

Odhad velikosti populace a stupně hybridizace vlka obecného (*Canis lupus*) na Slovensku analýzou DNA

Barbora Černá Bolfíková¹, Lenka Veselovská², Kamila Valentová², Nikola Tkáčová², Jana Šrutová², Klára Demjanovičová³, Mária Apfelová⁴, Vladimír Antal⁴, Slavomír Findo⁴, Pavel Hulva^{2,3}

¹Katedra chovu zvířat a potravinářství v tropech, Fakulta tropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita, Praha, Česká republika

²Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika

³Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava, Česká republika

⁴Štátná ochrana prírody, Banská Bystrica, Slovensko

Závěrečná zpráva k projektu: Zisťovanie počtosti veľkých šeliem a zisťovanie stupňa hybridizácie vlka dravého na základe analýz DNA. Referenční číslo: ŠOP SR/1159/2017.

Štúdiá vznikla v rámci projektu „Realizácia programov starostlivosti o veľké šelmy na Slovensku“, ktorý je spolufinancovaný prostredníctvom Kohézneho fondu EÚ v rámci Operačného programu Kvalita životného prostredia, ITMS kód projektu: 310011L489.



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova



Fakulta tropického
zemědělství



OSTRAVSKÁ UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



MINISTERSTVO
ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY



OPERAČNÝ PROGRAM
KVALITA ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA



Európska únia
Kohézny fond



ŠTÁTNA
OCHRANA PRÍRODY
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

Abstrakt

Tato studie je zaměřena na populace vlka obecného (*Canis lupus*) obývající území Slovenska. Studie vychází z údajů ze dvou zimních sezón v letech 2017 až 2019. Pro ověření druhové příslušnosti vzorků ke studovanému druhu, určení populační struktury a zjišťování stupně hybridizace se psy byl použit panel 21 jaderných mikrosatelitových lokusů spolu s markerem pro detekci pohlaví a mitochondriální markery. Pod příslušnou statistickou kontrolou (parametr PIsib aj.) byla provedena filtrace dat a bylo vybráno 10 jaderných lokusů pro odhad velikosti populace zkoumaného druhu. Poměr pohlaví studovaného vzorku byl 1 : 1,3 ve prospěch samců. Mitochondriální markery byly použity k identifikaci jedinců do haploskupin a následně do haplotypů a populací. K popisu struktury populace byla použita bayesiánská klastrovací analýza mikrosatelitových dat. Na Slovensku byla zaznamenána přítomnost karpatské a středoevropské nížinné populace. Karpatská populace vykazuje substrukturu, jejímž základem je rozdělení na západokarpatskou a východoslovenskou subpopulaci, přičemž bariérou je východoslovenská nížina. Při vyšším počtu testovaných klastrů se odděluje i subpopulace v Levočských vrších a Čergově a případně další subpopulace, např. na Oravě. Genový tok mezi zmiňovanými populacemi je omezen vlivem kumulativního bariérové efektu, antropogenní překážky v podobě liniové infrastruktury (např. dálnice D1) jsou často vystavěny podél přirozených překážek genového toku (např. údolí mezi orografickými celky, řeka Váh).

Pro odhad cenzi velikosti populace byl použit přístup Capture-Mark-Recapture pro genetická data s využitím balíčků CAPWIRE a SECR v jazyce R. Pro oblast západních Karpat (pro karpatskou i středoevropskou nížinnou populaci) je odhad početnosti 423 [342;765] jedinců v sezóně 2017/2018 podle CAPWIRE a 341 [196;702] jedinců podle SECR. V případě vlka je ale na rozdíl od např. medvěda obtížněji splněn předpoklad uzavřenosti populace. Oproti předchozím publikovaným výsledkům můžeme sledovat nárůst přítomnosti genetických markerů středoevropské nížinné populace (např. na východním Slovensku, Oravě i jinde). To může souviset se source-sink dynamikou způsobenou odstřely v jádru karpatské populace ve srovnání s celoroční ochranou středoevropské nížinné populace. Odhad cenzi velikosti pro západokarpatskou subpopulaci zvlášť (definovanou jako příslušný klastr ve STRUCTURE) je 217 [189;336] jedinců v sezóně 2017/2018. Efektivní velikost populace pro západokarpatskou subpopulaci byla odhadnuta na 52 [41;65] jedinců. Relativně nízké hodnoty efektivní velikosti populace pravděpodobně souvisí s nárůstem populace na recentní velikost z malého počtu zakladatelských jedinců. Analýza životaschopnosti populace provedená v programu VORTEX naznačuje, že některé scénáře budoucího vývoje populace při realistickém nastavení hodnot populačních parametrů mohou zahrnovat i její zmenšování, i zde je proto aktuální téma potenciálního extinkčního dluhu.

Klastrové analýzy neprokázaly na Slovensku přítomnost raných fází hybridizace mezi psem a vlkem (kategorie F1, F2 a zpětné křížence první generace), což je v souladu s genomickými výsledky z jiných oblastí Evropy mimo Mediterán. Nicméně pro statistickou průkaznost analýzy nad rámec této studie pokračují s využitím genomických metod. Na Slovensku ale dochází ke křížení karpatské populace se středoevropskou nížinnou populací. Důsledky tohoto procesu se nedají dobře predikovat - může dojít k postupnému splývání obou populací, ale obě populace si také mohou zachovat určitou míru samostatnosti i přes přítomný genový tok. Efekty na fitness populací rovněž mohou představovat teoretickou škálu od heterozního efektu po outbreední depresi, např. díky rozrušení adaptací na příslušné habitaty (hory vs. nížina). Dá se proto doporučit další monitoring tohoto procesu.

Obsah

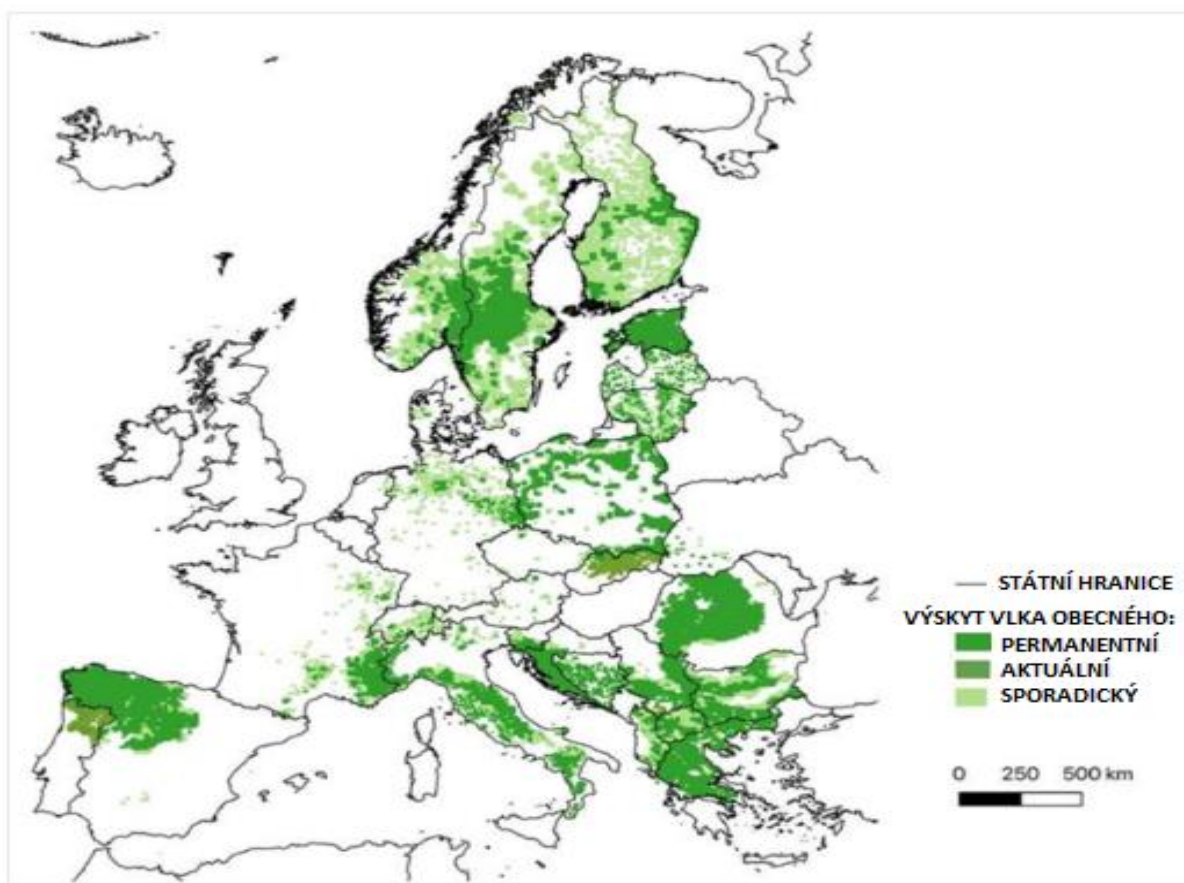
Abstrakt	2
Obsah	4
Úvod	1
Rozšíření a populační struktura vlka v Evropě	1
Rozšíření a populační struktura vlka na Slovensku	3
Demografie a odhad početnosti	4
Cenzní velikost populace	6
Efektivní velikost populace	7
Populační hustota	7
Hybridizace	8
Cíle práce	8
Metodika	10
Studované území a vzorkování	10
Extrakce DNA	10
Amplifikace genetických markerů	11
Genotypování	15
Druhové určení	16
Analýza identit	17
Populačně-genetické analýzy	17
Demografické analýzy	17
Testování uzavřenosti populace	17
Odhady početnosti na základě CMR modelů	18
Efektivní velikost populace	18
Analýza životaschopnosti populace	19
Populační hustota	19
Testování hybridizace	20
Výsledky	21
Vzorkování	21
Amplifikace genetických markerů	23
Druhové určení	29
Analýza identit	30
Populačně genetické analýzy	30
Demografické analýzy	35
Testování uzavřenosti populace	35
Odhady početnosti na základě CMR modelů	35
Efektivní velikost populace	38
Analýza životaschopnosti populace	39
Populační hustota	40
Testování hybridizace	41
Diskuse	42

Odběr vzorků a amplifikace genetických markerů	42
Druhové určení	43
Analýza identit	43
Populačně genetické analýzy	43
Demografické analýzy	44
Odhady početnosti na základě CMR modelů	44
Efektivní velikost populace	45
Analýza životaschopnosti populace	46
Populační hustota	48
Hybridizace	48
Poděkování	49
Podíl autorů	49
Reference	50

Úvod

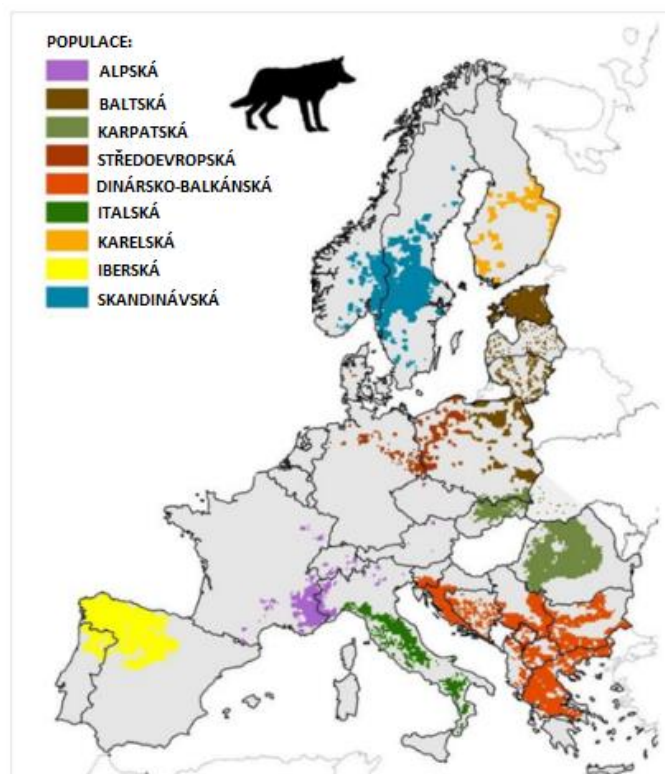
Rozšíření a populační struktura vlka v Evropě

V současné době je vlk obecný (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) prokázán ve všech kontinentálních státech Evropské unie (Chapron et al. 2014; Boitani et al. 2018; Fernández-Gil et al. 2018), jak ukazuje mapa Boitaniho et al. (2022) (Obr. 1). Vlka byl dříve na většině svého areálu vyhuben (Lopéz-Bao et al. 2018) a na rozdíl od částečně umělé reintrodukce jiných velkých šelem, jako je rys ostrovid (*Lynx lynx* Linnaeus, 1758) nebo medvěd hnědý (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) (Zedrosser et al. 2001; Samojlik et al. 2018), byl jeho návrat do evropské přírody přirozený (Cimatti et al. 2021).



Obr. 1: Mapa výskytu vlka obecného (převzato z Boitani et al. 2022, na základě dat Boitani 2018).

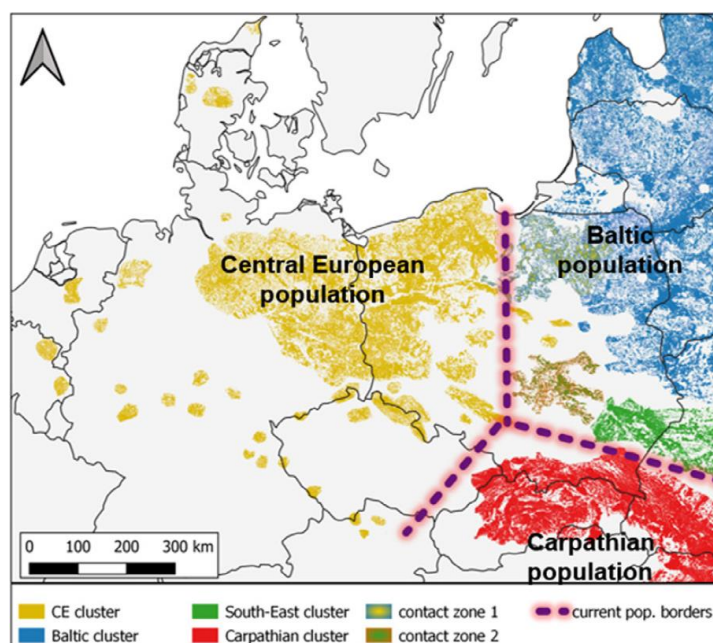
Areál vlka v Evropě je fragmentovaný, dělení do populací je do určité míry subjektivní a vyvíjí se, různí autoři rozlišují např. devět (Boitani et al. 2022) a deset (Chapron et al. 2014) izolovaných populací (Obr. 2). Jejich diferenciaci odráží různou evoluční historii, zesílenou antropogenní fragmentací.



Obr. 2: Mapa zobrazuje současné populace vlka obecného v Evropě (převzato z Boitani et al. 2022, na základě dat Boitani 2018).

Zatímco v minulosti v Evropě dominovala haploskupina II, v posledních tisíci letech ji nahradila haploskupina I (Pilot et al. 2006; Pilot et al. 2010; Ciucani et al. 2019). Na území střední Evropy se setkávají dvě haploskupiny, haploskupina I a haploskupina II (Pilot et al. 2014; Hulva et al. 2018).

Ve střední Evropě dominuje středoevropská nížinná a karpatská populace (Chapron et al. 2014), přičemž recentně se do západní části dostává i alpská populace a situace ve východní části je komplikovanější (Szewczyk et al. 2021) (Obr. 3).



Obr. 3: Současné rozšíření vybraných populací ve Střední Evropě (převzato od Szewczyk et al. 2021, podle Linnell et al. 2008; Chapron et al. 2014; Diserens et al. 2017; Boitani 2018). Středoevropská nížinná populace je znázorněna žlutě, baltská populace modře a karpatská populace červeně. Přerušovaná růžová čára označuje kontaktní linii sousedících populací.

Rozšíření a populační struktura vlka na Slovensku

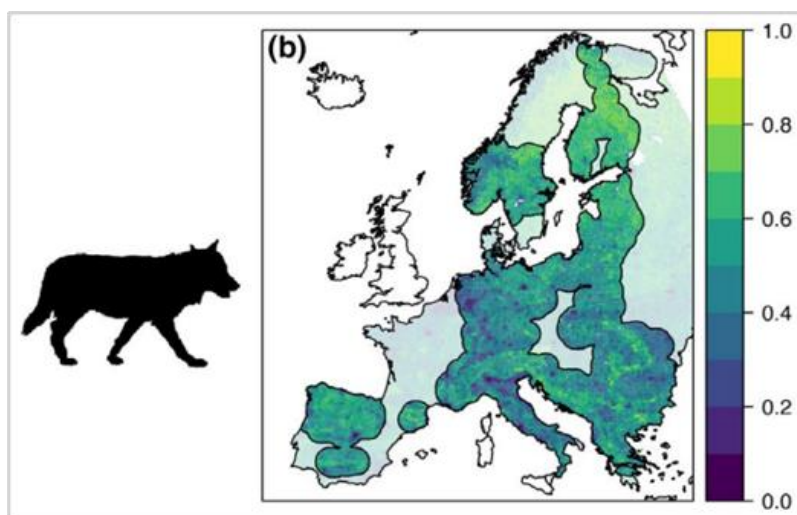
Západní Karpaty, stejně jako velká část celého karpatského pohoří, představují velmi vhodné prostředí pro populaci vlka obecného (Salvatori et al. 2002). Na Slovensku byli vlci zaznamenáni v nadmořských výškách od 518 do 1680 m n. m. (Find'o & Chovancová 2004). V posledních dvou desetiletích se odhaduje, že areál vlka na Slovensku zahrnuje 40 až 60 % území (Find'o et al. 2008). Přesné číslo je obtížné určit vzhledem k tomu, že rozšíření vlka obecného je silně ovlivněno disperzí ze sousedních států (Hell et al. 2001; Huck et al. 2010; Szewczyk et al. 2021; Fehér et al. 2022).

Genetické nástroje dnes představují důležitý nástroj monitoringu velkých šelem. Z jaderných markerů využívají zejména mikrosatelity (Randi et al. 2014), standardním lokusem mitochondriální DNA se stala kontrolní oblast (Pilot et al. 2006; Pilot et al. 2010; Czarnomska et al. 2013; Jansson et al. 2014; Randi et al. 2014; Hulva et al. 2018; Szewczyk et al. 2019; Szewczyk et al. 2021).

Na Slovensku se vyskytuje karpatská a středoevropská nížinná populace. U karpatské populace v současnosti dominuje haploskupina II. Na Slovensku se nicméně vyskytují enklávy středoevropské nížinné populace, u kterých se vyskytuje haploskupina I (Hulva et al. 2018).

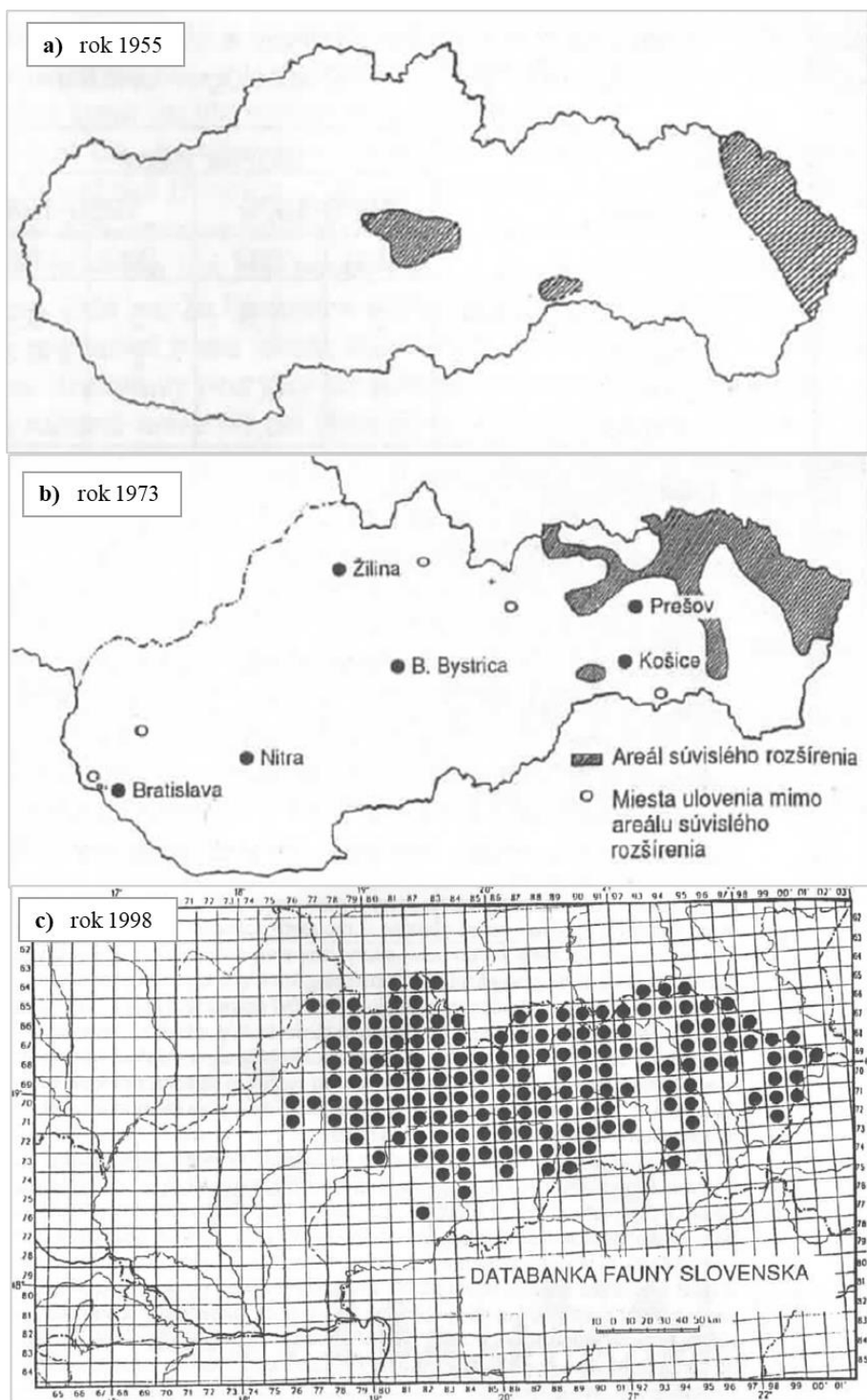
Demografie a odhad početnosti

Karpatská populace vlků je jednou z největších v Evropě a čítá více než 3000 jedinců (Boitani 2015; Pereira 2015; Hindrikson et al. 2017) nebo dokonce 5000 jedinců (Linnell & Boitani 2012). Dřívější studie odhadovaly velikost slovenské populace na 200–450 jedinců (Chapron et al. 2014; Hindrikson et al. 2017). Střední Evropa se svými přírodními podmínkami představuje vhodný biotop pro jeho rozšíření (Obr. 4).



Obr. 4: Předpokládaná vhodnost biotopu pro vlka obecného na základě údajů z roku 2015 od Cimatti et al. (2019).

Početnost vlků na Slovensku v průběhu minulého století značně kolísala v souvislosti se změnami legislativy týkající se jejich lovu. V minulosti se údaje o jejich početnosti opíraly především o lovecké statistiky (Hell et al. 2001). V této době se počet jedinců odhadoval na 100 (Turček in Hell et al. 2001), nebo na 128 jedinců (Feriancová 1955). V 60. letech 20. století byla početnost stanovena přibližně na 200 jedinců (Voskár 1976). Hell et al. (2001) uvádějí, že koncem minulého století byla početnost podle myslivecké statistiky značně nadhodnocena (1 329 jedinců v roce 1997, 1 240 jedinců v roce 1999), což mohlo být až trojnásobné nadhodnocení. V těchto letech činily roční úlovky v průměru 40–60 jedinců, ale Hell et al. (2001), uvádějí, že ani tato čísla nemusí být přesná, protože udávají pouze legální odstřel, který mohl být podstatně nižší než skutečný. Obr. 5 ukazuje trend rozšiřování vlčí populace v druhé polovině minulého století.



Obr. 5: Rozšírenie vlka obecného na Slovensku (převzato z Hell et al. 2001). Mapy představují údaje z roku 1955 (A), z roku 1973 (B) a z roku 1998 (C).

Současný areál vlka na Slovensku se odhaduje na 40–60 % celkového území (Findo et al. 2008), což činí 19 614 km² až 29 421 km². Ve stejné studii autoři stanovili domovský okrsek v Tatranském národním parku na 146 km² a v Národním parku Nízke Tatry na 191 km². Nejnižší odhad průměrné velikosti smečky odhadují Findo & Chovancová (2004) na 4,2 jedince. Na základě poměru velikosti vlčího teritoria a domovského okrsku s odhadem průměrného počtu ve smečce je spodní hranice počtu vlků na Slovensku stanovena na 411 jedinců a horní hranice na 1 149 jedinců.

Cenzní velikost populace

Hlavním neinvazivním nástrojem, který používají především ekologové a zoologové ke stanovení přibližné celkové velikosti populace a k dalším demografickým účelům, je metoda Capture-Mark-Recapture (CMR; v překladu „metoda zpětného odchyty“). V literatuře však lze nalézt i podobně pojmenované nebo blízké příbuzné přístupy, jako jsou: capture-recapture, mark and recapture, sight-resight, mark-release-recapture, multiple systems estimation, band recovery, Petersenova metoda nebo Lincolnova metoda (Krebs 2009).

Základním principem metody je odchyt části populace, její označení a vypuštění zpět do populace. Později se odchyty další skupina a zaznamená se, kolik označených jedinců bylo odchyceno. Odhady velikosti populace v nejjednodušších modelech lze určit z podílu neoznačených a označených jedinců v každém odchyty za předpokladu, že označení a neoznačení jedinci mají stejnou pravděpodobnost odchyty. V malé populaci je pravděpodobnost opakovaného odchyty označených jedinců vyšší, zatímco ve velké populaci je pravděpodobnost opakovaného odchyty označených jedinců nižší (Seber 1986). Pro výzkum velkých a pohyblivých savců jako jsou vlci je stěžejní metoda genetického CMR s využitím neinvazivních vzorků (Creel et al. 2003; Prugh et al. 2005; Meijer et al. 2008). První genetická detekce jedince v populaci představuje „capture“, a další detekce stejného jedince „recapture“. Statisticky je zhodnocení získaných dat komplikované, neboť „capture“ a „recapture“ neprobíhají jako předem definované události, ale kontinuálně. Kromě míry opakovaných záchyťů a odhadu velikosti populace lze pomocí přístupu CMR sledovat také trend a míru přežití (Nichols 1992).

Pro výsledné rozlišení označených jedinců lze použít širokou škálu statistických modelů a populačně-genetických výpočetních programů (McCrea & Morgan 2014). Sofistikované mark-recapture modely lze nastavit pomocí několika R balíčků. Patří mezi ně „Spatially Explicit Capture-Recapture“ - SECR nebo CAPWIRE (Pennell et al. 2013)

Efektivní velikost populace

Efektivní velikost populace (N_e) je velikost idealizované populace, která by vedla ke stejné míře příbuzenského křížení nebo genetickému driftu jako v dané reálné populaci

(Caballero, 1994). Představuje odhad počtu jedinců, kteří přispívají potomky do další generace (Charlesworth, 2009). V populacích které jsou předmětem ochrany přírody obvykle docházelo kvůli malé efektivní velikosti k příbuzenskému křížení a genetickému driftu. Tyto populační procesy mohou vést ke snížení genetické variability a potažmo životaschopnosti populace.

Efektivní velikost populace je ovlivněna mnoha faktory, například změnami ve velikosti populace, sociálním systémem druhu, odlišným počtem potomků mezi jedinci nebo rozdílným poměrem pohlaví. Extrapolace cenzní velikosti populace na efektivní velikost populace je pro většinu populací obtížná (Frankham et al., 2014). Stanovení efektivní velikosti populace je nicméně stále používanějším přístupem a často doplňuje tradiční demografické odhady (Luikart et al., 2010). Odhady efektivní velikosti populace často odkazují na odlišné časové rámce a různá prostorová měřítka, a proto může být obtížné je porovnávat (Schwartz et al., 1998). Odhady pro časový rámec zahrnující několik generací jsou nejspolehlivější (Luikart et al., 2010).

Čím menší je efektivní velikost populace, tím větší může být ztráta genetické diverzity, protože frekvence alel jsou náchylnější ke změnám kvůli genetickému driftu (Wright, 1931). Ztráta genetické diverzity se zrychluje s klesající velikostí populace a je obzvláště velká u velmi malých populací. Některé definice tohoto pojmu používají popis pomocí genetické velikosti populace, která je nepřímo úměrná rychlosti genetické eroze, ztrátě genetické variace a ztrátě adaptačního potenciálu (Hoban et al., 2020). Efektivní velikost populace je teoretický koncept s důležitou praktickou hodnotou, který má dobře stanovené prahy pokud jde o genetickou erozi. Při efektivní velikosti nižší než 500 (Jamieson & Allendorf, 2012) bude mít populace sníženou schopnost přizpůsobit se změnám prostředí (někteří stanovují práh N_e na 1000; Frankham et al., 2014). Předpokládá se, že pokud je efektivní velikost populace menší než 100, tak bude populace čelit vážným genetickým hrozbám po pěti a více generacích. Pokud je efektivní velikost větší než 1000, je zachován evoluční potenciál (Frankham et al., 2014).

Populační hustota

U vlků, vysoce teritoriálních a vrcholových predátorů s velkými domovskými okrsky, se průměrná velikost teritoria jedné smečky pohybuje mezi 100 a 1000 km² (Jedrzejewski 2005), což představuje 0,2 až 2 jedince na 100 km².

Statistická prostorově explicitní metoda CMR SECR (Spatially Explicit Capture-Recapture) byla použita mimo jiné k odhadu hustoty populace a odhadu její velikosti (Efford 2011; Efford & Fewster 2013; Efford 2015; Mattioli et al. 2018; Roffler et al. 2019). Zjednodušeně řečeno se jedná o rozšíření tradičního modelu zpětného odchyту, který je dále rozšířen o prostorovou lokalizaci jednotlivých zvířat na základě místa jejich odchyту. SECR je v mnoha případech kombinována se sběrem neinvazivních vzorků (Roffler et al. 2019). Tato kombinace navíc zvyšuje přesnost monitoringu (vlčích) populací (Roffler et al. 2019). Metoda navíc dokáže odhadnout nejen populační hustotu, ale také velikost domovského okrsku nebo prostorovou organizaci populací.

Hybridizace

Hybridizace vlků se psy je velmi aktuálním tématem ochrany vlka, protože ohrožuje genetickou integritu jeho populací (Randi et al. 2014). V případě vlčka etiopského (*Canis simensis*) dokonce přežití tohoto ohroženého druhu (Gottelli et al. 1994; Laurenson et al. 1998). Jedním z potenciálních rizik spojených s hybridizací je možný průnik domestikovaných variant genomu do vlčí populace, což by mělo za následek narušení vlčích adaptací a mohlo by to vést k ohrožení existence druhu (Rhymer & Simberloff, 1996). Průnik domestikovaných znaků má dopad nejen na fyziologii, ale také na chování. V důsledku hybridizace může dojít ke snížení plachosti a k nárůstu agresivního chování a zvýšené predaci hospodářských zvířat (Randi 2011). Pro studium hybridizace je nezbytné využívat genetické nástroje, protože samotná morfologie není dostačující k určení podílu genomu vlka a psa. Existují plemena psů, která morfologicky připomínají vlky, avšak mají jen malý podíl (do 30%) vlčího genomu (například československý vlčák; Smetanová et al. 2015). I tato plemena jsou v analýzách podobnější psům a lze je geneticky bez omylu rozpoznat od vlků a hybridů vzniklých recentně (Smetanová et al. 2015; Caniglia et al. 2018).

Známá je přítomnost hybridizace v Itálii (Randi et al. 2014), kde k ní došlo ve větší míře před několika generacemi, a to v raných fázích expanze vlků z jejich historických jádrových oblastí (Randi et al. 2014), obzvláště díky nízkým populačním hustotám vlků a vysokým počtům ferálních psů. Další případy hybridizace mezi vlkem a psem byly zaznamenány na Pyrenejském poloostrově (Godinho et al. 2011), v Pobaltských zemích a Skandinávii (Vilà et al. 2003) a také v několika oblastech východní Evropy.

Výskyt hybridizace je potřeba monitorovat, a to zejména v oblastech s vysokou mírou urbanizace, v okrajových oblastech výskytu vlka a při narušování dynamiky populace odstřelem vlků.

Cíle práce

Základem studie bylo vytvoření genetického datasetu z neinvazivních vzorků vlka obecného získaných na Slovensku během dvou zimních sezón v letech 2017–2019 a na tomto základě provedení analýz identit pod statistickou kontrolou s přihlédnutím k možnému výskytu statistické chyby prvního a druhého typu.

i) Poté následovalo zjištění popisných parametrů genetické diverzity populace, informace o pohlavní a genetické struktuře populace, diferenciaci subpopulací a jejich vzájemné izolaci (případně genovém toku).

ii) Důležitým cílem byl odhad cenzní velikosti populace vlka obecného na Slovensku, za pomoci modelů vycházejících z metod zpětného odchytu (Capture Mark Recapture, CMR). Stanovení změn velikosti populace nebylo přímým cílem studie (k takovému srovnání chybí data z minulosti získaná analogickou metodikou). Stanovení potenciálního přemnožení nebylo

předmětem této studie. Tento fenomén nicméně závisí zejména na populační hustotě, jejíž hodnoty jsou při analýze početnosti odhadovány. Analýza vztahu populace vlka obecného k nosné kapacitě prostředí vyžaduje ekologický přístup a analýzu stavu populace kořisti. Analýza útoků vlka na hospodářská zvířata rovněž nebyla předmětem této studie. Po integraci genetických a prostorově ekologických dat z telemetrie můžou data získaná v této studii přispět k této otázce pomocí výsledků v rámci přístupů krajinné genetiky.

iii) Důležitá byla interpretace získaných výsledků v kontextu učebnicových paradigmat evoluční a ochranné genetiky, které se týkají souvislostí velikosti populace a její životaschopnosti, tedy rizika inbreedingu, ztráty genetické variability vlivem genetického driftu a genetické eroze. Z toho důvodu byl dalším cílem odhad efektivní velikosti populace a simulace možných budoucích scénářů vývoje velikosti populace s přihlédnutím k trendům v prostředí pomocí analýzy životaschopnosti populace.

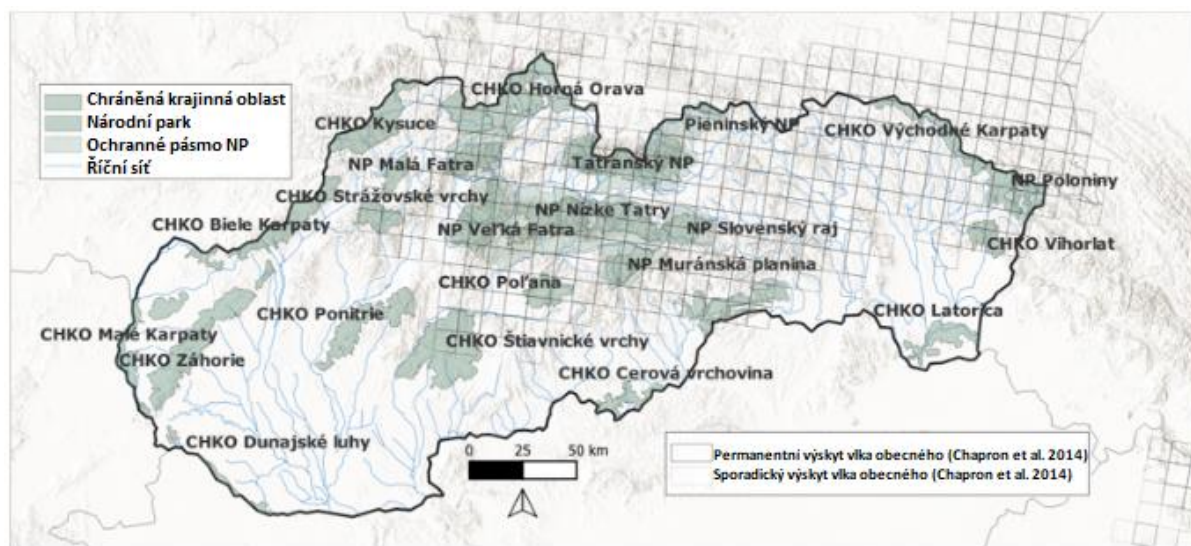
iv) Cílem práce byla i analýza potenciálního výskytu raných fází hybridizace vlka a psa (zejména F1, F2 a B1 hybridů).

Co se týče formy, jedná se o závěrečnou zprávu projektu, určenou širšímu spektru zájemců o přírodní vědy, čemuž je přizpůsoben styl i žánr textu. Zaprvé je optimalizována srozumitelnost a nikoli přesnost, zadruhé je preferován popis kontextu nad úzkým zaměřením, jedná se tedy v souladu se zadáním o „komplexní studii“. Do budoucna budou připraveny rukopisy do odborných vědeckých periodik v příslušném žánru vědeckého textu.

Metodika

Studované území a vzorkování

Vlk se vyskytuje na 40–60 % území Slovenska (Findo et al. 2008), proto byl odběr vzorků proveden ve všech kompetenčních územích Státní ochrany přírody kromě kompetenčního území Bratislavy, CHKO Malé Karpaty, CHKO Dunajské luhy a CHKO Záhorie (Obr. 6).



Obr. 6: Mapa Slovenska s vyznačením národních parků a chráněných krajinných oblastí.

Vzorky trusu, moči a tkání byly sterilně uloženy do 50 ml kónických zkumavek s 96% etanolem a vzorky chlupů a stěrů do obálek se silikagelem. Vzorky byly řádně označeny kódem vzorku, datumem sběru, GPS souřadnicemi nálezu a jménem nálezce. Zkumavka byla rovněž označena předpokládaným druhem zvířete a zamýšleným použitím pro genetickou nebo potravní analýzu. Následně byly všechny odebrané vzorky co nejdříve uloženy do mrazáků o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky, u nichž chyběly údaje o poloze a datumu sběru, byly později vyhledány v databázích KIMS a loveckých odstřelů. Pokud ani tam nebyly nalezeny potřebné údaje, byly tyto vzorky z příslušných analýz vyřazeny. Do příslušných laboratoří byly vzorky převezeny v přepravních termoboxech.

Extrakce DNA

Vzorky trusu byly opatrně vyjmuty ze zkumavek s etanolem na filtrační papír, poté byly odstraněny okrajové a koncové části (tj. části epitelu, které s největší pravděpodobností obsahují DNA z trávicího traktu) a ponechány několik minut pro úplné vyschnutí etanolu (Eggert 2008). Extrakce trusu byla provedena pomocí kitu QIAamp DNA Stool Mini Kit a QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) podle dodaného protokolu výrobce s drobnou úpravou v posledním kroku: DNA byla eluována do celkového objemu 100 μl místo 200 μl ,

aby se zvýšila její koncentrace.

Kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) byl použit také pro vzorky moči, ale s několika úpravami oproti protokolu výrobce. Po rozmrazení byly vzorky smíchány s 96% etanolem a s 3M octanem sodným (pH 5,2) v poměru 15 ml moči, 33 ml etanolu a 1,5 ml octanu sodného. Takto připravené vzorky byly inkubovány při -20 °C přes noc. Následně byly po rozmrazení odstředěny v centrifuze při 4 °C a 5 500 otáčkách za minutu po dobu 60 minut (Hausknecht et al. 2006). Peleta, která se vytvořila na dně zkumavky, byla připravena pro následnou extrakci podle oficiálního protokolu kitu.

Pro vzorky tkání, vlasů a stěrů byly použity kity Tissue Genomic DNA Mini Kit (Geneaid) a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) dle protokolů dodaných výrobcem.

Některé vzorky byly před izolací vyřazeny z důvodu velmi nízké kvality materiálu, a tudíž minimální šance na izolaci potřebné DNA. Jednalo se o vzorky trusu, které byly skladovány bez etanolu v sáčku, kde během manipulace se vzorkem a jeho přepravy došlo k rychlému tání, a tedy i rychlé degradaci DNA. Podobně byly na počátku vyřazeny vzorky chlupů, u kterých nebyly za použití binokulu nalezeny žádné folikuly potřebné pro izolaci DNA.

Amplifikace genetických markerů

Mikrosatelitové lokusy, které jsou jadernými markery, byly použity k odlišení jiných druhů než je vlk obecný, dále k identifikaci jedinců, analýze populační struktury a demografickým odhadům. Byly použity vybrané mikrosatelitové lokusy z předchozích studií genetiky vlků (Randi et al. 2014; Hulva et al. 2018; Szewczyk et al. 2019) sestávající z panelu Canine Genotypes Panel 1 v kombinaci s markery používanými konsorciem CEwolf. Směs 21 použitých fluorescenčně značených primerů byla zkombinována do dvou multiplexových směsí spolu s markerem pro detekci pohlaví zvířete na genu amelogenin dle Hulva et al. (2024). Podrobné informace o lokusech a jejich přiřazení jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Panel použitých 22 mikrosatelitových lokusů.

Název lokusu	Sekvence primeru 5' – 3'	Délka fragmentu (bp)	Repetice	Fluorescenční značení	Zdroj
Multiplex 1					
INRA21	ATGTAGTTGAGATTTCTCCTACGG GTTAATGGCTGATTTATTTGGTGG	87–111	Di	PET	Mariat et. al. 1996

FH2088	CCCTCTGCCTACATCTCTGC TAGGGCATGCATATAACCAGC	93–129	Tetra	6-FAM	Francisco et al. 1996
CXX.279	TGCTCAATGAAATAAGCCAGG GGCGACCTTCATTCTCTGAC	109–133	Di	NED	Ostrander et. al. 1993
FH2001	TCCTCCTCTTCTTTCCATTGG TGAACAGAGTTAAGGATAGACACG	132–156	Tetra	PET	Francisco et al. 1996
FH2054	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC	136–172	Tetra	6-FAM	
REN169O1 8	CACCCAACCTGTCTGTTCTT ACTGTTGTGAGCCAATCCCTT	154–170	Di	NED	Guyon et. al. 2003
REN169D0 1	AGTGGGTTTGCAAGTGGAAC AATAGCACATCTTCCCCACG	199–221	Di	PET	
FH2097	CAATGTGGAATTCCATGGTG ATGGAGCAAGATGTGTTTGTG	260–305	Tetra	NED	Francisco et al. 1996
PEZ17	CTAAGGGACTGAACTTCTCC GTGGAACCTGCTTAAGATTC	193–220	Tetra	VIC	Perkin–Elmer, Zoogen;
FH2087a	CTGCCACATTCATGATGC CAACTCCCTCCCTCATTCA	224–252	Tetra	6-FAM	Francisco et al. 1996
FH2017	AGCCTCTATAATCACGTGAGCC CCCAGTACCACCTCAGGAA	260–276	Tetra	VIC	
Multiplex 2					
AHTk211	TTAGCAGCCGAGAAATACGC	83–101	Di	VIC	Lingaas et. al.

	ATTCGCCCCGACTTTGGCA				1997
FH2096	CCGTCTAAGAGCCTCCCAG GACAAGGTTTCCTGGTTCCA	90–100	Tetra	6-FAM	Francisco et al. 1996
FH2140	GGGGAAGCCATTTTTAAAGC TGACCCTCTGGCATCTAGGA	99–149	Tetra	NED	
CPH5	TCCATAACAAGACCCCAAAC GGAGGTAGGGGTCAAAGTT	111–119	Di	PET	Fredholm and Wintero 1995
Vwf	CTCCCCTTCTCTACCTCCACCTCTAA CAGAGGTCAGCAAGGGTACTATTGT G	118–178	Tetra	VIC	Shibuya et al. 1994
REN64E19	TGGAGAGATGATATCCAAAAGGA AGCCACACTGCTTGGTGAG	139–155	Di	PET	Breen et. al. 2001
FH2137	GCAGTCCCTTATTCCAACATG CCCCAAGTTTTGCATCTGTT	153–180	Tetra	6-FAM	Francisco et al. 1996
Amelogenin	GTGCCAGCTCAGCAGCCCGTGGT	180;216		NED	Chen et al. (1999)
INU055	CCAGGCGTCCCTATCCATCT GCACCACTTTGGGCTCCTTC	190–216	Di	6-FAM	Ichikawa et al. (2002)
FH2010	AAATGGAACAGTTGAGCATGC CCCCTTACAGCTTCATTTTCC	217–260	Tetra	PET	Francisco et al. 1996
FH2161	TCAGCAAGAAACCCTCCAGT CATTCCCAACGGAGGACTCT	219–248	Tetra	VIC	

Reakční směs PCR o celkovém objemu 10 µl obsahovala 5 µl mastermixu z kitu Multiplex PCR plus (Qiagen), 3 µl RNA-free vody pro PCR, 1 µl primermixu (o koncentraci

2 μM) a 1 μl templátové DNA bez ohledu na koncentraci. Reakce PCR byla provedena na termocykleru Bio Rad T100™ s následujícím termálním protokolem:

1. 95 °C 5 min
2. 95 °C 30 s
3. 60 °C 90 s
4. 72 °C 60

s

Krok 2–4 byl opakován po dobu 35 cyklů

5. 68 °C 30 min

Termální protokol vychází z kitu Multiplex PCR Plus (Qiagen), ale s prodloužením terminální fáze extenze z 10 minut na 30 minut, aby se eliminovala tvorba alel minus A.

Ve snaze omezit potenciální chyby, jako je alelický výpadek (nerovnoměrná amplifikace jedné z alel) během amplifikace během PCR, byl protokol při dalších opakováních upraven změnou objemu templátové DNA. U tkání byl tento objem oproti původnímu protokolu snížen na polovinu.

Po finalizaci PCR byl produkt PCR připraven k fragmentační analýze. Fragmentační směs o objemu 10 μl se skládala z 0,25 μl fluorescenčního velikostního standardu GeneScan™ 500 LIZ™ (Thermo Fisher), 9,25 μl formamidu a 0,5 μl produktu PCR. Vlastní fragmentační analýza byla provedena v sekvenační laboratoři Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy na přístroji ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) za použití polymeru POP4 a standardu DS-33.

U vybraných vzorků byla navíc amplifikována část kontrolní oblasti mitochondriální DNA (mtDNA) pro dodatečné ověření druhového zařazení a rozlišení na haplotypy. Reakční směs pro PCR obsahovala 12,5 μl PPP-Mastermixu (Top-Bio), 1 μl 0,5 μM primeru (Thr-L15926 (5'-CAATCCCCCGGTCTTGTAACCC-3'; Vilà et al. 1999) a 1 μl 0,5 μM primeru DL-H16340 (5'- CCTGAAGTAGAAACCAGATG-3'; Vilà et al. 1999), 8,5 μl RNA-free vody pro PCR a 2 μl DNA. PCR probíhala na termálním cykleru Bio Rad T100™ s protokolem:

1. 94°C 3 min
2. 94°C 1 min
3. 50°C 1 min
4. 72°C 1

min

Krok 2–4 byl opakován po dobu 40 cyklů

5. 72°C 4 min

Úspěšnost amplifikace mtDNA byla ověřena elektroforézou (100 V, 400 mA, 30 min) na 1% agarózovém gelu. Do gelu bylo umístěno 5 μl PCR produktu. V případě úspěšné amplifikace byl zbývající PCR produkt (20 μl) přečištěn pomocí kitu QIAquick DNA PCR Purification Kit (Qiagen) do 30 μl PCR vody. Koncentrace DNA v přečištěném produktu PCR byla poté změřena pomocí UV-Vis spektrofotometru NanoDrop™ One/OneC Microvolume (Thermo Fisher). Konečná směs pro sekvenační analýzu se skládala z 0,5 μl primeru Thr-L15926, přečištěné DNA (30/c) a RNA-free PCR vody do celkového objemu 9 μl . Sekvenační

analýzu provedla externí laboratoř Univerzity Karlovy pomocí genetického analyzátoru 3130xl (Applied Biosystems).

Genotypování

Data získaná z fragmentační analýzy byla nejprve podrobena odečtení délky jednotlivých mikrosatelitových lokusů a binningu v programu GENEIOUS PRIME (Kearse et al. 2012). Délky alel byly odečteny na základě velikostního žebříku 500 LIZ™ Dye Size Standard (Thermo Fisher).

Po dokončení úpravy dat v programu GENEIOUS PRIME (Kearse et al. 2012) byla tabulka s délkami alel exportována do programu MS EXCEL (Microsoft Corporation 2020) pro vytvoření datového souboru. Aby se minimalizoval výskyt chyb při genotypování, byl použit přístup „multiple-tube“, který je založen na vícenásobném opakování s následným generováním konsenzuálního genotypu (Taberlet et al. 1996). Aby se předešlo genotypovacím chybám, jako je vypadávání alel a falešné alely (Taberlet et al. 1996), byl každý neinvazivní vzorek opakován, dokud nebyl stanoven konsenzus na základě pravidla „n/2“ - amplifikace alel alespoň v polovině případů (Stenglein et al. 2011; Benschop et al. 2013). Pokud se každá alela objevila alespoň dvakrát, byl jedinec považován za heterozygota na daném lokusu. K potvrzení homozygotnosti na daném lokusu bylo ve většině případů zapotřebí tři a více opakování, aby se vyloučilo vypadnutí alely (Taberlet et al. 1996; Tumendemberel et al. 2019). V případech, kdy ani z více opakování nevyplýval jednoznačný konsenzus a nebylo dodrženo pravidlo „n/2“ (Benschop et al. 2013), nebyl daný lokus odečten.

Nejprve byl soubor dat roztríděn na vzorky, u kterých bylo možné získat alespoň částečný genotyp - amplifikováno bylo alespoň 67 % lokusů (podle studie Szewczyk et al. 2019), což představuje minimálně 14 amplifikovaných lokusů z 21. Následně byla vypočtena míra amplifikace u každého lokusu napříč panelem, podle které byly postupně vyřazeny nejméně informativní lokusy analýzou P_{ID} a PI_{SIB} pomocí softwaru CERVUS (Kalinowski et al. 2007), respektive GIMLET (Valière 2002). Výběr a počet lokusů pro populační genotypy pro přesnou identifikaci jedinců je důležitý pro snížení pravděpodobnosti náhodného určení dvou různých jedinců jako jednoho genotypu, označované jako P_{ID} (probability of identity). Vhodný panel lokusů má hodnotu P_{ID} menší než 0.00001 (Waits et al. 2001; McKelvey & Schwartz 2004). Hodnota PI_{SIB} , která představuje pravděpodobnost sdílení shodného genotypu mezi dvěma sourozenci, by neměla být větší než 0.001 (Waits et al. 2001; McKelvey & Schwartz 2004). Porovnáním amplifikace lokusů s hodnotami pravděpodobnosti identity byla v programu R pomocí balíčku ALLELEMATCH (Galpern et al. 2012) vytvořena analýza genetické podobnosti mezi genotypy, kde byl vygenerován nejideálnější panel lokusů pro populační analýzy. Tento přístup umožňuje efektivní vizualizaci optimálního souboru dat obsahující unikátní genotypy, ve kterém počet jedinců není podhodnocen ani nadhodnocen.

Pro efektivnější přehled v souborech dat byly vytvořeny datasety:

- *Canis0* - všechny vzorky bez vyloučení jiných druhů

- *Canis1* - unikátní jedinci za sezónu 2017/2018 a 2018/2019 z celého území Slovenska
- *Canis2* - unikátní jedinci za sezónu 2017/2018 a 2018/2019 z území Západních Karpat

Druhové určení

Při sběru vzorků trusu v terénu může být trus vlka snadno zaměněn za pobytové stopy jiného druhu žijícího ve stejné oblasti a žijícího se podobnou stravou, jako je například šakal obecný (*Canis aureus* Linnaeus, 1758), liška obecná (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) nebo pes domácí (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758). K určení druhů byly použity dva přístupy: STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) a GENALEX 6.5 (Peakall & Smouse 2006; Peakall & Smouse 2012). Bayesiánská klastrovací analýza v programu STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) byla použita k prvotnímu vyloučení ostatních druhů z primárního souboru dat *Canis0*. Počáteční perioda byla nastavena na 2×10^5 , následovalo 10^6 opakování podle metody Markovova řetězce Monte Carlo (MCMC). Jako model byl použit „Ancestry no admixture model“ spolu s „Alleles frequencies correlated“ bez použití funkce „Locprior“. V souboru dat bylo použito celkem 818 vzorků, z nichž 42 bylo použito jako srovnávací modelové vzorky pro lišku, pro psa a pro šakala. Dále byly pro srovnání použity ověřené genotypy slovenských a polských vlků z karpatské i středoevropské nížinné populace.

Bylo otestováno rozdělení pro klastry (K) od K=1 do K=7, přičemž každá analýza se zopakovala třikrát. K výběru nejpravděpodobnějšího rozdělení na klastry, byla použita aplikace STRUCTURE SELECTOR (Li & Liu 2018). Aplikace porovnává dvě metody, přičemž v této studii byla vybrána metoda podle Puechmaille (2016). Tato metoda je pro tento soubor dat vhodnější, protože zohledňuje nerovnoměrné zastoupení jedinců v populacích. Pro přehlednější zobrazení grafů z výsledných analýz STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) byl použit grafický program CLUMPAK (Kopelman et al. 2015).

Po příslušném rozdělení na ideální K byl každý vzorek přiřazen ke klastru vlků, psů nebo lišek na základě hodnoty Q_i , která odráží míru příslušnosti k danému klastru. Práh přiřazující vzorek k určitému klastru byl stanoven na hodnotu Q_i vyšší než 0,75.

Z vyřazených vzorků byla vytvořena podmnožina dat s genotypy, které se nepodařilo přiřadit k žádnému z klastrů. Tyto genotypy byly spolu s referenčními vzorky podrobeny analýze hlavních koordinát (PCoA) v programu GENALEX. Parametry analýzy byly nastaveny pro model nekorelované frekvence alel.

Analýza identit

K identifikaci shodných genotypů byl použit program CERVUS (Kalinowski et al. 2007) se vstupními parametry minimálně 7 shodných lokusů a maximem 2 neshodných lokusů (mismatchů), které byly doporučeny analýzou v programu ALLELEMATCH (Galpern et al. 2012). Výsledná data byla všechna zkontrolována v primárních chromatogramech v programu GENEIOUS PRIME (Kearse et al. 2012) s definitivními kritérii: alespoň 8 shodných lokusů a maximálně 2 neshody. U shodných genotypů byla porovnána také metadata. Pro obě sledované

sezóny a následně pro obě pohlaví byla míra opakovaných záchytu vypočtena na základě poměru počtu získaných genotypů k počtu unikátních genotypů.

Populačně-genetické analýzy

Analýza struktury populace byla provedena v programu STRUCTURE na základě bayesiánské klastrovací analýzy. Jako vstupní soubor dat byl použit dataset *CanisI*, ve kterém byly vzorky seřazeny od západu k východu na základě údajů GPS. Dataset byl sestaven z 373 testovacích vzorků, k nimž byly přidány srovnávací vzorky vlků ze středoevropské nížinné populace (n=35) a vzorky z karpatské populace (n=13). Srovnávací vzorky pocházely z tkání z předchozí studie Hulva et al. (2018).

Klastrování bylo otestováno pro rozdělení od K=1 do K=6, přičemž pro každé K byly provedeny 3 opakování. Parametry opakování analýzy byly nastaveny identicky jako v případě testování druhové příslušnosti, pouze model byl nastavený na parametr „Admixture“. Pro zhodnocení optimálního počtu klastrů pro rozdělení populací byl opět použit program STRUCTURE SELECTOR (Li a Liu, 2018). Výsledky byly zhodnoceny na základě dvou metod: metody podle Puechmaille (2016) a metody podle Evanno et al. (2005). Pro nerovnoměrné zastoupení jedinců v populacích je informativnější metoda dle Puechmaille, která na rozdíl od metody dle Evanno zohledňuje také rozdělení souboru dat na subpopulace.

Demografické analýzy

Testování uzavřenosti populace

Před výběrem vhodných demografických analýz bylo nutné zjistit, zda můžeme s naším souborem dat pracovat jako s uzavřenou populací. Analýza uzavřenosti populace byla provedena v programu CLOSETEST (Stanley & Richards 2005), kde byl vybraný soubor dat počítán pro jednotlivé sezóny zvlášť. Přírozený průměrný přírůstek a úmrtnost v populaci byly testovány na základě heterogenity pravděpodobnosti záchytů v souvislosti s časově specifickou variací v pravděpodobnostech záchytu. Nízká p-hodnota indikuje otevřenou populaci.

Odhady početnosti na základě CMR modelů

K výpočtu velikosti populace byla použita metoda *Capture-Mark-Recapture (CMR)*, která je široce používána při neinvazivním vzorkování. Pomocí R balíčku CAPWIRE (Pennell et al. 2013), navrženého speciálně pro kontinuální neinvazivní vzorkování, jsme na soubor dat implementovali dva modely: *ECM* a *TIRM*. Model *ECM* předpokládá stejnou pravděpodobnost záchytu jedinců, zatímco model *TIRM* předpokládá různou pravděpodobnost záchytu jedinců. (Miller et al. 2005; Pennell et al. 2013; Pennell & Miller 2015). Vhodný model byl vybrán na základě testu poměru věrohodností (likelihood ratio test, LRT). Parametry pro analýzu byly nastaveny na 95% interval spolehlivosti s maximálním odhadem velikosti populace 2000 jedinců. Velikost populace byla vypočtena zvlášť pro jednotlivé sezóny (2017/2018 a

2018/2019). Odhady početnosti byly stanoveny pro celé území Slovenska, pro oblast Západních Karpat a na základě výsledků klastrovacích analýz pro $K=3$ také pro západokarpatskou subpopulaci a východoslovenskou subpopulaci. Pro stredo-evropskou nížinnou populaci nebyly kvůli nedostatečnému množství dat odhady stanoveny.

Efektivní velikost populace

Pro výpočet efektivní velikosti populace jsme zvolili odhad s využitím vazebné nerovnováhy (Wang 2005). Vazebná nerovnováha je definována jako nenáhodná asociace mezi alelami v různých lokusech, tj. určitá kombinace alel z několika různých lokusů je častější, než kdyby byla náhodná (Waples 2016). Zatímco v malých populacích je úroveň vazebné nerovnováhy relativně vysoká, ve velkých populacích je nízká (Sved et al. 2013).

K výpočtu efektivní velikosti populace pro dataset *Canis1* byl použit program LDNE (Waples & Do 2008). Pro výpočet efektivní velikosti populace program LDNE počítá odhady na základě dvou modelů. Zatímco parametrický model je určen spíše pro soubory dat, u kterých předpokládáme určitou strukturu populace a známe alespoň část demografické historie, model JackKnife je metoda převzorkování, která se nespolehá na konkrétní předpoklady. Parametrický model počítá celý datový soubor dohromady a iterativně přepočítává dílčí odhad odstraňováním prvku po prvku. Model *jack-knife* používá odhad s náhodnými efekty a je vhodný pro menší soubory dat, je však žádoucí, aby pozorování v souboru dat byla na sobě nezávislá (Efron 1979; Abdi & Williams 2010). Z tohoto důvodu jsme při interpretaci výsledků použili oba modely.

Údaje potřebné pro výpočet byly převzaty z výsledků programu STRUCTURE (Pritchard et al. 2000), který rozdělil soubor dat *Canis1* na příslušný počet klastrů (K). Příslušnost k jednomu z klastrů musela činit alespoň 75 %. Kvůli tomuto kritériu bylo nutné vyřadit vzorky, které nebylo možné jednoznačně přiřadit k žádnému z klastrů.

Analýza životaschopnosti populace

Pro modelování populační dynamiky a hodnocení pravděpodobnosti extinkce populace byl použit program VORTEX (Lacy, 1993), navržený pro PVA. Pro PVA byly použity demografické parametry, které jsou uvedeny v Tab. 2. Pro model byl zvolen časový interval 100 let, přičemž pro každý scénář bylo umožněno 10 000 iterací. Počáteční velikost populace byla stanovena na základě výsledků odhadů početnosti pro první sezónu, provedenou pomocí balíčku CAPWIRE. Nosná kapacita pro vlka nebyla formálně odhadnuta. Pro analýzy byla použita hodnota, která byla stanovena na základě poměru velikosti vlčího teritoria a domovského okrsku s průměrným počtem jedinců ve smečce. Při analýze životaschopnosti populace se jako kritické parametry projeví - procento rozmnožujících se samic, úmrtnost a nosná kapacita prostředí, a proto byla provedena PVA s různým nastavením těchto hodnot.

Tab. 2: Vstupní parametry pro modelování životaschopnosti populací vlka obecného.

Parametr	Hodnota	Zdroj
Počet opakování	1000	Caroll et al. 2014; Miller, 2017
Počet simulovaných let	100	Miller, 2017
Úmrtnost mláďat do jednoho roku	0,26–0,63	Fuller, 1989; Mech, 1977; Messier, 1985; Nilsson,2004, Peterson et al. 1984
Úmrtnost mláďat do dvou let	0,26–0,36	Nilsson,2004
Úmrtnost subadultů	0,20–0,36	Nilsson,2004
Typ reprodukčního systému	dlouhodobě monogamní	Miller, 2017
Věk první reprodukce	2	Miller, 2017
Reprodukční senescence	16	Miller, 2017
Maximální velikost vrhu	11	Miller, 2017
Poměr pohlaví při narození	50:50	Carroll et al. 2014
Podíl rozmnožujících se samic	0,35–0,57	Miller, 2017

Populační hustota

Odhad velikosti populace byl rovněž proveden pomocí prostorově explicitní metody CMR balíčku SECR v R (Efford 2011). Tento přístup včetně odhadu velikosti populace umožňuje určit hustotu populace na vymezeném území (Efford 2019). Studovaná oblast byla vymezena pomocí polygonu, který byl sestaven na základě souřadnic vzorku získaných během studie. Z datasetu *Canis1* byly vytvořeny dva vstupní soubory pro obě sezóny odděleně ze Západních Karpat. Odhady velikosti populace byly získány pomocí několika modelů ze tří základních tříd (Mt, Mb a Mh) a jejich kombinací (Otis et al. 1978; Lee & Chao 1994). Na základě hodnoty *AICc* byl vybrán model, který nejlépe odpovídal vstupním datům. Odhady velikosti populace byly stanoveny s 95% intervaly spolehlivosti.

Testování hybridizace

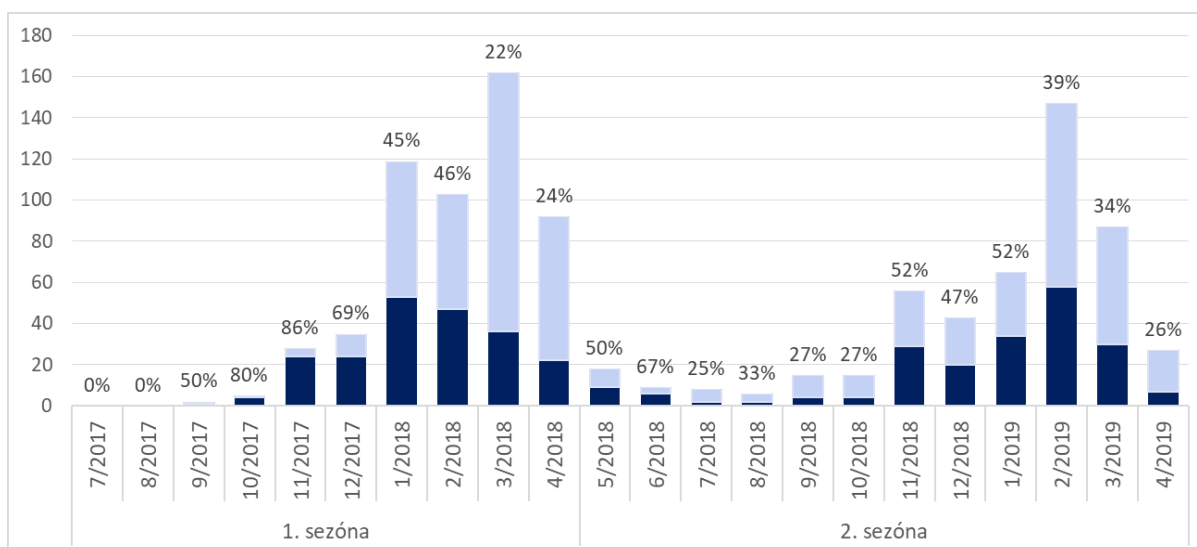
Dataset *Canis1* byl rozdělen na menší celky dle výsledků klastrovací analýzy. Každý jedinec by zařan do testovacích datasetů podle hodnot příslušnosti do klastru (Q) a byl použit genotyp ze všech 21 lokusů. Každý testovaný dataset obsahoval srovnávací genotypy psů. Zahrnuta byla ovčácká, pastevecká a lovecká plemena a několik kříženců. Dle výsledků klastrovací analýzy byly zahrnuty i srovnávací populace vlků buďto ze středoevropské nížinné populace nebo z oblastí Karpat. Samotné testování bylo provedeno v programu NEWHYBRIDS (Anderson & Thompson, 2002), který zařazuje testované jedince do kategorií: pes, vlk, F1 generace, F2 generace, zpětný kříženec se psem a zpětný kříženec s vlkem. Jako hraniční

hodnota pro jednoznačné přiřazení do kategorie byla 0,9. Analýza běžela po dobu 1 000 000 opakování po 100 000 burn-in periody.

Výsledky

Vzorkování

Sběr vzorků pro studium populačních analýz probíhal po dobu dvou vlčích let od 1. května 2017 do 30. dubna 2019, převážně v zimním období, a jejich přesné rozložení je vidět na Obr. 7. Sběr byl zaměřen na neinvazivní vzorky, jako je trus, moč, krev v moči, srst, případně vzorky z kořisti. Následně byly zahrnuty i invazivní vzorky z legálního odstřelu, pytláctví, jedinců uhynulých vlivem kolize s dopravním prostředkem a bukální stěry z telemetrovaných jedinců. Kromě toho byly zpracovány všechny vzorky dodané mimo stanovené období od roku 2015 do roku 2020. Za celé období bylo zpracováno 1173 vzorků, z toho 548 vzorků za 1. sezónu a 496 vzorků za 2. sezónu.



Obr. 7: Graf znázorňující počty zpracovaných vzorků (světlá barva) s vyznačením podílu vzorků, které byly použity pro statistické zpracování dat (tmavá část sloupců) ve zkoumaných sezónách.

Počet vzorků zpracovaných během celé studie pro každou oblast působnosti spolu s počtem jedinečných genotypů je uveden v Tab. 3. U jednotlivých kompetenčních území je zobrazena vypočtená míra opakovaných záchytů za obě studované sezóny 2017–2019.

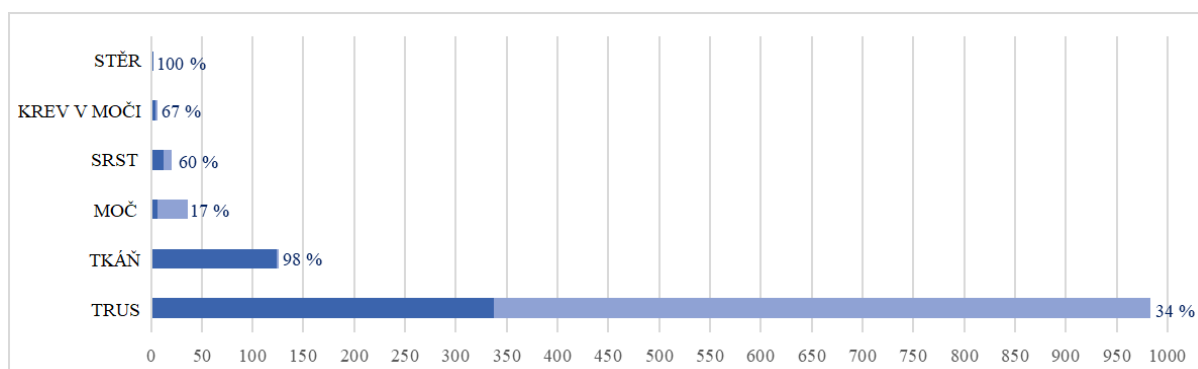
Tab. 3: Počet zpracovaných vzorků z jednotlivých území během celého studovaného období a počet získaných genotypů.

Oblast	Počet vzorků	Počet genotypů	Míra opakovaných záchytů
Prešov	34	19	1

TANAP	33	22	1
NAPANT	100	37	1.09
Malá Fatra	87	29	1.7
Slovenský ráj	94	46	1.24
Muráňská planina	80	35	1.16
PIENAP	60	30	1.21
Poloniny	178	66	1.5
Bílé Karpaty	1	1	1
Kysuce	38	12	1.8
Strážovské vrchy	4	0	-
Ponitří	3	1	1
Štiavnické vrchy	12	7	1
Velká Fatra	174	49	1.25
Horní Orava	77	34	1.53
Polana	43	23	1.45
Cerová vrchovina	36	10	1.5

Slovenský kras	66	27	1.27
Východní Karpaty	32	23	1.05
Vihorlat	16	11	1.67

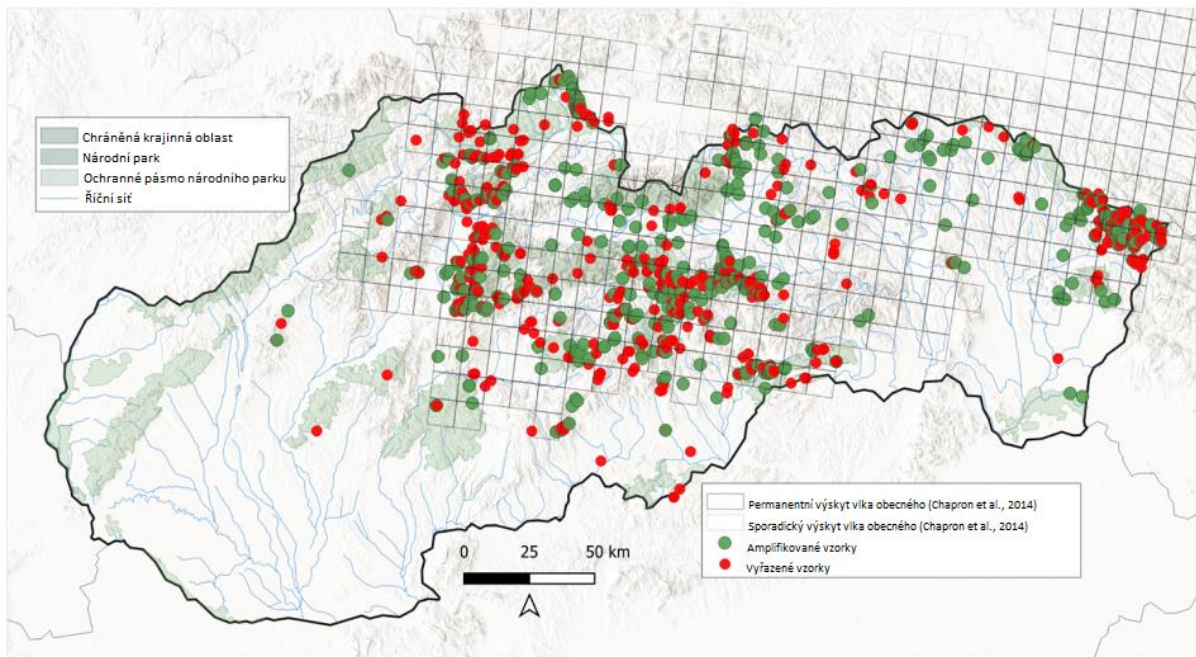
Nejčastějším typem vzorku byl trus, který byl zpracován celkem 983 krát, úspěšnost amplifikace byla 34 %. Nejvyšší úspěšnost amplifikace byla zaznamenána u vzorků tkání, úspěšná izolace DNA byla provedena ve 124 ze 126 případů, a u dvou vzorků bukálních stěrů. Následovala krev v moči se šesti vzorky a srst s 20 vzorky. Úspěšnost amplifikace se v obou případech pohybovala v průměru kolem 64 %. Samotná moč se vyskytla 36 krát a úspěšnost amplifikace činila 17 % (Obr. 8).



Obr. 8: Grafické znázornění počtu zpracovaných vzorků jednotlivých typů (světlou barvou) a proporce vzorků po filtrování kvality genotypů (tmavou barvou).

Amplifikace genetických markerů

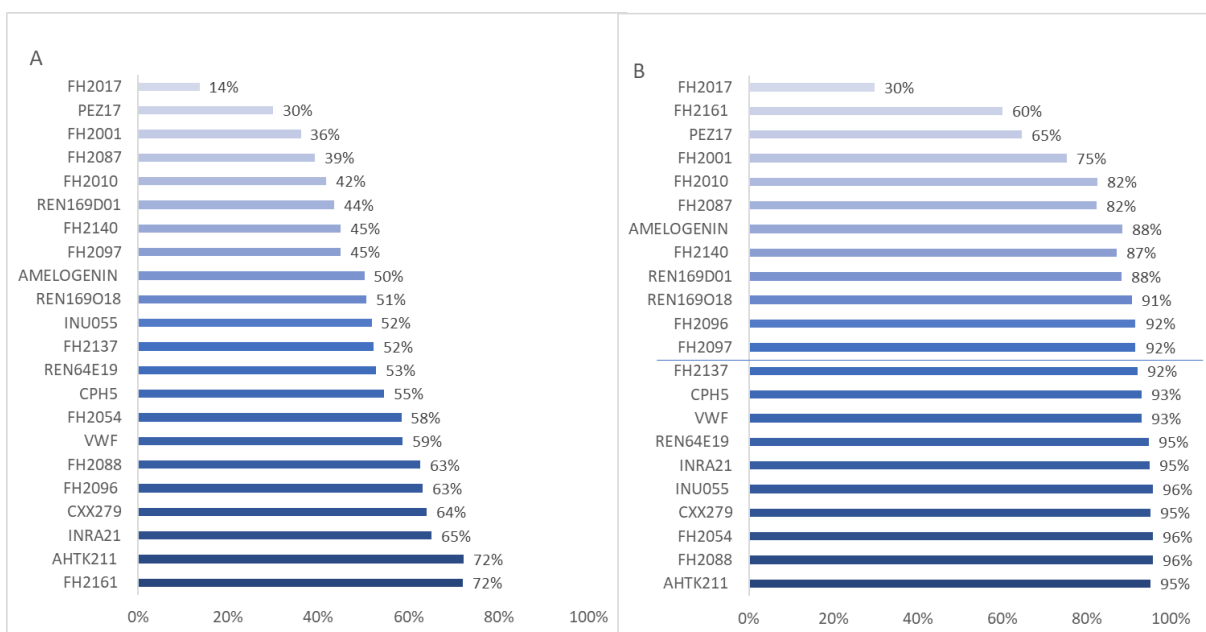
Ze všech zpracovaných vzorků byly při prvním třídění vyřazeny vzorky, u nichž se nepodařilo získat ani částečný genotyp představující alespoň 67 % amplifikaci lokusů pro jeden vzorek, což představuje min. 14 z 21 lokusů. Tímto způsobem jsme při prvním třídění dat vyřadili 688 (59 %) všech vzorků (na Obr. 9 vyznačeno červeně). Soubor dat obsahoval celkem 485 úspěšně amplifikovaných genotypů.



Obr. 9: Lokality sběru vzorků za celé studované období.

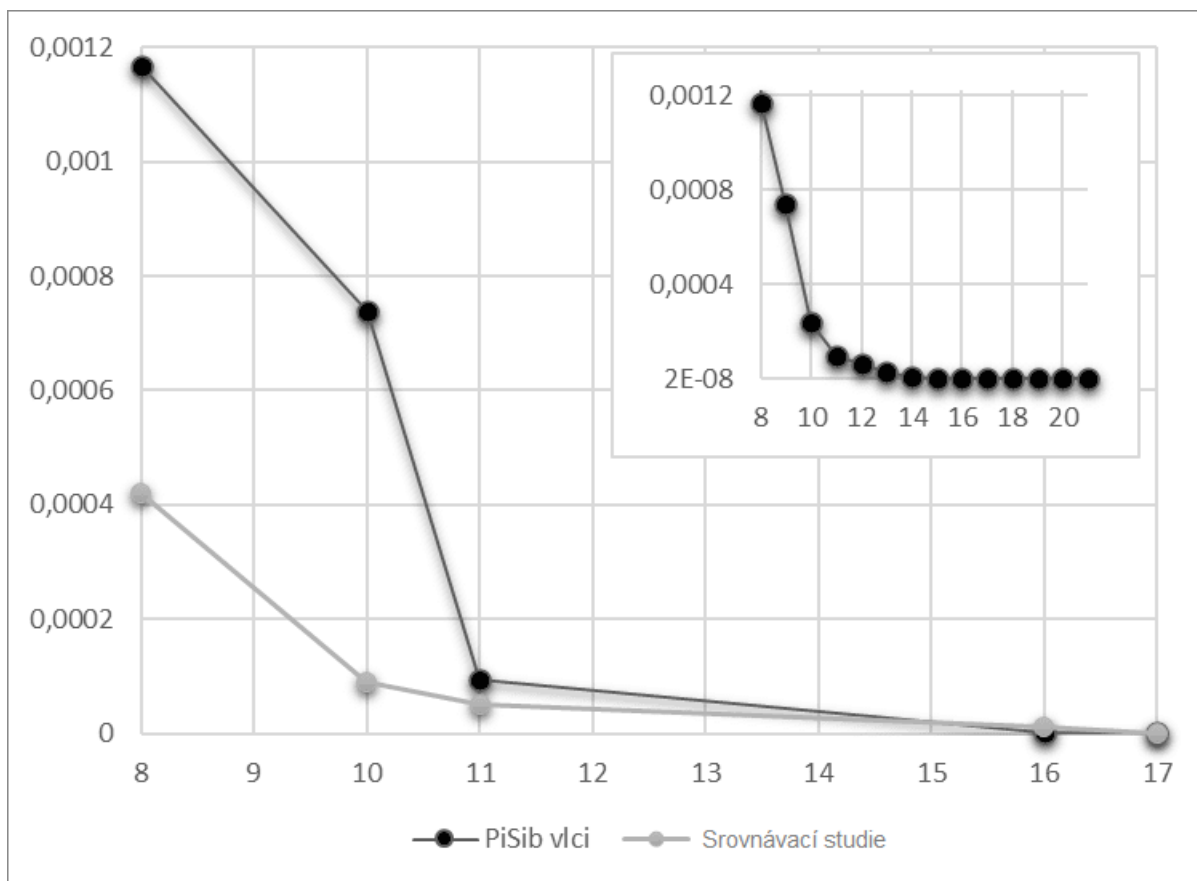
Pomocí amplifikace genu pro amelogenin, který byl použit k určení pohlaví jedince, bylo ve dvou sezónách v letech 2017 až 2019 identifikováno 109 samic a 141 samců. Ve 23 případech nebylo pohlaví zvířete určeno. Poměr pohlaví byl 1:1,3 ve prospěch samců. Při celkovém počtu zpracovaných vzorků (1173) měla amplifikace genu pro amelogenin úspěšnost 51 %.

Na základě amplifikace jednotlivých lokusů v celém panelu jsme vypočítali nejméně úspěšné lokusy pro celý soubor zpracovaných vzorků a poté pouze pro vzorky s úspěšným částečným genotypem (Obr. 10).



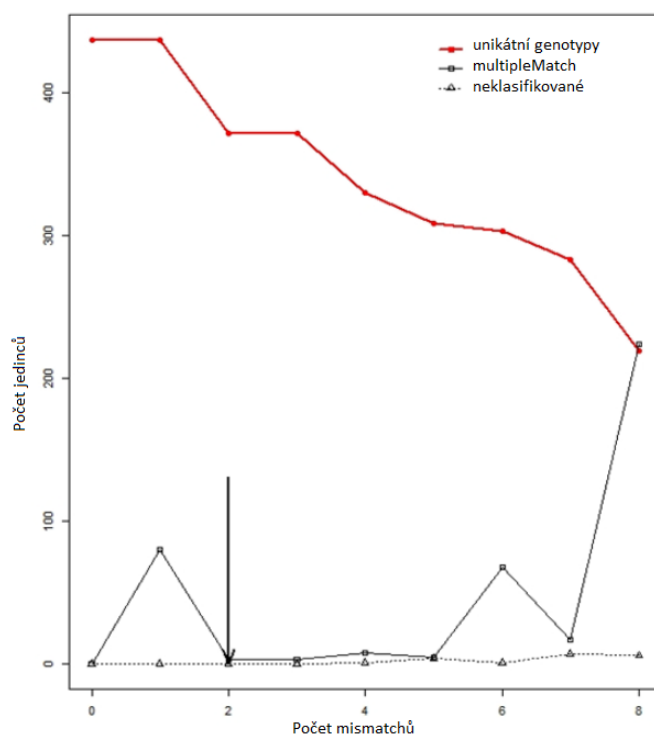
Obr. 10: Míra amplifikace jednotlivých lokusů v celém panelu ve všech zpracovaných vzorcích (A) a ve vzorcích, kde byl získán částečný genotyp (B).

Srovnání se studii se stejným zaměřením (Czarnomska et al. 2013; Wehrhan et al. 2018; Marucco et al. 2022) ukázalo, že hodnoty PI_{SIB} v této studii se začínají shodovat s hodnotami jiných studií přibližně u 11 lokusů (Obr. 11). Na základě hodnoty PI_{SIB} ($2,36 \cdot 10^{-4}$) bylo jako ideální počet vybráno deset lokusů.



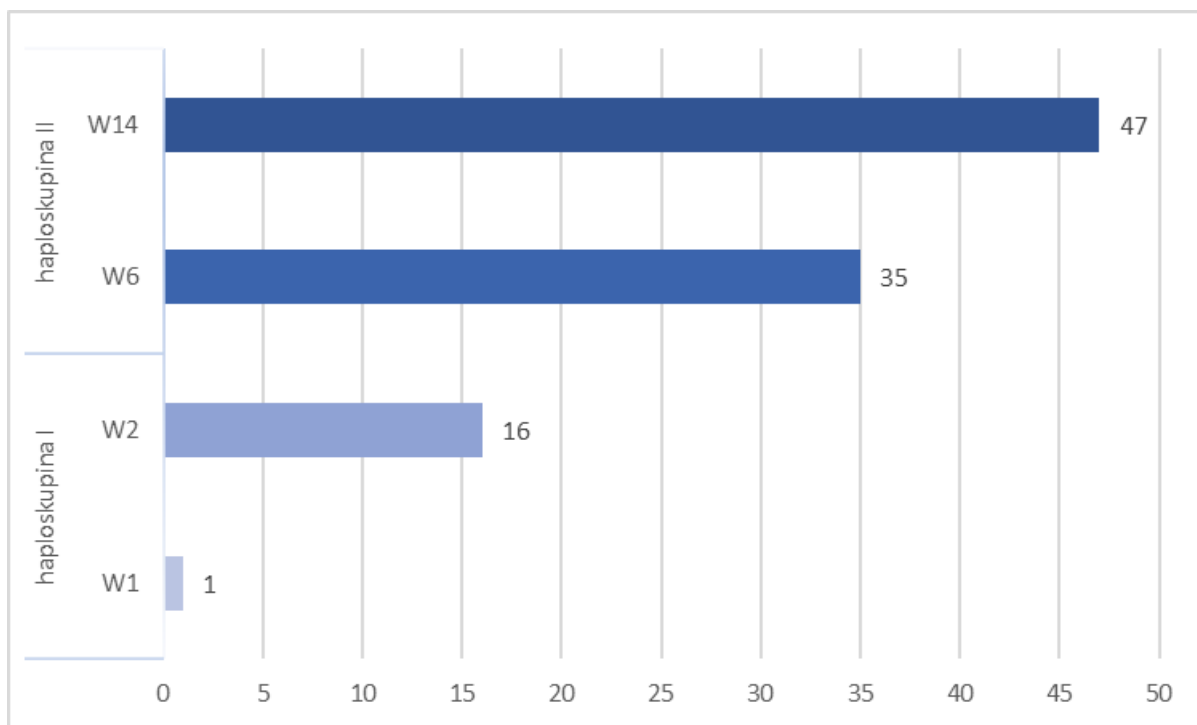
Obr. 11: Srovnání závislosti hodnoty PI_{SIB} pro různé počty lokusů u studií s podobnou tematikou (Czarnomska et al. 2013; Wehrhan et al. 2018; Marucco et al. 2022).

Výsledný panel lokusů pro populační analýzy byl podpořen hodnocením kvality dat v programu R STUDIO (R Core Team 2022) pomocí balíčku ALLELEMATCH (Galpern et al. 2012) s ideálním počtem neshod 2 pro 10 lokusů (Obr. 12).



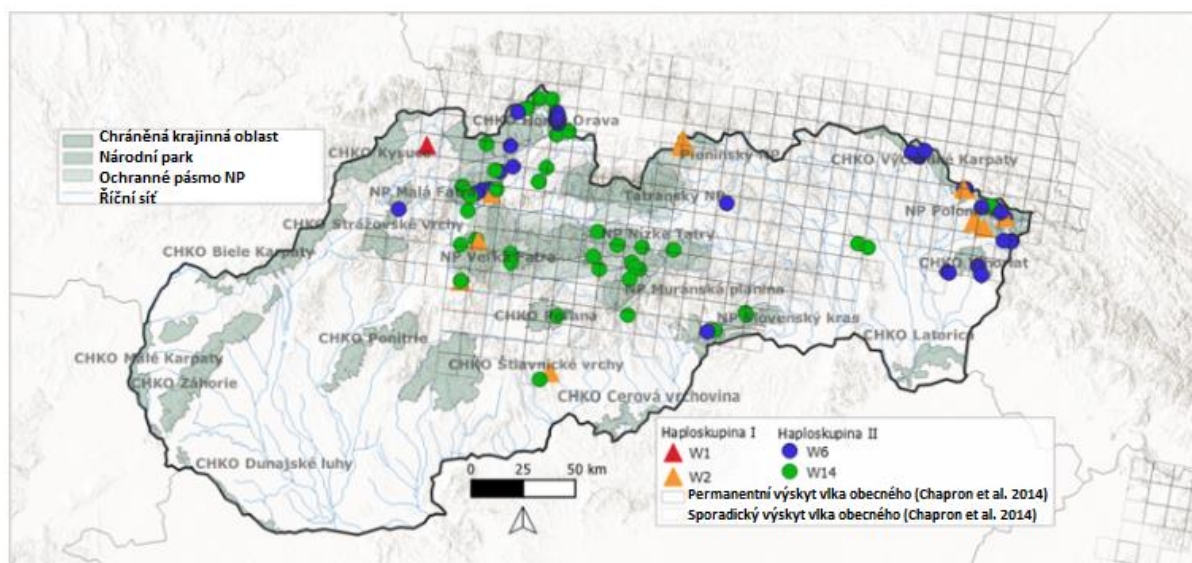
Obr. 12: Výsledky programu ALLELEMATCH (Galpern et al. 2012) ukazují doporučený počet lokusů, které se mohou při analýze identit neshodovat, aby se zabránilo nadhodnocení počtu jedinečných genotypů (jedinců). Černá šipka označuje doporučenou hodnotu (2).

Soubor mitochondriálních dat obsahoval 179 vzorků, ve kterých se podařilo identifikovat 11 jedinců jiných druhů. Haplotyp byl přiřazen u 99 vzorků, přičemž v naprosté většině (83 %) převažovala haploskupina II (Obr. 13). Nejvíce zastoupenými haplotypy v našem souboru dat jsou haplotyp W14, který nese 47 jedinců, a haplotyp W6, který nese 35 jedinců. K haploskupině I jsme byli schopni přiřadit pouze 18 % vzorků. Zatímco haplotyp W2 se vyskytuje u 16 jedinců a pouze jeden jedinec nese haplotyp W1.



Obr. 13: Výsledky sekvenování kontrolní oblasti mtDNA ukazují, že většina (83 %) jedinců v souboru dat spadá do haplogrupiny II. Nejvyšší zastoupení v testované populaci má haplotyp W14 se 47 výskyty, následovaný haplotypem W6 s 35 výskyty. Haplogrupina I zahrnuje 16 jedinců s haplotypem W2 a u jednoho jedince byl nalezen haplotyp W1.

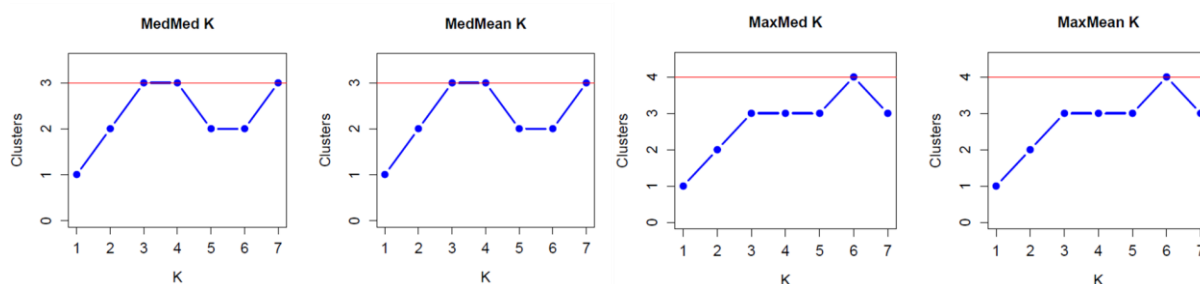
Geografické rozšíření haplotypů haplogrupiny I bylo spíše ostrovní, zatímco haplogrupina II měla souvislejší pokrytí (Obr. 14).



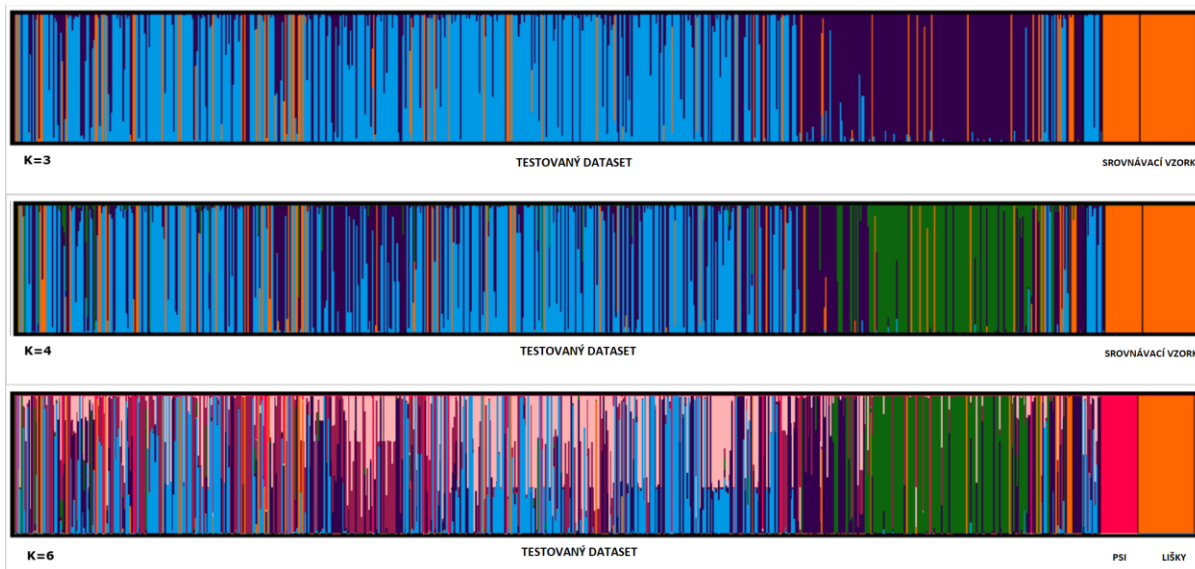
Obr. 14: Místa sběru vzorků s vyznačenými mitochondriálními haplotypy. Haplotypy jsou rozděleny do dvou haplogrup dle Pilot et al. (2010).

Druhové určení

Ve zpracovaných vzorcích byly nalezeny další dva druhy - pes domácí a liška obecná. Pomocí programu STRUCTURE SELECTOR (Li & Liu 2018), jsme identifikovali 105 vzorků, které se druhově lišily od vlka obecného při rozdělení na $K=3$, které byly vybrány jako optimální (Obr. 15). Pro detailnější určení bylo přihlédnuto k výsledku pro $K=4$ a $K=6$ (Obr. 16). Vzorky ostatních druhů tvořily 71 % lišky obecné (75 jedinců) a 30 % psa domácího (30 jedinců).



Obr. 15: Ideální počet klastrů pro analýzu druhové determinace v programu STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) pomocí statistik MedMed K, MedMean K, MaxMed K a MaxMean K (Puechmaille 2016), s použitím modelu z programu STRUCTURE SELECTOR (Li & Liu 2018). Ideální počet klastrů je $K=3$ nebo $K=4$.



Obr. 16: Rozdělení vzorků do klastrů pomocí programu STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Grafické znázornění výsledků bylo provedeno v programu CLUMPAK. Pro rozdělení $K=3$ a $K=4$ představují oranžové vzorky na konci skupinu srovnávacích vzorků pro lišku obecnou a psa domácího dohromady.

Analýza identit

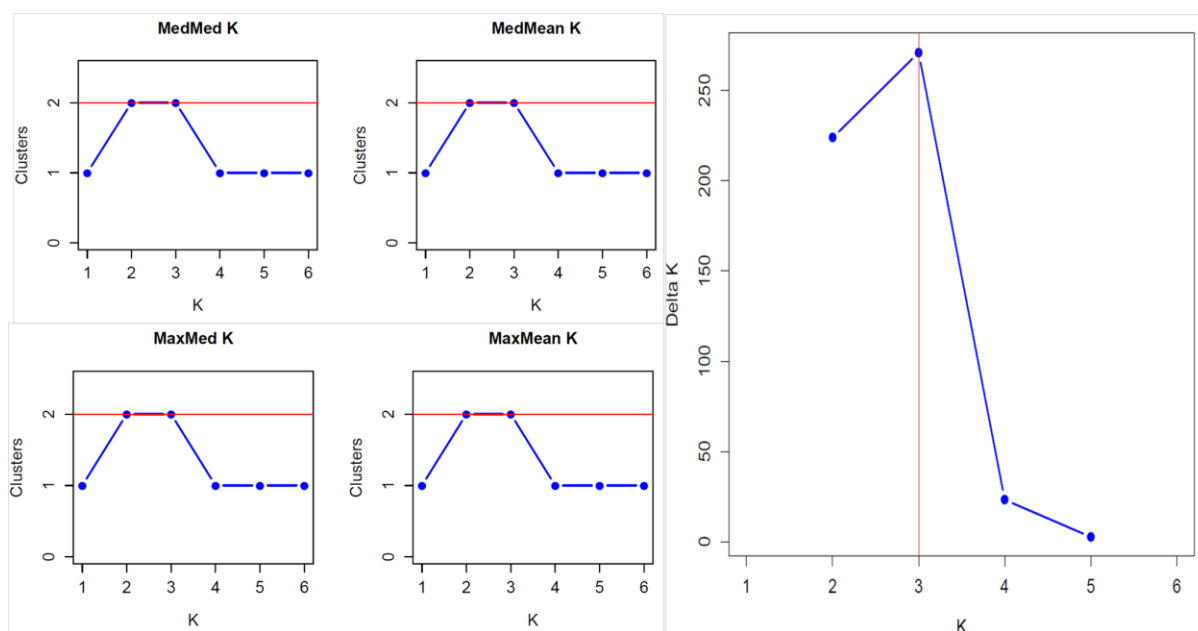
Do analýzy identity bylo zahrnuto celkem 350 vzorků z obou sezón, z nichž se podařilo identifikovat 273 jedinců. Pro první sezónu je míra opakovaných záchytů 1,23; 143 jedinců z celkového počtu 176 genotypů. Ve druhé sezóně byla tato míra o něco nižší, a to 1,19, 146 jedinců z celkového počtu 174 genotypů (Tab. 4). Při analýze obou sezón současně jsme byli schopni určit míru opakovaných záchytů na 1,28. Při rozdělení podle pohlaví mají samci o 7 % vyšší míru opakovaných záchytů, 1,34, než samice, u nichž je míra 1,25.

Tab. 4: Analýza identit pomocí programu CERVUS (Kalinowski et al. 2007) ukázala následující počet opakovaných záchytů v každé sezóně. Z celkového počtu 350 úspěšně amplifikovaných genotypů bylo možné identifikovat 273 jedinečných genotypů.

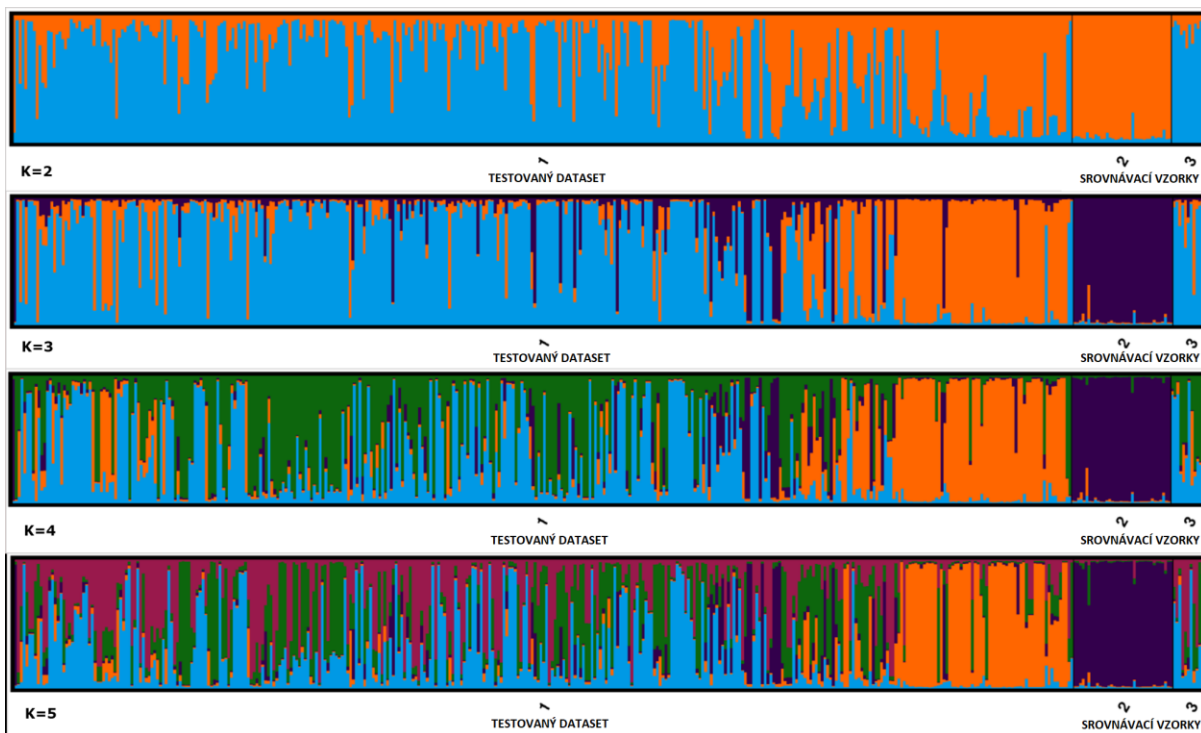
1. sezóna		2. sezóna	
záchyty	počet jedinců	záchyty	počet jedinců
1	119	1	125
2	16	2	30
3	7	3	15
4	4	4	4
počet jedinců celkem	143	počet jedinců celkem	146
počet záchytů celkem	176	počet záchytů celkem	174

Populačně genetické analýzy

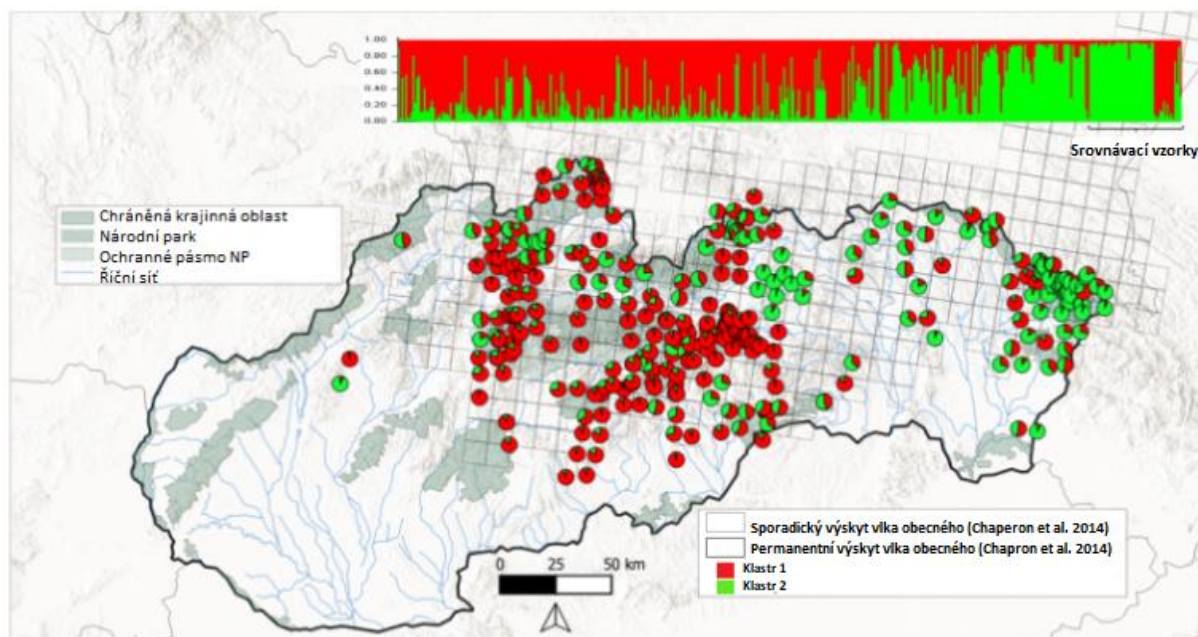
Na základě bayesiánské klastrovací analýzy vyšel ideální počet klastrů podle metody *Puechmaille* (2016) jako dva. Při použití metody ΔK (Evanno 2005) se tento počet zvýšil na tři klastry (Obr. 17). V tomto zobrazení však můžeme pomocí srovnávacích vzorků oddělit pouze západokarpatskou subpopulaci a středoevropskou nížinnou populaci (Obr. 19), resp. při $K = 3$ je zobrazena i východoslovenská subpopulace. Do výsledků bylo zahrnuto i vyšší K pro případné určení dalších samostatných populací. Zachycení jedinců v souboru dat od západu k východu je vidět na Obr. 18 v klastrovací analýze vizualizované programem CLUMPAK (Kopelman et al. 2015). Každý sloupec představuje jednoho jedince a jeho příslušnost k jednotlivým klastrům.



Obr. 17: Ideální počet klastrů v bayesiánské analýze ze STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Při použití metody dle *Puechmaille* (2016) ve STRUCTURE SELECTOR (Li & Liu 2018) je ideální počet klastrů $K=2$. Při použití metody podle *Evanno* (2005) je nejpravděpodobnější počet klastrů podle ΔK , $K=3$.

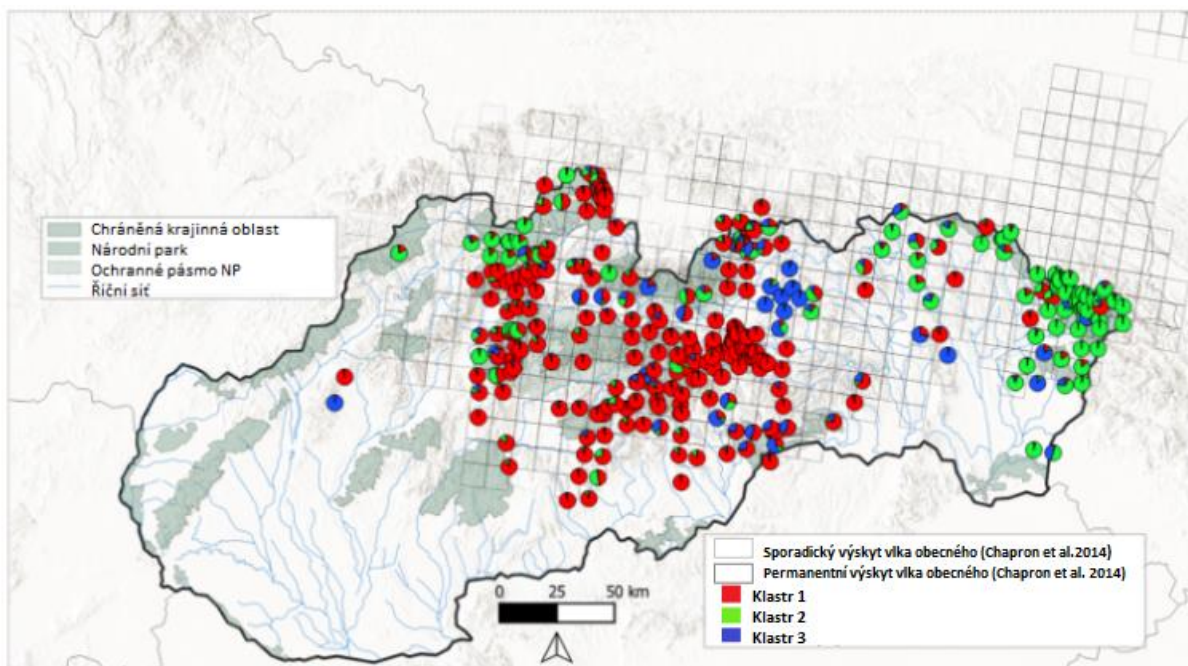


Obr. 18: Grafické znázornění klastrovací analýzy pomocí programu CLUMPAK (Kopelman et al. 2015), založené na výsledcích programu STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Soubor dat testovaných genotypů vlků je označen číslem 1 a byl porovnán se srovnávacími vzorky ze středoevropské nížinné populace (2) a západokarpatské subpopulace (3). Vzorky jsou v datasetu seřazeny podle GPS souřadnic od západu k východu.

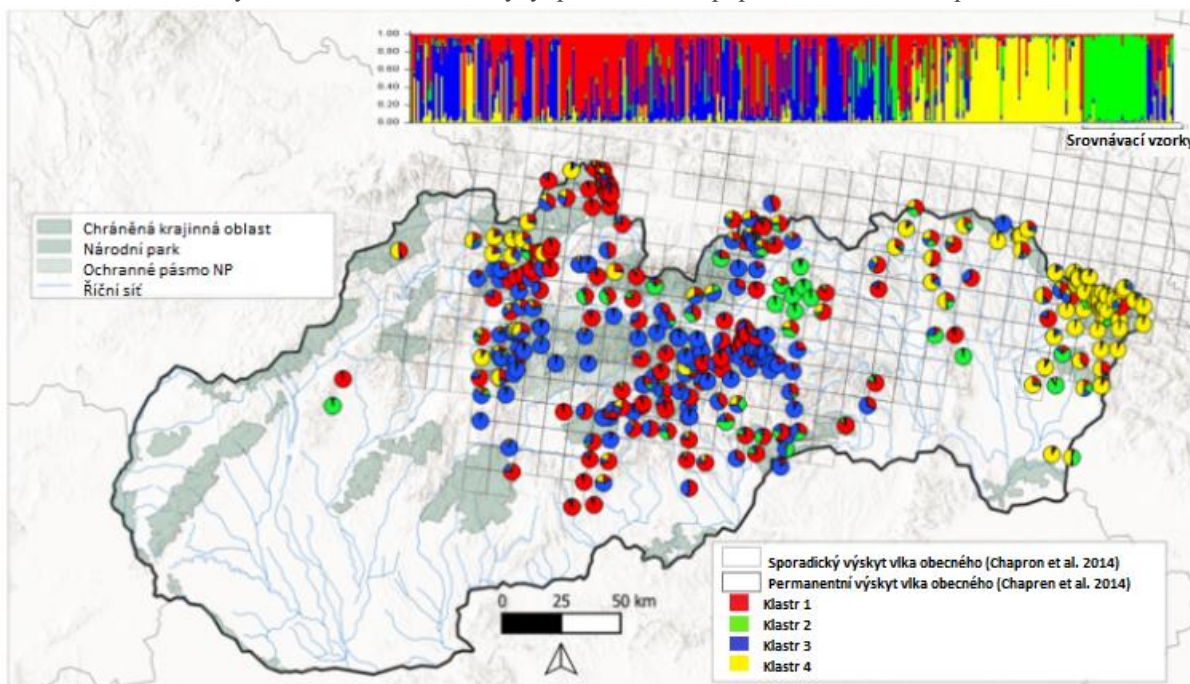


Obr. 19: Ilustrace výsledků klastrovací analýzy při $K=2$ v programu STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) v prostorovém kontextu.

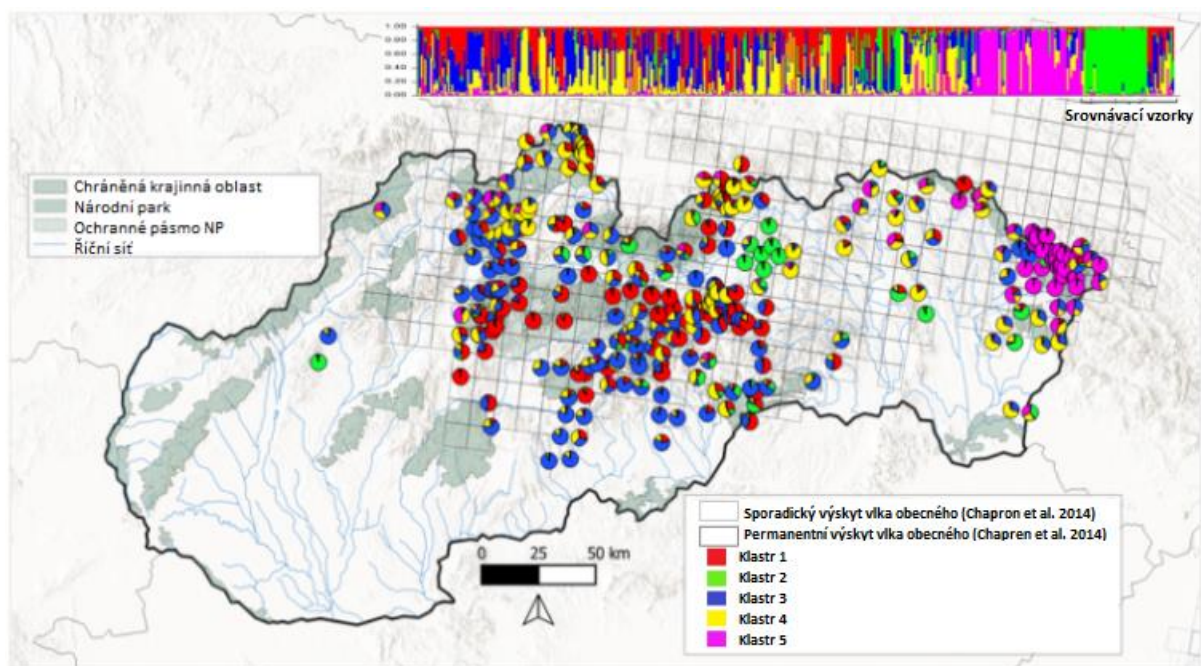
Pomocí srovnávacích vzorků středoevropské nížinné a karpatské populace byli jedinci z testovaného souboru dat s určitou pravděpodobností přiřazeni k danému klastru (subpopulaci), pro nižší K mohou být příslušníci různých subpopulací spojeni do jednoho klastru.



Obr. 20: Ilustrace výsledků klastrovací analýzy při rozdělení populace dle $K=3$ v prostorovém kontextu.



Obr. 21: Zobrazení výsledků klastrovací analýzy při rozdělení populace dle $K=4$.



Obr. 22: Znáznornění výsledků klastrovací analýzy při rozdělení do pěti populací $K=5$.

Demografické analýzy

Testování uzavřené populace

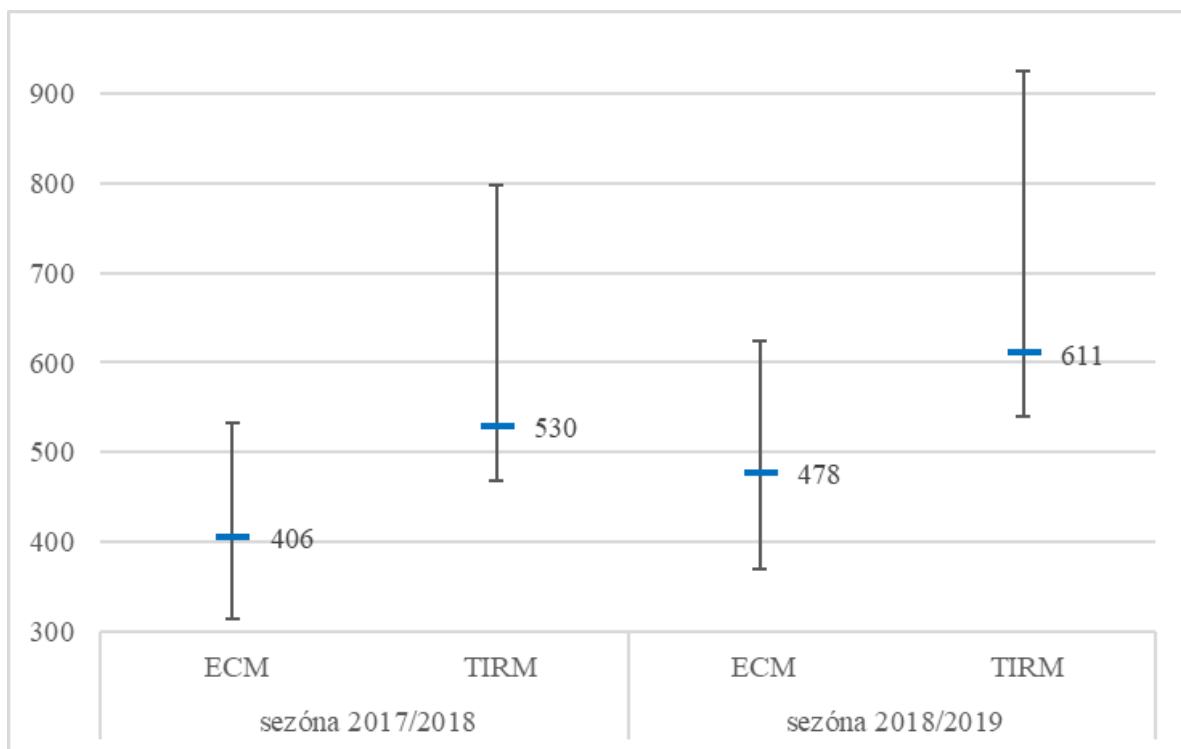
V první sezóně byla pomocí softwaru CLOSETEST uzavřenost populace ve zvoleném období podpořena modelem na základě heterogenity pravděpodobnosti záchytů, kde byla dle výsledné p hodnoty = 0,56003 zamítnuta nulová hypotéza. Uzavřenost populace ve druhé sezóně nebyla na základě výsledné p hodnoty = 0,0128 tímto modelem podpořena. Uzavřenost populace v první sezóně byla podpořena i modelem na základě časově specifické variace v pravděpodobnosti záchytu. Na základě p hodnot byly zamítnuty nulové hypotézy pro přírůstek i pro úbytek jedinců (Tab. 5).

Tab. 5: Výsledky testu uzavřené populace. V tabulce jsou zobrazeny p hodnoty statistiky komponentů testu uzavřené populace pro jednotlivé sezony zvlášť a pro obě sezony dohromady. Nízká p hodnota předpokládá otevřenost populace.

	1. sezona	2. sezona
Přírůstek jedinců	0,49815	0,18622
Úbytek jedinců	0,51501	0,01418

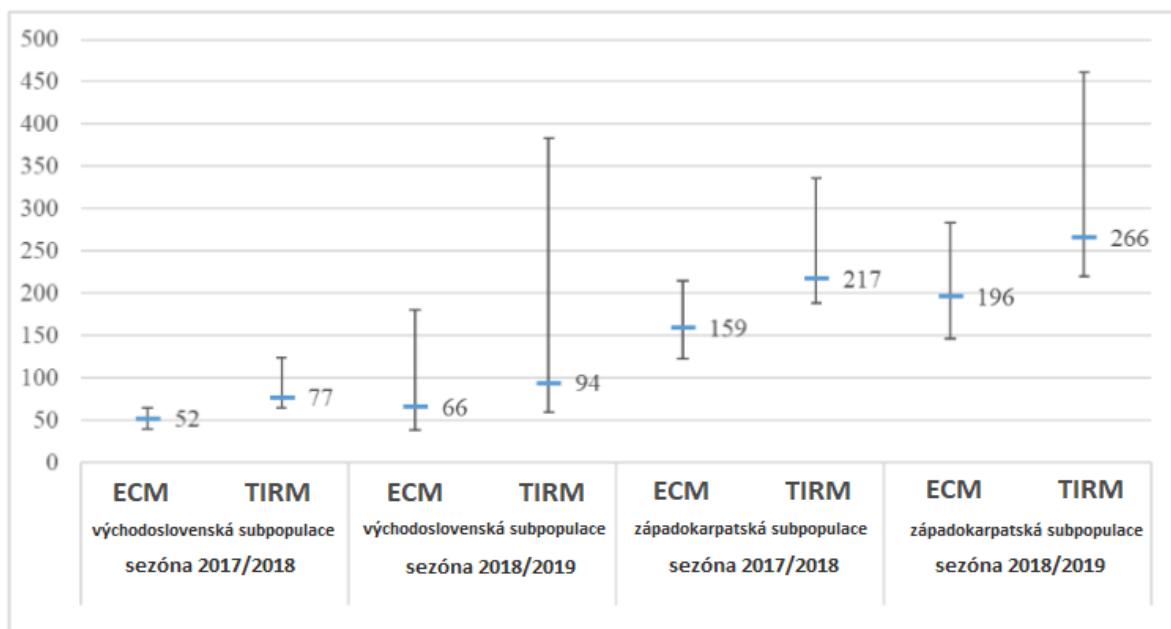
Odhady početnosti na základě CMR modelů

V R balíčku CAPWIRE byl u obou sezon na základě LRT zvolen jako vhodný model TIRM. Odhadovaná velikost populace pro celé území Slovenska byla na základě tohoto modelu stanovena na 530 jedinců [468;797] v první sezóně a 611 jedinců [540;925] ve druhé sezóně (Obr. 23).



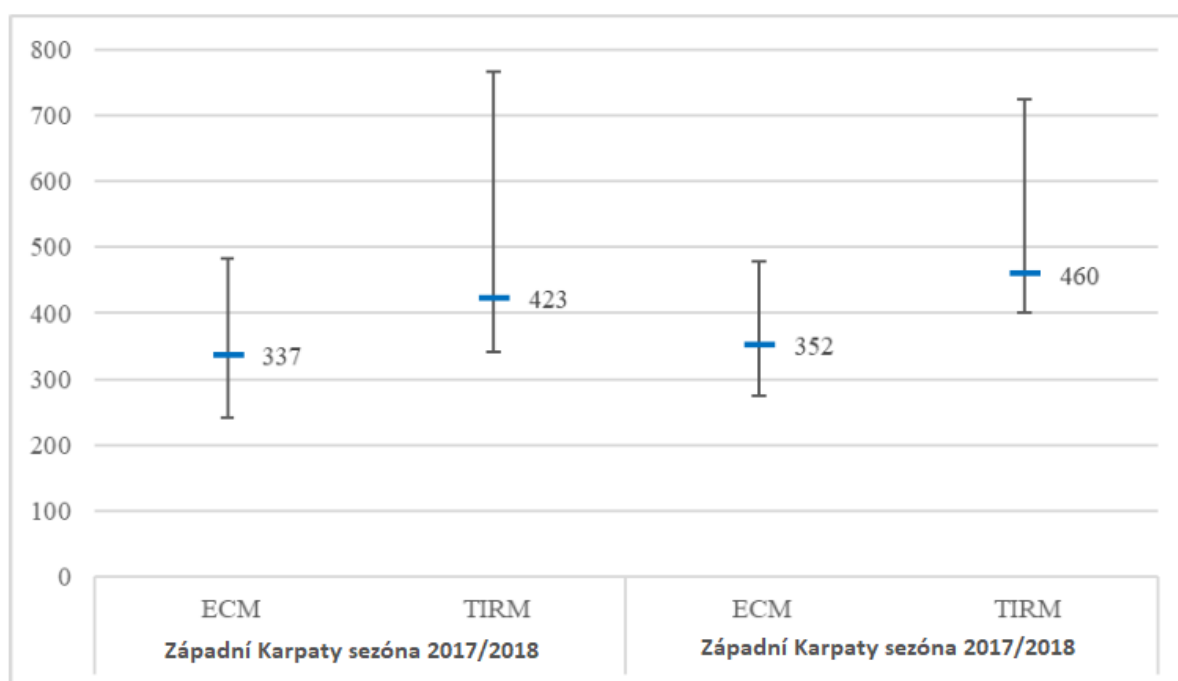
Obr. 23: Odhady velikosti populace pomocí programu CAPWIRE (Pennell et al. 2013) pro dvě sezóny na základě datasetu *CanisI*. Odhady jsou uvedeny s 95% intervalem spolehlivosti.

Dále byla početnost stanovena zvlášť pro východoslovenskou a západokarpatskou subpopulaci definovanou dle klastrové analýzy. U všech čtyř analýz byl na základě LRT zvolen jako vhodný model *TIRM* (Obr. 24). Početnost východoslovenské subpopulace byla odhadnuta na 77 [65;124] jedinců v první sezóně a 94 [60;383] jedinců ve druhé sezóně. U západokarpatské subpopulace byla početnost odhadnuta na 217 [189;336] jedinců v první sezóně a 266 [220;461] jedinců ve druhé sezóně. Stejně jako v případě odhadů početnosti u východoslovenské subpopulace ve druhé sezóně může být vyšší interval spolehlivosti ve druhé sezóně u karpatské subpopulace způsoben nízkým počtem opakovaných záchytů.



Obr. 24: Odhady velikosti populace pomocí CAPWIRE (Pennell et al. 2013) rozdělené do dvou sezón. Odhady jsou uvedeny s 95% intervalem spolehlivosti.

Dále byly stanoveny odhady početnosti pro oblast Západních Karpat (datový soubor *Canis2*), kde jsme ze souboru vyloučili vzorky z východního Slovenska. V tomto případě byla velikost populace také odhadnuta na základě modelu *TIRM*. Pro sezónu 2017/2018 byla velikost populace odhadnuta na 423 [342;765] jedinců. V sezóně 2018/2019, byla velikost populace odhadnuta na 460 [400;724] jedinců (Obr. 25).

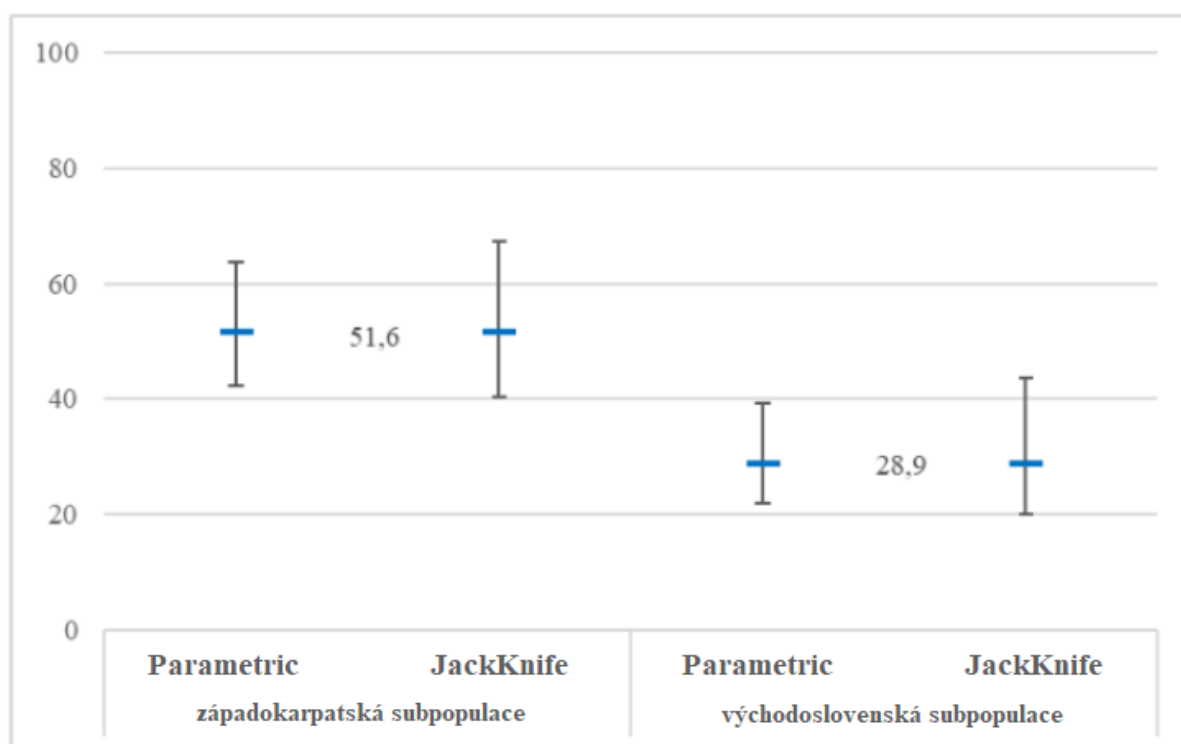


Obr. 25: Odhad velikosti populace pomocí CAPWIRE (Pennell et al. 2013) pro oblast Západních Karpat (dataset

Canis2). Populace byla vyčleněna na základě GPS souřadnic v kombinaci s výsledky klastrovací analýzy při K=3. Odhady jsou uvedeny s 95% intervalem spolehlivosti.

Efektivní velikost populace

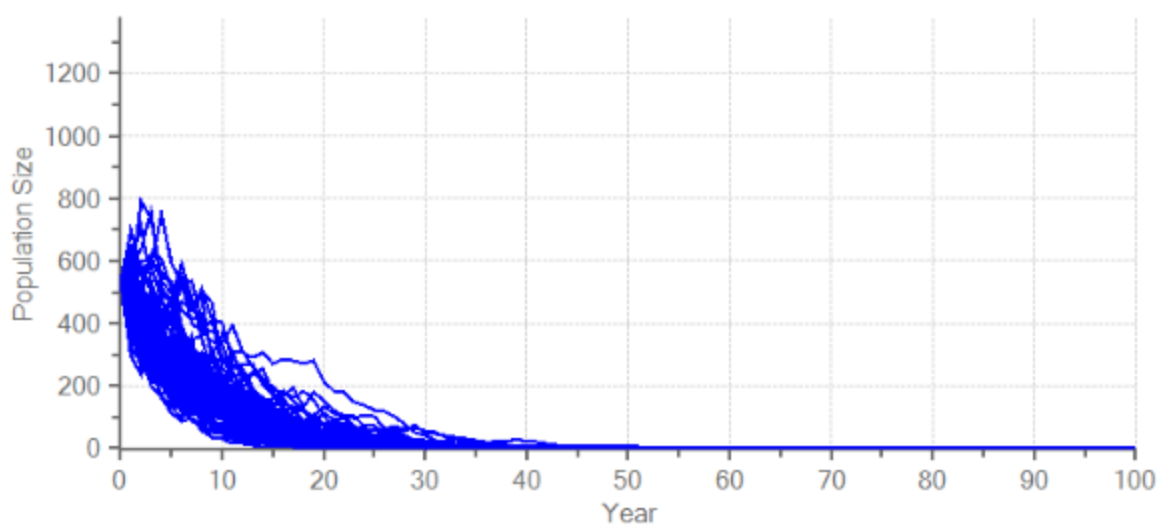
Pro testovací soubor efektivní velikosti populace jsme vybrali vzorky z bayesiánské klastrovací analýzy, které alespoň ze 75 % patřily do jednoho ze tří klastrů. Klastry jsme rozdělili na 3 populace: západokarpatskou subpopulaci s 208 jedinci, východoslovenskou subpopulaci s 86 jedinci a středoevropskou nížinnou populaci s 15 jedinci. Program LDNE nedokázal vypočítat relevantní odhad pro středoevropskou nížinnou populaci, pravděpodobně kvůli nízkému množství dat. Pro západokarpatskou subpopulaci při nejnižší frekvenci alel 0,01 byl odhad efektivní velikosti populace 52. Efektivní velikost pro izolovanou východoslovenskou subpopulaci byla vypočtena na 29 jedinců (Obr. 26). Rozdíl ve velikosti intervalu spolehlivosti na 95 % byl v *parametrickém* modelu a modelu *JackKnife* mírně odlišný, ale zanedbatelně významný. V průměru činil interval [41;65] pro západokarpatskou subpopulaci a [21;41] pro východoslovenskou subpopulaci.



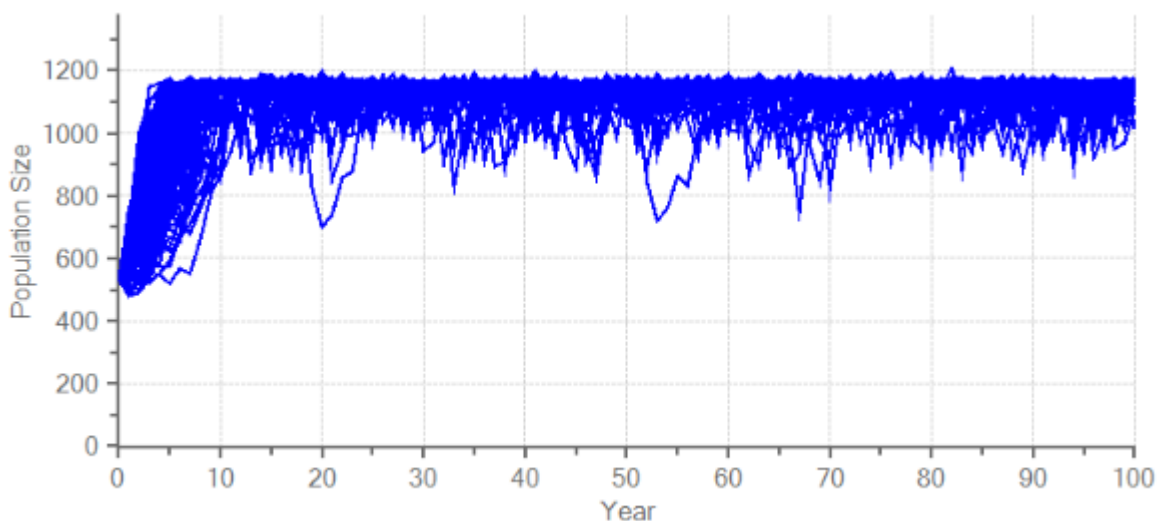
Obr. 26: Graf znázorňující LDNE odhad efektivní velikosti populace na 95% intervalu spolehlivosti.

Analýza životaschopnosti populace

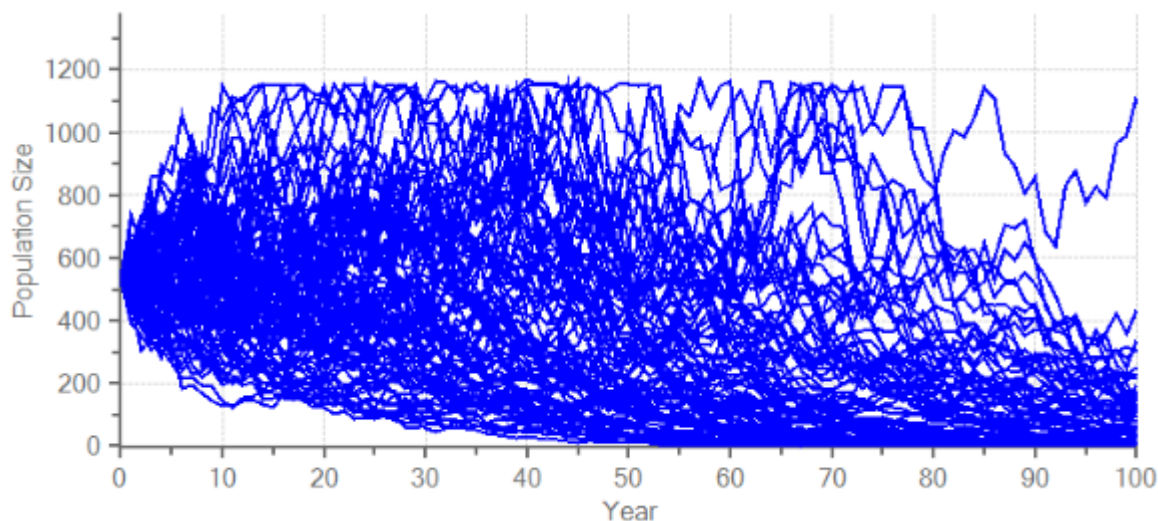
Na základě použitých demografických parametrů byly vytvořeny následující grafy. Na Obr. 27 je zobrazen negativní vývoj populace. U vstupních parametrů byly použity minimální počty rozmnožujících se samic a vysoká mortalita, v tomto případě by pravděpodobně došlo k extinkci populace v průběhu následujících 100 let. Na Obr. 28 je zobrazena populační predikce s využitím maximálních hodnot u rozmnožujících se samic a minimální mortalitou. V tomto případě je limitujícím prvkem velikosti populace nosná kapacita prostředí. Analýza životaschopnosti populace s využitím průměrných hodnot vstupních parametrů je zobrazena na Obr. 29. V tomto případě lze předpokládat mírně negativní vývoj populace v průběhu následujících 100 let.



Obr. 27: Výsledek modelu populační predikce vlka obecného při použití vstupních parametrů s nejvyšší mortalitou a nejnižším procentem rozmnožujících se samic. Odhadovaná velikost populace (osa y) v průběhu let (osa x).



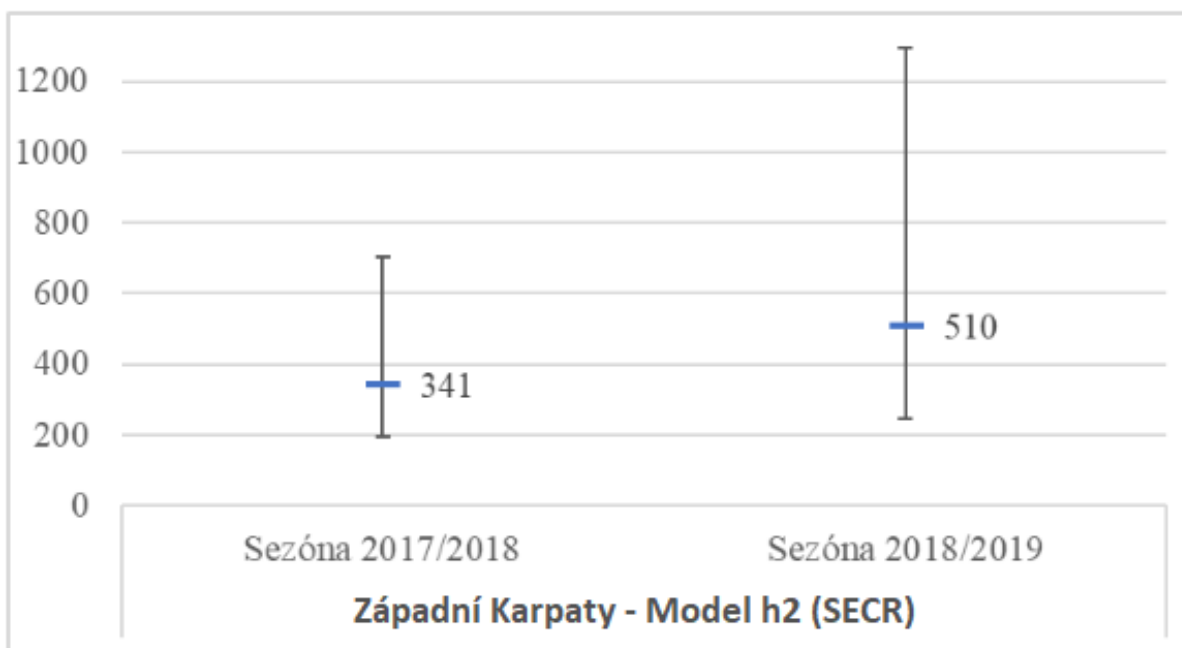
Obr. 28: Výsledek modelu populační predikce vlka obecného při použití vstupních parametrů s nejnižší mortalitou a nejvyšším procentem rozmnožujících se samic. Odhadovaná velikost populace (osa y) v průběhu let (osa x).



Obr. 29: Výsledek modelu populační predikce vlka obecného při použití průměrných hodnot vstupních parametrů. Odhadovaná velikost populace (osa y) v průběhu let (osa x).

Populační hustota

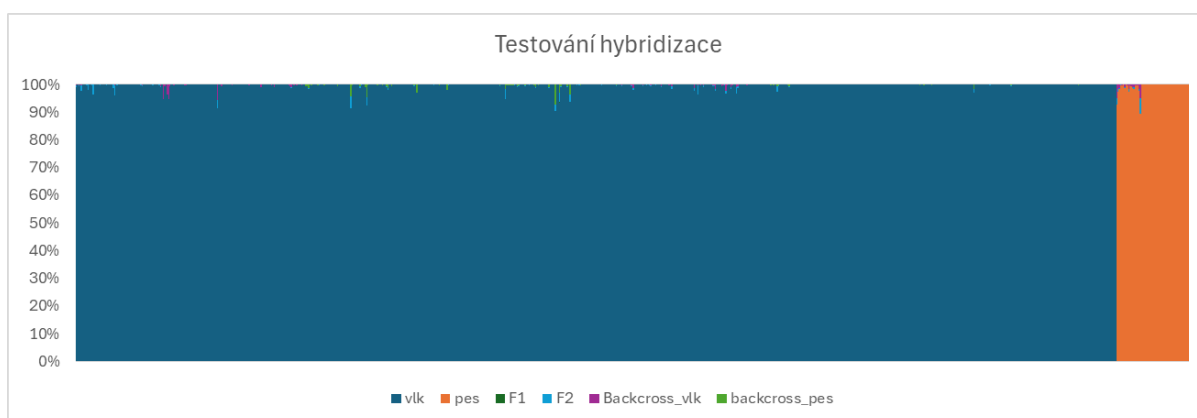
V případě odhadu početnosti pomocí metody SECR obsahovala oblast vymezená pomocí polygonů celkem 21 552 km². Pro první sezónu byl odhad hustoty populace stanoven na 1 jedince [0,75;1,4] na 100 km². Pro druhou sezónu činila 1,7 [1,1;2,6] jedinců na 100 km². Odhad početnosti byl stanoven na 341 [196;702] jedinců pro první sezónu a 510 [224;1294] jedinců pro druhou sezónu (Obr. 30). K odhadu velikosti populace byl použit model h2, který oproti nulovému modelu předpokládá nehomogenní odběr vzorků v rámci studované oblasti a přítomnost zachycených skupin (Pledger 2000).



Obr. 30: Graf znázorňující odhad velikosti populace v Západních Karpatech pomocí balíčku SECR v R. Pro obě období byl zvolen model h2 (Pledger 2000). Odhad je uveden s 95% intervalem spolehlivosti.

Testování hybridizace

Všichni testovaní jedinci byly zařazeni do kategorie vlk s hodnotou vyšší než 0,9 (Obr. 31). V testovaném datasetu jsme nenalezli jedince vykazující známky raných stádií (F1, F2 a zpětné křížení) hybridizace se psem (Obr. 31).



Obr. 31: Přiřazení jedinců do kategorií čistý vlk, čistý pes, F1 = první generace hybridizace vlka a psa, F2 = druhá generace hybridů, backcross_vlk = zpětný kříženec hybrida a vlka, backcross_pes = zpětný kříženec hybrida a psa.

Diskuse

Odběr vzorků a amplifikace genetických markerů

V minulosti byly do studií zahrnuty údaje o početnosti vlků pouze pro některé oblasti Slovenska (Findo & Chovancová 2008; Kutal et al. 2017; Interreg V-A SK-CZ 2019). Tato práce poskytla rozsáhlá data pro areál vlka na celém Slovensku zpracováním více než tisíce neinvazivních vzorků.

Filtrováním kvality dat z neinvazivních vzorků odebraných pro tuto studii neprošla podobná proporce vzorků jako v jiných podobných studiích (Stenglein et al. 2010; Kelly et al. 2012; Agetsuma-Yanagihara et al. 2017). Zatímco vzorky odebrané na začátku zimy (listopad, prosinec) mají relativně vysokou úspěšnost amplifikace celého genotypu, vzorky odebrané na jaře mají úspěšnost amplifikace mnohem nižší. Kromě teploty může hrát roli i vlhkost, která může mít vliv při tání sněhu na konci zimy (Kelly et al. 2012; Agetsuma-Yanagihara et al. 2017). V teplejších měsících může mít na degradaci DNA kromě teploty vliv také sluneční záření (Kelly et al. 2012; Agetsuma-Yanagihara et al. 2017). V neposlední řadě může úspěšnost amplifikace ovlivnit i špatné skladování vzorku v době mezi jeho nálezem a transportem do laboratoře. Kromě nedostatečného zmrazení nebo opakovaného rozmrazení a zmrazení (Panasci et al. 2011) bylo na základě empirické zkušenosti potvrzeno, že vzorky, které nebyly skladovány podle předepsané metodiky, nebyly dostatečně kvalitní pro získání genotypu (skladování bez etanolu apod.). Mírné zvýšení úspěšnosti genotypizace ve druhé sezóně bylo pravděpodobně způsobeno vyšším podílem invazních vzorků, které mají obecně vyšší úspěšnost amplifikace DNA.

Procentuální úspěšnost však nelze mezi studii přímo porovnávat, protože mezi studii existují rozdíly v proceduře filtrování kvality dat a v definici pojmu „úspěšnost“ (např. minimální počet amplifikovaných lokusů aj.). U genetických studií CMR je třeba kvalitu dat filtrovat přísněji než např. u studií zaměřených na analýzu populační struktury, aby se omezila četnost druhého typu statistické chyby - falešně negativních výsledků při analýze identity, což byla strategie aplikovaná i u této studie.

Úspěšnost získání genotypu ze všech vzorků byla 41 %, tj. přibližně (s ohledem na předchozí odstavec) srovnatelná s jinou studií na slovenských vlčích s menším souborem dat (Rigg et al. 2014). V širším měřítku je toto číslo v porovnání s jinými studii založenými na genetickém výzkumu neinvazivních vzorků vlčí predace spíše nižší - 41 % v Marucco et al. (2009), 45,5 % v Caniglia et al. (2012), 48,5 % v Galaverni et al. (2012) a 53 % v Dufresnes et al. (2019), což je dáno výše zmíněnou strategií genetické studie CMR.

Poměr pohlaví v této studii byl 3:2 ve prospěch samců. Tento poměr pohlaví je srovnatelný s jinými studii používajícími jiný marker pro zjišťování pohlaví - 3:2,2 v Marucco et al. (2009), 2,3:2 v Mattioli et al. (2018) a 2:1.7 ve Fabri et al. (2007) vždy ve prospěch samců. Opačný poměr byl zjištěn například ve studii Skrbinšek et al. (2019) využívající stejný gen, kde byl poměr 3:2,2 ve prospěch samic, ale na menším souboru dat.

Druhové určení

Při neinvazivním odběru vzorků ve volné přírodě lze trus, moč nebo chlupy snadno zaměnit za jiný druh masožravce s výskytem ve stejné oblasti. V případě monitoringu vlka dochází nejčastěji k záměně s trusem jiných psovitých šelem, tj. lišky obecné a psa domácího, což se v několika případech potvrdilo i v této studii.

Ve studovaném souboru dat se vyskytly dva vzorky tkáně (C04_VIN02, C10_OU21), které byly považovány za legálně usmrceného vlka. Na základě analýzy jaderné DNA bylo zjištěno, že se ve skutečnosti jednalo o psa. Jako pes byl identifikován i další vzorek tkáně, v tomto případě se jednalo by tkáň z jedince usmrceného vlivem kolize s dopravním prostředkem.

Analýza identit

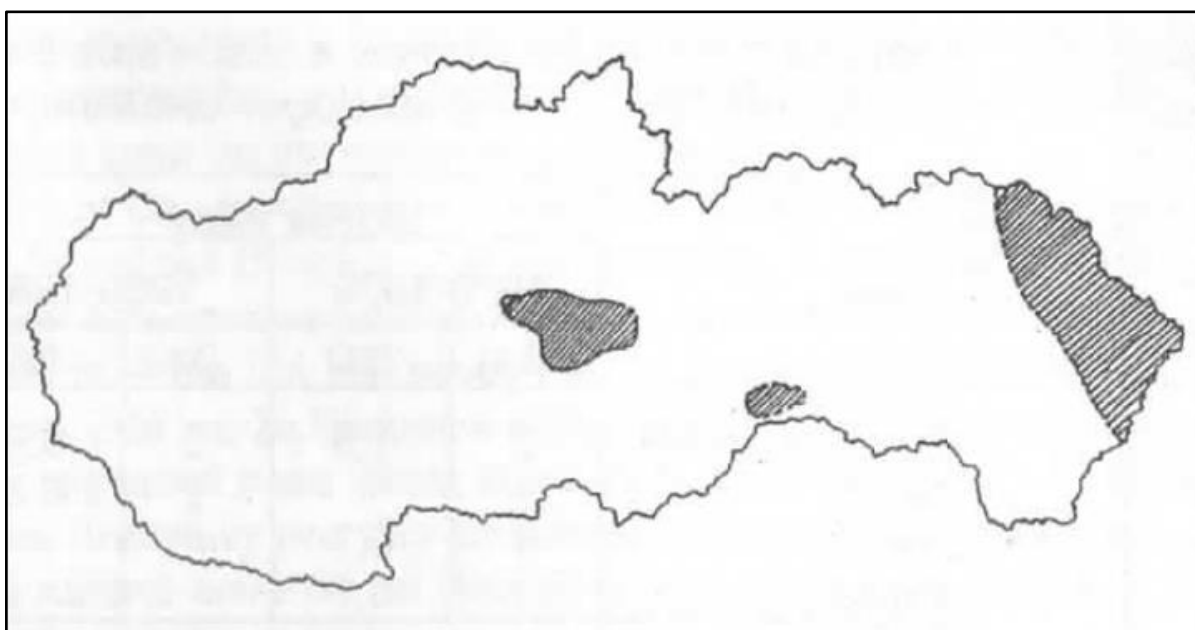
Při identifikaci jedinců je důležité zaměřit se na to, aby nedošlo k nadhodnocení nebo podhodnocení velikosti populace. Faktorem, který může velikost populace podhodnotit, je vysoký počet povolených lokusů s neshodou v přiřazení identity a naopak (Creel et al. 2003).

Hodnota PI_{SIB} byla v této studii ukazuje, že pouze 2,36 sourozenců na 10 000 jedinců může sdílet identický genotyp. Taberlet & Luikart (1999) ukazují, že hodnota PI_{SIB} stanovená v této studii je dostatečná pro analýzy metodami Capture-Mark-Recapture (CMR). Při porovnání PI_{SIB} s podobnými studiemi (Czarnomska et al. 2013; Rigg et al. 2014; Werhahn et al. 2018) o predaci vlků v posledních letech jsme zjistili, že hodnoty při stejném počtu genetických markerů korelují téměř identicky.

Výrazně vyšší počty záchyťů se objevují ve studiích, které kromě genetického monitoringu kombinují genetický monitoring s fotopastmi (Mattioli et al. 2018), které mohou dosáhnout v průměru 12 záchyťů na jedince (Mattioli et al. 2018).

Populačně genetické analýzy

Rozsáhlá analýza v celém areálu výskytu vlka obecného na Slovensku byla naposledy provedena v roce 2017 (Hulva et al. 2018). Analogicky jako v této studii byl potvrzen výskyt karpatské a středoevropské nížinné populace. V minulosti byla na Slovensku popsána tři izolovaná refugia - populace na severovýchodě Slovenska, jižní populace a středoslovenská populace v okolí Poľany (Feriancová 1955), viz Obr. 32. V současnosti se na Slovensku vyskytuje pouze jedna izolovaná populace, a to populace na severovýchodě Slovenska.



Obr. 32: Mapa zobrazující tři ostrůvky výskytu vlka na Slovensku v roce 1955, převzato z Hell et al. (2001, podle Feriancové 1995).

Výskyt karpatské a středoevropské nížinné populace byl potvrzen pomocí jaderných a mitochondriálních markerů. Haplotypy obou haploskupin jsou na území Slovenska stále přítomny, přičemž v porovnání s minulostí došlo k nárůstu lokalit haplotypů W2 (Hulva et al. 2018). Celoplošná ochrana vlků v Polsku zavedená v roce 1998 umožnila šíření středoevropské nížinné populace (Nowak & Mysłajek, 2016). Již v předchozí studii byly na Slovensku identifikovány enklávy středoevropské nížinné populace a byl zdokumentován genový tok mezi karpatskou a středoevropskou nížinnou populací (Hulva et al. 2018). Úspěšná kolonizace Slovenska nepůvodní středoevropskou nížinnou populací vlků může pravděpodobně souviset také s kvótoým lovem vlka, který probíhal do roku 2021. Během loveckých sezon bylo každoročně uloveno několik desítek jedinců, čímž docházelo k turbulentním změnám ve struktuře smeček i celé populace.

Někteří autoři uvádějí, že vlk má jako šelma s velkým areálem výskytu natolik kryptickou genetickou strukturu, že ji nelze popsat geografickými faktory (Rueness et al. 2003; Dalén et al. 2005); dále uvádějí, že spíše ekologické faktory než typ krajiny a bariéry v ní omezují mobilitu, a tedy i migraci, což dále vede k izolaci populací.

Vyčlenění východoslovenské subpopulace jako samostatné populace je typické i pro další šelmy na Slovensku, např. medvěda hnědého (Straka et al. 2012; Tkáčová 2022).

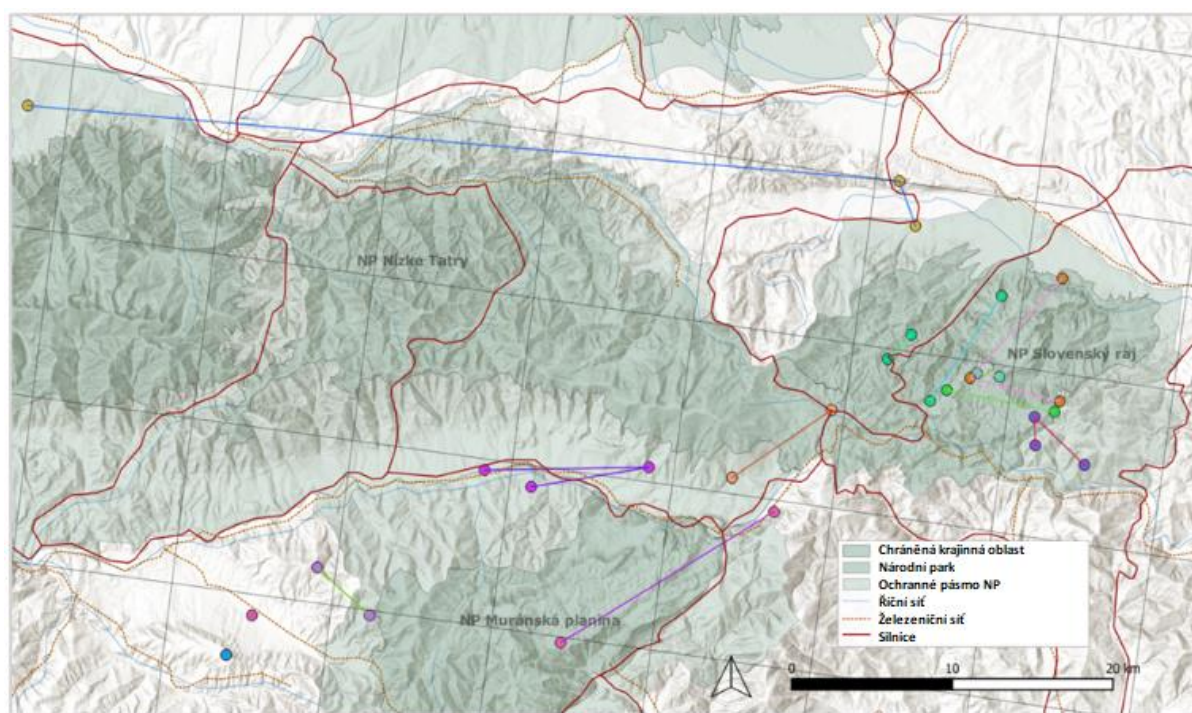
Demografické analýzy

Odhady početnosti na základě CMR modelů

V první sezóně bylo geneticky zachyceno více jedinců a míra opakovaných záchytů byla vyšší ve srovnání s druhou sezónou. To může vysvětlovat menší intervaly spolehlivosti v rámci první sezóny. Velkou roli ve vyšších intervalech spolehlivosti, ale také v rozdílných

odhadech početnosti jednotlivých populací hraje také skutečnost, že na Slovensku byly ve sledovaných letech povoleny kvóty na lov vlka. V sezóně 2017/2018 bylo legálně zastřeleno 42 jedinců (statistika Ministerstva zemědělství Slovenské republiky). V sezóně 2018/2019 to bylo 40 jedinců (statistika Ministerstva zemědělství Slovenské republiky). Do této statistiky je třeba zahrnout i jedince usmrcené na silnicích a železnicích. Díky opakovaným záchytům a jejich lokalitám jsme schopni přesně určit, které úseky na silnicích jsou kritické nejen pro šelmy, jako je vlk. Příklad můžeme najít na Obr. 33, kde vidíme úhyn jednoho jedince po srážce s automobilem. Na této silnici mezi Nízkými Tatrami a Muránskou planinou (I66) není žádný zelený most - ekodukt. Na stejném obrázku vidíme, že ve sledovaných sezónách nebyl na severní magistralé mezi Nízkými a Vysokými Tatrami (D1), která je alespoň částečně chráněna oplocením, zabit žádný vlk.

Nesprávné odhady početnosti mohou vést k nesprávné interpretaci stavu populace, což může mít důsledky pro stanovení loveckých kvót nebo ochranných opatření.



Obr. 33: Mapa zobrazuje vybraný úsek silnic spolu se záznamy o opakovaných záchytech jedinců. Každá barva představuje jednoho jedince a jeho opakované záchyty jsou vzájemně propojeny.

Efektivní velikost populace

Efektivní velikost populace je měřítkem genetické variability populace a odráží počet jedinců v populaci, kteří přispívají svými geny do další generace. Efektivní velikost populace je obvykle nižší než cenzní velikost, protože ne všichni jedinci v populaci jsou schopni přispívat stejnou měrou ke genetickému složení populace nebo se rozmnožovat. Cenzní

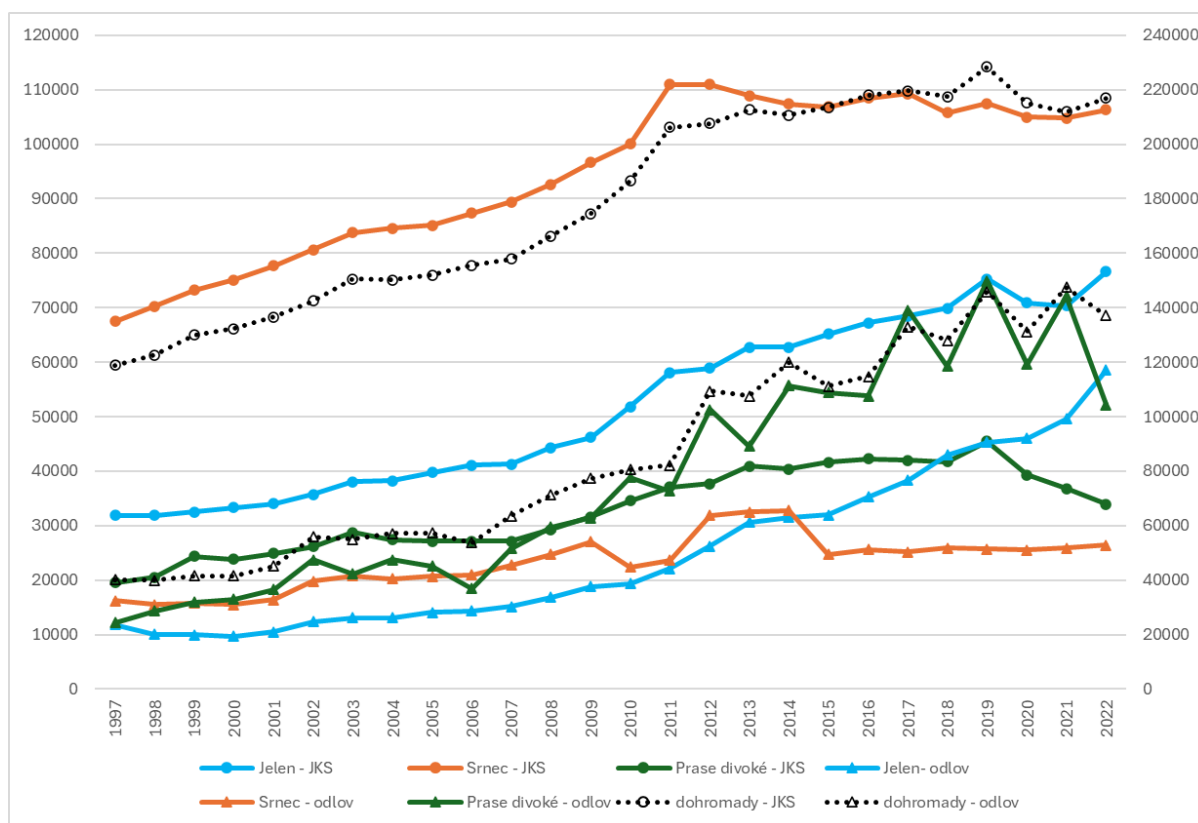
velikost populace označuje celkový počet jedinců v populaci v daném čase bez ohledu na jejich genetický příspěvek.

Mezi faktory, které mohou snížit efektivní velikost patří nerovnoměrná reprodukční úspěšnost jedinců, nerovnoměrný poměr pohlaví nebo genetický drift. Pokud je efektivní velikost populace malá, jsou frekvence alel náchylnější ke změnám v důsledku genetického driftu, což způsobuje ztrátu genetické rozmanitosti (Wright 1931). V případě této studie je efektivní velikost nižší než cenzní velikost, což je velmi pravděpodobně způsobeno velkým nárůstem populace z malého počtu zvířat během posledních desetiletí (Voskar 1976; Hell et al. 2001). Efektivní velikost populace je také ovlivněna vychýleným poměrem pohlaví ve prospěch samců.

Analýza životaschopnosti populace

Prognóza životaschopnosti populace vlka obecného založená na průměrných hodnotách populačních parametrů zahrnuje i scénáře s poklesem populační velikosti, což není překvapivé vzhledem k malé efektivní velikosti populace.

Jedním z faktorů, které ovlivňují velikost populace je nosná kapacita prostředí. Růst populací volně žijících živočichů je limitován zdroji prostředí, např. dostupností potravy nebo vhodností habitatu a vnitrodruhovými interakcemi, např. teritorialitou. V potravě vlka na území Slovenska dominují volně žijící kopytníci, především srnec obecný (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758), jelen evropský (*Cervus elaphus* Linnaeus, 1758) nebo prase divoké (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) (Kutal et al. 2023). Na základě sledování jarních kmenových stavů se populace kopytníků zvětšují, především populace jelena evropského (Štatistický úrad Slovenskej republiky 2024; Obr. 34). Dostupnost potravy pravděpodobně nebude limitujícím faktorem ovlivňujícím velikost populace vlka, nicméně v lokálním měřítku se situace může lišit.



Obr. 34: Graf zobrazující jarní kmenové stavy (JKS) a roční odlovy vybraných druhů kopytníků. Hlavní svislá osa zobrazuje JKS a počet odlovů jednotlivých druhů, vedlejší svislá osa zobrazuje JKS a počet odlovů dohromady za daný rok (Štatistický úrad Slovenskej republiky 2024).

Pravděpodobně nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím velikost populace a její vztah k nosné kapacitě prostředí jsou vnitrodruhové interakce a autoregulační procesy (Cariappa et al. 2011). Populace vlků, které nejsou ovlivňovány lovem, jsou stabilnější a jejich denzity nejsou v porovnání s lovenými populacemi vyšší (Rutledge et al. 2010). Naopak se při loveckém manažmentu populací zvyšuje počet mláďat ve vrhu. Vlivem lovu dále dochází ke fragmentaci populace, což může vést z vyššímu počtu rozmnožujících se samic (Bryan et al., 2015; Haber, 1996). Vrcholoví predátoři dokáží udržovat rovnováhu v ekologických sítích, což je klíčovým faktorem pro udržení stabilních ekosystémů. Přirozené autoregulační mechanismy navíc zajišťují i stabilitu v početnosti jejich populací (Wallach et al. 2015).

Na Slovensku dochází ke křížení karpatské populace se středoevropskou nížinnou populací. To může souviset se source-sink dynamikou způsobenou odstřely v jádru karpatské populace ve srovnání s celoroční ochranou středoevropské nížinné populace. Důsledky tohoto procesu se nedají dobře predikovat - může dojít k postupnému splývání obou populací, ale obě populace si také mohou zachovat určitou míru samostatnosti i přes přítomný genový tok. Obdobná situace byla zdokumentována na území Šumavy v Česku, kde dochází ke křížení středoevropské nížinné a alpské populace (Hulva et al. 2024). Efekty na fitness populací rovněž mohou představovat teoretickou škálu od heterozního efektu po outbrední depresi, např. díky rozrušení adaptací na příslušné habitaty (hory vs. nížina).

Populační hustota

Odhady velikosti vlčí populace v západních Karpatech pomocí balíčku CAPWIRE jsou v dobré shodě s odhady získanými pomocí balíčku SECR. Výsledky druhé sezóny v této studii jsou v dobré shodě se studií vlků na polském území sdílejícím severozápadní hranici (Orava a Kysuce). V tomto případě byla populační hustota stanovena na 1,9 [1,7;2,1] jedinců na 100 km² v létě a 1,6 [1,3;1,9] jedinců na 100 km² v zimě (Nowak et al. 2008). Rozsah výskytu vlků v západních Karpatech vytvořený polygonem v balíčku SECR na základě genetických záchytů však neodráží skutečné rozšíření v této oblasti. Přestože je vlk z hlediska výběru stanovišť poměrně přizpůsobivý, vyhýbá se silně pozměněným, fragmentovaným a lidmi hustě osídleným oblastem (Boitani 2000). Z tohoto důvodu lze předpokládat, že skutečný areál výskytu v západních Karpatech je menší než zjištěný areál o rozloze 21 552 km².

Hybridizace

Tato studie nenalezla na území Slovenska rané fáze hybridizace a tedy významný genový tok mezi vlkem a psem. Studium hybridizace s použitím mikrosatelitů je statisticky obtížné (Randi et al. 2014). Např. vlk má 39 párů chromozomů, přičemž obvyklý počet mikrosatelitních lokusů používaných při neinvazivním monitoringu bývá menší. Proto je nutné interpretovat výsledky klastrovacích analýz s opatrností a zaměřit se na detekci potenciálních raných stádií hybridizace (F1, F2 a zpětné křížení). Výskyt falešně pozitivních výsledků (statistická chyba typu I) je u analýz se středním počtem mikrosatelitů běžný (Randi et al. 2014).

Navíc existuje problém s interpretací případných jedinců dispergujících z geneticky odlišných populací, které nejsou zastoupeny v klastrových analýzách, kteří mohou být falešně interpretováni jako hybridy (Ravagni et al. 2020).

Tyto metodologické obtíže jsou řešitelné pomocí genomických metod, které byly však nad finanční rozvrh stávajícího projektu a jsou řešeny samostatně. Nicméně výsledky jsou v souladu s většinou nových studií které v Evropě nenalézají intenzivní hybridizaci vlka se psem (Smeds et al. 2010). Příčiny jsou komplexní, patří mezi ně řada biologických i etologických bariér mezi domestikovanou a divokou formou vlka, řídký výskyt ferálních populací psů mimo některé oblasti Mediteránu, neschopnost řídce vznikajících F1 hybridů předat dále genetický materiál aj.

Poděkování

Studie byla vypracována na základě dat, jejichž vznik byl financován ze zakázky “Zisťovanie početnosti veľkých šeliem a zisťovanie stupňa hybridizácie vlka dravého na základe analýz DNA.” Tato zakázka byla součástí projektu “Realizácia programov starostlivosti o veľké šelmy na Slovensku.” Sběr vzorků v terénu zajistila Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky (ŠOP SR).

Podíl autorů

Převážná část laboratorních analýz a zpracování chromatogramů byla provedena Mgr. Lenkou Veselovskou, přispěli i Mgr. Kamila Valentová a Mgr. Klára Demjanovičová, pod vedením doc. Pavla Hulvy a dr. Barbory Černé Bolfíkové. Demografické a populačně genetické analýzy byly provedeny týmem autorů pod vedením doc. Pavla Hulvy.

Reference

- Abdi H, Williams LJ. 2010. Principal component analysis. *WIREs Computational Statistics* **2**:433-459.
- Anderson E C, Thompson E A. 2002. A Model-Based Method for Identifying Species Hybrids Using Multilocus Genetic Data. *Genetics*. **160**:1217–1229.
- Agetsuma Y, Inoue E, Agetsuma N. 2017. Effects of time and environmental conditions on the quality of DNA extracted from fecal samples for genotyping of wild deer in a warm temperate broad-leaved forest. *Mammal Research* **62**:201-207.
- Bakan J, Lavadinovic V, Popovic Z, Paule L. 2014. Genetic differentiation of grey wolf population (*Canis lupus*) from Balkan and Carpathians. *Balkan Journal of Wildlife Research* **1**:87-93.
- Benschop C, Haned H, Sijen T. 2013. Consensus and pool profiles to assist in the analysis and interpretation of complex low template DNA mixtures. *International Journal of Legal Medicine* **127**:11-23.
- Boitani L. 2000. Action Plan for the Conservation of wolves in Europe (*Canis lupus*). Council of Europe, Strasbourg.
- Boitani L. 2003. Wolf conservation and recovery. Pages 317-340 in Mech LD, Boitani L, editors. *Wolves: behavior, ecology, and conservation*. University of Chicago Press, Chicago.
- Boitani L, Phillips M, Jhala Y. 2018. *Canis lupus* (errata version published in 2020). The IUCN Red List of Threatened Species **8235**:e.T3746A163508960.
- Boitani L, Kaczensky P, Alvares F, Andrén H, Balys V, Blanco JC, Chapron G, Chiriack S, Cirovic D, Drouet-Houguet N, Groff C, Huber D, Iliopoulos Y, Ionescu O, Kojola I, Krofel M, Kutal M, Linnell J, Majic A, Mannil P, Marucco F, Melovski D, Mengüllüoğlu D, Mergeay J, Nowak S, Ozolins J, Perovic A, Rauer G, Reinhardt I, Rigg R, Salvatori V, Sanaja B, Schley L, Shkvyria M, Sunde P, Tirronen K, Trajce A, Trbojevic I, Trouwborst A, von Arx M, Wolf M, Zlatanova D, Patkó L. 2022. Assessment of the conservation status of the Wolf (*Canis lupus*) in Europe Convention On The Conservation Of European Wildlife And Natural HabitatS Standing Committee 42nd meeting 28 November - 2 December, Strasbourg. Large Carnivore Initiative for Europe & Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission with assistance of the Istituto Ecologia Applicata, Roma.
- Breen M, Hitte C, Lorentzen TD, Thomas R, Cadieu E, Sabacan L, Scott A, Evanno G, Parker HG, Kirkness EF, Hudson R, Guyon R, Mahairas GG, Gelfenbeyn B, Fraser CM, Andre C, Galibert F, Ostrander EA. 2004. An integrated 4249 marker FISH/RH map of the canine genome. *BMC Genomics* **5**:65.
- Bryan HM, Smits JEG, Koren L, Paquet PC, Wynne-Edwards KE, Musiani M. 2015. Heavily hunted wolves have higher stress and reproductive steroids than wolves with lower hunting pressure. *Functional Ecology* **29**: 347–356.
- Caballero A. 1994. Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* **73**: 657-679.

- Caniglia R, Fabbri E, Cubaynes S, Gimenez O, Lebreton JD, Randi E. 2012. An improved procedure to estimate wolf abundance using non-invasive genetic sampling and capture-recapture mixture models. *Conservation Genetics* **13**:53-64.
- Caniglia R, Fabbri E, Hulva P, Černá Bolfíková B, Jindřichová M, Vik Stronen A, Dykyy I, Camatta A, Carnier P, Randi E, Galaverni M. 2018. Wolf outside, dog inside? The genomic make-up of the Czechoslovakian Wolfdog. *BMC Genomics* **19**: 533.
- Cariappa CA, Oakleaf JK, Ballard WB, Breck SW. 2011. A reappraisal of the evidence for regulation of wolf populations. *The Journal of Wildlife Management* **75**: 726–730.
- Chapron G, Kaczensky P, Linnell J, von Arx M, Huber D, Andrén H, López-Bao J, Adamec M, Álvares F, Anders O, Balčiauskas L, Balys V, Bedó P, Bego F, Blanco J, Breitenmoser U, Brøseth H, Bufka L, Bunikyte R, Ciucci P, Dutsov A, Engleder T, Fuxjäger C, Groff C, Holmala K, Hoxha B, Iliopoulos Y, Ionescu O, Jeremić J, Jerina K, Kluth G, Knauer F, Kojola I, Kos I, Krofel M, Kubala J, Kunovac S, Kusak J, Kutal M, Liberg O, Majjić A, Männil P, Manz R, Marboutin E, Marucco F, Melovski D, Mersini K, Mertzanis Y, Mysłajek RW, Nowak S, Odden J, Ozolins J, Palomero G, Paunović M, Persson J, Potočnik H, Quenette PY, Rauer G, Reinhardt I, Rigg R, Ryser A, Salvatori V, Skrbinšek T, Stojanov A, Swenson J, Szemethy L, Trajçe A, Tsingarska-Sedefcheva E, Váňa M, Veeroja R, Wabakken P, Wölfl M, Wölfl S, Zimmermann F, Zlatanova D, Boitani L. 2014. Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science* **346**:1517-1519.
- Charlesworth B. 2009. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics* **10**: 195-205.
- Cimatti M, Ranc N, Benítez-López A, Maiorano L, Boitani L, Cagnacci F, Čengić M, Ciucci P, Huijbregts MAJ, Krofel M, López-Bao JV, Selva N, Andren H, Bautista C, Čirović D, Hemmingmoore H, Reinhardt I, Marenče M, Mertzanis Y, Pedrotti L, Trbojević I, Zetterberg A, Zwiłacz-Kozica T, Santini L. 2021. Large carnivore expansion in Europe is associated with human population density and land cover changes. *Diversity and Distributions* **27**:602-617.
- Ciucci P, Reggioni W, Maiorano L, Boitani L. 2009. Long-Distance Dispersal of a Rescued Wolf From the Northern Apennines to the Western Alps. *Journal of Wildlife Management* **73**:1300-1306.
- Ciucani M, Palumbo D, Galaverni M, Serventi P, Fabbri E, Ravegnini G, Angelini S, Maini E, Davide P, Caniglia R, Cilli E. 2019. Old wild wolves: Ancient DNA survey unveils population dynamics in Late Pleistocene and Holocene Italian remains. *PeerJ* **7**:e642.
- Creel S, Spong G, Sands JL, Rotella J, Zeigle J, Joe L, Murphy KM, Smith D. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone non-invasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* **12**:2003-2009.
- Czarnomska SD, Jędrzejewska B, Borowik T, Niedziałkowska M, Stronen AV, Nowak S, Mysłajek RW, Okarma H, Konopiński M, Pilot M, Śmietana W, Caniglia R, Fabbri E, Randi E, Pertoldi C, Jędrzejewski W. 2013. Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics* **14**:573-588.

- Dalén L, Fuglei E, Hersteinsson P, Kapel CM, Roth JD, Samelius G, Tannerfeldt M, Angerbjörn A. 2005. Population history and genetic structure of a circumpolar species: the arctic fox. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**:79-89.
- Diserens TA, Borowik T, Nowak S, Szewczyk M, Niedźwiecka N, et al. 2017. Deficiencies in Natura 2000 for protecting recovering large carnivores: A spotlight on the wolf (*Canis lupus*) in Poland. *PLOS ONE* **12**:1-20.
- Dufresnes C, 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.
- Efford MG. 2011. SECR: spatially explicit capture–recapture models. R package version 2.1.0. <http://cran.r-project.org/i>.
- Efford MG, Fewster RM. 2013. Estimating population size by spatially explicit capture–recapture. *Oikos* **122**:918-928.
- Efford MG, Dawson D, Jhala Y, Qureshi Q. 2015. Density-dependent home-range size revealed by spatially explicit capture–recapture. *Ecography* **39**:676-688.
- Efford MG, Boulanger J. 2019. Fast evaluation of study designs for spatially explicit capture-recapture. *Methods in Ecology and Evolution* **10**:1529-1535.
- Efford MG. 2023. SECR: Spatially explicit capture-recapture models. R package version 4.5.10, <https://CRAN.R-project.org/package=secr>.
- Eggert LS, Maldonado JE, Fleischer RC. 2005. Nucleic acid isolation from ecological samples Animal Scat and Other Associated Materials *Methods in Enzymology* **395**:73-87.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**:2611-2620.
- Fabrizi E, Caniglia R, Mucci N, Thomsen HP, Krag K, Pertoldi C, Loeschcke V, Randi E. 2012. Comparison of single nucleotide polymorphisms and microsatellites in non-invasive genetic monitoring of a wolf population. *Archives Biological Science* **64**:321-335.
- Fabrizi E, Miquel C, Lucchini V, Santini A, Caniglia R, Duchamp C, Weber JM, Lequette B, Marucco F, Boitani L, Fumagalli L, Taberlet P, Randi E. 2007. From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology* **16**:1661-1671.
- Fehér P, Krisztián F, Gombkötő P, Rigg R, Bedő P, Újváry D, Stéger V, Szemethy L. 2022. The origin and population genetics of wolves in the north Hungarian mountains. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* **102**:5-6.
- Feriancová Z. 1955. Rozšírenie niektorých vzácnych druhov cicavcov na Slovensku. *Práce II.sekcie SAV, ser. biologická* **1**:1-40.

- Fernández-Gil A, Cadete Da Rocha Pereira D, Dias Ferreira Pinto SM, Di Silvestre I. 2018. Large Carnivore Management Plans of Protection: Best Practices in EU Member (study). European Parliament (EU), Brussels.
- Find'o S, Chovancova B. 2004. Home ranges of two wolf packs in the Slovak Carpathians. *Folia Zoologica* **53**:17-26.
- Find'o S, Rigg R, Skuban M. 2008. The wolf in Slovakia. Pages 15-24 in Kotal M, Rigg R, editors. Perspectives of wolves in Central Europe: Proceedings from the conference held on 9th April 2008 in Malenovice, Beskydy Mts., Czech Republic. Hnutí DUHA Olomouc, Olomouc, CD-ROM.
- Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, Neal CL, Ostrander EA. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* **7**:359-362.
- Frankham R, Bradshaw C, Brook B. 2014. Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* **170**: 56-63.
- Fredholm M, Wintero AK. 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome* **6**:11-18.
- Gagneux P, Boesch C, Woodruff DS. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* **6**:861-868.
- Galaverni M, Palumbo D, Fabbri E, Caniglia R, Greco C, Randi E. 2012. Monitoring wolves (*Canis lupus*) by non-invasive genetics and camera trapping: A small-scale pilot study. *European Journal of Wildlife Research* **58**:47-58.
- Galpern P, Manseau M, Hettinga P, Smith K, Wilson P. 2012. ALLELEMATCH: An R package for identifying unique multilocus genotypes where genotyping error and missing data may be present. *Molecular Ecology Resources* **12**:771-778.
- Godinho R, Llaneza L, Blanco J C, Lopes S, Álvares F, Garcia EJ, Palacios V, Cortés Y, TALEGÓN 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.
- Gottelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum G.D, 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.
- Guyon R, Lorentzen TD; Hitte C, Kim L, Cadieu E, Parker HG, Quignon P, Lowe JK, Renier C, Gelfenbeyn B, Vignaux F, Defrance HB, Gloux S, Mahairas GG, Andre C, Galibert F, Ostrander EA, 2003. A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:5296-5301.
- Haber GC. 1996. Biological, Conservation, and Ethical Implications of Exploiting and Controlling Wolves. *Conservation Biology* **10**.
- Hausknecht R, Gula R, Pirga B, Kuehn R. 2006. Urine a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Molecular Ecology Notes* **7**:208-212.

- Hell P, Slamečka J, Gašparík J. 2001. Vlk v slovenských Karpatoch a vo svete. PaRPRESS, Bratislava.
- Hindrikson M, Remm J, Pilot M, Godinho R, Stronen AV, Baltrūnaitė L, Czarnomska SD, Leonard JA, Randi E, Nowak C, Åkesson M, López-Bao JV, Álvares F, Llaneza L, Echegaray J, Vilà C, Ozolins J, Rungis D, Aspi J, Paule L, Skrbinšek T, Saarma U. 2017. Wolf Population Genetics in Europe: A Systematic Review, Meta-Analysis and Suggestions for Conservation and Management. *Biological Reviews* **92**:1601-1629.
- Hoban S, Bruford M, D'Urban Jackson J, Lopes-Fernandes M, Heuertz M, Hohenlohe PA, Paz-Vinas I, Sjögren-Gulve P, Segelbacher G, Vernesi C, Aitken S, Bertola LD, Rodríguez-Correa H, Funk WCH, Grueber CE, Hunter ME, Jaffe R, Liggins L, Mergeay J, Moharrek F, O'Brien D, Ogden R, Palma-Silva C, Pierson J, Ramakrishnan U, Simo-Droissart M, Tani N, Waits L, Laikre L. 2020. Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 global biodiversity framework must be improved. *Biological Conservation* **248**: 108654.
- Huck M, Jędrzejewski W, Borowik T, Miłosz-Cielma M, Schmidt K, Jędrzejewska B, Nowak S, Mysłajek RW. 2010 Habitat suitability, corridors and dispersal barriers for large carnivores in Poland. *Acta Theriologica* **55**:177-192.
- Hulva P, Černá Bolfíková B, Woznicová V, Jindřichová M, Benešová M, Mysłajek RW, Nowak S, Szewczyk M, Niedźwiecka N, Figura M, Hájková A, Sándor AD, Zyka V, Romportl D, Kutal M, Find'oS, Antal V. 2018. Wolves at the crossroad: fission-fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe. *Diversity and Distributions* **24**:179-192.
- Hulva P, Collet S, Baránková L, Valentová K, Šrutová J, Bauer H, Gahbauer M, Mokry J, Romportl D, Smith A F, Vorel A, Zýka V, Nowak C, Černá Bolfíková B, Heurich M. 2024. Genetic admixture between Central European and Alpine wolf populations. *Wildlife Biology*
- Ichikawa Y, Takahashi Y, Tsumagari S, Takeishi M, Ishihama K, Morita M, Kanemaki M, Minezawa M, Takahashi H. 2002. Identification and characterization of 40 dinucleotide microsatellites in the dog genome. *Animal Genetics* **33**:400-401.
- Interreg V-A SK-CZ. 2019. Koordinácia ochrany, monitoringu a manažmentu západokarpatskej populácie vlka dravého a rysa ostrovida na česko-slovenskom pomedzí: Štúdiá s odporúčaniami pre starostlivosť o veľké šelmy v cezhraničnom regióne SR-ČR. 304021D016.
- Jamieson IG, Allendorf FW. 2012. How does the 50/500 rule apply to MVPs? *Trends in ecology & evolution* vol. **27**: 578-584.
- Jansson E, Harmoinen J, Ruokonen M, Aspi J. 2014. Living on the edge: Reconstructing the genetic history of the Finnish wolf population. *BMC Evolutionary Biology* **14**:64.
- Jędrzejewski W, Branicki W, Veit C, Medugorac I, Pilot M, Bunevich AN, Jędrzejewska B, Schmidt K, Theuerkauf J, Okarma H, Gula R, Szymura L, Forster M. 2005. Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves (*Canis lupus*). *Acta Theriologica* **50**:3-22.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**:1099-1106.

- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. GENEIOUS Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**:1647-1649.
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB. 2014. Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLOS ONE*. **9**:e86175.
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. 2015. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* **15**:1179-1191.
- Krebs CJ. 2009. *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. 6th ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Kutal M, Belotti E, Volfová J, Mináriková T, Bufka L, Plednik L, Krojerová-Prokešová J, Bojda M, Váňa M, Kutalová L, Beneš J, Flousek J, Tomášek V, Kafka P, Poledníková K, Pospíšková J, Dekar P, Machciník B, Koubek P, Duľa M. 2017. Výskyt velkých šelem – rysa ostrovida (*Lynx lynx*), vlka obecného (*Canis lupus*) a medvěda hnědého (*Ursus arctos*) – a kočky divoké (*Felis silvestris*) v České republice a na západním Slovensku v letech 2012–2016 (Carnivora). *Lynx - Mammaliologický časopis* **48**:93-107.
- Kutal M, Duľa M, Royer Selivanova A, López-Bao JV. 2023. Testing a conservation compromise: No evidence that public wolf hunting in Slovakia reduced livestock losses. *Conservation Letters* **17**: e12994.
- Laake J, Borchers D, Thomas L, Miller D, Bishop J. 2022. mrds: Mark-Recapture Distance Sampling. Comprehensive R Archive Network (CRAN), <https://CRAN.R-project.org/package=mrds>.
- Laurenson K, Sillero-Zubiri C, Thompson H, Shiferaw F, Thirgood S, Malcolm J. 1998. Disease as a threat to endangered species: Ethiopian wolves, domestic dogs and canine pathogens. *Animal Conservation*. **1**: 273–280.
- Lee SM, Chao A. 1994. Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models. *Biometrics* **50**:88-97.
- Li YL, Liu JX. 2018. STRUCTURE SELECTOR: a web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources* **18**:176-177.
- Lingaas F, Aarskaug T, Gerlach JA, Juneja RK, Fredholm M, Sampson J, Suter N, Holmes NG, Binns MM, Ryder EJ, Van Haeringen WA, Venta PJ, Brouillette JA, Yuzbasiyan-Gurkan V, Wilton AN, Bredbacka P, Koskinen M, Dunner S, Parra D, Schmutz S, Schelling C, Schläpfer J, Dolf G. 2001. A canine linkage map: 39 linkage groups. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **118**:3-20.
- Linnell J, Salvatori V, Boitani L. 2008. Guidelines for population level management plans for large carnivores in Europe. A Large Carnivore Initiative for Europe report prepared for the European Commission (contract 070501/2005/424162/MAR/B2).

- Linnell JDC, Boitani L. 2012. Building biological realism into wolf management policy: the development of the population approach in Europe. *Hystrix – Italian Journal of Mammalogy* **23**:80-91.
- López-Bao JV, Fleurke F, Chapron G, Trouwborst A. 2018. Legal obligations regarding populations on the verge of extinction in Europe: Conservation, restoration, recolonization, reintroduction. *Biological Conservation* **227**:319-325.
- Luikart G, Ryman N, Tallmon DA, Schwartz MK, Allendorf FW. 2010. Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conservation Genetics* **11**: 355-373.
- Mariat D, Kessler JL, Vaiman D, Panthier JJ. 1996. Polymorphism characterization of five canine microsatellites. *Animal Genetics* **27**:434-435.
- Marucco F, Pletscher DH, Boitani L, Schwartz MK, Pilgrim KL, Lebreton JD. 2009. Wolf survival and population trend using noninvasive capture–recapture techniques in the Western Alps. *Journal of Applied Ecology* **46**:1003-1010.
- Marucco F, Pilgrim KL, Avanzinelli E, Schwartz MK, Rossi L. 2022. Wolf dispersal patterns in the Italian Alps and implications for wildlife diseases spreading. *Animals* **12**:1260.
- Mattioli L, Canu A, Passilongo D, Scandura M, Apollonio M. 2018. Estimation of pack density in grey wolf (*Canis lupus*) by applying spatially explicit capture–recapture models to camera trap data supported by genetic monitoring. *Frontiers in Zoology* **15**:38.
- McCrea RS, Morgan BJT. 2014. Analysis of capture–recapture data. Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.
- McKelvey KS, Schwartz MK. 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *The Journal of Wildlife Management* **68**:439-448.
- Meijer T, Noren K, Hellstrom P, Dalen L, Angerbjorn A. 2008. Estimating population parameters in a threatened arctic fox population using molecular tracking and traditional field methods. *Animal Conservation* **11**:330-338.
- Miller CR, Joyce P, Waits LP. 2005. A new method for estimating the size of small populations from genetic mark–recapture data. *Molecular Ecology* **14**:1991-2005.
- Nichols JD. 1992. Capture–recapture models: using marked animals to study population dynamics. *BioScience* **42**:94-102.
- Nowak S, Mysłajek RW, Jędrzejewska B. 2008. Density and demography of wolf (*Canis lupus*) population in the western-most part of the Polish Carpathian Mountains, 1996-2003. *Folia Zoologica* **57**:392-402.
- Nowak S, Mysłajek RW. 2016. Wolf recovery and population dynamics in Western Poland, 2001–2012. *Mammal Research* **61**:83–98.
- Ostrander EA, Sprague GF Jr, Rine J. 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics* **16**:207-213.

- Otis DL, Kenneth P, White GC, Anderson D. 1978. Statistical inference from capture data on closed animal populations. *Wildlife Monographs* **62**:3-135.
- Panasci M, Ballard WB, Breck S, Rodriguez D, Densmore LD, Wester DB, Baker RJ. 2011. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. *The Journal of Wildlife Management* **75**:1616-1624.
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**:288-295.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* **28**:2537-2539.
- Pennell MW, Stansbury CR, Waits LP, Miller CR. 2013. Capwire: a R package for estimating population census size from non-invasive genetic sampling. *Molecular Ecology Resources* **13**:154-157.
- Pennell MW, Miller CR. 2015. CAPWIRE: Estimates population size from non-invasive sampling - R package version 1.1.4. <http://cran.nexr.com/web/packages/capwire/capwire.pdf>.
- Pilot M, Branicki W, Jędrzejewski W, Goszczyński J, Jędrzejewska B, Dykyy I, Shkvryra M, Tsingarska E. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Ecology and Evolution* **10**:104.
- Pilot M, Dąbrowski MJ, Hayrapetyan V, Yavruyan EG, Kopaliani N, Tsingarska E, Bujalska B, Kamiński S, Bogdanowicz W. 2014. Genetic variability of the grey wolf (*Canis lupus*) in the Caucasus in comparison with Europe and the Middle East: distinct or intermediary population? *PLoS One* **9**:e93828.
- Pilot M, Greco C, von Holdt BM, Jędrzejewska B, Randi E, Jędrzejewski W, Sidorovich VE, Ostrander EA, Wayne RK. 2014. Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in European wolves. *Heredity* **112**:428-442.
- Pilot M, Jędrzejewski W, Branicki W, Sidorovich VE, Jędrzejewska B, Stachura K, Funk SM. 2006. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology* **15**:4533-4553.
- Pledger S. 2000. Unified maximum likelihood estimates for closed capture-recapture models using mixtures. *Biometrics* **56**:434-442.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-959.
- Prugh LR, Ritland CE, Arthur SM, Krebs CJ. 2005. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology* **14**:1585-1595.
- Puechmaille SJ. 2016. The program STRUCTURE does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources* **16**:608-627.

- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [http://www R-project org/](http://www.R-project.org/).
- 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 × dog hybridization in Italy, and guidelines for marker selection. *PLoS ONE* **9**:e86409.
- Ravagni S, Sanchez-Donoso I, Vilà C. 2020. Biased assessment of ongoing admixture using STRUCTURE in the absence of reference samples. *Molecular Ecology Resources* **3**: 677-689.
- Rhymer JM, Simberloff D. 1996. Extinction by hybridisation and introgression. *Annual Review in Ecology Systematics*. **27**: 29–44.
- Rigg R, Skrbínšek T, Linnell J. 2014. Engaging hunters and other stakeholders in a pilot study of wolves in Slovakia using non-invasive genetic sampling. Report to DG Environment, European Commission, Bruxelles.
- Rivest LP, Baillargeon S. 2022. Rcapture: Loglinear Models for Capture-Recapture Experiments. Comprehensive R Archive Network (CRAN), <https://CRAN.R-project.org/package=Rcapture>.
- Roffler G, Waite J, Pilgrim K, Zarn K, Schwartz M. 2019. Estimating abundance of a cryptic social carnivore using spatially explicit capture–recapture. *Wildlife Society Bulletin* **43**:31-41.
- Rueness EK, Jorde PE, Hellborg L, Stenseth NC, Ellegren H, Jakobsen KS. 2003. Cryptic population structure in a large, mobile mammalian predator: the Scandinavian lynx. *Molecular Ecology* **12**:2623-2633.
- Rutledge LY, Patterson BR, Mills KJ, Loveless KM, Murray DL, White BN. 2010. Protection from harvesting restores the natural social structure of eastern wolf packs. *Biological Conservation* **143**: 332–339.
- Salvatori V, Okarma H, Ionescu O, Dovhanych Y, Find'o S, Boitani L. 2002b. Hunting legislation in the Carpathian Mountains: implications for the conservation and management of large carnivores. *Wildlife Biology* **8**:3-10.
- Samojlik T, Selva N, Daszkiewicz P, Fedotova A, Wajrak A, Kuijper DPJ. 2018. Lessons from Białowieża Forest on the history of protection and the world's first reintroduction of a large carnivore. *Conservation Biology* **32**:808-816.
- Seber GAF. 1986. A Review of Estimating Animal Abundance. *Biometrics* **42**:267-292.
- Shibuya H, Collins BK, Huang TH, Johnson GS. 1994. A polymorphic (AGGAAT)in tandem repeat in an intron of the canine von Willebrand factor gene. *Animal Genetics* **25**:122.
- Schwartz M, Tallmon D, Luikart G. 1998. Review of DNA-based census and effective population size estimators. *Animal Conservation* **1**: 293-299.

Skrbinšek T, Jelenčič M, Boljte B, Konec M, Erich M, Iosif R, Iasmina M, Promberger B. 2019. Report on analysis of genetic samples collected in 2017 – 2018 on brown bears (*Ursus arctos*), Eurasian lynx (*Lynx lynx*) and grey wolf (*Canis lupus*) in a pilot area in Southern Carpathians, Romania.

Smetanová M, Černá Bolfíková B, Randi E, Caniglia R, Fabbri E, Galaverni M, Kutal M, Hulva P. 2015. From wolves to dogs, and back: Genetic composition of the Czechoslovakian wolfdog. PLoS ONE. **10** e0143807.

Solberg K, Bellemain E, Drageset OM, Taberlet P, Swenson J. 2006. An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. Biological Conservation **128**:158-168.

Smeds L, Aspi J, Berglund J, Kojola I, Tirronen K, Ellegren H. 2021. Whole-genome analyses provide no evidence for dog introgression in Fennoscandian wolf populations. Evolutionary applications **14**: 721-734.

Stanley T, Richards J. 2005. Software review: a program for testing capture-recapture data for closure. Wildlife Society Bulletin **33**:782-785.

Stenglein JL, Waits LP, Ausband DE, Zager P, Mack CM. 2010. Efficient, noninvasive genetic sampling for monitoring reintroduced wolves. Journal of Wildlife Management **74**:1050-1058.

Stenglein JL, Waits LP, Ausband DE, Zager P, Mack CM. 2011. Estimating gray wolf pack size and family relationships using noninvasive genetic sampling at rendezvous sites, Journal of Mammalogy **92**:784-795.

Straka M, Paule L, Ionescu O, Štofík J, Adamec M. 2012. Microsatellite diversity and structure of Carpathian brown bears (*Ursus arctos*): Consequences of human caused fragmentation. Conservation Genetics **13**:153–164.

Sved JA, Cameron EC, Gilchrist AS. 2013. Estimating effective population size from linkage disequilibrium between unlinked loci: theory and application to fruit fly outbreak populations. PLoS One **8**:e69078.

Szewczyk M, Nowak S, Niedźwiecka N, Hulva P, Špinkytė-Bačkaitienė R, Demjanovičová K, Bolfíková BČ, Antal V, Fenchuk V, Figura M, Tomczak P, Stachyra P, Stępiak KM, Zwijacz-Kozica T, Mysłajek RW. 2019. Dynamic range expansion leads to establishment of a new, genetically distinct wolf population in Central Europe. Scientific Reports **9**:19003.

Szewczyk M, Nowak C, Hulva P, Mergeay J, Stronen A, Černá Bolfíková B, Czarnomska S, Diserens T, Fenchuk V, Figura M, Groot A, Haidt A, Hansen M, Jansman H, Kluth G, Kwiatkowska I, Lubińska K, Michaux J, Niedźwiecka N, Mysłajek RW. 2021. Genetic support for the current discrete conservation unit of the Central European wolf population. Wildlife Biology **2021**(2).

Štatistický úrad Slovenskej republiky. 2024. "DATAcube". <<https://datacube.statistics.sk>>

Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. Nucleic Acids Research **24**:3189-3194.

- Taberlet P, Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**:41-55.
- Tkáčová N. 2022. Molekulární demografie medvěda hnědého v Západních Karpatech [MSc. Thesis]. Univerzita Karlova, Praha.
- Tumendemberel O, Zedrosser A, Proctor MF, Reynolds HV, Adams JR, Sullivan JM, Jacobs SJ, Khorloojav T, Tserenbataa T, Batmunkh M, Swenson JE, Waits LP. 2019. Phylogeography, genetic diversity, and connectivity of brown bear populations in Central Asia. *PLOS ONE* **14**:e0220746.
- Valière N. 2002. GIMLET: A computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* **2**:377-379.
- Vila C, Amorim IR, Leonard JA, Posada D, Castroviejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall KA, Ellegren H, Wayne RK. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf (*Canis lupus*). *Molecular Ecology* **8**:2089-2103.
- Vilà C, Walker C, Sundqvist AK, Flagstad Ø, Andersone Z, Casulli A, Kojola I, Valdmann H, Halverson J, Ellegren H. 2003. Combined use of maternal, paternal and biparental genetic markers for the identification of wolf–dog hybrids. *Heredity*. **90**: 17–24.
- Voskár J. 1976. Príspevok k problematike ochrany vlka (*Canis lupus*) na Slovensku. *Lynx - Mammaliologický časopis* **18**: 99-107.
- Voskár J. 1993. Ekológia vlka obyčajného (*Canis lupus*) a jeho podiel na formovaní a stabilite karpatských ekosystémov na Slovensku. *Ochrana prírody* **12**:241-276.
- Waits LP, Luikart G, Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* **10**:249-256.
- Wallach AD, Izhaki I, Toms JD, Ripple WJ, Shanas U. 2015. What is an apex predator? *Oikos* **124**: 1453–1461.
- Waples RS. 1991. Genetic methods for estimating the effective size of cetacean populations. Report of the International Whaling Commission **13**:279-300.
- Waples RS. 2005. Genetic estimates of contemporary effective population size: to what time periods do the estimates apply? *Molecular Ecology* **14**:3335-3352.
- Waples RS, Do C. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* **8**:753-756.
- Waples RS. 2015. Testing for Hardy–Weinberg Proportions: Have We Lost the Plot? *Journal of Heredity* **106**:1-19.
- Waples RK, Larson WA, Waples RS. 2016. Estimating contemporary effective population size in non-model species using linkage disequilibrium across thousands of loci. *Heredity* **117**:233-40.

Werhahn G, Senn H, Ghazali M, Karmacharya D, Sherchan A, Joshi J, Kusi N, López-Bao JV, Rosen T, Kachel S, Sillero C, Macdonald D. 2018. The unique genetic adaptation of the Himalayan wolf to high-altitudes and consequences for conservation. *Global Ecology and Conservation* **16**:e00455.

Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**:97-159.

Zedrosser A, Dahle B, Swenson JE, Gerstl N. 2001. Status and management of the brown bear in Europe. *Ursus* **12**: 9-20.