

ANNA JANICZEK¹ , KATARZYNA IZWORSKA¹ , TOMASZ SUCHAN¹ ,
MICHAŁ RONIEMER¹ 

Autor korespondencyjny: a.janiczek@botany.pl

¹ Instytut Botaniki im. W. Szafera Polskiej Akademii Nauk, ul. Lubicz 46, 31-512 Kraków

W. Szafer Institute of Botany Polish Academy of Sciences, Lubicz 46, 31-512 Cracow

***seda*DNA – przeszłość środowiska zapisana w kodzie genetycznym**

***seda*DNA – nature's past recorded in the genetic code**

DOI: <https://doi.org/10.12775/KOSMOS.2024.004>

Abstrakt

Osady gromadzące się na dnie zbiorników wodnych stanowią cenne źródło informacji o przeszłości środowiska przyrodniczego. Tradycyjne badania paleoekologiczne opierały się głównie na analizie zachowanych w sedymencie pyłków roślin i makroszczątków. W międzyczasie następował intensywny rozwój genetyki, a w wielu dziedzinach nauk przyrodniczych zaczęto korzystać z informacji zawartych w DNA organizmów. Nowe metody izolacji i sekwencjonowania DNA umożliwiły wykorzystanie informacji genetycznej zachowanej w osadach (tzw. *seda*DNA, *sedimentary ancient DNA*) w badaniach środowiskowych. Dzięki temu możliwa stała się m.in. detekcja organizmów, które nie zostawiają śladów wykrywanych tradycyjnymi metodami paleoekologii oraz zwiększenie rozdzielczości prowadzonych badań. DNA z czasem ulega degradacji, co sprawia, że uzyskanie informacji z takiego materiału jest problematyczne. Obecnie badania w dziedzinie paleogenetyki skupiają się nie tylko na rozwoju nowych metod sekwencjonowania, ale również na czynnikach wpływających na zachowanie *seda*DNA w środowisku. Takie wieloaspektowe podejście zwiększa

efektywność planowania analiz – coraz lepiej rozumiemy, gdzie prawdopodobieństwo zachowania DNA jest największe oraz jakie metody stosować, aby skutecznie włączyć dane genetyczne do badań paleoekologicznych i biogeograficznych.

Słowa kluczowe: *sedaDNA*, osady jeziorne, kopalne DNA, paleoekologia, biogeografia

Abstract

Sediments that accumulate at the bottom of lakes and other water bodies have long been a valuable source of information about the past of the natural environment. Traditional palaeoecological research mainly relied on pollen and macrofossil analysis. Meanwhile, the tools of genetics have developed, and the information contained in DNA has begun to be applied to a wide range of fields in natural sciences. New methods of DNA isolation and sequencing have also made it possible the use of genetic information preserved in sediments (so-called *sedaDNA*, sedimentary ancient DNA) in environmental studies. This has a great potential to increase the resolution of research and to allow the detection of organisms that do not leave traces detectable by traditional methods of palaeoecology. However, DNA degrades over time and obtaining information from ancient material is challenging and problematic. Current research in palaeogenetics focuses not only on the development of new sequencing methods, but also on the factors that influence the preservation of *sedaDNA* in the environment. This multifaceted approach increases the efficiency of analysis planning – we know more and more about where DNA is most likely to be preserved and what methods should be used to efficiently incorporate genetic data into the palaeoecological and biogeographical research.

Key words: *sedaDNA*, lake sediments, ancient DNA, palaeoecology, biogeography

WSTĘP

Ostatnie dekady rozwoju technik biologii molekularnej doprowadziły do rewolucji, między innymi, w naukach ekologicznych i ewolucyjnych. Postęp w badaniach stał się możliwy dzięki opracowaniu rutynowych metod sekwencjonowania, czyli odczytywania sekwencji nukleotydów kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) (Shokralla i współaut. 2012). Stosunkowo niedawno, powszechnie stosowane sekwencjonowanie metodą Sangera (sekwencjonowanie pierwszej generacji), zostało w wielu dziedzinach zastąpione, sekwencjonowaniem nowej generacji (z ang. *Next Generation Sequencing*; NGS). Metoda Sangera pozwala na odczytywanie pojedynczych fragmentów DNA, podczas gdy metody NGS umożliwiają równoległe sekwencjonowanie wielu fragmentów (Verma i współaut. 2017). Dzięki temu możliwe jest uzyskanie dużej ilości danych z różnych źródeł (np. od wielu gatunków lub osobników), w stosunkowo krótkim czasie i przy coraz niższych kosztach. Analizy NGS otworzyły nowe możli-

wości nie tylko w diagnostyce, kryminalistyce i przemyśle, ale również umożliwiły skuteczne i efektywne badanie zróżnicowania genetycznego organizmów w środowisku.

DNA ŚRODOWISKOWE

W naszym otoczeniu znajduje się bardzo wiele cząsteczek DNA. Każdy organizm pozostawia ślad swojej obecności w postaci wydzielin, komórek czy fragmentów tkanek, które zawierają materiał genetyczny, a po ich rozpadzie uwalniają go bezpośrednio do otoczenia. Tak zwane DNA środowiskowe (ang. *environmental DNA*; eDNA) jest mieszaniną DNA pochodzącego z różnych organizmów, którą można wyizolować np. z gleby lub wody (Taberlet i współaut. 2012). Na eDNA składają się różne frakcje; wyróżnia się DNA wewnątrzkomórkowe, zawarte w komórkach zarówno organizmów jednokomórkowych, jak i wielokomórkowych (np. złuszczone komórki nabłonka, ślina, śluz, pyłek, spory) oraz wolne DNA, nazywane zewnątrzkomórkowym, które nie jest już chronione przez błony komórkowe.

Pozostawione ślady mogą umożliwić wykrycie danego organizmu w badanym środowisku. Ten fakt wykorzystywany jest między innymi w kryminalistyce do pobierania prób DNA z miejsca zbrodni. Nawet krótki kontakt z powierzchnią (np. z narzędziami czy naczyniami) może wystarczyć, aby pozostawić materiał genetyczny w postaci ludzkich komórek, takich jak komórki skóry. Techniki analityczne umożliwiają izolację i identyfikację unikatowych profili genetycznych, które można porównać z bazą danych osób podejrzanych lub ofiar (Meakin i Jamieson, 2013). Podobnie, badanie śladów obecności zwierząt za pomocą eDNA stanowi skuteczną i nowoczesną metodę monitorowania ich populacji. Na przykład, badania z wykorzystaniem DNA środowiskowego stanowią przełom w monitorowaniu i identyfikowaniu gatunków zapylaczy odwiedzających kwiaty. Tradycyjne metody obserwacji zapylaczy, choć ważne, często są pracochłonne i czasochłonne. W przeciwieństwie do nich, analiza DNA deponowanego na kwiatkach umożliwia szybką i precyzyjną identyfikację gatunków uczestniczących w procesie zapylania. Pozwala ona nie tylko na efektywne monitorowanie różnorodności zapylaczy, ale także na identyfikację tych gatunków, które są kluczowe dla utrzymania równowagi ekosystemów (Newton i współaut. 2023). Najnowsze badania sugerują możliwość wiarygodnego genotypowania poszczególnych osobników, w tym identyfikację płci, nawet na podstawie eDNA pochodzącego ze śladów pozostawionych przez duże ssaki na śniegu (De Barba i współaut. 2023). Cenne narzędzie, jakim jest analiza eDNA, pozwala na zbieranie informacji bezpośrednio z naturalnego środowiska, otwierając nowe perspektywy dla skutecznego monitorowania i ochrony dzikiej fauny. Dotyczy to również organizmów wodnych, w tym ryb, płazów czy owadów (Valentini i współaut. 2016, Keck i współaut. 2022). DNA środowiskowe można również pobrać z prób powietrza zebranych na otwartej przestrzeni, nawet w odległości kilkuset metrów od źródła, co otwiera nowe możliwości w monitorowaniu i identyfikowaniu gatunków oraz prowadzeniu badań biologicznych w różnych środowiskach (Clare i współaut. 2022).

Środowiskowe DNA jest wykorzystywane w pracach nad różnorodnością i dynamiką współczesnych ekosystemów oraz populacji. W tego typu analizach stosuje się tak zwane barkody (z ang. *barcodes* – kody kreskowe), czyli krótkie sekwencje pochodzące z wybranych, standardowych regionów genomu, charakterystyczne dla danego gatunku. Metoda barkodingu została pierwotnie opracowana w celu identyfikacji taksonu na podstawie DNA wyizolowanego z badanego osobnika w odniesieniu do bazy referencyjnej. Jako barkody wykorzystywane są głównie fragmenty DNA, które występują w genomie w wielu kopiach (np. DNA mitochondrialne, DNA rybosomalne), ponieważ ułatwia to namnożenie fragmentów ze zdegradowanego materiału; optymalnie, fragmenty takie mają sekwencje specyficzne na poziomie gatunku. W zależności od celów badań i koniecznej rozdzielczości, stosuje się barkody opracowane dla dużych grup taksonomicznych (np. grzyby, rośliny naczyniowe, owady) lub dla mniejszych grup (np. rodziny lub rodzaje). Dzięki technikom NGS, które pozwalają na sekwencjonowanie DNA bezpośrednio z mieszaniny wielu cząsteczek, koncepcja barkodingu może być wykorzystana również w analizach prób DNA środowiskowego (zob. Kowalska i współaut. 2019). Barkodowanie całej złożonej próby środowiskowej określa się jako metabarkoding – to bardziej zaawansowana technika, która wykorzystuje jednoczesne sekwencjonowanie barkodów DNA pochodzących z wielu osobników różnych gatunków występujących w środowisku. Metabarkoding pozwala określić skład gatunkowy całych zbiorowisk organizmów obecnych w badanym środowisku. Ze względu na znaczny stopień degradacji DNA środowiskowego, w analizach metabarkodingu wykorzystuje się najczęściej krótsze fragmenty DNA niż w tradycyjnym barkodingu organizmów.

KOPALNE DNA

Materiał genetyczny pozostający w środowisku z czasem ulega postępującemu rozpadowi i modyfikacjom. Angielski termin *ancient DNA* (aDNA), tłumaczony jako antyczne DNA lub kopalne DNA, określa materiał genetyczny pocho-

dzący z dawno obumarłych organizmów, który występuje w środowisku naturalnym w śladowym stężeniu i w postaci bardzo krótkich fragmentów. Obecne techniki biologii molekularnej pozwalają na analizę nawet silnie pofragmentowanego i zdegradowanego DNA. Tego typu badania rozpoczęły się od wykorzystania DNA zachowanego w okazach muzealnych i zielnikowych (Nakahama 2021; Weiß i współaut. 2016). Taki materiał (określany jako muzealne DNA lub historyczne DNA), pochodzi z okazów zebranych i zakonserwowanych przez człowieka i przechowywanych w kontrolowanych warunkach. Jego wiek rzadko przekracza 200 lat; charakteryzuje się mocną fragmentacją cząsteczek, jednak modyfikacje strukturalne, charakterystyczne dla środowiskowego DNA kopalnego, są ograniczone (Raxworthy i Smith 2021).

Najwcześniej eksplorowanym starym materiałem genetycznym było DNA zachowane w szczątkach organizmów zwierzęcych, takich jak włosy, zęby, czy kości ssaków. Badania tego typu materiałów zostały zapoczątkowane w latach 80. XX wieku, kiedy po raz pierwszy wyizolowano i odczytano krótkie fragmenty DNA z muzealnego eksponatu wymarłego gatunku zebry kwagga (*Equus quagga quagga*) (Higuchi i współaut. 1984). Rok później Svante Pääbo (Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny 2022; <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2022/paabo/facts/>) zsekwencjonował fragmenty DNA jednej z egipskich mumii (Pääbo 1985).

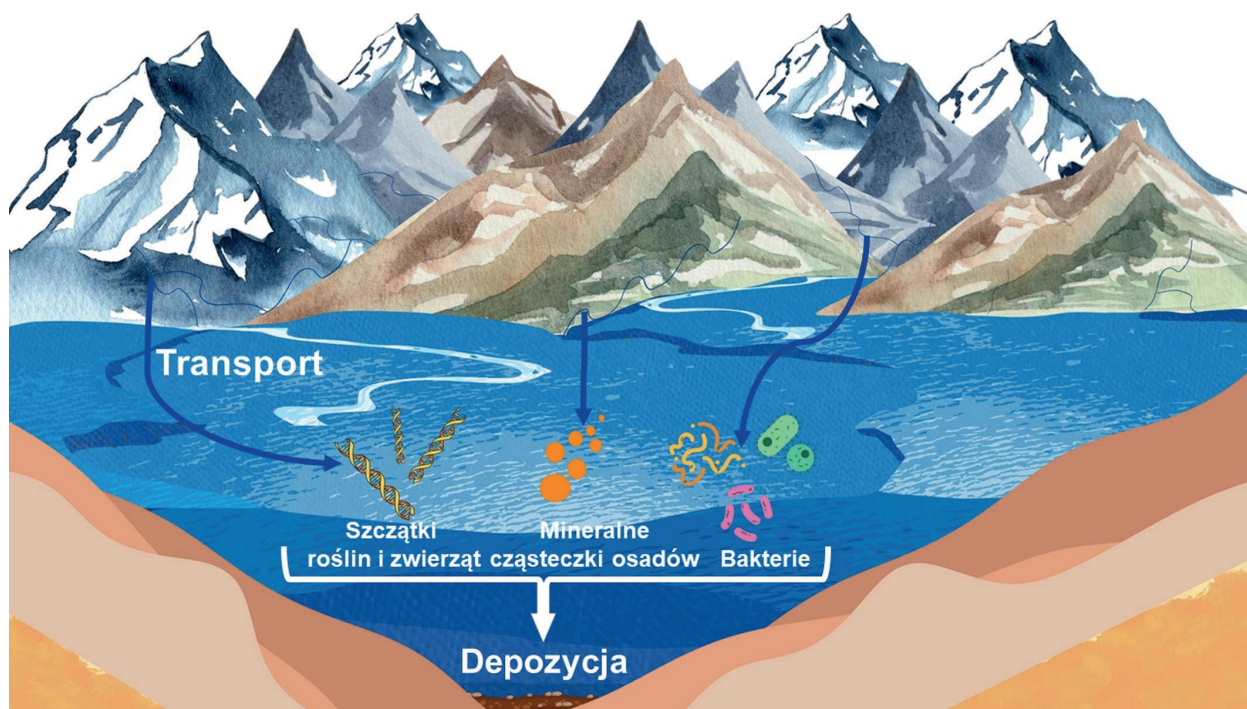
Lata ulepszania metod oraz dalszy rozwój technik biologii molekularnej, przede wszystkim sekwencjonowania nowej generacji, pozwoliły na coraz bardziej efektywną analizę aDNA i dały początek nowej dyscyplinie naukowej – paleogenomice. Ta stosunkowo młoda dziedzina dostarcza cennych informacji dotyczących przeszłości człowieka oraz, coraz częściej, stanowi źródło informacji w badaniach nad zwierzętami, roślinami, a także dawnym środowiskiem przyrodniczym. W pierwszych dekadach XXI w. udało się już zsekwencjonować obszerne dane genomowe np. ze szczątków wymarłych zwierząt, takich jak mamuty, zakonserwowanych przez setki tysięcy lat w warunkach wiecznej

zmarzliny (van der Valk i współaut. 2021). Intensywny rozwój analiz paleogenomicznych jest również związany z wykorzystaniem potencjału DNA zachowanego w specyficznych warunkach osadów akumulowanych na dnie zbiorników wodnych.

DNA ZACHOWANE W OSADACH

Możliwości wykorzystania DNA środowiskowego nie ograniczają się jedynie do badania zmian zachodzących w środowisku współczesnym. W kontekście zmian ekosystemów i populacji w czasie szczególnie interesującym rodzajem eDNA jest DNA osadowe. Określa się tak materiał pochodzący z osadów dennych, czyli zgromadzonych fragmentów organicznych (obumarłe szczątki organizmów, pyłki roślin, zarodniki, nasiona) oraz nieorganicznych (np. cząstki mineralne, tj. kwarc czy węglany), które zostały wytworzone w zbiornikach wodnych (jeziora, morza, oceany) lub przetransportowane do nich z otaczającego środowiska i osadzają się na ich dnie (Ryc. 1). Miejscem odkładania się regularnych warstw osadów są często również jaskinie. Ze względu na wiek i charakterystykę wyróżnia się bliskie współczesności, mniej zdegradowane osadowe DNA z warstw powierzchniowych (ang. *sedimentary* DNA; sedDNA) oraz starsze i silnie zdegradowane osadowe kopalne DNA (ang. *sedimentary ancient* DNA; sedaDNA) (Capo i współaut. 2021), które w ostatnich latach stanowi obiekt szczególnego zainteresowania w badaniach paleogenomicznych.

Osady denne zbiorników wodnych stanowią dokumentację zmian, jakie zachodziły w ekosystemach wodnych. Osady zbiorników śródlądowych oraz torfowiska tworzą także unikatowe archiwa przeszłości otaczającego je środowiska lądowego. Źródłem deponowanego materiału biologicznego są nie tylko szczątki organizmów zamieszkujących dany zbiornik, ale również materiał organiczny pochodzący z sąsiadujących ekosystemów lądowych. Jest on nanoszony do zbiorników poprzez ciek wodny, grawitacyjnie oraz za pośrednictwem wiatru. Stanowią go na przykład: nasiona, zarodniki, pyłek, owoce, szczątki roślinne, szyszki oraz szczątki owadów



Ryc. 1. Proces tworzenia osadów na dnie jeziora oraz (przykładowe) źródła pochodzenia *sedaDNA*

(szczególnie fragmenty pokryte chityną), a także organizmy żyjące w glebie (Ryc. 1). Powstałe na przestrzeni lat osady tworzą chronologicznie ułożone warstwy, co umożliwia ich datowanie, czyli określenie wieku, z wykorzystaniem metody radiowęglowej (Goslar 1995). Dzięki temu możliwe jest rekonstruowanie zmian środowiskowych w czasie. Skład osadów dennych zmienia się sezonowo, co może nawet skutkować, w odpowiednich warunkach, deponowaniem wyraźnych lamin o różnym składzie. Struktura osadu może zostać łatwo zaburzona w wyniku np. aktywności fauny, ruchów wody, osuwania się osadu a także, w przypadku stawów górskich, poprzez spływy gruzowe ze zboczy i lawiny. Stąd, ważnymi czynnikami, które wpływają na zachowanie warstwowej struktury są: stały niedobór tlenu, odpowiednia topografia, głębokość jeziora i osłonięcie od wiatru (Goslar 1995).

Wnioskowanie o przeszłości środowiska przyrodniczego na podstawie osadów może opierać się na szczegółowej analizie makroszczątkowej, która pozwala opisać makrofosylia roślinne i zwierzęce, w połączeniu z analizą danych palinologicznych, obejmującą identyfikację pyłków roślinnych. Obie te metody wzajemnie się uzu-

pełniają, dostarczając informacji na temat gatunków budujących dawne ekosystemy (McLachlan i współaut. 2005; Williams i współaut. 2004). Jednak w przypadku organizmów o podobnych cechach morfologicznych lub pyłków o zbliżonym kształcie i strukturze, badania te mogą prowadzić do niejednoznacznych wniosków. Co więcej, identyfikacja organizmów, które nie pozostawiły makroszczątków ani pyłków w badanym materiale, jest niemożliwa. Dlatego analiza osadowego kopalnego DNA stanowi bardzo ważne, nowe rozszerzenie analiz paleoekologicznych, pozwalające na zwiększenie ich rozdzielczości. Jest ona szczególnie istotna w przypadku organizmów rzadkich lub słabo reprezentowanych w badanej próbie (Sønstebo i współaut. 2010).

OSADY JEZIORNE I STABILNOŚĆ DNA W ŚRODOWISKU

Zbiorniki wodne, takie jak jeziora, morza oraz oceany, mogą zapewniać sprzyjające warunki dla depozycji i zachowania wrażliwych cząsteczek kwasu deoksyrybonukleinowego w środowisku. Ze względu na obszerność tematu, w tym artykule zagadnienie badań *sedaDNA*

zostanie omówione głównie na przykładzie osadów jeziornych.

Zachowanie DNA w warstwach osadów jest procesem skomplikowanym. Wolny, niezwiązany z niczym DNA szybko ulega degradacji w środowisku. W osadach można znaleźć obie formy eDNA (wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe). eDNA zewnątrzkomórkowe jest szczególnie narażony na enzymatyczną aktywność mikroorganizmów znajdujących się w środowisku oraz działanie różnych czynników abiotycznych (Dabney i współaut. 2013). Uwolnione z komórek cząsteczki DNA zdolne są jednak do wiązania się z cząstkami mineralnymi znajdującymi się w sedymentach. Dla zachowania materiału genetycznego kluczowe znaczenie mają skład i struktura osadów mineralnych oraz odpowiednia termika wody w zbiorniku, która pozwala na odizolowanie deponowanych na dnie osadów od środowiska zewnętrznego i dostępu tlenu. Warstwy wody o niskiej temperaturze oraz znikoma zawartość tlenu w dolnych warstwach jezior zwiększają prawdopodobieństwo przetrwania DNA. Najnowsze badania wskazują, że na efektywność procesu tworzenia kompleksów DNA z cząstkami mineralnymi i ilość zachowanego DNA duży wpływ ma skład mineralny osadów. Cząsteczki DNA preferują wiązanie się z cząsteczkami ilów. Kationy takie jak Na^+ , Ca^{2+} , czy Mg^{2+} tworzą mostki pomiędzy grupami fosforanowymi DNA a cząsteczkami osadu (Levy-Booth i współaut. 2007). Do czynników, które również wpływają na adsorpcję DNA do cząsteczek mineralnych znajdujących się w sedymentach, należą pH wody oraz jej przewodność elektryczna. Wiązaniu DNA sprzyjają średnie przewodnictwo wody ($100\text{--}500\ \mu\text{S cm}^{-1}$) oraz pH w zakresie 7–9. Te dwa czynniki również związane są z obecnością jonów w wodzie (Jia i współaut. 2022). Takie powinowactwo umożliwia efektywne zachowanie kopalnego DNA na dnie jezior a także zabezpiecza je przed ewentualnym wypłukiwaniem z osadu i przemieszczaniem się pomiędzy warstwami (Kanbar i współaut. 2020). Co więcej, związane DNA nie jest podatne na działanie znajdujących się w środowisku nukleaz, czyli enzymów tnących wiązania cząsteczek (Torti i współaut. 2015). Badania sugerują,

że same enzymy mogą tworzyć kompleksy ze składnikami osadów, przez co również one ulegają dezaktywacji (Khanna i Stotzky, 1992). Obecnie trwają intensywne prace nad szczegółowym poznaniem i zrozumieniem procesów wiązania się DNA z cząsteczkami osadów oraz czynników tafonomicznych, które je warunkują. Pozwoli to w przyszłości na dokładniejsze określenie stanowisk i warstw osadów, w których jest większe prawdopodobieństwo znalezienia materiału genetycznego, co jest niezwykle istotne już na etapie planowania badań.

Komórki żywych organizmów posiadają szereg mechanizmów zabezpieczających DNA przed uszkodzeniami oraz umożliwiających rozpoznanie i naprawę nieprawidłowości (Friedberg 2003). Jednak, po obumarciu komórki, DNA nie jest w żaden sposób zabezpieczone, przez co ulega wielu modyfikacjom (szczególnie w przypadku materiału długo pozostającego w środowisku, czyli DNA kopalnego). Jednym z podstawowych procesów, które zachodzą po śmierci komórki, jest fragmentacja materiału genetycznego. Enzymy pochodzące z obumarłej komórki, a następnie z innych organizmów, tną DNA na krótsze odcinki. Większość sekwencji aDNA zachowuje długość 40 do 500 par zasad (Pääbo 1989). W miarę upływu czasu po śmierci komórki pojawiają się również modyfikacje strukturalne, które prowadzą do zmian w sekwencji nukleotydów (najczęściej cytozyna jest przekształcana do uracylu), co utrudnia dalszą analizę i interpretację otrzymanych danych (Hofreiter i współaut. 2001). Ważnym czynnikiem środowiskowym, który wpływa na zachowanie DNA, jest temperatura. By sprawdzić, jak długo cząsteczki mogą być zachowane w środowisku, przeprowadzono badania mitochondrialnego DNA (mtDNA) pobranego z kości wymarłych ptaków moa (*Dinornithiformes* sp.). Wykazano, że szacowany czas półtrwania krótkich fragmentów o długości 242 par zasad w temperaturze 13°C wynosi 521 lat. Co ważne, zaobserwowano również, że obniżenie temperatury znacznie zmniejszało częstość fragmentacji (Allentoft i współaut. 2012). W sprzyjających warunkach DNA może przetrwać ponad milion lat, co potwierdziły późniejsze odkrycia. Do niedawna,

najstarszym kopalnym DNA był materiał uzyskany z fragmentów zębów trzonowych mamutów (*Mammuthus* sp.) znalezionych na Syberii, którego wiek oszacowano na 1,2 miliona lat (van der Valk i współaut. 2021). Najnowsze badania przeprowadzone na Grenlandii wykazują, że eDNA może zachować się w próbach sprzed 2 milionów lat. Jest to możliwe dzięki sprzyjającym warunkom środowiska, do których należą przede wszystkim niska temperatura oraz skład osadów bogatych w minerały (Kjær i współaut. 2022). Z tego względu większość obecnie prowadzonych badań ma miejsce w rejonach chłodnych i polarnych, w warstwach wiecznej zmarzliny lub chłodnych zbiorników wodnych. Podobnie, korzystne warunki dla zachowania materiału genetycznego występują w rejonach górskich, szczególnie tych o charakterze alpejskim. Prowadzone są jednak również badania z wykorzystaniem DNA osadowego w terenach tropikalnych (Boessenkool i współaut. 2013; Stooft-Leichsenring i współaut. 2012). Wskazuje to, że wyższa temperatura środowiska nie uniemożliwia zachowania DNA, a co za tym idzie, skutecznej analizy materiału.

ZASTOSOWANIE ANALIZ SEDADNA

Osady jeziorne są obiektem badań, między innymi paleobotanicznych, od wielu lat. Wprowadzenie analiz genetycznych pozwoliło na znaczące zwiększenie rozdzielczości standardowych metod paleoekologicznych (Anderson-Carpenter i współaut. 2011, Pedersen i współaut. 2016). Potencjał zastosowania tych analiz wciąż jest jednak testowany i eksplorowany.

Sekwencjonowanie docelowych fragmentów DNA (markerów metabarkodingowych dla wybranych grup taksonomicznych) jest podstawową metodą analizy sedaDNA, wykorzystywaną w badaniach dotyczących dynamiki zbiorowisk roślinnych, odtwarzania dawnych zasięgów gatunków fauny i flory oraz ich różnorodności genetycznej (Schwörer i współaut. 2022). Dzięki optymalizacji technik izolacji sedaDNA, wysokoprzepustowemu sekwencjonowaniu NGS, zaawansowanej analizie bioinformatycznej oraz ciągłemu rozwojowi baz re-

ferencyjnych (w tym lokalnych), naukowcy mają obecnie dostęp do danych genetycznych o coraz lepszej rozdzielczości, dla różnych grup taksonomicznych. To z kolei umożliwia rozszerzenie badań dawnych zbiorowisk również o grupy organizmów takie jak grzyby czy bakterie, których identyfikacja zazwyczaj nie jest możliwa za pomocą standardowych metod stosowanych w paleobotanice. Otwiera to możliwości dokładniejszej rekonstrukcji minionych środowisk i zachodzących w nich zmian oraz lepszego zrozumienia procesów i relacji pomiędzy różnymi grupami organizmów (Ficetola i Taberlet 2023).

Badania sedaDNA dostarczają kompleksowych informacji o historii, ewolucji i potencjale siedliskowym zbiorowisk. Analiza DNA okrzemek oraz makrofitów zachowanego w osadach pozwoliła na przykład na prześledzenie 10 800-letniej historii jeziora Satagay (Syberia) i wpływu jaki na lokalne ekosystemy wodne miały ocieplenie klimatu i rozwój rolnictwa (Baisheva i współaut. 2023). Jak pisaliśmy, możliwość wykorzystania sedaDNA wykracza jednak znacznie poza badania ekosystemów wodnych i przynosi także unikatowe informacje dotyczące lokalnego środowiska lądowego. Wykorzystując informację genetyczną zachowaną w osadach, opisano możliwy scenariusz kolonizacji Islandii przez rośliny po ustąpieniu zlodowacenia. Wykazano, że prawdopodobnym źródłem ich rozprzestrzeniania był lód dryfujący na morzu (Alsos i współaut. 2021). Inne badania, w których wykorzystano sedaDNA, pozwoliły na rekonstrukcję zmian zachodzących w środowisku Fennoskandii. Wyniki analizy sugerują, że ekosystemy w tym regionie osiągnęły równowagę różnorodności biologicznej około 8 tysięcy lat temu i utrzymują ją na stałym poziomie do dziś, mimo zmian klimatycznych oraz napływu nowych gatunków (Alsos i współaut. 2022). Wiele informacji na temat zmian środowiskowych mogą dostarczyć drobnoustroje obecne w osadach. Analiza zbiorowisk mikroorganizmów na podstawie sedaDNA z wiecznej zmarzliny wykazała gwałtowną zmianę, która zaszła w środowisku Ameryki Północnej około 13 300 tysięcy lat temu. Zmiana w składzie

mikrobiomu była powiązana z pojawieniem się krzewów, a później drzew na terenach stepotundry (Murchie i współaut. 2023). Osady mogą także pomóc zrozumieć, jak zmiany klimatyczne wpłynęły na społeczności ludzkie. Tego typu badania przeprowadzono, analizując rdzenie pobrane w Morzu Arabskim. Dzięki *sedaDNA* możliwa była rekonstrukcja monsunów zimowych z ostatnich 6 tysięcy lat, które miały wpływ na funkcjonowanie cywilizacji doliny Indusu (Giosan i współaut. 2018).

Szczególnie interesującym przykładem znaczenia badań *sedaDNA* jest temat funkcjonowania flory górskiej i polarnej w kontekście zmian klimatycznych. Badania tej flory są kluczowe dla poznania dynamiki bioróżnorodności w wysokich górach oraz obszarach polarnych, które uchodzą za szczególnie wrażliwe na zmiany klimatyczne. Badania te stanowią ważne narzędzie do zgłębiania tajemnic przeszłości tych unikatowych miejsc, jednocześnie wspierając planowanie działań ochronnych wobec współczesnych wyzwań środowiskowych. Gatunki roślin występujące w regionach północnych często obecne są również w izolowanych ekosystemach gór strefy umiarkowanej, tworząc biogeograficzny element arktyczno-alpejski. Takie rozmieszczenie wynika z historycznych zmian klimatu w plejstocenie, kiedy zlodowacenia obejmowały zarówno obszary polarne, jak i część strefy umiarkowanej. W okresach zimnych (glacjalach) zasięgi roślin przesuwały się na południe, natomiast w cieplejszych okresach (interglacjalach) rośliny ponownie zasiedlały uwolnione od lądolodu obszary północne. Populacje roślin zimnolubnych utrzymywały się wtedy w wyższych partiach gór strefy umiarkowanej. Wieloaspektowe badania, łączące *sedaDNA*, analizę pyłkową, makroszczątki roślinne oraz węgle drzewne, pozwalają na rekonstrukcję i szczegółową analizę czynników wpływających na roślinność gór wysokich, również pod kątem przyszłych zmian. Zebrane informacje umożliwiają tworzenie modeli prognozujących zmiany w środowisku pod wpływem różnych czynników. Przeprowadzone symulacje mogą pomóc ekologom w opracowaniu odpowiednich strategii ochrony i zarządzania środowiskiem przyrodniczym (Alsos i współaut.

2023). Dla przykładu, badania przeprowadzone we włoskiej części Alp wskazują, że tamtejsza flora była przez ostatnie stulecia pod silnym wpływem takich czynników, jak wypas zwierząt i pożary. Zebrane dane paleoekologiczne sugerują, że prognozowane zmiany klimatyczne oraz zmiany w użytkowaniu gruntów wpłyną na przesunięcie górnej granicy lasu na większe wysokości, co doprowadzi do zmian w składzie gatunkowym i zmniejszy różnorodność biologiczną (van Vugt i współaut. 2022). Podobne badania w Alpach szwajcarskich, oparte na analizie *sedaDNA* wykazały, że różnorodność flory alpejskiej w holocenie była zależna od zmian klimatycznych, jednak już od 6000 lat istotnie zaznaczał się również wpływ lokalnej działalności człowieka związanej z wylesianiem i gospodarką rolno-pasterską (Garcés-Pastor i współaut. 2022). Na strukturę gatunkową ekosystemów wpływa wiele czynników, zarówno wewnętrznych, jak i zewnętrznych, w tym konkurencja międzygatunkowa, drastyczne zmiany klimatyczne oraz pojawianie się nowych gatunków. Szczególnie populacje roślin wysokogórskich i arktyczno-alpejskich, które charakteryzują się małą konkurencyjnością, mogą ulegać stopniowej eliminacji w wyniku ekspansji roślinności drzewiastej i zmniejszania dostępnej dla nich przestrzeni życiowej. Wyniki badań opartych na 24 000-letnim zapisie *sedaDNA* z jeziora Bolszoje Szczucze na Uralu Polarnym dokumentują jednak nieprzerwaną trwałość lokalnych populacji gatunków arktyczno-alpejskich w obliczu zmian klimatycznych. Analizy genetyczne oraz analizy palinologiczne materiału z jeziora pozwoliły prześledzić zmiany, które ostatecznie doprowadziły do obecnie obserwowanej bioróżnorodności na tym terenie (Clarke i współaut. 2020).

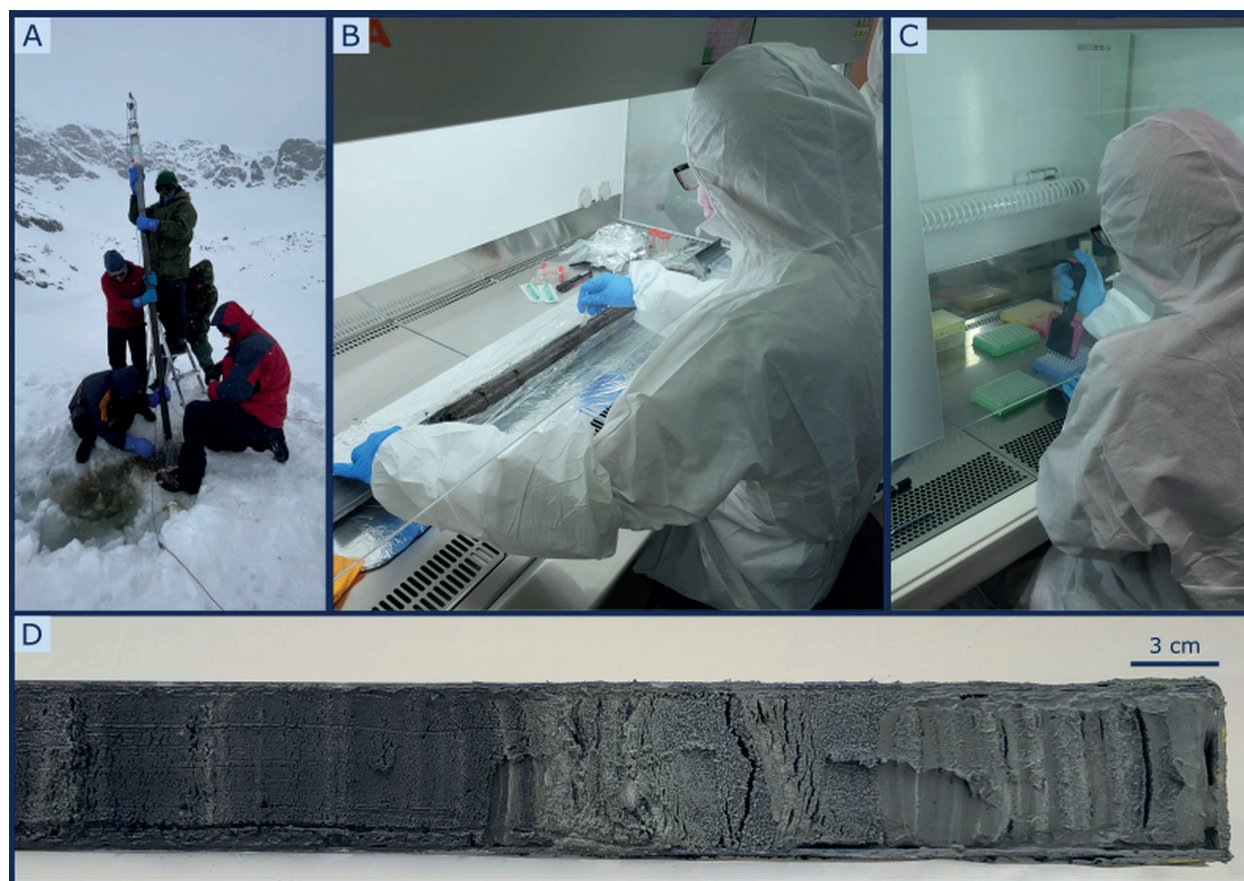
Obecnie celem badań *sedaDNA* nie jest jedynie poznanie składu gatunkowego zbiorowisk organizmów występujących w badanym środowisku. Istotnym nurtem rozwoju tych analiz są badania mające na celu szersze uchwycenie charakterystyki populacyjnej i ewolucyjnej, co stanowi unikatowy potencjał *sedaDNA* wśród materiałów wykorzystywanych w paleoekologii. Podejmowane są próby adaptacji i modyfikacji metod genetyki populacyjnej powszechnie uży-

wanych przy analizach współczesnego materiału genetycznego, aby możliwe było przeprowadzenie analiz na kopalnym DNA. Przykładem może być wykorzystanie sekwencjonowania nie tylko barkodów, ale także wszystkich fragmentów DNA wyizolowanych ze środowiska. W jednym z przeprowadzonych badań zsekwencjonowano próby DNA z osadów jeziornych i zrekonstruowano cały genom chloroplastowy i mitochondrialny glonu *Nannochloropsis limnetica*. Wyniki te umożliwiły analizę historycznego zróżnicowania genetycznego populacji występujących w jeziorze oraz wykrycie dwóch haplotypów (Lammers i współaut. 2021). Z kolei, do dogłębnej analizy historii świerka pospolitego (*Picea abies*) wykorzystano reakcję qPCR (ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy; ang. *quantitative PCR*). Na podstawie wykonanej krzywej topnienia DNA wykazano obecność dwóch grup genetycznych badanego gatunku co pozwoliło na wnioskowanie o prawdopodobnej dawnej migracji świerka do Fennoskandii ze wschodu we wczesnym holocenie (Nota i współaut. 2022). Dzięki badaniom sedaDNA pochodzącego z ośmiu syberyjskich jezior możliwa była też rekonstrukcja zmian zasięgów dwóch gatunków modrzewi (*Larix sibirica* i *L. gmelinii*). Wykorzystanie metody kierunkowego wzbogacania (ang. *target enrichment*) pozwoliło na uzyskanie sekwencji umożliwiających zwiększenie rozdzielczości analiz i rozróżnienie tych gatunków, co z kolei pozwoliło na prześledzenie ich biogeograficznej historii (Schulte i współaut. 2022). Inną rozwijającą się metodą, która ma na celu rekonstrukcję biogeograficzną jest tzw. *multiplexing PCR*. W tym przypadku, w reakcji PCR namnażanych jest w próbach sedaDNA kilka fragmentów DNA, które zawierają informacje o wewnątrzgatunkowej zmienności genetycznej. Wybór tych fragmentów i projektowanie starterów do ich amplifikacji odbywa się na podstawie analizy genomów organellarnych z próby osobników reprezentatywnej dla zasięgu geograficznego. Wykorzystując *multiplexing PCR* zrekonstruowano na podstawie zmienności takiego zestawu sekwencji DNA plastydowego realne rozmieszczenie geograficzne haplotypów borówki bagiennej (*Vaccinium uliginosum*) w Alpach, Uralu Polarnym oraz północnej Nor-

wegii w kilku okresach od schyłku ostatniego zlodowacenia (Lammers i współaut. 2024). Jest to obiecująca technika, która jest stosunkowo prosta i czuła, a pierwsze badania wskazują, że umożliwia efektywne śledzenie zmian zachodzących w obrębie gatunku w przestrzeni i czasie na podstawie sedaDNA. Badania z zakresu biogeografii molekularnej (filogeografia) opierały się dotychczas na analizie zmienności wewnątrzgatunkowej współczesnych populacji w kontekście geograficznym i próbach jej interpretacji w kontekście historycznych zmian zasięgów. Rozwój analiz prób osadów z wykorzystaniem *multiplexing PCR* i *target enrichment* otwiera obecnie bardzo obiecującą perspektywę dla badań biogeograficznych, ponieważ przybliża możliwość analizy zmian rozmieszczenia linii genetycznych bezpośrednio na podstawie zmienności genetycznej sedaDNA z historycznych populacji (paleofilogeografia). Jest to jedno z najbardziej obiecujących i wyjątkowych zastosowań kopalnego DNA z osadów.

METODYKA BADAŃ

Metodyka badań nad kopalnym DNA jest projektowana tak, by zminimalizować ryzyko kontaminacji współczesnym DNA (np. bakteryjnym, pochodzącym z pyłków roślin, a także DNA pochodzącym od osób zajmujących się wydobyciem osadu i jego późniejszymi badaniami) (Parducci i współaut. 2017, Fulton i współaut. 2019). Podczas prac terenowych związanych z próbkowaniem rdzeni osadowych bardzo ważne jest odpowiednie zabezpieczenie i transport materiału. Rekomendowane jest prowadzenie prac terenowych w zimie, gdy w powietrzu znajduje się niewiele pyłków roślinnych, które mogłyby zanieczyścić zebrane próby. Rdzenie pobierane są za pomocą specjalistycznych sond, umożliwiających przebicie się przez warstwy osadu i pobranie rdzenia (słupa niezaburzonych warstw osadu) o średnicy od kilku do kilkunastu centymetrów (Ryc. 2). W przypadku pobierania materiału do analiz sedaDNA optymalne są metody, które pozwalają na pobranie osadów do hermetycznych rur, które w pełni zabezpieczają materiał przed kontaktem z otoczeniem.

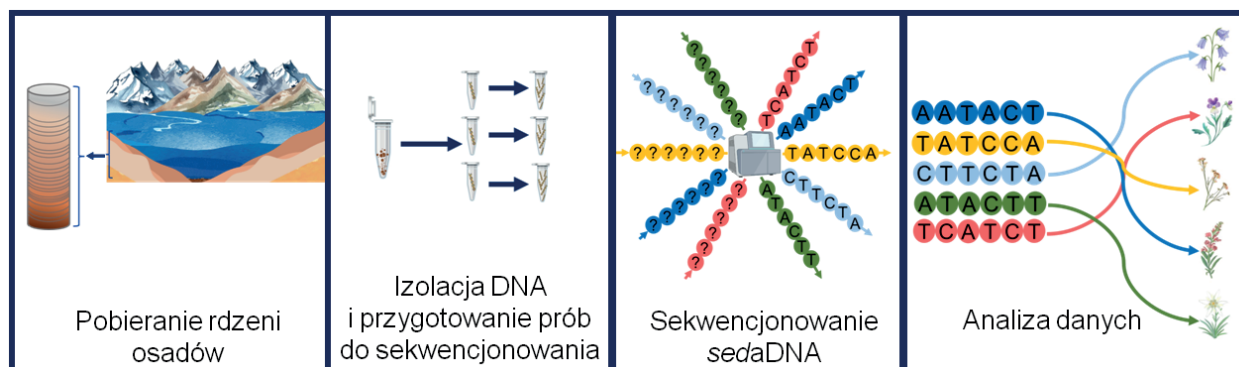


Ryc. 2. A. Prace terenowe — Zielony Staw Gąsienicowy (Tatry, Polska). B. Próbkowanie osadów pod komorą laminarną. C. Przygotowanie prób do sekwencjonowania. D. Fragment profilu osadów (otwarty rdzeń) pobranego w 2023 r. z Czarnego Stawu Gąsienicowego w Tatrach. Ciemniejsze warstwy świadczą o dużej zawartości materiału organicznego (ocieplenie), natomiast jaśniejsze warstwy wskazują na zwiększoną ilość osadów mineralnych (ochłodzenie)

Pierwsze etapy prac laboratoryjnych przeprowadzane są w specjalnie przystosowanych pomieszczeniach, gdzie zapewnione są sterylne warunki pracy (w tym całkowita filtracja i sterylizacja powietrza oraz utrzymanie lekkiego nadciśnienia, które ogranicza dostawanie się powietrza spoza systemu filtracji). Ponadto, ważne jest fizyczne odseparowanie laboratoriów aDNA od pomieszczeń, w których analizowane jest współczesne DNA. W celu ograniczenia kontaminacji z zewnątrz, prace prowadzone są w kompletnej odzieży ochronnej, a wszystkie powierzchnie i wprowadzane materiały podlegają powierzchniowej sterylizacji roztworem podchlorynu sodu (wybielacza).

Próby materiału do izolacji DNA (Ryc. 3) oraz innego typu analiz pobierane są z wnętrza rdzenia po usunięciu jego warstw zewnętrz-

nych, które miały kontakt z powietrzem, tubami, w których materiał jest przechowywany, oraz sprzętem użytym podczas rozcinania rdzeni. Następne kroki to izolacja *seda*DNA z prób osadów i przygotowanie tzw. „bibliotek” — zbiorów gotowych do sekwencjonowania fragmentów DNA z badanych prób; podstawową analizą, która pozwala na określenie różnorodności próby, jest metabarkoding. W tym procesie namnaża się krótkie fragmenty DNA (w przypadku metabarkodingu są to barkody dla wybranej grupy taksonomicznej) w reakcji PCR. Procedury obejmują m.in. wielokrotne izolacje DNA i wprowadzanie prób kontrolnych, aby wykryć i zniwelować potencjalne zanieczyszczenia. Każda próba jest analizowana kilkakrotnie, co zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia rzadziej występujących gatunków, które pozosta-



Ryc. 3. Etapy analizy *sedaDNA*

wiły mniej DNA w badanym materiale (Alsos i współaut. 2016). Dzięki sekwencjonowaniu nowej generacji możliwe jest odczytywanie w stosunkowo krótkim czasie ogromnej liczby sekwencji DNA.

Podstawowa analiza uzyskanych danych, z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych, polega na porównaniu otrzymanych sekwencji DNA z prób środowiskowych do sekwencji zgromadzonych w bazach referencyjnych. Bazy te gromadzą dane genetyczne (sekwencje DNA) uzyskane z oznaczonych okazów, co umożliwia identyfikację taksonów (w miarę możliwości gatunków) znajdujących się w badanym materiale. Jakość wykorzystywanych taksonomicznych baz referencyjnych jest szczególnie istotna na tym etapie, ponieważ od niej zależy rozdzielczość wyników, czyli liczba taksonów zidentyfikowanych w badanym materiale i poziom dokładności identyfikacji. Największymi i najbardziej popularnymi bazami tego typu są GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) oraz EMBL (z ang. *European Molecular Biology Laboratory*; <https://www.ebi.ac.uk/>). Co ważne, bazy te są nieustannie rozbudowywane, dzięki czemu, z każdą nową sekwencją, stają się bardziej kompletne i umożliwiają dokładniejszą analizę danych. Wymienione wyżej bazy zawierają sekwencje należące do wszystkich grup organizmów. Istnieją jednak także bazy zbierające informacje na temat określonej grupy organizmów, takie jak PhytoRef dla fotosyntetyzujących eukariontów (<http://phytoRef.sb-roscoff.fr/>). Wraz z rozwojem technicznych możliwości badań środowiskowych i ewolucyjnych powstają projekty i inicjatywy badawcze mające na celu

budowanie szczegółowych, regionalnych baz referencyjnych, które będą możliwie kompletne pod względem taksonomicznym i rozbudowane pod względem zakresu danych genetycznych. Przykładem takiej inicjatywy jest projekt PhyloAlps (<http://phyloalps.org/>) i powiązana z nim baza danych obejmująca obszerne dane genomowe (w tym genomy organellarne) dla niemal kompletnej flory Alp lub projekt PhyloNorway (<http://www.phylonorway.no>), który koncentruje się na obszarach polarnych. Oprócz baz zawierających informacje na temat szerokiego zakresu sekwencji DNA, istnieją również takie, których celem jest rozbudowa bibliotek konkretnych referencji barkodowych, jak UNITE (dla eukariotycznego rybosomalnego regionu ITS; <https://unite.ut.ee/>), czy system BOLD (koordynacja danych barkodowych; <http://www.boldsystems.org/>). Pojawiają się także konsorcja, które tworzą biblioteki dla konkretnych regionów, tak jak NorBOL (<https://www.norbol.org/>), zbierający barkody DNA organizmów żyjących w Norwegii.

PODSUMOWANIE

Paleogenomika, w połączeniu z tradycyjnymi metodami, umożliwia dokładniejsze poznanie i zrozumienie zjawisk zachodzących w przeszłości i ich wpływu na obecne populacje, rekonstruowanie ilościowych i jakościowych zmian bioróżnorodności, czy rozmieszczenia organizmów w przestrzeni. Dodatkowo pozwala na coraz lepszą kalibrację modeli przyszłych zmian środowiska. Ma ona też szansę dostarczyć unikatowych narzędzi do analiz paleofilogeograficznych i poznania dynamiki zasięgów geograficznych ga-

tunków i ich odpowiedzi na zmiany klimatyczne. Niewątpliwie dalszy rozwój technik sekwencjonowania oraz zwiększenie mocy obliczeniowej urządzeń (niezbędnej do zarządzania dużymi bazami danych), pozwolą na zwiększenie rozdzielczości danych i zakresu analiz. W niedalekiej przyszłości możemy się spodziewać rozwoju metod umożliwiających przeprowadzanie coraz bardziej kompleksowych badań, w tym unikatowe analizy historycznej zmienności genetycznej w obrębie gatunku i populacji. DNA kopalne jest doskonałym ekologicznym wskaźnikiem i narzędziem do analizy przeszłości, a także kluczowym elementem w naszym zrozumieniu i zarządzaniu przyszłymi ekosystemami. Ze względu na intensywny rozwój paleogenomiki w ostatnich latach, dostępne jest kilka obszernych, aktualnych opracowań przeglądowych dotyczących analiz *sedaDNA*, które pozwalają na poszerzenie informacji dotyczących zarówno metodyki jak i zastosowań i aktualnych badań z wykorzystaniem prób genetycznych z osadów dennych (Parducci i współaut. 2017, Capo i współaut. 2021, Capo i współaut. 2024).

Artykuł został przygotowany dzięki wsparciu finansowemu przez grant Narodowego Centrum Nauki (NCN) OPUS nr 2020/37/B/NZ8/03307, pt. *Paleogenomika refugium środkowoeuropejskich: dynamika flory arktyczno-alpejskiej w czasie i przestrzeni pomiędzy strefą polarną a umiarkowaną* (PIONEER). Autorzy dziękują dr. hab. Michałowi Słowińskiemu i jego grupie (Instytut Geografii i Przestrzennego Zagospodarowania PAN) za wspólne prace nad pobieraniem rdzeni osadów, zilustrowane w artykule.

BIBLIOGRAFIA

- Allentoft M.E., Collins M., Harker D., Haile J., Oskam C.L. i współaut., 2012. *The half-life of DNA in bone: Measuring decay kinetics in 158 dated fossils*. Proc. R. Soc. B 279: 4724–4733. Doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1745>.
- Alsos I.G., Boussange V., Rijal D.P., Beaulieu M., Brown A.G., Herzsuh U., 2024. *Using ancient sedimentary DNA to forecast ecosystem trajectories under climate change*. Phil. Trans. R. Soc. B 379: 20230017. Doi: <https://doi.org/10.1098/rstb.2023.0017>.
- Alsos I.G., Ehrich D., Seidenkrantz M.S., Bennike O., Kirchhefer A.J., Geirsdottir A., 2016. The role of sea ice for vascular plant dispersal in the Arctic. Biol. Lett. 12: 10–13. Doi: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0264>.
- Alsos I.G., Lammers Y., Kjellman S.E., Merkel M.K.F., Bender E.M. i współaut., 2021. *Ancient sedimentary DNA shows rapid post-glacial colonisation of Iceland followed by relatively stable vegetation until the Norse settlement (Landnám) AD 870*. Quat. Sci. Rev. 259: 106903. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2021.106903>.
- Alsos I.G., Rijal D.P., Ehrich D., Karger D.N., Yoccoz N.G. i współaut., 2022. *Postglacial species arrival and diversity buildup of northern ecosystems took millennia*. Sci. Adv. 8(39): eabo7434. Doi: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abo7434>.
- Anderson-Carpenter L.L., McLachlan J.S., Jackson S.T., Kuch M., Lumibao C.Y., Poinar H.N., 2011. *Ancient DNA from lake sediments: Bridging the gap between paleoecology and genetics*. BMC Evol. Biol. 11: 30. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-30>.
- Baisheva I., Pestryakova L., Levina S., Glückler R., Biskaborn B.K. i współaut., 2023. Permafrost-thaw lake development in Central Yakutia: sedimentary ancient DNA and element analyses from a Holocene sediment record. J. Paleolimnol. 70: 95–112. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10933-023-00285-w>.
- Boessenkool S., McGlynn G., Epp L.S., Taylor D., Pimentel, M. i współaut., 2013. *Use of Ancient Sedimentary DNA as a Novel Conservation Tool for High-Altitude Tropical Biodiversity*. Conserv. Biol. 28: 446–455. Doi: <https://doi.org/10.1111/cobi.12195>.
- Capo E., Barouillet C. i współaut., 2024. *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments Volume 6: Sedimentary DNA. In Developments in Paleoenvironmen-*

- tal Research (Vol. 21). Doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-43799-1>.
- Capo E., Giguët-Covex C., Rouillard A., Nota K., Heintzman P.D. i współaut., 2021. *Lake sedimentary dna research on past terrestrial and aquatic biodiversity: Overview and recommendations*. Quat. 4(1): 6. Doi: <https://doi.org/10.3390/quat4010006>.
- Clare E.L., Economou C.K., Bennett F.J., Dyer C.E., Adams K. i współaut., 2022. *Measuring biodiversity from DNA in the air*. Curr. Biol. 32, 693–700. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.11.064>.
- Clarke C.L., Alsos I.G., Edwards M.E., Paus A., Gielly L. i współaut., 2020. *A 24,000-year ancient DNA and pollen record from the Polar Urals reveals temporal dynamics of arctic and boreal plant communities*. Quaternary Sci. Rev. 247: 106564. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2020.106564>.
- da Silva Coelho F.A., Gill S., Tomlin C., Papavassiliou M., Farley S. i współaut., 2023. *Ancient bears provide insights into Pleistocene ice age refugia in Southeast Alaska*. Mol. Ecol. 32, 3641–3656. Doi: <https://doi.org/10.1111/mec.16960>.
- Dabney J., Meyer M., Pääbo S., 2013. *Ancient DNA damage*. Cold Spring Harb. perspect. biol. 5(7), a012567. Doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012567>.
- De Barba M., Baur M., Boyer F., Fumagalli L., Konec M. i współaut., 2023. *Individual genotypes from environmental DNA: Fingerprinting snow tracks of three large carnivore species*. Mol. Ecol. Resour. 5(7), a012567. Doi: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13915>.
- Ficetola G.F., Taberlet, P., 2023. *Towards exhaustive community ecology via DNA metabarcoding*. Mol. Ecol. 32(23), 6320–6329. Doi: <https://doi.org/10.1111/mec.16881>.
- Friedberg E.C., 2003. *DNA damage and repair*. Nature 421, 436–440.
- Fulton T.L., Shapiro B., 2019. Setting Up an Ancient DNA Laboratory. [W:] *Ancient DNA Methods and Protocols*. Shapiro B., Barlow A., Heintzman P., Hofreiter M., Pajimans J., Soares A. E. (red.). Humana Press, New York, 1–14.
- Garcés-Pastor S., Coissac E., Lavergne S., Schwörer C., Theurillat J.-P. i współaut., 2022. *High resolution ancient sedimentary DNA shows that alpine plant diversity is associated with human land use and climate change*. Nat. Commun. 13(1), 6559. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34010-4>.
- Giosan L., Orsi W.D., Coolen M., Wuchter C., Dunlea A.G. i współaut., 2018. *Neoglacial climate anomalies and the Harappan metamorphosis*. Clim. Past 14, 1669–1686. Doi: <https://doi.org/10.5194/cp-14-1669-2018>.
- Goslar T., 1995. *Laminowane osady jeziorne jako źródło informacji o zmianach środowiska w przeszłości*. Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej 1293, 115–135.
- Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O.A., Wilson A.C., 1984. *DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family*. Nature 312, 282–284.
- Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., Von Haeseler A., Pääbo S., 2001. *DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA*. Nucl. Acids Res. 29(23), 4793–4799. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/29.23.4793>.
- Jia W., Liu X., Stoof-Leichsenring K.R., Liu S., Li K., Herzsich U., 2022. *Preservation of sedimentary plant DNA is related to lake water chemistry*. Environ. DNA 4, 425–439. Doi: <https://doi.org/10.1002/edn3.259>.
- Kanbar H.J., Olajos F., Englund G., Holmboe M., 2020. *Geochemical identification of potential DNA-hotspots and DNA-infrared fingerprints in lake sediments*. Appl. Geochem. 122, 104728. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2020.104728>.
- Keck F., Blackman R.C., Bossart R., Brantschen J., Couton M. i współaut., 2022. *Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment*. Mol. Ecol. 31, 1820–1835. Doi: <https://doi.org/10.1111/mec.16364>.
- Khanna M., Stotzky G., 1992. *Transformation of Bacillus subtilis by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the trans-*

- forming ability of bound DNA*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1930–1939.
- Kjær K.H., Pedersen M.W., De Sanctis B., De Cahsan B., Korneliussen T.S. i współaut., 2022. *A 2-million-year-old ecosystem in Greenland uncovered by environmental DNA*. Nature 612, 283–291. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05453-y>.
- Kowalska Z., Pniewski F., Latała A., 2019. *Barkodowanie dna – nowoczesne podejście do identyfikacji organizmów*. Kosmos 68, 89–96. Doi: https://doi.org/10.36921/kos.2019_2493.
- Lammers Y., Taberlet P., Coissac E., Elliott L.D., Merkel M.F., Pitelkova I., Alsos I. G., 2024. *Multiplexing PCR allows the identification of within-species genetic diversity in ancient eDNA*. Mol. Ecol. Resour. 24(3), e13926. Doi: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13926>.
- Lammers Y., Heintzman P.D., Alsos I.G., 2021. *Environmental palaeogenomic reconstruction of an Ice Age algal population*. Commun. Biol. 4(1), 220. Doi: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01710-4>.
- Lamperti L., Sanchez T., Si Moussi S., Mouillot D., Albouy C. i współaut., 2023. *New deep learning-based methods for visualizing ecosystem properties using environmental DNA metabarcoding data*. Mol. Ecol. Resour. 23(8): 1946–1958. Doi: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13861>.
- Levy-Booth D.J., Campbell R.G., Gulden R.H., Hart M.M., Powell J.R i współaut., 2007. *Cycling of extracellular DNA in the soil environment*. Soil Biol. Biochem. 39(12): 2977–2991. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020>.
- McLachlan J.S., Clark J. S., Manos P.S., 2005. *Molecular indicators of tree migration capacity under rapid climate change*. Ecology 86: 2088–2098. Doi: <https://www.jstor.org/stable/3450919>.
- Meakin G., Jamieson A., 2013. *DNA transfer: Review and implications for casework*. Forensic Science International: Genetics 7: 434–443. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi-gen.2013.03.013>.
- Murchie T.J., Long G.S., Lanoil B.D., Froese D., Poinar H.N., 2023. *Permafrost microbial communities follow shifts in vegetation, soils, and megafauna extinctions in Late Pleistocene NW North America*. Environ. DNA 5(6): 1759–1779. Doi: <https://doi.org/10.1002/edn3.493>.
- Nakahama N., 2021. *Museum specimens: An overlooked and valuable material for conservation genetics*. Ecol. Res. 36: 13–23. Doi: <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12181>.
- Newton J.P., Bateman P.W., Heydenrych M.J., Kestel J.H., Dixon K.W. i współaut., 2023. *Monitoring the birds and the bees: Environmental DNA metabarcoding of flowers detects plant–animal interactions*. Environ. DNA 5: 488–502. Doi: <https://doi.org/10.1002/edn3.399>.
- Nota K., Klaminder J., Milesi P., Bindler R., Nobile A. i współaut., 2022. *Norway spruce postglacial recolonization of Fennoscandia*. Nat. Commun. 13: 1333. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28976-4>.
- Pääbo, S., 1985. *Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA*. Nature 314, 644–645.
- Pääbo, S., 1989. *Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification*. PNAS 86: 1939–1943.
- Parducci L., Bennett K.D., Ficetola G.F., Alsos I.G., Suyama Y. i współaut., 2017. *Ancient plant DNA in lake sediments*. New Phytol. 214: 924–942. Doi: <https://doi.org/10.1111/nph.14470>.
- Pedersen M.W., Ruter A., Schweger C., Friebe H., Staff R.A. i współaut., 2016. *Postglacial viability and colonization in North America's ice-free corridor*. Nature 537: 45–49. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature19085>.
- Raxworthy C.J. i Smith B.T., 2021. *Mining museums for historical DNA: advances and challenges in museomics*. TREE, 36 (11), 1049–1060. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.07.009>
- Schulte L., Meucci S., Stoof-Leichsenring K.R., Heitkam T., Schmidt N. i współaut., 2022. *Larix species range dynamics in Siberia since the Last Glacial captured from sedimentary ancient DNA*. Commun. Biol. 5(1): 570. Doi: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03455-0>.

- Schwörer C., Leunda M., Alvarez N., Gugerli F., Sperisen C., 2022. *The untapped potential of macrofossils in ancient plant DNA research*. New Phytol. 235: 391–401. Doi: <https://doi.org/10.1111/nph.18108>.
- Shokralla S., Spall J.L., Gibson J.F., Hajibabaei M., 2012. *Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research*. Mol. Ecol. 21: 1794–1805. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>.
- Sønstebo J.H., Gielly L., Brysting A.K., Elven R., Edwards M. i współaut., 2010. *Using next-generation sequencing for molecular reconstruction of past Arctic vegetation and climate*. Mol. Ecol. Resour. 10: 1009–1018. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02855.x>.
- Stoof-Leichsenring K.R., Epp L.S., Trauth M.H., 2012. *Hidden diversity in diatoms of Kenyan Lake Naivasha: a genetic approach detects temporal variation*. Mol. Ecol. 21: 1918–1930. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05412.x>.
- Taberlet P., Coissac E., Hajibabaei M., Rieseberg L.H., 2012. *Environmental DNA*. Mol. Ecol. 21: 1789–1793. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>.
- Torti A., Lever M.A., Jørgensen B.B., 2015. *Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments*. Mar. Genomics 24: 185–196. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.08.007>.
- Valentini A., Taberlet P., Miaud C., Civade R., Herder J. i współaut., 2016. *Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding*. Mol. Ecol. 25: 929–942. Doi: <https://doi.org/10.1111/mec.13428>.
- van der Valk T., Pečnerová P., Díez-del-molino D., Bergström A., Oppenheimer J. i współaut., 2021. *Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths*. Nature. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03224-9>.
- van Vugt L., Garcés-Pastor S., Gobet E., Brechbühl S., Knetge, A. i współaut., 2022. *Pollen, macrofossils and sedaDNA reveal climate and land use impacts on Holocene mountain vegetation of the Lepontine Alps, Italy*. Quat. Sci. Rev. 296: 107749. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2022.107749>.
- Verma M., Kulshrestha S., Puri A., 2017. *Genome Sequencing*. [W:] *Bioinformatics. Methods in Molecular Biology* Keith J. (red.), 3–33. Vol. 1525. Humana Press, New York. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1.
- Weiß C.L., Schuenemann V.J., Devos J., Shirsekar G., Reiter E. i współaut., 2016. *Temporal patterns of damage and decay kinetics of DNA retrieved from plant herbarium specimens*. R. Soc. Open Sci. 3(6): 160239. Doi: <https://doi.org/10.1098/rsos.160239>.
- Williams J.W., Shuman B.N., Webb T., Bartlein P.J., Leduc, P.L., 2004. *Late-Quaternary vegetation dynamics in north America: Scaling from taxa to biomes*. Ecol. Monogr. 74: 309–334. Doi: <https://doi.org/10.1890/02-4045>.