

Metodika identifikace vybraných nepůvodních vodních organizmů

Oldřich Kopecký, Lucie Bohatá, Milan Gottwald, Pavlína Kuříková, Miloslav Petrtyl, Lukáš Kalous

Interní recenzenti:

RNDr. Luboš Beran, Ph.D.

Mgr. et Mgr. Karel Chobot, Ph.D.

RNDr. Jindřich Novák, Ph.D.

Autoři fotografií: Miloslav Petrtyl

Autoři fotografií identifikačních karet jsou uvedeni na konkrétních identifikačních kartách

Autor kreseb: Jiří Patoka

Kontaktní informace:

Kopecký, O., Katedra zoologie a rybářství, ČZU v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6 – Suchdol e-mail: kopeckyo@af.czu.cz

Vydala:

Katedra zoologie a rybářství, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6 – Suchdol

Vydání: první vydání

Rok vydání: 2020

ISBN 978-80-213-3005-4

© Česká zemědělská univerzita v Praze <http://katedry.czu.cz/kzr/>

Poděkování:

Děkujeme odborným recenzentům a všem kolegům, kteří na realizaci experimentální části metodiky spolupracovali: Věra Plechingerová, Iva Langrová, Kateřina Rylková, Robert Šmejkal, Tereza Míčová, Zuzana Čadková a další. Metodika byla zpracována za finanční podpory TAČR (www.tacr.cz; projekt TB020MZP041).

Obsah

1	Cíl metodiky.....	1
2	Problematika biologických invazí.....	1
2.1	Teoretické základy invazní biologie.....	1
2.2	Obecné zákonitosti šíření invazních organismů	3
2.3	Konkrétní případy zavlečení nepůvodních vodních organismů	4
2.4	Dopady invazí vodních organismů	6
2.4.1	Měkkýši	7
2.4.2	Korýši	7
2.4.3	Ryby	7
2.4.4	Obojživelníci	8
2.4.5	Plazi	8
2.5	Snižování negativních dopadů invazí a jejich předcházení	8
3	Možnosti hodnocení invazního potenciálu	9
3.1	Aquatic Species Invasiveness Screening Kit (AS-ISK)	10
3.2	Risk Assessment Model (RAM).....	11
3.3	Maximum Entropy Modeling (Maxent)	12
3.4	Boosted Regression Trees (BRT)	14
4	Metoda třístupňové identifikace nepůvodních vodních organismů.....	14
4.1	Výběr druhů zařazených v metodice	15
4.2	Metodika vypracování univerzálního heslovitého postupu identifikace	15
4.3	Identifikace pomocí environmentální DNA (eDNA)	16
5	Specifika vypracování univerzální identifikačního postupu dle taxonomických skupin..	20
5.1	Mechovky	20
5.2	Měkkýši	21
5.3	Korýši	21
5.4	Ryby.....	21
5.5	Obojživelníci	22
5.6	Plazi	22
5.7	Rostliny.....	23
6	Záznam a dokumentace nálezu organismu	23
6.1	Aplikace BioLog.....	23
6.2	Základy fotografické dokumentace	24
6.3	Externí pomoc s identifikací - odborníci	26
7	Identifikace pomocí skevenace DNA	27
8	Ověření funkčnosti metodiky.....	34

9	Použitá literatura	36
10	Přílohy.....	44
10.1	Identifikační karty.....	44
10.2	Odkaz na metodiku a přílohy ke stažení.....	45
	• www.bioinvaze.agrobiologie.cz	45

1 Cíl metodiky

Biologické invaze jsou aktuálně jedním z nejpálčivějších problémů ochrany přírody, ale místy i jiných, komerčních sektorů (zemědělství, rybářství, myslivosti, lesnictví a dalších). Snahu o jejich předcházení, kterou je třeba koordinovat i na nadnárodní (resp. evropské) úrovni, dokládá např. nedávno přijaté nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1143/2014. Současným celosvětovým trendem v oblasti prevence invazí nepůvodních druhů organismů je obecně snaha o vysokou míru informovanosti napříč dotčenými státními i nestátními organizacemi. Základním předpokladem pro předcházení biologických invazí je totiž správná a včasná determinace a odlišení původních a nepůvodních organismů. Jednoznačná, shrnující určovací a rozlišovací příručka těchto organismů však doposud chybí.

Cílem této metodiky je tedy ve dvou rovinách zpřístupnit znalosti využitelné pro morfologickou a genetickou identifikaci nepůvodních vodních organismů s potenciálem usazení v České republice (metodika včetně dílčích výsledků je volně ke stažení na www.bioinvaze.agrobiologie.cz). První rovinou je identifikace, v metodice zahrnutých, konkrétních organismů, které potenciál usadit se a i případně negativně působit v prostředí mimo svůj původní areál již prokázaly, případně pro něj mají předpoklady. Druhou rovinou je popis obecného postupu jakým určovat nové nepůvodní organizmy a tím tuto příručku aktualizovat dle potřeb uživatele s rozšiřujícím se vývojem poznání nových nepůvodních druhů.

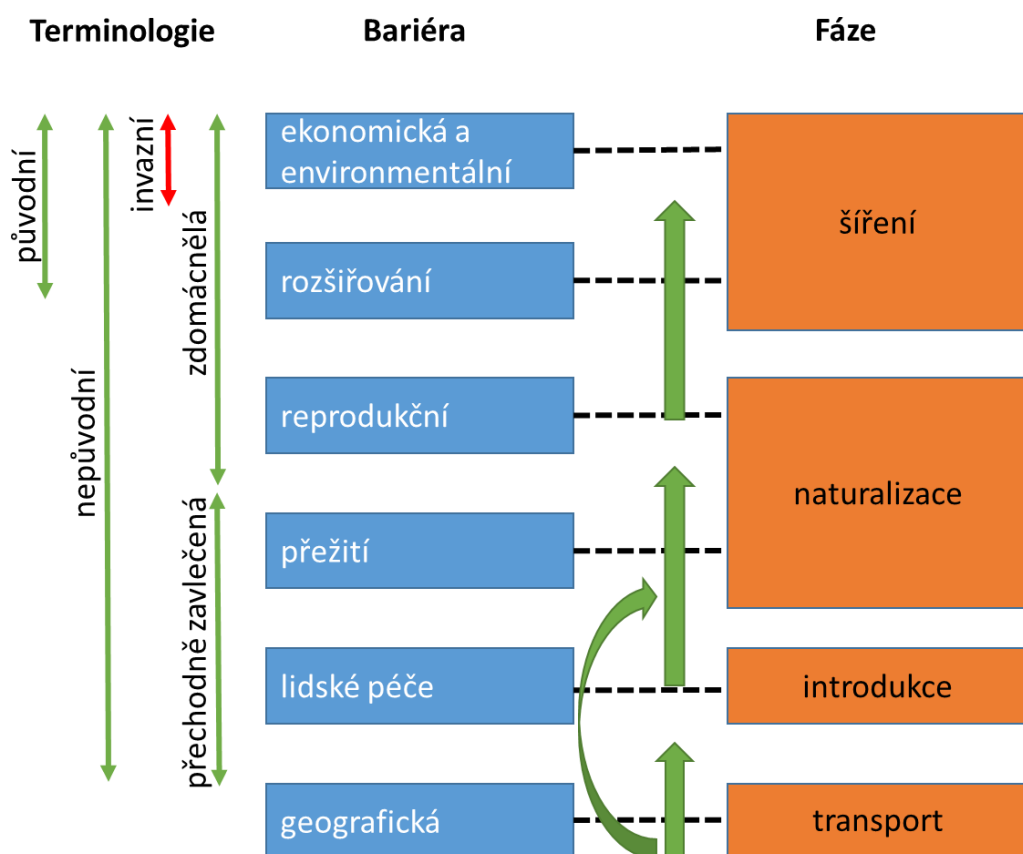
2 Problematika biologických invazí

2.1 Teoretické základy invazní biologie

Invazní biologie jako vědecké odvětví je definována publikací „The Ecology of Invasion by Animals and Plants“ (Elton 1958). Předpovědi vyslovené autorem se začaly masivně naplňovat v posledních třech dekadách, zejména díky rostoucí propojenosti světa – globalizaci (např. Meyerson et Mooney 2007). Zájem o nepůvodní druhy se odráží v návazném rapidním nárůstu vědeckých publikací na toto téma (Geraldí et al. 2019). Jedním z úskalí, které přinesl velmi překotný rozvoj vědy o invazní biologii v posledních 30 letech, bylo používání různé terminologie různými autory (Lockwood 2007). Nejinak tomu bylo i v českém jazykovém prostředí, kde rozdíly zejména v používání termínů botaniky a zoologie sjednotil nedávno Pyšek (2018).

Zájem o nepůvodní organizmy je pochopitelný, vzhledem k tomu, že mnohé z těchto druhů způsobily změny v oblasti, kde se nově vyskytují (Pyšek et al. 2012, Ricciardi et al. 2013). Mezi nejvýznamnější problémy, za kterými stojí výskyt, případně šíření nepůvodních druhů patří: vymírání původních druhů, genetické změny v původních populacích, behaviorálně-ekologické změny, změny v trofických vztazích, produktivitě ekosystémů, cyklech živin i hydrologii (Brooks et al. 2004, Hendrix et al. 2008, Suarez et Tsutsui 2008, Kenis et al. 2009, Vila et al. 2011). Z výše uvedených důvodů jsou nepůvodní druhy obecně organizacemi zabývající se ochranou přírody považovány za nežádoucí. Zde je nutné uvést, že existují i opozitní názory zdůrazňující malý vliv nepůvodních druhů, a tedy neefektivní využívání prostředků při jejich potírání (Strayer 2012), případně přímo vyzdvihují jejich pozitivní efekt na konkrétních ekosystémových změnách, ze kterých mohou benefitovat v některých případech i ohrožené druhy (Graves et Shapiro 2003, Sogge et al. 2008, Chiba 2010, Schlaepfer et al. 2011).

V současném pojetí je biologická invaze pojímána jako proces, při kterém druh musí hierarchicky překonávat jednotlivé bariéry, aby se dostal do další fáze invaze (Blackburn et al. 2011) (Obr. 1).



Obr. 1. Schematické znázornění procesu invaze jako hierarchického překonávání bariér (dle Kalous 2018, upraveno dle Richardson et al. 2000, Blackburn et al. 2011)

Usazení nepůvodního druhu, je kromě jeho abiotických limitů, ovlivněno nejvíce počtem jedinců a frekvencí jejich objevování se v novém prostředí (tzv. propagule pressure) (Williamson 1996, Williamson et Fitter 1996, Colautti et MacIsaac 2004). Příklad želvy nádherné, jako nejmasověji dováženého plaza pro zájmový chov a její následné usazení ve volné přírodě Evropy, je velmi dobře znám (Cadi et Joly 2003). Dovoz želv byl na území EU zakázán v roce 2004 (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1143/2014) ovšem prediktivní modely hodnotí potenciál některých sladkovodních želv, které ji na trhu nahradily, jako vyšší (Kopecký et al. 2013, Masin et al. 2014). Nicméně se nepředpokládá, že jejich dopad by měl překročit rozsah působení želvy nádherné, právě z důvodu řádově nižšího počtu dovážených jedinců (Kopecký et al., 2013). Roli zde hraje Alleeho efekt, kdy pohlavně se rozmnožující organizmy musí nalézt partnera opačného pohlaví a šance tohoto setkání klesá se (snižujícím se počtem jedinců nebo rostoucí plochou území (např. Taylor et Hastings 2005). Výskyt nepůvodních druhů je spojen s činností člověka, a invaze tak jsou dávány do příčinné souvislosti i s demografickými údaji. Bylo např. prokázáno, že výskyt nepůvodních druhů je úměrný s hustotou lidského osídlení (Semmens et al., 2004), blízkostí komunikací (Copp et al. 2005a), počtem obchodů se zvířaty (Duggan et al. 2006) nebo indexem vyjadřujícím míru urbanizace území (Copp et al. 2010).

Ne každý výskyt nepůvodního druhu v novém území vede ke vzniku invaze (šíření s negativním dopadem na původní biotu), ovšem ukazuje se, že dlouhou dobu vyzdvihované „pravidlo desetiny“ (*tens rule*) (Williamson et Fitter 1996) – dle něhož se pouze 0,1 % nepůvodních druhů stane invazními – spíše podceňuje dopady výskytu nepůvodních druhů (Jaric et Cvijanovic 2012). Jednou z příčin je, že negativní dopad nemusí být hned patrný a následky výskytu druhu se mohou projevit později (Jaric et Cvijanovic 2012). Pro již testovanou skupinu vodních

organizmů, konkrétně ryby, se pravidlo desetiny ukázalo jako velmi nevhodný prediktor budoucí invaze (Lapointe et al. 2012). Ke každému nepůvodnímu druhu bychom tak měli přistupovat velmi obezřetně, což pro sladkovodní živočichy platí více než pro jiné skupiny. Důvodem je jejich, pro člověka skrytý, způsob života pod vodní hladinou. Pravděpodobnost objevení nepůvodního druhu z akvatického prostředí je oproti druhům terestrickým předpokládána nižší a to z důvodu jejich často trvalého života pod vodní hladinou, kde zůstávají skryti běžným pozorovatelům (Kalous 2018).

2.2 Obecné zákonitosti šíření invazních organismů

Možností, jakými se mohou nepůvodní organizmy dostávat na nová místa, je celá řada, vzhledem k velké taxonomické pestrosti invadujících organismů a jejich rozdílným životním historiím. Určitou snahou o unifikaci a zjednodušení přístupu k tomuto problému bylo definování šesti základních kategorií cest nepůvodních organismů na nová území, jsou to (Hulme et al. 2008):

1. Vypuštění (*release*) – záměrné vysazení/vypuštění druhu do volné přírody nového území. Patří sem např. vysazování rostlin jako protierozní ochrana, vypouštění zvířat za účelem biologického boje, jako lovné zvěře atp.
2. Únik (*escape*) – záměrné dovezení druhu do nového území se záměrem jeho kontrolovaného užívání. Do volné přírody nového území pak druh unikne samovolně. Patří sem např. zavádění nových plodin, dovoz hospodářských zvířat, pěstování okrasných rostlin, zájmové chovy zvířat, živá návnada atp.
3. Kontaminant (*contaminant*) – jedná se o nezáměrný dovoz do nového území, kdy nepůvodní druh zůstává skryt jako součást zásilky jiné komodity. Do této kategorie patří např. parazité, škůdci plodin, plevele v semenných směsích, komenzálové převážených organismů atp.
4. Černý pasažér (*stowaway*) – jedná se o nezáměrný převoz druhu na nové území tak, že využívá dopravního prostředku, aniž by o tom člověk věděl. Sem patří případy, kdy např. je druh dovozen v nádržích s balastní vodou, je přichycen na trupu jako součást jeho znečištění atp.
5. Koridor (*corridor*) – jedná se o otevření nových cest pro přirozenou disperzi druhu činností člověka. Příkladem je např. propojování oceánů, moří, jezer a řek člověkem budovanými průplavy.
6. Samovolně (*unaided*) – jde o přirozené šíření druhu na nová území (definována v tomto případě politickými hranicemi), ovšem z centra, kam byl dříve druh zavlečen činností člověka. Vzhledem k tomu, že disperze je evolučně stabilní strategií, sem patří téměř všechny případy navazující na usazení nepůvodních druhů v nových územích.

Pohyb organismů v bodech 1. – 3. je umožněn zejména primárním lidským zájmem, přemísťovaný organismus je komoditou. V bodě 4. je lidská činnost vektorem umožňujícím nezáměrný přesun organismů. V bodech 5. a 6. se pak jedná o přirozenou disperzní aktivitu druhu, kterou ovšem člověk usnadnil nebo umožnil, a to do dříve nepřístupných míst.

Šíření nepůvodních organismů probíhalo v několika historicky konkrétních vlnách a různé taxonomické skupiny prodělávaly vrchol obsazování nových území v různý čas (Jeschke et Strayer 2005). Platí, že obratlovci jsou ve srovnání s ostatními skupinami šíření spíše záměrně (Pitt et Witmer 2014). Pokud se zaměříme na vodní obratlovce, nejvíce rybích druhů bylo introdukováno ve druhé polovině 20. století (Elvira et Almodovar 2005, Jeschke et Strayer 2005), zatímco introdukce obojživelníků, příp. na vodu vázaných plazů prošla svým vrcholem na přelomu 20. a 21. století (Kraus 2015).

Česká republika patří k předním dovozcům i vývozcům zájmově chovaných organismů v rámci Evropské unie (Ploeg 2007, Patoka et al. 2015). Zároveň Česká republika leží v pramenných

oblastech a rozvodí tří úmoří, což představuje významný potenciál pro šíření nepůvodních druhů do dalších států Evropy (Kalous 2018). Z těchto důvodů je důležité monitorovat dovoz případných nepůvodních druhů nejen vzhledem k zájmům národním, ale též celoevropským. Naopak určitou výhodou vnitrozemské polohy České republiky je ztížený přístup druhů šířících se dálkovou lodní dopravou. U skupin, které mají v rámci vodního prostředí nejvyšší negativní dopad a i s přihlédnutím k podmínkám České republiky, je možné konstatovat, že hlavním zdrojem negativních dopadů invaze (i v budoucnu) jsou zejména skupiny korýši, ryby a měkkýši (Pergl et al. 2016), a těmi se proto zabýváme v následujících třech kapitolách intenzivněji.

2.3 Konkrétní případy zavlečení nepůvodních vodních organizmů

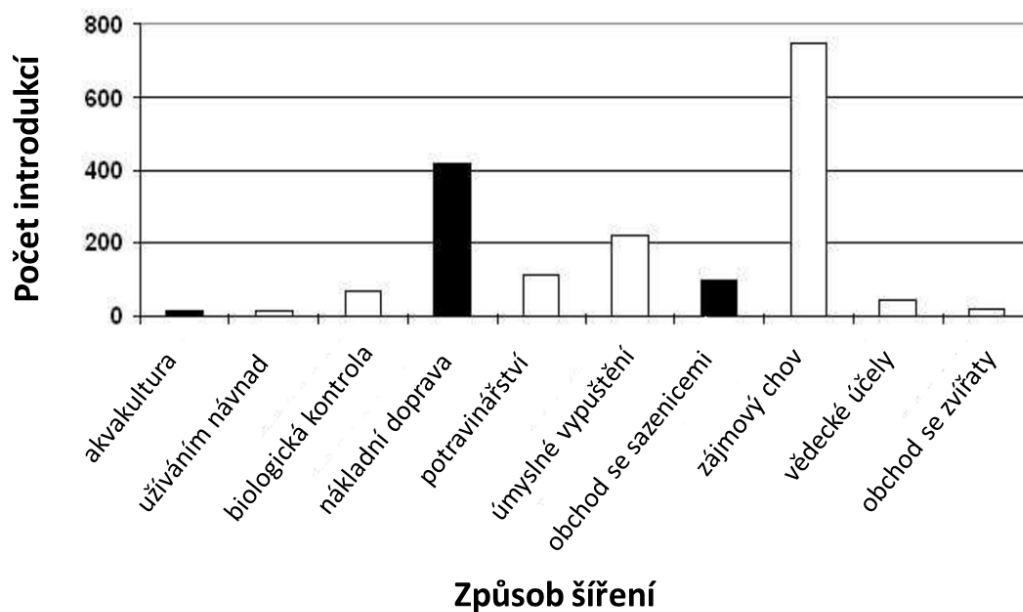
Cesty, kterými se do vod dostávají nepůvodní ryby, se dají rozdělit do 6 kategorií. První kategorií jsou druhy, jejichž introdukce byla spojena s hospodářským využíváním ryb v akvakultuře, nebo pro potřeby rekreačních rybářů (Mlíkovský et al. 2006). Příkladem takové introdukce může být pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), který je jednak chován v akvakultuře, ale je i nasazovaný do rybářských revírů za účelem rybolovu (Jurajda et Adámek 2016). Do této kategorie spadají i druhy, které byly pokusně vysazeny s cílem jejich možné aklimatizace (Mlíkovský et al. 2006, Musil et al. 2010), jako příklad lze uvést okounka pstruhového (*Micropterus salmoides*) (Jurajda et Adámek 2016), nebo ssamečka amerického (*Ameiurus nebulosus*) (Mlíkovský et al. 2006) a kaprovce (*Ictiobus* sp.) (Kalous et al. 2018). Druhou kategorií jsou druhy, které nebyly vysazeny záměrně, ale dostaly se na území Česka společně s násadou hospodářsky významných druhů, nebo vlastní migrační aktivitou (Mlíkovský et al. 2006). Do této kategorie introdukcí se dá zařadit skupina hlaváčovitých ryb (Gobiidae) (Jurajda 2018), slunečnice zelená (*Lepomis cyanellus*) (Mlíkovský et al. 2006), střevlička východní (*Pseudorasbora parva*), která byla na území ČR zavlečena společně s plůdkem amura a tolstolobika (Baruš et Oliva 1996). Třetí kategorie je tvořena druhy vypuštěnými do přírody akvaristy, zde se předpokládá, že se takto do vod Česka dostala koljuška tříostná (*Gasterosteus aculeatus*) Linnaeus, 1758 (Jurajda a Adámek 2016). Čtvrtou kategorií představují druhy chované v rybníční i uzavřené akvakultuře, které se ale dosud do volné přírody nedostaly. Mezi tyto druhy patří amur černý (*Mylopharyngodon piceus*), v oteplených vodách keříčkovce jihoafrický (*Clarias gariepinus*) a tlamoun nilský (*Oreochromis niloticus*) (Mlíkovský et al. 2006, Musil et al. 2010). Pátou kategorií jsou druhy, které jsou na území ČR původní, ale jen v některém ze třech úmoří nacházejícím se na území Česka a byly vysazeny do úmoří nepůvodního (Mlíkovský et al. 2006). Patří sem například ostroretka stěhovavá (*Chondrostoma nasus*), která je na území ČR původní v povodí Dunaje a Odry (Kottelat et Freyhof, 2007) a jako nepůvodní jí lze označit v povodí Labe (Kalous 2018, Mlíkovský et al. 2006).

Hlavní cesty disperze vodních korýšů můžeme rozdělit do 3 koridorů – zájmový chov, lodní doprava a potravinářské odvětví. První cestou je zájmový chov se všemi jeho riziky vědomého i nevědomého vypuštění organismů do volné přírody. Specifickým příkladem je původ raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*), jakožto nepůvodního druhu, s nejasnou domovskou lokalitou. Původ raka mramorovaného se odkazuje na raka klamavého (*Procambarus fallax*), který byl chován v akvakultuře a z něhož pravděpodobně vznikl nový druh – rak mramorovaný, dříve uváděný jako forma raka klamavého *Procambarus fallax* f. *virginalis*. Tento druh se partenogeneticky rozmnožuje, a právě přemnožení raků v akváriích vedlo, a stále vede, neznalé chovatele k vypuštění přemnožených jedinců na přirozená či polopřirozená stanoviště (Chucholl et al. 2012, Vogt 2018, Rewicz 2014). Další způsob šíření je pomocí lodní dopravy, kdy zejména skrze balastní vodu dochází k přenosům organismů na různé vzdálenosti. Přes moře, oceány nebo z jednoho povodí do dalšího se otevírá cesta pro aktivní či pasivní šíření druhu dále po povodí. Například blešivec velkohrbý (*Dikerogammarus villosus*) je úspěšně

šířícím se živočichem, který byl introdukován lodní dopravou (Grosholz 2011, MacNeil et al. 2010). Třetím významným způsobem introdukce druhu je potravinářské odvětví. Některé druhy korýšů byly zavlečeny na nepůvodní lokality kvůli konzumaci jich samotných nebo druhotně zavlečeny s nepůvodními druhy ryb či manipulace s rybí obsádkou (Gherardi 2011, Horecký et al. 2006). Ze všech nepůvodních raků se na území České republiky vyskytuje jeden, který je však zákonem chráněný – rak bahenní (*Astacus leptodactylus*), jehož původem je Pontokaspická oblast (Horká 2006, dle vyhlášky č. 395/1992 Sb.).

Další skupinou organismů, které mají nízkou schopnost aktivního šíření, tudíž jsou závislé na disperzi pasivní a často využívají antropogenní aktivity, jsou měkkýši. V důsledku globalizace spojené s rozvojem obchodních cest se během posledních desetiletí intenzita šíření nepůvodních měkkýšů, včetně vodních, zvýšila (Cianfanelli et al. 2007). Mezi jednu z hlavních cest zavlečení patří zájmové chovy a jejich záměrné či nezáměrné vypuštění do volné přírody. Může se jednat o dovoz měkkýšů určených přímo k chovu nebo o dovoz kontaminovaných komodit využívaných k této činnosti (rostliny, vybavení a osazení akvárií, jezírek) (Ng et al. 2016, Patoka et al. 2017). Dalším neopomenutelným zdrojem pro šíření nepůvodních druhů je lodní doprava. Balastní vodou mohou být měkkýši zavlečeni na dlouhé vzdálenosti, kde se následně uchytí a povodím se šíří dál (využívají proudů, přichycení na jiné živočichy či předměty aj.) (Francis 2012, Johnson et Carlton 1996). V neposlední řadě jsou zdokumentovány případy šíření využívající zemědělské (se zemědělskými plodinami) a potravinářské odvětví (Cowie et Hayes 2012, Zaranko et al. 1997). K invazím často dochází propojením různých cest šíření. Například na počátku šíření invazního druhu korbikuly asijské (*Corbicula fluminea*) stáli čínští přistěhovalci, kteří si tento druh přivezli jako potravinu do Spojených států amerických. Za její globální invazi stojí sled lidských aktivit jako je transport balastní vodou, zájmový chov a následné vypuštění či přesuny juvenilních jedinců přichycených na lodích či jiných předmětech ponořených ve vodě (odumírající dřevo, rostliny, lana, bóje apod.) (Sousa et al. 2008).

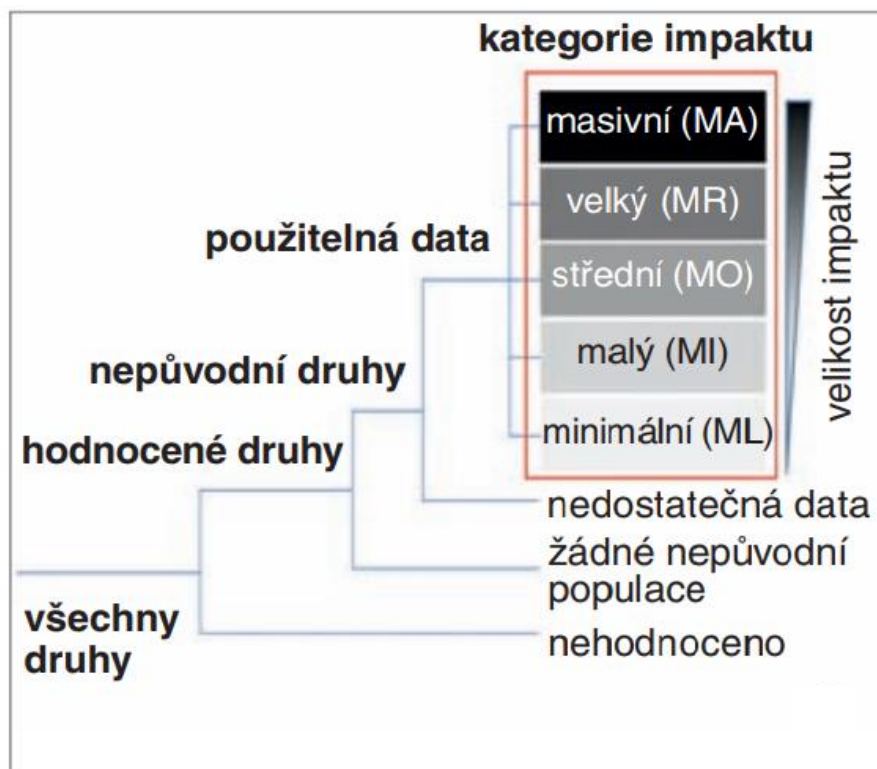
Z dalších vodních organismů, kde hlavním celosvětovým zdrojem introdukcí je zájmový chov a úniky či vypouštění z něj, jsou obojživelníci a plazi (Kraus 2009) (Obr. 2). V České republice je z těchto dvou skupin ve volné přírodě v současnosti pravidelně nalézána pouze želva nádherná (*Trachemys scripta*) (Brejcha et al. 2010). Její poddruh, atraktivně zbarvená *Trachemys scripta elegans*, je v zájmových chovech vůbec nejpopulárnějším a nejrozšířenějším plazem s počtem 52 miliónů vyvezených jedinců z USA za období 1989 – 1997 (Franke et Telecky 2001, Telecky 2001). Tento poddruh byl dovážen masově i do Evropy, kde byl velmi levně nabízen. Nicméně s růstem želvy je spojena i ztráta jejího atraktivního zbarvení a vzrůst agresivity, což často vedlo chovatele k jejímu vypouštění do volných vod (Cadi et Joly 2003). V Evropě se za velmi problematický dá označit i výskyt skokana volského (*Lithobates catesbeianus*), který byl do Evropy záměrně dovážen za účelem chovu na specializovaných farmách na žabí stehýnka, tedy jako zdroj potravy, a do volné přírody z těchto farem unikl (Ficetola et al. 2007).



Obr. 2. Celosvětový počet introdukcí obojživelníků a plazů ve vztahu ke konkrétním typům způsobů jejich šíření (*pathway*) jednoznačně ukazuje na zájmové chovy (*pet trade*) jako na hlavní příčinu (Kraus 2009)

2.4 Dopady invazí vodních organizmů

Druhy nepůvodních organismů mohou v novém prostředí působit s různou intenzitou (Obr. 3), některé z nejznámějších příkladů, včetně druhů již negativně působících na území ČR uvádíme dále.



Obr. 3. Schéma kategorií působení nepůvodních druhů a vztahy mezi těmito kategoriemi (dle Hejda et Pyšek 2018, upraveno dle Blackburn et al. 2014)

2.4.1 Měkkýši

V současné době je na území České republiky doložen výskyt 8 nepůvodních druhů vodních měkkýšů (Lorencová et al. 2015), kteří mají negativní i pozitivní vliv na vodní prostředí. Nepůvodní mlži, jako je škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*), korbikula asijská (*Corbicula fluminea*) či slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*), jsou dobrými filtrátory, kteří zvyšují kvalitu a průhlednost vody, a proto byli v českých lomech a pískovnách uměle vysazováni potápěči. Nicméně, vzhledem k tomu, že potravně konkurují původní fauně a mají velice dobré reprodukční schopnosti, vytlačují původní organizmy, a způsobují tak ztrátu lokální biodiverzity. Při přemnožení těchto mlžů se negativní vliv projevuje i na socioekonomické úrovni, kdy může například dojít k ucpání vodovodního potrubí nebo přítoků vodních elektráren či poškození majetku spojeného zejména s lodní dopravou (Woodwar 2011, Gherardi 2007). Mackie (1991) se ve své práci zabývá dopady slávičky mnohotvárné na původní faunu velkých mlžů v Jezeře svatě Kláry ze systému Velkých jezer Severní Ameriky. Kromě nepřímého negativního vlivu (např. potravní konkurence a obsazování nik) mají slávičky mnohotvárné přímý negativní vliv na faunu původních mlžů. Svými bysovémi vlákny se přichycují k lasturám jiných mlžů a vlastní tíhou jim zamezují v otevření schránek nebo naopak zavření schránek, což je pro mlže nezbytné k přežití. V rámci České republiky není prozatím zdokumentováno tak silné přemnožení některého z nepůvodních druhů na výše zmíněné úrovni. Jedním z dobře zmapovaných nepůvodních mlžů pro Českou republiku je škeblice asijská, která může dosahovat vysoké populační hustoty a její parazitické larvy „glochidie“ konkurují o potenciální rybí hostitele původním druhům mlžů (např. škeble říční *Anodonta anatina*) (Douda et. al 2016).

2.4.2 Korýši

Rizikovitost nepůvodních druhů korýšů spočívá v potravní konkurenci s původními druhy, v obsazování nik původních druhů, dopadech na složení biodiverzity a přenosu patogenů. Severoameričtí raci: rak pruhovaný (*Faxonius limosus*), rak signální (*Pacifastacus leniusculus*) a rak mramorovaný (*Procambarus virginialis*) jsou přenašeči tzv. račího moru, vůči němuž jsou původní evropské druhy vysoce vnímavé a po nakažení hynou (Chucholl et al. 2012, Filipova et al. 2013). Krab čínský (*Eriocheir sinensis*) je na území ČR spíše náhodným hostem. Jakožto katadromní živočich potřebuje k rozmnožování mořskou vodu. Právě jeho schopnost migrace na velké vzdálenosti je ohrožující s ohledem na možný přenos račího moru (Herborg et al. 2003, Svoboda et al. 2014). Za nebezpečné druhy se nepovažují z řad korýšů pouze raci. Svou velikostí i méně nápadné druhy mohou způsobit ekologické škody. Kupříkladu blešivec velkohrbý (*Dikergammarus villosus*) svou dravostí a kompetitivní schopností ohrožuje celá společenstva a jeho úspěšné uchycení má dopad na lokální biodiverzitu (MacNeil et al. 2010, Petrusek 2006).

2.4.3 Ryby

Z ryb je v současnosti intenzivně zkoumán případ druhového komplexu karasa stříbřitého. Jedná se o invazní, silně konkurenční druhový komplex a jeho výskyt je hodnocen jako jednoznačně negativní (Jurajda et Adámek 2016). Může působit jako sexuální parazit vzhledem ke svému alternativnímu gynogenetickému způsobu rozmnožování, a tím snižovat reprodukční úspěšnost heterospecifických druhů (Mlíkovský et al. 2006). Zřejmě i díky tomuto působení je například původní karas obecný (*Carassius carassius*) v současnosti považován za kriticky ohrožený druh na mnoha místech Evropy (Kottelat et Freyhof 2007). Mezi další druhy, na které negativně z hlediska potravní i prostorové kompetice komplex karase působí, můžeme zařadit slunko obecnou (*Leucaspis delineatus*), nebo lína obecného (*Tinca tinca*) (Mlíkovský et al. 2006). Potravním konkurentem původních druhů je i střevlička východní (*Pseudorasbora parva*). Kromě toho je střevlička fakultativní parazit, napadající jiné druhy ryb, kterým

poškozuje epitel i hlubší vrstvy kůže a břišní stěnu (Libosvářský et al. 1990). Silně též ovlivňuje populace zooplanktonu i zoobentosu, což dále negativně ovlivňuje environmentální podmínky vod. V rybnících se střevličkou došlo ke snížení početnosti původních druhů ryb, například perlína ostrobřichého (*Scardinius erythrophthalmus*), karase obecného (*Carassius carassius*), hořavky hořké (*Rhodeus amarus*), hrouzka obecného (*Gobio gobio*) nebo slunky obecné (*Leucaspis delineatus*) (Mlíkovský et al. 2006).

2.4.4 Obojživelníci

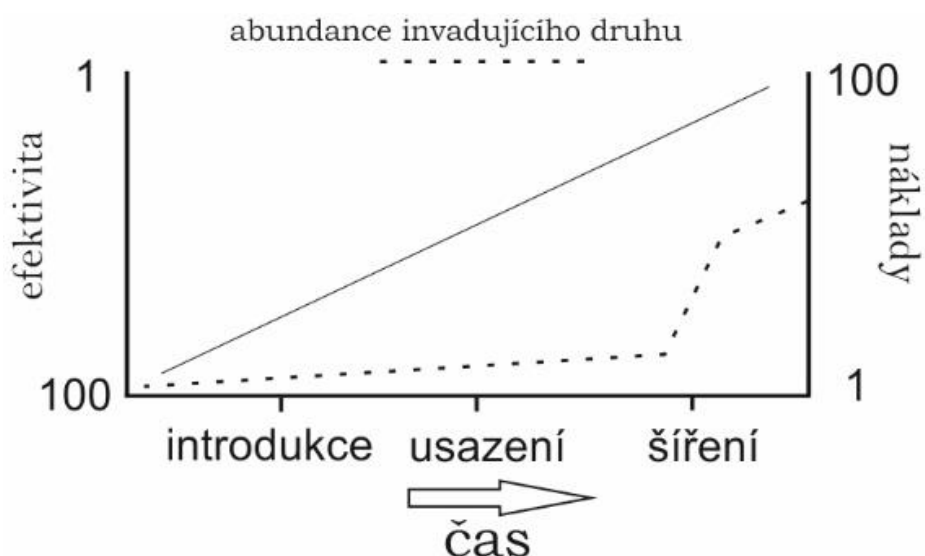
V rámci obojživelníků nejsilnější dopad na původní ekosystémy způsobili a působí především ropucha obrovská (*Rhinella marina*) a skokan volský (*Lithobates catesbeianus*) (Pitt et al. 2005). Jedna z největších žab světa, původně jihoamerická ropucha obrovská, byla dovezena do Austrálie, kde po úniku do volné přírody konkuruje místním druhům (Williamson 1999) i přímo původní druhy, a to včetně drobnějších obratlovců, preduje (Boland 2004). Velké nebezpečí ropuchy obrovské spočívá v tom, že v rámci invadovaných ekosystémů působí nejen na spodní patra trofické pyramidy, ale i směrem vzhůru – predátoři, kteří ropuchu loví, jsou často otráveni silným jedem ropuchy (McCoid 1995). Tyto žáby mohou působit i socio-ekonomické škody, kdy díky své biomase a jedovatosti mohou znečistit vodní zdroje (McCoid 1995). Skokan volský je též zodpovědný za významné ekologické škody, protože je vysoce mobilní, vykazuje široké potravní spektrum a vysokou plodnost (Moyle 1973). Z řady míst, kde unikl do volné přírody, jsou známy případy vymizení jiných druhů obojživelníků, jako následek přímé predace nebo kvůli intenzivní konkurenci (Kats et Ferrer 2003). Podstatné je i prokázané zesilování jiných negativních (abiotických i biotických) faktorů na lokalitách s přítomností tohoto druhu (Boone et al. 2007). V rámci České republiky problémy s nepůvodními druhy obojživelníků v současnosti nejsou, jejich výskyt ve volné přírodě ČR je zejména díky cyklickým annuálním změnám pouze epizodický (Moravec 2006).

2.4.5 Plazi

Jediný z plazů, který se dostal na seznam 100 nejhorších invazních druhů světa (Lowe et al. 2000), je želva nádherná. Její nebezpečnost pro domácí druhy sladkovodních želv spočívá v komplexní konkurenci, díky značnému překryvu nik (Cadi & Joly 2003, Cadi & Joly 2004). Jako predátor se ovšem může podílet na lokálním úbytku domácí fauny bezobratlých, ryb a obojživelníků (Moravec 2006). Též je jedním z možných přenašečů bakterií např. rodu *Salmonella* (Nagano et al. 2006).

2.5 Snižování negativních dopadů invazí a jejich předcházení

Stadiu invaze bychom měli přizpůsobit i ochranné akce, při nichž by na prvním místě měla stát (1) Prevence, kdy na základě dostupných informací, ať už zkušeností (Parrot et al. 2009) nebo modelováním (Gallardo et Aldridge 2013) se vytipují druhy, které by se potenciálně mohly stát invazními, pokud by jim bylo umožněno dostat se do volné přírody. Někdy se vzhledem k nedostatku informací o biologii daných druhů využívá odhadu expertů, často specificky koordinovaného (Sutherland et al. 2011). Proti dovozu, šíření, případně introdukci těchto druhů jsou pak podnikána specifická opatření. Prevence je velmi důležitým nástrojem při zamezování invazí nepůvodních druhů, a to zejména kvůli své efektivitě a zároveň nízkým nákladům (Mack et al. 2000, Thuiller et al. 2005, Keller et al. 2008) (Obr. 4).



Obr. 4. Schéma nákladů a efektivity opatření proti postupující invazi (Kopecký, upraveno dle Hulme 2006)

Prevence je i velice specifická vzhledem k nutnosti převést vytipované potenciálně invazní druhy z akademické sféry do sféry ochranné, a tedy do sféry veřejného zájmu (Mackay et al. 2017). Vzhledem k tomu, že lidé jsou primárním vektorem šíření nepůvodních organismů, vytipování možností vstupu druhů na nové území a jejich následná kontrola, tj. kontrola dané lidské činnosti, jsou nejlepší možnou strategií prevence (Hulme 2006). Negativní dopady invazí rostou s početností a hustotou výskytu nepůvodního druhu (Simberloff et al. 2013), a tak zamezení nárůstu této početnosti by mělo být primárním cílem.

Velmi důležitou součástí této fáze předcházení invazím nepůvodních druhů organismů by měla být též osvěta, tedy šířit jednoznačné, a jednoduché zprávy mezi širokou veřejností a tím ovlivňovat jednání lidí (McNeely 2001).

Pokud i přes snahu o maximální preventivní předcházení invazi, dojde k vypouštění/úniku potenciálně nebezpečného druhu, nejlepší možnou reakcí je co nejrychlejší (2) Eradikace (Wittenberg et Cock 2001). Klíčovým problémem však je, že na počátku invazního procesu bývají abundance druhu nízké a jeho výskyt omezen. Z toho důvodu je i velmi těžké jej zachytit, což platí i ve státech s profesionálně organizovaným monitoringem přírody (Van Strien et al. 1997). Osvětové akce mohou mobilizovat velké množství nadšených dobrovolníků k hledání nepůvodních druhů na rozsáhlých plochách, ovšem velkým problémem je zde fenomén označovaný jako “střelba do vlastních řad – friendly fire“ tj. psychologicky podmíněná snaha nalézt to, co má být nalezeno, a z této snahy plynoucí záměny s původními druhy (Lepczyk 2005). Například vyhodnocení eradikační akce dobrovolníků zaměřené proti ropuše obrovské (*Rhinella marina*) z území Austrálie, dobrovolníky odhalilo až 43% pravděpodobnost záměny s domácími druhy (často velmi nepočetných) žab (Samaweera et al. 2010). Nicméně pro hledání druhů jednoznačně odlišitelných je aktivizace a využití veřejnosti velmi vhodnou volbou. Cílený monitoring může být zaveden na lokality, které jako místa potenciálního výskytu vzešly z prediktivních modelů.

Někdy ani v případě včasného nálezu nepůvodního druhu není jeho (okamžitá) eradikace možná, v takovém případě je nutné přistoupit ke strategii (3) containmentu a kontroly, kdy nepůvodní druh je uzavřen v určité oblasti (Hulme 2006).

3 Možnosti hodnocení invazního potenciálu

Potenciální invaze určitého druhu se dá předpovědět zejména na základě znalosti jeho: životní historie (Pheloung et al. 1999, Bomford 2003); biotických (Strauss et al. 2006); a abiotických

nároků spolu s vyjádřením hodnot těchto faktorů v potenciálně invadovaném území (Thuiler et al. 2005, Bomford et al. 2009, van Wilgen et al. 2009); introdukčního tlaku, tedy množství jedinců, kteří se mohou dostat nebo se dostávají na nová území (Simberloff 2009). Ze znalosti nebo odhadu těchto čtyř charakteristik vychází soudobé modely snažící se o vyjádření rizika usazení nebo přímo invaze hodnocených druhů.

3.1 Aquatic Species Invasiveness Screening Kit (AS-ISK)

Je nástrojem pro odhad invazivity druhů žijících ve vodním prostředí, a to na základě vyplnění dotazníkové aplikace v rozhraní Microsoft Excel (Copp et al. 2016). AS-ISK v2 vychází ze základů Weed Risk Assessment (WRA), který byl vyvinut pro hodnocení invazivity rostlin v oblasti Austrálie (Pheloung et al. 1999). AS-ISK je z uvedených uživatelsky nejpříjemnějším nástrojem, vyžaduje pouze co nejdětaálnější znalosti o hodnoceném druhu. Další z jeho výhod je dostupnost české jazykové verze (Kopecký 2018). Program obsahuje 55 otázek. Otázky jsou rozděleny do sekcí: historie/biogeografie; biologie/ekologie; nežádoucí vlastnosti; klimatická změna. Program nevychází z matematického základu, ale z empirického ohodnocení závažnosti jednotlivých odpovědí, které jsou vyjádřeny bodovou hodnotou. Program automaticky uživateli předkládá možné odpovědi (nejčastěji ANO/NE) se čtyřstupňovou korekcí na míru jistoty vyplňované otázky (nízká, střední, vysoká, velmi vysoká) (Obr. 5). Míra jistoty je velmi vhodnou úpravou, protože ne vždy jsou veškeré detaily z života hodnoceného organismu známe nebo publikované, a bodová závažnost takové odpovědi je pak programem snížena.

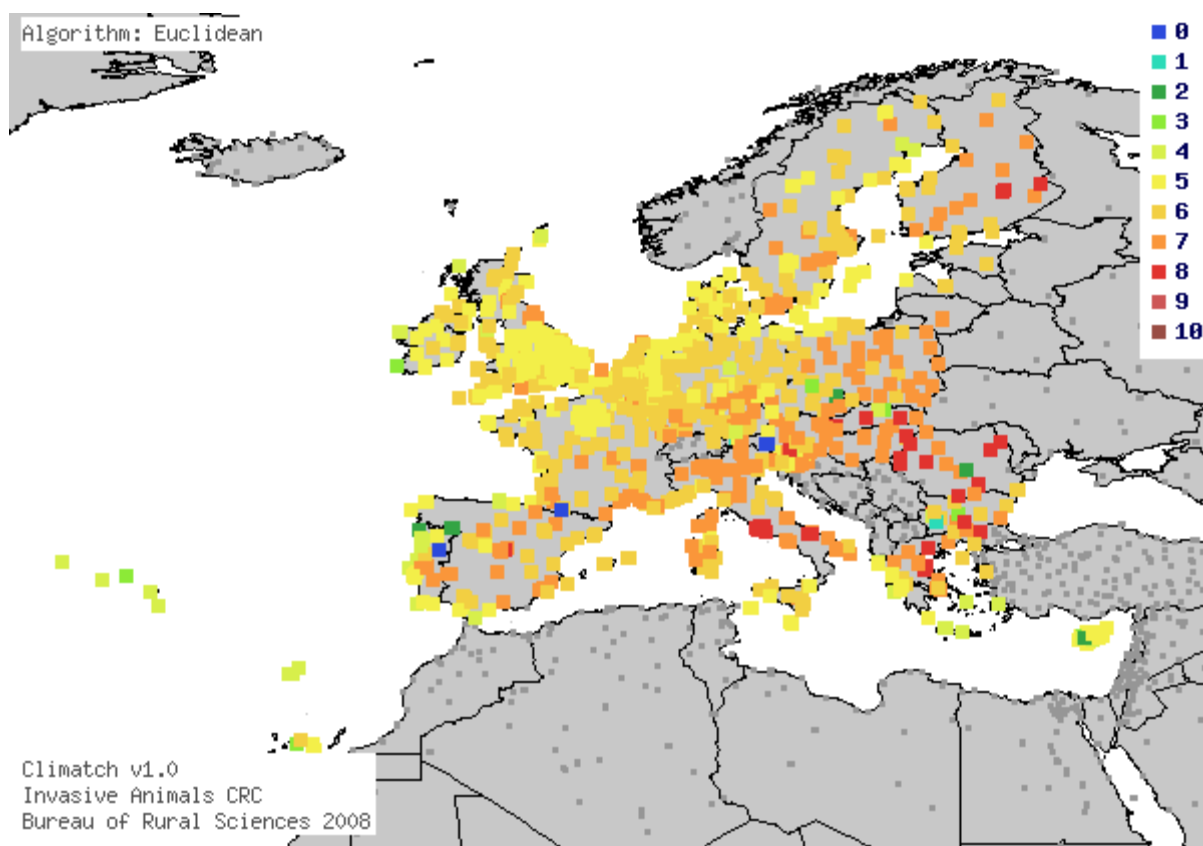
Obr. 5. Rozhraní programu AS-ISK v2 (Copp et al. 2016) v české jazykové verzi s rozvinutým výběrem možností míry jistoty pro danou odpověď

Kalibrace prvních verzí probíhala dle hodnocení stejných organizmů různými experty na danou taxonomickou skupinu nezávisle na sobě (Pheloung et al. 1999, Copp et al. 2005b) a až následně byla statisticky prověřována správnost dělení do kategorií rizikovosti (low, medium, high) pomocí ROC analýz (Tricarico et al. 2010). Výsledným výstupem programu AS-ISK je tabulka aplikace Microsoft Excel s bodovým hodnocením na škále od -20 do 68 bodů, kdy vyšší skóre značí vyšší riziko invaze. Tabulka obsahuje i bodový rozpis jednotlivých sekcí (historie/biogeografie; biologie/ekologie; nežádoucí vlastnosti; klimatická změna) k celkovému skóre.

Ač je program koncipován pro vodní organizmy, většina otázek má obecnou platnost. U nabízených odpovědí je vždy jednou z možností „*not applicable*“, a pokud je tato možnost vybrána pro otázky, týkající se vodního prostředí, je možné AS-ISK využít i k relativnímu porovnání invazivity suchozemských organizmů.

3.2 Risk Assessment Model (RAM)

Risk Assessment Model je postup hodnocení potenciálu usazení (*establishment*) a byl vyvinut zejména pro čtyřnohé obratlovce (Tetrapoda) (Bomford 2008). Matematickým základem modelu jsou zobecněné smíšené aditivní modely (GAMM) (Bomford et al. 2009). Model vychází z několika proměnných: *Climate 6 value*, *prop.species value*, *family random effect*, *jurisdiction score*. Prvním krokem při práci s tímto modelem je zjištění klimatické shodnosti. Klimatická shodnost je posuzována pomocí programu Climatch v.1.0, vyvinutého jedním z oddělení australského ministerstva zemědělství a vodních zdrojů (Bureau of Rural Sciences 2008). V tomto programu volíme na jedné straně původní areál, resp. označujeme klimatické stanice v tomto areálu. Na druhé straně pak volíme rozsah cílové oblasti (pro níž hodnotíme riziko usazení). V programu obsažené klimatické stanice sledují 16 klimatických vlastností (roční úhrn srážek, průměrná roční teplota, průměrná teplota v nejteplejším měsíci,...). Můžeme tedy zvolit, na jakém základě budeme sledovat klimatickou shodnost původního a potenciálního nepůvodního areálu. Výsledek tohoto prvního kroku je rozčlenění stanic dle shodnosti vyjádřené na škále od 1 (nejnižší klimatická shodnost) až do 10 (nejvyšší klimatická shodnost). Stanice s hodnotou šest a vyšší jsou považovány za území, které by druh potenciálně mohl obsadit; získáváme tak první proměnnou modelu *Climate 6*, která v modelu reprezentuje abiotické faktory (Obr. 6).



Obr. 6. Ukázka grafického výstupu z programu Climatch v1.0. Klimatická shodnost původního areálu s územím Evropské unie pro druh kajmanka dravá (*Chelydra serpentina*) pro jednotlivé klimatické stanice (Kopecký et al. 2013).

Charakteristiky biologie a biotických faktorů reprezentují v modelu hodnoty *prop.species* a *family random effect*. *Prop.species* je podílem počet států kde se druh úspěšně usadil z celkového počtu států, kde se objevil ve volné přírodě. *Family random effect* pak v modelu zastupuje robustní prvek, který operuje s rozdíly v nevysvětlené variabilitě úspěšných usazení po zohlednění biologie druhů. Některé čeledi totiž mají velmi kompaktní výsledky pro usazení jejich příslušníků, u jiných naopak existuje velká variabilita v úspěchu usazení mezi jednotlivými druhy nebo rody. Posledním faktorem je pak *jurisdiction score*, která je v modelu vyjádřena konstantou reprezentující “vstřícnost” daného státu pro hodnocenou skupinu. Je tedy složena jak z abiotických faktorů nevysvětlených hodnotou *Climate 6* tak i ze složení společenstev, které svou strukturou mohou buď facilitovat nebo inhibovat usazení hodnoceného druhu. Původní model vypracovaný pro tři státy (Velká Británie, Kalifornie, Florida) a 596 druhů ze 45 čeledí je možné jednoduše upravit dosazováním konstant a výpočtem originálního průniku klimatické shodnosti pro nově hodnocené druhy (Bomford 2008). Rozepsání vzorce originálního modelu lze jednoduše provést v rozhraní Microsoft Excel, které při zadání logického řetězce po doplnění hodnot rovnou generuje výslednou hodnotu pro možnost usazení. Ta se pohybuje na škále od 0 do 1, kde vyšší hodnota značí vyšší pravděpodobnost usazení, která je rozčleněna do čtyř kategorií (low, moderate, serious, extreme).

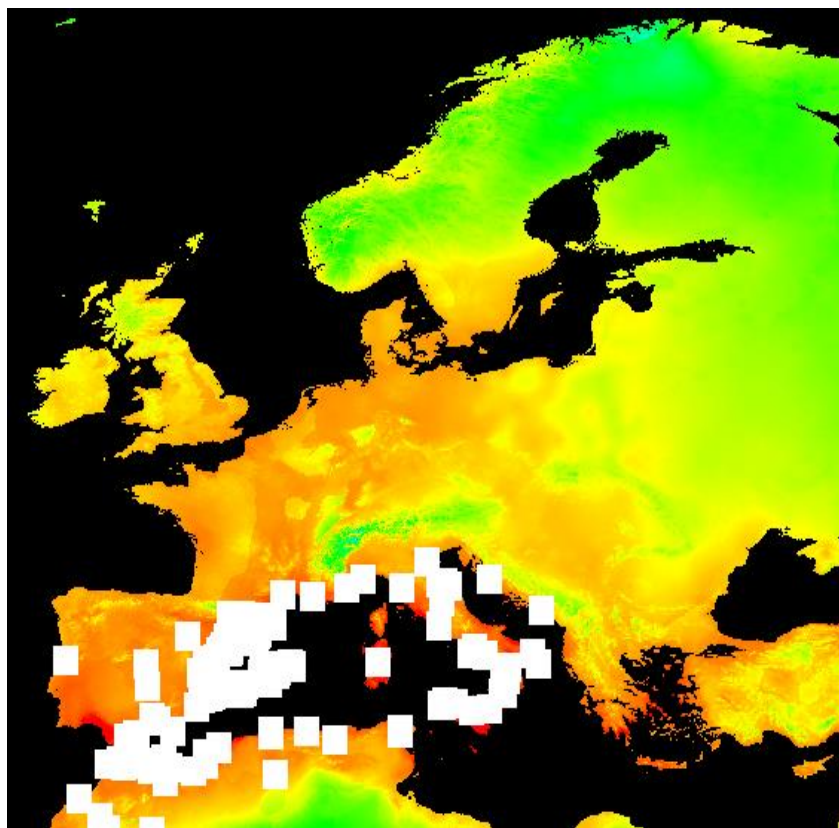
3.3 Maximum Entropy Modeling (Maxent)

Program MaxEnt (Phillips 2005) se stal jedním z hojně využívaných predikčních nástrojů v ekologii napříč biotopy (Blank et Blaustein 2012, Oberdorff et al. 2015, Vogler et al. 2013). Je založený na principu maximální entropie, modelující rozšíření druhů na základě environmentálních nebo klimatických dat a prezenčních dat lokalit výskytu druhu. Výstupem

je pravděpodobnostní model přítomnosti nebo hustoty zastoupení druhu (Merow et al. 2013). MaxEnt porovnává environmentální a klimatické proměnné, které jsou připraveny do jednoho rastru se stejným rozlišením pro celou síť buněk, se souřadnicemi výskytu druhu a s vyznačenou oblastí pro predikci rozšíření. Výstupem je pravděpodobnostní mapa založená na maximálním odhadu hustoty entropie v geografickém prostoru, kdy pro každou buňku je stejná pravděpodobnost výskytu druhu, ale limitujícím faktorem jsou environmentální či klimatické proměnné (Phillips et Dudík 2008, Merow et al., 2013) (Obr. 7).

MaxEnt v.3.4.1 lze volně stáhnout ve formě aplikace Java (https://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent; Phillips 2005) či přidat do nástrojů programu ArcGIS. Pro úpravu environmentálních a klimatických vrstev do rastru lze využít bezplatné verze DIVA – GIS (Phillips 2005, Hijmans et al. 2012). Jednou z nevýhod pro české uživatele je nedostupnost české verze programu. Slabinou je také predikce pouze na základě abiotických faktorů, pro něž existují rastrované informační vrstvy.

Pro modelování ve velkých měřítkách jsou k dispozici datové vrstvy abiotických faktorů, jako například výškový profil (eea.europa.eu), maximální, minimální a průměrné teploty či srážky nebo solární radiace. Dále jsou k dispozici i data upravená do bioklimatických faktorů jako je nejnižší teplota nejstudenějšího měsíce či srážky v nejsušším měsíci (worldclim.org). Tyto faktory mohou působit limitně na potencionální rozšiřování modelovaného druhu. Data z těchto volně dostupných zdrojů k dispozici v rozsahu celé planety a jsou vhodná na modelování v měřítkách kontinentů nebo celých států, kde jejich vyšší rozlišení (cca 1 x 1 km na jeden pixel v rastru) není na závadu. Avšak při modelování na menší území, jako jsou například jednotlivé chráněné oblasti, již toto měřítko není vhodné. Zde nastává problém se získáním datových sad s potřebným detailem (rozlišením). Pokud tato data již existují, většinou je možné je získat za poplatek od státních institucí (ČÚZK, VÚV v.v.i., ČGS, ČHMÚ v.v.i., VÚMOP v.v.i. a další).



Obr. 7. Výsledný výstup programu MaxEnt 3.4.1 - pravděpodobnostní mapa výskytu druhu. Čím tepleji zabarvenější barva, tím je na daném území větší pravděpodobnost výskytu druhu.

3.4 Boosted Regression Trees (BRT)

Tento přístup je obecným statistickým postupem, který je možné využít k řešení celé škály otázek (Leathwick et al. 2006). Metoda kombinuje dva přístupy: regresní stromy (*regression trees*) a boosting (“posílení”). Regresní strom popisuje závislou proměnou pomocí série dichotomických rozhodnutí, boosting následně pomocí velkého počtu opakované stavby různých stromů testuje a následně posiluje místa v modelu, která vložená data nejhůře prokládala. Výhodou tohoto přístupu je, že díky boostingu pracuje i s proměnnými, pro něž nejsou sebraná všechna data a dokáže kombinovat netransformovaná data s nenormálním rozdělením s kategoriálními proměnnými (Elith et al. 2008).

Této metody bylo použito k vytvoření modelu, jehož výstupem je odhad invazní schopnosti obojživelníků a plazů (Wilgen et Richardson 2012). Autoři, vycházeli z hlavních charakteristik těchto taxonomických skupin, které usnadňují jejich invaze (fylogenetická vzdálenost všem původním druhům, klimatická shodnost, počet snůšek za rok, věk dosažení pohlavní dospělosti, průměrná velikost snůšku/počet mláďat, počet introdukcí) použitím BRT seřadili jejich důležitost, vyjádřenou v závěrečném modelu hodnotou různě vysokého koeficientu. Koncový uživatel modelu tak pouze do tabulky aplikace Microsoft Excel doplňuje údaje o jednotlivých druzích, které zjistil předchozí rešerší literárních údajů (Obr. 8). Výsledkem je jediné číslo s rozsahem od nula do deseti, které se s přihlédnutím k hodnocenému řádu (krokodýli, želvy, ocasatí obojživelníci,...) dá převést na jednoslovné vyjádření míry invazní nebezpečnosti hodnoceného druhu pro dané území. Podobný postup lze aplikovat i na další taxonomické skupiny, ovšem již s nutností disponovat pokročilými statistickými znalostmi.

Species name						
Discrepancy between score 1 and 2			-0,415			
		Range of possible answers	Score	Standardised score	Weight	Final score
Route 1						
Number	Question	Range of possible answers	Score	Standardised score	Weight	Final score
		Categorical variable: Crocodile, lizard, snake, turtle, salamander, frog	-			-
1	What is the species life form?					
2	What is the average climate match for the species across the area of interest?	Continuous variable between 0 and 1		1	0,115	0,115
3	If phylogeny available, what is the phylogenetic distance to the species nearest native relative?	Continuous variable > 0		0	0,135	0
4	If phylogeny available, what is the average phylogenetic distance to all native taxa in its class?	Continuous variable > 0		0	0,145	0
6	How many introductions will be made over the next five years? Assume number of introductions over the next five years is 5, unless information available	Integer variable greater than or equal to 1. Scores 7 or higher maximize the effect of this variable.		0	0,4	0
7	At what age (in months) does the species reach reproductive maturity?	Continuous variable > 0, probably not greater than 144		10	0,145	1,45
8	How many clutches of eggs or young does the species produce per year?	Continuous variable >0 and probably not greater than 18		1	0,06	0,06
TOTAL SCORE						1,625
Route 2						
Instructions		1. Model questions	2. Standardised scores	3. Interpretation	4. Basis data for sheet 3	+

Obr. 8. Finální rozhraní pro uživatele tohoto přístupu může být vytvořeno i jednoduše v rámci programu Excel (Wilgen et Richardson 2012)

4 Metoda třístupňové identifikace nepůvodních vodních organismů

Stejně jako biologická invaze je i postup určování nepůvodních druhů organismů hierarchický proces. Prvním krokem je vytipování těch organismů, které mají největší šanci na usazení/invazi v rámci určeného území (České republiky), a je tedy nutné vypracovat jejich seznam. Následně se o druzích získá maximum detailů, zejména z oblasti morfologie, vnitrodruhové variability a genetiky. Tyto vlastnosti se následně využijí jako podklady pro odlišení vybraných druhů od druhů ostatních.

4.1 Výběr druhů zařazených v metodice

Druhy zařazené do metodiky byly vybrány několikastupňovým výběrem. Nejprve byl vytvořen seznam druhů na základě různých literárních zdrojů (Mlíkovský et al. 2006; Pergl et al. 2016; Kopecký et al. 2016; Arena et al. 2012; Lorencová et al. 2015; Patoka et al. 2017; Patoka et al. 2014; Kalous et al. 2015; Musil et al. 2010; Jurajda et al. 2016). Tento prvotní seznam nebyl striktně limitovaný výskytem druhu na území ČR. Takto vytvořený seznam byl prezentován na několika národních odborných konferencích (Česká limnologická konference, Konference zoologické dny, Česká rybářská a ichtyologická konference - RybÍkon) formou posteru. Účastníci konference byli vyzváni k doplnění nebo naopak k vyškrtnutí některého z uvedených druhů a vložení svého návrhu formou doporučení do boxu připevněného k posteru. Během konferencí probíhaly také neformální osobní konzultace a diskuze nad zařazením či vyškrtnutím jednotlivých druhů. Názory odborné veřejnosti byly vyhodnoceny členy řešitelského týmu a byl sestaven seznam navrhovaných změn. Tyto návrhy byly poté konzultovány s vybranými specialisty na jednotlivé skupiny organismů. Na základě jejich doporučení se pak seznam finalizoval v rámci diskuze členů řešitelského týmu.

4.2 Metodika vypracování univerzálního heslovitého postupu identifikace

Klasický identifikační klíč pro jakoukoliv skupinu organismů pracuje nejčastěji na principu dichotomického rozhodování. Klíče obvykle svým rozsahem postihují jasně vymezenou a druhově nepřiliš početnou taxonomickou skupinu, např. kytovce celého světa (Jefferson et al. 1993), případně více taxonomických skupin se stejnou prostorovou příslušností, např. klíč našich obratlovců (Štěpánek 1950). Nejčastějším případem pak je dvojí vymezení, tj. jak prostorem, tak taxonomickou příslušností, např. klíč váček České republiky (Dolný et al. 2016). Ve výše uvedených případech existuje omezené množství organismů a tím pádem i morfologických znaků, dle nichž je lze klasifikovat a určovat. Ve specifickém případě, jenž pokrývá text této metodiky, ale často musíme rezignovat na znalost nebo dokonce i možnost reálného prověření prostorového původu organismu. Pokud stojíme před nutností určit organismus z volné přírody, o kterém je známo, že je nepůvodní nebo se jedná např. o organismus v obchodní zásilce (země původu záсылky se nemusí shodovat s původním areálem organismu), pak jediným vodítkem může být zařazení organismu do některé z vyšších taxonomických úrovní (čeleď, řád, třída apod.). Musíme tedy následně být schopni daný organismus odlišit od potenciálně zaměnitelných všech dalších příslušníků dané taxonomické úrovně. Metodou, která v sobě kombinuje výlučnost dichotomických znaků klasických klíčů a popis organismu, je souhrn diagnostických tvrzení - má/nemá.

Ukázka tohoto postupu při určení druhu axolotl skvrnitý (*Ambystoma maculatum*): Axolotl skvrnitý patří mezi ocasaté obojživelníky (Caudata). Velice lehce ho odlišíme od jiných řádů obojživelníků dle kombinace přítomnosti končetin (ty chybí červorům - Gymnophiona) a přítomnosti ocasu (ten chybí žábám - Anura). Od plazů ještěrkovitěho tělního typu (Sauria) ho odlišíme dle absence šupin. Vycházíme tedy z příslušnosti k danému řádu Caudata; ten zahrnuje 10 čeledí, samotná čeleď axolotlovitých pak obsahuje 32 druhů, které všechny patří do stejného rodu *Ambystoma*. V rámci rodu je tento druh možné identifikovat na základě osmi diagnostických tvrzení:

- Nemá ocasní ani hřbetní hřebeny

Tento znak odlišuje axolotla skvrnitěho od příslušníků čeledi mlokovitých (Salamandridae), konkrétně některých rodů z podčeledi Pleurodelinae, jejichž samcům narůstají tyto hřebeny v období rozmnožování

- Má na bocích viditelné žebrování (rýhy)

Tento znak odlišuje axolotla skvrnitěho od příslušníků čeledi mlokovitých (Salamandridae), konkrétně některých rodů z podčeledi Pleurodelinae, jejichž samcům nenarůstají hřebeny v období rozmnožování

- Nemá rýhy v oblasti nozder

Tento znak odlišuje axolotla skvrnitého od příslušníků čeledi Plethodontidae

- Nemá příušní žlázy (parotidy)

Tento znak odlišuje axolotla skvrnitého od příslušníků čeledi mlokovitých (Salamandridae), konkrétně některých rodů z podčeledi Salamandrinae a od příslušníků rodu *Tylotriton* (Salamandridae)

- Přední končetiny mají čtyři prsty, zadní končetiny mají pět prstů

Tento znak odlišuje axolotla skvrnitého od čeledí Amphiumidae, Proteidae, Sirenidae a některých jednotlivých rodů napříč řádem

- Světlé kruhové skvrny jsou pouze na hřbetě (svrchní strana těla) a vždy ve dvou řadách

Nejsilnější diagnostický znak axolotla skvrnitého, který ho odlišuje od příslušníků čeledí Cryptobranchidae, Dicamptodontidae, Hynobiidae, Rhyacotritonidae a zároveň od ostatních příslušníků rodu *Ambystoma*

- Nemá plovací blány na předních ani zadních končetinách

Tento znak odlišuje axolotla skvrnitého od některých příslušníků čeledi Plethodontidae a od příslušníků čeledi mlokovitých (Salamandridae), konkrétně některých rodů z podčeledi Pleurodelinae, jejichž samcům narůstají plovací blány v období rozmnožování

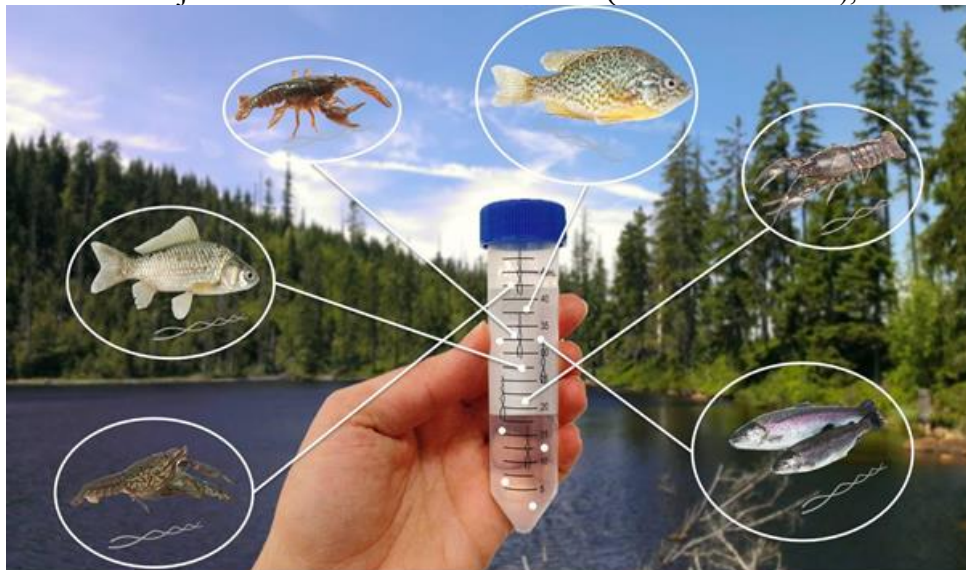
- V dospělosti nemá vnější keříčkovité žábry

Tento znak odlišuje axolotla skvrnitého od čeledí Sirenidae, Proteidae a některých jednotlivých rodů napříč řádem

Pro doplnění informací po ověření uvedených diagnostických tvrzení je uvedená i celková velikost organismu a v odůvodněných případech (např. když diagnostické znaky jsou na různých místech těla, které nemůže postihnout jediná fotografie, popř. když daný organizmus má více forem či barevných mutací) i další fotografie. Vzhledem k podstatě biologických objektů a jejich přirozené variabilitě je nutná rovněž zkušenost determinátora spojená s určitým stupněm odborné erudice.

4.3 Identifikace pomocí environmentální DNA (eDNA)

Organismy zanechávají stopy své přítomnosti všude, kde se vyskytují, ve formě vyloučených nebo odloupených buněk. V každé z těchto buněk je obsažena jaderná i mitochondriální DNA. V nedávné době začaly být zkoumány způsoby, jak DNA dostupnou v prostředí, pro jejíž označení se ujal termín environmentální DNA (ve zkratce eDNA), vzorkovat (viz obrázek 9).



Obr. 9. Princip analýzy eDNA v grafické zkratce (Autor: Pavlína Kuříková)

Buňky a v nich obsažená DNA vstupují do životního prostředí různými cestami z těla živočicha, jako např. odlupováním kůže a jejích derivátů, vyměšováním, kdy jsou na exkrementy vázané buňky střevní výstelky, svlékáním kutikuly, při reprodukci, kdy je do prostředí při vnějším oplození uvolněno velké množství buněk, oddělením tkáně od těla v důsledku zranění, rozkladem mrtvého těla a ve formě exkrementů predatorních druhů, které organismus zkonsumovaly.

Dokud DNA v uvolněných buňkách nebo samostatně mimo mateřskou buňku přetrvává v životním prostředí, existuje možnost, jak přečíst sekvenci nukleotidů, ze kterých se skládá. Vlastní analýza eDNA je založena na pracovních postupech využívaných v molekulární genetice a její obecná metodologie se skládá z: **1) odběru vzorku, 2) extrakce DNA a 3) identifikace získané sekvence DNA**. Identifikace probíhá porovnáním získané sekvence eDNA se sekvencemi obsaženými například v databázi BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007) nebo Genbank (Benson et al. 2012). Pokud databáze obsahuje odpovídající referenční sekvenci, můžeme s určitou mírou pravděpodobnosti identifikovat její příslušnost k určitému taxonu (druhu, rodu), a tím určit taxonomickou příslušnost jedince, ze kterého se DNA uvolnila. Potvrzení výskytu určitého druhu na lokalitě je tak možné bez potřeby jeho fyzického odchyty (Ficetola et al. 2008). Analýza eDNA se dá ve zkratce také charakterizovat jako detekce druhově specifických fragmentů DNA v prostředí (Valentini et al. 2009; Lodge et al. 2012).

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se amplifikuje specifický úsek DNA, u živočichů nejčastěji úsek genu cytochrom oxidáza I (barcode) pomocí krátkého primeru, aby došlo k amplifikaci i degradované DNA (rozštěpané DNA na kratší kusy). Získaný produkt je poté podroben masivnímu sekvenování nové generace (Ruppert et al. 2019).

Environmentální metabarcoding může mít využití pro detekci vzácných druhů v prostředí s nízkou abundancí, také pro potvrzení existence domněle vymřelých druhů, nebo právě pro detekci invazních organismů (Rees et al. 2014; Xia et al. 2018). Díky metodám metabarcodování eDNA je možné z jednoho vzorku získat informace o celém ekosystému (McDevitt et al. 2019).

Ačkoliv již existují vědecké práce zabývající se např. identifikací ryb pomocí eDNA, (Jerde et al. 2011; Thomsen et al. 2012a), obojživelníků (Ficetola et al. 2008; Goldberg et al. 2011, Dejean et al. 2012; Bálint et al. 2018), plazů (Piaggio et al. 2014), ale i plžů (Goldberg et al. 2013) a mlžů (Egan et al. 2015; Clusa et al. 2017), rutinní používání eDNA pro monitoring organismů v terénu je z mnoha důvodů poměrně komplikované. Naše vlastní zkušenosti při testování eDNA získané ve volných vodách nejsou příliš slibné a identifikace prokazatelně přítomných druhů v lokalitě nebyla většinou úspěšná. Je to dáno více faktory, ale jedním z nich je i použití jednoduššího a levnějšího Sangerova sekvenování (Sanger et al. 1977).

Jedním z důležitých faktorů, který ovlivňuje přítomnost DNA v prostředí, je čas. Jakmile se část tkáně, buňka nebo samotná DNA dostanou do vodního prostředí, počínají rozkladné procesy působením řady mikroorganismů a enzymů přítomných ve vodě. Působí i další faktory, které ovlivňují rychlost rozpadu DNA, mezi které patří světlo, teplo, množství rozpuštěného kyslíku i samotná voda (resp. její chemické složení) (Lindahl 1993). Po určité době se degradované fragmenty DNA stanou příliš krátké na to, aby je bylo možné amplifikovat pomocí běžně používaných primerů. Identifikace tak není možná. Tento efekt jsme pozorovali v případě námi zprvu použitých primerů pro amplifikaci úseku mtDNA cyt b u karasa stříbřitého. Tato situace může přinést mylně negativní informaci o nepřítomnosti této ryby v daném prostředí. Například DNA mloka (*Salamandra salamandra*) nebyla detekovatelná již po týdnu v kontrolovaných laboratorních experimentech (Thomsen et al. 2012a). Zdá se také, že možnosti detekce eDNA jsou značně závislé na druhu organismu. Například DNA jeseterů (Acipenseridae) v případě odběru vzorků z malých rybníků byla detekovatelná až dva týdny (Dejean et al. 2012). Uvedené příklady zdůrazňují potřebu vyhodnotit účinnost metody detekce

pomocí eDNA v závislosti na prostředí a druhu. Je důležité pečlivě zvážit omezení a kontext při implementaci detekce přítomnosti určitého taxonu pomocí eDNA.

Pro zachycení eDNA z vodních systémů se používá více různých přístupů. Například lze DNA vysrážet za použití octanu sodného a etanolu (např. Ficetola et al. 2008). Další možností je centrifugace (např. Foote et al. 2012) anebo filtrace (např. Goldberg et al. 2011). Nicméně každá z uvedených metod má své nevýhody. Srážení a centrifugace omezují objem vzorku vody, filtrační metody nejsou vhodné pro vodu kalnou (Williams et al. 2017). Při testování odběru vzorků jsme se setkávali s přetrvávajícími technickými problémy především u filtrace. Testovali jsme použití konvenčního čerpadla, i přes velké množství alternativních nastavení filtračního systému se nám filtrace příliš nedařila a objem filtrované vody byl velmi malý (několik desítek ml). Jednoznačně tak můžeme doporučit speciální peristaltické pumpy, které však jsou finančně náročnější na pořízení. Pomocí nich je možné obvykle přefiltrovat několik litrů vody.

Na základě získaných informací můžeme doporučit cílený monitoring eDNA z volných vod pouze specialistům, kteří budou schopni celý proces komplexně zajistit od odběru vzorků až po interpretaci získaných dat.

Metabarcodingové analýzy jsou finančně velmi náročné, a to nejen na vlastní sekvenaci DNA (NGS - sekvenování nové generace), ale především na následující bioinformační analýzy spojené s vyhodnocováním obvykle ohromného množství získaných dat (metody NGS podrobně popisuje například Holubcová (2018)).

Podezření, že nějaký pozorovaný jedinec patří mezi nepůvodní organismy, je často spojeno s přítomností organismu již v člověkem kontrolovaných podmínkách (ryba ulovená rybářem, vodní organismy v transportních nádržích apod.). V takové případě je nasnadě odběr materiálu pro genetickou identifikaci, viz kapitola 6. Avšak odběr tkáně z organismu pro genetickou identifikaci není vždy možný. Například jsou organismy převáženy v uzavřeném prostředí transportních pytlů pod kyslíkovou atmosférou. Problém odběru tkáně u obratlovců je také spojený s problematikou týrání zvířat a takový odběr je možný pouze ve shodě se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání. Je potřeba také zmínit, že jakýkoliv odběr tkáně z živého organismu je invazní, může vést k jeho poškození a ohrožení zdraví.

Navrhli jsme a odzkoušeli metodu odběru a analýzy eDNA s cílem neinvazivní genetické identifikace organismů s využitím levnějšího Sangerova sekvenování. Tento přístup má své technické limity.

Odběr vzorku

Vodní organismy jsou převáženy nebo uchovávány ve vodě a odebraným vzorkem pro genetickou identifikační analýzu je voda. Aby byla DNA z vody izolována s větší pravděpodobností úspěchu, doporučujeme, aby byl organismus v prostoru s vodou optimálně šest hodin. Další důležitou podmínkou je, aby v uzavřeném prostoru byl ve vodě přítomen pouze jeden druh, a to s ohledem na cílenou amplifikaci specifického úseku DNA. V případě, že se společně ve vodě vyskytuje více druhů, je pravděpodobné, že dojde k izolaci DNA z obou druhů, což komplikuje (v případě použití Sangerova sekvenování) taxonomickou identifikaci. Při sekvenování nastává problém analogický čtení dvou informačních záznamů najednou přes sebe. Podobnost DNA více jedinců stejného druhu je velmi vysoká (rozdíl v řádu jednotek bazí), proto jejich současný výskyt ve vodě není pro genetickou identifikaci problém.

V případě převozu organismů v uzavřeném prostoru (obvykle polyethylenový pytel s kyslíkovou atmosférou) uzavřený kovovou sponou viz obrázek 10 C), doporučujeme odebírat vzorek 50 ml vody pomocí sterilní 50 ml injekční stříkačky a sterilní jehly o průměru 0,8 mm a délce 40 mm. Nejprve pytel otočte uzávěrem dolu na přibližně 10 minut. Poté odeberte vodu při poloze pytle na boku, viz obrázek BB. Penetrace jehly do vnitřního prostoru pytle musí být provedena prostředkem spony, která pytel uzavírá. Odebraný vzorek vody přestříknete ze

stříkačky do sterilní 50 ml kónické zkumavky (falkonky) a uzavřete, viz obrázek BE. Takto připravený vzorek vložte do 5°C optimálně do chladničky do doby izolace DNA ne na delší dobu než 24 hodin.

V případě odběru vzorku z otevřeného prostoru je vhodné vodu před odběrem promíchat pokud možno sterilním předmětem nebo rukou ve sterilní laboratorní rukavici. Odběr provedeme ponořením jedné čisté (nejlépe) sterilované lahve (0,5 l), několik cm pod hladinu vody. Takto připravený vzorek vložte do 5°C (optimálně do chladničky) do doby izolace DNA na dobu kratší než 24 hodin.

V případě využití komplexní služby genetické laboratoře zajistěte, aby byl vzorek udržován v chladu a izolace proběhla včas.

Extrakce DNA

V případě odběru vody z přepravního prostoru, kde je poměr vody vůči přepravovaným organismům obvykle mnohem nižší než ve volných vodách, je nejvhodnější využití níže popsanych postupů koncentrace vzorku. Koncentrace vzorku umožňuje jeho přípravu do formy použitelné pro extrakční metody. Metoda extrakce pak purifikuje DNA přítomnou v koncentrovaném vzorku. Extrakci doporučujeme provádět pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).

Doporučený postup při koncentraci pomocí centrifugace

Použít můžete různé typy centrifug, které umožňují vložení 50 ml falkonek, viz obrázek XE. Centrifugu nastavte na hodnotu RCF = 3220 g na 45 minut.

RCF (relative centrifugal force) je relativní centrifugační síla, která udává, kolikrát je odstředivé zrychlení vyšší než tíhové zrychlení ($g = 981 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-2}$). Podmínky centrifugace jsou tedy jasně popsány parametrem RCF uváděného v násobcích g, někdy uváděné jako (xg). V mnoha případech se však můžete setkat namísto RCF s udávaným počtem otáček za minutu (rpm). Hodnota rpm však není dostačující informace pro správné nastavení centrifugy a v tomto případě je nutné dopočítat RCF podle vzorečku $RCF = (1,118 \cdot \text{rpm}^2 \cdot r \cdot 10^{-5})$, kde rpm je počet otáček rotoru za minutu a r je poloměr rotoru v centimetrech.

Po 45 minutové centrifugaci odstraňte supernatant (horní vrstva, čirá část kapaliny ve falkonce až na úroveň 1,5 ml). Provedete to rychlým otočením falkony dnem vzhůru a zpět. Vzorek poté opět homogenizujeme na vortexu, nebo lépe přejetím vzorku po otvorech ve stojánku. Takto získaný vzorek lze dále fixovat absolutním čistým alkoholem, nebo podrobit přímé izolaci DNA.

Doporučený postup při koncentraci pomocí centrifugace s precipitací DNA

Pro vysrážení DNA použijte 50 ml falkonky, do kterých přidejte: 15 ml vzorku vody; 1,5 ml 3M octanu sodného (CH_3COONa ; pH 5,2) a 33 ml absolutního etanolu ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). Směs vložte do mrazáku (-20°C) na 12 hodin. Po 12 hodinách směs odstřed'te na centrifuze (RCF = 5500g, 35 min, 6 ° C). Po 35 minutách odstraňte celé množství supernatantu, na dně by měla zůstat sražená DNA spolu s odstředěným materiálem (peleta). Takto získanou peletu zalijte absolutním alkoholem.



Obr. 10. Odběr vzorku vody a jeho koncentrace. A – hermeticky uzavřený polyetylenový pytel s vodou injekční stříkačka, jehla a 50 ml kónická falkonka; B – odběr vody z polyetylenového pytle; C – detail odběru vody skrz sponu pomocí jehly; D – přestříknutí vzorku vody do falkonky; E – vkládání falkonek se vzorkem vody do centrifugy

5 Specifika vypracování univerzální identifikačního postupu dle taxonomických skupin

Znaky, které jsou použity u jednotlivých skupin, jsou ty, na které je potřeba se zaměřit nejen při samotném poznávání, ale i v případě, kdy budeme žádat o určení organismu někoho jiného. Pokud daného odborníka (viz kapitola 6.2) budeme kontaktovat emailem, je vhodné připojit nejen celkovou fotografii organismu, ale i detailnější snímky diagnosticky důležitých částí těla.

5.1 Mechovky

Bochnatka americká je živočich, který tvoří rozsáhlé kulovité kolonie s růžencovým seskupením zooidů neboli jedinců, kteří jsou přichycení na předmětech ponořených ve vodě, zejména na makrofytech. Pokud je kolonie mladá a nedosahuje velkých kulovitých rozměrů, lze ji zaměnit s našimi původními mechovkami.

5.2 Měkkýši

Pro morfologickou determinaci plžů i mlžů využíváme jejich schránky (u plžů ulity, u mlžů lastury), resp. jejich nepřítomnost (slimáci, plzáci). U některých druhů je determinace dle schránky nepřesná, proto se v tomto případě musí využít rozdílných znaků na pohlavní soustavě a zejména v poslední době i molekulárně-genetických metod. Při determinaci plžů položíme ulitu do základní polohy – vrcholem nahoru a ústím k pozorovateli, tato poloha je výchozí pro měření velikosti a šířky schránky, které jsou pro konkrétní druhy charakteristické. Dále je tato poloha výchozí pro určení pravotočivosti či levotočivosti ulity - při vedení pomyslné osy procházející vrcholem a píštělem (více či méně patrný útvar umístěný ze spodní strany ulity) je ústí ulity uloženo buď na pravé straně (pravotočivá) či na levé straně (levotočivá). U okružákovitých (Planorbidae) se zploštělým tvarem schránky není jednoduché určit vrchol, jejich schránka je pravotočivá a při určování bude ústí ulity na pravé straně od pomyslné osy. Dále se při morfologické determinaci soustředíme na další útvary, jakými jsou koutouč (tvar, výška, šířka), švy (ostrost švu, šířka závitů), počet závitů (tvar vrcholu), ústí a obústí (tvar, šířka), kýl (přítomnost či absence) a píštěl (viditelnost a šířka).

Schránka mlžů se skládá ze dvou částí – lastur, které jsou spojené vazem, někdy i zuby a zámky, jež mohou být determinačním znakem. Základní poloha pro určování mlžů dle lastur je vrcholem pravé lastury nahoru – vazem od vrcholu doprava. V této poloze je dobře patrný celkový tvar lastury, s posazením vrcholu, který je prvním determinačním znakem, a v této poloze můžeme snadno změřit výšku i šířku lastury. Na povrchu lastury si všímáme zbarvení a útvarů, jako je například žebrování (*Corbicula* sp.) – které je třeba odlišovat od jemnějších linií přírůstků (např. *Sphaerium* sp.) (Beran 1998, Horsák et al. 2013).

5.3 Korýši

V této metodice zmiňujeme tři řády korýšů: stejnonožce (např. beruška *Proasellus coxalis*), různonožce (např. blešivec velkohrbý) a desetinožce (raci a krab čínský). Jejich tělo je obvykle členěno na hlavohruď (někdy s rostem) a zadeček, někdy s různými modifikacemi, a je kryto inkrustovaným krunýřem. Raci mají kromě hlavohrudi a zadečku ještě ocasní ploutvičku, kdežto krabům se zadeček během ontogenetického vývoje stáčí pod hlavohruď a není svrchu patrný. U stejnonožců a různonožců se v první řadě pozorovatel soustředí na tvar částí těla a jeho zploštělost (dorsoventrálně zploštělé jsou např. beruška a laterálně (bočně) zploštělí jsou blešivci). Druhově specifickými znaky jsou tykadla (obrvení, délka) a kresby či výrůstky na různých částech těla. U raků jsou determinační znaky umístěny na hlavohrudi a klepetech (přítomnost a tvar výrůstků). Svrchní část hlavohrudi kryje tvrdý štít (karapax), jehož struktura i výrůstky jsou vázány k určitému druhu. Za hlavovou částí jsou kaudálně umístěné, tzv. žábrosrdeční švy, jejichž délka či mezera (areola) mezi nimi jsou též určující. Kraniálním směrem od karapaxu, nad hlavovou částí, je špičatý výběžek, tzv. rostrum, jehož délka, tvar či přítomnost výrůstků, jsou jedněmi z determinačních znaků. Dalšími znaky, na které by se měl pozorovatel soustředit, jsou tzv. postorbitální lišty, které se nacházejí za očima, a to v jednom nebo ve dvou párech.

5.4 Ryby

V rámci vytvoření identifikačního postupu byly vybrány charakteristiky pro jednotlivé čeledi ryb v rámci zjednodušeného určovacího systému, založeného na informacích, zdali jedinec má, či nemá určitý základní determinační znak. Pro identifikaci do nižší taxonomické jednotky byly vybrány další specifické znaky. Při určování do čeledi je důležité se zaměřit na celkový tvar těla, na to, zdali ryba má, či nemá tukovou ploutvičku, má jednu spojenou nebo rozdělenou hřbetní ploutev, jaké má paprsky v ploutvích, zdali má přítomny ostny, apod. V rámci jednotlivých rodů či druhů se pak soustředíme například na přítomnost či absenci vousků,

postavení oka, tvar hřbetní ploutve, výskyt nebo absenci barevných skvrn či kreseb případně převládající zbarvení živých jedinců.

V rámci focení exemplářů sloužící k identifikaci druhu by měla být ryba v pozici na boku. Pokud možno, měla by ležet na pravém boku (tj. fotografujeme pravý bok). Dále je potřeba dbát na to, aby bylo možné na fotografii vidět co nejvíce determinačních znaků. Případně je nutné nedobře viditelné znaky podrobně vyfotografovat zvlášť. Všechny ploutve by se měly fotografovat plně roztažené, fotografie tlamy musí zahrnovat detaily, jako například přítomnost vousků, zubů apod. Pokud to čas umožňuje, vyfotografujte rybě i hřbetní a břišní stranu těla. Rybu fotografujte na jednolitém pozadí nejlépe, středně světlém, nevýrazné (například modré) barvy (Tan 2014).

5.5 Obojživelníci

Mezi námi vytipovanými potenciálně invazními druhy se vyskytli zástupci dvou řádů (ocasatí – Caudata, žáby – Anura). Odlišení těchto řádů je velmi jednoduché na základě nepřítomnosti ocasu a výrazně delších zadních končetin u žab. Proto jsme vytipovali takové diagnostické znaky, které od sebe odliší pouze druhy v rámci (uvnitř) těchto řádů.

Při pořizování fotodokumentace za účelem určení třetí osobou se u žab zaměřujeme zejména na vyfotografování celkového tvaru těla shora, z boku i ze spodu, a to s takovým rozlišením, aby na snímku byla patrná textura pokožky. Hlavu stačí dokumentovat jedním snímek z profilu pod úhlem cca 30 stupňů. Detail hlavy by měl být ostrý, tak aby bylo možné poznat, jaký tvar má zornička, zdali je přítomen ušní bubínek a v jakém rozsahu (pokud) je přítomna příušní žláza (parotida). Dále se zaměříme na detaily rozsahu plovací blány na předních i zadních nohou, oblast patního hrbolu (drobný výstupek v oblasti paty) a konců prstů (zdali nejsou přítomny přísavné terčíky). Pokud zachytíme vokalizujícího samce, jako diagnostický znak lze použít i tvar rezonančního měchýřku, který se mu při volání napíná v oblasti hrdla, příp. koutků úst.

U ocasatých obojživelníků můžeme vynechat při fotografování detail předních končetin a snímek celého těla shora. Ostatní snímky těla pořizujeme stejně jako u žab. U fotografie boční strany těla je nutné, aby bylo patrné případné žebrovaní. Oblast hlavy je vhodné vyfotografovat i zepředu, tak aby byla zachycena přítomnost a tvar průběhu rýh v oblasti nozder.

5.6 Plazi

Mezi plazy s úzkou vazbou na vodní prostředí patří z invazně rizikových druhů zejména želvy. Případně odlišení příslušníků jiných řádů od sebe (šupinatí, haterie, krokodýli) je rovněž velmi snadné. První krokem při určování želv je pohled na tvar předních končetin. Ploutvovité končetiny mají příslušníci čeledí karetovití, kožatkovití a karetkovití. Většina diagnostických znaků želv se pak dá snadno nalézt přímo na krunýři, popřípadě na hlavě. Proto při nutnosti identifikace želvy třetí osobou vytvoříme minimálně tři snímky daného jedince: fotografii svrchní části krunýře (karapaxu), spodní části krunýře (plastronu) a hlavy.

Krunýř fotografujeme tak, aby na snímku byl patrný počet a tvar jednotlivých štítků. V případě plastronu je vhodné zvýraznit (např. tlakem prstů na příslušnou část), zdali má želva v této části těla tzv. švy, což jsou místa, podél nichž se plastron může ohýbat. Vhodné je také vyfotografovat přechod od plastronu ke karapaxu (profil), protože spojení těchto částí není u všech skupin zajištěno stejnými prvky. Snímek hlavy je dostatečný z profilu, pokud je želva v klidu a celá její hlava je vysunuta z krunýře. V případě, že chceme znát pohlaví želvy, je vhodné se zaměřit na inspekci oblasti kloaky (báze ocasu), předních končetin (délka drápů), zbarvení hlavy a vlnutí plastronu. Pohlavní dimorfismus vodních želv je patrný nejčastěji na těchto částech těla.

5.7 Rostliny

U rostlin nám pro jejich určení může pomoci i stanoviště, v našem případě si všímáme zejména, zdali je rostlina na souši či vodní hladině nebo ve vodním sloupci. Dále fotografujeme celkový habitus rostliny, pokud možno s okolní vegetací pro možné porovnání velikosti. V detailu se soustředíme na tvar listů, jejich nasedání na stonek. Pozor – rostlina může mít více typů listů, pokud ano, pak dokumentujeme všechny. To platí i pro květenství, které může být odlišně uspořádané v závislosti na pohlaví květů (samčí, samičí, oboupohlavní). Pokud je květ složený, fotografujeme nejprve květ celkově. Připojíme ovšem také detail, ideálně pořízený tak, aby bylo možno spočítat množství okvětních listů, tyčinek a blizen, které květ obsahuje.

6 Záznam a dokumentace nálezu organismu

Aby jakýkoliv nález organismu měl informační hodnotu, je v první řadě nutné tento organismus správně určit. Pokud na daný úkol stačíme svými aktuálními znalostmi, příp. s použitím příslušné literatury, můžeme přejít rovnou k druhému důležitému kroku, a tím je dokumentace nálezu. Dokumentaci nálezu je vhodné provádět i v případě správné identifikace nálezce na místě, z důvodu možného zpětného ověření záznamu, dalších analýz atd. V případě, že organismus schopní identifikovat nejsme, je dokumentace nálezu podkladem pro jeho určení třetí osobou.

Základem záznamu o nálezu o organismu je uvedení základních lokalizačních údajů:

1. Času nálezu – v formě standardních formátů datumu (den, měsíc, rok), v případě zajímavých okolností nálezu, např. nalezení denního druhu v noci, někdy je navíc vhodné zaznamenat i přesnější čas pozorování ve formátu hodina: minuta.
2. Místa nálezu – nejpresnější formou zápisu je záznam pomocí souřadnic GPS. Pokud je nemůžeme zaznamenat přímo na místě, je možné souřadnice určit poměrně přesně i zpětně, a to pomocí mnoha mapových serverů (např. www.mapy.cz). V případě nemožnosti určit přesnou lokalitu pomocí GPS, je standardním postupem uvést číslo faunistického čtverce (bližší viz Zicha 2019), určitě však nejbližší obec a další podrobnější popis (např. prostřední rybník v soustavě 500 m západně od obce Hrusice). Velmi může napomoci upřesnění lokality nálezu (např. zavrtán v písčitém dně mělké, prosluněné zátočiny).
3. Osoby, která nález uskutečnila – zejména kontaktních údajů. Uvedeme jméno, příjmení, název instituce zaměstnavatele, pokud byl nález učiněn v pracovní době, telefon, e-mail. V případě, že nález učinil někdo jiný, než kdo nález určil, uvádí se kontaktní údaje obou osob, tak aby bylo možné rozlišit jejich roli při nálezu.
4. Dalších okolností nálezu – uvedeme zejména takové okolnosti, které by mohly svědčit o již delší, případně potenciální budoucí přítomnosti organismu na lokalitě. Takové informace jsou např. počet pozorovaných jedinců, zdali jsme viděli mláďata, projevy rozmnožování, hnízda, nory atp. Pokud jsme přítomnost organismu poznali na základě nikoliv přímého pozorování, ale pobytových značek (stopy, okus, trus,...) uvedeme i tuto skutečnost. Dále můžeme uvést klimatické okolnosti nálezu (srážky, teplota,...).

6.1 Aplikace BioLog

Záznamy a dokumentaci nálezů i jejich následné zpracování podstatně zefektivňují databáze a jejich aplikace, v českém prostředí aplikace BioLog, která je součástí Informačního systému ochrany přírody, který provozuje Agentura ochrany přírody a krajiny ČR.

BioLog, je aplikace pro operační systém Android, dostupná v češtině a angličtině. BioLog slouží jako digitální záznamník pozorování fauny a flóry na území ČR. Zapisovat je možné všechny druhy živočichů, rostlin a hub vyskytující se ve střední Evropě. Z výše uvedených

prvků dokumentace automaticky řeší body 1 – čas nálezu (využívá čas zápisu), 2 – lokaci - (využívá polohu přístroje) a 3 – autorství (pokud je autor i zapisovatelem, je registrovaným uživatelem se známým kontaktem). Aplikace umožňuje k záznamu přidat fotografie i další poznámky (tedy naplnit bod 4). Mimo to umožňuje záznam provést i z fotografie v mobilním zařízení. V takovém případě převezme čas a lokaci z EXIF informací fotografie, přiřadí automaticky autora a ten doplní jen druhové jméno, popř. poznámky. Samotný zápis je možný i bez datového připojení, to je však vhodné pro zobrazení mapových podkladů (Google Maps). BioLog má i svou webovou podobu, která umožňuje dokumentaci provést i bez mobilního zařízení, samozřejmě bez výhod automatické lokace.

Po uložení je možné vybraná pozorování odeslat do databáze, která je dostupná na webu BioLoga (<https://biolog.nature.cz>). Z této databáze jsou pak data expertů převáděna přímo, v případě veřejnosti po revizi, do Nálezové databáze ochrany přírody (tedy národního systému pro data o výskytu druhů) spravované Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR. Data z aplikace je možné také exportovat pro vlastní využití a vyhodnocení ve formátu csv, případně přímo v aplikaci prohlížet.

Aplikace umožňuje také přímý pohled do aktuálních dat z obsahu celé Nálezové databáze pomocí funkce Mé okolí. Uživatel tak může získat přehled o známých druzích v zadaném území.

Pokud to umožňuje legislativa a kvalifikace osoby, která nález uskutečnila, je vhodné získání buď celého jedince, nebo alespoň části jeho tkáně pro následné určení pomocí genetických metod. Vhodným médiem pro takto odebraný vzorek je čistý alkohol (nedenaturovaný etanol), který by měl v nádobě převyšovat objem vzorku alespoň desetinásobně. Pokud okolnosti dovolí, odebereme z organismu více vzorků, a to pomocí čistých, sterilizovaných (například plamenem) nástrojů. Při odběru dbáme na to, aby se nám do nádobky pro uložení vzorku nepřimísil další organický materiál. Vzorek můžeme krátkodobě skladovat v lednici (teplota 4 °C), pro delší skladování je vhodné uchování v mrazicím boxu (- 20 °C).

Neméně důležitou částí dokumentace nálezu je pořízení fotografických snímků organismu. V kapitole 5. této Metodiky je popsáno, jaké části organismu je doporučeno fotografovat a jak. Tato doporučení jsou specifická pro jednotlivé skupiny. Technickou stránku pořízení fotografie přibližuje kapitola následující (6.1).

6.2 Základy fotografické dokumentace

Hlavním účelem fotodokumentace nepůvodních druhů je možnost jednoznačné identifikace konkrétního druhu organismu a potvrzení jeho výskytu na dané lokalitě. Fotografii v dostatečné kvalitě pro tento účel lze pořídit širokou škálou fotografické techniky, od drahých plnoformátových zrcadlovek, přes kompaktní fotoaparát až po levný „chytrý“ telefon.

S ohledem na účel fotodokumentace nepůvodních/invazních druhů je důležitou součástí finální fotografie detailní informace o místě zachytu organismu. U všech chytrých telefonů a části kompaktních i DSLR fotoaparátů je možné použít vestavěný přijímač GPS a zachytit aktuální polohu přímo do metadat (EXIF) digitálního snímku. V ostatních případech lze použít chytrý telefon na uložení pozice do mapy. Je možné využít i aplikace BioLog (kapitola 6. Záznamy a dokumentace nálezu organismu)

Vhodným nastavením fotoaparátu docílíme za daných světelných podmínek správně exponované fotografie. Obecně je vhodné vyhnout se pokud možno situacím s extrémními světelnými podmínkami (přímé polední slunce, silné bodové světlo z blízka či naopak příliš nízká intenzita světla). V běžných podmínkách (venkovní denní světlo či rovnoměrné umělé osvětlení z jednoho typu zdroje) nastavujeme zpravidla čas, clonu a hodnotu ISO (tzv. expoziční trojúhelník). Se snižujícím se množstvím dostupného světla jsme nuceni navýšit hodnotu ISO, snížit clonové číslo nebo prodloužit dobu expozice (čas). Trojici hodnot čas (Tv),

clona (Av) a ISO se snažíme u každého přístroje nastavit tak, abychom docílili ostrého, vyrovnaně exponovaného snímku s co nejnižší úrovní šumu. Zmíněné parametry samozřejmě není nutné nastavovat při použití mobilního telefonu či automatického režimu na fotoaparátu. Kontrolu nad nastavením v tom případě přebírají automatické funkce přístroje a je možné se soustředit pouze na kompozici (umístění či natočení organismu na výsledné fotografii), nasvícení a další doporučené kroky.

1. Čas – čím kratší expozice (kratší nastavený čas osvit), tím menší riziko pohybové neostrosti (třes našich rukou či pohyb snímaného organismu). Obecně platí pravidlo, že čím delší je ohnisková vzdálenost objektivu, tím kratší bychom měli nastavit čas expozice. Čas je ovšem z druhé strany silně limitován intenzitou světla. Při nízké intenzitě osvětlení jsme zpravidla nuceni použít delší expoziční čas, případně navýšit hodnotu ISO či snížit hodnotu clonového čísla (což není vhodné kvůli souvislosti s malou hloubkou ostrosti). Při nutnosti použít delší expozici, roste potřeba stabilizace. Ta je dnes často řešena jako přímá technická součást telefonu/fotoaparátu. Případně je možné využít příslušenství v podobě foto-stativu. Často ovšem stačí stabilizovat fotoaparát tím, že se sami opřeme o jakoukoliv pevnou oporu (nábytek, kmen stromu, parková lavička atp.), a tím dojde k dostatečnému snížení třesu našich rukou (platí i pro focení mobilním telefonem). Obecně lze doporučit minimální expoziční čas na úrovni desetin, lépe však setin vteřiny. Dle typu přístroje je čas zobrazen jako zlomek ($1/50$; $1/500$) či jako celé číslo (50; 500) s významem patřičného zlomku sekundy.
2. Clona – velikost otvoru, kterým světlo proniká na senzor (kinofilm), a ovlivňuje tak čas nutný k expozici a hlavně hloubku ostrosti (DOF). Ta určuje rozsah vzdálenosti nejbližšího a nejvzdálenějšího objektu od objektivu, které jsou na fotografii zachycené jako ostré. Nejedná se o pohybovou ne/ostrost, ale o zobrazovací limit použité optické soustavy. Čím vyšší je clonové číslo (větší zaclonění = menší clonový otvor), tím větší je hloubka ostrosti, a tím i šance, že bude celý organismus na fotografii ostrý. Pokud to náš přístroj umožňuje, snažíme se nastavit spíše vyšší clonová čísla (>5.6 u kompaktních fotoaparátů či >8 u aparátů s výměnnými objektivy). Předcházíme tak situaci, kdy by na výsledném snímku byla ostrá pouze část těla (v okolí ostřicího bodu) a zbytek by byl rozostřený (díky pozici mimo rovinu ostření).
3. ISO – určuje citlivost, s jakou světločivné buňky na digitálním senzoru reagují na intenzitu světla. Vyšší hodnota ISO nám tak umožňuje fotografovat při nižší intenzitě světla. Je to ovšem vykoupeno vyšší úrovní digitálního šumu, což je nutné individuálně zohlednit. Pro většinu dnešních přístrojů lze pro zachování dostatečné kvality snímku doporučit hodnotu ISO v rozmezí 100-1600. Dražší, resp. kvalitnější technika umožňuje bez větších problémů používat i hodnoty 3200-6400. Při vyšších hodnotách ISO již může být míra šumu limitující i pro úspěšnou determinaci organismu.

Alespoň na jedné z fotografií by tělo organismu mělo být vidět celé a pokud možno v přirozené poloze. Při držení organismu v ruce se snažíme, aby prsty nezasahovaly na snímku přes tělo a hlavně přes důležité determinační znaky. Pokud fotografujeme organismus umístěný na zemi, snažíme se vyhnout okolním rušivým prvkům, které by mohly zakrývat části těla (vyšší tráva, částečné zastínění, atp.). V ideálním případě fotografujeme organismus umístěný na jakékoliv improvizované (pokud možno matné) jednobarevné podložce s neutrální světlostí (ani příliš světlá ani příliš tmavá). Tím zajistíme dobrou viditelnost všech částí bez rušivého pozadí a zpravidla i správnou expozici pokud snímáme v automatickém režimu.

Skutečná velikost zachyceného objektu (organismu) může být na fotografii zkreslená. Snažíme se tak zachytit nějakým způsobem i měřítko velikosti. Pokud zrovna po ruce nemáme pravítko,

postačí pro potřeby pozdější identifikace zachytit s organismem nějaký drobný předmět denní potřeby o známé velikosti (zapalovač, tužka, mince atp.).

Pro účely identifikace je vhodné zachytit organismu tak, že jeho tělo (pokud možno v přirozené pozici) vyplňuje většinu fotografie. Dlouhou osu těla organismu se snažíme udržet co nejvíce kolmo k ose snímání. V opačném případě dojde k optickému zkreslení velikosti jednotlivých částí těla, případně k neostrosti částí těla. Ta část organismu, která je blíže objektivu, se na snímku jeví relativně větší, než je ve skutečnosti. Naopak vzdálenější část bude díky tomuto zkreslení vypadat proporčně menší, než je ve skutečnosti.

Dále fotografujeme detaily důležitých identifikačních znaků (viz popisky konkrétních skupin organismů v této metodice). Pro tento účel se s fotoaparátem přibližujeme ke konkrétní části těla (znaku) tak, aby z větší části vyplnila celý výsledný snímek. Musíme však dávat pozor na minimální ostřicí vzdálenost, kterou náš fotoaparát umožňuje (režim makro viz níže), jinak hrozí výrazná neostrost snímku.

Focení kolmo k dlouhé ose organismu mimo jiné zpravidla zajišťuje obsažení celého organismu v rovině zaostření. Úroveň hloubky ostrosti (viz DOF) závisí na nastaveném clonovém čísle a na vzdálenosti objektu od objektivu. Pro potřeby zachycení detailu je v případě fotoaparátu s výměnnými objektivy vhodné použít speciální „makro-objektiv“ umožňující zaostření z krátké vzdálenosti a zobrazení objektu na čipu v poměru 1:1. U kompaktních aparátů a některých mobilních telefonů pro tyto účely přepínáme nastavení do speciálního režimu „makro“ (dle návodu s ohledem na konkrétního výrobce/typ/model, často zobrazeno jako symbol květiny). Pro dokumentační fotografii je ideální tzv. měkké světlo. Jedná se o rozptýlené světlo, které je např. ve stínu pod stromy či pod mraky při silně oblačné obloze. V takové situaci na fotografii zpravidla nevznikají expoziční extrémy. Jinými slovy objekt máme nasvícený rovnoměrně bez výrazných stínů či přesvětlených míst (tzv. „přepalů“). Mezi nevhodné světelné podmínky patří bodové zdroje přímého světla, kam řadíme jak přímé sluneční záření (hlavně v poledních hodinách), tak umělé zdroje světla s malou plochou vyzařování. Čím blíže je zdroj světla objektu a čím je menší, tím „tvrdší“ (méně vhodné) světlo získáváme. Při nasvícení, např. mobilním telefonem či ruční svítilnou se snažíme držet zdroj světla v takové vzdálenosti, aby na objektu nepůsobil výrazně přesvětlené/neosvětlené části. Za slunného dne či při možnosti použít pouze blízký bodový zdroj světla, můžeme u menších organismů pro potřeby fotografování použít zastínění vhodným materiálem (např. arch bílého papíru či slabé látky). Měli bychom se vyhnout situaci, kdy je část snímku nasvícená přímým slunečním zářením (či jiným světelným zdrojem) a část je zastíněná. Vhodnou možností je samozřejmě využití interního či externího fotografického blesku s rozptýlkou (volitelné příslušenství). Světlo se tak vhodně „změkčí“. Při nedostatku světla je vhodné zvýšit v nastavení fotoaparátu hodnotu ISO (pokud to váš přístroj umožňuje). Výsledkem sice bude zvýšení digitálního šumu, ale ten je stále (do určité míry) lepší variantou, než neostrost způsobená příliš dlouhým expozičním časem (s ohledem na nízkou intenzitu světla v kombinaci s možným pohybem organismu).

6.3 Externí pomoc s identifikací - odborníci

Takto pořízené snímky můžeme dále porovnat s dalšími, v terénu nám nedostupnými, zdroji. Pokud si i nadále identifikaci organismu nejsme jistí, je vhodné kontaktovat oddělení monitoringu (Agentura ochrany přírody a krajiny ČR – karel.chobot@nature.cz, 283 069 105). Další možností je při nejasnostech oslovit odborníka na danou skupinu s prosbou o určení nalezeného organismu (Tab. 1). V tomto případě však nelze odpověď garantovat.

Pokud není možné, ať už z technických či časových důvodů, dovézt/zaslat odborníkovi nalezený organismus či jeho část, pošleme fotografie a záznam okolností nálezu, abychom identifikaci co nejvíce usnadnili.

Tab. 1. Vybraní odborníci na vodní organizmy, které doporučujeme v případě nejasné identifikace kontaktovat – seznam je pouze doporučující a neobsahuje všechny současné odborníky na zmíněné skupiny.

taxonomická skupina	jméno	pracoviště	e-mail
řasy	Jan Kaštovský	Přf, JU v České Budějovice	hanys@prf.jcu.cz
řasy	Aloisie Pouličková	Přf, UPOL Olomouc	aloisie.poulickova@upol.cz
vodní makrofyta	Bohumil Mandák	FŽP, ČZU Praha	mandak@fzp.czu.cz
vodní makrofyta	Vít Grulich	Přf, MU Brno	grulich@sci.muni.cz
sladkovodní houby	Věra Opravilová	Přf, MU Brno	opravilo@sci.muni.cz
mechovky	Věra Opravilová	Přf, MU Brno	opravilo@sci.muni.cz
ploštěnci	Věra Opravilová	Přf, MU Brno	opravilo@sci.muni.cz
žahavci	Adam Petrusek	Přf, UK Praha	adam.petrusek@natur.cuni.cz
hlísti	Jaroslav Vadlejch	FAPPZ, ČZU Praha	vadlejch@af.czu.cz
mlži a plži	Karel Douda	FAPPZ, ČZU Praha	doudak@af.czu.cz
mlži a plži	Luboš Beran	CHKO Kokořínsko	lubos.beran@nature.cz
kroužkovci	Jana Schenková	Přf, MU Brno	schenk@sci.muni.cz
planktonní korýši	Adam Petrusek	Přf, UK Praha	adam.petrusek@natur.cuni.cz
korýši	Jiří Patoka	FAPPZ, ČZU Praha	patoka@af.czu.cz
korýši	Antonín Kouba	FROV, JU České Budějovice	akouba@frov.jcu.cz
jepice	Světlana Zahradková	Přf, MU Brno	zahr@sci.muni.cz
vážky	Filip Harabiš	FŽP, ČZU Praha	harabis@fzp.czu.cz
vážky	Aleš Dolný	Přf, OU Ostrava	ales.dolny@osu.cz
ploštice	Petr Kment	NM Praha	sigara@post.cz
chrostíci	Vladimír Uvíra	Přf, UPOL Olomouc	vladimir.uvira@upol.cz
dvoukřídli	Martin Kulma	SZÚ Praha	martin.kulma@szu.cz
dvoukřídli	Miroslav Barták	FAPPZ, ČZU Praha	bartak@af.czu.cz
brouci	Jiří Hájek	NM Praha	jiri_hajek@nm.cz
ryby	Lukáš Kalous	FAPPZ, ČZU Praha	kalous@af.czu.cz
ryby	Radek Šanda	NM Praha	radek_sanda@nm.cz
ryby	Pavel Jurajda	ÚBO AVČR	jurajda@ivb.cz
obojživelníci	Oldřich Kopecký	FAPPZ, ČZU Praha	kopeckyo@af.czu.cz
obojživelníci	Jiří Moravec	NM Praha	jiri_moravec@nm.cz
plazi	Oldřich Kopecký	FAPPZ, ČZU Praha	kopeckyo@af.czu.cz
plazi	Jiří Moravec	NM Praha	jiri_moravec@nm.cz

V případě, že jsme si jisti, že živý, námi chycený živočich je nepůvodním organismem můžeme se pokusit ho deponovat do některé ze záchranných stanic (<https://www.mzp.cz/Aplikace/rzc.nsf/index.xsp>).

7 Identifikace pomocí skevenace DNA

Získaný vzorek DNA, ať již přímo z těla organismu (část tkáně), nebo pomocí koncentrace eDNA (viz kapitola 4.3), doporučujeme zaslat fixovaný (96% etanol) k analýze do molekulárně - genetické laboratoře. V laboratoři bude provedena izolace a PCR za pomoci odpovídajícího primeru. Prostřednictvím PCR je u živočichů amplifikovaný úsek genu COI (cytochrom oxidáza 1) u rostlin obvykle úsek ITS (internal transcribed spacer) (Tab. 2). Námi doporučené primery uvádíme v tabulce A. Primery však mohou být použity různé. Genetická laboratoř může vyhledat odzkoušené primery na COI v databázi BOLD. V databázi BOLD nalezneme

primery, které jsou vhodné pro identifikaci určité skupiny organismů. Stačí zadat do dialogového okna taxonomickou skupinu v angličtině nebo její vědecký název (např. frogs, Anura nebo plants, Plantae). Databáze je přístupná na internetové adrese http://www.boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch.

Po výběru vhodné sekvence primerů je potřeba nechat primery vyrobit (syntetizovat). To lze například u společností KRD (<https://www.krd.cz/>) nebo BIOGEN (<https://biogen.cz>) jedná se o syntézu oligonukleotidů. Cena se pohybuje v řádech desítek až stovek korun v závislosti na počtu nukleotidů a množství (např. 25 nmol).

Tabulka 2. Primery pro amplifikaci mitochondriálního genu COI (cytochrom oxidáza 1)

Organismus	Název	Gen	Primer (5'-3')	Citace
Univerzální	Uni-MinibarF1	COI	TCCACTAATCACAARGATATTGGTAC	Meusnier <i>et al.</i> 2008
	Uni-MinibarR1		GAAAATCATAATGAAGGCATGAGC	Meusnier <i>et al.</i> 2008
Bezobratlí	LCO1490	COI	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> 1994
	HCO2198		TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> 1994
Ryby	FishF1	COI	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Ward <i>et al.</i> , 2005
	FishR1		TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	Ward <i>et al.</i> , 2005
Obojživelníci	Chmf4	COI	TYT CWA CWA AYC AYA AAG AYA TCG G	Che <i>et al.</i> 2012
	Chmr4		ACY TCR GGR TGR CCR AAR AAT CA	Che <i>et al.</i> 2012
Plazi	RepCOI-F	COI	TNT TMT CAA CNA ACC ACA AAG A	Nagy <i>et al.</i> 2012
	RepCOI-R		ACT TCT GGR TGK CCA AARAAT CA	Nagy <i>et al.</i> 2012

Podmínky PCR:

PCR reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahuje: 12,5 µl PPP master mixu (Top-Bio), 3 µl DNA, 1 µl Primer1, 1 µl primer 2 a 7,5 µl PCR vody (Top-Bio).

Program univerzální primery: 2 min. 95°C; 5 cyklů (1 minuta na 95°C, 1 min. na 46°C, 30 s na 72°C); 35 cyklů (1 min. na 95°C, 1 min na 53°C, 30 s na 72°C), závěrečná elongace 7 min. na 72°C for 7 min, zchlazení na 4°C (Meusnier et al. 2008).

Program ryby: 2 min na 95°C; 35 cyklů (30 s na 94°C, 30 s na 54°C, 1 min na 72°C) závěrečná elongace 10 min na 72°C a zchlazení na 4°C (Pegg 2006).

Program bezobratlí: 2 min na 95°C; 35 cyklů (1 min. na 95°C, 1 min na 40°C, 30 s na 72°C) závěrečná elongace 7 min na 72°C a zchlazení na 4°C (Folmer et al. 1994).

Program obojživelníci: 5 min na 95°C; 35 cyklů (1 min. na 94°C, 1 min na 46°C, 1 min na 72°C) závěrečná elongace 10 min na 72°C a zchlazení na 4°C (Che et al. 2012).

Program plazi: 3 min na 94°C; 40 cyklů (40 s na 94°C, 30 s na 48.5°C a 1 min. na 72°C); závěrečná elongace 7 min. na 72°C for 7 min, zchlazení na 4°C (Nagy et al. 2012).

Sekvenace PCR produktu

Získaný produkt PCR se uchovává při 5°C v případě, že se vzorek v brzké době (dny) odešle na sekvenaci. Pokud chceme PCR produkt uchovávat delší dobu, je možné jej zamrazit (-20°C). Sekvenování se v současnosti provádí obvykle servisně některou z osvědčených společností například MacroGen (<https://dna.macrogen-europe.com/eng/>) nebo SEQme (<https://www.seqme.eu/>). Společnost zajistí vyzvednutí vzorků, jejich přečištění a sekvenaci. Cena dvou sekvenačních reakcí (PCR produkt se obvykle sekvenuje se z obou stran DNA) se pohybuje v řádu stovek Kč za jeden vzorek. Výsledky sekvenace jsou odeslány na email, resp. jsou k dispozici ke stažení z webu společnosti. Sekvenace je hotová do několika dnů od vyzvednutí vzorku.

Pokud byly objednané dvě sekvenační reakce, získané sekvence jsou dvě (forward a reverse) k jednomu vzorku. Sekvence je potřeba sesadit (vytvořit jednu konsenzuální), což je možné provést v různých editačních programech například BioEdit dostupný na webu <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

Identifikace získané sekvence *in silico*

Identifikace respektive porovnání získané sekvence s dostupnými sekvencemi je možné provést ve webovém prostředí BOLD na adrese <http://www.boldsystems.org>

BOLD (Barcode of Life Data System) se stal databází pro všechny barcodové sekvence. Představuje „pracovní prostor“, kam všechny barcodingové projekty mohou vkládat barcodové sekvence ze svých analýz, spolu s informacemi o daném druhu, a zároveň z něj čerpat podklady k dalšímu studiu (Rotterová 2012).

Postup vyhledávání v databázi

Do dialogového okna viz obrázek B, vybereme, zdali se jedná o živočicha (Animal identification) nebo rostlinu (Plant identification), zaškrtneme verifikované vyhledávání (Species Level Barcode Records) vložíme naši získanou sekvenci a necháme prohledávat (submit). Výsledkem je protokol, který nám přisuzuje nejbližší podobnou sekvenci COI z verifikované databáze spolu s dalšími informacemi. Nám však postačí identifikace s pravděpodobností uvedenou v procentech.

V případě, že námi zadaná sekvence nenalezne adekvátní verifikovanou sekvenci v databázi BOLD, je možné využít mnohem rozsáhlejší databáze GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Na webové stránce BOLD se objeví hláška “Unable to match any records in the selected database” a tlačítko BLAST SEQUENCE ON GENBANK. Stisknutím pokračujete na vyhledávání v databázi Genbank pomocí BLASTu.

Nástroj BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1990) hledá oblasti lokální podobnosti mezi všemi sekvencemi v databázi. Program v našem případě porovnává nukleotidové sekvence z databází a vypočítává statistickou významnost shody. Díky rozsahu a komplexnosti informací v GenBanku je možné pomocí BLAST (blastem) identifikovat gen a potažmo organismus téměř vždy s určitou mírou shody.

Princip blastu

BLAST představuje heuristické vyhledávání v rozsáhlé databázi, které rychle eliminuje nepodobné sekvence (pro tento proces se používá sloveso blastovat). Vyhledávání blastem se ukončí, pokud algoritmus narazí na některé z omezení (threshold). Může to být počet nalezených záznamů (hits), anebo naopak nenalezení dostatečného počtu záznamů, které by byly statisticky významně podobné námi zadané sekvenci a zároveň měly nízkou pravděpodobnost, že se natolik podobné záznamy v databázi vyskytují náhodou. Tato statistika se nazývá E hodnota (E-value) a je důležité jí porozumět pro pochopení výstupu z blastu (Holčík & Komenda 2015).

E hodnota

Genetické databáze obsahují velké množství dat, která se skládají z abecedy o čtyřech znacích (A - adenin, C-cytosin, T-thymin, G-guanin). Můžeme předpokládat, že se některé pořadí nukleotidů bude v databázi vyskytovat náhodou. Například trojice nukleotidů ATG kóduje aminokyselinu metionin a zároveň je to start kodon, kterým začíná většina známých genů. Tato krátká sekvence se ovšem vyskytuje i v genomických úsecích, které nekódují proteiny. Nalezení takové shody v genomické sekvenci je z pohledu vyhledávání podobných sekvencí nesmyslné. E hodnota vyjadřuje, nakolik nesmyslné porovnání sekvencí je.

Přesněji, E hodnota určuje, kolikrát se v dané genetické databázi bude vyskytovat stejně podobná sekvence náhodou. Výsledná hodnota v protokolu (výstupu vyhledávání) informuje o tom, nakolik jsou si sekvence alignmentu (zarovnané sekvence) podobné vzhledem k jejich délce (Holčík & Komenda 2015).

Z možností pro vyhledávání zvolte Megablast, který vyhledá velmi podobné sekvence a pro identifikaci se hodí více, protože porovnává delší úseky sekvencí, viz obrázek 12.

Výsledek a interpretace

Webová stránka s výsledkem (protokolem) z blastu (viz obrázek 13) obsahuje v horní části grafickou reprezentaci skóre jednotlivých párových alignmentů. Ve střední části výsledkové stránky jsou nalezené sekvence uvedené v seznamu společně se statistikami pro párové porovnání s námi zadanou sekvencí. Z pohledu interpretace výsledku blastu je pro účel identifikace organismu nejdůležitější právě tato část tabulky ve střední části výsledku (Holčík & Komenda 2015). Uvedené vědecké jméno a charakteristiky porovnání jsou kýženým výsledkem identifikace. Při kliknutí na genbankové číslo ve tvaru např. MF135911.1 se otevře protokol k sekvenci, který obsahuje podrobnosti o sekvenovaném organismu, autorovi a také obvykle publikaci, ke které se sekvence vztahuje. V publikaci, pokud existuje, lze nalézt další podrobnosti k lokalitě či identifikaci organismu.

Vysvětlivky charakteristik porovnání

Celkové skóre (Total score) – součet skóre všech nekontinuálních částí lokálních alignmentů mezi námi zadanou a nalezenou (shodnou) sekvencí (optimálně hodnoty přesahující 95 %). Pokrytí (Query cover) – jaká část námi zadané sekvence byla porovnaná s nalezenou sekvencí (záleží na délce sekvence). E hodnota (E-value) - viz předchozí text. E-value by měla být co nejnížší, ideálně nula, v případě, že $E < 0.02$ – sekvence jsou pravděpodobně homologní. V případě, že $0.02 < E < 1$ – homologie není vyloučena a v případě, že $E > 1$, shoda je výsledkem náhody. Shoda (Ident) – nakolik je námi zadaná sekvence shodná s konkrétní sekvencí v databázi udává se v procentech. Shodnost sekvencí by měl být blízka 100 %. Přístupový kód (Accession) – odkaz na nalezenou sekvenci.

Rizika identifikace organismu pomocí blastu v Genbank

Jak již bylo zmíněno, Genbank obsahuje ohromné množství sekvencí, ale původ DNA respektive jedinec, ze kterého byla DNA izolována, nemusel být vždy korektně taxonomicky determinován. V Genbank se tedy můžeme setkat se sekvencemi, které jsou označené vědeckým názvem druhu, avšak toto označení nemusí odpovídat správnému názvu organismu, ze kterého byl vzorek získán. Toto je běžné například u ryb rodu karas, kdy jsou například *C. langsdorfii* nebo *C. gibelio* chybně označeni jako *C. auratus* (Rylková et al. 2013). Doporučujeme tak pro porovnání využít referenčních sekvencí uvedených v příloze metodiky u karet jednotlivých druhů.

BOLD SYSTEMS DATABASES IDENTIFICATION TAXONOMY WORKBENCH RESOURCES LOGIN

IDENTIFICATION ENGINE

BOLD is undergoing system upgrades. Analytical functionality may be unavailable for short periods.

ANIMAL IDENTIFICATION [COI] FUNGAL IDENTIFICATION [ITS] PLANT IDENTIFICATION [rbcL & MATK]

The BOLD Identification System (IDS) for COI accepts sequences from the 5' region of the mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I gene and returns a species-level identification when one is possible. Further validation with independent genetic markers will be desirable in some forensic applications.

Historical Databases: [All Barcode Records on BOLD](#) [Species Level Barcode Records](#) [Public Record Barcode Database](#) [Full Length Record Barcode Database](#)

Search Databases:

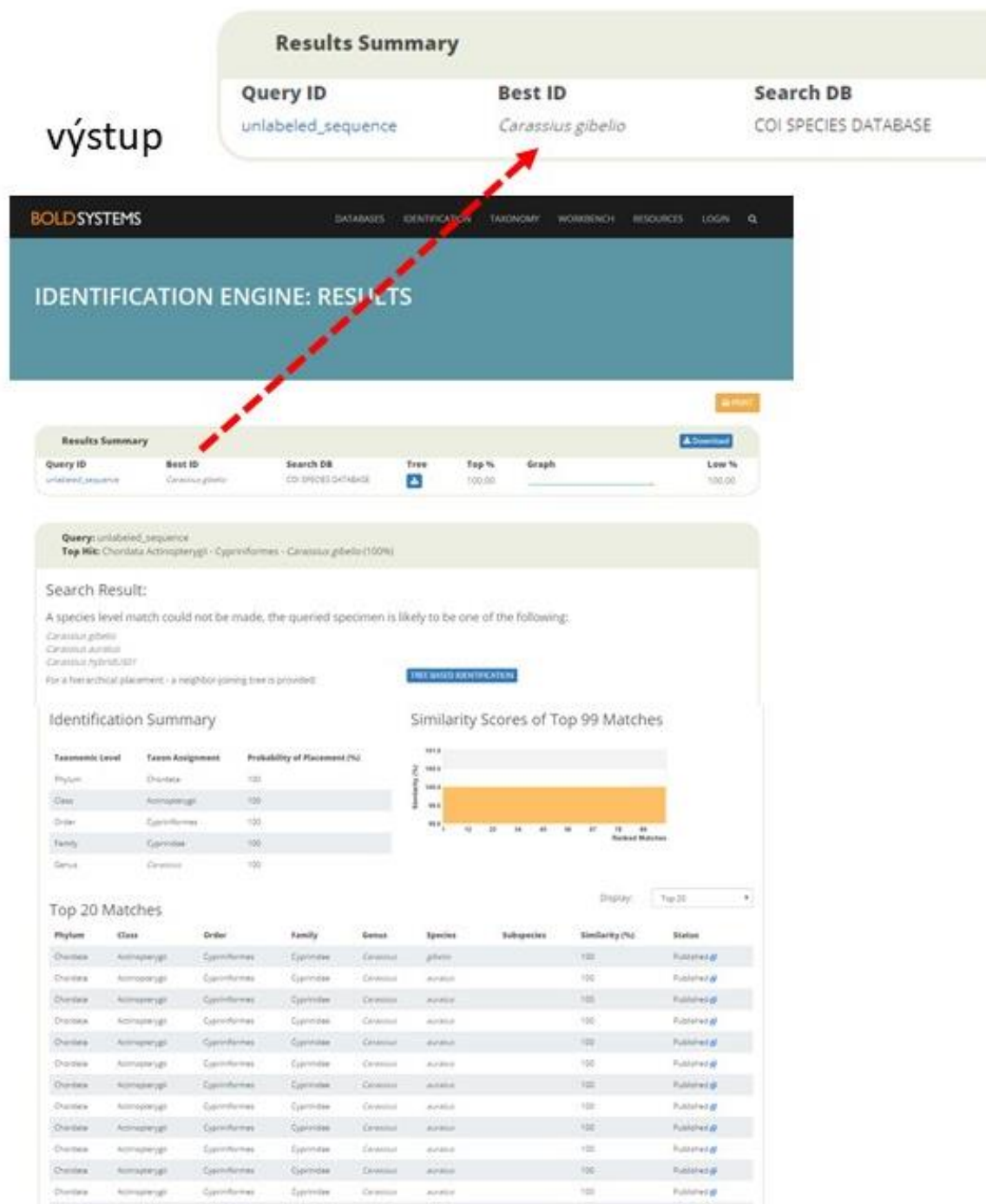
- All Barcode Records on BOLD (6,524,212 Sequences)**
Every COI barcode record on BOLD with a minimum sequence length of 500bp (warning: unvetted library and includes records without species level identifications. This includes many species represented by only one or two specimens as well as all species with interim taxonomy. This search only returns a list of the nearest matches and does not provide a probability of placement to a taxon).
- Species Level Barcode Records (3,486,616 Sequences/298,816 Species/89,526 Interim Species)**
Every COI barcode record with a species level identification and a minimum sequence length of 500bp. This includes many species represented by only one or two specimens as well as all species with interim taxonomy.
- Public Record Barcode Database (1,456,407 Sequences/118,178 Species/37,398 Interim Species)**
All published COI records from BOLD and GenBank with a minimum sequence length of 500bp. This library is a collection of records from the published project section of BOLD.
- Full Length Record Barcode Database (2,226,334 Sequences/187,368 Species/72,699 Interim Species)**
Subset of the Species Library with a minimum sequence length of 1400bp and containing both public and private records. This library is intended for short sequence identification as it provides maximum overlap with short reads from the barcode region of COI.

Enter fastq formatted sequences in the forward orientation:

vložit sekvenci

vyhledávat **SUBMIT**

Obr. 11. Vstupní dialogové okno pro vyhledávání v databázi BOLD (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)



Obr. 12. Výstupní protokol BOLD s identifikací námi vložené sekvence.

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite vložit sekvenci

blastn blastx tblastn tblastx

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

etctcgtatttggtgctgagccggaatagtaggaacccgtttaagcctctcaagagctgaacttagtcaa
 cccgagtcacttcttagttagtgcataatttacaatgaattgtaccgcccaccccttgtaataattttctt
 aagtaatgcctatcctcattggagatttggaaactgaattgtaccctcaaatggagccctgattggca
 tttccacgaataataataaagcttctgattacttccccatcatttctactactactagcttcttctggt
 tgaagcggagctggaaactggg

Clear Query subrange

From

To

Or, upload file Vybrat soubor Soubor nevybrán

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Choose Search Set

Database ☐ Human genomic + transcript ☐ Mouse genomic + transcript ☒ Others (nr etc.):
 Nucleotide collection (nr/nt)

Organism Optional bony fishes (taxid 7898) ☐ exclude

Exclude Optional ☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

Limit to Optional ☐ Sequences from type material

Entrez Query Optional Enter an Entrez query to limit search

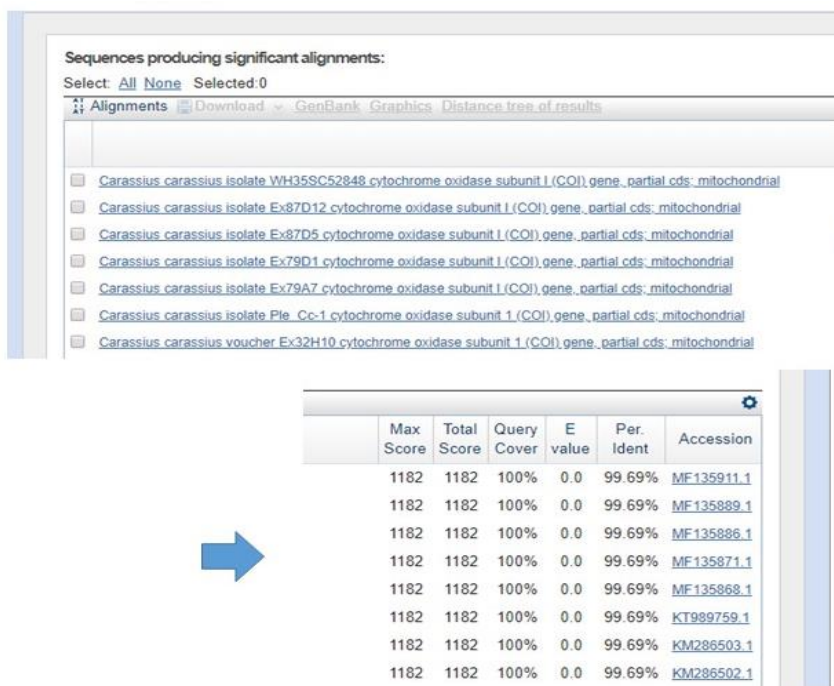
Program Selection

Optimize for ☒ Highly similar sequences (megablast)
☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
☐ Somewhat similar sequences (blastn)
 Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)
☐ Show results in a new window

vyhledávat

Obr. 13. Vstupní dialogové okno pro vyhledávání v databázi Genbank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

- [Carassius carassius isolate WH35SC52848 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds: mitochondrial](#)
- [Carassius carassius isolate Ex87D12 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds: mitochondrial](#)
- [Carassius carassius isolate Ex87D5 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds: mitochondrial](#)
- [Carassius carassius isolate Ex79D1 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds: mitochondrial](#)
- [Carassius carassius isolate Ex79A7 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds: mitochondrial](#)
- [Carassius carassius isolate Ple_Cc-1 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds: mitochondrial](#)
- [Carassius carassius voucher Ex32H10 cytochrome oxidase subunit I \(COI\) gene, partial cds: mitochondrial](#)

	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
	1182	1182	100%	0.0	99.69%	MF135911.1
	1182	1182	100%	0.0	99.69%	MF135889.1
	1182	1182	100%	0.0	99.69%	MF135886.1
	1182	1182	100%	0.0	99.69%	MF135871.1
	1182	1182	100%	0.0	99.69%	MF135868.1
	1182	1182	100%	0.0	99.69%	KT989759.1
	1182	1182	100%	0.0	99.69%	KM286503.1
	1182	1182	100%	0.0	99.69%	KM286502.1

Obr. 14. Výstupní protokol BOLD s identifikací námi vložené sekvence.

8 Ověření funkčnosti metodiky

Dne 7. 3. 2019 proběhl na půdě FAPPZ ČZU v Praze workshop jehož účelem bylo zejména prověření konceptu třístupňové identifikace nepůvodních druhů vodních organismů. Účastníci workshopu byli především zaměstnanci nebo členové Agentury ochrany přírody a krajiny České republiky (AOPK ČR), České inspekce životního prostředí (ČIŽP) a Českého rybářského svazu (ČRS). Tyto organizace mají problematiku invazních druhů přímo ve své gesci nebo k ní mají blízko díky vykonávané činnosti. Jejich zaměstnanci/členové jsou také často specializovanými odborníky a tvoří tak jakýsi most mezi sférou akademickou a širokou veřejností.

Během workshopu byly po představení základního konceptu účastníkům distribuovány pracovní verze klíče, pokrývajícího skupiny plži a mlži, korýši, ryby, obojživelníci, plazi. S klíčem následně každý z účastníků prošel všechny objekty a jeho úkolem bylo dle klíče správně určit, o jaký organismus se jedná. Svě odpovědi mohl doplnit komentářem, jehož účelem bylo zpřesnit informace v klíči a zároveň je učinit co nejsnáze pochopitelné pro co nejširší masu budoucích uživatelů.

Mezi objekty předloženými k identifikaci nebyly pouze druhy obsažené v klíčích, ale i druhy původní, příp. nepůvodní druhy bez invazního potenciálu. Situace při testování klíče tak odpovídala v maximální možné míře skutečnosti. Snahu o co nejvyšší míru realizmu podporoval i výběr objektů, kdy některá zvířata byla přítomna živá, jiná ve formě trvalých preparátů, schránek, konzervovaných částí těla nebo fotografií.

Celkem 22 respondentů ze čtyř institucí/organizací (AOPK, ČIŽP, ČRS, ostatní) poznávalo 37 druhů živočichů z pěti taxonomických skupin (korýši, měkkýši, ryby, obojživelníci, plazi). Data jsme hodnotili na binomické škále (poznal/nepoznal), kdy respondenti odpovídali buď uvedením jména konkrétního druhu z předloženého klíče, nebo odpovědí není (tj. že druh v klíči není uveden, a jedná se tak o jiné zvíře, ať už původní či nepůvodní, ovšem neinvazní). Mohly tedy nastat dvě možné varianty chyby – špatně určený nepůvodní druh uvedený v klíči (falešně negativní) nebo záměna druhu, který v klíči není, za druh, který v klíči je (falešně pozitivní). K vyhodnocení byly použity zobecnělé lineární mixované modely (GLMM), vzhledem k opakovaným hodnocením respondentem (náhodná složka modelu) a binomickému

charakteru výsledků. Vzhledem k počtu odpovědí a úrovni faktorů nebylo možné hodnotit je v interakci, ale museli jsme je analyzovat samostatně.

Celkem jsme mohli získat 814 odpovědí (37 druhů*22 respondentů), získali jsme 738 (90.7 %) odpovědí. Respondenti se nejvíce vyhýbali hodnocení plžů a mlžů (77.3 %), dále plazů (86.4 %), obojživelníků (95.5 %) naopak korýše a ryby zhodnotili všichni respondenti.

Odpovědi mohou být ovlivněny čtyřmi faktory – osoba respondenta, z jaké pochází organizace, jakou taxonomickou skupinu hodnotí a jaký konkrétní druh hodnotí. Vzhledem k počtu druhů vs. respondentů není možné statisticky otestovat vliv druhu na to, jak úspěšně je poznávám, nicméně nejlépe poznávané byly:

Rak signální (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	100%
Škeblice čínská (<i>Sinanodonta woodiana</i>)	100%
Vranka obecná (<i>Cottus gobio</i>)	95,45%

Naopak nejhůře poznávanými byly druhy:

Hlavačkovec Glenův (<i>Percottus glenni</i>)	27,30%
Ropucha obecná (<i>Bufo bufo</i>)	28,57%
Kamomil říční (<i>Ancylus fluviatilis</i>)	31,25%

Co se týče hodnocení napříč institucemi, tak zde již bylo možné statisticky testovat jejich vliv, který byl významný (GLMM: $F = 1.850$, $P = 0.042$), když nejlépe odpovídali pracovníci z ČIŽP, dále z AOPK a pak ostatní, nicméně mezi těmito třemi skupinami není statisticky významný rozdíl. Ten se ale ukázal při pohledu na výsledky zaměstnanců ČRS, které byly statisticky významně horší než organizací ČIŽP a AOPK, ovšem od skupiny ostatních se nelišil. Zde je potřeba kriticky uvést, že průzkumu se za ČRS účastnili pouze dva respondenti.

Při pohledu na poznávání jednotlivých taxonomických skupin jsme také odhalili statisticky významné rozdíly (GLMM: $F = 3.836$, $P = 0.011$). Nejvyšší podíl správně určených druhů byl mezi plazy, dále korýši, rybami, měkkýši a nakonec obojživelníky. Krom skupiny měkkýši byly všechny ostatní poznávány lépe než obojživelníci. Kvalita poznávání plazů, korýšů a ryb se od sebe statisticky neliší.

Model, který obsahoval vliv respondenta ($AIC = 882.61$), byl o něco lepší než model bez něj ($AIC = 887.00$), nicméně rozdíl v hodnotách $AIC < 7$ naznačuje, že pro námi řešený vzorek byly podstatnější faktory s pevným efektem, tj. příslušnost k organizaci a taxonomická skupina. Jinými slovy - respondenti, kteří pochází z jedné organizace, jsou si svými výkony v poznávání relativně podobní. Některé taxonomické skupiny se poznávaly obecně respondentům lépe než jiné - jen málokdo znal vše, neznámé skupiny jsou pak často neznámé obecně.

Ohlášení problému s nepůvodními druhy a jejich hledání může odstartovat efekt “střelba do vlastních řad” (viz kap. 2.5). V tomto směru se jako nejkritičtější ukázala skupina plžů a mlžů, kde u 40% případů došlo k záměně původního druhu za nepůvodní, následovali skupiny obojživelníci 36,5%, korýši 27 %, ryby 6 % a plazi, u kterých byly původní druhy rozpoznány vždy. Pořadí taxonomických skupin nám i určuje jejich (ne)vhodnost pro případný sběr dat poučenými laiky.

9 Použitá literatura

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J., 1990: Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215,403–410.
- Arena, P. C., Steedman, C., & Warwick, C., 2012: Amphibian and reptile pet markets in the EU: An investigation and assessment. Animal Protection Agency, Animal Public, International Animal Rescue, Eurogroup for Wildlife and Laboratory Animals, Fundación para la Adopción, el Apadrinamiento y la Defensa de los Animales, 52.
- Baruš V., Oliva O.(eds), 1995: Mihulovci a ryby (1). Academia. Praha, ČR.
- Baruš V., Oliva O. (eds), 1995: Mihulovci a ryby (2). Academia. Praha, ČR.
- Bálint, M., Nowak, C., Márton, O., Pauls, S. U., Wittwer, C., Aramayo, J. L., ... & Jansen, M., 2018: Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Molecular ecology resources*, 18(6), 1415-1426.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W., 2012: GenBank. *Nucleic acids research*, 41(D1), D36-D42.
- Blackburn, T. M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J. T., Duncan, R. P., Jarošík, V., ... & Richardson, D. M., 2011: A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in ecology & evolution*, 26(7), 333-339.
- Blackburn T.M., Essl F., Evans T., Hulme P.E., Jeschke J.M., et al. 2014: A Unified Classification of Alien Species Based on the Magnitude of their Environmental Impacts. *PLOS Biology* 12(5): e1001850.
- Blank L., Blaustein L., 2012: Using ecological niche modeling to predict the distributions of two endangered amphibian species in aquatic breeding sites. *Hydrobiologia* 693: 157–167.
- Boland C.R.J., 2004: Introduced cane toads *Bufo marinus* are active nest predators and competitors of rainbow bee-eaters *Merops ornatus*: Observational and experimental evidence. *Biological Conservation* 120: 53–62.
- Boone M., Semlitsch R.D., Little E.E., Doyle M.C., 2007: Multiple stressors in amphibian communities: Effects of chemical contamination, bullfrogs and fish. *Ecological Applications* 17: 291–301.
- Brejcha J., Jeřábková L., Miller V., Šandera M., 2010: Zaznamenávání výskytu želvy nádherné (*Trachemys scripta*) na území ČR v roce 2010. – *Herpetologické informace* 9: 18–24.
- Brooks M.L., D’Antonio C.M., Richardson D.M., Grace J.B., Keeley J.E. et al., 2004: Effects of invasive alien plants on fire regimes. *BioScience* 54: 677–688.
- Bureau of Rural Sciences, 2008: CLIMATCH software. Bureau of Rural Sciences, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, Australia.
- Cadi A., Joly P., 2003: Competition for basking places between the endangered European pond turtle (*Emys orbicularis galloitalica*) and the introduced red-eared turtle (*Trachemys scripta elegans*). *Canadian Journal of Zoology* 81: 1392–1398.
- Cadi A., Joly P., 2004: Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Biodiversity and Conservation* 13: 2511–2518.
- Che J, Chen HM, Jin JQ et al., 2012: Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources*, 12, 247–258.
- Cianfanelli S., Lori E., Bodon M., 2007: Non-indigenous freshwater molluscs and their distribution in Italy In: Gherardi F., *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*: Springer, Netherlands.
- Clusa, L., Miralles, L. Basanta, A Escot C., & García-Vázquez, E., 2017: eDNA for detection of five highly invasive molluscs. A case study in urban rivers from the Iberian Peninsula. *PloS one* 12: e0188126.

- Colautti R.I., MacIsaac H.J., 2004: A neutral terminology to define 'invasive' species. *Biodiversity and Distributions* 10: 135–141.
- Copp G.H., Wesley K.J., Vilizzi L., 2005a: Pathways of ornamental and aquarium fish introductions into urban ponds of Epping Forest (London, England): the human vector. *Journal of Applied Ichthyology* 21: 263–274.
- Copp G.H., Garthwaite R., Gozlan R.E., 2005b: Risk identification and assessment of non-native freshwater fishes: A summary of concepts and perspectives on protocols for the UK. *Journal of Applied Ichthyology* 21: 371–373.
- Copp G.H., Vilizzi L. and Gozlan R.E., 2010: The demography of introduction pathways, propagule pressure and occurrences of non-native freshwater fish in England. *Aquatic Conservation of Marine and Freshwater Ecosystems* 20: 595–601.
- Copp G.H., Vilizzi L., Tidbury H., Stebbing P.D., Tarkan A.S., Miossec L., Gouilletquer P., 2016: Development of a generic decision-support tool for identifying potentially invasive aquatic taxa: AS-ISK. *Management of Biological Invasions* 7: 343–350.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., E. Bellemain, E. et al., 2012: Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of applied ecology* 49: 953–959.
- Dolný A., Harabiš F., Bárta D., 2016: Vážky České Republiky. Academia, Česká Republika.
- Douda K., Kalous L., Horký P., Slavík O., Velíšek J., Kolářová J., 2016: Metodika eliminace a prevence šíření invazního druhu škeblice asijské (*Sinanodonata woodiana*) ve vodních ekosystémech a akvakulturních zařízeních ČR: Katedra zoologie a rybářství, Česká zemědělská univerzita v Praze, Česká Republika.
- Duggan I.C., Rixon C.A.M., MacIsaac H.J., 2006: Popularity and propagule pressure: determinants of introduction and establishment of aquarium fish. *Biological Invasions* 8: 393–398.
- Egan, S., Olds, B., Grey, D., Feder, J. & Lodge D., 2015: Molecular detection of invasive species in ballast water using environmental DNA and Laser Transmission Spectroscopy. *Environmental Science & Technology* 49: 4113–4121.
- Elith J., Leathwick J.R., Hastie, T., 2008: A working guide to boosted regression trees. *Journal of Animal Ecology* 77: 802–813.
- Elton C.S.E., 1958: *The Ecology of Invasion by Animals and Plants*. Springer Science Media, London.
- Elvira B., Almodovar A., 2005: Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning of the 21st century. *Journal of Fish Biology* 59 (Suppl. A): 323–331.
- Ficetola G.F., Coic C., Detaint M., Berroneau M., Lorvelec O., Miaud C., 2007: Pattern of distribution of the American bullfrog *Rana catesbeiana* in Europe. *Biological Invasions* 9: 767–772.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P., 2008: Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4(4), 423–425.
- Filipova L., Petrusek A., Matasova K., Delaunay C., Grandjean F., 2013: Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in populations of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: evaluating the threat to native crayfish. *PLoS One* 8: e70157.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotech* 3: 294–299.
- Foot, A. D., Thomsen, P. F., Sveegaard, S., Wahlberg, M., X Kielgast, J. et al. 2012: Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PloS one* 7: e41781.

- Francis R. A., 2012: A handbook of global freshwater invasive species: Earthscan, USA.
- Franke J., Telecky T.M., 2001: Reptiles as pets. An examination of the trade in live reptiles in the United States. Washington DC.
- Gallardo B., Aldridge D.C., 2013: The 'dirty dozen': Socio-economic factors amplify the invasion potential of 12 high-risk aquatic invasive species in Great Britain and Ireland. *Journal of Applied Ecology* 50: 757–766.
- Geraldi N.R., Anton A., Lovelock C.E., Duarte C.M., 2019: Are the ecological effects of the “worst” marine invasive species linked with scientific and media attention? *PlosOne* 4: e0215691.
- Gherardi F., 2007: Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats: Springer, Netherlands.
- Gherardi F., 2011: Crayfish. In: Simberloff D., Rejmánek M. (Eds.), *Encyclopedia of biological invasions*: University of California Press, USA.
- Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S. & Waits, L. P. 2011: Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PloS one* 6: e22746.
- Goldberg, C. S., Sepulveda, Ray, A., Baumgardt J. & Waits, L. P. 2013: Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarus*). *Freshwater Science* 32: 792-800.
- Graves S.D., Shapiro A.M., 2003: Exotics as hostplants of the California butterfly fauna. *Biological Conservation* 110: 413–433.
- Grosholz E., 2011: Crabs. In: Simberloff D., Rejmánek M. (Eds.), *Encyclopedia of biological invasions*: University of California Press, USA.
- Hendrix P.F., Callahan M.A. Jr., Drake J.M., Huang C.Y., James S.W. et al., 2008: Pandora's Box Contained Bait: The global problem of introduced earthworms. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 39: 593–613.
- Herborg L. M., Rushton S. P., Clare A. S., Bentley M. G., 2003: Spread of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards) in Continental Europe: analysis of a historical data set. *Hydrobiologia* 503: 21–28.
- Hijmans R., Guarino L., Mathur P., 2012: Manual of DIVA-GIS version 7.5., <http://www.diva-gis.org>.
- Holčík J. & Komenda, M. (eds.). 2015: *Matematická biologie: e-learningová učebnice 1. vydání*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-8095-9.
- Holubcová, H. 2018: *Aplikace sekvenování nové generace ve fylogenetice rostlin* (Doctoral dissertation, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta).
- Horecký J., Špaček J., Petrusek A., 2006: *Proasellus coxalis* (beruška) In: Mlíkovský J., Stýblo P., *Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky: ČSOP Praha*.
- Horsák M., Čejka T., Juříčková L., Beran L., Horáčková J., Hlaváč J. Č., Dvořák L., Hájek O., Divíšek J., Maňas M. & Ložek V., 2019: <http://mollusca.sav.sk/malacology/checklist.htm>.
- Hulme P.E., 2006: Beyond control: wider implications for the management of biological invasions. *Journal of Applied Ecology* 43: 835–847.
- Hulme P.E. et al., 2008: Grasping at the routes of biological invasions: a Framework for integrating pathways into policy. *Journal of Applied Ecology* 45: 403–414.
- Chiba S. 2010: Invasive non-native species' provision of refugia for endangered native species. *Conservation Biology* 24: 1141–1147.
- Chucholl, C., Morawetz, K., & Gross, H. (2012). The clones are coming – strong increase in Marmorkrebs (*Procambarus fallax f. virginialis*) records from Europe. *Aquatic Invasions* 7: 511–519.

- Jaric I., Civjanovic G., 2012: The Tens Rule in Invasion Biology: Measure of a True Impactor Our Lack of Knowledge and Understanding? *Environmental Management* 50: 979–981.
- Jefferson T., Leatherwood S., Webber M., 1993: Marine mammals of the world. Fao Species indetification guide. United nations environment programme, food and agricultural organization of the United Nations. Rome, Italy.
- Jeschke J.M., Strayer D.L., 2015: Invasion success of vertebrates in Europe and North America. *PNAS* 102: 7198–7202.
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L. & Lodge, D. M. 2011: “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4: 150-157.
- Lindahl, T. 1993: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709.
- Johnson L. E., Carlton J. T., 1996: Post-establishment spread in large-scale invasions: dispersal mechanisms of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecology* 77: 1686–1690.
- Jurajda, P., Adámek Z., 2016: Nepůvodní druhy ryb ve vodách ČR. AV ČR, v.v.i. Praha, ČR.
- Jurajda, P. 2018: Hlaváči v našich vodách. *Živa* 5: 269-271.
- Kalous, L., Patoka, J., Kopecký, O. (2015). European hub for invaders: risk assessment of freshwater aquarium fishes exported from the Czech Republic. *Acta ichthyologica et piscatoria*, 15.
- Kalous L., 2018: (Naše) nepůvodní a invazní druhy ryb. *Živa* 5: 266–269.
- Kalous, L., Nechanská, D., & Petrtyl, M. 2018: Survey of angler's internet posts confirmed the occurrence of freshwater fishes of the genus *Ictiobus* (Rafinesque, 1819) in natural waters of Czechia. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, (419), 29.
- Kats L.B., Ferrer P.R., 2003: Alien predators and amphibian declines: Review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions* 9: 99–110.
- Keller R.P., Frang K. Lodge D.M., 2008: Preventing the spreyc of invasive species: economic benefits of intervention guided by ecological predictions. *Conservation Biology* 22: 80–88.
- Kenis M., Bacher S., Baker R.H.A., Branquart E., Brunel S. et al., 2009: Ecological effects of invasive alien insects. *Biological Invasions* 11: 21–45.
- Kopecký O., Kalous L., Patoka J., 2013: Establishment risk from pet-trade freshwater turtles in the European Union. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 410: 02
- Kopecký, O., Patoka, J., & Kalous, L. (2016). Establishment risk and potential invasiveness of the selected exotic amphibians from pet trade in the European Union. *Journal for nature conservation*, 31, 22-28.
- Kottelat M., Freyhof J., 2007: Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin.
- Kraus F., 2009: Alien reptiles and amphibians : A scientific compedium and analysis. Springer, Dordrecht, Netherland.
- Kraus F., 2015: Impacts from invasive reptiles and amphibians. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 46: 75–97.
- Lapointe N.W.R., Pendleton R.M., Angermeier P.L., 2012: A comparison of approaches for estimating relative impacts of nonnative fishes. *Environmental Management* 49: 82–95.
- Leathwick, J.R., Elith J., Francis M.P., Hastie T., Taylor P., 2006: Variation in demersal fish species richness in the oceans surrounding New Zealand: an analysis using boosted regression trees. *Marine Ecology Progress Series* 321: 267–281.
- Lepczyk C.A., 2005: Integrating published data and citizen science to describe bird diversity across a landscape. *Journal of Applied Ecology* 42: 672–677.
- Libosvářský J., Baruš V., Štěrbá O., 1990: Facultative parasitism of *Pseudorasbora parva* (Pisces). *Folia Zoologica* 29: 355–360.
- Lockwood, J. L., et al. 2007: *Invasion Ecology*. Blackwell Publishing, Washington.

- Lorencová E., Beran L., Horsáková V., Horsák M. 2015: Invasion of freshwater molluscs in the Czech Republic: time course and environmental predictors. *Malacologia* 59: 105-120.
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M., 2000: 100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN).
- Luque G. M., Bellard C., Bertelsmeier C., Bonnaud E., Genovesi P., Simberloff D., Courchamp F., 2014: The 100th of the world's worst invasive alien species. *Biological invasions* 16: 981–985.
- Mack R., Simberloff D., Lonsdale W., Evans H., Clout M., Bazzaz F., 2000: Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10: 689–710.
- Mackay H., Keskitalo E.C.H., Petterson M., 2017: Getting invasive species on the political agenda: agenda setting and policy formulation in the case of ash dieback in the UK. *Biological Invasions* 19: 1953–1970.
- Mackie G. L., 1991: Biology of the exotic zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in relation to native bivalves and its potential impact in Lake St. Clair. *Hydrobiologia* 219: 251–268.
- MacNeil C. D., Platvoet J. T. A., Dick N., Fielding A., Constable N., Hall D., Aldridge T., Renals Diamond M., 2010: The Ponto-Caspian 'killer shrimp', *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894), invades the British Isles. *Aquatic Invasions* 5: 441–445.
- Masin S., Bonardi A., Padoa-Schioppa E., Bottoni L., Ficetola G.F., 2014: Risk of invasion by frequently traded freshwater turtles. *Biological Invasions*, 16: 217–231.
- McCoid M.J., 1995: Non-native reptiles and amphibians. Pages 433-437 in E.T. Laroe, G.S. Farris, C.E. Puckett, P.D. Doran, and M.J. Mac, editors. *Our living resources: A report to the nation on the distribution, abundance, and health of U.S. plants, animals, and ecosystems*. U.S. Department of the Interior, National Biological Service, Washington, D.C., USA
- McDevitt, A. D., Sales, N. G., Browett, S. S., Sparnenn, A. O., Mariani, S., Wangenstein, O. S., Coscia, I., & Benvenuto, C., 2019: Environmental DNA metabarcoding as an effective and rapid tool for fish monitoring in canals. *bioRxiv preprint first posted online Dec. 18, 2018*; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/498451> *Journal of fish biology*.
- McNeely J.A., 2001: *The Great Reshuffling. Human Dimensions of Invasive Alien Species*. IUCN, Cambridge, UK.
- Merow C., Smith M.J., Silander J.A., 2013: A practical guide to MaxEnt for modeling species distributions: what it does, and why inputs and settings matter. *Ecography* 36: 1058–1069.
- Meusnier, I., Singer, G. A., Landry, J. F., Hickey, D. A., Hebert, P. D., & Hajibabaei, M. 2008: A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC genomics*, 9(1), 214.
- Meyerson L.A., Monney H.A., 2007: Invasive alien species in an era of globalization. *Frontiers in Ecology and the Environment* 5: 199–208.
- Mlíkovský J., Stýblo P., et al., 2006: *Nepůvodní druhy fauny a flóry ČR*, ČSOP Praha.
- Moyle P.B., 1973: Effects of introduced bullfrogs, (*Rana catesbeiana*), on the native frogs of the San Joaquin Valley, California. *Copeia* 1: 18–22.
- Musil, J., Jurajda, P., Adámek, Z., Horký, P., & Slavík, O. 2010: Non-native fish introductions in the Czech Republic—species inventory, facts and future perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 38-45.
- Nagano N., Oana S., Nagano Y., Arakawa Y., 2006: A severe *Salmonella enterica* serotype paratyphi B infection in a child related to a pet turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 59: 132–134.

- Nagy, Z. T., Sonet, G., Glaw, F., & Vences, M. 2012: First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. PLoS One, 7(3), e34506.
- Nentwig W., Bacher S., Kumschick S., Pyšek P., Vilà M., 2018: More than “100 worst” alien species in Europe. Biological invasions 20: 1611–1621.
- Ng T. H., Tan S. K., Wong W. H., Meier R., Chan S.-Y., Tan H. H., Yeo D. C., 2016: Molluscs for sale: assessment of freshwater gastropods and bivalves in the ornamental pet trade. PLoS one, 11: e0161130.
- Oberdorff T., Jézéquel C., Campero M., Carvajal-Vallejos F., Cornu J. F., Dias M. S., et al., 2015: Opinion Paper: how vulnerable are Amazonian freshwater fishes to ongoing climate change?. Journal of Applied Ichthyology 31: 4–9.
- Parrott D., Roy S., Baker R., Cannon R., Eyre D., Hill M.O., Mum-Ford J. 2009: Horizon scanning for new invasive non-native species in England. Natural England Commissioned Report NECR009.
- Patmore, J. R., & Gough, K. C. ,2014: The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. Journal of Applied Ecology, 51(5), 1450-1459.
- Patoka, J., Kalous, L., & Kopecký, O. (2014). Risk assessment of the crayfish pet trade based on data from the Czech Republic. Biological Invasions, 16(12), 2489-2494.
- Patoka, J., Kalous, L., Kopecký O., 2015: Imports of ornamental crayfish: the first decade from the Czech Republic's perspective. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 416: 04.
- Patoka J., Kopecký O., Vrabec V., Kalous L., 2017: Aquarium molluscs as a case study in risk assessment of incidental freshwater fauna. Biological invasions 19: 2039–2046.
- Pergl et al., 2016: Black, Grey and Watch Lists of alien species in the Czech Republic based on environmental impacts and management strategy? NeoBiota 28: 1–37.
- Petrusek A., 2006: *Dikeroгамmarus villosus* (blešivec velkohlavý) - korýši. In: Mlíkovský J., Stýblo P., Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky: ČSOP Praha.
- Phillips S. J., 2005.: A brief tutorial on Maxent. AT&T Research, https://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent
- Phillips S. J., Dudík M., 2008: Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. Ecography 3: 161–175.
- Piaggio, A. J., Engeman, R. M., Hopken, M. W., Humphrey, J. S., Keacher, K. L., Bruce, W. E., & Avery, M. L. 2014: Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. Molecular ecology resources, 14(2), 374-380.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J.,
- Pitt W., Vice D., Pitzler M., 2005: Challenges of Invasive Reptiles and Amphibians. Wildlife Damage Management Conferences - Proceedings 84: 112–119.
- Pitt W.C., Witmer G.W., 2015: Invasive vertebrate species and the challenges of management. Proc. 26th Vertebrate Pest Conference: 12–14.
- Ploeg A., 2007: The volume of the ornamental fish trade, International transport of live fish in the ornamental aquatic industry. Ornamental Fish International Journal 2: 48–61.
- Pyšek P., Jarošík V., Hulme P.E., Pergl J., Hejda M. et al., 2012: A global assessment of invasive plant impacts on resident species, communities and ecosystems: the interaction of impact measures, invading species' traits and environment. Global Change Biology 18: 1725–1737.
- Pyšek P., 2018: Historie, definice, hypotézy a budoucnost biologických invazí. Živa 5: 210–213.

- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N., 2007: BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- Rewicz T., Grabowski M., MacNeil C., Bacela-Spychalska K., 2014: The profile of a 'perfect' invader – the case of killer shrimp, *Dikerogammarus villosus*. *Aquatic Invasions* 9: 267–288.
- Ricciardi A., Hoopes M.F., Marchetti M.P., Lockwood J.L., 2013: Progress toward understanding the ecological impacts of non-native species. *Ecological Monographs* 83: 263–282.
- Richardson D.M., et al. 2000: Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and distributions* 6: 93–107.
- Rotterová J., 2012: Metoda DNA barcodingu a její využití u protist Bakalářská práce. Karlova univerzita, Praha
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S., 2019: Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, e00547.
- Rylková, K., Kalous, L., Bohlen, J., Lamatsch, D. K., & Petrtýl, M., 2013: Phylogeny and biogeographic history of the cyprinid fish genus *Carassius* (Teleostei: Cyprinidae) with focus on natural and anthropogenic arrivals in Europe. *Aquaculture*, 380, 13-20.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R., 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Semmens B.X., Buhle E.R., Salomon A.K., Pattengill-Semmens C.V., 2004: A hotspot of non-native marine fishes: evidence for the aquarium trade as an invasion pathway. *Marine Ecology Progress Series* 266: 239–244.
- Schlaepfer M.A., Sax D.F., Olden J.D., 2011: The potential conservation value of non-native species. *Conservation Biology* 25: 428–437.
- Simberloff D., et al. 2013: Impacts of biological invasions: what's what and the way forward." *Trends in Ecology & Evolution* 28: 58–66.
- Sogge M.K., Sferra S.J., Paxton E.H., 2008: *Tamarix* habitat for birds: implications for riparian restoration in the southwestern United States. *Restoration Ecology* 16: 146–154.
- Sousa R., Antunes C., Guilhermino L., 2008: Ecology of the invasive Asian *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 44: 85–94.
- Strayer D.L., 2012: Eight questions about invasions and ecosystem functioning. *Ecological Letters* 15: 1199–1210.
- Suarez A.V., Tsutsui N.D., 2008: The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology* 17: 351–360.
- Sutherland, W.J., Fleishman E., Mascia M.B., Pretty J., Rudd M.A., 2011: Methods for collaboratively identifying research priorities and emerging issues in science and policy. *Methods in Ecology and Evolution* 2: 238–247.
- Svoboda J., Strand D. A., Vrålstad T., Grandjean F., Edsman L., Kozák P., Kouba A., Fristad R. F., Koca S. B., Petrusek A., 2014: The crayfish plague pathogen can infect freshwater-inhabiting crabs. *Freshwater Biology* 59: 918–929.
- Tan, H.H. 2014: Scientific Photography of Fishes A 'keep it sweet and simple' guide for the Global Freshwater Fish BioBlitz With contributions from the IUCN SSC/WI Freshwater Fish Specialist Group.
- Taylor C.M., Hastings A., 2005: Allee effects in biological invasions. *Ecological Letters* 8: 895–908.

- Telecky T.M., 2001: United States import and export of live turtles and tortoises. *Turtle and Tortoise Newsletter* 4: 8–13.
- Thiesmeier B., Jäger O., Fritz, U., 1994: Erfolgreiche Reproduktion des Ochsenfrosches (*Rana catesbeiana*) im nördlichen Landkreis Böblingen (Baden-Württemberg). *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 1: 169–176.
- Thomsen, P., J. Kielgast, L. L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen et al. 2012: Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology* 21: 2565–2573.
- Thuiller W., Richardson D., Pyšek P., Midgley G., Hughes G., Rouget M., 2005: Niche based modelling as a tool for predicting the risk of alien plant invasions at a global scale. *Global Change Biology* 11: 2234–2250.
- Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P., 2009: DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 110–117.
- Van Strien A.J., Van de Pavert R., Moss D., Yates T.J., Van Swaay C.A.M., Vo P., 1997: The statistical power of two butterfly monitoring schemes to detect trends. *Journal of Applied Ecology*, 34: 817–828.
- Vila M., Espinar J.L., Hejda M., Hulme P.E., Jarošík V. et al., 2011: Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecological Letters* 14: 702–708.
- Vogler R. E., Beltramino A. A., Sede M. M., Gregoric D. E. G., Núñez V., Rumi A., 2013: The giant African snail, *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinidae): Using bioclimatic models to identify South American areas susceptible to invasion. *American Malacological Bulletin*: 31 39–51.
- Vogt G., 2018: Investigating the genetic and epigenetic basis of big biological questions with the parthenogenetic marbled crayfish: A review and perspectives. *Journal of Biosciences* 43: 189–223.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. & Hebert, P.D.N., 2005: DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 1847–1857.
- Williams, K. E., Huyvaert, K. P., & Piaggio, A. J., 2017: Clearing muddied waters: Capture of environmental DNA from turbid waters. *PLoS One*, 12(7), e0179282.
- Williamson M.H., 1996: *Biological Invasions*. Chapman & Hall, London.
- Williamson M.H., Fitter A., 1996: The characters of successful invaders. *Biological Conservation* 78: 163–170.
- Williamson I., 1999: Competition between the larvae of the introduced cane toad *Bufo marinus* (Anura: Bufonidae) and native anurans from the Darling Downs area of southern Queensland. *Australian Journal of Ecology* 24: 636–643.
- Wirth, T. and Bernatchez L., 2001: Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature* 409(6883):1037–1039.
- Wittenberg R., Cock M.J. W., 2001: *Invasive Alien Species: A Toolkit for Best Prevention and Management Practices*. CAB International, Wallingford, UK.
- Xia, Z., Zhan, A., Gao, Y., Zhang, L., Haffner, G. D., & MacIsaac, H. J., 2018: Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA). *Biological invasions*, 20(2), 437–447.
- Zaranko D. T., Farara D. G., Thompson F. G., 1997: Another exotic mollusc in the Laurentian great lakes: the New Zealand native *Potamopyrgus antipodarum* (Gray 1843) (Gastropoda, Hydrobiidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 809–814.
- Zicha O., 2019: www.biolib.cz

10 Přílohy

10.1 Identifikační karty

Vyšší rostliny

- azola americká (*Azolla filiculoides*)
- dvouzubec černoplodý (*Bidens frondosa*)
- chebule karolínská (*Cabomba caroliniana*)
- lysichiton americký (*Lysichiton americanus*)
- okřehek červený (*Lemna turionifera*)
- plevuňka (*Alternanthera philoxeroides*)
- pupečník pryskyřníkovitý (*Hydrocotyle ranunculoides*)
- spirálovka větší (*Lagarosiphon major*)
- stolístek různolistý (*Myriophyllum heterophyllum*)
- stolístek vodní (*Myriophyllum aquaticum*)
- šípátka širolistá (*Sagittaria latifolia*)
- tokozela vzplývavá (*Eichhronia crassipes*)
- vodní mor kanadský (*Elodea canadensis*)
- vodní mor americký (*Elodea nuttallii*)
- zakucelka (*Ludwigia peploides*)
- zakucelka velkokvětá (*Ludwigia grandiflora*)

Měkkýši

- člunka pravohrotá (*Ferrissia californica*)
- korbíkula asijská (*Corbicula fluminea*)
- korbíkula brakická (*Corbicula fluminalis*)
- kružník malý (*Gyraulus parvus*)
- levatka ostrá (*Physa acuta*)
- menetovník rozšířený (*Menetus dilatatus*)
- písečník novozélandský (*Potamopyrgus antipodarum*)
- slávička kvaga (*Dreissena bugensis*)
- slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*)
- škeblíčka asijská (*Sinanodonta woodiana*)

Korýši

- *Chelicorophium curvispinum*
- blešivec (*Gammarus tigrinus*)
- blešivec velohrbý (*Dikerogammarus villosus*)
- beruška (*Proasellus coxalis*)
- krab čínský (*Eriocheir sinensis*)
- rak červený (*Procambarus clarkii*)
- rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*)
- rak ničivý (*Cherax destructor*)
- rak pruhovaný (*Faxonius limosus*)
- rak signální (*Pacifastacus leniusculus*)
- rak statný (*Faxonius virilis*)

Ryby

- amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*)
- amur černý (*Mylopharyngodon piceus*)

- hadohlavec skvrnitý (*Channa argus*)
- hlavačkovec Glenův (*Percottus glenni*)
- rody hlaváčů (*Babka* sp., *Neogobius* sp., *Ponticola* sp.)
- hrouzek Belingův (*Romanogobio bellingi*)
- jeleček duhový (*Notropis chromosus*)
- jelčík červenav (*Cyprinella lutrensis*)
- kardinálka čínská (*Tanichthys albonubes*)
- koljuška třístná (*Gasterosteus aculeatus*)
- komplex karase (Complex *Carassius*)
- kapr obecný (*Cyprinus carpio*)
- rod okounek (*Micropterus* sp.)
- piskoř dálnovýchodní (*Misgurnus anguillicaudatus*)
- pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)
- rezatka čínská (*Myxocyprinus asiaticus*)
- siven americký (*Salvelinus fontinalis*)
- rod slunečnice (*Lepomis* sp.)
- střevlička východní (*Pseudorasbora parva*)
- sumeček tečkovaný (*Ictalurus punctatus*)
- rod sumeček (*Ameiurus* sp.)
- rod tolstolobik (*Hypophthalmichthys* sp.)

Plazi

- kajmanka dravá (*Chelydra serpentina*)
- vousivka ploskohlavá (*Platemys platycephala*)
- klapavka kýlnatá (*Sternotherus carinatus*)
- Klapavka obecná (*Sternotherus odoratus*)
- Želva nádherná (*Trachemys scripta*)

Ostatní

- bochnatka americká (*Pectinella magnifica*)
- komár tygrovaný (*Aedes albopictus*)
- medúzka sladkovodní (*Craspedacusta sowerbii*)
- ploštěnka americká (*Dugesia tigrina*)

10.2 Odkaz na metodiku a přílohy ke stažení

- www.bioinvaze.agrobiologie.cz