

ČESKÁ ZĚMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní výzkum EVA4.0



Fakulta lesnická
a dřevařská

Možnosti využití moderních molekulárních metod pro faunistické průzkumy bezobratlých

Autor: Jaroslav Strádal

Vedoucí práce: Ing. Jiří Synek, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Jaroslav Strádal

Lesní inženýrství

Název práce

Možnosti využití moderních molekulárních metod pro faunistické průzkumy bezobratlých

Název anglicky

Possibilities of using modern molecular methods for faunistic invertebrate surveys

Cíle práce

- 1) Sesbírání vlastních vzorků bezobratlých pomocí různých odchyťových metod
- 2) Zhodnocení časové a finanční náročnosti sběrů a klasické determinace bezobratlých pro faunistické průzkumy
- 3) Zhodnocení možností využití moderních molekulárních metod pro faunistické průzkumy bezobratlých
- 4) Porovnání klasické determinace sběrů bezobratlých s moderními molekulárními metodami na sebraných a standardizovaných vzorcích

Metodika

Na zvolené zkusné lokalitě bude po dobu několika týdnů probíhat odchyť bezobratlých různými metodami tak, aby bylo pokryto co největší spektrum druhů bezobratlých. Získané vzorky budou zafixovány v ethanolu a roztříděny na úroveň řádů a čeledí. Vybrané vzorky budou předány odborníkům na druhovou determinaci, včetně standardizovaného a předem determinovaného vzorku. Tyto výsledky klasické determinace budou slepým testem porovnány s výsledky moderních molekulárních metod. Na základě získaných dat, bude hodnocena časová a finanční náročnost všech zvolených metod a také přesnost jejich výsledků.

Duben až srpen – sběr materiálu

Červen až září – determinace a třídění materiálu

Září až říjen – provedení molekulárních analýz

Červenec až prosinec – tvorba literární rešerše a metodiky

Leden – vyhodnocení výsledků

Únor – odeslání celkového konceptu práce školiteli k revizi

Doporučený rozsah práce

60 stran

Klíčová slova

faunistický průzkum, NGS, bezobratlí, druhová determinace

Doporučené zdroje informací

- Boers S. A., Jansen R., Hays J. P. 2019: Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 38: 1059–1070.
- Dijk E. L., Auger H., Jaszczyszyn Y., Thermes C. 2014: Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*. 30 (9): 418-426. ISSN 0168-9525
- Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L., deWaard J. R. 2003: Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*. 270(1512):313-21. doi: 10.1098
- Schneider A., Blick T., Köhler F., Pauls S. U., Römbke J., Zub P., Dorow W. H.O. 2021: Animal diversity in beech forests – An analysis of 30 years of intense faunistic research in Hessian strict forest reserves. *Forest Ecology and Management*, 499: 1-13. ISSN 0378-1127
- Tillmar A. O., Dell'Amico B., Welander J., Holmlund G. 2013: A Universal Method for Species Identification of Mammals Utilizing Next Generation Sequencing for the Analysis of DNA Mixtures. *PLoS ONE* 8(12): e83761. DOI: 10.1371
- Winkler J. R. 1974: Sbíráme hmyz a zakládáme entomologickou sbírku. 1. vyd. Praha: SZN. 211, [4] s. Lesnická knihovna. Příroda; Sv. 3. Lesnictví, myslivost a vodní hosp. ISBN: 07-033-74
- Zahradník P. 2017: Seznam brouků (Coleoptera) České republiky a Slovenska = Check-list of beetles (Coleoptera) of the Czech Republic and Slovakia. První vydání. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce. 544 stran. ISBN 978-80-7458-092-5.

Předběžný termín obhajoby

2022/23 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jiří Synek, Ph.D.

Garantující pracoviště

Excelentní výzkum EVA4.0

Elektronicky schváleno dne 2. 5. 2022

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 31. 8. 2022

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 11. 02. 2023

Čestné prohlášení o autorství

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: Možnosti využití moderních molekulárních metod pro faunistické průzkumy bezobratlých vypracoval samostatně a citoval jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použil, a které jsem rovněž uvedl na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědom, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědom, že odevzdáním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzi tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze 5. dubna 2023

.....

Jméno příjmení

Poděkování

Nejdříve bych rád poděkoval svému vedoucímu Ing. Jiřímu Synkovi, Ph.D. za odborné vedení práce a za pomoc se sběrem a determinací bezobratlých. Co se týče práce v laboratoři tak nesmím opomenout ani pomoc Mgr. Tomáše Větrovského, Ph.D. Dále bych chtěl také poděkovat odborníkům entomologům z ČZU a PřF UK, kteří mi byli nápomocní při určování jednotlivých skupin bezobratlých.

Mé poslední a největší díky ovšem vzdávám svým rodičům a prarodičům za jejich neutuchající podporu.

Abstrakt

Moderní molekulární taxonomické metody založené na identifikaci druhů pomocí sekvence DNA pronikají, díky technologickému pokroku, do stále většího množství odvětví biologie. Nacházejí využití jak v tradiční taxonomii, kde slouží k popisu molekulárních znaků druhů, tak při studiu světové biodiverzity při identifikaci kryptických druhů nebo faunistických průzkumech, či dokonce v potravinářském průmyslu při kontrole skutečného složení potravin. Jednou z těchto metod je i DNA barcoding anebo mitochondriální metagenomika využívající moderních sekvenačních metod, které přispívají k neustálému zdokonalování těchto přístupů při odhalování skutečné biodiverzity na Zemi.

Cílem této práce je posouzení možnosti využití moderních molekulárních metod při vyhodnocování faunistických průzkumů a položení základů pro jejich vyhodnocování s využitím molekulárních metod, především při průzkumech zaměřených na bezobratlé. Za tímto účelem, po dobu několika týdnů, probíhal odchyt bezobratlých různými metodami na lokalitě PŘ Housle. Vhodné vzorky byly následně předány odborníkům na druhovou determinaci. Na základě získaných dat byla hodnocena časová a finanční náročnost všech zvolených metod a také přesnost jejich výsledků. V neposlední řadě byl jako součást diplomové práce navrhnut hybridizační panel, jenž pokládá základy pro NGS sekvenování COI genů pocházejících ze směsných vzorků členovců na území České republiky a střední Evropy.

Klíčová slova: faunistický průzkum, NGS, bezobratlí, druhová determinace

Abstract

Modern molecular taxonomic methods, based on species identification through DNA sequencing, are spreading into an increasing number of fields in biology, thanks to technological advancements. They are being utilized in traditional taxonomy, where they are used to describe molecular characteristics of species, as well as in the study of global biodiversity, for identifying cryptic species or conducting faunistic surveys, and even in the food industry, for authenticating food composition. One of these methods is DNA barcoding or mitochondrial metagenomics, which employs modern sequencing techniques and contributes to the continual improvement of these approaches in uncovering the true biodiversity on Earth.

The aim of this study is to evaluate the possibility of using modern molecular methods in assessing faunistic surveys and to lay the foundation for their evaluation using molecular methods, particularly in surveys focused on invertebrates. To this end, various invertebrates were captured over several weeks using different methods at the PŘ Housle site. Suitable samples were then submitted to experts for species identification. Based on the data obtained, the time and financial costs of all the selected methods were evaluated, as well as the accuracy of their results. Lastly, as part of this thesis, a hybridization panel was proposed, which lays the groundwork for NGS sequencing of COI genes from mixed samples of arthropods in the Czech Republic and Central Europe.

Key words: faunistic survey, NGS, invertebrates, species determination

Obsah

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | Úvod..... | 11 |
| 2. | Cíle práce | 15 |
| 4. | Faunistické průzkumy a molekulární metody | 16 |
| 4.1. | Faunistika..... | 16 |
| 4.1.1. | Ukazatele druhové bohatosti | 18 |
| 4.2. | Taxonomie a problematika nejednoznačné definice druhu | 19 |
| 4.2.1. | Biologický druhový koncept | 20 |
| 4.2.2. | Genetický druhový koncept..... | 21 |
| 4.2.3. | Fylogenetický druhový koncept | 21 |
| 4.2.4. | Kryptický druh..... | 21 |
| 4.3. | Problematika určování druhů..... | 22 |
| 4.4. | Určování druhů pomocí molekulárních metod | 25 |
| 4.5. | DNA Barcoding | 25 |
| 4.5.1. | Metody molekulární biologie..... | 26 |
| 4.5.2. | Izolace DNA..... | 26 |
| 4.5.2.1. | Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 27 |
| 4.5.3. | Sekvenování DNA | 28 |
| 4.5.3.1. | Sangerovo sekvenování..... | 29 |
| 4.5.4. | Sekvenování nové generace (NGS) | 29 |
| 4.5.4.1. | Pyrosekvenování | 30 |
| 4.5.4.2. | Illumina sekvenování | 32 |
| 4.5.4.3. | TELL-Seq..... | 36 |
| 4.5.4.4. | Ion Torrent sekvenování | 37 |
| 4.5.5. | Sekvenování třetí generace | 38 |
| 4.5.5.1. | PacBio SMRT sekvenování | 39 |
| 4.5.5.2. | Oxford nanopór sekvenování | 41 |
| 4.5.6. | Hledání ideální DNA barcode sekvence v genetickém kódu..... | 42 |
| 4.5.6.1. | Živočišné barcodes | 44 |
| 4.5.6.2. | Barcodes ostatních eukaryot a bakterií..... | 46 |
| 4.5.7. | Barcodové databáze | 47 |
| 4.5.8. | CBOL | 47 |
| 4.5.9. | BOLD | 48 |
| 4.5.10. | INSDC | 49 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.5.11. | NCBI a GenBank | 49 |
| 4.5.12. | iBOL | 50 |
| 4.5.13. | Barcode gap..... | 50 |
| 4.5.14. | Využití DNA barcodingu | 51 |
| 4.5.15. | Využití NGS a TGS | 53 |
| 5. | Metodika | 56 |
| 5.1.1. | Metodika tradiční determinace..... | 58 |
| 5.1.2. | Metodika molekulární determinace..... | 60 |
| 5.1.3. | Designování prób | 61 |
| 5.1.4. | Metodika statistického vyhodnocení dat..... | 61 |
| 6. | Výsledky | 64 |
| 6.1.1. | Výsledky designu prób..... | 66 |
| 6.1.2. | Výsledky určování druhů | 66 |
| 6.1.3. | Výsledky hodnocení databáze BOLD..... | 68 |
| 6.1.4. | Výsledky ekonomické analýzy | 70 |
| 7. | Diskuze..... | 72 |
| 8. | Závěr | 75 |
| 9. | Seznam citované literatury:..... | 76 |
| 10. | Tabulkové přílohy | 108 |

Seznam tabulek

| | |
|---|-----|
| Tabulka 1: Seznam druhů ve standardizovaném vzorku | 59 |
| Tabulka 2: Tabulka zobrazující počty chycených členovců (Arthropoda) a použité odchytné metody..... | 65 |
| Tabulka 3: Seznam čeledí a procentální zastoupení druhů v databázi BOLD..... | 69 |
| Tabulka 4: Tabulka zobrazující rozpočet nákladů metody TELL-Seq..... | 70 |
| Tabulka 5: Tabulka zobrazující určování č.1 standardního vzorku tradiční metodou | 108 |
| Tabulka 6: Tabulka zobrazující určování č.2 standardního vzorku tradiční metodou | 109 |
| Tabulka 7 | 109 |
| Tabulka 8: Tabulka zobrazující určování č.3 standardního vzorku tradiční metodou | 110 |
| Tabulka 9: Tabulka zobrazující určování č.4 standardního vzorku tradiční metodou | 111 |
| Tabulka 10: Tabulka zobrazující určování standardního vzorku molekulární metodou | 112 |
| Tabulka 11: Tabulka zobrazující určování vzorku Orthoptera tradiční metodou | 113 |
| Tabulka 12: Tabulka zobrazující určování vzorku Orthoptera molekulární metodou | 114 |
| Tabulka 13: Tabulka zobrazující určování vzorku Coleoptera tradiční metodou... | 115 |
| Tabulka 14: Tabulka zobrazující určování vzorku Coleoptera molekulární metodou | 116 |
| Tabulka 15: Tabulka zobrazující určování vzorku Araneae tradiční metodou..... | 117 |
| Tabulka 16: Tabulka zobrazující určování vzorku Araneae molekulární metodou | 118 |
| Tabulka 17: Tabulka zobrazující určování vzorku Diptera tradiční metodou | 119 |
| Tabulka 18: Tabulka zobrazující určování vzorku Diptera molekulární metodou . | 120 |

Seznam obrázků

| | |
|---|--|
| Obrázek 1: Výskyt kněžice mramorované v ČR, zdroj: https://www.najdiJe.cz | 18 |
| Obrázek 2: Graficky znázorněný průběh PCR, zdroj: (jordancuff 2021) | 28 |
| Obrázek 3: Grafické zobrazení průběhu pyrosekvenace, převzato a upraveno (Ahmadian et al. 2006) | 31 |
| Obrázek 4: Schéma emulzní PCR a přípravy DNA knihovny na pyrosekvenaci, převzato a upraveno (Metzker 2010) | 32 |
| Obrázek 5: Schéma můstkové PCR a přípravy DNA knihovny, převzato a upraveno (Metzker 2010) | 34 |
| Obrázek 6: Grafické znázornění Illumina sekvenování, převzato a upraveno (Metzker 2010) | 35 |
| Obrázek 7: Schématické znázornění přípravy DNA knihovny pomocí TELL-Seq metody, převzato a upraveno (Chen et al. 2020) | 37 |
| Obrázek 8: Příklad šesti čtecích rámců u dvoušroubovice DNA, zdroj: (Brown 2002) | Chyba! Záložka není definována. |
| Obrázek 9: Graf zobrazující průměrné náklady na sekvenování jedné megabáze a porovnání s Moorovo zákonem, převzato a upraveno z www.genome.gov | 54 |
| Obrázek 10: Katastrální mapa zobrazující parcelu č. 447/1 v Lysolajích, na pozadí mapy České republiky, na které byl proveden odchyt vzorků, převzato a upraveno (www.geoportal.uhul.cz (online)) | 57 |
| Obrázek 11: Graf zobrazující srovnání průměrných nejvyšších a nejnižších výsledků determinace za čas. Vyšší hodnota řádku symbolizuje vyšší výkon. | 67 |
| Obrázek 12: Graf zobrazující srovnání průměrných nejvyšších a nejnižších výsledků determinace. Hodnota 1 značí přesně určený druh. | 67 |
| Obrázek 13: Diagram přelomu zobrazující nákladovost determinačních metod vzhledem k počtu vzorku. | 70 |

Seznam zkratk použitých v textu

VÚRV - Výzkumný ústav rostlinné výroby

NGS - sekvenování nové generace

ABGD – (Automatic Barcode Gap Discovery)

bp – jednotka počtu komplementárních párů bazí (base pair)

COI - cytochrom c oxidáza I (Cytochrome c oxidase subunit I)

ddNTP - dideoxyribonukleotid

DNA - deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)

dNTP - deoxyribonukleotid

DUI – dvojitá uniparentální dědičnost (Doubly Uniparental Inheritance)

eDNA – environmentální DNA (environmental DNA)

HTS - vysokokapacitní sekvenování (High-Throughput Sequencing)

ITS – interní přepsaný spacer (Internal Transcribed Spacer)

matK – maturáza K, protein (Maturase K)

MOTU - molekulární operační taxonomická jednotka (Molecular Operational Taxonomic Unit)

mtDNA – mitochondriální DNA (mitochondrial DNA)

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ORF - otevřený čtecí rámec (Open Reading Frame)

OTU – operační taxonomická jednotka (Operational Taxonomic Unit)

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

rDNA -DNA kódující ribosomální RNA (ribosomal DNA)

RNA - ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)

rRNA – RNA tvořící ribosomy (ribosomal RNA)

ssDNA – jednovláknové DNA (single-stranded DNA)

PPi - anorganický pyrofosfát

emPCR – emulzní PCR

NGS – sekvenování nové generace

TGS – sekvenování třetí generace

SMRT - Single Molecule Real-time Sequencing

ZMW - Zero-Mode Waveguides

1. Úvod

Ačkoli popis a katalogizace biologických druhů zaměstnává velký počet vědců, odhady celkové druhové bohatosti na planetě Zemi se diametrálně liší (Mora et al. 2011). Kolik je na Zemi forem života je jedna z důležitých ekologických otázek. Bez dostatečné znalosti počtu a výskytu organismů se můžeme jen těžko postarat o náležitou ochranu jejich prostředí a jich samotných, stejně jako bez toho nelze plně objasnit fungování ekosystémů. Za posledních 250 let bylo na Zemi díky enormnímu úsilí taxonomů popsáno zhruba 1,7 milionů žijících a 59 tisíc vyhynulých druhů, které dnes můžeme najít například v Catalogue of Life (Orrell et al. 2018). Toto číslo však tvoří, podle nejrozumnějších odhadů, jen zlomek skutečného počtu. V minulosti byly publikovány studie odhadující množství biologických druhů až na několik desítek milionů. Vycházely z různých extrapolací a aproximací vycházejících například z počtu druhů členovců (Arthropoda) nalézáných na určitých druzích rostlin (May 1988; Erwin 1991). Recentní studie však ukazují, že zařazování druhů do vyšších taxonomických tříd sleduje předvídatelné a vcelku stabilní schéma, na základě kterého lze vyvodit celkový počet druhů v dané taxonomické skupině. Tento přístup byl nejprve ověřen na dobře prozkoumaných skupinách živočichů, jako jsou například větší savci, a poté převeden i na další skupiny. Tyto metody dosahují střídmejších výsledků a odhadují počet všech druhů organismů na 6,5 milionů na souši a 2,2 milionů v mořích, tedy celkově na 8,7 milionů druhů. Z celkového počtu druhů na naší planetě se pak odhaduje 7,77 milionů živočichů (Animalia, Linnaeus, 1758), 298 000 rostlin (Plantae, Haeckel) 611 000 hub (Fungi, Whittaker), 36 400 prvoků (Protozoa, Goldfuss, 1818) a 27 500 řas (Algae) (Mora et al. 2011). Co se hmyzu (Insecta, Linnaeus, 1758) týče, nejodvážnější odhady, kolem 30 milionů druhů (Erwin 1991), byly v nejnovějších studiích umírněny na přibližně 5 milionů. Velká pozornost by se tak měla věnovat nejvíce druhově bohatým řádům, kde stále mnoho druhů čeká na svoje objevení, jako jsou dvoukřídlí (Diptera, Linnaeus, 1758), brouci (Coleoptera, Linnaeus, 1758), blanokřídlí (Hymenoptera, Linnaeus, 1758), ploštice (Heteroptera, Latreille, 1810) a motýli (Lepidoptera, Linnaeus 1758) (Stork 2018).

Zatímco hmyz vede v druhé bohatosti, z pohledu tvořené biomasy je tomu jinak. Většina organické hmoty na Zemi je z 80 % tvořena rostlinami (Chapman 2009; Bar-On et al. 2018), ale ani to nezabránilo některým jednotlivým druhům zaujmout větší zlomek biomasy než celé čeledi nebo dokonce třídy. Jako dobrý příklad nám mohou posloužit termiti (Blattodea: Termitoidea), kteří i přes svojí malou relativní velikost celkově

zaujímají více biomasy než celé třídy obratlovců jako například volně žijící ptáci (Aves, Linnaeus 1758) nebo volně žijící savci (Mammalia, Linnaeus 1758) (Sanderson 1996; Bar-On et al. 2018).

A čím jsou hmyz a ostatní bezobratlí prospěšní? Bezobratlí provázejí člověka po celou dobu jeho života, skrývají se v půdě, pod každým kamenem či padlým stromem, a přestože s nimi prakticky vyrůstají, jsou pro mnoho lidí převážně zdrojem strachu a odporu než čehokoliv jiného. To je patrné například i z toho, že jednou z nejčastějších fobií je arachnofobie (Wiederhold a Bouchard 2014), tedy strach z pavouků, kteří tak často úplně zbytečně padají za oběť sandálům nebo novinám, aniž by si někdo uvědomoval jejich místo v ekosystému. Populace rostlinných škůdců nejsou omezovány potravou, nýbrž predací. Tuto myšlenku podporuje fakt, že výskyt zelených rostlin je téměř neomezený (Hairston et al. 1960). V mnoha ekosystémech však využívání pesticidů vedlo k narušení této rovnováhy a k místnímu vyhubení predátorů z řad bezobratlých. Jedním z významných predátorů jsou právě například pavouci (Araneae, Clerck 1757), kteří se ukazují jako důležití ochránci zemědělských rostlin, kde pomáhají regulovat množství hmyzu, který napadá právě tyto rostliny. Například v Asii na rýžových polích jsou často nedoceněnou pomocí při regulaci počtu sarančat (Caelifera, Ander 1936) a kříسů (Auchenorrhyncha) (Lee a Kim 2001; Nyffeler a Benz 1987) a na obilných polích v Evropě to nejspíše nebude jinak. Nesmí být opomenuti ani další predátoři z řad hmyzí říše jako například drabčící (Staphylinidae, Latreille 1802), střevlíci (Carabidae, Latreille 1802), v současné době stále populárnější sluněčka (Coccinellidae, Latreille 1807), které je dokonce možné v zahraničí zakoupit a vypustit na své zahradě nebo na pokojových rostlinách pro boj s mšicemi (Aphididae), což bohužel často vede k introdukci nepůvodních druhů (Roy a Wajnberg 2008).

Zvýšená pozornost je také věnována pestrokrovečnickům (*Thanasimus*, Latreille 1806), důležitým predátorům kůrovců (Scolytinae, Latreille 1804). Jeden takový pestrokrovečník je schopný průměrně zabít tři za den a jejich larva za svůj vývoj zkonzumuje okolo čtyřiceti čtyř larev a kukel této čeledi a může tak v některých případech sloužit jako kontrolní agents v integrované ochraně lesa, jeho účinnost je však podmíněna mnoha faktory, které jsou stále zkoumány (Mills 1985).

I na v současné době na nechvalně známého brouka lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*, Linnaeus 1758) lze nahlížet pozitivně. Navzdory svému označení jako

škodlivý organismus má i on svojí roli v ekosystémech. Spolu se symbiotickými houbami pomáhá rozkládat dřevní hmotu a navracet tak živiny v ni obsažené zpět do půdy. Rozpojení koruny v hustých porostech způsobených působením hmyzu vede ke zvýšení lokální biodiverzity, například v Tatrách byl na takových místech zaznamenána až o 25 % zvýšený výskyt ptáků oproti porostům s hustým zápojem (Przepióra et al. 2020). Slovy entomologa Lukáše Čížka hmyz je vlastně taková granulka pro obratlovce, a když ho ubývá, tak ubývá i všeho ostatního.

Podobnou roli jako kůrovci (Scolytinae, Latreille 1804) ve střední a severní Evropě, co se týče rozkladu dřevní hmoty, zaujímají v tropech termiti, kterým je v České republice, i přestože je země mírného pásu věnována velká pozornost. V Čechách má výzkum termitů tradici od 60. let 20. století a působí zde celosvětově uznávaní termitologové. Je to dáno historicky, jelikož době studené války byla tehdejší ČR jedním z vývozců dřeva na Kubu a bylo tak potřeba zkoumat ochranu dřeva před tímto hmyzem. V oblastech tropického a subtropického pásma jsou termiti jednou z nejdůležitějších skupin hmyzu s masivním dopadem na ekosystém a globální klima. Největší přínos termitů plyne z jejich role rozkladačů. Strava termitů se skládá prakticky z čehokoliv rostlinného původu, ať už jde o opad, rozkládající se dřevo nebo humus (Khan et al. 2018). V okolí svých hnízd jsou schopni spotřebovat až 100 % mrtvého dřeva (Engel et al. 2009; Bezerra-Gusmão et al. 2011) a až polovinu opadu vytvořeného stromy za jeden rok (Brauman 2000). Jsou tak zodpovědní za návrat mnoha živin, které by jinak zůstaly po delší dobu uvázané v rostlinných pletivech, zpátky do půdy. Hrají velkou roli při udržování úrodnosti tropických oxisolů, které jinak rychle degradují při zemědělském využití v tropických oblastech (Zhang et al. 2007). Kromě toho tvorba termitích struktur, zejména podzemních chodeb, pomáhá provzdušňovat půdu, a tím usnadňuje vstřebávání vody. V oblastech s nízkými srážkami, jako je Afriky, vedle přítomnosti termitů na polích, podle experimentu, k až 36% nárůstu v produkci obilí (Evans et al. 2011). Přes všechny tyto pozitivní vlivy na okolní prostředí jsou termiti primárně považováni za škůdce, kteří se živí dřevěnými konstrukcemi a zemědělskými plodinami, i přestože pouze 185 z přibližně 3 000 popsaných druhů bylo identifikováno za škůdce (Jouquet et al. 2011).

Za termitům, na první pohled, podobné organismy lze označit mravence (Formicidae, Latreille 1809), a to i přesto, že náleží to kompletně odlišné taxonomické skupiny. Termiti se v dnešní době řadí pod šváby (Blattodea, Latreille 1810), kdežto mravenci spadají pod blanokřídlý hmyz. Oproti termitům se jedná o predátory. Největší význam, pro nás jako

lesníky, mají lesní mravenci rodu *Formica*. Jedná se o silně teritoriální druhy a jedno středně velké mraveniště je schopné za rok nalovit až 8 mil. jedinců hmyzu a ochránit tak před žírem stromy v okruhu 20 až 30 m od hnízda (Adlung 1966). Je tedy zřetelné, že zástupci této živočišné skupiny jsou i přes svojí malou velikost jednou z nejvýznamnějších živočišných skupin, co se týče tvorby a udržování rovnováhy v ekosystémech.

Je alarmující, že podle nejrůznější odhadů čeká až 80 % druhů hmyzu na svoje objevení (Stork 2018) a hmyzí druhy tak ubývají s větší rychlostí, než je vůbec stíháme objevovat. Jen za posledních 27 let by zaznamenán 75% pokles v biomase létavého hmyzu ve vybraných chráněných územích (Hallmann et al. 2017). Není divu, že je tak těžké objasnit vztahy a fungování ekosystémů, když ani neznáme všechny jeho složky. Proto je pro poznání skutečné biodiverzity na Zemi nesmírně důležité provádět faunistické průzkumy, za účelem objevování nových druhů a sledování dopadů klimatické změny, a s tím související zdokonalování, respektive zavádění, nových identifikačních metod, včetně těch molekulárních.

2. Cíle práce

Prvním z cílů práce je vyhotovení literární rešerše o současném stavu poznání a využívání molekulárních metod, jako jsou například metody NGS a DNA barcoding, pro identifikaci druhů a faunistické průzkumy bezobratlých.

Informace nabyté v předešlé části budou poté aplikovány v praxi při odchytu bezobratlých, pomocí různých odchytových metod, za účelem pokrytí co největšího spektra druhů, a vytvoření vlastních vzorků z nachytaných jedinců pro následnou analýzu. Na základě toho bude zhodnocena časová a finanční náročnost jednotlivých sběrů a klasické determinace bezobratlých, ve spolupráci se specialisty na jednotlivé skupiny členovců (Arthropoda). Ti pomohou s klasickou determinací druhů v nachytaných vzorcích. Jako součást této práce bude také navrhnout teoretický postup použití jedné z molekulárních metod a položeny základy k jejímu provedení.

V závěrečné části práce dojde k porovnání klasické determinace sběrů bezobratlých oproti teoretické determinaci s využitím DNA.

3. Faunistické průzkumy a molekulární metody

Faunistické průzkumy a molekulární metody jsou dva zdárně různé přístupy ke studiu druhů a jejich rozmanitosti v daném ekosystému. Zatímco faunistické průzkumy se zaměřují na pozorování, sběr vzorků v terénu a jejich následnou identifikaci pomocí mikroskopování, morfologických charakteristik a srovnávání se sbírkami v přírodovědných muzeích (Ložek a Juříčková 2004), metody molekulární biologie umožňují studovat genetickou diverzitu, vztahy mezi druhy i druhy identifikovat na základě jejich DNA nebo RNA (Hebert et al. 2003a).

Kombinace těchto dvou přístupů může poskytnout komplexní pohled na druhovou rozmanitost v daném ekosystému, včetně nejen identifikace druhů, ale i jejich fylogenetického vztahu, geografického rozšíření a ekologických funkcí. Tyto informace jsou důležité pro ochranu a správu přírodních zdrojů, včetně udržení biodiverzity a ekosystémových služeb bezobratlých (Sheth a Thaker 2017).

3.1. Faunistika

Faunistika je oborem biologie, který studuje životní pochody zvířat v určité oblasti nebo ekosystému. Zabývá se identifikací, klasifikací, rozšířením a ekologií živočišných druhů. Zahrnuje také zkoumání vztahů mezi zvířaty a jejich prostředím, včetně interakcí s jinými druhy, jejich rolí v ekosystémech a adaptací na konkrétní prostředí. Nejdůležitějším, a základním nástrojem faunistiky, je výše zmíněný faunistický průzkum (Ložek a Juříčková 2004).

Jde o druh terénního průzkumu, který se zaměřuje na živočišné druhy přítomné v určité geografické oblasti. Zahrnuje komplexní a systematické studium fauny v daném regionu nebo lokalitě. Klade si za cíl zdokumentovat diverzitu, rozšíření, početnost a chování živočišných druhů nacházejících v určité zájmové oblasti. Za tímto účelem často dochází ke sběru exemplářů, v případě bezobratlých, anebo pořizování fotografií, videí anebo zvukových záznamů, například fotopastmi, pokud jsou středem našeho zájmu větší živočichové jako savci či ptáci, u kterých odchyt není možný, anebo žádoucí.

Faunistické průzkumy jsou důležité, jelikož poskytují cenné informace o zdraví a stabilitě ekosystémů a mohou pomoci vědcům a ochráncům přírody pochopit dopady lidské činnosti na populace volně žijících živočichů, nebo dokonce vést k objevení nových druhů. Ze získaných dat lze odvodit rozšíření a početnosti druhů, identifikovat oblasti s vysokou biodiverzitou a posoudit zdraví jednotlivých populací. Takto

analyzovaná data jsou následně neocenitelná při vytvoření plánů péče pro chráněná krajinná území, plánování strategií ochrany a sledování vlivu klimatické změny na životního prostředí v průběhu času (Juříčková a Ložek 2004). Kompletovaná data mohou posloužit i k vydání různých publikací a atlasů. Ministerstvo životního prostředí na tyto průzkumy vynakládá nemalé peníze (TA ČR Starfos 2003).

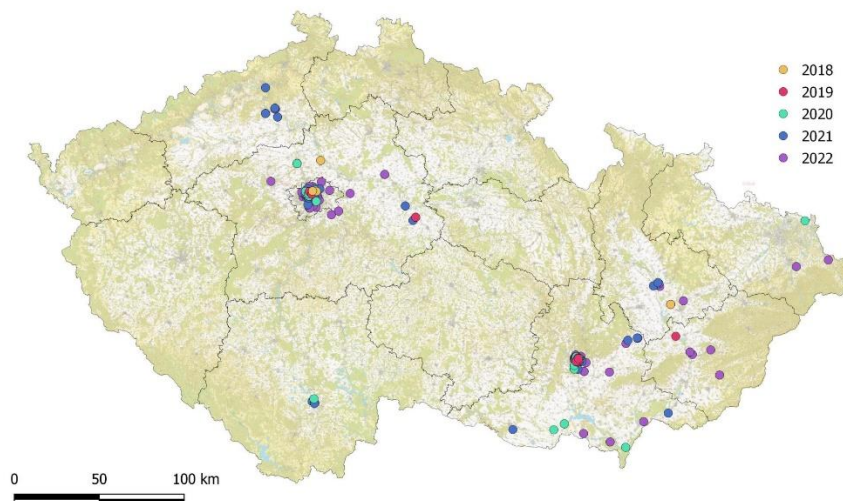
S faunistickými průzkumy také úzce souvisí snahy o mapování výskytu jednotlivých druhů a vytváření checklistů, který sledují změny populací v čase. Do těchto snah se často může zapojit i laická veřejnost a zadávat do map, pomocí náležitých formulářů, místa s pozorovaným výskytem zájmového taxonu. Záznam je ve většině případech dále opatřen datem a například fotografií. Tyto mapy lze nalézt například na českém webu biolib.cz, kde umožňují uživatelům prohlížet si rozšíření jednotlivých druhů rostlin a živočichů na území České republiky, přičemž největší pozornost je věnována savcům, obojživelníkům, plazům, vybraným druhům ryb, bezobratlým živočichům a ohroženým druhům hub. Lze zde také najít mapy zobrazující výskyt invazních druhů, oblasti s vysokou biodiverzitou, anebo mapy biogeografických oblastí. Jsou interaktivní a je tak možné si kliknutím zobrazovat další potřebné informace nebo je přiblížit či oddálit podle potřeby. Datové podklady poskytuje Národní muzeum, Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Česká herpetologická společnost, Muzeum přírody Český ráj a Česká vědecká společnost pro mykologii z. s. (Zicha 1997).

Světovou alternativu poté představuje například web <https://www.gbif.org>, celým názvem the Global Biodiversity Information Facility, který byl založen v roce 2001 na popud členských států Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD), jejichž vlády jsou zároveň zodpovědné za financování provozu tohoto webu, který je tak zdarma. Hlavní misí je zajistit open access přístup k datům o všech typech života na Zemi uživatelům po celém světě. Je zde možné sledovat výskyt různých druhů živočichů, anebo sledovat šíření invazivních druhů a jiných škůdců (GBIF.org 2023).

Pokud jde o sledování výskytu invazivních druhů tak Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. v Praze, skrz web www.NajdiJe.cz, každoročně vyhlašuje pátrací akce na tyto škodlivé organismy. Celosvětově se počet invazí v posledních letech dramaticky zvyšuje (Diagne et al. 2021). Aby se snížily ekonomické a ekologické škody jimi způsobené, je klíčové takové druhy včas odhalit a lokalizovat, nejlépe když je jich počet malý a lehce uniká pozornosti. Včasná detekce a varování si žádá hodně očí a času. Tyto

akce proto přímo stojí na pomoci amatérských entomologů a občanů. V současné době jsou sledovanými organismy VÚRV sluněčko východní (*Harmonia axyridis*, Pallas 1773), vroubenku americkou (*Leptoglossus occidentalis*, Heidemann, 1910) a kněžici mramorovanou (*Halyomorpha halys*, Stål 1855).

Výskyt kněžice mramorované (*Halyomorpha halys*) v České republice



Obrázek 1: Výskyt kněžice mramorované v ČR, zdroj: <https://www.najdi je.cz>

3.1.1. Ukazatele druhové bohatosti

Ukazatelů druhové bohatosti, nebo také biodiverzity, které se používají k charakterizování rozmanitosti druhů v daném ekosystému existuje celá řada. Hodnocení biodiverzity se skládá ze dvou složek. Je hodnocena druhová rozmanitost a vyrovnanost druhového složení (evenness), jenž slouží k vyjádření poměrů mezi jednotlivými druhy zastoupenými na zájmovém území. Vyšší vyrovnanost druhového složení znamená, že jednotlivé druhy jsou v daném prostředí reprezentovány přibližně stejným počtem jedinců, zatímco nižší hodnota ukazuje, že některé druhy jsou mnohem hojnější než ostatní. Ovšem v posledních letech jsou indexy dávající velkou váhu evenness na ústupu, jelikož je interpretace jejich výsledků obtížná a lehce ovlivnitelná zvolenou odchytkovou metodou. Například v lesnictví nebo zemědělství, kde se jednotlivé druhy odchytkávají, ve velkém množství, standardizovanými metodami, což má za následek pokles vyrovnanosti, a vypočítané indexové hodnoty odpovídají nižší biodiverzitě, navzdory možné vysoké druhové bohatosti (Jenkins 1992).

Mezi jeden ze základních ukazatelů se řadí jednoduché číselné vyjádření počtu odlišných druhů, vyskytujících se na ploše, tzv. species richness. Za složitější ukazatele lze pak považovat například Shannon index (Shannon 1948) nebo Simpson's index (Simpson 1949), kteří se řadí mezi jedny z nejnámějších.

První z indexů bere v úvahu, jak počet druhů, tak i jejich relativní zastoupení, přičemž počítá i s faktem, že nebyla vzorkována celá zájmová plocha. Vyšší výsledná hodnota indexu odpovídá vyšší druhové rozmanitosti plochy.

Simpson's index je takzvaným indexem dominance a zaměřuje se, jak název napovídá, na vyrovnanost v ekosystému a přítomnost dominantních druhů. Čím je vypočtená hodnota nižší, tím by měla být biodiverzita na ploše vyšší.

Pro vypočtení indexů a následné správné vyhodnocení průzkumů je ovšem potřebná znalost a schopnost správně taxonomicky zařadit posbírané druhy, které se dají považovat za nejmenší jednotku biodiverzity, což komplikuje výskyt kryptických druhů, ale i jednoznačná definice toho co to vlastně druh je. Velkoplošné faunistické průzkumy se také často vyhýbají používání bezobratlých, respektive členovců (Arthropoda), jako indikátorů biodiverzity, a to i přesto, že tvoří její největší část. Děje se tak z časových a finančních důvodů, ale i kvůli obtížné ne-li nemožné identifikaci všech nasbíraných druhů (Duelli a Obrist 2003). Zájmem průzkumů jsou tak často spíše obratlovci, anebo jen vybrané taxony členovců (Arthropoda), jako například brouky (Coleoptera). Nejen s tímto problémem by mohly pomoci molekulární metody (Hebert et al. 2004a).

3.2. Taxonomie a problematika nejednoznačné definice druhu

Druh je základní taxonomickou kategorií, přičemž taxonomie je věda zabývající se pojmenováváním, popisováním a tříděním všech organismů, ať už žijících nebo vyhynulých, do příslušných biologických skupin, takzvaných taxonů. Jsou tříděny na základě společných znaků, kterými se liší od ostatních. Taxon je stavebním kamenem biologické nomenklatury a lze jej chápat jako souhrnné označení pro skupinu organismů se společnými znaky, které je odlišují od další skupiny / taxonů. Tyto taxony je možné seřadit od obecnějších po konkrétnější, což dalo vzniknout taxonomickým kategoriím. Mezi základní kategorie patří doména, říše, kmen, třída, řád, čeleď, rod a druh, které je možné dále dělit na podkategorie, pokud je to potřeba. Za otce taxonomie, jak ji dnes známe, je považován švédský biolog Carl Linnaeus (Das 2018).

Taxonomie je tradičně dělena do tří úrovní. Každá z těchto úrovní je označována latinskými písmeny, a to buď alfa (α), beta (β) nebo gama (γ) (Mayr et al. 1969). Úkolem alfa-taxonomie je identifikace nových druhů, jejich popis, charakterizování a pojmenovávání v souladu se zbytkem biologické nomenklatury. Také řeší veškeré ostatní problémy týkající se druhů (Capinera 2008a). Beta-taxonomie třídí známé druhy do systému taxonomických kategorií a vypracovává jejich vyšší klasifikaci. Děje se tak na základě vyhodnocení sdílených a jedinečných rysů, vzorců chování a podle vztahu k ostatním organismům pokud možno z evolučního hlediska (Capinera 2008b). Gama-taxonomie se zabývá analýzou vnitrodruhové variability, strukturou populací a speciací, tedy způsoby vzniku a vývojem nových druhů (Capinera 2008c).

Původ termínu druh lze nalézt v době řeckých filosofů, od kterých ho následně převzal Carl Linnaeus pro svůj taxonomický systém (Cain 1958). Avšak od doby jeho vzniku je definice druhu provázena mnoha diskusemi, což nemálo komplikuje práci alfa taxonomů. Není také divu, že se o jednu z prvních definic pokusil sám Carl Linnaeus. „Druh je (i) odlišný od ostatních a monotypický (ii) nemutující a stvořený jako takový (iii) čistokrevný“. Tento koncept je ovšem značně zastaralý v naší „po-darwinovské“ době. Dnes známe přes 20 (Mayden 1997; Wilkins 2002) takových možných definic druhu, ale mnoho jich je redundantních a nemá cenu se jimi všemi dopodrobna zabývat.

3.2.1. Biologický druhový koncept

Mezi jednu z nejrozšířenějších definic patří biologický druhový koncept. Ten nám říká, že druh je soubor populací aktuálně nebo potencionálně se mezi sebou křížících, které jsou reprodukčně izolovány od jiných takových skupin (Mayr a Eldredge 1999). Hlavní důraz je zde kladen na reprodukční izolaci populací, někdy označovanou jako izolační bariéru (Coyne a Orr 2004). Druhy jsou, však v praxi jen zřídka kdy, rozpoznávány zkoumáním reprodukční izolace a mnohem častěji na základě znaků, které jsou chápány jako indikátory její existence. Typicky se jedná o morfologické znaky, které jsou v současnosti hojně doplňovány o cytologii, vzory chování, biochemické rozbory a geneticky-molekulární znaky (Footitt a Adler 2017).

Mezi hlavní problémy biologického druhového konceptu patří existence asexuálních nebo partenogenetických populací (Footitt a Adler 2017), protože ho lze aplikovat, v jeho mnoha formách, pouze na pohlavně se rozmnožující populace. Takové druhy typicky existují jako soubory klonů. Tento způsob rozmnožování se nejčastěji vyskytuje u bakterií

a některých druhů rostlin a hub. I přes tyto zřejmé nedostatky je entomology i dalšími biology stále nejvíce využíván, protože se odhaduje, že 99 % hmyzu se rozmnožuje pohlavně a tedy že dochází k procesu, při němž dojde mezi samcem a samicí k výměně gamet při kopulaci (Footitt a Adler 2017).

3.2.2. Genetický druhový koncept

Alternativou k biologickému druhovému konceptu může být využití molekulárně genetických znaků (markerů) získaných ze sekvencí aminokyselin sestavujících DNA. Dokonce již bylo navrženo, že nové druhy by měly být rozpoznávány primárně za pomoci molekulární biologie (Blaxter 2004), například pomocí DNA barcodingu, kterému bude věnována pozornost v příslušné kapitole. Tato metoda se ukázala být obzvláště efektivní při rozlišování kryptických druhů. Cenová dostupnost a adopce molekulárních metod širokou odbornou veřejností vedla ke vzniku nového druhového konceptu. Genetický druhový koncept definuje druh jako přirozenou skupinu geneticky kompatibilních a rozmnožujících se populací, které jsou geneticky izolovány od jiných takových skupin (Baker a Bradley 2006).

3.2.3. Fylogenetický druhový koncept

Problém s nepohlavními populacemi se snaží vyřešit i další populární druhový koncept. Fylogenetický druhový koncept označuje druh jako nejmenší seskupení jednotlivých populací (sexuálních) nebo linií (asexuálních), které lze rozpoznat na základě unikátních společných znaků (Nixon a Wheeler 1990). Zde však vyvstává problém z nejasné definice unikátního společného znaku, a hlavně po nalezení tohoto společného znaku nedává žádná další incentiva k rozlišování kryptických druhů.

3.2.4. Kryptický druh

Za kryptické druhy lze považovat takové druhy, jejichž jedinci jsou dle morfologických znaků klasifikováni jako příslušníci již popsaného druhu, ačkoli se ve skutečnosti nejedná o příslušníky stejného druhu. Jedná se tedy o populace jedinců bez schopnosti se mezi sebou křížit, ale zároveň bez zjevných morfologických rozdílů. Existence mnoha takových druhů byla prokázána i u hmyzu (Hebert et al. 2004a; Williams et al. 2012; Seifert 2016). Kryptický druh často není samostatně popsán právě z důvodu nedostatečné vnější morfologické odlišnosti (Bickford et al. 2007), což se u různých taxonů řeší různými metodami jako například disekcí pohlavních orgánů u

členovců (Arthropoda). Správná determinace takovýchto druhů je jednou z nejobtížnějších částí faunistického průzkumu (Ejsmont-Karabin 2019).

3.3. Problematika určování druhů

Rozpoznávání biologických druhů a popisy druhů nových jsou tradičně založeny především na jejich rozdílných morfologických znacích, a to jak vnějších, tak vnitřních. Tímto přístupem lze zkoumat i fosilie vyhynulých organismů, což je důležité především z evolučního hlediska. Pokrok technologií v současnosti umožňuje použít při popisu druhů nebo odhadu diverzity i molekulární metody, které jsou však v případě fosilií či přísně chráněných organismů stále složitě použitelné. (Hillis 2003; Friedheim 2016).

Hlavním úskalím tradičních taxonomických metod je nedostatek zkušených vědců-taxonomů, kteří jsou navíc často vysoce specializovaní na konkrétní taxonomické skupiny, často nižších taxonomických úrovní než čeled'. V praxi tak jen málo taxonomů dokáže spolehlivě určit více než 0,01 % druhů (Hammond 1992; Hawksworth et al. 1995). V úvahu je navíc potřeba brát i ekonomické hledisko, protože práce taxonomů je časově náročná a tím pádem i drahá. Další úskalí pro taxonomy představují rozsáhlé faunistické průzkumy, u kterých je potřeba opakovat sběr vzorků několikrát na vícero místech. Rychlá frekvence sbírání vzorků může vést k přehlacení taxonomů, kteří následně nejsou schopni identifikovat vzorky včas. Problémem pro tradiční morfologické metody jsou také kryptické druhy, které taxonomové při zkoumání vnější morfologie jedinců velmi často přehlížejí (Jarman a Elliott 2000). Komplikace může dále způsobit (i) pohlavní dimorfismus, kdy se samec stejného druhu výrazně liší od samičky (Magalhaes a Santos 2012), (ii) výskyt vícero vývojových stádií, jako je běžné například u hmyzu, přičemž rozdílné morfologické znaky jsou často viditelné až v dospělosti (Hebert et al. 2003a), (iii) výskyt sezónních variant (Osawa a Nishida 1992) anebo (iv) ochranné zbarvení a mimikry, napodobující jiný druh (Friedheim 2016).

Tato omezení spojená s identifikací na základě morfologických znaků společně s finanční náročností na výcvik a platové ohodnocení taxonomů vytváří tlak na hledání nových a efektivnějších přístupů k rozpoznávání a určování taxonů. Při současné rychlosti práce by popsání všech dosud neznámých druhů zabralo přibližně 1 200 let při společném úsilí 303 000 taxonomů (Mora et al. 2011). Vzhledem k současnému intenzivnímu vykořisťování přírody a probíhající klimatické změně by se tak

mohlo stát, že velký podíl druhů vyhyne ještě dřív, než se dozvíme o jejich existenci (Pimm et al. 1995; Mora et al. 2011).

Naštěstí se díky současným výrazným technologickým pokrokům v oblasti molekulární biologie otevřely nové možnosti. V praxi se začaly výrazněji prosazovat metody využívající poznatků molekulární biologie a daly tak vzniknout odvětví molekulární taxonomie. Nejprve se tyto metody začaly využívat v mikrobiologii, kde kvůli značné uniformitě organismů nebyly klasické taxonomické přístupy dlouhodobě dostačující. Na základě podobnosti genetické informace se tak začaly mikroorganismy dělit do tzv. OTU. Výraz byl poprvé použit v roce 1963 pro označení zkoumané skupiny blízce příbuzných druhů (Sokal 1963). Je to praktický nástroj pro práci se skupinou organismů, které spojují definované vlastnosti, ale jejich podrobnější taxonomii prozatím úmyslně opomíjíme. V současné době se s pojmem OTU setkáváme především právě v mikrobiologii, kde je samotná definice druhu, a tím pádem i tradiční taxonomie, problematická a často i na překážku. Někdy se setkáváme i s pojmem MOTU (molekulární operační taxonomická jednotka), který reflektuje na základě, jakých znaků je OTU definována. V mikrobiologických analýzách se jednotlivým OTU (MOTU) přiřazují čísla nebo i názvy a jedná se tak *de facto* o provizorní jména pro potencionálně dosud nepopsané taxony (Blaxter et al. 2005; Schmidt et al. 2014). Samotná definice druhu je u bakterií velice diskutabilní téma, protože se u nich často vyskytuje horizontální přenos genetické informace, při němž dochází k transportu genetické informace od jednoho ke druhému jedinci. Neustále se tak vyvíjí a získávají nové vlastnosti, jako je například rezistence vůči toxinům včetně antibiotik (Demerec 1948).

Koncept třídění jedinců do OTU na základě podobnosti genetické informace umožňuje rychlou a efektivní identifikaci stávajících i nově objevených taxonů (Blaxter 2004). Takový přístup ale není samospasitelný, a tak je důležité vyřešit otázku na základě toho, z jak velkého molekulárního rozdílu lze vyčlenit nový druh z toho stávajícího, pokud dále ignorujeme podmínky výše zmíněných druhových konceptů. Této otázce se blíže věnuje podkapitola 4.4 „Barcoding gap“.

Ačkoli by se mohlo zdát, že molekulární genetické metody nejsou schopny ze své podstaty významněji přispět například v paleobiologii, myšlenka sci-fi díla Jurský park (Jurassic Park, Crichton 1990, zfilmováno Spielberg 1993) je ve skutečnosti postavena na reálných výsledcích vědeckého výzkumu. Například z fosílií zalitých jantarem se

podářilo extrahovat DNA z 25 až 30 milionů let starého jedince termita *Mastotermes electrodominicus* Krishna a Grimaldi, 1991, který by mohl být pomyslným chybějícím evolučním článkem mezi termity a šváby (Emerson a Banks 1965; Hennig 1981; Thorne a Carpenter 1992; DeSalle et al. 1992). Získaná DNA sice obsahovalo malé množství vysoce degradovaných nukleonových kyselin, ale i přesto se zkoumaného jedince podařilo úspěšně identifikovat a zařadit do taxonu (DeSalle et al. 1992).

Přes prvotní problémy, spojené především s technologickým pokrokem, nacházejí tyto molekulární metody dále uplatnění i v zoologii, kde pomáhají při deskripci kryptických druhů, popisování jejich specializace a životních pochodů (Hebert et al. 2003a). Velký počet kryptických druhů se očekává především v tropických a mořských oblastech, protože se jedná o jedny z nejvíce druhově bohatých a zároveň nejméně prozkoumaných míst na Zemi (Beheregaray a Caccone 2007). Dále i přes důležitou roli rozkladačů organické hmoty v ekosystému patří houby mezi jednu z nejméně prozkoumaných skupin organismů a dá se u nich očekávat výskyt kryptických druhů z důvodu nedostatečné morfologické klasifikace (Bickford et al. 2007). Velký počet kryptických druhů se odhaduje také u hlístic (Nematoda, Rudolphi, 1808) (Powers 1992) nebo členovců (Arthropoda, Latreille, 1829), především u hmyzu. Nasvědčuje tomu množství studií na toto téma (Hebert et al. 2004a; Barrett a Hebert 2005; Smith et al. 2005; 2008). Překvapivě i mezi obratlovci lze najít linie s kryptickými druhy, poněvadž některé druhy se při rozmnožování nespolehají na morfologické znaky, ale spíše na feromony nebo hlasové projevy (Funk et al. 2012).

Četné případy odhalování kryptických druhů na základě DNA barcodingu, včetně následné identifikace podrobnějších morfologických odlišností, se zdají být dobrým argumentem pro zařazení DNA barcodingu do běžné praxe taxonomů. Navíc nové poznatky v oblasti molekulárního barcodingu dnes nacházejí využití v oblasti zemědělství například při identifikaci parazitických hlístic (Nematoda Rudolphi 1808) (Powers 1992). Také v ochraně životního prostředí nebo v medicíně, kde je delimitace kryptických druhů klíčová pro boj s nemocemi a jejich přenašeči (Mukabayire et al. 1999; Riehle et al. 2011). Moderní molekulární identifikační systémy, které umožňují diskriminaci druhů analýzou krátkého segmentu DNA, se tak dostávají do popředí a ukazují se jako více než slibný nástroj pro mapování biologické diverzity na Zemi (Hebert et al. 2003a) a vedou, ať už přímo nebo nepřímo, ke zvyšování a zlepšení životní úrovně lidí.

3.4. Určování druhů pomocí molekulárních metod

Identifikace vzorků získaných při terénních průzkumech je často velice časově náročná a vyžaduje mnoho expertů na dané taxonomické skupiny. Na tento problém narážejí především rozsáhlejší ekologické studie zaměřující se na členovce (Arthropoda) a další drobné živočichy (Stork 2018). Směsné vzorky nasbírané do nárazových nebo zemních pastí často obsahují tisíce jedinců patřících do stovek různých druhů. Protože ekologických ukazatelů druhové bohatosti je celá řada, je třeba vzorky nejen správně roztrždit a určit, ale také spočítat kolik jedinců se zde vyskytovalo. Ve výsledku je tedy získávání těchto dat velice zdlouhavou a expertní prací, která stojí nemalé prostředky a vyžaduje rozsáhlé znalosti.

Moderní molekulární metody však přinášejí nové možnosti řešení. Pro mnohá společenstva (např. bakteriální a houbová) se používá krátkých genových úseků k roztrždění do takzvaných OTU – Operačních taxonomických jednotek (Blaxter et al. 2005). Stejněho postupu je možné využít i pro jiné směsné vzorky. Je třeba však vybrat vhodnou referenční sekvenci DNA. Často se používají části sekvence 16S rRNA, ITS, ITS2 nebo COI, či COII. Právě u živočichů se velmi osvědčilo pro takzvaný DNA barcoding využívat krátkou sekvenci mitochondriálního genu cytochrom c oxidázy I – COI (Hebert et al. 2003). Pro analýzu sběru stačí izolovat DNA ze vzorku a amplifikovat daný úsek genu pomocí PCR. Takový amplikon je pak možné sekvenovat buď pomocí Sangerova sekvenování nebo pomocí NGS technologií.

3.5. DNA Barcoding

Molekulární DNA barcoding je metodou snadné determinace druhů na základě univerzální krátké sekvence DNA, která je co nejvíce rozdílná mezi druhy, ale zároveň co nejvíce shodná mezi zástupci stejného druhu a je tedy unikátní právě pro jeden druh. Liší se od ostatních identifikačních systémů právě snahou o nalezení tohoto univerzálního genetického kódu, pomocí kterého by bylo možné identifikovat veškerý život. Mimo jiné si dále staví za cíl vytvoření světové referenční databáze s genetickou informací všech organismů na Zemi pro jejich jednoduché, přesné a automatizované určení zbavené jakéhokoliv biasu (Hebert a Gregory 2005; Kress a Erickson 2012).

Dalo by se říct, jak již samotný název napovídá, že DNA barcoding se v jistém slova smyslu podobá běžné každodenní činnosti, kterou všichni dobře známe, a to je skenování čárových kódů za účelem identifikace kupovaného zboží. Takový kód se skládá

z několika číslic a písmen na určitých pozicích, zakódovaných ve formě černých čar někdy i mezer, záleží na typu, což dává za vznik velkému množství jedinečných kombinací a oskenováním těchto kódů lze bezpečně identifikovat produkt. Podobně jako zboží v obchodních řetězcích tak i všechny organismy mají svůj vlastní čárkový kód v podobě genetické informace zapsané v DNA. DNA je druh nukleové kyseliny, která v sobě uchovává genetickou informaci všech buněčných organismů. Její existence byla prvně popsána v roce 1869 biochemikem Fredrichem Miescherem.

Oproti čárovým kódům může mít DNA sekvence na každé pozici pouze jednu ze čtyř nukleových bází a to adenin (A), guanin (G), thymin (T) a cytosin (C), a délka takové sekvence je oproti čárovému kódu delší. Například pouhých 15 nukleonových párů může dát za vznik více než jedné miliardě různých kombinací, což je číslo, které několikanásobně převyšuje odhadovaný počet druhů na Zemi (Hebert et al. 2003a).

3.5.1. Metody molekulární biologie

Sekvence pro DNA barcoding mají průměrně délku okolo 400 až 800 bp (Kress a Erickson 2008) a při DNA barcodingu je s nimi zacházeno následovně. Po odebrání tkáně je izolována DNA, která se poté použije k amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), která dokáže i z malého fragmentu DNA vytvořit několik tisíc stejných kopií (Mullis et al. 1994). Poté následuje sekvenace a přečtená sekvence neboli DNA barcode, je poté porovnávána s již známými sekvencemi obsaženými v online databázích a dojde k vyhodnocení potencionálních shod s druhy v nich obsaženými a již dříve osekvenovanými.

3.5.2. Izolace DNA

Izolace je proces uvolnění a očištění DNA od proteinů a solí z buněk nebo tkáně. Cílem je získat co nejčistší a největší množství, které lze použít pro následné molekulární metody, jako je povětšinou PCR a sekvenování. Postupů izolace DNA existuje celá řada. Je možné ji provádět za využití komerčně dostupných kitů, který obsahuje veškerý materiál nezbytný pro úspěšnou izolaci DNA. Tyto kity obvykle poskytují i standardizovaný protokol. Chemické složení řady látek obsažených v kitu bývá výrobním tajemstvím prodejce. Izolaci je ale možné provést i bez kitu za využití látek jako je chloroform, merkptoethanol nebo chlorid cesný (Nishiguchi et al. 2002).

Izolace DNA se skládá ze tří základních kroků, za prvé rozrušení buněčné struktury rozpadem jejich vnější membrány a uvolnění DNA lýzou. Kontaminanty, hlavně

proteiny, vázající se na nukleové kyseliny, jsou odstraněny například proteinázou K. Dalšími kontaminanty mohou být různé soli, tuky a RNA. Posledním krokem je další purifikace například ethanolem.

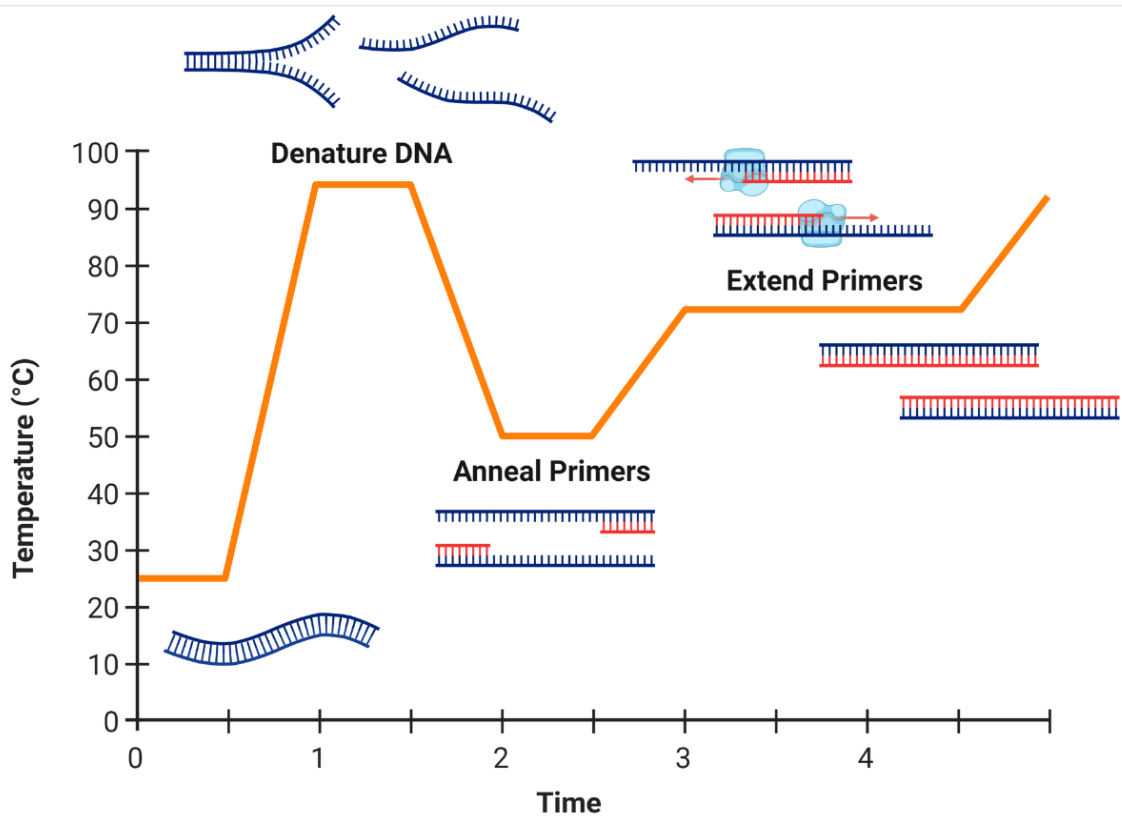
Čistotu DNA lze kvantifikovat na přístrojích NanoDrop, což je druh spektrofotometru, jenž měří absorpci světla ve vzorku. Tato absorpce světla je rozdílná pro DNA, proteiny nebo soli a lze tak na jejím základě stanovit čistotu vzorku a koncentraci DNA v něm. Mezi jeho výhody patří relativně malá velikost a rychlé vyhodnocení vzorku, kterého je potřeba jen malé množství okolo 0,5-2 μ l izolovaného roztoku DNA (Desjardins et al. 2009).

Čistotu měřeného vzorku charakterizují poměry dvou čísel, které vyjadřují jeho kontaminaci proteiny a solemi, jsou stanovené výrobcem přístroje a lze je nalézt na stránkách: https://bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf. Měli by se pohybovat okolo následujících hodnot 260/280 okolo 1,8 – 2,1. Sekundární poměr míry čistoty 260/230 mezi 2,0 – 2,3.

3.5.2.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázovou řetězovou reakci vynalezl v roce 1983 Kary B. Mullis. Za tento objev mu později v roce 1993 byla udělena Nobelova cena za chemii. PCR je metodou rychlého a snadného namnožení specifického úseku DNA. Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových úseků DNA ze vstupního templátu, která umožňuje vytvoření až několika milionů identických klonů. Pro izolaci vzorové (templátové) DNA mohou posloužit různé organismy nebo buňky získané například z vlasových cibulek, nehtů, kousků tkáně nebo tělních tekutin (Hansen et al. 2007). DNA je při PCR nejprve podrobena denaturaci teplem a vzniká jednovláknová DNA, ke které je následně syntetizován nový komplementární řetězec. K zahájení syntetizace je potřeba připojit k ssDNA primer, většinou se jedná o synteticky vyrobené jednovláknové krátké řetězce nukleových kyselin (Cox et al. 2012). Ty nasedají na pro ně komplementární část ssDNA ve směru od 3' konce templátu, a vymezují tak i úsek, který se bude amplifikovat. Primer tedy slouží k určení místa vzniku polymerázového komplexu, k nastartování vlastní řetězové reakce (amplifikace) a k vymezení požadovaného množeného úseku v obou směrech replikace. Dobře navrhnutý primer je velice důležitý pro správný průběh celé reakce a její přesnost (Marsolais et al. 1994). Do této směsi se zároveň přidávají

deoxyribonukleotidy, ze kterých enzym polymeráza syntetizuje druhé vlákno k původnímu jednovláknovému DNA. Tato polymeráza je označována jako Taq polymeráza podle bakterie *Thermus aquaticus* vyskytující se v horkých vřídlech, ze které byla izolována. Je ceněna pro svoji schopnost snášet vysoké teploty a odolávat denaturaci. Takto nově vzniklý řetězec DNA může být následně použit v novém cyklu PCR k syntéze dalšího DNA a počet syntetizovaných produktů tak exponenciálně roste (Pollard et al. 2017). Veliké množství amplifikovaného úseku bylo dříve nutné pro úspěšné sekvenování, při kterém se zjistí pořadí nukleonových bází v DNA. Dnes je již možné pracovat i v mnohem menším měřítku a v některých případech dokonce i bez PCR.



Obrázek 2: Grafický znázornění průběhu PCR, zdroj: (jordancuff 2021)

3.5.3. Sekvenování DNA

Sekvenování DNA je proces čtení a stanovení přesného pořadí nukleotidů v sekvenci molekuly DNA. Sekvence DNA je dlouhý řetězec písmen představující čtyři nukleotidové báze, které tvoří DNA. Řadí se sem adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a thymin (T). Pořadí těchto bází v sekvenci určuje genetickou informaci organismu, a proto je přesné stanovení jejich přesného pořadí klíčové pro další analýzy. Sekvenování DNA je důležitým nástrojem v mnoha oblastech biologie včetně molekulární a evoluční biologie, kde pomáhá rozpoznávat příbuzenské vztahy mezi organismy nebo identifikovat

úplně nové taxony. Metody sekvenování DNA se neustále vyvíjejí a vylepšují. V současné době jich existuje celá řada a mezi ty nejznámější se řadí Sangerovo sekvenování, sekvenování nové generace (NGS) a metody dlouhého čtení, někdy nazývané jako sekvenování třetí generace (TGS).

3.5.3.1. Sangerovo sekvenování

Jednou z nejstarších a stále hojně používaných je Sangerovo sekvenování, pojmenované po svém vynálezci Fredericku Sangerovi (Taylor a Harris 2012). Od doby svého objevení prošla značnou evolucí, ale všechny její verze fungují na podobném principu. Zkoumaná sekvence se vloží do reakční směsi obsahující primer, polymerázu, deoxyribonukleotid-trifosfáty (dNTP je hromadné označení pro dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a určité procento fluorescenčními barvami obarvených dideoxyribonukleotid-trifosfátů (ddNTP). Jedná se o uměle vytvořené deriváty nukleotidů postrádajících OH skupinu na 2' i 3' uhlíku svého cukru ribózy. Přiřazení takového ddNTP má za následek ukončení syntetizace řetězce DNA polymerázou v daném bodě, protože další dNTP se kvůli chybějícím OH skupinám v ddNTP nemá jak navázat. Výhodou používání fluorescenčních barev je možnost provádění této reakce v jedné zkumavce oproti původním čtyřem zkumavkám. Samotné čtení nukleotidů se dnes provádí u Sangerova sekvenování kapilární elektroforézou s laserovou detekcí fluorescence. Ta na základě rozdílné délky a typu fluorescence vyhodnotí pořadí jednotlivých nukleotidů v sekvenci. V předešlých inkarnacích Sangerovy metody se využívalo radioaktivních primerů nebo čtyř nádob, přičemž každá z nich obsahovala pouze tři deoxyribonukleotidy a polymeráza tak ukončila syntetizaci náhodně v místě navázání ddNTP. Nevýhodou Sangerova sekvenování obecně je omezená délka čtení (Catherine Shaffer 2017). U delších sekvencí se proto muselo provádět tzv. „shotgun“ sekvenování, při kterém byla zkoumaná DNA náhodně rozdělena na menší fragmenty. Sekvence pak byla zrekonstruována na základě překryvů, pomocí počítačových softwarů, do původní podoby (Staden 1979; Anderson 1981). Pro Sangerovo sekvenování se ale „shotgun“ dnes již nepoužívá.

3.5.4. Sekvenování nové generace (NGS)

Zatímco Sangerovo sekvenování se zaměřovalo na identifikaci bází v dlouhé sekvenci DNA ze známého regionu genu, oproti tomu metody NGS se snaží o paralelní sekvenování většího množství malých částí DNA z náhodné části genu. Tyto krátké sekvence jsou poté zpětně poskládány v celou sekvenci genu, nebo jeho části, pomocí bioinformačních softwarů na základě překryvů při alignmentu. Jedná se o proces srovnání

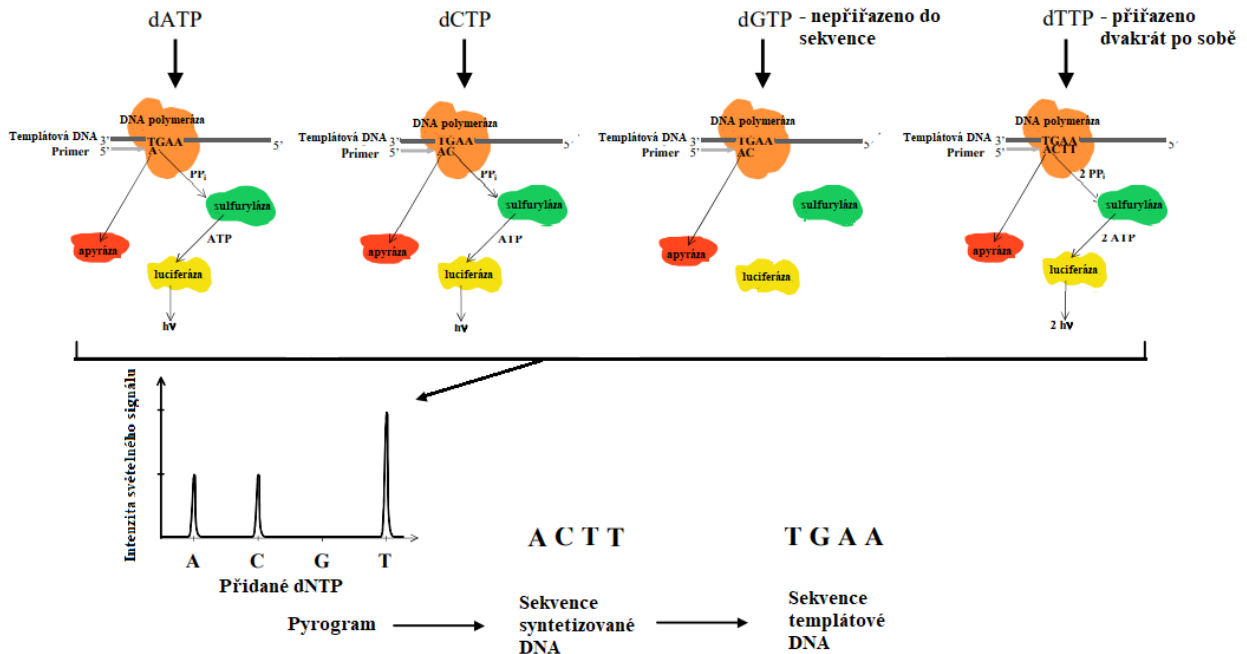
a porovnání dvou nebo více sekvencí pomocí různých algoritmů. Sekvence jsou srovnány nad sebe do řad, tak aby homologické pozice ležely nad sebou, a nukleotidy na překrývajících se pozicích se použijí k výpočtu podobnosti sekvencí nebo ke zkompletování sekvenovaného genu. Do výsledného alignmentu lze, za předem stanovených podmínek, vkládat mezery (Mount 2001). NGS umožňují rychlé a efektivní sekvenování velkých objemů DNA nebo RNA v jediném běhu sekvenačního přístroje (Shendure et al. 2017). Řadí se mezi ně 454 Pyrosequencing, Illumina sekvenátory, Ion Torrent nebo nejnovější metoda Avidity Sequencing (Arslan et al. 2022).

3.5.4.1. Pyrosekvenování

Základy pro tuto metodu byly položeny již v roce 1987, kdy byla měřena aktivita polymerázy při syntéze DNA na základě množství uvolněného anorganického pyrofosfátu (PPi), za pomoci enzymů ATP-sulfurylázy a luciferázy. PPi vzniká jako vedlejší produkt při přiřazení dNTP do syntetizovaného řetězce DNA polymerázou (Nyrén 1987). Tento poznatek spolu se snahami o vyvinutí sekvenační technologie, bez potřeby elektroforézy, vedly v roce 1996 ke vzniku pyrosekvenování (Ronaghi et al. 1996), které se tak stalo jednou z prvních metod patřících do NGS a signalizovalo začátek revoluce v sekvenování po pomyslné téměř dvacetileté vládě Sangerovo metody.

Pyrosekvenování stojí na práci čtyř enzymů jejichž vzájemná reakce vede ke vzniku viditelného světla. Jedná se o enzymy DNA-polymerázu, ATP-sulfurylázu, luciferázu, jenž je například zodpovědná za bioluminiscenci světlušek (*Lampyris*, Geoffroy 1762)(Hosseinkhani 2011) a apyrázu. Dalšími složkami sekvenační reakční směsi jsou adenosin-fosfosulfát (APS) a luciferin, sloužící jako substrát reakce, a templátová DNA s primery, který označuje výchozí pozici pro syntézu komplementárního řetězce DNA k té templátové. Do této směsi jsou poté postupně přidávány známé dNTP, jejichž přiřazení do syntetizovaného řetězce DNA-polymerázou vede k uvolnění pyrofosfátu. Ten je ATP-sulfurylázou přeměněn na ATP, který je enzymem luciferázou převeden na detekovatelné světlo, jenž je zachycováno speciální kamerou a zaznamenáváno do pyrogramu. Množství a intenzita vzniklého světla se liší podle druhu přiřazeného

nukleotidu a lze jej tak na základě jeho množství určit. Apyráza slouží k rozkladu nepřipravených bází a přebytečného ATP mezi reakcemi (Ahmadian et al. 2006).

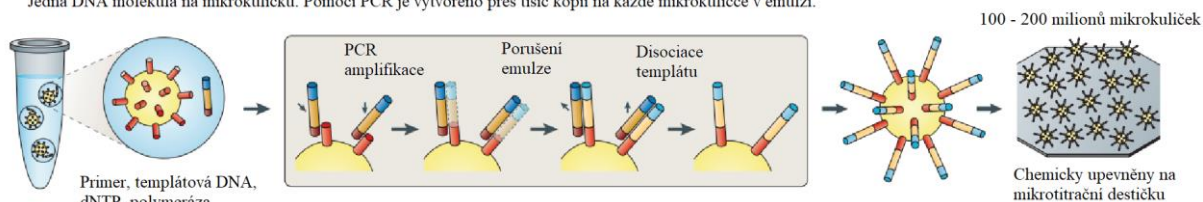


Obrázek 3: Grafické zobrazení průběhu pyrosekvence, převzato a upraveno (Ahmadian et al. 2006)

Ovšem před samotným sekvenováním je potřeba mít připravenou knihovnu odpovídajících DNA fragmentů. Izolované DNA je, buď mechanicky nebo pomocí enzymů, fragmentováno na menší části dlouhé 300 - 800 bp (Wiley et al. 2009). Na 3' a 5' konce těchto fragmentů jsou ligázou napojeny adaptéry označované jako A a B, které slouží jako místa k napojení primerů. Pomocí druhého adaptéru B jsou fragmenty DNA imobilizovány na sekvenační mikrokuličky, jeden ssDNA fragment na jednu mikrokuličku, které jsou uloženy v olejnaté emulzi. Imobilizované DNA je poté pomocí emulzní PCR amplifikováno a dojde k vytvoření velkého množství identických kopií na každé kuličce. Nevhodné a špatně označené fragmenty, přebytečný primer a další kontaminanty jsou odstraněny při purifikaci. Mikrokuličky s klonálně amplifikovanou ssDNA jsou umístěny na mikrotitrační destičku s jamkami a připraveny k pyrosekvencování syntézou, kdy je do každé jamky s mikrokuličkou přidána sekvenační reakční směs a postupně dNTP. Tento postup se může mírně lišit podle výrobce sekvenačního přístroje a použitého manuálu, ale principiálně zůstává stejný (Margulies et al. 2005; Wiley et al. 2009; Zheng et al. 2010).

Emulzní PCR

Jedna DNA molekula na mikrokuličku. Pomocí PCR je vytvořeno přes tisíc kopií na každé mikrokuličce v emulzi.



Obrázek 4: Schéma emulzní PCR a přípravy DNA knihovny na pyrosekvenaci, převzato a upraveno (Metzker 2010)

První komerčně dostupný NGS přístroj na pyrosekvenování začala v roce 2005 nabízet firma 454, která byla později odkoupena Roche Applied Science a od roku 2012 přestala tato platforma být dále vyvíjena (Shendure et al. 2017). Mezi nabízené přístroje patřil například GS20 a jeho následovníci od Roche Applied Science GS FLX a GS FLX+ nebo GS junior lišící se délkou možného čtení.

Mezi nevýhody této metody patří omezená delších čtení, vysoká cena primerů, enzymů a chybovost při výskytu homopolymerních oblastí v řetězci DNA, v důsledku nepřesnosti zesílení světla, které není přímo úměrné počtu přiřazených bází stejného druhu (Marsh 2010).

3.5.4.2. Illumina sekvenování

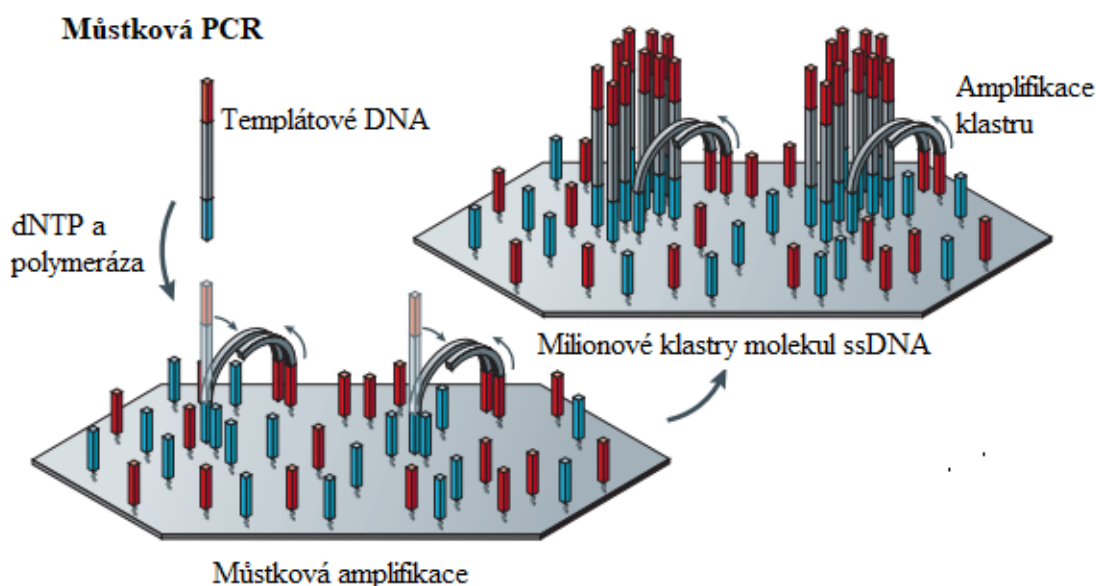
Způsob sekvenování Illumina využívá konceptu vratné terminace, jenž byl poprvé představen v roce 1994 Brunem Canardem a Robertem S. Sarfatem (Canard a Sarfati 1994), a následně převzat společností Solexa, která v roce 2006 představila svojí první sekvenáčnickou platformu Genome Analyzer, schopný generovat čtení o délce 1 Gb, během jednoho běhu přístroje. O rok později byla společnost Solexa odkoupena společností Illumina, jejíž název tato metoda dnes nese (www.illumina.com).

Stejně jako u pyrosekvenování je potřeba před samotným čtením DNA sekvence pomocí Illumina přístrojů vygenerovat DNA knihovnu, což je proces, který je společný pro všechny NGS. Při Illumina sekvenování se využívá můstkové PCR. Izolované DNA je opět mechanicky, speciálními přístroji, nebo pomocí enzymů rozštěpeno na fragmenty vhodné velikosti, ta se v současnosti pohybuje okolo 200 – 500 bp, což je značný nárůst oproti cca 30 bp, na kterých metoda začínala (Bronner a Quail 2019). Konce těchto dsDNA fragmentů jsou poté fosforylací upraveny a připraveny na ligázu adaptérů. Nevhodné fragmenty jsou odstraněny, buď za pomoci kytu, kolonek anebo SPRI kuliček

(DeAngelis et al. 1995). Po vyselektování vhodných fragmentů následuje PCR, při níž dojde k amplifikaci vhodných cílových úseků, a k přidání rozdílných oligonukleotidů na každý z konců řetězce DNA, pokud nebyly součástí adaptérů.

Alternativou k tomuto postupu, bez potřeby PCR, je Hybridization capture enrichment, který je vhodný, pokud se snažíme o sekvenování již známého genu. Způsob zahrnuje hybridizaci předem navržených prób s cílovými úseky DNA, které jsou poté zachyceny na magnetické kuličky nebo mikročipy. Po odmytí nenavázaných prób a dalších složek reakční směsi jsou zachycené fragmenty detekovány a kvantifikovány na základě fluorescence, jelikož použité próby obsahují fluorescenční barvivo, a není tak zapotřebí PCR. Hlavní výhodou tohoto postupu je možnost zachycení velkého počtu různých cílových fragmentů DNA o větší velikosti (Mamanova et al. 2010).

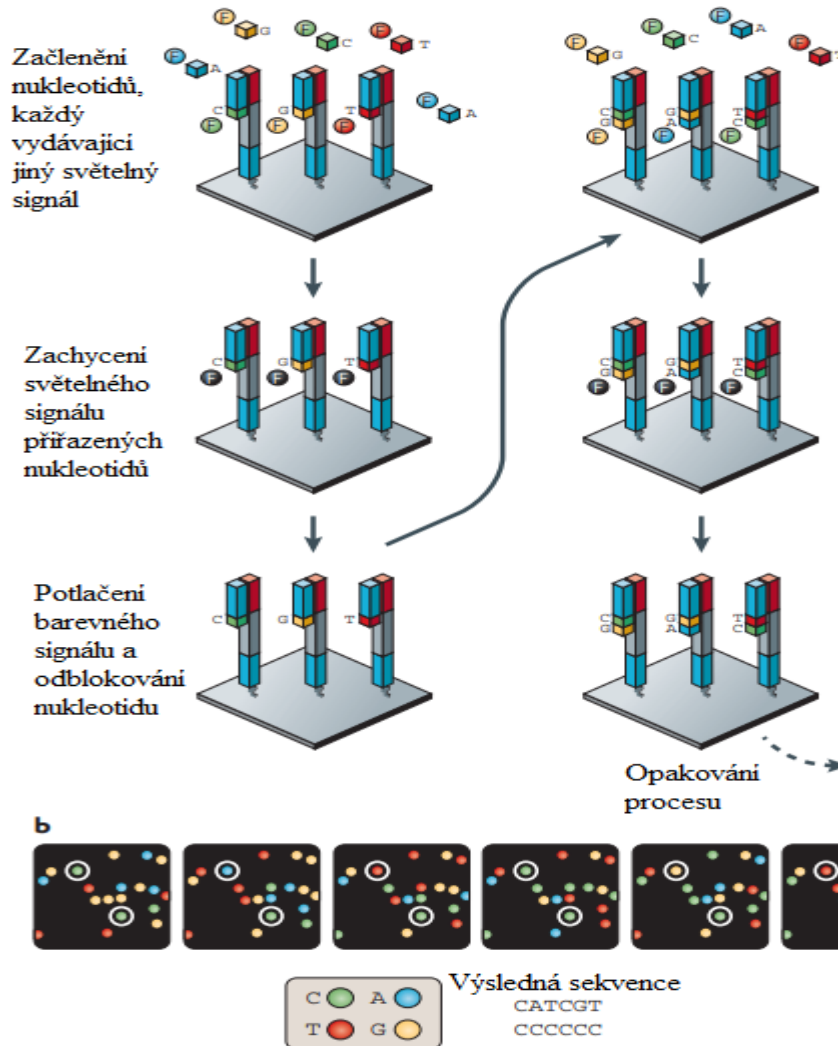
Připravené fragmenty DNA, jsou například inkubací s NaOH, denaturovány a vzniklé ssDNA s komplementárními oligonukleotidy přisedá k povrchu průhledné skleněné destičky s mikroskopickými kanálky (flowcell), na jejichž povrchu se nacházejí dva druhy oligonukleotidů, každý komplementární k jednomu ze dvou adaptérů (Bronner a Quail 2019). Takto hybridizované DNA je připraveno k PCR, po jejímž průběhu a syntéze komplementárního vlákna dojde k denuraci, a původní templátové fragmenty jsou odmyty pryč. V následující fázi anelingu přisedá volný konec řetězce ssDNA k sousednímu volnému oligonukleotidu na destičce a vytváří tak můstek. Dalším krokem je opětovná amplifikace a vznik dsDNA s tím rozdílem, že po jeho následné amplifikaci již není jedno z vláken volné, ale díky vzniklému můstku v předešlém kroku, zůstávají po jejich denuraci obě vlákna přichycena k jednomu ze sousedních rozdílných oligonukleotidů. Nevhodné protichůdné vlákno je poté uvolněno opět odmyto pryč. Výsledkem tohoto procesu je vznik tisíce kopií jediného fragmentu, kterých mohou být v kanálcích destičky miliony (Delseny et al. 2010). Takto vzniklé klastry jsou připravené na následovné sekvenování.



Obrázek 5: Schéma můstkové PCR a přípravy DNA knihovny, převzato a upraveno (Metzker 2010)

Sekvenování začíná přidáním reakční směsi obsahující sekvenční primery a fluorescenčně značené nukleotidy, které zároveň slouží jako terminátory reakce a dochází tak vždy po přiřazení jednoho nukleotidu k jejímu ukončení. Tím je možné stanovit a kontrolovat délku výsledné sekvence. Počet cyklů určuje délku čtení a barva světelného signálu nukleotidu jeho typ. Poté je 3' konce začleněného dNTP odblokován a může dojít k přiřazení dalšího, a celý proces se opakuje. Po dokončení prvního čtení je nové syntetizované vlákno odmyto a původní templátové DNA se ohýbá a volným koncem hybridizuje se sousedním oligonukleotidem na destičce a proběhne můstková PCR jejímž výsledkem je ssDNA vlákno komplementární k té templátové, které je osekvenováno stejným způsobem. Při Illumina sekvenování tedy dochází ke čtení sekvence v obou směrech, což vede ke snížení chybovosti a usnadnění alignmentu (Ansorge 2009).

Illumina sekvenování



Obrázek 6: Grafické znázornění Illumina sekvenování, převzato a upraveno (Metzker 2010)

Společnost Illumina nabízí několik sekvenačních platform, z nichž každá se liší převážně délkou, časovou náročností čtení a mají tak různé využití. První z nich je MiSeq. Dokáže vyprodukovat 15 Gb dat. Je vhodný pro sekvenování cílových úseků DNA nebo RNA, metagenomiku a sekvenování menších genomů. NextSeq je výkonnější a dokáže vyprodukovat až 120 Gb dat. Nachází využití při sekvenování celého genomu nebo exomů a v transkriptomice a epigenomice. Nejvýkonnější sekvenačním zařízením je NovaSeq, který dokáže produkovat až 16 Tb dat, během jediného běhu přístroje. Je vhodný pro rozsáhlé projekty, jako je populační genomika ve velkém měřítku nebo sekvenování celého genomu. Pro představu lidský genom je velký přibližně 3,1 Gb (Morton 1991). Poslední nabízenou platformou je relativně kompaktní a nízko nákladový MiniSeq schopný vyprodukovat 7,5 Gb dat za cca 4–24 hodin, vyznačuje se tak velkou rychlostí. Jeho využití je podobné jako u platformy MiSeq. Podrobnější popis všech

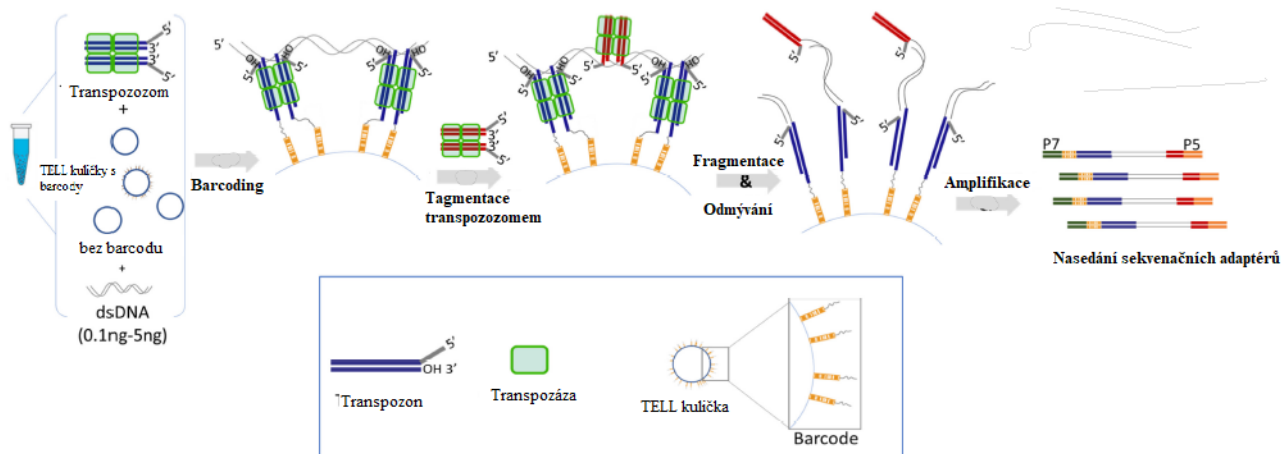
přístrojů a jejich doporučené využití lze nalézt na stránkách výrobce <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>.

3.5.4.3. TELL-Seq

Transposase Enzyme Linked Long-read Sequencing, volně přeloženo jako sekvenování dlouhých sekvencí s využitím transpozázových enzymů nebo zkráceně TELL-Seq, je relativně nová metoda generování DNA knihovny pro NGS sekvenování, která se snaží vyřešit jejich nevýhody, mezi které patří, kvůli krátké délce čtení jednotlivých fragmentů, omezená schopnost rozlišovat haplotypy, sestavovat komplexní genomy a například detekovat strukturální rozdíly mezi sekvencemi dvou jedinců (Chen et al. 2020).

Generování knihovny pomocí TELL-Seq Library Prep kitu zabere okolo tří hodin, celá reakce probíhá v jedné PCR zkumavce a stačí malé množství vstupního vzorku, okolo 0,1 -0,5 ng DNA. Do zkumavky obsahující DNA jsou nejprve přidány 3µm magnetické kuličky, na jejichž povrchu se nachází alespoň jedna unikátní barcode sekvence, těch může být na každé TELL kuličce okolo 50 000, přičemž minimálně ~1 % sekvencí mají kuličky společné. Dalším krokem je přidání enzymu transpozázy a malých fragmentů DNA transpozonů vytvářejících komplex transpozozon. Transpozozony reagují se vstupním DNA a připojují ho k barcodům na TELL kuličkách, Na takto zachycené DNA poté nasedá druhý označený transpozozon a fragmentuje ho. Po odmytí enzymu transpozázy zůstávají na koncích fragmentů jen transpozony s unikátním molekulárním identifikátorem, které DNA stále jedním koncem vážou k povrchu kuličky, a umožňuje identifikovat a sledovat každý fragment DNA, během procesu sekvenování, což je hlavní výhodou této metody. Poté je možné provést PCR amplifikaci a sekvenování, například jednou z platforem nabízených firmou Illumina (Chen et al. 2020).

TELL-Seq příprava DNA knihovny



Obrázek 7: Schématické znázornění přípravy DNA knihovny pomocí TELL-Seq metody, převzato a upraveno (Chen et al. 2020)

3.5.4.4. Ion Torrent sekvenování

Za spirituálního nástupce pyrosekvenování a pomyslný můstek mezi NGS a TGS lze označit Ion Torrent sekvenování. První sekvenátor využívající této technologie byl představen v roce 2010 firmou Life Technologies a od ostatních popsanych metod se odlišuje především tím, že nevyužívá žádných speciálně upravených dNTP nebo optických signálů, ale zaznamenává změnu pH v roztoku vznikající uvolňováním vodíkových iontů při syntéze DNA (Rusk 2011).

Při syntéze komplementárního vlákna DNA dochází při zařazení nukleotidu do stále rostoucí sekvence nejen k uvolnění anorganického pyrofosfátu (PPi), který je poté pomocí speciálních enzymů převáděn na světelný signál u pyrosekvenování, ale i k uvolnění vodíkových iontů (H⁺). Uvolnění těchto iontů zapříčiní změnu pH v roztoku, množství uvolněného H⁺ a míra, kterou pH klesá, odpovídá množství začleněných dNTP, a tato změna je detekována polovodičovým čipem a převedena na digitální signál, z něž lze poté vyčíst množství a druh inkorporovaného nukleotidu.

Při Ion Torrent sekvenování je izolované DNA nejprve fragmentováno na řetězce dlouhé přibližně 200 bp, na jejichž konce jsou ligázou přidány adaptéry (Slatko et al. 2018). Tyto fragmenty jsou pomocí oligonukleotidů zachyceny na povrchu mikrokuliček, a amplifikovány emulzní PCR, podobně jako u pyrosekvenování. Po emPCR jsou mikrokuličky, s tisíci identickými kopiemi fragmentů, umístěny do jamek

na sekvenační destičce, tak aby v každé jamce byla pouze jedna. Amplifikované DNA je pak sekvenováno postupným přidáváním jednotlivých nukleotidů do jamek s DNA a reakční směsí, které jsou obklopeny elektronickými čidly. Uvolnění H^+ iontů a tím vznikající změna pH, po zařazení nukleotidu do rostoucí sekvence DNA, během každé cyklu, vyvolá změnu povrchového potenciálu mezi kovovou snímací vrstvou a ISFET tranzistorem v čidle, které tuto změnu zaznamená. Zaznamenaný digitální signál je pak zpracován softwarem a na jeho základě dojde k určení pořadí nukleotidů v sekvenci DNA (Rothberg et al. 2011).

Life Technologies, která v roce 2010 jako první přišla na trh s technologií iontového polovodičového sekvenování, byla společnost zaměřená na výzkum a vývoj technologií pro potřeby vědy a zdravotnictví, včetně sekvenování DNA. V roce 2014 byla tato společnost odkoupena korporací Thermo Fisher Scientific (www.thermofisher.com (online)), která tuto sekvenační platformu dále vyvíjí, a tak v její nabídce lze nalézt například sekvenační přístroje Ion GeneStudio S5 série. Jednotlivé přístroje se liší osazenými čipy, například nejzákladnější Ion 510™ čip dokáže vygenerovat 0,5 Gb dat za pouhé tři hodiny. Ion Torrent technologie se tak vyznačuje svojí rychlostí a nízkou cenou, ale je limitované délkou čtení, a potýká se s problémy při výskytu dlouhých homopolymerních oblastí v sekvenci, podobně jako pyrosekvenování. Změna pH, vyvolaná uvolněním vodíkových iontů H^+ , přestává být přímo úměrná, po přiřazení většího počtu bází do syntetizovaného řetězce (Slatko et al. 2018).

3.5.5. Sekvenování třetí generace

Sekvenování třetí generace (TGS) je souhrnné označení pro nejnovější generaci sekvenačních technologií, které se na trhu objevily po Sangerovo, někdy označované jako první, a druhé / nové generaci (Shendure et al. 2017). TGS jsou také označovány jako metody dlouhého čtení, protože umožňují sekvenování mnohem delších úseků nebo celých molekul DNA, při jediném běhu přístroje. Čímž se odlišují od NGS, jenž jsou schopné sekvenovat pouze krátké fragmenty DNA, které je potřeba po fragmentaci amplifikovat.

Ovšem i široce využívaná metoda amplifikace, jako PCR, není bez svých chyb a může po svém působení zavádět do výsledného vzorku chyby, které mohou vést ke snížení přesnosti sekvenování, zkreslení výsledků a poskytnout nesprávné informace o množství a rozmanitosti zkoumaných genů (Warnecke et al. 1997). Tyto nepřesnosti a chyby jsou

označovány jako PCR biases nebo artefakty. Jedná se například o primer bias, zodpovědný za upřednostnění amplifikace jedné sekvence DNA před jinou. Další potencionální chybou může být template bias, který se projevuje v případech, kdy izolovaná templátová DNA není reprezentativní pro celý vzorek, nebo amplification bias. Ke kterému dochází, pokud amplifikace DNA není lineární a množství výsledného DNA není přímo úměrné výchozímu templátu. To může vést k nadměrnému nebo nedostatečnému zastoupení určitých sekvencí DNA. Také hrozí vznik artefaktů, jedná se o produkty PCR, které vznikají nespecifickou amplifikací, jiných než cílových úseků DNA, a neodpovídají tak cílové sekvenci (Kanagawa 2003).

Riziko výskytu těchto nepřesností vznikajících PCR a další problémy NGS měly vyřešit metody dlouhého čtení, ale i ty se potýkají s problémy jako je nižší přesnosti čtení, vyšší cena a potřeba většího množství vstupního vzorku (Chen et al. 2020). Mezi nejpopulárnější TGS metody se řadí PacBio SMRT sekvenování a Oxford Nanopore sekvenování za využití nanopórů. Obě metody se spoléhají na odlišný přístup, ale sdílejí schopnost generovat dlouhá čtení dosahujících délky kb, která mohou pokrýt celé zájmové oblasti, jako jsou geny nebo dokonce celé kratší genomy. Díky tomu sekvenování třetí generace nachází využití obzvláště při *de novo* sekvenování genomů nebo v epigenetice, která se zabývá studiem genové exprese (Shendure et al. 2017).

3.5.5.1. PacBio SMRT sekvenování

Možná na první pohled zvláštní název pro sekvenační technologii je ve skutečnosti akronymem pocházejícím z anglických slov Single Molecule Real-time Sequencing, které lze volně přeložit jako sekvenování jediné molekuly v reálném čase. Základy pro tento typ sekvenování byly položeny v roce 2003 s popsáním Zero-Mode Waveguides (ZMW), pomocí kterých bylo možné opticky pozorovat aktivitu DNA polymerázy v reálném čase (Levene et al. 2003).

Zero-Mode Waveguides jsou malé nanodírky v tenké kovové vrstvě, do kterých díky jejich velikosti proniká pouze jediná molekula. Otvor, do kterého pozorovaná molekula padá, je mnohem menší než vlnová délka světla použitého pro detekci, což znamená, že světlo proniká do nanodírky a interaguje s molekulou, jen když se nachází přesně v centru nanodírky. To umožňuje přesné měření vlastností molekuly i při jejich velmi vysoké koncentraci (Levene et al. 2003).

Tuto technologii poté poprvé úspěšně využili v roce 2009 Eid a kolektiv k sekvenování, které bude později známé pod zkratkou SMRT. Základem této metody jsou 70 nm široké a 100 nm hluboké nanodírky, v jejichž středu je umístěna molekula $\phi 29$ DNA polymerázy. Ta se při sekvenování používá k začlenění fluorescenčně značených nukleotidů do řetězce DNA. Na rozdíl od Illumina sekvenování jsou fluorofory napojeny na terminální fosfátovou skupinu dNTP, a jejich přiřazení tak nevede k ukončení syntézy, ale nepřetržitě pokračuje dál (Eid et al. 2009). Čtyři fluorescenční signály vydávané při zaražení nukleotidu, každý nukleotid má vlastní specifickou barvu, jsou detekovány kamerou. To umožňuje stanovení jejich pořadí v sekvenci DNA v reálném čase a s vysokou přesností.

Počáteční problém pro tuto metodu představovala rychlost, s jakou je enzym DNA polymeráza schopna začleňovat jednotlivá dNTP do řetězce DNA, ta je pohybuje okolo 1000 bp/s, což je mnohem větší rychlost, než kterou je současná technologie schopna zachytit (Alberts et al. 2002). Tento problém byl vyřešen ligázou speciálních adaptérů na oba konce sekvenované molekuly DNA a jejího zacyklení. Adaptéry obsahují sekvenci komplementární k primerům zahajujících syntézu na templátové DNA. To umožňuje zacyklenému řetězci DNA nepřetržitě procházet molekulou $\phi 29$ DNA polymerázy, dokud nedojde k jejímu kupletnímu přečtení snímací kamerou. Jelikož jsou adaptéry ligovány na oba konce dsDNA je možné získat komplementární informace ze syntézy obou vláken v 5->3 směru, což vede ke snížení chybovosti a k přesnosti ~99,3% (Eid et al. 2009; Slatko et al. 2018).

Významnou vlastností SMRT sekvenování, která vyplývá ze sledování aktivity DNA polymerázy v reálném čase, je schopnost této metody detekovat chemické modifikace nacházející se v sekvenci DNA. Pokud polymeráza narazí na takovou modifikaci projeví se to změnou rychlosti syntézy, a na základě té lze rozeznat, o kterou modifikaci se jedná. Proto je PacBio sekvenování neocenitelným nástrojem při studiu epigenetiky (McCarthy 2010).

Pacific Biosciences of California je firma, která jako první uvedla na trh sekvenační platformy využívající SMRT sekvenování. Technologii stále vyvíjí a nabízí několik sekvenačních přístrojů jako například Sequel nebo novější Sequel II. Přístroje se liší délkou trvání sekvenování, ta se pohybuje okolo 20-30 hodin, a objemem produkovaných dat. PacBio platformy jsou schopné osekvenovat jednotlivé molekuly o průměrné délce

15–20 kb s 99% přesností a více informací lze nalézt na stránkách výrobce www.pacb.com.

3.5.5.2. Oxford nanopór sekvenování

Nejmodernější a na trhu nejnověji dostupnou metodou je nanopór sekvenování, které nabízí a vyvíjí firma Oxford Nanopore Technologies, jenž vznikla v 2005 odštěpením od Oxfordské univerzity, za účelem vývoje elektronického sekvenačního systému založeného na nanopórech (www.nanoporetech.com (online)).

První koncepty využití nanopórů, malých otvorů v membráně, v molekulární biologii se začínaly objevovat již v 80. letech 20. století a hypotetizovalo se o jejich využití, mimo jiné, jako filtrů a separátorů molekul (Bayley 2015). V roce 1996 poté vychází první článek popisující nanopóry v praxi. Byla popsána možnost pomocí elektrického pole protahovat záporně nabitě molekuly ssDNA proteinovou membránou. Vstup molekuly do této membrány částečně blokuje jí procházející elektrický signál. Podle trvání tohoto poklesu elektrického signálu je pak možné zjistit délku molekuly. V závěru článku byla vznešena myšlenka, že by tato metoda mohla po několika vylepšeních sloužit i k detekci nukleotidů v řetězci DNA (Kasianowicz et al. 1996).

Pro potřeby sekvenování se využívají jak biologické, tak solid-state nanopóry. Mezi ty biologické se řadí například lipidový α -HL nanopór, v přírodě produkováný bakterií *Staphylococcus aureus*, Rosenbach 1884, který lze nalézt v sekvenačním přístroji MinION (Clarke et al. 2009; Lindsay 2016). Mezi solid-state nanopóry patří například membrány vyrobené ze Si_3N_4 , silikonu anebo grafenu (Li et al. 2001; Storm et al. 2003). Grafen je velice tenký materiál skládající se z atomů uhlíku uspořádaných do hexagonálních mřížek. Jedná se o velice pevný, flexibilní a vysoce vodivý materiál, což s něj činí ideální substanci na výrobu nanopórů (Novoselov et al. 2004; Heerema a Dekker 2016). Za jeho vývoj v roce 2010 získali vědci Geim a Novoselov Nobelovu cenu za fyziku (Dresselhaus a Araujo 2010).

Při sekvenování jsou řetězce DNA smíchány se sekvenačním enzymem v podobě Φ 29 DNA-polymerázy, který spolu s DNA přilne k 1,4 nm velkým α -HL pórům uložených v lipidové vrstvě, která odděluje dvě nízko objemové komory, mezi nimiž proudí elektrický proud. DNA je k nanopóru přitaženo vlivem elektrického pole a rychlost jeho průchodu je upravena polymerázou, která zároveň rozděljuje dsDNA na ssDNA. Protože se nukleotidy od sebe mimo jiné liší i svojí velikostí, tak svým průchodem přes nanopór

způsobují fluktuaci ve velikosti elektrického proudu mezi oběma komorami. Tyto změny lze měřit a poté použít k identifikaci jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA (Deamer a Branton 2002; Clarke et al. 2009). Zvýšení přesnosti se dá dosáhnout denaturací templátového dsDNA a vytvořením tzv. hairpin DNA, které vzniká spojením rozdělených ssDNA na jejich 3' koncích speciálními primery a navázáním blokovacích oligonukleotidů, který zabraňují polymerizaci. Vzniká tak jedno dlouhé jednovláknového hairpin DNA, a je možné provést sekvenaci obou vláken původního dsDNA zároveň, respektive za sebou (Comer et al. 2009), ale i tak nanopór sekvenování dosahuje oproti ostatním zmíněným metodám nižší přesnosti ~ 95 % (Ferguson et al. 2022).

V počátcích bylo možné sekvenovat pouhých 30 bp (Howorka et al. 2001), v dnešní době se dá v extrémních případech dosáhnout délky čtení až okolo 900 kb (Jain et al. 2017). Oxford Nanopore Technologies na svých stránkách www.nanoporetech.com nabízí tři sekvenační přístroje, a to přenosný a cenově dostupný MinION, který je schopný generovat až 50 Gb dat za 72 hodin nebo dražší a větší GridION či PromethION.

3.5.6. Hledání ideální DNA barcode sekvence v genetickém kódu

Ideální barcode se většinou hledá v sekvencích kódující proteiny, a to především z důvodu nižší šance indelů a tím pádem větší šance správného alignmentu při hledání podobných sekvencí v databázích. rRNA geny se v tomto ohledu potýkají s potížemi, které jsou buď přehlíženy, nebo jsou řešené pomocí výpočetních metod nepoužívajících alignment.

Jak bylo zmíněno dříve, DNA je tvořena ze 4 typů nukleotidů, ty slouží ke kódování proteinů, které se obvykle skládají z 20 typů aminokyselin. V genetickém kódu tedy není možné, aby jednotlivé nukleotidy sloužily pro zápis všech aminokyselin samostatně. Matematicky je to možné teprve až pro kombinace tří nukleotidů, tzv. tripletů neboli kodónů, které dávají možnost vzniku 64 variací s opakováními. Jedna aminokyselina tak může být kódována více různými kodóny.

Náhodný úsek sekvence DNA může být do genetického kódu, který je kódován po tripletech, přeložen šesti způsoby, třemi v každém směru čtení, přičemž pouze jeden způsob čtení odpovídá skutečnému kódovanému proteinu. Pro interpretaci genetického kódu se proto musí správně vybrat tzv. otevřený čtecí rámec (Open Reading Frame - ORF) (Alberts 2002). Navíc je nutné si uvědomit, že k syntéze proteinů dochází na ribozomech čtením informace z RNA, nikoli přímo z DNA. V sekvencích RNA je

nukleotidová báze thyminu (T) zaměněna za uracil (U). ORF pro většinu proteinů začíná start kodonem ATG (AUG) a končí stop kodonem, který může mít tvar TAA (UAA), TAG (UAG) nebo TGA (UGA). Výjimkou mohou být genové sekvence u některých bakterií (Watanabe a Suzuki 2008).

Z evolučního hlediska má veliký význam fakt, že mutace na různých pozicích kodónu mají různý význam a jejich fixace různou pravděpodobnost. Stejně tak inserce nebo delece nukleotidů v exonech mají za důsledek posun čtecího rámce. Některé takové sekvence jsou tedy napříč říšemi vcelku konzistentní a jiné jsou naopak velmi variabilní i mezi jedinci stejného druhu. Různá variabilita v sekvencích genů přináší vědcům možnost studovat evoluci života na velké časové škále a v různém taxonomickém rozlišení. Právě rozdíly na úrovni příbuzných druhů využívá DNA barcoding.

V počátcích DNA barcodingu se usilovalo o nalezení jedné univerzální sekvence, která by byla společná pro všechny organismy, to se ovšem záhy ukázalo jako nemožná ambice a hledání ideálního DNA barcodu se omezilo na jednotlivé skupiny organismů (Hebert et al. 2003a). Genetické markery využívané pro DNA barcoding se nazývají DNA barcodey. Takový barcod by měl splňovat několik kritérií a to (i) být, jak již bylo dříve řečeno, dostatečně variabilní, aby umožnil rozeznávat mezi druhy, ale zároveň co nejvíce stabilní pro zástupce stejného druhu, (ii) být standardizovaný s konstantní substituční rychlostí pro co nejširší spektrum organismů a umožnit tak použití stejné DNA sekvence pro rozeznání co nejvíce taxonů a taxonomických kategorií (iii) mít vhodné vysoce konzervované primerovací sekvence na koncích, což umožňuje vysoce spolehlivou amplifikaci daného úseku a následné sekvenování (iv) cílová DNA sekvence by neměla být příliš dlouhá, aby bylo možné její využití i při amplifikaci z degradovaného materiálu (Taberlet et al. 2007).

Vypsaná kritéria mají pro každý vědní obor jinou váhu. Taxonom bude například upřednostňovat genetický marker, který mu poskytne dostatek informací, na základě, kterých bude možné zkoumaný druh přesněji zařadit do taxonů. Kdežto pro ekologa zkoumajícího organické zbytky ve vodě nebo v půdě bude mít naopak největší hodnotu univerzálnost a možnost amplifikovat i krátké degradované sekvence při odnoži barcodingu zvané metabarcoding, který se využívá při zkoumání environmentální DNA (eDNA) a dokáže současně identifikovat větší počet organismů nacházejících se v jednom vzorku (Taberlet et al. 2012). Toho může být dosaženo tzv. High-throughput

sekvenováním (HTS), kdy dochází k sekvencování více fragmentů DNA paralelně za využití méně specifických primerů nebo i zcela bez nich (Liu et al. 2020).

3.5.6.1. Živočišné barcodes

Největší pozornosti, jako zdroji ideální DNA barcode sekvence, se v živočišné říši těší mitochondriální DNA. Mitochondrie je membránová semiautonómni organela nacházející se ve všech eukaryotických organismech. Mezi její hlavní funkce patří produkce energie pro správný chod organismu a v jedné buňce se jich může nacházet až několik stovek nebo tisíců, přičemž každá v nich obsahuje několik molekul DNA (Wiesner et al. 1992), a tak jsou jejím bohatým zdrojem, i když je množství dostupné tkáně / vzorku omezené (Purty a Chatterjee 2016). Rychlost evoluce protein kódující mtDNA je také dostatečně vysoká i pro identifikaci blízce příbuzných druhů (Hebert et al. 2003a). Mezi další příznivé vlastnosti se řadí absence intronů, malá predispozice k rekombinaci, haploidní, maternální dědičnost a existence robustních primerů (Saccone et al. 1999).

Prvotní studie se zpočátku zaměřovaly na mitochondriální geny (12S, 16S) kódující ribosomální RNA, ale od jejich širšího využití bylo upuštěno z důvodu častého výskytu indelů, insercí a delecí bází, což vedlo k problémům při sekvenačním alignmentu (Doyle a Gaut 2000). Od nich byla pozornost přesunuta na cytochrom-oxidázový komplex představující poslední článek elektronového transportního (dýchacího) řetězce. U eukaryot se tento enzymatický komplex nachází ve vnitřní membráně mitochondrií a skládá se z několika podjednotek (Dieteren et al. 2008). Tři největší z nich cytochrom c oxidáza I, II a III jsou kódovány přímo v mtDNA (Voet a Voet 1990).

Konkrétně podjednotka cytochrom c oxidáza I (COI) se zdá být jako nejslibnější zdroj živočišného DNA markeru. Vykazuje dostatečnou substituční rychlost pro rozlišení blízce příbuzných druhů (Knowlton a Weigt 1998; Fourdrilis et al. 2016), má stabilní délku, poněvadž inserce a delece bází se vyskytují sporadicky, narozdíl od rRNA genů (Ramirez-Gonzalez et al. 2013) a jsou pro něj vyvinuty robustní univerzální primery, pomocí kterých lze spolehlivě amplifikovat stabilně dlouhé úseky z většiny zástupců živočišné říše včetně hmyzu (Folmer et al. 1994; Zhang a Hewitt 1997). Za univerzální živočišný marker byla tak vybrána právě sekvence dlouhá 648bp mitochondriálního genu cytochrom c oxidázy I (Hebert et al. 2003a).

Bohužel získání takto dlouhé sekvence se ve specifických případech ukazuje jako složité nebo příliš nákladné. Jedná se o různě degradované vzorky z muzejních sbírek, enviromentální DNA nebo z průmyslově zpracovaných potravin za účelem ověření jejich původu a složení (Hajibabaei et al. 2006). To vedlo k experimentování s takzvanými mini-barcodes, od běžných barcodů se liší svojí menší délkou, která činí přibližně 100 bp, ale i přes to dokázaly spolehlivě identifikovat většinu zkoumaných vzorků za cenu minimálního úbytku na přesnosti (Hajibabaei et al. 2006; Meusnier et al. 2008). Alternativou je například i kombinace více takových mini-barcodů. Použití COI a Cytb mini-barcodů se mimo jiné osvědčilo při kontrole obchodu s rybami druhu *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) a *P. larnaudii* (Bocourt, 1866), kteří bývají často zaměňováni za kritický ohrožený druh *P. gigas* (Chevey 1931). DNA bylo získáno z ploutví nebo svalové tkáně a použité mini-barcody dokázaly tyto morfologicky těžko rozlišitelné druhy 100 % určit a po doplnění jadernými markery i jejich hybridy (Buddhachat et al. 2021).

Pro kritiku využívání mtDNA markerů jsou uváděny obavy z možného nadhodnocování výsledků při fylogenetických studiích v případě ovlivnění mitochondriální dědičnosti. K nestandardní dědičnosti mtDNA může dojít při dvojí uniparentální dědičnosti (DUI) běžné u mlžů (Bivalvia, Linnaeus 1758), která je výjimkou potvrzující pravidlo maternální dědičnosti běžné u většiny živočichů. U druhů s DUI dochází k předání buď maternální mtDNA nebo paternální mtDNA a rozdílnost sekvencí mezi nimi může činit až 30 % (Passamonti a Ghiselli 2009; Passamonti et al. 2011; Antit et al. 2018). Dalším faktorem vedoucím k rozdílnostem v mtDNA mezi zástupci stejných druhů mohou být obligátně prospěšné mikroorganismy, endosymbionti nebo endoparazité. Jejich výskyt také vede k obavám z ovlivnění amplifikace při použití méně specifických primerů. Nejvíce ovlivněným taxonem se zdají být členovci (Arthropoda), například společně s mitochondrií kosegregující bakterie rodu *Wolbachia* (Hertig 1936), která ovlivňuje reprodukční cyklus svého hostitele. U *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus, 1758) byl objeven horizontální přenos genetické informace mezi touto bakterií a hostitelem a vzhledem k rozmanitosti hmyzu nelze tento fenomén vyloučit ani u dalších druhů (Kondo et al. 2002). Odhadem *Wolbachia* postihuje 15-75 % hmyzu a 50 % pavouků (Araneae Clerck, 1757), takto infikovaní jedinci mohou být nesprávně zařazeni či označeni za nový druh (Hurst a Jiggins 2005; Whitworth et al. 2007; Weeks et al. 2007; Smith et al. 2012). Na druhou stranu některé studie tyto obavy označují za přehnané. Šance neúmyslné amplifikace bakteriální sekvence při použití specifických primerů pro

členovce (Arthropoda) je malá a pokud k ní přesto dojde je snadné tuto chybu odhalit a napravit (Stahlhut et al. 2012; Smith et al. 2012). V případě podezření na ovlivnění genové sekvence může být sporný jedinec dále podroben analýze jadernými markery, kterým je například gen *Rag1* (Frézal a Leblois 2008; Buddhachat et al. 2021). I přes tyto diskuze zůstávají pro živočichy COI a další mitochondriální markery nejvyužívanějšími (Taylor a Harris 2012).

3.5.6.2. Barcodes ostatních eukaryot a bakterií

COI marker používaný u zvířat a adoptovaný jako univerzální barcode nachází své využití i v říši hub, obzvláště dobře se osvědčil u rodu *Penicillium* (Link) a u dalších příbuzných druhů, kde se obavy z výskytu intronů, komplikujících PCR ve většině případech, nepotvrdily (Seifert et al. 2007). Obecně však COI sekvence u hub naráží na několik úskalí, mezi které patří dříve zmíněný výskyt intronů, nedostatečná variabilita mezi druhy (Gilmore et al. 2009) a existence anaerobně dýchajících taxonů, jejichž zástupci postrádají mitochondrie, jako například členové kmene Neocallimastigomycota (Powell, 2007) (Purty a Chatterjee 2016), a proto od COI markerů u hub bývá upouštěno ve prospěch jaderného ribozomálního mezerníku zvaného ITS, který je akceptován jako oficiální barcode marker pro tuto říši eukaryot. ITS vykazuje velkou úspěšnost při PCR amplifikaci a obecně si vede lépe při diskriminaci příbuzných taxonů, než COI, které dokáže spolehlivě zatřídit do druhů (Dentinger et al. 2011; Schoch et al. 2012).

U bakterií, které mitochondrie pochopitelně nemají, se nejčastěji jako DNA barcode používá část sekvence genu 16S rRNA. Vyskytuje se u všech bakterií, funkce toho genu se v průběhu času příliš neměnila a jeho délka přesahující 1500 bp znamená, že dokáže poskytnout více než dostatek fylogenetických informací. K barcodingu se ovšem používá pouze obecně konzervativní část dlouhá obvykle cca. 350 bp, pro kterou jsou vyvinuty robustní primery (Janda a Abbott 2007). Relativní jednoduchost sekvencování 16S rRNA, primárně z environmentálních vzorků, významně přispěla k mapování mikrobiální rozmanitosti na Zemi (Lozupone a Knight 2007).

Vzhledem k heterogennímu charakteru protistů (Protista), pro zjednodušení chápáno jako souhrnné označení pro eukaryotické organismy, kteří nepatří mezi zvířata, rostliny ani houby (Pawlowski et al. 2012), je stanovení jednoho univerzálního barcodu téměř nemožné, ale i tak vedlo použití COI markerů k příznivým výsledkům u některých řas (Algae) a k odhalení nových druhů (Saunders 2005; Clarkston a Saunders 2010).

Spolehlivějším řešením se však zdá být použití jednoho „univerzálního“ barcodu doplněného o barcode, který by byl specifický pro danou skupinu řas nebo prvoků, pro co nejpřesnější zařazení do taxonu. Jednalo by se o postup podobný používání mini-barcodů u živočichů. Navrhovanými geny jsou například 28S rDNA, 18S rRNA, ITS, COI spolu se svými klady a zápory zmíněnými u předešlých říší (Pawłowski et al. 2012).

Skutečným problémem se ovšem zdají být rostliny, kde je hledání spolehlivého genetického markeru stále předmětem debat. Evoluce mitochondriální DNA u rostlin je mnohem pomalejší než u zvířat a COI sekvence tak u nich dosahuje menší variability. Proto bylo potřeba pro rostliny zvolit vhodnější marker. Pozornost z mitochondrie se přenesla na chloroplastovou DNA. Chloroplast je, podobně jako mitochondrie, semiautonomní organela se specifickou funkcí. Syntetizuje a obsahuje zelené barvivo chlorofyl. Na membránách chloroplastů probíhá fotosyntéza tj. přeměna sluneční energie na energii chemických vazeb v uhlíkatých řetězcích. Jako nejslibnější barcod se jeví rychle se vyvíjející plastidový gen maturáza K (matK) (Lahaye et al. 2008) doplněná o informace z jaderného ribozomálního ITS a nebo z dalšího plastidového genu zvaného rbcL. Ten se vyznačuje značnou délkou 1428 bp a nabízí velkou univerzalitu za cenu menší diskriminační síly na úrovni druhů (Kress et al. 2005; Hollingsworth et al. 2009). Mezi nevýhody matK se řadí potíže s vývojem vhodných a spolehlivých primerů, ale ty budou v budoucnu zajisté vyřešeny. Prozatím se jako nejlepším řešením barcode identifikace rostlin zdá být 2-locus systém založený na používání dvou DNA markerů (Hollingsworth et al. 2011).

3.5.7. Barcodové databáze

Jako další paralelu se zbožím v supermarketu s čárovými kódy a DNA barcodingem lze uvést snahy o vytvoření online referenčních databází, které by ideálně obsahovaly DNA sekvence všech organismů a umožnily jejich porovnání se sekvencemi nejen známých ale i nových a neznámých druhů. V současné době existuje takových databází několik.

3.5.8. CBOL

Impulzem ke vzniku a zavedení standardizovaných DNA barcodů u již existujících genových databází bylo v roce 2004 založení sdružení The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) za podpory filantropické neziskové organizace Nadace Alfreda P. Sloana. Mezi členy tohoto sdružení se řadí více než 120 národních i soukromých organizací, ať

už jde o přírodovědecká muzea, herbária a další organizace zabývající se biodiverzitou, pocházejících z 45 zemí světa (Ratnasingham a Hebert 2007). Všechny tyto různorodé organizace spojuje jeden společný cíl, kterým je propagace, rozvoj a prohloubení poznání díky DNA barcodingu (Schindel a Miller 2005).

Jedním z prvních počínů CBOL společně s předními světovými genetickými databázemi bylo vytvoření formálních předpisů, které DNA sekvence musí splňovat, aby mohla získat označení DNA barcode. Sekvence musí pocházet z určené genové oblasti, splňovat určený standart kvality a pocházet ze vzorku, který lze v budoucnu přezkoumat. To znamená, že vzorový jedinec je uchováván ve sbírce pro možnost případného přezkoumání (Hanner a Gregory 2007).

3.5.9. BOLD

První databázi založenou čistě za účelem shromažďování standardizovaných DNA barcodeů byl The Barcode of Life Data System (BOLD). Od svého založení v roce 2005 je neocenitelným pracovním nástrojem, zejména pro vědce zabývající se taxonomií a biologií druhů, pomáhá získávat, ukládat, analyzovat a šířit DNA barcode sekvence.

Také se neustále vyvíjí. V roce 2017 došlo ke spuštění modernizované čtvrté verze této databáze zlepšující její chod a představila také nový zlepšený systém citací a anotací. BOLD je kompletně zdarma a veřejně přístupný pro každého vědeckého pracovníka zajímajícího se o DNA barcoding a lze ho nalézt, spolu se všemi novými funkcemi, na webových stránkách <http://www.boldsystems.org>. V současné době shromažďuje přes 12 milionů barcode sekvencí pocházejících z více než 300 tisíc druhů živočichů, rostlin, hub a dalších organismů ze všech koutů světa. Vědci mohou neustále přidávat nové záznamy do databáze, které se poté stávají součástí globálního souboru DNA barcodeů a pomáhají tak zlepšovat budoucí taxonomické a fylogenetické studie.

Záznamy obsahují veškeré informace týkající se kvality, délky sekvence, použitých primerů a podobně. Zároveň s těmito informacemi poskytuje databáze uživatelům i různé nástroje k analýze sekvencí, jako jsou například možnosti vyhledávání, porovnávání a vizualizace. Také zde lze nalézt bibliotéku článků a publikací zabývajících se DNA barcodingem, které jsou zapojeny v sdružení CBOL (Ratnasingham a Hebert 2007).

3.5.10. INSDC

Alternativu k The Barcode of Life Data System představuje organizace International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Jedná se o systém spolupráce mezi třemi online databázemi, kterými jsou GenBank spadající pod National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), DNA Data Bank of Japan (Japonsko) a Evropský archiv nukleotidů (Spojené království). Cílem těchto databází je sbírat a šířit sekvence DNA a RNA, které mezi sebou neustále sdílejí. Také jsou spolu s CBOL zodpovědné za dříve zmíněné standardizování DNA barcodingu (Ratnasingham a Hebert 2007).

3.5.11. NCBI a GenBank

Jak bylo výše zmíněno GenBank je jednou z dalších databází shromažďujících sekvence různých organismů, včetně bakterií, rostlin, zvířat a virů. Lze jí nalézt na adrese <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Databáze byla vybudována, a je spravována, NCBI, které je jedním z oddělení National Library of Medicine (NLM) se sídlem v kampusu US National Institutes of Health v americkém městě Bethesda, jenž je severozápadním předměstím Washingtonu, D. C., ve státě Maryland (Benson et al. 2012). Jedná se o vládní agentury Spojených států amerických.

GenBank se zaměřuje na sběr, organizaci a distribuci nukleotidových sekvencí. K roku 2020 databáze obsahuje přes 6,25 bilionů bp z více než 1,6 miliard sekvencí náležících 450 000 popsaným druhům (Sayers et al. 2020). Na stránkách lze nalézt jak úplné genomy, například mitochondriální, tak i částečné sekvence genů, a to zejména COI nebo COII. Databáze je neustále obohacována o nové sekvence, které přidávají vědci z celého světa a množství nukleotidových bp v databázi tak ročně roste až o 35 % (Sayers et al. 2020).

NCBI poskytuje v rámci GenBank také různé nástroje a služby pro analýzu a vizualizaci dat, jako je například funkce BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), která umožňuje porovnávat sekvence v GenBank databázi s novými sekvencemi a hledat mezi nimi shodu vyjádřenou v procentech. BLAST je velmi užitečný pro identifikaci nových druhů nebo určování funkcí genů. Tento nástroj poskytuje různé možnosti pro vyhledávání, včetně porovnání sekvencí DNA, RNA nebo proteinů z různých organismů a porovnávat sekvence v GenBank oproti vlastní databázi. Samozřejmostí je také možnost nastavit si vlastní parametry vyhledávání pro co největší přesnost (Boratyn et al. 2013).

Dále zde lze nalézt PubMed, což je nástroj pro vyhledávání v biomedicínských publikacích a člancích, anebo PubChem, databázi chemických sloučenin a jejich účinků.

Všechny databáze a nástroje poskytované NCBI jsou volně dostupné a mohou být využívány vědci a výzkumníky z celého světa. NCBI a GenBank tak hrají důležitou roli v podpoře a zlepšování výzkumu a slouží jako klíčový zdroj informací zejména v oblasti genetiky, molekulární biologie a medicíny, a to nejen v USA, ale i po celém světě.

3.5.12. iBOL

Za zmínku dále stojí The International Barcode of Life Consortium (iBOL). Jde o spojení mnoha národů se společnou snahou prohloubit naši znalost biodiverzity budováním DNA barcode databází, sekvenačních laboratoří a dalších informačních a vědeckých zařízení. Mezi úspěchy iBOL se řadí dokončení projektu BARCODE 500K, jehož cílem bylo získat 5 milionů sekvencí pro 500 tisíc druhů. Podařilo se tak za investice 150 milionů dolarů od výzkumných organizací z 25 zemí světa. Do toho projektu byla zapojena i Česká republika (ibol.org). Následovníkem projektu BARCODE 500K je projekt BIOSCAN s cílem posunout počet sekvenovaných druhů na 2,5 milionu do roku 2025. V současné době je iBOL zodpovědný za chod a udržování BOLD.

3.5.13. Barcode gap

Kdy je možné vyčlenit nový druh z toho stávajícího na základě sekvence DNA, respektive ho označit jako MOTU k dalšímu přezkoumání, určuje fenomén nazývaný barcoding gap, jehož existence je pro celý systém DNA barcodingu klíčová. Barcoding gap je předpokládáný minimální rozdíl mezi sekvencemi různých druhů, podle něž je možné tyto sekvence spolehlivě označit za náležící jiným druhům. Vychází se z předpokladu, že vnitrodruhová genetická variabilita je menší než mezidruhová genetická divergence (Hebert et al. 2003b).

Velikost barcode gap byla prvotními studiemi, na základě empirických dat, stanovena na desetinásobek průměrné mezidruhové variace dané pro studovanou skupinu a její výše se většinou pohybovala okolo 2 % - 3 % (Hebert et al. 2004b; Smith et al. 2005; Čandek a Kuntner 2015). Pokud by se DNA sekvence zkoumaného taxonu lišila o méně než 2 % od známé sekvence, tak by se v tomto případě očekávalo, že obě náleží stejnému druhu. Pokud by se lišila o více než 2 % tak by se předpokládalo, že se jedná o nový / jiný druh.

K nalezení barcoding gap a k roztřídění vzorků na jeho základě se používá mnoho statistických metod a analytických nástrojů. Jedním z takových nástrojů je například

jMOTU. Využívá shlukové analýzy, konkrétně metody nejbližšího souseda, kdy dochází ke shlukování nejpodobnějších vzorků. Vzdálenost jednotlivých shluků je pak dána vzdáleností dvou nejbližších objektů z různých shluků (Jones et al. 2011). Finálním výsledkem je dendrogram, který se používá k zobrazení předpokládaných příbuzenských vztahů mezi taxony. Dalšími metodami jsou například Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre et al. 2012) nebo Barcode Index Number (BIN) (Ratnasingham a Hebert 2013).

3.5.14. Využití DNA barcodingu

Pilotní studie na téma DNA barcodingu v roce 2003 testovala tuto metodu a její schopnost správně identifikovat druhy na zástupcích řádu Lepidoptera Linnaeus 1758. Bylo vybráno 200 běžných druhů z okolí města Guelph v Kanadě. Identifikace všech druhů byla 100 % úspěšná, a tak se podobné výsledky očekávaly i u ostatních taxonů, jelikož Lepidoptera jsou jedním z nejvíce taxonomicky diverzním řádem a jejich DNA sekvence nejsou moc rozdílné. Při otestování 3 % barcode gap se podařilo identifikovat 196 z 200 druhů, výjimku tvořili čtyři druhy recentního původu, u kterých byla míra divergence menší (Hebert et al. 2003a).

V podobném duchu se nesla další studie, též zaměřená na Lepidoptera, tentokrát s cílem objevit nové taxony. Motýl *Astrartes fuligator* (Walch 1775) byl dlouho podezříván za ukrývání více kryptických druhů. Jedná se o druh se širokým areálem výskytu od jihu USA až po sever Argentiny. Prvním náznakem, že se jedná o více kryptických druhů, bylo nezvyklé množství krmných rostlin housenek tohoto motýla. Jev nezvyklý pro čeleď soumráčníkovitých (Hesperiidae Latreille 1809) do které patří. Dalším znakem byla vysoká variabilita pigmentace housenek. Na druhou stranu dospělí jedinci mají jen mírně odlišné morfologické znaky a disekce pohlavních orgánů, což je v entomologii častý zdroj identifikačních znaků, v nich nenašla žádný rozdíl. Nebýt DNA barcodingu rozčlenění toho komplexu druhů by zabralo několik dalších let plných pozorování dospělců a jejich spojování s housenkami a krmnými rostlinami, jelikož se nejspíše jedná o sympatrické taxony schopné mezidruhového křížení. DNA barcoding podpořený morfologickými a ekologickými poznatky se ukázal jako velice efektivní nástroj. Divergence v COI sekvencích *A. fuligator* se ukázala být mnohem vyšší, než je typické v rámci jednoho druhu. Výsledný počet druhů byl ze šesti až sedmi předpokládaných, na základě pozorování, navýšen na deset MOTU (Hebert et al. 2004a).

Toto navýšení pouze na základě divergence DNA sekvence se však setkalo s kritikou a skutečně se nejspíše jedná jen o sedm rozdílných druhů (Brower 2006).

Dalšího průlomů v oblasti molekulární taxonomie a nastínění skutečné biodiverzity se podařilo dosáhnout u řádu Hymenoptera v Kostarice. Ve studii bylo podrobeno 2 597 jedinců parazitoidních vosiček (Hymenoptera: „Parasitica“) ze šesti rodů (*Alphomelon*, Mason 1981; *Apanteles*, Forster 1862; *Cotesia*, Cameron 1891; *Dolichogenidea*, Viereck 1911; *Glyptapanteles*, Ashmead 1904; a *Microplitis*, Forster 1862). Na základě morfologie bylo vyčleněno 171 OTU, ale DNA barcoding toto číslo navýšil o dalších 142 na celkový počet 313 druhů, z toho více než 95 % bylo nepopsaných. Z předpokládaných parasitoidů generalistů napadajících široké množství různých housenek se vyklubalo mnoho druhů specialistů, každý parazitující jeden až dva druhy housenek. Celková druhová bohatost těchto šesti rodů byla navýšena o 70 %. Nejextrémnější případ přehlížené biodiverzity byl zjištěn u druhu *Apanteles leucostigmus* (Förster, 1862), u kterého se předpokládalo, že parazituje 32 druhů housenek z čeledi soumračníkovitých. Barcoding tento předpoklad vyvrátil a zjistil, že jde o komplex 36 kryptických druhů. U druhů vyčleněných pouze na základě divergence DNA sekvence, byly po podrobnějším přezkoumání skutečně objeveny rozdílné morfologické znaky anebo rozdíly v chování a výběru hostitelů. V případech, kdy DNA barcoding byl v rozporu s ekologickými daty nebo s morfologií, byla molekulární data doplněna o jaderné markery 28S rRNA. Prvotní screening COI barcodem, následně doplněný o jaderný marker, morfologická a ekologická data, se ukázal jako velice slibný nástroj pro mapování biodiverzity na α -úrovni (Smith et al. 2008).

DNA barcoding je z největší části využíván právě pro zkoumání hmyzu (Taylor a Harris 2012). To není žádným překvapením, jelikož se jedná o velice různorodou a druhově bohatou skupinu s mnoha kryptickými druhy a naše poznání zde stále zaostává (May a Harvey 2009). Mnoho druhů hmyzu je významnými zemědělskými škůdci a vektory nemocí, a jejich správná identifikace je proto nesmírně důležitá. Hlavní předností DNA barcodingu je schopnost rozpoznat organismus bez ohledu na vývojové stádium. To má opět velké využití u hmyzu a to i u druhů, u kterých to bylo historicky obtížné jako například u kukel a housenek motýlů (Virgilio et al. 2010; Hausmann et al. 2020). Na základě empirických dat největší přesnosti DNA barcoding dosahuje při určování zástupců řádů Hymenoptera a Orthoptera (Latreille, 1793). Prokazatelně hůře si vede u členů řádu Diptera (Linnaeus 1758) (Virgilio et al. 2010), kde dosahuje smíšených výsledků

kvůli malé divergenci COI sekvence (Meier et al. 2006; M. Hernández-Triana et al. 2019; Kunprom a Pramual 2019). V Thajsku se i přesto podařilo odhalit tři nové druhy náležící do čeledi Tabanidae Latreille, 1802, kde jsou tyto mouchy známými přenašeči parazitických prvků *Trypanosoma evansi* Balbiani, 1888. Jejich správná identifikace je proto důležitá pro kontrolu a omezení šíření těchto parazitů (Changbunjong et al. 2020).

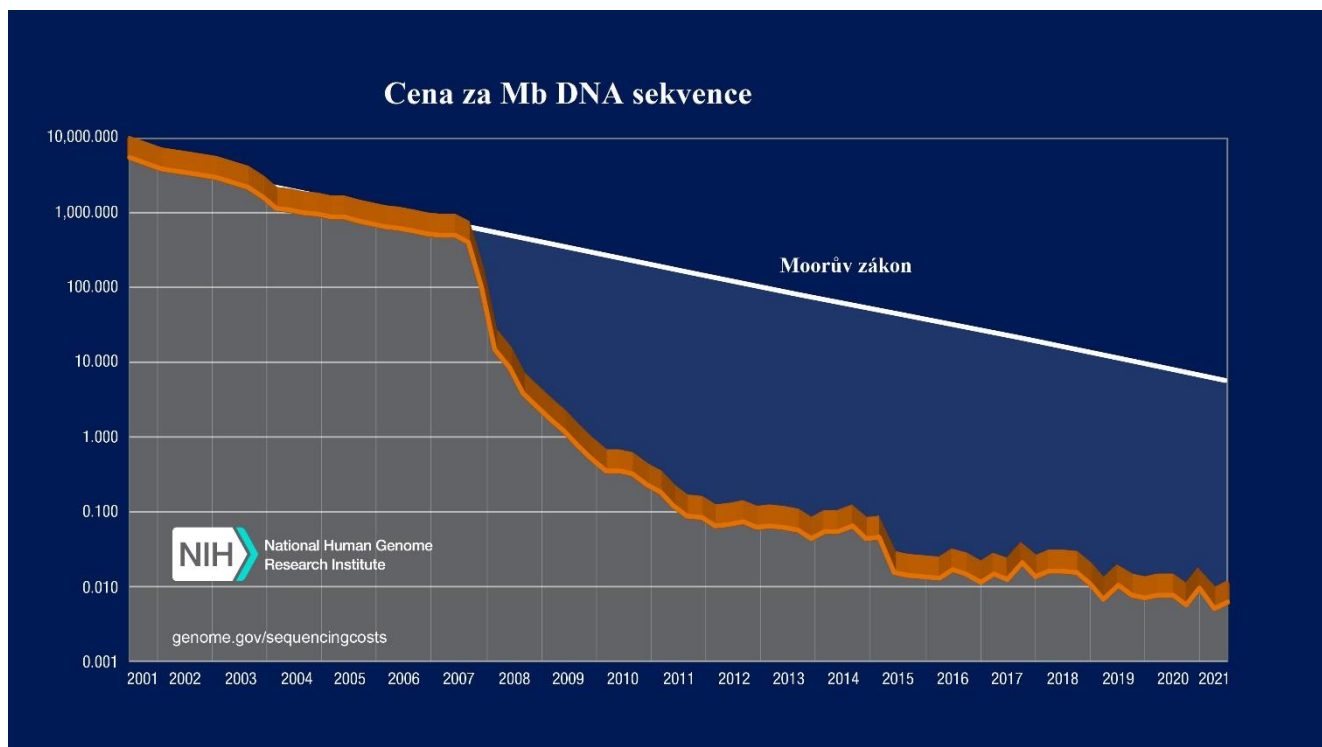
Možná pro někoho překvapivě nachází DNA barcoding společně s entomologií i využití v kriminalistice. Ze všech možných mrchožroutů jsou mouchy bzučivky (Diptera: Calliphora Robineau-Desvoidy, 1830) jedním z prvních a nejhojnějších organismů kolonizujících uhynulá těla. Mohou tak posloužit jako účinný nástroj pro stanovení doby úmrtí na základě stádia vývoje vajíček a především larev. Pro přesné určení času je ovšem kritické správně určit druh bzučivky. Jako u většiny kryptických druhů se toto určování provádělo na dospělých jedincích podle rozdílnosti pohlavních orgánů, což vyžadovalo značnou expertízu čas pro dochování larev v imaga. Larev a vajíček bývá mnoho, ale jejich identifikace je morfologicky téměř nemožná. Aplikování DNA barcodingu se opět ukázalo jako dobré řešení tohoto problému. Larvy i dospělce se povedlo úspěšně zařadit do druhů (Chen et al. 2004).

Ekologové se na DNA barcoding obracejí zejména pokud je potřeba identifikovat zvíře jen ze živočišných zbytků, které po sobě zanechá. Takovým zbytkem mohou být chlupy, výkaly atd. Tento přístup je nejvíce oceňován při sledování skrytě žijících nebo ohrožených druhů (Valentini et al. 2009). Stejně tak je významný i pro ochranu ohrožených druhů, lze kontrolovat, zda z nich nepocházejí různé výrobky, nebo zda nejsou mylně nebo úmyslně zaměňovány za jiné druhy. DNA barcoding umožňuje i uživatelům nezkušeným v taxonomii, jako je celní hlídka, spolehlivě rozpoznat převážnou zvěř a rostliny (Schindel a Miller 2005).

3.5.15. Využití NGS a TGS

Moderní sekvenační metody, nacházející využití hlavně v genetice a medicíně (Varshney et al. 2009; Boers et al. 2019; Qin 2019), začínají pomalu pronikat i do studií biodiverzity, kde pomáhají při zkoumání mikroorganismů (Fukatsu 2012; Mailhe et al. 2018), které lze jinak jen obtížně rozpoznat a určit, ale se snižující se cenou a zvyšující se dostupností těchto metod je jejich využití při určování větších organismů jen otázkou času.

Před dvaceti lety se náklady na sekvenování jednoho genomu pohybovaly v řádech miliard dolarů a trvalo několik let (Venter et al. 2001). Dnes stojí sekvenování jednoho genomu stovky dolarů a trvá několik dní nebo týdnů. K největšímu poklesu nákladů v roce 2008 vedla revoluce v sekvenování v podobě NGS. S příchodem dalších metod, a



Obrázek 8: Graf zobrazující průměrné náklady na sekvenování jedné megabáze a porovnání s Moorovo zákonem, převzato a upraveno z www.genome.gov

se zdokonalováním těch stávajících, náklady na sekvenování rok od roku neustále klesají. Rychlost klesání cen sekvenování dokonce překonává hypotetický Moorův zákon, který charakterizuje exponenciální růst výpočetního výkonu v počítačovém průmyslu a slouží tak jako dobrý ukazatel pokroku (www.genome.gov (online)).

DNA barcoding a sekvenování nové či třetí generace jsou molekulární metody použitelné pro zkoumání biodiverzity, ale mají různé aplikace a účely. DNA barcoding nachází využití především při identifikaci a klasifikaci jednotlivých předem roztríděných druhů. NGS a TGS jsou schopny sekvenovat velké množství nespecifikovaného DNA ze směsných vzorků, a je možné získat sekvence dlouhé několik kb. Poskytují tak komplexnější pohled na biodiverzitu. Jsou zejména užitečné při zkoumání mikroorganismů, eDNA, analýze směsných vzorků a jelikož se porovnávají delší sekvence, tak je možné dosáhnout i větší přesnosti než například u metabarcodingu, pomocí kterého může být obtížné rozlišit blízké příbuzné druhy, či určit všechny druhy

obsažené ve směsi, vlivem nedostatečného navázání primerů (Medinger et al. 2010; Nowrousian 2010; Rees et al. 2014; Gueuning et al. 2019; Gendron et al. 2023).

Pokrok v oblasti NGS vedl okolo roku 2009 k vzestupu mitochondriální metagenomiky, někdy také zkráceně nazývané mitogenomiky, která se ukázala jako účinný nástroj při identifikaci půdních hlístic (Nematoda Rudolphi, 1808) (Porazinska et al. 2009; 2012). Oproti DNA metabarcodingu tento postup nevyužívá druhově specifických markerů a PCR primerů, ale sekvenuje celkové DNA izolované ze smíšeného vzorku, z nějž poté pomocí počítačových softwarů vybírá mitochondriální genomové DNA (Gendron et al. 2023).

Pomocí mitogenomiky je možné relativně spolehlivě konstruovat fylogenetické stromy. Ze smíšeného vzorku 500 druhů brouků z deštného pralesa na Borneu se pomocí Illumina MiSeq sekvenování 480 až 850 bp dlouhých fragmentů podařilo sestavit 175 alespoň částečných mitochondriálních genomů (částečných mitochondriální genom se skládá minimálně z osmy genů (Crampton-Platt et al. 2016)). Na základě těchto dat byl sestaven fylogenetický strom a po porovnání s DNA databázemi byly sekvence přiřazeny k druhům (Crampton-Platt et al. 2015). Tento přístup také umožňuje zařadit druhy formálně známé pouze jako barcodes do jejich fylogenetického kontextu, což není možné pouze s pomocí barcode sekvencí. Například mezi mitogenomy z bornejské studie se nacházela CO1 sekvence shodná na ~98 % se sekvencí druhu *Liroetiella antennata* (Chrysomelidae (Galerucinae), který byl popsán v roce 1993 v horách Kinabalu v Sabahu, a o několik let později i o sekvenován, a bylo možné tento druh náležitě zařadit do fylogenetického stromu (Mohamedsaid 1993; Bezdek 2013). Počet studií testující mitogenomický přístup k identifikaci druhů neustále roste, ale DNA barcoding zůstává stále nejpresnější identifikační molekulární metodou (Gueuning et al. 2019).

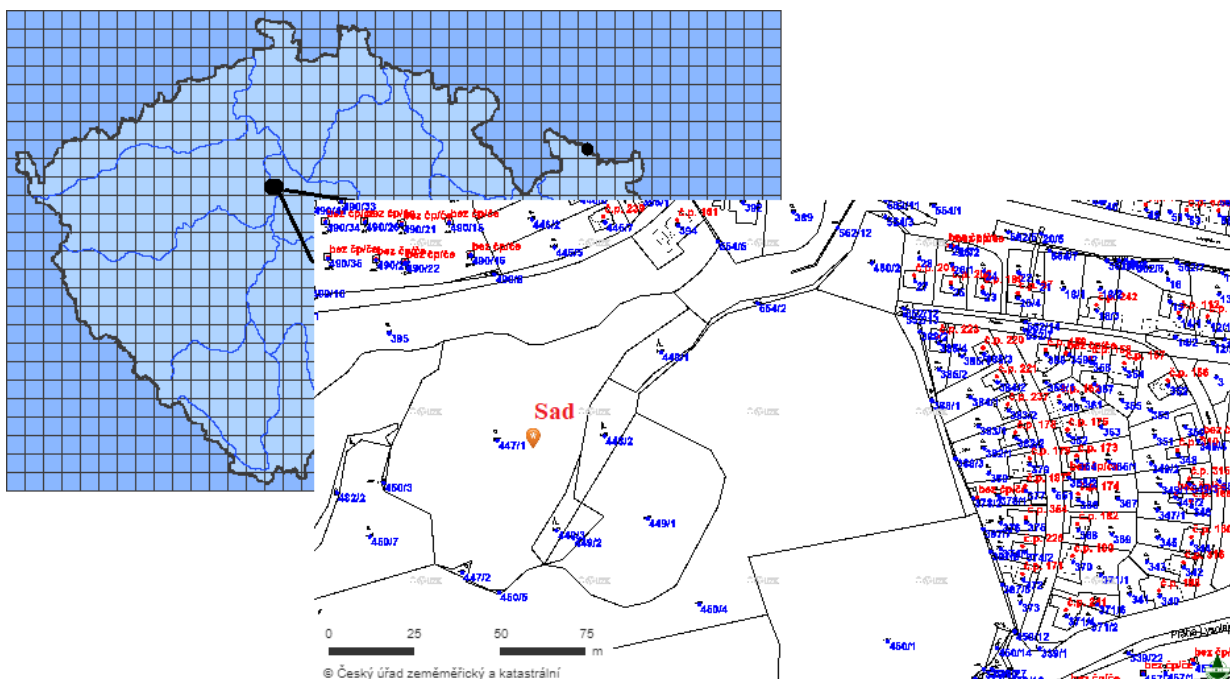
Jedním z problémů mitogenomiky je amplifikace a sekvenování necílových úseků, mitochondriální sekvence zaujímala jen okolo 0,5 – 1,5 % z celkového objemu sekvenovaných dat (Tang et al. 2014; Crampton-Platt et al. 2015), což vede ke zbytečnému plýtvání časem a penězi při analýze necílových úseků DNA. Pomocí modernějších postupů je možné koncentraci mtDNA ve vzorku zvýšit až 100x, například zachycením cílových úseků próbami (Liu et al. 2016). Dalším citovaným problémem jsou nekompletní databáze s mitochondriálními genomy (Gendron et al. 2023).

4. Metodika

Jedním z hlavních cílů této diplomové práce je porovnání klasické determinace sběrů bezobratlých s moderními molekulárními metodami na sebraných a standardizovaných vzorcích, které mají sloužit jako simulace faunistického průzkumu.

Sběr vzorků byl proveden v třešňovém sadu spadajícím do ochranného pásma přírodní památky Housle nacházející se v Praze 6 pod katastrálním územím Lysolaje. Chráněné území, s celkovou rozlohou 3,8 ha, je z velké části tvořeno ~25 m hlubokou a 250 metrů dlouhou roklí, jež vznikla v kvartéru denudační činností. Rokle je z velké části tvořena spraší a pískovcem, její podloží je pak tvořeno tmavými břidlicemi. V minulosti byla lokalita využívána jako suťový lom a dále zde docházelo i k těžbě dřeva, pro potřeby nedalekých osad, což vedlo k postupnému odlesnění této lokality. Právě tato lidská činnost bohatě přispěla k současné geomorfologii a umožnila růst a výskyt xerothermní vegetace a živočichů, kteří jsou spolu s jedinečnou geomorfologií lokality předmětem ochrany. Bohužel tato xerothermní biocenóza byla počátkem 20. století narušena protierozní výsadbou akátu a smrku. Ke vzniku přírodní památky došlo až v roce 1982 vyhláškou č. 3/1982 Sb. NVP a jejím správcem je AOPK Praha (www.praha-priroda.cz (online); www.drusop.nature.cz (online)).

V ochranném pásmu PP, směrem k obci Lysolaje, se na svazích erozní rokle nachází v minulosti vysazený ovocný sad s parcelním číslem 447/1 a rozlohou 14 207 m². Značné úsilí je zde věnováno odstraňování nežádoucích dřevin. a travní porost je jednou ročně sekán. Důraz je kladen na zachování genetického materiálu místních odrůd ovoce a mnoha reliktních druhů hmyzu. Pro entomology je tato lokalita zajímavá například výskytem četného množství střevlíků, vzácných včel *Hoplitis rufohirta* Latreille 1811, snovaček *Dipoena melanogaster* (C. L. Koch 1837) a jedním z klenotů české přírody krascem třešňovým (*Anthaxia candens*, Panzer 1787) (www.praha-priroda.cz (online); www.drusop.nature.cz (online)), jehož larvy se vyvíjejí v kůře třešně (*Prunus avium*, Linnaeus 1755) a višně (*Prunus cerasus*, Linnaeus 1753), kterých je ve zdejším sadu dostatek. Ty samé stromy poté v dospělosti slouží jako živná rostlina dospělců, s kterými se lze nejčastěji setkat v období od května do června (www.naturabohemica.cz (online)).



Obrázek 9: Katastrální mapa zobrazující parcelu č. 447/1 v Lysolajích, na pozadí mapy České republiky, na které byl proveden odchyt vzorků, převzato a upraveno (www.geoportal.uhul.cz (online))

Právě výskyt těchto druhů a předpokládaná vyšší biodiverzita byly jedním z důvodů vybrání této lokality. Mezi další patřila dobrá dostupnost, jelikož sad se nachází nedaleko naučné stezky a zastávky autobusu MHD „Lysolaje“, což umožňovalo frekventované návštěvy za účelem sběru vzorků. V budoucnu dokončený faunistický průzkum, pro který tato práce pokládá základy, by také mohl posloužit k zhodnocení efektivnosti dosavadního hospodaření na tomto území a plnění plánu péče, co se týče ochrany bezobratlých.

Na zájmovém území bylo 16. 8. 2021 nainstalováno několik odchyťových pastí, jejichž kontrola probíhala po cca týdenním intervalu, za slunného počasí, až do 3. 9. 2021. Konkrétně tři zemní pasti, jedna nárazová a jedna Malaiseho past, dále byl při každé návštěvě lokality proveden 10minutový smyk, a sklep z okolních stromů po dobu 20 minut. Zemní pasti byly tvořeny po hrdlo zakopanými 720 ml zavařovacími sklenicemi naplněnými 70% ethanolem. Byly umístěny pod višňovým stromem s GPS souřadnicemi 50.124573, 14.365298, bez použití návnady. Malaiseho a nárazová past byly nataženy ve své blízkosti mezi dvěma stromy na souřadnicích 50.124430, 14.364979. Smyk byl prováděn dvěma smýkádky zároveň na celé ploše sadu v těsném kontaktu s bylinným

patrem. Naopak sklepvání bylo zaměřeno na okolní ovocné stromy, za využití tyče a tzv. sklepvadla, plátina nataženého na kovové konstrukci.

Tyto metody byly zvoleny pro co největší pokrytí odchycených druhů, protože každá metoda je vhodná pro odchyt jiných skupin. Jak Malaiseho tak nárazová past zneužívá unikových strategií létajícího hmyzu po setkání s překážkou, v případě pasti se sítkou nebo s průhlednou plastovou deskou. Hmyz buď vylétá prudce vzhůru, anebo předstírá mrtvého a padá k zemi, proto je Malaiseho past vhodná k odchytu jedinců z řádů much (Diptera) a vos (Hymenoptera) s tendencemi k první unikové strategii, nárazová pak k odchytu brouků (Coleoptera). Naopak zemní pasti jsou zaměřeny na terestriální druhy, za oběť jí padají převážně karnivorní zástupci z řad střevlíků, drabčků, mrchožroutovitých (Silphidae, Latreille 1806), či pavouků anebo chvostokoků (Collembola, Lubbock 1870) (Winkler 1974, Russo et al. 2011). Zbylé řády jako kobylky (Orthoptera), motýli (Lepidoptera) anebo například ploštice (Hemiptera) byly pokryty smykem a sklepem. Nachytání členovci (Arthropoda) byly roztrženy podle data sběru a odchytové metody a uloženy v 70% ethanolu a -80 °C, v těchto podmínkách byly skladovány do doby jejich analýzy.

4.1.1. Metodika tradiční determinace

Z jednotlivých nádob se vzorky byly před začátkem třídění odstraněny nečistoty, jako byly různé kusy listů, zeminy nebo trávy a další předměty, které vzorky při práci v terénu neúmyslně kontaminovaly. Dále byly odstraněny i necílové organismy, jako například plži (Gastropoda, Cuvier 1795), kteří se neřadí mezi členovce (Arthropoda) ale měkkýše (Mollusca, Cuvier 1795), čímž byla zjednodušena pozdější manipulace s obsahem nádob. Vzorky z každé pasti byly poté roztrženy na úroveň řádů. Bylo spočítáno a zaznamenáno kolik jedinců, kterého řádu členovců (Arthropoda) se danou metodou a v daný den podařilo odchytit. Také byl měřen čas tohoto kroku. Zjištěné údaje posloužily jako vstupní data pro diagram přelomu.

S identifikací vybraných vzorků do nižších taxonomických skupin bylo dotázáno několik odborníků na dané skupiny hmyzu. Za tímto účelem byly ze sběrů sestaveny čtyři vzorky, každý se skládal z 28 neznámých brouků (Coleoptera), much (Diptera), pavouků (Araneae) a kobylek (Orthoptera), jelikož se podařilo zajistit odborníci jen na tyto skupiny. Každý z dotázaných taxonomů také obdržel standardizovaný vzorek s 28 různými druhy členovců (Arthropoda) s převážně kosmopolitním rozšířením, jehož

obsah byl tazateli předem znám. Druhy na standardizovaný vzorek byly zakoupeny na burze nebo odebrány z univerzitních chovů. Při determinaci byla měřena časová dotace potřebná k určení každého druhu a finanční náročnost. Vzorky byly po jejich determinaci vráceny zpátky do ethanolu, uloženy v -80 °C a připraveny na budoucí analýzu v laboratoři v případě zajištění dostatečných financí.

| Číslo vzorku | Druh |
|--------------|---|
| 1 | <i>Tenebrio molitor</i> , Linnaeus 1758 |
| 2 | <i>Tenebrio molitor</i> , Linnaeus 1758 |
| 3 | <i>Tenebrio molitor</i> , Linnaeus 1758 |
| 4 | <i>Tenebrio molitor</i> (larva), Linnaeus 1758 |
| 5 | <i>Alphitobius diaperinus</i> , (Panzer, 1797) |
| 6 | <i>Alphitobius diaperinus</i> , (Panzer, 1797) |
| 7 | <i>Alphitobius diaperinus</i> , (Panzer, 1797) |
| 8 | <i>Alphitobius diaperinus</i> , (Panzer, 1797) |
| 9 | <i>Alphitobius diaperinus</i> , (Panzer, 1797) |
| 10 | <i>Blatta orientalis</i> , Linnaeus 1758 |
| 11 | <i>Blatta orientalis</i> , Linnaeus 1758 |
| 12 | <i>Meta menardi</i> , (Latreille, 1804) |
| 13 | <i>Dermestes sp.</i> , Linnaeus 1758 |
| 14 | <i>Acheta domesticus</i> (nymfa), (Linnaeus 1758) |
| 15 | <i>Acheta domesticus</i> (nymfa), (Linnaeus 1758) |
| 16 | <i>Ips typographus</i> (Linnaeus, 1758) |
| 17 | <i>Polygraphus poligraphus</i> (Linnaeus, 1758) |
| 18 | <i>Polygraphus poligraphus</i> (Linnaeus, 1758) |
| 19 | <i>Polygraphus poligraphus</i> (Linnaeus, 1758) |
| 20 | <i>Polygraphus poligraphus</i> (Linnaeus, 1758) |
| 21 | <i>Polygraphus poligraphus</i> (Linnaeus, 1758) |
| 22 | <i>Pholcus phalangioides</i> (Fuesslin, 1775) |
| 23 | <i>Porcellionides pruinosus</i> (Brandt, 1833) |
| 24 | <i>Clogmia albipunctata</i> (Williston, 1893) |
| 25 | <i>Clogmia albipunctata</i> (Williston, 1893) |
| 26 | <i>Cephalcia abietis</i> (larva) (Linnaeus, 1758) |
| 27 | <i>Cephalcia abietis</i> (larva) (Linnaeus, 1758) |
| 28 | <i>Cephalcia abietis</i> (larva) (Linnaeus, 1758) |

Tabulka 1: Seznam druhů ve standardizovaném vzorku

4.1.2. Metodika molekulární determinace

Pro tuto práci navržený postup zahrnuje kombinaci dvou unikátních přístupů, a to navíc v opačném pořadí, než je běžné je používat. Jedná se o TELL-Seq a Hybridization capture enrichment metody přípravy DNA knihovny pro sekvenování. Hybridization capture enrichment se aplikuje se na již připravenou DNA knihovnu. V principu jde o hybridizační reakci připravené DNA knihovny s panelem navržených prób, které ze směsi vychytají pouze zájmové sekvence pro výsledné sekvenování, v tomto případě COI. Razantně se tak snižují náklady na sekvenování a následnou analýzu.

TELL-Seq je moderní postup přípravy sekvenační knihovny pomocí magnetických kuliček, které hybridizují s DNA molekulou a pomocí enzymů molekulárním identifikátorem specificky označí řetězec DNA v krátkých intervalech. Umožňuje tak při *de novo* assembly efektivně spojit správné sekvence k sobě a rekonstruovat původní molekulu v celé její délce.

Navrhovaný postup počítá s nestandardním použitím obou technologií. Ze směsných vzorků členovců (Arthropoda) se po izolaci DNA pomocí hybridizační reakce vychytá pouze mitochondriální DNA. Poté se provede základní velikostní selekce, při které by došlo k odstranění fragmentů DNA příliš malé délky, protože TELL-Seq vyžaduje pro využití plného potenciálu DNA o co nejvyšší integritě.

Molekuly takto přečištěné DNA se posléze přemění v DNA knihovnu, po jejímž sekvenování bude díky TELL-Seq, teoreticky možné rekonstruovat takřka jednotlivé molekuly mitochondriální DNA. Kopii mtDNA bývá v jedné buňce mnoho, avšak v rámci jedince by měly být maximálně shodné, a proto analýza rozdílů v pořadí nukleotidů přítomných variant sekvencí mtDNA pomůže při přesném určení počtu jedinců přítomných ve sběru. Problém tomuto postupu by bohužel mohly činit nepohlavně se rozmnožující druhy a sociální hmyz.

Pomocí tohoto postupu by bylo tedy možné z jedné reakce získat veškeré informace o jednotlivých sběrech. Tedy počet druhů porovnáním izolovaných COI sekvencí s referenčními databázemi i počet jedinců porovnáním unikátních variant mtDNA. Přesnost této metody pak lze ověřit porovnáním s výsledky klasické determinace a citlivost například přidáním necílového organismu, na který nebyly nadesignované próby. Bohužel kvůli vysoké počáteční investici nebylo možné tento experiment v rámci

diplomové práce zrealizovat, a tak došlo pouze k nadesignování prób a zhodnocení referenčních databází.

4.1.3. Designování prób

Jako podklad pro design NGS prób posloužila databáze skládající se ze sekvencí mitochondriálních genomů a COI sekvencí. COI sekvence byla použita, pokud se v databázi nenacházela sekvence celého mitochondriálního genomu. Cílem při vytváření této databáze bylo obsáhnout alespoň jednu sekvenci náležící druhu z čeledě, která se vyskytuje v Evropě, především v České republice. Kompletní mitochondriální genomy byly staženy z NCBI databáze (www.ncbi.nlm.nih.gov (online)), a COI sekvence byly získány z BOLD databáze (<http://www.boldsystems.org> (online)). Všechny soubory byly staženy ve FASTA formátu, byly opatřeny názvem a druhem sekvence, zda se jedná o full-mtDNA, nebo COI gen. Zároveň byla každá sekvence opatřena accession number, pod kterým je v databázi zaregistrována. Přehled čeledí byl převzat z webových stránek biolib.cz (Zicha 1997) a jejich světové rozšíření bylo zkontrolováno na stránkách inaturalist.org (www.inaturalist.org (online)) a gbif.org (www.gbif.org (online)). Tyto stažené sekvence byly poté sloučeny v jeden Excel soubor, který byl odeslán firmě Twist Bioscience k dalšímu zpracování.

4.1.4. Metodika statistického vyhodnocení dat

Přesnost určení standardizovaného vzorku byla kvantifikována jako počet druhů (T) spadající pod nejnižší taxon, který sdružoval určený taxon a druh uvedený v Tabulce 1. V případě hodnocení neznámých vzorků se taxon určený determinátorem, jakožto odborníkem na danou skupinu, považoval za správný, tudíž se T rovnalo počtu druhů v zapsaném taxonu. Zjištěná přesnost byla poté vydělena průměrným časem (t) v hodinách, potřebným k určení vzorku. Hodnoty byly sečteny a vyděleny počtem určovaných vzorků (n). Tímto byl vypočten výkon (P_T) ve formě přesnosti určení za čas. Větší hodnota P_T značí vyšší přesnost za čas.

$$P_T = \frac{1}{T} / t$$

Přesnost molekulárních metod (P_{TM}) byla kvantifikována jako teoretické nejpřesnější možné určení, kterého by bylo možné dosáhnout, pokud by byla úspěšně provedena

izolace a sekvenování. Byly převzaty determinátory určené taxony a porovnány s obsahem BOLD databáze (<https://boldsystems.org>). Když se určený druh nacházel v databázi, bylo považováno za možné ho přesně určit s pomocí molekulární biologie. Pokud se určený taxon v databázi nenacházel postupovalo se stejně jako u hodnocení determinátorů a hodnota T se rovnala počtu druhů v nejnižším určeném taxonu. T poté bylo sníženo o procentuální zastoupení druhů v databázi (T_d) oproti jejich skutečnému reálnému počtu (T).

$$P_{TM} = \left(\frac{1}{T} * \frac{Td}{T} \right) / t$$

Časová náročnost jednotlivých metod byla zjištěna následovně. Celkový čas trvání třídění vzorků do řádů byl vydělen počtem druhů a k tomu byl poté přičten čas potřebný k zařazení druhu do nižšího taxonu odborníkem. Časová náročnost prezentované molekulární metody se počítala jako hypotetický čas DNA izolace, TELL-Seq a Hyb-cap přípravy knihovny a následné analýzy dat. Čas jednotlivých molekulárních metod byl sečten a rozpočítán mezi vzorky určené k determinaci.

Také byla hodnocena obsáhlost databází na úrovni čeledí, s kterými se taxonomové setkali při determinování vzorků. Vypočet byl proveden jako podíl skutečného množství druhů v čeledi a počet osekvenovaných druhů v BOLD databázi (<httpwww.boldsystems.org> (online)).

K posouzení finanční viabilita jednotlivých metod byl použit diagramem syntézy. S jeho pomocí byl graficky i číselně vyjádřen průběh nákladovosti jednotlivých variant determinace v závislosti na počtu vzorků. Mezi variabilní náklady tradiční determinace patřily náklady na roztrídění vzorků do řádů a za určení do druhů. Náklady na zatřídění druhu do řádu byly vypočteny na základě časové dotace potřebné k zatřídění jednoho jedince do řádu a vynásobeno hodinovou mzdou 220 Kč. Cena za určení druhu byla po konzultaci s odborníky stanovena na 10,-. U molekulární metody byly za variabilní náklady považovány náklady na izolaci s využitím DNeasy Blood & Tissue Kit (50). Do fixních nákladu poté patřily náklady na přípravu panelu a DNA knihovny. Náklady a

časovou náročnost jednotlivých kroků, včetně cen izolace, poskytnul Institute of Applied Biotechnologies a. s. (www.iabio.eu (online)) a Twist Bioscience (www.twistbioscience.com (online)). Cena spotřebního materiálu, jako pipetovacích špiček a zkumavek, při izolaci a dalších procedurách nebyla brána v úvahu, jelikož se jedná o korunové položky a jejich spotřeba je individuální. Stejně tak nebyla do finančních analýz zahrnuta cena sekvenace, ta by se odvíjela od finálního množství DNA, které nelze korelovat s množstvím vzorků ve sběrech. Její cena by se pohybovala okolo 100 Kč za Gb dat. Jelikož by se při veškerých fázích molekulární determinace pracovalo se směsnými vzorky, byl počet členovců (Arthropoda) v nich obsažený stanoven jako průměrná hodnota chycených kusů všemi odchytovými metodami.

5. Výsledky

Pomocí 20 odchytočných pastí se podařilo celkem chytit 11 919 členovců (Arthropoda). Třemi skupinami s největším počtem chycených jedinců byli blanokřídílí (Hymenoptera), dvoukřídílí (Diptera) a chvostoskoci (Collembola), přičemž dvoukřídílí (Diptera) svým celkovým počtem 4845 více než dvojnásobně převyšovali duhou nejpočetnější skupinu blanokřídílí (Hymenoptera) s počtem 1908 kusů. Mezi nejméně zastoupené řády v odchytech patřily síťokřídílí (Neuroptera), chrostíci (Trichoptera), vidličnatky (Diplura) a srpice (Mecoptera). Všechny tyto taxony byly v odchytech reprezentovány méně než deseti kusy. Nejvíce kusů členovců bylo chyceno smýkáním, a naopak nejméně pomocí nárazových pastí. Metodou smyku bylo nachytáno 62 % všech exemplářů.

| 1. půlka tabulky | Zemní past | | | | | | | | | | | |
|------------------------|------------|-----|----|--------|-----------|-----|-----|--------|----------|-----|-----|--------|
| | 16.8.2021 | | | | 26.8.2021 | | | | 3.9.2021 | | | |
| | 1 | 2 | 3 | celkem | 1 | 2 | 3 | celkem | 1 | 2 | 3 | celkem |
| <i>Araneae</i> | 10 | 8 | 7 | 25 | 9 | 4 | 4 | 17 | 2 | 2 | 2 | 6 |
| <i>Acarine</i> | 2 | 0 | 0 | 2 | 3 | 1 | 5 | 9 | 2 | 4 | 1 | 7 |
| <i>Opiliones</i> | 0 | 0 | 2 | 2 | 5 | 1 | 0 | 6 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| <i>Coleoptera</i> | 16 | 11 | 33 | 60 | 14 | 9 | 13 | 36 | 5 | 14 | 9 | 28 |
| <i>Dermaptera</i> | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Diplopoda</i> | 4 | 1 | 0 | 5 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Hymenoptera</i> | 23 | 15 | 24 | 62 | 10 | 10 | 6 | 26 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| <i>Diptera</i> | 22 | 29 | 20 | 71 | 17 | 33 | 51 | 101 | 6 | 17 | 18 | 41 |
| <i>Auchenorrhyncha</i> | 2 | 2 | 3 | 7 | 3 | 2 | 0 | 5 | 0 | 6 | 1 | 7 |
| <i>Sternorrhyncha</i> | 3 | 4 | 2 | 9 | 1 | 2 | 9 | 12 | 5 | 9 | 7 | 21 |
| <i>Collembola</i> | 159 | 109 | 69 | 337 | 86 | 188 | 197 | 471 | 52 | 160 | 196 | 408 |
| <i>Diplura</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Orthoptera</i> | 0 | 0 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Psocoptera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Thysanoptera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Lepidoptera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Isopoda</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Hemiptera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Trichoptera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Mecoptera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neuroptera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| 2. půlka tabulky | Malaisiho past | | | Nárazová past | | | Sídek | | | Smyk | | Celkem |
|------------------------|----------------|-----------|----------|---------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|--------|
| | 16.8.2021 | 26.8.2021 | 3.9.2021 | 16.8.2021 | 26.8.2021 | 3.9.2021 | 16.8.2021 | 26.8.2021 | 3.9.2021 | 16.8.2021 | 26.8.2021 | |
| | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| <i>Araneae</i> | 5 | 8 | 5 | 1 | 0 | 1 | 38 | 25 | 27 | 260 | 236 | 654 |
| <i>Acarine</i> | 2 | 0 | 2 | 7 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 2 | 39 |
| <i>Opiliones</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 19 |
| <i>Coleoptera</i> | 23 | 7 | 12 | 33 | 12 | 5 | 39 | 29 | 33 | 65 | 162 | 544 |
| <i>Dermaptera</i> | 2 | 5 | 1 | 3 | 0 | 7 | 3 | 2 | 5 | 0 | 0 | 31 |
| <i>Diplopoda</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| <i>Hymenoptera</i> | 130 | 510 | 150 | 53 | 37 | 13 | 2 | 1 | 0 | 432 | 488 | 1908 |
| <i>Diptera</i> | 499 | 283 | 129 | 26 | 21 | 7 | 6 | 3 | 5 | 2236 | 1417 | 4845 |
| <i>Auchenorrhyncha</i> | 7 | 13 | 8 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 593 | 677 | 1323 |
| <i>Sternorrhyncha</i> | 8 | 18 | 15 | 0 | 4 | 1 | 0 | 1 | 0 | 40 | 25 | 154 |
| <i>Collembola</i> | 106 | 88 | 73 | 8 | 5 | 3 | 1 | 1 | 0 | 23 | 33 | 1557 |
| <i>Diplura</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Orthoptera</i> | 4 | 1 | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | 74 | 119 |
| <i>Psocoptera</i> | 0 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | 5 | 8 | 4 | 1 | 4 | 31 |
| <i>Thysanoptera</i> | 0 | 1 | 1 | 5 | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 | 207 | 186 | 406 |
| <i>Lepidoptera</i> | 9 | 6 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | 20 | 27 | 74 |
| <i>Isopoda</i> | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| <i>Hemiptera</i> | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 9 | 13 | 74 | 94 | 197 |
| <i>Trichoptera</i> | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Mecoptera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Neuroptera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 4 |
| | | | | | | | | | | | Celkem | 11919 |

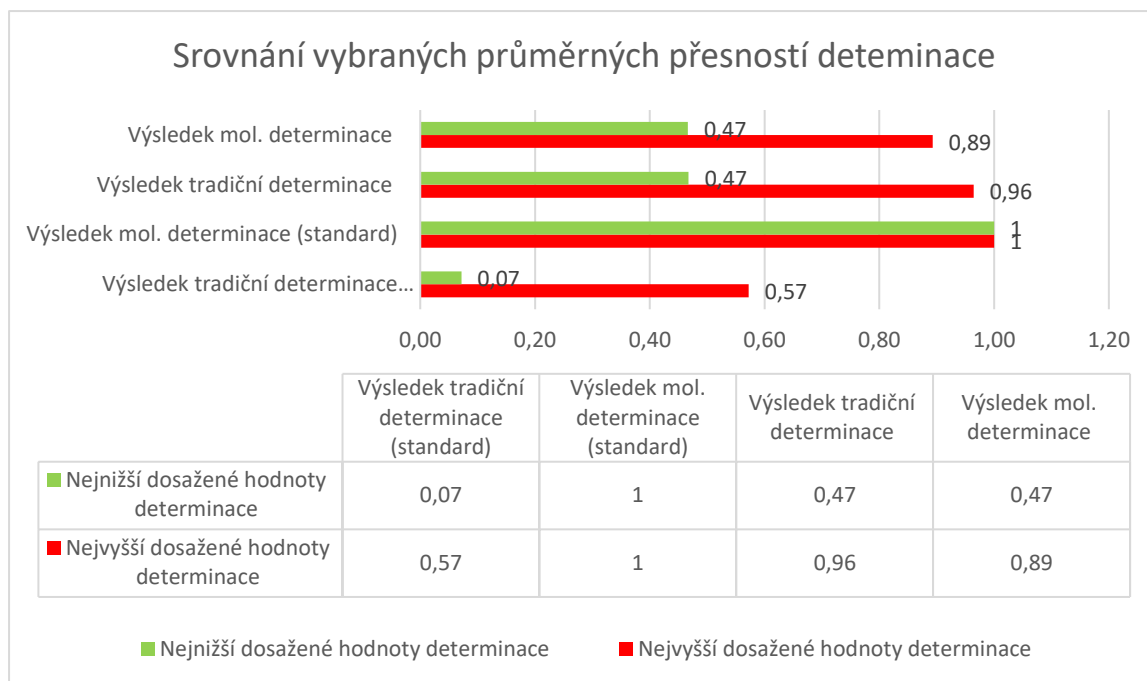
Tabulka 2: Tabulka zobrazující počty chycených členovců (*Arthropoda*) a použité odchytné metody.

5.1.1. Výsledky designu prób

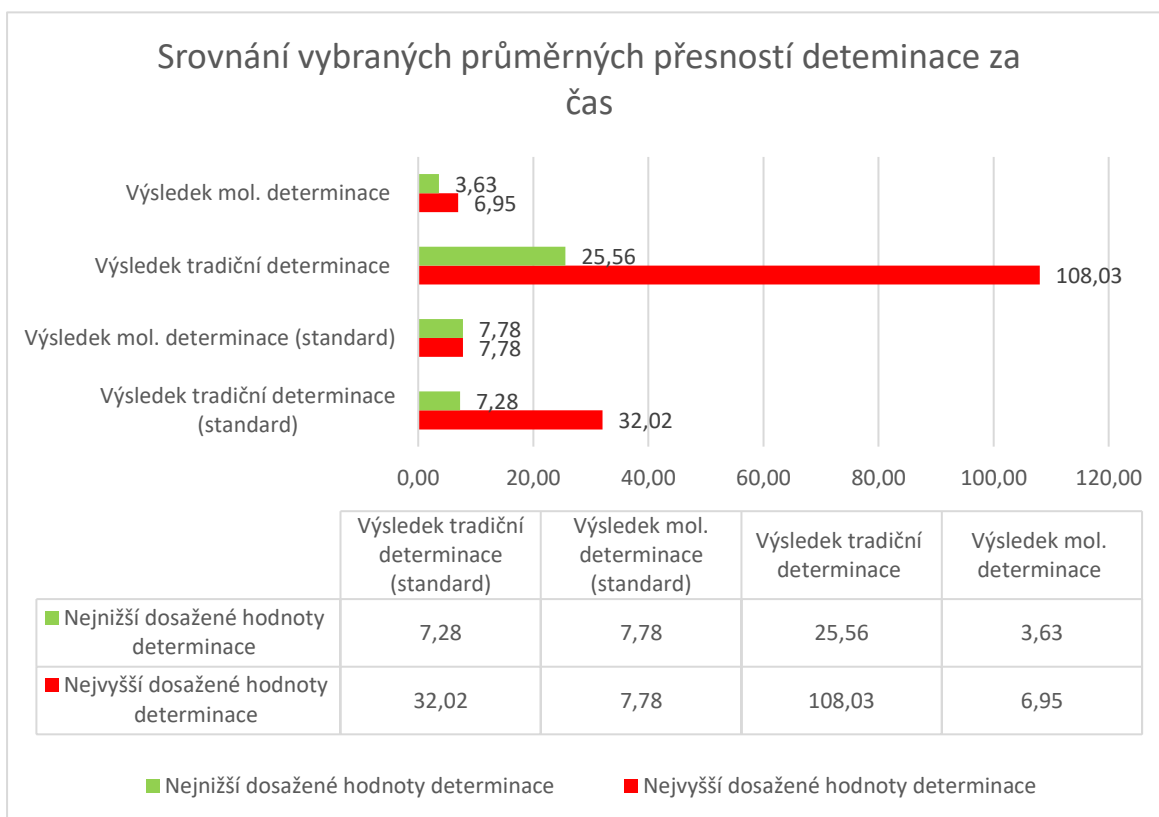
Vytvořený Excelový soubor s DNA sekvencemi, které posloužili jako podklad designu prób a NGS panelu, obsahoval celkem 5348 záznamů z toho jich 2574 patřilo sekvencím. Z těchto sekvencí jich bylo 355 vyřazeno kvůli velkému obsahu neurčených bází N. Excelové databáze obsahovala mtchDNA sekvence pro 266 čeledí hmyzu a 30 ostatních členovců. Zbýlých 256 čeledí hmyzu a 34 čeledí členovců bylo reprezentováno COI sekvencemi. Podle Excelové databáze byl připraven design 11 697 prób dlouhých 120 bp schopných pokrýt celé cílové sekvence a umožňuje tak jejich sekvenování v celé délce a následné *de novo* assembly.

5.1.2. Výsledky určování druhů

Čas potřebný k učení jednoho vzorku pomocí molekulární biologie po rozpočítání mezi jejich počet byl 3 hodiny a 36 min, což odpovídá ~8 minutám na druh, naopak čas tradiční determinace pomocí odborníků potřebný k určení vzorků se pohyboval v rozmezí 14 min až 1 hodiny. V některých případech určení exempláře zabralo 5 sec. Taxonomy bylo určeno 71 % všech druhů ve vzorcích se skupinami členovců, na které se specializují. Naopak ve standardizovaném vzorku bylo určeno 26 % druhů. Molekulární biologii by bylo možné určit veškeré druhy ve standardizovaném vzorku. Jednotlivá měření jsou dostupná v přílohách.



Obrázek 11: Graf zobrazující srovnání průměrných nejvyšších a nejnižších výsledků determinace. Hodnota 1 značí přesně určený druh.



Obrázek 10: Graf zobrazující srovnání průměrných nejvyšších a nejnižších výsledků determinace za čas. Vyšší hodnota řádku symbolizuje vyšší výkon.

5.1.3. Výsledky hodnocení databáze BOLD

Bylo celkem zhodnoceno pokrytí pro 37 čeledí, s kterými se taxonomové při determinaci setkali. Průměrné zastoupení druhů v čeledích se pohybovalo okolo 21 %, přičemž směrodatná odchylka byla 18 %. Zastoupení 21 % by znamenalo, že se v databázi nachází sekvence reprezentující ~250 000 druhů členovců. Nejvíce druhů v databázi vzhledem k celkovému počtu druhů v čeledi se nacházelo u čeledí ploskohřbetkovití (Pamphiliidae, Cameron 1890) a kůrovci (Scolytinae, Latreille 1804). Tyto čeledi byly pokryty z 85 % respektive z 82 % v případě kůrovců. Nejmenší zastoupení v databázi měla druhově bohatá čeleď bahnomilkovití (Limoniidae, Rondani 1856) z řádu dvoukřídlí (Diptera) s 0,3 %.

| Blattodea | Isopoda | Hymenoptera | Orthoptera | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|--|
| švábovití (Blattidae, Latreille 1810) | Stínky (Porcellionidae, Brandt a Ratzeburg 1831) | ploskohřbetkovi tí (Pamphiliidae, Cameron 1890) | cvrčkovití Gryllidae Laicharding, 1781 | sarančovití (Acrididae, MacLeay 1821) | kobylkovití (Tettigoniidae , Stoll 1787) | | |
| 18% | 15% | 85% | 6% | 15% | 13% | | |
| Coleoptera | | | | | | | |
| střevlíkovití (Carabidae, Latreille 1802) | kovaříkovití (Elateridae, Leach 1815) | lesknáčkovití (Nitidulidae, Latreille 1802) | mrchožroutovití (Silphidae, Latreille 1806) | nosatcovití (Curculionida e, Latreille 1802) | stehenáčkovití (Oedemeridae , Latreille 1810) | hlodníkovití (Latridiidae, Erichson 1842) | kůrovci (Scolytinae, Latreille 1804) |
| 10% | 14% | 7% | 50% | 10% | 13% | 10% | 82% |
| mandelinkovití (Chrysomelidae , Latreille 1802) | potemníkovití (Tenebrionidae, Latreille 1802) | kožojedovití (Dermestidae, Latreille 1804) | | | | | |
| 6% | 5% | 22% | | | | | |
| Araneae | | | | | | | |
| lovčíkovití (Pisauridae, Simon 1890) | běžníkovití (Thomisidae, Sundevall 1833) | šplhalkovití (Anyphaenidae, Bertkau 1878) | listovníkovití (Philodromida e, Thorell 1870) | křížákovití (Araneidae, Clerck 1757) | čelistnatkovití (Tetragnathida e, Menge 1866) | snovačkovití (Theridiidae, Sundevall 1833) | třesavkovití (Pholcidae, C. L. Koch 1850) |
| 13% | 16% | 18% | 16% | 18% | 22% | 21% | 29% |
| Diptera | | | | | | | |
| zelenuškovití (Chloropidae) | mouchovití (Muscidae) | bahnomilkovití (Limoniidae, Rondani 1856) | pestřicovití (Opomyzidae) | octomilkovití (Drosophilida e, Rondani 1856) | bzučivkovití (Calliphoridae , Brauer a Bergensstamm 1889) | pestřenkovití (Syrphidae, Samouelle 1819) | pakomárovití (Chironomida e, Erichson 1841) |
| 10% | 15% | 0,3% | 25% | 33% | 22% | 36% | 46% |
| vrťalkovití (Agromyzidae, Fallén 1823) | bejломorkovití (Cecidomyiidae, Rye 1874) | břežnicovití (Ephydriidae) | koutulovití (Psychodidae, Bigot 1854) | | | | |
| 16% | 11% | 11% | 17% | | | | |
| | | | | Průměrné zastoupení | Směrodatná odchylka: | | |
| | | | | 21% | 18% | | |

Tabulka 3: Seznam čeledí a procentální zastoupení druhů v databázi BOLD.

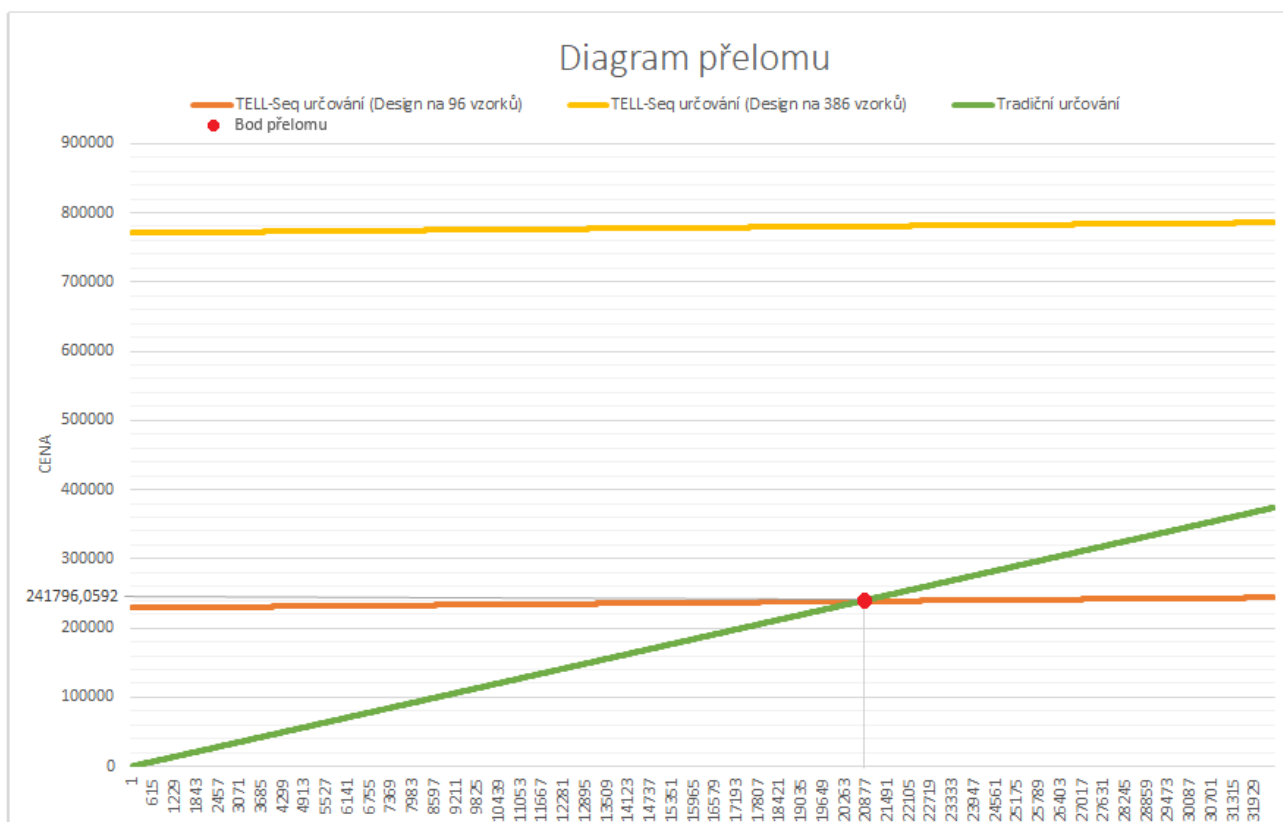
5.1.4. Výsledky ekonomické analýzy

Podle designu prób byla stanovena cena na jejich reálnou výrobu a přípravu TELL-Seq DNA knihovny, která by se pohybovala okolo ~2000 na směsný vzorek. Průměrný počet jedinců ve směsném vzorku byl 596, což dělá 4 Kč za kus. Cena izolace, včetně hodinové mzdy laboratorního technika, byla 2 Kč na kus při naplnění maximální kapacity 96 vzorků. Na základě diagramu přelomu se TELL-Seq vyplatí již při 35 směsných vzorcích, ale počáteční investice na určení těchto vzorků je 241 796 Kč.

| | 96 vzorků | 384 vzorků | 1536 vzorků | |
|---------------------------|-----------|------------|-------------|----|
| Design prób: | 128460 | 428200 | 834990 | Kč |
| Příprava knihovny: | 100627 | 342560 | 1306010 | Kč |
| Cena za vzorek: | 2376,51 | 2007,1875 | 1393,791 | Kč |

Tabulka 4: Tabulka zobrazující rozpočet nákladů metody TELL-Seq

Manuální třídění sběrů, a zařazení každého jednice do řádu, zabralo celkem 82 hodin. Což činilo 0,6 min na vzorek. Při hodinové sazbě 220,- na hodinu náklady na určení řádu jednoho kusu dělají 1,51 Kč. Cena účtovaná taxonomy byla 10 Kč za určení druhu. Celkové náklady na určení druhu tradičními metodami byly 11,51 Kč.



Obrázek 12: Diagram přelomu zobrazující nákladovost determinačních metod vzhledem k počtu vzorku.

Na základě podkladů poskytnutých Institute of Applied Biotechnologies a. s. (www.iabio.eu (online)) a Twist Bioscience (www.twistbioscience.com (online)) byl odhadnut i celkový čas strávený v laboratoři potřebný k provedení molekulárních analýz vzorků vedoucích k určení druhu. Časově nejnáročnějším procesem byla DNA izolace a provedení Hyb-Cap, čas těchto metod se může mírně lišit vzhledem k použitému kitu, ale pohyboval by se okolo 5 hodin na izolaci a 8 hodin na Hyb-Cap (Zimmerman Zuckerman et al. 2022). TELL-Seq příprava knihovny zabere 3 hodiny (Chen et al. 2020) a analýza osekvenovaných dat 2 hodiny. Celkový čas strávený v laboratoři potřebný k provedení těchto úkonů je 18 hodin.

6. Diskuze

Druhová rozmanitost je jednou z hlavních otázek faunistického průzkumu. Data získaná roztríděním nachytaných sběrů poskytují zajímavý pohled na účinnost jednotlivých odchyťových metod. Například odchyťovou metodou smyku bylo nachytáno 62 % všech exemplářů a po dvou opakováních bylo této metody zanecháno, jelikož množství chyceného hmyzu začínalo být obtížné na zpracování. Jednalo se o nejvíce účinnou metodu, ale zároveň nejméně selektivní. Počty jedinců v řádech nastiňují druhovou rozmanitost členovců v dané oblasti a jejich zastoupení v různých typech pastí. Celkový počet chycených jedinců, 11 919, je relativně velké číslo a zařazení všech exemplářů do druhů, nebo alespoň nižších taxonů, by bylo značně náročné.

Nejméně zastoupenými skupinami byli síťokřídli (Neuroptera), chrostíci (Trichoptera), vidličnatky (Diplura) a srpice (Mecoptera). Z každého tohoto řádu se podařilo chytit méně než deset exemplářů. Tento výsledek by mohl naznačovat, že tyto skupiny jsou v dané oblasti poměrně vzácné, anebo jsou zvolené metody nevhodné k jejich odchyťu. Především velice nízký odchyť síťokřídlych (Neuroptera) je překvapivý, jelikož se jedná o dravý teplomilný hmyz preferující xerothermní stanoviště, kterých by erozní rokle v PP Housle měla nabízet dostatek.

Jednou z nejzastoupenější skupinou v odchytech byli chvostoskoci (Collembola). Což je skupina drobných a pro mnoho entomologů nezajímavých živočichů, a proto se na ně ani nikdo nespécializuje. I prosto, že jsou jednou z nejpočetnější skupinu v ekosystémech, bylo popsáno jen okolo ~ 7000 druhů (Deharveng 2004). Dalo by se předpokládat, že 1557 chvostoskoků z celkového počtu 11 919 chycených členovců, by bylo v současnosti nemožné, anebo příliš finančně náročné zatřídit do nižších taxonů. Tato skupina zaujímala 13 % z celkové sběru. Dalšími nejpočetnějšími skupinami byly blanokřídli (Hymenoptera) a dvoukřídli (Diptera). Oba tyto taxony jsou známý svojí velkou druhovou bohatostí a většina taxonomů se specializuje pouze na jednu nebo dvě čeledi.

Toto podtrhuje i fakt, že 28 náhodně vybraných dvoukřídlych (Diptera), z kterých byl připraven vzorek pro odborníky k určení obsahoval druhy patřící do 16 čeledí, oproti tomu například vzorek rovnokřídlych (Orthoptera) obsahoval pouze druhy ze 3 čeledí. Přesnost určení dvoukřídlych (Diptera) byla téměř poloviční oproti rovnokřídlym (Orthoptera), a to i přes výskyt juvenilních jedinců. Naopak kde určování juvenilních

stadií dělalo problémy byl řád pavouci (Araneae). U tohoto řádu byla průměrná přesnost nejnižší a to 0,47.

To, že jsou taxonomové vysoce specializovaní na svoje taxonomické skupiny bylo zřejmé z poklesu přesnosti určení u standardizovaného vzorku, u kterého si všichni vedli podstatně hůře, a to i přes to, že se vzorek skládal převážně z běžných kosmopolitních druhů. Průměrná přesnost určení klesla ze 71 % na 26 %. Metagenomika měla potenciál určit veškerý materiál ve standardizovaném vzorku, dokonce se sekvence všech druhů vyskytovali v referenční databázi, a ve většině ostatních případech byla srovnatelná s tradičními metodami. Při započítání času byl výkon horší.

Výsledky tradiční taxonomie byly značně zvýhodněny krátkým časem vzhledem ke způsobu výpočtu výkonu. Například u rovnokřídlých (Orthoptera) určení jedné kobylky do druhu trvalo v průměru 5 sec. Pro zvýšení objektivnosti by se do výpočtu mohl například započítat čas, který taxonom potřeboval k získání svých vědomostí, ale to je jen těžko měřitelná veličina.

Oproti tomu celkový čas strávený v laboratoři by se pohyboval okolo ~ 18 hodin, ale v praxi by bylo možné během tohoto času zpracovat mnohem větší množství vzorků, než bylo 5 směsných vzorků po 28 v případě tohoto pokusu, a celý proces určování je možné značně zautomatizovat. Ovšem jaké by se reálně podařilo dosáhnout přesnosti je otázkou do budoucna.

Hlavní překážkou otestování proponovaného postupu s využitím DNA knihovny připravené TELL-Seq metodou pomocí prób, byla vysoká prvotní investice. Ta byla 229087 Kč za design panelu na přípravu knihovny pro 96 vzorků. Vzhledem k vysokým prvotním nákladům by se použití této metody vyplatilo hlavně při masivních sběrech bezobratlých, přičemž by neměl být problém tímto způsobem připravovat vzorky získané z více lokalit v rámci různých projektů. Efektivita práce razantně stoupá se zvyšujícím se počtem vzorků, hovoří se zde o desítkách tisících kusech, které by bylo nemožné a nereálně určovat běžnými metodami, takže má tato metoda určitě budoucnost.

Postupy molekulární biologie je výhodné použít v případech, kdy je potřeba určit velké množství vzorků, anebo když vzorky obsahují obtížně určitelné druhy. Dá se říct, že molekulární biologie má potenciál stávat se stále relevantnější při určování druhů členovců. Napomáhá tomu i trend neustále klesající ceny sekvenování a vyvíjení nových sekvenačních metod. Na druhou stranu, tradiční metody jsou užitečné zejména pokud se

jedná o determinaci snadno určitelných druhů, a když se podaří nalézt taxonoma specializujícího se na požadovanou čeleď. Tradiční metody stále zůstávají důležité a v některých situacích nezbytné, hlavně při určování nových druhů. Molekulární metody často dokážou upozornit na výskyt nového druhu, nebo na existenci kryptického druhu (Song et al. 2008), ale ten pak musí být potvrzen tradičními metodami po popsání morfologických znaků. Proto je důležité používat oba typy metod pro dosažení co největší přesnosti a spolehlivosti při určování nových druhů. Největší přesnosti při určování druhů molekulárními metodami podle dosud publikovaných studií se stále dosahuje DNA barcodingem (Porazinska et al. 2009; Wilson et al. 2019), při kterém se druhy určují po jednom, nikoliv ve směsných vzorcích. Ale tato přesnost se odvíjí od úplnosti databází.

Průměrné zastoupení druhů posuzovaných čeledích bylo kolem 21 %, což by znamenalo, že databáze obsahuje sekvence patřící přibližně 250 000 druhům členovců. Největší počet druhů v databázi byl zaznamenán u čeledí ploskohřbetkovití (Pamphiliidae) a kůrovci (Scolytinae), které byly pokryty z 85 % a 82 %. Dá se předpokládat, že toto velké pokrytí je způsobeno významností těchto druhů jako škůdců, a proto je věnována větší snaha na osekvenování zástupců těchto čeledí. Na druhé straně, čeleď bahnomilkovití (Limoniidae) z řádu dvoukřídlí (Diptera) byla nejméně zastoupena v databázi, pouze 0,3 %, což ukazuje, že pro některé čeledi by v budoucnu bylo vhodné vyvíjet větší snahy o osekvenování a doplnit databázi. Překvapivé také bylo, že databáze obsahuje údaje o původu vzorku, ale neumožňuje jejich filtraci podle výskytu nebo alespoň místa sběru, což značně prodlužuje práci, pokud má někdo zájem jen o sekvence z určitého území nebo o sekvence druhů z daného kontinentu či země.

7. Závěr

Moderní molekulární metody mají obrovský potenciál pro využití při faunistických průzkumech, bohužel jsou často drženy zpátky vyšší počáteční investicí. DNA barcoding je dnes již dobře etablovanou metodou, která umožňuje rychle a spolehlivě identifikovat druhy na základě jejich COI sekvence. Další molekulární metody, jako je metabarcoding a metagenomika umožňují získat podrobnější informace o taxonomickém složení a funkční diverzitě celých společenstev, jelikož je možné pomocí těchto metod pracovat se směsnými vzorky. Tyto metody by mohli v budoucnu nahradit, respektive doplnit tradiční metody identifikace sběrů velkých objemů a zároveň poskytovat nové informace o fungování ekosystémů a jejich změnách v čase a usnadnit ochranu těchto důležitých organismů.

Při zpracovávání této práce byly udělány časově nejnáročnější krok předcházející praktickému otestování v práci popsané metody. Jednalo se o komplementaci vzorových DNA sekvencí a následný design DNA panelu. Tento panel obsahoval alespoň jednu sekvenci reprezentující téměř každou z čeledí vyskytujících se v České republice, stejně tak byly i připraveny vzorky, na kterých by bylo možné tento postup v budoucnu vyzkoušet a otestovat tak jeho perspektivistu. Touto prací tak byla úspěšně připravena živná půda pro budoucí experiment, který se bohužel jejím rámci nepodařilo realizovat.

8. Seznam citované literatury:

ADLUNG, Karl G., 1966. A Critical Evaluation of the European Research on Use of Red Wood Ants (*Formica rufa* Group) for the Protection of Forests against Harmful Insects. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* [online]. **57**(1–4), 167–189. ISSN 1439-0418. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0418.1966.tb03822.x

AHMADIAN, Afshin, Maria EHN a Sophia HOBBER, 2006. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* [online]. **363**(1–2), 83–94. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cccn.2005.04.038

ALBERTS, Bruce, 2002. *Molecular biology of the cell* [online]. B.m.: New York : Garland Science [vid. 2021-04-03]. ISBN 978-0-8153-3218-3. Dostupné z: <http://archive.org/details/molecularbiology0004albe>

ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 2002. The Initiation and Completion of DNA Replication in Chromosomes. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* [online]. [vid. 2023-03-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26826/>

ANDERSON, S, 1981. Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. *Nucleic Acids Research*. **9**(13), 3015–3027. ISSN 0305-1048.

ANSORGE, Wilhelm J., 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology* [online]. **25**(4), 195–203. ISSN 1871-6784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2008.12.009

ANTIT, M, N AMOR, J URRA, An ALAGAILI a S FARJALLAH, 2018. Genetic variability of the Lessepsian migrant mussel *Brachidontes pharaonis* (Bivalvia: Mytilidae) in Tunisia. *African Journal of Marine Science* [online]. **40**(2), 211–217. ISSN 1814-232X, 1814-2338. Dostupné z: doi:10.2989/1814232X.2018.1476265

ARSLAN, Sinan, Francisco J. GARCIA, Minghao GUO, Matthew W. KELLINGER, Semyon KRUGLYAK, Jake A. LEVIEUX, Adeline H. MAH, Haosen WANG, Junhua ZHAO, Chunhong ZHOU, Andrew ALTOMARE, John BAILEY, Matthew B. BYRNE, Chiting CHANG, Steve X. CHEN, Claudia N. DENNLER, Vivian T. DIEN, Derek FULLER, Ryan KELLEY, Omid KHANDAN, Michael G. KLEIN, Michael KIM, Bryan R. LAJOIE, Bill LIN, Yu LIU, Tyler LOPEZ, Peter T. MAINS, Andrew D. PRICE,

Samantha R. ROBERTSON, Hermes TAYLOR-WEINER, Ramreddy TIPPANA, Austin B. TOMANEY, Su ZHANG, Mark R. AMBROSO, Rosita BAJARI, Ava M. BELLIZZI, Chris B. BENITEZ, Daniel R. BERARD, Lorenzo BERTI, Kelly N. BLEASE, Angela P. BLUM, Andrew M. BODDICKER, Leo BONDAR, Chris BROWN, Chris A. BUI, Juan CALLEJA-AGUIRRE, Kevin CAPPA, Joshua CHAN, Victor W. CHANG, Katherine CHAROV, Xiyi CHEN, Rodger M. CONSTANDSE, Ryan COSTELLO, Weston DAMRON, Mariam DAWOOD, Nicole DEBUONO, John D. DIMALANTA, Laure EDOLI, Keerthana ELANGO, Nikka FAUSTINO, Chao FENG, Mathhew FERRARI, Keith FRANKIE, Adam FRIES, Anne GALLOWAY, Vlad GAVRILA, Gregory J. GEMMEN, James GHADIALI, Arash GHORBANI, Logan A. GODDARD, Adriana R. GUETTER, Garren L. HENDRICKS, Jendrik HENTSCHEL, Daniel J. HONIGFORT, Yun-Ting HSIEH, Yu-Hsien Hwang FU, Scott K. IM, Chaoyi JIN, Shradha KABU, Daniel E. KINCADE, Shawn LEVY, Yu LI, Vincent K. LIANG, William H. LIGHT, Jonathan B. LIPSHER, Tsung-li LIU, Grace LONG, Rui MA, John M. MAILLOUX, Kyle A. MANDLA, Anyssa R. MARTINEZ, Max MASS, Daniel T. MCKEAN, Michael MERON, Celyne S. MOH, Rachel K. MOORE, Juan MORENO, Jordan M. NEYSMITH, Cassandra S. NIMAN, Jesus M. NUNEZ, Micah T. OJEDA, Sara Espinosa ORTIZ, Jenna OWENS, Geoffrey PILAND, Daniel J. PROCTOR, Josua B. PURBA, Michael RAY, Daisong RONG, Virginia M. SAADE, Sanchari SAHA, Gustav Santo TOMAS, Nicholas SCHEIDLER, Luqmanal H. SIRAJUDEEN, Samantha SNOW, Gudrun STENGEL, Ryan STINSON, Michael J. STONE, Keoni J. SUNDSETH, Eileen THAI, Connor J. THOMPSON, Marco TJIOE, Christy L. TREJO, Greg TRIEGER, Diane Ni TRUONG, Ben TSE, Benjamin VOILES, Henry VUONG, Jennifer C. WONG, Chiung-Ting WU, Hua YU, Yingxian YU, Ming YU, Xi ZHANG, Da ZHAO, Genhua ZHENG, Molly HE a Michael PREVITE, 2022. *Sequencing by avidity enables high accuracy with low reagent consumption* [online]. 4. listopad 2022. B.m.: bioRxiv. [vid. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1101/2022.11.03.514117

BAKER, Robert J. a Robert D. BRADLEY, 2006. SPECIATION IN MAMMALS AND THE GENETIC SPECIES CONCEPT. *Journal of Mammalogy* [online]. **87**(4), 643–662. ISSN 0022-2372, 1545-1542. Dostupné z: doi:10.1644/06-MAMM-F-038R2.1

BAR-ON, Yinon M., Rob PHILLIPS a Ron MILO, 2018. The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **115**(25), 6506–6511. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1711842115

BARRETT, Rowan D.H a Paul D.N HEBERT, 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* [online]. **83**(3), 481–491. ISSN 0008-4301, 1480-3283. Dostupné z: doi:10.1139/z05-024

BAYLEY, Hagan, 2015. Nanopore sequencing: from imagination to reality. *Clinical Chemistry* [online]. **61**(1), 25–31. ISSN 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2014.223016

BEHEREGARAY, Luciano B. a Adalgisa CACCONE, 2007. Cryptic biodiversity in a changing world. *Journal of Biology* [online]. **6**(4), 9. ISSN 1475-4924. Dostupné z: doi:10.1186/jbiol60

BENSON, Dennis A., Mark CAVANAUGH, Karen CLARK, Ilene KARSCH-MIZRACHI, David J. LIPMAN, James OSTELL a Eric W. SAYERS, 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research* [online]. **41**(D1), D36–D42. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks1195

BEZDEK, Jan, 2013. BEZDĚK J. 2013: Revision of the genus *Hesperopenna* (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae). I. Generic redescription, definition of species groups and taxonomy of *H. medvedevi* species group. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* 53: 715–746. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*. **53**.

BEZERRA-GUSMÃO, Maria A., José Renato C. BARBOSA, Maria Regina de V. BARBOSA, Ademar G. BANDEIRA a Everardo V. S. B. SAMPAIO, 2011. Are nests of *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae) important in the C cycle in the driest area of semiarid caatinga in northeast Brazil? *Applied Soil Ecology* [online]. **47**(1), 1–5. ISSN 0929-1393. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsoil.2010.11.003

BICKFORD, David, David J. LOHMAN, Navjot S. SODHI, Peter K.L. NG, Rudolf MEIER, Kevin WINKER, Krista K. INGRAM a Indraneil DAS, 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* [online]. **22**(3), 148–155. ISSN 01695347. Dostupné z: doi:10.1016/j.tree.2006.11.004

BLAXTER, Mark L., 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. **359**(1444), 669–679. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2003.1447

BLAXTER, Mark, Jenna MANN, Tom CHAPMAN, Fran THOMAS, Claire WHITTON, Robin FLOYD a Eyuaem ABEBE, 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **360**(1462), 1935–1943. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2005.1725

BOERS, Stefan A., Ruud JANSEN a John P. HAYS, 2019. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. **38**(6), 1059–1070. ISSN 1435-4373. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-019-03520-3

BORATYN, Grzegorz M., Christiam CAMACHO, Peter S. COOPER, George COULOURIS, Amelia FONG, Ning MA, Thomas L. MADDEN, Wayne T. MATTEN, Scott D. MCGINNIS, Yuri MEREZHUK, Yan RAYTSELIS, Eric W. SAYERS, Tao TAO, Jian YE a Irena ZARETSKAYA, 2013. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research* [online]. **41**(W1), W29–W33. ISSN 1362-4962, 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt282

BRAUMAN, Alain, 2000. Effect of gut transit and mound deposit on soil organic matter transformations in the soil feeding termite: A review§1Paper presented at the 16th World Congress of Soil Science, 20–26 August 1998, Montpellier, France. *European Journal of Soil Biology* [online]. **36**(3), 117–125. ISSN 1164-5563. Dostupné z: doi:10.1016/S1164-5563(00)01058-X

BRONNER, Iraad F. a Michael A. QUAIL, 2019. Best Practices for Illumina Library Preparation. *Current Protocols in Human Genetics* [online]. **102**(1), e86. ISSN 1934-8258. Dostupné z: doi:10.1002/cphg.86

BROWER, Andrew, 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: ‘Ten species’ of *Astraptus fulgurator* reassessed (Lepidoptera: Hesperiiidae). *Systematics and Biodiversity* [online]. **4**, 127–132. Dostupné z: doi:10.1017/S147720000500191X

BUDDHACHAT, Kittisak, Chadaporn ATTAKITBANCHA, Onchira RITBAMRUNG, Kanmethar CHANTHAP, Chatmongkon SUWANNAPOOM a Korakot NGANVONGPANIT, 2021. Using mini-barcodes coupled with high resolution melting (minibar-HRM) method for species discrimination across *Pangasianodon gigas*,

Pangasianodon hypophthalmus and Pangasius larnaudii. *Aquaculture* [online]. **530**, 735773. ISSN 00448486. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735773

CAIN, A. J., 1958. Logic and Memory in Linnaeus's System of Taxonomy. *Proceedings of the Linnean Society of London* [online]. **169**(1–2), 144–163. ISSN 1095-8312. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1958.tb00819.x

CANARD, Bruno a Robert S. SARFATI, 1994. DNA polymerase fluorescent substrates with reversible 3'-tags. *Gene* [online]. **148**(1), 1–6. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(94)90226-7

CAPINERA, John L., ed., 2008a. Alpha Taxonomy. In: John L. CAPINERA, ed. *Encyclopedia of Entomology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 136–136 [vid. 2021-04-14]. ISBN 978-1-4020-6359-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-6359-6_163

CAPINERA, John L., ed., 2008b. Beta Taxonomy. In: John L. CAPINERA, ed. *Encyclopedia of Entomology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 474–474 [vid. 2021-04-14]. ISBN 978-1-4020-6359-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-6359-6_289

CAPINERA, John L., ed., 2008c. Gamma Taxonomy. In: John L. CAPINERA, ed. *Encyclopedia of Entomology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 1586–1586 [vid. 2021-04-14]. ISBN 978-1-4020-6359-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-6359-6_1031

CATHERINE SHAFFER, 2017. Challenges with Sanger Sequencing. *News-Medical.net* [online] [vid. 2021-04-03]. Dostupné z: https://www.news-medical.net/life-sciences/Challenges-with-Sanger-Sequencing.aspx

CEP TA ČR STARFOS, [b.r.]. *Faunistické a ekologické vyhodnocení ichtyofauny České republiky - CEP - TA ČR Starfos* [online] [vid. 2023-02-19]. Dostupné z: https://starfos.tacr.cz/cs/project/SM%2F620%2F18%2F03

CLARKE, James, Hai-Chen WU, Lakmal JAYASINGHE, Alpesh PATEL, Stuart REID a Hagan BAYLEY, 2009. Continuous Base Identification for Single-Molecule Nanopore DNA Sequencing. *Nature nanotechnology* [online]. **4**, 265–70. Dostupné z: doi:10.1038/nnano.2009.12

CLARKSTON, Bridgette E. Clarkston B E. a Gary W. Saunders G W. SAUNDERS, 2010. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany* [online]. [vid. 2021-03-26]. Dostupné z: doi:10.1139/B09-101

COMER, Jeffrey, Valentin DIMITROV, Qian ZHAO, Gregory TIMP a Aleksei AKSIMENTIEV, 2009. Microscopic Mechanics of Hairpin DNA Translocation through Synthetic Nanopores. *Biophysical Journal* [online]. **96**(2), 593–608. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2008.09.023

COX, Michael M., Jennifer A. DOUDNA a Michael O'DONNELL, 2012. *Molecular biology: principles and practice*. New York, NY: W.H. Freeman and Co. ISBN 978-0-7167-7998-8.

COYNE, Jerry A. a H. Allen ORR, 2004. *Speciation*. Sunderland, Mass: Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-091-3.

CRAMPTON-PLATT, Alex, Martijn J.T.N. TIMMERMANS, Matthew L. GIMMEL, Sujatha Narayanan KUTTY, Timothy D. COCKERILL, Chey VUN KHEN a Alfried P. VOGLER, 2015. Soup to Tree: The Phylogeny of Beetles Inferred by Mitochondrial Metagenomics of a Bornean Rainforest Sample. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **32**(9), 2302–2316. ISSN 0737-4038. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/msv111

CRAMPTON-PLATT, Alex, Douglas W YU, Xin ZHOU a Alfried P VOGLER, 2016. Mitochondrial metagenomics: letting the genes out of the bottle. *GigaScience* [online]. **5**(1), s13742-016-0120-y. ISSN 2047-217X. Dostupné z: doi:10.1186/s13742-016-0120-y

ČANDEK, Klemen a Matjaž KUNTNER, 2015. DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular Ecology Resources* [online]. **15**(2), 268–277. ISSN 1755098X. Dostupné z: doi:10.1111/1755-0998.12304

DAS, Abhaya, 2018. THE FATHER OF TAXONOMY: CARL VON LINNÉ. In: .

DEAMER, David W. a Daniel BRANTON, 2002. Characterization of nucleic acids by nanopore analysis. *Accounts of Chemical Research* [online]. **35**(10), 817–825. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar000138m

DEANGELIS, M M, D G WANG a T L HAWKINS, 1995. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Research*. **23**(22), 4742–4743. ISSN 0305-1048.

DEHARVENG, Louis, 2004. Recent advances in Collembola systematics. *Pedobiologia* [online]. **48**(5), 415–433. ISSN 0031-4056. Dostupné z: doi:10.1016/j.pedobi.2004.08.001

DELSENY, Michel, Bin HAN a Yue Ie HSING, 2010. High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Science* [online]. **179**(5), 407–422. ISSN 0168-9452. Dostupné z: doi:10.1016/j.plantsci.2010.07.019

DEMEREK, M., 1948. Origin of Bacterial Resistance to Antibiotics 1. *Journal of Bacteriology*. **56**(1), 63–74. ISSN 0021-9193.

DENTINGER, Bryn T. M., Maryna Y. DIDUKH a Jean-Marc MONCALVO, 2011. Comparing COI and ITS as DNA Barcode Markers for Mushrooms and Allies (Agaricomycotina). *PLoS ONE* [online]. **6**(9) [vid. 2021-03-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0025081

DESALLE, R, J GATESY, W WHEELER a D GRIMALDI, 1992. DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* [online]. **257**(5078), 1933–1936. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1411508

DESJARDINS, Philippe, Joel B. HANSEN a Michael ALLEN, 2009. Microvolume Protein Concentration Determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* [online]. (33), e1610. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/1610

DIAGNE, Christophe, Boris LEROY, Anne-Charlotte VAISSIÈRE, Rodolphe GOZLAN, David ROIZ, Ivan JARIĆ, Jean-Michel SALLES, Corey BRADSHAW a Franck COURCHAMP, 2021. High and rising economic costs of biological invasions worldwide. *Nature* [online]. **592**. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-03405-6

DIETEREN, Cindy E. J., Peter H. G. M. WILLEMS, Rutger O. VOGEL, Herman G. SWARTS, Jack FRANSEN, Ronald ROEPMAN, Gijs CRIENEN, Jan A. M. SMEITINK, Leo G. J. NIJTMANS a Werner J. H. KOOPMAN, 2008. Subunits of Mitochondrial Complex I Exist as Part of Matrix- and Membrane-associated

Subcomplexes in Living Cells. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(50), 34753–34761. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M807323200

DOYLE, Jeff a Brandon GAUT, 2000. Evolution of genes and taxa: A primer. *Plant molecular biology* [online]. **42**, 1–23. ISSN 978-94-010-5833-9. Dostupné z: doi:10.1023/A:1006349518932

DRESSELHAUS, Mildred S. a Paulo T. ARAUJO, 2010. Perspectives on the 2010 Nobel Prize in physics for graphene. *ACS nano* [online]. **4**(11), 6297–6302. ISSN 1936-086X. Dostupné z: doi:10.1021/nn1029789

DUELLI, Peter a Martin K OBRIST, 2003. Biodiversity indicators: the choice of values and measures. *Agriculture, Ecosystems & Environment* [online]. **98**(1), Biotic Indicators for Biodiversity and Sustainable Agriculture, 87–98. ISSN 0167-8809. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-8809(03)00072-0

EID, John, Adrian FEHR, Jeremy GRAY, Khai LUONG, John LYLE, Geoff OTTO, Paul PELUSO, David RANK, Primo BAYBAYAN, Brad BETTMAN, Arkadiusz BIBILLO, Keith BJORNSON, Bidhan CHAUDHURI, Frederick CHRISTIANS, Ronald CICERO, Sonya CLARK, Ravindra DALAL, Alex DEWINTER, John DIXON, Mathieu FOQUET, Alfred GAERTNER, Paul HARDENBOL, Cheryl HEINER, Kevin HESTER, David HOLDEN, Gregory KEARNS, Xiangxu KONG, Ronald KUSE, Yves LACROIX, Steven LIN, Paul LUNDQUIST, Congcong MA, Patrick MARKS, Mark MAXHAM, Devon MURPHY, Insil PARK, Thang PHAM, Michael PHILLIPS, Joy ROY, Robert SEBRA, Gene SHEN, Jon SORENSON, Austin TOMANEY, Kevin TRAVERS, Mark TRULSON, John VIECELI, Jeffrey WEGENER, Dawn WU, Alicia YANG, Denis ZACCARIN, Peter ZHAO, Frank ZHONG, Jonas KORLACH a Stephen TURNER, 2009. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **323**(5910), 133–138. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1162986

EJSMONT-KARABIN, Jolanta, 2019. Does the world need faunists? Based on rotifer (Rotifera) occurrence reflections on the role of faunistic research in ecology. *International Review of Hydrobiology* [online]. **104**(3–4), 49–56. ISSN 1522-2632. Dostupné z: doi:10.1002/iroh.201901991

EMERSON, Alfred Edwards a Frank Albert BANKS, 1965. The neotropical genus *Labiotermes* (Holmgren) : its phylogeny, distribution, and ecology (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). *American Museum novitates* ; no. 2208 [online]. [vid. 2021-03-26]. Dostupné z: <http://digitallibrary.amnh.org/handle/2246/3321>

ENGEL, Michael S., David A. GRIMALDI a Kumar KRISHNA, 2009. Termites (Isoptera): Their Phylogeny, Classification, and Rise to Ecological Dominance. *American Museum Novitates* [online]. **2009**(3650), 1–27. ISSN 0003-0082, 1937-352X. Dostupné z: [doi:10.1206/651.1](https://doi.org/10.1206/651.1)

ERWIN, Terry L., 1991. How Many Species Are There?: Revisited. *Conservation Biology*. **5**(3), 330–333. ISSN 0888-8892.

EVANS, Theodore A., Tracy Z. DAWES, Philip R. WARD a Nathan LO, 2011. Ants and termites increase crop yield in a dry climate. *Nature Communications* [online]. **2**(1), 262. ISSN 2041-1723. Dostupné z: [doi:10.1038/ncomms1257](https://doi.org/10.1038/ncomms1257)

FERGUSON, Scott, Todd MCLAY, Rose L. ANDREW, Jeremy J. BRUHL, Benjamin SCHWESSINGER, Justin BOREVITZ a Ashley JONES, 2022. Species-specific basecallers improve actual accuracy of nanopore sequencing in plants. *Plant Methods* [online]. **18**(1), 137. ISSN 1746-4811. Dostupné z: [doi:10.1186/s13007-022-00971-2](https://doi.org/10.1186/s13007-022-00971-2)

FOLMER, Ole, Michael BLACK, Hoeh WR, R LUTZ a Robert VRIJENHOEK, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*. **3**, 294–9.

FOOTTIT, R. a Peter H. ADLER, ed., 2017. *Insect biodiversity: science and society*. Second edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-1-118-94553-7.

FOURDRILIS, Séverine, Patrick MARDULYN, Olivier J. HARDY, Kurt JORDAENS, António Manuel DE FRIAS MARTINS a Thierry BACKELJAU, 2016. Mitochondrial DNA hyperdiversity and its potential causes in the marine periwinkle *Melarhaphe neritoides* (Mollusca: Gastropoda). *PeerJ* [online]. **4** [vid. 2021-04-04]. ISSN 2167-8359. Dostupné z: [doi:10.7717/peerj.2549](https://doi.org/10.7717/peerj.2549)

FRÉZAL, Lise a Raphael LEBLOIS, 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. **8**(5), 727–736. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2008.05.005

FRIEDHEIM, Sophie, 2016. Comparison of Species Identification Methods: DNA Barcoding versus Morphological Taxonomy. *Horizons* [online]. **1**(1). ISSN 2472-5234 (print). Dostupné z: <https://kahualike.manoa.hawaii.edu/horizons/vol1/iss1/13>

FUKATSU, Takema, 2012. Next-generation sequencing sheds light on intricate regulation of insect gut microbiota. *Molecular Ecology* [online]. **21**(24), 5908–5910. ISSN 1365-294X. Dostupné z: doi:10.1111/mec.12090

FUNK, W. Chris, Marcel CAMINER a Santiago R. RON, 2012. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **279**(1734), 1806–1814. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2011.1653

GBIF.ORG, 2023. *GBIF* [online]. Dostupné z: <https://www.gbif.org/>

GENDRON, Eli M., Joseph L. SEVIGNY, Innocent BYIRINGIRO, W. Kelley THOMAS, Thomas O. POWERS a Dorota L. PORAZINSKA, 2023. Nematode mitochondrial metagenomics: A new tool for biodiversity analysis. *Molecular Ecology Resources* [online]. ISSN 1755-0998. Dostupné z: doi:10.1111/1755-0998.13761

GILMORE, Scott R., Tom GRÄFENHAN, Gerry LOUIS-SEIZE a Keith A. SEIFERT, 2009. Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources* [online]. **9 Suppl s1**, 90–98. ISSN 1755-098X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02636.x

GUEUNING, Morgan, Dominik GANSER, Simon BLASER, Matthias ALBRECHT, Eva KNOP, Christophe PRAZ a Juerg E. FREY, 2019. Evaluating next-generation sequencing (NGS) methods for routine monitoring of wild bees: Metabarcoding, mitogenomics or NGS barcoding. *Molecular Ecology Resources* [online]. **19**(4), 847–862. ISSN 1755-0998. Dostupné z: doi:10.1111/1755-0998.13013

HAIRSTON, Nelson G., Frederick E. SMITH a Lawrence B. SLOBODKIN, 1960. Community Structure, Population Control, and Competition. *The American Naturalist* [online]. **94**(879), 421–425. ISSN 0003-0147, 1537-5323. Dostupné z: doi:10.1086/282146

HAJIBABAEI, Mehrdad, M. Alex SMITH, Daniel H. JANZEN, Josephine J. RODRIGUEZ, James B. WHITFIELD a Paul D. N. HEBERT, 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* [online]. **6**(4), 959–964. ISSN 1471-8286. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x>

HALLMANN, Caspar A., Martin SORG, Eelke JONGEJANS, Henk SIEPEL, Nick HOFLAND, Heinz SCHWAN, Werner STENMANS, Andreas MÜLLER, Hubert SUMSER, Thomas HÖRREN, Dave GOULSON a Hans de KROON, 2017. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS ONE* [online]. **12**(10), e0185809. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:[10.1371/journal.pone.0185809](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809)

HAMMOND, Peter, 1992. Species Inventory. In: Brian GROOMBRIDGE, ed. *Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 17–39 [vid. 2021-03-31]. ISBN 978-94-011-2282-5. Dostupné z: doi:[10.1007/978-94-011-2282-5_4](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2282-5_4)

HANNER, Robert H. a T. Ryan GREGORY, 2007. Genomic Diversity Research and the Role of Biorepositories. *Cell Preservation Technology* [online]. **5**(2), 93–103. ISSN 1538-344X, 1557-8119. Dostupné z: doi:[10.1089/cpt.2007.9993](https://doi.org/10.1089/cpt.2007.9993)

HANSEN, Thomas V. O., Mette K. SIMONSEN, Finn C. NIELSEN a Yrsa Andersen HUNDRUP, 2007. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* [online]. **16**(10), 2072–2076. ISSN 1055-9965. Dostupné z: doi:[10.1158/1055-9965.EPI-07-0611](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0611)

HAUSMANN, Axel, Juliane DILLER, Jerome MORINIERE, Amelie HÖCHERL, Andreas FLOREN a Gerhard HASZPRUNAR, 2020. DNA barcoding of fogged caterpillars in Peru: A novel approach for unveiling host-plant relationships of tropical moths (Insecta, Lepidoptera). *PLOS ONE* [online]. **15**(1), e0224188. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:[10.1371/journal.pone.0224188](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224188)

HAWKSWORTH, David, MT KALIN-ARROYO, Peter HAMMOND, RE RICKLEFS, Michael SAMWAYS, B AGUIRRE-HUDSON, M DADD, B GROOMBRIDGE, J HODGES, Martin JENKINS, MH MENGESHA, William GRANT, Roger LATHAM, Thomas LEWINSOHN, Deborah LODGE, Norman PLATNICK, David WRIGHT, TM CROWE a CA STACE, 1995. *GBA(1995)-Ch 3-part 1*. 1995.

HEBERT, P. D. N., E. H. PENTON, J. M. BURNS, D. H. JANZEN a W. HALLWACHS, 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **101**(41), 14812–14817. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0406166101

HEBERT, Paul D. N., Alina CYWINSKA, Shelley L. BALL a Jeremy R. DEWAARD, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. **270**(1512), 313–321. ISSN 0962-8452, 1471-2954. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2002.2218

HEBERT, Paul D. N. a T. Ryan GREGORY, 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology* [online]. **54**(5), 852–859. ISSN 1076-836X, 1063-5157. Dostupné z: doi:10.1080/10635150500354886

HEBERT, Paul D. N, Mark Y STOECKLE, Tyler S ZEMLAK a Charles M FRANCIS, 2004b. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology* [online]. **2**(10), e312. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.0020312

HEBERT, Paul D.N., Sujeevan RATNASINGHAM a Jeremy R. DE WAARD, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. **270**(suppl_1) [vid. 2021-03-26]. ISSN 0962-8452, 1471-2954. Dostupné z: doi:10.1098/rsbl.2003.0025

HEEREMA, Stephanie J. a Cees DEKKER, 2016. Graphene nanodevices for DNA sequencing. *Nature Nanotechnology* [online]. **11**(2), 127–136. ISSN 1748-3395. Dostupné z: doi:10.1038/nnano.2015.307

HENNIG, W., [b.r.]. Insect phylogeny. *Insect phylogeny*. [online]. **1981** [vid. 2021-03-26]. Dostupné z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19810583224>

HILLIS, David, 2003. Molecular Versus Morphological Approaches To Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* [online]. **18**, 23–42. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.es.18.110187.000323

HOLLINGSWORTH, Peter M., Laura L. FORREST, John L. SPOUGE, 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **106**(31), 12794–12797. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0905845106

HOLLINGSWORTH, Peter M., Sean W. GRAHAM a Damon P. LITTLE, 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLOS ONE* [online]. **6**(5), e19254. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0019254

HOSSEINKHANI, Saman, 2011. Molecular enigma of multicolor bioluminescence of firefly luciferase. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **68**(7), 1167–1182. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-010-0607-0

HOWORKA, S., S. CHELEY a H. BAYLEY, 2001. Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. *Nature Biotechnology* [online]. **19**(7), 636–639. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/90236

HTTPWWW.BOLDSYSTEMS.ORG, (online). *Bold Systems v4* [online] [vid. 2023-04-03]. Dostupné z: <http://www.boldsystems.org/index.php/>

HURST, Greg a Francis JIGGINS, 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: The effects of inherited symbionts. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* [online]. **272**, 1525–34. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2005.3056

CHANGBUNJONG, Tanasak, Thekhawet WELUWANARAK, Poonyapat SEDWISAI, Jiraporn RUANGSITTICHAJ, Gerard DUVALLET a Theeraphap CHAREONVIRIYAPHAP, 2020. New records and DNA barcoding of deer flies, Chrysops (Diptera: Tabanidae) in Thailand. *Acta Tropica* [online]. **210**, 105532. ISSN 0001-706X. Dostupné z: doi:10.1016/j.actatropica.2020.105532

CHAPMAN, Arthur, 2009. *Numbers of Living Species in Australia and the World 2nd edn*. ISBN 978-0-642-56861-8.

CHEN, Wei-Yun, Ting-Hsuan HUNG a Shiuh-Feng SHIAO, 2004. Molecular Identification of Forensically Important Blow Fly Species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *Journal of Medical Entomology* [online]. **41**(1), 47–57. ISSN 0022-2585, 1938-2928. Dostupné z: doi:10.1603/0022-2585-41.1.47

CHEN, Zhoutao, Long PHAM, Tsai-Chin WU, Guoya MO, Yu XIA, Peter L. CHANG, Devin PORTER, Tan PHAN, Huu CHE, Hao TRAN, Vikas BANSAL, Justin SHAFFER, Pedro BELDA-FERRE, Greg HUMPHREY, Rob KNIGHT, Pavel PEVZNER, Son PHAM, Yong WANG a Ming LEI, 2020. Ultralow-input single-tube linked-read library method enables short-read second-generation sequencing systems to routinely generate highly accurate and economical long-range sequencing information. *Genome Research* [online]. **30**(6), 898–909. ISSN 1088-9051, 1549-5469. Dostupné z: doi:10.1101/gr.260380.119

JAIN, Miten, S. KOREN, J. QUICK, A. C. RAND, T. A. SASANI, J. R. TYSON, A. D. BEGGS, A. T. DILTNEY, I. T. FIDDES, S. MALLA, H. MARRIOTT, K. H. MIGA, T. NIETO, J. O'GRADY, H. E. OLSEN, B. S. PEDERSEN, A. RHIE, H. RICHARDSON, A. R. QUINLAN, T. P. SNUTCH, L. TEE, B. PATEN, A. M. PHILLIPPY, J. T. SIMPSON, N. J. LOMAN a M. LOOSE, 2017. *Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads* [online]. 20. duben 2017. B.m.: bioRxiv. [vid. 2023-03-29]. Dostupné z: doi:10.1101/128835

JANDA, J. Michael a Sharon L. ABBOTT, 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **45**(9), 2761–2764. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01228-07

JARMAN a ELLIOTT, 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, „living fossils" from the Triassic. *Journal of Evolutionary Biology* [online]. **13**(4), 624–633. ISSN 1010-061X, 1420-9101. Dostupné z: doi:10.1046/j.1420-9101.2000.00207.x

JENKINS, Martin, 1992. Species Diversity: An Introduction. In: Brian GROOMBRIDGE, ed. *Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 40–46 [vid. 2021-03-31]. ISBN 978-94-011-2282-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-2282-5_5

JONES, Martin, Anisah GHOORAH a Mark BLAXTER, 2011. jMOTU and Taxonator: Turning DNA Barcode Sequences into Annotated Operational Taxonomic Units. *PLOS ONE* [online]. **6**(4), e19259. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0019259

JORDANCUFF, 2021. Primer time: a rollercoaster ride through metabarcoding PCR primer design. *Biocoenosis* [online]. [vid. 2021-04-11]. Dostupné z: <https://biocoenosis.org/2021/03/29/primer-time/>

JOUQUET, Pascal, Saran TRAORÉ, Chutinan CHOOSAI, Christian HARTMANN a David BIGNELL, 2011. Influence of termites on ecosystem functioning. Ecosystem services provided by termites. *European Journal of Soil Biology* [online]. **47**(4), 215–222. ISSN 1164-5563. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejsobi.2011.05.005

JUŘIČKOVÁ, Lucie a Vojen LOŽEK, [b.r.]. Faunistika pro 21. století II. Přínos faunistiky k poznání naší přírody a krajiny a výhledy do budoucna. **2004**.

KANAGAWA, Takahiro, 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. **96**(4), 317–323. ISSN 1389-1723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(03)90130-7

KASIANOWICZ, John J., Eric BRANDIN, Daniel BRANTON a David W. DEAMER, 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **93**(24), 13770–13773. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.93.24.13770

KHAN, Md. Aslam, Wasim AHMAD a Bishwajeet PAUL, 2018. Ecological Impacts of Termites. In: Md. Aslam KHAN a Wasim AHMAD, ed. *Termites and Sustainable Management* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 201–216 [vid. 2021-04-09]. ISBN 978-3-319-72109-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-72110-1_10

KNOWLTON, Nancy a Lee A. WEIGT, 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. **265**(1412), 2257–2263. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.1998.0568

KONDO, Natsuko, Naruo NIKOH, Nobuyuki IJICHI, Masakazu SHIMADA a Takema FUKATSU, 2002. Genome fragment of Wolbachia endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online].

99(22), 14280–14285. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.222228199

KRESS, W. J. a D. L. ERICKSON, 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **105**(8), 2761–2762. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0800476105

KRESS, W. John, Kenneth J. WURDACK, Elizabeth A. ZIMMER, Lee A. WEIGT a Daniel H. JANZEN, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **102**(23), 8369–8374. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0503123102

KUNPROM, Chonticha a Pairot PRAMUAL, 2019. DNA barcoding of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand: ambiguity, misidentification and cryptic diversity. *Mitochondrial DNA Part A* [online]. **30**(8), 861–873. ISSN 2470-1394. Dostupné z: doi:10.1080/24701394.2019.1693550

LAHAYE, R., M. VAN DER BANK, D. BOGARIN, J. WARNER, F. PUPULIN, G. GIGOT, O. MAURIN, S. DUTHOIT, T. G. BARRACLOUGH a V. SAVOLAINEN, 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **105**(8), 2923–2928. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0709936105

LEE, Joon-Ho a Seung-Tae KIM, 2001. USE OF SPIDERS AS NATURAL ENEMIES TO CONTROL RICE PESTS IN KOREA. 13.

LEVENE, M. J., J. KORLACH, S. W. TURNER, M. FOQUET, H. G. CRAIGHEAD a W. W. WEBB, 2003. Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations. *Science* [online]. **299**(5607), 682–686. Dostupné z: doi:10.1126/science.1079700

LI, J., D. STEIN, C. MCMULLAN, D. BRANTON, M. J. AZIZ a J. A. GOLOVCHENKO, 2001. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature* [online]. **412**(6843), 166–169. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35084037

LINDSAY, Stuart, 2016. The promises and challenges of solid-state sequencing. *Nature Nanotechnology* [online]. **11**(2), 109–111. ISSN 1748-3395. Dostupné z: doi:10.1038/nnano.2016.9

LIU, Mingxin, Laurence J. CLARKE, Susan C. BAKER, Gregory J. JORDAN a Christopher P. BURRIDGE, 2020. A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. *Ecological Entomology* [online]. **45**(3), 373–385. ISSN 1365-2311. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/een.12831>

LIU, Shanlin, Xin WANG, Lin XIE, Meihua TAN, Zhenyu LI, Xu SU, Hao ZHANG, Bernhard MISOF, Karl M. KJER, Min TANG, Oliver NIEHUIS, Hui JIANG a Xin ZHOU, 2016. Mitochondrial capture enriches mito-DNA 100 fold, enabling PCR-free mitogenomics biodiversity analysis. *Molecular Ecology Resources* [online]. **16**(2), 470–479. ISSN 1755-0998. Dostupné z: doi:[10.1111/1755-0998.12472](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12472)

LOZUPONE, Catherine A. a Rob KNIGHT, 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **104**(27), 11436–11440. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.0611525104](https://doi.org/10.1073/pnas.0611525104)

LOŽEK, Vojen a Lucie JUŘIČKOVÁ, [b.r.]. Faunistika pro 21. století I. Historie terénního výzkumu – od sběratelství ke komplexnímu hodnocení. **2004**.

M. HERNÁNDEZ-TRIANA, Luis, Victor A. BRUGMAN, Nadya I. NIKOLOVA, IGNACIO RUIZ-ARRONDO, Elsa BARRERO, Leigh THORNE, Mar FERNÁNDEZ DE MARCO, Andreas KRÜGER, Sarah LUMLEY, Nicholas JOHNSON a Anthony R. FOOKS, 2019. DNA barcoding of British mosquitoes (Diptera, Culicidae) to support species identification, discovery of cryptic genetic diversity and monitoring invasive species. *ZooKeys* [online]. **832**, 57–76. ISSN 1313-2989. Dostupné z: doi:[10.3897/zookeys.832.32257](https://doi.org/10.3897/zookeys.832.32257)

MAGALHAES, Ivan a Adalberto SANTOS, 2012. Phylogenetic analysis of *Micrathena* and *Chaetacis* spiders (Araneae: Araneidae) reveals multiple origins of extreme sexual size dimorphism and long abdominal spines. *Zoological Journal of the Linnean Society* [online]. **166**(1), 14–53. ISSN 0024-4082. Dostupné z: doi:[10.1111/j.1096-3642.2012.00831.x](https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2012.00831.x)

MAILHE, Morgane, Davide RICABONI, Véronique VITTON, Jean-Michel GONZALEZ, Dipankar BACHAR, Grégory DUBOURG, Frédéric CADORET, Catherine ROBERT, Jérémy DELERCE, Anthony LEVASSEUR, Pierre-Edouard FOURNIER, Emmanouil ANGELAKIS, Jean-Christophe LAGIER a Didier RAOULT,

2018. Repertoire of the gut microbiota from stomach to colon using culturomics and next-generation sequencing. *BMC Microbiology* [online]. **18**(1), 157. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-018-1304-7

MAMANOVA, Lira, Alison J. COFFEY, Carol E. SCOTT, Iwanka KOZAREWA, Emily H. TURNER, Akash KUMAR, Eleanor HOWARD, Jay SHENDURE a Daniel J. TURNER, 2010. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature Methods* [online]. **7**(2), 111–118. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1419

MARGULIES, Marcel, Michael EGHOLM, William E. ALTMAN, Said A, 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* [online]. **437**(7057), 376–380. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature03959

MARSH, Sharon, 2010. Chapter 8 - Pyrosequencing. In: George P. PATRINOS a Wilhelm J. ANSORGE, ed. *Molecular Diagnostics (Second Edition)* [online]. San Diego: Academic Press, s. 107–116 [vid. 2023-03-19]. ISBN 978-0-12-374537-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374537-8.00008-0

MARSOLAIS, G., R. DUBUC, J. BERGERON, J. D. MORREY, E. J. KELLY a M. K. JACKSON, 1994. Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* [online]. **6**(3), 297–301. ISSN 1040-6387. Dostupné z: doi:10.1177/104063879400600303

MAY, Robert M., 1988. How Many Species Are There on Earth? *Science* [online]. **241**(4872), 1441–1449. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.241.4872.1441

MAY, Robert M. a Paul H. HARVEY, 2009. Species uncertainties. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **323**(5915), 687. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1170937

MAYDEN, R. L., 1997. A Hierarchy of Species Concepts: The Denouement in the Saga of the Species Problem. In: M. F. CLARIDGE, H. A. DAWAH a M. R. WILSON, ed. *Species: The units of diversity*,. B.m.: Chapman & Hall, s. 381–423.

MAYR, E, G T LINDSEY a R L URSINGER, 1969. Methods and Principles of Systematic Zoology. 168.

MAYR, Ernst a Niles ELDREDGE, 1999. *Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist: With a New Introduction by the Author*. Cambridge, Mass: Harvard University Press. ISBN 978-0-674-86250-0.

MCCARTHY, Alice, 2010. Third Generation DNA Sequencing: Pacific Biosciences' Single Molecule Real Time Technology. *Chemistry & Biology* [online]. **17**(7), 675–676. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2010.07.004

MEDINGER, Ralph, Viola NOLTE, Ram Vinay PANDEY, Steffen JOST, Birgit OTTENWÄLDER, Christian SCHLÖTTERER a Jens BOENIGK, 2010. Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. *Molecular Ecology* [online]. **19**(s1), 32–40. ISSN 1365-294X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04478.x

MEIER, Rudolf, Kwong SHIYANG, Gaurav VAIDYA a Peter K. L. NG, 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* [online]. **55**(5), 715–728. ISSN 1063-5157. Dostupné z: doi:10.1080/10635150600969864

MEUSNIER, Isabelle, Gregory AC SINGER, Jean-François LANDRY, Donal A. HICKEY, Paul DN HEBERT a Mehrdad HAJIBABAEI, 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics* [online]. **9**(1), 214. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-9-214

MILLS, N. J., 1985. Some observations on the role of predation in the natural regulation of *Ips typographus* populations1. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* [online]. **99**(1–5), 209–215. ISSN 1439-0418. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0418.1985.tb01980.x

MOHAMEDSAID, Mohamed, 1993. An interesting new species of *Liroetiella* from Sabah, Malaysia (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae). *Entomological Review Japan*. **48**, 45–46.

MORA, Camilo, Derek P. TITTENSOR, Sina ADL, Alastair G. B. SIMPSON a Boris WORM, 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology* [online]. **9**(8), e1001127. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.1001127

MORTON, N E, 1991. Parameters of the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **88**(17), 7474–7476. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.88.17.7474

MOUNT, David W., 2001. *Bioinformatics: sequence and genome analysis*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-87969-655-9.

MUKABAYIRE, O., D. BOCCOLINI, L. LOCHOUARN, D. FONTENILLE a N. J. BESANSKY, 1999. Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Molecular Ecology* [online]. **8**(2), 289–297. ISSN 0962-1083, 1365-294X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-294X.1999.00567.x

MULLIS, Kary B., Francois FERRÉ a Richard A. GIBBS, 1994. *The Polymerase Chain Reaction*. B.m.: Birkhäuser. ISBN 978-3-7643-3750-6.

NISHIGUCHI, Michele K., Phaedra DOUKAKIS, Mary EGAN, David KIZIRIAN, Aloysius PHILLIPS, Lorenzo PRENDINI, Howard C. ROSENBAUM, Elizabeth TORRES, Yael WYNER, Rob DESALLE a Gonzalo GIRIBET, 2002. DNA Isolation Procedures. In: Rob DESALLE, Gonzalo GIRIBET a Ward WHEELER, ed. *Techniques in Molecular Systematics and Evolution* [online]. Basel: Birkhäuser Basel, s. 249–287 [vid. 2023-03-11]. ISBN 978-3-7643-6257-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-0348-8125-8_12

NIXON, Kevin C. a Quentin D. WHEELER, 1990. An Amplification of the Phylogenetic Species Concept. *Cladistics* [online]. **6**(3), 211–223. ISSN 1096-0031. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.1990.tb00541.x

NOVOSELOV, K. S., A. K. GEIM, S. V. MOROZOV, D. JIANG, Y. ZHANG, S. V. DUBONOS, I. V. GRIGORIEVA a A. A. FIRSOV, 2004. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science* [online]. **306**(5696), 666–669. Dostupné z: doi:10.1126/science.1102896

NOWROUSIAN, Minou, 2010. Next-Generation Sequencing Techniques for Eukaryotic Microorganisms: Sequencing-Based Solutions to Biological Problems. *Eukaryotic Cell* [online]. **9**(9), 1300–1310. Dostupné z: doi:10.1128/EC.00123-10

NYFFELER, M. a G. BENZ, 1987. Spiders in natural pest control: A review1. *Journal of Applied Entomology* [online]. **103**(1–5), 321–339. ISSN 1439-0418. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0418.1987.tb00992.x

NYRÉN, P., 1987. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Analytical Biochemistry* [online]. **167**(2), 235–238. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(87)90158-8

ORRELL, Thomas, YR ROSKOV, Luisa ABUCAY, Nicolas BAILLY, Paul KIRK, Thierry BOURGOIN, R.E. DEWALT, Wim DECOCK, Aaike DE WEVER a D. NICOLSON, 2018. *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2018 Annual Checklist*.

OSAWA, Naoya a Takayoshi NISHIDA, 1992. Seasonal variation in elytral colour polymorphism in *Harmonia axyridis* (the ladybird beetle): the role of non-random mating. *Heredity* [online]. **69**(4), 297–307. ISSN 1365-2540. Dostupné z: doi:10.1038/hdy.1992.129

PASSAMONTI, Marco a Fabrizio GHISELLI, 2009. Doubly uniparental inheritance: two mitochondrial genomes, one precious model for organelle DNA inheritance and evolution. *DNA and cell biology* [online]. **28**(2), 79–89. ISSN 1557-7430. Dostupné z: doi:10.1089/dna.2008.0807

PASSAMONTI, Marco, Andrea RICCI, Liliana MILANI a Fabrizio GHISELLI, 2011. Mitochondrial genomes and Doubly Uniparental Inheritance: new insights from *Musculista senhousia* sex-linked mitochondrial DNAs (Bivalvia Mytilidae). *BMC Genomics* [online]. **12**(1), 442. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-12-442

PAWLOWSKI, Jan, Stéphane AUDIC, Sina ADL, David BASS, Lassaâd BELBAHRI, Cédric BERNEY, Samuel S. BOWSER, Ivan CEPICKA, Johan DECELLE, Micah DUNTHORN, Anna Maria FIORE-DONNO, Gillian H. GILE, Maria HOLZMANN, Regine JAHN, Miloslav JIRKŮ, Patrick J. KEELING, Martin KOSTKA, Alexander KUDRYAVTSEV, Enrique LARA, Julius LUKEŠ, David G. MANN, Edward A. D. MITCHELL, Frank NITSCHKE, Maria ROMERALO, Gary W. SAUNDERS, Alastair G. B. SIMPSON, Alexey V. SMIRNOV, John L. SPOUGE, Rowena F. STERN, Thorsten STOECK, Jonas ZIMMERMANN, David SCHINDEL a Colombran DE VARGAS, 2012. CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness

beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. *PLoS Biology* [online]. **10**(11) [vid. 2021-03-26]. ISSN 1544-9173. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.1001419

PIMM, S. L., G. J. RUSSELL, J. L. GITTLEMAN a T. M. BROOKS, 1995. The Future of Biodiversity. *Science* [online]. **269**(5222), 347–350. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.269.5222.347

POLLARD, Thomas D, William C EARNSHAW, Jennifer LIPPINCOTT-SCHWARTZ a Graham T JOHNSON, 2017. *Cell biology*. ISBN 978-0-323-34126-4.

PORAZINSKA, Dorota L., Robin M. GIBLIN-DAVIS, Lina FALLER, William FARMERIE, Natsumi KANZAKI, Krystalynne MORRIS, Thomas O. POWERS, Abraham E. TUCKER, Way SUNG a W. Kelley THOMAS, 2009. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. *Molecular Ecology Resources* [online]. **9**(6), 1439–1450. ISSN 1755-0998. Dostupné z: doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02611.x

PORAZINSKA, Dorota L., Robin M. GIBLIN-DAVIS, Thomas O. POWERS a W. Kelley THOMAS, 2012. Nematode Spatial and Ecological Patterns from Tropical and Temperate Rainforests. *PLOS ONE* [online]. **7**(9), e44641. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0044641

POWERS, T.O., 1992. Molecular diagnostics for plant nematodes. *Parasitology Today* [online]. **8**(5), 177–179. ISSN 01694758. Dostupné z: doi:10.1016/0169-4758(92)90017-V

PRZEPIÓRA, Fabian, Jan LOCH a Michał CIACH, 2020. Bark beetle infestation spots as biodiversity hotspots: Canopy gaps resulting from insect outbreaks enhance the species richness, diversity and abundance of birds breeding in coniferous forests. *Forest Ecology and Management* [online]. **473**, 118280. ISSN 0378-1127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2020.118280

PUILLANDRE, N., A. LAMBERT, S. BROUILLET a G. ACHAZ, 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation: ABGD, AUTOMATIC BARCODE GAP DISCOVERY. *Molecular Ecology* [online]. **21**(8), 1864–1877. ISSN 09621083. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x

PURTY, Ram Singh a Sayan CHATTERJEE, 2016. DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*. **3**, 1059.

QIN, Dahui, 2019. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology & Medicine* [online]. **16**(1), 4–10. ISSN 2095-3941. Dostupné z: doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055

RAMIREZ-GONZALEZ, Ricardo, Douglas W. YU, Catharine BRUCE, Darren HEAVENS, Mario CACCAMO a Brent C. EMERSON, 2013. PyroClean: Denoising Pyrosequences from Protein-Coding Amplicons for the Recovery of Interspecific and Intraspecific Genetic Variation. *PLoS ONE* [online]. **8**(3), e57615. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0057615

RATNASINGHAM, Sujeevan a Paul D. N. HEBERT, 2007. BARCODING: bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>): BARCODING. *Molecular Ecology Notes* [online]. **7**(3), 355–364. ISSN 14718278. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x

RATNASINGHAM, Sujeevan a Paul D. N. HEBERT, 2013. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE* [online]. **8**(7), e66213. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0066213

REES, Helen C., Ben C. MADDISON, David J. MIDDLEDITCH, James R.M. PATMORE a Kevin C. GOUGH, 2014. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* [online]. **51**(5), 1450–1459. ISSN 1365-2664. Dostupné z: doi:10.1111/1365-2664.12306

RIEHLE, M. M., W. M. GUELBEOGO, A. GNEME, K. EIGLMEIER, I. HOLM, E. BISCHOFF, T. GARNIER, G. M. SNYDER, X. LI, K. MARKIANOS, N. SAGNON a K. D. VERNICK, 2011. A Cryptic Subgroup of *Anopheles gambiae* Is Highly Susceptible to Human Malaria Parasites. *Science* [online]. **331**(6017), 596–598. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1196759

RONAGHI, M., S. KARAMOHAMED, B. PETTERSSON, M. UHLÉN a P. NYRÉN, 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release.

Analytical Biochemistry [online]. **242**(1), 84–89. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1996.0432

ROTHBERG, Jonathan M., Wolfgang HINZ, Todd M. REARICK, Jonathan SCHULTZ, William MILESKI, Mel DAVEY, John H. LEAMON, Kim JOHNSON, Mark J. MILGREW, Matthew EDWARDS, Jeremy HOON, Jan F. SIMONS, David MARRAN, Jason W. MYERS, John F. DAVIDSON, Annika BRANTING, John R. NOBILE, Bernard P. PUC, David LIGHT, Travis A. CLARK, Martin HUBER, Jeffrey T. BRANCIFORTE, Isaac B. STONER, Simon E. CAWLEY, Michael LYONS, Yutao FU, Nils HOMER, Marina SEDOVA, Xin MIAO, Brian REED, Jeffrey SABINA, Erika FEIERSTEIN, Michelle SCHORN, Mohammad ALANJARY, Eileen DIMALANTA, Devin DRESSMAN, Rachel KASINSKAS, Tanya SOKOLSKY, Jacqueline A. FIDANZA, Eugeni NAMSARAEV, Kevin J. MCKERNAN, Alan WILLIAMS, G. Thomas ROTH a James BUSTILLO, 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* [online]. **475**(7356), 348–352. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature10242

ROY, Helen a Eric WAJNBERG, 2008. From biological control to invasion: the ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. *BioControl* [online]. **53**(1), 1–4. ISSN 1573-8248. Dostupné z: doi:10.1007/s10526-007-9127-8

RUSK, Nicole, 2011. Torrents of sequence. *Nature Methods* [online]. **8**(1), 44–44. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.f.330

RUSSO, Laura, Rachel STEHOUWER, Jacob Mason HEBERLING a Katriona SHEA, 2011. The Composite Insect Trap: An Innovative Combination Trap for Biologically Diverse Sampling. *PLOS ONE* [online]. **6**(6), e21079. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0021079

SACCONI, Cecilia, Carla DE GIORGI, Carmela GISSI, Graziano PESOLE a Aurelio REYES, 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* [online]. **238**(1), 195–209. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(99)00270-X

SANDERSON, M. G., 1996. Biomass of termites and their emissions of methane and carbon dioxide: A global database. *Global Biogeochemical Cycles* [online]. **10**(4), 543–557. ISSN 08866236. Dostupné z: doi:10.1029/96GB01893

SAUNDERS, Gary W, 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **360**(1462), 1879–1888. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2005.1719

SAYERS, Eric W, Mark CAVANAUGH, Karen CLARK, James OSTELL, Kim D PRUITT a Ilene KARSCH-MIZRACHI, 2020. GenBank. *Nucleic Acids Research* [online]. **48**(D1), D84–D86. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkz956

SEIFERT, Bernhard, 2016. Inconvenient hyperdiversity – the traditional concept of “*Pheidole pallidula*” includes four cryptic species (Hymenoptera: Formicidae). *SOIL ORGANISMS*. **88**(1), 1-17-1–17. ISSN 2509-9523.

SEIFERT, Keith A., Robert A. SAMSON, Jeremy R. DEWAARD, Jos HOUBRAKEN, C. André LÉVESQUE, Jean-Marc MONCALVO, Gerry LOUIS-SEIZE a Paul D. N. HEBERT, 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **104**(10), 3901–3906. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0611691104

SHANNON, C E, [b.r.]. A Mathematical Theory of Communication. **1948**.

SHENDURE, Jay, Shankar BALASUBRAMANIAN, George M. CHURCH, Walter GILBERT, Jane ROGERS, Jeffery A. SCHLOSS a Robert H. WATERSTON, 2017. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* [online]. **550**(7676), 345–353. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature24286

SHETH, Bhavisha P. a Vrinda S. THAKER, 2017. DNA barcoding and traditional taxonomy: an integrated approach for biodiversity conservation. *Genome* [online]. **60**(7), 618–628. ISSN 0831-2796. Dostupné z: doi:10.1139/gen-2015-0167

SCHINDEL, David E. a Scott E. MILLER, 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* [online]. **435**(7038), 17–17. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/435017b

SCHMIDT, Thomas S. B., João F. MATIAS RODRIGUES a Christian VON MERING, 2014. Ecological Consistency of SSU rRNA-Based Operational Taxonomic Units at a Global Scale. *PLoS Computational Biology* [online]. **10**(4) [vid. 2021-03-31]. ISSN 1553-734X. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pcbi.1003594

SCHOCH, C. L., K. A., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **109**(16), 6241–6246. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1117018109

SIMPSON, E. H., 1949. Measurement of Diversity. *Nature* [online]. **163**(4148), 688–688. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/163688a0

SLATKO, Barton E., Andrew F. GARDNER a Frederick M. AUSUBEL, 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. **122**(1), e59. ISSN 1934-3647. Dostupné z: doi:10.1002/cpmb.59

SMITH, M. A., J. J. RODRIGUEZ, J. B. WHITFIELD, A. R. DEANS, D. H. JANZEN, W. HALLWACHS a P. D. N. HEBERT, 2008. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **105**(34), 12359–12364. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0805319105

SMITH, M. Alex, Claudia BERTRAND, Kate CROSBY, Eldon S. EVELEIGH, Jose FERNANDEZ-TRIANA, Brian L. FISHER, Jason GIBBS, Mehrdad HAJIBABAEI, Winnie HALLWACHS, Katharine HIND, Jan HRCEK, Da-Wei HUANG, Milan JANDA, Daniel H. JANZEN, Yanwei LI, Scott E. MILLER, Laurence PACKER, Donald QUICKE, Sujeevan RATNASINGHAM, Josephine RODRIGUEZ, Rodolphe ROUGERIE, Mark R. SHAW, Cory SHEFFIELD, Julie K. STAHLHUT, Dirk STEINKE, James WHITFIELD, Monty WOOD a Xin ZHOU, 2012. Wolbachia and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems. *PLoS ONE* [online]. **7**(5) [vid. 2021-03-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0036514

SMITH, M. Alex, Brian L FISHER a Paul D.N HEBERT, 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **360**(1462), 1825–1834. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2005.1714

SOKAL, Robert R., 1963. The Principles and Practice of Numerical Taxonomy. *TAXON* [online]. **12**(5), 190–199. ISSN 1996-8175. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.2307/1217562>

SONG, Hojun, Jennifer E. BUHAY, Michael F. WHITING a Keith A. CRANDALL, 2008. Many Species in One: DNA Barcoding Overestimates the Number of Species When Nuclear Mitochondrial Pseudogenes Are Coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**(36), 13486–13491.

STADEN, R, 1979. A strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic Acids Research*. **6**(7), 2601–2610. ISSN 0305-1048.

STAHLHUT, Julie K., Jason GIBBS, Cory S. SHEFFIELD, M. ALEX SMITH a Laurence PACKER, 2012. *Wolbachia* (Rickettsiales) infections and bee (Apoidea) barcoding: a response to Gerth *et al.* *Systematics and Biodiversity* [online]. **10**(4), 395–401. ISSN 1477-2000, 1478-0933. Dostupné z: doi:[10.1080/14772000.2012.753488](https://doi.org/10.1080/14772000.2012.753488)

STORK, Nigel E., 2018. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annual Review of Entomology* [online]. **63**(1), 31–45. Dostupné z: doi:[10.1146/annurev-ento-020117-043348](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348)

STORM, A. J., J. H. CHEN, X. S. LING, H. W. ZANDBERGEN a C. DEKKER, 2003. Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision. *Nature Materials* [online]. **2**(8), 537–540. ISSN 1476-1122. Dostupné z: doi:[10.1038/nmat941](https://doi.org/10.1038/nmat941)

TABERLET, Pierre, Eric COISSAC, François POMPANON, Christian BROCHMANN a Eske WILLERSLEV, 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* [online]. **21**(8), 2045–2050. ISSN 1365-294X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>

TABERLET, Pierre, Eric COISSAC, François POMPANON, Ludovic GIELLY, Christian MIQUEL, Alice VALENTINI, Thierry VERMAT, Gérard CORTIER, Christian BROCHMANN a Eske WILLERSLEV, 2007. Power and limitations of the chloroplast trn L (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* [online]. **35**(3), e14–e14. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:[10.1093/nar/gkl938](https://doi.org/10.1093/nar/gkl938)

TANG, Min, Meihua TAN, Guanliang MENG, Shenzhou YANG, Xu SU, Shanlin LIU, Wenhui SONG, Yiyuan LI, Qiong WU, Aibing ZHANG a Xin ZHOU, 2014. Multiplex sequencing of pooled mitochondrial genomes-a crucial step toward

biodiversity analysis using mito-metagenomics. *Nucleic Acids Research* [online]. **42**(22), e166. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gku917

TAYLOR, H. R. a W. E. HARRIS, 2012. An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* [online]. **12**(3), 377–388. ISSN 1755-098X, 1755-0998. Dostupné z: doi:10.1111/j.1755-0998.2012.03119.x

THORNE, Barbara a James CARPENTER, 1992. Phylogeny of Dictyoptera. *Systematic Entomology* [online]. **17**, 253–268. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3113.1992.tb00336.x

VALENTINI, Alice, François POMPANON a Pierre TABERLET, 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* [online]. **24**(2), 110–117. ISSN 01695347. Dostupné z: doi:10.1016/j.tree.2008.09.011

VARSHNEY, Rajeev K., Spurthi N. NAYAK, Gregory D. MAY a Scott A. JACKSON, 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology* [online]. **27**(9), 522–530. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2009.05.006

VENTER, J. Craig, Mark D. ADAMS, , 2001. The Sequence of the Human Genome. *Science* [online]. **291**(5507), 1304–1351. Dostupné z: doi:10.1126/science.1058040

VIRGILIO, Massimiliano, Thierry BACKELJAU, Bruno NEVADO a Marc DE MEYER, 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics* [online]. **11**(1), 206. ISSN 1471-2105. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2105-11-206

VOET, Donald a Judith G. VOET, 1990. *Biochemistry* [online]. B.m.: New York : Wiley [vid. 2021-03-26]. ISBN 978-0-471-61769-3. Dostupné z: <http://archive.org/details/biochemistry00voet>

WARNECKE, Peter M., Clare STIRZAKER, John R. MELKI, Douglas S. MILLAR, Cheryl L. PAUL a Susan J. CLARK, 1997. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. **25**(21), 4422–4426. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/25.21.4422

WATANABE, Kimitsuna a Tsutomu SUZUKI, 2008. Universal Genetic Code and its Natural Variations. In: JOHN WILEY & SONS, LTD, ed. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, s. a0000810.pub2 [vid. 2021-04-04]. ISBN 978-0-470-01617-6. Dostupné z: doi:10.1002/9780470015902.a0000810.pub2

WEEKS, Andrew R., Michael TURELLI, William R. HARCUMBE, K. Tracy REYNOLDS a Ary A. HOFFMANN, 2007. From Parasite to Mutualist: Rapid Evolution of Wolbachia in Natural Populations of *Drosophila*. *PLOS Biology* [online]. **5**(5), e114. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.0050114

WHITWORTH, T.I, R.d DAWSON, H MAGALON a E BAUDRY, 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **274**(1619), 1731–1739. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2007.0062

WIEDERHOLD, Brenda K. a Stéphane BOUCHARD, 2014. Arachnophobia and Fear of Other Insects: Efficacy and Lessons Learned from Treatment Process. In: Brenda K. WIEDERHOLD a Stéphane BOUCHARD, ed. *Advances in Virtual Reality and Anxiety Disorders* [online]. Boston, MA: Springer US, Series in Anxiety and Related Disorders, s. 91–117 [vid. 2023-03-03]. ISBN 978-1-4899-8023-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4899-8023-6_5

WIESNER, Rudolf, Caspar RÜEGG a Ingo MORANO, 1992. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochemical and biophysical research communications* [online]. **183**, 553–9. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(92)90517-O

WILEY, Graham, Simone MACMIL, Chunmei QU, Ping WANG, Yanbo XING, Doug WHITE, Jianfeng LI, James D. WHITE, Alexander DOMINGO a Bruce A. ROE, 2009. Methods for generating shotgun and mixed shotgun/paired-end libraries for the 454 DNA sequencer. *Current Protocols in Human Genetics* [online]. **Chapter 18**, Unit18.1. ISSN 1934-8258. Dostupné z: doi:10.1002/0471142905.hg1801s61

WILKINS, John S, 2002. Summary of 26 species concepts. 5.

WILLIAMS, Paul H., Mark J.F. BROWN, James C. CAROLAN, Jiandong AN, Dave GOULSON, A. Murat AYTEKIN, Lincoln R. BEST, Alexandr M. BYVALTSEV, Björn CEDERBERG, Robert DAWSON, Jiaxing HUANG, Masao ITO, Alireza MONFARED,

Rifat H. RAINA, Paul SCHMID-HEMPEL, Cory S. SHEFFIELD, Peter ŠIMA a Zenghua XIE, 2012. Unveiling cryptic species of the bumblebee subgenus *Bombus s. str.* worldwide with COI barcodes (Hymenoptera: Apidae). *Systematics and Biodiversity* [online]. **10**(1), 21–56. ISSN 1477-2000, 1478-0933. Dostupné z: doi:10.1080/14772000.2012.664574

WILSON, John-James, Guo-Jie BRANDON-MONG, Han-Ming GAN a Kong-Wah SING, 2019. High-throughput terrestrial biodiversity assessments: mitochondrial metabarcoding, metagenomics or metatranscriptomics? *Mitochondrial DNA Part A* [online]. **30**(1), 60–67. ISSN 2470-1394. Dostupné z: doi:10.1080/24701394.2018.1455189

WWW.DRUSOP.NATURE.CZ, (online). *Maloplošná zvláště chráněná území* [online] [vid. 2023-04-02]. Dostupné z: https://drusop.nature.cz/ost/chrobjekty/zchru/index.php?SHOW_ONE=1&ID=747

WWW.GBIF.ORG, (online). *GBIF* [online] [vid. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://www.gbif.org/>

WWW.GENOME.GOV, (online). DNA Sequencing Costs: Data. *Genome.gov* [online] [vid. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>

WWW.IABIO.EU, (online). Homepage. *IAB - Institute of Applied Biotechnologies* [online]. [vid. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://www.iabio.eu/>

WWW.ILLUMINA.COM, [b.r.]. *History of Illumina Sequencing & Solexa Technology* [online] [vid. 2023-03-24]. Dostupné z: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/illumina-sequencing-history.html>

WWW.INATURALIST.ORG, (online). iNaturalist. *iNaturalist* [online] [vid. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://www.inaturalist.org/>

WWW.NANOPORETECH.COM, online. Company history. *Oxford Nanopore Technologies* [online] [vid. 2023-03-29]. Dostupné z: <https://nanoporetech.com/about-us/history>

WWW.NATURABOHEMICA.CZ, (online). *Anthaxia candens* - krasec třešňový | *Buprestidae* - krascovití | *Natura Bohemica* [online] [vid. 2023-04-02]. Dostupné z: <http://www.naturabohemica.cz/anthaxia-candens/>

WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV, (online). *Genome List - Genome - NCBI* [online] [vid. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/organelles/>

WWW.PRAHA-PRIRODA.CZ, (online). *Housle* | *Pražská příroda* [online] [vid. 2023-04-02]. Dostupné z: <http://www.praha-priroda.cz/chranena-priroda/zvlaste-chranena-uzemi/housle/>

WWW.THERMOFISHER.COM, (online). *Thermo Fisher Scientific Completes Acquisition of Life Technologies Corporation - CZ* [online] [vid. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/about-us/news-gallery/press-releases/2014/thermo-fisher-scientific-completes-acquisition-of-life-technologies-corporation.html>

WWW.TWISTBIOSCIENCE.COM, (online). *Twist Bioscience | We lead innovation in DNA synthesis* [online] [vid. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://www.twistbioscience.com/>

ZHANG, D.-X. a G. M. HEWITT, 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology* [online]. **6**(2), 143–150. ISSN 1365-2583. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1997.tb00082.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1997.tb00082.x)

ZHANG, Hua, Gan-Lin ZHANG, Yu-Guo ZHAO, Wen-Jun ZHAO a Zhi-Ping QI, 2007. Chemical degradation of a Ferralsol (Oxisol) under intensive rubber (*Hevea brasiliensis*) farming in tropical China. *Soil and Tillage Research* [online]. **93**(1), 109–116. ISSN 0167-1987. Dostupné z: [doi:10.1016/j.still.2006.03.013](https://doi.org/10.1016/j.still.2006.03.013)

ZHENG, Zongli, Abdolreza ADVANI, Öjar MELEFORS, Steve GLAVAS, Henrik NORDSTRÖM, Weimin YE, Lars ENGSTRAND a Anders F. ANDERSSON, 2010. Titration-free massively parallel pyrosequencing using trace amounts of starting material. *Nucleic Acids Research* [online]. **38**(13), e137. ISSN 0305-1048. Dostupné z: [doi:10.1093/nar/gkq332](https://doi.org/10.1093/nar/gkq332)

ZICHA, Ondrej, 1997. *BioLib: Biological library* [online] [vid. 2023-02-26].
Dostupné z: <https://www.biolib.cz/>

ZIMMERMAN ZUCKERMAN, Eric, Joseph A. THOMPSON, Amber R. SCHNEIDER, Michael B. CAMPION, Jennifer J. JOHNS, Theodore J. STIER, Lisa M. PETERSON, Amanda M. WARD, Joseph H. BLOMMEL, Rohan D. GNANAOLIVU, Kimberly P. LAUER, Gopinath SIVASANKARAN, Jagadheshwar BALAN, Surendra DASARI, Yuta SAKAI, Cherisse A. MARCOU, Gang ZHENG, Kevin C. HALLING, Wei SHEN, David S. VISWANATHA a Zhiyong NIU, 2022. Automation of hybridization and capture based next generation sequencing library preparation requires reduction of on-deck bead binding and heated wash temperatures. *SLAS Technology* [online]. **27**(3), 214–218. ISSN 2472-6303. Dostupné z: [doi:10.1016/j.slast.2021.10.016](https://doi.org/10.1016/j.slast.2021.10.016)

| Číslo vzorku | Druh | snost určení za čas | Přesnost určení (1/T) | t |
|--------------|------------------------------|---------------------|-----------------------|----------|
| 1 | <i>Tenebrio molitor</i> | 53,26904417 | 1 | 0,018773 |
| 2 | <i>Tenebrio molitor</i> | 53,26904417 | 1 | 0,018773 |
| 3 | <i>Tenebrio molitor</i> | 53,26904417 | 1 | 0,018773 |
| 4 | <i>Zophobas morio</i> | 0,002637604 | 4,95148E-05 | 0,018773 |
| 5 | <i>Alphitobius sp.</i> | 2,959391343 | 0,055555556 | 0,018773 |
| 6 | <i>Alphitobius sp.</i> | 2,959391343 | 0,055555556 | 0,018773 |
| 7 | <i>Alphitobius sp.</i> | 2,959391343 | 0,055555556 | 0,018773 |
| 8 | <i>Alphitobius sp.</i> | 2,959391343 | 0,055555556 | 0,018773 |
| 9 | <i>Alphitobius sp.</i> | 2,959391343 | 0,055555556 | 0,018773 |
| 10 | <i>Blatta sp.</i> | 7,609863453 | 0,142857143 | 0,018773 |
| 11 | <i>Blatta sp.</i> | 7,609863453 | 0,142857143 | 0,018773 |
| 12 | <i>Steatoda triangulosa</i> | 0,00112446 | 2,11091E-05 | 0,018773 |
| 13 | <i>Dermestes sp.</i> | 53,26904417 | 1 | 0,018773 |
| 14 | <i>Acheta domesticus</i> | 53,26904417 | 1 | 0,018773 |
| 15 | <i>Acheta domesticus</i> | 53,26904417 | 1 | 0,018773 |
| 16 | <i>Ips sp.</i> | 1,268310576 | 0,023809524 | 0,018773 |
| 17 | Scolytinae | 0,04616035 | 0,000866551 | 0,018773 |
| 18 | Scolytinae | 0,04616035 | 0,000866551 | 0,018773 |
| 19 | Scolytinae | 0,04616035 | 0,000866551 | 0,018773 |
| 20 | Scolytinae | 0,04616035 | 0,000866551 | 0,018773 |
| 21 | Scolytinae | 0,04616035 | 0,000866551 | 0,018773 |
| 22 | <i>Pholcus phalangioides</i> | 53,26904417 | 1 | 0,018773 |
| 23 | <i>Oniscus asellus</i> | 0,004814193 | 9,03751E-05 | 0,018773 |
| 24 | Psychodidae | 0,016166629 | 0,00030349 | 0,018773 |
| 25 | Psychodidae | 0,016166629 | 0,00030349 | 0,018773 |
| 26 | Scarabaeoidea | 5,54382E-05 | 1,04072E-06 | 0,018773 |
| 27 | Scarabaeoidea | 5,54382E-05 | 1,04072E-06 | 0,018773 |
| 28 | Scarabaeoidea | 5,54382E-05 | 1,04072E-06 | 0,018773 |
| | Cletem: | 404,44 | 7,59 | |
| | Průměr: | 14,44 | 0,27 | |
| | h/kus | | | |
| Čas na rod: | 0,0069 | | | |
| Čas na druh: | 0,0119 | | | |
| Celkový čas: | 0,0188 | | | |

Tabulka 8: Tabulka zobrazující určování č.3 standardního vzorku tradiční metodou

| Číslo vzorku | Druh | Přesnost určení za čas (P _T) | Přesnost určení (1/T) | t |
|--------------|-----------------------------|--|-----------------------|-------------|
| 1 | Tenebrionidae | 0,005024445 | 4,95148E-05 | 0,009854772 |
| 2 | Tenebrionidae | 0,005024445 | 4,95148E-05 | 0,009854772 |
| 3 | Tenebrionidae | 0,005024445 | 4,95148E-05 | 0,009854772 |
| 4 | Insecta | 0,000105606 | 1,04072E-06 | 0,009854772 |
| 5 | Tenebrionidae | 0,005024445 | 4,95148E-05 | 0,009854772 |
| 6 | Tenebrionidae | 0,005024445 | 4,95148E-05 | 0,009854772 |
| 7 | Tenebrionidae | 0,005024445 | 4,95148E-05 | 0,009854772 |
| 8 | Tenebrionidae | 0,005024445 | 4,95148E-05 | 0,009854772 |
| 9 | Tenebrionidae | 0,005024445 | 4,95148E-05 | 0,009854772 |
| 10 | Blatodea | 0,012673122 | 0,000124891 | 0,009854772 |
| 11 | Blatodea | 0,012673122 | 0,000124891 | 0,009854772 |
| 12 | Araneae | 0,002142015 | 2,11091E-05 | 0,009854772 |
| 13 | Coleoptera | 0,000358051 | 3,52851E-06 | 0,009854772 |
| 14 | Grylloidea | 0,017818031 | 0,000175593 | 0,009854772 |
| 15 | Grylloidea | 0,017818031 | 0,000175593 | 0,009854772 |
| 16 | Scolytinae | 0,087932135 | 0,000866551 | 0,009854772 |
| 17 | Scolytinae | 0,087932135 | 0,000866551 | 0,009854772 |
| 18 | Scolytinae | 0,087932135 | 0,000866551 | 0,009854772 |
| 19 | Scolytinae | 0,087932135 | 0,000866551 | 0,009854772 |
| 20 | Scolytinae | 0,087932135 | 0,000866551 | 0,009854772 |
| 21 | Scolytinae | 0,087932135 | 0,000866551 | 0,009854772 |
| 22 | <i>Pholcus</i> sp. | 0,243342168 | 0,002398082 | 0,009854772 |
| 23 | Isopoda | 0,00917069 | 9,03751E-05 | 0,009854772 |
| 24 | <i>Clogmia albipunctata</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009854772 |
| 25 | <i>Clogmia albipunctata</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009854772 |
| 26 | Insecta | 0,000105606 | 1,04072E-06 | 0,009854772 |
| 27 | Insecta | 0,000105606 | 1,04072E-06 | 0,009854772 |
| 28 | Insecta | 0,000105606 | 1,04072E-06 | 0,009854772 |
| | Cletem: | 203,83 | 2,01 | 0,27593361 |
| | Průměr: | 7,28 | 0,07 | |
| | | | | |
| | h/kus | | | |
| Čas na rod: | 0,0069 | | | |
| Čas na druh: | 0,0030 | | | |
| Celkový čas: | 0,0099 | | | |

Tabulka 9: Tabulka zobrazující určování č.4 standardního vzorku tradiční metodou

| Číslo vzorku | Druh | Přesnost určení za čas (P_{TM}) | Čas určení (1/ T_d) | T_d/T | t | Pokrytí druhů v železi |
|--------------------------|--|-------------------------------------|------------------------|---------|------|------------------------|
| 1 | Tenebrio molitor, Linnaeus 1758 | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,031 |
| 2 | Tenebrio molitor, Linnaeus 1758 | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,031 |
| 3 | Tenebrio molitor, Linnaeus 1758 | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,031 |
| 4 | Tenebrio molitor, Linnaeus 1758 (larva) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,031 |
| 5 | Alphitobius diaperinus (Panzer, 1797) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,031 |
| 6 | Alphitobius diaperinus (Panzer, 1797) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,031 |
| 7 | Alphitobius diaperinus (Panzer, 1797) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,031 |
| 8 | Alphitobius diaperinus (Panzer, 1797) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,031 |
| 9 | Alphitobius diaperinus (Panzer, 1797) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,031 |
| 10 | Blatta orientalis, Linnaeus 1758 | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 17,516 |
| 11 | Blatta orientalis, Linnaeus 1758 | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 17,516 |
| 12 | Meta menardi, (Latreille, 1804) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 21,660 |
| 13 | Dermestes sp., Linnaeus 1758 | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 21,550 |
| 14 | Acheta domesticus, (Linnaeus 1758) (nymfa) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,586 |
| 15 | Acheta domesticus, (Linnaeus 1758) (nymfa) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 5,586 |
| 16 | Ips typographus (Linnaeus, 1758) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 82,496 |
| 17 | Polygraphus poligraphus (Linnaeus, 1758) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 82,496 |
| 18 | Polygraphus poligraphus (Linnaeus, 1758) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 82,496 |
| 19 | Polygraphus poligraphus (Linnaeus, 1758) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 82,496 |
| 20 | Polygraphus poligraphus (Linnaeus, 1758) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 82,496 |
| 21 | Polygraphus poligraphus (Linnaeus, 1758) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 82,496 |
| 22 | Pholcus phalangioides (Fuesslin, 1775) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 29,496 |
| 23 | Porcellionides pruinosus (Brandt, 1833) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 15,273 |
| 24 | Clogmia albipunctata (Williston, 1893) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 16,601 |
| 25 | Clogmia albipunctata (Williston, 1893) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 16,601 |
| 26 | Cephalcia abietis (Linnaeus, 1758) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 85,047 |
| 27 | Cephalcia abietis (Linnaeus, 1758) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 85,047 |
| 28 | Cephalcia abietis (Linnaeus, 1758) | 7,778 | 1,000 | 1,000 | 0,13 | 85,047 |
| Cílekem: | | 217,78 | 28,00 | | | |
| Průměr: | | 7,78 | 1,00 | | | |
| Čas molekulárních metod: | | h | | | | |
| DNA izolace: | | 5 | | | | |
| TELL-Seq: | | 3 | | | | |
| Hyb-cap: | | 8 | | | | |
| Analýza dat: | | 2 | | | | |
| Čas na vzorek: | | 3,6 | | | | |
| Průměrný čas na jedince: | | 0,13 | | | | |

Tabulka 10: Tabulka zobrazující určování standardního vzorku molekulární metodou

| Číslo vzorku | Druh | Čas určení za kus | Čísnost určení (kusů) | t |
|--------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|--------|
| 1 | <i>Chorthippus mollis</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 2 | <i>Chorthippus mollis</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 3 | <i>Chorthippus mollis</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 4 | <i>Chorthippus mollis</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 5 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 6 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 7 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 8 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 9 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 10 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 11 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 12 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 13 | <i>Pholidoptera griseoptera</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 14 | <i>Pholidoptera griseoptera</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 15 | <i>Conocephalus fuscus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 16 | <i>Conocephalus fuscus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 17 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 18 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 19 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 20 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 21 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 22 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 23 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 24 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 25 | <i>Chorthippus mollis</i> | 120,9386 | 1,0000 | 0,0083 |
| 26 | <i>Chorthippus sp. (nymfa)</i> | 0,4761 | 0,0039 | 0,0083 |
| 27 | <i>Chorthippus sp. (nymfa)</i> | 0,4761 | 0,0039 | 0,0083 |
| 28 | <i>Chorthippus sp. (nymfa)</i> | 0,4761 | 0,0039 | 0,0083 |
| Clekem: | | 3024,89 | 25,01 | |
| Průměr: | | 108,03 | 0,89 | |
| h/kus | | | | |
| Čas na rod: | 0,00688 | | | |
| Čas na druh: | 0,00139 | | | |
| Celkový čas: | 0,00827 | | | |

Tabulka 11: Tabulka zobrazující určování vzorku Orthoptera tradiční metodou

| Číslo vzorku | Druh | Čas určení za čas | Čas určení (1/T)* | T _d /T | t | Pokrytí druhů | |
|--------------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|---------------|--------|
| 1 | <i>Chorthippus mollis</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 2 | <i>Chorthippus mollis</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 3 | <i>Chorthippus mollis</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 4 | <i>Chorthippus mollis</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 5 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 6 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 7 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 8 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 9 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 10 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 11 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 12 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 13 | <i>Chorthippus paralellus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 13,030 |
| 14 | <i>Phalidoptera griseoptera</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 13,030 |
| 15 | <i>Phalidoptera griseoptera</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 13,030 |
| 16 | <i>Conocephalus fuscus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 13,030 |
| 17 | <i>Conocephalus fuscus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 18 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 19 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 20 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 21 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 22 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 23 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 24 | <i>Chorthippus biguttulus</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 25 | <i>Chorthippus mollis</i> | 7,778 | 1,000 | | 1,000 | 0,13 | 14,575 |
| 26 | <i>Chorthippus sp.</i> | 0,005 | 0,001 | | 0,169 | 0,13 | 14,575 |
| 27 | <i>Chorthippus sp.</i> | 0,005 | 0,001 | | 0,169 | 0,13 | 14,575 |
| 28 | <i>Chorthippus sp.</i> | 0,005 | 0,001 | | 0,169 | 0,13 | 14,575 |
| | Cletem: | 194,46 | 25,00 | | | | |
| | Průměr: | 6,94 | 0,89 | | | | |
| Čas molekulárních metod: | h | | | | | | |
| DNA izolace: | 5 | | | | | | |
| TELL-Seq: | 3 | | | | | | |
| Hyb-cap: | 8 | | | | | | |
| Analýza dat: | 2 | | | | | | |
| Čas na vzorek: | 3,6 | | | | | | |
| Průměrný čas na jedince: | 0,13 | | | | | | |

Tabulka 12: Tabulka zobrazující určování vzorku Orthoptera molekulární metodou

| Číslo vzorku | Druh | Přesnost určení za čas (P _T) | Čas určení (t) | t |
|--------------|---------------------------------|--|----------------|-------|
| 1 | <i>Carabus sp.</i> (larva) | 0,028 | 0,001 | 0,038 |
| 2 | <i>Agrypnus murinus</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 3 | <i>Stelidota geminata</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 4 | <i>Stelidota geminata</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 5 | <i>Pterostichus melas</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 6 | <i>Pterostichus melas</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 7 | <i>Pterostichus melas</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 8 | <i>Abax carinatus</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 9 | <i>Abax carinatus</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 10 | <i>Abax carinatus</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 11 | <i>Silpha obscura</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 12 | <i>Trechus quadristriatus</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 13 | <i>Trechus quadristriatus</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 14 | <i>Otiorhynchus raucus</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 15 | <i>Otiorhynchus raucus</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 16 | <i>Otiorhynchus ovatus</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 17 | <i>Odedemera podagraria</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 18 | <i>Ceutorhynchus assimilis</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 19 | <i>Epuraea ocularis</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 20 | <i>Sitona lineata</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 21 | <i>Sitona lineata</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 22 | <i>Sitona lineata</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 23 | <i>Sitona lineata</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 24 | <i>Corticaria gibbosa</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 25 | <i>Xyleborus saxesseni</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 26 | <i>Polygraphus grandiclava</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 27 | <i>Chaetocnema concinna</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| 28 | <i>Hypocasida subferruginea</i> | 26,502 | 1,000 | 0,038 |
| | Cletem: | 715,58 | 27,00 | |
| | Průměr: | 25,56 | 0,96 | |
| | h/kus | | | |
| Čas na rod: | 0,0069 | | | |
| Čas na druh: | 0,0309 | | | |
| Celkový čas: | 0,0377 | | | |

Tabulka 13: Tabulka zobrazující určování vzorku Coleoptera tradiční metodou

| Číslo vzorku | Druh | st určení za časť | určení (1/T _a /T | t | Pokrytí druhí | |
|--------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------|---------------|-------------|
| 1 | <i>Carabus sp.</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,48005409 |
| 2 | <i>Agrypnus murinus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 13,7283562 |
| 3 | <i>Stelidota geminata</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 7,476222075 |
| 4 | <i>Stelidota geminata</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 7,476222075 |
| 5 | <i>Pterostichus melas</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,48005409 |
| 6 | <i>Pterostichus melas</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,48005409 |
| 7 | <i>Pterostichus melas</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,48005409 |
| 8 | <i>Abax carinatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,48005409 |
| 9 | <i>Abax carinatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,48005409 |
| 10 | <i>Abax carinatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,48005409 |
| 11 | <i>Silpha obscura</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 49,53271028 |
| 12 | <i>Trechus quadristriatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,48005409 |
| 13 | <i>Trechus quadristriatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,48005409 |
| 14 | <i>Otiorhynchus raucus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 9,730170597 |
| 15 | <i>Otiorhynchus raucus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 9,730170597 |
| 16 | <i>Otiorhynchus ovatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 9,730170597 |
| 17 | <i>Oedemera podagrariae</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 13,48547718 |
| 18 | <i>Ceutorhynchus assimilis</i> | 0,007530599 | 0,00096822 | 0,446601942 | 0,13 | 9,730170597 |
| 19 | <i>Eपुरaea ocularis</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 7,476222075 |
| 20 | <i>Sitona lineatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 9,730170597 |
| 21 | <i>Sitona lineatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 9,730170597 |
| 22 | <i>Sitona lineatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 9,730170597 |
| 23 | <i>Sitona lineatus</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 9,730170597 |
| 24 | <i>Corticaria gibbosa</i> | 0,008164455 | 0,001049716 | 0,315789474 | 0,13 | 10 |
| 25 | <i>Xyleborinus saxeseni</i> | 0,032144097 | 0,004132813 | 0,575 | 0,13 | 82,49566724 |
| 26 | <i>Polygraphus grandiclava</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 82,49566724 |
| 27 | <i>Chaetocnema concinna</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 6,087914289 |
| 28 | <i>Hypocassida subferruginea</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 6,087914289 |
| | Cletem: | 194,49 | 25,01 | | | |
| | Průměr: | 6,95 | 0,89 | | | |

Tabulka 14: Tabulka zobrazující určování vzorku Coleoptera molekulární metodou

| Číslo vzorku | Druh | Čas určení za čas (P ₁) | Čas určení (P ₂) | t |
|--------------|--|-------------------------------------|------------------------------|----------|
| 1 | <i>Pisaura mirabilis</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 2 | <i>Pisaura mirabilis</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 3 | <i>Pisaura mirabilis</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 4 | <i>Pisaura mirabilis</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 5 | <i>Pisaura mirabilis</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 6 | <i>Xysticus</i> spp. (juvenilní stádium) | 0,22041023 | 0,003484321 | 0,015808 |
| 7 | <i>Xysticus</i> spp. (juvenilní stádium) | 0,22041023 | 0,003484321 | 0,015808 |
| 8 | <i>Xysticus</i> spp. (juvenilní stádium) | 0,22041023 | 0,003484321 | 0,015808 |
| 9 | <i>Xysticus</i> spp. (juvenilní stádium) | 0,22041023 | 0,003484321 | 0,015808 |
| 10 | <i>Xysticus</i> spp. (juvenilní stádium) | 0,22041023 | 0,003484321 | 0,015808 |
| 11 | <i>Xysticus</i> spp. (juvenilní stádium) | 0,22041023 | 0,003484321 | 0,015808 |
| 12 | <i>Xysticus</i> spp. (juvenilní stádium) | 0,22041023 | 0,003484321 | 0,015808 |
| 13 | <i>Anyphaena accentuata</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 14 | <i>Philodromus</i> cf. <i>Cespitum</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 15 | <i>Aculepeira ceropegia</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 16 | <i>Tetragnatha</i> sp. (juvenilní stádium) | 0,194042135 | 0,003067485 | 0,015808 |
| 17 | <i>Mangora acalypha</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 18 | <i>Mangora acalypha</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 19 | <i>Ebrechtella tricuspida</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 20 | <i>Ebrechtella tricuspida</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 21 | <i>Ebrechtella tricuspida</i> (juvenilní stádium) | 63,25773587 | 1 | 0,015808 |
| 22 | <i>Araniella</i> sp. (juvenilní stádium) | 3,721043286 | 0,058823529 | 0,015808 |
| 23 | Araneidae (juvenilní stádium) | 0,020294429 | 0,000320821 | 0,015808 |
| 24 | Araneidae (juvenilní stádium) | 0,020294429 | 0,000320821 | 0,015808 |
| 25 | Araneidae (juvenilní stádium) | 0,020294429 | 0,000320821 | 0,015808 |
| 26 | Theridiidae (juvenilní stádium) | 0,024376777 | 0,000385356 | 0,015808 |
| 27 | Theridiidae (juvenilní stádium) | 0,024376777 | 0,000385356 | 0,015808 |
| 28 | Theridiidae (juvenilní stádium) | 0,024376777 | 0,000385356 | 0,015808 |
| | Cletem: | 827,94 | 13,09 | |
| | Průměr: | 29,57 | 0,47 | |
| | | | | |
| | h/kus | | | |
| Čas na rod: | 0,0069 | | | |
| Čas na druh: | 0,0089 | | | |
| Celkový čas: | 0,0158 | | | |

Tabulka 15: Tabulka zobrazující určování vzorku Araneae tradiční metodou

| Číslo vzorku | Druh | Číselnost určení za čas (P _T) | Číselnost určení (1/T _d) | T _d /T | t | Pokrytí dr |
|-----------------------|--------------------------|---|--------------------------------------|-------------------|------|------------|
| 1 | Pisaura mirabilis | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 12,66491 |
| 2 | Pisaura mirabilis | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 12,66491 |
| 3 | Pisaura mirabilis | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 12,66491 |
| 4 | Pisaura mirabilis | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 12,66491 |
| 5 | Pisaura mirabilis | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 12,66491 |
| 6 | Xysticus spp. | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 7 | Xysticus spp. | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 8 | Xysticus spp. | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 9 | Xysticus spp. | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 10 | Xysticus spp. | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 11 | Xysticus spp. | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 12 | Xysticus spp. | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 13 | Anypaena accentuata | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 17,75244 |
| 14 | Philodromus cf. Cespitum | 0,005269497 | 0,000677507 | 0,166667 | 0,13 | 15,58642 |
| 15 | Aculepeira ceropegia | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 18,44722 |
| 16 | Tetragnatha sp. | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 21,65992 |
| 17 | Mangora acalypha | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 18,44722 |
| 18 | Mangora acalypha | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 18,44722 |
| 19 | Ebrechtella tricuspidata | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 20 | Ebrechtella tricuspidata | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 21 | Ebrechtella tricuspidata | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 16,34964 |
| 22 | Araniella sp. | 7,777777778 | 1 | 1 | 0,13 | 18,44722 |
| 23 | Araneidae | 0,000460309 | 5,91826E-05 | 0,184472 | 0,13 | 18,44722 |
| 24 | Araneidae | 0,000460309 | 5,91826E-05 | 0,184472 | 0,13 | 18,44722 |
| 25 | Araneidae | 0,000460309 | 5,91826E-05 | 0,184472 | 0,13 | 18,44722 |
| 26 | Theridiidae | 0,000615613 | 7,91503E-05 | 0,205395 | 0,13 | 20,5395 |
| 27 | Theridiidae | 0,000615613 | 7,91503E-05 | 0,205395 | 0,13 | 20,5395 |
| 28 | Theridiidae | 0,000615613 | 7,91503E-05 | 0,205395 | 0,13 | 20,5395 |
| | Cletem: | 163,34 | 21,00 | | | |
| | Průměr: | 5,83 | 0,75 | | | |
| nolekulárních metod: | h | | | | | |
| DNA izolace: | 5 | | | | | |
| TELL-Seq: | 3 | | | | | |
| Hyb-cap: | 8 | | | | | |
| Analýza dat: | 2 | | | | | |
| Čas na vzorek: | 3,6 | | | | | |
| nerný čas na jedince: | 0,13 | | | | | |

Tabulka 16: Tabulka zobrazující určování vzorku Araneae molekulární metodou

| Číslo vzorku | Druh | Přesnost určení za čas (P _T) | Čas určení | t |
|--------------|-----------------------|--|------------|----------|
| 1 | <i>Oscinella ma</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 2 | <i>Oscinella ma</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 3 | <i>Oscinella ma</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 4 | <i>Oscinella frit</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 5 | <i>Oscinella frit</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 6 | <i>Coenosia agr</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 7 | Limoniidae | 0,000630812 | 6,22E-06 | 0,009855 |
| 8 | <i>Opomyza pet</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 9 | <i>Geomyza trip</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 10 | <i>Scaptomyza p</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 11 | <i>Scaptomyza p</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 12 | <i>Scaptomyza p</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 13 | <i>Scaptomyza p</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 14 | <i>Pollenia sp.</i> | 0,545557442 | 0,005376 | 0,009855 |
| 15 | <i>Pollenia sp.</i> | 0,545557442 | 0,005376 | 0,009855 |
| 16 | <i>Melanostoma</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 17 | Chironomida | 0,013609668 | 0,000134 | 0,009855 |
| 18 | Chironomida | 0,013609668 | 0,000134 | 0,009855 |
| 19 | Agromyzidae | 0,031464708 | 0,00031 | 0,009855 |
| 20 | Agromyzidae | 0,031464708 | 0,00031 | 0,009855 |
| 21 | Agromyzidae | 0,031464708 | 0,00031 | 0,009855 |
| 22 | Cecidomyiida | 0,016308853 | 0,000161 | 0,009855 |
| 23 | Cecidomyiida | 0,016308853 | 0,000161 | 0,009855 |
| 24 | <i>Psilopa sp.</i> | 1,284477014 | 0,012658 | 0,009855 |
| 25 | <i>Psilopa sp.</i> | 1,284477014 | 0,012658 | 0,009855 |
| 26 | <i>Psilopa sp.</i> | 1,284477014 | 0,012658 | 0,009855 |
| 27 | <i>Opomyza flo</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| 28 | <i>Opomyza flo</i> | 101,4736841 | 1 | 0,009855 |
| | Clekem: | 1527,20 | 15,05 | |
| | Průměr: | 54,54 | 0,54 | |
| | | | | |
| | h/kus | | | |
| Čas na rod: | 0,0069 | | | |
| Čas na druh: | 0,0030 | | | |
| Celkový čas: | 0,0099 | | | |

Tabulka 17: Tabulka zobrazující určování vzorku Diptera tradiční metodou

| Číslo vzorku | Druh | st určení za čas | st určení (1/T _d /T | t | Pokrytí dr | |
|--------------------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------|-------------|------------|----------|
| 1 | <i>Oscinella maura</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,0551 |
| 2 | <i>Oscinella maura</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,0551 |
| 3 | <i>Oscinella maura</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,0551 |
| 4 | <i>Oscinella frit</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,0551 |
| 5 | <i>Oscinella frit</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 10,0551 |
| 6 | <i>Coenosia agromyzina</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 14,52959 |
| 7 | Limoniidae | 1,62008E-07 | 2,08296E-08 | 0,003350698 | 0,13 | 0,33507 |
| 8 | <i>Opomyza petrei</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 25,42373 |
| 9 | <i>Geomyza tripunctata</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 25,42373 |
| 10 | <i>Scaptomyza pallida</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 32,5433 |
| 11 | <i>Scaptomyza pallida</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 32,5433 |
| 12 | <i>Scaptomyza pallida</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 32,5433 |
| 13 | <i>Scaptomyza pallida</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 32,5433 |
| 14 | <i>Pollenia sp.</i> | 0,005620431 | 0,000722627 | 0,134408602 | 0,13 | 21,59017 |
| 15 | <i>Pollenia sp.</i> | 0,005620431 | 0,000722627 | 0,134408602 | 0,13 | 21,59017 |
| 16 | <i>Melanostoma mellinum</i> | 7,77777778 | 1 | 1 | 0,13 | 35,90924 |
| 17 | Chironomidae | 0,000476388 | 6,12499E-05 | 0,456679185 | 0,13 | 45,66792 |
| 18 | Chironomidae | 0,000476388 | 6,12499E-05 | 0,456679185 | 0,13 | 45,66792 |
| 19 | Agromyzidae | 0,000390361 | 5,01893E-05 | 0,161860465 | 0,13 | 16,18605 |
| 20 | Agromyzidae | 0,000390361 | 5,01893E-05 | 0,161860465 | 0,13 | 16,18605 |
| 21 | Agromyzidae | 0,000390361 | 5,01893E-05 | 0,161860465 | 0,13 | 16,18605 |
| 22 | Cecidomyiidae | 0,000135813 | 1,74617E-05 | 0,108646737 | 0,13 | 10,86467 |
| 23 | Cecidomyiidae | 0,000135813 | 1,74617E-05 | 0,108646737 | 0,13 | 10,86467 |
| 24 | <i>Psilopa sp.</i> | 0,023678542 | 0,003044384 | 0,240506329 | 0,13 | 11,32623 |
| 25 | <i>Psilopa sp.</i> | 0,023678542 | 0,003044384 | 0,240506329 | 0,13 | 11,32623 |
| 26 | <i>Psilopa sp.</i> | 0,023678542 | 0,003044384 | 0,240506329 | 0,13 | 11,32623 |
| 27 | <i>Opomyza florum</i> | 0,188389081 | 0,024221453 | 0,411764706 | 0,13 | 25,42373 |
| 28 | <i>Opomyza florum</i> | 0,188389081 | 0,024221453 | 0,411764706 | 0,13 | 25,42373 |
| | Cletem: | 101,57 | 13,06 | | | |
| | Průměr: | 3,63 | 0,47 | | | |
| Čas molekulárních metod: | h | | | | | |
| DNA izolace: | 5 | | | | | |
| TELL-Seq: | 3 | | | | | |
| Hyb-cap: | 8 | | | | | |
| Analýza dat: | 2 | | | | | |
| Čas na vzorek: | 3,6 | | | | | |
| Průměrný čas na jedince: | 0,13 | | | | | |

Tabulka 18: Tabulka zobrazující určování vzorku Diptera molekulární metodou