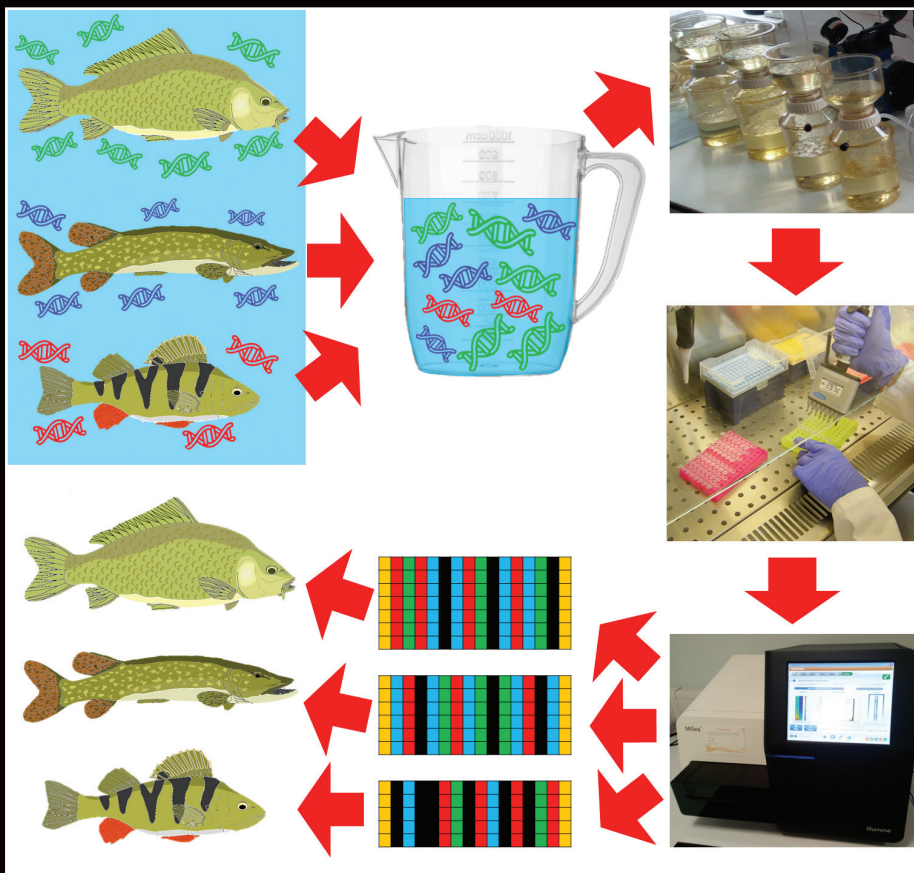


Biologické centrum AV ČR, v.v.i.  
Hydrobiologický ústav

Ověřená technologie

## Vzorkování volné genetické informace (eDNA) z vody



Petr Blabolil, Bernd Hänfling, Lynsey R. Harper, Graham Sellers,  
Cristina Di Muri, Nathan P. Griffiths, Romulo A. dos Santos, Jelena Knežević-Jarić,  
Tomáš Jůza, Mojmír Vašek, Martin Čech, Milan Muška, Ivan Fiala,  
Martina Lisnerová, Jiří Peterka

České Budějovice  
2021



Biologické centrum AV ČR, v.v.i.  
Hydrobiologický ústav

Ověřená technologie

# Vzorkování volné genetické informace (eDNA) z vody

RNDr. Petr Blabolil, Ph.D.  
Dr. Bernd Hänfling  
Dr. Lynsey R. Harper  
Dr. Graham Sellers  
Dr. Cristina Di Muri  
Mgr. Nathan P. Griffiths  
Bc. Romulo A. dos Santos  
Mgr. Jelena Knežević-Jarić  
Mgr. Tomáš Jůza, Ph.D.  
Mgr. Mojmír Vašek, Ph.D.  
Doc. RNDr. Martin Čech, Ph.D.  
RNDr. Milan Muška, Ph.D.  
RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.  
Mgr. Martina Lisnerová  
RNDr. Jiří Peterka, Ph.D.

Ověření technologie bylo uskutečněno za finanční podpory programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025 ZEMĚ, projektu QK1920011 Metodologie kvantifikace dravých druhů ryb ve vodárenských nádržích pro optimalizaci managementu vodních ekosystémů a projektu MSM200961901 The true picture of eDNA.

RNDr. Petr Blabolil, Ph.D.\*

Dr. Bernd Hänfling#

Dr. Lynsey R. Harper#

Dr. Graham Sellers#

Mgr. Cristina Di Muri#

Mgr. Nathan P. Griffiths#

Bc. Romulo A. dos Santos\*

Mgr. Jelena Knežević-Jarić\*

Mgr. Tomáš Jůza, Ph.D.\*

Mgr. Mojmír Vašek, Ph.D.\*

Doc. RNDr. Martin Čech, Ph.D.\*

RNDr. Milan Muška, Ph.D.\*

RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.†

Mgr. Martina Lisnerová†

RNDr. Jiří Peterka, Ph.D.\*

Adresy autorů:

\* Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Hydrobiologický ústav,  
Na Sádkách 702/7, 370 05 České Budějovice

# Evolutionary and Environmental Genomics Group,  
Department of Biological and Marine Sciences,  
University of Hull, Hull, HU6 7RX, Velká Británie

† Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Parazitologický ústav,  
Braníšovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

## Obsah

1. Cíl .....	2
2. Popis .....	2
3. Oblast výzkumu .....	2
4. Úvod .....	3
4.1. Charakteristika eDNA .....	3
4.2. Přednosti eDNA metabarkódingu .....	3
4.3. Specifika eDNA metabarkódingu .....	3
5. Studované lokality .....	4
6. Postup práce .....	5
6.1. Odběr vody a filtrace .....	5
6.2. Extrakce DNA .....	9
6.2.1 Příprava zásobních roztoků .....	9
6.2.2 Příprava extrakčních činidel .....	9
6.2.3 Postup extrakce .....	10
6.3. Příprava genetických knihoven .....	11
6.3.1 PCR1 .....	11
6.3.2 PCR2 .....	15
6.3.3 Závěrečná příprava genetických knihoven .....	16
6.4. Bioinformatické zpracování .....	17
6.5. Statistické zpracování .....	17
7. Okruhy ověření .....	18
8. Výsledky a diskuse .....	18
8.1. Počty sekvencí .....	18
8.2. Kontaminace vzorků .....	18
8.3. Společenstva ryb a mihulí .....	18
8.4. Ostatní skupiny obratlovců .....	24
8.4.1 Obojživelníci .....	24
8.4.2 Plazi .....	28
8.4.3 Ptáci .....	28
8.4.4 Savci .....	32
8.5. Příklady využití .....	36
8.5.1 Shoda eDNA metabarkódingu s výlovem .....	36
8.5.2 Využití stratifikovaného designu k ekologické studii .....	37
9. Závěry .....	38
10. Novost postupů .....	39
11. Ekonomické aspekty .....	39
12. Popis uplatnění technologie .....	40
13. Seznam literatury .....	41

## 1. Cíl

Cílem technologie je optimalizovat postup vzorkování volné genetické informace (environmentální DNA, dále jen eDNA) z vody a seznámit s výsledky tohoto postupu široké spektrum relevantních subjektů, tj. orgánů ochrany přírody, ichtyologů, rybářských hospodářů na vodárenských nádržích, uživatelů rybářských revírů, majitelů soukromých revírů a chovatelů ryb.

## 2. Popis

Analýza eDNA umožňuje pouhým odběrem vody detekci určitého rybního druhu (barkóding) či celého rybního společenstva (metabarkóding). Využití eDNA je zcela neinvazivní a vysoce citlivé s vysokým potenciálem aplikace nejen pro vědecké účely, ale i standardní monitoring vodních útvarů.

V roce 2018 proběhly první experimenty zaměřené na vzorkování a zpracování eDNA ze tří přehradních nádrží a jejich přítoků. Tyto postupy byly v následujících letech (2019–2020) optimalizovány v podmínkách nejen přehradních nádrží, ale i rybnících, přirozeného jezera a toků. Testovány byly odběry během letní a podzimní sezóny, stratifikovaný a pravidelný design odběru z různých prostředí vodních útvarů. Z laboratorního zpracování bylo testováno zpracování jednotlivých vzorků a vzorků vzniklých smísením částí jednotlivých vzorků. Vzorky byly filtrovány na otevřených filtrech uložených do alkoholu nebo zamrazeny. K extrakci DNA byla využita metoda univerzálního modulárního postupu a při přípravě genetických knihoven pak dvoufázová polymerázová řetězová reakce (PCR). Sekvence knihoven byla provedena na přístroji Illumina MiSeq a získané sekvence následně bioinformaticky a statisticky zpracovány.

## 3. Oblast výzkumu

Ověření technologie: odběr vody, filtrace, uchování filtrů, extrakce DNA, příprava genetických knihoven, bioinformatické a statistické zpracování. Vývoj technologie byl proveden na Hydrobiologickém a Parazitologickém ústavu Biologického centra AV ČR, v.v.i. ve spolupráci s Univerzitou v Hullu (Spojené království Velké Británie a Severního Irska).

## 4. Úvod

### 4.1. Charakteristika eDNA

Environmentální DNA je směs buněčného i mimobuněčného genetického materiálu různých organismů, kterou lze získat ze vzorku prostředí. Těmito vzorky jsou nejčastěji voda, půda, vzduch, led a exkrementy. eDNA je vylučována makroorganismy slizem či zbytky kůže, výkaly, krví a dalšími tělesnými tekutinami nebo případně lze analyzovat celé mikroorganismy. eDNA koncentrujeme z vody chemickým srážením či filtrací.

### 4.2. Přednosti eDNA metabarkódingu

Nejvýznamnější přednost analýzy eDNA je její neinvazivnost. Voda je jedinečným médiem přenosu eDNA. Odběr vody lze uskutečnit z jakéhokoli biotopu a v jakoukoli dobu, zkoumaný organismus není třeba odlovit ani pozorovat. K průzkumu stačí povolení ke vstupu k vodě. Celkově jsou analýzy rychlejší než tradiční odlovy a lze očekávat jejich zlevňování s pokrokem technologie zpracování a vyhodnocení. Užívané metody molekulární biologie jsou navíc vysoce citlivé, což je jejich výhoda, ale i podmínka pro velmi pečlivou práci. Klíčový je výběr vhodného páru primerů, který ohraničuje cílovou oblast DNA. Ideálními vlastnostmi specifického úseku DNA jsou stálost úseků s primery a vysoká mezidruhová variabilita sekvence úseku mezi nimi. Použitím unikátně označených primerů lze docílit individuálního rozlišení jednotlivých vzorků a osekvenovat až několik desítek vzorků současně (Blabolil a kol. 2021b).

### 4.3. Specifika eDNA metabarkódingu

Doposud nelze běžným barkódingem ani metabarkódingem zjistit velikostní a věkové složení populace, určit poměr pohlaví ani kondici ryb. Složitějšími molekulárními metodami tyto informace do jisté míry zjistit lze, ale běžně se neprovádějí. K analýze eDNA obratlovců se v současnosti nejčastěji využívá část mitochondriální DNA, které je v buňce více než jaderné a vykazuje vyšší variabilitu mezi druhy. Zároveň je však tato DNA dědičná po mateřské linii, a proto neodhalí mezidruhové křížence (Wang a kol. 2021).

Interpretace výsledků je vždy nutná v kontextu podmínek prostředí. Během teplého léta, kdy dochází k rychlému rozkladu je „životnost“ eDNA v prostředí nejvýše hodiny. Naopak, za chladného počasí při nízké aktivitě mikroorganismů a omezeném UV záření je eDNA detekovatelná v řádu dnů, ve zmrzlém stavu i roky a déle. Odběr vody neprovádíme v blízkosti vyústění kanalizace, ani v oblasti koncentrace vodního květu. Snažíme se vyhnout i období po vydatném dešti, kvůli naředění i zákalu splavenin. Tekoucí voda s sebou nese částice včetně eDNA z výše položených míst a zahrnuje tak značnou oblast. Ve stojaté vodě pak převládá navázání na částice, ukládání do sedimentu a rozklad. Klíčová je rovněž aktivita ryb. Teritoriální štika detekujeme na menší oblasti, než takřka nepřetržitě plavajícího bolena. Sumec je zase aktivnější při vyšších teplotách a opačný trend pozorujeme u mníka. Množství eDNA bude ve vodě nejvyšší během tření ryb (Milhau a kol. 2021).

Metody jsou stále ve vývoji. Existuje již několik obecně použitelných protokolů, ovšem je vysoká pravděpodobnost, že se část vlivem technické inovace v budoucnu změní.

## 5. Studované lokality

Ověřování technologie bylo prováděno v letech 2018 (experimentálně) a 2019-2020 (optimalizace technologie) na čtyřech vodárenských údolních nádržích, sedmi rybnících a jednom přírodním jezeře v České republice (tabulka 1). U všech nádrží, čtyřech rybníků a přírodního jezera byly odebírány vzorky i z přítékající vody.

**Tabulka 1:** Vybrané vodní útvary a jejich základní charakteristiky, kde probíhalo ověřování technologie environmentální DNA metabarkódingu.

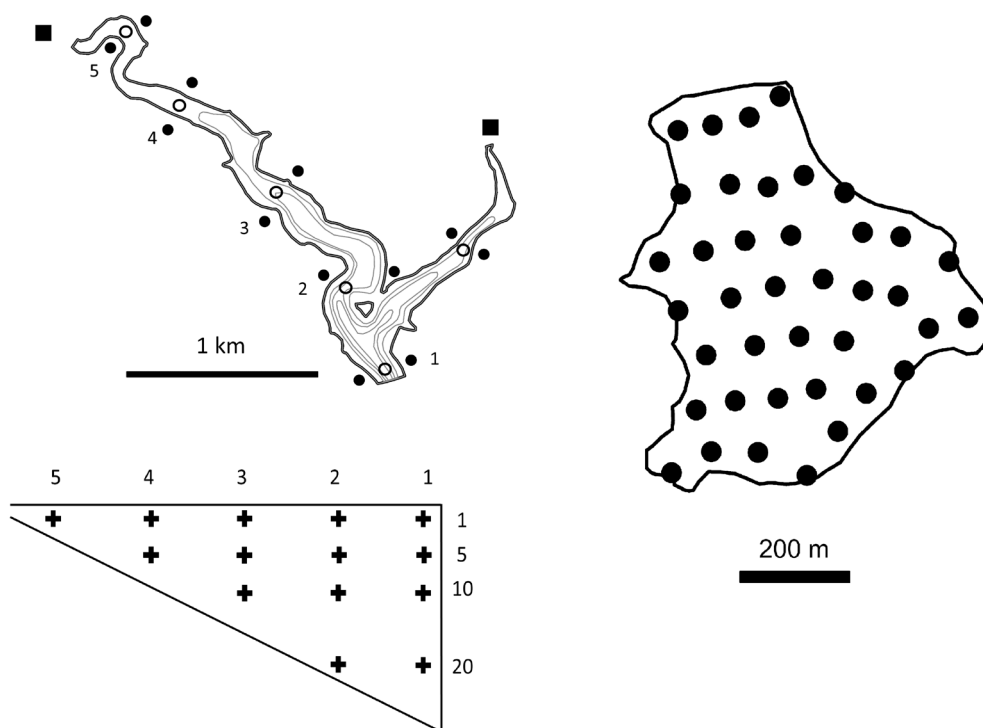
Vodní plocha	Název	Okres	Rozloha (ha)	Maximální hloubka (m)	Úroveň trofie
Přehrada	Klíčava	Rakovník	62	31	oligotrofní
Přehrada	Římov	České Budějovice	206	41	mezo-eutrofní
Přehrada	Žlutice	Karlovy Vary	167	22	eutrofní
Přehrada	Láz	Příbram	17	13	oligotrofní
Jezero	Laka	Klatovy	2,5	3,8	oligotrofní
Rybník	Horní Pravíkov	Pelhřimov	2,6	2,0	eutrofní
Rybník	Kalich	Pelhřimov	9,5	4,1	eutrofní
Rybník	Dolní Kladiny	Pelhřimov	29	3,3	eutrofní
Rybník	Tuksa	Pelhřimov	10	3,9	eutrofní
Rybník	Starý Lusk	Písek	1,0	2,5	eutrofní
Rybník	Sírotčí Dolní	Písek	0,7	1,6	eutrofní
Rybník	Sírotčí Horní	Písek	0,4	1,4	eutrofní

## 6. Postup práce

Všechny přepravní lahve i laboratorní materiál (především zkumavky) jsou vždy před použitím popsány unikátními názvy voděodolným popisovačem. Pokud není uvedeno jinak, práce v laboratoři probíhaly za laboratorních teplot.

### 6.1. Odběr vody a filtrace

Existuje více možností designu odběru vzorků, v této technologii byly testovány odběry stratifikované, sledující známé gradienty nádrží (odběrová místa rozmístěna v pravidelných vzdálenostech, v různých hloubkách a prostředí volné vody a příbřeží) a pravidelné na rybnících a přirozeném jezeře (obrázek 1). Odběr vody byl proveden sterilními pomůckami, případně za využití pomůcek k jednorázovému použití (především rukavice). Sterilizace materiálu spočívala v oplachu 10% sterilizačním činidlem obsahujícím 5% chlornan sodný (př. Savo, Bochemie a.s., CZ) na minimálně 10 min, následném opláchnutí v 10% detergentu (př. Lipsol, P-LAB a.s., CZ) po dobu opět 10 min a důkladném opláchnutí purifikovanou vodou (stříčkou). Tento postup byl využit při odběru vzorků v terénu i v laboratoři pro sterilizaci opakovaně používaného materiálu.



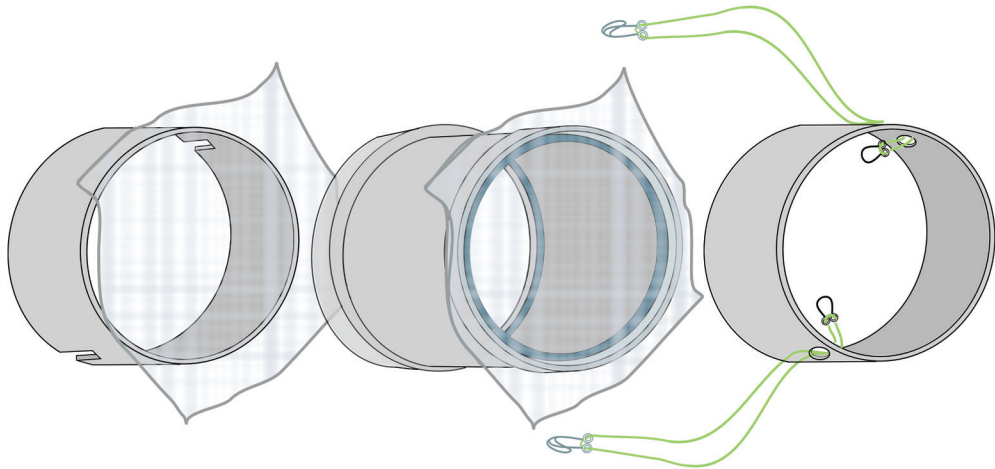
**Obrázek 1:** Příklad stratifikovaného odběru vzorku na nádrži Klíčava (levá část obrázku) a pravidelného na rybníku Kladiny Dolní (pravá část obrázku).

V případě odběru vody z hladinové vrstvy a v tekoucí vodě, byly vzorky odebrány přímo do přepravních lahví (obrázek 2). V rámci jednoho místa byl vždy vytvořen integrovaný vzorek smísením pěti podvzorků (např. 5x 400 ml do 2 l) z blízkého okolí (100 m u nádrží, 5–20 m u rybníků). K odběru vody z hlubších vrstev bylo použito Friedingerovo odběrové zařízení, které bylo mezi jednotlivými odběry chemicky sterilizováno.



**Obrázek 2:** Odběr vody pro analýzu eDNA do sterilní odběrové nádoby.

Přepravní lahve a odběrové zařízení byly na každé lokalitě opláchnuty vzorkovanou vodou. V případě výskytu silného vodního květu bylo využito předfiltrační zařízení na odstranění sestonu, konkrétně sterilní planktonní síť s oky 100  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$  těsně uzavřena mezi dvě plastové trubice (obrázek 3). Pro kontrolu čistoty práce byly do terénu přivezeny vzorky purifikované vody (tzv. negativní kontroly), s nimiž bylo pracováno jako se standardními vzorky. Tato voda byla nalita do odběrového zařízení a zpět. Mezi odběrem a laboratorním zpracováním byly vzorky uloženy ve sterilním boxu ve tmě s teplotou zhruba 4  $^{\circ}\text{C}$  zajištěnou obložením vzorků bloky ledovačů, obrázek 4).



**Obrázek 3:** Schéma předfiltračního zařízení k odstranění sestonu.



**Obrázek 4:** Převážná nádoba naplněná vzorky obloženými bloky ledovačů.

Ve sterilní laboratoři (veškeré povrchy byly ořeny sterilizačním čínidlem a před začátkem prací zapnuto UV záření po dobu minimálně 20 minut) byla voda filtrována přes sterilní celulózo-acetátový / -nitrátový filtr o průměru 47 mm a porozitě 0,45  $\mu\text{m}$  (Whatman, UK) za využití filtrační jednotky Nalgene a vakuové pumpy (obrázek 5). Objem přefiltrované vody přes jeden filtr činil 0,25-0,5 l v závislosti na počtu částic ve vodě. Mezi filtrací jednotlivých vzorků byly filtrační jednotky sterilizovány. Po protečení veškeré vody přes filtr byl tento ponechán po dobu jedné minuty na filtrační jednotce k zaschnutí filtrátu a následně byl pomocí sterilních pinzet sejmout. Filtry byly uchovány ve zkumavkách (Axygen SCT-5ML-S, UK, s konickým dnem o objemu 7 ml) s předem naváženým 0,5 g sterilního drceného minerálu granátu zrnitosti 0,15 mm a 1,0-1,4 mm. Do každé zkumavky s granátem byly uloženy dva filtry, které byly k sobě přiloženy stranou bez filtrátu (filtrát byl z vnější a vnitřní strany). Druhým způsobem uložení bylo jednotlivé filtry složit „do vějíře“ ve zkumavkách o objemu 2 ml s 96% etanolem. Na začátku, zhruba uprostřed filtrací a na konci byly filtrovány vzorky negativní kontroly. Filtrace byla vždy provedena do 24 hodin od odběru v terénu, nejlépe do 12 hodin, přičemž po celou dobu byly vzorky uloženy v chladu a tmě. Zkumavky s filtry a granátem i etanolem byly do doby extrakce uchovány v teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Obrázek 5:** Filtrace vzorků za využití filtrační jednotky a vakuové pumpy.

## 6.2. Extrakce DNA

K extrakci DNA z filtrů byl využit upravený modulární univerzální postup podle Sellerse a kol. (2018). Při tomto postupu jsou všechny roztoky připravovány v laboratoři, čímž je kontrolováno jejich složení, čistota a celkově je dosaženo nižších finančních nákladů než při použití komerčně dodávaných kitů. Všechny chemikálie musí být označeny čistotou pro PCR bez stop DNA, RNáz, DNáz, a jedná se o octan amonný, ultračistou vodu ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ), síran hlinito-amonný, di-hydrát chloridu vápenatého, trisaminomethan kyseliny chlorovodíkové (Tris HCl), hydroxid sodný (NaOH), di-hydrát EDTA di-sodné soli, guanidin hydrochlorid, guanidin thiokyanát, dodeka-hydrát fosforečnanu sodného, chlorid sodný, 5 M kyselina chlorovodíková, dodecyl-síran sodný (SDS) a 100% etanol.

### 6.2.1 Příprava zásobních roztoků

*1 M Tris HCl (pH 8):*

Do zkumavky o objemu 100 ml bylo naváženo 15,7 g Tris HCl a odměřeno 75 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Následně přidáno 5 ml 5 M NaOH k úpravě pH na 8. Na závěr byla zkumavka doplněna na konečný objem 100 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  a umístěna do třepačky do rozpuštění pevných částí.

*0,5 M EDTA (pH 8):*

Do zkumavky o objemu 100 ml bylo naváženo 18,6 g di-hydrátu EDTA di-sodné soli. Následně přidáno 75 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  a 10,2 ml 5 M NaOH k úpravě pH na 8. Na závěr byla zkumavka doplněna na konečný objem 100 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  a umístěna do třepačky do rozpuštění pevných částí.

*5 M octan amonný:*

Do zkumavky o objemu 100 ml bylo naváženo 38,6 g octanu amonného, doplněno do 100 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  a umístěno do třepačky do rozpuštění pevných částí.

*180 mM dodeka-hydrát síranu amonného a hlinitého:*

Do zkumavky o objemu 100 ml bylo naváženo 8,2 g dodekahydrát síranu amonného a hlinitého, doplněno do 100 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  a umístěno do třepačky do rozpuštění pevných částí.

*3% chlorid vápenatý:*

Do zkumavky o objemu 100 ml byly naváženy 3 g di-hydrátu chloridu vápenatého, doplněny do 100 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  a umístěny do třepačky do rozpuštění pevných částí.

### 6.2.2 Příprava extrakčních činidel

*Lyzační roztok:*

Do zkumavky o objemu 100 ml bylo naváženo 1,7 g guanidin thiokyanátu, 8,7 g dodeka-hydrát fosforečnanu sodného a 0,2 g chloridu sodného. Následně bylo odměřeno 70 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$ , 6,7 ml 1 M Tris HCl (pH 8) a 5,3 ml 0,5 M EDTA (pH 8). Zkumavka s činidly byla umístěna do třepačky do rozpuštění pevných částí. Dále bylo přidáno 2,5 ml 5 M HCl k úpravě pH na 9, doplněno  $\text{ddH}_2\text{O}$  do konečného objemu 100 ml a vše promíseno.

*Přísada k lyzi vzorků vody:*

Do zkumavky o objemu 100 ml bylo naváženo 1,25 g SDS, doplněno do 100 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  a umístěno do třepačky do rozpuštění pevných částí.

#### *Flokulační roztok:*

Do zkumavky o objemu 50 ml bylo odměřeno 50 ml 5 M octanu sodného, přidáno 25 ml 180 mM dodeka-hydrátu síranu amonného a hlinitého, oba roztoky byly promíchány a přidáno 25 ml 3% chloridu vápenatého a vše opět promíseno.

#### *Vazebný roztok:*

Do zkumavky o objemu 100 ml bylo naváženo 52,6 g guanidin hydrochloridu, doplněno do 100 ml ddH<sub>2</sub>O a umístěno do třepačky do rozpuštění pevných částí.

#### *Promývací roztok:*

Do zkumavky o objemu 100 ml bylo odměřeno 80 ml 100% etanolu, doplněno do 100 ml ddH<sub>2</sub>O a promíseno obrácením zkumavky.

#### *Vymývací roztok:*

Do zkumavky o objemu 100 ml byl odměřen 1 ml 1 M Tris HCl (pH 8), doplněn 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8), doplněno ddH<sub>2</sub>O do objemu 100 ml a vše promíseno.

Před začátkem izolace DNA byly všechny roztoky sterilizovány UV světlem (min. 20 min). Bylo připraveno stejné množství nových zkumavek o objemu 1,5 ml jako bylo vzorků a do nich odměřeno 200 µl flokulačního roztoku, který byl před použitím umístěn do chladničky nastavené na 4 °C. Obdobně byl připraven vazebný roztok do zkumavek (2 ml) o objemu 1200 µl, ovšem tyto zkumavky a vymývací roztok byly zahřáty v inkubátoru na 55 °C. Na závěr byly připraveny prázdné zkumavky (1,5 ml), kterým bylo odstriženo víčko.

### **6.2.3 Postup extrakce**

Pokud byly filtry uloženy ve zkumavce s granátem při teplotě pod bodem mrazu, byly ponechány k roztátí při laboratorní teplotě. V případě uložení filtrů v etanolu byly filtry z etanolu vyjmuty a rozprostřeny na pootevřených sterilních Petriho miskách ve sterilní digestoři do vysušení. Suché filtry byly následně umístěny do zkumavek s granátem. Kromě vzorků s filtry byly k extrakci využity i vzorky kontroly čistoty filtrace a kontrola čistoty extrakce, kde byla použita zkumavka bez filtru stejným způsobem.

Do každé zkumavky s filtry a granátem bylo přidáno 900 µl lyzačního roztoku, 300 µl přísady k lyzi vzorků vody a zkumavka umístěna na 5 minut do vortexu (30 Hz). Následně byla provedena centrifugace při nastavení rychlosti na 4000x g po dobu 2 minut. Celkový objem roztoku (~600 µl) z každé zkumavky byl odpipetován do zkumavek s připraveným flokulačním činidlem, roztok byl promísěn a umístěn do chladničky na 10 minut. Po této době byly zkumavky centrifugovány při nastavení rychlosti na 11000x g po dobu 1 minuty. 750 µl supernatantu bylo přeneseno do připravených zkumavek s vazebným roztokem. Roztoky byly promísěny a centrifugovány při 11000x g po dobu 5 sekund. V dalším kroku bylo přeneseno 670 µl roztoku do zkumavky s kolonkou, centrifugováno při 11000x g po dobu 10 sekund a prošlá tekutina vylita. Přenesení na kolonku, centrifugace a vylití tekutiny bylo ještě 2x zopakováno, kdy v původní zkumavce již nezbyl žádný roztok. Do zkumavky s kolonkou bylo následně napipetováno 500 µl promývacího roztoku, opět centrifugováno při 11000x g po dobu 10 sekund a vylita prošlá tekutina. Stejně zkumavky byly centrifugovány při 11000x g po dobu dvou minut a následně celý spodní díl s tekutinou odstraněn. Kolonka byla následně opatrně přenesena do zkumavky (1,5 ml)

s odstriženým víčkem, bylo přidáno 100 µl vymývacího roztoku na membránu kolonky, kde byl ponechán po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. Následně byla sestava kolonky ve zkumavce centrifugována při 11000x g po dobu 1 minuty. Prošlá tekutina byla následně vrácena na membránu kolonky, opět inkubována a centrifugována. Obsah zkumavky (přečištěná DNA) byl přemístěn do nové zkumavky s popiskem (1,5 ml). Zkumavky s DNA byly do dalšího zpracování uloženy v mrazáku při -66 °C.

Pro ověření koncentrace a čistoty extrahované DNA bylo provedeno měření na spektrofotometrickém přístroji NanoDrop 1000. Optimální koncentrace DNA byly v oblasti 1-150 ng/µl a poměry vlnových délek 260/280 hodnoty 1,8 a 260/230 hodnoty 2.

### 6.3. Příprava genetických knihoven

Genetické knihovny byly připraveny pomocí dvoufázové PCR. Při první PCR byl namnožen úsek DNA ohraničený primery specifickými pro celou vývojovou linii obratlovců a zároveň sekvence mezi těmito primery je variabilní mezi druhy (především u kostnatých ryb). Sekvence použitých primerů jsou 12S-V5-F (5'-ACTGGGATTAGATACCCC-3') a 12S-V5-R (5'-TAGAA-CAGGCTCCTCTAG-3'), které se váží na mitochondriální 12S ribozomální RNA (Riaz et al., 2011). Během první PCR jsou navíc k primerům přidány umělé sekvence, které se mezi jednotlivými vzorky liší (bylo použito 24 unikátních kombinací). Následně byly vzorky smíseny do genetických knihoven, v rámci nichž lze vzorky spolehlivě rozlišit. Genetické knihovny byly dále použity v druhé PCR, kde jsou k primerům opět připojeny umělé sekvence k jejich rozlišení. Tímto způsobem byly vytvořeny konečné genetické knihovny obsahující až několik set vzorků, které lze osekvenovat zároveň. Všechny přípravné práce probíhaly ve sterilní digestoři.

#### 6.3.1 PCR1

Pro každý vzorek byly při první PCR provedeny tři opakování (triplikát). K přípravě první PCR bylo pro každý vzorek zapotřebí: 12,5 µl enzymu Q5 (High-Fidelity 2X Master Mix, New England Biolabs Inc., MA, USA), 7 µl ultračisté molekulární vody, 3 µl (1,5 µl od každého, 10 µM) primerů se značkou, 0,5 µl hovězího sérového albuminu (BSA Bovine Serum Albumin Thermo Scientific, Fisher Scientific, UK) a 2 µl DNA. Celkový objem každé reakce tak činí 25 µl. Po přípravě byla do každé mikrozukumavky přidána kapka minerálního oleje k omezení výparu tekutin. Mikrozukumavky byly vloženy do termocykleru podle uvedeného nastavení:

PCR podmínky			
Počáteční denaturace	35 cyklů hybridizace	Konečná syntetická fáze	Ukončení
98 °C	98 °C 58 °C 72 °C	72 °C	4 °C
5 min	10 s 20 s 30 s	7 min	∞

Pro kontrolu čistoty práce byly mezi vzorky zařazeny i negativní kontroly terénních vzorků, které byly zároveň kontroly čistoty filtrace, kontroly čistoty extrakce, dále negativní kontroly PCR (místo 2 µl DNA byla použita voda) a dále pozitivní kontrola PCR (2 µl tkáňové DNA tlamovce příčnopruhého *Maylandia zebra* o koncentraci 0,05 ng/µl) (obrázek 6).



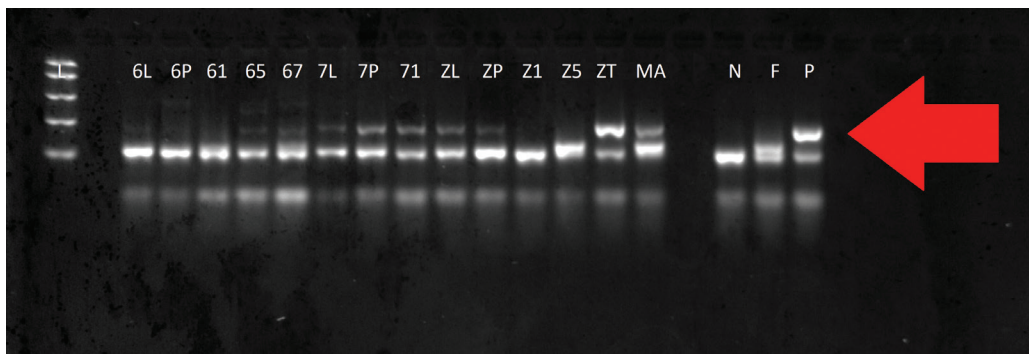
**Obrázek 6:** Příprava chemikálií při první PCR ve sterilním boxu.

Po ukončení reakce byly všechny tři vzorky téže PCR reakce (včetně všech kontrol) smíseny a jejich produkt zobrazen gelovou elektroforézou (2% koncentrace agarózy s přidavkem GelRed od Cambridge Bioscience, UK) (Obrázek 7).



**Obrázek 7:** Příprava vzorků k vizualizaci produktů první PCR při elektroforéze.

Všechny individuálně označené vzorky během první PCR byly smíseny do genetické knihovny na přibližný objem 100  $\mu$ l normalizací. Objemy jednotlivých vzorků ke smísení byly určeny intenzitou proužků zobrazených při gelové elektroforéze (velmi jasný = 5  $\mu$ l, jasný = 10  $\mu$ l, slabý = 15  $\mu$ l a velmi slabý nebo žádný viditelný proužek = 20  $\mu$ l) (obrázek 8). Kontrolní vzorky (filtrace, extrakce, PCR negativní kontrola) byly přidány v objemech 10  $\mu$ l a vzorek PCR pozitivní kontroly o objemu 1  $\mu$ l.



**Obrázek 8:** Fotografie gelu zobrazující produkty první PCR. V prvním sloupci levé části je zobrazen molekulární žebřík, následují jednotlivé vzorky (6L-MA) a kontroly (N – negativní PCR kontrola, F – filtrační kontrola a P – pozitivní PCR kontrola). Červená šipka označuje cílový fragment, ostatní proužky jsou kontaminace a nevyužitá primery.

Po vytvoření genetických knihoven následuje jejich čištění selektivními magnetickými kuličkami (př. Mag-Bind TotalPure NGS, Omega Bio-tek, USA). Na zobrazení PCR produktů gelovou elektroforézou byly vidět druhotné proužky nespecifických PCR produktů o délce ~100 párů bází (bp, dimery primerů) a ~ 300 bp. K čištění byly využity poměry magnetických kuliček 0,9x a 0,15x k celkovému objemu 100 µl PCR produktu. Poměr 0,9x váže jakýkoli produkt od 300 bp výše, zatímco druhý poměr (0,15x) váže větší sekundární produkty o délce ~ 1000 bp. Proto bylo k 100 µl PCR produktu přidáno nejprve 90 µl a následně 15 µl magnetických kuliček.

Zkumavky o objemu 1,5 ml byly umístěny do stojánku v počtu odpovídajícím počtu genetických knihoven. Magnetické kuličky o laboratorní teplotě (dlouhodobě se ukládají do mrazáku) byly zhomogenizovány vortexem a následně bylo odměřeno do každé zkumavky 90 µl magnetických kuliček. K magnetickým kuličkám bylo přidáno 100 µl genetické knihovny. Vzorek s magnetickými kuličkami byl promíchán 5-10x nasátím do špičky pipety, opětovným vypuštěním a následně na vortex po dobu 30 sekund. Velmi krátce po dobu asi 2 sekund byla provedena centrifugace každého vzorku, aby došlo k sjednocení materiálu i ze stěn zkumavky. Směs genetické knihovny s magnetickými kuličkami byla na stojánku pro pomalé mísení ponechána po dobu 5 minut. Zkumavky se směsí byly následně umístěny do magnetického stojánku, dokud se všechny magnetické kuličky nenavázaly na stěnu zkumavky, čímž došlo k vyčištění roztoku. Podle síly magnetu trvá čištění kuliček zhruba 1 minutu. Čirá tekutina (supernatant) byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a původní, s navázanými magnetickými zkumavkami na stěně, odstraněny. Do nové zkumavky bylo přidáno 15 µl magnetických kuliček, roztok opět dobře promíchán a odstředěn po dobu 2 sekund. Následovala inkubace po dobu 5 minut na stojánku pro pomalé míchání. Zkumavky byly umístěny na magnetický stojánek do vyčištění roztoku (~1 min). Supernatant byl odsát a odstraněn, přičemž ve zkumavce zbyly pouze magnetické kuličky navázané na stěnu zkumavky. Do zkumavky bylo opatrně přidáno 200 µl 80% etanolu tak, aby nedošlo k narušení magnetických kuliček. Etanol byl ve zkumavce ponechán 30 sekund a následně odstraněn. Přechištění etanolem bylo stejně provedeno 2x. Zbytky etanolu byly odsáty tenkou pipetou (špičky 10/20 µl). Zkumavky s otevřenými víčky byly ponechány na magnetickém stojánku po dobu 10-15 minut (v závislosti na teplotě) k odpaření etanolu a vysušení magnetických kuliček. Pokud ve zkumavce stále zbýval etanol, jeho zbytky byly odstraněny. Všechny zkumavky byly vyjmuty z magnetického stojánku do běžného, kde bylo do každé přidáno 25 µl vymývacího roztoku. Roztok byl promíchán pipetou 20x nasátím a vypuštěním a následně na vortexu po dobu 30 sekund. Následovala inkubace po dobu 5 minut na stojánku pro pomalé míchání. Zkumavky byly umístěny zpět na magnetický stojánek do doby vyčištění roztoku (~2-3 min). Supernatant (vyčištěný produkt první PCR sloučený do genetických knihoven, ~23,5 µl) byl přenesen do nové 1,5 ml zkumavky. Pro ověření efektivity čištění byly produkty všech genetických knihoven porovnány ve stavu před čištěním a po čištění magnetickými kuličkami vizualizací gelové elektroforézy.

Pro krátkodobé uskladnění v rámci dnů byly vyčištěné produkty uskladněny v chladničce při teplotě 2-8 °C a pro dlouhodobé uskladnění zamraženy při teplotě -20 °C.

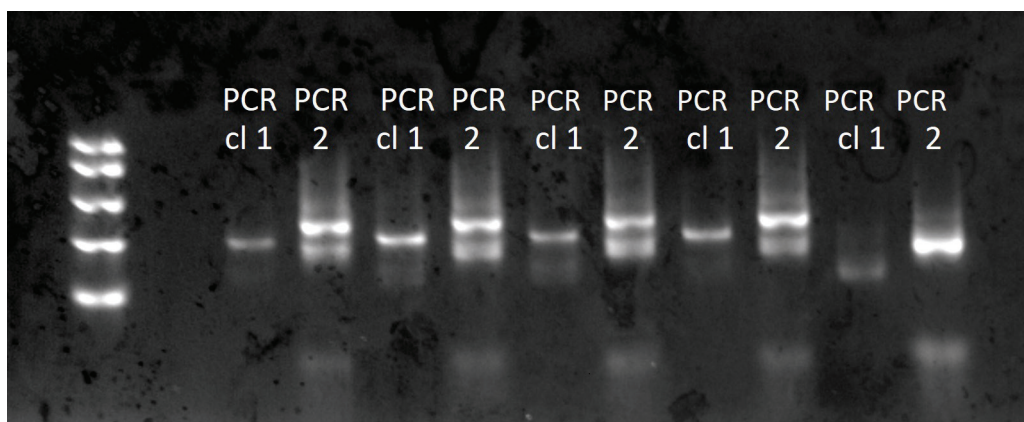
### 6.3.2 PCR2

V druhé fázi byla pro každou přečištěnou genetickou knihovnu z předchozího kroku provedena druhá PCR reakce, kde byla původní část vzorem pro namnožení. Reakce byly provedeny s jedním opakováním (duplikát). V této části bylo účelem především připojení umělých sekvencí pro rozlišení jednotlivých knihoven během sekvenování na platformě Illumina MiSeq.

K přípravě druhé PCR bylo pro každou genetickou knihovnu zapotřebí: 25  $\mu$ l enzymu Q5 2X, 15  $\mu$ l ultračisté molekulární vody, 6  $\mu$ l (3  $\mu$ l od každého) značených primerů a 4  $\mu$ l přečištěného produktu první PCR. Celkový objem každé reakce tak činí 50  $\mu$ l. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru podle uvedeného nastavení:

PCR podmínky			
Počáteční denaturace	35 cyklů hybridizace	Konečná syntetická fáze	Ukončení
95 °C	98 °C    72 °C	72 °C	4 °C
3 min	20 s    1 min	5 min	$\infty$

Oba vzorky téže PCR reakce byly smíseny a jejich produkt (PCR2) spolu s původním přečištěným produktem první PCR zobrazen gelovou elektroforézou. Produkt druhé PCR byl delší o připojené části (a proto umístěn výše) a proužek sytější než původní produkt první PCR (obrázek 9).



**Obrázek 9:** Fotografie gelu zobrazující přečištěné produkty první PCR (PCR cl 1) spolu s produkty druhé PCR (PCR 2) a molekulárním žebříkem v levé části obrázku.

Na zobrazení druhého produktu PCR byly vidět druhotné proužky o délce ~200bp, které byly odstraněny selektivními magnetickými kuličkami. K čištění byly využity poměry 0,7x a 0,15x magnetických kuliček k celkovému objemu 50  $\mu$ l produktu druhé PCR. Poměr 0,7x váže nespecifické produkty od délky 200 bp výše, zatímco druhý poměr (0,15x) váže větší sekundární produkty o délce ~ 1000 bp. Proto bylo k 50  $\mu$ l produktu druhé PCR přidáno nejprve 35  $\mu$ l a následně 7,5  $\mu$ l magnetických kuliček. Postup byl shodný s čištěním produktů první PCR, viz výše. Opět byly porovnány produkty všech genetických knihoven po druhé PCR vizualizací gelovou elektroforézou ve stavu před čištěním a po čištění magnetickými kuličkami.

### 6.3.3 Závěrečná příprava genetických knihoven

V dalším kroku byly všechny přečištěné genetické knihovny po druhé PCR smíseny. Koncentrace DNA každé z nich byla změřena na přístroji Qubit dsDNA High-Sensitivity:

[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit\\_dsDNA\\_HS\\_Assay\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_HS_Assay_UG.pdf)

Podle hodnot koncentrace DNA a množství vzorků obsažené v každé z knihoven byly vypočteny objemy pro smíšení konečné genetické knihovny tak, aby celkový objem dosahoval >100  $\mu$ l.

Konečná genetická knihovna byla čištěna selektivními magnetickými kuličkami podle postupu použitým na čištění produktu druhé PCR, tedy poměry 0,7x a 0,15x k čištění 50  $\mu$ l konečné genetické knihovny. Produkty konečné přečištěné genetické knihovny před čištěním magnetickými kuličkami a po čištění byly zobrazeny gelovou elektroforézou. Následovalo ředění přečištěné konečné genetické knihovny na koncentraci 4 nM vymývacím roztokem za předpokladu délky 330 bp.

Koncentrace byla ověřena na přístroji Qubit dsDNA High-Sensitivity a v případě potřeby provedeno druhé ředění. Pro přesnější ověření byl proveden výpočet koncentrace pomocí kvantitativní PCR (NEBNext Library Quant Kit for Illumina, New England Biolabs Inc., MA, USA):

<https://www.neb.com/protocols/2015/05/14/nebnext-library-quant-kit-protocol-e7630>

<https://nebiocalculator.neb.com/#!/qPCRGen>

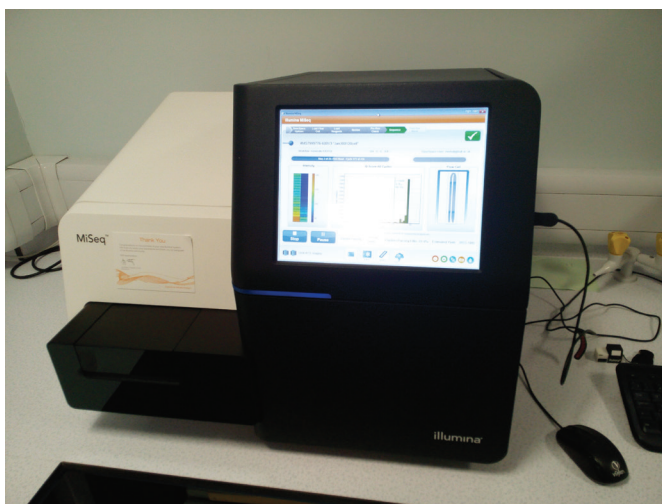
Dále byla provedena digitální elektroforéza na přístroji Agilent 2200 TapeStation and High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, CA, USA) k odhalení velikostní distribuce produktů:

[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/ScreenTape\\_HSD1000\\_QG.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/ScreenTape_HSD1000_QG.pdf)

Na závěr byla provedena denaturace vzorku (0,2 N NaOH), ředění na 13 pM s 10% PhiX Control v3 a spuštěna sekvenace na přístroji MiSeq s 600 cykly (Illumina, Inc., CA, USA):

[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system\\_documentation/miseq/miseq-system-guide-for-miseq-reporter-100000061014-00.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-system-guide-for-miseq-reporter-100000061014-00.pdf)

(obrázek 10)



**Obrázek 10:** Illumina MiSeq se spuštěnou sekvenací vzorku.

#### 6.4. Bioinformatické zpracování

K bioinformatickému zpracování byl využit Linux Ubuntu Mate server s Intel Xeon CPU E5-2620 v2 2.10 GHz x 12 and 24 GB RAM. Kvalita získaných sekvencí byla ověřena pomocí programu FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Sekvence byly následně rozděleny do jednotlivých knihoven (demultiplex) a zpracovány kódy sdruženými v aplikaci metaBEAT v0.97.11 (bioinformatic pipeline, <https://github.com/HullUnibioinformatics/metaBEAT>). Odstraněny byly méně kvalitní sekvence (phred <30), adaptéry (trimming, program Trimmomatic 0.32) a sekvence kratší než 90 bp. Páry kompatibilních sekvencí (čtení od 3' a 5' konců) byly sloučeny programem FLASH 1.2.11 (dereplikace). Ze zbylých sekvencí byly dále vyřazeny chimérické sekvence porovnáním s referenční databází sekvencí pomocí funkce `uchime_ref` v programu VSEARCH 1.1 (<https://github.com/torognes/vsearch>). Použitá referenční databáze sekvencí byla vytvořena na Univerzitě v Hullu ([https://github.com/HullUni-bioinformatics/Curated\\_reference\\_databases](https://github.com/HullUni-bioinformatics/Curated_reference_databases)) s doplněním sekvencí bolena dravého *Leuciscus aspius* (GenBank čísla: MT163435, MT163450, MT163449) a síha marény *Coregonus maraena* (GenBank čísla: MT163451, MT163458, MT163460). Sekvence byly sloučeny podle podobnosti do skupin pomocí programu VSEARCH 1.1 (anotace). Pokud byly ve skupině méně než tři sekvence, byly považovány s vysokou pravděpodobností za chybné a vyloučeny. Ostatní sekvence byly porovnány s referenční databází sekvencí programem BLAST (100% shoda). Výstupy byly v případě identických sekvencí pro různé druhy postoupeny o taxonomickou úroveň níže principem nejbližšího společného předka. Výstupem byla tabulka s jednotlivými vzorky (řádky) a druhy (sloupce) vyplněna počtem zjištěných sekvencí jednotlivých druhů.

#### 6.5. Statistické zpracování

V případě detekce sekvencí četnosti méně než 0,1 % ve vzorku, byly tyto sekvence považovány za nevěrohodné a vyřazeny. Následně bylo ověřeno označení zjištěných druhů pro případ, že by byl detekován druh, který se v dané lokalitě s vysokou pravděpodobností nevyskytuje (falešně pozitivní záznam). V některých případech bylo málo věrohodné druhové přiřazení upraveno na úroveň druhového komplexu karase stříbřitého (*Carrasius auratus* + *C. gibelio*), rodu (síl *Coregonus*, tolstolobik *Hypophthalmichthys*) a čeledě (jeseterovití *Acipenseridae*). V případě čtyř druhů, které patří do různých rodů, avšak použité sekvence byly vždy pro dva druhy identické, byly tyto druhy spojeny do druhových párů cejnek malý (*Blicca bjoerkna*) + podoustev říční (*Vimba vimba*), bolen dravý (*Leuciscus aspius*) + perlín ostrobříchý (*Scardinius erythrophthalmus*), jelec proudník (*Leuciscus leuciscus*) + jelec jesen (*Leuciscus idus*) a candát obecný (*Sander lucioperca*) + okoun říční (*Perca fluviatilis*). Téměř u všech vzorků došlo k přiřazení sekvencí na úroveň čeledi (kaprovití Cyprinidae, okounovití Percidae, lososovití Salmonidae), které byly z nadcházejících analýz vyloučeny, jelikož sdružovaly potenciálně degradovanou DNA více druhů s odlišným využíváním prostředí. V případě ostatních skupin organismů bylo postupováno shodným způsobem.

## 7. Okruhy ověření

- 7.1. Zjistit počty získaných sekvencí a jejich zastoupení přiřazené k jednotlivým taxonomickým úrovním.
- 7.2. Stanovit míru kontaminace vzorků negativních a pozitivních kontrol.
- 7.3. Určit složení společenstva ryb a mihulí zkoumaných lokalit na základě sekvencí eDNA metabarkódingu.
- 7.4. Popsat společenstva skupin obratlovců mimo rybovitých obratlovců.
- 7.5. Doplnit příklady využití získaných údajů o rybím společenstvu k ekologickým studiím.

## 8. Výsledky a diskuse

### 8.1. Počty sekvencí

Jednotlivými genetickými knihovnami bylo v průměru vygenerováno 23,3 miliónů sekvencí (17,2–28,2 mil., nejméně-nejvíce). Z tohoto množství bylo v průměru 86,9 (80,6–93,1) % sekvencí přiřazeno k jednotlivým vzorkům. Výtěžek sekvencí odpovídá správnému nastavení sekvenátoru a použití unikátně značených genetických knihoven bez zásadních chyb během čtení sekvencí.

### 8.2. Kontaminace vzorků

Ve všech genetických knihovnách bylo použito 135 negativních kontrol, z nichž byla v 10 případech zjištěna kontaminace detekcí rybí DNA. Jednalo se vždy o nejčastější druhy v dané sadě vzorků. Počty těchto sekvencí zpravidla nepřesahovaly 100 a bylo by je možné striktnějším bioinformatickým filtrem odstranit. Zjištěné kontaminace mohly být způsobeny chybou při laboratorním zpracování vzorků (přenos aerosolu) nebo nesprávným přečtením označení vzorku. Negativní vzorky jsou velmi náchylné ke kontaminaci, neboť v nich není v optimálním případě obsažena žádná DNA (Sepulveda a kol. 2020).

Z dalších obratlovců byly ve čtyřech případech detekovány hospodářská zvířata, konkrétně kur domácí (*Gallus gallus*), tur domácí (*Bos taurus*) a prase domácí (*Sus scrofa*), což může být laboratorní kontaminace (potravinou) i z chemikálií (např. albumin hovězího séra, BSA). Nejčastější kontaminace byla lidskou DNA, v průměru 70,9 (55,6–88,0) %. I přes mnohá preventivní opatření se do vzorků dostává při zpracování lidská eDNA a při interpretaci výsledků je nutné na tyto interní kontroly brát zřetel.

Pozitivních PCR kontrol bylo použito 52. Vždy byla detekována cichlida tlamovec příčnopruhý, což dokládá správnou funkčnost PCR. Kontaminace rybí eDNA byla zjištěna v jednom vzorku, přičemž zpětně bylo dohledáno, že šlo o kontaminaci z nedostatečně sterilizovaného minerálního oleje (uzávěrem neproniklo UV záření). Z ostatních obratlovců byla zjištěna kontaminace jen lidskou eDNA v průměru u 17,3 (0–33,3) % případů. V každé genetické knihovně s výskytem kontaminace je třeba zvažovat pravděpodobnost chybné detekce druhu, který byl zjištěn v kontrole.

### 8.3. Společenstva ryb a mihulí

V přehradních nádržích byl zjištěn jeden druh mihule, 27 druhů ryb, komplex karase stříbřité-

ho, čtyři páry druhů, dva rody a jedna čeleď (tabulka 2). Nejvíce taxonů (34) bylo zjištěno v nádrži Římov a nejméně (5) v nádrži Láz. Nejčastějšími druhy byly: plotice obecná (*Rutilus rutilus*), lín obecný (*Tinca tinca*) a štika obecná (*Esox lucius*), z párů druhů pak bolen + perlín a candát + okoun. Naopak jen při jednom vzorkování byly zjištěny druhy: hořavka hořká (*Rhodeus amarus*), karas obecný (*Carassius carassius*) a sumeček černý (*Ameiurus melas*). Složení rybího společenstva odpovídá druhové skladbě zjištěné tradičními metodami (např. Blabolil a kol. 2021a). Některé druhy (např. hořavka hořká v Klíčavě) byly zjištěny pro danou oblast vůbec poprvé, což odpovídá vysoké citlivosti metody (Lawson Handley a kol. 2019, Pond a kol. 2018). Ve stojaté vodě byly častěji zjištěny druhy: amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*), kapr obecný (*Cyprinus carpio*), lín obecný, sumec velký (*Silurus glanis*), úhoř říční (*Anguilla anguilla*), z párů cejnek + podoustev a zástupci rodů síh a tolstolobik. Ve vodě tekoucí byly nejčastěji zjištěny druhy: mihule potoční (*Lampetra planeri*), hrouzek obecný (*Gobio gobio*), mník jednovousý (*Lota lota*) a stěvlička východní (*Pseudorasbora parva*). Detekce ryb v jednotlivých prostředích převážně odpovídá jejich ekologickým nárokům (Kottelat a Freyhof 2007). Zjištěné počty taxonů odpovídají trendu nárůstu druhové diverzity s rozlohou, objemem a velikostí povodí vodního tělesa (Mehner a kol. 2005).

Tabulka 2: Seznam taxonů rybových obratlovců detekovaných na nádržích v létě (L) a na podzim (P) let 2018 až 2020. X značí detekci a 0 absenci taxonu. Před lomítkem je uvedena detekce v hlavní části nádrže a za lomítkem v přílohu.

Úroveň určení	Název taxonu	Klíčava						Řimov						Žlutice						Láz 2020
		2018		2019		2020		2018		2019		2020		2018		2019		2020		
		L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	
	Název taxonu	27/2	28/2	28/2	28/2	28/2	28/2	36/2	33/2	36/2	33/2	36/2	36/2	26/2	27/2	27/2	27/2	27/2	27/2	3/1
Druh	Míhule	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	Míhule	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Úhoř říční	0/X	X/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	Úhoř říční	0/X	X/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Hořavka hofková	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	Hořavka hofková	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Parma obecná	0/0	X/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	Parma obecná	0/0	X/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Karas obecný	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	Karas obecný	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Kapr obecný	X/0	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/0	X/0	X/X	X/X	X/X	0/0
	Kapr obecný	X/0	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/0	X/0	X/X	X/X	X/X	0/0
Druh	Hrouzek obecný	0/X	0/X	X/X	X/X	0/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	X/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/0
	Hrouzek obecný	0/X	0/X	X/X	X/X	0/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	X/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/0
Druh	Sítevička východní	0/0	0/X	X/X	0/X	0/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/X	0/0	X/0	X/0	X/X	X/X	X/X	0/0
	Sítevička východní	0/0	0/X	X/X	0/X	0/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/X	0/0	X/0	X/0	X/X	X/X	X/X	0/0
Druh	Cejn velký	X/0	X/X	0/X	X/0	X/0	X/0	X/X	X/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/0	X/X	0/X	X/X	X/X	0/0
	Cejn velký	X/0	X/X	0/X	X/0	X/0	X/0	X/X	X/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/0	X/X	0/X	X/X	X/X	0/0
Druh	Oukleč obecná	0/0	0/0	X/X	X/0	0/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/0	XX	0/0	X/0	X/0	0/0
	Oukleč obecná	0/0	0/0	X/X	X/0	0/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/0	XX	0/0	X/0	X/0	0/0
Druh	Ostředka stěhovavá	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	0/X	X/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	Ostředka stěhovavá	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	0/X	X/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Sítevle Plotice	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	X/X	0/0	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0
	Sítevle Plotice	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	X/X	0/0	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0
Druh	Plotice obecná	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0
	Plotice obecná	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0
Druh	Jelec tloušť	0/X	X/X	0/0	X/0	X/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/0	X/X	0/X	X/X	X/X	0/0
	Jelec tloušť	0/X	X/X	0/0	X/0	X/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/0	X/X	0/X	X/X	X/X	0/0
Druh	Mřenka mramorovaná	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	X/X	0/0	X/X	X/X	X/X	0/0
	Mřenka mramorovaná	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	X/X	0/0	X/X	X/X	X/X	0/0
Druh	Lín obecný	X/X	X/0	X/0	X/X	X/0	0/0	X/X	0/0	0/0	0/0	0/X	0/X	X/0	X/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0
	Lín obecný	X/X	X/0	X/0	X/X	X/0	0/0	X/X	0/0	0/0	0/0	0/X	0/X	X/0	X/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0
Druh	Amur bílý	0/0	0/0	X/0	0/0	X/X	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0
	Amur bílý	0/0	0/0	X/0	0/0	X/X	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Štika obecná	X/X	X/X	X/0	X/X	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/X
	Štika obecná	X/X	X/X	X/0	X/X	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/X
Druh	Mník jednovousý	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/0	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0
	Mník jednovousý	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/0	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Vranka obecná	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	X/X	0/X	X/X	X/X	X/X	0/0
	Vranka obecná	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/0	X/X	0/X	X/X	X/X	X/X	0/0
Druh	Slunečnice pestrá	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0	X/X	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	Slunečnice pestrá	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0	X/X	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Ježdík obecný	X/0	X/X	X/0	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X
	Ježdík obecný	X/0	X/X	X/0	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/0	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X



V přirozeném jezeře Laka byla zjištěna eDNA pouze pstruha obecného (*Salmo trutta*) a na nejvzdálenějším profilu od jezera i vranky obecné (*Cottus gobio*). Oba zjištěné druhy i lokality jejich detekce zcela korespondují s výsledky odlovů elektrickým agregátem v době odběru vody k analýze eDNA (Blabolil a kol. 2020a, 2021c).

V rybnících bylo zjištěno 16 druhů ryb, komplex karase stříbřitého, tři páry druhů a po jednom rodu a čeledi (tabulka 3). Nejvíce taxonů (16) bylo zjištěno v rybníce Dolní Kladiny a nejméně (4) ve Starém Lusku a Sirotčím Dolním. Nejčastěji zjištěným druhem byl kapr obecný, dále plotice obecná a pár bolen + perlín. Pouze při jednom průzkumu byla zjištěna parma obecná (*Barbus barbuis*) a ve dvou rybnících slunečnice pestrá (*Lepomis gibbosus*). Detekovaná rybí společenstva jsou shodná se společenstvy ryb zjištěnými při výlovu rybníků (viz část 8.5.1, Blabolil a kol. rukopis, Di Muri a kol. 2020). Ve stojaté vodě byl nejčastěji zjištěn cejn velký (*Abramis brama*), sumec velký a rod tolstolobik. Výhradně v tekoucí vodě byl zjištěn pouze mník jednovousý. V 68,6 % byly stejné druhy zjištěny ve vzorcích standardních a směsných, v 26,5 % pak byl taxon zjištěn pouze ve vzorcích směsných a pouze v 4,9 % byl taxon zjištěn ve směsných vzorcích a nikoli standardních. V případě rybí obsádky, lze místo mnoha jednotlivých standardních vzorků analyzovat menší množství směsných vzorků a detekovat tak časté druhy ryb (Sato a kol. 2017).

Tabulka 3: Seznam taxonů ryb detekovaných v rybnících v létě (L) a na podzim (P) let 2018 až 2020. X značí detekci a 0 absenci taxonu. Před lomítkem je uvedena detekce v hlavní části nádrže a za prvním lomítkem v přílohu a za druhým lomítkem ve směsném vzorku.

Úroveň určení	Název rybníku	Horní Pravíkov				Kalič				Dolní Kladiny				Tukša				Stary Lusk				Siroťeí Dolní				Siroťeí Horní										
		2019		2020		2019		2020		2019		2020		2019		2020		2019		2020		2019		2020		2019		2020		2019		2020				
Název taxonu	Období vzorkování Taxon latinsky / počet vzorků	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P					
Druh	Parma obecná	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0			
Druh	Kapr obecný	X/X/X	X/X/X	X/0/0	X/0/0	X/0/X	X/0/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X			
Druh	Hrouzek obecný	X/X/X	X/X/X	0/0/0	0/0/0	0/X/X	0/X/X	X/X/X	X/X/X	0/X/X	0/X/X	X/X/X	X/X/X	0/X/0	0/X/0	X/X/X	X/X/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0		
Druh	Střevlička východní	X/0/X	X/X/X	0/0/0	0/0/0	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	0/X/0	0/X/0	X/X/X	X/X/X	0/X/0	0/X/0	X/X/X	X/X/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0		
Druh	Cejn velký	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/X	0/0/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0		
Druh	Oukleř obecná	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/X	0/0/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	
Druh	Plotice	X/0/X	X/0/X	0/0/0	0/0/0	0/0/X	0/0/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	
Druh	Mřenka mramorovaná	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/X/X	0/X/X	X/X/X	X/X/X	0/X/0	0/X/0	0/0/0	0/X/0	0/0/0	0/X/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	
Druh	Lin obecný	0/X/0	X/X/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Druh	Amur bílý	X/0/X	X/0/X	X/0/0	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Druh	Štika obecná	0/0/0	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	
Druh	Mník jednovoušý	0/X/0	0/X/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Druh	Lota lota	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Druh	Slunečnice pestrá	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Druh	Ježábek obecný	X/0/0	X/0/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Druh	Pstruh obecný	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Druh	Sumec velký	X/0/0	X/0/X	X/0/0	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Komplex	Karas	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
	<i>Carassius auratus / gibelio</i>																																			
	<i>Leuciscus aspius / Scardinius erythrophthalmus</i>	X/X/X	X/X/X	X/0/X	X/0/X	0/0/0	0/0/0	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X
Druhy	Bolen / Perlin																																			
	<i>Leuciscus idus / leuciscus</i>																																			
Druhy	Jelec proudník / jesen	0/0/0	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
	<i>Perca fluviatilis / Okounk / Candát</i>	X/X/X	X/X/X	0/0/0	0/0/0	0/X/X	0/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X
Druhy	Tolstolobik	0/0/0	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
	<i>Hypophthalmichthys</i>																																			
Čeleď	Jeseteroviti	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
	Acipenseridae																																			

## 8.4. Ostatní skupiny obratlovců

### 8.4.1 Obojživelníci

V nádržích Klíčava a Římov byly zjištěny tři druhy žab, což bylo i celkově nejvíce (tabulka 4). Dva druhy byly zjištěny v nádrži Žlutice a žádný v Lázu. Nejčastěji byla zjištěna ropucha obecná (*Bufo bufo*), pak skokan hnědý (*Rana temporaria*) a relativně nejvzácněji skokan krátkonohý (*Pelophylax lessonae*). Žáby byly častěji zjištěny v přítocích (42,1 %) než ve vodě stojaté (36,8 %) případně v obou prostředích (21,1 %). Malé množství zjištěných druhů odpovídá nevhodnému načasování (k monitoringu obojživelníků je ideální jaro) i málo vhodnému prostředí s homogenními břehy bez vegetace v důsledku manipulace s vodní hladinou a relativně vysokou početností ryb (Moravec 2019).

Tabulka 4: Seznam taxonů obojživelníků detekovaných na nádržích v létě (L) a na podzim (P) let 2018 až 2020. X značí detekci a 0 absenci taxonu. Před lomítkem je uvedena detekce v hlavní části nádrže a za lomítkem v přítoku.

Název nádrže	Klíčava		Římov		Žlutice		Láz 2020
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	
Rok vzorkování							
Období vzorkování	L	P	L	P	L	P	P
Taxon							
Název česky	27/2	28/2	36/2	33/2	26/2	27/2	3/1
latinsky / počet vzorků	28/2	28/2	36/2	33/2	26/2	27/2	27/2
<i>Ropucha</i>							
obecná	0/X	0/0	X/0	0/0	X/X	X/0	0/X
<i>Bufo bufo</i>							
Skokan	0/X	X/0	0/0	0/X	0/0	0/0	0/0
<i>Pelophylax</i>							
krátkonohý	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>lessonae</i>							
Skokan	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	X/X	X/X
<i>Rana</i>							
hnědý	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>temporaria</i>							

V jezeře Laka byla zjištěna eDNA čolka horského (*Ichthyosaura alpestris*, jediný zjištěný zástupce ocasatých obojživelníků) a v blízkých tocích pak skokana hnědého. Vzhledem k načasování odběru na pozdní podzim a vysokou nadmořskou výšku se jedná o cenné detekce prokazující využívání těchto vod k přezimování obojživelníků.

V rybnících byly zjištěny čtyři druhy žab (tabulka 5). Nejvíce tři druhy v rybníce Sirotčí Dolní a naopak žádný v Kalichu a Kladinách Dolních. Nejčastěji, ve třech rybnících, byli zjištěni skokan krátkonohý a skokan skřehotavý (*Pelophylax ridibundus*). Pouze jednou byla zjištěna ropucha obecná. Při třech odběrech byl stejný druh zjištěn ve standardních i ve směsných vzorcích a ve dvou byl zjištěn pouze ve standardních a nikoli směsných. Stejně jako v případě nádrží jsou detekce obojživelníků v rybnících spíše náhodné, a to z důvodu početné násady kaprů, kteří podporují rozvoj fytoplanktonu predací zooplanktonu, s obojživelníky konkurují o potravu, při bioturbaci sedimentu požírají bentické organismy včetně vývojových stádií žab i přítomností četných dravých druhů ryb, kteří mohou ulovit i dospělé (Kloskowski 2010). Rybníky s čtenějšími záznamy obojživelníků měly vždy vyvinutý litorál s emerzní vegetací, který obojživelníci využívali jako úkryt před rybami (Zavadil a kol. 2011).

Tabulka 5: Seznam taxonů obojživelníků detekovaných v rybnících v létě a na podzim let 2018 až 2020. X značí detekci a 0 absenci taxonu. Před lomítkem je uvedena detekce v hlavní části nádrže a za prvním lomítkem v přítoku a za druhým lomítkem ve směsném vzorku.

Název rybníka	Homí Právilkov		Kalič		Dolní Kladriny		Tukša		Starý Lusk		Siroťčí Dolní		Siroťčí Homí	
	2019	2020	2019	2020	2019	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	
Název česky / Počet vzorků	L	P	L	P	L	P	P	P	L	P	L	P	L	P
Rok vzorkování	39/1/15	39/1/20	39/1/15	39/1/15	39/1/15	39/1/20	39/1/20	39/1/20	4	4	3	3	3	3
Období vzorkování														
Taxon latinsky														
Kuňka														
obecná	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	X	X	X	0	0
<i>Bombina</i>														
obecná	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
<i>Bufo bufo</i>														
obecná	X/X/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	X	0	0	0
<i>Pelophylax</i>														
Skokan	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	X	X	0	0	X
krátkonožý														
<i>Lessoniae</i>														
Skokan	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
skřehotavý														
<i>ridibundus</i>														
Skokan	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
<i>Rana</i>														
hnědý														
<i>temporaria</i>														
	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X/X/X	0	0	0	0	0	0

#### 8.4.2 Plazi

V žádném zkoumaném vodním tělese nebyla zjištěna eDNA želvy ani hada. Užovky obojkové (*Natrix natrix*) jsou pravidelně vidány na březích nádrží Klíčava, Římov a Žlutice a užovka hladká (*Coronella austriaca*) přímo u jednoho z odběrových míst na Římově (Blabolil osobní pozorování). V přehradě Láz pak byli při výlovu na jaře roku 2021 zjištěni dva jedinci želvy nádherné (*Trachemys scripta*), kteří zde s vysokou pravděpodobností byli i v době odběru vzorků (Šmejkal a kol. 2021). Absence detekce plazů v našich vzorcích je dána pevným povrchem kůže bez slizové vrstvy a vysokou afinitou k suchozemskému prostředí (především k rozmnožování a odpočinku), v literatuře se však možnosti detekcí želv i plazů z eDNA z vody objevují (Davy a kol. 2015, Hunter a kol. 2015).

#### 8.4.3 Ptáci

V nádržích bylo zjištěno 16 druhů ptáků a dalších šest taxonomických skupin zahrnujících dva až šest druhů (tabulka 6). Nejvíce taxonů (17) bylo zjištěno v Římově a nejméně (1) v Lázu. Nejčastěji zjištěnou skupinou byly zástupci rodů *Anas* a *Spatula* (kachny, čírky, lžičáci), dále hvízdák eurasijský (*Mareca penelope*), holubi (rod *Columba*) a skupina hus s labutěmi (zástupci rodů *Anser*, *Branta* a *Cygnus*). Nejvzácněji byli zjištěni káně lesní (*Buteo buteo*), zrzohlávka rudozobá (*Netta rufina*), slípka zelenonohá (*Gallinula chloropus*), červenka obecná (*Erithacus rubecula*), králíček obecný (*Regulus regulus*), strakapoud velký (*Dendrocopos major*) a zástupce hýlů či konipasů (rody *Pyrrhula* a *Motacilla*). Ve stojaté vodě byly zjištěny taxony: slípka zelenonohá, pěnice černohlavá (*Sylvia atricapilla*), červenka obecná, králíček obecný, strakapoud velký, pěnkavy (rod *Fringilla*), hýl/konipas, holubi, husy s labutěmi a krkavcovití ptáci (zástupci rodů *Corvus* a *Pica*). V tekoucí vodě byl zjištěn čáp černý (*Ciconia nigra*) a pěvuška modrá (*Prunella modularis*). Počet zjištěných druhů ptáků může být výrazně vyšší, neboť použitá referenční databáze není kompletní a v některých případech byly určeny jen vyšší taxonomické úrovně. Stejně jako u ryb, přesnějšímu určení by pomohly specifitější primery. I tak je popsána taxonomická diverzita relativně bohatá. Převládají divoké druhy ptáků obývajících buď přímo vodního prostředí nebo okolní lesního prostředí (Hudec 2005, 2016, Hudec a Šťastný 2011).

Tabulka 6: Seznam taxonů ptáků detekovaných na nádržích v létě (L) a na podzim (P) let 2018 až 2020. X značí detekci a 0 absenci taxonu. Před lomítkem je uvedena detekce v hlavní části nádrže a za lomítkem v přítoku.

Úroveň určení	Název český	Název nádrže		Klíčava						Římov						Žlutice						Láz	
		Rok vzorkování		2018		2019		2020		2018		2019		2020		2018		2019		2020		2020	P
		Období vzorkování		L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
	Název latinsky / počet vzorků	27/2	28/2	28/2	28/2	28/2	28/2	28/2	36/2	33/2	36/2	33/2	36/2	36/2	26/2	27/2	27/2	27/2	27/2	27/2	27/2	3/1	
Druh	Káně lesní	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Zrzohlávka rudozobá	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Hvizdáček eurasijský	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/0	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Čap černý	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/0	0/0	0/0
Druh	Kur domácí	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/X	X/X	0/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/X	0/0
Druh	Slipka zelenohlá	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Sýkora koňadra	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Pěvuška modrá	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Pěnice černohlavá	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Červenka obecná	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Kos černý	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Drozd zpěvný	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Kralíček obecný	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Volavka popelavá	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	X/X	X/0	X/0	X/0	X/0	0/0	0/0
Druh	Strakapoud velký	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Pěnkava obecná / jikavec	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Hýl obecný / konipas horský / bílý	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Holub	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Skupina	Husa / labuť	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Skupina	Kachny	X/X	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	0/X	X/X	X/0	X/X	X/0	X/X	X/X	0/X	X/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X
Skupina	Straka / havran / vrána	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

V jezeře Laka bylo zjištěno pět taxonů ptáků (skřivan polní *Alauda arvensis*, červenka obecná, kos černý *Turdus merula*, drozd zpěvný *Turdus philomelos* a kachny), z nichž byly kachny zjištěny i v blízkých tocích, kde byly dále zjištěny kur domácí a králíček obecný. Detekce kura domácího je s největší pravděpodobností artefakt laboratorní kontaminace, neboť byl tento druh zaznamenán v negativní kontrole. Nejbližší lidská sídla jsou vzdálená 4 km v Nové Hůrce, a navíc v jiném povodí. Původ kontaminace může být z použitých chemikálií, ale i od pracovníků, potraviny obsahující drůbeží maso jsou časté v Anglii i v Čechách. Výskyt ostatních druhů je reálný i v nadmořské výšce přesahující 1000 m n.m.

V rybnících bylo zjištěno 12 druhů a dalších 5 skupin ptáků (tabulka 7). Nejvíce taxonů (11) bylo zjištěno v Dolních Kladínách a nejméně (3) v Sirotčím Dolním rybníce. Nejčastěji byly zjištěny kur domácí a kachny. Nejvzácněji byli zjištěni sojka obecná (*Garrulus glandarius*), sýkora koňadra (*Parus major*), pěnice černošedá, červenka obecná, budníček větší (*Phylloscopus trochilus*) a poláci (rod *Aythya*). Stejně jako v případě nádrží reflektují záznamy taxonů ptáků jejich ekologické nároky. Častěji ve stojaté vodě byl detekován špaček obecný (*Sturnus vulgaris*) a v tekoucí pak sojka obecná, křivka obecná (*Loxia curvirostra*), sýkora koňadra a budníček větší. V kontrastu s údaji o ichtyofauně byla shoda v druzích detekovaných ze standardních vzorků a vzorků smíšených výrazně nižší (36,1 %) a více taxonů bylo zjištěno ve standardních vzorcích (58,3 %), pouze v 5,6 % byl taxon zjištěn ve směsných vzorcích a nikoli standardních. Méně časté detekce ve směsných vzorcích jsou způsobeny nízkými koncentracemi ptačí eDNA ve vodě. Detekce jsou tak především lokálního charakteru v místech, kde pták usedl na hladinu či zanechal stopu ve formě exkrementu a/nebo vývržku (Ushio a kol. 2018).

Tabulka 7: Seznam taxonů ptáků detekovaných v rybnících v létě (L) a na podzim (P) let 2018 až 2020. X značí detekci a 0 absenci taxonu. Před lomítkem je uvedena detekce v hlavní části nádrže a za prvním lomítkem v přítoku a za druhým lomítkem ve směsném vzorku.

Úroveň určení	Název český	Název rybníku		Horní Právkov		Kalič		Dolní Kladiny		Tukša	Starý Lusk		Siroťeí Dolní		Siroťeí Horní	
		Rok vzorkování		2019		2019		2019		2020	2020		2020		2020	
		L	P	L	P	L	P	L	P	P	L	P	L	P	L	P
		39/1/15	39/1/15	39/1/20	39/1/15	39/1/15	39/1/15	39/1/15	39/1/15	39/1/20	4	4	3	3	3	3
Druh	Kur domácí	0/X/0	X/X/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/X/X	X/0/0	0/0/0	X/0/X	X	X	X	X	X	X
	Slípka zelenonohá	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	X	0	X	0	0
Druh	Sojka obecná	0/X/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Lyska černá	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	X	X	X	X
Druh	Křivka obecná	0/X/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/X/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Sýkora koňadra	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/X/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Pěníce černohlavá	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/X/X	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Červenka obecná	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/X/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Budníček větší	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/X/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Špaček obecný	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	X	0	0	0	X
Druh	Kos černý	0/0/X	0/0/0	0/0/0	0/X/0	0/0/0	X/X/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Volavka popelavá	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X/X/X	0/0/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Polák velký / chocholačka	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Pěnkava obecná / jíkavec	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0
Druh	Holub	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X	0	0	0	0	0
		0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X/X/0	0/0/0	0/0/0	0/X/X	0	0	0	0	0	0
Skupina	Husa / labuť	X/0/0	0/0/0	X/0/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/X/0	0/X/0	0	0	0	0	0	X
		X/0/X	X/0/X	X/0/0	0/0/0	0/0/0	X/X/0	X/X/0	X/X/0	X/X/0	0	X	0	0	0	X
Skupina	Kachny	X/0/X	X/0/X	X/0/0	0/0/0	0/0/0	X/0/X	X/X/0	X/X/0	X/X/0	0	X	0	0	0	0

#### 8.4.4 Savci

V nádržích bylo zjištěno 23 druhů a tři páry druhů savců (tabulka 8). Nejvíce (21) taxonů bylo zjištěno v Římově a nejméně (3) v Lázu. Ve všech typech vzorků byla zjištěna lidská (*Homo sapiens*) eDNA, často byl zjištěn i pes (*Canis lupus*) a prase. Tyto časté druhy byly zjištěny i v negativních kontrolách a je tak velmi pravděpodobné, že minimálně v některých případech se jedná o kontaminaci během laboratorního zpracování. Na druhou stranu je třeba doplnit, že všude přítomná lidská eDNA není až tak překvapující, může jít o fyzickou přítomnost člověka (i ve vodárenských nádržích a Národním parku jsou porušovány zákazy vstupu) nebo nedostatečně čištěný odpad z kanalizací. Obdobný zdroj může být psí eDNA, kdy lidé berou psy na procházky i do zakázaných oblastí. Na českém venkově je stále udržována tradice hospodaření včetně domácího chovu prasat a dalšího zvířectva. Vzácně byl zjištěn rejsek obecný (*Sorex araneus*), krtek obecný (*Talpa europaea*), kůň (*Equus caballus*), myš domácí (*Mus musculus*) a veverka obecná (*Sciurus vulgaris*). Převážně ve stojaté vodě byl zjištěn pes, liška obecná (*Vulpes vulpes*) a netopýři (rod *Myotis*). Ve vodě tekoucí byl zjištěn rejsek obecný. Počet vzorků ze stojaté vody byl výrazně vyšší než z tekoucí.

Tabulka 8: Seznam taxonů savců detekovaných na nádržích v létě (L) a na podzim (P) let 2018 až 2020. X značí detekci a 0 absenci taxonu. Před lomítkem je uvedena detekce v hlavní části nádrže a za lomítkem v přítoku.

Úroveň určení	Název český	Název nádrže	Klíčava						Řimov						Žlutice						Láz	
			2018		2019		2020		2018		2019		2020		2018		2019		2020		2020	
			L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
	Název česky / Počet vzorků		27/2	28/2	28/2	28/2	28/2	28/2	36/2	33/2	36/2	33/2	36/2	33/2	36/2	26/2	27/2	27/2	27/2	27/2	27/2	3/1
Druh	Tur domácí	<i>Bos taurus</i>	0/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	X/0	0/0
Druh	Ovce domácí	<i>Ovis aries</i>	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Smec obecný	<i>Capreolus capreolus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Jelen evropský	<i>Cervus elaphus</i>	X/X	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Daněk evropský	<i>Dama dama</i>	0/X	0/0	0/0	X/X	X/X	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Prase	<i>Sus scrofa</i>	X/X	X/0	X/X	X/X	X/X	X/0	X/0	X/0	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	0/X
Druh	Pes	<i>Canis lupus</i>	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Liška obecná	<i>Vulpes vulpes</i>	0/0	X/0	0/0	X/0	X/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Vydra říční	<i>Lutra lutra</i>	0/0	0/0	0/0	X/0	X/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Mýval severní	<i>Procyon lotor</i>	0/0	X/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Netopýr rezavý	<i>Nyctalus noctula</i>	0/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Rejsek vodní	<i>Neomys fodiens</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Krtek obecný	<i>Talpa europaea</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Kůň	<i>Equus caballus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Člověk	<i>Homo sapiens</i>	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X
Druh	Bobr evropský	<i>Castor fiber</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Normik rudý	<i>Myodes glareolus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Mýška drobná	<i>Micromys minutus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Mýš domácí	<i>Mus musculus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Podkan	<i>Rattus norvegicus</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Nutrie	<i>Myocastor coypus</i>	0/0	0/0	X/0	0/0	0/0	X/0	X/X	X/X	X/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X
Druh	Veverka obecná	<i>Sciurus vulgaris</i>	0/0	0/0	0/0	X/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Kuna skalní / lesní	<i>Martes foina / martes</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Netopýr velký / vodní	<i>Myotis myotis / daubentonii</i>	X/0	0/0	X/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Druh	Mýšice křovinná / lesní	<i>Apodemus sylvaticus / flavicollis</i>	0/X	0/X	X/0	X/0	0/X	0/0	0/0	0/0	0/0	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X	0/X

V jezeře Laka a blízkých tocích bylo zjištěno devět druhů a jeden druhový pár savců: jelen evropský (*Cervus elaphus*), pes, vydra říční (*Lutra lutra*), rejsek vodní (*Neomys fodiens*), rejsek obecný, krtek obecný, člověk, bobr evropský (*Castor fiber*), myška drobná (*Micromys minutus*) a kuna skalní a/nebo lesní (*Martes foina / martes*). Zjištěné společenstvo je shodné s pozorováním místních strážců přírody a je až překvapivé, kolik druhů zanechává své stopy ve vodách v pramenné oblasti a přirozeném jezeře s krátkou dobou zdržení vody.

V rybnících bylo zjištěno 14 druhů a dva druhové páry savců. Nejvíce (13) v Tukse a nejméně (2) v Sirotěm Dolním rybníce (tabulka 9). Prakticky ve všech vzorcích byla zjištěna lidská eDNA, často i prase a potkan (*Rattus norvegicus*). Vzácně byli detekováni daněk evropský (*Dama dama*), lasice kolčava (*Mustela nivalis*), netopýři a nutrie (*Myocastor coypus*). Ve stojaté vodě byl častěji detekován pes a myšice (rod *Apodemus*); v tekoucí pak rejsek vodní a myška drobná. Pouze u 39,3 % vzorků byl taxon zaznamenán ve vzorcích standardních a zároveň smíšených. V 53,6 % byl taxon zjištěn pouze ve vzorcích standardních a nikoli smíšených a opačně pouze ve vzorcích smíšených v 7,1 % případů. Savců byla zjištěna poměrně vysoká taxonomická diverzita, což je dáno především popularitou této skupiny mající vliv na konzistentní záznamy v referenční knihovně. Zjištěny byly drobné druhy hlodavců i zástupci velkých jelenovitých. Shodným atributem je skrytý život, často noční aktivita a závislost na vodním prostředí. Savčí eDNA se může do vody uvolnit při plavání, pití, exkreci i z případného zranění. Využívání savčí eDNA z vody je k detekci druhů již relativně časté (Harper a kol. 2019b, Leempoel a kol. 2020, Sales a kol. 2020).

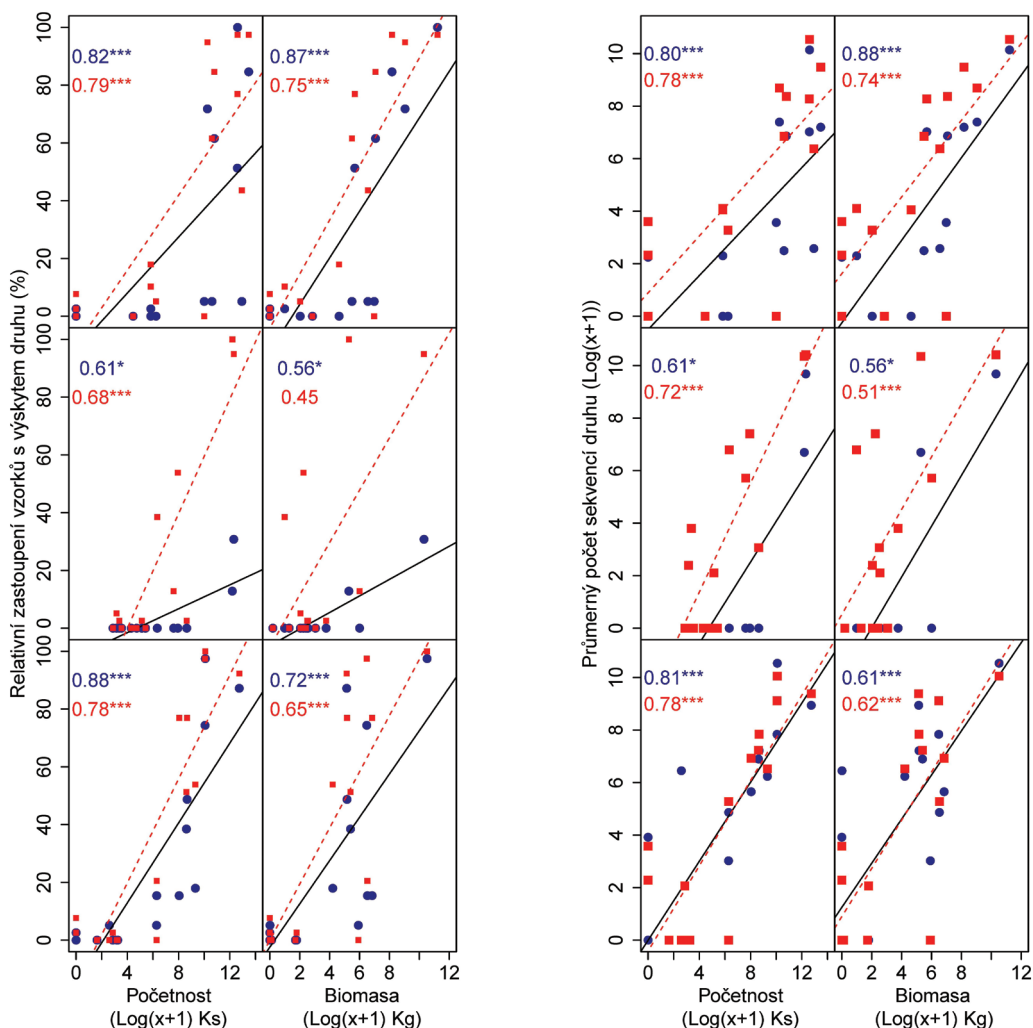
Tabulka 9: Seznam taxonů savců detekovaných v rybnících v létě (L) a na podzim (P) let 2018 až 2020. X značí detekci a 0 absenci taxonu. Před lomítkem je uvedena detekce v hlavní části nádrže a za prvním lomítkem v přítoku a za druhým lomítkem ve směsném vzorku.

Úroveň určení	Název rybníku Rok vzorkování Období vzorkování Taxon latinsky / počet vzorků	Horní Pravíkov 2019		2020		Kalič 2019		Dolní Kladiny 2019		2020		Tukša 2020		Starý Lusk 2020		Sirově Dolní 2020		Sirově Horní 2020	
		L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
Druh	Tur domácí <i>Bos taurus</i>	X/X/0	X/X/X	X/0/0	X/0/0	X/0/0	X/0/0	X/0/0	X/0/0	X/X/0	X/0/0	X/0/0	0	0	0	0	0	0	X
Druh	Smec obecný <i>Capreolus</i>	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0	0
Druh	Daněk evropský <i>Dama dama</i>	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0	0
Druh	Prase divoké <i>Sus scrofa</i>	X/X/X	X/X/X	0/0/X	0/0/X	X/0/0	X/X/X	X/0/0	X/0/0	X/0/X	X/X/X	X/X/X	0	0	0	0	X	0	X
Druh	Pes <i>Canis lupus</i>	X/0/0	X/0/0	0/0/X	0/0/X	0/0/0	X/X/X	X/0/0	0/0/X	X/0/X	X/0/X	X/0/X	X	X	0	0	0	0	0
Druh	Výdra říční <i>Lutra lutra</i>	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/X	0/0/0	0/0/0	0/X/0	X/0/0	0	0	0	0	0	0	0	0
Druh	Lasice koňava <i>Mustela nivalis</i>	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0	0
Druh	Rejsek vodní <i>Neomys fodiens</i>	0/0/0	0/X/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/X/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0	X
Druh	Člověk <i>Homo sapiens</i>	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X/X/X	X	X	X	X	X	X	X
Druh	Normík rudý <i>Myodes glareolus</i>	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0	0
Druh	Mýška drobná <i>Micromys minutus</i>	0/0/0	0/X/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0	0
Druh	Potkan <i>Rattus norvegicus</i>	0/0/0	X/0/X	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X/0/0	0/0/0	X/X/0	X/X/X	X/X/X	0	X	0	0	0	0	0	X
Druh	Nutrie <i>Myocastor coypus</i>	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0	0
Druh	Netopýr velký / vodní <i>Myotis myotis</i> / <i>daubentonii</i>	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0	0
Druh	Mysice křovinná / lesní <i>Apodemus</i> <i>sybaricus</i> / <i>flavicollis</i>	X/0/0	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	X/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0	0	0	0	0	0	0

## 8.5. Příklady využití

### 8.5.1 Shoda eDNA matabarkódingu s výlovem

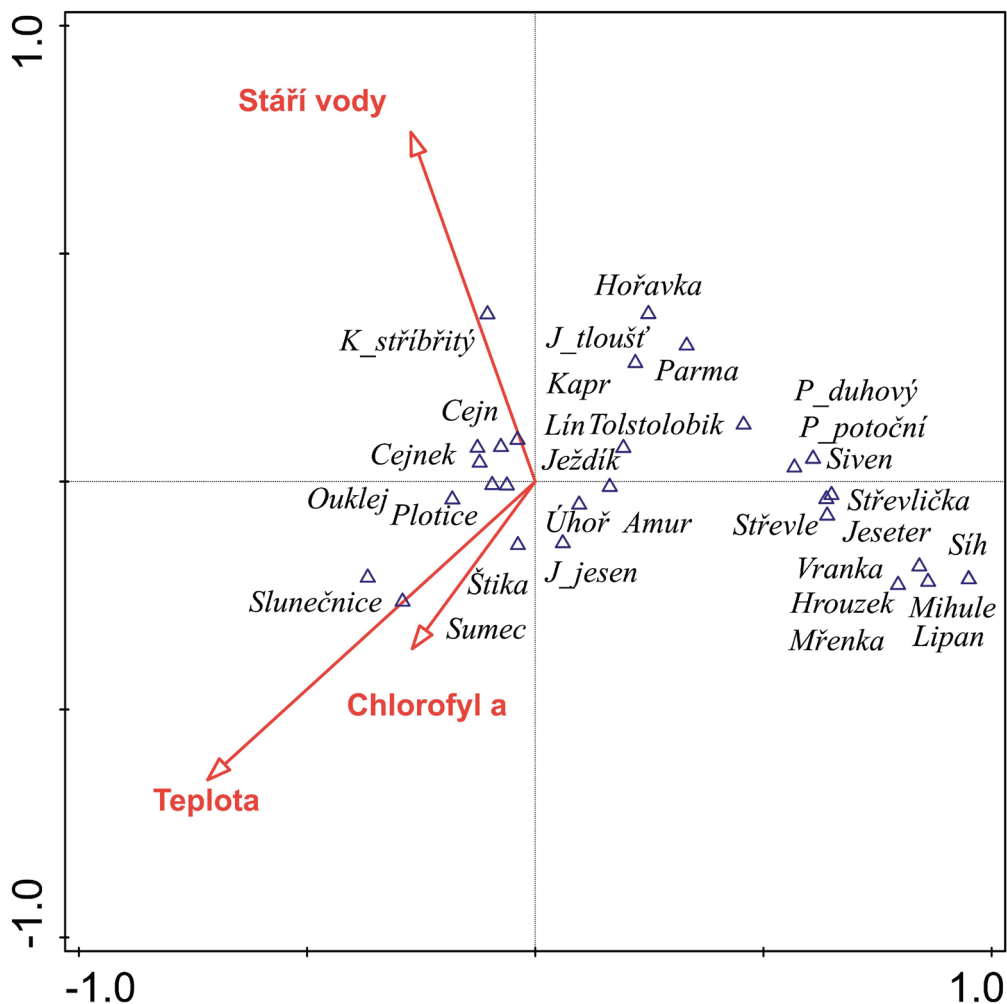
Detekce druhu je sama o sobě důležitou informací. V případě opakovaných odběrů lze vypočítat relativní zastoupení vzorků s výskytem druhu (či vyšší taxonomické úrovně). Další možností je využít přímo počty zjištěných sekvencí (u opakovaného vzorkování průměry ze všech vzorků). Tyto informace jsou v těsném pozitivním vztahu s početností a biomasou ryb v daném vodním tělese, jak bylo prokázáno ve studii Blabolila a kol. (rukopis) s využitím údajů z rybníků Horní Pravíkov, Kalich a Dolní Kladiny, kde probíhalo v létě a na podzim 2019 vzorkování, na což navázal výlov rybníků s detailní kvantifikací obsádky (obrázek 11).



**Obrázek 11:** Závislost mezi relativním zastoupením druhu (vlevo) a průměrným počtem sekvencí druhu (vpravo) na početnosti a biomase jednotlivých druhů zjištěných při výlovu rybníků Pravíkov Horní (první řádek), Kalich (prostřední řádek) a Kladiny Dolní (spodní řádek). V jednotlivých obrázcích jsou uvedeny korelační koeficienty a průkaznost testu ( $p$ : \* $<0,05$ , \*\* $<0,01$  a \*\*\* $<0,001$ ) pro vzorkování v létě (modře) a na podzim před výlovem (červeně).

### 8.5.2 Využití stratifikovaného designu k ekologické studii

Při sběru údajů ve stratifikovaném designu a zároveň zjišťování základních parametrů prostředí lze zjištěné údaje použít v ekologických studiích. Výše uvedené výsledky z nádrží Klíčava, Římov a Žlutice vzorkované v létě a na podzim roku 2018 použili Blabolil a kol. (2021b) ve studii, kde prokázali, že údaje z eDNA metabarkódingu odráží ekologické nároky jednotlivých druhů ryb. Obrázek 12 zobrazuje kanonickou korelační analýzu (Canonical Correlation Analysis, CCA), kterou byly vybrány tři proměnné (teplota vody, standardizované stáří vody a logaritmovaná koncentrace chlorofylu a), které mají statisticky průkazný vliv na složení společenstev v nádržích. Identita nádrže byla použita jako kovariát. Na obrázku je patrné, že osa X znázorňuje podélný gradient od hráze s detekcí slunečnice pestré, sumce velkého a oukleje obecné přes eurytopní druhy jakými jsou například úhoř říční, ježdík obecný po druhy z přítokových částí a tekoucích vod (pstruh duhový a obecný, siven americký, lipan podhorní a další). Osa Y představuje především hloubkový gradient, kde byli slunečnice pestrá a sumec velký častěji zjištěni ve vrstvách u hladiny (voda vyšší teploty a koncentrace chlorofylu a) na rozdíl od karase stříbřitého a hořavky hořké, které byly detekovány v hlubších vrstvách, tedy starších vodách.



**Obrázek 12:** Zobrazení první a druhé osy kanonické korelační analýzy.

## 9. Závěry

Metoda eDNA metabarkóding byla úspěšně ověřena k detekci ryb a dalších obratlovců ze vzorků vody. Zjištěné výsledky mohou být podkladem k využití této zcela neinvazivní, a přitom vysoce citlivé metody k monitoringu organismů v různých vodních ekosystémech. Na rozdíl od tradičních metod odlovů ryb není eDNA metabarkóding druhově ani velikostně selektivní (Kubečka a kol. 2009). Na druhou stranu záleží na podmínkách prostředí (v chladné vodě s nízkou aktivitou mikroorganismů je životnost eDNA delší) a především aktivitě organismů: chování teplomilného sumce velkého se bude diametrálně lišit od chladnomilného mníka jednovousého v různých obdobích, detekce aktivního bolena dravého bude častější než sedentární vranky obecné. Při našem porovnání bylo více taxonů detekováno na podzim než v létě. Z hlediska porovnání prostředí bylo více taxonů zjištěno ve vodě tekoucí než stojaté, což je dáno sedimentačními procesy ve stojaté vodě ve srovnání s prouděním nesoucím eDNA i z větší vzdálenosti v tocích (Lawson Handley a kol. 2019, Pond a kol. 2018).

Metoda eDNA metabarkóding je velmi perspektivní pro praktické využití. Díky její citlivosti byly detekovány i druhy, které nebyly tradičními metodami doposud zjištěny a lze předpokládat jejich nízké populační hustoty. Metoda je tak velmi vhodná pro včasnou detekci invazních druhů jako je komplex karase stříbříteho, střevlička východní a sumeček černý (Keskin 2014). Při včasné detekci lze zabránit rozšíření populace nežádoucích druhů, které jinak působí významné škody v hospodaření i ekosystémových funkcích. Dále je metoda vhodná k monitoringu citlivých druhů podléhajících ochraně (Brys a kol. 2020). Zcela neinvazivním způsobem lze zmapovat výskyt těchto druhů a nastavit managementová opatření k ochraně těchto lokalit. V neposlední řadě lze údaje využít k hodnocení ekologické kvality pro Rámcovou směrnici o vodách a další povinné směrnice na národní i mezinárodní úrovni (Hering a kol. 2018).

Kromě cílového společenstva ichtyofauny byly zjištěny zástupci dalších skupin obratlovců. Tyto údaje zde prezentujeme jako doplňkové. Opět by bylo možné rozebrat indikační potenciál jednotlivých taxonů, afinitu k jednotlivým prostředím či stupeň ochrany. V každém případě, pro zjištění obdobných informací tradičními metodami by bylo nezbytné provést monitoring odborníky na jednotlivé skupiny, kteří používají odlišné metody. Výsledky by tak byly nejen nákladnější, ale i vzájemně neporovnatelné (Cao a kol. 2007).

Práce s eDNA má své specifické stránky, zásadní je velmi pečlivá práce k omezení kontaminace vzorků. Nejčastější kontaminací je lidská eDNA, což lze případně řešit specifickými inhibitory či využít primery, které nebudou mít specifické místo pro lidskou DNA. K omezení náhodné variability při PCR reakci byla v první PCR použita tři opakování. Z jednoho vzorku bylo získáno dostatečné množství eDNA k více reakcím, s více opakováními by bylo lépe postiženo rozlišení jednotlivých vzorků (Harper a kol. 2019a).

Ne vždy bylo dosaženo rozlišení jednotlivých druhů. Použité primery ohraničují relativně krátkou oblast 73-110 párů bází. Pro lepší rozlišení je možné otestovat specifičtější primery, jakými jsou pro ryby MiFish (Myia a kol. 2015) nebo Teleo (Valentini a kol. 2016). Referenční knihovna sekvencí byla doplněna k pokrytí známé druhové diverzity ichtyofauny České republiky (Kottelat a Freyhof 2007, Lusk a kol. 2017), nelze vyloučit, že se v nádržích vyskytují další druhy z okrasných chovů, které nebyly do databáze zařazeny. Většina ryb je široce rozšířena i v dalších státech, z nichž pochází část sekvencí. V ideálním případě by měla být osekvenována reprezentativní část místní populace, které může mít lokální adaptace zachycené v DNA (Weigand a kol. 2019).

## 10. Novost postupů

V současné době se k monitoringu ryb využívá především elektrický agregát v tocích (Jurajda a kol. 2019) a síťové odlovy ve vodách stojatých (Kubečka a kol. 2010). Tyto metody zasahují do prostředí i života ryb a dalších vodních organismů, působí jejich stres, případné zranění a jsou vždy selektivní pro určité druhy a velikostní skupiny. Popsaná metodika eDNA metabarkódingu je zcela neinvazivní, vysoce citlivá a není selektivní. S vývojem metody lze očekávat detailní rozlišení jednotlivých druhů a zjištění i dalších informací o jejich početnosti a kondici. Tato ověřená technologie popisuje dostupný materiál včetně detailních parametrů, postup odběru vody, její filtraci, extrakci DNA, PCR a přípravu genetických knihoven. Uvedeny jsou i příklady využití v různých vodních prostředích, zjištěné výsledky a možnost interpretace v kontextu parametrů vody.

## 11. Ekonomické aspekty

S rozvojem technologií se stávají molekulární metody stále dostupnější a starší funkční verze levnější. Vyčíslení nákladů na zpracování vzorků závisí především na vybavenosti pracoviště. Vzhledem k vysoké citlivosti metody je nezbytné vyčlenit zvláštní místnosti pro jednotlivé kroky zpracování. Jednotlivé laboratoře musí být odděleny, čímž vzniká potřeba vybavení každé z nich. Na druhou stranu jsou používané přístroje běžným vybavením a jejich jednorázová pořizovací cena je v řádu tisíců až desetitisíců korun. Při zpracování je třeba používat jednorázové ochranné pomůcky a čisté chemikálie. Nejnákladnějším zařízením je sekvenátor, který většinou vlastní pouze specializované laboratoře, častěji je sekvenace objednávana formou služby. Rovněž bioinformatické zpracování vyžaduje výkonnou výpočetní techniku, což je ale stále dostupnější položka. Cena za zpracovaný vzorek se pohybuje od stokorun do jednotek tisíců.

Práce s eDNA je výrazně rychlejší než odlovy tradičními metodami. S méně pracovníky lze během krátké doby odebrat vzorky z více lokalit a získat tak porovnatelné výsledky vhodné k hodnocení ekologické kvality (Hänfling a kol. 2021). Podle zaměření studie lze získat informace nejen o rybím společenstvu, ale i o ostatních skupinách obratlovců, což by jinak vyžadovalo monitoring odborníky na jednotlivé skupiny.

Zavedení technologie do systému komplexních odlovů Oddělení ekologie ryb a zooplanktonu na Hydrobiologickém ústavu Biologického centra AV ČR, v.v.i. významně rozšiřuje výzkumné záměry studia rybích obsádek. Až nyní lze efektivně zjišťovat složení rybích společenstev ze všech prostředí jednotnou metodou. Vysoká citlivost odhalila přítomnost i velmi vzácných druhů ve studovaných vodních útvech. Jejím začlenění do odlovného schématu dojde ke snížení lovného úsilí u tradičních technologií a tím i poklesu celkových nákladů na ichtyologické průzkumy.

## 12. Popis uplatnění technologie

Molekulární metody nachází stále častěji uplatnění v aplikovaných odvětvích. Uplatnění ověřené technologie může být u orgánů ochrany přírody, ichtyologů, rybářských hospodářů na vodárenských nádržích, uživatelů rybářských revírů, majitelů soukromých revírů a chovatelů ryb s potřebou managementu vodních ekosystémů. Informace o složení rybích obsádek a případně využívání lokalit jinými skupinami obratlovců jsou zásadní pro hospodaření, ochranu a podporu biodiverzity a zajištění její stability.

Smlouva o uplatnění ověřené technologie byla uzavřena se státním podnikem Povodí Vltavy se sídlem Holečkova 3178/8, 150 00 Praha 5 – Smíchov.

## Seznam literatury

Blabolil P., Draštík V., Kočvara L., Kolařík T., Muška M., Peterka J., Soukalová K., Vrba J. 2020a. Zjištění aktuální ichtyofauny jezera Laka a propojených toků. Hydrobiologický ústav BC AVČR 10 s.

Blabolil P., Čech M., Draštík V., Holubová M., Kočvara L., Kubečka J., Muška M., Prchalová M., Říha M., Sajdlová Z., Šmejkal M., Tušer M., Vašek M., Vejřík L., Vejříková I., Peterka J., Jůza T. 2021a. Less is more - Basic quantitative indices for fish can be achieved with reduced gillnet sampling. *Fisheries Research* 240: 105983.

Blabolil P., Harper L.R., Říčanová Š., Sellers G., Di Muri C., Jůza T., Vašek M., Sajdlová Z., Rychtecký P., Znachor P., Hejzlar J., Peterka J., Hänfling B. 2021b. Environmental DNA metabarcoding uncovers environmental correlates of fish communities in spatially heterogeneous freshwater habitats. *Ecological Indicators* 126: 107698.

Blabolil P., Peterka J. 2021c. Návrat pstruhů do jezera laka. *Šumava* 1: 18-19.

Blabolil P., Jůza T., Draštík V., Knežević-Jarić J., dos Santos R., Griffiths N., Hänfling B., Peterka J. Rukopis. The true picture of environmental DNA, a case study in harvested fishponds.

Brys R., Halfmaerten D., Neyrinck S., Mauvisseau Q., Auwerx J., Sweet M., Mergeay J. 2020. Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*). *Journal of Fish Biology* 98(2): 399-414.

Cao Y., Hawkins C.P., Larsen D.P., Sickle, J.V. 2007. Effects of sample standardization on mean species detectabilities and estimates of relative differences in species richness among assemblages. *The American Naturalist* 170(3): 381-395

Davy C.M., Kidd A.G., Wilson C.C. 2015. Development and validation of environmental DNA (eDNA) markers for detection of freshwater turtles. *PLoS ONE* 10(7): e0130965.

Di Muri C., Lawson Handley L., Bean C.W., Li J., Peirson G., Sellers G.S., Walsh K., Watson H.V., Winfield I.J., Hänfling B. 2020. Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *Metabarcoding and Metagenomics* 4: e56959.

Keskin E. 2014. Detection of invasive freshwater fish species using environmental DNA survey. *Biochemical Systematics and Ecology* 56: 68-74.

Hänfling B., Willby N., Lawson-Handley L., Sellers G. 2021. 101 lakes - lentic fish community monitoring using eDNA metabarcoding. *ARPHA Conference Abstracts* 4: e65438

Harper L.R., Griffiths N.P., Lawson Handley L., Sayer C.D., Read D.S., Harper K.J., Blackman R.C., Li J., Hänfling B. 2019a Development and application of environmental DNA surveillance for the threatened crucian carp (*Carassius carassius*) *Freshwater Biology* 64(1): 93-107.

Harper L.R., Lawson Handley L., Carpenter A.I., Ghazali M., Di Muri C., Macgregor C.J., Logan T.W., Law A., Breithaupt T., Read D.S., McDevitt A.D., Hänfling B. 2019b. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological Conservation* 238: 108225.

Hering D., Borja A., Jones J.I., Pont D., Boets P., Bouchez A., Bruce K., Drakare S., Hänfling B., Kahlert M., Leese F., Meissner K., Mergen P., Reyjol Y., Segurado P., Vogler A., Kelly M. 2018. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research* 138: 192-205-

Hudec, K. 2005. Fauna ČR Ptáci 2/I, II. Academia, Praha 1208 s.

Hudec, K. 2016. Fauna ČR Ptáci 1. Academia, Praha 792 s.

Hudec, K., Šťastný, K. 2011. Fauna ČR Ptáci 3/I, II. Academia, Praha 1840 s.

Hunter M.E., Oyler-McCance S.J., Dorazio R.M., Fike J.A., Smith B.J., Hunter C.T., Reed R.N., Hart K.M. 2015. Environmental DNA (eDNA) sampling improves occurrence and detection estimates of invasive burmese pythons. *PLoS ONE* 10(4): e0121655.

Jurajda P., Slavík O., Adámek Z., Janáč M. 2019. Metodika odlovu a zpracování vzorku plůdkových společenstev ryb tekoucích vod. Ministerstvo životního prostředí ČR, Praha 13 s.

Kloskowski J. 2010. Fish farms as amphibian habitats: Factors affecting amphibian species richness and community structure at carp ponds in Poland. *Environmental Conservation*, 37(2): 187-194.

Kottelat M., Freyhof J. 2007. Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol. 646 s.

Kubečka J., Hohausová E., Matěna J., Peterka J., Amarasinghe U.S., Bonar S.A., Hateley J., Hickley P., Suuronen P., Tereschenko V., Welcomme R., Winfield I.J. 2009. The true picture of a lake or reservoir fish stock: A review of needs and progress. *Fisheries Research* 96(1): 1-5.

Kubečka J., Frouzová J., Jůza T., Kratochvíl M., Prchalová M., Říha M. 2010. Metodika monitorování rybích společenstev nádrží a jezer. Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České Budějovice 64 s.

Lawson Handley L., Read D.S., Winfield I.J., Kimbell H., Johnson H., Li J., Hahn C., Blackman R., Wilcox R., Donnelly R., Szitenberg A., Hänfling, B. 2019. Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England's largest lake. *Environmental DNA*. 1(1): 26-39.

Leempoel K., Hebert T., Hadly E.A. 2020. A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. *Royal Society Proceedings B* 287: 20192353.

Lusk S., Hanel L., Lojkásek B., Lusková V., Muška M. 2017. Červený seznam mihulí a ryb České republiky. *Příroda*, Praha 34: 51-82.

Mehner T., Diekmann M., Brämick U., Lemcke R. 2005. Composition of fish communities in German lakes as related to lake morphology, trophic state, shore structure and human-use intensity *Freshwater Biology* 50(1): 70-85.

Milhau T., Valentini A., Poulet N., Roset N., Jean P., Gaboriaud C., Dejean T. 2021. Seasonal dynamics of riverine fish communities using eDNA. *Journal of Fish Biology* 98(2): 387-398.

Miya M., Sato Y, Fukunaga T., Sado T., Poulsen J.Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M., Iwasaki W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2: 150088

Moravec J. 2019. Obojživelníci a plazi České republiky. Academia, Praha 464 s.

Pont D., Rocle M., Valentini A. Civade R., Jean P., Maire A., Roset N., Schabuss M., Zornig H., Dejean T. 2018. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports* 8: 10361.

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* 39(21): e145.

Sales N.G., McKenzie M.B., Drake J., Harper L.R., Browett S.S., Coscia I., Wangenstein O.S., Baillie C., Bryce E., Dawson D.A., Ochu E., Hänfling B., Lawson Handley L., Mariani S., Lambin X., Sutherland C., McDevitt A.D. 2020. Fishing for mammals: Landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from riverine systems. *Journal of Applied Ecology* 57(4): 707-716.

Sato H., Sogo Y., Doi H., Yamanaka H. 2017. Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities. *Scientific Reports* 7: 14860.

Sellers G.S., Di Muri C., Gómez A., Hänfling, B. 2018. Mu-DNA: a modular universal DNA extraction method adaptable for a wide range of sample types. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e24556.

Sepulveda A.J., Hutchins P.R., Forstchen M., Mckeefry M.N., Swigris A.M. 2020. The elephant in the lab (and field): contamination in aquatic environmental DNA studies. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8: 609973.

Šmejkal M., Blabolil P., Kolařík T., Kortan D., Muška M., Draštík V. 2021. Zajištění odborného dohledu a odlovu rybí obsádky z nádrže Láz při jejím vypouštění a další související činnosti dle požadavků správy CHKO Brdy. Hydrobiologický ústav BC AVČR 17 s.

Ushio M., Murata K., Sado T. Nishiumi I., Takeshita M., Iwasaki W., Miya M. 2018. Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports* 8: 4493.

Valentini A., Taberlet P., Miaud C., Civade R, Herder J., Thomsen P.F., Bellemain E., Besnard A., Coissac E., Boyer F., Gaboriaud C., Jean P., Poulet N., Roset N., Copp G.H., Geniez P., Pont D., Argillier C., Baudoin J.M., Peroux T., Crivelli A.J., Olivier A., Acqueberge M., Le Brun M., Møller P.R., Willerslev E., Dejean T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25(4): 929-942

Wang S., Yan Z., Hänfling B., Zheng X., Wang P., Fan J., Li J. 2021. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of The Total Environment*. 755(2): 142622.

Weigand H., Beermann A.J., Čiampor F., Costa F.O., Csabai Z., Duarte S., Geiger M.F., Grabowski M., Rimet F., Rulik B., Strand M., Szucsich N., Weigand A.M., Willassen E., Wyler S.A., Bouchez A., Borja A., Čiamporová-Zaťovičová Z., Ferreira S., Dijkstra K.-D. B., Eisendle U., Freyhof J., Gadawski P., Graf W., Haegerbaeumer A., van der Hoorn B.B., Japoshvili B., Keresztes L., Keskin E., Leese F., Macher J.N., Mamos T., Paz G., Pešić V., Pfannkuchen D.M., Pfannkuchen A.M., Price B.W., Rinkevich B., Teixeira M.A.L., Várбірó G., Ekrem T. 2019. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of The Total Environment* 678: 499-524.

Zavadil V., Sádlo J., Vojar J. 2011. Biotopy našich obožitelníků a jejich management. *Metodika AOPK ČR*, Praha 178 s.



## **Ověřená technologie: Vzorkování volné genetické informace (eDNA) z vody**

Petr Blabolil, Bernd Hänfling, Lynsey R. Harper, Graham Sellers, Cristina Di Muri, Nathan P. Griffiths, Romulo A. dos Santos, Jelena Knežević-Jarić, Tomáš Jůza, Mojmir Vašek, Martin Čech, Milan Muška, Ivan Fiala, Martina Lisnerová a Jiří Peterka

Vydavatel: Biologické centrum AV ČR, v.v.i.,  
Hydrobiologický ústav, Na Sádkách 702/7, 370 05 České Budějovice, [www.hbu.cas.cz](http://www.hbu.cas.cz)

Vydání ověřené technologie bylo podpořeno Českou limnologickou společností ([www.limnospol.cz](http://www.limnospol.cz))

Tisk: Tiskárna Lukáš Sobota, Řečany nad Labem

Grafická úprava: Jaroslav Bartoň, [Design69.cz](http://Design69.cz)

Vydání: první, 2021

Náklad: 100 ks

Počet stran: 44

ISBN 978-80-86668-89-5



