

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA

Fakulta lesnická a dřevařská

Excelentní tým pro mitigaci



## **Taxonomická identifikace hmyzu pomocí DNA barcodingu**

Autor: Jaroslav Strádal

Vedoucí práce: Ing. Jiří Synek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petr Stiblík, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jaroslav Strádal

Lesnictví

Lesnictví

Název práce

**Taxonomická identifikace hmyzu pomocí DNA barcodingu**

Název anglicky

**Taxonomical identification of insect species using DNA barcoding**

---

### Cíle práce

1. Vyhotovení literární rešerše o současném stavu poznání a využívání metody DNA barcodingu
2. Praktické využití metod DNA barcodingu pro identifikaci druhů hmyzu
3. Porovnání efektivity DNA barcodingu s tradiční metodou identifikace

### Metodika

V rámci literární rešerše se student zaměří na funkční podstatu DNA barcodingu, zavádění této metody do praxe a její využití v různých oborech. Podrobněji se bude také zabývat problematikou kryptických druhů hmyzu a využití barcodingu pro jejich efektivní určování. V praktické části pak bude student nabyté znalosti aplikovat na vybrané sadě vzorků hmyzu, který je obtížné klasickými metodami správně determinovat. Zároveň kvantifikuje rozdíl efektivity klasické a molekulární metody identifikace.

Harmonogram:

září – říjen 2020: studium vědeckých prací k pochopení podstaty metody bar-codingu

říjen 2020 – leden 2021: Identifikace materiálu pomocí klasických metod

listopad 2020: laboratorní práce s genetickým materiálem, příprava na sekvenaci

prosinec 2020: kompozice literární rešerše

leden 2021: práce se sekvencemi a vyhodnocení experiment

únor-březen 2021: kompilace textu práce

## Doporučený rozsah práce

40 stran

## Klíčová slova

DNA barcoding, moderní taxonomie, identifikace hmyzu, Hexapoda

---

## Doporučené zdroje informací

- Hebert P.D.N. & Gregory T.R. (2005) The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*, 54:5, <https://doi.org/10.1080/10635150500354886>
- Kress W.J. & Erickson D.L. (2012) DNA Barcodes: Methods and Protocols. In: Kress W.J., Erickson D. L. (eds) *DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 858. Humana Press, Totowa, NJ., [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_1)
- Schindel D.E. & Miller S.E. (2005) DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435:7038, <https://doi.org/10.1038/435017b>
- Smith M.A., Rodriguez J.J., Whitfield J.B., Deans A.R., Janzen D.H., Hallwachs W., & Hebert P.D.N. (2008) Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *PNAS*, 105:34, <https://doi.org/10.1073/pnas.0805319105>
- Valentini A., Pompanon F., & Taberlet P. (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in ecology & evolution*, 24:2, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011>

---

## Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FLD

## Vedoucí práce

Ing. Jiří Synek, Ph.D.

## Garantující pracoviště

Excelentní tým pro mitigaci

---

Elektronicky schváleno dne 22. 3. 2021

**prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.**

Vedoucí ústavu

---

Elektronicky schváleno dne 22. 3. 2021

**prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.**

Děkan

V Praze dne 08. 04. 2021

## **Čestné prohlášení o autorství**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma "Taxonomická identifikace hmyzu pomocí DNA barcodingu" vypracoval samostatně pod vedením Ing. Jiřího Synka, Ph.D. a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědom, že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze 19. dubna 2021

.....

Jméno příjmení

## Poděkování

Na začátek bych rád poděkoval svému vedoucímu Ing. Jiřímu Synkovi, Ph.D. za odborné vedení práce a za řešení veškeré administrativy. Moje největší díky ovšem patří Mgr. Petru Stiblíkovi, Ph.D., který mě zasvětil do celé problematiky DNA barcodingu, ukázal a vysvětlil práci v laboratoři a poskytoval cenné rady, bez kterých bych se při psaní této práce neobešel. Dále chci poděkovat celému týmu Termite Research Team, jehož členové mi pomohli s určováním vzorků a byli mi dobrým kolektivem.

V neposlední řadě chci také poděkovat Ing. Davidu Novákovi, který mě představil Mgr. Petru Stiblíkovi, Ph.D., bez tohoto seznámení by tato práce nejspíše nikdy nevznikla. Nakonec chci poděkovat i svým rodičům za jejich neutuchající podporu.



Termite  
Research  
Team

## **Abstrakt**

Molekulární taxonomické metody založené na identifikaci druhů pomocí sekvence DNA pronikají díky technologickému pokroku už i mimo vybavené laboratoře na terénní stanice v pralesích. Nacházejí využití jak v tradiční taxonomii, kde slouží k popisu molekulárních znaků druhů, tak při studiu světové biodiverzity pro identifikaci kryptických druhů, nebo dokonce v potravinářském průmyslu při kontrole skutečného složení potravin. Jednou z těchto metod je i DNA barcoding. Cílem této práce je vysvětlení funkční podstaty DNA barcodingu, představení jeho výhod, úskalí a využití v různých oborech, především pak při odhalování kryptických druhů hmyzu. Efektivitu DNA barcodingu byla otestována v praxi na termitech (Blattodea: Termitoidea), jelikož tato skupina skrývá velký počet značně uniformních druhů a DNA barcoding se zde dlouhodobě prosazuje. Vybraná sada druhů byla v laboratoři podrobena identifikaci pomocí DNA barcodingu a výsledky byly následně porovnány s klasickými identifikačními metodami využívajícími vnějších morfologických znaků.

**Klíčová slova:** DNA barcoding, molekulární taxonomie, identifikace hmyzu, Insecta, termiti

## **Abstract**

Molecular taxonomic methods based upon identification of a species using a DNA sequence are becoming increasingly prominent with constant technological progress, even outside a functional laboratories at field stations in the forests. They find use not only in the traditional taxonomy, where they are used to describe the molecular features of species, but also in the study of global biodiversity, for the identification of cryptic species, or in the food industry to monitor actual composition of the food. One of these methods is the DNA barcoding. The aim of this work is to explain the functional nature of DNA barcoding, to present its advantages, pitfalls and uses in various fields, especially in the detection of cryptic insect species. The effectiveness of DNA barcoding has been tested in practice on termites (Blattodea: Termitoidea), members of this super-family are fairly uniform and hard to discriminate so the DNA barcoding is of great use. The selected set of species was identified in the laboratories with DNA barcoding and the results were then compared with classical identification methods using external morphological features.

**Key words:** DNA barcoding, molecular taxonomy, identification of insects, Insecta, termites

## Obsah

1.	Úvod: .....	11
2.	Cíle práce .....	13
3.	Taxonomie a problematika nejednoznačné definice druhu .....	14
3.1.1.	Biologický druhový koncept .....	14
3.1.2.	Genetický druhový koncept .....	15
3.1.3.	Fylogenetický druhový koncept .....	15
3.1.4.	Kryptický druh .....	16
4.	Problematika určování druhů .....	17
5.	DNA Barcoding .....	20
5.1.	Metody pro získání DNA sekvence .....	20
5.1.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	21
5.1.2.	Sekvenování DNA .....	22
5.2.	Hledání ideální DNA barcode sekvence v genetickém kódu .....	23
5.2.1.	Živočišné barcodes .....	25
5.2.2.	Barcodes ostatních eukaryot a bakterií.....	27
5.3.	Barcodevé databáze .....	29
5.3.1.	CBOL.....	29
5.3.2.	BOLD .....	29
5.3.3.	INSDC .....	30
5.3.4.	iBOL .....	30
5.4.	Barcode gap .....	30
5.5.	Využití DNA barcodingu.....	31
6.	Termiti (Blattodea: Termitoidea) .....	35
7.	Porovnání efektivity DNA barcodingu s tradiční metodou identifikace .....	38
7.1.	Metodika tradičních metod identifikace.....	40
7.2.	Metodika molekulární taxonomie .....	40
7.2.1.	Izolace DNA .....	40
7.2.2.	Průběh polymerázové řetězové reakce (PCR).....	41
7.2.3.	Gelová elektroforéza.....	42
7.2.4.	Čtení sekvencí.....	43
7.3.	Výsledky molekulárních metod .....	43
7.4.	Výsledky určování druhů.....	44
8.	Diskuze .....	46
9.	Závěr .....	48
10.	Seznam citované literatury:.....	49
11.	Tabulkové přílohy .....	63
12.	Fotopřílohy.....	71



## Seznam tabulek

Tabulka 1: Počet prací (N) s frází „DNA barcode“ v názvu k roku 2012, rozděleno podle zaměření (Taylor a Harris 2012). .....	33
Tabulka 2: Seznam vzorků k experimentálnímu určení .....	39
Tabulka 3: Seznam použitých primerů a jejich sekvencí .....	41
Tabulka 4: Výsledky určování 24 vzorků termitů za využití tří různých metod .....	45
Tabulka 5: Výsledky měření koncentra a čistoty DNA pomocí NanoDropu 2000 .....	63
Tabulka 6: Výsledky Qubit měření koncentrace DNA u vzorků izolovaných z gelu ....	63
Tabulka 7: Výsledky DNA barcodingu pro gen COI.....	64
Tabulka 8: Výsledky DNA barcodingu pro gen COII .....	65
Tabulka 9: Výsledky parataxonomického určování č. 1 .....	66
Tabulka 10: Výsledky parataxonomického určování č. 2 .....	67
Tabulka 11: Výsledky parataxonomického určování č. 3 .....	68
Tabulka 12: Výsledky parataxonomického určování č. 4 .....	69
Tabulka 13: Výsledky parataxonomického určování s použitím klíče.....	70

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Graficky znázorněný průběh PCR, zdroj: (jordancuff 2021).....	22
Obrázek 2: Příklad šesti čtecích rámců u dvoušroubovice DNA, zdroj: (Brown 2002)..	24
Obrázek 3: Voják a dělníci <i>Neocapritermes taracua</i> s viditelnými modrými krystaly. Foto: Jan Šobotník.....	36
Obrázek 4: Fotografie elektroforézy č. 1 pro gen COI zobrazující jeho délku .....	71
Obrázek 5: Fotografie elektroforézy č. 2 a 3 pro geny COI (s čarou) a COII zobrazující jejich délku.....	72

## **Seznam zkratk použitých v textu**

ABGD – (Automatic Barcode Gap Discovery)

bp – jednotka počtu komplementárních párů bází (base pair)

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

ddNTP - dideoxyribonukleotid

DNA - deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)

dNTP - deoxyribonukleotid

DUI – dvojí 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)

## 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 nejrůznějších 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 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, což by přesto znamenalo, že 80 % druhů hmyzu stále čeká na svoje objevení. Největší pozornost by se tak měla věnovat nejvíce druhově bohatým řádům 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). Pro poznání skutečné biodiverzity na Zemi je proto nesmírně důležité objevování nových druhů a zdokonalování identifikačních metod.

## **2. Cíle práce**

- Vyhotovení literární rešerše o současném stavu poznání a využívání metody DNA barcodingu
- Praktické využití metod DNA barcodingu pro identifikaci druhů hmyzu
- Porovnání efektivity DNA barcodingu s tradiční metodou identifikace

### 3. Taxonomie a problematika nejednoznačné definice druhu

Druh je základní taxonomickou kategorií, přičemž taxonomie je věda zabývající se pojmenováním, 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 ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) nebo gama ( $\gamma$ ) (Mayr et al. 1969). Úkolem alfa-taxonomie je identifikace nových druhů, jejich popis, charakterizování a pojmenování 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 diskuzemi, 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.

#### 3.1.1. 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,

kteře 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 (Footit a Adler 2017).

Mezi hlavní problémy biologického druhového konceptu patří existence asexuálních nebo partenogenetických populací (Footit 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 (Footit a Adler 2017).

### **3.1.2. 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).

### **3.1.3. 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.

#### **3.1.4. Kryptický druh**

Za kryptické druhy lze považovat takové druhy, jejichž jedinci jsou dle morfologických znaků klasifikováni jako příslušníci již popsaného duhu, 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 hmyzu.



#### 4. 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 nám 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. Problémem pro tradiční morfologické metody jsou 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 potenciálně 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 podařilo 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.

## 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 zbažené 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 čárový 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).

### 5.1. Metody pro získání DNA sekvence

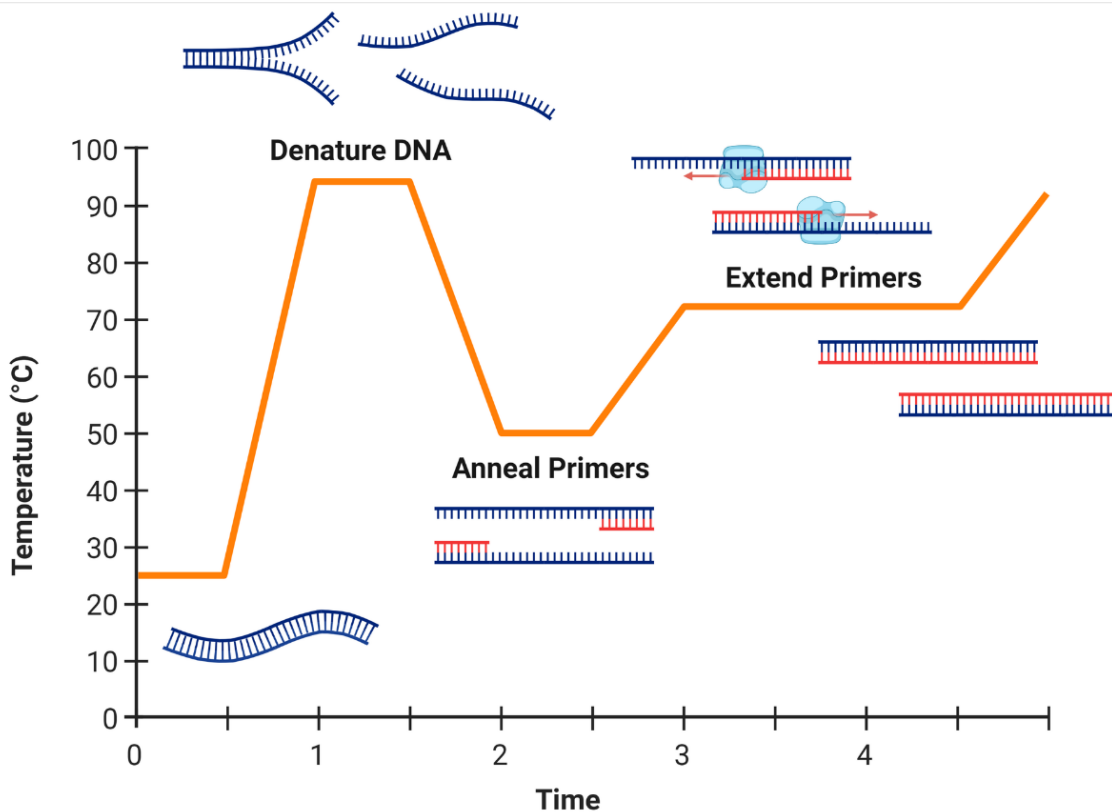
Sekvence pro DNA barcoding mají průměrně délku okolo 400 až 800 bp (Kress a Erickson 2012) a při DNA barcodingu je s nimi zacházeno následovně. Po odebrání tkáně je izolována DNA, která se použije ke specifické amplifikaci úseku DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), která dokáže i z malého fragmentu DNA vytvořit několik tisíc stejných kopií (Mullis et al. 1994). Získaná přečtená sekvence, neboli DNA barcode, je poté porovnána s již známými sekvencemi obsaženými v online

databázích a dojde k vyhodnocení potencionálních shod s druhy, které již byly sekvenovány.

### **5.1.1. 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 přidají 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 1: Graficky znázorněný průběh PCR, zdroj: (jordancuff 2021)

### 5.1.2. Sekvenování DNA

Sekvenování DNA je proces čtení pořadí nukleových bází v sekvenci DNA. Existuje mnoho metod, kterými toho lze dosáhnout. 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) 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 4 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.

Moderní alternativu k Sangerovo sekvenování dnes představují metody sekvenování nové generace, kterými jsou např. Illumina MiSeq, HiSeq a NovaSeq, nebo metody dlouhého čtení jako např. PacBio či PromethION.

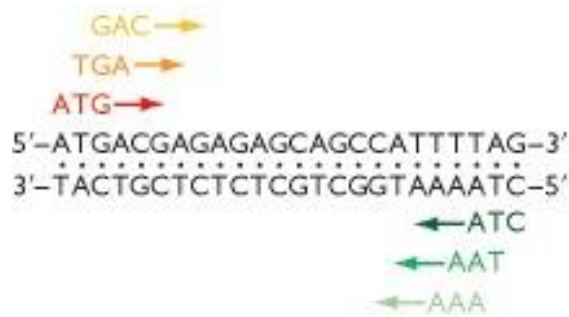
## **5.2. Hledání ideální DNA barcode sekvence v genetickém kódu**

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. Alignment je proces srovnávání / porovnávání dvou sekvencí. Sekvence jsou pomocí různých algoritmů srovnány do řad tak, aby homologické pozice v sekvenci byly uspořádány nad sebe a nukleotidy na těchto pozicích se pak použijí k výpočtu podobnosti sekvencí. Za předem daných podmínek je do výsledného alignmentu možné vkládat i mezery (Mount 2001).

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 rámeček (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).



Obrázek 2: Příklad šesti čtecích rámců u dvoušroubovice DNA, zdroj: (Brown 2002)

K vyhledávání genů a jejich ORF se dnes používají počítačové softwary, jakým je například ORF finder. Děje se tak na základě statistických metod a odhadu průměrné délky genu. Tato metoda je velice efektivní u bakterií. U eukaryot hledání genů komplikuje výskyt nekódujících úseků DNA zvaných intronů (Alberts 2002). Ty se po přepisu DNA do RNA vystřihnou během procesu zvaného RNA splicing a ve výsledné mRNA se pak již nevyskytují a zůstávají pouze kódující exony. Geny eukaryot jsou tedy často rozděleny introny a v DNA sekvenci se tak neobjevují jako nepřerušovaný otevřený čtecí rámec, na rozdíl od bakterií. Pokračování čtení sekvence do intronu tak může vést k chybnému výkladu, nalezení stop kodonu a ukončení ORF (Brown 2002).

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 barcode 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 sekvenování více fragmentů DNA paralelně za využití méně specifických primerů nebo i zcela bez nich (Liu et al. 2020).

### **5.2.1. Živočišné barcodey**

Největší pozornosti, jako zdroji ideální DNA barcode sekvence, se v živočišné říši těší mitochondriální DNA. Mitochondrie je membránová semiautonomní 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 tkáň / 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).

První studie se zpočátku zaměřovaly na mitochondriální geny (12S, 16S) kódující ribosomální RNA, ale od jejich širšího využití bylo upuštěno z důvodu častého výskytu indelů, inserce a delecí bází, což vedlo k problémům při sekvenčním alignementu (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 delecce bází se vyskytují sporadicky, narušují 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, environmentální 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, 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 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).

### **5.2.2. Barcody 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 (Pawlowski 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).

### **5.3. 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.

#### **5.3.1. 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).

#### **5.3.2. BOLD**

První databází založenou čistě za účelem shromažďování standardizovaných DNA barcodů byl The Barcode of Life Data System (BOLD). Od svého založení v roce 2005 je neocenitelným pracovním nástrojem, který 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>, kde v současné době shromažďuje přes 12 milionů barcode sekvencí pocházejících z více než 300 tisíc druhů. Záznamy obsahují veškeré informace týkající se kvality, délky sekvence, použitých primerů a podobně. Také zde lze nalézt bibliotéku článků a publikací zabývajících se DNA barcodingem, které jsou zapojeny v sdružení CBOL (Ratnasingham a Hebert 2007).

### **5.3.3. 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 (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).

### **5.3.4. 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, sekvenčních 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](http://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.

## **5.4. 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 předpokládán 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 studii, 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.

Takto vyzorovaná definice se setkala s kritikou a bylo poukázáno na její náchylnost k chybám I a II stupně, tedy k falešným pozitivům a falešným negativům. Za falešně pozitivní může být například označen nově vzniklý taxon, u něhož je mezidruhová variabilita menší, než se předpokládá. Falešný negativ může zase nastat u biologických druhů, kde je mezidruhová divergence menší než barcoding gap (Meyer a Paulay 2005). V některých studiích se výskyt barcoding gap dokonce nepovedlo potvrdit, a jeho nalezení ostatními studii bylo označeno za artefakt vzniklý nedostatečným počtem vzorků (Meyer a Paulay 2005; Wiemers a Fiedler 2007).

K nalezení barcoding gap a k rozřídění 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).

## **5.5. 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 soumračnickovitých (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 průlomu v oblasti molekulární taxonomie a nastínění skutečné biodiverzity se podařilo dosáhnout u řádu Hymenoptera v Kostarice. Ve studii bylo podrobena 2 597 jedinců parazitoidních vosiček (Hymenoptera: „Parasitica“) ze šesti rodů (*Alphomelon*, Mason 1981; *Apanteles*, Förster 1862; *Cotesia*, Cameron 1891; *Dolichogenidea*, Viereck 1911; *Glyptapanteles*, Ashmead 1904; a *Microplitis*, Förster 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 soumračnickovitých. 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  $\alpha$ -úrovni (Smith et al. 2008).

<b>Taxon</b>	<b>N*</b>	<b>(%)</b>
Bezobratlí (Invertebrata)	186	53
Rostliny (Plantae)	55	16
Ryby (Osteichthyes)	37	10
Ptáci (Aves)	18	5
Protisté (Protist)	18	5
Houby (Fungi)	14	4
Savci (Mammalia)	9	3
Obojživelníci (Amphibia)	8	2
Plazi (Reptilia)	5	1

\* několik prací zkoumalo více taxonů

Tabulka 1: Počet prací (N) s frází „DNA barcode“ v názvu k roku 2012, rozděleno podle zaměření (Taylor a Harris 2012).

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

prvoků *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).

Další oblastí, kde se DNA barcodingu hojně využívá, je potravinářský průmysl. Jak bylo okrajově zmíněno v kapitole „4.2.1. Živočišné markery“, chybné označování a zaměňování druhů ryb a mořských plodů za jiné se zdá být přetrvávajícím problémem. Na území USA jsou například platýs obecný (*Hippoglossus hippoglossus* (Linnaeus, 1758)) a chňapal červený (*Lutjanus colorado* Jordan & Gilbert, 1882) v  $\geq 75\%$  nahrazovány jinými druhy, ale stále prodávány pod těmito jmény (Wong a Hanner 2008; Khaksar et al. 2015; Willette et al. 2017). Ať už je motivace pro toto zaměňování jakákoliv DNA barcoding se ukazuje jako silný spojenec v boji s nekalými obchodními praktikami.

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).

## 6. Termiti (Blattodea: Termitoidea)

Jako modelový organismus pro otestování DNA barcodingu byli vybráni termiti. Identifikace termitů je převážně založena na kastě vojáků, protože ostatní kasty jsou poměrně uniformní a okřídlení dospělci s druhově specifickou křídelní žilnatinou se vyskytují pouze po omezenou dobu. U některých skupin termitů jsou však i kasty vojáků k nerozeznání, případně jsou vojáci vzácní nebo zcela chybí. Bezvojákátí hlínožraví termiti se pak určují především podle anatomie enterické valvy v zadním střevě (Noirot 2001; Brune a Dietrich 2015). Jak identifikace na základě morfologie kasty vojáků, tak identifikace na základě morfologie a anatomie střeva a jeho částí jsou značně časově náročné a nelze je aplikovat univerzálně na všechny druhy termitů (Korb et al. 2019). Zároveň ale u termitů nebývá problém získat dostatek živých tkání pro izolaci DNA. Proto se ještě před samotnou praktickou částí na tento zajímavý a relativně málo prozkoumaný taxon podíváme blíže. Sice se nejedná o u nás významný druh, ale i přesto má v Čechách výzkum termitů tradici od 60. let 20. století a působí zde celosvětově uznávaní termitologové. V oblastech tropického a subtropického pásma jsou termiti jednou z nejdůležitějších skupin hmyzu s masivním dopadem na ekosystém a globální klima.

Termiti byli ještě do nedávna řazeni do samostatného řádu všekazi (Isoptera Brullé, 1832). Díky pokrokům v molekulární taxonomii a fylogenetickým studiím, které se zabývají evolucí organismů, jsou nyní řazeni jako sesterský taxon k čeledi dřevožravých švábů *Cryptoceridae* Scudder, 1862 do řádu Blattodea Latreille, 1810, který nyní sdružuje šváby a termity. Bez této změny by řád Blattodea byl neúplným (parafyletickým) taxonem, jelikož by nesdružoval všechny potomky společného předka. Termiti tedy i přes svoje přízvisko bílých mravenců z vývojového hlediska s mravenci nic společného nemají (Inward et al. 2007).

Termiti byli prvními organismy, u nichž se někdy před ~130 miliony lety vyvinula eusocialita (Martínez-Delclòs a Martinell 1995; Harrison et al. 2018). Eusocialita je společné soužití více členů jednoho druhu, kde dochází k dělbě práce, k péči o potomstvo, soužitím více generací a systémem kast, ve kterém je reprodukce vyhrazena pouze některým, zatímco většina členů eusociálního společenství se nerozmnožuje (Crespi a Yanega 1995). U termitů lze nalézt tři základní kasty, každou s přesně danou funkcí potřebnou pro chod kolonie. Zajímavostí je, že všechny larvy, první juvenilní instary, jsou po vylíhnutí stejné a dále se vyvíjejí podle potřeby kolonie na základě vnějších faktorů

(Noirot 1985). Nejpočetnější kasty tvoří dělníci, jimiž jsou sterilní samci i samice. Jejich úkolem je obstarávat potravu, pečovat o vajíčka a ostatní kasty a stavět i opravovat hnízdo. Kastou určenou pro obranu kolonie jsou vojáci, kteří jsou pro specifický způsob obrany dokonale morfologicky uzpůsobeni. Vojáci většinou brání hnízdo za pomoci zvětšené hlavy s tvrdým exoskeletem a kusadly, nebo pomocí jiných více specializovaných obraných strategií jako je vystřikování toxických či repelentních látek z protáhlého výstupku na hlavě (Prestwich 2003; Šobotník et al. 2010). Přesto u některých druhů termitů může kasta vojáků chybět a o obranu se pak starají velice agresivní dělníci, jako například u podčeledi Apicotermatinae (Grassé & Noirot, 1955). V obraně hnízda dokáží pomoci i dělníci vojákatého druhu *Neocapritermes taracua* (Termitidae: Termitinae) a to dokonce za cenu svého života. V bezvýhodné situaci smísí obsah slinných žláz se specializovanými modrými krystaly, což vede k explozivní reakci, která má za výsledek erupci toxické látky skrz roztrženou tělní stěnu (Šobotník et al. 2012).



Obrázek 3: Voják a dělníci *Neocapritermes taracua* s viditelnými modrými krystaly. Foto: Jan Šobotník

Za zakládání kolonií a nových hnízd, která mohou být nadzemní, podzemní nebo uvnitř odumřelých stromů, je zodpovědný královský pár, který je hlavní reprodukční kastou v kolonii. Při procesu zvaném rojení opouštějí potentní okřídlení termiti obou pohlaví hnízdo a po takzvaném snubním letu si vyberou reprodukčního partnera a zakládají nové kolonie. Po usazení svá křídla odhazují a létací svaly přemění ve zdroj

energie metabolismu. Královský pár je tvořen většinou jednou samičkou a samcem (Bignell et al. 2011).

Kromě eusociality náleží termitům ještě jedno prvenství, a to v „zemědělství“, konkrétně v pěstování hub (Bignell et al. 2011). Kromě termitů se toto symbiotické soužití s houbami později vyvinulo u dvou dalších taxonů, a to u mravenců (Mueller et al. 2001) a ambróziových kůrovců (Farrell et al. 2001).

Největší přínos termitů plyne z jejich role rozkladačů. Jejich jídelníček se skládá z čehokoliv rostlinného původu, ať se jedná o opad, tlející dřevo nebo humus (Khan et al. 2018). Jsou schopni za rok zkonzumovat až 100% mrtvého dřeva ve svém okolí (Engel et al. 2009; Bezerra-Gusmão et al. 2011) a až polovinu ročního opadu (Brauman 2000), navracejí tak mnoho živin zpátky do půdy. Jsou důležití pro udržování její úrodnosti, protože v tropických oblastech půda při zemědělském využití rychle degraduje. Také tvorba termitích staveb, především podzemních chodeb, pomáhá provětrávat půdu a usnadňuje tak vstřebávání vody. V suchých oblastech, například v Africe, vedl výskyt termitů podle experimentu k až 36 % nárůstu produkce obilí (Evans et al. 2011). I přes všechny tyto pozitivní vlivy na svoje okolí je na termity nahlíženo hlavně jako na škůdce požírající dřevěné stavby a úrodu, přitom z přibližně popsanych 3 000 druhů je jen 185 druhů potvrzenými škůdci (Jouquet et al. 2011).

## 7. Porovnání efektivity DNA barcodingu s tradiční metodou identifikace

Důležitým cílem této bakalářské práce je porovnání efektivnosti DNA barcodingu oproti tradiční metodě identifikace, pro kterou byli využiti termitologové dostupní v ČR. Ačkoli žádný z oslovených není specializován na taxonomii termitů, vzhledem k počtu termitích druhů jsou i běžní termitologové schopni se základním vybavením přibližně určit druhy a rody. Za účelem porovnání obou metod bylo připraveno 24 vzorků termitů uchovaných v 80% ethanolu, které byly získány ze sbírky Termite Research Team z České zemědělské univerzity v Praze. Záměrně byly vybrány vzorky z Ameriky, neboť není druhově tak bohatá jako Afrika, a všichni oslovení termitologové zde v minulosti termity sbírali a mají s vybranými taxony zkušenosti. Zkumavky vždy obsahovaly alespoň dva zástupce kasty dělníků i vojáků za účelem usnadnění identifikace, která se většinou soustřeďuje právě na morfologickou odlišnost vojáků mezi jednotlivými druhy (Wang *et al.* 2009; Arif *et al.* 2019).

Přesnost určení byla kvantifikována jako počet druhů (T) spadající pod nejnižší taxon, který sdružoval určený taxon a druh uvedený v Tabulce 2. Přesnost jednotlivých určení byla vztažena na průměrný čas (t) potřebný k určení. Následně byly hodnoty sečteny a vyděleny počtem určovaných vzorků (n). Získané výsledky byly u totožných metod identifikace sečteny a dále průměrovány. Počet druhů náležící taxonům byl převzat z „Treatise on the Isoptera of the world“ (Krishna *et al.* 2013). Větší hodnota P značí vyšší pravděpodobnost správného tipu.

$$\sum \frac{1}{T * t} / n = P/h$$

Číslo vzorku	Země původu	Druh
1	Brazílie	<i>Amitermes amifer</i> Silvestri, 1901
2	Brazílie	<i>Cornitermes cumulans</i> (Kollar, 1832)
3	Brazílie	<i>Diversitermes</i> sp. 1 Holmgren, 1912
4	Brazílie	<i>Divinotermes allognathus</i> (Mathews, 1977)
5	Brazílie	<i>Cyranotermes timuassu</i> Araujo, 1970
6	Brazílie	<i>Heterotermes sulcatus</i> Mathews, 1977
7	Brazílie	<i>Heterotermes tenuis</i> (Hagen, 1858)
8	Brazílie	<i>Velocitermes</i> sp.1 cf. <i>heterotypus</i> * Holmgren, 1912
9	Brazílie	<i>Subulitermes baileyi</i> (Emerson, 1925)
10	Brazílie	<i>Curvitermes odontognathus</i> (Silvestri, 1901)
11	Brazílie	<i>Orthognathotermes aduncus</i> Emerson, 1949
12	Florida	<i>Neotermes jouteli</i> (Banks, 1919)
13	Florida	<i>Cryptotermes cavifrons</i> Banks, 1906
14	Florida	<i>Incisitermes snyderi</i> (Light, 1933)
15	Florida	<i>Neotermes castaneus</i> (Burmeister, 1839)
16	Panama	<i>Dolichorhinotermes longidens</i> (Snyder, 1924)
17	Panama	<i>Cylindrotermes macrognathu</i> Snyder, 1929
18	Panama	<i>Nasutitermes nigriceps</i> (Haldeman, 1854)
19	Panama	<i>Calcaritermes brevicollis</i> (Holmgren, 1910)
20	Panama	<i>Nasutitermes guayanae</i> (Holmgren, 1910)
21	Brazílie	<i>Crepititermes verruculosus</i> (Emerson, 1925)
22	Brazílie	<i>Diversitermes</i> sp. 2 Holmgren, 1912
23	Panama	<i>Comatermes perfectus</i> (Hagen, 1858)
24	Francouzská Guyana	<i>Atlantitermes osborni</i> Fontes, 1979

Tabulka 2: Seznam vzorků k experimentálnímu určení

\*určení nepopsaného druhu

## **7.1. Metodika tradičních metod identifikace**

Za tradiční metodu identifikace byl zvolen parataxonomický přístup. Parataxonomie nesplňuje na rozdíl od taxonomie kritéria vědecké disciplíny, ale i přesto je cenným nástrojem sloužícím k prvotnímu třídění a identifikaci vzorků na základě vnějších morfologických znaků (Krell 2004), ke kterému dochází přímo v terénu za pomoci nejzákladnějších pomůcek jako jsou například přenosné binolupy, lupy, vlastní fotografie a referenční sbírky. Takový přístup umožňuje rychlé zhodnocení biodiverzity na zkoumané ploše a umožňuje profesionálním taxonomům omezit jejich činnost na skupiny, ve kterých jsou erudovaní, což má za výsledek zrychlení a zlepšení efektivity práce (Allen 2001).

S identifikací bylo dotázáno celkem pět terminologů. Čtyři dotázaní k identifikaci použili pouze binolupu a volně dostupné fotografie termitů na internetu. Poslední dotázaný měl k dispozici určovací klíč. Také byla všem k dispozici informace o zemi původu vzorků.

## **7.2. Metodika molekulární taxonomie**

### **7.2.1. Izolace DNA**

Pro izolaci DNA byly použity duplikáty vzorků uvedených v Tabulce 2, které byly sbírány souběžně, avšak do preservačního média RNAlater<sup>®</sup>. Toto médium oproti etanolu výrazně lépe konzervuje DNA celistvou a zvyšuje šanci na úspěšné provedení molekulárně biologických experimentů. Izolace DNA ze tkání termitů se prováděla za pomoci DNeasyR Blood & Tissue Kit od firmy QIAGEN s menšími modifikacemi a preferovaně z vojáků, pokud jich zkumavka obsahovala více než tři, proto aby byl zachován jejich dostatečný počet pro další identifikaci na základě morfologie. Vzorky byly vyjmuty ze zkumavky, následně byla oddělena jejich hlava, nejlépe spolu s hrudí a končetinami, pro získání co největšího a nejčistšího objemu genetického materiálu. Abdomen byl vyřazen kvůli přítomnosti střevní mikroflóry, možného výskytu parazitů, symbiotických prvoků a zbytků natrávené potravy, která by tak mohla kontaminovat výsledný izolát a ovlivnit další rozbor. Vše bylo prováděno pinzetou sterilizovanou 70% ethanolem a plamenem.

S takto připravenými vzorky bylo dále postupováno podle mírně modifikovaného manuálu od výrobce izolačního kitu. Byly dány do odstředivkových zkumavek se 180 µl ATL Bufferu a 20 µl proteinázy K, protřepány a ponechány přes noc k inkubaci při 56 °C



po dobu 11 hodin, při inkubaci došlo k lýze, tedy k rozkladu buněk důsledkem rozpadu jejich vnějších membrán, a následně k odstranění kontaminantů, kterými v největší míře bývají proteiny vázající se na nukleové kyseliny, proteinázou K. Delší doba inkubace byla stanovena díky poznatkům z praxe s izolací DNA z hmyzu s jejich odolným exoskeletem. Následně se vzorky 15 sekund promíchávaly, přidalo se 200 µl AL bufferu a promíchaly znovu. To samé se opakovalo s 200 µl předem namraženého 96% ethanolu. Takto upravené vzorky byly následně přepipetovány do DNeasy Mini filtračních zkumavek vložených do 2ml sběrných zkumavek a centrifugovány 1 min při 8 000 ot/min. Poté byly přendány filtrační zkumavky do nových 2ml sběrných zkumavek a pipetou přidáno 500 µl AW1 bufferu. Následně byly opět centrifugovány 1 min při 8 000 ot/min. Po centrifugaci byly sběrné zkumavky znovu přendány do nových 2ml sběrných zkumavek a bylo přidáno 500 µl AW2 bufferu, poté byly centrifugovány 3 min při 14 000 ot/min. Po tomto kroku došlo k zachycení DNA na kolonkách zkumavek, ty byly tentokrát vloženy do 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek, do kterých bylo přidáno 100 µl AE bufferu. Vzniklé roztoky byly inkubovány 1 min při pokojové teplotě a následně centrifugovány po dobu 1 min při 8 000 ot/min. Tento krok byl znovu opakován, ale místo 100 µl bylo přidáno 50 µl AE bufferu, který byl pipetován přímo na střed membrány filtračních zkumavek. Na konci tohoto kroku došlo k eluování izolované DNA do 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek.

### 7.2.2. Průběh polymerázové řetězové reakce (PCR)

Izolované DNA bylo z 24 zkumavek přepipetováno do 48 mikrozkušavek, do každé přišlo 5 µl izolátu, takže na každý vzorek připadaly dvě mikrozkušavky. Do první sady 24 mikrozkušavek byla přidána reakční směs z 12,5 µl PPP MIX složeného z Taq polymerázy, reakčního bufferu a barviva, 1 µl BSA, 1 µl COI – F2 primeru, 1 µl COI – R2 primeru a 4,5 µl dvakrát destilované H<sub>2</sub>O. Ve výsledku každá mikrozkušavka obsahovala 5 µl izolátu DNA a 20 µl reakční směsi. Stejný postup byl zopakován i pro druhou sadu vzorků, jediný rozdíl byl v použitém primeru. Byl použit primer COII – F a COII – R. Reakční směs byla po celou dobu udržována na ledu.

Název primeru	Sekvence 5'-3'	Citace
Termite_COII_R	GTTTAAGAGACCAGTACTTG	(Liu a Beckenbach 1992)
Termite_COII_F	CAGATAAGTGCATTGGATTT	(Miura et al. 2000)
TermiteCOI-R2	GTATTGTGATTGCTCCTGCT	nepublikované
TermiteCOI_F2	AGCATTCCCACGAATAACA	nepublikované

Tabulka 3: Seznam použitých primerů a jejich sekvencí

PCR pro první set 24 vzorků s COI primery bylo zahájeno na termocykleru predenaturací při 94 °C po dobu 1 min. Následně se 35x opakoval cyklus složený z denaturace 94 °C, 15 s; nasednutí primeru 50 °C, 1 min; elongace 72 °C, 1 min a 15 s a reakci ukončila postelongace při 72 °C po dobu 3 min. Po tomto posledním kroku byly vzorky udržovány při teplotě 4 °C.

Amplifikace DNA druhého setu vzorků s COII primery byla zahájena predenaturací 94 °C, 3 min a z 35x opakovaného cyklu denaturace 94 °C, 30 s; nasednutí primeru 45 °C, 45 s; elongace 72 °C, 1 min a reakci opět zakončila postelongace při 72 °C po dobu 3 min, následně teplota klesla na 4 °C do doby, než bylo se vzorky dále manipulováno.

### **7.2.3. Gelová elektroforéza**

Ke zhodnocení amplifikace DNA byla použita horizontální gelová elektroforéza. Při elektroforéze se záporně nabitě molekuly DNA pohybují skrz póry gelu v elektrickém poli. Za tímto účelem byl připraven 1% agarózový gel složený z 2,5 g agarózy a 250 ml TAE bufferu. Vzniklý roztok byl důkladně promíchán a zahříván po dobu 2 min v mikrovlnné troubě. Roztok byl ochlazen ledem na přibližně 50 °C, bylo přidáno barvivo a poté byl nalit na skleněnou podložku opatřenou hřebínky, které jsou po zatvrdnutí gelu vyjmuty a vytvoří v něm tak jamky pro napipetování vzorků. Elektroforéza trvala 1 hodinu a 30 minut při napětí 100 V. Tento postup byl zopakován pro všech 48 vzorků spolu se zápornou (K-) a kladnou (K+) kontrolou a žebříky (Ž).

U vzorků s COII primerem došlo při PCR i k namnožení blíže nespecifikovaných nežádoucích úseků, a proto byla u vzorků číslo 6, 7, 10, 20, 21 a 23 provedena izolace z gelu. Za tímto účelem byl připraven více koncentrovaný 1,5% agarózový gel, z něhož po proběhnutí elektroforézy byly vyříznuty požadované amplifikované úseky. Při izolaci PCR produktu z gelu se postupovalo podle instrukcí QIAquick® Gel Extraction Kit od firmy QIAGEN za použití destilované H<sub>2</sub>O v posledním kroku. Koncentrace izolované DNA ve vzorcích izolovaných z gelu byla změřena pomocí Qubit fluorometru (Thermo Fisher Scientific, USA).

Vzorky byly odeslány k sekvenaci firmě Microsynth AG. Byla využita nabízená služba „Sanger Sequencing - Economy run“ a odeslané produkty nebylo třeba před odesláním purifikovat. Doporučená koncentrace ve vzorcích určených k sekvenaci by měla činit 1,5 ng / μl na každých 100 bp podle instrukcí firmy (microsynth.ch). Určení

vzorků vhodných k sekvenaci bylo provedeno vizuálním porovnáním signálu na žebříku se signálem vzorku na fotografiích elektroforézy dostupných v 10. „Fotopřílohy“.

#### **7.2.4. Čtení sekvencí**

Sekvence byly od dodavatele obdrženy ve formátu „.ab1“ obsahujícím kromě sekvence i informaci o kvalitě čtení. Čtení a úprava získaných sekvencí DNA byla prováděna pomocí programu Geneious Prime verze 2019. 2. 1. Nejprve bylo k jednotlivým sekvencím pomocí funkce Geneious Assembler de novo reverzně spárováno druhé vlákno s komplementárními nukleotidy. Ze vzniklých sekvencí byly oříznuty oba konce s primery a spolu s nimi i okrajové části s nízkou kvalitou čtení. Takto upravené sekvence byly poté pomocí funkce BLAST – Megablast (Altschul et al. 1990) porovnány se sekvencemi uloženými v NCBI databázi.

### **7.3. Výsledky molekulárních metod**

Množství izolované DNA se mezi vzorky značně lišilo, pohybovalo se od 0,9 ng /  $\mu$ l do 61,7 ng /  $\mu$ l. Míra čistoty izolované DNA 260/280 byla 2,1; která je blízká modelové hodnotě 1,8 – 2,1. Sekundární míra čistoty 260/230 byla – 1,6; v některých případech dokonce až – 58,5. Ideální hodnota pro tuto míru se nachází mezi 2,0 – 2,3 podle výrobce přístroje ([https://bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop\\_tip.pdf](https://bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf)). Obzvláště nízká koncentrace nukleových kyselin byla naměřena u vzorků 20, 21 a 23 izolovaných z gelu.

V mnoha případech úspěšnost PCR korelovala s množstvím získané DNA z izolace. Výsledný produkt PCR byl na elektroforéze patrný v oblasti 300bp (COI) a 450bp (COII) Na sekvenaci bylo odesláno celkem 34 vzorků, u kterých se zdařilo PCR. Konkrétně vzorky číslo 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23 s COI sekvencí a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23 s COII sekvencí.

Čitelné sekvence se podařilo získat pro všechny odeslané vzorky s výjimkou COI 8 a třemi vzorky izolovanými z gelu COII 20, 21 a 23. U vzorků COI 21 a COII 2, 4 a 22 byly výsledné sekvence nižší kvality a délky, ale podařilo se je přečíst a porovnat s NCBI databází.

#### 7.4. Výsledky určování druhů

Pomocí kombinace obou genů se podařilo pomocí DNA barcodingu přesně určit celkem 10 vzorků, s číselným označením 2, 3, 5, 7, 10, 11, 14, 15, 22, 23 z uvedených 24. Konkrétně se jedná o druhy *Cornitermes cumulans*, *Diversitermes* sp. 1, *Cyranotermes timuassu*, *Heterotermes tenuis*, *Curvitermes odontognathus*, *Orthognathotermes aduncus*, *Incisitermes snyderi*, *Neotermes castaneus*, *Diversitermes* sp. 2, *Comatermes perfectus*. Celková doba strávená v laboratoři byla 20 h a 25 min, což odpovídá času 51 min na vzorek.

Parataxonomickým přístupem se ve většině případech podařilo určit rod, druh pouze výjimečně. Čtyřem termitologům se podařilo dohromady určit čtyři druhy *Neotermes castaneus*, *Dolichorhinotermes longidens*, *Cylindrotermes macrognathus* a *Crepititermes verruculosus*. Průměrná doba určování činila 42 min. Určování s determinačním klíčem trvalo 2 h a 34 min. Podařilo se opět určit čtyři druhy a to *Dolichorhinotermes longidens*, *Cylindrotermes macrognathus*, *Nasutitermes nigriceps*, *Crepititermes verruculosus*.

Číslo vzorku	DNA barcoding		Parataxonomické určování		Určování pomocí klíče	
	Přesnost určení [%] 1/T	Přesnost určení (P) / čas (t)	Přesnost určení [%] 1/T	Přesnost určení (P) / čas (t)	Přesnost určení [%] 1/T	Přesnost určení (P) / čas (t)
1	0,9	0,0212	0,9	0,5148	0,9	0,0845
2	100	2,3507	7,1	3,1746	7,1	0,6697
3	100	2,3507	0,2	0,0746	0,17	0,0157
4	0,05	0,0011	3,3	14,8148	0	0
5	100	2,3507	25	11,1111	0	0
6	3,3	0,0784	3,3	1,4815	3,3	0,3125
7	100	2,3507	3,3	1,9048	3,3	0,3125
8	0	0	0,2	0,0746	0,17	0,0157
9	16,6	0,3918	16,6	4,256	16,6	1,5626
10	100	2,3507	1	0,2755	0,05	0,0045
11	100	2,3507	6,6	1,7024	0,16	0,0146
12	0	0	0,85	0,4884	0,85	0,0801
13	0	0	1,4	0,8282	1,4	0,1359
14	100	2,3507	3,4	1,9704	0,22	0,0206
15	100	2,3507	100	44,4444	0,22	0,0206
16	1,6	0,0385	100	44,4444	100	9,3756
17	12,5	0,2938	100	44,4444	100	9,3756
18	0,17	0,0039	0,4	0,1778	100	9,3756
19	0	0	8,3	3,7037	8,3	0,7813
20	0	0	0,4	0,1778	0,4	0,0375
21	0,16	0,0037	100	57,1429	100	9,3756
22	100	2,3507	0,2	0,0746	0	0
23	100	2,3507	0,22	0,1253	0	0
24	0	0	12,5	5,5556	12,5	1,1719
Průměrný čas potřebný k určení 24 vzorků (h):	10,21		0,46		2,56	
Průměrná přesnost měření za hodinu:	1,01		10,12		1,78	
Počet měření (n):	2		4		1	

Ze všech měření byly vybrány nejlepší výkony

Vyšší hodnota značí vyšší přesnost určení  
(100 % = přesně určený vzorek)

Tabulka 4: Výsledky určování 24 vzorků termitů za využití tří různých metod

## 8. Diskuze

Parataxonická metoda determinace se potvrdila jako efektivní způsob identifikace taxonů především na úrovni čeledí nebo rodů. I přes nižší celkový počet vzorků určených do druhu se této metodě podařilo dosáhnout nejvyšší přesnosti vzhledem k času, ale variabilita mezi jednotlivými měřeními byla velká a závislá na expertíze jednotlivých terminologů. Určování s pomocí identifikačního klíče dosáhlo časové efektivity srovnatelné s DNA barcodingem.

DNA barcoding se od ostatních porovnávaných metod odlišuje delší dobou určování, kdy bylo v laboratoři stráveno až ~20x více času než při parataxonickém určování. Tento vyšší čas by se dal brát jako kompenzace za téměř nulové zkušenosti se zkoumanými taxony uživatelem DNA barcodingu. Navíc i tento čas je silně nadhodnocen nezkušeností s prací v laboratoři a neosvojenými postupy. Celá procedura by neměla trvat více než 10 hodin čistého času. Efektivita práce by dále měla stoupat se zvyšujícím se počtem vzorků.

Čím se DNA barcoding dále odlišuje od klasických metod identifikace, testovaných v tomto experimentu, je i vyšší počet správně určených vzorků, kterých určil deset. Ukázal se tak jako nejspolehlivější pro určování druhů bez ohledu na čas. Vyšší přesnosti by se dalo dosáhnout pečlivější izolací DNA nebo izolací z většího množství tkáně. Sedmnáct vzorků mělo i po PCR nižší koncentraci DNA, než je vhodné k odeslání na sekvenaci. Většina izolátů také vykazovala možnou kontaminaci organickými zbytky a dalšími kontaminanty, mezi které může patřit fenol, EDTA a chaotropní soli, vzhledem k nízkému poměru sekundární míry čistoty DNA 260/230. Ty by se daly odstranit provedením celé izolace znovu a pečlivějším promýváním, ale zároveň hrozí i vymytí nukleových kyselin a další snížení jejich koncentrace, která byla v některých případech už tak nízká. Lepších výsledků izolace by se také mohlo docílit použitím jiných izolačních kitů, kterých je na trhu velké množství.

Ze dvou použitých fragmentů genů COI a COII si úsek COII vedl lépe, výsledné získané sekvence byly delší a čistší, ale při PCR došlo k amplifikování i nežádoucích úseků, čemuž by se dalo zabránit navržením a použitím specifitějších primerů pro tento gen, jiným nastavením PCR nebo opět použitím jiného izolačního kitu.

DNA barcoding je také závislý na stavu komplementace databází s barcody, která je i přes snahy terminologů a taxonomů obecně, jak se ukázalo, stále zaostávající. NCBI

databáze neobsahovala sekvence pro 12 COI genů náležících k určovaným druhům a 6 sekvencí pro COII gen. DNA barcodingu se dále možná podařilo u vzorku COII 18 odhalit potencionální záměnu nebo špatné označení exempláře ve sbírce. Sekvence dlouhá 661 bp dosáhla při alignmentu shody 99,5 % se sekvencí druhu *Nasutitermes dasyopsis*, oproti tomu shoda s původně určeným druhem *Nasutitermes nigriceps* je 98,20 %.

## 9. Závěr

Od svého vzniku v roce 2003 se DNA barcoding těší stále větší oblibě a ukazuje se jako účinný taxonomický nástroj, zejména při určování kryptických druhů. Vysoký výskyt, těchto velice si morfologicky podobných taxonů, je očekáván právě u hmyzu vzhledem k velké druhové bohatosti a relativní neprobádanosti této třídy. DNA barcoding se zde zasloužil o objevení a popsání množství nových druhů. Některé z nich by se nejspíše podařilo odhalit i za pomoci klasických metod identifikace, ale tento proces by byl časově náročnější, trvající až několik let, a pracnější. Na druhou stranu jiné druhy by byly kompletně přehlédnuty.

Ovšem ani DNA barcoding není dokonalý a určování druhů pouze na základě jednoho genu neslibuje 100% odraz reality. Popisování nových druhů funguje nejlépe při kombinaci jak genetických, tak morfologických znaků a DNA barcode by se tak měly v budoucnu stát součástí standardů pro určování nových druhů. Je důležité zmínit, že DNA barcoding se nesnaží nahradit klasickou taxonomií, ale pouze jí doplnit.

Jedním z důležitých prvků pro správné fungování molekulárních identifikačních metod je budování databází se sekvencemi organismů. Ty se v případě barcodování termitů ukázaly jako nedostačující, ale s vzrůstajícím zájmem o tuto metodu roste i počet získávaných a ukládaných sekvencí, a tak by tento problém měl v budoucnu ztratit na váze. I přes toto úskalí se DNA barcodingu v rukou nezkušeného uživatele podařilo dosáhnout, v praktické části práce, obstojných výsledků. Za využití dvou fragmentů genů COI a COII byl zařazen největší počet vzorků do druhů, oproti ostatním metodám, a podařilo se tak dokázat, že DNA barcoding svojí relativní jednoduchostí umožňuje určit druhy i u jinak problémových organismů, jako jsou například termiti, a to bez předešlého taxonomického výcviku. Oproti tomu největšího průměrného výkonu dosáhl parataxonomický přístup, který v praxi slouží především jako prvotní nástroj k hrubému roztřídění vzorků v terénu na základě shodných morfologických znaků, ale i tato časově efektivní metoda by mohla být na zkusných plochách v budoucnu nahrazena molekulárními metodami, díky neustálému technologickému pokroku a vývoji přenosných sekvencerů, kterým je například přístroj MinION (Oxford Nanopore Technologies). DNA barcoding, všechny taxonomy a entomology zajisté čeká světlá budoucnost.



## 10. Seznam citované literatury:

- ALBERTS, Bruce, 2002. *Molecular biology of the cell* [online]. B.m.: New York : Garland Science. ISBN 978-0-8153-3218-3. Dostupné z: <http://archive.org/details/molecularbiology0004albe>
- ALLEN, William, 2001. *Green Phoenix: restoring the tropical forests of Guanacaste, Costa Rica*. Nachdr. Oxford: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-516177-9.
- ALTSCHUL, Stephen F., Warren GISH, Webb MILLER, Eugene W. MYERS a David J. LIPMAN, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* [online]. **215**(3), 403–410. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- ANDERSON, S, 1981. Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. *Nucleic Acids Research*. **9**(13), 3015–3027. ISSN 0305-1048.
- Sample Requirements - Microsynth - CH. *Microsynth* [online] [vid. 2021-04-13]. Dostupné z: <https://www.microsynth.ch/sample-requirements.html>
- ANTIT, M, N AMOR, J URRÁ, 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
- 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
- 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
- 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
- BIGNELL, David Edward, Yves ROISIN a Nathan LO, ed., 2011. *Biology of Termites: a Modern Synthesis* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands [vid. 2021-03-26]. ISBN 978-90-481-3976-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-90-481-3977-4

- 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
- 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
- BROWER, Andrew, 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: ‘Ten species’ of *Astrartes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: HesperIIDae). *Systematics and Biodiversity* [online]. **4**, 127–132. Dostupné z: doi:10.1017/S147720000500191X
- BROWN, Terence A., 2002. *Understanding a Genome Sequence* [online]. B.m.: Wiley-Liss [vid. 2021-04-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21136/>
- BRUNE, Andreas a Carsten DIETRICH, 2015. The Gut Microbiota of Termites: Digesting the Diversity in the Light of Ecology and Evolution. *Annual Review of Microbiology* [online]. **69**(1), 145–166. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-micro-092412-155715
- 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>
- 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

- SHAFFER Catherine, 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>
- 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
- 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.
- CRESPI, Bernard J. a Douglas YANEGA, 1995. The definition of eusociality. *Behavioral Ecology* [online]. 6(1), 109–115. ISSN 1045-2249. Dostupné z: doi:10.1093/beheco/6.1.109
- 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: .
- 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
- 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
- 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
- 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
- FARRELL, Brian D., Andrea S. SEQUEIRA, Brian C. O'MEARA, Benjamin B. NORMARK, Jeffrey H. CHUNG a Bjarte H. JORDAL, 2001. The Evolution of Agriculture in Beetles (curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution* [online]. **55**(10), 2011–2027. ISSN 1558-5646. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01318.x
- 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 *Melarhaphes neritoides* (Mollusca: Gastropoda). *PeerJ* [online]. **4** [vid. 2021-04-04]. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi: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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- 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
- HARRISON, Mark C., Evelien JONGEPIER, Hugh M. ROBERTSON, Nicolas ARNING, Tristan BITARD-FEILDEL, Hsu CHAO, Christopher P. CHILDERS, Huyen DINH, Harshavardhan DODDAPANENI, Shannon DUGAN, Johannes GOWIN *et al.* 2018. Hemimetabolous genomes reveal molecular basis of termite eusociality. *Nature Ecology & Evolution* [online]. **2**(3), 557–566. ISSN 2397-334X. Dostupné z: doi:10.1038/s41559-017-0459-1
- 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
- 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
- HENNIG, W., nedatováno. 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, Mehrdad HAJIBABAEI, Sujeevan RATNASINGHAM, Michelle VAN DER BANK, Mark W. CHASE, Robyn S. COWAN, David L. ERICKSON *et al.*, 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
- 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 Shih-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
- CRICHTON, Michael. *Jurský park*. Vyd. 2. Přeložil Zdeněk VOLNÝ. Praha: Baronet, 1997. ISBN 80-85621-35-5.
- INWARD, Daegan, George BECCALONI a Paul EGGLETON, 2007. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology Letters* [online]. **3**(3), 331–335. ISSN 1744-9561, 1744-957X. Dostupné z: doi:10.1098/rsbl.2007.0102
- 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

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

KHAKSAR, Ramin, Traci CARLSON, Donald W. SCHAFFNER, Mahni GHORASHI, Dieter BEST, Srikanth JANDHYALA, Julie TRAVERSO a Sasan AMINI, 2015. Unmasking seafood mislabeling in U.S. markets: DNA barcoding as a unique technology for food authentication and quality control. *Food Control* [online]. **56**, 71–76. ISSN 0956-7135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.007

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

KORB, Judith, Boris D. KASSENEY, Yvonne Tété CAKPO, Robin H. CASALLA DAZA, Jean Norbert K. B. GBENYEDJI, Mayouré Edith ILBOUDO, Guy JOSENS, N'golo Abdoulaye KONÉ, Karen MEUSEMANN, Abdoulaye B. NDIAYE, Simon Idoko OKWECHE, Michael POULSEN, Yves ROISIN a Fernand SANKARA, 2019. Termite Taxonomy, Challenges and Prospects: West Africa, A Case Example. *Insects* [online]. **10**(1), 32. Dostupné z: doi:10.3390/insects10010032

KRELL, Frank-Thorsten, 2004. Parataxonomy vs. taxonomy in biodiversity studies – pitfalls and applicability of ‘morphospecies’ sorting. *Biodiversity & Conservation*

[online]. **13**(4), 795–812. ISSN 1572-9710. Dostupné z: doi:10.1023/B:BIOC.0000011727.53780.63

KRESS, W. John a David L. ERICKSON, 2012. DNA Barcodes: Methods and Protocols. In: W. John KRESS a David L. ERICKSON, ed. *DNA Barcodes* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>, s. 3–8 [vid. 2021-03-26]. ISBN 978-1-61779-590-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-591-6\_1

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

KRISHNA, Kumar, David GRIMALDI, Valerie KRISHNA a Michael ENGEL, 2013. Treatise on the Isoptera of the World. *Bulletin of the American Museum of Natural History* [online]. **377**, 1–200. Dostupné z: doi:10.1206/377.1

KUNPROM, Chonticha a Pairoit 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

LIU, Hong a Andrew T. BECKENBACH, 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. **1**(1), 41–52. ISSN 1055-7903. Dostupné z: doi:10.1016/1055-7903(92)90034-E

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

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

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

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

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

MARTÍNEZ-DELCLÒS, Xavier a Jordi MARTINELL, 1995. The Oldest Known Record of Social Insects. *Journal of Paleontology*. **69**(3), 594–599. ISSN 0022-3360.

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.

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

MEYER, Christopher P a Gustav PAULAY, 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology* [online]. **3**(12), e422. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.0030422

MIURA, Toru, Yves ROISIN a Tadao MATSUMOTO, 2000. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Nasute Termite Genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific Tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. **17**(1), 1–10. ISSN 1055-7903. Dostupné z: doi:10.1006/mpev.2000.0790

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

- 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.
- MUELLER, Ulrich, Ted SCHULTZ, Cameron CURRIE, Rachelle ADAMS a David MALLOCH, 2001. The Origin of the Attine Ant-Fungus Mutualism. *The Quarterly review of biology* [online]. **76**, 169–97. Dostupné z: doi:10.1086/393867
- 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., François FERRÉ a Richard A. GIBBS, 1994. *The Polymerase Chain Reaction*. B.m.: Birkhäuser. ISBN 978-3-7643-3750-6.
- 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
- NOIROT, C., 2001. The gut of Termites (Isoptera) comparative anatomy, systematics, phylogeny. II. Higher Termites (Termitidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)*. **37**, 431–471.
- NOIROT, Ch., 1985. The Caste System in Higher Termites. In: *Caste Differentiation in Social Insects* [online]. B.m.: Elsevier, s. 75–86 [vid. 2021-04-08]. ISBN 978-0-08-030783-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-030783-1.50011-2
- 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 *et al.*, 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.
- 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
- PRESTWICH, G, 2003. Defense Mechanisms of Termites. *Ann Rev Entomol* [online]. **29**, 201–232. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.en.29.010184.001221
- PULLANDRE, 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.
- 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
- RIEHLE, M. M., W. M. GUELBOGO, 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
- SACCONE, 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

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

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. SEIFERT, S. HUHDORF, V. ROBERT, J. L. SPOUGE, C. A. LEVESQUE, W. CHEN, FUNGAL BARCODING CONSORTIUM, FUNGAL BARCODING CONSORTIUM AUTHOR LIST, E. BOLCHACOVA, K. VOIGT, P. W. CROUS, A. N. MILLER, *et al.*, 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

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 *et al.*, 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

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

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

ŠOBOTNÍK, J., T. BOURGUIGNON, R. HANUS, Z. DEMIANOVÁ, J. PYTELKOVÁ, M. MAREŠ, P. FOLTYNOVÁ, J. PREISLER, J. CVAČKA, J. KRASULOVÁ a Y. ROISIN, 2012. Explosive Backpacks in Old Termite Workers. *Science* [online]. **337**(6093), 436–436. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1219129

ŠOBOTNÍK, Jan, Anna JIROŠOVÁ a Robert HANUS, 2010. Chemical warfare in termites. *Journal of Insect Physiology* [online]. **56**(9), 1012–1021. ISSN 0022-1910. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinsphys.2010.02.012

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

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

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

- 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
- WIEMERS, Martin a Konrad FIEDLER, 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* [online]. **4**(1), 8. ISSN 17429994. Dostupné z: doi:10.1186/1742-9994-4-8
- 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)90517-0
- WILKINS, John S, 2002. Summary of 26 species concepts. 5.
- WILLETTE, Demian A., Sara E. SIMMONDS, Samantha H. CHENG, Sofia ESTEVES, Tonya L. KANE, Hayley NUETZEL, Nicholas PILAUD, Rita RACHMAWATI a Paul H. BARBER, 2017. Using DNA barcoding to track seafood mislabeling in Los Angeles restaurants: Seafood Mislabeling. *Conservation Biology* [online]. **31**(5), 1076–1085. ISSN 08888892. Dostupné z: doi:10.1111/cobi.12888
- 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
- WONG, Eugene H.-K. a Robert H. HANNER, 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International* [online]. **41**(8), 828–837. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2008.07.005
- 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

## 11. Tabulkové přílohy

Číslo vzorku	Koncentrace DNA (ng/μl)	260/280	260/230
1	5,5	1,79	-1,21
2	18,3	1,67	1
3	18,8	1,92	5,8
4	17,8	1,63	1,25
5	61,7	1,55	0,76
6	5,2	1,99	1,04
7	10	1,96	-58,52
8	8,1	1,99	0,71
9	1,9	3,59	-0,54
10	2,9	2,05	-0,63
11	1,9	2,79	-0,37
12	3,5	2,28	-0,56
13	0,9	3,19	-0,12
14	5,4	2,23	-0,85
15	7,4	1,78	10,39
16	5,2	2,32	-0,77
17	3,5	2,65	1,03
18	6,8	2,17	0,81
19	6,1	1,67	-5,61
20	3,8	1,81	-0,78
21	16,9	2,12	4,52
22	27,7	2,04	7,62
23	9,9	2,02	-2,98
24	3,7	1,77	-0,81

Tabulka 5: Výsledky měření koncentrace a čistoty DNA pomocí NanoDropu 2000

260/280 = poměr mezi 260 nm a 280 nm, míra čistoty DNA

260/230 = poměr mezi 260 nm a 230 nm, sekundární míra čistoty DNA

Číslo vzorku	Koncentrace DNA (ng/μl)
6	12,4
7	8,5
10	11,2
20	3,29
21	1,76
23	2,59

Tabulka 6: Výsledky Qubit měření koncentrace DNA u vzorků izolovaných z gelu

Číslo vzorku (COI)	Délka sekvence (bp)	Určený druh	Shoda (%) porovnávaných sekvencí	Přesnost určení (P) / ø čas (t)	Přesnost určení 1/T
1*	283	<i>Amitermes obeuntis</i> (Silvestri, 1909)	96,50	0,0212	0,0090
2	200	<i>Cornitermes cumulans</i> (Kollar, 1832)	97	2,3507	1,0000
3	300	<i>Diversitermes diversimilens</i> (Silvestri, 1901)	97,50	2,3507	1,0000
4*	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
5	276	<i>Cyranotermes timuassu</i> Araujo, 1970	98,60	2,3507	1,0000
6	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
7	89	<i>Heterotermes tenuis</i> (Hagen, 1858)	99,40	2,3507	1,0000
8	Nízká kvalita	---	---	0,0000	0,0000
9*	135	<i>Subulitermes denisae</i> Roisin, 1995	95,60	0,3918	0,1667
10*	290	<i>Proconitermes lespesii</i> (Müller, 1873)	92,60	0,0237	0,0101
11*	178	<i>Basidentitermes aurivillii</i> (Sjöstedt, 1897)	96,10	0,0037	0,0016
12*	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
13*	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
14	320	<i>Neotermes sp.</i> Holmgren, 1911	91,60	0,0066	0,0028
15	300	<i>Neotermes castaneus</i> (Burmeister, 1839)	99,20	2,3507	1,0000
16*	267	<i>Macrotermes gilvus</i> (Hagen, 1858)	94,20	0,0008	0,0003
17*	290	<i>Cylindrotermes parvignathus</i> Emerson, 1949	96	0,2938	0,1250
18*	308	<i>Nasutitermes macrocephalus</i> (Silvestri, 1903)	96,80	0,0094	0,0040
19*	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
20*	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
21	350	<i>Cylindrotermes parvignathus</i> Emerson, 1949	90,60	0,0037	0,0016
22	296	<i>Diversitermes diversimilens</i> (Silvestri, 1901)	97,60	2,3507	1,0000
23	268	<i>Comatermes perfectus</i> (Hagen, 1858)	94,20	2,3507	1,0000
24*	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000

Pro vzorky s \*  
chyběl záznam  
v NCBI  
databázi

Celkový čas  
určování (h):

10,21

ø P/ t:

0,72

Tabulka 7: Výsledky DNA barcodingu pro gen COI



Číslo vzorku (COII)	Délka sekvence (bp)	Určený druh	Shoda (%) porovnávaných sekvencí	Přesnost určení (P) / ø čas (t)	Přesnost určení 1/T
1	675	<i>Amitermes sp.</i> Silvestri, 1901	95,60	0,0212	0,0090
2	121	<i>Cornitermes cumulans</i> (Kollar, 1832)	99,40	2,3507	1,0000
3	687	<i>Diversitermes sp.</i> Holmgren, 1912	98,50	2,3507	1,0000
4*	158	<i>Nasutitermes torresi</i> (Hill, 1942)	95,60	0,0011	0,0005
5*	677	<i>Cyranotermes caete</i> Cancelli, 1987	96,70	0,5877	0,2500
6	710	<i>Heterotermes convexinotatus</i> (Snyder, 1924)	95,20	0,0784	0,0333
7	657	<i>Heterotermes tenuis</i> (Hagen, 1858)	99,80	2,3507	1,0000
8	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
9	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
10	691	<i>Curvitermes odontognathus</i> (Silvestri, 1901)	96,90	2,3507	1,0000
11	688	<i>Orthognathotermes sp.</i> Holmgren, 1910	96,30	2,3507	1,0000
12	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
13	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
14	699	<i>Incisitermes snyderi</i> (Light, 1933)	99,50	2,3507	1,0000
15	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
16*	677	<i>Schnedorhinotermes breinli</i> (Hill, 1921)	93,90	0,0385	0,0164
17*	689	<i>Cylindrotermes parvignathus</i> Emerson, 1949	97,40	0,2938	0,1250
18	661	<i>Nasutitermes dasyopsis</i> Thorne, 1989	99,50	0,0039	0,0017
19*	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000
20	Nízká kvalita	---	---	0,0000	0,0000
21	Nízká kvalita	---	---	0,0000	0,0000
22	79	<i>Nasutitermes sp.</i> Banks, 1920	70,50	0,0039	0,0017
23	Nízká kvalita	---	---	0,0000	0,0000
24*	Neodesláno	---	---	0,0000	0,0000

Pro vzorky s \*  
chyběl záznam v  
NCBI databázi

Celkový čas určování  
(h):

10,21

ø P/ t:

0,63

Tabulka 8: Výsledky DNA barcodingu pro gen COII

Číslo vzorku	Určený rod	Určený druh	Přesnost určení (P) / $\emptyset$ čas (t)	Přesnost určení 1/T
1	<i>Subulitermes</i> Holmgren, 1910	---	0,0123	0,0005
2	<i>Procornitermes</i> Emerson, 1949	---	0,2579	0,0101
3	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,0428	0,0017
4	<i>Spinitermes</i> Wasmann, 1897	---	0,0399	0,0016
5	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,0428	0,0017
6	<i>Heterotermes</i> Froggatt, 1897	---	0,8512	0,0333
7	<i>Heterotermes</i> Froggatt, 1897	---	0,8512	0,0333
8	<i>Nasutitermes</i>	<i>ephratae</i> (Holmgren, 1910)	0,0428	0,0017
9	<i>Subulitermes</i> Holmgren, 1910	---	4,2560	0,1667
10	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,0123	0,0005
11	<i>Orthognathotermes</i> Holmgren, 1910	---	1,7024	0,0667
12	<i>Neotermes</i> Holmgren, 1911	---	0,2183	0,0085
13	<i>Cryptotermes</i> Banks, 1906	---	0,3701	0,0145
14	<i>Incisitermes</i> Krishna, 1961	---	0,8806	0,0345
15	<i>Neotermes</i> Holmgren, 1911	---	0,2183	0,0085
16	<i>Dolichorhinotermes</i> Emerson, 1949	---	3,6480	0,1429
17	<i>Heterotermes</i> Froggatt, 1897	---	0,0087	0,0003
18	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,1021	0,0040
19	<i>Cryptotermes</i> Banks, 1906	---	0,0560	0,0022
20	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,1021	0,0040
21	<i>Termes</i> Linnaeus, 1758	---	0,0399	0,0016
22	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,0428	0,0017
23	<i>Glyptotermes</i> Froggatt, 1897	---	0,0560	0,0022
24	<i>Subulitermes</i> Holmgren, 1910	---	0,0428	0,0017

Celkový čas určování (h): 0,94

$\emptyset$  P/ t: 0,58

Tabulka 9: Výsledky parataxonomického určování č. 1

Číslo vzorku	Určený rod	Určený druh	Přesnost určení (P) / ø čas (t)	Přesnost určení 1/T
1	<i>Apicotermes</i> Holmgren, 1912	---	0,0131	0,0005
2	<i>Cornitermes</i>	<i>silvestrii</i> Wasmann, 1897	1,9484	0,0714
3	---	---	0,0000	0,0000
4	<i>Cavitermes</i>	<i>rozeni</i> Emerson, 1925	0,0426	0,0016
5	<i>Nasutitermes</i>	<i>pinocchio</i> Roisin & Pasteels, 1996	0,0458	0,0017
6	<i>Coptotermes</i> Wasmann, 1896	---	0,0866	0,0032
7	<i>Heterotermes</i>	<i>tenuis</i> (Hagen, 1858)	0,9093	0,0333
8	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,0458	0,0017
9	<i>Atlantitermes</i> Fontes, 1979	---	0,0458	0,0017
10	<i>Embiratermes</i>	<i>neotenicus</i> (Holmgren, 1906)	0,2755	0,0101
11	<i>Termes</i> Linnaeus, 1758	---	0,0426	0,0016
12	<i>Kalotermes</i>	<i>flavicollis</i> (Fabricius 1793)	0,0598	0,0022
13	<i>Cryptotermes</i>	<i>brevis</i> (Walker 1853)	0,3953	0,0145
14	<i>Kalotermes</i>	<i>flavicollis</i> (Fabricius 1793)	0,0598	0,0022
15	<i>Kalotermes</i> Hagen 1853	---	0,0598	0,0022
16	<i>Schedorhinotermes</i> Silvestri, 1909	---	0,4472	0,0164
17	<i>Rhinotermes</i> Hagen, 1858	---	0,0093	0,0003
18	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,1091	0,0040
19	<i>Cryptotermes</i> Banks, 1906	---	0,0598	0,0022
20	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,1091	0,0040
21	<i>Termes</i> Linnaeus, 1758	---	0,0426	0,0016
22	---	---	0,0000	0,0000
23	<i>Atlantitermes</i> Fontes, 1979	---	0,0093	0,0003
24	---	---	0,0000	0,0000

Celkový čas určování (h): 0,88

ø P/ t: 0,20

Tabulka 10: Výsledky parataxonomického určování č. 2

Číslo vzorku	Určený rod	Určený druh	Přesnost určení (P) / $\sigma$ čas (t)	Přesnost určení 1/T
1	<i>Amitermes</i> Silvestri, 1901	---	0,5148	0,0090
2	<i>Labiotermes</i> Holmgren, 1912	---	0,5772	0,0101
3	---	---	0,0000	0,0000
4	---	---	0,0000	0,0000
5	---	---	0,0000	0,0000
6	<i>Reticulitermes</i> Holmgren, 1913	---	0,3401	0,0060
7	<i>Heterotermes</i> Froggatt, 1897	---	1,9048	0,0333
8	---	---	0,0000	0,0000
9	---	---	0,0000	0,0000
10	<i>Mimeotermes</i> Silvestri, 1914	---	0,0275	0,0005
11	---	---	0,0000	0,0000
12	<i>Neotermes</i> Holmgren, 1911	---	0,4884	0,0085
13	<i>Cryptotermes</i> Banks, 1906	---	0,8282	0,0145
14	<i>Incisitermes</i> Krishna, 1961	---	1,9704	0,0345
15	<i>Neotermes</i> Holmgren, 1911	---	0,4884	0,0085
16	<i>Rhinotermes</i> Hagen, 1858	---	0,9368	0,0164
17	<i>Heterotermes</i> Froggatt, 1897	---	0,0195	0,0003
18	---	---	0,0000	0,0000
19	<i>Cryptotermes</i> Banks, 1906	---	0,1253	0,0022
20	---	---	0,0000	0,0000
21	<i>Crepititermes</i>	<i>verruculosus</i> (Emerson 1925)	57,1429	1,0000
22	---	---	0,0000	0,0000
23	<i>Neotermes</i> Holmgren, 1911	---	0,1253	0,0022
24	---	---	0,0000	0,0000

Celkový čas určování (h): 0,42

$\sigma$  P/ t: 2,73

Tabulka 11: Výsledky parataxonomického určování č. 3

Číslo vzorku	Určený rod	Určený druh	Přesnost určení (P) / $\sigma$ čas (t)	Přesnost určení 1/T
1	<i>Amitermes</i> Silvestri, 1901	---	0,4004	0,0090
2	<i>Cornitermes</i> Wasmann, 1897	---	3,1746	0,0714
3	<i>Obtusitermes</i> Snyder, 1924	---	0,0746	0,0017
4	<i>Divinotermes</i> Carrijo & Canello, 2011	---	14,8148	0,3333
5	<i>Cyranotermes</i> Araujo, 1970	---	11,1111	0,2500
6	<i>Heterotermes</i> Froggatt, 1897	---	1,4815	0,0333
7	<i>Heterotermes</i> Froggatt, 1897	---	1,4815	0,0333
8	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,0746	0,0017
9	---	---	0,0000	0,0000
10	---	---	0,0000	0,0000
11	<i>Genuotermes</i> Emerson, 1950	---	0,0694	0,0016
12	<i>Incisitermes</i> Krishna, 1961	---	0,0975	0,0022
13	<i>Cryptotermes</i>	<i>brevis</i> (Walker 1853)	0,6441	0,0145
14	<i>Incisitermes</i>	<i>schwarzi</i> (Banks 1919)	1,5326	0,0345
15	<i>Neotermes</i> (Burmeister 1839)	<i>castaneus</i>	44,4444	1,0000
16	<i>Dolichorhinotermes</i>	<i>longidens</i> (Snyder 1924)	44,4444	1,0000
17	<i>Cylindrotermes</i>	<i>macrogathus</i> Snyder 1929	44,4444	1,0000
18	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,1778	0,0040
19	<i>Calcaritermes</i> Snyder, 1925	---	3,7037	0,0833
20	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,1778	0,0040
21	<i>Genuotermes</i> Emerson, 1950	---	0,0694	0,0016
22	<i>Rotunditermes</i> Holmgren, 1910	---	0,0746	0,0017
23	<i>Incisitermes</i>	<i>minor</i> (Hagen, 1858)	0,0975	0,0022
24	<i>Atlantitermes</i> Fontes, 1979	---	5,5556	0,1250

Celkový čas určování (h): 0,54

$\sigma$  P/ t: 7,42

Tabulka 12: Výsledky parataxonomického určování č. 4

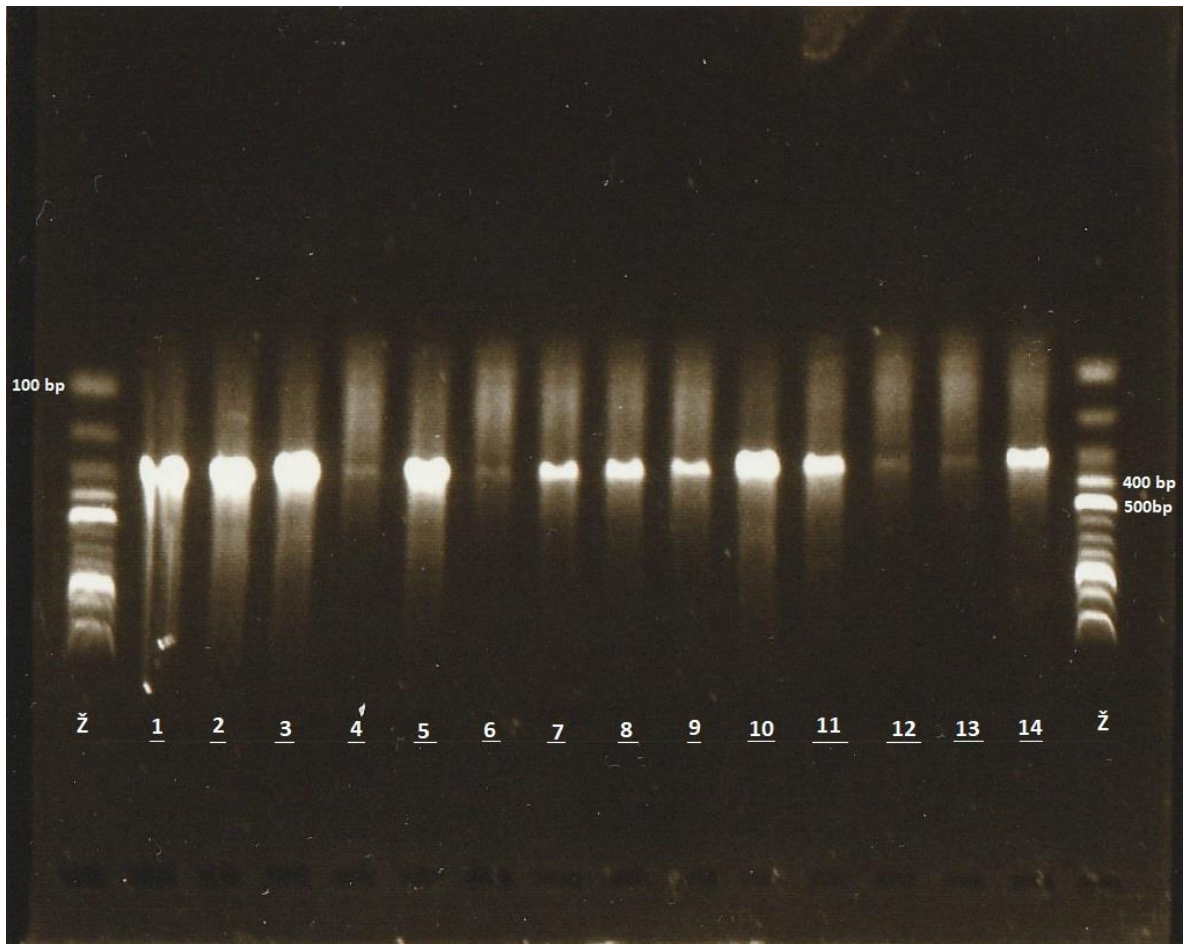
Číslo vzorku	Určený rod	Určený druh	Přesnost určení (P) / $\sigma$ čas (t)	Přesnost určení 1/T
1	<i>Amitermes</i> Silvestri, 1901	---	0,0845	0,0090
2	<i>Cornitermes</i> Wasmann, 1897	---	0,6697	0,0714
3	<i>Velocitermes</i> Holmgren, 1912	---	0,0157	0,0017
4	---	---	0,0000	0,0000
5	---	---	0,0000	0,0000
6	<i>Heterotermes</i> Froggatt, 1897	---	0,3125	0,0333
7	<i>Heterotermes</i> Froggatt, 1897	---	0,3125	0,0333
8	<i>Nasutitermes</i>	<i>corniger</i> (Motschulsky 1855)	0,0157	0,0017
9	<i>Subulitermes</i> Holmgren, 1910	---	1,5626	0,1667
10	<i>Amitermes</i> Silvestri, 1901	---	0,0045	0,0005
11	<i>Termes</i> Linnaeus, 1758	---	0,0146	0,0016
12	<i>Neotermes</i> Holmgren, 1911	---	0,0801	0,0085
13	<i>Cryptotermes</i> Banks, 1906	---	0,1359	0,0145
14	<i>Kalotermes</i> Hagen, 1853	---	0,0206	0,0022
15	<i>Kalotermes</i> Hagen, 1853	---	0,0206	0,0022
16	<i>Dolichorhinotermes</i>	<i>longidens</i> (Snyder 1924)	9,3756	1,0000
17	<i>Cylindrotermes</i>	<i>macrognathus</i> Snyder 1929	9,3756	1,0000
18	<i>Nasutitermes</i>	<i>nigriceps</i> (Haldeman 1854)	9,3756	1,0000
19	<i>Calcaritermes</i> Snyder, 1925	---	0,7813	0,0833
20	<i>Nasutitermes</i> Dudley, 1890	---	0,0375	0,0040
21	<i>Crepititermes</i>	<i>verruculosus</i> Emerson, 1925	9,3756	1,0000
22	---	---	0,0000	0,0000
23	---	---	0,0000	0,0000
24	<i>Atlantitermes</i> Fontes, 1979	---	1,1719	0,1250

Celkový čas určování (h): 2,56

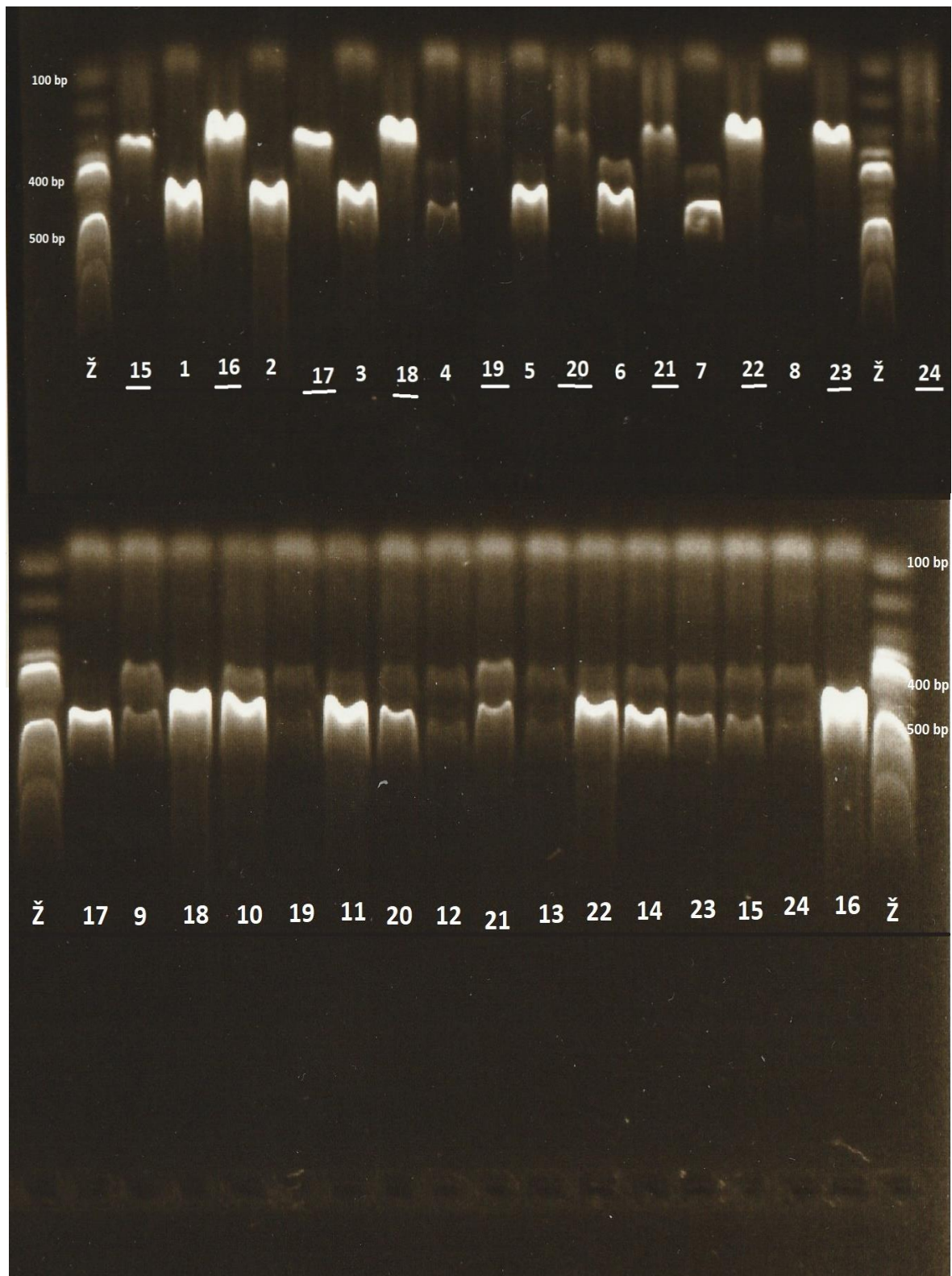
$\sigma$  P/ t: 1,78

Tabulka 13: Výsledky parataxonomického určování s použitím klíče

## 12. Fotopřílohy



Obrázek 4: Fotografie elektroforézy č. 1 pro gen COI zobrazující jeho délku



Obrázek 5: Fotografie elektroforézy č. 2 a 3 pro geny COI (s čarou) a COII zobrazující jejich délku