

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie**



Bakalářská práce

**Využití environmentální DNA pro detekci vodních bezobratlých
Use of environmental DNA for detection of aquatic invertebrates**

Marek Bílek

Praha 2017

Školitel: prof. RNDr. Adam Petrusek Ph.D.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat svému školiteli, profesorovi RNDr. Adamovi Petruskovi Ph.D., za jeho vedení při psaní mé bakalářské práce, za cenné rady, čas a upřímnost.

PROHLÁŠENÍ

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

V Praze, dne 15. 5. 2017

ABSTRAKT

Environmentální DNA (eDNA) je genetická informace uvolněna z jedince do okolí. Zejména ve vodním prostředí je množství detekovatelné DNA v mnoha případech dostačující k tomu, aby dokázalo potvrdit či vyvrátit přítomnost hledaného organismu. Metoda, jak tuto DNA ve vodním prostředí odebrat a dále s ní pracovat, se neustále rozvíjí a přináší nové poznatky. Zejména v oblasti vodních obratlovců jsou v aktuálních výzkumech velmi dobré výsledky, které mnohdy odpovídají skutečnosti více, než je tomu při tradičních metodách odchyty. Oproti tomu výzkum na téma vodních bezobratlých pomocí detekce eDNA je upozaděno, a to zejména z důvodu, že produkce eDNA u bezobratlých obecně je mnohem nižší, než je tomu například u ryb a obojživelníků, kde největší množství eDNA je uvolněno v podobě slizu.

V této práci se zaměřuji na vlastnosti eDNA ve vodním prostředí, na biotické a abiotické faktory, které ovlivňují trvanlivost detekovatelné DNA. Dále se zmiňuji o produkci DNA vodních bezobratlých, o možnostech sběru a o laboratorních postupech jejího zpracování, porovnávám různé přístupy vědeckých týmů v odkazovaných výzkumech a upozorňuji na nejčastější problémy. V závěru práce porovnávám výsledky aktuálních prací s výsledky odchyty, který až do vytvoření této metody byl víceméně jedinou možnou, i když agresivní, metodou sběru dat o vodních organismech.

ABSTRACT

Environmental DNA is released genetical information from the individual to the environment. Especially in the aquatic environment, the amount of detectable DNA is sufficient to prove or refute the presence of a target organism. The method of taking samples from an aquatic environment and working with DNA is constantly evolving and bringing new insights. Especially in the area of aquatic vertebrates, very good results are found. Especially in actual researches results often correspond to reality more than traditional methods of capture. In contrast, research of an aquatic invertebrates by detection of eDNA is overlooked, especially because of eDNA production by invertebrates, which is generally much lower than fish and amphibians production. In this case the largest amount of eDNA is released in the form of mucus.

In this work I focus on properties of eDNA in the aquatic environment, biotic and abiotic factors that affect the durability of detectable DNA. I also mention the production of DNA of aquatic invertebrates, the possibilities of collection and the laboratory procedures of its processing, I compare the different approaches of the scientific teams in the referenced research and draw attention to the most frequent problems. At the end of the thesis I compare the results of the current research with the capture results, which was more or less the only possible, though aggressive, method of collecting data on aquatic organisms till the creation of this method.

OBSAH

Úvod	1
1. Co je environmentální DNA?	3
1.1. Výhody detekce eDNA oproti tradičním metodám	4
1.2. Nevýhody a limitace eDNA oproti tradičním metodám	5
1.3. Přetrvávání eDNA ve vodním prostředí	6
1.3.1. Abiotické faktory	8
1.3.2. Biotické faktory	9
1.4. Produkce eDNA u bezobratlých	10
2. Metody sběru a detekce eDNA ve vodním prostředí	12
2.1. Metody sběru	12
2.1.1. Vysrážení	13
2.1.2. Filtrace	14
2.1.3. Hrozba kontaminace	14
2.2. Využívané molekulární metody pro detekci a amplifikaci eDNA	15
2.2.1. Varianty PCR používané pro detekci eDNA	15
2.2.2. DNA metabarcoding	17
2.3. Problémy metody PCR a jejich řešení	18
3. Invazivní a ohrožené druhy bezobratlých a detekce eDNA	21
4. Závěr	25
6. Seznam citované literatury	26

ÚVOD

Metody výzkumu druhů ve vodním prostředí často zasahují do samotného ekosystému zbytečným odchytem i jiných než cílových druhů. V návaznosti na ochranu prostředí mohou být navíc tyto tradiční metody pomalé, méně citlivé nebo náročné na pracovní sílu, což může být i nákladné. Tyto faktory hrají důležitou roli zejména v případě, kdy na výsledcích závisí přežití druhů. V krizové situaci, například při podezření výskytu invazivních druhů je tak důležitá včasná reakce, než se invazivní druh rozmnoží.

Možným vhodným způsobem výzkumu, který za daných podmínek může být nejen rychlejší, ale také neinvazivní, je metoda detekce druhu pomocí environmentální DNA. Náročná metodika společně s potřebným vybavením pro detekci může odrazovat k použití environmentální DNA a nahrává tradičním metodám pozorování či odchytu. Molekulární metody detekce se postupem času ale rozvíjejí a zlevňují. Pokud jsou tedy tradiční metody také časově či finančně náročné a je k nim potřeba specifické vybavení, detekce environmentální DNA je v takovém případě efektivnější a v mnoha případech i levnější metodou.

Environmentální DNA (eDNA) je genetická informace uvolněna z organismu do prostředí (Taberlet et al. 2012). Uvolněna může být v buňkách i mimo ně v podobě krátkodobě perzistujícího jádra či fragmentu DNA řetězce z organel, které také genetickou informaci nesou (plastidy, mitochondrie), v majoritní většině se ale bude jednat o fragmenty DNA. Environmentální DNA se oproti počtu jedinců daného druhu vyskytuje v prostředí v mnohonásobném množství a díky tomu může být extrahována a detekována ze sedimentů, bahna či vody.

Environmentální DNA uvolněna do prostředí může pocházet z mnoha zdrojů. Nejčastějšími zdroji jsou fekálie, moč, sliny, kožní fragmenty, svlečky, tekutiny vyloučené z kožních žláz či samotná mrtvá těla živočichů (Lydolph et al. 2005). Detekování eDNA umožňuje zjištění daného druhu, aniž by bylo potřeba daný druh odchytávat, či dokonce jeho jedince zpozorovat. Právě proto je vhodná zejména tam, kde je odchyt metodicky či finančně náročný, populační hustota druhu příliš nízká, nebo je druh těžko detekovatelný tradičními metodami. Oproti odchytu je detekce eDNA neinvazivní.

DNA uvolněna do vodního prostředí velmi rychle podléhá rozkladu a jen za určitých podmínek (anoxické prostředí, teplota pod bodem mrazu, absence filtrátorů a další) přetrvává v detekovatelné formě po delší dobu. Ačkoli se tedy detekovatelné části postupem času vytrácí, jedná se z určitého hlediska o pozitivum, protože je velká pravděpodobnost, že detekovaná DNA patří druhu, který se v dané lokalitě stále vyskytuje, nebo se v ní vyskytoval před nedávnem. Rychlost rozkladu eDNA, potažmo trvanlivost detekovatelných fragmentů eDNA, je závislá na mnoha biotických a abiotických faktorech (Levy-Booth et al. 2007). Ve vodním prostředí eDNA obvykle podléhá rozkladu v rámci dnů (Dell'Anno & Corinaldesi, 2004; Dejean et al. 2011).

Detekce eDNA je velmi kvalitní nástroj, jak neinvazivně detekovat nejen obojživelníky a ryby, jejichž eDNA je ve vodě zastoupena nejvíce slizem, výkaly a v neposlední řadě v době rozmnožování i pohlavními buňkami. Stejně tak je touto metodou možné detekovat i vodní bezobratlé. Těm bylo dosud věnováno méně pozornosti kvůli jejich nižší produkci environmentální DNA oproti výše zmíněným taxonům.

Bezobratlí jsou nedílnou součástí vodních ekosystémů a zodpovídají velkou měrou za druhovou diverzitu. Vodní bezobratlé je náročné sledovat, taxonomicky zařadit a detekovat. Může za to zejména jejich malá velikost, malé a často náhodně rozmístěné populace a komplexita, se kterou každý druh jiným způsobem osidluje daný habitat v různých částech vývoje (Barbour et al 1999).

Monitorování bezobratlých je důležité při celkovém biomonitoringu a jejich druhy jsou často využívány při studiích biodiverzity ve vodním prostředí (Deiner et al. 2016, podle Stucki 2010; Altermatt et al. 2013). Celá čtvrtina sladkovodních druhů je zařazena mezi ohrožené podle Mezinárodního svazu ochrany přírody (IUCN 2012) a s tím se pojí častá změna jejich diverzity a abundance.

Má bakalářská práce je zejména řešerše o sběru, metodice a výzkumu environmentální DNA a má za úkol shrnout poznatky a zkušenosti s detekcí vodních bezobratlých. Dále se zaměřuji na pozitiva a negativa této metody, její limitace a možné budoucí využití.

1. CO JE ENVIRONMENTÁLNÍ DNA?

Environmentální DNA je genetický materiál získaný z odebraného vzorku bez potřeby přímého kontaktu se zdrojovým druhem (Thomsen & Willerslev 2015). Jiná definice environmentální DNA v kontextu konkrétního druhu je charakterizována jako komplex nukleární, mitochondriální a plastidové DNA, které jsou uvolněny z organismu do prostředí (Taberlet et al. 2012).

Environmentální DNA může pocházet z živého organismu, ze kterého se uvolňuje na základě biologických či patologických dějů, nebo z již mrtvého organismu, ze kterého je uvolňována během rozkladných procesů do jeho plného rozložení. Environmentální DNA je uvolňována mnoha způsoby v podobě výkalů, ochlupení, v buňkách epidermu, svlečkami, kožními deriváty atd. (Lydolph et al. 2005). Každý druh a dokonce každý jedinec během svého životního cyklu uvolňuje jiné množství eDNA v závislosti na širokém spektru biotických a abiotických faktorů a stavu jedince.

Environmentální DNA je pravděpodobně ve vodním prostředí vždy směs celulární a extracelulární DNA (Levy-Booth et al. 2007). Zatímco celulární je nejspíše v kompletním stavu, chráněna do chvíle lyze buňky, extracelulární je postupně degradována a tedy se vyskytuje v různě dlouhých fragmentech genetické informace.

V suchozemském prostředí je sice eDNA z živočichů také uvolňována, ale ve vodním prostředí je její detekce mnohem snazší vzhledem k možnosti pohybu v rozsahu celého vodního sloupce a proudu, mnohonásobnému množství a delšímu přetrvávání oproti suchozemskému prostředí. Environmentální DNA po uvolnění postupně podléhá degradaci. Přetrvávání, tedy doba, po kterou zůstává v detekovatelné formě, podléhá mnoha biotickým a abiotickým faktorům (Levy-Booth et al. 2007).

Zavedení pojmu „environmentální DNA“ a její výzkum byly zavedeny za účelem vyhledávání molekulárních stop druhů ve vodním prostředí (Ficetola et al. 2008). První zmínka pochází ale již z o dvacet let staršího výzkumu mikrobiální DNA v sedimentech (Ogram et al. 1987). Jedna z prvotních studií o environmentální DNA makroorganismů ve sladkovodním prostředí se ale kupodivu zaměřovala na detekci lidské DNA, DNA skotu, prasat a ovcí při výzkumu kontaminace povrchových vod (Martellini et al. 2005). Jak se vyvíjela metodika a přibývalo více metod z molekulární biologie, začala se převážně zkoumat eDNA obojživelníků (Ficetola et al. 2008; Dejean et al. 2012) a ryb (Jerde et al. 2011; Mahon et al. 2013; Takahara et al. 2013). Až později byly provedeny výzkumy na bezobratlých (Goldberg et al. 2013; Tréguier et al. 2014). Byly zkoumány nejen jednotlivé druhy, ale také distribuce a diverzita společenstev ve vodním prostředí (Minamoto et al. 2011; Thomsen et al. 2012b).

Nutno dodat, že ne každý druh je touto metodou detekovatelný a nejedná se tedy o univerzální metodu detekce vodních organismů (Roussel et al. 2015). Například nemožnost detekce může být způsobena nulovým uvolňováním eDNA z organismu, například během dormance rostlin či přečkávání nepříznivých podmínek v podobě cysty,

spory. Další nevýhody a výhody tohoto metodologického přístupu rozvádím v následující kapitole.

1.1. Výhody detekce eDNA oproti tradičním metodám

Jako tradiční metody detekce označují pozorování živočichů bez zásahu do ekosystému, například pozorování ptáků, jejich hnízd, stop a trusu. Dále tak označují samotný odchyt živočichů v podobě jednoho a více jedinců. Tradiční metodou je například ruční odchyt, odchyt pomocí pastí nebo nástrah u raků, výlov u ryb. Tento odchyt je víceméně specifický pro každý druh.

Detekce eDNA z určitého prostředí je oproti tomu metodicky obdobná nezávisle na studovaném druhu. Není pravdou, že detekce eDNA je obecně levnější metodou než tradiční pozorovací metody. Nicméně některé studie potvrzují, že eDNA nabízí kratší dobu zpracování (Biggs et al. 2015; Siggaard et al. 2015). V několika případech se již ukázalo, že je metoda detekce druhu pomocí eDNA stejně účinná jako vzorkování, a to při odběru, který zabral méně času (Wilcox et al. 2016; Deiner et al. 2016).

Tradiční metody odchyty jsou dále vázány na fenotypové znaky jedinců a schopnost je rozeznat. Navíc u některých druhů jsou i u ideálního jedince fenotypové rozdíly takřka neznatelné. Stejně tak je nemožné takové rozdíly najít u nedospělých či poškozených jedinců (Pfrender et al. 2010; Baird & Hajibabaei 2012; Deiner et al. 2013). Identifikace druhu na základě pozorování je závislá na znalostech pozorovatele. S rozvojem systematiky a počtu popsáných druhů klesá taxonomická odbornost veřejnosti a tím může dojít k chybám při určování (Hopkins & Freckleton 2002). U některých druhů fenotypové znaky plně absentují, jedná se o druhy kryptické, a informaci, že se jedná o více rozličných druhů, přinese až molekulární testování (Mahon et al. 2013).

Samotné pozorování je časově náročné, i když je neinvazivní. Oproti tomu odchyt je již invazivním výkonem, a to nejen pro cílený druh, což by u invazivních druhů nebylo na škodu, ale pro celý ekosystém. V případě detekce bezobratlých je běžně využíváno dvou metod. U malých živočichů, zejména těch, kteří žijí ve vodním sloupci jako například součást planktonu, se využívají sítě a filtry. Stejně tak je tomu u živočichů, jejichž dospělé stádium je náročné pro odchyt v porovnání se stádiem juvenilním (Ardura et al. 2015). Druhou možností oproti sítím je nástraha pastí, do kterých se spolu s hledaným druhem chytí také jiné druhy. Ti se vzájemně stávají snadnou kořistí. Často se tak například do pastí na raky chytí také vodní hmyz a obojživelníci, přilákání nástrahou, a ti jsou často pozřeni právě rakem.

Odchyt také není pokaždé možný, ať již z hlediska náročnosti, například u živočichů žijících ve velkých hloubkách, nebo z hlediska legislativy, která na daných územích omezuje, či zcela zakazuje odchyt. Detekce druhu pomocí eDNA je neinvazivní a tedy i odběr vody není z hlediska legislativy tak omezován jako samotný odchyt.

Nezdařený odchyt jedinců tradičními metodami nemusí vůbec znamenat absenci druhu v dané lokalitě. Nevydařený odchyt lze částečně vysvětlit např. špatným výběrem stanoviště nebo obdobím pro umístění pastí či nevhodným počasím. Z důvodu špatného výběru stanoviště nebo období nemusí být prokázána přítomnost druhu ani pomocí detekce eDNA. Je nicméně méně náročné udělat odběr vody z mnoha stanovišť na daném vodním toku, než na stejném počtu míst provádět odchyt. Při správném provedení detekce se tak můžeme dostat k výsledkům, ve kterých bude eDNA detekována všude, kde byly druhy pozorovány (Takahara et al. 2013) nebo dokonce k výsledkům, kde je více stanovišť detekce pomocí eDNA než samotným odchyt (Deiner et al. 2016). Konkrétně bylo zjištěno, že stačí vzorek s průměrně 2 kopiemi DNA hledaného druhu k pozitivní detekci v 72 až 86 % případů (Wilcox et al. 2016). Spolehlivost ale takového výsledku je rozporuplná z hlediska možné kontaminace či falešně pozitivního signálu, o kterých je psáno ve druhé kapitole.

Odchyt jedinců tradičními metodami je závislý na populační hustotě a rozšíření cílového druhu. V případě invazivních druhů je tak tradičními metodami často možné detekovat daný druh až ve chvíli, kdy je již rozšířen nebo jeho chování negativně ovlivňuje ostatní druhy (Collas et al. 2016). Detekce pomocí eDNA bez zásahu do prostředí umožňuje dělat rychlá rozhodnutí a včasně reagovat v urgentních případech.

1.2. Nevýhody a limitace eDNA oproti tradičním metodám

Tradiční metody detekce nabízí informace nejen o jedinci, ale také o celé populaci druhu. Při odchycení jedince můžeme zjistit jeho pohlaví, velikost, věk. Dále můžeme pozorovat jeho fyzickou zdatnost. Na základě odchytu můžeme měřit populační hustotu. Oproti tomu výsledná veličina z detekce eDNA je čistě skalární, tedy hodnota naměřené DNA ve vzorku, ze které jsou vlastnosti jedince, natož populace, nezjistitelné. Existuje mnoho prací, které se zabývají odhadem populační hustoty druhu na základě výsledků eDNA při využití kvantitativně molekulárních postupů (např. Takahara et al. 2012; Thomsen et al. 2012a; Pilliod et al. 2013; Lacoursière-Rousse et al. 2016; Evans et al. 2016; Olds et al. 2016). Všechny tyto metodiky jsou ale těžko aplikovatelné na detekci bezobratlých, jelikož koncentrace jejich eDNA je ve vodě mnohem nižší než je tomu u ryb či obojživelníků. Ve výsledku tak eDNA zatím neposkytuje kvantifikované informace o populační hustotě, biomase, pohlaví, věze, věku či kondici jako samotný sběr (Olds et al. 2016).

Protože eDNA je detekcí nepřímou, pomocí detekování DNA daného druhu v prostředí nemůžeme tvrdit, že se druh v lokalitě vyskytuje, ale že se v ní pouze našla jeho DNA. V praxi to znamená, že se ve vodním prostředí může vyskytovat DNA druhů, které v daném prostředí ani nežijí. DNA díky relativně dlouhé době přetrvávání v detekovatelném stavu může urazit velkou vzdálenost (Thomsen et al. 2012B). Příkladem vektorem DNA hledaného druhu tak může být jeho dravec, jehož trávicí soustavou může eDNA projít a být vyloučena do míst, kde se hledaný druh vůbec nevyskytuje (Amberg et al. 2013).

Abiotickým vektorem, jenž transportuje eDNA, je například proud řeky. Detekce eDNA druhu v tekoucích vodách v praxi může znamenat, že se populace daného druhu vyskytuje v toku v místech i několik kilometrů proti proudu. Ke zjištění, jakou vzdálenost může eDNA ve vodním toku urazit v detekovatelném stavu, vedl výzkum velevruba nadmutého *Unio tumidus* a hrotnatky *Daphnia longispina* (Deiner & Altermatt 2014). Nejdále měřená detekce v tomto případě byla 12 kilometrů po proudu od zdroje při nejmenší rychlosti toku řeky 1,2 km/hod. Protože měření probíhalo během léta a zimy, vypočítaná hranice detekovatelné koncentrace *Unio tumidus* byla stanovena na 15 kilometrů v letním a 12 kilometrů v zimním období. Po dosažení rychlosti toku řeky lze vypočítat, že eDNA je na hranici detekce nesena proudem přibližně 16 hodin. U hrotnatky *Daphnia longispina* tato hranice byla dokonce 50 kilometrů od zdroje v letním období. U hrotnatky, která je součástí planktonu a tedy zdrojem potravy mnoha predátorů, je tato délka způsobena zejména díky eDNA z mrtvých jedinců a z velké části se jedná o fragmenty genů vyloučené predátory. Také je mnoho živých jedinců nesené proudem, například odtokem z jezera.

Pokud je koncentrace DNA ve vzorku dostačující, dalo by se kombinací dat o průtoku vody, koncentraci eDNA ve vodě, poměru uvolněné eDNA z jedince a rychlosti degradace, zjistit, jestli detekovaná eDNA pochází spíše od populace žijící v okolí odběru či od populace v horních částech toku (Rees et al. 2015). Neznámým faktorem v takovém případě je množství a kvalita produkované DNA daným druhem (Deiner & Altermatt 2014). Navíc bylo zjištěno, že z každého jedince je eDNA uvolňována v jiném množství (Strickler et al. 2014; Pilliod et al. 2014), např. v závislosti na jeho zdravotním stavu, věku a množství stresu (Forsstrom & Vasemagi 2016).

Nevýhodou eDNA je skutečnost, že není možné detekovat všechny vodní organismy (Roussel et al. 2015). Existuje navíc mnoho druhů, jejichž produkce eDNA je příliš nízká a tedy detekovatelná jen v případě vysoké populační hustoty. U bezobratlých se jedná zejména o dobu, kdy jsou ve vodě juvenilní stádia ve vysokém poměru oproti dospělým stádiím. Odhad populační hustoty na základě detekované eDNA by byl zavádějící vzhledem k nízkému počtu jedinců, kteří se dožijí dospělosti a tedy jejich nízké individuální fitness.

Tradiční sběr má oproti detekci eDNA jednu další výhodu. Má unifikovanou a zavedenou metodiku (Barbour et al. 1999) a ta je jen minimálně obměňována (Deiner et al. 2016, podle Stucki 2010; Altermatt 2013). Metodický proces eDNA detekce je oproti tomu vždy potřeba připravit vzhledem k cílenému druhu nejen z hlediska sběru dat a tedy rozhodnutí se, jakým způsobem a odkud budou vzorky odebrány, ale také z hlediska volby molekulárních metod a postupů (např. v případě detekce cílené na konkrétní druh je nutný výběr primeru s ohledem na blízkce příbuzné druhy, které se v dané oblasti také vyskytují).

1.3. Přetrvávání eDNA ve vodním prostředí

Environmentální DNA je uvolňována z živého i mrtvého organismu. Během rozkladných procesů těla uvolňování DNA eskaluje a další vnější fyzikální či biotické vlivy napomáhají

rozptylu DNA do okolí. DNA je dále degradována biotickými a abiotickými cestami, nebo v prostředí setrvává v zakonzervovaném stavu například v sedimentech bez přístupu vzduchu (Levy-Booth et al. 2007). V sedimentech již takto byla detekována a analyzována DNA s přibližným stářím 217 000 let. Dokonce byla detekována rostlinná DNA z ledu v Grónsku s přibližným stářím 500 000 let (Willerslev et al. 2007). V nedávno vydané studii byla v jeskynních sedimentech nalezena zakonzervovaná eDNA neandrtálců a denisovanů (Slon et al. 2017).

Samotné nalezení dostatečně dlouhého fragmentu eDNA, aby z něj bylo možné daný druh určit, tedy nemusí za daných okolností vůbec znamenat přítomnost druhu v místě a čase odběru. Naštěstí uvolněná eDNA za běžných podmínek podléhá rozkladu a v dostatečně dlouhém řetězci, aby ji bylo možné detekovat, zůstává relativně krátkou dobu.

Přetrvání DNA ve slaných vodách je přibližně dvěstěkrát kratší než ve sladkých. Ve slaných vodách je přetrvání eDNA ve vodním sloupci průměrně deset hodin. Předpokládaným důvodem je aktivita bakterií ve slaných vodách, které využívají eDNA jako významný zdroj fosforu (Dell'Anno & Corinaldesi, 2004). Během pokusu extracelulární DNA v laboratorních podmínkách přetrvala ve sladké vodě v detekovatelném stavu měsíc (Dejean et al. 2011).

Rozklad detekovatelných fragmentů uvolněné DNA do sladkovodního prostředí v přírodě trvá několik dnů až týdnů (Dejean et al. 2011; Barnes et al. 2013). Tato doba je závislá na mnoha biotických a abiotických faktorech a liší se víceméně s každou pozměněnou veličinou. Z abiotických faktorů je nejdůležitějším a často nejvíce variabilním faktorem okolní teplota. Z biotických jsou to převážně houby a bakterie, respektive působení jejich exonukleáz.

Ve sladkovodním prostředí experimenty prokázaly, že dostatečně dlouhé a tedy detekovatelné fragmenty DNA ryb se rozpadly až do jednoho měsíce od vyjmutí jedince z akvária (Thomsen et al. 2012a,b).

Důležité je také brát v úvahu, z jakého prostředí je daný vzorek odebrán. DNA nalezena například v anoxickém prostředí může být v detekovatelném stavu až po tisíce let. Takové prostředí může být nejen v hlubinných sedimentech, ale i jen v několikacentimetrové vrstvě bahna. Stejně tak eDNA může přetrvávat v zakonzervovaném stavu díky nízké teplotě v permafrostu a ledu. Při detekci aktuálně žijících druhů je tedy potřeba se vyhnout prostředí, které jsou schopné eDNA konzervovat. Stejně tak je potřeba brát zřetel na možnou kontaminaci na hranici takového prostředí s místem odběru, například zvířením sedimentu na dně při odběru vzorku z vodního sloupce.

Naopak absence eDNA ve vzorcích z vodního sloupce sladkovodních toků v místech, kde předpokládáme výskyt druhu, nebo dokonce díky odchyty o něm víme, může být způsobena ne degradací genetické detekovatelné informace, ale odplavením (Pilliod et al. 2014; Figiel et al. 2015). To je typické zejména pro horní toky, kde díky erozi a minimu usazenin je eDNA splavena. Naopak v místech, kde je vodní tok pomalejší (například v meandrech), můžeme očekávat vyšší sedimentaci. V těchto místech bude detekována

eDNA živočichů, jejichž stanoviště může být i o kilometry výše v horních tocích (Deiner & Altermatt 2014).

Abiotické změny v nestálých vodních prostředích velmi ovlivňují přetrvávání DNA. V krátkodobých vodních prostředích včetně pravidelně vysychajících vodních toků je přetrvávání eDNA závislé na vlhkosti prostředí a při vyschnutí je degradována. Tím vzniká naopak výhoda, protože je pravděpodobnější detekce pouze právě žijících druhů, aniž by bylo potřeba brát ohled na druhy, které obývaly stejné stanoviště v minulosti a v trvalých tocích by tak jejich eDNA mohla zkreslit výsledky.

1.3.1. Abiotické faktory

Doba přetrvávání detekovatelné eDNA není unifikovaná a je závislá na mnoha biotických a abiotických faktorech (Levy-Booth et al. 2007), navíc není závislá na počátečním množství DNA ve vodě (Strickler et al. 2014). Detekce genu je závislá na jeho délce, nepřímo tedy na jeho fragmentaci. Detekce eDNA je obvykle postavena na vyhledání, replikaci a kvantifikaci specifického úseku genu o délce několika desítek až set komplementárních párů bází (bp). Aby tyto úseky byly detekovány, je potřeba je zachytit ještě před fragmentací na menší úseky. Rychlost této fragmentace závisí zejména na endogenních nukleázách, UV záření, pH, vlhkosti a činnosti organismů (Shapiro 2008).

Důležitým abiotickým faktorem je fyzikální zátěž působící na DNA. Zejména v tekoucích vodách je DNA vystavována neustálému pohybu a nárazům, které ve spojení s dalšími faktory, jakými jsou změny teplot z přítoků a časté vystavení slunečnímu záření, fragmentují řetězce DNA efektivněji, než je tomu u stojatých vod (Wilcox et al. 2013; Barnes et al. 2014). V tekoucích vodách je koncentrace eDNA nižší také kvůli doplňování vody z podzemních zdrojů, kde se hledání živočichové nevyskytují. V tocích je tedy menší množství eDNA, než je tomu ve stojatých vodách.

1.3.1.1. Záření

Sluneční záření má přímý i nepřímý negativní dopad na délku přetrvávání eDNA. Pokud je DNA vystavena opakovaně či dlouhodobě ultrafialovému světlu B (UV-B), tedy záření o vlnové délce 320 nm až 280 nm, fotochemicky se poškodí (Ravanat et al. 2001).

UV-B záření působí plošně na hladinu vody a hloubka jeho působení je závislá na jeho vlnové délce a průzračnosti vody (Hargreaves 2003). Proto i v tekoucích vodách s nízkou průzračností je eDNA opakovaně vystavována záření, zatímco u jezer dopad UV-B může být od několika centimetrů až do dvaceti metrů u oligotrofních jezer (Kirk 1994).

I když je prokázáno, že UV-B záření společně s teplotou ovlivňují rychlost degradace, jejich efektivita se velmi liší s ohledem na další faktory. Ultrafialové záření ovlivňuje rychlost degradace DNA také nepřímo a to stimulací růstu autotrofních bakterií a inhibicí bakterií heterotrofních (Sommaruga 2001; Hader et al. 2003).

Dalším abiotickým faktorem je pH. Řetězce DNA jsou stále v kyselějším prostředí, zatímco v zásaditém jsou rychle degradovány. Kyselé prostředí katalyzuje hydrolytické procesy, které ale také velmi rychle degradují DNA (Alaeddini et al. 2010).

1.3.1.2. Teplota

Teplota je nejdůležitějším a také nejvíce proměnlivým faktorem délky přetrvávání eDNA ve vodním prostředí. Vysoké teploty nad 50 °C přímo podporují degradaci, protože během nich DNA denaturuje. DNA je ale často fragmentována do nedetekovatelných celků vyšší teplotou nepřímo a to tak, že při zvýšené teplotě roste mikrobiální aktivita (Hofreiter et al. 2001; Zhu 2006; Corinaldesi et al. 2008; Fu et al. 2012).

S klesající teplotou stoupá doba degradace eDNA zejména díky zpomalené aktivitě enzymů a mikrobiální aktivitě (Zhu 2006). Teploty pod bodem mrazu zajišťují konzervaci DNA. Vzorky DNA v ledu staré až 500 000 let byly nalezeny v Grónsku (Willerslev et al. 2007). V zásadě v chladných vodách je degradace pomalá, zatímco teplé prostředí degradaci přímo i nepřímo urychluje (Willerslev & Cooper 2005).

1.3.1.3 Konzervace

Některé faktory prostředí naopak zajišťují konzervaci, a tedy prodlužují přetrvávání detekovatelné eDNA. Například anoxické prostředí zajišťuje dlouhodobou ochranu eDNA a to z důvodu snížení nukleázové degradace (Corinaldesi et al. 2011). Anoxická prostředí se vyskytují v hlubinných vodách a sedimentech, ale též v podmořských jeskynních, při snížené cirkulaci vody nebo jen v několikacentimetrové vrstvě bahna na dně.

Environmentální DNA uvolněna do prostředí přetrvává v podobě buněk, nebo může být z buněk uvolněna. V takovém případě nemusí být vždy ve vodním prostředí degradována, pokud se ve vodě vyskytuje velké množství anorganických částic. K těm se eDNA může navázat a být tak chráněna přes mikrobiální a chemickou degradaci (Crecchio & Stotzky 1998). Odolat tak degradaci může i dlouhodobě (Levy-Booth et al. 2007). Toho je důkazem nález DNA v sedimentech s odhadnutým stářím 217 000 let (Coolen & Overmann 2007). Stejně tak anorganické části s nábojem mohou vázat inhibitory a tím zabránit hydrolýze extracelulární DNA (Blum et al. 1997).

Obecně se tak dá říci, že nejnižší naměřený rozpad DNA je v kyselém prostředí se stálou teplotou kolem 5 °C a nízkým UV-B zářením. Naopak nejvyšší by byl s vysokou teplotou, neutrálním či zásaditým pH a s dlouhodobým vystavením UV-B zářením. V těchto abiotických podmínkách je DNA nejen rychleji degradována, ale navíc je takové prostředí vhodné pro růst mikrobiontů, do jejichž potravního spektra DNA patří.

1.3.2. Biotické faktory

Jak již bylo řečeno v kapitole o abiotických faktorech, DNA je po uvolnění do vody degradována chemickou hydrolýzou, například během vystavení kyselině či enzymatickou hydrolýzou. Se stoupající mikrobiální aktivitou stoupá produkce nukleáz, které enzymatickou hydrolýzou štěpí DNA (Lindahl 1993).

Mikroorganismy využívají složky environmentální DNA primárně jako zdroj fosforu, uhlíku a dusíku (Chen & Dubnau 2004). Extracelulární DNA může být také inkorporována do genomu bakterie či archea. Pokud se extracelulární DNA dotkne povrchu bakterie, může projít skrze pilus. Uvnitř bakterie je jedno vlákno DNA degradováno, zatímco druhé může být navázáno na bakteriální genom během jeho replikace. Tak jedna z dceřiných buněk bakterie nese část genomu například rostliny či živočicha, zatímco druhá dceřiná buňka ne. Tento fragment eDNA postupně vytrácí a jen vzácně se malá část (přibližně 20 bp) stává trvalou součástí genomu bakterie (Overballe-Petersen et al. 2013).

Biotická aktivita také ovlivňuje dobu degradace nepřímo, a to ovlivněním abiotických faktorů. Například v eutrofních vodách je omezena prostupnost záření vodním sloupcem.

Živočichové mají nejen vliv na množství eDNA ve vodním prostředí, ale také na jeho mobilitu. Byly zjištěny případy rozšiřování eDNA výkaly ptáků a savců (Symondson 2002). Časté rozšíření eDNA je zejména u druhů, které jsou ve velkém množství požírány filtrátory. Příkladem je hrotnatka *Daphnia longispina*, jejíž DNA je přítomna v mnoha případech v různých prostředích, kde sama nežije, ale mohou se v nich vyskytovat její predátoři (Deiner & Altermatt 2014).

Pro potvrzení možnosti přenosu eDNA mezi prostředími skrze trávicí systém predátorů, byl v jedné studii studován trus kormoránů, orlů a pelikánů po dobu pěti dní po strávení tolstolobika bílého. Jeho DNA byla přítomna v trusu ptačích predátorů po celých následujících pět dní (Amberg et al. 2015). Nutno dodat, že kvantita a především kvalita DNA (délka fragmentů) po průchodu trávicím traktem je nízká. Společně s další degradací po vyloučení do vody a nízkou koncentrací DNA ve velkém objemu vody je možnost kontaminace touto cestou a zkreslení výsledků nízká, protože naměřené hodnoty budou obvykle pod nastaveným prahem detekovatelnosti.

Důležitým faktorem detekce eDNA je populační dynamika a biologie samotného cílového druhu, zejména jeho životní cyklus a přesun mezi prostředími v rámci životního cyklu (Goldberg et al. 2011).

Výsledky výzkumu eDNA hrotnatky *Daphnia longispina* (Deiner & Altermatt 2014) ukázaly, že vzdálenost detekovatelné DNA je 50 kilometrů od zdroje. Proč je tato vzdálenost tak velká, vysvětluje jedna hypotéza a to ta, že se hrotnatka dostává do tekoucích vod živá a umírá nesena proudem, zatímco eDNA velevruba nadmutého *Unio tumidus*, která byla studována ve stejné práci, je přinášena proudem ze stojatých vod, které jedinci neopouštějí, a proto je vypočítaná hodnota dosahu jeho detekovatelné eDNA pouze 12 kilometrů.

1.4. Produkce eDNA u bezobratlých

Oproti rybám a zejména obojživelníkům je u bezobratlých hlavním problémem detekce molekulárními metodami malé množství extracelulární DNA (Tréguier et al. 2014). Ryby a obojživelníci produkují velké množství slizu na povrchu těla, který jim slouží jako ochrana před ztrátou tepla, vyrovnání koncentrací a dále jako obrana před antigeny

z vnějšího prostředí. Sliz je signifikantním zdrojem DNA (Livia et al. 2006). Bezobratlí buď sliz vůbec nevylučují, nebo v malém množství (měkkýši) v porovnání s rybami a obojživelníky.

Pro srovnání rozdílu ve výsledcích detekce si dovoluji zmínit studii o detekci hmyzu a ryb ve stojatých vodách. Pomocí kvantitativní PCR (qPCR) byla potvrzena přítomnost ryb se 100% účinností, zatímco u hmyzu s účinností 82 % (Thomsen et al. 2012a).

Čím je kromě nízké hodnoty uvolněné eDNA v podobě slizu nebo jeho úplné absence tato nižší účinnost způsobena? Ti vodní bezobratlí, co mají vnější kostru, ji mají zpravidla z chitinu (v podobě chitino—proteinového komplexu), ten je v mnoha případech doplněn dalšími sloučeninami, například uhličitanem vápenatým či fosforečnanem vápenatým. Tento chitino-proteinový komplex zabraňuje uvolňování DNA do okolí a tím snižuje možnou detekci. Vyšší produkce eDNA a tedy i koncentrace ve vodě jsou zapříčiněny zejména v určitých částech životního cyklu, tedy v době svlékání vnější kostry (ekdyze), páření a zejména při degradaci mrtvých těl. Při svlékání vnější kostry je třeba poznamenat, že i z odhozené svlečky se i nadále uvolňuje eDNA, a tedy je jejím zdrojem (Watts et al. 2005).

Aby detekce mohla být označena za signifikantní, tedy druh, jehož eDNA jsme detekovali, opravdu nejspíše na daném území žije, je potřeba určit prahovou hodnotu koncentrace DNA. Například ve studii mlže *Rangia cuneata* v planktonním stádiu (Ardura et al. 2015) byla tato hranice koncentrace DNA stanovena na $0,4 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. V této práci bylo také spočítáno, že pro dosažení této hodnoty se ve vodě musí vyskytovat přibližně 1900 larev *R. cuneata* na jeden metr krychlový vody. I když se počet jedinců zdá vysoký, testy byly provedeny v době po rozmnožování, kdy byl Viselský záliv v Baltském moři, kde se výzkum odehrával, plný planktoních larválních stádií.

2. METODY SBĚRU A DETEKCE eDNA VE VODNÍM PROSTŘEDÍ

Metodou detekce eDNA ve vzorku lze vyhledávat cíleně jen jeden daný druh, nebo naopak detekovat všechny taxony živočichů, jejichž eDNA se ve vzorku vyskytuje, což je tzv. metabarcoding (Taberlet et al. 2012; Ji et al. 2013). Díky stále se rozšiřujícím databázím potvrzených sekvencí druhů je usnadněna práce při přípravách výzkumu detekce. Jak ale píše dále, informace z databází, jako je zejména GenBank provozovaná National Center for Biotechnology Information (NCBI) nejsou univerzálně použitelné a před samotným výzkumem je třeba řada testů s vybranými primery a markery. S ohledem na blízké příbuzné druhy, které mohou žít také v oblasti výzkumu, je třeba se také zaměřit na délku hledaného amplikonu, který správně interpretuje pouze hledaný druh (Deagle et al. 2014; Elbrecht & Leese 2015).

Po stanovení základních metodických principů přichází řada na odebírání vzorků, přesun do laboratoří, purifikace vzorků, amplifikace a vyhodnocení. Samotný postup odběru a zpracování vzorků není unifikovaný, tedy přiblížím nejvíce využívané metodiky.

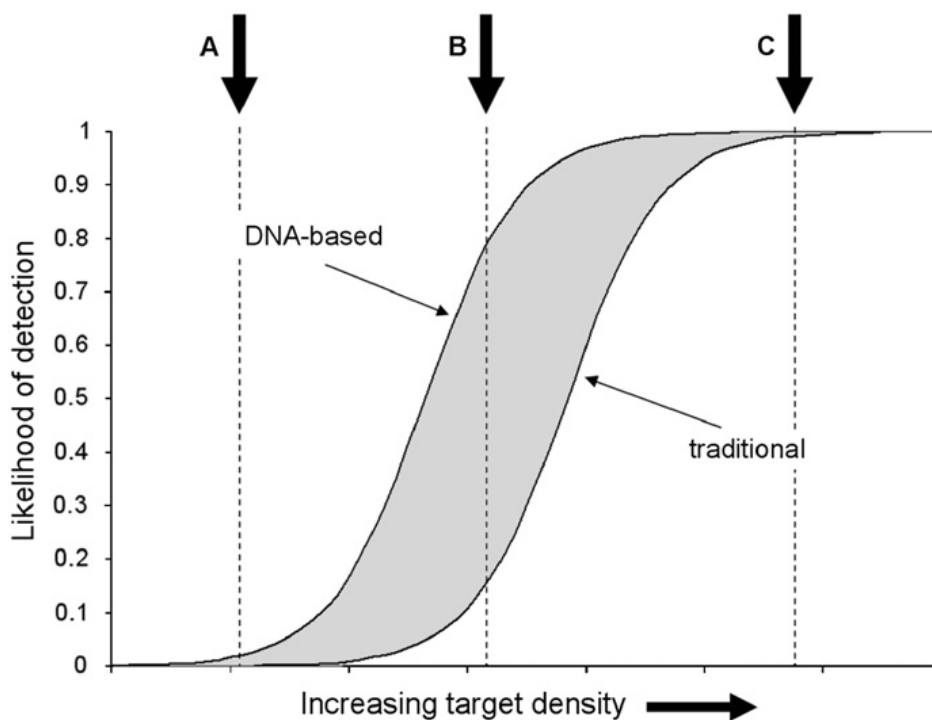
2.1. Metody sběru

Tradiční metodou k určení vodního makrozoobentosu v řekách je použití sítí. Touto metodou je možné vyčtyat víceméně všechny jednotlivé hledané organismy v dané části toku (Barbour et al. 1999). Oproti tomu metoda při detekci eDNA stojí na odběru vody, ve které se předpokládána DNA hledaného živočicha vyskytuje.

Metoda sběru vzorků vody je velmi důležitá a musí být upravena vzhledem ke znalostem ekologie, životní strategii hledaného druhu, a dále na základě těchto znalostí usoudit, kde a kdy vzorky odebrat.

Prvotní otázka je na doporučenou hloubku odebrání vzorků. U druhů, kteří se vyskytují ve velkém množství ve stojatých vodách, je víceméně nedůležité, z jaké části vodního sloupce bude vzorek odebrán. Naopak u druhů, kteří žijí u dna, jsou vzorky převážně odebrány z vody těsně nad ním po mírném zviření vrchní vrstvy. Hlubší vrstvy dna mohou obsahovat zakonzervovanou DNA, která by při odebrání vzorku zkreslila výsledky (Yoccoz et al. 2012). Ve výzkumech se ale můžeme setkat s opačnou strategií.

Například Dougherty et al. (2016) se domnívá, že zviření sedimentu sice může zvýšit množství eDNA ve vzorku, ale také se tím ze sedimentu uvolní látky, které mohou sloužit jako inhibitory PCR a tím negativně ovlivnit výsledky. Proto ve svém výzkumu výše používá vodu z hladiny, i když u té je zase riziko časně degradace eDNA z důvodu vyšší teploty a dlouhodobému vystavení slunečnímu záření. Například ve výzkumu raka *Orconectes rusticus* (Dougherty et al. 2016) v jezerech ve Wisconsinu byly vzorky odebírány z hladiny a ve výsledku byla detekce eDNA pozitivní v jedenácti jezerech, což je o dvě jezera více, než kde byl *Orconectes rusticus* odchycen.



Obr. 1: Porovnání pravděpodobnosti detekce pomocí detekce eDNA a tradičních metod se zvyšující densitou hledaného druhu. Na ose y je zakreslena pravděpodobnost v rozmezí od 0 do 1, na ose x zvyšující se densita. V bodě A je densita populace nízká natolik, že ani jedna z metod nemá výhodu. V bodě C je oproti tomu densita natolik dostačující, že je druh detekován oběma metodami. V bodě B je densita oproti tomu v takové hodnotě, že je vyšší pravděpodobnost detekce pomocí molekulárních metod než pomocí odchyty či pozorování (Darling & Mahon 2011).

Ohled musí být brán také na rozsah výskytu druhu. Pokud zkoumáme druhy s nízkou populační hustotou, nebo je jejich pohyb či výskyt omezený na malý úsek v prostředí, oblast, kde se vyskytuje jejich eDNA, je velmi omezená. Pokud budeme odebrat vzorek ve velké vzdálenosti od zdroje, či například proti proudu, nemusí být eDNA druhu vůbec detekována. Opět tedy narážíme na znalost výskytu, životního cyklu a strategie druhu.

V případě rozlehlé vodní plochy je potřeba větší množství odběrů z různých stanovišť. Alternativou je odebrání velkého množství vzorků, jejich promíchání za účelem homogenizace a odebrání a konzervace finálního vzorku (Biggs et al. 2014; Herder et al. 2013, Piaggio et al. 2014).

2.1.1. Vysrážení

Ke sběru a následné konzervaci vzorků je možné použít dvě zatím nejčastěji užívané metody. V první je odebráno menší množství vody v řádu několika desítek mililitrů (např. 15 mL, Ficetola et al. 2008) nebo i litru (Doi et al. 2015; Figiel et al. 2015; Deiner et al. 2016; Blackman et al. 2017) a následná konzervace a vysrážení organických částic například přidáním ethanolu a octanu sodného. Ethanol konzervuje a zabraňuje degradaci i při skladování vzorku v pokojové teplotě po několik dní, což je výhoda při pohybu v terénu, kde je metodicky obtížné vzorky zchladit.

2.1.2. Filtrace

Druhou metodou sběru vzorků je filtrace. Tato metoda je postupně více upřednostňována před vysrážením z důvodu možnosti zpracování podstatně většího objemu vody. V lotických systémech je eDNA rychleji degradována kvůli mechanické zátěži a častému vystavení UV záření, než je tomu u stojatých vod (Wilcox et al. 2013, Barnes et al. 2014). Pro zvýšení koncentrace eDNA ve vzorku je v tekoucích vodách potřeba velkého objemu vzorku odebírané vody oproti stojatým vodám, i když se tím zvyšuje riziko kolekce vzorku z vyšších toků, a tedy i detekce druhu, který v místě sběru ani žít nemusí (Machler et al. 2014, Deiner and Altermatt 2014). *In-situ* filtrace zajišťuje využití velkého objemu vody bez potřeby náročného převozu, což teoreticky zvyšuje pravděpodobnost detekce (Wilcox et al. 2013). Využití metody filtrace ale automaticky nedosahuje lepších výsledků než vysrážení menšího objemu vody. Filtrací velkého množství vody se do vzorku kromě eDNA dostane také velké množství inhibitorů.

Environmentální DNA se ve velkém množství vyskytuje zejména ve formě krátkých fragmentů pod 150 bp (Deagle et al. 2006), čemuž musí být přizpůsobený průměr pórů filtru. To znamená, že filtry s póry většími než 0,2 μm by neměly být schopny zachytit extracelulární DNA (Matsui et al. 2001; Turner et al. 2014) a zachytí jen DNA v celých buňkách či mitochondriích. Nutno ovšem dodat, že fragmenty eDNA jsou často přichyceny na větších částicích, se kterými jsou na filtru zachyceny. Nejvíce používané jsou filtry s póry o průměru 0,45 – 1,5 μm , ty také nejsou schopny zachytit většinou část eDNA. Turner et al. (2014) tedy navrhuje využívat filtry s póry o rozměru 0,2 μm . Filtry s tak nízkou propustností jsou ale zaneseny po využití velmi malého objemu vody. Právě z tohoto důvodu byl například při studii slávičky mnohotvárné v řece Rýně (De Ventura et al. 2017) použit filtr s póry o průměru 0,7 μm . Je vhodné tedy nejdříve využít filtry s většími póry a poté využít až tyto s malým průměrem.

Dnes je více využívána metoda filtrace než vysrážení. To ovšem neznámá, jak uvádějí výsledky některých novějších studií (Deiner et al 2015, 2016), že by snad metoda vysrážení byla neúčinná. Účinnost potvrzují úspěšné detekce eDNA v dalších studiích například na skokanovi volském *Rana catesbeiana* (Ficetola et al. 2008), ale i na bezobratlých (Thomsen et al. 2012; De Ventura et al. 2017).

2.1.3. Hrozba kontaminace

Během sběru je vysoké riziko kontaminace vzorků. Kontaminací se v tomto případě rozumí přenesení eDNA hledaného druhu do aktuálně odebíraného vzorku. S tím se pojí také potřebná dekontaminace všech částí výstroje, které byly použity pro odběr. Kontaminovat se vzorek ale nemusí jen z chybně vyčištěného či použitého vybavení při odběru, ale také ze samotného okolí. Pokud by například při filtraci vodního sloupce došlo k rozvříení dna, je vysoká pravděpodobnost, že se ze dna uvolní i starší zakonzervované (například vlivem absence kyslíku) fragmenty eDNA hledaného druhu, a tedy bude daný druh ve výsledku falešně detekován, i když se například na daném místě již delší dobu nevyskytuje.

Stejně zásady je také potřeba dodržovat z jiného důvodu - zabránění možného přenosu patogenů (například račí mor *Aphanomyces astaci* nebo *Batrachochytrium dendrobatidis*) a to nejen mezi různými vodními toky, ale mezi každým odchytem na různých částech jediného toku. V zásadě je potřeba využívat co nejvíce jednorázových částí příslušenství, se kterými po použití již nepříjde ani vzorek, ani ten, kdo vzorky odebírá, do kontaktu.

Aktivně jsou využívány testovací vzorky, odebírané přímo v terénu. Jedná se o vzorky destilované vody, která je například při využití technologie filtrace, nasávána skrze filtr stejným způsobem, jako by to bylo v případě odběru opravdového vzorku. Pokud takto vzniklý vzorek vyjde negativní, prokazuje to, že vybavení, které je v terénu využíváno, není mezi jednotlivými odběry kontaminované. Nicméně se tím nedá vyvrátit, že nemůže dojít ke kontaminaci při samotném odběru vzorku z tekoucích či stojatých vod (například již zmíněným eDNA ze zvířeného dna).

Při nevhodné manipulaci se vzorkem v laboratoři může být hrozba kontaminace stejně významným problémem jako při odběru. Jelikož je hledané eDNA v mnoha případech ve vzorku málo (v počtu jednotek), jsou doporučovány stejné bezpečnostní zásady jako při studiu zakonzervované DNA (Willerslev & Cooper 2005). Například molekuly DNA ve vzduchu ve formě aerosolu mohou případně vzorek kontaminovat. Každá místnost by měla být vybavena nočním UV světlem, mít vyšší tlak vzduchu (pro snížení rizika kontaminace DNA zvenčí podtlakem). Doporučují se oddělené laboratoře pro každý krok zpracování vzorku a zejména izolace mezi místy, kde se pracuje s malým množstvím DNA ve vzorku na počátku detekce, a místy, kde vlivem např. PCR je koncentrace DNA vyšší.

Kruciální jsou také kontroly v každém kroku, jak během sběru, tak během zpracování vzorků v laboratoři. Společně s každým krokem zpracování vzorku je doporučováno zpracovat také negativní vzorky (ve kterých se hledaná eDNA nevyskytuje) a pozitivní kontroly (vzorky, ve kterých se eDNA vyskytuje na 100 %). Výsledky těchto kontrolních skupin nejenže dokážou odhalit případnou kontaminaci, ale také za pomoci nich je možné změřit aktuální hodnotu kontaminace (De Barba et al. 2014).

2.2. Využívané molekulární metody pro detekci a amplifikaci eDNA

Po převozu vzorků do laboratoře následuje extrakce DNA ze vzorku. To se provádí pomocí vysrážení nebo centrifugací (Forsstrom & Vasemagi 2016). V dalším kroku jsou buňky ve vzorku chemicky donuceny k lyzi a uvolní se DNA. Následuje purifikace DNA za pomoci navržených protokolů nebo pomocí komerčních sad, které pracují na principu adsorpce DNA na vhodný nosič. Konečnou fází po purifikaci vzorku je jeho *amplifikace*, neboli namnožení, a vyhodnocení výsledků. Nejvíce používanou metodou pro amplifikaci eDNA *in vitro* je polymerázová řetězová reakce (PCR) a kvantitativní PCR (qPCR).

2.2.1. Varianty PCR používané pro detekci eDNA

Princip a průběh PCR je všeobecně známý. Jedná se o proces s cyklickými změnami teplot, během kterých je vybraná část genetického kódu amplifikována a dále za použití sond detekována. Primery, oligonukleotidy, nasedají na specifické místo na templátové DNA

v daných úsecích a za pomoci DNA-polymerázy je na tomto místě syntetizováno nové vlákno ve směru od 5' k 3'. U klasické PCR jsou výsledky vizualizovány pomocí elektroforézy, ať již na vrstvě gelu z agaru, v kapilárách nebo v případě fluorescenčně označených primerů je možné odečíst výsledky ze sekvenátoru.

Pro spolehlivou detekci právě hledaného úseku DNA je zásadní specifita primerů a sond. Před samotnou detekcí je důležité zvolit co nejspolehlivější primer a sondu a podrobit je testování *in silico*, tedy výpočetní cestou. V databázi GenBank jsou primery pro dané druhy přímo navržené, ale nemohou být univerzálně použity celoplošně. Výsledky v dané oblasti mohou být zkesleny blízkými příbuznými druhy, které se v oblasti, kde byly primery navrženy, ani nemusí vyskytovat. Dojde-li tedy při testech na příbuzných druzích k amplifikaci, nejsou navržený primer ani sonda druhově specifické a na základě toho se jedná o falešnou pozitivní detekci (Taberlet et al. 2007; Ficetola et al. 2010).

Po vyhledání odpovídajících primerů a sond následuje testování přímo na DNA hledaného jedince ze vzorku (*in vitro*) a optimalizace průběhu metody PCR. Součástí optimalizace je například vyhledání teploty tání primerů a sond. Primery by měly mít nejlépe shodnou teplotu tání. Teplota nasedání primerů na komplementární sekvenci a hybridizace sond musí být menší než jejich teplota tání.

Nejvíce využívaným genem pro detekci eDNA živočichů je podjednotka mitochondriální cytochrom c oxidázy (COI) a to zejména kvůli vysokému počtu referenčních sekvencí a také díky faktu, že mitochondrie jsou ve vyšším počtu kopií v jediné buňce oproti jedinému buněčnému jádru (Mills et al. 2000).

Tento gen byl určen dohodou jako srovnávací standard (Hebert et al. 2003) a data napříč živočichy jsou uložena ve veřejných databázích GenBank a Barcode of Life database (BOLD). Sekvence genu COI je plošně používána pro detekci vodních bezobratlých, zatímco pro detekci jiných taxonů jsou často používány jiné specifické části genomu, jako např. mitochondriální gen pro cytochrom B pro obojživelníky (Ficetola et al. 2008; Goldberg et al. 2011) a ryby (Goldberg et al. 2011).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR):

Kvantitativní PCR metoda je schopna kromě amplifikace také stanovit počet kopií DNA na konci každého cyklu. Tato metodika je využívána ve dvou využívaných metodách kvantitativní PCR a to v takzvané Real-Time PCR nebo modernější ddPCR. Pro detekci množství namnožené DNA je používáno fluorescenční barvivo. To emituje světlo ve dvou případech. Při degradaci vazby sondy s fluorescenčním značením (I), která hybridizuje s templátovou DNA, nebo po vmezeření do dvoušroubovice DNA a navázání primeru na cílové místo v templátové DNA (II). Fluorescenčním barvivem emitované světlo je zachyceno a detekováno.

Kvantitativní Real-Time PCR:

Principem Real-Time PCR je měření síly fluorescenčního signálu, který je úměrný množství amplifikované DNA, po každém cyklu PCR. Detekce DNA je uskutečněna za pomoci fluorescenčního substrátu, ten emituje signál po navázání k DNA. To přináší nejen aktuální informace o síle signálu, ale také možnosti výpočtu, kolik je potřeba cyklů PCR pro vytvoření produktu s detekovatelným množstvím DNA. To umožňuje výpočtem zpětně odhadnout počáteční množství DNA ve vzorku.

Zpravidla se Real-time PCR provádí v destičce s 96 nebo 384 jamkami. V každé jamce je úroveň emitovaného světla měřena zvlášť. Jelikož se jedná o velmi citlivou metodu, v případě, že je použit specifický substrát, mohou být výsledky velmi přesné.

Droplet Digital PCR:

Moderní technologie, která se pro zjištění eDNA začíná teprve používat. V principu funguje tak, že je zpracovávána hledaná DNA do kapek tekutiny a v každé kapce se vyskytuje ideálně jedna nebo i více kopií dané DNA. Po proběhnutí PCR je fluorescenční signál vyhodnocen pro každou kapku zvlášť, tedy oproti jamkové Real-Time PCR přináší mnohem přesnější výsledky.

U metody ddPCR by měl být nižší efekt PCR inhibitorů a detekuje i nižší koncentrace než Real-Time PCR, protože konečná amplifikace PCR probíhá na úrovni každé kapky (Dingle et al. 2013).

Jednou z prací, která porovnává výsledky amplifikace DNA pomocí obou metod qPCR, je práce na slunečnici velkoploutvé *Lepomis macrochirus* (Doi et al. 2015). V tomto případě není pro nás důležité, jakým způsobem byl prováděn odběr, jelikož se jedná o rybu, ze které se uvolňuje eDNA v mnohem větší míře, než je tomu u bezobratlých. Na základě výsledků tohoto výzkumu bylo závěrem doporučeno využívat ddPCR metodu zejména tam, kde očekáváme velmi nízkou koncentraci eDNA, jelikož pracuje v ideálním případě s každou molekulou DNA zvlášť v kapce a tím je citlivější.

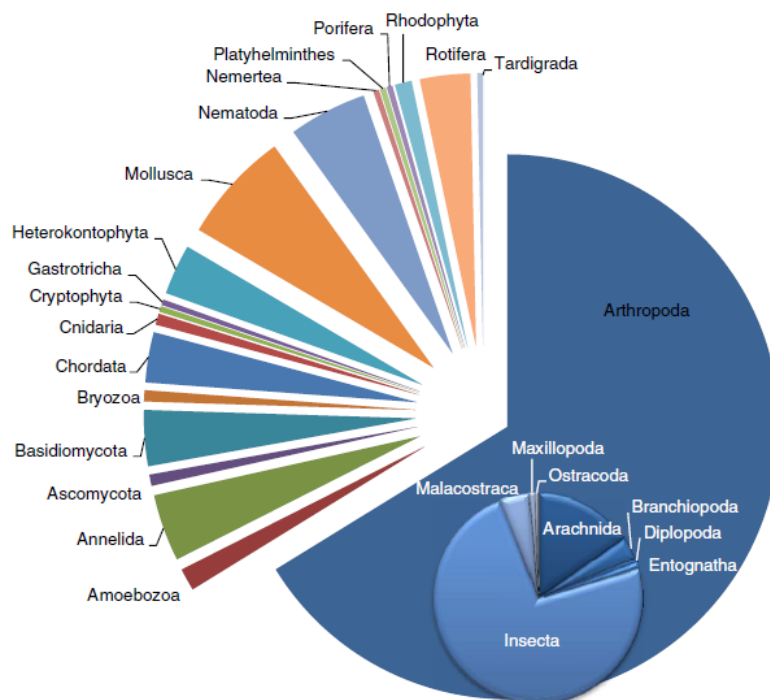
2.2.2. DNA metabarcoding

Tato technologie necílí na jeden konkrétní cílový druh, ale jsou detekovány všechny organismy ve vzorku. Je k tomu využíváno univerzálních primerů, které amplifikují DNA druhově nespecificky, ale za to amplifikují celé taxonomické skupiny. Následně jsou amplifikované sekvence sekvenovány některou z metod masivního paralelního sekvenování Next-Generation Sequence (NGS), v současnosti obvykle na platformě Illumina, a porovnány s databází. Tím se vytvoří seznam druhů, které se ve vzorku vyskytovaly, jak je viditelné na obr. 3.

Oproti detekci jednoho druhu je u metabarcodingu několik rozdílů. Markery pro metabarcoding amplifikují kratší fragment, aby byly detekovány i více degradované fragmenty DNA, a zároveň musí být specifické k cílové skupině (Riaz et al. 2011).

Metabarcoding má také několik závažných negativních faktorů oproti detekci jednoho druhu. Během procesu sekvenování v NGS vzniká obrovské množství dat, která jsou dále zpracovávána a porovnávána (Coissac et al. 2012). K tomu je potřeba vyspělá výpočetní technika a analýza se proto často provádí na dedikovaných serverech. Například během metabarcodingu vzorků z řek napříč Anglií v roce 2016 bylo výsledně přečteno a zaznamenáno 4 290 271 sekvencí (Blackman et al. 2017).

Nutné je také podotknout, že porovnávání s veřejnými referenčními databázemi (jako je GenBank®) v sobě nese různá úskalí. Mnoho druhů v databázích žádný záznam nemá. Dále se ve veřejných databázích vyskytují chyby, např. v důsledku špatného určení vzorků nebo kontaminace. Možným řešením jsou databáze s ověřenými daty, jako je například databáze BOLD, kde jsou zaznamenány u každé sekvence parametry vzorku.



Obr. 2: Taxonomické rozdělení organismů detekovaných v řece Glatt za pomoci metody eDNA metabarcodingu (Deiner et al. 2016).

2.3. Problémy metody PCR a jejich řešení

Častým případem zkreslení výsledků je falešná detekce, ať již pozitivní, či negativní. Přehled potenciálních chyb a případné důvody jsou popsány v obrázku 3.

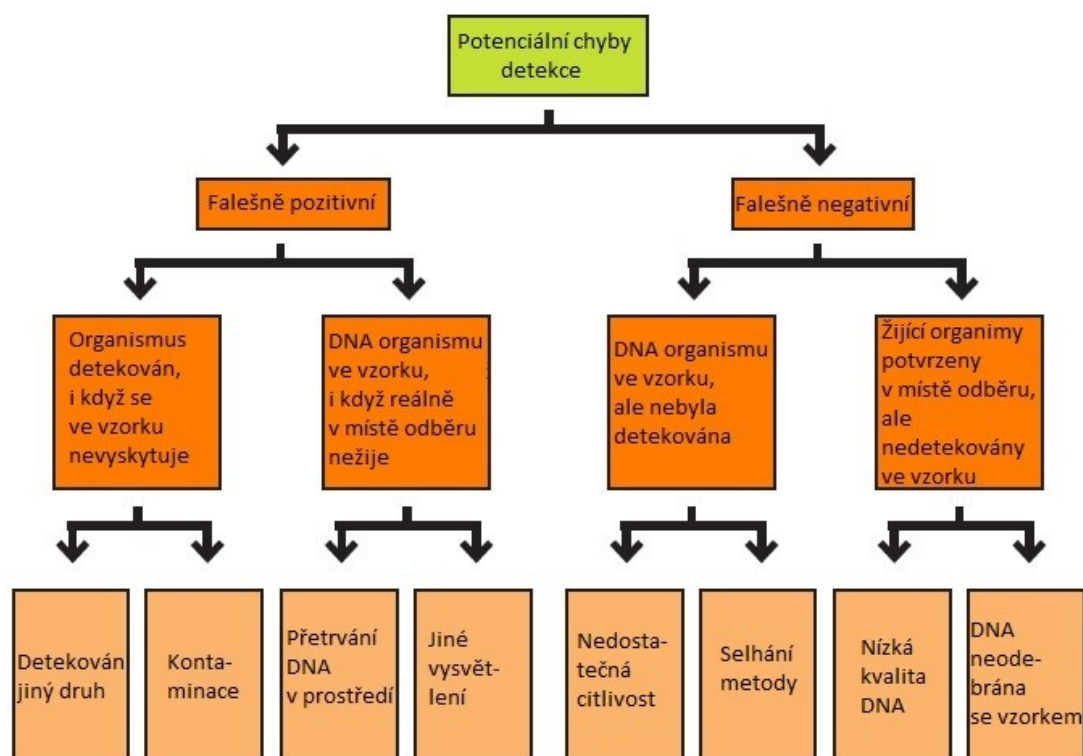
K zabránění vzniku falešně pozitivních výsledků nebo případné dohledání důvodu jejich vzniku je užíváno kontrolních vzorků (blank samples). V principu je při odběrech vzorků vytvořen také čistý vzorek, který neobsahuje žádnou DNA. V praxi je využívána destilovaná voda. S takovým vzorkem je poté manipulováno stejně jako s ostatními

vzorky. Tímto způsobem lze vyloučit některé falešné výsledky, například v případě kontaminace.

Jedním z faktorů, který limituje rozsah detekce a negativně zkresluje výsledky, je přítomnost sloučenin, tzv. inhibitorů (Takahara et al. 2015; Jane et al. 2015). Ty inhibují funkci proteináz, DNA polymeráz a ligáz a tím znemožňují analýzu eDNA (Hedman & Radstrom, 2012).

Zamezení funkce inhibitorů je možné třemi základními postupy. Snížit funkci inhibice lze snadno zředěním (I). Odstranění inhibitorů je možné přidáním fenol-chloroformu (II). Funkce inhibitorů je také možné zablokovat přidáním látek, které váží lipidy, fenoly nebo další organické inhibitory (III). Mezi tyto látky patří například BSA, RSA, Tween, PEG 400 nebo Gp32 (Schwarz et al. 2009; Hedman & Radstrom, 2012).

Dalším častým problémem je nízká koncentrace eDNA ve vzorku a nedostatečná délka řetězců, aby mohly být druhově specifické. Fragmenty eDNA ve vodním prostředí jsou sotva 150 bp dlouhé a s rostoucí vzdáleností od zdroje jsou tyto fragmenty zkracovány vlivem biotických a abiotických vlivů.



Obr. 3: Přehled potenciálních chyb detekce a jejich případné důvody (upraveno a přeloženo z práce Darling & Mahon, 2011).

Například detekce eDNA pomocí metody PCR u druhu měkkýše *Rangia cuneata* je při využití primeru amplifikujícího fragment dlouhý 205 bp možná pouze tehdy, pokud je

koncentrace DNA ve vodě minimálně $0,4 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (Ardura et al. 2015). Naopak je tomu u skupin, které žijí v místech s nízkou biodiverzitou, i když jsou chudé na počet druhů v daném místě. V těchto případech je možné určit druh již na základě mnohem kratšího fragmentu v řádech desítek bp (Bienert et al. 2012; Thomsen et al. 2012a). Při využití správně nadesignovaného primeru je možné úspěšně cílit i na krátký fragment.

3. INVAZIVNÍ A OHROŽENÉ DRUHY BEZOBRATLÝCH A DETEKCE EDNA

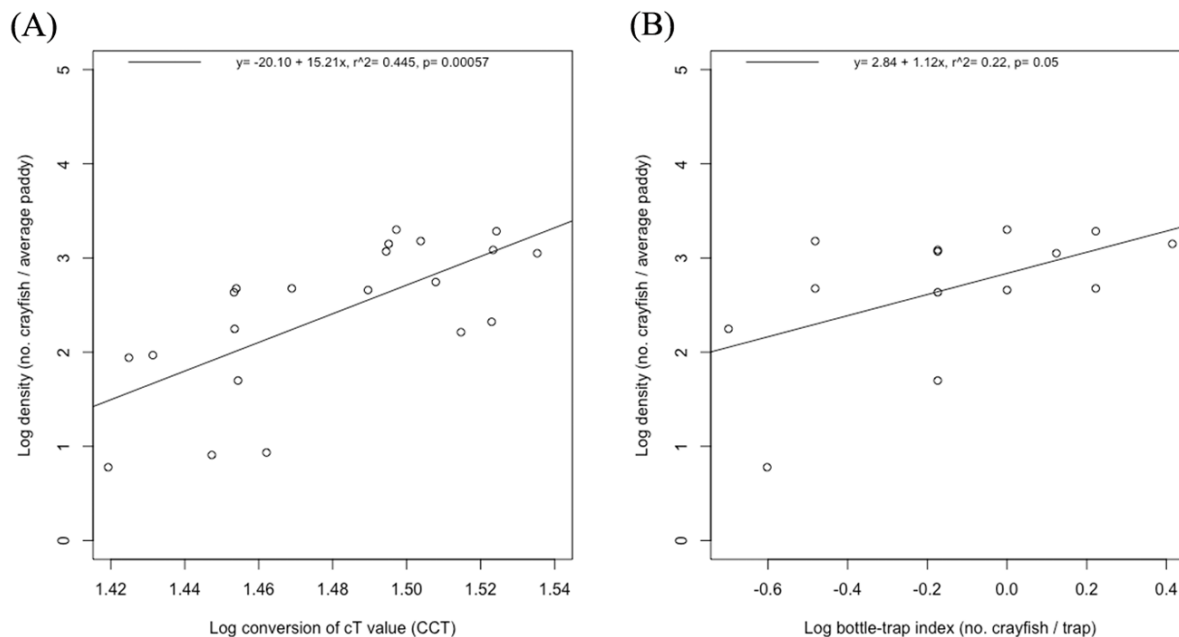
Detekce invazivních druhů v počátečním stádiu, kdy je nízká populační hustota, je klíčová k možné kontrole a v nejlepším případě vyhubení invazivního druhu (Hulme 2006). Problém je, že odhalení přítomnosti invazivních druhů často probíhá až ve chvíli, kdy jsou populace daného druhu již početné a rozšířené (Geller et al. 1997). Po ustálení invazivního druhu vzroste finanční náročnost boje s ním a úplné odstranění druhu je téměř nemožné (Kraus 2008). V realitě se spíše setkáváme se situací, kde na základě pozorování s nížené populace původního druhu dojde ke zjištění invaze druhu jiného.

Například invazivní druhy raků jsou nebezpečné zejména kvůli přenosu račího moru (*Aphanomyces astaci*), jehož jsou vektory, a který evropským druhům raků způsobuje smrt. Díky své odolnosti vůči patologickým účinkům račího moru se invazivní druhy raků rozšiřují na úkor ostatních druhů a mezidruhovou kompeticí je vytlačují. Dochází tak k možnému riziku extinkce druhu původního a některé druhy raků se tak staly ohroženými (Kozubíková et al. 2008).

Existují studie, ve kterých jsou výsledky detekce výskytu bezobratlých porovnávány s odchytom na stejných stanovištích. Aktuálním tématem je otázka, jestli je z množství eDNA na základě informací o počtu jedinců z odchyty možné zjistit abundanci druhu v daném místě. V některých studiích bylo právě toto poměřováno (Harvey et al. 2009; Takahara et al. 2012; Klymus et al. 2015; Evans et al. 2016; Cait et al. 2017).

V posledním zmíněném, který je zároveň nejnovější prací na toto téma, byl sledován introdukovaný rak *Procambarus clarkii* nejdříve v akváriích a později v rýžových plantážích. Vcelku jednoduchým pokusem nasimulovali různý počet raků. Vodu z akvárií po racích ředili v různých poměrech, aby dosáhli hodnot po přepočtení na předpokládanou plochu 0,1 ha plantáže, což je odhadovaný objem 10^5 l.

Na samotných plantážích kromě odběru vzorků nastavili pasti na raky a po odchytu počkali, až místní majitelé rýžových polí o pár dní později pole vypustí a po užití pesticidy, které raky zahubily. Tak mohlo dojít k porovnání reálného počtu jedinců v každé části rýžového pole a výsledků z odchyty a detekce pomocí eDNA.



Obr. 4: Porovnání odhadu početnosti populace pomocí výsledků eDNA a počtu chycených jedinců do pastí. (A) model lineární regrese z dat eDNA a počet nalezených jedinců ve vypuštěném poli a (B) odchyt do pastí a počet nalezených jedinců ve vypuštěném poli (Cai et al. 2017).

V jiné práci (Figiel et al. 2015) jsou v laboratorních podmínkách poměřovány hodnoty detekované eDNA ze sedimentu a vodního sloupce. K pokusu byl vybrán invazivní druh raka *Procambarus zonangulus*, jehož jedinci byli po dobu patnácti dní přechováni v akváriích s proudící vodou za stálých podmínek v počtu jednoho jedince a čtyř jedinců na jedno akvárium. Vzorky, nasbírané postupně v rámci doby pokusu, byly zvláště z vodního sloupce a sedimentu. Ty byly vysráženy a pomocí kvantitativní PCR amplifikovány. Ve výsledku nebyla nalezena korelace mezi množstvím eDNA ve vzorcích s počtem jedinců v daném akváriu, za to bylo zjištěno, že eDNA byla vícekrát detekována ze sedimentu (15 detekcí z 24 odběrů) než z vodního sloupce (2 detekce). Figiel et al. (2015) navrhuje několik důvodů, proč vzorky sedimentu předčily ty z vodního sloupce: eDNA kit pro detekci ze sedimentu je více citlivý pro detekci račí DNA (I), nebo koncentrace DNA ve vodě byla pod prahem detekce (II), nebo DNA se postupně usadila z vody do sedimentu (III), nebo díky proudící vodě byla většina DNA ze sloupce odplavena (IV).

Uzavřené toky se stojatou vodou a možnostmi prozkoumat reálný počet jedinců (jako v případě výzkumu Cai et al. 2017) jsou velmi vzácnou výjimkou. Ve většině prací se tak setkáme spíše se situací, kde je poměřován pouze odchyt a detekce eDNA. V tekoucích vodách je situace ještě ztížena.

Nasadě je detekce více druhů a poměření s odchytom. Při výzkumu na řece Glatt bylo detekováno 296 různých čeledí eukaryot z eDNA, jak zobrazuje obrázek 5. Z toho bylo 65 čeledí bezobratlých, které jsou sledovány ve Švýcarském monitorovacím programu (Deiner et al. 2016, podle Stucki 2010). Z toho 33 čeledí bylo detekováno oběma

metodami. 32 čeledí bylo detekováno pouze pomocí eDNA. Dalších 13 čeledí bezobratlých bylo detekováno pouze za použití odchyty sítí. Nutno dodat, že z těchto 13 čeledí bylo 11 detekováno i za pomoci eDNA, ale byly pod prahovou hranicí, pod kterou data nebyla brána za relevantní, protože fragmenty měly méně jak 90% podobnost nebo délka fragmentu byla pod 100 párů bází (Deiner et al. 2016).

Je třeba poznamenat, že výsledky eDNA vykazaly více čeledí bezobratlých než bylo odchyceno. Deiner et al. to přisuzují faktu, že se kompozice společenstva příliš nemění v porovnání s různými částmi toku, zatímco u odchyty b-diverzita rostla směrem po proudu měřené části řeky Glatt. Ve výsledku to znamená, že tyto dvě různé metody mají různé výsledky (Deiner et al. 2016).

Důležitou prací na téma invazivních druhů bezobratlých je práce od De Ventury et al. (2017) na dva druhy slávičky a to slávičky mnohotvárné *Dreissena polymorpha* a druhu *Dreissena rostriformis bugensis* v řece Rýn. Druhý jmenovaný druh byl poprvé zaznamenán v Rýnu na území Nizozemí a byla předpokládána jeho budoucí postupná migrace na jih. Pro sběr vzorků byla použita filtrace s filtrem s póry o poloměru 0,7 μm a bylo přes ni na každém stanovišti profiltrováno 10 l vody. Vzorky byly zpracovány jak klasickou PCR, tak kvantitativní PCR. Druh *Dreissena rostriformis* byl detekován již dříve na všech odběrových místech a v tomto výzkumu sloužil jako pozitivní kontrola. Poprvé až v této studii byl ale druh *Dreissena rostriformis bugensis* molekulárně detekován v Rýnu na území Švýcarska, v Basileji. Do té doby nebyl detekován žádnou z tradičních metod, i když na tomto území probíhají kontroly odchytem a potápěním.

Nejčastější práce na téma invazivních druhů a eDNA jsou o srovnání výsledků molekulárních metod detekce a odchyty. Důležitá data v tomto oboru přinesl výzkum Dougherty et al. (2016), ve kterém jsou porovnávány výsledky detekce raka *Orconectes rusticus*. Výzkum byl veden na jezerech ve Wisconsinu, kde byl tento druh introdukován v sedmdesátých letech dvacátého století a je od té doby bedlivě pozorován. Díky tomu je zde ustálený způsob odchyty pomocí pastí s návnadou v hloubce jednoho až tří metrů. Odběry vzorků vody o objemu 250 ml byly provedeny z hladiny blízko pastí a dále zpracovány metodou qPCR.

Odchyceni byli raci z celkem devíti jezer ze dvanácti. Environmentální DNA byla detekována v jedenácti případech ze dvanácti, tedy i ve dvou jezerech, kde *O. rusticus* nebyl odchycen a nutno dodat, že ani historicky v nich nebyla jeho přítomnost zaznamenána. Protože koncentrace detekované eDNA byla velmi nízká a obě jezera mají přítoky, v nichž se *O. rusticus* vyskytuje, s největší pravděpodobností se jedná o jejich eDNA, kterou přinesl proud.

Podobné výsledky přinesl také výzkum raka červeného *Procambarus clarkii* v rybnících Francouzského národního parku Brière na jihozápadu Francie (Tréguier et al. 2014). V tomto případě byl ale objem vzorků pouhých 4 ml a byl odebírán těsně nad dnem po jemném rozvření sedimentu za účelem zvýšení možné koncentrace eDNA ve vzorku.

Ve výsledku (Tréguier et al. 2014) byla za použití obou metod přítomnost raka *Procambarus clarkii* detekována v 78 rybnících ze 158. Pomocí pastí s návnadou byli raci odchyceni v 51 rybnících (65 %) a eDNA byla pozitivní v 57 rybnících (73 %). Nicméně

pouze v případě 30 rybníků (38,5 %) byla přítomnost *Procambarus clarkii* potvrzena oběma metodami. V šesti rybnících, kde byla přítomnost potvrzena pouze pomocí eDNA, proběhl další odchyt a ve třech rybnících byl opravdu *Procambarus clarkii* odchycen, i když hodnoty koncentrace byly pod limitem kvantifikace (LOQ), která byla nastavena na 10^{-4} ng μl^{-1} . Hodnoty koncentrace se ale mohou s časem měnit.

Kvalitnější výsledky by tak například přinesl sběr vzorků během různých ročních období (Ikeda & Doi 2016). Při výzkumu ohroženého druhu raka *Cambaroides japonicus* byly poměřovány výsledky detekce eDNA a odchytu během tří časových období, a to v listopadu 2014, lednu a červnu 2015. Při odběrech byly odebírány vzorky o objemu 1 l. Byla využita technologie real-time PCR a použity primery, které amplifikovaly 124 bp dlouhý úsek COI. Ve výsledku byla eDNA druhu detekována na všech stanovištích a ve všech časech, kde byl *Cambaroides japonicus* i odchycen. Prvotní detekce ohrožených druhů pomocí eDNA by tak neměla negativní dopad na populaci, jako mohou tradiční metody odchytu.

Aktuální prací na ojedinělé téma detekce bezobratlého druhu v mořském prostředí se zabývali Forsstrom a Vasemagi (2016). Invazivní krab *Rhithropanopeus harrisi* žije ve slaných vodách téměř po celém světě, původně pochází ze Severní Ameriky. V tomto výzkumu byly odebrány vzorky vody ze 16 stanovišť o objemu 15 ml u ostrova Seili v Baltském moři a dalších 7 vzorků kolem přístavu Nauvo na ostrově Seili. Místo vysrážení DNA ze vzorku byla použita centrifugace. Pro proces qPCR byl použit primer COI z GenBank. Ve výsledku 4 ze 7 vzorků odebraných v přístavu, byly pozitivní, což odpovídalo ale přesně místům, kde byl *Rhithropanopeus harrisi* pozorován, ale absence detekce z jiných stanovišť jen dokazuje rychlou degradaci DNA v mořské vodě, i když jistou negativní roli mohl hrát také malý objem odebíraných vzorků.

Detekovat nepůvodní druhy lze také pomocí metabarcodingu a to včetně druhu kryptických, jak dokázala studie Blackman et al. (2017), ve které byly srovnány výsledky metabarcodingu a odchytu. Během tohoto pokusu byla nalezena linie druhové komplexu blešivce potočního *Gammarus fossarum*, což je v Anglii nepůvodní druh. Molekulární a morfologická detekce druh potvrdila i ve vzorku odchytu.

4. ZÁVĚR

Obor detekce eDNA má slibnou budoucnost. Ve vodním prostředí je silně rozvinut u obratlovců, zejména u obojživelníků a ryb, kde je způsoben vyšší produkcí eDNA a tedy i její vyšší koncentrací ve vodním prostředí. Obecně výsledky výzkumů u bezobratlých s porovnáním detekce pomocí eDNA a odchyty jsou rozporuplné. V mnohých případech předčí odchyt molekulární detekci, v jiných dosahuje kvalitnějších výsledků právě detekce eDNA. Nelze tedy aktuálně udělat rozhodnutí, která metoda má lepší výsledky.

Pozitivní výsledky detekce eDNA druhu dávají vědět, že se daný druh na území objevil. Neznamená to ale, že se na daném území stále vyskytuje. Dále pozitivní výsledek neříká nic o velikosti populace, chování a dalších charakteristice populace. Je potřeba další výzkumy, které sjednotí informace o biotických a abiotických faktorech a dále doplní trvanlivost detekovatelné eDNA v různých životních prostředích. Se stoprocentní jistotou tak lze tvrdit, že pozitivní výsledek detekce eDNA dokazuje, že alespoň jeden jedinec daného druhu je nebo byl přítomný.

Nutno dodat, že ani metoda odchyty nepřináší úplně přesné výsledky, jak dokazuje například výzkum raka *Procambarus clarkii* (et al. 2017), kde byly porovnány výsledky odchyty a detekce pomocí eDNA se sběrem již mrtvých jedinců při plošném odstranění tohoto raka na konci výzkumu. Takové výsledky jsou ve většině případů jen těžko dosažitelné a v případě tekoucích vod bez agresivního zásahu do prostředí technicky nemožné.

Identifikace DNA sekvencí z nasbíraných vzorků z prostředí je závislá na znalosti sekvencí DNA daných druhů. Projekt DNAqua-Net, který by měl podpořit mezioborové sdílení právě takových informací a vytváření nových genetických nástrojů, právě probíhá (Leese et al. 2016). Velkou podporu tvoří DNA databáze, kde jsou shromažďovány DNA sekvence druhů z celého světa. Ne všechny druhy byly ale osekvenovány a i u těch osekvenovaných není možné bez předešlého výzkumu univerzálně použít DNA sekvenci daného druhu (Deagle et al. 2014). Aby byla metoda eDNA v budoucnu plošně aplikovatelná, je potřeba doplnit množství dat do DNA databází, která nyní chybí (Deiner et al. 2016).

Z technického hlediska nutno dodat, že detekce eDNA je oproti tradičním metodám výhodná zejména z hlediska doby výzkumu, využití i jen vyškolených pracovníků pro sběr dat, absence vyřizování povolení, snížení bezpečnostní rizika a absence potřeby převozu organismů.

Ve výsledku je detekce eDNA jistě velmi kvalitní metodou, zejména v případech, kde hledaný druh je vzácný, chráněný nebo kryptický, nebo by byl odchyt příliš náročný, těžko proveditelný, nebo by narušil život cílovému druhu nebo druhům jiným. Do budoucna je tedy rozhodně zajímavé používat obě techniky, jak detekci eDNA, tak sběr, najednou a využít tak výhod každé z nich, například detekovat druh pomocí eDNA a na základě výsledků provést odchyt a tím zjistit další informace o populaci hledaného druhu.

6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Alaeddini, R., Walsh, S. J., & Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. *Forensic science international: genetics*, 4(3), 148-157.
- Altermatt, F., Seymour, M., & Martinez, N. (2013). River network properties shape α -diversity and community similarity patterns of aquatic insect communities across major drainage basins. *Journal of Biogeography*, 40(12), 2249-2260.
- Amberg, J. J. (2013, September). Understanding Vectors and Fomites and Overcoming Their Challenges in Edna Monitoring. In 143rd Annual Meeting of the American Fisheries Society. Afs.
- Amberg, J.J., McCalla, S.G., Monroe, E., Lance, R., Baerwaldt, K. & Gaikowski, M.P. (2015) Improving efficiency and reliability of environmental DNA analysis for silver carp. *Journal of Great Lakes Research*, 41, 367-373.
- Ardura, A., Zaiko, A., Martinez, J. L., Samulioviene, A., Semenova, A., & Garcia-Vazquez, E. (2015). eDNA and specific primers for early detection of invasive species—a case study on the bivalve *Rangia cuneata*, currently spreading in Europe. *Marine environmental research*, 112, 48-55.
- Ardura, A., & Planes, S. (2017). Rapid assessment of non-indigenous species in the era of the eDNA barcoding: A Mediterranean case study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 188, 81-87.
- Baird, D. J., & Hajibabaei, M. (2012). Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular ecology*, 21(8), 2039-2044.
- Barbaresi, S., & Gherardi, F. (2000). The invasion of the alien crayfish *Procambarus clarkii* in Europe, with particular reference to Italy. *Biological invasions*, 2(3), 259-264.
- Barbour, M. T., Gerritsen, J., Snyder, B. D., & Stribling, J. B. (1999). Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers. USEPA, Washington.
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental science & technology*, 48(3), 1819-1827.
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental science & technology*, 48(3), 1819-1827.
- Bienert, F., De Danieli, S., Miquel, C., Coissac, E., Poillot, C., BRUN, J. J., & Taberlet, P. (2012). Tracking earthworm communities from soil DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 2017-2030.
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R. A., ... & Williams, P. (2015). Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183, 19-28.
- Blackman, R. C., Constable, D., Hahn, C., Sheard, A. M., Durkota, J., Hänfling, B., & Handley, L. L. (2017). Detection of a new non-native freshwater species by DNA metabarcoding of environmental samples—first record of *Gammarus fossarum* in the UK.
- Blum, S. A., Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1997). Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(4), 513-521.

BOLD, <https://www.boldsystems.org/>

- Cai, W., Ma, Z., Yang, C., Wang, L., Wang, W., Zhao, G., ... & Douglas, W.Y. (2017). Using eDNA to Detect the Distribution and Density of Invasive Crayfish in the Honghe-Hani Rice Terrace World Heritage Site. bioRxiv, 109074.
- Collas, M., Becking, T., Delpy, M., Pflieger, M., Bohn, P., Reynolds, J., & Grandjean, F. (2016). Monitoring of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) population during a crayfish plague outbreak followed by rescue. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, (417), 1.
- Coolen, M. J., & Overmann, J. (2007). 217 000-year-old DNA sequences of green sulfur bacteria in Mediterranean sapropels and their implications for the reconstruction of the paleoenvironment. Environmental microbiology, 9(1), 238-249.
- Corinaldesi, C., Beolchini, F., & Dell'Anno, A. (2008). Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: implications for the preservation of gene sequences. Molecular Ecology, 17(17), 3939-3951.
- Corinaldesi, C., Barucca, M., Luna, G. M., & DELL'ANNO, A. (2011). Preservation, origin and genetic imprint of extracellular DNA in permanently anoxic deep-sea sediments. Molecular Ecology, 20(3), 642-654.
- Coissac, E., Riaz, T., & Puillandre, N. (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. Molecular ecology, 21(8), 1834-1847.
- Crecchio, C., & Stotzky, G. (1998). Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* bound to humic acids from soil. Soil Biology and Biochemistry, 30(4), 463-470.
- Darling, J. A., & Mahon, A. R. (2011). From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. Environmental research, 111(7), 978-988.
- De Barba, M., Miquel, C., Boyer, F., Mercier, C., Rioux, D., Coissac, E., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. Molecular Ecology Resources, 14(2), 306-323.
- Deagle, B. E., Eveson, J. P., & Jarman, S. N. (2006). Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples—a case study on DNA in faeces. Frontiers in zoology, 3(1), 11.
- Deagle, B. E., Jarman, S. N., Coissac, E., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. Biology letters, 10(9), 20140562.
- Deiner, K., & Altermatt, F. (2014). Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. PLoS One, 9(2), e88786.
- Deiner, K., Knapp, R. A., Boiano, D. M., & May, B. (2013). Increased accuracy of species lists developed for alpine lakes using morphology and cytochrome oxidase I for identification of specimens. Molecular ecology resources, 13(5), 820-831.
- Deiner, K., Walser, J. C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. Biological Conservation, 183, 53-63.
- Deiner, K., Fronhofer, E. A., Mächler, E., Walser, J. C., & Altermatt, F. (2016). Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. Nature communications, 7.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., & Miaud, C. (2011). Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. PloS one, 6(8), e23398.

- Dell'Anno, A., & Corinaldesi, C. (2004). Degradation and turnover of extracellular DNA in marine sediments: ecological and methodological considerations. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 4384-4386.
- De Ventura, L., Kopp, K., Seppälä, K., & Jokela, J. (2017). Tracing the quagga mussel invasion along the Rhine river system using eDNA markers: early detection and surveillance of invasive zebra and quagga mussels. *Management*, 8(1), 101-112.
- Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L., & Jerome, K. R. (2013). Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical chemistry*, 59(11), 1670-1672.
- Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys. *PLoS One*, 10(3), e0122763.
- Dougherty, M. M., Larson, E. R., Renshaw, M. A., Gantz, C. A., Egan, S. P., Erickson, D. M., & Lodge, D. M. (2016). Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *Journal of Applied Ecology*.
- Elbrecht, V., & Leese, F. (2015). Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass—sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. *PloS one*, 10(7), e0130324.
- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., ... & Lodge, D. M. (2016). Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology resources*, 16(1), 29-41.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4(4), 423-425.
- Ficetola, G. F., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessière, J., ... & Pompanon, F. (2010). An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC genomics*, 11(1), 434.
- Figiel, CH. R. Jr., Bohn, S. (2017). Laboratory Experiments for the Detection of Environmental DNA of Crayfish: Examining the Potential. *Freshwater Crayfish* 21(1), 159-163.
- Forsström, T., & Vasemägi, A. (2016). Can environmental DNA (eDNA) be used for detection and monitoring of introduced crab species in the Baltic Sea?. *Marine pollution bulletin*, 109(1), 350-355.
- Fu, X. H., Wang, L., Le, Y. Q., & Hu, J. J. (2012). Persistence and renaturation efficiency of thermally treated waste recombinant DNA in defined aquatic microcosms. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(13), 1975-1983.
- Geller, J. B., Walton, E. D., Grosholz, E. D., & Ruiz, G. M. (1997). Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. *Molecular Ecology*, 6(10), 901-906.
- Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2011). Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PloS one*, 6(7), e22746.
- Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. (2013). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32(3), 792-800.
- Häder, D. P., Kumar, H. D., Smith, R. C., & Worrest, R. C. (2003). Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(1), 39-50.
- Hargreaves, B. R. (2003). Water column optics and penetration of UVR. *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*, 1, 59-108.

- Harvey, C. T., Qureshi, S. A., & MacIsaac, H. J. (2009). Detection of a colonizing, aquatic, non-indigenous species. *Diversity and Distributions*, 15(3), 429-437.
- HEBERT, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B – Biological Sciences* 270: S96–S99.
- Hedman, J., & Radstrom, P. (2012). PCR Detection of Microbial Pathogens.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., von Haeseler, A., & Pääbo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic acids research*, 29(23), 4793-4799.
- Hopkins, G. W., & Freckleton, R. P. (2002). Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: implications for conservation. *Animal Conservation*, 5(3), 245-249.
- Hulme, P. E. (2006). Beyond control: wider implications for the management of biological invasions. *Journal of Applied Ecology*, 43(5), 835-847.
- Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 241-249. ISO 690
- Ikeda, K., Doi, H., Tanaka, K., Kawai, T., & Negishi, J. N. (2016). Using environmental DNA to detect an endangered crayfish *Cambaroides japonicus* in streams. *Conservation Genetics Resources*, 8(3), 231-234.
- IUCN (International Union for the Conservation of Nature). 2012. The IUCN Red List of threatened species. Verze 2012.2. International Union for the Conservation of Nature, Gland, Switzerland. (Možno nalézt na: <http://www.iucnredlist.org>)
- Jane, S. F., Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Schwartz, M. K., Lowe, W. H., ... & Whiteley, A. R. (2015). Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), 216-227.
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4(2), 150-157.
- Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S. M., Edwards, D. P., Tang, Y., Nakamura, A., ... & Larsen, T. H. (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology letters*, 16(10), 1245-1257.
- Kirk, J. (1994). Optics of UVB radiation in natural waters. *Ergebnisse Limnol*, 43, 16.
- Klymus, K. E., Richter, C. A., Chapman, D. C., & Paukert, C. (2015). Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation*, 183, 77-84.
- Kozubíková, E., Petrušek, A., Ďuriš, Z., Martín, M. P., Diéguez-Urbeondo, J., & Oidtmann, B. (2008). The old menace is back: recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Aquaculture*, 274(2), 208-217.
- Kraus, F. (2008). Alien reptiles and amphibians: a scientific compendium and analysis (Vol. 4). Springer Science & Business Media.
- Lacoursière-Roussel, A., Côté, G., Leclerc, V., & Bernatchez, L. (2016). Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*.
- Leese, F., Altermatt, F., Bouchez, A., Ekrem, T., Hering, D., Csabai, Z. S., ... & Várбірó, G. (2016). DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *RESEARCH IDEAS AND OUTCOMES (RIO)*, 2, e11321.

- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., Hart, M. M., Powell, J. R., Klironomos, J. N., ... & Dunfield, K. E. (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(12), 2977-2991.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *nature*, 362(6422), 709-715.
- Livia, L., Antonella, P., Hovirag, L., Mauro, N., & Panara, F. (2006). A nondestructive, rapid, reliable and inexpensive method to sample, store and extract high-quality DNA from fish body mucus and buccal cells. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 257-260.
- Lydolph, M. C., Jacobsen, J., Arctander, P., Gilbert, M. T. P., Gilichinsky, D. A., Hansen, A. J., ... & Lange, L. (2005). Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 1012-1017.
- Mahon, A. R., Jerde, C. L., Galaska, M., Bergner, J. L., Chadderton, W. L., Lodge, D. M., ... & Nico, L. G. (2013). Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PloS one*, 8(3), e58316.
- Mächler, E., Deiner, K., Steinmann, P., & Altermatt, F. (2014). Utility of environmental DNA for monitoring rare and indicator macroinvertebrate species. *Freshwater Science*, 33(4), 1174-1183.
- Martellini, A., Payment, P., & Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water research*, 39(4), 541-548.
- Matsui, K., Honjo, M., & Kawabata, Z. (2001). Estimation of the fate of dissolved DNA in thermally stratified lake water from the stability of exogenous plasmid DNA. *Aquatic Microbial Ecology*, 26(1), 95-102.
- Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M. N., & Kawabata, Z. I. (2012). Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13(2), 193-197.
- Mills, L. S., Pilgrim, K. L., Schwartz, M. K., & McKelvey, K. (2000). Identifying lynx and other North American felids based on mtDNA analysis. *Conservation genetics*, 1(3), 285-288.
- NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., ... & Lodge, D. M. (2016). Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology resources*, 16(1), 29-41.
- Ogram, A., Sayler, G. S., & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, 7(2-3), 57-66.
- Overballe-Petersen, S., Harms, K., Orlando, L. A., Mayar, J. V. M., Rasmussen, S., Dahl, T. W., ... & Inselmann, S. (2013). Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(49), 19860-19865.
- Pfrender, M., Hawkins, C., Bagley, M., Courtney, G., Creutzburg, B., Epler, J., ... & Larsen, D. (2010). Assessing macroinvertebrate biodiversity in freshwater ecosystems: advances and challenges in DNA-based approaches. *The Quarterly Review of Biology*, 85(3), 319-340.
- Piaggio, A. J., Engeman, R. M., Hopken, M. W., Humphrey, J. S., Keacher, K. L., Bruce, W. E., & Avery, M. L. (2014). Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 14(2), 374-380.

- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2013). Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(8), 1123-1130.
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 109-116.
- Ravanat, J. L., Douki, T., & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1), 88-102.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R., & Gough, K. C. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450-1459.
- Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., & Coissac, E. (2011). ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, gkr732.
- Roussel, J. M., Paillisson, J. M., Treguier, A., & Petit, E. (2015). The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. *Journal of Applied Ecology*, 52(4), 823-826.
- Shapiro, B. (2008). Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA. *Trends in biotechnology*, 26(6), 285-287.
- Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H., Aubrey, A. D., ... & Poinar, H. (2009). New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic acids research*, gkp159.
- Sigsgaard, E. E., Carl, H., Møller, P. R., & Thomsen, P. F. (2015). Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation*, 183, 46-52.
- Slon, V., Hopfe, C., Weiß, C. L., Mafessoni, F., de la Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., ... & Stewart, J. R. (2017). Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science*, eaam9695.
- Sommaruga, R. (2001). The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 62(1), 35-42.
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85-92.
- Stucki, P. (2010). Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer: Makrozoobenthos Stufe F. Bundesamt für Umwelt, Bern Umwelt-Vollzug, 1026, 61.
- Symondson, W. O. C. (2002). Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular ecology*, 11(4), 627-641.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., ... & Willerslev, E. (2007). Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic acids research*, 35(3), e14-e14.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular ecology*, 21(8), 1789-1793.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. I. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS one*, 7(4), e35868.
- Takahara, T., Minamoto, T., & Doi, H. (2013). Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PloS one*, 8(2), e56584.
- Takahara, T., Minamoto, T., & Doi, H. (2015). Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Biological Conservation*, 183, 64-69.

- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18.
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS one*, 7(8), e41732.
- Thomsen, P., Kielgast, J. O. S., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., ... & Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, 21(11), 2565-2573.
- Tréguier, A., Paillisson, J. M., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, M. A., & Roussel, J. M. (2014). Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology*, 51(4), 871-879.
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), 676-684.
- Watts, P. C., Thompson, D. J., Daguet, C., & Kemp, S. J. (2005). Exuviae as a reliable source of DNA for population-genetic analysis of odonates. *Odonatologica*, 34(2), 183-187.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Jane, S. F., Lowe, W. H., Whiteley, A. R., & Schwartz, M. K. (2013). Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PloS one*, 8(3), e59520.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Sepulveda, A. J., Shepard, B. B., Jane, S. F., ... & Schwartz, M. K. (2016). Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation*, 194, 209-216.
- Willerslev, E., & Cooper, A. (2005). Review paper. ancient dna. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1558), 3-16.
- Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M. B., Brand, T. B., ... & Johnsen, S. (2007). Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *Science*, 317(5834), 111-114.
- Yoccoz, N. G., Bråthen, K. A., Gielly, L., Haile, J., Edwards, M. E., Goslar, T., ... & Sønstebo, J. H. (2012). DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. *Molecular Ecology*, 21(15), 3647-3655.
- Zhu, B. (2006). Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction (PCR). *Water research*, 40(17), 3231-3238.