Česká zemědělská univerzita v Praze

Katedra ekologie

Bakalářská práce

Princip a využití eDNA pro detekci druhů a jejich patogenů

Bakalant: Hana Uherková
Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Hana Uherková

Aplikovaná ekologie

Název práce

Princip a využití eDNA pro detekci druhů a jejich patogenů

Název anglicky

The principle and use of eDNA for the detection of species and their pathogens

---

Cíle práce

Cílem práce je detailně popsat princip využití eDNA pro detekci druhů a jejich patogenů. V rámci popisu principu metody se zaměřit na metodickou stránku sběru vzorků, jejich analýzy a následné interpretace. Dále řešit výhody a nevýhody této metody v porovnáním s klasickými metodami (přímá detekce jedinců, standardní odběry vzorků z nich) a nakonec uvést příklady využití eDNA pro detekci druhů, zejména pak obojživelníků a jejich patogenů.

Metodika

Práce s literárními zdroji

Doporučený rozsah práce

30–40 stran, přílohy dle potřeby

Klíčová slova

barcoding, PCR, obojživelníci, Batrachochytrium

Doporučené zdroje informací

Amarasiri M., Furukawa T., Nakajima F. & Sei K., 2021: Pathogens and disease vectors/hosts monitoring in aquatic environments: Potential of using eDNA/eRNA based approach. Science of The Total Environment. 796, 148810

Bass D., Christison K. W., Stentiford G. D., et al., 2023: Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ekology. Trends in Parasitology. 39 (4), 285–304

Beng K. C. & Corlett R. T., 2020: Applications of environmental DNA (eDNA) in ekology ecology and conservation: opportunities, challenges and proscects. Biodiversity and Conservation. 29, 2089–2121

Berger L., A. Roberts A., Voyles J., et al., 2016: History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. Fungal Ecology. 19, 89–99

Ficetola G. F., Miaud C., Pompanom F. & Taberlet P., 2008: Species detection using environmental DNA from water samples. Biology Letters. 4 (4), 423–425

Goldberg C., Strickler K., Pilliod D.S., 2015: Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic organism. Biological Conservation. 183, 1–3

Pascher K., Švara V. & Jungmeier M., 2022: Environmental DNA – Based Methods in Biodiversity Monitoring of Protected Areas: Application Range, Limitations, and Needs. Diversity. 14(6), 463

Pawlowski J., Bruce K., Panksep K., et al., 2022: Environmental DNA metabarcoding for benthic monitoring: A review of sediment sampling and DNA extraction methods. Science of The Total Environment. 818, no. 151783

Spitzen-van der Sluijs A., Stark T., DeJean T., et al., 2020: Using environmentlan DNA for detection of Batrachochytrium salamandrivorans in neutral water. Environmental DNA. 2(4), 565–571

Thomsen P. F. & Willerslev E., 2015: Enviromental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Biological Conservation. 183, 4–18

Předběžný termín obhajoby

2023/24 LS – FŽP

Vedoucí práce

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

MSc. Roberto Chiara

Elektronicky schváleno dne 20. 3. 2024

prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 21. 3. 2024

prof. RNDr. Michael Komárek, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 25. 03. 2024

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Princip a využití eDNA pro detekci druhů a jejich patogenů" jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Jiřího Vojara, Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu použitých zdrojů na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 28. 3. 2024 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jiřímu Vojarovi Ph.D. za poskytnutí cenných rad a ochotu.

V Praze 28. 3. 2020 _____

Abstrakt

Enviromentální DNA (eDNA) je mladá rychle se rozvíjející metoda, postavená na zjišťování přítomnosti organismů na základě detekce jejich DNA v prostředí. Liší se tak od standardních detekčních metod založených na přímém sledování druhů, respektive jejich jedinců. Metodu lze využít při studiu druhů a v rámci jejich ochrany, jelikož je schopna detekovat plno vzácných, ohrožených či kryptických druhů. K ochraně druhů je ale za potřebí mít pod kontrolou i jejich patogeny, které tyto organismy ohrožují na životech. Jedním z těchto patogenů, na kterých byli metody eDNA využity, jsou patogeny houbového onemocnění obojživelníků chytridiomykóza. Přesněji se jedná o patogeny *Batrachochytrium dendrobatidis* a *Batrachochytrium salamandrivorans*. I na tyto patogeny a patogeny další je v této bakalářské práci nahlíženo, jak v kontextu eDNA, tak jejich biologie a možné léčby. Mezi hlavní cíle mimo využití eDNA pro detekci patogenů je shrnutí principů využití eDNA i v rámci sledování druhů. Dále je v této práci řešeno porovnání tradičních metod a metod eDNA a uvedeny příklady využití. Práce tak přináší vhled do problematiky nově se rozvíjející detekční metody, které u nás zatím nachází bohužel minimální uplatnění. Na toto téma bylo nahlíženo rešeršně skrze různé články a studie.

Klíčová slova: barcoding, PCR, obojživelníci, Batrachochytrium

Abstract

Environmental DNA (eDNA) is a young and rapidly developing method based on the detection of organisms by detecting their DNA in the environment. It differs from standard detection methods based on direct monitoring of species or individuals. The method can be used in the study of species and in the context of their protection, as it is able to detect a full range of rare, endangered, or cryptic species. However, in order to protect species, it is also considered necessary to control the pathogens that threaten the lives of these organisms. One of these pathogens on which eDNA methods have been used are pathogens of the fungal amphibian disease chytridiomycosis. More specifically, the pathogens are *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans*. These pathogens and other pathogens are also considered in this bachelor thesis, in the context of eDNA as well as their biology and possible treatment. Among the main objectives beyond the use of eDNA for pathogen detection is a summary of the principles of using eDNA in species monitoring as well. Furthermore, a comparison of traditional and eDNA methods is addressed and examples of applications are given. The thesis thus provides an insight into the emerging detection methods, which unfortunately still find minimal application in our country. This topic has been approached by research through various articles and studies.

Keywords: barcoding, PCR, amphibians, Batrachochytrium

Obsah

1. Úvod **6**

2. Cíle **8**

3. Rešerše **9**

3.1 Princip eDNA 9

3.2 Metody sběru a zpracování vzorků 9

3.2.1 Sběr vzorků 9

3.2.2 Laboratorní analýza 12

3.2.3 Vyhodnocení dat 14

3.3 Výhody a nevýhody metody 15

3.4 Patogeny obojživelníků 17

3.5 Příklady využití eDNA 22

3.5.1 Příklady využití eDNA 22

3.5.2 Využití pro detekci patogenů 23

3.5.3 Využití eDNA ve vodním prostředí 25

4. Závěry **27**

5. Přehled literatury **29**

6. Seznam obrázků **40**

1. Úvod

DNA, zkratka pro deoxyribonukleovou kyselinu, je dědičný materiál v organismech, který obsahuje biologické pokyny pro jejich stavbu a údržbu. Chemická struktura DNA je stejná pro všechny organismy, ale existují rozdíly v pořadí stavebních bloků DNA, známých jako páry bází. Jedinečná sekvence párů bází, zejména opakujících se vzory, poskytují prostředky k identifikaci druhů, populací, a dokonce i jedinců *(Pilliod et al. 2013)*. Environmentální DNA (eDNA) je jednou z metod pro identifikaci druhů s využitím DNA, které uvolňují organismy do prostředí prostřednictvím různých vylučovaných výkalů, sliznic, svržením kůže či srsti *(Pilliod et al. 2012; Hunter et al. 2018; Sahu et al. 2023)*. Jedná se o jednu z metodik, která celkově posouvá vědu o krok dále. Dříve bylo pro monitorování a sledování druhů nutné provádět konkrétní pozorování v terénu, což mohlo například u druhů vzácnějších zabrat několik hodin nebo dokonce dní. EDNA oproti těmto metodám umožňuje efektivnější sledování a monitorování druhů organismů (*Brannelly et al. 2020*).

Celý koncept metody spočívá v získávání DNA z prostředí neboli environmentu *(Pilliod et al. 2012)*. Proces začíná tedy odebíráním vzorků enviromentální DNA z daného testovaného prostředí. Tímto prostředím převážně bývá voda a s ní bezprostředně spojené sedimenty, půda či vzduch *(Ruppert et al. 2019)*. Odebrané vzorky environmentu se poté dopravují do laboratoří za účelem podstoupení laboratorních analýz. U laboratorních analýz se obecně rozhodujeme nad použitím barcodingu či metabarcodingu. Rozhodnutí spočívá v cíli našeho výzkumu. Pokud zkoumáme jeden určitý druh organismu, mluvíme o barcodingu. Pokud studium směřujeme k detekci celých společenstev organismů, tak si k laboratorní analýze vybíráme metabarcoding. Výsledky z laboratorních analýz se poté interpretují *(AquaBiota @2023)*.

Výsledky laboratorní analýzy eDNA závisí na předem určeném cíli studie. Nejčastěji se metoda eDNA využívá pro monitoring biodiverzity, při které zjišťujeme veškeré organismy vyskytující se v námi vybraném prostředí za účelem výzkumu. Tenhle monitoring má tak velkou váhu v odvětví ochrany přírody *(Frøslev et al. 2022)*. Velmi prospěšná se tato metoda projevuje svou schopností detekcí vzácných. kryptických a endemických druhů. Detekce a monitoring těchto druhů pomocí tradičních metod je velmi obtížné a vyžaduje obrovské množství času a úsilí. Navíc někdy potřebný opakovaný odběr jedinců je drahý a může způsobit poškození cílového organismu nebo jeho stanoviště. Metoda eDNA tak nabízí nákladově efektivní přístup k neinvazivnímu monitorování takových druhů *(Beng & Corlett*

2020). K tomu abychom však ochránili dané druhy nám nestačí vědět jejich samotný výskyt, ale i výskyt jejich patogenů. Enviromentální DNA je schopna monitorovat parazity, plísně i viry, které mohou způsobit onemocnění ve volné přírodě i v chovech. Techniky eDNA byly využity výzkumníky i při výzkumech, za účelem zlepšení lidského zdraví, což je ukázkovým příkladem toho, že lze výzkum z jedné oblasti (ochrana volně žijících živočichů) přizpůsobit oblasti jiné (zmírňování lidských chorob) *(Farrel et al. 2020)*.

Zvláště důležitými patogeny volně žijících živočichů, pro které byly použity metody eDNA jsou patogeny *Batrachochytrium*, které u obojživelníků způsobují houbové onemocnění chytridiomykózu *(Mutschmann 2015)*. Do dneška je primárním způsobem detekce patogenů odchyt zvířat, odběr stěru z kůže, extrakce DNA ze stěru a použití qPCR testu k detekci přítomnosti a množství patogenu. Tato metoda však vyžaduje nalezení a odchyt zvířat z prostředí, což není vždy jednoduché *(Brannelly et al. 2020)*. Kromě toho může přímý kontakt člověka a obojživelníka způsobit u zvířat stres, který obojživelníky ohoržuje. Testování pomocí eDNA je oproti tomuto způsobu neinvazivní *(Beng & Corlett 2020)*. Technika nám však napoví méně k prevalenci (například kolik procent jedinců je infikovaných patogeny, do jaké míry či jaké druhy), proto se tato metoda kombinuje s odchytem zvířat. Funguje to tak, že nejdříve provedeme metodu získávání informací skrze eDNA, která nám prozradí, jestli jsou v daném prostředí výskytu obojživelníků přítomny tyto patogeny, pokud ano, tak je dobré provést odchyty z této lokality a pomocí stěru zjistit, jak moc tato skutečnost ovlivnila danou populaci, jestli vůbec ovlivnila a v jaké míře *(Mutschmann 2015; Brannelly et al. 2020; Towe et al. 2021)*.

Enviromentální metoda je vcelku mladá a při tom je jednou z nejrychleji se rozvíjejících metod v biologických studiích vůbec *(Takahashi et al. 2023)*. Poprvé byla tato metoda zrealizována a popsána v roce 1986. Největšímu rozvoji se však dočkala až od roku 2000. Z počátku metodu vědci využívali k získávání informací o druzích ze středověkých vykopávek *(Sahu et al. 2023)*. Metoda se ale od té doby o hodně posunula a její využití je velmi pestré. Metody eDNA se v České republice moc nevyužívají, další limitou je omezená možnost kvantifikace pomocí eDNA. O metodě se objevuje čím dál tím více článků i studií. Tato bakalářská práce tak přináší jejich shrnutí v podobě popisu metody a její využití. Jedno z nejčastějších využití je detekce patogenů obojživelníků, na které bude v této bakalářské práci také kladen důraz.

2. Cíle

Hlavním cílem této bakalářské práce je detailní popis principu využití eDNA pro detekci druhů a jejich patogenů. V rámci popisu principu metody se zaměřením na metodickou stránku sběru vzorků, jejich laboratorní analýzy a následné interpretace těchto analýz. Dále řešit výhody a nevýhody této metody v porovnání s klasickými metodami (přímá detekce jedinců, standartní odběry vzorků z nich) a nakonec uvést příklady využití eDNA pro detekci druhů, zejména pak obojživelníků a jejich patogenů.

Práce tak shrnuje celkové téma eDNA s důrazem na využití pro detekci patogenů obojživelníků, pro které je tato metoda hojně využívaná v ostatních zemích při poměrně nových, celosvětově ohrožující patogenů, které způsobují smrtící onemocnění chytridiomykóza. Nejsou ale jedinými patogeny, pro které lze tuto metodu využít. Proto je v této práci kladen důraz i na ostatní obojživelníky ohrožující patogeny. Tato práce tak poskytuje souhrn všech potřebných informací od celkového procesu této metody přes její výhody i nedostatky až k jejímu samotnému využití.

3. Rešerše

3.1 Princip eDNA

Deoxyribonukleová kyselina, mezi širší společností známá pod zkratkou DNA je dvoušroubovicový dědičný materiál, který má v sobě každý žijící organismus. DNA slouží jako přenosce biologických instrukcí, pro jejich stavbu a údržbu *(Pedersen et al. 2014)*. I přes to, že všichni organismy vlastní stejnou chemickou strukturu DNA, lze díky ní rozlišit konkrétní druhy, populace či jedince. Lze to díky rozdílným pořadím stavebních kamenů DNA, takzvaných párů bází, které jsou právě originální pro jednotlivé druhy, populace dokonce i jedince *(Pilliod et al. 2012; Hunter et al. 2018; Sahu et al. 2023)*.

EDNA je potom DNA jaderného nebo mitochondriálního původu, kterou organismy zanechávají pomocí vylučování výkalů, produkty sliznic do prostředí, DNA mohou organismy v prostředí zanechávat i svlékáním kůže a srsti či svojí vlastní nebo jiným organismem ulovenou mršinou *(Pilliod et al. 2012; Hunter et al. 2018; Sahu et al. 2023)*. EDNA lze v přírodě najít a poté detekovat v různých skupenstvích, a to buď buněčném nebo rozpuštěném, kterému se jinými slovy říká extracelulární *(Pilliod et al. 2012)*. První využití eDNA bylo v mikrobiologii, k účelu popisu získání DNA ze vzorků odebraných z půdy. Od předešlých metod se odlišovala v neuskutečnění izolace cílových mikroorganismů. K detekci organismů byla tato metoda poprvé navržena v roce 1986, ale největší rozvoj získal teprve rokem 2000, kdy eDNA začali výzkumníci využívat k určení savců, ptáků i rostlin ze středověkých sedimentů *(Sahu et al. 2023)*. Jedná se o jednu z nejrychleji se rozvíjejících se metod výzkumu v oblasti biologie *(Takahashi et al. 2023)*.

3.2 Metody sběru a zpracování vzorků

3.2.1 Sběr vzorků

Celý proces získávání DNA z životního prostředí začíná odebíráním vzorků z testovaného prostředí. Obvykle to bývají vzorky z vody, půdy nebo vzduchu, ale eDNA může být také odebíráno z nástrah a pastí nastavených k zachycení hmyzu, který do pastí spadne nebo vletí, dále střev nebo výkalů zvířete, a dokonce i z okvětních lístků *(Kelly et al. 2019; Ruppert et al. 2019)*. Jelikož eDNA lze využít v prostředí mnoha ekosystémech, musí metody sběru odpovídat těmto různým typům vzorků. Mikroby a pyl lze snadno sbírat ze vzduchu, biofilmy lze otřít nebo seškrábnout, vodu vysrážet nebo filtrovat a sedimenty zpracovat *(Ruppert et al. 2019)*. Na kvalitě vzorku závisí plno abiotických činitelů a podmínek. Tito činitelé zpravidla

ovlivňují setrvání DNA v prostředích. Mezi tyto faktory může patřit teplota, vlhkost, výskyt bakterií či virů, UV záření a řada dalších *(Herder et al. 2014)*.

Vzorky půdy

Studie eDNA prováděné za účelem detekce organismů z půdních vzorků analyzují částice pocházejíc ze zbytků organismů, organické hmoty nebo z mimobuněčných molekul DNA, jako jsou například tělesné tekutiny *(Fouche et al. 2020; Frøslev et al. 2022)*. Ze všech těchto vyjmenovaných částic, potřebujeme pouze ty, které jsou vázané na půdní sloučeniny. Jednou z půdních sloučenin, která dokáže na sebe vázat tyto částice je jíl, který je navíc schopen eDNA chránit před degradací. Detekovatelnost a odolnost eDNA v půdách je ovlivněna, několika faktory, jako je struktura molekuly DNA nebo podmínky prostředí (teplota, pH, UV záření, mikrobiální aktivity…), které napomáhají k rychlejší degradaci DNA. Kvůli těmto činitelům je odebíraní vzorků obtížné například v tropických oblastech, kde je degradace DNA rychlá *(Fouche et al. 2020)*.

Před samotným sběrem vzorků je zapotřebí sterilizace veškerých pomůcek, které budou potřeba při samotném sběru, což obecně platí pro odebíraní vzorků z jakéhokoliv prostředí. U půdy si vybereme několik míst, od sebe několik metrů vzdálených a půdu odebereme. Hloubka odběru se určí vždy před samotným odběrem *(Allen et al. 2023)*. Odebranou půdu pak můžeme vložit například do sáčků, které při převozu do laboratoří skladujeme při teplotě −20 °C. Vzorky půdy se zmrazují převážně za účelem nedegradování DNA obsažené v daném vzorku, dalším účelem je pak minimalizace biotické aktivity, kterou jde zamezit použitím zbrzďujících bufferům *(Frøslev et al. 2022)*. Po převozu pak tyto vzorky vložíme do vakua, ve kterém se suší mrazem. Vysušené vzorky poté procházejí homogenizací, po které se z nich odebere jeden g, který dále podléhá laboratorní analýze *(Allen et al. 2023)*.

Vzorky vzduchu

Nejméně využívaným prostředím pro sběr vzorků je vzduch, i přesto, že by tyto vzorky byly vhodné pro sběr dat z mikrobů, pylů nebo i hub. Je také jedním z prostředím, ve kterém lze sledovat výskyt větších suchozemských živočichů, nejčastěji se ale vzorky ze vzduchu využívají k detekci a studii alergenů a patogenů. Existují dva způsobu odběru vzorků, aktivní a pasivní *(Clare et al. 2021; Garrett et al. 2022)*. Pro aktivní sběr vzorků ze vzduchu je zapotřebí čerpadel s filtry. Čerpadla nasávají okolní vzduch po dobu několika desítek minut až hodin *(Clare et al. 2021; Lynggaard et al. 2022)*. Při odběrech má velký vliv teplota a vlhkost, které mohou ovlivnit množství a kvalitu vzorků. Pasivní metoda sběru se provádí prostřednictvím prachových lapačů, nebo se může využít usazený materiál na určitém

povrchu. Tato metoda se prokázala být účinná hlavně pro sběr eDNA z obratlovců, bezobratlých, hub i rostlin *(Garrett et al. 2022)*. Po provedení odběru se vyjmou filtry či lapače a ty se poté uloží nejčastěji do sáčků, které se pak zamrazují z důvodu zamezení degradace. Tyto zamrazené sáčky poté putují k extrakci eDNA, ke které se dostaneme u podkapitoly laboratorní analýzy *(Clare et al. 2021)*.

Vzorky vody

Naopak nejvíce probádaným prostředím pro sběr vzorků k detekci eDNA je voda. Vzorkování vody je velmi pestré a pro každou lokalitu a cílovou skupinu specifické *(Carrora et al. 2020)*. Například u lotických typů vodních ploch můžeme odebírat vodu klidně z jejího povrchu, jelikož se v těchto ekosystémů voda snadno promíchává, naopak u lentických vod je zapotřebí se vydat do větších hloubek. U objemu záleží na velikosti vodních nádrží, z moře či oceánu budeme odebírat více objemné vzorky nežli ze sladkovodních rybníků, nebo na početnosti cílového druhu, u větších vzorků je větší šance získání DNA méně se vyskytujících organismů v daném prostředí. Objemy vzorků se povětšinou pohybují mezi jeden a půl mililitru až do 45 litrů. Standartní velikost vzorku je většinou ale jeden až dva litry. U větších ploch je také dobré odebrat větší kvanta vzorků, aby se pokryla co největší plocha a žádný organismus nám při laboratorní analýze neunikl. Vzorkování by rovněž mělo být prováděno několik krát po různých intervalech, nejmenší počet opakování by měli být alespoň tři návštěvy lokality *(Shu et al. 2020)*. Další ovlivňujícím faktorem je degradace DNA. U vody je prokázáno, že se molekuly DNA vytrácí po několika dnů někdy až měsíců. Je také potvrzeno, že degradace eDNA ve vodním prostředí se urychluje s její kyselostí, naopak ve vodách chladnějších a tekoucích se eDNA může objevit až 10 km od jeho zdroje *(Herder et al. 2014; Bessey et al. 2021)*.

V průběhu odebírání vzorků se voda filtruje převážně za pomocí membránových filtrů ve vakuových nebo peristaltických čerpadel. Tyto finální vzorky v podobě filtračních papírků jsou pak okamžitě zmrazeny na teplotu −20 °C až −25 °C, aby se zabránilo biologické aktivitě rozkládající jakoukoliv DNA. Do vyfiltrovaných vzorků se přidávají také chemikálie, které jak zchlazení zabraňuje degradaci DNA. Pro tyto účely se využívá kvartérní amonná sloučenina benzalkoniumchloridu (BAC), která v konečné koncentraci 0,01 % je účinná k udržení 92 % eDNA. Mezi další používanou chemickou látkou patří i 100% ethanol (*Goldberg et al. 2014; Takahashi et al. 2023)*. Vzorky se ne vždy musí filtrovat. U menších množství odběrů stačí vzorky srazit *(Bessey et al. 2021)*. Výběr mezi srážením a filtrací však také závisí na cílových taxonech, protože různé taxony lze izolovat efektivněji různými

způsoby *(Ruppert et al. 2015)*. Kromě samostatného odběru vzorků se dále měří faktory, které ovlivňují dané prostředí, jako jsou například pH, teplota vody, rychlost toku a další *(Yamanaka et al. 2017; Sakata et al. 2021; Davis 2023).*

Vzorky sedimentů

U vodního prostředí stojí zmínit důležitost sedimentů, u kterých se také odebírají vzorky za účelem provádění laboratorních analýz získané eDNA. Toto prostředí sedimentů je velice důležité z hlediska usazování všech možných znečištění i DNA organismů vyskytujících se v různých podobách, ať už v podobě eDNA tak i mrtvých těl živočichů žijících v daných vodních prostředích (*Hauer et al. 2018; Pawlowski et al. 2022).* Největší roli mají sedimenty ve studiích o znečištění vodních prostředí. I přesto jsou k tomuto ohledu využívány spíše vzorky odebrané z volné vody nežli ze sedimentů, které nejen znečišťující látky obsahují, dokonce je i konzervují po dlouhou dobu, tato doba se odhaduje na několik tisíc let *(Pawlowski et al. 2022; Sahu et al. 2023).*

Nejznámější metodou u odebírání vzorků ze sedimentů je třídění skrze prosévání, za účelem rozdělit organismy dle velikostí. Pokud prosévání provedeme, tak tím získáme u metabarcodingu výhodu v omezení příliš velké dominance velikostně větších druhů, které zabraňují k lepší detekci druhů upozaděných, z důvodu jejich velkému množství vyprodukované DNA. Tento proces má, ale i své chyby, kterými jsou časová náročnost a potřeba dostatečného objemu sedimentů, proto se spíše využívá metoda vysrážení, která zabraňuje kontaminaci vzorků i degradaci eDNA a hlavně je mnohem časově výhodnější *(Brandt et al. 2021)*. Sedimenty se obecně odebírají po gramech do zkumavek, které se poté ukládají do chladících boxů zmrazujících vzorky při teplotě cca −25 °C z důvodu omezení degradace eDNA. Takto zabezpečené vzorky se odvážejí do laboratořích, kde dále podstupují laboratorní analýze *(Sakata et al. 2019).*

3.2.2 Laboratorní analýza

Extrakce eDNA

Prvním krokem laboratorní analýzy je extrakce eDNA. Tento krok provádíme kvůli uvolnění DNA z buněk a organel, které jsou přítomny ve vzorcích eDNA. Mimo toto uvolnění se během extrakce odstraňují PCR inhibitory ve formě huminových kyselin nebo jiných huminových látek díky procesu purifikace *(Xing et al. 2022; AquaBiota @2023)*. Za účelem extrakce eDNA existují různé typy souprav neboli kitů. Vybrání typu souprav závisí na tom, z kterého prostředí je testovaný vzorek odebrán. Tradiční metodou extrakce je extrakce za

pomocí fenolu, chloroformů a izoamylalkoholu (PCI) *(Renshaw et al. 2015)*. Tato metoda se využívá pro vyluhování DNA z kapalných vzorků, při které se oddělují směsi molekul díky odlišnosti rozpustnosti přítomných molekul ve dvou neslučitelných kapalinách *(Zumbo 1979)*. PCI byla upravena *Deinerem et al. (2015)* s cílem využití této metody pro vzorky eDNA. I přesto že PCI byla schopná poskytnout lepší výtěžnost eDNA a nižší obsah inhibitorů, tak jsou častěji doporučovány extrakční soupravy. Hlavním důvodem je využívání škodlivých látek, jako je fenol či chloroform při provádění této metody *(Xing et al. 2022)*. Metoda má mimo jiné velký potenciál ve snížení nákladů na vzorcích, jelikož u ní není zapotřebí nízká okolní teplota, což znamená, že by se vzorky mohly vyskytovat v prostředí s pokojovou teplotou *(Renshaw et al. 2015)*.

Pro extrakci DNA ze vzorků vody jsou dále využívány čtyři základní typy souprav. Jedná se o DNeasy Tissue and Blood DNA extraction kit, QIAamp DNA Micro extraction kit, MoBio Power Water DNA extraction kit a Quick-gDNA spin-column kit *(Ress et al., 2014)*. Nejčastěji využívanou soupravou je DNeasy, díky nejmenším ekonomickým nákladům a účinnosti pro detekci DNA. Nevýhodu je pak neschopnost kroku purifikace za účelem odstranění inhibitorů. PowerWater naopak vykazuje jak lepší výtěžnost DNA, tak odstranění inhibitorů, ale i tady se vyskytuje nevýhoda v podobě vysokých nákladů, které jsou až čtyřikrát vyšší než u soupravy DNeasy *(Xing et al. 2022)*.

Typ soupravy	Výtěžnost DNA	Náklady (v dolarech za jeden vzorek)	Hladina inhibitorů
DNeasy kit	vysoká	4.7	vysoká
PowerWater kit	vysoká	18.5	střední

Tabulka 1: Porovnání souprav pro extrakci DNA *(Xing et al. 2022)*.

PCR amplifikace

Extrahovaná DNA se poté amplifikuje za pomoci kvantitativním PCR testů (qPCR) s druhově specifickými primery. Amplifikace lze provést i pomocí konvenčního PCR, ale ve srovnání s qPCR je tato možnost méně citlivá a po úspěšné amplifikaci DNA nám dodává menší množství informací *(Sanches & Schreier 2020)*. Funguje to tak, že k extrahované DNA přidáme ke konci 5´ nukleotidový fragment 12-nt. Tento fragment, který je také známý pod názvem barcode neboli čárový kód, umožňuje identifikaci konkrétních cílových druhů. PCR testy se zpravidla provádí ve třech opakování, aby se zabránilo k jakémukoliv zkreslení výsledků *(Min et al. 2023)*.

Nejvyužívanější typy qPCR testů jsou za pomocí SYBR green a TaqMan. SYBR green funguje jako barvivo, které při střetu s jakoukoliv DNA fluoreskuje. Použití tohoto barviva je sice levnější, ale je u něj větší pravděpodobnost falešných pozitivních výsledků, pokud amplifikujeme nespecifickou DNA. Naopak TaqMan má pravděpodobnost falešných výsledků o dost menší a je vůči specifičnosti cílového druhu o dost přesnější, je to i důvod proč je tato možnost doporučovanější než SYBR green. Nevýhodu je však její vyšší finanční nákladnost *(Coster et al. 2021)*.

3.2.3 Vyhodnocení dat

K zjištění jednoho konkrétního druhu nám slouží barcoding. Princip spočívá v tom, že každý organismus vylučuje genetický materiál neboli DNA. V této dvoušroubovici existují určité části, které jsou jedinečné pro každého jednotlivce, objevují se v ní ale i části DNA, které jsou společné pro jeden konkrétní druh, jiné zase sdílí organismy v rámci celé jedné taxonomické skupiny. Pro provedení barcodingu tedy vybíráme právě tu část DNA, která je jedinečná pro jeden konkrétní druh organismů *(Ankola et al. 2021)*. Na začátku procesu výzkumníci pomocí rozsáhlých databází vyberou krátkou sekvenci DNA, kterou lze zkopírovat. Sekvence by celkově u laboratorních analýz z eDNA měly být zaměřeny na krátké fragmenty DNA, z důvodu krátkých fragmentů eDNA, které se pohybují kolem 150 párů bází v důsledku degradace *(Herder et al. 2014)*. Tyto krátké sekvence se nazývají primery. Výsledkem neboli zkopírovaným primerem, se tak stává barcode. Tento barcode lze přirovnat k čárovému kódu, který se používá na zboží v obchodech. Tyto vzniklé primery se poté smíchají společně s kapkou eDNA, enzymu a soli ve zkumavce. Tato zkumavka je po smíchání umístěna do přístroje, který vytváří četné kopie DNA pro vybraný druh *(AquaBiota @2023)*. Toto je známé jako PCR (polymerázová řetězová reakce) a je založen na syntéze proteinů. Dalším způsobem analýzy vzorku při získávání informací o jednom konkrétním druhu je kvantitativní PCR, známá pod zkratkou qPRC *(Herder et al. 2014)*. Pokud je konkrétní druh přítomen, tak se během zpracování vzorku objeví na obrazovce počítače barevná křivka. Pokud naopak není přítomen, křivka se neobjeví *(AquaBiota @2023)*.

V tomto procesu je také důležité testovat primery, jelikož si u této metody nikdy nemůžeme být na 100 % jistí. První testování je testování bioinformatické. Spočívá to v porovnání primeru se sekvencemi z databází, u kterých jsme si jistí, že patří danému druhu. Toto nám pomůže k tomu, aby se v procesu analýzy vázaly pouze k DNA cílového druhu a nedošlo k její záměně s jiným druhem. Druhé testování je velmi podobné tomu prvnímu s výjimkou toto, že k testování konkrétního druhu přidáme i druhy jemu příbuzné. Poslední metodou je

testování ve třech místech, kde hustota populace cílového druhu je nízká, třech místech, kde jej naopak vysoká a v poslední řadě třech místech kde existence konkrétního druhu není známá. Tato poslední metoda se využívá k určení pravděpodobnosti detekci druhu *(Herder et al. 2014).*

K účelu zjišťování více druhů slouží metabarcoding. Jediným rozborem je možné přijít na tisíce druhů. Princip při použití metabarcodingu je stejný jako u barcodingu. Primery pro metabarcoding jsou vytvářeny tak, že vybereme část DNA, která je podobná, stejná pro všechny druhy ve skupině *(Liu et al. 2019)*. Zbytek postupu je totožný s určováním jednoho daného druhu. Pro analýzu výsledků jsou vzorky podrobeny tzv. NGS (Next Generation Sequencing). Při NGS se vzorky srovnávají s databází, v kterých se vyskytují informace plno druhů *(Herder et al. 2014)*. Když je analýza hotová, výsledkem je obrovské množství dat obsahující miliony různých typů DNA. K uspořádání a zjištění, které druhy jsou přítomny ve vzorku se využívají různé promovací metody, které oddělují různé kódy DNA od sebe. Tento proces je známý jako bioinformatics. Za tímto účelem existuje plno programů, jako jsou PhyloPythia, Mothur, Usearch, QIIME, OBITools nebo Cutadapt. Konečným výsledkem je Exelová tabulka, která specifikuje druh a počet kopií DNA pro každý druh. Posledním krokem je interpretace výsledků *(Xing et al. 2022; AquaBiota @2023)*.

3.3 Výhody a nevýhody metody

Výhody

Jednou z největších výhod eDNA je její schopnost přetrvat v prostředí po dobu dlouhou několik hodin (u mírně tekoucích vod) až po neuvěřitelných stovek či dokonce tisíce let v permafrostech. Tato persistence eDNA v prostředí tak umožňuje získat informace o druhu bez jeho přítomnosti v reálném čase odběrů *(Beng & Corlett 2020)*. Tuto schopnost DNA však ohrožuje degradace těchto látek. V přehledu literatury *Barnes et al. (2014)* zhodnotil veškeré doposud sepsané poznatky o degradaci eDNA. Po sepsání přehledu, ze kterého vyplývá velký význam mikrobů a jejich enzymů, byly provedeny experimenty zohledňující toto stanovisko. Experimenty odhalili klesání degradace eDNA v prostředí se zvyšující se koncentrací biologické spotřeby kyslíku (BSK), chlorofylu a či pH *(Rees et al. 2014)*.

Oproti tradičním metodám jako jsou různé typy odchytů, lovu anebo jen samotném vizuálním pozorováním druhů je metoda eDNA především neinvazivní, vůči druhům organismů citlivější a vědcům napomůže i svou časovou nenáročností *(Kusanke et al. 2020)*. Nejčastěji se prováděnou metodou pro získání DNA informace druhů je jejich odchyt a následný odběr

vzorcích přímo z povrchu testovaného subjektu. Tato manipulace je pro organismy velice stresujícím faktorem a při nesprávné nakládání s nimi může živočicha dokonce i usmrtit. Tohle všechno můžeme předejít právě díky metodám eDNA, u které nepotřebujeme k odběrům fyzicky konkrétní druh, ale stačí nám pouze místo výskytu tohoto druhy či druhů *(Beng & Corlett 2020)*. EDNA není jen citlivá k samotným organismům, je ale i citlivá a zároveň ekologická pro samotné prostředí. Například u studiích prováděných na mořských druzích se jako tradiční metody využíval lov organismů za pomocí pastí, chytačů nebo vlečných sítí, které měli negativní dopad na mořské dno, které se těmito metodami ničilo. U eDNA, ale žádné sítě či pasti nepotřebujeme, stačí nám pouze sterilizovaná nádoba a filtry *(Kopp et al. 2023)*.

Jedním z velkých problémů, který eDNA řeší je čím dál tím větší ztráta biodiverzity. Druhy stále mizí a jejich zástupců je čím dál tím méně. Proto je mnohdy velmi složité skrze tradiční metody tyto druhy monitorovat a nalezení druhů může trvat několik hodin, dnů až týdnů. Díky využití vzorkování prostředí a získání informací o výskytu druhu skrze jejich zanechanou DNA je tedy o mnoho časově i psychicky méně pro vědce náročné nežli tradiční metoda pozorování *(Ruppert et al. 2019)*. Přístupy eDNA jsou mnohdy i finančně dostupnější a lépe proveditelné oproti konvenčním metodám *(Harper et al. 2018)*. Na Zemi žije plno organismů, které je velmi těžké až skoro nemožné taxonomicky zařadit, proto u konvenčních metod studie je u některých druhů velmi těžké jejich zařazení a abychom je správně zařadili je zapotřebí jejich odchyt a detailnější prozkoumání a testování, co už víme může mít velice drastické následky pro tyto druhy. V tomto ohledu má navrch tedy eDNA, která to dokáže o dost přesněji a bez jakéhokoliv omezování zkoumaného živočicha *(Thomsen et al. 2015; Beng & Corlett. 2020)*.

Nevýhody

Metody eDNA bohužel nemají jenom pozitivní, ale i negativní stránku. Někdy dokonce i jejich výhody mohou být zároveň i jejich nevýhodami, příkladem nám může být právě jejich persistence v prostředí. Jak už bylo řečeno, eDNA může v prostředí přetrvat až několik let, což má jako negativní dopad to, že vzorky eDNA nemusí být zrovna aktuální a živočich se v tomto prostředí momentálně nemusí vůbec vyskytovat, což pouze s využitím této metody nemůžeme vědět, ani si to potvrdit *(Harper et al. 2018)*. Nesmíme ani zapomenout na degradaci DNA ve vzorcích z prostředí, kterou sice zmrazením či přidání chemikáliích můžeme zmírnit, ale nemůžeme jí nikdy stoprocentně zamezit. Proto s eDNA musíme

pracovat rychle a při manipulaci dodržovat dané postupy k zabránění ztráty DNA informací druhů vyskytujících se ve vzorcích *(Holman et al. 2021)*.

U pozitiv metod eDNA byla zmíněna její možnost lepší identifikace taxonomických tříd, což je oproti tradičních metod lepší k získání informací o výskytu organismu v daném prostředí. Toto je ale bohužel jediná informace, co nám eDNA může dodat a mezery v této informativnosti můžeme najít například v získávání informací o velikostí populací druhů či věkové struktury dané populace. U těchto studií má tedy metoda tradiční oproti metodě eDNA navrch *(Ruppert et al. 2019)*. Jelikož se jedná o poměrně mladou a stále se rozvíjející se metodu, tak v ní je plno mezer. Až moc otázek a málo odpovědí, na které se ještě stále hledají odpovědi (např. otázka kontaminace, vzorky eDNA jsou jí totiž vystaveny a neví se, jak jí co nejefektivněji zabránit). Metoda tedy není stoprocentní a měla by se tedy kombinovat s metodami tradičními, za účelem co nejpřesnějších výsledků studií *(Takahashi et al. 2023)*.

3.4 Patogeny obojživelníků

Ranaviry

Ranaviry jsou nově vznikající skupinou patogenů, které jsou schopné infikovat všechny zástupce studenokrevných živočichů od ryb přes obojživelníky až po zástupce plazů. Jsou jednou z pěti skupin rodu *Iridoviridae* a jako jediná v tomto rodu způsobuje významné onemocnění i u volně žijících plazů. Mezinárodní výbor pro taxonomii virů uznává v současnosti osm druhů z rodu *Ranavirus (Wirth et al. 2018)*. Tyto druhy virů patří mezi viry z dvou řetězcovou DNA, které se nachází v krevním řečišti hostitele, kterému způsobují systémové infekce. Největší úmrtnost u obojživelníků způsobená ranaviry, které činí 90 %, nastává při metamorfóze *(Vilaca et al. 2020)*.

Poprvé byly objeveny v roce 1965, kdy Allan Granoff izoloval ranavirusy u skokanů levhartích *Lithobates pipiens (Gray et al. 2015; Wirth et al. 2018)*. Původně byly studovány pro svou zajímavou molekulární biologii, ale poté, co byly ranaviry spojeny s mnoha úmrtími u ekologicky i ekonomicky důležitých druhů ryb, obojživelníků a později plazů, je začali zkoumat a studovat jako patogeny. Tento skok proběhl koncem 80.let minulého století I když jsou ranaviry schopny infikovat velké množství taxonomických skupin ektotermních obratlovců, drtivá většina výzkumů byla a je prováděna na obojživelnících *(Lesbarrères et al. 2012; Wirth et al. 2018)*. S ranavirusem se můžeme setkat na 6 kontinentech, výjimkou je Arktida a Antarktida, kde tyto patogeny nebyli identifikováni. Do dneška není úplně jasné, jakým způsobem se tento virus rozšířil po zcela celém světě *(Gray et al. 2015)*.

Mezi typické příznaky ranaviru, které můžeme sledovat na hostiteli patří kožní erytém (zarudnutí), oční exoftalmus (vypouklé oči), šedý zákal, retikální krvácení (krvácení do tkáně sítnice, způsobené poškozením stěn očních cév), nekróza končetin (otok a zánik buněk v končetinách) a krvácení, které můžeme převážně pozorovat z úst *(Lang et al. 2018).* U histopatologického vyšetření dále sledujeme degeneraci a nekrózu v játrech, ledvinách, slezině a slinivce břišní *(Yu et al. 2020).*

Za účelem detekování a potvrzení přítomnosti ranavirů ze vzorků hostitele existuje mnoho metod. Mezi tyto metody patří například elektronová mikroskopie prováděna za pomocí elektronového mikroskopu, který na rozdíl od světelného mikroskopu používá elektrony místo fotonu a elektromagnetické čočky. Další metodou může být enzymatická imunoanalýza (ELISA), imunohistochemie (IHC), nebo amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR). Výběr diagnostické techniky závisí na odbornosti výkonného pracovníka v laboratoři, požadovaných datech a typu studie *(Holopainen 2012; Wirth et al. 2018).*

Do dneška neexistuje stoprocentní léčba proti ranaviru. O nalezení efektivní léčby bylo zvažováno a posléze testováno mnoho druhů antivirotik. Bohužel existuje pouze malé množství příkladů, u kterých tyto antivirotika měli při léčbě nakažených jedinců úspěch. Jedním ze zkoušených antivirotik byl aciklovir, který byl jedním z nejvíce rozsáhle studovaných přípravků u plazů. U pár vědeckých pokusů byl potvrzen účinek v podobě částečné inhibice ranaviru. Tento výsledek se, ale postupem času neopakoval a aciklovir se vyřadil ze seznamu možných způsobů léčby onemocnění ranaviru *(Miller et al. 2015; Wirth et al. 2018).* Dále se mluví o léčbě pomocí zvyšování teploty prostředí, která obecně podstatně ovlivňuje imunitní systém. Proto i tato metoda léčby byla navržena a testována. Výsledkem byla ztráta mediánu doby přežití nakažených subjektů, kteří byli touto metodou léčeni. Přesněji mluvíme o teplotách mezi 22 °C a 27°C. Vědci se, ale i tak domnívají, že existuje optimální teplota, která by napomohla k léčbě nakažených organismů ranavirem. K určení této teploty je ale zapotřebí dalších a rozsáhlejších výzkumů *(Wirth et al. 2018).*

Chytridiomykóza

V posledních letech jedním z nejznámějších a nejvíce řešeným onemocněním třídy obojživelníků Amphibia je chytridiomykóza. Toto smrtelné onemocnění způsobují dva patogeny rodu *Batrachochytrium*. *Batrachochytrium dendrobatidis*, který zapříčil celosvětové vymírání volně žijících populací Amphibia. Tento patogen je schopen infikovat různé druhy organismů řádů žab Anura, červořů Gymnophiona a ocasatých Caudata *(Mutschmann 2015).* Druhým druhem patogenu je *Batrachochytrium salamandrivorans*, který nám svým názvem

napovídá, že se jedná o patogen napadající jedince řádu ocasatých *Caudata*, převážně tedy mloky. Existují i případy, kdy byli nalezeny a posléze i potvrzeny příznaky tohoto konkrétního patogenu u zástupců žab *(Towe et al. 2021).*

Batrachochytrium dendrobatidis

Prvním patogenem je vodní houba, která nese název *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Od objevení tohoto patogenu obojživelníků se jeho výskyt začal potvrzovat a rozšiřovala v průběhu 20. století po celém světe *(Brem 2020)*. Jeho působení způsobilo nejen drastický pokles nejméně 501 druhů obojživelníků, dokonce stojí i za vymřením 90 druhů této třídy. Žije a vyvíjí se pomocí dvoufázového životního cyklu. První fáze má formu pohyblivých zoospor, právě tyto zoospory si hledají své hostitele u obojživelníků, na kterých nastává druhá životní fáze zoosporangií, která se dále rozšiřují a rostou na svém hostiteli. Po usmrcení hostitele tyto zoosporangia vypouští do prostředí další generaci zoospor, které se ve zoosporangií vyvinula *(Yap et al. 2017; Sewell et al. 2021)*. K tomu, aby se stal *Bd* infekčním, závisí na plno dalších jak biotických, tak abiotických faktorech ovlivňující interakce mezi patogenem a jeho hostitelem. Proto ne každý napadený podléhá nemocí chytridiomykóza. Místo toho se stává přenašečem této smrtelné infekce *(Sewell et al. 2021)*.

K jednomu z největších úbytků populací obojživelníků došlo už koncem 70.let 20.století. Toto vymírání bylo pozorováno v horských oblastech Austrálie a Střední Ameriky. Pozornost si ale tento úkaz získal až o celých 10 let později. Vědci zpočátku nevěděli, co toto vymírání způsobuje. Byli testovány řady hypotéz, jako například hypotéza o znečišťujících látkách v prostředí, byla tu i pravděpodobnost zvýšení UV záření, nebo taky možnost zvýšení volně se vyskytujících predátorů *(Alford & Richards 1999; Stuart et al. 2004)*. K detekci infekce, která byla pojmenována chytridiomykóza došlo v roce 1993, poté co byli povoláni epidemiologové k prozkoumání tohoto úkazu. Zároveň s detekcí infekce, probíhalo i zjišťování patogenu. Pokusy spočívali v záměrném infikování žab infikovanými částmi kůže už dříve nakažených jedinců *(Laurance et al. 1996; Berger et al. 1998)*. Toto bylo praktikováno u dospělých jedinců žab, jelikož se tato nemoc prokázala být smrtelná pouze u jedinců po metamorfóze. V roce 1997 byla potvrzena úmrtí třídy obojživelníků, způsobena právě infekcí chytridiomykózy, v Panamě. V tento moment se začalo diskutovat o onemocnění v celosvětovém měřítku. První nalezený patogen *Bd* se postupně rozšiřoval dále po celé Jižní i Severní Americe. *(Berger et al. 2016).*

U dospělých jedinců jsou viditelné příznaky velmi nestálé a často i nespecifické. Mezi několik viditelných příznaků, které se mohou, ale i nemusí objevit patří anorexie nebo letargie. Mění

se i chování organismů. Můžeme u nich pozorovat neobvykle dlouho dobu strávenou ve vodě, záchvaty, křeče, úplnou nebo částečnou ztrátu vzpřimovacího reflexu či jakékoliv abnormální držení těla, u většiny případů jde o neobvykle natažené zadní končetiny. Velmi zřídka lze u nakažených jedinců vypozorovat změna pigmentu kůže, její zdrsnění, nadměrné sloupávání kůže, která se pak hromadí po celém těle jedince, nebo i nepřirozené rohovatění pokožky *(Mutschmann 2015)*.

Jsou možné dvě strategie léčby infikovaných obojživelníků: vyléčení, které vyžaduje eliminaci *Bd* v epidermisu a paliativní péče, která zahrnuje korekci patofyziologických abnormalit. Většina úsilí byla vynaložena na technice čištění kůže. Jsou využívány dva přístupy *(Voyles et al. 2009)*. Prvním přístupem je navyšování teploty infikovaných obojživelníků na teploty, která patogeny chytridiomykózy zabíjí, ta nese hodnotu 37 °C u tropických druhů a u druhů mírného pásma to je pak 32 °C. Nejnižší teplota, která byla použita k vyléčení infikovaných druhů byla 24 °C, tahle teplota má bohužel jen 50% úspěšnost, proto se používá pouze u jedinců více odolným vůči tomuto onemocnění, nebo s kombinací léků. Druhým přístupem je vystavování infikovaných živočichů „antifungal" lékům. Na patofyziologické abnormality se pak využívají koupele. Nejjistější formou je koupel s izotonickým nebo hypotonickým roztokem elektrolytů. Základními postupy při nalezení infikovaného jedince je jeho izolace od ostatních, dodržovat stanovené hygienické postupy (např. častá výměna rukavic a nástrojů používané při léčbě), pracovat a uchovávat jedince v dezinfikovaném prostředí a aplikovat výše zmiňované typy léčby *(Berger et al. 2010)*.

Batrachochytrium salamandrivorans

Druhým patogenem houbového onemocnění chytridiomakóza je *Batrachochytrium salamandrivorans,* známý také pod zkratkou *Bsal*. Tento patogen je především spojován s vymíráním populací mloka skvrnitého *(Towe et al. 2021)*. Předpokládanou zemí původu tohoto patogenu je východní Asie. Oficiálně byl však poprvé identifikován až po jeho rozšíření do Evropy v roce 2013. Tato identifikace proběhla v Belgii a Nizozemsku. Důvodem tohoto rozšíření mimo Asii je s velkou pravděpodobností obchod s obojživelníky chovanými v zajetí *(Kelly et al. 2021)*. Po tomto objevu vznikla dokonce i teorie, že tito jedinci chované v zajetí mohou za rozšíření Bsal právě mezi živočichy žijící ve volné přírodě. Díky muzejním záznamům se ale zjistilo, že se tato smrtelná nemoc způsobená *Bsal* objevila již v roce 2004 v Německu *(Monzon et al. 2022)*. Dále byl jeho výskyt potvrzen mimo jiné i v několika dalších asijských zemích a existují důkazy, že v Evropě stále rozšiřuje svůj areál výskytu.

Poslední zaznamenané nálezy byli nalezeny v několika regionech Španělska *(González et al. 2020)*. Celkem bylo zaznamenáno 67 druhů z různých čeledí obojživelníků testovaných pozitivně na přítomnost *Bsal*. Z toho u 29 druhů byli zaznamenány úmrtí související s tímto patogenem. Všechny druhy, u kterých byla potvrzena úmrtí, byly z řádu ocasatí, z čeledí mlokovitých Salamandridae a mločíkovití Plethodontidae. Plno z těchto postižených druhů se nachází v Červeném seznamu pod statusem ohrožení, u osmi druhů v tomto seznamu, díky řádění patogenu *Bsal*, hrozí jejich vyhynutí *(Monzon et al. 2022)*.

Patogen *Bsal* je schopný se ve volné přírodě šířit dvěma způsoby, a to aktivně přes mezihostitele či pasivně prostřednictvím média, kterým může být například voda. Pro to abychom zamezili dalšímu šíření patogenu existuje několik postupů. Jendou z nejhlavnějších je zákaz či omezení mezinárodního obchodu s mloky, dále pak izolace nakažených jedinců nebo aktivní výzkum léčby na jedincích už infikovaných *(More et al. 2018)*. *Bsal* má stejně jako *Bd* dvoufázový životní cyklus. První fáze probíhá ve vodním prostředí prostřednictvím pohyblivých samostatných zoospor. Po samostatné infekci jedince touto zoosporou, která vniká do kožních buněk jedince, nastává druhá životní fáze patogenu, ve které se ze zoospor vytváří zoosporie, v nichž se vyvíjí další generace nových zoospor. Zralé zoospory se poté vypouští znovu do vodního prostředí a celý cyklus se opakuje *(Yap et al. 2017)*. U *Bsal* můžeme pozorovat i druhý typ zoospor, které jsou specifické svou schopností plavání na vodní hladině. Díky této vlastnosti je schopen infikovat právě zástupce mloků či rozšiřovat svůj výskyt skrze médium vodních ptáků, kde jsou schopni přilnout na jejich končetiny *(Stegen et al. 2017)*.

U infikovaných druhů můžeme stejně jako u *Bd* pozorovat nadměrné svlékání kůže či zarudlou barvu pokožky, toto u *Bsal* způsobuje oproti *Bd* vznik hlubokých kožních vředů, které jsou terčem pro jiné kolonizující mikroorganismy *(Sabino-Pinto et al. 2018)*. Na takto infikované jedince neexistuje žádná léčba. Při ošetřování se ale osvědčila léčba pomocí tepla, které je schopna při vystavení nakaženého jedince na teplotu 25 až 17 °C po dobu 10 dní nebo při teplotě 25 °C na 14 dní, dočasně vyléčit výskyt hlubokých vředů. Bohužel i přes to není možné se touto metodou infekce zbavit a vředy se opět po několika týdnů vrací *(Schulz et al. 2020)*. K léčbě byli také používány antimykotické léky, které ale byli považovány za neúčinné, dokonce některým jedincům více uškodili, než pomohli. Léky se, ale i tak na infikovaných jedincích stále testují, dokonce v jedné studii bylo potvrzeno vyléčení za pomocí antimykotik nesoucí název itrakonazol, který se už dříve využíval v léčení obojživelníků *(Plewnia et al. 2023)*.

3.5 Příklady využití eDNA

3.5.1 Příklady využití eDNA

Skrze analýzu eDNA lze sledovat složení druhů ve společenstev, vývoj biodiverzity, výskyt ohrožených, vzácných či kryptických druhů. Všechno, co si vezmeme ze studiích těchto oddílů nám hlavně napomáhá ke zlepšení porozumění různých procesů na ekosystémových úrovních *(Cristescu & Hebert 2018)*. Metoda prošla testováním na získávání informací a lepšímu chápání například trofických interakcí a potravních preferencí druhů ze vzorků trusu, anebo k pozorování vitality a dynamiky ekosystémů. EDNA má také velký potenciál posunout vpřed ochranářskou vědu i praxi, a ne jenom jedním směrem, ale hned několika *(Beng & Corlett 2020)*. Jedním z hlavních směrů posunu je schopnost detekovat více taxonomických tříd na větší ploše a při tom nezasahovat přímými vlivy do životů organismů mnohdy chráněných či citlivých a v přírodě velmi zranitelných druhů, což má velký význam v chráněných krajinných oblastech *(Pascher et al. 2022)*.

Nejčastějším využitím eDNA je pozorování biodiverzity, kterou lze krásně využít k monitoringu této rozmanitosti mezi chráněnými územími navzájem, co se ochranářské vědy týče. Pozorovat ji lze skrze všechny typy vzorků, dle toho, v jakém prostředí biodiverzitu zkoumáme. Nejčastěji se ale pro tento účel využívají vzorky půdy, které jsou jedinečné jak svou různorodostí a pestrostí, pro každý habitat, tak i jedinečností bodového vzorkování, spočívající v neustálém přibýváním i vymíráním druhů *(Frøslev et al. 2022; Pascher et al. 2022)*. Při managementu biodiverzity je zapotřebí monitorovat její oblasti, jako je získat výskyt a popsat ohrožené druhy, vyhodnocování ohrožení samotné biodiverzity a s tím spojené bránění potenciálnímu ohrožení společenstev před invazními druhy *(Cristescu & Herbert 2018)*. Dobrý příkladem ochrany druhů pomocí eDNA je ochrana většiny vodních organismů, díky sledování a obzvláště pak určení velikosti území využívané těmito druhu ke tření. Studie o rozmnožování těchto živočichů se dříve provádělo skrze získávání vzorků jiker, larev či sběrem dospělců v čase tření, což může mít pro organismy mnohdy fatální následky *(Tsukamoto et al. 2011; Maruyama et al. 2018; Antrognazza et al. 2019)*.

Vzorky půdu či sedimentů jsou rovněž dobrý zdrojem pro získávání informací o pestrosti hub, rostlin, savců nebo i několik půdních bezobratlých. U jednoho z průzkumů mířených na společenstva v odlišných biomech, který uskutečnili *Yoccoz et al. (2012)*, se zjistilo, že vzorky eDNA zachytili jak přítomné květenství biomů, ale i druhy rostlin, které byli na území pěstovány před 40 až 50 lety. Toto zjištění je na jednu stranu úžasné z pohledu historie a s ní

spojenou evoluci, pro studie přítomné rozmanitosti jak rostlin, tak i živočichů je však mírně komplikujícím faktorem, který si žádá přezkoumání pomocí metod tradičních *(Cristescu & Hebert 2018)*. Analýza eDNA z půdních vzorků má potenciál i v odvětví zemědělství a zahradnictví, kde je důležitost kladena na kvalitu půdy a výživu rostlin, tyto faktory jsou však potlačována nátlaku různých chorob a zároveň závisí na výskytu prospěšných organismů v půdě. Proto je pro tyto odvětví zapotřebí pravidelný monitoring a detekce těchto druhů organismů, popřípadě nám analýza jakéhokoliv území za pomocí metod eDNA může napomoct k výběru nejideálnějšího prostředí pro pěstování plodin *(Kestel et al. 2022)*. U sedimentů je velkou výhodou jejich schopnost konzervovat eDNA po několik desítek, stovek, dokonce tisíce let, což samo nabízí jejich využití ve studiích o historických změnách prostředí nebo například jaké bylo složení společenstev organismů dříve s porovnáním s přítomnou skladbou. Doplňování tradičních metod metodu eDNA nám dává možnost pochopit více do hloubky veškeré evoluční pochody jak pro vodní ekosystémy, tak pro organismy samotné *(Ellegaard et al. 2020)*. Sedimenty nám také mohou přinést informace o znečištění vodního prostředí, díky usazování škodlivých látek na dně vodních útvarů. Největší nánosy těchto látek se nachází zejména v přechodových ekosystémech, jako jsou ústí řek či pobřežní laguny. Kvalitu čistot jak vody, tak i sedimentů se určuje pomocí přítomnosti biologických indikátorů, u kterých lze jejich přítomnost taktéž určit za pomocí analýza eDNA *(Pawlowski et al. 2022)*.

I velmi mladé a moc neprobádané prostředí pro odběr a analýzu eDNA jako je vzduch, je dobrý prostředkem pro identifikaci plna druhů obzvláště savců. Většinou je tato metoda úspěšná hlavně pro savce, kteří žijí v uzavřených prostorách, jako jsou například zoologické zahrady *(Clare et al. 2021; Lynggaard et al. 2022)*. Nyní se více výzkumů ubírá spíše směrem detekce hmyzu, rostlin, hub, obojživelníků či dalších obratlovců ve volné přírodě. Při těchto výzkumech se zjistilo nejen že je možné získat informace o druzích z odběrů vzduchu ve volné přírodě, ale i nejideálnější postup odběrů při zkoumání konkrétních skupin druhů. Odběr pomocí aktivního sběru vzorků se prokázal být účinnější pro zástupce tříd hmyzu, ptáků, obojživelníků a savců, naopak u sběru pasivním lze získat eDNA z hub, rostlin, bezobratlých a různých druhů obratlovců *(Garrett et al. 2022)*. Ve svých studiích *Johnson et al. (2023)* zjistili kolísání detekce ptáků a savců v čase, což přináší potenciál analýz eDNA k monitorování aktivity těchto druhů.

3.5.2 Využití pro detekci patogenů

Vědci v dnešní době využívají eDNA především k detekci ohrožených druhů zvířat a invazních druhů organismů. Schopnost zjistit, zda je organismus přítomen bez toho, aniž

bychom ho viděli, je neuvěřitelným skokem vpřed, který snižuje čas, zdroje a lidské úsilí potřebné k monitorování a ochraně zranitelných druhů. K tomu abychom však ochránili ohrožené druhy nám nestačí je pouze pozorovat, je také za potřebí sledovat patogeny a jejich životní cykly, které ohrožují jejich přežití. EDNA je schopna monitorovat parazity, plísně a viry, které mohou způsobit onemocnění ve volné přírodě *(Farrell et al. 2021; Bass et al. 2023)*. Detekce patogenů má však i svá úskalí. Jelikož se jedná o velmi malé organismy, tak je velká pravděpodobnost, i když biomasa těchto organismů je obrovská, že bude jejich koncentrace ve vzorcích eDNA velmi nízká a těžko dohledatelná, tudíž bude jejich určení velmi obtížné *(Bass et al. 2023)*. Další ze zádrhelů při detekci patogenů může být riziko falešné pozitivní výsledky jeho výskytu, způsobené díky neživotaschopných či dosud neznámých jedinců, které jsou cílovému druhu pouze příbuzensky blízké *(Trujillo-González et al. 2020)*. Jejich rozmanitost prostředí, ve kterém můžeme detekovat patogeny skrze eDNA, je velmi pestrá, dá se dokonce říci, že jsou úplně všude, proto určení území pro odběr vzorků závisí na habitatu cílového druhu patogenu a výskytu jeho hostitele či mezihostitele. Bylo zjištěno, že detekce lze provést například u včel přes analýzu medu. Dalším velmi dobrým nosičem eDNA parazitů trávicího traktu jsou výkaly pocházející z hostitele či mezihostitele *(Bass et al. 2023)*. Přes analýzu eDNA výkalů, lze zjistit i kdo je přenašečem různých patogenů. Jedním z takových přenašečů, objevených právě díky této metodě, jsou migrující druhy ptáků, kteří přenáší patogeny úhořů *(Menning et al. 2020)*.

O ochraně zdraví se mluví převážně u témat potravinářství, vodních systémů, životního prostředí, z globálních problémů lidstva pak u klimatických změn a v neposlední řadě u infekčních onemocnění, které jsou mnohdy spojeny s předešlými oblastmi, obzvláště pak v oblasti vodního prostředí. Zrovna vodní prostředí je hlavním přenašečem různých patogenních virů či bakterií a zároveň poskytuje útočiště pro přežívání různým druhům organismů, kteří jsou pro patogeny důležité svojí schopností mezihostitelství nebo napomáháním patogenům k jejich rozšíření prostřednictvím přenášení *(Amarasiri et al. 2021)*. Dalším prostředím často využívaným pro detekci patogenů je vzduch. Toto prostředí je velkým nosičem hlavně různých alergenů, ale i patogenů. Je dokonce i dokázáno, že v prostředí vzduchu jsou schopny stopy eDNA těchto organismů setrvávat poměrně po delší dobu nežli eDNA obratlovců *(Garrett et al. 2022)*. Studie prováděné pomocí vzorků z prostředí vzduchu k identifikaci patogenů nebo alergenů jsou do dneška soustředěny pouze na zdraví lidské a s tím i související zdraví potravin konzumovatelnými lidmi *(Clare et al. 2021)*. Velmi důležitým prostředím pro detekci patogenů je také půda, jelikož se jedná o

environment, díky kterému získáváme potraviny nebo krmivo pro hospodářská zvířata, ale i ta volně žijící. Díky analýz eDNA na vzorcích půdy, můžeme detekovat jejich zdravotní stav, což nám napomůže k výběru vhodného managementu území. Pokud tedy identifikujeme větší množství patogenů, můžeme na úkor toho změnit výběr a množství použití pesticidů, či jiných látek likvidujících tyto organismy a tím zabránit infekci produktů, které by mohli mít neblahé následky na organismy včetně lidí *(Kestel et al. 2022)*.

V roce 2020 byli techniky eDNA využity výzkumníky i v oblasti lidského zdraví ke sledování pandemie COVID-19 (eRNA) *(Farrell et al. 2021)*. COVID-19 je pojmenování pro infekci SARS-Cov-2, který okolo roku 2019 přešlo do statusu pandemie se zemí původů v Číně. Tento virus způsobuje u mnoha případů oboustranný zápal plic doprovázený těžkou dušností, která u méně imunních lidí může vést k úmrtí *(Platto et al. 2021; Barturen et al. 2022)*. Při testování na přítomnost COVID-19 za pomocí metod eDNA bylo jako prostředí k získání vzorků použita odebraná krev *(Barturen et al. 2022)*. Toto je ukázkový příklad toho, že lze výzkum z jedné oblasti (ochrana volně žijících organismů) přizpůsobit jiné oblasti (zmírňování a léčení lidských chorob) *(Farrell et al. 2021)*.

3.5.3 Využití eDNA ve vodním prostředí

Studie prováděné pomocí metod eDNA se většinou aplikují na vodní prostředí. Tato skutečnost je podmíněna skupenstvím, kdy ve vodách se eDNA vyskytuje v podobě roztoku, oproti tomu ve vzorcích půdy či vzduchu jsou její molekuly vázány na částice. Skupenství, v jakém je poté dovezena do laboratořích, je velmi zásadní u procesu extrakce DNA, kde vyluhování DNA u vzorcích z roztoků probíhá o mnoho jednodušeji nežli u pevných skupenství půdy a vzduchových částic. První studie ve vodním prostředí byly provedeny za účelem detekce zástupců druhů obojživelníků, ryb, savců a bezobratlých *(Cristescu & Hebert 2018)*. První využití metod eDNA v marinním prostředí proběhlo v roce 2012 s cílem sledování biodiverzity mořských organismů a jejich monitorování *(Díaz-Ferguson & Moyer 2014)*.

Prostředí vody k detekci obojživelníků bylo poprvé provedeno francouzskými vědci v roce 2008, za účelem detekce skokana volského (*Rana catasbeiana*) z území, ve kterém byl jeho výskyt už dříve potvrzen *(Ficetola et al. 2008)*. V roce 2011 proběhla první studie mířená na ohrožené druhy obojživelníků, ve které šlo o zkoumání vlivů ročních období na detekci eDNA těchto obojživelníků. U roku 2011 a obojživelnících ještě zůstaneme díky prvnímu provedenému výzkumu, kterým cílem bylo zjistit odolnost eDNA těchto druhů ve

sladkovodním prostředím. Celý výzkum spočíval v odebrání pulců skokana volskýho z prostředí a každodenního vzorkování tohoto prostředí. DNA pulců bylo rozpoznatelné do 25. dne od odstranění pulců s procentem detekovatelnosti vyšší jak 5 % *(Goldberg et al. 2011; Dejean et al. 2011)*. Ve výzkumu vedeném *Hall et al. (2015)*, byla potvrzena možnost detekovat patogeny obojživelníků jako jsou ranaviry. Tato studie nám říká, že eDNA je jednou z metod, kterou je možné použít při odhalení blížících se epidemií ve světě obojživelníků *(Hall et al. 2015)*.

Metoda se nejčastěji používá při detekci patogenů *Batrachochytrium*, které mají na svědomí celosvětové vymírání populací obojživelníků. Do dnešního dne jsou i přes možnost aplikování eDNA spíše využívány metody tradiční, které spočívají v odchytu jedince, provedení stěru z jeho pokožky a podrobení laboratorní analýzy z nich, při které se používají kvantitativní PCR testy *(Brannelly et al. 2020)*. První detekce proběhli na výzkumech patogenu *Bd* v roce 2007. *Walker et al. 2007* byli schopni tento patogen detekovat v 50 ml vzorcích vody. Pro studii provedenou *Chestnut et al. 2014* byla použita eDNA k nalezení Bd ve 47 % lokalit s modelově předpokládaných 61 %. Pro druhy z patogenů *Bsal* byly metody eDNA poprvé využity v roce 2018. Výzkum proběhl za účelem ověření účinnosti této metody za podmínek izolovaného rybníku *(Spritzen-van der Sluijs et al. 2020)*. Metoda eDNA má plno výhod, jednou z nich je persistence DNA *Batrachochytrium*, která přetrvává v prostředí po delší dobu. U *Bd* je to sedm týdnů v sedimentech a jeden týden ve vodním prostředí, u *Bsal* je tato doba ještě delší, a to jeden měsíc ve vodním prostředí a sedm měsíců v sedimentech. Analýzy eDNA k detekci patogenů však nejsou úplně stoprocentní, a proto se do dneška kombinují s metodami tradičními. Funguje to tak, že nejdříve provedeme metodu získávání informací skrze eDNA, která nám prozradí, jestli jsou v daném prostředí výskytu obojživelníků přítomny tyto patogeny, pokud ano, tak je dobré provést odchyt z této lokality a pomocí stěrů zjistit, jak moc tato skutečnost ovlivnila danou populaci, jestli vůbec ovlivnila a v jaké míře *(Brannelly 2020)*.

4. Závěry

Enviromentální DNA (eDNA) funguje na principu zanechání genetické informace (DNA) organismy v prostředí, jako je voda, půda, vzduch či s vodou související sedimenty. DNA organismy do prostředí produkují prostřednictvím různých vylučovacích sekretů, jako jsou výkaly, produkty slizových žláz, rozkladem mrtvých těl a dalších. Metoda je mladá a při tom jednou z nejrychleji se rozvíjející. Poprvé byly navržena v roce 1986, ale své popularity dosáhla až o několik let později kolem roku 2000.

Prvním krokem metody eDNA je sběr vzorků z daného prostředí. Před sběrem z jakéhokoliv prostředí je v první řadě potřeba sterilizovat veškeré pomůcky potřebné k odběru samotného vzorku. Vzorky půdy jsou odebírány z předem určené hloubky do sáčků, které jsou poté převezeny do laboratořích, kde jsou uchovávány ve vakuu a dále pak homogenizovány a tím připraveny k laboratorní analýze. Ze vzduchu odběr probíhá za pomocí čerpadel s filtry (pasivní odběr) nebo ponecháním prachových lapačů v prostředí (pasivní odběr). Vzorky vody se buď odebírají do nádob a po převozu podstupují filtrací nebo se filtrují ihned při samotných odběrech. Vodu lze při menších vzorcích i vysrážet. U odběrech sedimentů se využívají prosévadla či metoda vysrážení. Vzorky ze všech vyjmenovaných prostředí se při převozu do laboratoří uchovávají při teplotách −20 až −25 °C, což zabraňuje degradaci přítomné DNA. Za účelem zamezení degradace se do vzorcích mohou přimíchávat různé chemikálie. Jednou z doporučených je kvartérní amonná sloučenina benzalkoniumchloridu (BAC), která v koncentraci 0,01 % je účinná na 92 %. Mezi další účinné látky patří například 100% ethanol.

Prvním krokem při laboratorní analýze je extrakce DNA ze vzorků. Tento krok probíhá podle typu odebraného vzorku přes různé soupravy, které mají za úkol uvolnit DNA z přítomných organel a buněk. Nejčastěji využívanou soupravou pro extrakci eDNA odebranou z vody je DNeasy kit, která sice trochu pozůstává, co se hladiny inhibitorů týče, ale ve všech ostatních ohledech je velmi účinná a k tomu ještě finančně méně nákladná. Extrahovaná DNA poté podléhá amplifikaci za pomocí PCR. Nejefektivnější typem PCR pro tento krok je qPCR za pomoci TagMan, který nám dodává více informací a má menší pravděpodobnost k falešným pozitivním výsledkům. Následná interpretce probíhá podle určeného cíle. Pokud je naším cílem jeden konkrétní druh, tak se využívá barcoding, u kterého nám po provedení PCR počítač při výskytu druhu ve vzorku ukáže stoupající křivku. Při zjišťování více druhů nám

pak slouží metabarcoding, u kterého nám pomocí Next generation sequencing (NGS) a následného procesu bioinformatics vznikne excelová tabulka veškerých přítomných druhů.

EDNA má oproti tradičním metodám plno výhod. Jednou z největších je persistence DNA v prostředí, díky které nepotřebujeme přítomnost daného druhu a zároveň tak lze provést studie zabývající se o vývoji a minulosti organismů v daném prostředí. Další velmi cennou výhodou je její citlivost jak k organismům samotným, tak k prostředí, ve kterém žijí. A posledním hlavním pozitivem je usnadnění pozorování endemických, vzácných nebo kryptických druhů, které je mnohdy těžké zahlédnout pouhým okem. EDNA ale nemá pouze výhody, má i své nevýhody. Jendou z nich může být i právě jejich persistence, díky které nemůžeme 100% určit zda se daný druh v prostředí ještě stále vyskytuje či nikoliv. EDNA má své mezery i co se informativnosti týče. Je nám sice schopna přesně určit taxonomické zařazení organismů, ale to je bohužel jediná informace, co nám poskytuje. Proto je dobré metody eDNA nadále kombinovat s metodami tradičními, abychom dosáhli nejpřesnějších výsledků.

Metoda má mnoho využití. Skrze eDNA můžem pozorovat rozšíření volně žijících druhů organismů a jejich hojnost, provádět biomonitoring zdraví a dynamiky ekosystémů. Používá se dokonce i v analýze stravy k odhadu rozmanitosti, složení a četnosti výskytu kořisti z výkalů dravců. Jedním z nejdůležitějších je detekce vzácných, kryptických nebo ohrožených druhů. K tomu abychom ochránili ohrožené druhy, potřebujeme sledovat i jejich patogeny, které tyto organismy ohrožují na životech. EDNA je schopna monitorovat parazity, plísně a viry, které mohou způsobit onemocnění jak ve volné přírodě, tak i u organismech v chovech. Zvláště důležitými patogeny volně žijících živočichů, pro které byly použity metody eDNA, jsou patogeny *Batrachochytrium*, které u obojživelníků způsobují houbové onemocnění chytridiomykózu. Jedná se o patogen *Batrachochytrium dendrobatidis*, který způsobuje celosvětové vymírání populací obojživelníků. Druhým, nově se vyskytujícím druhem je *Batrachochytrium salamandrivorans* u kterého je typické, že infikuje jedince řádu ocasatých, převážně mloky. Toto onemocnění u nakažených jedinců způsobuje anorexii, letargii, záchvaty, křeče, hromadění kůže a mnoho dalších. Z důvodu neznalosti účinné léčby většina případů končí smrtí.

I přes to, že je metoda eDNA v dnešní době hodně diskutovaná, tak u nás stále nachází pouze minimální využití. Proto bych doporučila toto téma v dalších pracích rozebrat nejen rešeršně, ale i prakticky, skrze studii například na monitoring už zmiňovaných patogenů chytridiomykózy.

5. Přehled literatury

Alford R. A. & Richards S. J., 1999: Global Amphibian Declines: A Problem in Applied Ecology. Annual Review of Ecology and Systematics. 30, 133–165. (online) [cit. 2023.04.03], dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.30.1.133.

Allen M.C., Kwait R., Vastano A., et al., 2023: Sampling enviromental DNA from trees and soil to detect cryptic arboreal mammals. Scientific reports. 13, 180. (online) [cit. 2023.10.10], dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-023-27512-8.

Amarasiri M., Furukawa T., Nakajima F. & Sei K., 2021: Pathogens and disease vectors/hosts monitoring in aquatic environments: Potential of using eDNA/eRNA based approach. Science of The Total Environment. 796, 148810. (online) [cit. 2023.04.03], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148810.

Anastasia E. Towe, Matthew J. Gray, Edward Davis Carter, et al., 2021: Batrachochytrium salamandrivorans can devour more than Salamanders. Journal of Wildlife Diseases. 57 (4), 942–948. (online) [cit. 2023.09.13], dostupné z: https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00214.

Ankola K., Mahadevegowda G. L., Melichar T., Boregowda M., 2021: DNA barcoding: nucleotide signatur efor identification and authentication of livestock. Advences in Animal Genomics. Academic Press.18, 299–308. (online) [cit. 2024.01.02], dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820595-2.00018-7.

Antognazza C. M., Britton J. R., Potter C., et al., 2019: Environmental DNA as a non – invasive sampling tool to detect the spawning distribution of European anadromous shads (*Alosa* spp.). Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems. 29 (1), 148–152. (online) [cit. 2023.03.03], dostupné z: https://doi.org/10.1002/aqc.3010.

AquaBiota @2023: This i show eDNA-sampling works. (online) [cit. 2023-09-26], dostupné z: https://www.aquabiota.se/en/edna-sampling-works/.

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 and Technology. 48, 1819–1827. (online) [cit. 2023.19.03], dostupné z: https://doi.org/10.1021/es404734p.

Barturen G., Carnero-Montoro E., Martínez-Bueno M., et al., 2022: Whole blood DNA methylation analysis reveals respiratory environmental traits involved in COVID-19 severity

following SARS-CoV-2 infection. Nature Communications. 13, 4597. (online) [cit. 2023.04.03], dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41467-022-32357-2.

Bass D., Christison K. W., Stentiford G. D., et al., 2023: Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ekology. Trends in Parasitology. 39 (4), 285–304. (online) [cit. 2023.03.03], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.12.010.

Beng K. C. & Corlett R. T., 2020: Applications of environmental DNA (eDNA) in ekology and conservation: opportunities, challenges and proscects. Biodiversity and Conservation. 29, 2089–2121. (online) [cit. 2023.02.03], dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10531-020-01980-0.

Berger L., Speare R., Pessier A., Voyles J., et al., 2010: Treatment of chytridiomycosis requires urgent clinical trials. Diseases of Aquatic Organisms. 92 (2-3), 165–174. (online) [cit. 2023.10.12], dostupné z: https://doi.org/10.3354/dao02238.

Berger L., A. Roberts A., Voyles J., et al., 2016: History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. Fungal Ecology. 19, 89–99. (online) [cit. 2023.09.14], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.09.007.

Bessey C., Jarman S. N., Simpson T., et al., 2021: Passive eDNA collection enchances aquatic biodiversity analysis. Communications Biology. 4, 236. (online) [cit. 2024.17.02], dostupné z: https://doi.org/10.1038/s42003-021-01760-8.

Brandt M. I., Pradillon F., Trouche B., et al., 2021: Evaluating sediment and water sampling methods for the estimation of deep – sea biodiversity using enviromental DNA. Scientific Reports. 11, 7856. (online) [cit. 2024.17.02], dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-021-86396-8.

Brannelly L.A., Wetzel D.P., Ohmer M.E.B. et al., 2020: Evaluating enviromental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. Oecologia. 192 (1-2), 267–281. (online) [cit. 2023.10.03], dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00442-020-04743-4.

Brem F.M. R., 2020: amphibian chytridiomycosis. Encyclopedia Britannica. (online) [cit. 2023.04.03], dostupné z: https://www.britannica.com/science/amphibian-chytridiomycosis.

Carrora L., Stauffer J. B., Altermatt F., 2020: How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. Enviromental DNA. 3, 157-172. (online) [cit. 2024.13.02], dostupné z: https://doi.org/10.1002/edn3.137.

Clare E.L., Economou Ch.K., Faulkers Ch., Gilbert J.D., et al., 2021: eDNAir: Proof of concept that animal DNA can be collected from air sampling. PeerJ. 9 (3), e11030. (online) [cit. 2023.10.10], dostupné z: https://doi.org/10.7717/peerj.11030.

Coster S. S., Dillon M. N., Moore W. & Merovich G. T. Jr., 2021: The update and optimization of ane DNA assay to detect the invasive rusty crayfish (*Faxonius rusticus*). PLoS One. 16 (10), e0259084. (online) [cit. 2023.03.27], dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259084.

Cristescu M. E. & Hebert P. N. D., 2018: Uses nad Misuses of Enviromental DNA in Bidiversity Science and Conservation. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 49, 209–230. (online) [cit. 2023.01.03], dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062306.

Davis J., 2023: Enviromental DNA: what is it and how ca nit help us protect wildlife? The Trustess of The Natural Museum, London. (online) [cit. 2023-10-12], dostupné z: https://www.nhm.ac.uk/discover/what-is-environmental-dna-edna.html.

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. (online) [cit. 2024.03.27], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018.

Dejean T., Valentini A., Duparc A., et al., 2011: Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. PLoS One. 6 (8), e23398. (online) [cit. 2023.05.03], dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398.

Díaz-Ferguson E. & Moyer G. R., 2014: History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. Revista de biología tropical. 62, 1273–1284. (online) [cit. 2023.05.03], dostupné z: https://doi.org/10.15517/rbt.v62i4.13231.

Ellegaard M., Clokie M. R. J., Czypionka T., et al., 2020: Dead or alive: sediment DNA archives as tools for tracking aquatic evolution and adaptation. Communications Biology. 3, 169. (online) [cit. 2023.02.03], dostupné z: https://doi.org/10.1038/s42003-020-0899-z.

Farrell J. A., Duffy D. & Whitmore L., 2021: Enviromental DNA – how a tool used to detect endangered wildlife ended up helping fight the COVID-19 pandemic. The conversation. (online) [cit. 2023.10.03], dostupné z: https://theconversation.com/environmental-dna-how-a-

tool-used-to-detect-endangered-wildlife-ended-up-helping-fight-the-covid-19-pandemic-158286.

Ficetola G. F., Miaud C., Pompanom F. & Taberlet P., 2008: Species detection using environmental DNA from water samples. Biology Letters. 4 (4), 423–425. (online) [cit. 2023.05.03], dostupné z: https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118.

Foucher, A., Evrard, O., Ficetola, G.F. *et al.*, 2020: Persistence of environmental DNA in cultivated soils: implication of this memory effect for reconstructing the dynamics of land use and cover changes. Scientific Reports. 10, 10502. (online) [cit. 2022.10.14], dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-020-67452-1.

Frøslev T. G., Ejrnæs R., Hansen A. J., et al., 2022: Treated like dirt: Robus forensic and ecological enferences drom soil eDNA after challenging sample storage. Enviromental DNA. 5 (1), 158–174. (online) [cit. 2024.14.02], dostupné z: https://doi.org/10.1002/edn3.367.

Garrett N. R., Watkins J., Simmons N. B., et al., 2022: Airborne eDNA documents a diverse and ecologically complex tropical bat and other mammal community. Enviromental DNA. 5 (2), 350–362. (online) [cit. 2024.14.02], dostupné z: https://doi.org/10.1002/edn3.385.

Goldberg C. S., Pilliod D. S., Arkle R. S. & Waits L., 2011: Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. PLoS One. 6 (7), e22746. (online) [cit. 2023.05.03], dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746.

Goldberg C., Strickler K., Pilliod D.S., 2014: Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic organism. Biological Conservation. 48, 1–3. (online) [cit. 2023.10.12], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.040.

González D. L., Baláž V., Chajma P. & Vojar J., 2020: Surveying for presence of salamander – killer fungus in Spanish captive collections of amphibians. Diseases of Aquatic Organisms. 142, 99-103. (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://doi.org/10.3354/dao03535.

Gray M. J. & Chinchar V. G., 2015: Introduction: History and Future of Ranaviruse. Ranaviruses. 1-7. (online) [cit. 2024.18.02], dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-13755-1_1.

Hall E. M., Crespi E. J., Goldberg C. S. & Brunner J. L., 2015: Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. Molecular

Ecology Resources. 16 (2), 423–433. (online) [cit. 2023.06.03], dostupné z: https://doi.org/10.1111/1755-0998.12461.

Harper L. R., Buxton A. S., Rees H. C., et al., 2018: Prospects and challenges of enviromental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. Hydrobiologia. 826, 25–41. (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10750-018-3750-5.

Hauer Ch., Leitner P., Unfer G., et al., 2018: The Role of Sediment and Sediment Dynamics in the Aquatic Environment. Riverine Ecosystem Management. Aquativ Ecology Series. 8, 151–169. (online) [cit. 2024.17.02], dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-73250-3_8.

Herder J., Valentini A., Bellemain E., et al., 2014: Enviromental DNA – a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. RAVON. 2013-104. (online) [cit. 2024.01.02], dostupné z: https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4002.1208.

Holman L. E., Chng Y. & Rius M., 2021: How does eDNA decay affect metabarcoding experiments? Enviromental DNA. 4 (1), 108–116. (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://doi.org/10.1002/edn3.201.

Holopainen Riikka, 2012: Ranaviruse: Detection, differentiation and host immune response. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biosciences, Helsinki. 75 s. (academic dissertation). (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/267709522_Ranaviruses_Detection_differentiation_and_host_immune_response.

Chestnut T., Anderson Ch., Popa R., et al., 2014: Heterogeneous Occupancy and Density Estimates of the Pathogenic Fungus *Batrachohcytrium dendrobatidis* in Waters os North Amerrica. PLoS One. 9 (9), e106790. (online) [cit. 2023.06.03], dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106790.

Johnson M. D., Barnes M. A., Garrett N. R. & Clare E. L., 2023: Answers blowing in the wind: Detection of birds, mammals, and amphibians with airborne environmental DNA in a natural environment over a yearlong survey. Environmental DNA. 4 (2), 375–387. (online) [cit. 2023.03.03], dostupné z: https://doi.org/10.1002/edn3.388.

Kelly M., Pasmans F., Shea T. P., et al., 2021: Diversity, multifaceted evolution, and facultative saprotrophism in the European *Batrachochytrium salamandrivorans* epidemic.

Nature Communications. 12, 6688. (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41467-021-27005-0.

Kelly R., Shelton A. O. & Simon R. G., 2019: Understanding Enviromental DNA. 17 s. (online) [cit. 2024.13.02], dostupné z: https://doi.org/10.1101/660530.

Kestel J. H., Field D. L., Bateman P. W., et al., 2022: Applications of environmental DNA (eDNA) in agrocultural system: Current uses, limitations and future prospects. Science of The Total Environment. 847, 157556. (online) [cit. 2023.02.03], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157556.

Kusanke L. M., Panteleit J., Stoll S., et al., 2020: Detection of the endangered European weather loach (Misgurnus fossillis) via water and sediment samples: Testing multiple eDNA workflows. Ecology and Evolution. 10 (15), 8331-8344. (online) [cit. 2024.17.02], dostupné z: https://doi.org/10.1002/ece3.6540.

Kopp D., Faillettaz R., Joncour A. L., et al., 2023: Assessing without harvesting: Pros and cons of enviromental DNA sampling and image analysis for marine biodiversity evaluation. Marine Enviromental Research. 188, 106004. (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106004.

Lang Gui, V. Gregory Chinchar, Qiya Zhang, 2018: Molecular basis of pathogenesis of emerging viruses infecting aquatic animals. Aquaculture and Fisheries. 3 (1), 1–5. (online) [cit. 2022.10.20], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.12.003.

Laurance W. F., McDonald K. R. & Speare R., 1996: Epidemic Disease and the Catastrophic Decline of Australian Rain Forest Frogs. Conservation Biology. 10 (2), 406–413. (online) [cit. 2023.04.03], dostupné z: https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10020406.x.

Lesbarrères D, Balseiro A, Brunner J, et al., 2012: Ranavirus: past, present and future. Biol Lett. 8 (4), 481–483. (online) [cit. 2022.10.19], dostupné z: https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0951.

Liu M., Clarke J. L., Baker C.S., Jordan J. G., Burridge P. Ch., 2019: A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. Ecological Entomology. 45 (3), 373–385. (online) [cit. 2024.01.02], dostupné z: https://doi.org/10.1111/een.12831.

Lynggaard Ch., Bertelsen M. F., Jensen C. V., et al., 2022: Airborne enviromental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. Current Biology. 32 (3), 701–707. (online) [cit. 2024.14.02], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.014.

Maruyama A., Sugatani K., Watanabe K., et al., 2018: Environmental DNA analysis as a non-invasice quantitative tool for reproductive migration of a threatened endemic fish in rivers. Ecology and Evolotion. 8 (23), 11964–11974. (online) [cit. 2023.03.03], dostupné z: https://doi.org/10.1002/ece3.4653.

Menning D. M., Ward D. H. Wylllie-Echeverria S., et al., 2020: Are migratory waterflowl vectors of seagrass pathogens? Ecology and Evolution. 10 (4), 2062–2073. (online) [cit. 2023.04.03], dostupné z: https://doi.org/10.1002/ece3.6039.

Miller D. L., Pessier A. P., Hick P. & Whittington R. J., 2015: Comparative Pathology of Ranaviruses and Diagnostic Techniques. Ranaviruses. 171–208. (online) [cit. 2024.02.19], dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-13755-1_7.

Min X., Li F., Zhang X., et al., 2023: Choice of primer pairs and PCR polymerase affect the detection of fish eDNA. Environmental Sciences Europe. 35, 103. (online) [cit. 2024.03.27], dostupné z: https://doi.org/10.1186/s12302-023-00812-6.

Monzon F. C., Rödel MO & Jeschke J. M., 2022: Batrachohcytrium salamandrivorans' Amphibian Host Species and Invasion Range. EcoHealth. 19, 475–486. (online) [cit. 2023.11.09], dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10393-022-01620-9.

More S., Angel M. M., Bicout D., et al., 2018: Scientific Opinion on the risk of survival, establishment and spread of *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) in the EU. *EFSA Journal.* 16 (4), e05259. (online) [cit. 2024.20.02], dostupné z: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5259.

Mutschmann Frank, 2015: Chytridiomycosis in Amphibians. Journal of Exotic Pet Medicine. 24 (3), 276–282. (online) [cit. 2023.08.15], dostupné z: https://doi.org/10.1053/j.jepm.2015.06.013.

Pascher K., Švara V. & Jungmeier M., 2022: Environmental DNA – Based Methods in Biodiversity Monitoring of Protected Areas: Application Range, Limitations, and Needs. Diversity. 14 (6), 463. (online) [cit. 2023.02.03], dostupné z: https://doi.org/10.3390/d14060463.

Pawlowski J., Bruce K., Panksep K., et al., 2022: Environmental DNA metabarcoding for benthic monitoring: A review of sediment sampling and DNA extraction methods. Science of The Total Environment. 818, 151783. (online) [cit. 2023.10.18], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151783.

Pedersen R., Marchi N. A., Majikes J., et al., 2014: Properties of DNA. Handbook of Nanomaterials Properities. 34, 1125–1157. (online) [cit. 2024.31.01], dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-31107-9_10.

Pilliond D.S., Goldberg C.S., Laramie M.B, Waits L.P., 2012: Application of environmental DNA for inventory and monitoring of aquatic species. U.S. Geological Survey Fact Sheet 2012–3146. 4 s. (online) [cit. 2023.10.05], dostupné z: http://pubsdata.usgs.gov/pubs/fs/2012/3146/index.html

Platto S., Wang Y., Zhou J. & Carafoli E., 2021: History of the COVID-19 pandemic: Origin, explosion, worldwide spreading. Biochemical and Biophysical Research Communications. 538, 14–23. (online) [cit. 2023.04.03], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.087.

Plewnia A., Veith M., Peters M., et al., 2023: Successful Drug-Mediated Host Clearance of Batrachochytrium salamandrivorans. Emerging Infectious Diseases. 29 (2), 411-414. (online) [cit. 2024.20.02], dostupné z: https://doi.org/10.3201/eid2902.221162.

Renshaw M. A., Olds B. P., Jerde Ch. L., et al., 2015: The room temperature preservation of filtered enviromental DNA samples and assimilation into a phenol – chloroform – isoamyl alcohol DNA extraction. Molecular Ecology Resources. 15 (1), 168–176. (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://doi.org/10.1111/1755-0998.12281.

Ress H. C., Maddison B. C., Middleditch D. J., et al., 2014: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ekology. Journal of Applied Ecology. 51, 1450–1459. (online) [cit. 2023.19.03], dostupné z: https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306.

Ruppert K.M., Kline R.J., Rahman M.S., 2019: Past, present, and future perspectives of enviromental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. Global Ecology and Conservation. 17, e00547. (online) [cit. 2022.10.14], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547.

Sabino-Pinto J., Vith M., Vences M. & Steinfartz S., 2018: Asymptomatic infection of fungal pathogen Batrachochytrium salamandrivorans in captivity. Scientific Reports. 8, 11767. (online) [cit. 2024.20.02], dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-018-30240-z.

Sahu A., Kumar N., Singh Ch. P., et al., 2023: Enviromental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. Journal for Nature Conservation. 71, 126325. (online) [cit. 2024.13.02], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jnc.2022.126325.

Sakata M. K., Yamamoto S., Gotoh R. O., et al., 2019: Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. Enviromental DNA. 2 (4), 505-518. (online) [cit. 2024.18.02], dostupné z: https://doi.org/10.1002/edn3.75.

Sakata M. K., Watanabe T., Maki N., et al., 2021: Determining an effective sampling method for eDNA metabarcoding: a case study for fish biodiversity monitoring in a small, natural river. Limnology. 22 (9), 221–235. (online) [cit. 2023.10.12], dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10201-020-00645-9.

Sanches T. M. & Schreier A. D., 2020: Optimizing ane DNA protocol for estuarine environments: Balancing sensitivity, cost and the time. PLoSOne. 15 (5), e0233522. (online) [cit. 2024.03.27], dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233522.

Shu L., Ludwig A., Peng Z., 2020: Standards for Methods Utilizing Environmental DNA for Detection of Fish Species. Genes (Basel). 11 (3), 296. (online) [cit. 2023.10.12], dostupné z: https://doi.org/10.3390/genes11030296.

Schulz V., Schulz A., Klamke M., et al., 2020: Batrachochytrium salamandrivorans in the ruhr district, germany: History, distribution, decline dynamics and disease symptoms of salamander plague. Salamandra. 56 (3), 186-214. (online) [cit. 2024.20.02], dostupné z: https://www.mendeley.com/catalogue/3cc3bf7c-be82-3cc0-be10-f44fde49ee7e/.

Spitzen-van der Sluijs A., Stark T., DeJean T., et al., 2020: Using environmentlan DNA for detection of Batrachochytrium salamandrivorans in neutral water. Environmental DNA. 2 (4), 565–571. (online) [cit. 2023.06.03], dostupné z: https://doi.org/10.1002/edn3.86.

Stengen G., Pasmans F., Schmidt B. R., et al., 2017: Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. Nature. 544, 353–356. (online) [cit. 2024.20.02], dostupné z: https://doi.org/10.1038/nature22059.

Stuart S. N., Chanson J. S., Cox N. A., et al., 2004: Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. Science. 306 (5702), 1783–1786. (online) [cit. 2023.04.03], dostupné z: https://doi.org/10.1126/science.110353.

Takahashi M., Saccò M., Kestel J. H., et al., 2023: Aquatic enviromental DNA: A review of the, acro – organismla biomonitoring revolution. Science of The Total Enviroment. 873, 162322. (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322.

Thomas R. Sewell, Joyce Longcore, Matthew C. Fisher, 2021: Batrachochytrium dendrobatidis. Trends in Parasitology. 37 (10), 933–934. (online) [cit. 2023-09-25], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.014.

Thomsen P. F. & Willerslev E., 2015: Enviromental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Biological Conservation. 183, 4–18. (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019.

Trujillo-González A., Becker J. A., Hutson K. S., et al., 2020: Can environmental DNA be used for aquatic biosecurity in the aqurium fish trade? Biological Invasions. 22, 1011–1025. (online) [cit. 2023.03.03], dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10530-019-02152-0.

Tsukamoto K., Chow S., Otake T., et al., 2011: Oceanic spawning ekology of freswater eels in the western North Pacific. Nature Communications. 2, 179. (online) [cit. 2023.03.03], dostupné z: https://doi.org/10.1038/ncomms1174.

Vilaça ST, Grant SA, Beaty L, et al., 2020: Detection of spatiotemporal variation in ranavirus distribution using eDNA. Environmental DNA. 2 (2), 210–220. (online) [cit. 2022.10.19], dostupné z: https://doi.org/10.1002/edn3.59.

Voyles J., Young S., Berger L., et al., 2009: Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. Science. 326 (5952), 582–585. (online) [cit. 2023.04.03], dostupné z: https://doi.org/10.1126/science.117676.

Walker S. F., Salas M. B., Jenkins D., et al., 2007: Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. Diseases of Aquatic Organisms. 77, 105–112. (online) [cit. 2023.06.03], dostupné z: https://doi.org/10.3354/dao01850.

Wirth W, Schwarzkopf L, Skerratt LF, Ariel E., 2018: Ranaviruses and reptiles. PeerJ. 6, e6083. (online) [cit. 2022.10.19], dostupné z: https://doi.org/10.7717/peerj.6083.

Xing Y., Gao W., Shen Z., et al., 2022: A Review of Environmental DNA Field and Laboratory Protocols Applied in Fish Ecology and Environmental Health. Frontiers in Environmental Science. 10, 725360. (online) [cit. 2024.03.27], dostupné z: https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.725360.

Yamanaka H., Minamoto T., Matsuura J., et al., 2017: A simple method for preserving enviromental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfaktant. Limnology. 18, 233–241. (online) [cit. 2023.27.12], dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10201-016-0508-5.

Yap T. A., Nguyen N. T., Serr M., et al., 2017: *Batrachochytrium salamandrivorans* and the Risk of a Second Amphibian Pandemic. EcoHealth. 14, 851–864. (online) [cit. 2024.20.02], dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10393-017-1278-1.

Yoccos N.G., Bråthen K. A., Gielly L., et al., 2012: DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth from diversity. Molecular Ecology. 21 (15), 3647–3655. (online) [cit. 2023.01.03], dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05545.x.

Yu, Z, Mou, W, Geng, Y, et al., 2020: Characterization and genomic analysis of a ranavirus associated with cultured black-spotted pond frogs (*Rana nigromaculata*) tadpoles mortalities in China. Transboundary and Emerging Dieases. 67 (5), 1954–1963. (online) [cit. 2022.10.20], dostupné z: https://doi.org/10.1111/tbed.13534.

Zumbo P., 1979: Phenol – chloroform Extraction. Weill Cornell Medical Collage. 1–7. (online) [cit. 2024.19.02], dostupné z: https://is.muni.cz/el/pharm/podzim2023/F1MG1_16/um/PHENOL-CHLOROFORM.pdf.

6. Seznam obrázků

Tabulka 1: Porovnání souprav pro extrakci DNA (Xing Y., Gao W., Shen Z., et al., 2022: A Review of Environmental DNA Field and Laboratory Protocols Applied in Fish Ecology and Environmental Health. Frontiers in Environmental Science. 10, 725360. (online) [cit. 2024.03.27], dostupné z: https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.725360.)