlka v Krušných horách. V roce 2015 byl výskyt vlka zaznamenán jak na Šumavě, tak v německém Národním parku Bavorský les. Na konci roku 2016 zavítal vlk i do Pošumaví. Vzhledem k rozšiřující se populaci v Lužici se může v dalších letech očekávat přítomnost vlků také v Krušných horách, v Krkonoších nebo v Českém Švýcarsku.

Poslední zprávy vše jen potvrzují...

23.2.2017 ([idnes.cz](http://idnes.cz)): „ Asi 15-i letý jelen, kterého v neděli našli lesníci strženého v honitbě Zelená hora spadající pod lesní závod Boubín, a kolouch nalezený ve stejné honitbě ve středu, se zřejmě stali kořistí vlků.

Na území Národního parku Šumava se podle fotopastí pohybují dvě tyto šelmy. Není vyloučené, že při lovu jelena jinak samotářsky se pohybující jedinci spolupracovali. To, že by na Šumavě vznikala vlčí smečka, ale zatím podle odborníků není příliš pravděpodobné.

Jak informoval mluvčí NP – v budoucnosti by vlci na Šumavě mohli pomáhat v korigování stavů jelení zvěře, které se v parku daří. Kvůli škodám, které zvěř působí v lesích, je ale nutné její stavy snižovat. V bezzásahových územích mají skvělé podmínky k životu i dostatek úkrytů. I z toho důvodu každoročně navyšujeme plán lovu. Na Šumavě zatím chybí přirozený predátor, který by jejich stavy mohl regulovat. Vlčí smečka by se nám hodila.“

24.3.2017 ([ekolist.cz](http://ekolist.cz)): „ Vlk, kterého počátkem března zabilo auto na dálnici D1 na Jihlavsku, pocházel z Karpat. Prokázaly to genetické analýzy z jeho tkáně. Zvíře tak pravděpodobně urazilo z místa svého narození několik set kilometrů.

Genetické analýzy ověřily, že zvíře sražené na dálnici D1 je vlk. Srovnání s databází několika set zvířat z celé střední Evropy ukázalo, že jedinec pocházel z karpatské populace. Mitochondriální DNA nese variantu, která je nejčastější u vlků ze středního a západního Slovenska a polských Beskyd. Tato varianta se vůbec nevyskytuje u takzvané středoevropské nížinné populace, která obývá převážně západní Polsko a Německo a zahrnuje i české smečky v Podbezdězí a na Broumovsku. Příslušnost ke karpatské populaci ukazují i analýzy jaderné DNA.“

### **Seznam literatury:**

- Adams, J. R., Waits, L. P., 2007:** An efficient method for screening faecal DNA genotypes and detecting new individuals and hybrids in the red wolf (*Canis rufus*) experimental population area. *Conservation Genetics* 8: 123-131.
- Allendorf, F. W., et al., 2007:** *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, 664 s.
- Anderson, T. M., et al., 2009:** Molecular and evolutionary history of melanism in North American gray wolves. *Science* 323: 1339-1343.
- Andersone, Ž., et al., 2002:** Hybridization between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mamm.Biol.* 67: 79-90.
- Apollonio, M., Mattioli, L., Scandura, M., 2004:** Occurrence of black wolves in the Northern Apennines, Italy. *Acta Theriol* 49: 281-285.
- Barilani, M., et al., 2007a:** Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A.graeca*) and red-legged (*A.rufa*) partridge populations. *Conservation Biology*. DOI: 10.1016/j.biocon.2007.01.014
- Beaumont, M., et al., 2001:** Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology*, 10: 319-336.
- Boitani, L., 1984:** Genetic considerations on wolf conservation in Italy. *Bollettino Di Zoologia*, 51: 367-373.
- Boitani, L., 1992:** Wolf research and conservation in Italy. *Biol. Conservation* 61: 125-132.
- Boyko, A. R., et al., 2009:** Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. ([http:// pnas.org/content/early/2009/07/31/0902129106](http://pnas.org/content/early/2009/07/31/0902129106))
- Ciucci, P., Boitani, L., 1998:** Il lupo. *Elementi di biologia, gestione e ricerca*. Istituto Nazionale della Fauna Selvatica „Alessandro Ghigi“, Documenti Tecnici no. 23. (In Italian).
- Ciucci, P., et al., 2003:** Dewclaws in wolves as evidence of admixed ancestry with dogs. *Can.J.Zool.* 81: 2077-2081.
- Colbert, E. H., 1961:** *Evolution of the Vertebrates*. Science Editions Inc., New York, 479 s.
- Davis, S. J., Valla, F. R., 1978:** Evidence for domestication of the dog 12,000 years ago in the Natufian of Israel. *Nature*, No. 276, 608-610.
- Deguilloux, M. F., et al., 2008:** Ancient DNA supports lineage replacement in European dog gene pool: insight into Neolithic southeast France. *Journal of Archaeological Science*, Vol. 36, No. 2: 513-519.

- Ding, Z.-L., et al., 2011:** Origins of domestic dog in Southern East Asia in supported by analysis of Y-chromosome DNA. *Heredity*. (<http://nature.com/hdy/journal/vaop/ncurrent/full/hdy2011114a.html>)
- Dostál, J., 2007:** Genetika a šlechtění plemen psů. Dona, České Budějovice, 261 s.
- Ellegren, H., Savolainen, P., Rosén, B., 1996:** The genetical history of an isolated population of the endangered gray wolf *Canis lupus*: a study of nuclear and mitochondrial polymorphisms. *Philos.Trans.Roy.Soc.B*. 351: 1661-1702.
- Ernst, M., et al., 2008:** Využití mikrosatelitních analýz při šlechtění populace bílých jelenů u LČR, s. p. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Projekt Grantové služby LČR, 22 s.
- Excoffier, L., et al., 1992:** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Freedman, A. H., et al., 2014:** Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PloS Genetics*, 10 (1): e1004016.
- Galov, A., et al., 2015:** First evidence of hybridization between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers. *Royal Society Open Science*, 2 (12): 150450.
- Genovesi, P., Dupré, E., 2000:** Strategia nazionale di conservazione del lupo (*Canis lupus*): indagine sulla presenza e la gestione di cani vaganti in Italia. *Biologia e Conservazione della Fauna*, 104: 1-36.
- Germonpré, M., et al., 2008:** Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Journal of Archaeological Science*, Vol. 36, No. 2: 473-490.
- Germonpré, M., et al., 2011:** Palaeolithic dog skulls at the Gravettian Předmostí site, the Czech Republic. *Journal of Archaeological Science*, Vol. 39, No. 1: 184-202.
- Godinho, R., et al., 2011:** Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20 (24): 5154-5166.
- Gottelli, D., et al., 1994:** Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, 3 (4): 301-312.
- Hedrick, P. W., 2001:** Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution*, 16 (11): 629-636.



**Hindrikson, M., et al., 2012:** Bucking the trend in wolf-dog hybridization: first evidence from Europe of hybridization between female dogs and male wolves. *PloS One*, 7 (10): e46465.

<https://thearticwolfblog.wordpress.org/evolutionary-history/>

**Johnsgard, P. A., 1988:** The Quails, Partridges, and Francolins of the World. Oxford University Press, New York, 264 s.

**Khosravi, R., et al., 2014:** Is black coat color in wolves of Iran an evidence of admixed ancestry with dogs? *J.Appl.Genetics*. DOI 10.1007/s13353-014-0237-6.

**Knoll, A., et al., 2002:** Molekulární genetika zvířat: (metody detekce polymorfismů DNA genů). Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, 100 s.

**Kohoutová, M., et al., 2012:** Lékařská biologie a genetika II. Karolinum, Praha, 202 s.

**Kopaliani, N., et al., 2014:** Gene flow between wolf and shepherd dog populations in Georgia (Caucasus). *Journal of Heredity*, 105 (3): 345-353.

**Kost'uková, M., 2009:** Genetické markery ve studiu genetické diverzity v populacích hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, 57 s. (bakalářská práce)

**Lindblad-Toh, K., et al., 2005:** Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438: 803-819.

**Mazzoglio, P. J., et al., 2009:** Preliminary molecular data on the hybrid zone between *Zyginidia pullula* and *Z. ribauti* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae) in the Italian northern Apennines. Abstracts, 5<sup>th</sup> European Hemiptera Congress, Velenice, Hungary.

**Mech, D., 1970:** The Wolf. The Ecology and Behaviour of an Endangered Species. American Museum of Natural History, New York.

**Milenković, M., et al., 2006:** Cases of spontaneous interbreeding of wolf and domestic dog in the region of Southeast Banat. *Arch.Biol.Sci.* 58: 225-231.

**Morey, D., 2010:** **Dogs:** Domestication and the Development of a Social Bond (chap. The Case of Bonn-Oberkassel dog). Cambridge University Press, New York, s. 24-29.

**Nei, M., et al., 1983:** Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* (19): 153-170.

**Nowell, K., Jackson, P., 1996:** Status Survey and Conservation Action Plan. Wild Cats. IUCN/SSC Cat Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, England.

**Okumura, N., et al., 2006:** Intra- and interbreed genetic variations of mitochondrial DNA major non-coding regions in Japanese native dog breeds. *Animal Genetics*, Vol. 27, No. 6: 397-405.

- Oliveira, R., et al., 2007:** Molecular analysis of hybridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Systematics Botany* 21, 559-566.
- Otová, B., et al., 2012:** *Základy biologie a genetiky člověka*. Karolinum, Praha, 227 s.
- Pang, J.-F., et al., 2009:** mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Mol.Biol.Evol.* 26 (12):2849-2864.
- Pierpaoli, M., et al., 2003:** Genetic distinction of wild cats (*Felis silvestris*) populations in Europe, and hybridisation with domestic cats in Hungary. *Molecular Ecology*, 12: 2585-2598.
- Pilot, M., et al., 2010:** Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC EvolBiol* 10: 104 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2873414](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2873414))
- Piveteau, J., Lehman, J.-P., Dechaseaux, C., 1978:** *Précis de paléontologie des vertébrés*. Masson, Paris, 677 s.
- 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. *Conserv.Genet.* 3: 31-45.
- 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 (2): 99-111.
- Randi, E., et al., 2000:** 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., et al., 2001:** Genetic identification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*) and their hybrids using Bayesian clustering methods. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1679-1693.
- Randi, E., Lucchini, V., 1998:** Organization and evolution of the mitochondrial DNA control-region in the avian genus *Alectoris*. *Journal of Molecular Evolution*, 47: 449-462.
- Roček, Z., 2002:** *Historie obratlovců (evoluce, fylogeneze, systém)*. Academia, Praha, 512 s.
- Savage, A. A., 1989:** *Adults of the British Aquatic Hemiptera Heteroptera: A key with ecological notes*. Freshwater Biological Association, Scientific Publication No. 50, 173 s.
- Savolainen, P., et al., 2002:** Genetic evidence for an East Asian Origin of Domestic Dogs. *Science*, Vol. 298, No. 5598: 1610-1613.
- Slatkin, M., 1995:** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139 (1): 457-462.

- Sponenberg, D. P., Rothschild, M. F., 2001:** Genetics of Coat Colour and Hair Texture. In: Ruvinsky, A., Sampson, J., 2001: The Genetics of the Dog. CABI Publishing, 564 s.
- Su, H., et al., 2003:** The Great Wall of China: a physical barrier to gene flow? *Heredity*, 90: 212-219.
- Svobodová, K., et al., 2005:** Analýza variability vybraných SNPs u psů. In: Ryant, P., et al., 2005: MendelNet'05 Agro. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, s. 1-19.
- Teruelo, S., Valverde, J. A., 1992:** Los lobos de Morla. Circulo de Bibliofilia Venatoria, Madrid, Spain.
- Urban, T., 2008:** Virtuální svět genetiky 3 – principy genetiky populací a kvantitativních znaků. (online) (<http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/index.html>)
- 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*, 15 (10): 2845-2855.
- Vilà, C., et al., 2003:** Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity*, 90: 17-24.
- Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., et al., 1997:** Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, Vol. 276, No. 5319: 1687-1689.
- Wang, X., et al. 1999:** Systematics of Borophaginae. *Bulletin American Museum of Natural History*. No. 243, 391 s.
- Wang, X., Tedford, R. H., 2008:** Dogs: Their fossil relatives and evolutionary history. Columbia University Press, New York, pp. 24-67.
- Wayne, R. K., et al., 1997:** Molecular systematics of the Canidae. *Syst. Biol.* 46: 622-653.
- Wozencraft, W. C., 1993:** Felidae. In: *Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographical Reference*. Smithsonian Institution Press, pp. 290-291.
- [www.akela.mendelu.cz/~xcepl/inobio/inovace/GSLD/popul. ge. 12.pdf](http://www.akela.mendelu.cz/~xcepl/inobio/inovace/GSLD/popul. ge. 12.pdf)
- [www.biolib.cz/cz/taxontree/id1846](http://www.biolib.cz/cz/taxontree/id1846)
- [www.budejovice.idnes.cz/vlk-ulovil-na-sumave-jelena-dfz/](http://www.budejovice.idnes.cz/vlk-ulovil-na-sumave-jelena-dfz/)
- [www.ekolist.cz/cz/zpravodajstvi/zpravy/vlk-srazeny-na-dalnici-d1-prisel-az-z-karpat-ukazala-analyza-dna](http://www.ekolist.cz/cz/zpravodajstvi/zpravy/vlk-srazeny-na-dalnici-d1-prisel-az-z-karpat-ukazala-analyza-dna)
- [www.helsinki.fi/~mhaaramo/metazoa/deuterostoma/chordata/synapsida/eutheria/carnivora/carnivoramorpha.html](http://www.helsinki.fi/~mhaaramo/metazoa/deuterostoma/chordata/synapsida/eutheria/carnivora/carnivoramorpha.html)
- [www.helsinki.fi/~mhaaramo/metazoa/deuterostoma/chordata/synapsida/eutheria/carnivora/cynoidea/canini.html](http://www.helsinki.fi/~mhaaramo/metazoa/deuterostoma/chordata/synapsida/eutheria/carnivora/cynoidea/canini.html)
- [www.old.botany.upol.cz/prezentace/dolezal/PH.pdf](http://www.old.botany.upol.cz/prezentace/dolezal/PH.pdf)

[www.scienceworld.cz/biologie/vlci-a-domaci-psi-se-krizi-primo-pred-nasima-ocima/](http://www.scienceworld.cz/biologie/vlci-a-domaci-psi-se-krizi-primo-pred-nasima-ocima/)

[www.selmy.cz/vlk/rozsireni-vlka/](http://www.selmy.cz/vlk/rozsireni-vlka/)

**Zwach, I., 1990:** Naši obojživelníci a plazi ve fotografii. SZN, Praha, 144 s.