

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Andrea Hájková

**Neutrální genetická variabilita a struktura populací kamzíka horského
na Slovensku**

Neutral genetic variability and structure in chamois populations in Slovakia

Diplomová práce

Školitel: Prof. RNDr. Jan Zima, DrSc.

Konzultantky: Mgr. Petra Hájková Ph.D., Mgr. Barbora Zemanová

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 6. 2011

Pod'akovanie



Na tomto mieste by som sa rada poďakovala môjmu školiteľovi prof. RNDr. Janovi Zimovi, DrSc. za odborné vedenie, konzultácie a odporúčania počas vzniku tejto práce. Taktiež moja veľká vďaka patrí konzultantke Mgr. Petre Hájkovej, Ph.D. za odborné vedenie v laboratóriu, pri spracovaní výsledkov, mnohé cenné rady a pripomienky. Mgr. Barbore Zemanovej a Mgr. Janovi Zimovi ml. ďakujem za pomoc v laboratóriu a pri genotypizácii. Za zasvätenie do niektorých programov k analýze dát ďakujem Mgr. Petrovi Mikulíčkovi, Ph.D., Doc. Mgr. et Mgr. Josefovi Bryjovi, Ph.D. a Mgr. Natálii Martínkovej, Ph.D. Bc. Jozefovi Ružinskému ďakujem za vytvorenie programu na porovnávanie genotypov jednotlivých opakovaní PCR a celkovú podporu najmä technického rázu. V neposlednom rade by som rada poďakovala celému kolektívu pracovníkov z Oddělení populační biologie Ústavu biologie obratlovců Akademie věd ČR, v.v.i. v Studenci za vytvorenie veľmi dobrých podmienok a príjemného pracovného prostredia pre prácu v laboratóriu a počas analýz.

Osobitne chcem poďakovať našim spolupracovníkom, strážcom a zoológom z jednotlivých národných parkov za poskytnutie vzoriek tkanív, krvi, srsti a trusu. Táto práca by nemohla vzniknúť bez pomoci Miroslava Lehockého, Mgr. Jozefa Kormančika a Ing. Vladimíra Muchu zo Správy Národného parku Slovenský raj, ďalej Miroslava Brezovského, Juraja Ksiažeka a Bc. Milana Ballu zo Správy Tatranského národného parku, Ing. Barbary Chovancovej, Ph.D. zo Štátnych lesov Tatranského národného parku, Ing. Stanislava Ondruša z Národného parku Nízke Tatry, RNDr. Petra Bačkora, Ph.D. z Fakulty prírodných vied Univerzity Mateja Bela v Banskej Bystrici, Ing. Márie Boďovej a Ľudovíta Remeníka zo Správy Národného parku Veľká Fatra. Za poskytnutie fotografií a podkladov pre spracovanie máp ďakujem Miroslavovi Brezovskému, Jurajovi Ksiažekovi a Mgr. Jozefovi Kormančikovi.

Otcovi Ing. Bedřichovi Hájkovi ďakujem za obetavú prácu pri koordinácii terénnych prác a získavaní vzoriek, ďalej za motiváciu k zoológii a vedeckej práci, výskumu živočíchov a ich ochrane.

Ešte raz ďakujem všetkým, ktorí akýmkoľvek spôsobom prispeli k vzniku mojej diplomovej práce.

Táto práca vznikla s finančnou podporou Grantové Agentury Akademie věd České republiky (grant č. IAA600930609).

OBSAH

1. Úvod	1
1.1 Systematické zaradenie a ochranársky status, biológia a ekológia kamzíka	2
1.2 Populácie kamzíkov na Slovensku.....	5
1.2.1 Kamzík vrchovský tatranský.....	6
1.2.2 Kamzík vrchovský alpský.....	10
1.3. Ochránárska genetika	15
1.3.1 Evolúcia v malých populáciách	16
1.3.2 Mikrosatelity a ich využitie pri štúdiu populačno-genetickej štruktúry.....	19
1.3.3 Neinvazívna genetická metóda.....	19
1.4 Genetická variabilita a štruktúra populácií kamzíka v Európe.....	21
1.5 Ciele diplomovej práce.....	22
2. Materiál a metódy	24
2.1 Charakteristika skúmaných území.....	24
2.2 Získavanie a skladovanie vzoriek.....	26
2.3 Laboratórne analýzy.....	29
2.3.1 Izolácia DNA	29
2.3.2 PCR a fragmentačná analýza	29
2.4 Analýza dát.....	30
3. Výsledky	32
3.1 Genetická variabilita	32
3.2 Genetická štruktúra populácií a detekcia hybridizácie	35
3.3 Detekcia bottlenecku a odhady efektívnej veľkosti populácií	38
4. Diskusia	40
4.1 Genetická variabilita	40
4.2 Genetická štruktúra populácií a detekcia hybridizácie	42
4.3 Detekcia bottlenecku a odhady efektívnej veľkosti populácií	44
5. Súhrn	46
Literatúra	47
Prílohy	62

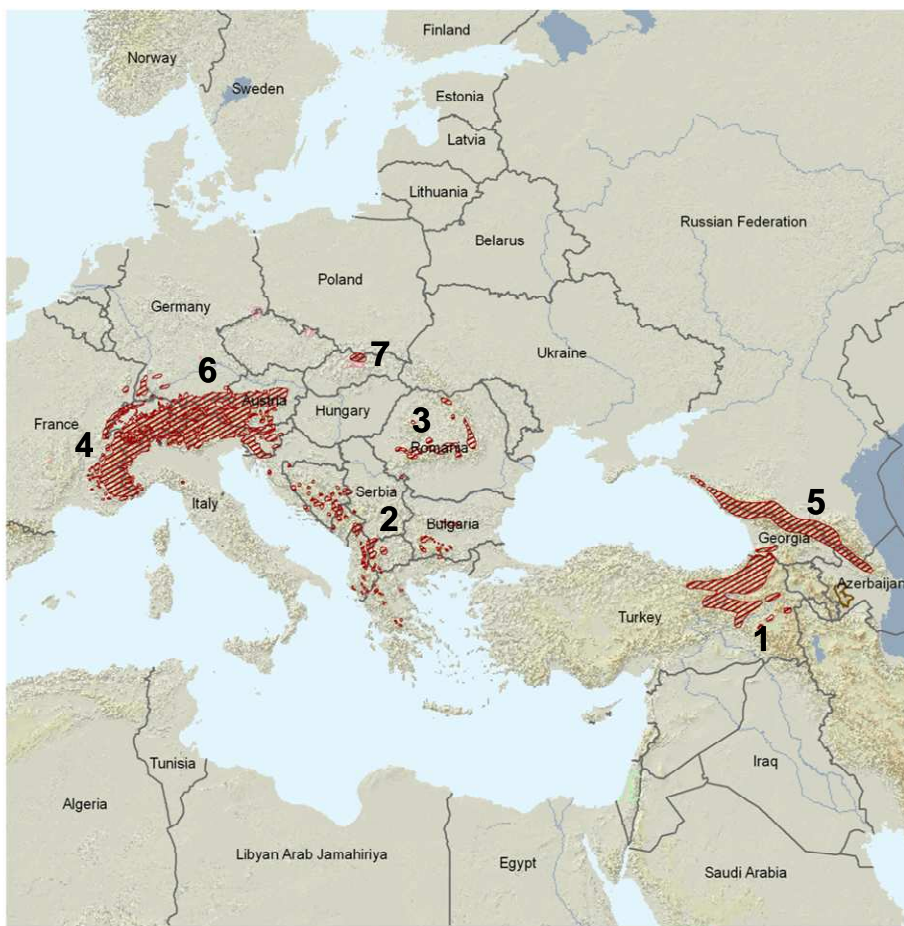
1. ÚVOD

Kamzík vrchovský (*Rupicapra rupicapra* Linnaeus, 1758) je najpočetnejším druhom horského kopytníka žijúceho v Európe a na Blízkom Východe. Hoci ako druh nie je ohrozený a dosahuje celkovej početnosti až 250-350 tis. (CORLATTI et al. 2011), viacero poddruhov žije v malých izolovaných populáciách. Takýmto poddruhom je aj kamzík vrchovský tatranský (*Rupicapra rupicapra tatrica* Blahout, 1972), ktorý sa prirodzene vyskytuje len na území Vysokých, Západných a Belianskych Tatier na Slovensku (ďalej v texte len Vysoké Tatry) a v časti poľských Tatier. Tento poddruh je považovaný za kriticky ohrozený (AULAGNIER et al. 2008) a jeho ochrane i výskumu je na Slovensku venovaná veľká pozornosť. V rámci ochranárskych opatrení bol kamzík vrchovský tatranský v 70. rokoch minulého storočia introdukovaný do oblasti Nízkych Tatier. Zároveň však ešte pred popisom samostatného poddruhu bol na dve územia na Slovensku, do Veľkej Fatry a Slovenského raja, introdukovaný kamzík vrchovský alpský (*Rupicapra rupicapra rupicapra*). Nepriaznivý demografický vývoj autochtónnej populácie tatranského kamzíka vo Vysokých Tatrách, spolu s introdukciami kamzíkov do oblastí Nízkych Tatier, Veľkej Fatry a Slovenského raja, vytvorili pomerne komplikovanú situáciu. Vo Vysokých Tatrách došlo v priebehu minulého storočia k dvom výrazným poklesom početnosti, nasledovaným dlhodobou nízkymi stavmi a až na začiatku 21. storočia začala početnosť opäť narastať. Na území Nízkych Tatier, ktoré susedia s Veľkou Fatrou a Slovenským rajom, môže zase potenciálne dochádzať k hybridizácii medzi tatranským a alpským poddruhom. V tejto situácii môžu významné poznatky priniesť genetické metódy. Zistenie genetickej variability a štruktúry populácií, detekcia prípadnej hybridizácie, odhady efektívnej veľkosti populácií a analýza demografickej histórie na základe genetických markerov môžu výrazne prispieť k ochrane i plánovaniu managementových opatrení pre populácie kamzíka vrchovského na Slovensku.

1.1 Systematické zaradenie a ochranársky status, biológia a ekológia kamzíka



Systematické zaradenie a ochranársky status





Kamzík vrchovský (*Rupicapra rupicapra*) patrí do tribu Rupicaprini, podčeľade Caprinae, čeľade Bovidae, radu Cetartiodactyla. V súčasnosti sa rozlišuje sedem poddruhov kamzíka vrchovského: *R. r. asiatica*, *R. r. balcanica*, *R. r. carpatica*, *R. r. cartusiana*, *R. r. caucasica*, *R. r. rupicapra* a *R. r. tatrica* (obr. 1). Okrem autochtónnych populácií bol poddruh *R. r. rupicapra* introdukovaný i na Nový Zéland, do Českej republiky, na Slovensko a do Argentíny (CORLATTI et al. 2011). V tejto práci sa zaoberám dvoma poddruhmi kamzíka vrchovského: kamzíkom vrchovským alpským (introdukované populácie), a najmä kamzíkom vrchovským tatranským (autochtónna a introdukovaná populácia), ktorý bol opísaný ako samostatný poddruh v roku 1972 Milíčom Blahoutom (BLAHOUT 1972). Rozdiely vymedzujúce kamzíka vrchovského tatranského sú kvantitatívne – lebkové miery, telesné rozmery, hmotnosť; a tiež kvalitatívne – tvar fontanely, letné sfarbenie srsti (BLAHOUT 1975, 1976). Správnosť zaradenia bola neskôr potvrdená na morfolologickej (HRABĚ & KOUBEK 1984, KOUBEK & HRABĚ 1984, ZIMA et al. 1990) a čiastočne aj genetickej úrovni (JURDÍKOVÁ & HAMMER 2001, PÉREZ et al. 2002, RANDI et al. 2002, CRESTANELLO et al. 2003, HAMMER et al. 2003). Kamzík vrchovský tatranský je v Červenom zozname IUCN (IUCN Red List of Threatened Species) klasifikovaný ako kriticky ohrozený (angl. „critically endangered“) v kategórii C2a (menej ako 200 dospelých jedincov, klesajúci populačný trend, iba jedna populácia) (AULAGNIER et al. 2008). Kamzík vrchovský (ako druh) je v Červenom zozname IUCN klasifikovaný ako „najmenej znepokojujúci“ (angl. „least concern“) (AULAGNIER et al. 2008; obr. 1). Ďalším poddruhom uvedeným v tomto zozname je *R. r. cartusiana* (endemický poddruh z Massif de la Chartreuse, Francúzske Alpy), ktorý je zaradený do kategórie „zraniteľný“ (angl. „vulnerable“) (AULAGNIER et al. 2008).



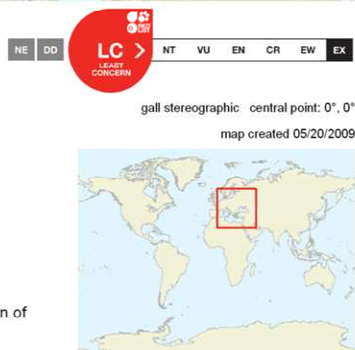
Rupicapra rupicapra

range type

-  Introduced
-  Native (resident)

-  national boundaries
-  subnational boundaries
-  lakes, rivers, canals
-  salt pans, intermittent rivers

data source:
IUCN (International Union for Conservation of Nature)



European Regional Assessment

- 1** *R. r. asiatica* **2** *R. r. balcanica* **3** *R. r. carpatica* **4** *R. r. cartusiana*
5 *R. r. caucasica* **6** *R. r. rupicapra* **7** *R. r. tatrica*

Obz. 1. Rozšírenie kamzíka vrchovského a jeho zaradenie v medzinárodnom červenom zozname (IUCN Red List). Upravené podľa IUCN, stiahnuté 19. 5. 2011, <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/39255/0/rangemap>.

Ďalším druhom kamzíka vyskytujúceho sa v Európe je kamzík stredozemný, *Rupicapra pyrenaica*, s tromi poddruhmi: *R. p. pyrenaica*, *R. p. ornata*, *R. p. parva*. Na základe najnovších výsledkov genetických analýz rodu *Rupicapra* niektorí autori (CRESTANELLO et al. 2009, RODRÍGUEZ et al. 2010) navrhujú poddruh *R. p. ornata* povýšiť na samostatný druh, *Rupicapra ornata*. Kamzík stredozemný je v Červenom zozname IUCN zaradený do kategórie „najmenej znepokojujúci“ (angl. „least concern“), ale poddruh *R. p. ornata* do kategórie „zraniteľný“ (angl. „vulnerable“) (HERRERO et al. 2008). Tento poddruh prešiel v minulosti výrazným znížením početnosti (menej než 100 jedincov na konci 40. rokov minulého storočia), ale vďaka prísnej ochrane, chovu v zajatí a reintrodukciám bola jeho početnosť zvýšená až na 800 jedincov v roku 2003 (BOITANI et al. 2003) a v súčasnosti je odhadovaná až na 1100 jedincov (HERRERO et al. 2008).

Biológia a ekológia kamzíka vrchovského

Kamzík vrchovský využíva biotopy alpínskeho až subalpínskeho pásma vysokohorského prostredia, ideálne s vápencovým alebo dolomitovým podložíom. V lepšej orientácii a pohybe v náročnom teréne mu pomáhajú očné výčnelky vysunuté do strán, robustnejšie kosti, predĺžené zadné končatiny a tiež špeciálne prispôsobené ratice (HÁJKOVÁ 2007). Zväčšením veľkosti srdcového svalu sa kamzík adaptoval na vzduch s nižším obsahom kyslíka (BLAHOUT 1976). Osrstie zabezpečuje dokonalú izoláciu pred nepriaznivými klimatickými vplyvmi. Typickými znakmi kamzíkov sú háčikovito zahnuté rohy s blízko ležiacimi pachovými žľazami. Trofickú základňu predstavujú trávnaté a bylinné porasty horských lúk krátkeho vegetačného obdobia s pomerne malou druhovou diverzitou potravy. Závažnými ochoreniami ovplyvňujúcimi život a početnosť kamzíkov je infekčná slepota (DEGIORGIS et al. 2000, GIACOMETTI et al. 2002) a prašivina (FERNANDEZ-MORAN et al. 1997, ROSSI et al. 2007). Významný je aj vplyv parazitov, najmä pľúcnych a gastrointestinálnych nematód (ŠTEFANČÍKOVÁ et al. 1999, SATTLEROVÁ-ŠTEFANČÍKOVÁ 2005). Negatívny vplyv na populácie kamzíkov majú aj aktivity človeka, najmä rozširujúci sa turistický ruch, horolezectvo, skialpinizmus, vysokohorská turistika, záchranné a vyhliadkové lety, paragliding (INGOLD et al. 1993, GAŠINEC 2002). Významným negatívnym faktorom je ilegálny lov (GAŠINEC 2002, LOVARI 2002).

Základnou sociálnou jednotkou kamzíkov je črieda. Kamzice väčšinu roka, okrem obdobia rodenia mláďat, žijú v čriedach spolu s nedospelými jedincami. Dospelí samci vytvárajú menšie skupinky, oddelene od samíc; starší samci sú väčšinou samotári. Početnosť čried sa pohybuje od 2-3 jedincov až po 12-15, výnimočne aj viac (BLAHOUT 1976). Ruja prebieha na jeseň, v októbri až decembri (BLAHOUT 1976, RADÚCH & KARČ 1981, LOVARI & LOCATI 1991). Gravidita trvá šesť mesiacov a mláďatá (1-2) sa rodia v máji – júni (BLAHOUT 1976, RUCKSTUHL & INGOLD 1999).

1.2 Populácie kamzíkov na Slovensku

Na Slovensku sa vyskytujú dva poddruhy – kamzík vrchovský tatranský (*Rupicapra rupicapra tatrica*) a kamzík vrchovský alpský (*Rupicapra rupicapra rupicapra*). Jedinou autochtónnou populáciou je populácia kamzíka vrchovského tatranského na území Vysokých Tatier. Introdukovaná populácia kamzíka vrchovského tatranského žije v Nízkych Tatrách. Okrem toho bol na územie Slovenska introdukovaný kamzík vrchovského alpský do Veľkej Fatry a Slovenského raja (HÁJKOVÁ 2007; obr. 2).



Obr. 2. Rozšírenie kamzíka vrchovského na území Slovenska.

1.2.1 Kamzík vrchovský tatranský

Vysoké Tatry

Kamzík vrchovský tatranský žije ako pôvodný poddruh len vo Vysokých Tatrách, vrátane Západných a Belianskych Tatier a ich poľskej časti. Z geografického hľadiska predstavuje najsevernejšiu časť areálu prirodzeného výskytu kamzíkov v Európe. Najstarší literárny údaj o tatranských kamzíkoch pochádza z roku 1517 (KOVÁČ 2002). Na základe historických údajov (najmä o poľovníckych a pytliackych aktivitách) možno usudzovať, že až do 17. storočia bola početnosť kamzíkov v Tatrách relatívne vysoká (BOHUŠ 1957). V 18. storočí sa životné podmienky kamzíkov značne zhoršili, najmä z dôvodu rozvoja pastierstva a pytliactva (BOHUŠ 1957). Z konca 19. storočia pochádza odhad početnosti približne 1000 jedincov (BOHUŠ 1959, JANIGA & ZÁMEČNÍKOVÁ 2002). Výrazný vplyv na tatranskú populáciu mala 1. svetová vojna, kedy v roku 1912 bolo ešte približne 1600 kamzíkov, ale už v roku 1922 bola ich početnosť odhadovaná len na 300 jedincov (BOHUŠ 1957). Za hlavný dôvod bola považovaná „kríza, uvoľnená morálka, nedostatočný dozor a prítomnosť vojenských oddielov vo Vysokých Tatrách, ktoré viedli k obnovenému rozvoju pytliactva“ (BOHUŠ 1959). Tento drastický úbytok vyvolal výrazné ochranárske úsilie (zákaz lovu na dobu 10 rokov) a v roku 1931 už bola početnosť odhadovaná v rozmedzí 800-900 jedincov (KOMÁREK 1931). Populácia naďalej rástla, napr. z roku 1932 je udávaná početnosť 1249 jedincov (BOHUŠ 1972). V roku 1935 bol v časopise *Lovec* publikovaný anonymný údaj o početnosti 1705 jedincov (BOHUŠ 1957), ktorý predstavuje najvyššiu početnosť v recentnej histórii tatranskej populácie. Je však pravdepodobné, že je nadhodnotený, keďže podľa udaného počtu kamzíkov boli vydávané povolenia k lovu. Podľa NĚMCA (1938) bola v roku 1936 reálna početnosť vysokotatranskej populácie približne 1300 jedincov a v roku 1938 už len 800 - 850 jedincov. Jedným z významných dôvodov poklesu početnosti mohol byť rozmáhajúci sa turistický ruch, najmä nový druh športu – lyžovanie, ktoré výrazne rušilo kamzíky v náročnom zimnom období. Tomu nasvedčujú aj najvyššie straty, uvádzané z okolia Popradského a Štrbského plesa, kde bolo lyžovanie najviac rozšírené (NĚMEC 1938).

Prelomovým obdobím bola 2. svetová vojna, s ešte väčším dopadom na zníženie početnosti ako predošlá. Hoci v roku 1939 nariadil krajinský úrad zastavenie odstrelu kamzíkov, reprezentačné poľovačky Slovenského štátu, nárast pytliactva počas vojnových rokov a prítomnosť hitlerovských vojenských oddielov v poslednej fáze

vojny zapríčinili značné škody (BOHUŠ 1972). Z roku 1950 CHUDÍKOVÁ & CHUDÍK (1978) uvádzajú početnosť kamzíkov len 164 jedincov. Iné odhady z povojnového obdobia uvádzajú 230-250 jedincov (CHUDÍK 1968, KOREŇ et al. 2001). Z vojnového šoku sa kamzíčia populácia začala zotavovať až po vyhlásení Tatranského národného parku v roku 1949 (KOREŇ et al. 2001). Z roku 1964 je už udávaná početnosť až 944 jedincov (CHUDÍK 1968), čo bol až do roku 2011 najvyšší stav od obdobia 2. svetovej vojny. V rokoch 1966-1973 sa početnosť pohybovala okolo 500-700 jedincov (CHUDÍK 1968, 1974). V ďalších rokoch početnosť mierne klesala a v roku 1995 bola odhadovaná už len na 408 jedincov (HELL & CHOVANCOVÁ 1995).

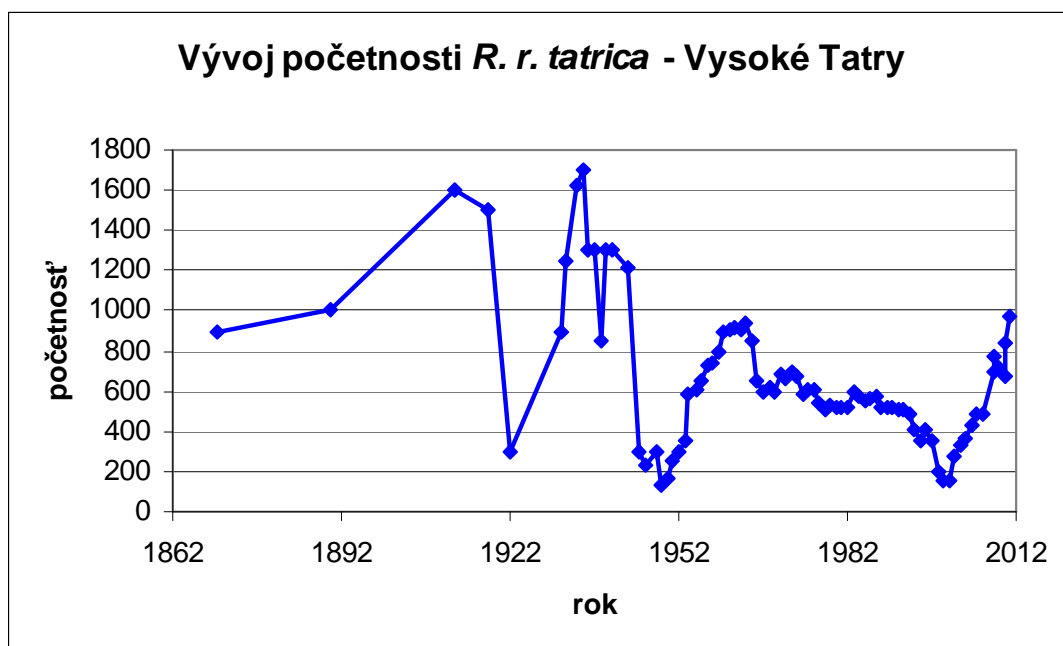
Konkrétne dôvody poklesu početnosti vysokotatranskej populácie nie sú známe, ale diskutovalo sa o viacerých faktoroch. Jedným z nich môže byť letecká doprava – turistické vyhliadkové a záchranné lety vrtuľníkom vyvolávajú v čriedach paniku a môžu zapríčiniť pád a zranenie kamzíkov (GAŠINEC 2002). Stres spôsobený turistickým ruchom (osobitne skialpinizmom a horolezectvom), spolu s nedodržiavaním sezónnych uzáverov alpínskej zóny, vyrušuje kamzíky v senzitívnom období (párenie, pôrody) a spôsobuje zmeny v dennej aktivite (CHUDÍK 1969). Ďalšími faktormi môžu byť zmenená veková štruktúra a odchýlky v pomere pohlaví spôsobené selektívnym lovom ako aj série nepriaznivého počasia počas zimy a obdobia rozmnožovania (CHOVANCOVÁ & GÖMÖRY 1999, CHOVANCOVÁ 2009). Za veľmi významný faktor je považované pytliactvo (GAŠINEC 2002). Diskutuje sa aj o vplyve veľkých predátorov (medveď, vlk, rys), ktorí môžu príležitostne uloviť aj kamzíka (RADÚCH 2002a, CHOVANCOVÁ 2009).

V roku 1998 CHOVANCOVÁ & GÖMÖRY (1999) uvádzajú početnosť už len približne 200 jedincov na slovenskej a asi 80 jedincov na poľskej strane Tatranského národného parku (TANAP). Táto kritická situácia viedla k vypracovaniu Projektu záchrany kamzíka vrchovského tatranského na roky 2001-2005. Dokument obsahoval analýzu súčasného stavu, hodnotenie faktorov ohrozenia i doterajšej ochrany a navrhol opatrenia na zlepšenie stavu (KOREŇ et al. 2001). Hlavnými cieľmi tohto projektu bol monitoring početnosti kamzíka a jeho stráženie, a tiež zvýšenie informovanosti užívateľov regiónu Tatier (RADÚCH 2002b).

Súčasťou projektu záchrany bol pravidelný monitoring populácie. Preto sú z tohto obdobia k dispozícii relatívne podrobné údaje o početnosti, a z niektorých rokov i o štruktúre populácie (napr. o počte tohoročných mláďat), ktoré boli priebežne zverejňované formou tlačových správ na web stránke www.kamzik.sk (oficiálna

webová stránka projektu). Po skončení projektu boli údaje o pravidelných sčítaniach (väčšinou 2x ročne) zverejňované na web stránke Správy Tatranského národného parku www.spravatanap.org. Pri sčítaní na jar roku 2001 bolo zistených 286 jedincov, pričom z tohto počtu bolo len 48 mláďat (údaje sa vždy týkajú celkovej početnosti, vrátane poľskej časti). V júni 2002 bola zistená početnosť 333 jedincov, ale napríklad z jesene 2005 je udávaná početnosť až 486 jedincov (vrátane 62 mláďat). Početnosť populácie sa i naďalej postupne zvyšovala – napríklad v júli 2008 bolo napočítaných 701 jedincov (vrátane 114 mláďat) a v októbri 2010 841 jedincov. Najnovší údaj o početnosti pochádza z júla 2011, kedy bolo pri sčítaní zaznamenaných 967 jedincov (z toho 98 samcov, 238 samíc, 149 tohtoročných mláďat, 84 minuloročných mláďat - tzv. háčikarov a 398 neurčených; www.spravatanap.org).

V posledných rokoch teda došlo k zastaveniu kritického poklesu početnosti a v súčasnosti je možné pozorovať jej pomerne výrazný nárast (obr. 3). K tomuto priaznivému trendu pravdepodobne najvýraznejšie prispela intenzívna strážna činnosť v teréne a pravidelný monitoring populácie, a možno i niektoré ďalšie opatrenia (revitalizácia kamzíčích biotopov, udržiavanie zriadených solísk, apod.). Podľa práce CHOVANCOVÁ (2009) však naďalej pretrváva nepriaznivá štruktúra populácie v prospech samíc a mladých jedincov. Tiež z hľadiska natality a mortality je stav populácie hodnotený ako priemerný až nepriaznivý (vysoká mortalita mláďat a ročných jedincov; CHOVANCOVÁ 2009).



Obr. 3. Vývoj početnosti populácie kamzíka vrchovského tatranského vo Vysokých Tatrách.

Nízke Tatry

Okrem autochtónnej populácie vo Vysokých Tatrách žije na území Slovenska kamzík vrchovský tatranský ešte v Nízkych Tatrách. Táto populácia vznikla introdukciou z vysokotatranskej populácie. V skutočnosti však nejde o introdukciu, ale presnejšie reštitúciu, keďže kamzík vrchovský tatranský sa v tomto pohorí historicky vyskytoval (nález lebiek a iných fragmentov kostrových zvyškov z jaskýň Demänovská ľadová jaskyňa a Medvedia jaskyňa z obdobia posledného glaciálu až staršieho holocénu; OBUCH 1977, 1981). V práci však naďalej používam pojem introdukovaná populácia. K prvému neúspešnému pokusu introdukcie kamzíka vrchovského tatranského z Vysokých Tatier do Nízkych Tatier došlo už v roku 1935, kedy tu bolo vypustených 12 kamzíkov, dva jedince však uhynuli následkom prepravy a zvyšok zlikvidovali rysy (BOHUŠ 1957, HRNČIAR 1972).

V 60.-70. rokoch minulého storočia sa opäť začalo uvažovať nad introdukciou kamzíka vrchovského tatranského. Hlavným dôvodom bolo vytvoriť náhradnú životaschopnú populáciu pre prípad kritického ohrozenia vysokotatranskej populácie v dôsledku neovplyvniteľných nepriaznivých faktorov (BLAHOUT 1968, HELL & CHOVANCOVÁ 1995). V roku 1967 bol vypracovaný „Návrh na vysadenie tatranských kamzíkov v iných horstvách Slovenska“ (BLAHOUT 1968, VELIČ 1981). Pre realizáciu projektu bolo z troch území (Nízke Tatry, Veľká Fatra, Malá Fatra) vybrané územie Nízkych Tatier, z dôvodu najvhodnejších podmienok – nadmorská výška, klimatické podmienky, konfigurácia terénu (VELIČ 1981). Odchyt jedincov vo Vysokých Tatrách a ich vypustenie v Nízkych Tatrách prebehlo v rokoch 1969 až 1976. V roku 1969 bolo do aklimatizačnej zverničky v Lomnistej doline vypustených 12 kamzíkov (päť samcov, štyri dospelé a tri subadultné samice) (ŠPROCHA 1976, VELIČ 1981). V roku 1970 bolo vypustených ďalších osem jedincov (samíc). V rokoch 1972-1974 bola v každom roku vypustená jedna ďalšia kamzica, v roku 1975 tri samce a v roku 1976 posledné štyri jedince – traja samci a jedna samica (HRNČIAR 1972, ŠPROCHA 1976, RADÚCH & KARČ 1983, HELL & CHOVANCOVÁ 1995, ONDRUŠ 2002). Spolu bolo teda vypustených 30 jedincov, ktoré sa úspešne začali rozmnožovať a rozširovať areál (RADÚCH & KARČ 1983). Vývoj početnosti populácie v nasledujúcich rokoch mal klasický priebeh sigmoidnej krivky: populácia v rokoch 1969 až 1980 mala vyrovnanú stúpajúcu tendenciu bez výraznejších výkyvov (exponenciálny rast) a v roku 1980 dosiahla početnosť 121 jedincov (HELL & CHOVANCOVÁ 1995). V ďalších rokoch početnosť

kolísala v rozmedzí 100-120 jedincov a v rokoch 1986-1995 sa populácia stabilizovala na odhadovanom počte 120 – 140 jedincov (RADÚCH & KARČ 1983, ONDRUŠ 2002). Maximum, až 150 jedincov, je uvádzané z roku 1989 (ONDRUŠ 2002). V nasledujúcich rokoch sa početnosť pohybovala v rozmedzí 120-140 jedincov, ale v roku 1999 poklesla na približne 100 jedincov (ONDRUŠ 2002). Z roku 2000 je udávaná početnosť 105-115 jedincov (ONDRUŠ 2002). Ohady početnosti z rokov 2003-2009 sú dostupné v publikáciách BAČKOR & VELIČ (2008) a BAČKOR & URBAN (2009). Najaktuálnejší údaj je 97 jedincov v roku 2009 (BAČKOR & URBAN 2009). Vývoj početnosti populácie znázorňuje obr. 4.



Obr. 4. Vývoj početnosti populácie kamzíka vrchovského tatranského v Nízkych Tatrách.

Hoci populácia kamzíka v Nízkych Tatrách nie je zaradená do Červeného zoznamu IUCN, jej ochrane bola venovaná dostatočná pozornosť na úrovni slovenskej legislatívy. Poddruh kamzík vrchovský tatranský (bez rozlíšenia populácií) je uvedený ako chránený vo Vyhláske MŽP SR č. 24/2003 k Zákonu NR SR č. 543/2002 o ochrane prírody a krajiny (BAČKOR & URBAN 2009). V národnom červenom zozname je zaradený do kategórie kriticky ohrozený druh (ŽIAK & URBAN 2001).

1.2.2 Kamzík vrchovský alpský

Skôr než bol opísaný tatranský poddruh kamzíka (BLAHOUT 1972), na Slovensku sa uskutočnili dve introdukcie kamzíkovo alpského pôvodu. V roku 1960 bolo na území

Veľkej Fatry vypustených 20 jedincov kamzíka vrchovského alpského z Jeseníkov a Lužických hôr a v roku 1963 bolo do Slovenského raja vypustených šesť jedincov z Jeseníkov. Na rozdiel od ochranárskeho významu introdukcie tatranského kamzíka do Nízkych Tatier, bola introdukcia alpských kamzíkov do Veľkej Fatry a Slovenského raja motivovaná predovšetkým poľovníckymi účelmi (KRATOCHVÍL 1981).

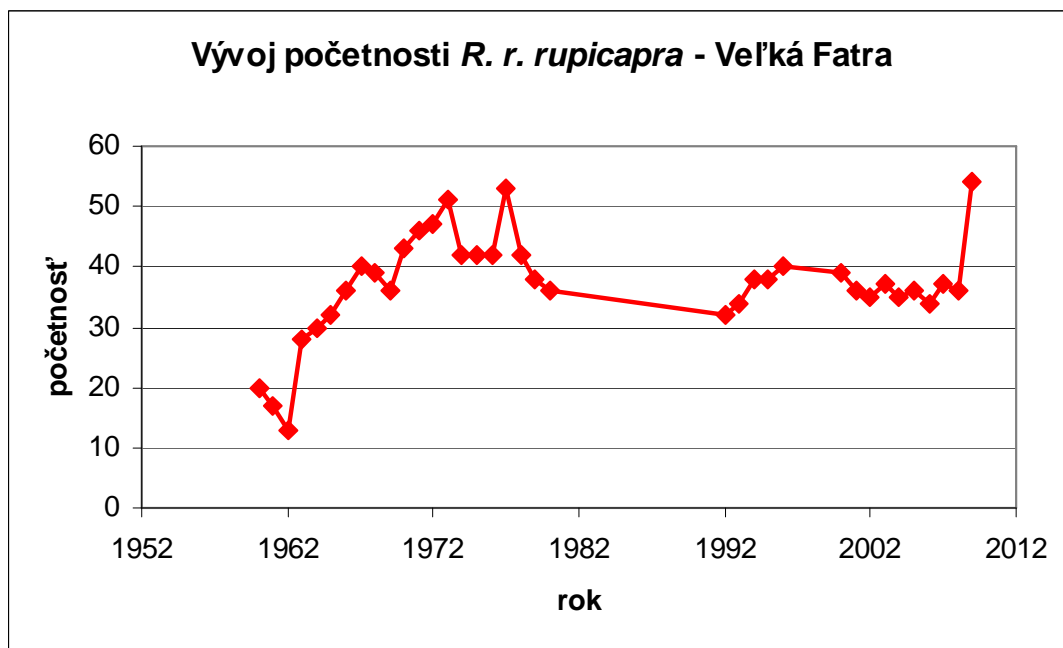
Veľká Fatra

Introdukcia kamzíka vrchovského alpského do oblasti Veľkej Fatry bola uskutočnená v záujme využitia relatívne vhodných stanovišť pre jeho existenciu, a tým rozšírenia poľovníckych možností v danej oblasti (ŠIMO 1981). V priebehu rokov 1956 až 1960 bolo do aklimatizačnej zverničky v Gaderskej doline dovezených 21 jedincov kamzíka vrchovského alpského z Lesného závodu Česká Kamenica a Rumburk (Lužické hory, 19 jedincov) a Loučná nad Desnou (Jeseníky, dva jedince) (SOKOL 1965, ŠIMO 1981). HRNČIAR (1972) a HELL & CHOVANCOVÁ (1995) uvádzajú vypustenie len 20 jedincov, z toho šiestich samcov, 11 samíc a troch kamzíčat. Išlo o sekundárnu introdukciu, pretože populácia kamzíka v Lužických horách vznikla introdukciou v rokoch 1909-1910 z jedincov dodaných Hagenbeckom zo zoologických záhrad vo Viedni a Salzburgu (HEINRICH 1958, MOTTL 1958) a neskôr ešte z Bavorska (BRIEDERMANN 1962, BRIEDERMANN & ŠTILL 1987). Populácia v Jeseníkoch vznikla v rokoch 1913-1914 z kamzíkov (pravdepodobne ôsmich jedincov) dovezených z poľovného revíru cisára Františka Jozefa I. v Mürzstegu v Štajerských Alpách v Rakúsku (RABE 1963, BERAN 1973).

Počas štvorročného chovu v zverničke bol celkový prírastok 10 jedincov, ale došlo aj k niekoľkým úhynom – 15 jedincov, na následky zranení pri odchyte a transporte, ulovením rysom a v dôsledku parazitárnych nákaz (HRNČIAR 1972). Obmedzený priestor a z toho vyplývajúci úzky kontakt zvierat spôsobili vysokú invadovanosť kamzíkov vnútornými parazitmi, najmä pľúcnyimi červami. Preto bola v decembri roku 1960 zvernička otvorená a postupne sa kamzíky rozptýlili do okolia (HRNČIAR 1972, ŠIMO 1981). Po vypustení kamzíkov do voľnej prírody bol v roku 1961 počiatkový stav 17 jedincov (HRNČIAR 1972). Do roku 1970 populácia narástla na 43 jedincov (HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Z roku 1977 pochádza údaj 53 jedincov (ŠIMO 1981). V nasledujúcich rokoch početnosť mierne klesala a napr. v roku 1992 bola početnosť odhadovaná už len na 32 jedincov (HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Početnosť kamzíkov v

rokoch 1993-2008 bola 34-40 jedincov, pričom posledný údaj z roku 2009 uvádza 54 jedincov, čo je maximum od založenia populácie (HURTA 2009).

Z grafu na obr. 5 si môžeme všimnúť exponenciálny rast populácie až do polovice 70. rokov, ale odvtedy jej početnosť výrazne nenarastá a má celkovo skôr klesajúcu tendenciu. Príčinou zastavenia počiatočného rastu populácie a následnej stagnácie až poklesu početnosti bolo pravdepodobne viacero faktorov – málo vhodných biotopov, nedostatočná potravná základňa, silný predačný tlak rýsa, orla skalného a vlka, medzidruhová konkurencia s jeleňou zverou a príbuzenské kríženie (ĎURÍK 1981, ŠIMO 1981, HELL & CHOVANCOVÁ 1995).



Obr. 5. Vývoj početnosti populácie kamzíka vrchovského alpského vo Veľkej Fatre.

Viacerí autori poukazujú na to, že v dôsledku málo vyhovujúcich podmienok vo Veľkej Fatre je zvýšená pravdepodobnosť migrácie jedincov do okolia (ĎURÍK 1981, HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Do roku 1972 boli zaznamenané najmä migrácie západným, ale aj severným smerom (do Chočských vrchov a do Veľkokrivánskej Fatry) a severozápadným smerom (do Strážovských vrchov) do vzdialenosti 6-43 km a tiež na východ (HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Kamzíky migrujúce na severozápad by pritom museli prekročiť bariéru husto osídleného údolia Váhu s dopravnými tepnami, teda je možné, že do Chočského pohoria a Veľkokrivánskej Fatry mohli preniknúť nie fatranské, ale skôr tatranské kamzíky zo Západných Tatier (KARČ & RADÚCH 1978). Nebezpečné sú najmä migrácie východným smerom, z dôvodu možnej hybridizácie

a ohrozenia genofondu nízkotatranskej populácie (ĎURÍK 1981, HELL & CHOVANCOVÁ 1995). V roku 1981 bolo na konferencii venovanej ochrane kamzíka rozhodnuté o eliminácii introdukovaných populácií z dôvodu ochrany genofondu pôvodného tatranského kamzíka, k realizácii tohto rozhodnutia však nedošlo. V období aklimatizácie vypustených kamzíkov bola ochrana tejto populácie zaistená vyčlenením uvedeného územia z výkonu práva poľovníctva a obmedzenia hospodárskej činnosti (ŠIMO 1981). Neskôr bol kamzík vrchovský na Slovensku zákonom chráneným druhom, bez rozlišovania poddruhu, bol však povolený tzv. regulačný odstrel, najmä vo východnej časti areálu, aby bolo eliminované riziko možných migrácií. Od roku 2003 je zákonom chráneným druhom už iba kamzík vrchovský tatranský a populácia kamzíka vo Veľkej Fatre je obhospodarovaná územne príslušnými poľovnými združeniami.

Slovenský raj

Populácia kamzíka v Slovenskom raji vznikla introdukciou šiestich jedincov kamzíka vrchovského alpského. V apríli 1963 boli na lokalite Veľký Sokol vypustené štyri samice a dvaja dospievajúci samci z Jeseníkov (HRNČIAR 1972, HÁJEK & OGURČÁK 1981, HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Populácia kamzíka v Jeseníkoch vznikla introdukciou jedincov z oblasti Mürzstegu v Alpách (BERAN 1973). Po priamom vypustení do nového prostredia sa kamzíky v Slovenskom raji značne rozptýlili. Postupne si však našli vyhovujúce prostredie v okolí Stratenej a v roku 1969 ich početnosť na tejto lokalite bola 11 jedincov (HRNČIAR 1972). V nasledujúcich rokoch sa kamzíky postupne rozšírili do všetkých vyhovujúcich skalnatých biotopov Slovenského raja, ale najbližší údaj o ich početnosti 40-45 jedincov pochádza až z roku 1980 (HÁJEK & OGURČÁK 1981). V roku 1981 bolo pri sčítaní zaznamenaných 48 kamzíkov, ale celková početnosť populácie v Slovenskom raji bola odhadovaná až na 60-65 jedincov (HÁJEK 1981). V ďalších rokoch sa početnosť populácie odhaduje na približne 50-55 jedincov (HÁJEK & BUDZIK 1985). Po roku 1989 sa k legálnemu regulačnému odstrelu pridalo intenzívne pytliactvo, ktoré výrazne redukovalo početnosť najmä v južnej časti Slovenského raja (Hájek in litt.). Najbližší ďalší dostupný údaj o početnosti pochádza z roku 1992, kedy poľovné združenia odhadovali celkovú početnosť populácie kamzíka v Slovenskom raji na 78 jedincov (HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Od roku 1996 sa kamzíkom v Slovenskom raji venovala intenzívnejšia pozornosť a každoročne bolo uskutočňované ich sčítanie. V roku 1996 bolo zaznamenaných 50 jedincov, z toho 11

mláďat (LEHOCKÝ & HÁJEK 1997). Pri každom ďalšom sčítaní bol zistený nárast populácie (obr. 6) a v rokoch 2001-2002 populácia dosiahla početnosť až 104 jedincov (LEHOCKÝ & HÁJEK 2001, 2002). Údaj o najvyššej početnosti pochádza z roku 2004 – 106 jedincov, z toho 19 mláďat (LEHOCKÝ & HÁJEK 2004). Početnosť kamzíkov v roku 2005 bola 93 jedincov (LEHOCKÝ & HÁJEK 2005), v rokoch 2006-2009 90-100 jedincov, pričom posledný údaj (rok 2009) je 96 jedincov (Hájek in litt.). Početnosť a štruktúra populácie v jednotlivých rokoch bola ovplyvňovaná jednak prirodzenými faktormi (úhyn, prípadne predácia – hlavne rysom), ale výrazne aj legálnym a nelegálnym odstreľom (ročne sa legálne uloví 4-6 jedincov; Hájek in litt.).

Vývoj početnosti tejto populácie mal exponenciálny charakter (okrem poklesu v druhej polovici 90. rokov) a zdá sa, že kamzíky tu naplno využili vhodné biotopy (obr. 6). Na tomto území, na rozdiel od populácie vo Veľkej Fatre, kamzík prosperuje. Biotopy Slovenského raja pravdepodobne lepšie spĺňajú jeho ekologické a potravné nároky (HÁJEK & OGURČÁK 1981). Jedným z dôvodov môže byť aj výrazná teplotná inverzia v roklinách Slovenského raja, s čím môže súvisieť lepšia dostupnosť potravy a širšia potravná ponuka (Hájek in verb.).



Obr. 6. Vývoj početnosti populácie kamzíka vrchovského alpského v Slovenskom raji.

Územie Slovenského raja sa však tiež nachádza v geografickej blízkosti s územím Nízkych Tatier – pohoria sú prepojené cez masív Kráľovej hole. KARČ & RADÚCH (1978) uvádzajú, že po vypustení kamzíkov v Slovenskom raji boli

zaznamenané migrácie niekoľkých samostatných jedincov až do vzdialeností 11-49 km, ale o trvalom výskyte kamzíkov v okolí Kráľovej hole nie sú žiadne správy (HÁJEK & OGURČÁK 1981). Z východnej časti Nízkych Tatier síce pochádzajú určité údaje o migrujúcich jedincoch, nie je však možné zistiť, či šlo o jedince zo Slovenského raja alebo z Vysokých Tatier (HÁJEK & OGURČÁK 1981, HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Podobne ako u veľkofatranskej populácie, na konferencii v roku 1981 bolo rozhodnuté o eliminácii aj tejto populácie; okrem pravidelných regulačných odstrelov však nedošlo k realizácii žiadnych ďalších opatrení. Legislatívne postavenie tejto populácie je rovnaké ako vo Veľkej Fatre. V súvislosti s výskytom kamzíka v Slovenskom raji sa tiež pomerne intenzívne diskutovalo o možnom negatívnom vplyve kamzíka na vegetáciu skalných biotopov (nepublikovaná štúdia Nadácie Daphne z roku 1995).

1.3 Ochránárska genetika

Výrazné zmeny krajiny, deštrukcia pôvodných biotopov, znečistenie prostredia, priame i nepriame využívanie a prenasledovanie i nevhodné introdukcie viedli k zníženiu početnosti mnohých druhov. V niektorých prípadoch došlo až k ich vyhynutiu na určitých územiach a k následnému vzniku fragmentovaných či izolovaných populácií. Tieto skutočnosti viedli v posledných desaťročiach k vzniku nového vedného odboru – ochránárska biológia. Vychádza z populačnej a evolučnej biológie, ekológie, biogeografie a genetiky, a tiež viacerých aplikovaných odborov ako napr. lesníctvo alebo rybárstvo (BRUSSARD 2000). Jej dôležitou súčasťou je tzv. ochránárska genetika (z anglického „conservation genetics“; niekedy tiež „konzervačná genetika“), ktorej hlavnou náplňou je štúdium genetickej variability v populáciách vzácných a ohrozených druhov (BRYJA & HÁJKOVÁ 2006). Charakteristickým znakom týchto druhov je, že žijú v malých a fragmentovaných populáciách, preto skúmanie genetických a evolučných procesov v malých populáciách tvorí základ ochránárskej genetiky (FRANKHAM et al. 2002). Táto mladá disciplína môže významnou mierou prispieť k úspešnej druhovej ochrane a k zníženiu rizika extinkcie ohrozených druhov.

V systéme kategorizácie ohrozených druhov podľa IUCN je veľkosť (tj. početnosť) populácie najvýznamnejším kritériom (O'GRADY et al. 2004). Druhy, ktorých početnosť dospelých jedincov je menšia ako 50, 250 alebo 1000, sú považované za kriticky ohrozené, ohrozené alebo zraniteľné (FRANKHAM et al. 2002). Ako pravidlo „hrubého odhadu“ pri odhadovaní rizika extinkcie sa tiež používa tzv. pravidlo 50/500

zavedené FRANKLINOM (1980), ktoré hovorí, že krátkodobá efektívna veľkosť populácie by nemala byť nižšia ako 50 a z dlhodobého pohľadu by nemala klesnúť pod 500 jedincov (ALBRECHT et al. 2005). Efektívna veľkosť populácie, ktorá zahŕňa iba pohlavne dospelé a biologicky plnohodnotné jedince (N_e ; niekedy tiež nazývaná genetická efektívna veľkosť populácie), je zvyčajne len 20-30 % z celkovej početnosti populácie, N (KALINOWSKI & WAPLES 2002, MILLS 2007), u niektorých druhov i len 10 % či menej (FRANKHAM 1995). Efektívna veľkosť populácie závisí od pomeru pohlaví v populácii a párovacieho systému, variability v počte potomkov, fluktuácii početnosti populácie a prekryvu generácií (napr. FRANKHAM et al. 2002, ALLENDORF & LUIKART 2007). Podľa definície efektívna veľkosť populácie zodpovedá „veľkosti idealizovanej populácie, ktorá by stratila genetickú diverzitu (alebo sa stala inbrednou) rovnakou mierou ako skutočná populácia“ (FRANKHAM et al. 2002). Takáto ideálna populácia má konštantnú veľkosť a oddelené generácie, v ktorých je reprodukčná úspešnosť jedincov náhodná a rovnaká – v takomto prípade $N = N_e$ (MILLS 2007). Preto bola zavedená premenná N_e , ktorá zohľadňuje faktory ako nerovný pomer pohlaví pri reprodukcii (napr. háremové druhy), fluktuácia početnosti populácie v čase a variabilita v reprodukčnej úspešnosti v dôsledku rôznych faktorov vrátane vekovej a sociálnej štruktúry. V takejto reálnej populácii je vždy $N_e < N$.

1.3.1 Evolúcia v malých populáciách

Hlavnými evolučnými mechanizmami v populáciách je mutácia, migrácia/rekombinácia, selekcia a genetický drift (ALLENDORF & LUIKART 2007). Prvé tri mechanizmy majú určujúci vplyv vo veľkých populáciách; v malých populáciách je však ich pôsobenie výrazne ovplyvňované náhodnými (stochastickými) efektami. Genetický drift (nazývaný tiež náhodný genetický posun) vyplýva z náhodného výberu gamét pri pohlavnom rozmnožovaní, kedy v dôsledku malej početnosti populácie môže náhodne dôjsť k úplnej a trvalej strate niektorých alel (FRANKHAM et al. 2002). Dôsledkom tohto procesu sú strata genetickej diverzity, náhodné zmeny frekvencie alel z generácie na generáciu, zvýšená pravdepodobnosť fixácie alel v rámci populácie a rýchlejšia diverzifikácia populácií vzniknutých z jednej populácie – prípad fragmentovanej populácie (FRANKHAM et al. 2002, ALLENDORF & LUIKART 2007).

Migrácia jedincov alebo ich gamét zabezpečuje tok génov a rekombináciu alel. Migrácia znižuje genetickú diferenciáciu medzi populáciami a môže dokonca obnoviť

stratenú genetickú variabilitu. V malej, izolovanej alebo fragmentovanej populácii je však tok génov limitovaný (FRANKHAM et al. 2002).

Mutácia je náhodná genetická zmena v alele alebo chromozóme. Je primárnym zdrojom všetkej genetickej diverzity (FLEGR 2005). Účinok mutácií je väčšinou škodlivý, iba vzácne sa objavujú mutácie pre organizmus prospešné. V malých populáciách je väčšina nových mutácií náhodne stratených.

Podobne aj efektívnosť selekcie je v malých populáciách nízka. To spôsobuje, že škodlivé alely nie sú dôsledne odstraňované a dokonca môže dôjsť k ich fixácii. Táto skutočnosť môže priamo viesť k redukcii reprodukčnej fitness a k zvýšeniu rizika extinkcie (FRANKHAM et al. 2002).

Malé populácie sú výrazne ovplyvňované náhodnými efektami, a to nielen genetickou stochasticitou (genetický drift), ale aj demografickou a environmentálnou stochasticitou a prírodnými katastrofami (SCHAFFER 1981). Fluktuácia v početnosti populácie môže viesť až k výraznému poklesu početnosti – tzv. populačnému bottlenecku (nazývaný tiež genetický bottleneck). Je to náhle zníženie početnosti populácie, ktoré vedie k nárazovej strate genetickej diverzity („bottleneck effect“, efekt „hrdla láhve“). Výsledky pôsobenia bottlenecku sú rovnaké ako vplyvom genetického driftu, zásadným rozdielom je však časové hľadisko, ktoré je v prípade bottlenecku veľmi krátke (FRANKHAM et al. 2002). Osobitným prípadom bottlenecku je efekt zakladateľa – „founder effect“. Je to založenie novej populácie z malého počtu jedincov – teda vlastne veľmi silný bottleneck v jednej generácii. Founder effect spôsobuje zmenu genetického zloženia populácie a často vedie k strate alel, zníženiu genetickej variability a genetickému driftu (FRANKHAM et al. 2002).

V malej populácii s nedostatočným množstvom jedincov nevyhnutne dochádza k príbuzenskému kríženiu – inbrídingu („inbreeding“). Vzájomná príbuznosť jedincov v populácii sa tak zvyšuje a možnosť kríženia nepríbuzných jedincov klesá. Inbríding zvyšuje pravdepodobnosť, že jedinec bude na lokuse homozygotný. Spôsobuje tak redukcii heterozygotnosti a môže viesť až k zníženiu životaschopnosti jedincov – inbredná depresia. Pri inbrednej depresii dochádza k negatívnemu ovplyvneniu mnohých aspektov reprodukčnej úspešnosti – množstvo potomstva, prežívanie mláďat, dĺžka života, schopnosť párenia, kvalita a kvantita spermií, materské schopnosti, schopnosť kompetície u potomstva apod. (LACY et al. 1996, ROLDAN et al. 1998, FRANKHAM et al. 2002). Vplyv inbrednej depresie sa zvyrazňuje v drsnejších, menej priaznivých podmienkach. Experimentálne to bolo dokázané napríklad na drozofilách v

laboratórnom chove (BIJLSMA et al. 2000). Negatívne pôsobenie inbrídingu spočíva v zvyšovaní homozygotnosti, a teda v znižovaní genetickej variability. To môže jednak priamo negatívne ovplyvňovať reprodukčnú úspešnosť a životaschopnosť (fitness) populácie alebo druhu, a zároveň inbríding redukuje ich evolučný adaptívny potenciál, dôležitý z pohľadu ich dlhodobej existencie.

Inbríding však môže mať aj určitý pozitívny efekt. Vzácne škodlivé recesívne alely sa prostredníctvom inbrídingu môžu dostať do homozygotného stavu, kedy môžu byť efektívnejšie odstránené prirodzenou selekciou (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 1999). Takýto proces sa nazýva „purging“ – v preklade približne „očistenie“. Purging je však účinný iba u alel veľkého účinku (napr. letálnych alel) a jeho vplyv je veľmi nízky u alel malého účinku, ktoré takmer dosahujú selekčnú neutralitu (FRANKHAM et al. 2002). Okrem toho purging môže účinkovať iba pri relatívne pomalom poklese početnosti, kedy k inbrídingu dochádza postupne v priebehu niekoľkých generácií. Ak je inbríding náhly, vplyv driftu je omnoho výraznejší ako vplyv selekcie, teda dôjde k náhodnej fixácii a nie k selekcii (FRANKHAM et al. 2002).

Pre populáciu, ktorá sa nachádza v inbrednej depresii, môže byť veľmi významná introdukcia i len veľmi malého počtu migrantov (TALLMON et al. 2004). Takto bola napríklad „zachránená“ škandinávská populácia vlka (*Canis lupus*), ktorá vznikla iba z dvoch jedincov a kde po príchode iba jediného imigranta došlo k zvýšeniu heterozygotnosti a k exponenciálnemu populačnému rastu (VILÀ et al. 2003). Introdukcia nových jedincov však nemusí byť vždy iba prospešná. Medzipopulačné kríženie v niektorých prípadoch môže viesť k zníženiu fitness jedincov F1 generácie. Takýto jav sa nazýva outbredná depresia („outbreeding depression“). Môže k nej dôjsť vtedy, ak je populácia adaptovaná na lokálne podmienky a po hybridizácii s jedincami z inej populácie sa táto lokálna adaptácia naruší (EDMANDS 2006). Pomerne často citovaným, hoci možno nie úplne dôveryhodným, je prípad kozorožca vrchovského (*Capra ibex*) vo Vysokých Tatrách, spomínaný aj v učebnici ochranárskej genetiky FRANKHAM et al. (2002). Na prelome 19. a 20. storočia boli do Tatier introdukované kozorožce z Álp a neskôr z Turecka a Sinajského polostrova, pričom ich kríženie viedlo k narušeniu rozmnožovacieho cyklu a nevhodnému načasovaniu pôrodov, následkom čoho celá populácia vyhynula. Podľa BOHUŠA (1958) však situácia kozorožca v Tatrách bola omnoho komplikovanejšia, pretože knieža Hohenlohe tu v priebehu 40-50 rokov introdukoval jedince z rôznych populácií: z Altaja, Sinaja, Kaukazu, a tiež kozy bezoárové (*Capra hircus aegagrus*), ktoré sa medzi sebou rôzne krížili. Neskôr, roku

1953, bola uskutočnená ďalšia introdukcia - kozorožca sibírskeho (*Capra sibirica*); všetky tieto pokusy však skončili nezdarom (BOHUŠ 1958). Príčinou neúspechu teoreticky mohla byť outbredná depresia, alebo aj mnohé iné faktory, napr. nevhodné podmienky prostredia. Neskôr boli v literatúre opísané ďalšie príklady outbrednej depresie u viacerých rastlinných a živočíšnych druhov (EDMANS 2006).

1.3.2 Mikrosatelity a ich využitie pri štúdiu populačno-genetickej štruktúry

Mikrosatelity (angl. „short tandem repeats“, STR) predstavujú najčastejšie využívané genetické markery pri populačno-genetických analýzach. Sú to vysoko polymorfne kodominantne dedičné jadrové molekulárne znaky rozptýlené po celom génome. Vďaka vysokej variabilite umožňujú analýzy nielen na úrovni populácie, ale aj na úrovni jedincov, napr. určovanie paternity alebo hybridizácie (FRIDOLFFSSON *et al.* 1997, ESTOUP *et al.* 1998, RANDI *et al.* 2007).

Všeobecne sú mikrosatelity považované za neutrálne znaky. Nachádzajú sa však aj v oblastiach kódujúcich proteíny (JARNE & LAGODA 1996, TÓTH *et al.* 2000). Zároveň sú okrem jadrového genómu, prítomné aj v chloroplastovom a v menšom množstve aj v mitochondriálnom genóme.

Mikrosatelity sú tvorené úsekmi DNA s niekoľkými (max. 100) tandemovo usporiadanými 2-6 bp dlhými repetíciami (SCHLÖTTERER & HARR 2001). Pri analýzach sú najčastejšie využívané dinukleotidové repetície, napr. (CA)_n, ale aj trinukleotidové, napr. (GTG)_n a tetranukleotidové repetície, napr. (GATA)_n (JARNE & LAGODA 1996). Na základe kontinuity môžeme mikrosatelity rozdeliť na dokonalé (napr. CACACACA), zložené (napr. CACAGTGT) a prerušované (napr. GCG(CA)_nGCA(CA)_nCGA). Variabilita mikrosatelitov závisí od počtu repetícií (SCHLÖTTERER & HARR 2001), stability (stabilnejšie prerušované mikrosatelity majú nižšiu variabilitu v porovnaní s dokonalými; PETES *et al.* 1997) a dĺžky repetície (v prípade dinukleotidových repetícií je mutačná rýchlosť vyššia v porovnaní s trinukleotidovými a tetranukleotidovými repetíciami; KRUGLYAK *et al.* 1998).

1.3.3 Neinvazívna genetická metóda

V prípadoch, kedy je získanie dostatočného množstva vzoriek z populácie problematické (ako napr. u vzácnych a chránených druhov), riešením môže byť použitie neinvazívnych genetických metód. Tieto techniky umožňujú určenie druhu, pohlavia

i identifikáciu konkrétnych jedincov, ako aj štúdium genetickej variability a štruktúry populácie bez nutnosti priameho kontaktu so živočíchom (TABERLET et al. 1999). Vďaka objavu polymerázovej reťazovej reakcie, ktorá umožňuje amplifikovať požadovaný špecifický úsek DNA takmer v neobmedzenom množstve, pričom množstvo pôvodnej vzorky DNA môže byť extrémne malé (ZIMA et al. 2004), sa molekulárne metódy stali prínosnými aj pre klasický zoologický a ekologický výskum. Ako zdroj DNA môže slúžiť napr. vypadaná srst' alebo perie, trus, moč, zvlčená pokožka, vajcové škrupiny, vývržky dravcov a sov. Často je najdostupnejším materiálom práve trus, obsahujúci bunky črevnej sliznice, z ktorých je možné získanie DNA daného jedinca (ale aj jeho parazitov či potravy).

Neinvazívne získavanie vzoriek má však vážne limitácie. Pokiaľ sa jedná o mikrosatelity, môže nastať situácia, že sa amplifikáciou nezíska PCR produkt, alebo sa získa nesprávny genotyp (TABERLET et al. 1999). Objavia sa tzv. genotypizačné chyby, kedy pozorovaný genotyp jedinca nesúhlasí so skutočným genotypom. K tzv. vypadnutiu alely („allelic dropout“) dochádza, ak sa u heterozygota naamplifikovala iba jedna alela a jedinec je chybné označený za homozygota. Dochádza k tomu náhodne pri vzorkách obsahujúcich malé množstvo DNA alebo degradovanú DNA (TABERLET & LUIKART 1999). Falošné alely („false alleles“) vzniknú, ak sa pri amplifikácii u homozygota objaví ďalšia alela. K tomuto javu najčastejšie dochádza, ak na začiatku amplifikačného procesu dôjde k posunu („poškmyknutiu polymerázy“), alebo ak sa pospájajú fragmenty DNA a takýto artefakt sa ďalej namnoží (TABERLET et al. 1996). Ľudská chyba často predstavuje hlavnú príčinu chýb, podľa HOFFMAN & AMOS (2005) môže byť zodpovedná až za 80 % všetkých vyskytujúcich sa chýb. Chyby môžu vzniknúť zámennou vzoriek, pri pipetovaní i pri vyhodnocovaní dát (POMPANON et al. 2005).

Účinnú prevenciu proti namnoženiu nešpecifických produktov predstavuje použitie „hot start PCR“, ktorá zvyšuje špecificitu a citlivosť DNA amplifikácie (BEJA-PEREIRA et al. 2009). Využíva sa termostabilná polymeráza (najčastejšie *Taq* polymeráza), ktorá je aktívna až po dlhšej inkubácii pri vysokej teplote, čo výrazne redukuje amplifikáciu necieľových produktov.

Najčastejšie využívaným postupom na elimináciu genotypizačných chýb (falošných alel, kontaminácií a vypadnutia alel) je viacnásobné opakovanie PCR, tzv. „multiple tubes approach“. Ide o niekoľkonásobné nezávislé opakovania každej PCR (NAVIDI et al. 1992). Výsledný genotyp je potom stanovený na základe série opakovaní.

Nevýhodami tohto prístupu je jeho finančná a časová náročnosť, možnosť vyčerpania získanej DNA a taktiež častejšou manipuláciou sa zvyšuje riziko genotypizačných chýb (ľudská chyba, kontaminácia) (BEJA-PEREIRA et al. 2009).

1.4 Genetická variabilita a štruktúra populácií kamzíka v Európe

Najčastejšie používanými genetickými markermi pre štúdium genetickej variability a štruktúry populácií kamzíka sú mikrosatelity. Bolo publikovaných viacero prác, popisujúcich mikrosatelitové primery, ktoré zároveň prinášajú základné informácie o genetickej variabilite (počet alel, heterozygotnosť) rôznych populácií kamzíka vrchovského či stredozemného. SOGLIA et al. (2005) a CASSAR et al. (2007) publikovali sety mikrosatelitových primerov pre alpské populácie *R. r. rupicapra*, LORENZINI (2005) pre apeninskú populáciu *R. pyrenaica ornata*, ZEMANOVÁ et al. (2011) pre tatranské populácie *R. r. tatrlica* a MAUDET et al. (2004) pre viacero druhov ohrozených kopytníkov, ktoré testovali aj u niekoľkých jedincov *R. rupicapra* z francúzskych Álp a *R. pyrenaica* zo španielskych Pyrenej. Najvyššie hodnoty genetickej variability boli zistené u alpských populácií *R. r. rupicapra*, naopak veľmi nízke u apeninskej populácie *R. pyrenaica ornata* a tatranských populácií *R. r. tatrlica*. Všetky tieto práce popisujúce primery sú však založené na analýze relatívne malého počtu jedincov. Štúdiom fylogeografie kamzíkov (*Rupicapra* spp.) na základe mikrosatelitovej DNA sa zaoberali PÉREZ et al. (2002). Do tejto štúdie boli zahrnuté aj tri jedince kamzíka vrchovského tatranského. Genetické dôsledky translokácií a fragmentácie biotopov u kamzíka skúmali CRESTANELLO et al. (2009). Ich práca je založená primárne na štúdiu deviatich pôvodných či introdukovaných populácií *R. r. rupicapra* zo západných a východných Álp v Taliansku a dvoch populácií *R. pyrenaica* z Talianska a Španielska, ale analyzovali aj niekoľko vzoriek (5-10) zo stredoeurópskych populácií, vrátane Vysokých a Nízkych Tatier, Veľkej Fatry a Slovenského raja. Na základe analýzy dvoch mitochondriálnych markerov a 11 mikrosatelitov zistili významnú genetickú diferenciáciu medzi všetkými študovanými populáciami kamzíkov a tiež jasné genetické stopy historických translokácií. Ďalšie dve štúdie (RODRÍGUEZ et al. 2009, 2010) sa zaoberali fylogenetickými vzťahmi medzi kamzíkmi. Prvá je založená len na analýze cytochrómu b (mtDNA), druhá je rozšírená o analýzy ďalších štyroch mitochondriálnych markerov a 20 mikrosatelitov. Táto práca

zahŕňa aj všetky poddruhy (vrátane 10 jedincov *R. r. tatrica*) a celý areál výskytu kamzíkov, avšak venuje sa len štúdiu evolučných vzťahov.

Jediná rozsiahlejšia práca zaoberajúca sa analýzami populačno-genetickej štruktúry *R. r. rupicapra* pochádza z talianskych Álp (SOGLIA et al. 2010). Analýzou 26 mikrosatelitových markerov u 209 jedincov zo šiestich populácií bola zistená ešte o niečo vyššia genetická variabilita ako v predošlých štúdiách (PÉREZ et al. 2002, CRESTANELLO et al. 2009). Medzi skúmanými populáciami boli zistené jasné genetické rozdiely, ktoré v niektorých prípadoch zodpovedali „isolation-by-distance“ modelu, v iných vplyvu recentných poklesov početnosti, resp. fragmentácii biotopu. Najmä populácie v periférnych oblastiach boli výraznejšie ovplyvňované genetickým driftom a nízkou mierou migrácie (SOGLIA et al. 2010).

Okrem analýz mitochondriálnej DNA a mikrosatelitov bol u kamzíkov študovaný aj MHC (major histocompatibility complex) polymorfizmus, a to konkrétne gén *DRB* (MHC class II). SCHASCHL et al. (2004) charakterizovali tento gén a jeho variabilitu u 59 jedincov z východných a západných Álp. V ďalšej práci sa zaoberali rekombináciou a pôvodom variability sekvencií tohto génu u *R. pyrenaica* a *R. rupicapra* (SCHASCHL et al. 2005). Rekombinácia v spojení s pozitívnou selekciou bola pravdepodobne príčinou rýchlej evolúcie peptid-viažúcich miest v danom géne (SCHASCHL et al. 2005). Následne ALVAREZ-BUSTO et al. (2007) skúmali variabilitu a evolúciu tohto génu u dvoch poddruhov kamzíka stredozemného (*R. p. pyrenaica* a *R. p. parva*). U oboch zistili relatívne nízku variabilitu, a to najmä u *R. p. parva* – iba tri alely – kde to zdôvodňovali bottleneckmi v dôsledku lovu a recentných parazitárnych infekcií.

1.5 Ciele diplomovej práce

Na Slovensku sa vyskytujú dva poddruhy kamzíka vrchovského žijúce v štyroch populáciách. Vo Vysokých Tatrách sa vyskytuje jediná autochtónna populácia kamzíka vrchovského tatranského. Do oblasti Nízkych Tatier bol introdukovaný tatranský kamzík, zatiaľ čo do susediacich území (Veľká Fatra, Slovenský raj) kamzík vrchovský alpský. Na základe demografickej histórie (bottlenecky a dlhodobá nízka početnosť) je u vysokotatranskej populácie možné očakávať nízku genetickú variabilitu. Podobne tomu môže byť aj u všetkých troch introdukovaných populácií, v dôsledku efektu zakladateľa. Okrem toho, keďže územia Nízkych Tatier, Veľkej Fatry a Slovenského

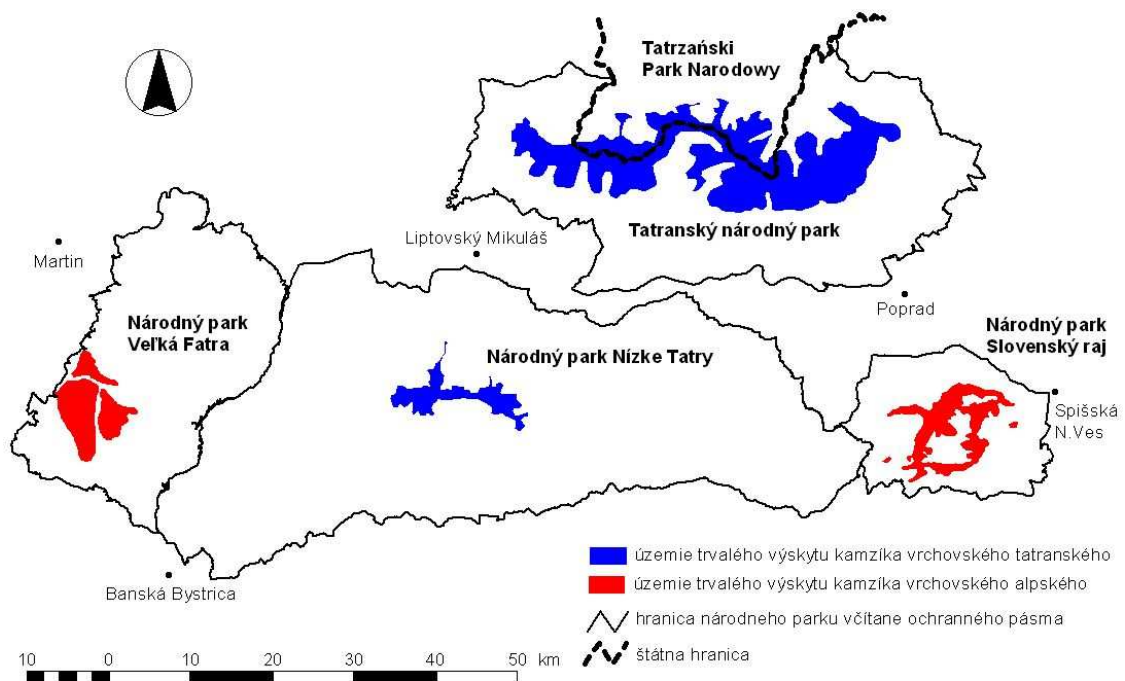
raja sú geograficky blízke, mohlo medzi jednotlivými populáciami dôjsť k migrácii a následnej hybridizácii. Cieľom mojej diplomovej práce preto bolo:

1. charakterizovať neutrálnu genetickú variabilitu jednotlivých populácií kamzíkov na Slovensku pomocou mikrosatelitových markerov;
2. popísať genetickú štruktúru týchto populácií;
3. zistiť prípadnú hybridizáciu medzi tatranským a alpským poddruhom;
4. overiť existenciu recentného bottlenecku/efektu zakladateľa a odhadnúť efektívnu veľkosť jednotlivých populácií.

2. MATERIÁL A METÓDY

2.1 Charakteristika skúmaných území

Pôvodná populácia kamzíka vrchovského tatranského osídľuje pohorie Vysokých Tatier (zahŕňajúc Vysoké, Belianske a Západné Tatry, vrátane poľskej časti). Introdukovaná populácia tohto poddruhu sa vyskytuje v Nízkych Tatrách. Introdukované populácie kamzíka vrchovského alpského osídľujú pohoria Veľkej Fatry a Slovenského raja (obr. 7). Všetky štyri pohoria včítane poľskej časti Vysokých Tatier sú chránené ako národné parky: Tatranský národný park, Tatrzański Park Narodowy, Národný park Nízke Tatry, Národný park Veľká Fatra a Národný park Slovenský raj.



Obr. 7. Rozšírenie kamzíka vrchovského (alpské i tatranské populácie) na území Slovenska. Mapa je vytvorená v ArcView GIS, na základe podkladov poskytnutých pracovníkmi daných národných parkov.

Vysoké Tatry (VT)

Vysoké Tatry majú vysokohorský charakter a sú najvyššími európskymi veľhorami ležiacimi severne od Álp (Gerlachovský štít 2 654 m n. m. je najvyšším v celých Karpatoch). Sú nielen najvyšším, ale aj najčlenitejším horstvom na Slovensku i v celom 1 200 km dlhom karpatskom oblúku. Vysoké Tatry sú pohraničným pohorím,

ktorého približne 20 % leží v susednom Poľsku. Vnútorne sa členia na Západné Tatry, Vysoké Tatry a Belianske Tatry. Desať vysokotatranských vrchov prevyšuje nadmorskú výšku 2 600 m a ďalších pätnásť vrchov je vyšších ako 2 500 m. Hlavný vysokotatranský hrebeň má dĺžku 26 km, tiahne sa od západu k východu, má tvar smerom na juh vypuklého oblúka a takmer vôbec neklesá pod nadmorskú výšku 2 000 m (AMBRÓZ et al. 2009). Vo Vysokých Tatrách sa kamzíky zdržiavajú predovšetkým v skalnatých hrebeňových častiach a v záveroch dolín.

Nízke Tatry (NT)

Nízke Tatry sú rozlohou najväčším a po Vysokých Tatrách druhým najvyšším pohorím na Slovensku. Tiahnú sa od západu na východ v dĺžke vyše 80 km. Najvyšším vrchom je Ďumbier 2 043 m n. m. a okrem neho ďalšie tri nízkotatranské vrchy prevyšujú 2 000 m n. m. K najväčším prírodným hodnotám Nízkych Tatier patrí kras. Väčšina krasových oblastí sa nachádza v severnej časti horského masívu (AMBRÓZ et al. 2009). Kamzíky sa tu vyskytujú najmä v skalnatých hrebeňových častiach a v záveroch dolín.

Veľká Fatra (VF)

Veľká Fatra je krasovým územím s typickými súvislými lesmi, dlhými bralnatými dolinami a chrbtami. Nie je vysokým pohorím, najvyšší vrch Ostredok dosahuje výšku 1 592 m n. m. (AMBRÓZ et al. 2009). Typickým biotopom pre kamzíky sú bralnaté doliny a chrbty prezentované najmä Gaderskou dolinou. Vo Veľkej Fatre alpínske pásmo úplne chýba a subalpínske je zastúpené len v najvyšších polohách, ktoré sú ale pre kamzíka relatívne nevhodné z dôvodu malej prítomnosti skál (HURTA 2009).

Slovenský raj (SR)

Slovenský raj je krasovým územím s typickými bralnatými roklinami a kaňonmi. Pre rokliny a kaňony je charakteristický teplotný zvrät – inverzia, kedy najchladnejšie polohy sú v najnižších nadmorských výškach na dne roklín a naopak najteplejšie polohy sú v najvyšších nadmorských výškach v horných častiach roklín. Dolné časti roklín sa nachádzajú v nadmorskej výške okolo 800 m a horné časti roklín okolo 1 000 m n. m. (HÁJEK 2009). Kamzíky sa tu vyskytujú najmä v skalnatých častiach roklín a kaňonov.

2.2 Získavanie a skladovanie vzoriek

Väčšinu analyzovaného materiálu tvorili tkanivá (svalovina) – 95 vzoriek. Ďalej boli analyzované vzorky krvi - päť vzoriek a neinvazívne získaný materiál, konkrétne päť vzoriek srsti a 88 vzoriek trusu. Celkový počet vzoriek bol 193, z toho 47 pochádza z územia Vysokých Tatier, 37 z Nízkych Tatier, 26 z Veľkej Fatry a 83 zo Slovenského raja. Prehľad počtu jednotlivých typov vzoriek z daných území je uvedený v tab. 1 a lokalizácia miest zberu vzoriek je znázornená na obr. 8-11.

Tab. 1. Prehľad počtu jednotlivých typov vzoriek zo skúmaných území.

	Tkanivá	Krv	Trus	Srst'	Spolu
Vysoké Tatry	22	1	20	4	47
Nízke Tatry	7	4	25	1	37
Veľká Fatra	9	-	17	-	26
Slovenský raj	57	-	26	-	83
Spolu	95	5	88	5	193

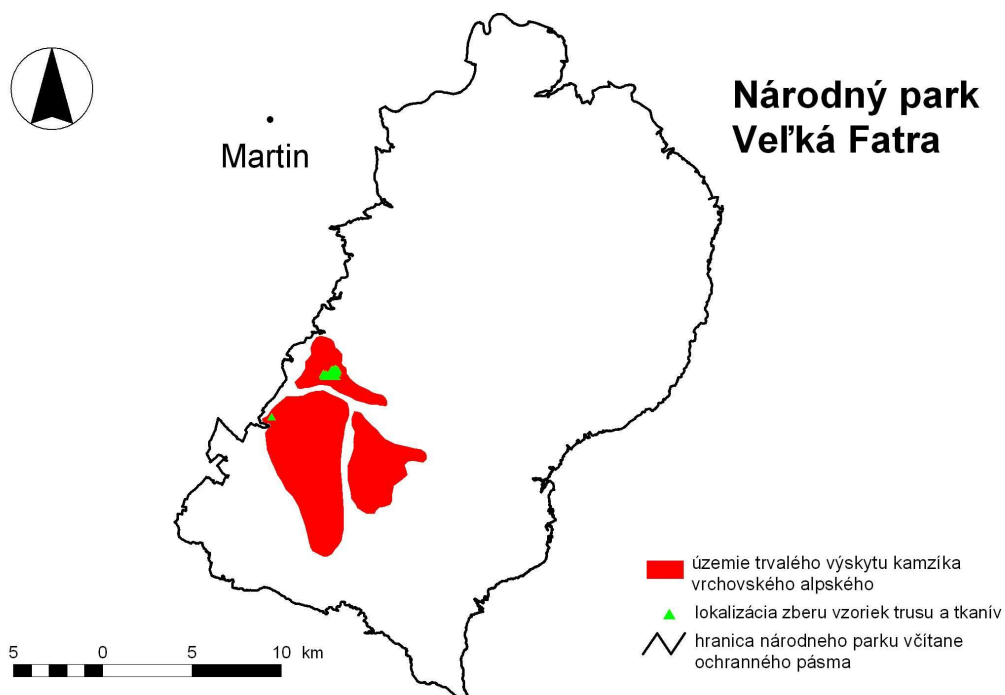
Vzorky tkanív a krvi boli poskytnuté pracovníkmi národných parkov. V prípade tatranských populácií vzorky pochádzali prevažne z úhynov v lavínach, prípadne z odberu krvi pri odchyte v rámci telemetrickeho sledovania. U alpských kamzíkov pochádzali vzorky tkanív predovšetkým z legálneho regulačného lovu. Vzorky trusu a srsti boli v teréne zbierané v spolupráci s pracovníkmi národných parkov a na základe výnimky krajských úradov životného prostredia MŽP SR. Zber vzoriek prebiehal v chladných mesiacoch, ideálne zo snehu. Čerstvý trus bol zbieraný v teréne priamo do skúmaviek so silikagélom a ďalej skladovaný pri izbovej teplote, alebo do skúmaviek s 96 % etanolom, ktoré boli ďalej skladované pri -20 °C. Srst' bola zbieraná do silikagélu a skladovaná pri izbovej teplote. V tejto práci sú použité len vzorky trusu a srsti s koncentráciou templátovej DNA nad 1000 ng/μl. Koncentrácia templátovej DNA bola zisťovaná pomocou real-time PCR (Hájková & Zemanová, nepubl. dáta).



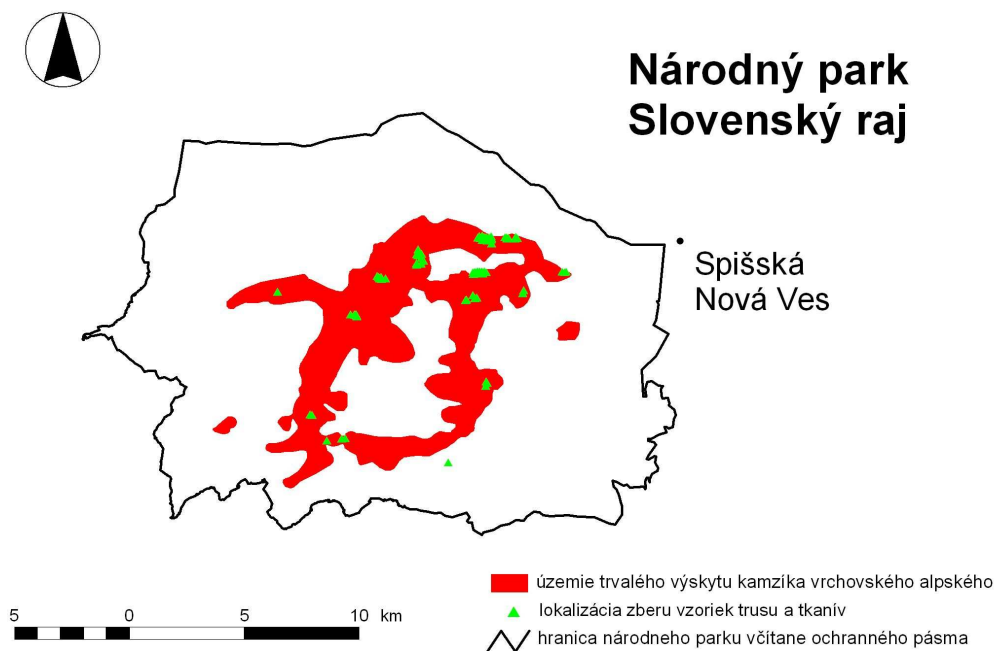
Obr. 8. Lokalizácia miest zberu vzoriek – Vysoké Tatry.*



Obr. 9. Lokalizácia miest zberu vzoriek – Nízke Tatry.*



Obr. 10. Lokalizácia miest zberu vzoriek – Veľká Fatra.*



Obr. 11. Lokalizácia miest zberu vzoriek – Slovenský raj.*

* Mapy boli vytvorené v ArcView GIS na základe podkladov poskytnutých pracovníkmi daných národných parkov.

2.3 Laboratórne analýzy

Všetky genetické analýzy sme vykonávali v laboratóriu Oddelenia populačnej biológie ÚBO AV ČR, v.v.i. v Studenci.

2.3.1 Izolácia DNA

Zo vzoriek tkanív, krvi a srsti bola DNA izolovaná pomocou DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), podľa protokolu poskytnutého výrobcom. Jediná modifikácia sa týkala posledného kroku, kedy bola DNA z membrány vymývaná v dvoch krokoch, zakaždým so 100 µl pufru AE a po 5-minútovej inkubácii. V prípade srsti boli použité len odstrihnuté korienky a izolácia prebiehala v neinvazívnom laboratóriu. Trus bol izolovaný pomocou QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Vzorky trusu skladované v etanole boli vysušené pri teplote 56 °C v inkubátore a omývané pufrom ASL (súčasť QIAamp DNA Stool Mini Kit) 25-50 minút (ručne a na vortexe). V prípade vzoriek trusu skladovaných v silikagéli boli zrníčka silikagélu opatrne odstránené a bobky omývané ako je uvedené vyššie. Na jednu izoláciu boli použité zvyčajne 2-3 bobky (v závislosti od veľkosti) a množstvo pufru ASL na omývanie povrchu trusu bolo 2000-2800 µl. Ďalej sme postupovali podľa protokolu výrobcu so záverečnou modifikáciou rovnako ako je uvedené v prípade izolácie zo vzoriek tkanív. Izolácia DNA z trusu prebiehala v neinvazívnom laboratóriu vo flow-boxe.

2.3.2 PCR a fragmentačná analýza

Analyzovali sme 18 mikrosatelitov označených OarFCB20, OarFCB304, SRCRSP05, SY84, CSSM66, ETH10, SY434, INRA121, SRCRSP11, TGLA53, SY259, BOBT24A, BM1258, SRCRSP09, ETH225, ILST030, NRAMP1, MAF214. Sekvencie primerov, rozsah veľkosti alel a ďalšie údaje týkajúce sa použitých lokusov sú uvedené v prílohe 1. Všetky použité mikrosatelity sú dinukleotidy. Pohlavie jedincov sme určovali na základe prítomnosti či neprítomnosti časti génu *Sry* (WILSON & WHITE 1998), ktorý sa nachádza na chromozóme Y.

Jednotlivé lokusy sme zoradili do troch multiplexových setov. Pri amplifikácií sme použili QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen). Protokoly PCR (zloženie reakčných zmesí a teplotné profily reakcií) pre jednotlivé sety sú uvedené v prílohe 2 a 3. Amplifikácia prebiehala na termálnych cykloch Mastercycler epgradient S (Eppendorf). Jeden z páru primerov každého lokusu bol fluorescenčne značený

niektorým zo štyroch flourochrómov (FAM, PET, NED, VIC). Na analýzu produktov PCR sme použili automatický sekvenátor ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Na fragmentačnú analýzu sme pripravili zmes zloženú z PCR produktov (2 μ l v prípade trusu a srsti; 1,5 μ l v prípade tkanív a krvi), formamidu (12 μ l) a veľkostného štandardu GeneScanTM – LIZ500TM (0,4 μ l) (Applied Biosystems). Následne sme zmes vystavili teplote 95 °C po dobu piatich minút (denaturácia DNA) a hneď potom ochladili na ľade (5-10 minút). Výsledky kapilárnej elektroforézy sme spracovali pomocou softwaru GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems). Každú PCR sme pre jednotlivé lokusy niekoľkokrát opakovali, tzv. „multiple-tubes approach“, aby sme maximalizovali pravdepodobnosť získania správneho genotypu (NAVIDI et al. 1992, TABERLET et al. 1996). Pre tkanivá a krv sme PCR opakovali dvakrát, pre neinvazívne získané vzorky trikrát až štyrikrát (výnimočne i viackrát). Takýto počet opakovaní bol dostatočný, keďže šlo o vzorky s relatívne vysokou koncentráciou templátovej DNA, nad 1000 ng/ μ l (Zemanová & Hájková, nepubl. dáta).

2.4 Analýza dát

Výsledky jednotlivých opakovaní PCR pre každú vzorku sme porovnávali pomocou makra vytvoreného v programe Excel, ktorý vyznačí odlišujúce sa alely. V týchto prípadoch boli vykonávané ďalšie opakovania PCR, až kým nebolo možné spoľahlivo určiť genotyp. Keďže v prípade neinvazívne získaného materiálu môže viacero vzoriek pochádzať od toho istého jedinca, genotypy pre jednotlivé vzorky boli porovnávané pomocou programu GenAlex, funkcia Multilocus Matches (PEAKALL & SMOUSE 2006). Do výsledného súboru dát sme ponechali len jeden genotyp pre každého jedinca (príloha 4). Základné charakteristiky genetickej variability (N_A – počet alel na lokus, A_R – alelová diverzita („allelic richness“; počet alel na lokus upravený pre rozdielnu veľkosť vzorky), H_E – očakávaná heterozygotnosť („expected heterozygosity“), H_O – pozorovaná heterozygotnosť („observed heterozygosity“), F_{IS} - koeficient inbrídingu) sme spočítali pomocou programu Fstat (GOUDET 2001). Počty privátnych alel (alely vyskytujúce sa len v jednej populácii) boli zistené pomocou programu GenAlex (PEAKALL & SMOUSE 2006). Odchýlka od Hardy-Weinbergovej rovnováhy u jednotlivých lokusov bola testovaná pomocou programu Genepop (RAYMOND & ROUSSET 1995). Celková hodnota koeficientu diferenciácie (F_{ST}) a párové hodnoty medzi jednotlivými dvojicami populácií boli spočítané pomocou programu

Fstat. Pre analýzu populačno-genetickej štruktúry sme použili faktoriálnu korespondenčnú analýzu v programe Genetix 4.05.2 (BELKHIR et al. 1996-2004) a Bayesiánsku zhlukovaciú analýzu v programe STRUCTURE 2.3.1 (PRITCHARD et al. 2000, FALUSH et al. 2003). Počet opakovaní MCMC (Markov Chain Monte Carlo) bol 500 000 krokov (burn-in 100 000), model Admixture, Allele Frequencies Correlated. Počet klastrov (K) bol testovaný od 1 do 6 a počet opakovaní pre každé K bol 5. Program určuje pravdepodobnosť, s akou každý jedinec patrí do príslušného klastru – hodnotu Q (odhad časti genómu, ktorá u daného jedinca patrí k príslušnému klastru; „membership coefficient“). Najvhodnejšie K bolo zisťované postupom podľa EVANNO et al. (2005).

Výskyt hybridizácie bol zisťovaný aj pomocou programu NewHybrids 1.1 (ANDERSON & THOMPSON 2002). Program používa Bayesiánske klastrovanie (MCMC simulácie) k zisteniu posteriórnej pravdepodobnosti príslušnosti jedincov do vopred definovaných kategórií (čistý druh 1, čistý druh 2, hybrid F1, hybrid F2, spätný kríženec („backcross“) s druhom 1, spätný kríženec („backcross“) s druhom 2). Pre analýzu boli použité oba typy „priors“ (Jeffrey’s priors a Uniform priors), počet opakovaní MCMC bol 50 000 (burn-in 10 000).

Skutočnosť, či populácie prešli recentným výrazným znížením početnosti (bottleneckom) bola testovaná pomocou programu Bottleneck (CORNUET & LUIKART 1996). Populácie, ktoré prešli recentným bottleneckom, vykazujú znížený počet alel aj heterozygotnosti (H_E), pričom počet alel klesá rýchlejšie ako heterozygotnosť. Preto je v takýchto populáciách heterozygotnosť vyššia ako by bola očakávaná pri ekvilibriu vypočítanom z pozorovaného počtu alel za predpokladu populácie stálej veľkosti (LUIKART et al. 1998). Program umožňuje testovať 3 modely: Infinite Allele Model (IAM), Stepwise Mutation Model (SMM), Two-phased Model (TPM). Pre TPM model bola použitá variancia 11 a frekvencia SMM 85 %. Počet iterácií bol pre všetky testy 1000 a pre hodnotenie bol použitý Wilcoxonov test.

Pre odhady efektívnej veľkosti populácií bol použitý program OneSAMP (TALLMON et al. 2008). Tento webový program používa metódu „approximate Bayesian computation“ a pre odhad stačí jedna časová vzorka s mikrosatelitovými dátami. Ako minimálna hodnota „priors“ pre efektívnu veľkosť populácie bola vo všetkých populáciách použitá hodnota 2, ako maximum 200 v prípade Vysokých Tatier a 50 v prípade ostatných populácií.

3. VÝSLEDKY

Z celkového počtu 193 získaných vzoriek bolo 29 vzoriek duplicitných (neinvazívne získané vzorky). Preto bolo v následných analýzach použitých len 164 genotypov: $n = 40$ z Vysokých Tatier, $n = 26$ z Nízkyh Tatier, $n = 21$ z Veľkej Fatry, $n = 77$ zo Slovenského raja. Celková úspešnosť genotypizácie bola 99,8 %, vrátane neinvazívne získaných vzoriek (boli použité len vysoko kvalitné vzorky, s koncentráciou templátovej DNA zistenej pomocou real-time PCR nad 1000 ng/ μ l; Zemanová & Hájková nepubl.).

3.1 Genetická variabilita

Genetická variabilita na úrovni mikrosatelitovej DNA bola celkovo nízka u všetkých sledovaných populácií. Počet alel na lokus (N_A) sa pohyboval len v rozmedzí 1-4, hodnoty pozorovanej heterozygotnosti (H_O) v rozpätí 0-0,810 a očakávanej heterozygotnosti (H_E) 0-0,754 (tab. 2-5). Priemerné hodnoty pre jednotlivé populácie sú uvedené v tab. 6. Priemerná alelová diverzita (A_R) v žiadnej populácii nepresiahla hodnotu 3 a v prípade heterozygotností hodnotu 0,5. V nízkotatranskej populácii boli všetky analyzované lokusy polymorfne, ale v ostatných populáciách boli 1 až 2 lokusy monomorfne (miera polymorfizmu 89 % vo Vysokých Tatrách a vo Veľkej Fatre, 94 % v Slovenskom raji). Najnižšia variabilita bola zistená u vysokotatranskej populácie ($A_R = 2,13$, $H_E = 0,36$). Mierne vyššie hodnoty boli zistené u introdukovaných populácií kamzíkov vo Veľkej Fatre a Slovenskom raji (tab. 4-5). Najvyššia variabilita bola zaznamenaná u nízkotatranskej populácie ($A_R = 2,91$, $H_E = 0,45$). V populácii v Nízkyh Tatrách boli najpolymorfnejšie lokusy SY434 ($N_A = 4$, $H_E = 0,67$) a CSSM66 ($N_A = 4$, $H_E = 0,55$); vo Vysokých Tatrách CSSM66 ($N_A = 3$, $H_E = 0,67$) a SY434 ($N_A = 3$, $H_E = 0,59$); v Slovenskom raji BOBT24A ($N_A = 3$, $H_E = 0,66$), ETH225 ($N_A = 3$, $H_E = 0,64$) a SY434 ($N_A = 3$, $H_E = 0,64$); a vo Veľkej Fatre NRAMP1 ($N_A = 4$, $H_E = 0,75$) a ILST030 ($N_A = 4$, $H_E = 0,74$). Odchýlka od Hardy-Weinbergovej rovnováhy bola zistená len v prípade dvoch lokusov (TGLA53, MAF214) vo vysokotatranskej populácii (tab. 2).

Tab. 2. Charakteristika neutrálnej genetickej variability v populácii kamzíka vrchovského tatranského vo Vysokých Tatrách (n = 40). N_A – počet alel na lokus, A_R – alelová diverzita, H_E – očakávaná heterozygotnosť, H_O – pozorovaná heterozygotnosť, F_{IS} – koeficient inbrídingu.

Lokus	N_A	A_R	H_E	H_O	F_{IS}
OarFCB20	2	1,992	0,162	0,175	-0,083
OarFCB304	3	2,947	0,249	0,275	-0,103
SRCRSP05	2	1,929	0,096	0,100	-0,040
SY 84	1	1,000	0	0	-
CSSM66	3	3,000	0,672	0,675	-0,005
ETH10	2	2,000	0,479	0,575	-0,199
SY434	3	3,000	0,595	0,625	-0,051
INRA121	2	2,000	0,437	0,325	0,256
SRCRSP11	2	2,000	0,453	0,425	0,062
TGLA53	2	2,000	0,504	0,300	0,405*
SY259	2	1,475	0,025	0,025	0,000
BOBT24A	2	2,000	0,497	0,615	-0,239
BM1258	2	2,000	0,330	0,359	-0,088
SRCRSP09	2	2,000	0,403	0,450	-0,116
ETH225	3	2,929	0,546	0,475	0,130
ILST030	3	2,999	0,456	0,475	-0,042
NRAMP1	1	1,000	0	0	-
MAF214	2	2,000	0,501	0,725	-0,448*
priemer	2,167	2,126	0,356	0,367	-0,030

* lokus mimo HWE, $P < 0,05$

Tab. 3. Charakteristika neutrálnej genetickej variability v populácii kamzíka vrchovského tatranského v Nízkych Tatrách (n = 26). Použité skratky sú rovnaké ako v Tab. 2.

Lokus	N_A	A_R	H_E	H_O	F_{IS}
OarFCB20	3	2,195	0,182	0,192	-0,059
OarFCB304	4	3,931	0,444	0,538	-0,213
SRCRSP05	3	3,000	0,458	0,538	-0,176
SY 84	2	1,996	0,145	0,154	-0,064
CSSM66	4	3,730	0,550	0,538	0,021
ETH10	2	2,000	0,209	0,154	0,265
SY434	4	3,931	0,672	0,731	-0,087
INRA121	2	2,000	0,415	0,577	-0,389
SRCRSP11	3	2,931	0,548	0,462	0,158
TGLA53	3	2,999	0,492	0,577	-0,172
SY259	3	2,731	0,270	0,308	-0,140
BOBT24A	3	2,731	0,526	0,423	0,196
BM1258	4	3,760	0,478	0,560	-0,173
SRCRSP09	3	2,996	0,566	0,615	-0,087
ETH225	3	2,731	0,519	0,538	-0,037
ILST030	3	3,000	0,645	0,731	-0,134
NRAMP1	3	2,760	0,400	0,520	-0,300
MAF214	3	2,989	0,523	0,360	0,312
priemer	3,056	2,912	0,447	0,473	-0,059

Tab. 4. Charakteristika genetickej variability v populácii kamzíka vrchovského alpského vo Veľkej Fatre (n = 21). Použité skratky sú rovnaké ako v Tab. 2.

Lokus	N_A	A_R	H_E	H_O	F_{IS}
OarFCB20	3	3,000	0,625	0,542	0,162
OarFCB304	4	4,000	0,650	0,619	0,048
SRCRSP05	2	2,000	0,283	0,333	-0,176
SY 84	3	3,000	0,654	0,667	-0,020
CSSM66	3	3,000	0,536	0,429	0,200
ETH10	2	2,000	0,250	0,286	-0,143
SY434	3	3,000	0,629	0,810	-0,288
INRA121	1	1,000	0	0	-
SRCRSP11	3	3,000	0,617	0,619	-0,004
TGLA53	2	2,000	0,440	0,333	0,243
SY259	3	3,000	0,430	0,381	0,114
BOBT24A	3	3,000	0,615	0,381	0,381
BM1258	4	4,000	0,612	0,667	-0,089
SRCRSP09	2	2,000	0,317	0,286	0,098
ETH225	1	1,000	0	0	-
ILST030	4	4,000	0,743	0,810	-0,090
NRAMP1	4	4,000	0,754	0,684	0,093
MAF214	3	3,000	0,654	0,667	-0,020
priemer	2,778	2,778	0,489	0,473	0,036

Tab. 5. Charakteristika neutrálnej genetickej variability v populácii kamzíka vrchovského alpského v Slovenskom raji (n = 77). Použité skratky sú rovnaké ako v Tab. 2.

Lokus	N_A	A_R	H_E	H_O	F_{IS}
OarFCB20	3	2,994	0,532	0,519	0,023
OarFCB304	3	2,998	0,592	0,558	0,057
SRCRSP05	2	2,000	0,481	0,532	-0,107
SY 84	2	2,000	0,458	0,494	-0,077
CSSM66	3	2,434	0,489	0,429	0,124
ETH10	2	2,000	0,394	0,351	0,109
SY434	3	3,000	0,639	0,571	0,106
INRA121	1	1,000	0	0	-
SRCRSP11	2	2,000	0,487	0,429	0,120
TGLA53	2	2,000	0,502	0,545	-0,086
SY259	2	2,000	0,416	0,429	-0,030
BOBT24A	3	3,000	0,657	0,597	0,091
BM1258	3	2,992	0,494	0,455	0,079
SRCRSP09	2	1,869	0,087	0,091	-0,041
ETH225	3	3,000	0,642	0,636	0,009
ILST030	3	3,000	0,597	0,545	0,086
NRAMP1	3	3,000	0,526	0,481	0,087
MAF214	3	3,000	0,624	0,558	0,105
priemer	2,500	2,460	0,479	0,457	0,046

Tab. 6. Charakteristika neutrálnej genetickej variability vo všetkých populáciách kamzíkov na Slovensku – priemerné hodnoty. VT – Vysoké Tatry, NT – Nízke Tatry, VF – Veľká Fatra, SR – Slovenský raj. A_R – alelová diverzita, H_E – očakávaná heterozygotnosť, H_O – pozorovaná heterozygotnosť, F_{IS} – koeficient inbrídingu.

Populácia	A_R	H_E	H_O	F_{IS}
VT	2,126	0,356	0,367	-0,030
NT	2,912	0,447	0,473	-0,059
VF	2,778	0,489	0,473	0,036
SR	2,460	0,479	0,457	0,046

3.2 Genetická štruktúra populácií a detekcia hybridizácie

Medzi populáciami bola zistená relatívne vysoká miera diferenciácie: $F_{ST} = 0,396$ ($P = 0,05$). Pri použití párových testov, teda porovnávaní každej populácie s každou (tab. 7), najmenšia diferenciácia bola zistená medzi vysokotatranskou a nízkotatranskou populáciou ($F_{ST} = 0,070$), ale aj táto hodnota je štatisticky významná. Naopak najväčšia diferenciácia populácií bola zaznamenaná medzi vysokotatranskou populáciou a populáciou kamzíka v Slovenskom raji ($F_{ST} = 0,487$). Pomerne vysoká je aj diferenciácia oboch populácií alpského pôvodu, teda medzi populáciou vo Veľkej Fatre a v Slovenskom raji ($F_{ST} = 0,246$). Tieto hodnoty teda ukazujú, že sa obe populácie alpských kamzíkov navzájom líšia a zároveň sa odlišujú od populácie kamzíka vo Vysokých Tatrách. Od nízkotatranskej populácie sa obe alpské populácie odlišujú menej.

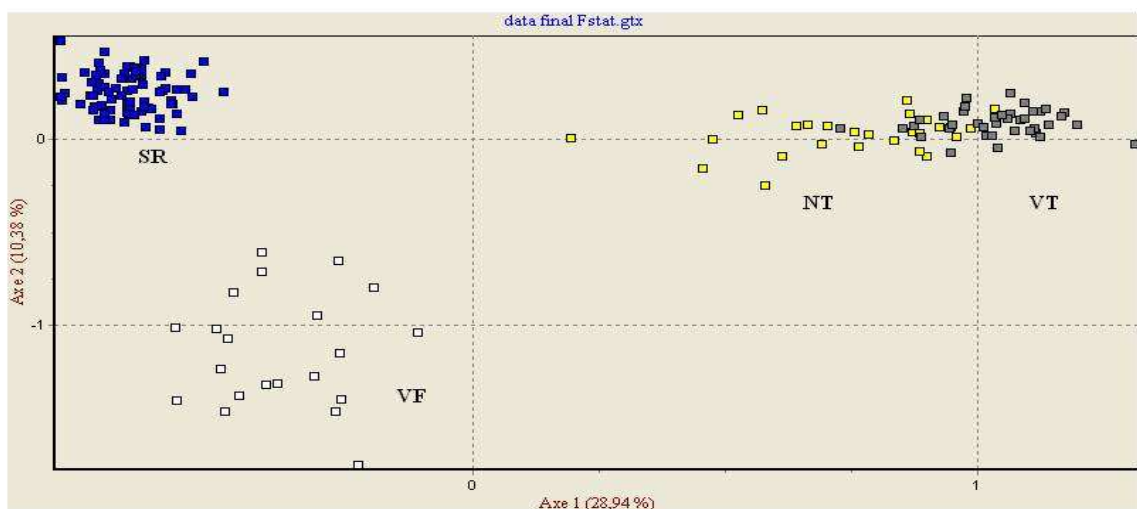
Tab. 7. Miera diferenciácie medzi študovanými populáciami vyjadrená fixačným indexom (F_{ST}). VT – Vysoké Tatry, NT – Nízke Tatry, VF – Veľká Fatra, SR – Slovenský raj.

* $P < 0,05$

	VT	NT	VF	SR
VT	—	0,0699*	0,4805*	0,4869*
NT	0,0699*	—	0,3664*	0,4059*
VF	0,4805*	0,3664*	—	0,2456*
SR	0,4869*	0,4059*	0,2456*	—

Na diferenciáciu populácií poukazuje aj existencia privátnych alel. Tieto boli zistené vo všetkých populáciách okrem Nízkych Tatier. V populácii v Slovenskom raji i vo Veľkej Fatre bol zistený rovnaký počet privátnych alel, sedem. V populácii vo Vysokých Tatrách boli zistené tri privátne alely.

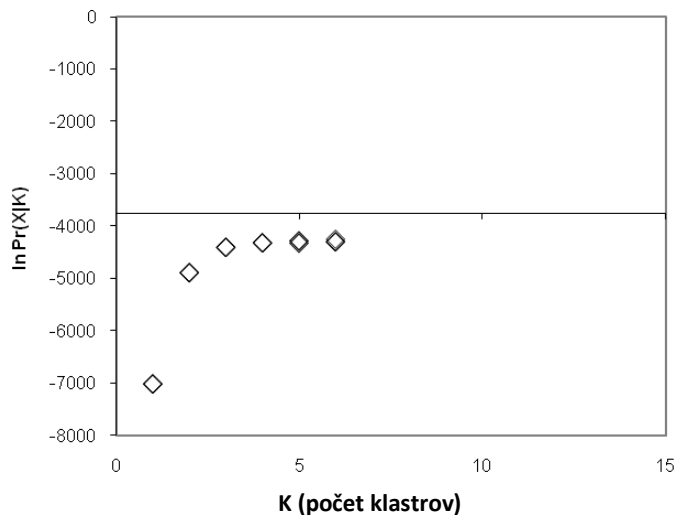
Genetická štruktúra populácií bola ďalej skúmaná pomocou faktoriálnej korešpondenčnej analýzy (FCA). Táto analýza ukázala, že oba poddruhy kamzíka sú na Slovensku geneticky veľmi dobre oddelené. Obe alpské populácie sú zreteľne diferencované, vytvárajú samostatné zhluky (obr. 12). Populácia v Slovenskom raji je značne homogénna. Diferenciácia je najväčšia v populácii vo Veľkej Fatre, čo poukazuje na rôznorodosť jedincov, ktorí sa podieľali na jej vzniku. Obe tatranské populácie sa zobrazili spolu v jednom zhluku, ale niektoré jedince z Nízkych Tatier sú posunuté smerom k alpským populáciám.



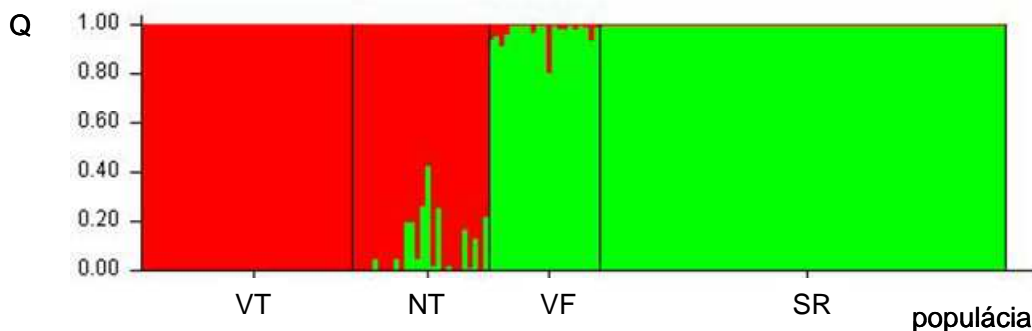
Obr. 12. Rozmiestenie genotypov jedincov v dvojrozmernom priestore na základe faktoriálnej korešpondenčnej analýzy. VT – Vysoké Tatry, NT – Nízke Tatry, VF – Veľká Fatra, SR – Slovenský raj.

Následne bola populačno-genetická štruktúra hodnotená Bayesiánskou zhlukovacou analýzou v programe STRUCTURE. Ako najvhodnejšie sa ukázalo rozdelenie do dvoch zhlukov ($K = 2$, obr. 13), ktoré zodpovedajú tatranskému a alpskému poddruhu (obr. 14). Pri rozdelení do troch zhlukov ($K = 3$) sa oddelili zvlášť populácie v Slovenskom raji a Veľkej Fatre, zatiaľ čo tatranské populácie zostali spojené (obr. 15). V nízkotatranskej populácii je pozorovateľná hybridizácia medzi tatranským a alpským poddruhom. Za hybridov boli považované jedince s hodnotou $Q > 0,15$ (pre alpský poddruh), čo sme zistili u siedmich jedincov, teda 27 %. Výsledky boli konzistentné pri $K = 2$ i $K = 3$. Jediný rozdiel bol v prípade jedinca NT89, ktorého by sme pri $K = 2$ podľa nášho kritéria ($Q > 0,15$) ešte nepovažovali za hybrida ($Q = 0,132-0,134$), ale pri $K = 3$ už áno ($Q = 0,157-0,160$). Teda v prípade $K = 3$ by miera

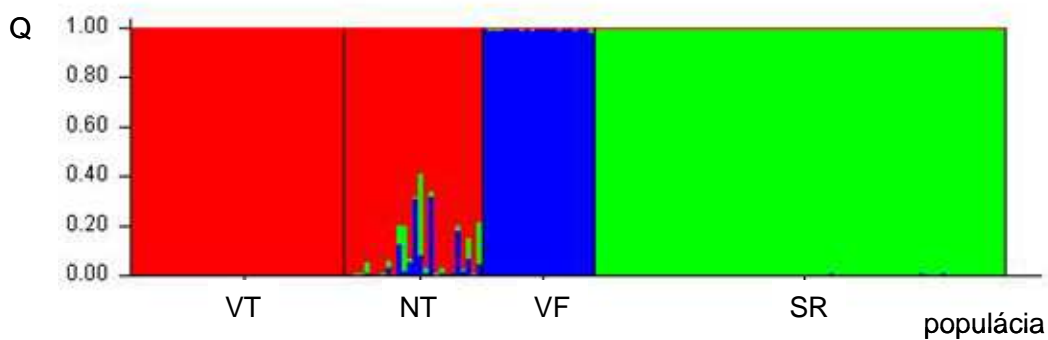
hybridizácie bola 31 % (osem jedincov). Výsledky analýz naznačujú, že k hybridizácii došlo v dôsledku migrácie jedincov z Veľkej Fatry aj zo Slovenského raja. Z ôsmich jedincov označených ako hybridy sa v analýze u troch jedincov ukazuje genetický podiel hlavne z Veľkej Fatry, u ďalších troch jedincov hlavne zo Slovenského raja a u posledných dvoch jedincov približne rovnaký podiel z oboch týchto populácií (obr. 15).



Obr. 13. Hodnoty pravdepodobnosti $\ln Pr$ pre jednotlivé hodnoty K ($K = 1-6$). Fáza plató nastáva pri $K = 3$. Najväčší rozdiel $\ln PR$ je pri $K = 2$ (podľa EVANNO et al. 2005).



Obr. 14. Genetická štruktúra slovenských populácií kamzíka vrchovského na základe Bayesiánskej zhlukovacej analýzy, $K = 2$. VT – Vysoké Tatry, NT – Nízke Tatry, VF – Veľká Fatra, SR – Slovenský raj. Jednotlivé stĺpce zodpovedajú jedincom z danej populácie a farby jednotlivým zhlukom. V prípade, že stĺpec je viacfarebný, pomer farieb vyjadruje, približne aká časť genómu patrí k danému zhluku („membership coefficient“, Q). Jedince sa rozdelili do zhlukov presne zodpovedajúcim tatranskému a alpskému poddruhu. V Nízkych Tatrách je pozorovateľná hybridizácia medzi tatranským a alpským poddruhom.



Obr. 15. Genetická štruktúra slovenských populácií kamzíka vrchovského na základe Bayesiánskej zhlukovacej analýzy, $K = 3$. Jedince sa rozdelili do troch zhlukov: obe populácie tatranského poddruhu vytvorili jeden spoločný zhluk, zatiaľ čo jedince alpského pôvodu sa zoskupili oddelene a presne zodpovedajú populáciám vo Veľkej Fatre a Slovenskom raji. V Nízkych Tatrách je opäť pozorovateľná hybridizácia medzi tatranským a alpským poddruhom.

Hybridizácia bola ďalej analyzovaná pomocou programu NewHybrids. Všetky jedince z Vysokých Tatier sa zaradili k diskretnej skupine 1 (tatranský poddruh). Všetky jedince z Veľkej Fatry a Slovenského raja sa zaradili k diskretnej skupine 2 (alpský poddruh). V populácii v Nízkych Tatrách bol zistený výskyt hybridov. V kategóriách F1 a F2 nebol detekovaný žiadny hybrid, ale do kategórie spätný kríženec s poddruhom 1 („backcross“ s tatranským poddruhom) sa zaradilo osem jedincov. Zistená miera hybridizácie v populácii v Nízkych Tatrách teda bola 31 %.

3.3 Detekcia bottlenecku a odhady efektívnej veľkosti populácií

Skutočnosť, či populácie prešli výrazným recentným poklesom početnosti, bola zisťovaná pomocou programu Bottleneck. Existencia recentného bottlenecku bola potvrdená u všetkých štyroch skúmaných populácií, a to pri použití všetkých mutačných modelov (IAM, SMM, TPM), okrem nízkotatranskej populácie, kde bol bottleneck zistený len pri IAM modeli (tab. 8).

Tab. 8. Detekcia bottlenecku – hodnoty pravdepodobnosti (P) na základe Wilcoxonovho testu. Hodnoty $P < 0,05$ znamenajú signifikantný výsledok testu (potvrdenie recentného bottlenecku), hodnoty $P > 0,05$ nesignifikantný výsledok (označené *). IAM – Infinite Allele Model, SMM – Stepwise Mutation Model, TPM – Two-phased Model.

	IAM	SMM	TPM
VT	0,00053	0,03696	0,01070
NT	0,00912	0,73869*	0,41586*
VF	0,00001	0,00042	0,00005
SR	0,00001	0,00002	0,00004

Odhady efektívnej veľkosti populácií (N_e) boli získané pomocou programu OneSAMP. V prípade všetkých populácií bola zistená nízka N_e , iba 17 až 20 jedincov. Odhady priemerných hodnôt a mediánov sú veľmi podobné a 95 % interval spoľahlivosti odhadu je pomerne úzky (tab. 9). Najvyššia hodnota bola zistená pre introdukovanú populáciu kamzíka v Slovenskom raji – priemer 19,6. Odhad N_e autochtónnej vysokotatranskej populácie bol dokonca ešte o niečo nižší – priemer 17,8. Len o málo nižšie sú aj odhady N_e pre ďalšie dve introdukované populácie – priemer 16,9 pre Nízke Tatry a 16,5 pre Veľkú Fatru.

Tab. 9. Odhady efektívnej veľkosti populácií – priemer, medián a 95 % interval spoľahlivosti pre posteriórnu distribúciu N_e .

	priemer	medián	95 % interval spoľahl.
VT	17,798	17,624	15,199-23,463
NT	16,897	16,862	14,934-19,973
VF	16,485	16,468	14,295-20,704
SR	19,579	19,516	17,208-23,761

4. DISKUSIA

4.1 Genetická variabilita

Vo všetkých populáciách kamzíka vrchovského na Slovensku sme zistili nízku genetickú variabilitu mikrosatelitovej DNA. Najnižšie hodnoty boli zistené v jedinej pôvodnej populácii endemického kamzíka vrchovského tatranského vo Vysokých Tatrách, ale aj variabilitu v ostatných študovaných populáciách je možné považovať za nízku. Okrem našich výsledkov (táto práca a ZEMANOVÁ et al. 2011, ZEMANOVÁ et al. in press) existujú údaje o variabilite mikrosatelitovej DNA kamzíka vrchovského tatranského v niekoľkých ďalších publikáciách, i keď tieto sú založené len na malom počte skúmaných vzoriek. PÉREZ et al. (2002) použili 25 mikrosatelitových lokusov pre štúdium fylogeografie rodu *Rupicapra* a do analýz zahrnuli aj tri jedince kamzíka vrchovského tatranského. Z použitého počtu 25 lokusov bolo u týchto troch jedincov 79 % polymorfných a priemerný počet alel na lokus bol 2,29, $H_E = 0,47$ a $H_O = 0,43$. CRESTANELLO et al. (2009) v štúdiu genetického vplyvu translokácií a fragmentácie biotopov popri analýze mitochondriálnej DNA použili aj 11 mikrosatelitových markerov. Z vysokotatranskej populácie analyzovali šesť vzoriek a zistili priemerný počet alel na lokus 2,18, $H_E = 0,33$ a $H_O = 0,42$. Označenie populácií v tabuľke a hodnoty uvádzané v texte však nie sú úplne v súlade. Najnovšia štúdia fylogeografie rodu *Rupicapra* (RODRÍGUEZ et al. 2010) zahŕňa okrem rozsiahlych analýz mitochondriálnej DNA aj analýzu 20 mikrosatelitových lokusov. Kamzík vrchovský tatranský je v práci zastúpený 10 jedincami. Z 20 analyzovaných lokusov bolo u tohto poddruhu 15 polymorfných, priemerný počet alel na lokus bol 2,45, H_E aj $H_O = 0,33$. V našej práci sme na základe analýzy 18 mikrosatelitových lokusov zistili nasledovné hodnoty pre vysokotatranskú populáciu: 89 % lokusov polymorfných, alelová diverzita 2,13, $H_E = 0,36$ a $H_O = 0,37$. Priemerný počet alel na lokus vo vysokotatranskej populácii bol teda veľmi podobný vo všetkých štúdiách (2,13-2,18). V práci RODRÍGUEZ et al. (2010) bola síce zistená mierne vyššia hodnota (2,45), ale nie je tam uvedený pôvod jedincov (Vysoké alebo Nízke Tatry, resp. zmiešané obe populácie). Hodnoty očakávaných a pozorovaných heterozygotností sú tiež veľmi podobné, v práci RODRÍGUEZ et al. (2010) mierne nižšie, naopak v práci PÉREZ et al. (2002) mierne vyššie. Tieto malé rozdiely sú pravdepodobne dané odlišnými mikrosatelitovými lokusmi použitými v jednotlivých štúdiách, prípadne rôznym počtom jedincov použitých pre analýzy. Celkovo sú však hodnoty mikrosatelitovej variability vo

všetkých prácach veľmi podobné a je potrebné zdôrazniť, že ide o značne nízke hodnoty. Z ďalších nami skúmaných populácií je možné len porovnanie s CRESTANELLO et al. (2009), ktorí v rámci vyššie spomínanej štúdie analyzovali aj deväť vzoriek z nízkotatranskej populácie a šesť vzoriek z Veľkej Fatry. V nízkotatranskej populácii zistili priemerný počet alel na lokus 2,82, $H_E = 0,41$ a $H_O = 0,40$ a u vzoriek z Veľkej Fatry priemerný počet alel na lokus 2,18, $H_E = 0,28$ a $H_O = 0,27$. Naše výsledky týkajúce sa nízkotatranskej populácie sú veľmi podobné, resp. o trochu vyššie ($A_R = 2,91$, $H_E = 0,45$, $H_O = 0,47$). V populácii z Veľkej Fatry sme zistili vyššiu variabilitu mikrosatelitovej DNA ($A_R = 2,78$, $H_E = 0,49$, $H_O = 0,47$). Avšak aj v týchto introdukovaných populáciách ide celkovo o nízke hodnoty genetickej variability.

Nízka genetická variabilita je v prípade vysokotatranskej populácie pravdepodobne dôsledkom opakovaných výrazných poklesov početnosti, ktorými populácia prešla. Ostatné populácie majú nízku genetickú variabilitu v dôsledku efektu zakladateľa, keďže boli vytvorené len z niekoľkých jedincov. Podobne nízke hodnoty boli zistené aj v populáciách ďalších druhov kopytníkov, ktoré boli v minulosti na pokraji vyhynutia. V populácii kamzíka abruzskeho (*R. pyrenaica ornata*), ktorá mala na konci 40. rokov minulého storočia menej než 100 jedincov, bolo zistených 2,1 alely na lokus a $H_E = 0,44$ (LORENZINI 2005). Genetická variabilita v siedmich alpských populáciách kozorožca vrchovského (*Capra ibex*), ktorého areál bol v 18. storočí zredukovaný na jedinú populáciu s 90-200 jedincami, bola podobne nízka ($N_A = 2,4$; $H_e = 0,40$; MAUDET et al. 2002). Zubor európsky (*Bison bonasus*) v minulosti vo voľnej prírode úplne vyhynul a iba niekoľko desiatok jedincov tohto druhu bolo chovaných v zoológických záhradách. Z nich sa len niekoľko jedincov stalo zakladateľmi súčasnej populácie, čomu opäť zodpovedajú zistené hodnoty neutrálnej genetickej variability ($N_A = 2,8$; $H_E = 0,26$; TOKARSKA et al. 2009). Pre porovnanie, hodnoty v početných populáciách kamzíka vrchovského v Alpách a kamzíka pyrenejského (*R. pyrenaica pyrenaica*) v Pyrenejách, ktoré neprešli dramatickým demografickým vývojom, sa pohybujú v rozpätí $N_A = 3,5-7,2$ a $H_E = 0,43-0,74$ (PÉREZ et al. 2002, CASSAR et al. 2007, CRESTANELLO et al. 2009, RODRÍGUEZ et al. 2010, SOGLIA et al. 2010). Genetická variabilita mikrosatelitovej DNA v týchto populáciách je teda približne dvakrát vyššia ako u kamzíka vrchovského tatranského.

Je zaujímavé, že variabilita v slovenských populáciách, ktoré boli vytvorené introdukciou iba niekoľkých jedincov – v prípade Slovenského raja dokonca iba šiestich – bola v porovnaní s pôvodnou populáciou tatranského kamzíka vyššia. To je pravdepodobne dané genetickou rozmanitosťou zakladateľov populácií alpského kamzíka, ale zároveň to poukazuje na významnosť, s akou ovplyvňujú dramatické zmeny početnosti, prípadne dlhodobu nízku početnosť, genetickú variabilitu populácie. Variabilita nízkotatranskej populácie je oproti vysokotatranskej mierne vyššia v dôsledku hybridizácie niekoľkých jedincov s alpským poddruhom.

Extrémne nízka variabilita – iba jediná alela – bola zistená vo vysokotatranskej populácii aj v prípade adaptívnej variability, konkrétne u génu *DRB* (MHC class II). V Nízkych Tatrách boli zistené dve, vo Veľkej Fatre tri a v Slovenskom raji štyri alely (ZEMANOVÁ et al. in press). Naproti tomu vo východných Alpách v Taliansku bolo v desiatich populáciách alpského kamzíka zistených 4-13 (priemer 8,7) alel (MONA et al. 2008). Celkovo bolo doteraz identifikovaných 40 alel génu *DRB* v populáciách kamzíka vrchovského alpského a 13 u kamzíka stredozemného (*Rupicapra pyrenaica*) (SCHASCHL et al. 2004, SCHASCHL et al. 2005, ALVAREZ-BUSTO et al. 2007, MONA et al. 2008). Teda na základe doterajších výsledkov sa zdá, že genetická variabilita slovenských populácií kamzíka je nízka v prípade neutrálnych (mikrosatelity) i adaptívnych (gén *DRB*, MHC class II) markerov.

Nízka genetická variabilita môže pre populáciu znamenať ohrozenie v dôsledku zníženého adaptívneho potenciálu. Zároveň ale existujú populácie, ktoré napriek nízkej variabilite prosperujú – napr. v prípade kamzíka beláka (*Oreamnus americanus*) alebo zubra európskeho (*Bison bonasus*) (MAINGUY et al. 2007, TOKARSKA et al. 2009). K ohrozeniu populácie s nízkou genetickou variabilitou však môže dôjsť v prípade náhlych zmien prostredia – napr. pri objavení sa nového patogénu, pri zmene spoločenstva parazitov alebo v prípade klimatických zmien.

4.2 Genetická štruktúra populácií a detekcia hybridizácie

Viacerými metódami sme dospeli k podobným zisteniam o genetickej štruktúre slovenských populácií. Na základe prítomnosti pomerne vysokého počtu privátnych alel v populáciách alpských kamzíkov, signifikantných hodnôt fixačného indexu, FCA analýzy i Bayesiánskych zhlukovacích analýz sa ukázalo, že oba poddruhy sú na Slovensku veľmi jasne geneticky oddelené. Toto zistenie nie je prekvapujúce vzhľadom

k spôsobu rozšírenia horských kopytníkov, kde jednotlivé pohoria fungujú ako ostrovy vhodného prostredia a populácie medzi sebou často nekomunikujú. Tiež obe populácie alpských kamzíkov sa medzi sebou geneticky značne líšia, čo je pravdepodobne dôsledok genetickej rozdielnosti zakladateľov týchto dvoch populácií. Na základe všetkých vyššie spomenutých metód sme zistili, že v Nízkych Tatrách došlo k hybridizácii medzi tatranským a alpským poddruhom. Výsledky analýz v programe STRUCTURE a NewHybrids naznačujú, že v Nízkych Tatrách došlo ku kríženiu s jedincami z Veľkej Fatry aj zo Slovenského raja. Odhadovaná miera hybridizácie je 27-31 % na základe analýzy v programe STRUCTURE a 31 % na základe analýzy v programe NewHybrids. Nezistili sme však žiadnych hybridov F1 či F2 generácie, len spätných krížencov s tatranským poddruhom. Z toho možno usudzovať, že hybridizácia nie je v Nízkych Tatrách veľmi častým javom a tiež že k nej došlo zrejme už skôr v minulosti. Pre podrobnejšie analýzy miery hybridizácie by bolo vhodné analyzovať čo najviac vzoriek (napr. trusu, srsti) z nízkotatranskej populácie.

Na možnosť migrácie jedincov z oblasti Veľkej Fatry a Slovenského raja smerom do Nízkych Tatier upozorňovali už od 70. rokov minulého storočia viacerí autori. V prípade Veľkej Fatry poukazovali na to, že biotop je málo vyhovujúci pre kamzíka, a teda je zvýšená pravdepodobnosť migrácie jedincov do okolia (ĎURÍK 1981, HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Do roku 1972 boli zaznamenané občasné migrácie západným, severným a severozápadným smerom (do Chočských vrchov, Veľkokrivánskej Fatry a Strážovských vrchov), ale tiež na východ (HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Práve migrácie východným smerom predstavovali riziko novej hybridizácie a ohrozenia genofondu nízkotatranskej populácie (ĎURÍK 1981, HELL & CHOVANCOVÁ 1995). Podobne aj územie Slovenského raja sa nachádza v geografickej blízkosti s územím Nízkych Tatier – pohoria sú prepojené cez masív Kráľovej hole. KARČ & RADÚCH (1978) uvádzajú, že po vypustení kamzíkov v Slovenskom raji boli zaznamenané občasné migrácie až do vzdialenosti 11-49 km, ale o trvalom výskyte kamzíkov v okolí Kráľovej hole neboli žiadne správy (HÁJEK & OGURČÁK 1981). V roku 1981 bolo na konferencii venovanej ochrane kamzíka rozhodnuté o eliminácii introdukovaných populácií vo Veľkej Fatre i Slovenskom raji z dôvodu ochrany genofondu pôvodného tatranského kamzíka. Okrem pravidelných regulačných odstrelov (smerovaných hlavne na územie potenciálneho kontaktu populácií) však nedošlo k realizácii žiadnych ďalších opatrení. Pomocou genetických analýz sme potvrdili, že k migrácii a následnej hybridizácii v Nízkych Tatrách skutočne došlo, a to pravdepodobne z oboch alpských

populácií. Na základe našich výsledkov však možno usudzovať, že zrejme nejde o častý jav – možno to boli i len ojedinelé udalosti, ale ich genetická stopa sa v nízkotatranskej populácii zachováva. Populáciu v Nízkych Tatrách teda nemožno považovať za čistý poddruh *R. r. tatrlica*. Pomocou genetických analýz by však bolo možné identifikovať jedince, ktoré (s veľmi veľkou pravdepodobnosťou) nenesú gény alpského poddruhu. Takéto analýzy by mohli byť užitočné napríklad v prípade, že by sa uvažovalo nad posilnením populácie vo Vysokých Tatrách pomocou jedincov z Nízkych Tatier. Zároveň však poddruhový status nemá z biologického pohľadu veľké opodstatnenie a pokiaľ by populácia tatranského kamzíka mohla byť zachránená s pomocou jedincov hybridného pôvodu či iného poddruhu, je to pravdepodobne vždy lepšie riešenie, ako nechať populáciu dospieť k extinkcii. Našťastie v súčasnosti početnosť populácie vo Vysokých Tatrách rastie, teda takéto úvahy sú málo aktuálne. V súvislosti s nízkou genetickou variabilitou by potenciálnym problémom mohla byť malá evolučná plasticita v prípade výrazných zmien prostredia (napr. výrazné klimatické zmeny, objavenie sa nového parazita), čo by mohlo opäť túto otázku otvoriť.

4.3 Detekcia bottlenecku a odhady efektívnej veľkosti populácií

Na základe analýz v programe Bottleneck sme detekovali výrazný pokles početnosti vo všetkých skúmaných populáciách. Vo Vysokých Tatrách, Veľkej Fatre i Slovenskom raji bol výsledok signifikantný pri použití všetkých troch mutačných modelov (IAM, SMM, TPM), v Nízkych Tatrách len pri IAM modeli. Tieto výsledky potvrdzujú naše očakávania, keďže vo vysokotatranskej populácii došlo v minulom storočí k dvom výrazným bottleneckom a všetky ostatné populácie boli založené len z niekoľkých jedincov, teda sú silne ovplyvnené efektom zakladateľa (veľmi silný bottleneck v jednej generácii). Program Bottleneck umožňuje detekciu recentného bottlenecku, čo je tiež v súlade so známou históriou populácií. Skutočnosť, že v Nízkych Tatrách sme bottleneck detekovali len pri použití jedného modelu, môže súvisieť s tým, že v tejto populácii dochádza k výraznejšiemu toku génov v porovnaní s ostatnými populáciami. Tok génov môže čiastočne narušiť mutačno-driftové equilibrium, na ktorom je založený princíp testov v programe Bottleneck. Tento tok génov je pravdepodobne dôsledkom občasnej (alebo ojedinelej) migrácie jedinca/ov z Veľkej Fatry a Slovenského raja, ako sme to zistili pri analýzach populačnej štruktúry a hybridizácie.

Pomocou programu OneSAMP sme získali odhady efektívnej veľkosti populácií (N_e). V prípade všetkých populácií bola zistená nízka N_e , iba 17 až 20 jedincov. Najvyššia hodnota bola zistená pre introdukovanú populáciu kamzíka v Slovenskom raji, 20 jedincov. Odhad N_e autochtónnej vysokotatranskej populácie bol prekvapivo ešte nižší, len 18 jedincov. Odhady N_e ďalších dvoch introdukovaných populácií, v Nízkych Tatrách a Veľkej Fatre, sú takmer zhodné, 17 jedincov.

Odhady N_e v tejto práci sú založené len na použití jedného programu, OneSAMP. Tento program bol testovaný na introdukovanej populácii kozorožca z Francúzskych Álp a odhad N_e získaný programom veľmi dobre zodpovedal známej histórii tejto populácie (TALLMON et al. 2008). Pre získanie čo najspoľahlivejších výsledkov by bolo vhodné použitie viacerých programov, väčšina programov pre odhad N_e však vyžaduje minimálne dve časové vzorky, ktoré sme v tejto práci nemali k dispozícii.

Najvyšší odhad N_e bol zistený pre populáciu v Slovenskom raji, hoci táto vznikla len zo šiestich jedincov. Odhad N_e vysokotatranskej populácie bol dokonca ešte nižší, a to i napriek tomu, že ide o jedinú autochtónnu populáciu v tejto práci a že v súčasnosti už jej početnosť pomerne výrazne narastá (posledný údaj zo sčítania v júli 2011 je viac ako 900 jedincov). Nízka N_e je pravdepodobne dôsledkom výrazných poklesov početnosti (bottlenecky po 1. a 2. svetovej vojne a na prelome tisícročí), prípadne aj nedostatku samcov v populácii (na pomer pohlaví výrazne posunutý v prospech samíc upozorňuje napr. aj CHOVANCOVÁ (2009)). Nízka efektívna veľkosť populácie spolu s nízkou genetickou variabilitou poukazujú na značnú zraniteľnosť tejto populácie. N_e i genetická variabilita mikrosatelitovej DNA sú dokonca ešte nižšie ako v prípade populácie, ktorá bola založená iba zo šiestich jedincov (Slovenský raj). V prípade ďalších dvoch introdukovaných populácií (Nízke Tatry, Veľká Fatra) odhady N_e približne zodpovedajú počtu zakladateľov týchto populácií – obe vznikli približne z 20 jedincov a u oboch bola súčasná N_e odhadnutá na približne 17 jedincov. Efektívna veľkosť všetkých skúmaných populácií kamzíka na Slovensku je nižšia ako udávané minimum pri posudzovaní rizika extinkcie, ktoré hovorí, že krátkodobá efektívna veľkosť populácie by nemala byť nižšia ako 50 jedincov a z dlhodobého pohľadu by nemala klesnúť pod 500 (pravidlo 50/500; FRANKLIN 1980, ALBRECHT et al. 2005). Všetky populácie kamzíka na Slovensku teda možno považovať za veľmi malé a preto značne ohrozené genetickou (drift, inbríding) i demografickou stochasticitou. Efektívna veľkosť pôvodnej i introdukovanej tatranskej populácie je približne rovnaká a ani obe populácie dohromady nedosahujú doporučované minimum 50 jedincov. Zaradenie kamzíka vrchovského tatranského medzi kriticky ohrozené živočíchy je preto veľmi opodstatnené a obe jeho populácie vyžadujú prísnu ochranu a prípadne i ďalší management.

5. SÚHRN

1) Genetická variabilita mikrosatelitovej DNA bola nízka vo všetkých skúmaných populáciách kamzíka vrchovského na Slovensku. V prípade populácie vo Vysokých Tatrách je to pravdepodobne dôsledok opakovaných výrazných poklesov početnosti, ktorými populácia prešla. Ostatné populácie majú nízku genetickú variabilitu v dôsledku efektu zakladateľa, keďže boli vytvorené len z niekoľkých jedincov. Mikrosatelitová variabilita vysokotatranskej populácie bola však dokonca nižšia ako variabilita populácie v Slovenskom raji, ktorá bola založená len zo šiestich jedincov. Podobne nízke hodnoty boli zistené v populáciách ďalších druhov kopytníkov, ktoré boli v minulosti na pokraji vyhynutia (napr. kamzík abruzský, kozorožec vrchovský, zubor európsky). Úroveň genetickej variability početných populácií kamzíkov v Alpách a Pyrenejách je podľa publikovaných výsledkov približne dvakrát vyššia.

2) Oba poddruhy kamzíka žijúce na Slovensku sú geneticky veľmi jasne oddelené. Tiež obe populácie alpských kamzíkov (vo Veľkej Fatre a Slovenskom raji) sa medzi sebou geneticky značne líšia, čo je pravdepodobne dôsledok genetickej rozdielnosti zakladateľov týchto dvoch populácií. Obe populácie tatranských kamzíkov (vo Vysokých a Nízkych Tatrách) sa v analýzach zoskupovali spoločne.

3) Pomocou viacerých analýz sme zistili, že v Nízkych Tatrách došlo k hybridizácii medzi tatranským a alpským poddruhom. Odhadovaná miera hybridizácie je približne 30 %. Výsledky naznačujú, že došlo ku kríženiu s jedincami z Veľkej Fatry aj zo Slovenského raja. Nezistili sme však žiadnych hybridov F1 či F2 generácie, len spätných krížencov s tatranským poddruhom. Z toho možno usudzovať, že hybridizácia nie je v Nízkych Tatrách veľmi častým javom a tiež že k nej došlo zrejme už skôr v minulosti.

4) Na základe analýz v programe Bottleneck sme detekovali recentný výrazný pokles početnosti vo všetkých skúmaných populáciách. Tieto výsledky potvrdzujú naše očakávania, keďže vo vysokotatranskej populácii došlo v minulom storočí k dvom výrazným bottleneckom a všetky ostatné populácie boli založené len z niekoľkých jedincov, teda sú silne ovplyvnené efektom zakladateľa. Odhady efektívnej veľkosti populácií (N_e) v programe OneSAMP naznačujú, že N_e všetkých skúmaných populácií je veľmi nízka, len 17 až 20 jedincov. Odhad N_e vysokotatranskej populácie bol dokonca ešte nižší ako u populácie v Slovenskom raji (založená zo šiestich jedincov). Všetky populácie kamzíka na Slovensku teda možno považovať za veľmi malé a preto značne ohrozené genetickou i demografickou stochasticitou. Zaradenie kamzíka vrchovského tatranského medzi kriticky ohrozené živočíchy je preto veľmi opodstatnené a obe jeho populácie vyžadujú prísnu ochranu.

Literatúra

- ALBRECHT T, BRYJA J, HÁJKOVÁ P, MIKULÍČEK P & ZIMA J (2005). Genetická diverzita a metodické aspekty jejího výzkumu. In: Vačkář D (Ed.). Ukazatele změn biodiverzity. Academia, Praha. Pp. 24-42.
- ALLENDORF FW & LUIKART G (2007). Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Malden, Oxford, Carlton.
- ALVAREZ-BUSTO J, GARCÍA-ETXEBARRIA K, HERRERO J, GARIN I & JUGO BM (2007). Diversity and evolution of the Mhc-*DRB1* gene in the two endemic Iberian subspecies of Pyrenean chamois, *Rupicapra pyrenaica*. *Heredity* 99: 406-416.
- AMBRÓZ L, LACIKA J, ONDREJKA K & ŠUBOVÁ D (2009). Národné parky Slovenska. DAJAMA, Bratislava.
- AN J, MIN MS, SOMMER J, LOUIS E, BRENNEMAN R, KWON SW, SHIN NS & LEE H (2005). Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the Korean goral (*Nemorhaedus caudatus*). *Molecular Ecology Notes* 5: 421-423.
- ANDERSON EC & THOMPSON EA (2002). A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217-1229.
- AREVALO E, HOLDER DA, DERR JN, BHEBHE E, LINN RA, RUVUNA F, DAVIS SK & TAYLOR JF (1994). Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-1, SR-CRSP-2, SR-CRSP-3, SRCRSP-4, SR-CRSP-5 loci. *Animal Genetics* 25: 202.
- AULAGNIER S, GIANNATOS G & HERRERO J (2008). *Rupicapra rupicapra*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 June 2011.
- BAČKOR P & URBAN P (2009). Kamzík vrchovský tatranský v Národnom parku Nízke Tatry. *Folia Venatoria* 38-39: 47-64.
- BAČKOR P & VELIČ E (2008). Restitution Tatra chamois (*Rupicapra rupicapra tatrica* Blahout 1971) to the Nízke Tatry Mts (Central Slovakia). *Nature Conservation* 65: 17-25.
- BARENDSE W, ARMITAGE SM, KOSSAREK LM, SHALOM A, KIRKPATRICK BW, RYAN AM, CLAYTON D, LI L, NEIBERGS HL, ZHANG N, GROSSE WM, WEISS J,

- CREIGHTON P, MCCARTHY F, RON M, TEALE AJ, FRIES R, MCGRAW RA, MOORE SS, GEORGES M, SOLLER M, WOMACK JE & HETZEL DJS (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 6: 227-235.
- BEJA-PEREIRA A, OLIVEIRA R, ALVES PC, SCHWARTZ MK & LUIKART G (2009). Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* 9: 1279-1301.
- BELKHIR K, BORSA P, CHIKHI L, RAUFASTE N & BONHOMME F (1996-2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- BERAN J (1973). K vysazení kamzíků v Jeseníkách před šedesáti léty. *Ochrana přírody* 28: 12-14.
- BHEBHE E, KOGI J, HOLDER DA, AREVALO E, DERR JN, LINN RA, RUVUNA F, DAVIS SK & TAYLOR JF (1994). Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-6, SR-CRSP-7, SR-CRSP-8, SRCRSP-9 and SR-CRSP-10 loci. *Animal Genetics* 25: 203.
- BIJLSMA R, BUNDGAARD J & BOEREMA AC (2000). Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 502-514.
- BISHOP MD, KAPPES SM, KEELE JW, STONE RT, SUNDEN SLF, HAWKINS GA, TOLDO SS, FRIES R, GROSZ MD, YOO J & BEATTIE CW (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.
- BLAHOUT M (1968). Návrh na vysadenie tatranských kamzíkov v iných horstvách na Slovensku, I. etapa – Nízke Tatry. Výskumná stanica Tatranského národného parku, Tatranská Lomnica.
- BLAHOUT M (1972). Zur Taxonomie der Population von *Rupicapra rupicapra* (Linné, 1758) in der Hohen Tatra. *Zoologické listy* 21: 115-132.
- BLAHOUT M (1975). Biologie a ethologie kamzíka horského *Rupicapra rupicapra* (Linné, 1758) ve Vysokých Tatrách. Disertační kandidátská práce. Ústav pro výzkum obratlovců ČSAV, Brno.
- BLAHOUT M (1976). Kamzíčia zver. *Príroda*, Bratislava.

- BOHUŠ I (1957). Príspevok k dejinám kamzíka a jeho ochrana v Tatrách. Ochrana prírody 12: 43-47.
- BOHUŠ I (1958). Príspevok k dejinám kozorožca v Tatrách. Zborník prác o Tatranskom národnom parku 2: 148-159.
- BOHUŠ I (1959). Ochrana tatranskej prírody pred rokom 1918. Zborník prác o Tatranskom národnom parku 3: 186-203.
- BOHUŠ I (1972). Ochrana prírody pred zriadením Tatranského národného parku. Zborník prác o Tatranskom národnom parku 14: 185-223.
- BOITANI L, LOVARI S & TAGLIANTI AV (2003). *Rupicapra pyrenaica* (Bonaparte, 1845). In: CALDERINI (Ed.). Fauna d' Italia, Mammalia III, Carnivora-Artiodactyla. Bologna, Italy. Pp. 407-412.
- BRIEDERMANN L (1962). Kamzičí zvěř v NDR. Myslivost 9: 134-135.
- BRIEDERMANN L & ŠTILL V (1987). Die Gemse des Elbsandsteingebirges. Neue Brehm Bücherei Bd. 492. 2nd ed. Wittenberg Lutherstadt.
- BRUSSARD PF (2000). Foreword. In: YOUNG AG & CLARKE GM (Eds.). Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. xv-xvi.
- BRYJA J & HÁJKOVÁ P (2006). Ochranařská genetika a její využití při studiu a ochraně savců. In: ADAMEC M & URBAN P (Eds.). Výskum a ochrana cicavcov na Slovensku VII, 2005, Banská Bystrica. Pp. 109-113.
- BUCHANAN FC & CRAWFORD AM (1992). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF214 locus. Animal Genetics 23: 394.
- BUCHANAN FC & CRAWFORD AM (1993). Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 and OarFCB304 loci. Animal Genetics 24: 145.
- BUCHANAN FC, GALLOWAY SM & CRAWFORD AM (1994). Ovine microsatellites at the OarFCB5, OarFCB19, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB129 and OarFCB226 loci. Animal Genetics 25: 60.

- BUITKAMP J, OBEXER-RUFF G, KESSLER M & EPPLEN JT (1996). A microsatellite (BOBT24) located between the bovine IL4 and IL13 loci is polymorphic in cattle and goat. *Animal Genetics* 27: 212–213.
- CASSAR S, GALAN M & LOISON A (2007). A set of 21 polymorphic microsatellites in Alpine chamois (*Rupicapra rupicapra*). *Molecular Ecology Notes* 7: 243–247.
- CORLATTI L, LORENZINI R & LOVARI S (2011). The conservation of chamois *Rupicapra* spp. *Mammal Review* 41: 163-174.
- CORNUET JM & LUIKART G (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- CRESTANELLO B, PECCHIOLI E, BERTORELLE G, DAVOLI F, VERNESI C, CARAMELLI D, JANIGA M & HAUFFE HC (2003). Mitochondrial DNA variation and divergence in Italian and Slovakian chamois populations. In: MACHOLÁN M, BRYJA J & ZIMA J (Eds.). *European Mammalogy 2003. 4th European Congress of Mammalogy, Brno, Czech Republic, July 27-August 1, 2003. Program & Abstracts & List of Participants. IVB, Brno. P. 84.*
- CRESTANELLO B, PECCHIOLI E, VERNESI C, MONA S, MARTÍNKOVÁ N, JANIGA M, HAUFFE HC & BERTORELLE G (2009). The genetic impact of translocations and habitat fragmentation in chamois (*Rupicapra*) spp. *Journal of Heredity* 100: 691-708.
- DEGIORGIS MP, FREY J, NICOLET J, ABDO EM, FATZER R, SCHLATTER Y, REIST S, JANOVSKY M & GIACOMETTI M (2000). An outbreak of infectious keratoconjunctivitis in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) in Simmental-Gruyeres, Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 142: 520-527.
- ĎURÍK J (1981). Migrácia a štúdiá rozboru príčin migrácie kamzíka vrchovského alpského poddruhu (*R. r. rupicapra*, L. 1758) aklimatizovaného v CHKO Veľká Fatra. In: *Súčasný stav a perspektíva introdukovaných populácií kamzíka vrchovského na Slovensku. Dom techniky ČSVTS, Banská Bystrica. Pp. 46-55.*

- EDMANDS S (2006). Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* 16: 463-475.
- ESTOUP A, ROUSSET F, MICHALAKIS Y, CORNUET JM, ADRIAMANGA M & GUYOMARD R (1998). Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology* 7: 339-353.
- 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.
- FALUSH D, STEPHENS M & PRITCHARD JK (2003). Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- FLEGR J (2005). *Evoluční biologie*. Academia, Praha.
- FERNANDEZ-MORAN J, GOMEZ S, BALLESTEROS F, QUIROS P, BENITO JL, FELIU C, & NIETO JM (1997). Epizootiology of sarcoptic mange in a population of Cantabrian chamois (*Rupicapra pyrenaica parva*) in Northwestern Spain. *Veterinary Parasitology* 73: 163-171.
- FRANKHAM R (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research* 66: 95-107.
- FRANKHAM R, BALLOU JD & BRISCOE DA (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRANKLIN IR (1980). Evolutionary changes in small populations. In: SOULÉ ME & WILCOX BA (Eds.). *Conservation Biology: an Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer, Sunderland, MA. Pp.135-149.
- FRIDOLFSSON AK, GYLLENSTEN UB & JAKOBSSON S (1997). Microsatellite markers for paternity testing in the Willow warbler *Phylloscopus trochilus*: high frequency of extra-pair young in an island population. *Heredity* 126: 127-132.
- GAŠINEC I (2002). Eliminácia vplyvu negatívnych antropogénnych faktorov na úbytok kamzíka vrchovského tatranského v Tatranskom národnom parku In: JANIGA

- M & ŠVAJDA S (Eds.). Ochrana kamzíka. TANAP, NAPANT, IHAB, Tatranská Štrba, Banská Bystrica, Tatranská Javorina. Pp. 217-228.
- GIACOMETTI M, JANOVSKY M, BELLOY L & FREY J (2002). Infectious keratoconjunctivitis of ibex, chamois and other Caprinae. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 21: 335-345.
- GOUDET J (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- HÁJEK B (1981). Sčítanie kamzíkov v Slovenskom raji. *Pulsatilla, Spravodajca Správy CHKO Slovenský raj* 2: 15-17.
- HÁJEK B (2009). NAJ o Slovenskom raji. XXXIII. Východoslovenský tábor ochrancov prírody, Štátna ochrana prírody SR, Správa NP Slovenský raj, Spišská Nová Ves. Pp. 4-6.
- HÁJEK B & BUDZIK A (1985). Poľovníctvo. In: HUŇA L, KOZÁK M, VOLOŠČUK I a kol. (Eds.). *Slovenský raj Chránená krajinná oblasť. Príroda*, Bratislava. P. 196.
- HÁJEK B & OGURČÁK M (1981). Současný stav rozšíření a početnosti kamzíka vrchovského alpského v Slovenském ráji a prevence možné hybridizace. In: *Súčasný stav a perspektíva introdukovaných populácií kamzíka vrchovského na Slovensku*. Dom techniky ČSVTS, Banská Bystrica. Pp. 62-67.
- HÁJKOVÁ A (2007). Historie rozšíření a početnosti kamzíka horského v západních Karpatech: Genetika malých populací v druhové ochraně. *Bakalářská práce*. Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.
- HAMMER S, SUCHENTRUNK F, HERRERO J, PÉREZ-BARBERÍA FJ, LORENZINI R, MICHALLET J, SFOUGARIS AI, MARTÍNKOVÁ N & PAPAIOANNOU H (2003). Complex evolutionary scenario for the molecular phylogeny of chamois (genus *Rupicapra*), inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. XXVIth Congress of the International Union of Game Biologists (IUGB), September 1-6, Braga, Portugal.
- HEINRICH K (1958). Kamzíci v severním pohraničí. *Myslivost* 11: 168.
- HELL P & CHOVANCOVÁ B (1995). Súčasná situácia a perspektívy kamzíka vrchovského *Rupicapra rupicapra* na Slovensku. *Folia Venatoria* 25: 168-171.

- HERRERO J, LOVARI S & BERDUCOU C (2008). *Rupicapra pyrenaica*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 June 2011.
- HOFFMAN JI & AMOS W (2005). Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* 14: 599-612.
- HRABĚ V & KOUBEK P (1984). Craniometrical characteristics of *Rupicapra rupicapra tatica* (Mammalia, Bovidae). *Folia Zoologica* 33: 73-84.
- HRNČIAR M (1972). Populácie kamzíkov na Slovensku mimo územia TANAP-u. *Folia Venatoria* 2: 239-245.
- HURTA V (2009). Rozšírenie kamzíka vrchovského alpského a jeho využitie habitatu vo Veľkej Fatre. Diplomová práca. Katedra biológie a ekológie, Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela v Banskej Bystrici.
- CHARLESWORTH B & CHARLESWORTH D (1999). The genetic basis of inbreeding depression. *Genetical Research* 74: 329-340.
- CHOVANCOVÁ B (2009). Rozšírenie, morfológia a ekológia kamzíka vrchovského tatranského (*Rupicapra rupicapra tatica* Blahout 1972) v Tatranskom národnom parku. Dizertačná práca. Katedra ochrany lesa a poľovníctva, Lesnícka fakulta, Technická univerzita vo Zvolene & Výskumná stanica a múzeum ŠL TANAPu.
- CHOVANCOVÁ B & GÖMÖRY D (1999). Vplyv prírodných činiteľov na populáciu kamzíka vrchovského tatranského, *Rupicapra rupicapra tatica*, Bl. 1971 v Tatranskom národnom parku. *Folia Venatoria* 28-29: 85-97.
- CHUDÍK I (1968). Kamzičia zver v Tatranskom národnom parku. *Myslivost* 3: 55.
- CHUDÍK I (1969). Početné stavy kamzíkov v TANAP-e. *Ochrana fauny* 3: 1-10.
- CHUDÍK I (1974). Príčiny strát a vplyvu veľkých šeliem (Carnivora) na populáciu raticovej zveri v TANAP-e. *Folia Venatoria* 4: 83-94.
- CHUDÍKOVÁ O & CHUDÍK I (1978). O antropizácii prírody TANAP-u. Zborník prác o Tatranskom národnom parku 20: 23-49.

- INGOLD P, HUBER B, NEUHAUS P, MAININI B, MARBACHER H, SCHNIDRIGPETRIG R & ZELLER R (1993). Tourism and sport in the Alps – A serious problem for wildlife. *Revue Suisse de Zoologie* 100: 529-545.
- JANIGA M & ZÁMEČNÍKOVÁ H (2002). Zoologická charakteristika historických údajov o kamzíkoch (*Rupicapra rupicapra tatrica* Blahout, 1971) v Tatrách ako podklad pre vyhodnotenie ich súčasnej početnosti. In: JANIGA M & ŠVAJDA S (Eds.). Ochrana kamzíka. TANAP, NAPANT, IHAB, Tatranská Štrba, Banská Bystrica, Tatranská Javorina. Pp. 99-182.
- JARNE P & LAGODA PJL (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 424-429.
- JURDÍKOVÁ N & HAMMER S (2001). Variation of the Tatra chamois based on the cytochrome b sequence and its relationship to other autochthonous chamois populations. In: Scientific Programme and Abstracts. 8th International Theriological Congress, Sun City, South Africa 12-17 August 2001. Pp. 79-80.
- KALINOWSKI ST & WAPLES RS (2002). Relationship of effective to census size in fluctuating populations. *Conservation Biology* 16: 129-136.
- KARČ P & RADÚCH J (1978). Poznámky k rozšíreniu a ekológii aklimatizovaných kamzíkov v liptovskej časti Nízkyh Tatier. *Folia Venatoria* 8: 45-59.
- KEMP SJ, HISHIDA O, WAMBUGU J, RINK A, LONGERI ML, MA RZ, DA Y, LEWIN HA, BARENDSE W & TEALE AJ (1995). A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. *Animal Genetics* 26: 299-306.
- KOGI J, YEH CC, BHEBHE E, BURNS BM, RUVUNA F, DAVIS SK & TAYLOR JF (1995). Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-11, SR-CRSP-12, SR-CRSP-13, SR-CRSP-14 and SR-CRSP-15 loci. *Animal Genetics* 26: 449.
- KOMÁREK J (1931). Tatranská zvířena. Naše Tatry, Praha.
- KOREŇ M, RADÚCH J, CHOVANCOVÁ B, ŠTURCEL M, KOVÁČ J, GAŠINEC I, KSIAŽEK J, VANČURA V, HUMMEL M & ONDRUŠ S (2001). Program záchranu kamzíka vrchovského tatranského na roky 2001 - 2005. Tatranská Lomnica.

- KOUBEK P & HRABĚ V (1984). Morphometrical characteristics and horn growth dynamics in *Rupicapra rupicapra tatrica* (Mammalia, Bovidae). *Folia Zoologica* 33: 289-302.
- KOVÁČ J (2002). História starostlivosti a ochrany kamzíka vrchovského tatranského (*Rupicapra rupicapra tatrica* Blahout, 1971). In: JANIGA M & ŠVAJDA S (Eds.). Ochrana kamzíka. TANAP, NAPANT, IHAB, Tatranská Štrba, Banská Bystrica, Tatranská Javorina. Pp. 197-204.
- KRATOCHVÍL Z (1981). Specializace populací kamzíka horského. In: Súčasný stav a perspektíva introdukovaných populácií kamzíka vrchovského na Slovensku. Dom techniky ČSVTS, Banská Bystrica. Pp. 68-69.
- KRUGLYAK S, DURRETT RT, SCHUG MD & AQUADRO CF (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 10774-10778.
- LACY RC, ALAKS G & WALSH A (1996). Hierarchical analysis of inbreeding depression in *Peromyscus polionotus*. *Evolution* 50: 2187-2200.
- LEHOCKÝ M & HÁJEK B (1997). Stav kamzíčej zveri v NP Slovenský raj po sčítaní v r. 1996. Správa Národného parku Slovenský raj, Spišská Nová Ves.
- LEHOCKÝ M & HÁJEK B (2001). Stav kamzíčej zveri v NP Slovenský raj po sčítaní v r. 2000. Správa Národného parku Slovenský raj, Spišská Nová Ves.
- LEHOCKÝ M & HÁJEK B (2002). Stav kamzíčej zveri v NP Slovenský raj po sčítaní v r. 2001. Správa Národného parku Slovenský raj, Spišská Nová Ves.
- LEHOCKÝ M & HÁJEK B (2004). Sčítanie kamzíčej zveri v NP Slovenský raj v roku 2003. Správa Národného parku Slovenský raj, Spišská Nová Ves.
- LEHOCKÝ M & HÁJEK B (2005). Sčítanie kamzíčej zveri v NP Slovenský raj v roku 2004. Správa Národného parku Slovenský raj, Spišská Nová Ves.
- LORENZINI R (2005). A panel of polymorphic microsatellites in the threatened Apennine chamois (*Rupicapra pyrenaica ornata*). *Molecular Ecology Notes* 5: 372-374.
- LOVARI S (2002). Comments on decline of the local population of chamois in the Tatra Mountains. In: JANIGA M & ŠVAJDA S (Eds.). Ochrana kamzíka. TANAP,

- NAPANT, IHAB, Tatranská Štrba, Banská Bystrica, Tatranská Javorina. Pp. 1-2.
- LOVARI S & LOCATI M (1991). Temporal relationships, transitions and structure of the behavioral repertoire in male Apennine chamois during the rut. *Behaviour* 119: 77-103.
- LUIKART G, ALLENDORF FW, CORNUET JM & SHERWIN WB (1998). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89: 238-248.
- MAINGUY J, WORLEY K, CÔTÉ SD & COLTMAN DW (2007). Low MHC DRB class II diversity in the mountain goat: past bottlenecks and possible role of pathogens and parasites. *Conservation Genetics* 8: 885-891.
- MATTHEWS GD & CRAWFORD AM (1998). Cloning, sequencing and linkage mapping of the NRAMP1 gene of sheep and deer. *Animal Genetics* 29: 1-6.
- MAUDET C, LUIKART G, DUBRAY D, VON HARDENBERG A & TABERLET P (2004). Low genotyping error rates in wild ungulate faeces sampled in winter. *Molecular Ecology Notes* 4: 772-775.
- MAUDET C, MILLER C, BASSANO B, BREITENMOSER-WÜRSTEN C, GAUTHIER D, OBEXER-RUFF G, MICHALLET J, TABERLET P & LUIKART G (2002). Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex (ibex)*]. *Molecular Ecology* 11: 421-436.
- MILLS LS (2007). *Conservation of Wildlife Populations. Demography, Genetics and Management*. Blackwell Publishing, Malden, Oxford, Carlton.
- MONA S, CRESTANELLO B, BANKHEAD-DRONNET S, PECCHIOLI E, INGROSSO S, D'AMELIO S, ROSSI L, MENEGUZZI PG & BERTORELLE G (2008). Disentangling the effects of recombination, selection, and demography on the genetic variation at a major histocompatibility complex class II gene in the Alpine chamois. *Molecular Ecology* 17: 4053-4067.
- MOTTL S (1958). Kamzík v ČSR. *Myslivost* 7: 103.

- NAVIDI W, ARNHEIM N & WATERMAN MS (1992). A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. *American Journal of Human Genetics* 50: 347-359.
- NĚMEC M (1938). Ohrožení kamzíků ve Vysokých Tatrách. *Stráž myslivosti* 19: 469-472.
- OBUCH J (1977). Osteologický materiál z jaskýň. *Pamiatky a príroda* 2: 32.
- OBUCH J (1981). Subfosílny výskyt kamzíkov v Západných Karpatoch In: *Súčasný stav a perspektíva introdukovaných populácií kamzíka vrchovského na Slovensku*. Dom techniky ČSVTS, Banská Bystrica. Pp. 70-75.
- O' GRADY JJ, BURGMAN MA, KEITH DA, MASTER LL, ANDELMAN SJ, BROOK BW, HAMMERSON GA, REGAN T & FRANKHAM R (2004). Correlations among extinction risks assessed by different systems of threatened species categorization. *Conservation Biology* 18: 1624-1635.
- ONDRUŠ S (2002). Poznámky k programu záchranu kamzíka vrchovského tatranského v NAPANT-e. In: JANIGA M & ŠVAJDA J (Eds.). *Ochrana kamzíka*. TANAP, NAPANT, IHAB, Tatranská Štrba, Banská Bystrica, Tatranská Javorina. Pp. 183-194.
- PEAKALL R & SMOUSE PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- PÉREZ T, ALBORNOZ J & DOMÍNGUEZ A (2002). Phylogeography of chamois (*Rupicapra* ssp.) inferred from microsatellites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 524-534.
- PETES TD, GREENWELL PW & DOMINSKA M (1997). Stabilization of microsatellite sequences by variant repeats in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 146: 491-498.
- POMPANON F, BONIN A, BELLEMAIN E & TABERLET P (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6: 847-859.
- PRITCHARD JK, STEPHENS M & DONNELLY P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

- RABE V (1963). Kamzíci v Jeseníkách. *Myslivost* 5: 72-73.
- RADÚCH J & KARČ P (1981). Súčasný stav a perspektívy kamzičej populácie v Národnom parku Nízke Tatry. In: Súčasný stav a perspektíva introdukovaných populácií kamzíka vrchovského na Slovensku. Dom techniky ČSVTS, Banská Bystrica. Pp. 7-30.
- RADÚCH J & KARČ P (1983). Súčasný stav a perspektívy kamzičej populácie v Národnom parku Nízke Tatry. *Zborník prác o Tatranskom národnom parku* 24: 61-82.
- RADÚCH J (2002a). Význam predátorov v ekológii tatranského kamzíka. In: JANIGA M & ŠVAJDA S (Eds.). *Ochrana kamzíka*. TANAP, NAPANT, IHAB, Tatranská Štrba, Banská Bystrica, Tatranská Javorina. Pp. 56-66.
- RADÚCH J (2002b). Príprava a štruktúra projektu ochrany kamzíka v rokoch 1999-2000. In: JANIGA M & ŠVAJDA S (Eds.). *Ochrana kamzíka*. TANAP, NAPANT, IHAB, Tatranská Štrba, Banská Bystrica, Tatranská Javorina. Pp. 205-208.
- RANDI E (2007). Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology* 17: 285-293.
- RANDI E, MUCCINI & JANIGA M (2002). Mitochondrial DNA analysis on Tatra chamois. In: JANIGA M & ŠVAJDA J (Eds.). *Ochrana kamzíka*, TANAP, NAPANT, IHAB, Tatranská Štrba, Banská Bystrica, Tatranská Javorina. Pp. 31-34.
- RAYMOND M & ROUSSET F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249. (Genepop on the Web; <http://genepop.curtin.edu.au/index.html>).
- RODRÍGUEZ F, HAMMER S, PÉREZ T, SUCHENTRUNK F, LORENZINI R, MICHALLET J, MARTINKOVA N, ALBORNOZ J & DOMÍNGUEZ (2009). Cytochrome b phylogeography of chamois (*Rupicapra* spp.). Population contractions, expansions and hybridizations governed the diversification of the genus. *Journal of Heredity* 100: 47-55.
- RODRÍGUEZ F, PÉREZ T, HAMMER SE, ALBORNOZ J & DOMÍNGUEZ A (2010). Integrating phylogeographic patterns of microsatellite and mtDNA divergence to infer the evolutionary history of chamois (genus *Rupicapra*). *Evolutionary Biology* 10: 222.

- ROLDAN ERS, CASSINELLO J, ABAIGAR T & GOMENDIO M (1998). Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B (Biological Sciences)* 265: 243-248.
- ROSSI L, FRAQUELLI C, VESCO U, PERMUNIAN R, SOMMAVILLA GM, CARMIGNOLA G, DA POZZO R & MENEGUZ PG (2007). Descriptive epidemiology of a scabies epidemic in chamois in the Dolomite Alps, Italy. *European Journal of Wildlife Research* 53: 131-141.
- RUCKSTUHL KE & INGOLD P (1999). Aspects of mother-kid behavior in Alpine chamois, *Rupicapra rupicapra rupicapra*. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 64: 76-84.
- SATTLEROVÁ-ŠTEFANČÍKOVÁ A (2005). Kamzík a jeho prazitárne ochorenia. Košice.
- SCHAFFER ML (1981). Minimum population sizes for species conservation. *BioScience* 31: 131-134.
- SCHASCHL H, GOODMAN SJ & SUCHENTRUNK F (2004). Sequence analysis of the MHC class II *DRB* alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). *Developmental and Comparative Immunology* 28: 265-277.
- SCHASCHL H, SUCHENTRUNK F, HAMMER S & GOODMAN SJ (2005). Recombination and the origin of sequence diversity in the *DRB* MHC class II locus in chamois (*Rupicapra* spp.). *Immunogenetics* 57: 108-115.
- SCHLÖTTERER C & HARR B (2001). Microsatellite instability. In: *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group, New York. Pp. 1-4.
- SOGLIA D, ROSSI L, CAUVIN E, CITTERIO C, FERROGLIO E, MAIONE S, MENEGUZ PG, SPALENZA V, RASERO R & SACCHI P (2010). Population genetic structure of Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) in the Italian Alps. *European Journal of Wildlife Research* 56: 845-854.
- SOGLIA D, SARTORE S, MAIONE S, LA NEVE F, ROSSI D, FERROGLIO E, RASERO R & SACCHI (2005). Development of two multiplex PCRs for microsatellite analysis in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). *Italian Journal of Animal Science* 4: 61-63.
- SOKOL J (1965). Aklimatizácia kamzíka horského (*Rupicapra rupicapra L.*) vo Veľkej Fatre. *Biológia, Bratislava* 20: 440-446.

- STEFFEN P, EGGEN A, DIETZ AB, WOMACK JE, STRANZINGER G & FRIES R (1993). Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics* 24: 121-124.
- ŠIMO J (1981). Dvadsať rokov od introdukcie kamzíka alpského pôvodu v Gaderi. In: *Súčasný stav a perspektíva introdukovaných populácií kamzíka vrchovského na Slovensku*. Dom techniky ČSVTS, Banská Bystrica. Pp. 98-105.
- ŠPROCHA J (1976). Úspešne sa aklimatizovali. *Poľovníctvo a rybárstvo* 6: 7.
- ŠTEFANČÍKOVÁ A., CHOVANCOVÁ B., DUBINSKÝ P., TOMAŠOVIČOVÁ O., ČORBA J., KÖNIGOVÁ A., HOVORKA I. & VASILKOVÁ Z. 1999. Lung nematodes of chamois, *Rupicapra rupicapra tatrica*, from the Tatra National Park, Slovakia. *Journal of Helminthology* 73: 259-263.
- 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.
- TABERLET P, WAITS LP & LUIKART G (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 323-327.
- TALLMON DA, KOYUK A, LUIKART GH & BEAUMONT MA (2008). ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology Resources* 8: 299-301.
- TALLMON D, LUIKART G & WAPLES RS (2004). The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 489-496.
- TOKARSKA M, MARSHALL T, KOWALCZYK R, WÓJCIK JM, PERTOLDI C, KRISTENSEN TN, LOESCHCKE V, GREGERSEN VR & BENDIXEN C (2009). Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison. *Heredity* 103: 326-332.
- TOLDO SS, FRIES R, STEFFEN P, NEIBERGS HL, BARENDSE W, WOMACK JE, HETZEL DJS & STRANZINGER G (1993). Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mammalian Genome* 4: 720-727.

- TÓTH G, GÁSPÁRI Z & JURKA J (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.
- VAIMAN D, MERCIER D, MOAZAMI-GOUDARZI K, EGGEN A, CIAMPOLINI R, LÉPINGLE A, VELMALA R, KAUKINEN J, VARVIO SL, MARTIN P, LEVÉZIEL H & GUÉRIN G (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome* 5: 288-297.
- VILÀ C, SUNDQVIST AK, FLAGSTAD Ø, SEDDON J, BJÖRNERFELDT S, KOJOLA I, CASULLI A, SAND H, WABAKKEN P & ELLEGREN H (2003). Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society B (Biological Sciences)* 270: 91-97.
- VELIČ E (1981). Introdukcia kamzíkov v Nízkych Tatrách. In: Súčasný stav a perspektíva introdukovaných populácií kamzíka vrchovského na Slovensku. Dom techniky ČSVTS, Banská Bystrica. Pp. 106-109.
- WILSON PJ & WHITE BN (1998). Sex identification of elk (*Cervus elaphus canadensis*), moose (*Alces alces*), and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) using the polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Science* 43: 477-482.
- ZEMANOVÁ B, HÁJKOVÁ P, BRYJA J, HÁJEK B, MIKULÍČEK P, MARTÍNKOVÁ N, ZIMA J JR, HÁJKOVÁ A & ZIMA J (in press). Ochránárska genetika slovenských populácií kamzíka vrchovského. Výskum a ochrana cicavcov na Slovensku IX, Banská Bystrica 2009.
- ZEMANOVÁ B, HÁJKOVÁ P, BRYJA J, ZIMA J JR., HÁJKOVÁ A & ZIMA J (2011). Development of multiplex microsatellite sets for noninvasive population genetic study of the endangered Tatra chamois. *Folia Zoologica* 60: 70-80.
- ZIMA J, KOŽENÁ I & HUBÁLEK Z (1990). Non-metrical variation and divergence between autochthonous and introduced population of chamois (*Rupicapra rupicapra*). *Folia Zoologica* 39: 237-248.
- ZIMA J, MACHOLÁN M, MUNCLINGER P & PIÁLEK J (2004). Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.
- ŽIAK D & URBAN P (2001). Červený (ekozozologický) zoznam cicavcov (Mammalia) Slovenska. In: BALÁŽ D, MARHOLD K & URBAN P (Eds.). Červený zoznam rastlín a živočíchov Slovenska. Ochrana prírody 20. Pp. 154-156.