

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

**Katedra zoologie**



# **Metoda DNA barcodingu a její využití u protist**

The method of DNA barcoding and its use in protists

Bakalářská práce

Johana Rotterová

Školitel:  
RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2012

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Ivanovi Čepičkovi, PhD. za čas, který mi při mém psaní bakalářské práce věnoval a za cenné rady, které mi dal, spolu s Mgr. Tomášem Pánkem, kterému tímto také děkuji. Rovněž bych chtěla poděkovat rodičům za podporu po dobu studia.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Ivana Čepičky, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21. 8. 2012

.....

Johana Rotterová

## OBSAH:

Abstrakt.....	3
Abstract.....	3
1. Úvod.....	4
2. Vznik DNA barcodingu.....	5
2.1. DNA barcoding.....	5
2.2. Stav současné taxonomie, problém druhových konceptů.....	5
2.2. Aplikace druhových konceptů na protista.....	6
2.3. Problémy tradiční taxonomie.....	6
2.4. Řešení taxonomických problémů pomocí DNA barcodingu?.....	7
3. Co je DNA barcode? Hledání vhodné sekvence.....	8
3.1. Univerzální DNA barcode, COI sekvence.....	8
3.2. “Barcoding gap“.....	10
3.3. Odhalování kryptických druhů.....	11
4. Kritika DNA barcodingu.....	13
5. Kampaně DNA barcodingu s barcodem COI.....	14
5.1. CBOL a BOLD.....	15
5.2. Konference.....	15
5.3. Projekty DNA barcodingu s COI u živočichů.....	16
6. Další využití DNA barcodingu.....	18
7. Projekty DNA barcodingu s alternativními DNA barcody.....	22
7.1. Použití DNA barcodingu u hub.....	22
7.2. Použití DNA barcodingu u rostlin.....	24
8. Použití DNA barcodingu ve fykologii.....	24
9. Použití DNA barcodingu u protist.....	24
9.1. Pilotní studie.....	25
9.2. Nálevníci.....	26
9.3. Obrněnky.....	28
9.4. Protozoologičtí parazité.....	28
9.5. Autotrofní Stramenopiles.....	28
9.6. Amoebozoa.....	28
9.7. Rhizaria.....	29
10. Závěr.....	31
11. Použitá literatura.....	32

## **ABSTRAKT**

DNA barcoding je molekulární metoda identifikace druhů založená na krátkých úsecích sekvence DNA, které by měly být co nejvíce podobné u jedinců stejného druhu, a naopak se musí co nejvíce lišit mezi druhy. Tyto DNA barcodes se pak mohou porovnávat se sekvencemi známých druhů v globální barcodové databázi. Metoda vznikla jako návrh pro zjednodušení tradiční taxonomie, eliminaci jejích problémů a zrychlení jejích postupů. DNA barcoding ovšem také podléhá různým omezením, která znemožňují uskutečnění jeho původních cílů a dodržení rámce konceptu. Cílem této práce je vyložit dosavadní vývoj a význam této metody, obzvláště u protist, u kterých jsou identifikace druhů některých skupin z mnoha různých důvodů složité. Ohodnotit tuto metodu jako celek je obtížné, jelikož tvorba databáze sekvencí zatím není dokončena a pro mnohé skupiny organismů zatím ani nebyly vybrány vhodné DNA barcodové sekvence. Zda se toto podaří, se ukáže až v průběhu času, v této práci se proto zaměřím pouze na faktory, které již nyní úspěšnost metody DNA barcodingu ovlivňují.

Klíčová slova: COI; DNA barcoding; protista; taxonomie

## **ABSTRACT**

DNA barcoding is a molecular method of species identification based on short regions of DNA sequences. These DNA barcodes should be unique for each species. The sequences within species should be identical or very much alike, while between species they should display a significant amount of differences. The sequences of an undetermined specimen can be compared with sequences vouchered to a particular species in a global DNA barcode database. The database was developed with the aim to simplify traditional taxonomy, eliminate its problems and accelerate its approaches. However, DNA barcoding has its own limitations that may hinder achieving its original goals and a compliance with the concept. The aim of this bachelor thesis consists of explaining the evolution of DNA barcoding through time and assessing the importance of this method at present, particularly in protists. Species identification may be very difficult in many protist groups, which can be explained by several reasons. To appraise this method completely is a hard task, because creation of the database has not yet been finished and official DNA barcodes have not been chosen for many groups. We can only find out in the future, therefore I will only focus on factors that influence the success of DNA barcoding at present.

Keywords: COI; DNA barcoding; protists; taxonomy

## 1. Úvod

Myšlenka vytvoření pomocného identifikačního systému živých organismů vznikla s rostoucími nároky na rychlost a jednoduchost taxonomických metod v současné „uspěchané“ době. Množství informací o diverzitě života na této planetě neustále roste. Zároveň s ním se zvětšuje i složitost taxonomie. Se současným pokrokem znalostí molekulární biologie se otevřela možnost využít molekulární přístupy také v taxonomii, což značně zvyšuje množství dat, na jejichž základě lze klasifikovat živé organismy. Zároveň ale byla potřeba vyrovnat se s tím, jak molekulární data zabudovat do existujícího taxonomického systému a udržet přehlednost taxonomického systému.

Pro udržení něčeho tak rozsáhlého v kompaktní podobě je nezbytná spolupráce jednotlivých taxonomických týmů po celém světě. Ta je však mnohdy obtížná, neboť neexistuje jasný druhový koncept aplikovatelný na všechny skupiny organismů. Mezi taxonomy proto probíhají vášnivé debaty o tom, co je už možno považovat za samostatný druh a jakým způsobem jej lze jednoduše a spolehlivě identifikovat. Volá se také po globálním zpřístupnění dat taxonomické vědecké veřejnosti a současně po zjednodušení a zrychlení předávání informací mezi jednotlivými týmy. Řešením tohoto problému se zdá být globální standardizace postupů v taxonomii. Na cestě k cíli je nezbytné vytvořit celosvětově přístupnou a přehlednou databázi molekulárních taxonomických dat, kam by všichni mohli v jednotné formě přidávat své záznamy a vzájemně je porovnávat.

Metoda DNA barcodingu se zrodila právě jako snaha o maximální zjednodušení determinace organismů na druhové úrovni a zpřístupnění tohoto oboru vědcům, kteří nejsou specialisty na taxonomii, ale potřebují rychle a spolehlivě rozpoznat, s jakými konkrétními druhy právě pracují. DNA barcoding je metoda identifikace druhů pomocí krátkých úseků sekvence DNA, co nejvíce podobných u jedinců stejného druhu, a naopak co nejvíce odlišných mezi druhy, aby bylo možné spolehlivě zařadit neznámý vzorek ke známému druhu. Ačkoliv při prvním pohledu se může zdát, že DNA barcoding je pouze odnož molekulární taxonomie využívající molekulární markery, není tomu tak. Při hlubším pohledu se odhalí mnohem ambicióznější cíle tohoto přístupu. DNA barcoding si klade za cíl především usnadnit rutinní identifikace druhů, inventarizaci a katalogizaci celosvětové biodiverzity. Podle Heberta et al. (2003) je potřeba zavést do taxonomie DNA barcoding také proto, že tradiční taxonomie, založená na determinaci podle morfologických znaků, má svá zřejmá omezení. Ta vychází z toho, že je nutno vyhledávat a porovnávat určitá životní stadia, přitom není použitelná v případě degradovaného materiálu a přehlíží kryptické druhy. Další

problém je, že hrozí vysoké riziko chybné determinace vzhledem k velice náročným expertizám. Někteří taxonomové věří, že všechny tyto problémy by měly být pomocí DNA barcodingu vyřešeny. V této práci bych ráda shrnula, zda DNA barcoding je schopný splňovat, co si předsezval, a objasnila vývoj DNA barcodingu do současnosti, zejména možnost jeho použití u protist, která jsou předmětem mého zájmu.

Protože pro výraz „DNA barcoding“ dosud nebyl stanoven formální český ekvivalent, rozhodla jsem se tento pojem používat v anglické podobě s českým skloňováním.

## **2. Důvody vzniku DNA barcodingu**

### **2.1. DNA barcoding**

DNA barcoding je metoda vyvinutá za účelem identifikace druhů pomocí sekvence krátkých úseků DNA, které by se měly co nejvíce lišit mezi jednotlivými druhy a zároveň by se měly v rámci stejného druhu co nejvíce podobat. Podle těchto rozdílů se pak dají jednotlivé druhy určovat. Klíčovým prvkem, díky kterému by tento přístup mohl být uskutečněn, je vytvoření databáze těchto sekvencí u všech eukaryotických organismů (optimálně u všech živých organismů) tak, aby neznámé vzorky mohly být posléze porovnávány se sekvencemi již přiřazenými ke konkrétním známým druhům. Spolehlivá identifikace druhů je základním kamenem pro taxonomii, jelikož druhy představují její základní jednotky (Mallet, 2006).

Ideálně by k identifikacím podle konceptu DNA barcodingu měla sloužit jedna univerzální sekvence, která by se lišila u všech známých i dosud neobjevených druhů živých organismů. To se však již v prvopočátku DNA barcodingu ukázalo být nemožné, ambice tedy klesly na hledání univerzálního barcodu alespoň pro jednotlivé skupiny organismů (Hebert et al., 2003).

### **2.2. Stav současné taxonomie a problém druhových konceptů**

Taxonomie je jedna z nejdůležitějších biologických disciplín, která tvoří základ pro mnoho dalších oblastí biologie. Přesto je málo rozvíjena v porovnání s jinými obory, především vinou nedostatku financí (Wilson, 2003). i přes urputné snahy taxonomů zmapovat diverzitu všech živých organismů se odhaduje, že většina druhů dosud nebyla objevena. Odhady počtu všech druhů organismů na Zemi značně liší, od 3,6 milionu, až po možné stamiliony (Wilson, 2003).

Cíle taxonomie jsou od počátku komplikovány problémem definice druhu. Druhových konceptů je v současné době přes dvě desítky (Mayden, 1997). Z mnoha druhových konceptů (tato práce se jednotlivými druhovými koncepty nebude pro nedostatek místa zabývat) jsou

pro DNA barcoding použitelné koncept fylogenetického druhu (Phylogenetic Species Concept, zkráceně PSC) či genetický druhový koncept (Genetic Species Concept, zkráceně GSC). PSC zjednodušeně říká, že druh je nejmenší monofyletická linie organismů, diagnostikovatelná pomocí porovnávání unikátní kombinace znaků (Cracraft, 1983; Nixon & Wheeler, 1990). Do 60. let 20. století tyto znaky představovaly morfologické charakteristiky, ovšem s vývojem molekulární biologie se jako určující znaky začaly využívat i sekvence DNA. Z toho vyplývá možnost aplikace dalšího druhového konceptu, jenž se v různých podobách objevoval již od počátku 20. století. GSC definuje druh jako skupinu křížících se populací (Baker & Bradley, 2006). Oba tyto koncepty se v mnohém shodují. Druhy zde představují konečné taxony, které mohou být využity ve fylogenetických a biogeografických analýzách a měly by odrážet historické informace. Oba víceméně přijímají vnitrodruhový genový tok a reprodukční izolaci jednotlivých druhů. Liší se zejména v uznávání poddruhů, zatímco GSC uznává alopatrické populace jako geneticky definované poddruhy, pro PSC poddruhy nejsou relevantní (Baker & Bradley, 2006).

### 2.3. Aplikace druhových konceptů na protista

O řadě skupin protist máme jen velmi málo informací, neboť je jim (narozdíl třeba od živočichů či rostlin) věnována mnohem menší pozornost. Protože ale mezi protista patří drtivá většina eukaryotických linií, je hledání jejich univerzálního druhového konceptu velice obtížné. Dodnes neexistuje druhový koncept, který by vyhovoval všem jejich skupinám.

Druhy protist jsou tradičně rozeznávány pomocí morfologie, rozmnožovacích typů a v posledních desetiletích také molekulárními markery. Tyto taxonomické metody mnohdy docházejí k vzájemně rozporuplným výsledkům. Dalším faktem, který komplikuje identifikace druhů protist, je jejich často složitý životní cyklus, který může být pro taxonomy mnohdy matoucí. V některých případech navíc nejsou morfologické znaky jednotlivých druhů natolik stabilní, aby dostačovaly ke spolehlivému určení. Velikost protist je pro taxonomii založenou na morfologických znacích také velmi omezující, pozorování a hledání takových znaků lze uskutečňovat pouze za použití zvláštních technik světelné nebo elektronové mikroskopie. Molekulární metody určování druhů tedy protistologové začali využívat hned, jak se objevily.

## 2.4. Problémy tradiční taxonomie

Metody blízké DNA barcodingu byly zkoušeny na více mikroskopických organismech zkrátka z nutnosti objevit přesnější taxonomické přístupy. Morfologická taxonomie totiž, a to nejen u mikroorganismů, podléhá nejrůznějším omezením. Možnost určit druh podle morfologických znaků vyžaduje hluboké znalosti a mnohdy i použití náročných technik. I pokud výzkumník disponuje potřebnými znalostmi, nikdy nebude schopen určit kryptické druhy s identickou morfologií. To tedy může vést identifikačním chybám, které jsou ale tou samou metodou neodhalitelné. Postupem času se tento aspekt ukazuje jako nejvýznamnější, jelikož počet kryptických druhů je zřejmě mnohonásobně větší, než se předpokládalo (Bickford et al., 2007). Rozeznat lze navíc pouze určitá životní stádia (Hebert et al., 2003).

Dalším problémem, který v současné taxonomii vyvstává, je udržení stále se zvětšujícího množství informací o biodiverzitě kompaktní a zároveň snadno přístupné podobě. Vzorky konkrétních druhů jsou přechovávány v muzeích, soukromých sbírkách či na univerzitách. Tento postup ovšem znevýhodňuje taxonomii těch organismů, které nejsou pro veřejnost atraktivní (Tautz et al., 2003).

Neměla by být opomenuta také finanční situace současné taxonomie. Finanční tok pro taxonomický výzkum se stále zeslabuje. Taxonomie jako obor sama o sobě nepřitahuje pozornost grantových agentur a vlád, jelikož nemá vytyčené jednorázové cíle, které by po splnění mohly být ověřeny a slibovaly by převratné objevy (Godfray, 2002). Taxonomie navíc ztrácí prestiž skutečností, že články o objevech konkrétních druhů se často necitují ve všech pozdějších publikacích zmiňujících daný druh (Agnarsson & Kuntner, 2007).

## 2.5. Řešení taxonomických problémů pomocí DNA barcodingu

DNA barcoding se směle nabízí jako řešení některých těchto obtíží taxonomie. Svými velkými ambicemi a potenciálním využitím v mnoha oblastech (vědeckých i komerčních) přitahuje nemalou pozornost a finanční zdroje. Taxonomové se nejprve na financování DNA barcodingu dívali spíše kriticky. Ukázalo se ale, že DNA barcoding může přinášet finanční prostředky, které lze využít pro rozvoj taxonomie jako takové. Jeho velkou výhodou je možnost snadné identifikace druhů ze všech životních stádií a i značně degradovaného materiálu (Taylor & Harris, 2012). Diskutabilní je jeho potenciální využití k odhalování kryptických druhů, které na základě morfologických znaků nelze odlišit. Jeho cílem

je vytvořit celosvětovou databázi, která pojme DNA barcodes všech druhů organismů a dohromady položí základ pro globální identifikační systém (GBS), který by byl alternativou k databázi GenBank. DNA barcode sekvence v této databázi jsou pak přiřazeny k informacím o daném druhu, a tím vzniká snadno a veřejně dostupná kompletní informace, potřebná k identifikacím jednotlivých druhů (Hebert et al., 2003).

### 3. Co je to DNA barcode? Hledání vhodné sekvence

#### 3.1. Univerzální barcode

Idea univerzálního DNA barcodu pro identifikace druhů se zrodila v hlavě Paula Heberta, který působí na kanadské univerzitě v Guelphu<sup>1</sup>. Mitochondriálními DNA markery se začal zabývat již na začátku devadesátých let. Jako první je aplikoval na rybách, konkrétně na candátu americkém (Billington & Hebert, 1990). Výraz „DNA barcode“ byl použit až v roce 2003 v článku *Biological identifications through DNA barcodes* (Hebert et al., 2003), který se stal jedním z nejcitovanějších v oblasti biologie. V době psaní této práce<sup>2</sup>, byl tento článek citován podle Web of Science 1696krát. Použití unikátních sekvencí DNA jako identifikátoru druhů Paula Heberta napadlo při pohledu na UPC (Universal Product Code), čárového kódu u produktů v supermarketech, podle kterých je, při použití deseti číslic v jedenácti pozicích, možno vytvořit až 100 miliard unikátních identifikátorů. DNA má sice pouze čtyři různé nukleotidy, i tak ale kombinacemi například pouze 15 nukleotidových pozic lze vytvořit až jednu miliardu unikátních kódů, což převyšuje i ty nejvelkorysejší odhady počtu druhů živých organismů (Hebert et al., 2003). V praxi se ovšem nelze omezit na tak krátké sekvence, jelikož je potřeba, aby byl úsek dostatečně dlouhý za účelem snadné amplifikace a sekvenování.

Jako původní univerzální DNA barcode měla být vybrána sekvence, která by byla natolik variabilní, aby umožnila rozlišení i blízce příbuzných druhů (Hebert et al., 2003). Evoluce genů kódovaných v jádře je u živočichů příliš pomalá, než aby se podle nich mohly odlišit blízce příbuzné druhy. Pozornost se zaměřila na mitochondriální DNA, vzhledem k vysoké rychlosti evoluce mitochondriálních genů u živočichů. Ta vyplývá z častých substitucí bází na třetí nukleotidové pozici v kodónu. Rychlost evoluce se tu zdá být dostatečná k tomu, aby se podle ní daly odlišit i blízce příbuzné druhy živočichů. Dalšími fakty, proč byla mitochondriální DNA vybrána jako vhodná pro účely DNA barcodingu, jsou

---

<sup>1</sup>Převzato z životopisu Paula Heberta, dostupného na [www.dnabarcoding.ca/CCDB\\_DOCS/CV/CV-PaulHebert.pdf](http://www.dnabarcoding.ca/CCDB_DOCS/CV/CV-PaulHebert.pdf).

ty, že často postrádá introny, není příliš vystavena rekombinaci a má haploidní dědičnost (Saccone et al., 1999). Všechny mitochondriálně kódované proteiny u živočichů figurují ve čtyřech z pěti komplexů účastnících se dýchacího řetězce. Cytochrom *c* oxidáza je terminální enzymový komplex, který je (u savců) tvořen třemi podjednotkami kódovanými mitochondriální DNA a deseti podjednotkami kódovanými jadernou DNA (Schmidt et al., 2001).

Z těchto mitochondriálních protein-kódujících genů byl vybrán gen kódující podjednotku i enzymu cytochrom *c* oxidázy. Jako barcode pak byla určena sekvence dlouhá 648 bp z úseku 58 – 705 z 5' konce tohoto genu, dále jen COI (Hajibabaei et al., 2005). Byla vybrána díky vyhovujícím výsledkům předchozích studií COI, z kterých vyplývají její vhodné vlastnosti pro DNA barcoding, a také díky faktu, že byly úspěšně navrženy primery, pomocí kterých lze spolehlivě amplifikovat tento úsek u řady živočišných linií (Schmidt et al., 2001; Saccone et al., 1999; Folmer et al., 1994).

Alternativou byl mimo jiné tzv. minibarcode. Za jeho vznikem stojí to, že celou délku COI sekvence mnohdy není možné získat z degradovaného materiálu, například z muzejních vzorků staršího data. Délka sekvence byla snížena až na cca 100bp, přesto identifikovala druhy úspěšně, dokonce úspěšněji než delší sekvence COI, protože ji bylo možné bez problému amplifikovat (Hajibabaei et al., 2006; Meusnier et al., 2008).

Pro určování blízké příbuzných druhů nás zajímá variabilita nukleotidových sekvencí COI. Pokud bychom se podívali na aminokyselinové sekvence COI, jejich vnitrodruhová variabilita je nižší než u ostatních mitochondriálních genů, což by mohlo sloužit k předběžnému zařazení neidentifikovaných vzorků do vyšších taxonomických skupin, jako je kmen či řád, ještě před určením druhu pomocí nukleotidových sekvencí COI (Hebert et al., 2003).

Klíčové pro identifikace druhů je určit minimální množství rozdílů v sekvencích, podle kterého lze spolehlivě odlišit všechny druhy zvolené skupiny, tedy prahovou hodnotu („threshold“) rozdílů mezi vnitrodruhovou variabilitou a mezidruhovou divergencí. Předpokladem je, že vnitrodruhová genetická variabilita má být menší, než mezidruhová genetická divergence (Hebert et al., 2003). Ve většině počátečních studií se ukázalo, že tato prahová hodnota by mohla být u živočichů 3%, jelikož hodnoty divergencí mezi druhy byly obvykle větší. Vedla ke správným identifikacím všech, či naprosté většiny určovaných druhů (Hebert et al., 2003).

Prahovou hodnotu 3 % zkoušeli aplikovat nejprve u motýlů a správně zařadili 96 % druhů. V případech, kde zařazení nebylo možné, se obvykle jednalo o druhové páry, které

se od sebe zřejmě oddělily nedávno (Hebert et al., 2003). U ptáků byla prahová hodnota úspěšně odlišující druhy nepatrně nižší, a sice 2,7% (Hebert et al. 2004b). V jiné studii zaměřené na ptáky se ovšem výsledky diametrálně lišily, prahová hodnota byla pouze 1,9%, což znamenalo, že více než dvě třetiny druhů nebyly odlišeny (Johnson & Cicero, 2004).

### 3.2. Barcoding gap

Pokud mezidruhá divergence převyšuje vnitrodruhou genetickou variabilitu, vzniká mezera, která se nazývá „barcode gap“ (Meyer & Paulay 2005; Meier et al., 2008). Podle velikosti této mezery, respektive podle rozsahu rozdílů mezi vnitrodruhou a mezidruhou variabilitou se dá určit, zda vzorky představují jeden nebo více druhů. První studie DNA barcodingu prezentovala výrazný „barcoding gap“ u naprosté většiny analyzovaných vzorků ptáků (Hebert et al., 2004b). V další studii zabývající se ptáky byla prahová hodnota nižší (Wiemers & Fiedler, 2007). „Barcoding gap“ však objeven nebyl. Použití prahových hodnot zřejmě zatím nebude možné aplikovat v případech, kdy nebude nalezen jednoznačný „barcoding gap“. Práhová hodnota zřejmě není užitečná ani při rozlišování blízce příbuzných druhů ve skupinách s nízkou mírou „prosekvenování“ (Meyer & Paulay, 2005).

Hodnoty vnitrodruhových a mezidruhových divergencí v prvotních studiích byly ovšem odhadovány z nedostatečného počtu vzorků. i pokud byl odběr vzorků rozsáhlejší, byl omezen na malou část areálu druhu (Meyer & Paulay, 2005). V případech, kdy bylo prozkoumáno větší množství vzorků, se „barcoding gap“ často vůbec neobjevil a naopak byl odhalen překryv mezi vnitrodruhou a mezidruhou variabilitou (Meyer & Paulay, 2005). Tento překryv se navíc zvětšoval při zahrnutí většího počtu blízce příbuzných druhů (Moritz & Cicero, 2004). U skupin s málo dostupnými sekvencemi jsou překryvy také výrazné (Meyer & Paulay, 2005). Překryvy se pak opět zmenšují ve studiích, kde byl analyzován malý počet vzorků (Wiemers & Fiedler, 2007).

Někteří výzkumníci uvádějí, že „barcoding gap“ ve skutečnosti vůbec neexistuje a je pouze artefaktem způsobeným nedostatečným počtem vzorků (Wiemers & Fiedler, 2007). To by bylo pro DNA barcoding a přístup identifikací podle prahových hodnot fatální, jelikož bez existence „barcoding gapu“ by nebylo možné odhalit, zda je vzorek přiřazen ke správnému druhu. Barcodová sekvence druhu, ke kterému vzorek patří, totiž ještě nemusela být zjištěna, shoda by se tudíž najít ani nemohla (Wiemers & Fiedler, 2007). Výsledky analýzy vnitrodruhé a mezidruhé sekvenční variability u modráskovitých

(Lycaenidae) sice odhalily horní limit pro vnitrodruhovou sekvenční divergenci, pro mezidruhovou variabilitu ovšem žádné minimální hodnoty stanoveny nebyly, a neobjevil se tedy ani „barcoding gap“. Průměrná mezidruhová sekvenční divergence byla u modráskovitých v rámci jednoho rodu jen nepatrně nižší než u ostatních motýlů, zatímco u jiných členovců, pavoukoců, průměrná mezidruhová sekvenční divergence dosáhla třikrát větších hodnot než u motýlů (Barrett & Hebert, 2005). Vnitrodruhová variabilita byla ovšem jen nepatrně vyšší, takže vznikl výrazný „barcoding gap“. Wiemers & Fiedler (2007) tvrdí, že důvodem těchto rozporů může být nedostatečný počet vzorků pavoukoců (Barrett & Hebert, 2005) a zjištěný „barcoding gap“ je podle nich opět artefaktem.

Podle dalších (Meier et al., 2008) je míra „barcoding gapu“ navíc stanovována nesprávným způsobem a její hodnoty jsou mnohdy zavádějící. „Barcoding gap“ je standardně chápán jako rozdíl mezi vnitrodruhovou a průměrnou mezidruhovou vzdáleností v rámci rodu. Spolehlivější výsledky ale zřejmě přináší použití minimální mezidruhové vzdálenosti, protože úspěch určení druhů záleží na tom, jak moc se zkoumaná sekvence liší od nejpodobnějších sekvencí, patřících jiným druhům, kdežto její vzdálenost od průměrných hodnot v rámci rodu nehraje významnou roli. Proto bylo navrženo, aby se používala minimální mezidruhová vzdálenost. K potvrzení tohoto návrhu bylo třeba provést studii, která by porovnávala výsledky obou způsobů. Tou se zjistilo, že „barcoding gap“ založený na průměrné mezidruhové vzdálenosti je uměle navýšen (Meier et al., 2008).

### 3.3. Odhalování kryptických druhů

„Barcoding gap“ a prahové hodnoty významně ovlivňují efektivitu DNA barcodingu, pokud se zaměříme na jejich využití v jeho druhé potenciální sféře, a sice odhalování nových druhů. Pokud je genetická vzdálenost neznámého vzorku od určitého charakterizovaného druhu větší, než stanovená prahová hodnota, může být podle konceptu DNA barcodingu stanoven jako zvláštní druh. Zde bylo stanoveno pravidlo, že mezidruhová variabilita musí být desetkrát vyšší než ta vnitrodruhová (Hebert et al., 2004b). Při tomto postupu však hrozí, že budou nesprávně „odhalovány“ „nové druhy“, které ve skutečnosti patří do již známých druhů, jejichž vnitrodruhová sekvenční variabilita převyšuje prahovou hodnotu. Rovněž hrozí špatná identifikace taxonů s menšími mezidruhovými divergencemi, než doporučená prahová hodnota (Meyer & Paulay, 2005).

To nejsou jediná rizika užití DNA barcodingu jako metody k rozpoznávání nových druhů. Jaderné mitochondriální pseudogeny („numts“), což jsou nefunkční kopie

mitochondriální DNA v jádře, jsou u některých skupin živočichů často velmi odlišné od ortologních mitochondriálních sekvencí a tím analýzy komplikují. i přesto, že Hebert et al. (2003) při analýzách žádné pseudogeny v sekvenci COI neobjevili, vyskytují se u mnoha eukaryotických skupin, například u raků a sarančat (Song et al., 2008). To způsobuje chybné a nadsazené počty druhů v analýzách. Při jejich odstranění se počet potenciálních druhů rapidně sníží (Song et al., 2008).

Pokud by se „barcoding gap“ určoval podle minimální mezidruhové vzdálenosti v rámci rodu, má DNA barcoding jisté šance na úspěch jako pomůcka pro odhalování kryptických druhů. V nejznámějším případě odhalení kryptických druhů pomocí barcodingu, aplikace u motýla druhu *Astrapes fulgerator*, bylo ovšem využito průměrné mezidruhové vzdálenosti. Tento motýl byl popsán již roku 1775, proto bylo nesmírným překvapením, když bylo odhaleno, že je to ve skutečnosti komplex minimálně deseti kryptických druhů (Hebert et al., 2004a). Tento závěr byl indukován analýzou COI sekvencí, jejichž variabilita byla mnohem vyšší než stanovená prahová hodnota. O dva roky později byl však tento objev zpochybněn (Brower, 2006). Hebert et al. (2004a) totiž své analýzy nepodpořili předběžnou hypotézou vzdáleností domnělých skupin, vytvořenou například podle ekologických či morfologických metod, která by měla být až následně podpořena výsledky analýzy COI sekvencí. Později byly objeveny další kryptické druhy motýlů (Hajibabaei et al., 2006), jmenovitě například u druhu *Perichares philetas*, který byl rozdělen na minimálně čtyři samostatné druhy (Burns et al., 2008). Tyto objevy zatím zpochybněny nebyly.

Omezení DNA barcodingu pro objevování nových druhů jsou všeobecně uznávána jeho zastánci i protivníky. Spočívají v možné fixaci ancestrálního polymorfismu (Mallet & Willmott, 2003), a vyskytujících se paralogiích vinou genového transferu mitochondriální DNA do jádra (Hebert et al., 2004a; Moritz & Cicero, 2004). Při použití DNA barcodingu jako hlavní metody k odhalování druhů by byly přehlíženy mladé druhy, či druhy vzniklé radiací (Moritz & Cicero, 2004). Velkou výzvou jsou tropické druhy, kde analýzy podle sekvencí COI zřejmě účinné nebudou, jelikož tyto druhy jsou často příliš mladé, než aby šly určovat podle mitochondriální DNA. V tropech je předpokládán největší světový výskyt kryptických druhů (Moritz & Cicero, 2004; Hebert et al., 2003).

#### **4. Kritika DNA barcodingu**

Hned s prvními publikacemi o DNA barcodingu se objevilo mnoho kritik této metody. Někteří se obávají, že DNA barcoding bude odebírat většinu financí vkládaných

do taxonomie, které jsou již tak nedostatečné (Will et al., 2005). Odhady celkových nákladů na analýzu sekvencí u všech druhů v minulosti převýšily patnáct miliard dolarů (Cameron et al., 2006), i když Hebertovy odhady ještě v roce 2003 se pohybovaly jen okolo dvou miliard dolarů (Whitfield, 2003). Se současnou snižující se finanční náročností nové generace sekvenování (NGS) snad budou skutečné náklady hluboce pod těmito odhady. Objevily se ovšem názory, že DNA barcoding finance taxonomii ubírat nebude, jelikož není financován společnostmi, které by jinak podporovaly taxonomii, a je konkurentem spíše genomice či medicíně (Gregory, 2005).

Will & Wheeler (2005) uvádějí, že „uznání barcodingu jako způsob pro objevování nových druhů by byl zpátečnický krok zpět k typologii“. Tím myslí, že tato metoda se nápadně blíží fenetice, která klasifikuje druhy na základě matematických podobností znaků. Podle nich je největší úskalí DNA barcodingu shodné s tím, na kterém v minulosti ztroskotala fenetika, a sice že by taxonomii zjednodušoval až příliš, a jeho výhradní použití by mělo za následek ztrátu nadhledu a objektivního přístupu k taxonomii.

Will & Rubinoff (2004) se domnívají, že od taxonomů se očekává, že budou navrhovat taxonomické hypotézy a vyvinou identifikační pomůcky základní pro všechny ostatní biology, a nikoliv že sami budou provádět rutinní sekvenace genů. Uvádějí toto jako kritiku DNA barcodingu, podle mého názoru je ovšem tato kritika poněkud zcestná, vzhledem k tomu, že DNA barcoding je stále ve fázi nutné tvorby databáze, a až posléze se stane identifikační pomůckou usnadňující práci všem biologům využívajícím taxonomii.

Hlavním terčem kritik je využívání této metody k objevování nových druhů. Vymezování druhů pouze pomocí DNA sekvencí by bylo zavádějící, stejně jako vymezování druhů pouze pomocí morfologické metody vzhledem k jejím občasným nedostatkům. Obě by měly být používány v souladu a výsledky jedné mohou být ověřovány tou druhou (DeSalle, 2006).

DNA barcoding ovšem může na potenciálně nové druhy upozornit. Pokud při identifikacích některé vzorky nebudou přiřazeny ke známému druhu, respektive jejich odchylka bude větší než 3%, pak i v případě, že databáze referenčních sekvencí je dostatečná, jejich studium by mělo být převzato tradičními taxonomickými metodami a objev nového druhu by jimi mohl být buď potvrzen, či vyvrácen. Pro takové případy je ovšem nutné eliminovat chyby, na které někteří výzkumníci poukazují. Kritici totiž naznačují, že DNA barcoding přehlédne druhy, které jsou i přes značnou celkovou genetickou vzdálenost v barcodových sekvencích jen nepatrně divergentní (Meyer & Paulay, 2005). Dalším problémem je, že evoluce mitochondriální DNA nemusí korelovat s evolucí jaderné

DNA, protože mitochondriální genom je obvykle děděn maternálně. Výsledky analýz se pak mohou lišit (Rubinoff, 2006; Wiemers et al., 2007). Diskutabilní je také stanovení pevné prahové hodnoty divergencí 3%, jelikož se zdá, že i pokud k izolaci dvou druhů došlo velmi dávnou dobou, například před více než čtyřmi miliony lety, stále bude chybovost v objevování nových druhů větší než 10%. Tento práh totiž bude ukazovat jako nové i druhy, které nejsou izolované reprodukčně (Hickerson et al., 2006). Naopak budou přehlíženy mladé druhy (Kerr et al., 2006). DNA barcoding tedy není vhodná metoda k odhalování nových druhů, může ovšem poukazovat na kryptické druhy a jejich komplexy. Před potvrzením nových druhů je ovšem vždy třeba provádět další analýzy, jinak budou nesprávné identifikace odhalovány až s prodlevou, jako v případě motýla *Astrapes fulgerator* (Hebert et al., 2004b; Brower, 2006), v horším případě nebudou objeveny vůbec. Ironické je, že kladem DNA barcodingu měla být přesnost a eliminace chyb v taxonomii. Současně je DNA barcodingu vyčítáno zejména to, že studie se soustředí jen na některé skupiny organismů, a tím je potírán původní záměr této metody mapovat veškerou biodiverzitu eukaryotického života na planetě (Taylor & Harris, 2012). Vzhledem k tomu, že projekty dosud nebyly ukončeny, věřme, že tato kritika bude vyvrácena a DNA barcoding se v budoucnu zaměří i na dosud opomenuté skupiny.

Nejnovější nedostatky DNA barcodingu vyvstaly s vyvinutím sekvenování nové generace (NGS), díky kterému bude možné velice rychle získávat obrovská množství genomických dat, tedy vyřešit problém taxonomie, který byl jedním z hlavních důvodů pro vznik DNA barcodingu. Je bezpodmínečně nutné, aby se postupy DNA barcodingu vyvíjely, přijímaly nové inovativní metody a náležitě je využívaly. Standardizace neznámá, že metoda musí setrvat v rigidní podobě, v jaké vznikla, dokonce by to zde bylo velice nežádoucí. Díky NGS nebude nutné omezovat délku barcode sekvence a v blízké budoucnosti by měly být tyto postupy finančně snadno dostupné (Taylor & Harris, 2012). Pokud DNA barcoding neupraví svůj přístup k inovacím, hrozí, že se v budoucnu stane zastaralým a *de facto* zbytečným, jelikož bude nahrazen vhodnějšími a přesnějšími metodami, doufejme, že i finančně méně náročnými, než jsou ty současné.

## **5. Projekty a studie s COI barcode, mimo protista**

### **5.1. CBOL a BOLD**

V květnu roku 2004 bylo založeno konsorcium CBOL („The Consortium for the Barcode of Life“), aby se pomohlo rozvoji DNA barcodingu. od roku 2004 se k CBOL přidalo více

než 200 organizací z 50 zemí a 6 kontinentů. Mezi členy patří přírodovědná muzea, biologické sbírky, vládní agentury spolupracující s akademickými i komerčními experty v oblastech biotechnologie, informatiky, genomiky, taxonomie a počítačové vědy. CBOL a jeho členské organizace se zavázaly k vytvoření veřejné a volně dostupné nekomerční knihovny dat získaných DNA barcodingem a patřících k určitým biologickým vzorkům uloženým bezpečně v úložištích. Cílem CBOL je vyvinout nové metody, a také primery, k získání dalších barcodových záznamů a uplatnit tyto metody ve veřejných sférách.

Tyto postupy chce CBOL propagovat stanovením mezinárodních standardů pro laboratoře a protokoly dat tak, aby byly přesné, jednotné a důsledné, a spolehlivě určovaly druhy. Rovněž je nutné podpořit vývoj nových a inovativních technologií, produktů a služeb ke zrychlení, zlevnění a zmobilnění DNA barcodingu do celého světa. Také chce přispět k dosažení cílů Světové taxonomické iniciativy (Global Taxonomy Initiative), jež s pomocí Úmluvy o biologické rozmanitosti (Convention on Biological Diversity) usiluje, podobně jako DNA barcoding, o sjednocení taxonomie a zpřístupnění jejích dat<sup>2</sup>.

Databází pro všechny barcodové sekvence se stal BOLD (Barcode of Life Data Systém). Představuje „pracovní prostor“, kam všechny barcodingové projekty mohou vkládat barcodové sekvence ze svých analýz, spolu s informacemi o daném druhu, a zároveň z něj čerpat podklady k dalším studiím (Ratnasingham & Hebert, 2007). Za tím účelem byla vytvořena webová databanká (<http://www.barcodinglife.com/>), která je stále vyvíjí, nyní je k dispozici již třetí verze (BOLD 3). Jsou zde k dispozici veřejné záznamy barcodových sekvencí, současně je jich zde 1,3 milionu a zároveň kompletní seznam primerů používaných k amplifikacím DNA barcodů. Nalézt zde můžeme také všechny zveřejněné publikace týkající se DNA barcodingu, které byly přímo zapojeny v CBOL, v době psaní této práce jich bylo 2901.

## 5.2. Konference

První konferencí týkající se DNA barcodingu byla konference „Taxonomy and DNA“, konaná v březnu roku 2003 v newyorské CSHL (Cold Spring Harbor Laboratory). Specialisté v oborech systematické zoologie, mikrobiologie a botaniky tam diskutovali spolu s předními molekulárními biology a bioinformatiky o potenciální užitečnosti DNA barcodingu. Ten byl představen jakožto úsilí osekvenovat úsek jednoho genu u všech známých druhů eukaryotických organismů (Stoeckle, 2003). V září téhož roku se pak konala konference

---

<sup>2</sup>Informace lze nalézt na webové adrese [www.cbd.int/doc/publications/cbd-ts-30.pdf](http://www.cbd.int/doc/publications/cbd-ts-30.pdf).

Taxonomy, DNA, and the Barcode of Life, na které se výzkumníci snažili zodpovědět otázky vznesené během první konference. Na těchto konferencích se probíraly pilotní projekty zahrnující pouze živočichy (Stoeckle et al., 2003).

Protože následoval nespočet dalších konferencí zaměřených na DNA barcoding, zmíním se zde jen o těch nejvýznamnějších, které určovaly směr hlavních projektů. V únoru roku 2005 rozvířila vody DNA barcodingu First International Conference on DNA Barcoding v National Museum of History v Londýně, kterou navštívilo více než 230 výzkumníků, a jež byla organizována skrze CBOL (viz dále)<sup>3</sup>. V roce 2007 se zájem o DNA barcoding ještě zvýšil a na The Second International Barcode Conference v Taipei (<http://www.dnabarcodes2007.org/>, [http://staging.enilsson.com/cbol\\_taipei/](http://staging.enilsson.com/cbol_taipei/)) se dostavilo přes 400 výzkumníků. Třetí mezinárodní konference „Barcode of Life“ (Third International Barcode of Life Conference) v Mexiku proběhla v listopadu o dva roky později (<http://dnabarcodes2009.org/>). Na zatím poslední, Fourth International Barcode of Life Conference, <http://www.dnabarcodes2011.org/documents/index.php>), konané v australském městě Adelaide v listopadu roku 2011, se probíraly hlavně nové způsoby statistických analýz, použití NGS (Next Generation Sequencing), a využití DNA barcodingu k ochraně druhů.

### 5.3. Projekty DNA barcodingu s COI u živočichů

Protože živočichové jsou nejstudovanějšími organismy, na počátku se DNA barcoding zaměřil na ně. Mezi jednu z prvních studií, kde šlo hlavně o vyzkoušení této metody a odhalení její efektivity u živočichů, patří rozsáhlá analýza COI sekvencí celkem 13 320 kongenerických dvojic živočišných druhů. Tato studie byla zacílena zejména na hmyz a jiné bezobratlé, strunatců bylo použito jen 964 kongenerických dvojic. Naproti tomu 10 683 dvojic tvořili členovci, 84 ploštěnci, 49 hlístice, 1155 měkkýši a 86 ostnokožci (Hebert et al, 2003). Výsledky byly velice slibné a DNA barcoding se ukázal jako efektivní pomůcka pro identifikaci druhů.

Jediný zádrhel této studie se ukázal o pár let později. Hebert et al. (2003b) uvedli, že u žahavců se DNA barcoding s pomocí COI aplikovat nedá, což ale vyvodil z analýzy pouze 17 druhů, z čehož všechny tři analyzované rody (*Corallium*, *Narella*, *Utrictina*) jsou korálnatci. Huang et al. (2008) ukázali, že medúzovci, a méně i polypovci, měli ve skutečnosti mezidruhovou variabilitu COI sekvencí vysokou, obdobně jako ostatní linie živočichů, a jsou

---

<sup>3</sup>Převzato z dokumentu dostupného na webové adrese [www.barcodeoflife.org/sites/default/files/legacy/pdf/BarcodeofLife-pressreleaseFinal.pdf](http://www.barcodeoflife.org/sites/default/files/legacy/pdf/BarcodeofLife-pressreleaseFinal.pdf).

tedy pro barcodingové analýzy s použitím COI vhodné. Jedinou třídou žahavců, kde DNA barcoding selhává, zůstávají korálnatci (Huang et al., 2008).

V roce 2004 vznikla další studie, tentokrát zaměřená na DNA barcoding chvostoskoků (Hogg & Hebert, 2004). Do této studie bylo zahrnuto 19 druhů a všechny byly identifikovány úspěšně, s nízkou vnitrodruhovou odchylkou a vyšší mezidruhovou odchylkou, která se u jediného rodu (*Folsomia*) vyšplhala mimo průměrné hodnoty, což ukazuje, že ve vzorcích se možná vyskytovaly dosud nepopsané kryptické druhy.

Další studie byly často součástí projektů vzniklých na popud organizace CBOL. Zmiňují se o těch nejobsáhlejších, projekty, které jsou teprve v počátcích, jen vyjmenuji, jelikož k nim často nejsou publikované informace, ani funkční webové stránky.

Projekt, který rozhodně stojí za zmínku, je Lepidoptera Barcode of Life a je zacílený na analýzu sekvencí COI u všech druhů motýlů. Ti byli mezi prvními modelovými organismy, na kterých se tato metoda zkoušela, vybráni byli díky své bohaté druhové rozmanitosti (Hebert et al., 2004a). V době psaní této práce bylo na webové adrese projektu Lepidoptera Barcode of Life (<http://www.lepbarcoding.org/>) uvedeno, že počet „obarcodovaných“ druhů motýlů dosáhl 76 072, což by mělo znamenat pokrytí 46 % druhů z celkového počtu 165 000 známých druhů motýlů. Analýzy COI sekvence se zdají být u motýlů všeobecně úspěšné, jelikož mezidruhové odchylky jsou výrazně větší než vnitrodruhové. Přes obavy, že při analýzách větších geografických oblastí bude DNA barcoding méně efektivní, se úspěšnost identifikací druhů nesnížila ani při jeho aplikaci na velice rozsáhlou oblast Střední Asie (Lukhtanov et al., 2009).

Dalším velkým projektem je ABBI (All Birds Barcoding Initiative), jenž je zaměřený na ptáky, kteří jsou také velice vhodným modelem pro DNA barcoding, protože studie o nich jsou rozsáhlé a byli podrobeni velice intenzivní taxonomické analýze (Kerr et al., 2007). V srpnu roku 2012 mělo barcodové sekvence zatím 4019 druhů ptáků z celého světa (podle [www.barcodingbirds.org](http://www.barcodingbirds.org)). První studie identifikací druhů ptáků podle COI sekvencí se zaměřila na druhy rozmnožující se v Severní Americe, a všechny z nich měly odlišné COI sekvence, naopak u jedinců stejných druhů byly sekvence téměř stejné, což znamenalo obrovský úspěch. Pouze u čtyř druhů byly nalezeny výrazné vnitrodruhové odchylky, druhy byly ale označeny za polytypické, tedy obsahující poddruhy (Hebert et al., 2004b). Tato studie byla po čtyřech letech ještě rozšířena o další druhy, čímž vzniká pokrytí 93 % známých druhů v USA a Kanadě. Původní „polytypické“ druhy z první studie, které vykazovaly rozdílné sekvence i mezi jedinci stejného druhu, byly v roce 2007 uznány jako komplexy kryptických druhů (Kerr et al., 2007).

Mezi prvotními objekty zájmu DNA barcodingových projektů byly také ryby, jelikož představují přibližně polovinu všech známých druhů současných obratlovců. Cílem projektu Fish Barcode of Life Campaign (FISH-BOL) je vytvořit co největší databázi sekvencí COI, pokud možno u všech druhů ryb a paryb. V době zpracovávání této práce byly (podle <http://www.fishbol.org/index.php>) osekvenovány barcodové úseky COI u 8986 druhů ryb a paryb, z čehož nejvíc zástupců bylo mezi paprskoploutvými, největší pokryv druhů ovšem nalezneme u mihulí, chimér a příčnoústých. Zbývá zřejmě ještě přibližně 23 000 druhů bez barcodů. Jakmile bude databáze hotová, bude možné ryby přesně a rychle identifikovat, což je velice důležité pro mnoho oborů, zejména v potravinářství a rybářství (viz šestá kapitola), ale i pro samotné studium biodiverzity ryb. DNA barcoding u nich zatím probíhá velice úspěšně. Ryby vykazují při analýzách COI sekvencí ještě mnohem větší odchylky než výše zmínění ptáci (Ward, 2009).

V první studii COI u ryb z roku 2005 proběhly identifikace nadmíru úspěšně. Pouze u pěti druhů byl problém s amplifikací COI, což mohlo být způsobeno buď nevhodnými primery či degradací DNA ve vzorku (Ward et al., 2005). O dva roky později byla COI studována podrobněji s cílem vyvinout pro ryby lepší primery (Ivanova et al., 2007). Analyzovány byly australské paprskoploutvé ryby, z paryb pak chiméry, rejnoci i žraloci. U ryb bylo provedeno mnoho dalších úspěšných studií, jednou z posledních byl například barcoding ryb Indického oceánu (Lakra et al., 2011).

Po ptácích a rybách se zrodila snaha aplikovat DNA barcoding i na savce. Podle webových stránek projektu Mammalia Barcode of Life (<http://www.mammaliabol.org/>) bylo analyzováno jen 858 druhů. Cílem je ovšem „obarcodovat“ pouze 5426 druhů, tzn. nynější počet tvoří již 16 % z cílového počtu druhů. Mezi řády s nejvíce analyzovanými druhy patří letouni (389 druhů, 35 % z cílového počtu) a hlodavci (282 druhů, což je 12 % z celkového počtu druhů tohoto řádu). Úspěšně analyzovány byly například druhy letounů z Guyany, u několika bylo dokonce odhaleno, že zřejmě představují komplexy více druhů (Clare et al., 2006). Zatím nejrozsáhlejší studií suchozemských obratlovců založené na analýze COI sekvence je pouze rok stará studie, taktéž o letounech. Potvrdila odhalené a odkryla i nové komplexy kryptických druhů (Clare et al., 2011). Další analýza savců se týkala opět letounů, ale i hlodavců a vačic. i přes počáteční potíže s amplifikacemi COI sekvencí vzniklé barcodey nakonec spolehlivě zařadily analyzované jedince do druhů (Borisenko et al., 2008).

Mezi další projekty DNA barcodingu patří Sponge Barcoding Project (<http://www.spongebarcoding.org/>), jenž je zaměřený na houbovce (Porifera), Marine Barcode of Life (<http://www.marinebarcoding.org/>), který má za cíl osekvenovat COI u všech

mořských druhů živočichů, zatím má barcodes 6199 druhů. Většími projekty jsou také Formicidae Barcode of Life projekt (<http://www.formicidaebol.org/>), během něhož bylo dosud osekvenováno COI u 1283 druhů mravenců, nebo Trichoptera Barcode of Life (<http://trichopterabol.org/>), prezentující barcodes 2636 druhů chrostíků. Zajímavý je také projekt analýzy COI sekvencí u karanténních organismů, nazvaný Quarantine Barcode of Life (<http://www.qbol.org/UK/>), který se soustředí na barcoding za účelem globální kontroly rozšiřování výskytu potenciálně nebezpečných organismů.

K dalším projektům, jako Bee Barcode of Life Initiative (Bee-BOL), Coral Reef Barcode of Life, HealthBOL, Mosquito Barcode Initiative (MBI), Polar Barcode of Life (PolarBOL), Shark Barcode of Life (SharkBOL), Tephritid Barcode Initiative (TBI), bohužel nebylo možné najít informace, ani webové stránky. Ani pro tuto práci velice významný projekt barcodingu protist, nazvaný CBOL Protist Working Group (ProWG), nemá dosud žádné zveřejněné informace. Informace o barcodingu protist jsem tedy získávala pouze z jednotlivých dostupných studií.

## 6. Další využití DNA barcodingu

DNA barcoding se rychle osvědčil v oblasti potravinářského průmyslu. Analýzy sekvencí genu pro cytochrom *b* se zkoušely u různých druhů potravin, například u vepřové paštiky, konzervované makrely, uzeného lososa, nebo i u oslích a losích klobás, vařených klokanů (Teletchea et al., 2008). Cytochrom *b* sice není oficiálním barcode, zde se ale potvrdilo, že u zkoumaných obratlovců podle jeho sekvencí lze spolehlivě rozeznat druhy.

Sekvence COI byla využita přímo v určování druhů živočichů v jídlech konzumovaných v několika amerických restauracích. Jednalo se o určení druhů v tuňákovém sushi. Některé druhy tuňáků (*Thunnus obesus*, *T. maccoyii*, *T. orientalis*, *T. thynnus*) totiž podle nejnovějších informací WHO (World Health Organization) překračují povolená množství obsahu rtuti. Konzumování těchto druhů představuje velké zdravotní riziko (Lowenstein et al., 2010).

Sekvence COI dokonce zachraňovala životy. V roce 2007 byli v Chicagu hospitalizováni dva lidé s prudkou otravou po konzumaci ryby z místního trhu, kterou koupili jako d'asa mořského. Díky velice rychlé analýze COI sekvencí ze zbytků ryby se zjistilo, že se ve skutečnosti jednalo o nebezpečnou rybu fugu. I když ještě došlo k několika případům otrav ze stejného zdroje v dalších amerických státech, velice rychle byla celá dodávka těchto ryb označených původně jako mořský d'as stažena z trhu a byl nalezen jejich dodavatel. FDA

(Food and Drug Administration) díky COI identifikacím dosáhla zablokování dovozu čokoliv označeného jako mořský d'as od tohoto dodavatele do celých USA (Grant, 2007).

Využití DNA barcodingu při kontrolách v potravinářském průmyslu se začíná využívat plošně, aplikovat se dá i u výrobků rostlinného původu. Barcode sekvence totiž snadno určí, zda se v potravinách a nápojích doopravdy vyskytují složky uvedené na obalu. Barcode *rbcL* byl například úspěšně využit při identifikacích složek oblíbeného čínského bylinkového nápoje (Liangcha). Potřeba ověřit, z čeho přesně se nápoje skládají, vznikla kvůli rostoucí spotřebě tohoto nápoje a obavě, že se při jeho výrobě začnou používat levnější náhražky, které ovšem nemají slibované zdraví prospěšné účinky. Obava se potvrdila, díky úspěšným identifikacím pomocí *rbcL* ovšem je možné složení nápoje kontrolovat a používání náhražek předcházet (Li et al., 2011).

Perspektivu má využití DNA barcodingu ve forenzní genetice. DNA identifikace založené na sekvencích mitochondriální DNA ve forenzní genetice se prováděly i v minulosti, zajímavým příkladem je využití sekvencí DNA psů při určování pachatelů vražd a jiných kriminálních činů, kde v kradených autech či na oblečení podezřelého byly nalezeny chlupy, které mohly patřit psům obětí (Savolainen & Lundeberg, 1999). Ve forenzní entomologii byla COI sekvence použita k identifikacím druhů bzučivkovitých, jejichž samičky kladou vajíčka na mrtvá těla a podle stádia vývoje larev se dá určit přibližná doba úmrtí. (Chen et al., 2004).

DNA barcoding se jeví také jako velmi mocná pomůcka pro ochranu biodiverzity, jelikož lze pomocí něj rozeznávat, z jakých druhů živočichů pocházejí různé produkty, a zda neobsahují DNA chráněných druhů (Hebert et al., 2004a). Sekvence genu pro cytochrom *b* byla využita v indickém případě zabití (a konzumace) páva druhu *Pavo cristatus*, kteří jsou v Indii ohrožení. Pomocí analýzy vzorku z dřevného prkénka použitého při přípravě masa, byl identifikován druh páva a pachatelé mohli být souzeni (Gupta et al., 2005). Stejná sekvence byla využita i k identifikaci dalšího ohroženého druhu, tygra ussurijského. Důvodem jeho ohrožení je částečně i používání jeho kostí k výrobě tradičních čínských léků (Wetton et al., 2002). Bylo prokázáno, že sekvence COI, tedy oficiální barcode pro živočichy, jsou a nadále budou pro tuto oblast velice prospěšné (Dawnay et al., 2007).

## **7. Projekty DNA barcodingu s alternativními DNA barcody**

Využití sekvencí COI jako DNA barcodu u mnoha skupin nefungovalo, ať už proto, že sekvence byly i mezi druhy shodné, nebo kvůli příliš pomalé evoluci tohoto genu, či protože některé skupiny organismů gen pro cytochrom c oxidázu v genomu ani nemají.

K tomu, aby byl určitý úsek DNA organizací CBOL uznán jako barcode, musí splňovat nejrůznější kritéria<sup>4</sup>. Musí být dokázáno, že COI byla neefektivní, alternativní sekvence musí být důkladně prostudovány a porovnány a musí být schopné spolehlivě rozeznávat sesterské druhy z celé cílové skupiny. Současně musí být daný úsek snadno amplifikovatelný a musí existovat vhodné primery. Problematickými skupinami organismů, kde COI barcoding možný nebyl, jsou zejména houby a rostliny. Například u korálnatců ovšem použití sekvence COI také selhalo (viz výše). Užití COI sekvence se zdá problematické i u některých skupin hmyzu. Konkrétně u druhů, které byly infikovány bakterií *Wolbachia*. Byl totiž odhalen její vliv na variabilitu mitochondriální DNA mezi infikovanými druhy například u bzučivek, kde byla úspěšnost identifikací druhů pouze u 40% z 12 zkoumaných druhů (Whitworth et al., 2007). U druhů bzučivkovitých, které infekcím bakterií *Wolbachia* nepodléhají, byly identifikace pomocí COI sekvence úspěšné (Chen et al., 2004).

### 7.1. Použití DNA barcodingu u hub

V taxonomii hub se začalo, hned jak to bylo možné, k identifikacím využívat mikroskopie a později i molekulární fylogenetiky, jelikož většina druhů je mikroskopických, a i u těch makroskopických se vyskytují mikroskopické životní fáze, navíc mnoho druhů hub je morfologicky podobných a pěstování v laboratorních podmínkách je často obtížné (Seifert, 2009).

Vzhledem k těmto taxonomickým komplikacím se DNA barcoding zdá být jako velice vhodná identifikační pomůcka, Seifert (2009) si dokonce myslí, že by jednou mohl být používán jako hlavní způsob identifikací druhů hub. Bylo ovšem nutné provést důkladné analýzy, aby se zjistilo, která sekvence by mohla být pro houby nejlepším barcodem. Mezi kandidáty patřily jaderné geny pro ribosomální RNA, jako SSU rDNA a LSU rDNA (její D1-D2 podjednotky) a ITS region, nebo geny kódující proteiny jako  $\beta$ -tubulin A, největší a druhá největší podjednotka RNA polymerázy II. Testovány jako potenciální barcodey byly u mnoha skupin hub, zejména u různých zástupců vřeckovýtrusných hub a stopkovýtrusných hub (Dentinger et al., 2011; Schocha et al., 2012).

Protein-kódující geny, jako podjednotky RNA polymerázy II, byly zavrženy kvůli jejich ztížené amplifikaci. Sekvence LSU se zdá být úspěšná u starších linií a u kvasinek, u ostatních skupin ale její použití selhalo, navíc ani nevykazovala jasně definovatelný „barcoding gap“. Podobně na tom je sekvence genu pro SSU rDNA, která rovněž

---

<sup>4</sup>Non-COI Barcode Regions – Guidelines for CBOL Approval, 14 May 2007, dostupné z <http://www.ecbol.org/docs/Guidelines%20for%20non-COI%20selection%20-%204%20June.pdf>.

nevykazovala barcoding gap, ale navíc jako barcode v identifikacích druhů absolutně selhala. Byla tedy z kandidátních sekvencí vyřazena (Dentinger et al., 2011; Schocha et al., 2012). Sekvence COI, tolik úspěšná u živočichů, byla u hub úspěšná pouze při zkoumání malých skupin. Například u druhů rodu *Penicillium* nebylo pomocí COI možné odlišit druhy, jakmile se záběr zahrnutých taxonů zvětšil. Její sekvence pak byly velice málo divergentní a navíc se zde objevilo mnoho intronů, které dosahovaly délek až 1500 bp a významně ztěžovaly amplifikace i tam, kde by jinak COI snad byla úspěšná (Dentinger et al., 2011). Nepřítomnost konzervativních úseků v sekvencích navíc výrazně ztěžuje úspěšné navrzení univerzálních primerů (Seifert, 2009). Navíc některé skupiny hub, jako rod *Neocallimastix*, COI sekvence ani nemají, protože jsou anaerobní a jeho zástupci ztratili dýchací řetězec (Schocha et al., 2012). U těch skupin, kde se pomocí COI sekvence podařilo druhy identifikovat, byly stejně úspěšné sekvence ITS regionu, které slavily úspěch i u většiny dalších skupin hub. ITS region je totiž snadněji amplifikovatelný a vykazuje u hub výraznější „barcoding gap“. Jediným problémem v použití ITS regionu jako barcodu u hub je snad jen složitá tvorba alignmentů při zahrnutí více skupin, tomu se ale lze vyhnout tak, že se alignmenty tvoří po jednotlivých skupinách (Dentinger et al., 2011). Jen u několika málo skupin, např. u rodu *Aspergillus*, byly sekvence identické v komplexech druhů a je třeba dalších analýz k nalezení vhodnějšího barcodu pro tyto skupiny (Geiser et al., 2007). Další možností je využití dvou-lokusového systému barcodingu, kombinací sekvencí ITS a LSU, zejména u kvasinek, i když úspěch se tím zvýšil spíše nepatrně, takže se o jeho užitečnosti stále diskutuje (Schocha et al., 2012).

Jako oficiální barcode pro houby byl tedy v projektu zaměřeném na houby (CBOL Fungal Working Group<sup>5</sup>) navržen ITS region, i když pro některé askomycety je průměrná délka ITS menší než 500bp, což nesplňuje standardizovaná pravidla pro uznání barcodu, a podléhá i dalším komplikacím (viz výše), celkově se ale ze všech sekvencí zdá být pro houby obecně nejvhodnějším (Seifert, 2009).

## 7.2. Použití DNA barcodingu u rostlin

U rostlin se nukleotidy v sekvenci COI mění jen velmi málo, jelikož evoluce tohoto genu je u nich mnohem pomalejší než u živočichů. U rostlin tedy bylo potřeba zvolit jiný DNA barcode (Kress et al., 2005). Jako první potenciální markery byly vyzkoušeny ITS region, mezerník mezi geny *trnH* a *psbA* (*trnH-psbA*) u krytosemenných rostlin. Sekvence *trnH-psbA* je dlouhá jen 450 bp, ale je nejvariabilnějším úsekem v celém plastidovém genomu

---

<sup>5</sup>Informace o projektu dostupné na webové adrese <http://www.fungalbarcoding.org/>.

krytosemenných rostlin. Při identifikacích jednotlivých druhů byl tedy jako DNA barcode poměrně úspěšný, potíže byly jen s jeho amplifikací (Hollingsworth et al, 2009).

ITS region má řadu výhod, mezi nimi to, že lze amplifikovat i po dvou menších úsecích (ITS1, ITS2), má vysokou úroveň mezidruhov<sup>é</sup> divergence, a již se používal v jiných fylogenetických studiích rostlin, takže je k dispozici množství sekvencí k porovnání. Jeho omezení spočívají v nízké druhové variabilitě u nedávno vzniklých linií či ostrovních druhů. ITS region má sice silný fylogenetický signál, ten ale nesa<sup>h</sup>á až do úrovně druhů, na které je barcoding zaměřen, je patrný spíše u vyšších taxonů (Kress et al, 2005). ITS2 úsek byl nedávno vyzkoušen v užší skupině krytosemenných rostlin, v čeledi bobovitých (Fabaceae). Odchytky v sekvencích mezi druhy byly dostatečné, ba značné, a mezi jedinci stejných druhů byly velice malé. ITS2 byl tedy stanoven jako úspěšný barcode pro rozlišování druhů v čeledi bobovitých (Gao et al., 2010).

CBOL zformovalo pracovní skupinu výzkumníků, kteří by vyzkoušeli co nejvíce potencionálních barcodových sekvencí na co nejširším počtu vzorků rostlin, z co nejvíce skupin a oblastí. Jejím cílem je navrhnout jeden univerzální barcode pro rostliny, případně dvoj-lokusový barcode, jehož možné kombinace se (bezvýsledně) probíraly již na druhé mezinárodní konferenci Barcode of Life v Taipei (Hollingsworth et al., 2011). Jako barcode byla nejprve analyzována i samotná sekvence *rbcL*, což plastidový gen kódující ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxylázu/oxygenázu, která se zdá být vhodným markerem spíše pro identifikace řádů a vyšších taxonů, navíc její délka 1428 bp je příliš dlouhá. Lepší možností je sekvence *rbcLa*, což je kratší úsek původní sekvence, mající podle záznamů v GenBank délku jen mezi 526 až 619 bp, což už je mnohem vhodnější pro barcode sekvenci, která se snadno amplifikuje. *RbcLa* ale stále není dostatečně variabilní tak, aby se pomocí ní daly spolehlivě určovat druhy (Kress et al., 2005; Hollingsworth et al., 2009).

Řešením by snad mohla být kombinace *rbcLa* spolu se sekvencí *matK* v dvou-lokusovém systému. *MatK* je nejrychleji se vyvíjejícím plastidovým genem, vykazuje vysokou úspěšnost při identifikaci druhů zejména krytosemenných rostlin (Hollingsworth et al., 2009), je ovšem obtížně amplifikovatelná. Společným využitím *rbcL* a *matK* by se jejich nevýhody eliminovaly (Hollingsworth et al., 2011). Jinými diskutovanými a studovanými kombinacemi sekvencí byly troj-lokusové *rpoC1* s *rpoB* a *matK*, *rpoC1* s *matK* a *trnH-psbA*, či *atpF-H* s *psbK-I* a *matK*, a dvou-lokusové *rbcL* s *trnH-psbA*, jako nejvhodnější se ale stále zdá *rbcLa* s *matK* (Hollingsworth et al., 2011). Sekvence *atpF-H*, případně i *rpoC1* a *rpoB*, v rozlišování druhů selhaly, a to i v kombinaci s další sekvencí.

PsbK–I úsek sice druhy odlišoval poměrně úspěšně, jejich sekvenace byla ovšem příliš náročná (Hollingsworth et al., 2009).

DNA barcoding je tedy u rostlin stále ve fázi objevování vhodných markerů. Zdá se, že hlavním problémem je, že různé sekvence, které se zdají být potenciálními barcody, neurčují spolehlivě přímo druhy rostlin, ale spíše skupiny blízké příbuzných druhů. Vypadá to, že pokud jsou vzorky z úzké geografické oblasti, bude pravděpodobně počet rozlišených druhů vysoký, pokud nejsou druhy ve vzorku blízké příbuzné, a čím záběr vzorků budeme rozšiřovat, zdánlivý počet druhů bude narůstat pomaleji, než ve skutečnosti, protože barcody budou častěji identické. Je také třeba ještě provést rozsáhlejší studie u nahosemenných a výtrusných rostlin, jelikož u těch byla úspěšnost identifikací nižší i s použitím dvoj- lokusového barcodu *rbcLa* a *matK* (Hollingsworth et al., 2011).

## 8. Použití DNA barcodingu ve fykologii

Přestože se mezi řasy řadí i mnoho skupin protist, uvádím je ve zvláštní kapitole, jelikož barcoding u nich byl aplikován hlavně na mnohobuněčné linie. Saunders roku 2005 předpověděl, že „DNA barcoding neznačí konec fykologické taxonomie, ale iniciuje revoluci molekulárně asistované taxonomie, která obrovsky změní počet a rozložení druhů v těchto liniích.“ Nicméně tento nástroj by podle něj neměl být používán samostatně, zejména nyní, stále ve fázi vývoje. Úspěšně byl vyzkoušen u ruduch (Rhodophyta), fotosyntetizujících řas ze superskupiny Archaeplastida. u komplexů druhů *Mazzaella linearis*, *Mazzaella splendens*, druhů rodu *Dilsea* a *Neodilsea* z řádu Gigartinales (třída Florideophyceae), a druhu *Asteromenia peltata* z řádu Rhodymeniales (třída Rhodophyceae) byly analyzovány sekvence COI a zároveň jim byly navrženy odpovídající primery. Podle výsledků porovnaných s předchozími analýzami byly identifikace pomocí COI úspěšné (Saunders, 2005). U dalších řádů ruduch, včetně jednoho předešle zmíněného (Bangiales, Ceramiales, Corallinales, Gigartinales, Gracilariales a Rhodymeniales), bylo použití COI sekvence v porovnání s *rbcL* také úspěšné a dokonce byly odhaleny kryptické druhy (Robba et al., 2006).

## 9. Použití DNA barcodingu u protist

Studií, kde byly využity molekulární markery k identifikacím druhů či rozkrývání jejich fylogenetických vztahů byl u protist proveden nespočet, zaměřuji se nyní proto přímo na takové studie protist, které se přímo prezentují jako DNA barcoding.

## 9.1. Pilotní studie

Většina prvních studií zabývajících se DNA barcodingem protist byly porovnávací, kde se testovaly různé barcodes a vyhodnocovalo se, který barcode bude pro konkrétní skupinu protist nejvhodnější, respektive který se může stát jejich „oficiálním barcode“ (Waugh, 2007). Stále je však mnoho skupin (ve skutečnosti jich je většina), u kterých ani tato „pilotní“ studie provedena nebyla. i u těch skupin, kde potencionální úspěšný barcode vybrán byl, je nutné stále získávat další sekvence barcodeů.

V původním konceptu barcodingu byla jedním z hlavních bodů univerzalita a standardizace. Zrovna u protist se ale úspěšnost různých barcodeů skupinu od skupiny a tým od týmu liší a ustanovit jeden oficiální barcode pro celá protista zatím nelze. Nejen, že tento fakt znesnadňuje analýzy a vyhodnocování studií, jelikož je třeba výsledky srovnávat, ale navíc tato komplikace snižuje hodnotu metody DNA barcodingu u protist. U některých velkých skupin se ovšem podařilo stanovit barcodes, které fungují úspěšně u většiny jejich zástupců. Vzhledem k diverzitě a předpokládanému stáří jednotlivých skupin protist protist je toto ale vcelku předvídatelné (Saunders, 2005).

Hlavními skupinami protist, na kterých se podle BOLD prováděl DNA barcoding, jsou Alveolata, zejména obrněnky a nálevníci, Stramenopiles, a skupina chlorarachniofyt patřící do linie Rhizaria. Zajímavé je, že ani u blízce příbuzných skupin nebylo možné ustanovit jeden společný DNA barcode. COI sekvence se úspěšně dala využít pouze u několika skupin.

## 9.2. Obrněnky

První analýza COI sekvence u obrněnek měla ověřit platnost dosavadního větvení šesti větví ve dvou hlavních skupinách rodu *Symbionidium*. Výsledky jejich platnost potvrdily, až na výjimku jedné větve. COI byla tedy uznána jako potencionální barcode pro obrněnky (Santos et al., 2002; Takabayashi et al., 2004). COI sekvence byla později použita u mnoha dalších skupin obrněnek, kde odhalila neočekávanou druhovou diverzitu (Stern et al., 2010). po první barcodingové studii byly u obrněnek testovány i další potencionální barcodes. Litaker et al. (2007) hledali barcode, který by pomáhal rozlišovat druhy volně žijících obrněnek a zaměřil se na ITS sekvenci, která byla u obrněnek sekvenována v té době v rozsáhlejší míře a výsledky se tedy daly porovnávat s ostatními ITS sekvencemi v databázi GenBank. Vnitrodruhové genetické distance mezi ITS kopiemi byly nižší než mezidruhové distance, a ITS se tedy zdál být vhodným barcode pro obrněnky. U nedávno vzniklých druhů mohou být genetické distance příliš malé, a proto byl ITS pro obrněnky stanoven jen jako doplňující

barcode k COI sekvenci či jako barcode pro monoeukaryotické kultury (Litaker et al., 2007). COI i ITS byly rovněž využity k odhalení dvou linií u obrněnky *Oxyrrhis marina*, představujících pravděpodobně dva oddělené druhy (Lowe et al., 2010). Alternativou k COI barcodu u obrněnek je také COB (cytochrom *b*) sekvence. COB je u nich dostatečně sekvenčně variabilní k rozlišování druhů, jeho krátká délka, která usnadňuje amplifikace a sekvenování, je ovšem krátká příliš k rozlišování vyšších taxonů u obrněnek (Lin et al., 2009).

### 9.3. Nálevníci

Mezi cílové skupiny DNA barcodingu u protist patří nálevníci, kteří patří spolu s obrněnkami a apikomplexy do větve Alveolata (Adl. et al., 2005). Nálevníci (narozdíl od mnoha jiných skupin protist) disponují nesmírnou morfologickou diverzitou a obývají mnoho různých typů prostředí po celém světě (Lynn, 2008). Studie jejich diverzity jsou komplikovány metodologickými obtížemi, spojenými se zdlouhavým ověřováním pravosti/platnosti druhů a náročnou stavbou databáze, navíc jejich morfologická diverzita v mnoha případech neodráží tu genetickou, což naznačuje, že počet kryptických druhů je u nálevníků velice vysoký (Strüder-Kypke & Lynn, 2010).

Prahové hodnoty genetické variability se obvykle dají stanovit pro celou taxonomickou skupinu (kmen) organismů, nicméně u nálevníků se tyto hodnoty liší u každé třídy a někdy i mezi skupinami (řády a rody) v těchto třídách. Výsledky analýz se navíc liší i u jednotlivých markerů (Gentekaki & Lynn, 2009; Strüder-Kypke & Lynn, 2010). Ve třídě Oligohymenophorea jaderné sekvence (SSU rDNA) například u druhu *Carchesium polypinum* vůbec vysokou vnitrodruhovou odchylku nevykazovaly, zatímco analýzy odchylek u mitochondriální sekvence (COI) izolátů *C. polypinum* naopak odhalily vysokou genetickou diverzitu, čímž naznačují, že jde o komplex kryptických druhů (Gentekaki & Lynn, 2009). Při následném zahrnutí vzorků *C. polypinum* z více oblastí COI sekvence pomohly odhalit ještě větší genetickou diverzitu než v původní studii, přestože sami autoři uvedli, že studie může mít slabá místa vzhledem k nedodržení striktních postupů odběru vzorků a tomu, že i přes odběr vzorků z více oblastí stále převažovala jedna oblast. Další studie tohoto nálevníka z třídy Peritricha jsou k objasnění jeho diverzity nezbytné (Gentekaki & Lynn, 2012).

Podobně u druhů rodu *Paramecium*, a zejména v druhovém komplexu *Paramecium aurelia*, které se také shodovaly v SSU rDNA, v některých případech i ITS sekvencích

(u druhů *P. caudatum* a *P. multimacronucleatum*), COI vykazovaly vysoké vnitrodruhové odchylky, značící existenci více druhů. (Gentekaki & Lynn, 2009; Barth et al., 2006; Strüder-Kypke & Lynn, 2010). U druhu *Tetrahymena thermophila* byly sekvence COI shodné u všech izolátů z jedné geografické oblasti, pouze u dvou izolátů z jiné oblasti byly COI sekvence odlišné. Další druhy rodu *Tetrahymena*, které COI sekvence identifikovaly jako oddělené, se v přechozích studiích pomocí SSU rDNA rozeznat nedaly (Lynn & Strüder-Kypke, 2006; Kher et al., 2011).

U *Cyclidium glaucoma*, dalšího nálevníka třídy Oligohymenophora, byly testovány SSU rDNA, ITS-1, 5,8S a ITS-2 a COI sekvence. Podle analýz SSU rDNA vyšlo, že *C. glaucoma* je pravděpodobně komplex kryptických druhů (Guggiari & Peck, 2007). Vzhledem k tomu, že sekvence COI a ITS autoři nemohli porovnat v databázi se sekvencemi dalších izolátů, nemohli vyvodit, nakolik jsou COI či ITS pro druh *C. glaucoma* vhodné jako barcode markery. Nicméně usoudili, že i podle analýzy COI existuje v komplexu druhů *C. glaucoma* skupina kryptických druhů. Ke spolehlivým závěrům jsou však nutné další analýzy. Aplikace DNA barcodingu s použitím COI sekvencí byla tedy ve všech těchto případech úspěšná (Barth et al., 2006; Gentekaki & Lynn, 2009; Lynn & Strüder-Kypke, 2006; Strüder-Kypke & Lynn, 2010). Přestože sekvence SSU rDNA se u většiny druhů skupiny Oligohymenophorea značně shodují, v ostatních třídách nálevníků bývá jejich odchylka vysoká (Strüder-Kypke & Lynn, 2010). COI byl tedy pro nálevníky uznán jako vhodnější a citlivější DNA marker než ITS, případně u třídy Oligohymenophora i než SSU rDNA.

U nálevníků z jiných tříd byly hodnoceny i další sekvence, úseky V4 a V9 z SSU rDNA a LSU rDNA. u třídy Spirotrichea byl studován řád Tintinnida, jehož druhy jsou morfologicky poměrně snadno rozeznatelné, a největší úspěch v určování druhů měla analýza sekvence LSU rDNA, protože výsledky se shodovaly s poznatky získanými tradičními morfologickými identifikacemi podle tvaru loriky. V4 a V9 úseky měly jen nízkou úspěšnost (Santoferrara et al., 2012).

Jelikož mnohdy opravdu není možné k určování využít pouze jeden druh sekvence, zkouší se u protist dual-locus barcodingu či také multi-locus barcoding, který pomocí analýz více druhů sekvencí odhalí vztahy přesněji, než by bylo možné pouze s jedním druhem sekvence. Mezi navrhované sekvence, které by mohly být využívány k multi-locus barcodingu, patří předešle zmíněné úseky ribozomálních genů (ITS1-5,8S, ITS2, LSU), mitochondriální COI, ale i úseky histonových genů, konkrétně H4. Spolu s ostatními byly H4 sekvence použity k vyjasňování fylogenetických vztahů mezi syngeny *Paramecium bursaria*

a k prozkoumání úrovně vnitrodruhových odchylek izolátů ze vzdálených geografických oblastí (Greczek-Stachura et al., 2012).

DNA barcoding dokonce zpochybňoval druhy z rodu *Tetrahymena* (*T. nanneyi* a *T. nipissingi*), které podle výsledků z analýz izozymů a podle rozmnožovací kompatibility určil Simon et al. (1985) jako samostatné druhy. Chantangsima et al. (2007) totiž v jejich molekulárních analýzách sekvencí COI a SSU rDNA vykazovaly tyto dva druhy příliš blízkou příbuznost a shodu sekvencí. Nicméně díky jejich reprodukční izolaci jejich status oddělených druhů nezavrhli.

#### 9.4. DNA barcoding protistních parazitů

DNA barcoding by mohl mít velký význam také u jednobuněčných parazitů, jelikož jejich spolehlivá identifikace je obzvláště důležitá. V rozsáhlém objemu vzorků z parazitů skupiny Piroplasmida (Apicomplexa) porovnávali úspěšnost několika sekvencí, 18S rRNA, 28S rRNA, ITS1, ITS2 a COI. ITS2 měl tentokrát nejvyšší úspěšnost v identifikacích druhů a byl tedy zvolen jako nejvhodnější (Gou et al., 2012).

U jiné skupiny protist, stramenopilů, byla provedena analýza jaderných ribozomálních sekvencí u parazitárního rodu *Blastocystis*. Vzhledem k tomu, že *Blastocystis* je striktně anaerobní, jeho modifikované mitochondrie nekódují gen pro COI, a tudíž bylo nutné stanovit jako barcode jinou sekvenci. Vybrána byla jaderná sekvence SSU rDNA (Scicluna et al., 2006). K detekci subtypů a jejich spojení s výskytem infekcí byla využita analýza velké části SSU rDNA. Tyto genetické varianty nelze snadno určit epidemiologicky, morfologicky ani podle preference hostitele, jelikož různé skupiny hostitelů jsou infikovány stejnými variantami a naopak. Pomocí barcode úseku sekvence SSU rDNA byly jednotlivé subtypy detekovány úspěšně. (Scicluna et al., 2006).

#### 9.5. Autotrofní Stramenopiles

U rozsivek byly spolu s COI zkoušeny i další markery, jako rbcL, 18S rDNA a ITS (Hamsher et al., 2011). Jako první potenciální barcode byl analyzován úsek 18S rDNA, který je často používán pro fylogenetické studie a výsledky analýzy mohly tedy být spolehlivě porovnány s dalšími sekvencemi z databáze GenBank. S výsledky morfologických metod určování rozsivek se v pilotní studii shodovala pouze třetina výsledků analýz molekulárního barcodu 18SrDNA, zbylé druhy byly podpořeny buď jen molekulárně, nebo jen morfologicky. U rodu *Sellaphora*, který pravděpodobně obsahuje komplexy kryptických druhů, byla vnitrodruhová

variabilita COI vždy stejná či větší, než u 18S rDNA i rbcL, zatímco mezidruhová variabilita byla vždy větší u COI. u dalších rodů rozsivek (*Pinnularia*, *Eunotia* a *Tabularia*.) byly sekvence COI vhodnějším barcodingovým markerem. ITS byl jako barcode u některých taxonů rozsivek zavrhnut vzhledem k jeho vnitrogenomové variabilitě. (Jahn et al., 2007, Evans et al., 2007) Sekvence ITS2 měla ovšem úspěch u barcodingu tříd *Mediophyceae* a *Bacillariophyceae*, kde byl dostatečně variabilní k oddělení většiny druhů. (Moniz et al., 2010) Výhody rbcL spočívají v nepravděpodobnosti kontaminací jiným DNA, protože rbcL je plastidový gen, a nedávno byl jeho 3P úsek navržen Hamsherem et al. (2011) jako hlavní barcode pro rozsivky. Jako pomocný barcode u environmentálních studií by mohl sloužit LSU D2/D3, pro který byly vyvinuty univerzální PCR primery, ale nedá se využít k rozlišování blízce příbuzných druhů rozsivek (Hamsher et al., 2011). Další možností dosažení přesnějších výsledků je využívání barcodu rbcL ve spojení s ITS regionem, jako dual-locus marker, protože u analýz *Mediophyceae* a *Bacillariophyceae* rbcL barcode nebyl dostatečně citlivý (Macgillivray & Kaczmaraska, 2011), ale je snadno amplifikovatelný a sekvenovatelný, jeho využití je tedy stále na místě.

Oomycety (Perenosporomycota) druhotně ztratily plastidy a použít rbcL by u nich možné nebylo. Barcoding úseků sekvencí COI, ITS2 a LSU rDNA u nich byl aplikován s cílem zlepšit podmínky pro kontrolu výskytu jejich patogenních zástupců (z rodů *Phytophthora* a *Pythium*). Výsledky analýz s COI a ITS2 se poměrně shodovaly, oba byly v identifikacích druhů oomycet úspěšné, vnitrodruhová variabilita COI a ITS se shodovala, mezidruhová variabilita byla ovšem větší u ITS (Robideau et al., 2011). COI byla ale uznána jako vhodnější barcode vzhledem k tomu, že se snadno sekvenuje a i amplifikuje, protože má navržené primery univerzální pro oomycety. U několika dalších rodů ITS2 sekvence ani nemohly být analyzovány, protože se u nich vyskytovaly inserce, jež tyto úseky protáhly do délek, které již nebyly snadno amplifikovatelné. Sekvence LSU rDNA byla, vzhledem k její nejnížší mezidruhové variabilitě, jako barcode pro odhalování druhů oomycet zavržena (Robideau et al., 2011).

## 9.6. Amoebozoa

S velkým zpožděním za výše zmíněnými protisty se začal výslovný barcoding aplikovat u améb. První studií, kde byly sekvence analyzovány s cílem vyřešit, které z nich by mohly být potencionálními barcody pro identifikace druhů, byla studie lobosních améb rodu *Vanella simplex*. Nasonova et al. (2010) u nich porovnávali efektivitu různých barcodů (SSU rDNA,

ITS1, ITS2, COI). ITS a SSU rDNA sekvence měly nejmenší úspěšnost v identifikaci druhů, některé druhy rodu *Vanella* (*V. arabica*, *V. bursella*, *V. simplex*) se pomocí nich vůbec nedaly rozlišit kvůli vysokému polymorfismu. SSU rDNA má navíc u lobosních améb nízkou evoluční rychlost. Naproti tomu pomocí COI s nízkou úrovní polymorfismu vykazuje vysoké fylogenetické rozlišení a všechny druhy, nerozlišitelné pomocí ITS a SSU rDNA, se pomocí ní daly spolehlivě rozeznat. Jediný problém je u COI s navrhováním primerů (Nassonova et al., 2010). Efektivita COI jako barcodu se osvědčila také u jiných amoebozoí, arcellinid, nejen jako pomůcka k identifikaci známých druhů rodu *Nebella*, ale i jako možnost, jak odhalit kryptické druhy, jejichž množství se u amoebozoí podceňuje. U jiných zástupců arcellinid (rod *Quadrullella*, a druh *Hyalosphenia papilio*) se výsledky analýzy sekvence COI shodovaly s výsledky morfologických studií (Kosakyan et al., 2012).

## 9.7. Rhizaria

COI barcode je efektivní i u améb ze skupiny Cercozoa, rod *Cyphoderia* (řád Euglyphida). U druhů rodu *Cyphoderia* a u druhu *Pseudocorythion acutum* ze vzdálených oblastí světa byly porovnány sekvence COI a SSU rDNA. COI sekvence se ukázala jako dostatečně variabilní, dokonce trojnásobně vůči SSU rDNA, a tím pádem jako vhodnější marker pro určování blízké příbuzných izolátů z těchto skupin. Pomocí COI sekvence byly rovněž odhaleny kryptické druhy v populaci *Cyphoderia ampulla*, které byly nerozlišitelné pomocí světelné i skenovací elektronové mikroskopie (Heger et al., 2011). Lara et al. (2011) ukázal, že je u tří druhů améb rodu *Assulina* vnitrodruhová odchylka COI výrazně pod standardní prahovou hodnotou (Hebert et al., 2003). Zároveň je tato sekvence mezidruhově pětinašobně variabilnější než SSU rDNA sekvence (Lara et al., 2011).

Ne u všech cercozoí ovšem COI byla zvolena jako nejvhodnější, u malé fotosyntetické skupiny mořských protist, třídy Chlorarachniophyta, která má sekundární plastidy s redukovaným jádrem (nukleomorf), bylo vhodnější aplikovat nukleomorfové sekvence ITS, které jsou u této třídy k rozlišování druhů dostatečně variabilní (Gile et al., 2010). V této skupině bylo dosud popsáno jen několik druhů, kvůli jejich drobné velikosti se dají morfologicky identifikovat pouze za použití elektronové mikroskopie, a i to jejich složité životní cykly ztěžují. Většina analyzovaných izolátů byla zařazena k již známým druhům, ale byly objeveny i kryptické druhy (Gile et al., 2010). U jiných cercozoí byly ovšem jako vhodné markery uznány i SSU rDNA sekvence, podle jejichž fylogenetických analýz bylo dokonce popsáno 8 nových rodů (*Thaumatomonas*, *Reckertia*, *Spongomonas*, *Rhogostoma*,

*Agitata*, *Neoheteromita* a *Paracercomonas*). V této studii šlo ovšem spíše o environmentální studii fylogenetických vztahů mezi vyššími taxonomickými stupněmi u Cercozoí, než o DNA barcoding v pravém slova smyslu, přesto mi její výsledky přišly v této práci hodné zmínky, jelikož odhalily i kryptické druhy (Howe et al., 2011). Analýza s použitím genu pro RNA velké ribozomální podjednotky (LSU rDNA), respektive jejích domén D1-D5, byla u cercozoí prováděna také, přičemž se podobala výsledkům analýz s SSU rDNA, ale u některých druhů (*Cercomonas* sp., *Bodomorpha* sp., *Metromonas simplex*, *Thaumatomonas* sp., *Gyromitus* sp., *Paracercomonas marina*, *Paracercomonas metabolica* a *Gromia oviformis*) se zdála jako vhodnější DNA barcode (Wylezich et al., 2010).

Jako jediný minibarcode u protist byl stanoven 36 bp dlouhý úsek SSU rDNA (37f helix), který byl použit ve fylogenetických analýzách vztahů mezi dírkonošci. Použití tohoto minibarcodu je u nich možné díky velice rychlé evoluci ribozomálních genů. Vzhledem ke své nepatrné délce s ním lze určovat jen do úrovně rodů, a to i jen s polovičním úspěchem. Ten je ale možná snížen tím, že u foraminifer dosud není vytvořena rozsáhlá databáze sekvencí (Lecroq et al., 2011; Pawlowski & Lecroq, 2010).

## 10. Závěr

Celkově se tedy dá říci, že u dosavadních studií DNA barcodingu u protist se dají najít vhodné barcodey, i když ne jeden univerzální pro všechny skupiny. Použitelnost různých barcodů kolísá mezi různými skupinami od úrovně řádů k celému kmeni. Zdokonalení této metody bude u protist možné, pokud poroste počet sekvencí v databázích, aby se výsledky daly spolehlivě porovnávat, a pokud budou navrženy vhodnější a univerzálnější primery pro jednotlivé větší skupiny mezi protisty. Přestože se nedá určit jeden univerzální barcode pro všechna protista, je u nich tato metoda perspektivní. U mnoha skupin protist, zejména u exkavát či linií chromalveolát, archaeplastid, rhizárií i amébozoí barcodingové studie chybí, a je tedy třeba je doplnit, aby byl pohled na DNA barcoding u protist kompletní.

Původní ambice DNA barcodingu stát se novým základem moderní taxonomie postupně vybledly a pokorně se nazvaly taxonomickou pomůckou. Vzhledem k tomu, že DNA barcoding je zkrátka metoda identifikace druhů, nejde ji ani porovnávat s klasickou taxonomií jako takovou, ale pouze s její metodikou.

Úspěch DNA barcodingu spočívá v jeho „perfekcionismu“, jenž umožňuje jeho metodika, kde přesný standardizovaný a hlavně globální postup, spojený s mnohonásobnými kontrolami minimalizuje chyby dnes nejdokonalejším možným způsobem. DNA barcoding

může být perfektně ladící souhrou velkých vizí, smělých nápadů, přesných metod a fungování softwarových programů nevyvinutých přímo pro něj, ale vyvinutých s velmi vhodnou načasovaností tak, aby DNA barcoding vůbec mohl vzniknout.

Je již jasné, že DNA barcoding se nemůže stát hlavní metodou taxonomie, protože morfologické postupy mají v mnoha oblastech i lepší využití, ale budoucnost je otevřená a pokud se DNA barcoding přizpůsobí pokroku v sekvenování, mohl by u některých organismů zaujmout pozici významné taxonomické metody určování druhů.

Kritiky DNA barcodingu (Will & Rubinoff, 2004), které zavrhnou tlak na taxonomy provádět rutinní identifikace druhů, podle mého názoru nespátřují správně konečný cíl tohoto projektu, a sice vytvořit databázi barcodů, podle kterých bude možné provádět identifikace spolehlivě, rychle, levně a rutinně i „netaxonomy“. Pro taxonomy by tedy tato metoda měla v závěru znamenat užitečnou pomůcku jejich oboru, která jim práci usnadní a nepopírá současné využívání klasických metod, pokud jsou účinné. Nyní samozřejmě ještě v dostatečné míře práci taxonomů neusnadňuje, protože současná fáze je stále počátečním krokem stavby této databáze. Aby bylo možné ji využívat plnohodnotně, je třeba ji nejdříve dotvořit. Nelze ovšem samozřejmě předem odhadnout, kdy a zda vůbec někdy bude tato databáze „hotová“, jelikož jsou neustále objevovány nové druhy organismů, tuto databázi bude tedy potřeba vždy upravovat a přizpůsobovat současné situaci a době. To je ovšem pochopitelné a nijak to nesnižuje její hodnotu. Dělat závěry o této metodě jako celku je tedy předčasné a jde pouze hovořit o jednotlivých úspěších či selháních v jejím průběhu. Její skutečný význam se ukáže až v budoucnu. Zavrhnout něco proto, že to nemá jasnou a předem danou šanci na stoprocentní úspěch je ovšem, obzvláště ve vědě, nesmyslné.

## 11. Seznam citované literatury

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., Taylor, M. F. J. R., 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Eukaryotic Microbiology* 52, 399–451.
- Agnarsson, I., Kuntner, M., 2007. Taxonomy in a changing world: Seeking solutions for a science in crisis. *Systematic Biology* 56, 531–539.
- Baker, R. J., Bradley, R. D., 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy* 87, 643–662.
- Barrett, R. D. H., Hebert P. D. N., 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83, 481–491.
- Barth, D., Krenek, S., Fokin, S. I., Berendonk, T. U. 2006. Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome c oxidase i sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53, 20–25.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 148–155.
- Billington, N., Hebert, P. D. N., 1990. Mitochondrial DNA markers in walleye and a simple technique for their determination in live fish. *American Fisheries Society, Symposium* 7, 492–498.
- Borisenko, A. V., Lim, B. K., Ivanova, N. V., Hanner, R. H., Hebert, P. D. N., 2007. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources* 8, 471–479.
- Brower, A. V. Z., 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: ‘ten species’ of *Astraptes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperiiidae). *Systematics and Biodiversity* 4, 127–132.
- Burns, J. M., Janzen, D. H., Hajibabaei, M., Hallwachs, W., Hebert, P. D. N., 2008. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6350–6355.
- Cameron, S., Rubinoff, D., Will, K., 2006. Who Will actually use dna barcoding and what will it cost? *Systematic Biology* 55, 844–847.
- Clare, E. L., Lim, B. K., Engstrom, M. D., Eger, J. L., Hebert, P. D. N., 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes* 7, 184–190.
- Clare, E. L., Lim, B. K., Fenton, M. B., Hebert P. D. N., 2011. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. *PLoS ONE* 6, e22648.
- Cracraft, J., 1983. Species concepts and speciation analysis. In: *Current Ornithology* 1, 159–187. Plenum Press, New York, 2nd ed.
- Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G. R., Thorpe, R. S., 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173, 1–6.

- Dentinger, B. T. M., Didukh, M. Y., Moncalvo, J. M., 2011. Comparing COI and ITS as dna barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina). *PLoS ONE* 6, e25081.
- DeSalle, R., 2006. Species discovery versus species identification in dna barcoding efforts: response to rubinoff. *Conservation Biology* 20, 1545–1547.
- Doerder, F. P., Gates, M. A., Eberhardt, F. P., Arslanyolu, M., 1995. High frequency of sex and equal frequencies of mating types in natural populations of the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8715–8718.
- Evans, K. M., Wortley, A. H., Mann, D. G., 2007. An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist* 158, 349–364.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294–299.
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., Pang, X., Xu, H., Chen, S., 2010. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology* 130, 116–121.
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., Samson, R. A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59, 1–10.
- Gentekaki, E., Lynn, D. H., 2009. High-level genetic diversity but no population structure inferred from nuclear and mitochondrial markers of the peritrichous ciliate *Carchesium polypinum* in the Grand River Basin (North America). *Applied and Environmental Biology* 75, 3187–3195.
- Gentekaki, E., Lynn, D., 2012. Spatial genetic variation, phylogeography and barcoding of the peritrichous ciliate *Carchesium polypinum*. *European Journal of Protistology*, in press.
- Gile, G. H., Stern, R. F., James, E. R., Keeling, P., 2010. Dna barcoding of chlorarachniophytes using nucleomorph ITS sequences. *Journal of Phycology* 46, 743–750.
- Godfray, H. C. J., 2002. Challenges for taxonomy. *Nature* 417, 17–19.
- Gou, H., Guan, G., Liu, A., Ma, M., Xu, Z., Liu, Z., Ren, Q., Li, Y., Yang, J., Chen, Z., Yin, H., Luo, J., 2012. A DNA barcode for Piroplasma. *Acta Tropica* 124, 92–97.
- Grant, B., 2007. Cataloging life: Can a single barcode of DNA record biodiversity and keep us safe from poisons? *The Scientist* 21, 36.
- Greczek-Stachura, M., Potekhin, A., Przyboś, E., Rautian, M., Skoblo, I., Tarcz, S., 2012. Identification of *Paramecium bursaria* syngens through molecular markers – comparative analysis of three loci in the nuclear and mitochondrial DNA. *Protist* 163, 671–685.
- Gregory, T. R., 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434, 1067.
- Guggiari, M., Peck, R., 2008. The bacterivorous ciliate *Cyclidium glaucoma* isolated from a sewage treatment plant: Molecular and cytological descriptions for barcoding. *European Journal of Protistology* 44, 168–180.

- Gupta, S. K., Verma, S. K., Singh, L., 2005. Molecular insight into a wildlife crime: the case of a peafowl slaughter. *Forensic Science International* 154, 214–217.
- Hajibabaei, M., DeWaard, J. R., Ivanova N. V., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Kirk, S. L., Mackie, P. M., Hebert, P. D. N., 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 360, 1959–1967.
- Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M., Hallwachs, W., Hebert, P. D. N., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 968–971.
- Hajibabaei, M., Smith, M. A., Janzen, D. H., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B., Hebert, P. D. N., 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 6, 959–964.
- Hamshera, S. E., Evans, K. M., Mann, D. G., Poulíčková, A., Saunders, G. W., 2011. Barcoding diatoms: Exploring alternatives to COI-5P. *Protist* 162, 405–422.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., de Waard, J. R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 96–99.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 313–321.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14812–14817.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., Francis, C. M., 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science Biology* 2, 1657–1663.
- Heger, T. J., Pawlowski, J., Lara, E., Leander, B. S., Todorov, M., Golemansky, V., Mitchell, E. A. D., 2011. Comparing potential COI and SSU rDNA barcodes for assessing the diversity and phylogenetic relationships of cyphoderiid testate amoebae (Rhizaria: Euglyphida). *Protist* 162, 131–141.
- Hickerson, M. J., Meyer, C. P., Moritz, C., 2006. dna barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology* 55, 729–739.
- Hogg, I. D., Hebert P. D. N., 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 82, 749–754.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., Little, D. P., 2011. choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 6, e19254.
- Hollingsworth, P. M., Forresta, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. J., Kim, K., Kress, W. J., Schneider, H., van Alphen Stahl, J., Barrett, S. C. H., van den Berg, C., Bogarin, D., Burgess, K. S., Cameron, K. M., Carine, M., Chacón, J., Clark, A., Clarkson, J. J., Conrad, F., Devey, D. S., Ford, C. S., Hedderson, T. A. J., Hollingsworth, M. L., Husband, B. C., Kelly, L. J., Kesanakurti, P. R., Kim, J. S., Kim, Y., Lahaye, R., Lee, H., Long, D. G., Madriñán, S., Maurin, O., Meusnier, I., Newmaster, S. G., Park, C., Percy, D. M., Petersen, G., Richardson, J. E., Salazar, G. A., Savolainen, V., Seberg, O., Wilkinson, M. J., Yi, D., Little, D. P., (CBOL Plant Working Group),

2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12794–12797.
- Howe, A. T., Bass, D., Scoble, J. M., Lewis, R., Vickerman, K., Arndt, H., Cavalier-Smith, T., 2011. Novel cultured protists identify deep-branching environmental dna clades of Cercozoa: New genera *Tremula*, *Micrometopion*, *Minimassisteria*, *Nudifila*, *Peregrinia*. *Protist* 162, 332–372.
- Huang, D., Meier, R., Todd, P. A., Chou, L. M., 2008. Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution* 66, 167–174.
- Chantangsi, C., Lynn, D. H., Brandl, M. T., Cole, J. C., Hetrick, N., Ikonomi, P. 2007. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of the genus *Tetrahymena*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2412–2425.
- Chen, W. Y., Hung, T. H., Shiao, S. F., 2004. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *Journal of Medical Entomology* 41, 47–57.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., Hebert, P. D. N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7, 544–548.
- Jahn, R., Zetsche, H., Reinhardt, R., Gemeinholze, B., 2007. Diatoms and DNA barcoding: a pilot study on an environmental sample. *Proceedings of the 1st Central European Diatom Meeting 2007*, 63–68.
- Janzen, D. H., Hallwachs, W., Blandin, P., Burns, John M., Cadiou, J., Chacon, I., Dapkey, T., Deans, A. R., Epstein, M. E., Espinoza, B., Franclemont, J. G., Haber, W. A., Hajibabaei, M., Hall, J. P. W., Hebert, P. D. N., Gauld, I. D., Harvey, D. J., Hausmann, A., Kitching, I. J., Lafontaine, D., Landry, J.-F., Lemaire, C., Miller, J. Y., Miller, J. S., Miller, L., Miller, S. E., Montero, J., Munroe, E., Rab Green, S., Ratnasingham, S., Rawlins, J. E., Robbins, R. K., Rodriguez, J. J., Rougerie, R., Sharkey, M. J., Smith, M. A., Solis, M. A., Sullivan, J. B., Thiaucourt, P., Wahl, D. B., Weller, S. J., Whitfield, J. B., 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources* 9 (Suppl. 1), 1–26.
- Johnson, N. K., Cicero, C., 2004. New mitochondrial DNA data affirm the importance of Pleistocene speciation in North American birds. *Evolution*, 58, 1122–1130.
- Kerr, K. C. R., Stoeckle, M. Y., Dove, C. J., Weigt, L. A., Francis, C. M., Hebert, P. D. N., 2006. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* 7, 535–543.
- Kher, C. P., Doerder, P. F., Cooper, J., Ikonomi, P., Achilles-Day, U., Kupper, F. C., Lynn, D. H., 2010. Barcoding *Tetrahymena*: discriminating species and identifying unknowns using the cytochrome c oxidase subunit I cox-1 barcode. *Protist* 162, 2–13.
- Kosakyan, A., Heger, T. J., Leander, B. S., Todorov, M., Mitchell, E. A. D., Lara, E., 2012. COI barcoding of nebelid testate amoebae (Amoebozoa: Arcellinida): extensive cryptic diversity and redefinition of the Hyalospheniidae Schultze. *Protist* 163, 415–434.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., Janzen, D. H., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8369–8374.

- Lakra, W. S., Verma, M. S., Goswami, M., Lal, K. K., Mohindra, V., Punia, P., Gopalakrishnan, A., Singh, K. V., Ward R. D., Hebert, P. D. N., 2011. DNA barcoding Indian marine fishes. *Molecular Ecology Resources* 11, 60–71.
- Lara, E., Heger, T. J., Scheihing, R., Mitchell, E. A. D., 2011. COI gene and ecological data suggest size-dependent high dispersal and low intra-specific diversity in free-living terrestrial protists (Euglyphida: Assulina). *Journal of Biogeography* 38, 640–650.
- Lecroq, B., Lejzerowicz, F., Bachar, D., Christen, R., Esling, P., Baerlocher, L., Østerås, M., Farinelli, L., Pawlowski, J., 2011. Ultra-deep sequencing of foraminiferal microbarcodes unveils hidden richness of early monothalamous lineages in deep-sea sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 13177–13182.
- Li, M., Wong, K., Chan, W., Li, J., But, P. P., Cao, H., Shaw, P., 2011. Establishment of DNA barcodes for the identification of the botanical sources of the Chinese ‘cooling’ beverage. *Food Control* 25, 758–766.
- Lin, S., Zhang, H., Hou, Y., Zhuang, Y., Miranda, L., 2009. High-level diversity of dinoflagellates in the natural environment, revealed by assessment of mitochondrial *cox1* and *cob* genes for dinoflagellate DNA barcoding. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1279–1290.
- Litaker, R. W., M. W. Vandersea, S. R. Kibler, R. Steven, K. S. Reece, S. Kimberly, N. A. Stokes, F. M. Lutzoni, B. A. Yonish, M. A. West, M. N. D. Black, and P. A. Tester. 2007. Recognizing dinoflagellate species using ITS rDNA sequences. *Journal of Phycology* 43, 344–355.
- Lowe, C. D., Montagnes, D. J. S., Martin, L. E., Watts, P. C., 2010. Patterns of Genetic Diversity in the Marine Heterotrophic Flagellate *Oxyrrhis marina* (Alveolata: Dinophyceae). *Protist* 161, 212–221.
- Lowenstein, J. H., Burger, J., Jeitner, C. W., Amato, G., Kolokotronis, S., Gochfeld, M., 2010. DNA barcodes reveal species-specific mercury levels in tuna sushi that pose a health risk to consumers. *Biology Letters* 6, 692–695.
- Lukhtanov, V. A., Sourakov, A., Zakharov, E. V., Hebert, P. D. N., 2009. DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. *Molecular Ecology Resources* 9, 1302–1310.
- Lynn D. H., Strüder-Kypke M. C. 2006. Species of *Tetrahymena* identical by small subunit rRNA gene sequences are discriminated by mitochondrial cytochrome c oxidase i gene sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53, 385–387.
- Macgillivray, M. L., Kaczmarek, I., 2011. Survey of the Efficacy of a Short Fragment of the *rbcl* Gene as Supplemental DNA Barcode for Diatoms. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 58, 529–536.
- Moniz, M. B. J., Kaczmarek, I., 2010. Barcoding of diatoms: Nuclear encoded ITS revisited. *Protist* 161, 7–34.
- Mallet, J., 2006. Species Concepts. In: *Evolutionary Genetics: Concepts and Case Studies*. Fox, C. W. and Wolf, J. B. (eds.), Oxford University Press, 367–373.
- Mallet, J., Willmott, K., 2003. Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 57–59.
- Mayden, R. L., 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: *Species: The UNITS of Biodiversity*. Claridge, M. F. et al. (eds.). Chapman & Hall, New York, 2nd ed., 381–424.

- Meier, R., Zhang, G., Ali, F., 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. *Systematic Biology* 57, 809–813.
- Meusnier, I., Singer, G. A. C., Landry, J., Hickey, D. A., Hebert, P. D. N., Hajibabaei, M., 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BioMed Central Genomics*, 9, 214.
- Meyer, C. P., Paulay, G., 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3, 2229–2238.
- Nassonova E., Smirnov A., Fahrni J., Pawlowski J., 2010. Barcoding amoebae: comparison of SSU, ITS and COI genes as tools for molecular identification of naked lobose amoebae. *Protist* 161, 102–115.
- Nixon, K. C., Wheeler, Q. D., 1990. An Amplification Of The Phylogenetic Species Concept. *Cladistics* 6, 211–223.
- Pawlowski, J., Lecroq, B., 2010. Short rDNA barcodes for species identification in Foraminifera. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 57, 197–205.
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N., 2007. BOLD: The barcode of life data system. *Molecular Ecology Notes* 7, 355–364.
- Robba, L., Russell, S. J., Barker, G. L., Brodie, J., 2006. Assessing the use of the mitochondrial Cox1 marker for use in dna barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93, 1101–1108.
- Robideau, G. P., de Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q., A., Gachon, C. M. M., Hu, C., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B., Lévesque, C. A., 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase Subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11, 1002–1011.
- Rubinoff, D., 2006. Utility of mitochondrial dna barcodes in species conservation. *Conservation Biology* 20, 1026–1033.
- Saccone, C., DeCarla, G., Gissi, C., Pesole, G., Reyes, A., 1999. Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195–209.
- Santoferrara, L. F., McManus, G. B., Alder, V. A., 2012. Utility of genetic markers and morphology for species discrimination within the order Tintinnida (Ciliophora, Spirotrichea). *Protist*, in press.
- Santos, S. R., Taylor, D. J., Kinzie, R. A. III, Hidaka, M., Sakai, K., Coffroth, M. A. 2002. Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (cp23S)-rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23, 97–111.
- Saunders, G. W., 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360, 1879–1888.
- Savolainen, P., Lundeberg, J., 1999. Forensic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs. *Journal of Forensic Science* 44, 77–81.
- Sciocluna, S. M., Tawari, B., Clar, C. G., 2006. DNA Barcoding of Blastocystis. *Protist* 157, 77–85.
- Seifert, K. A., 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9 (Suppl. 1), 83–89.

- Schmidt, T. R., Wu, W., Goodman, M., Grossman, L. I., 2001. Evolution of nuclear- and mitochondrial-encoded subunit interaction in cytochrome c oxidase. *Molecular Biology and Evolution* 18, 563–569.
- Schocha, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., and Fungal Barcoding Consortium, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6241–6246.
- Simon, E. M., Meyer, E. B., Preparata, R. M., 1985. New wild *Tetrahymena* from Southeast Asia, China, and North America, including *Tetrahymena malaccensis*, *Tetrahymena asiatica*, *Tetrahymena nanneyi*, *Tetrahymena caudata*, and *Tetrahymena silvana* n. spp. *Journal of Protozoology* 32, 183–189.
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., Crandall, K. A., 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13486–13491.
- Stern, R. F., Horak, A., Andrew, R. L., Coffroth, M-A., Andersen, R. A., et al. (2010). Environmental Barcoding reveals massive dinoflagellate diversity in marine environments. *PLoS ONE* 5, e13991.
- Stoeckle, M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Hanken, J., Baker, J., 2003. Taxonomy, DNA, and the barcode of life. *Draft Conference Report, Meeting held at Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY, September 10–12 2003*.
- Strüder-Kypke, M. C., Lynn, D. H., 2010. Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit i (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of ITS suitability as a biodiversity marker. *Systematics and Biodiversity* 8, 131–148.
- Takabayashi, M., Santos, S. R., Cook, C. B., 2004. Mitochondrial DNA phylogeny of the symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta). *Journal of Phycology* 40, 160–164.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., Vogler, A. P., 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 70–74.
- Taylor, H. R., Harris, W. E., 2012. An emergent science on the brink of irrelevance: A review of the past 8 years of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 12, 377–388.
- Teletchea, F., Bernillon, J., Duffraisse, M., Laudet, V., Hänni, C., 2008. Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *Journal of Applied Ecology* 45, 967–975.
- Ward, R. D., 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources* 9, 1077–1085.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions Royal Society B* 360, 1847–1857.
- Waugh, J., 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays* 29, 188–197.
- Wetton, J. H., Tsang, C. S. F., Roney, C. A., Spriggs, A. C., 2002. An extremely sensitive species-specific ARMS PCR test for the presence of tigerbone DNA. *Forensic Science International* 126, 137–144.

- Whitfield, J., 2003. DNA barcodes catalogue animals. *Nature*, doi: 10.1038/news030512-7.
- Whitworth, T. L., Dawson, R. D., Magalon, H., Baudry, E., 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society B* 274, 1731–1739.
- Wiemers, M., Fiedler, K., 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* 4, 8.
- Will, K. W., Mishler, B. D., Wheeler, Q. D., 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54, 844–851.
- Will, K. W., Rubinoff, D., 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20, 47–55.
- Wilson, E. O., 2003. The encyclopedia of life. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 77–80.
- Wylezich, C., Nies, G., Mylnikov, A. P., Tautz, D., Arndt, H., 2010. An evaluation of the use of the LSU rRNA D1-D5 domain for DNA-based taxonomy of eukaryotic protists. *Protist* 161, 342–352.
- Zhang, J., Wang, J., Xia, T., Zhou, S., 2009. DNA barcoding: species delimitation in tree peonies. *Science in China, Series C: Life Sciences* 52, 568–78.