

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Kateřina Tučková**

Porovnání metabarcodingu a morfologických přístupů pro analýzu diverzity společenstev  
protist

A comparison of metabarcoding and morphology-based identification of protist communities

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Mgr. Pavel Škaloud, Ph.D.

Praha, 2020



**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně 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 8.6.2020

.....

Kateřina Tučková

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli, doc. Mgr. Pavlu Škaloudovi, Ph.D. za ochotu vždy poradit a pomoci a za jeho rychlé odpovědi na mé otázky. Také bych ráda poděkovala svojí rodině a přátelům za podporu při psaní práce.

## Abstrakt

Tato práce popisuje metodu metabarcodingu, její historii, princip a současné využití. Jednou z oblastí, ve které metabarcoding umožnil rozvoj poznání, je výzkum diversity protist. I přestože jsou protista na Zemi hojně rozšířená a zastávají mnoho důležitých rolí v ekosystémech, o jejich diverzitě toho příliš mnoho nevíme. Tradiční mikroskopické techniky založené především na určování druhů podle jejich morfologie nejsou vždy pro studium protist úplně vhodné vzhledem k jejich malé velikosti, nízké koncentraci jedinců v prostředí a konvergentní morfologické evoluci u některých skupin. Stejně jako tradiční mikroskopické techniky, i metoda metabarcodingu má své výhody a nevýhody. Tato práce přináší porovnání výhod a nevýhod metabarcodingu a mikroskopických technik pro určování diversity protist a snaží se zdůraznit potřebu, proč bychom měli při výzkumu použít obou těchto metod.

**Klíčová slova:** metabarcoding, protista, diverzita, mikroskopie, taxonomie, environmentální DNA (= eDNA), morfologické určení druhů, 18S rRNA

## Abstract

This thesis is focusing on metabarcoding; its history, principles and current use in science. Metabarcoding brings us a new way to observe a diversity of protists. Although the protists are ubiquitous on the Earth and play a key role in the majority of biological processes, our knowledge of their diversity is still very poor. Traditional microscopy techniques are mostly based on morphology-based identification of taxa. However, they are not so suitable for investigating protist diversity due to their small size, low concentration in the environment, and the convergent morphological evolution of many groups. Similarly, the metabarcoding has its pros and cons, as well. This thesis summarizes pros and cons of both techniques, trying to emphasize the need to both of them to gain a more complete insight into the diversity of protists on the Earth.

**Key words:** metabarcoding, protists, diversity, microscopy, taxonomy, environmental DNA (= eDNA), morphology-based identification, 18S rRNA

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Historie metabarcodingu .....	3
3	Princip metabarcodingu .....	5
3.1	Ideální metabarcode sekvence .....	5
3.2	Odběr eDNA vzorků z prostředí.....	7
3.3	Extrakce, amplifikace a sekvenování DNA.....	10
3.4	Referenční databáze.....	12
3.5	Možnosti analýzy získaných dat.....	13
4	Využití metabarcodingu.....	15
4.1	Monitorování ekosystémů a jejich biologické rozmanitosti.....	15
4.1.1	Monitorování moří .....	16
4.1.2	Monitorování sladkých vod.....	16
4.2	Analýza mikrobiomu .....	17
4.3	Znečištění.....	17
4.4	Analýza kvality ovzduší .....	17
5	Výhody a nevýhody metabarcodingu a tradičních mikroskopických technik pro analýzu společenstev protist a jejich porovnání .....	18
5.1	Výhody metabarcodingu.....	18
5.2	Nevýhody metabarcodingu.....	18
5.3	Výhody tradičních mikroskopických technik.....	19
5.4	Nevýhody tradičních mikroskopických technik .....	20
5.5	Porovnání výsledků obou metod při studiu diverzity protist.....	20
6	Závěr .....	22
7	Zdroje.....	23

# 1 Úvod

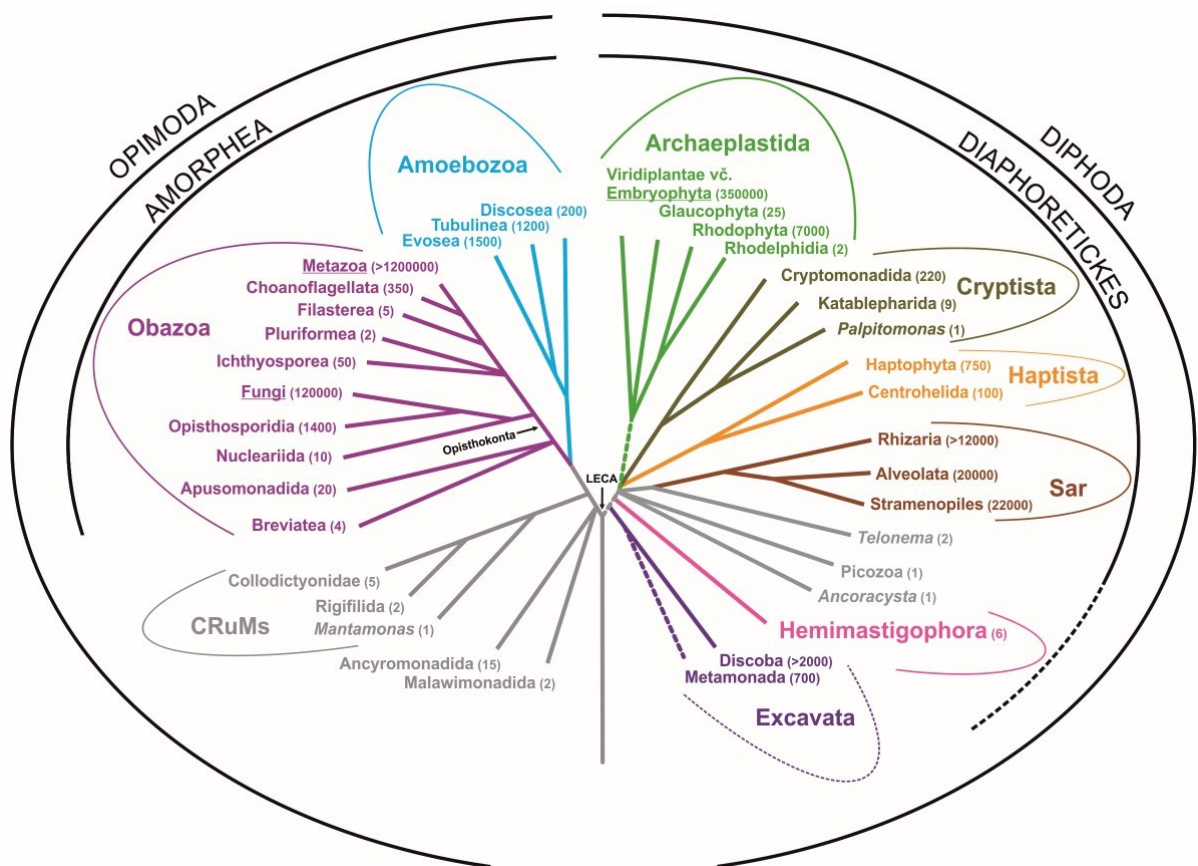
Organismy označované jako protista nalezneme v různých skupinách napříč celým eukaryotickým stromem života. Do protistů řadíme organismy, které jsou jednobuněčné a velmi drobné od 1  $\mu\text{m}$  (*Ostreococcus tauri*; Chretiennot-Dinet et al., 1995), ale i organismy mnohobuněčné, které mohou dorůstat několika metrů (*Macrocystis pyrifera*; Zimmerman & Robertson, 1985). Stejně jako je různá jejich velikost, zastávají tyto organismy různé funkce v ekologických i biogeochemických procesech. Mezi ty nejdůležitější patří: fixace uhlíku, dekompozice, přenos energie a choroby zvířat a rostlin (Adl et al., 2019; Corliss, 2001; Geisen et al., 2019; Stein et al., 2014; Wetzel, 2001). I když tyto organismy zastávají mnoho funkcí ve vodních i terestrických ekosystémech, o jejich diverzitě, rozšíření a ekologických nárocích toho u mnoha skupin příliš mnoho nevíme. Během posledních několika desítek let díky rozvoji molekulárních metod učinila vědecká společnost velký pokrok v poznání diversity protistů (Caron et al., 2012).

Ke studiu diverzity protistů se dříve využívalo hlavně jejich morfologické určení pod mikroskopem. Ve světelném mikroskopu byla pozorována většina druhů protistů (např. Céza et al. 2015; Neustupa and Němcová 2001), transmisní elektronový mikroskop se hojně používá k určení šupin *chrysomonád* (Čertnerová et al., 2019; Němcová et al., 2000) a skenovací elektronový mikroskop ke studiu schránek rozsivek (Pinseel et al., 2019) či jiných povrchových struktur jiných druhů protistů (Bourland et al., 2018). Některé studie však ukazují, že některé druhy od sebe nelze pouhým pozorováním pod mikroskopem rozlišit pro nedostatek určujících znaků a konvergentní morfologické evoluce (Krienitz et al., 2010; Pinseel et al., 2019; Škaloud & Rindi, 2013; Von Der Heyden et al., 2004).

Díky vývoji a rostoucí popularitě molekulárních metod pro identifikaci jednotlivých organismů a druhů je dnes většina diverzitních studií založena na sekvenování a analýze environmentální DNA (= eDNA). Vědci však v těchto studiích objevili mnoho rDNA sekvencí, které nelze přiřadit k dosud popsaným druhům (Behnke et al., 2011; Howe et al., 2009; Šlapeta et al., 2005). Na zemi se tedy nachází více druhů protistů, než jsme si mysleli dříve, když jsme jejich diverzitu pozorovali pouze pod mikroskopem. Některé druhy se nám však molekulárními metodami zachytit nedaří a nacházíme je i nyní jen pod mikroskopem (Groendahl et al., 2017; Rippin et al., 2018; Škaloud et al., 2020). Proto některé studie nyní využívají kombinace molekulárních a mikroskopických metod k zjištění, co nejpřesnějšího výskytu druhů na daném stanovišti. I přestože v současné době bylo provedeno mnoho studií zabývajících se diverzitou protistů, odhady kolik jich je celkem na světě se pořád pohybují

celkem na široké škále mezi pár desítkami milionů až 160 miliony, obzvlášť když zahrneme i parazitické a symbiotické taxony (Adl et al., 2012; Larsen et al., 2017).

Cílem této práce je shrnout výhody a nevýhody dříve používaných mikroskopických metod, a popsat jaké výhody a nevýhody nám přináší použití současných molekulárních metod (hlavně použití metabarcodingu). A proč bychom měli ke studiu diverzity protist využívat obou těchto metod.



Obr. 1 Fylogenetický strom eukaryot (Čepička unpubl. 2019)



## 2 Historie metabarcodingu

Termín DNA metabarcoding byl poprvé použit v roce 2011 (François Pompanon et al., 2011; Riaz et al., 2011). Tito vědci jako metabarcoding označili současně probíhající určení mnoha taxonů z jednoho vzorku na základě jejich DNA. Již předtím však mikrobiologové rutinně používali analýzu eDNA vzorků k tomu, aby mohli zkoumat i organismy, které se nedají kultivovat. Jejich hlavní cíle byly tři, (i) určit mikrobiální taxony přítomné ve vzorku, (ii) skrz analýzu kódujících genů odhadnout jejich potencionální biochemickou funkci, (iii) skládání genomů nekultivovatelných organismů. I když se cíl (i) shoduje s účelem metabarcodingu, mikrobiologové používali pro tuto metodu název metagenomika (Tringe et al., 2005). Jiné názvy používané dříve pro metabarcoding jsou ekometagenetika (Porazinska et al., 2010), ekogenomika (Chariton et al., 2010), enviromental barcoding (Hajibabaei et al., 2011), metataxogenomika (Terrat et al., 2012) a metasystematika (Hajibabaei, 2012). Kromě toho ještě existuje metatranskriptomika, která se zabývá analýzou veškeré RNA analyzované z enviromentálního vzorku. Tato metoda má potenciál pro studování i taxonomického zařazení i biochemické funkce organismů, ale je i plná výzev jako krátký poločas rozpadu messenger RNA a že většina celkové RNA je tvořena ribosomální RNA, která neposkytuje přímé informace o funkčním aspektu (Marcelino et al., 2019; Selinger et al., 2003).

První protokol k extrakci eDNA ze sedimentů publikoval Ogram et al., 1987. O tři roky později Giovannoni et al., 1990 publikoval studii, ve které studoval diverzitu genu 16S rRNA bakterioplanktonu ze Sargassového moře. Ve stejném roce použili podobný postup i Ward et al., 1990, kteří se ve své studii zabývali studováním bakterií horkých pramenů. Zjistili, že metody závislé na kultivaci organismů odhalí jenom asi 20 % diverzity mikroorganismů a navrhli metodu analýzy genu 16S rRNA, která je na kultivaci nezávislá. Gen 16S rRNA je v mikroorganismech běžný, ale jeho sekvence je zároveň specifická pro různé druhy. Metabarcoding založený na sekvenování a metagenomika se kolem roku 2000 stali běžnými metodami v mikrobiologii. První článek o DNA metabarcodingu, který se zaměřil na studii megafauny, vyšel v roce 2003. Tento článek ukazuje, že je možné získat z permafrostu DNA mamutů, bizonů, koňů a starověkých rostlin a že metabarcoding může být užitečný pro studium paleobiologie (Willerslev et al., 2003). Po zveřejnění této studie se analyzování starodávné eDNA stalo velmi populárním, a to ať už použitím technik DNA metabarcodingu (Epp et al., 2015; Giguet-Covex et al., 2014), nebo metagenomiky (Smith et al., 2015). Nejčastěji byla k těmto studiím využívána eDNA získaná ze sedimentu z jezer.

První metabarcoding studie spočívaly v naklonování jednotlivých fragmentů DNA. Tyto fragmenty byly vneseny do plasmidů či bakteriofágů, které umožnily jejich izolaci a namnožení. Tento časově a finančně náročný krok byl však odstraněn s vývojem next-generation sekvenování po roce 2005 (Shendure & Ji, 2008). Toto zefektivnění a zlevnění způsobilo ještě větší popularitu metabarcodingu a metagenomiky, a proto se začaly používat i ke studiu makroorganismů. Přesněji řečeno k analýze jejich potravy a složení mikrobiomu. Pro tyto studie se eDNA získávala z jejich exkrementů (Deagle et al., 2010; Pompanon et al., 2012). Později se objevily studie, které se znovu zabývaly mikroorganismy, ale získávaly eDNA z větších objemů půdy či vody (Ficetola et al., 2008; Sørstebø et al., 2010). Cílem většiny z nich bylo identifikovat konkrétní druh (Dejean et al., 2012; Goldberg et al., 2011) a některé z nich se zabývaly identifikací více taxonů skrze metabarcoding (Valentini et al., 2016). V současné době se metabarcoding těší velké oblibě a mnoho vědců publikuje různé studie využívající tuto metodu.

### 3 Princip metabarcodingu

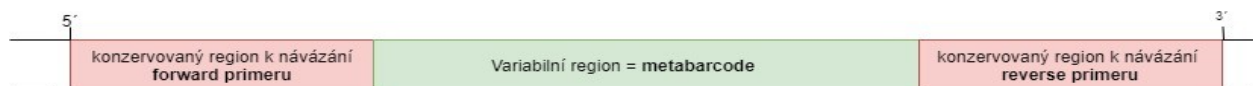
DNA metabarcoding spočívá ve zkoumání metabarcodesekvencí, jejich namnožení z eDNA a jejich následné analýzy.

Jako enviromentální DNA (=eDNA) označujeme komplexní směs DNA různých organismů, která se nachází ve vzorku z daného prostředí. Za prostředí můžeme považovat půdu, sediment, vodu, exkrementy, materiál získaný proséváním sedimentu, materiál získaný filtrací vody nebo vzduchu, nebo vzorky, které obsahují hlavně námi studovanou skupinu (získané např. filtrací vody skrze různě velké póry) (Taberlet et al., 2012).

Chceme-li určovat přítomnost nebo absenci druhů v eDNA vzorku, máme na výběr ze dvou hlavních možností převážně založených na PCR (=polymerase chain reaction; Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1985, 1988). Pokud v naší studii jde o určení přítomnosti nebo absence jednoho konkrétního druhu, využijeme metody založené na kvantitativní PCR (Logan et al., 2009). Pokud je naše studie zaměřená spíše na zjištění, jaké druhy se na daném stanovišti vyskytují, je lepší využít obecnější metody založené buď na target DNA, nebo na shotgun sekvenování, které mají lepší potenciál odhalit všechny přítomné druhy. Metoda target DNA sekvenování spočívá v izolování, amplifikování a osekvenování DNA pouze z určité a přesně definované oblasti a používá se tehdy, pokud je potřeba určit sekvenci několika málo genů či jejich částí (Krejčí et al., 2015; Saiki et al., 1988; White et al., 1989). Metoda shotgun sekvenování spočívá v náhodném rozštěpení analyzované DNA na krátké úseky, které jsou klonovány do vektoru, a poté sekvenovány z obou konců. Takto získané úseky se vzájemně překrývají, což nám umožňuje na počítači sestavení celé sekvence (Deininger, 1983; Pospíšilová et al., 2009).

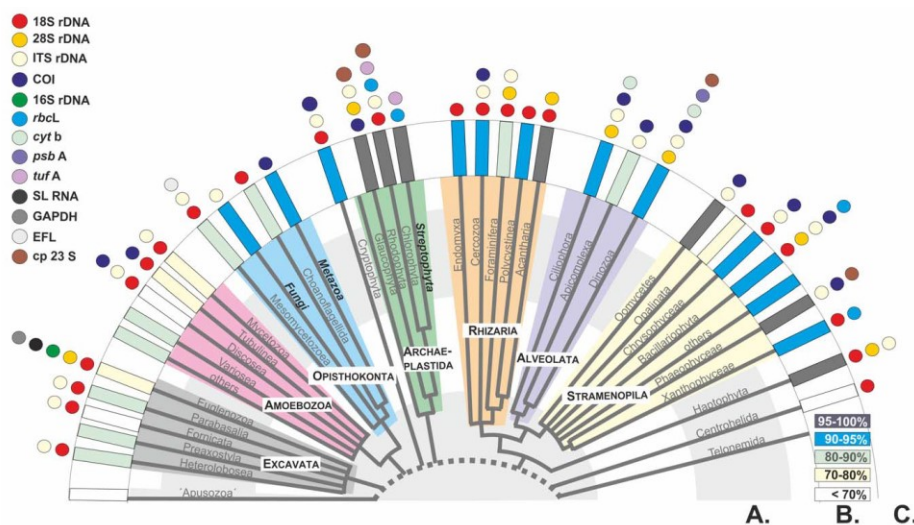
#### 3.1 Ideální metabarcodesekvence

Prvním důležitým krokem pro vytvoření úspěšného metabarcoding experimentu je zvolení co nejideálnější metabarcodesekvence. Ideální metabarcodesekvence je taková sekvence, která obsahuje krátký a taxonomicky specifický úsek DNA variabilní pro všechny druhy v dané skupině a zároveň ohraničený dvěma konzervovanými úseky, které jsou specifické pro danou skupinu organismů a zároveň různé od skupin, které nezkoumáme. Tyto konzervované úseky následně slouží k přichycení primerů při PCR (Taberlet et al., 2018).



Obr. 2 Metabarcodesekvence. Upraveno podle Taberlet et al., 2018

Ideální velikost metabarcoding sekvence závisí na počtu druhů, které chceme rozlišit. Podle teorie nám metabarcoding sekvence o  $n$  nukleotidech umožní rozlišit  $4^n$  druhů. To znamená, že sekvence dlouhá 10 nukleotidů by měla stačit na rozlišení cca jednoho milionu druhů. Jelikož však všechny druhy nemají unikátní metabarcoding sekvence, je reálné číslo mnohem nižší. Sekvence, která se již dlouho používá pro analýzu diverzity prokaryot (Bacteria a Archaea), se nachází na 16S ribosomální RNA, která je přibližně 1500 bp dlouhá (Johnson et al., 2019; Pace, 1997). Její eukaryotický ekvivalent 18S rRNA, který je průměrně o 300 bp delší, se začal později využívat pro studium mikroeukaryot (Geisen et al., 2019; López-García et al., 2001; Moreira, 2002). Oba tyto geny kódují RNA molekulu, která je součástí malé ribosomální podjednotky. Ribosomy jsou makromolekuly důležité pro všechny organismy, protože překládají mRNA do proteinů. Tato jejich funkce je konzervovaná napříč fylogenetickým stromem. 18S rRNA je vhodná pro studium celkové diversity protist, ale pro jejich jednotlivé skupiny může být lepší použít jiné markery, které nám umožní v námi studované skupině lepší rozlišení mezi jednotlivými druhy (viz Obr.3; Pawlowski et al., 2012).

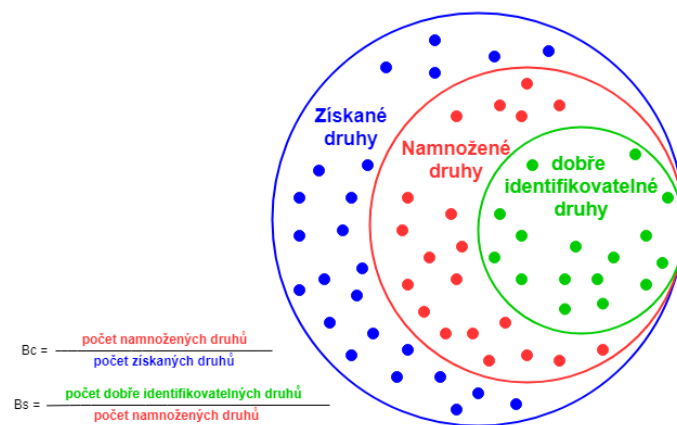


Obr. 3 Protistní linie a příklady používaných markerů A. Fylogeneze eukaryot B. Průměrná genetická podobnost V4 18S rDNA mezi všemi kongenerními druhy v každé linii C. Používané skupinově specifické úseky genů pro metabarcoding. Převzato z Pawlowski et al., 2012

18S rRNA gen obsahuje 9 relativně variabilních částí ohraničených více konzervativními úseky, které společně pokrývají širokou škálu evolučních rychlostí a umožňují nám fylogenetické porovnání mezi vzdáleně i blíže příbuznými taxony. Dnes nejvíce využívané regiony pro sekvenování za účelem zjišťování druhů jsou V4 a V9. V počátcích high-throughput sekvenování se používal region V9, který kvůli svojí relativně krátké délce (<200

bp) lépe vyhovoval počátečnímu limitu délky sekvencí. Díky své délce byl vhodný pro moderní hluboké metabarcoding studie, což výrazně snížilo náklady na sekvenování. Jeho nevýhodou však je, že tím, jak je krátký, nám poskytuje jen omezenou fylogenetickou informaci. Dnes je proto více používán region V4 (400-500 bp), který nám díky své délce poskytuje více fylogenetické informace často i na úrovni druhů nebo rodů (Dunthorn et al., 2012).

Při vybírání metabarcoding sekvence pro experiment se využívá i coverage index (=Bc) a specifity index (=Bs). Coverage index značí podíl počtu namnožených druhů a počtu veškerých zjištěných druhů a specifity index značí podíl počtu dobře identifikovatelných druhů a počtu namnožených druhů. Přesnost těchto indexů závisí na množství a kvalitě dostupných sekvencí studované skupiny ve veřejných databázích (Ficetola et al., 2010).



Obr. 4 Výpočet coverage (= Bc) a specifity (= Bs) indexu. Upraveno podle Taberlet et al., 2018.

Je též vhodné, aby vybraná sekvence byla hojně zastoupena ve veřejných databázích, pokud si nechceme vytvářet vlastní (Geisen et al., 2019).

I když člověk *in silico* vybere a otestuje ideální metabarcoding sekvenci a primery pro svůj experiment, není vůbec jisté, že spolu budou reagovat primery a sekvence stejně dobře i v reálném světě.

### 3.2 Odběr eDNA vzorků z prostředí

Pro jakoukoliv ekologickou studii je též důležité dobře navrhnout strategii pro odběr vzorků z prostředí. Od dobře zvolené strategie vzorkování se odvíjí i možné interpretace jejích výsledků. Neexistuje však optimální strategie vzorkování vhodná pro všechny studie. Při výběru vhodné vzorkovací strategie pro svůj experiment by měl výzkumník zvážit a zvolit strategii podle typu prostředí (vodní či terestrické), vědecké otázky, kterou si klade, statistické

interpretace výsledků, logistických a finančních nároků, a pokud byla provedena pilotní studie tak i její výsledky (Magurran, 2011). Pro eDNA studie je navíc důležité zvážit i časová okna, ve kterých se daný organismus vyskytuje či vyskytoval na dané lokalitě i to, že se na dané lokalitě může vyskytovat v různých vývojových stádiích. Optimální vzorkovací strategie se též liší mezi organismy, které z našeho prostředí získáme. Například z půdních vzorků můžeme získat DNA hub, bakterií, ale i rostlin, a složení druhů v mikrobiálním společenstvu je určitě ovlivněné jinými prostorovými měřítky než u rostlin. Výsledná vzorkovací strategie by tedy měla být určitým kompromisem mezi vzorkovacími strategiemi vhodnými pro jednotlivé druhy. Další věcí, o kterou se musí výzkumník pokusit, je standardizovat postupy a minimalizovat degradaci získané eDNA. Tato úvaha je důležitá pro získání co nejpřesnějšího a nejrealističtějšího srovnání mezi jednotlivými vzorky a studiemi, a chceme-li použít stejné parametry pro PCR reakci (Prosser, 2010; Taberlet et al., 2018). K pochopení eDNA ekologie je vhodné vědět něco o jejím původu, stavu, transportu a osudu v prostředí. Podle původu můžeme eDNA rozdělit na dvě velké skupiny – extracelulární a intracelulární DNA. Intracelulární složka eDNA pochází z žijících jednobuněčných nebo mnohobuněčných organismů přítomných právě teď v daném prostředí, případně z částí větších organismů (např. kořenů rostlin). Ve vzorku se může vyskytovat jak v aktivní formě v podobě buněk, tak ve formě dormantních stádií. Složka extracelulární má svůj původ v rozkládajících buňkách, které již nejsou chráněny buněčnou stěnou, a proto rychleji podléhají následné degradaci vlivem fyzikálních, biologických nebo chemických procesů (Levy-Booth et al., 2007; Pietramellara et al., 2009).

Jednou z problematických částí eDNA studií je fakt, že nevíme, jak dlouho je extracelulární DNA jednotlivých organismů schopná přetrvávat v daném prostředí. Doba jejího přetrvání v prostředí totiž závisí na různých fyzikálních, chemických a biologických faktorech, které se liší mezi jednotlivými prostředími (Levy-Booth et al., 2007; Pietramellara et al., 2009). Častými faktory zvýšené degradace DNA v prostředí může být zvýšená aktivita mikroorganismů nebo zvýšená teplota prostředí. Ve vodním prostředí bylo provedeno mnoho studií, které ukazují, že DNA jsme v prostředí schopni detekovat v období mezi několika dny až po několik týdnů (Dejean et al., 2011; Green et al., 2011). Rozdíl času, po který je DNA detekovatelná, závisí hlavně na zjištěné hustotě organismů nebo enzymatické aktivitě, ale i na abiotických podmínkách jako sluneční záření či zakalenost vody (Green et al., 2011). Obecně je DNA delší dobu uchována v sedimentech než ve vodním sloupci, neboť zde k jejímu konzervování napomáhají anoxické podmínky (Corinaldesi et al., 2011). V moři i v jezerech mohou vrstvy sedimentu obsahovat i několik tisíc let starou DNA (Giguët-Covex et al., 2014;

Smith et al., 2015). V terestrickém prostředí se Yoccoz et al., 2012 podařilo najít v alpské půdě stopy DNA brambor, ječmene a žita, i přestože se na daném místě už stovky let nepěstují. Nejstarší dochovanou DNA se podařilo najít skupině Willerslev et al., 2003 v permafrostu, byla stará až půl milionu let. K dlouhodobému zachování extracelulární DNA dochází více v chladnějším prostředí, protože je zde menší obrat biomasy než v teplých oblastech. I když tvoří DNA organismů, které žily v daném prostředí v minulosti, jen velmi malou frakci celkové DNA, kterou dnes v prostředí nalezneme (Taberlet et al., 2018), je dobré o jejím možném výskytu vědět.

Hlavně ve vodním prostředí nám může být komplikací při studiu eDNA i její původ. Většina molekul DNA má svůj původ v místě odběru vzorku. Některé molekuly však mohou pocházet ze sousedních oblastí a do naší oblasti se dostat buď pasivním nebo aktivním přenosem různých organismů. V tekoucích vodách se můžeme setkat s tím, že DNA bezobratlých či ryb může být nalezena i několik desítek kilometrů dolů po proudu v závislosti na rychlosti a turbulenci toku, i když dané organismy tam již nežijí (Deiner & Altermatt, 2014). U protist tento fenomén můžeme sledovat jen obtížně, protože kvůli jejich malé velikosti si nikdy nemůžeme být stoprocentně jistí, jestli se opravdu na daném místě vyskytují či nikoli. Pravděpodobně k tomu mohlo dojít ve studii Metz et al., 2019, kde byly nalezeny půdní a symbiotické *Trebuxiophyceae* v mořské vodě. Autoři tohoto článku v diskuzi vůbec nezmiňují možnost, že by k výskytu symbiotických a půdních *Trebuxiophyceae* v moři mohlo dojít kvůli jejich splavení vodním tokem, ale domnívám se, že k tomu v tomto případě mohlo dojít.

Pro odběr vzorků z vodního prostředí se využívá metoda filtrace. Velikost pórů užitých při filtraci musí být optimalizována na čistotu/zakalenost vody a očekávaný objem filtrované vody. Pro zakalenější vodu nebo pro větší objemy volíme filtr  $>10 \mu\text{M}$ . Pro čistou vodu či malé objemy volíme jemnější filtr  $0,22 \mu\text{M}$  (Valentini et al., 2016).

Abychom zabránili DNA degradaci a změně mikrobiálního společenstva v našem vzorku, je dobré co nejdříve provést extrakci DNA. Pokud z nějakého důvodu nemůžeme extrakci provést brzy, je vhodné se pokusit co nejdříve zastavit biologickou aktivitu ve vzorku. Obvykle se vzorky zamrazí v mrazícím boxu či v tekutém dusíku. Další možností je přidání pufracího roztoku, který stabilizuje DNA. Ke vzorkům z vodního prostředí se přidává za tímto účelem 1/10 octanu sodného (3M, pH 8) a dva objemy alkoholu (Ficetola et al., 2010), ale tato směs se musí zmrazit na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Existují i efektivnější pufrý jako například cetrimonium bromid (CTAB) a „Longmire“ pufrý, které nám umožňují skladovat DNA i v pokojové teplotě (Longmire, 1997). Pro konzervaci celých organismů a exkrementů se

používá alkohol (Yu et al., 2012). Další výhodný způsob, jak zabránit degradaci DNA je vysušení vzorku, což lze provést pomocí silikagelu nebo lyofilizace (Taberlet et al., 2018).

Když máme zvolenou vzorkovací strategii, odebraný vzorek z prostředí a zabráněno degradaci DNA v něm, můžeme se pustit do extrakce DNA.

### 3.3 Extrakce, amplifikace a sekvenování DNA

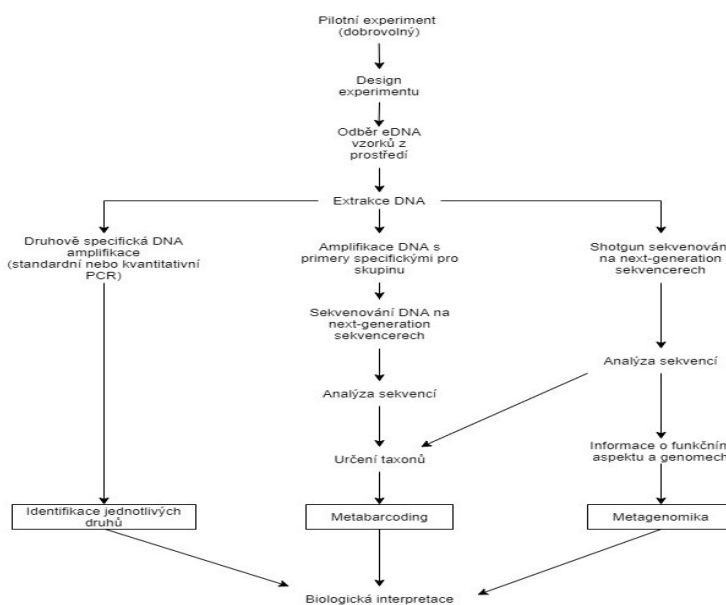
Existuje mnoho komerčních kitů a protokolů určených k extrakci DNA z enviromentálního vzorku. Byly vyvinuty především pro mikrobiology, kteří jejich pomocí získávají DNA nekultivovatelných hub a bakterií především z půdy a exkrementů. Použití různých extrakčních protokolů může ovlivnit složení pozorovaného bakteriálního společenství. Změny mohou být pozorovány v relativním zastoupení taxonů, ale i v přítomnosti či nepřítomnosti jednotlivých druhů (Martin-Laurent et al., 2001). Důvěryhodné porovnání jednotlivých vzorků mezi sebou může být tedy provedeno jen tehdy, pokud je použit stejný extrakční protokol a následující postupy (podmínky při průběhu PCR, primery). Při použití metody metabarcodingu získáváme stovky až tisíce enviromentálních vzorků. Jejich správné uchování v terénu tak, aby nedošlo k degradaci DNA a bylo zabráněno změnám ve společenstvu, může být výzva. Současné metody zachovávání DNA v enviromentálním vzorku vyžadují různá zařízení nebo množství spotřebního materiálu, což se moc nehodí při terénních expedicích. Pro získání co nejdříve eDNA je vhodné provést extrakci DNA ze vzorku co nejdříve. Extrahovat DNA přímo v terénu se jeví při delších terénních expedicích jako vhodné logistické, finanční a občas i legislativní řešení. Pro tyto účely lze použít mobilní extrakční DNA laboratoř, kterou si můžeme sestavit ze základních zařízení přímo v terénu (Taberlet et al., 2018).

Když je extrakce DNA problematická nebo příliš variabilní mezi jednotlivými vzorky, je doporučováno před samotnou extrakcí provést test její účinnosti (Smets et al., 2016). Přílišná heterogenita mezi vzorky může též způsobit různé výsledky v závislosti na extrakci. Proto je vhodné, pokud je to možné, provést více paralelních extrakcí DNA z jednoho vzorku, abychom tuto heterogenitu mohli nějak kvantifikovat při následné analýze. Postupy pro extrakci DNA ze vzorku se mezi jednotlivými prostředími liší. Různé postupy a kity jsou vhodné pro extrakci z půdy, sedimentů, opadaného listí, exkrementů a vzorků vody. Pro extrakci DNA z půdy a ze sedimentů se dá použít například kit PowerMax® Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Cambridge, UK; Zinger et al., 2016). Vzorky vody mohou být buď filtrovány z velkých objemů, nebo, pokud je odebrán jen malý objem, tak mohou být



rovnou zakonzervovány alkoholem a centrifugovány. Na extrakci DNA ze vzniklých pelet mohou následně být použity komerční kity (například DNeasy Blood & Tissue Extraction Kit). Pro zlepšení výtěžku extrakce DNA je vhodné přidání proteázy K (Tsuji et al., 2017). Jedním z parametrů často měřených u vodních těles je jejich pH. Tsuji et al., 2017 provedli pokusy, které měly ověřit vliv pH na filtraci DNA vodních vzorků. Především efektivita filtrace volně plovoucí DNA by totiž mohla být ovlivněna vzniklým elektrickým napětím vody o různém pH. Výsledkem jejich pokusu bylo, že vliv pH vody na filtraci je zanedbatelný a není nutné se jím při odběru příliš zabývat.

Až do této chvíle byly popisované kroky eDNA studie jednotné. Když nyní máme extrahovanou DNA, máme na výběr několik možností podle toho, co nás zajímá. Můžeme se pomocí druhově specifické DNA amplifikace metodami standardní nebo kvalitativní PCR pokusit identifikovat jednotlivé druhy. Další možnost využívá k amplifikaci DNA specifických primerů pro jednotlivé skupiny organismů nebo nespecifických primerů univerzálními pro všechna eukaryota. Amplifikace DNA nespecifickými primery se často využívá právě u protist. Následně se amplifikovaná DNA sekvenuje na next-generation sekvencerech, analyzují se získané sekvence a určují se jednotlivé taxony vyskytující se ve vzorku. Třetí možnost se od předchozích dvou liší tím, že neobsahuje žádnou cílenou PCR a používá metodu shotgun sekvenování, následovanou analýzou sekvencí, jejímž cílem je určit jednotlivé taxony a získat co nejvíc informací o funkčním aspektu a genomech organismů (viz Obr. 5; Taberlet et al., 2018).



Obr. 5 Schéma eDNA studie a přehled možných metod. Upraveno podle Taberlet et al., 2018.

### 3.4 Referenční databáze

Jedním z hlavních cílů metabarcodingu je určit analýzou získaných sekvencí taxony, které se vyskytují v enviromentálním vzorku. K tomu, abychom získané neznámé sekvence mohli přiřadit ke známým druhům či definovat na základě sekvencí nový druh, potřebujeme co nejkompletnější a kvalitní referenční databáze, které obsahují taxonomické informace o jednotlivých druzích. V osmdesátých letech byly založeny tři společnosti, které shromažďují většinu publikovaných DNA sekvencí European Molecular Biology Laboratory (=EMBL; Hamm & Cameron, 1986), GenBank (Bilofsky et al., 1986) a DNA Data Bank of Japan (=DDBJ). Tyto tři společnosti jsou členy International Nucleotide Sequence Database Collaboration (=INSDC), jejich databáze jsou veřejné a jsou denně aktualizovány. Většina sekvencí v nich uložených nese jak taxonomickou, tak funkční informaci a mohou sloužit jako vhodné zdroje pro vytvoření referenčních databází. Přiřazování taxonů může být provedeno několika způsoby. Nejjednodušší variantou je použít BLAST (= Basic Local Alignment Tool) server poskytovaný National Center of Biotechnology Information (=NCBI; Johnson et al., 2008). Výhody tohoto způsobu jsou, že si nemusíme vytvářet lokální databázi a výpočetní výkon počítačů potřebný pro přiřazování sekvencí lze přesunout na veřejné servery. Tento systém má ale i pár nevýhod. Tím, jak je veřejná databáze neustále aktualizovaná, lze jen obtížně porovnávat výsledky získané v různé dny. Další nevýhodou je potřeba velkého výpočetního výkonu k porovnání sekvence s celou veřejnou databází. Při použití BLAST však musíme získané výsledky ještě upravit a odstranit nesprávně identifikované sekvence, k čemuž dochází díky částečné shodě našich sekvencí s referenční databází (Taberlet et al., 2018). Ukazuje se však, že některé veřejné databáze v poslední době obsahují množství chybně přiřazených a nepřijížených sekvencí (Guillou et al., 2013).

Proto může být výhodné při některých pokusech buď získat nějakou více specifickou referenční databázi, nebo pro námi zkoumanou skupinu vytvořit vlastní databázi. Jelikož protista jsou skupinou nacházející se v různých skupinách bude pro výzkum zaměřený jen na jejich určitou skupinu spíše vhodné vytvořit si databázi vlastní či použít databázi někoho, kdo se zabývá stejnou skupinou. Referenční databáze dnes hojně využívané pro studium protist jsou SILVA (Pruesse et al., 2007) a PR<sup>2</sup> (Guillou et al., 2013). Obě tyto databáze obsahují sekvence 18S rRNA genu. Databáze SILVA obsahuje všechny existující 18S rRNA sekvence a spoléhá se na automatickou anotaci. PR<sup>2</sup> je zaměřená více na koherenci taxonomie a využívá k tomu zdroje jako Algaebase (Guiry & Guiry, 2020) pro fotosyntetizující protista či EukRef (del Campo et al., 2018). Pro fotosyntetická eukaryota je možné použít databázi

PhytoREF (Decelle et al., 2015), která obsahuje sekvenci 16S DNA plastidů. Když námi získané sekvence porovnáváme s různými referenčními databázemi, můžeme dostat různé taxonomické určení (Dupont et al., 2016). Kvůli tomu vznikla iniciativa UniEuk (Berney et al., 2017), která si klade za cíl vytvořit jednotnou referenční taxonomii pro všechna eukaryota.

### 3.5 Možnosti analýzy získaných dat

V dnešní době je nejdůležitější částí molekulární ekologie zpracování ohromného množství DNA sekvencí získaných sekvenováním. Kromě výpočetního výkonu a místa k uložení sekvencí se vyskytují problémy také v samotných sekvencích. Pokroky v sekvenování nám umožnily lepší získat kvalitnějších informací pro intraspecifickou i interspecifickou diverzitu, ale zároveň odhalily i molekulárně vzniklé artefakty, které jsme dříve neviděli. V současnosti je tedy výzvou tyto artefakty dokázat detekovat a odstranit a také se pokusit zmenšit velikost dat potřebných k taxonomické identifikaci. V dnešní době existuje mnoho programů, které nám v závislosti na naší studii mohou být různě prospěšné. Každý z nich má svoje výhody a nevýhody. Nejznámější a nejpoužívanější programy jsou OBITools program suite (Boyer et al., 2016), QIIME (Caporaso et al., 2010) a R, dalšími možnostmi mohou být MOTHUR (Schloss et al., 2009), DADA2 (Callahan et al., 2016) a PipeCraft (Anslan et al., 2017), ale existují i jiné programy.

Dříve než se pustíme do jakékoliv práce s daty, je vhodné si uložit i surová data pro případ, že bychom s nimi někdy v budoucnu chtěli provést jiné analýzy. Prvním důležitým krokem při analýze sekvenčních dat je stanovení jejich celkové kvality. Pokud se nám zdá nevyhovující, je lepší provést sekvenaci znovu, než se spoléhat jen na malou část dat, která jsou vyhovující. Všechny sekvenační platformy poskytují informaci o kvalitě jak celé sekvence, tak i pro jednotlivé báze. Kvalita sekvencí může být vizualizována v programu FastQC (Andrews, 2010). Kvalita získaných sekvencí není homogenní, některé sekvence mohou mít v závislosti na readu jinou kvalitu. Obecně kvalita sekvencí klesá od 5' k 3' konci. Je také doporučováno sekvence nízké kvality vyřadit z další analýzy (Bokulich et al., 2013). Stejný primer nám může pro různé druhy přinést různě kvalitní sekvence. Taberlet et al., 2018 ve své knize o metabarcodingu popisuje tento fenomén na příkladu primeru Sper01 a sekvencí tří rostlin. Nerovnoměrné odstranění nekvalitní sekvencí u některých rostlin se následně projevilo vlivem na složení a strukturu společenstva.

Jednou z dalších věcí, se kterou se musíme vypořádat, je fakt, že se obvykle v metabarcoding datech ty samé sekvence vyskytují mnohokrát. Tyto sekvence je vhodné pro zmenšení objemu dat sloučit do skupiny (=clustering). V nejstriktnějším případě slučujeme

sekvence, které jsou 100% stejné, ale obvykle bývá pravidlem slučovat do skupin i sekvence, které jsou si podobné jen s 97-95 %. Během sekvenování a PCR totiž dochází k různým chybám, které způsobují chyby v zařazení nukleotidů. Některé druhy mohou vykazovat intraspecifickou variabilitu v metabarcoding oblasti. Clustering je nutný pro minimalizování diverzity vzniklé chybami při amplifikaci a sekvenování DNA a intraspecifickým polymorfismem. Vědci dělí klasifikační metody na řízené, které spočívají v určování skupin podle již existujících skupin, a neřízené metody, které tvoří skupiny de novo během klasifikačního procesu. Neřízený vznik skupin odpovídá molecular operational taxonomic units (=MOTUs). Všechny metody používané pro klasifikaci metabarcoding sekvencí spoléhají na podobnost mezi nimi. Výsledné taxonomické určení je značně ovlivněno vybranou referenční databází a použitou metodou přiřazování (Taberlet et al., 2018).

Jelikož celková diverzita protist není známá, pro její zjišťování je vhodné použít neřízené clustering metody.

Dalším problémem, se kterým se při metabarcodingu musíme potýkat, je vznik chimér. Chiméry vznikají rekombinací mezi hojnými a úzce závislými sekvencemi. Mohou způsobovat až 45 % diversity v metabarcoding datech (Haas et al., 2011). Pro odstranění chimér byly vyvinuty programy Chimera-Slayer (Haas et al., 2011) a DECIPHER (Wright et al., 2012), jejichž úkolem je najít koncový segment sekvence podle databáze, která neobsahuje chiméry.

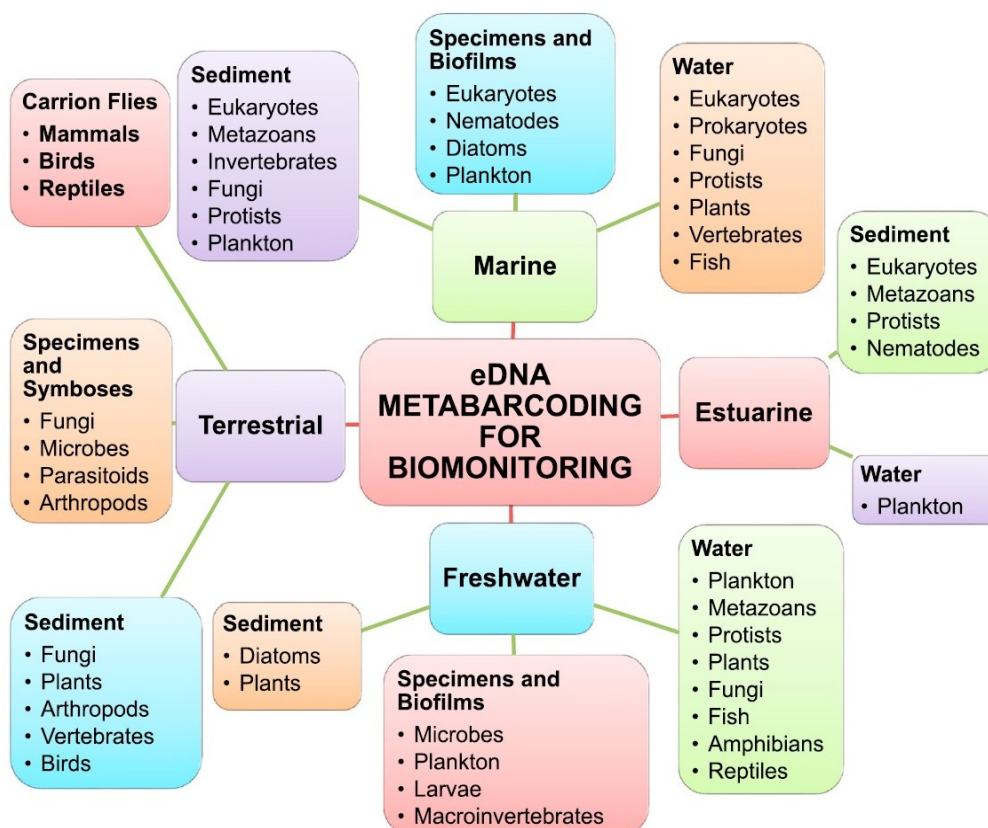
Při analýze sekvencí mohou vědce potkat i mnohé další problémy, které se musí nějakým způsobem ošetřit. V této kapitole je nastíněno jen několik hlavních problémů, které se týkají většiny metabarcoding studií.

## 4 Využití metabarcodingu

Poznatky získané enviromentálním sekvenováním se dají využít v mnoha různých oborech. Nejvíce se metabarcoding využívá při monitorování ekosystémů a jejich biologické rozmanitosti, ale i jiné obory mohou využít metabarcoding pro rozšíření svých poznatků. Mezi tyto obory patří paleobiologie, studium interakcí mezi opylovači a rostlinami, měření kvality ovzduší, detekce znečištění a invazních druhů a analýza mikrobiomu organismů (Ruppert et al., 2019). Všechny tyto aplikace metabarcodingu jsou zajímavé, ale s protisty souvisí jen některé z nich. Právě na ně se zaměřím v následujících podkapitolách.

### 4.1 Monitorování ekosystémů a jejich biologické rozmanitosti

Jedním z nejdůležitějších využití metabarcodingu je monitoring ekosystémů a zjišťování jejich biologické diverzity. V různých prostředích můžeme detekovat různé organismy. Přehledné schéma znázorňující prostředí a jejich podtypy společně s organismy, které v nich metabarcodingem můžeme detekovat se nachází v Ruppert et al., 2019.



Obr. 6 Schéma prostředí a organismů v nich detekovatelných metabarcodingem. Převzato z Ruppert et al., 2019.

Na obrázku 6. je dobře vidět, že nejvíce různých druhů se nám daří detekovat v sedimentech a ve vodním sloupci.

#### 4.1.1 Monitorování moří

Mořské sedimenty jsou bohaté na výskyt různých druhů, ale tradičními metodami nejsou příliš studované. Pawlowski et al., 2011 při analýze zaměřené na hlubokomořská eukaryota objevil přibližně 900-1800 druhů v jednom vzorku. Dominujícími nalezenými druhy byly *obrněnky* a *nálevníci*. Podobná data získali i ve studii Guardiola et al., 2015. Studování hlubokomořských organismů je náročné, protože zřídka víme něco o jejich morfologii. Ve studii zabývající se diverzitou epibiotických *rozsivek* na krunýřích mořských želv nám metabarcoding umožnil rozlišit jednotlivé želvy na základě složení společenstva na jejich krunýři a mikroskopické určování řas zase více informací o jejich ekologii (Rivera et al., 2018).

Ve vybraných lokalitách alabamského kontinentálního šelfu byla provedena studie, která se zabývala studiem diverzity mikroeukaryot v čase. Její výsledky ukazují, že složení společenstva koreluje se salinitou, teplotou, rozpuštěnými silikáty dostupnými v prostředí a liší se též v závislosti na sezóně (Brannock et al., 2016).

To, jak je monitorování mořské eDNA účinné, bylo též porovnáváno mezi různými typy vzorků. Massana et al., 2015 analyzovali společenství planktonních a bentických protist v prostoru a čase. Zjistili, že složení společenstva se liší v čase, ve vodním sloupci a v sedimentu, ale i mezi jednotlivými lokalitami. Důležitým faktorem byla i sezonalita.

#### 4.1.2 Monitorování sladkých vod

Monitorování diverzity sladkých vod je podobné jako monitorování moří. Sladkovodní ekosystémy jsou senzitivní ke změnám v prostředí (Ruppert et al., 2019). Monitorování sladkovodních sedimentů se používá k analýze rostlin (Alsos et al., 2018). Hodně studií se též zaměřuje na studium planktonních společenstev (Liu et al., 2017; Wurzbacher et al., 2017).

*Rozsivky* jsou dobrými biologickými indikátory vodní kvality, protože jsou hojně rozšířené, ukazují vysokou druhovou variabilitu a jsou senzitivní ke změnám v prostředí. Mnoho různých indexů kvality například Specific Polluosensitivity Index (=SPI), se stanovují podle složení společenstva *rozsivek*. Tradičně se pro stanovení indexů využívá morfologické určení druhů a počítání množství druhů pod mikroskopem. Tato metoda je však velmi časově náročná a vyžaduje i velkou taxonomickou odbornost. Pro ulehčení a zjednodušení se v dnešní době začalo používat pro určení kvality vod i molekulárních metod (Vasselon et al., 2017).

## 4.2 Analýza mikrobiomu

Jednou z výhod metabarcodingu pro analýzu mikrobiomu je, že je neinvazivní a DNA většinou získáváme z exkrementů, případně z obsahu žaludku. Na analýzu mikrobiomu bylo provedeno mnoho studií na různých typech organismů. Důležitý pokrok v analýze stravy herbivorů udělali Valentini et al., 2009, když cílením na trnL intron chloroplastu identifikovali 50 % rostlinných druhů z degradované DNA získané z exkrementů. V mikrobiomu organismů se nachází i různé protisty například *Oxymonadida* ve střevech termitů (Waidele et al., 2017).

## 4.3 Znečištění

I přestože znečištění je většinou způsobeno něčím, co nemá DNA, a tudíž to nemůžeme detekovat, obvykle působí změny v mikrobiologickém společenstvu, které je jím ovlivněno. K různým změnám ve společenstvu dochází například kvůli ropným vrtům nebo při vzniku ropných skvrn (Lanzén et al., 2016). Dalším výrazným zdrojem znečištění jsou mořské rybí farmy. Pawlowski et al., 2014 pozorovali vliv rybích farem na bentická společenstva *Foranimifer*. V blízkosti rybích farem našli nižší počet druhů než ve větší vzdálenosti od nich.

## 4.4 Analýza kvality ovzduší

DNA metabarcoding může mít vliv na lidské zdraví. Určení mikrobiomu ve vzduchu je důležité kvůli alergiím, patogenům a znečištění ovzduší. Současné metody používané k jeho studiu jsou založené na mikroskopii a intenzivní práci v laboratoři. Nejvíce se používají k detekci různých pylů, ale ve vzduchu nalezneme i různé zbytky mycelií hub (Banchi et al., 2018). Důležitou informací je složení mikrobiomu ve vzduchu v nemocnicích, kde mohou některé mikroorganismy snadněji způsobovat různé nemoci (Tong et al., 2017).

## 5 Výhody a nevýhody metabarcodingu a tradičních mikroskopických technik pro analýzu společenstev protist a jejich porovnání

Každá metoda využívaná ve vědě má své kladné a záporné stránky. I když vymyslíme sebelepší a sebepřesnější metodu, nikdy si nemůžeme být zcela jistí tím, že jsme použitím této metody příliš nezasáhli do zkoumaného prostředí a nějak ho nepozměnili a zda jsme vůbec použili ke zkoumání daného problému vhodnou metodu. Při některých výzkumech se může hodit použití více různých metod, abychom získali reálnější a přesnější data o daném problému.

Kombinace metabarcodingu a tradičních mikroskopických technik se jeví jako vhodný postup pro zkoumání diverzity protist, i přestože obě metody mají mnoho nevýhod.

### 5.1 Výhody metabarcodingu

Hlavní výhoda metabarcodingu spočívá v tom, že se dovídáme informace i o nekultivovatelných či příliš drobných organismech, které dříve mohly uniknout kvůli své velikosti pozornosti vědců, i přestože se vyskytují hojně. Je možné přefiltrovat obrovské množství vody, získaná eDNA z přefiltrovaného vzorku bude obsahovat i vzácně se vyskytující druhy. Získané množství sekvencí DNA je obrovské a umožní nám lepší náhled do reálné diverzity. S rostoucí popularitou sekvenování a s vývojem sekvenovacích technik došlo k výraznému zlevnění ceny osekvenování jednoho vzorku (Thomsen & Willerslev, 2015).

### 5.2 Nevýhody metabarcodingu

Mnoho nevýhod metabarcodingu souvisí s primery. Primery navržené v počítači se nám v reálném prostředí vůbec nemusí vázat na DNA sekvence, které jsme jimi chtěli amplifikovat nebo se přednostně váží na jiné sekvence v genomu než na ty námi zvolené. Když se zadaří a primer se váže na námi zvolené místo DNA sekvence, není jisté, že se na to stejné místo sekvence u různých druhů bude vázat stejně ochotně a že nebude upřednostňovat sekvence některých druhů před jinými, čímž může vzniknout rozdíl v abundanci jedinců jednotlivých druhů. Případně se nám též může stát, že se primer nebude vázat na některé sekvence DNA vyskytujících se druhů vůbec a na jiné až příliš ochotně, a kvůli tomu přijdeme o část diverzity (Geisen et al., 2019). Protista jsou parafyletickou skupinou vyskytující se v různých částech stromu života a zatím se vědcům nepodařilo najít univerzální primer, který by byl



vhodný pro všechna protista či eukaryota. Většina primerů u protist cílí na 18S DNA, ale například pro skupinu *Alveolata* je vhodné použít primer, který cílí na 28S DNA nebo na region ITS DNA, který je hojně využíván pro skupinu *Fungi* (Pawlowski et al., 2012). Problémem metabarcodingu je též fakt, že si nikdy nemůžeme být jistí, jestli druh, který jsme objevili je skutečný anebo jestli je to pouhý artefakt, vzniklý chybou při PCR a její následné amplifikaci. Clusterování druhů je též velmi obtížné, jelikož kvůli sekvenčním chybám nevíme, kde přesně se nachází hranice mezi reálnými druhy a variabilitou, která nemá biologickou podstatu.

Dalším vážným problémem eDNA metabarcodingu mohou být kontaminace, které mohou způsobit falešně pozitivní výsledky. Kontaminace se do vzorku mohou dostat v jakémkoliv kroku, jak při odebrání vzorku, tak i během analýzy v laboratoři. Obvykle bývají vzorky odebírány při odběrech jeden za druhým stejným náčiním a může dojít k jejich kontaminaci mezi sebou a přenosu DNA z jedné lokality na druhou. Kontaminace DNA vzorku v laboratoři může být velmi vážná, protože během PCR vzniká mnoho sekvencí, které se mohou rozšířit po laboratoři. Proto je nutné dodržovat přísné dekontaminační postupy a fyzicky oddělit laboratoře, ve kterých pracujeme před a po PCR, pro omezení kontaminace. Důležité je také zařadit kontroly extrakce, PCR a samotných vzorků pro případné zjištění, kdy došlo ke kontaminaci (Thomsen & Willerslev, 2015). Jelikož metabarcoding je velmi citlivá metoda, může se stát, že kromě kontaminací zachytíme i DNA organismů, které na daném místě již nežijí.

Obzvlášť při extrakci eDNA z půdy mohou problémy způsobovat huminoidní kyseliny či částice extrahované společně s DNA. Tyto kyseliny mohou silně inhibovat enzymy jako například Tag polymerázu, která se používá při PCR k namnožení DNA (Matheson et al., 2014).

### 5.3 Výhody tradičních mikroskopických technik

Výhoda mikroskopických pozorování spočívá v tom, že si můžeme být stoprocentně jistí, že se daný druh na studované lokalitě vyskytuje, jelikož ho vidíme. Často můžeme pozorovat celé živé organismy, jejich tvar, barvu a způsob pohybu. Studium diverzity pod mikroskopem nám též umožní studium relativních rozdílů v abundanci jednotlivých druhů (Bourlat et al., 2013).

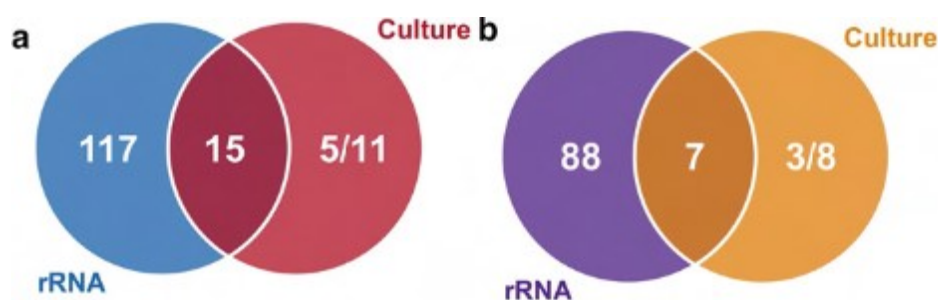
## 5.4 Nevýhody tradičních mikroskopických technik

Jedna z nevýhod tradičních mikroskopických technik spočívá v její schopnosti rozlišení. Někteří protisti se mohou svou velikostí nacházet až za hranicí rozlišení běžných mikroskopů. Je to též relativní metoda, protože jednotliví taxonomové určují některé druhy různě, což může být způsobeno například jejich různou zkušeností (Sweeney et al., 2011) či malým množstvím morfologické informace u protist. Kvůli malému množství morfologické informace nám mohou uniknout kryptické druhy. Některé druhy se nám vůbec nemusí podařit při odběrech nabrat do vzorku či přenést na sklíčko. Některé druhy jsou totiž v přírodě velmi vzácné a na dané lokalitě se může vyskytovat pouze pár jedinců v obrovském objemu vodního tělesa. Člověk reálně není schopen prohlédnout takové množství sklíček, aby si byl jistý, že už se žádný jiný druh na dané lokalitě nevyskytuje.

## 5.5 Porovnání výsledků obou metod při studiu diverzity protist

Do této podkapitoly jsem vybrala několik studií, v nichž byly výsledky získávány mikroskopickými i molekulárními metodami a nějakým způsobem porovnávány.

Ve studii Rippin et al., 2018 se autoři zaměřili na studium diverzity druhů sinic a mikrořas v půdě. Provedli jak mikroskopická, tak molekulární pozorování a porovnávali je mezi sebou. Některé druhy se jim podařilo identifikovat pouze mikroskopicky, jiné jen molekulárními metodami a některé oběma metodami. K podobnému rozložení zjištění druhů došli na obou zkoumaných lokalitách i v rámci jednotlivých skupin (podrobnosti viz Obr 7).



Obr. 7 Porovnání počtu nalezených prokaryotických i eukaryotických druhů molekulárně (fialová, modrá) a morfologicky (červená, oranžová) v oblasti a a b. Čísla rozdělená lomítkem znázorňují druhy přítomné v referenční databázi (vlevo) a všechny identifikované druhy (vpravo). Převzato a upraveno podle Rippin et al., 2018.

K podobným výsledkům došli i Groendahl et al., 2017, když studovali řasová společenstva perifytonu. Též se jim podařilo různé druhy identifikovat jen mikroskopicky,

jiné jen molekulárně a některé oběma způsoby. Též si všimli, že složení společenstva se velmi liší mezi vzorky pozorovanými molekulárně a mezi vzorky pozorovanými pod mikroskopem.

Jiná studie zabývající se studiem *rozsivek* ukázala, že použití next-generation technik téměř vždy vede k vyššímu počtu určených druhů než morfologické určení pod mikroskopem (Zimmermann et al., 2015). Některé druhy objevené molekulárně se následně podaří potvrdit i mikroskopicky. Většinu druhů, které najdeme mikroskopicky se podaří najít i molekulárně. Obráceně to však neplatí kvůli neúplnosti referenčních databází. Jedním z důvodů, proč obvykle najdeme molekulárními metodami více druhů je skrytá genetická variabilita morfologicky podobných druhů. Příkladem z této studie je rod *Nitzschia*, jejíž 19 druhů bylo detekováno pomocí světelné mikroskopie, ale 49 druhů bylo detekováno molekulárními metodami.

Vasselon et al., 2017 se zaměřili na studium *rozsivek* na ostrově Mayotte. Autorům se podařilo určit mikroskopicky 204 druhů *rozsivek*, kdežto molekulárními metodami jen 66 druhů. Též se lišily i některé zjištěné dominantní druhy. Mikroskopicky zjištěné dominantní druhy byly například *Cocconeis placentula* var. *euglypta*, *Gomphonema bourbonense*, *Gomphonema parvulum*, *Nitzschia inconspicua*, a *Amphora pediculus*. Molekulárně zjištěné dominantní druhy byly *Ulnaria ulna*, *Amphora pediculus*, *Gomphonema parvulum* a *G. bourbonense*. Vidíme, že většina dominantních druhů se shoduje v mikroskopickém i molekulárním určování, ale *Cocconeis placentula* var. *euglypta* a *Nitzschia inconspicua* byly zjištěny jen mikroskopicky a *Ulnaria ulna* jen molekulárně. Na úrovni rodů bylo pozorováno 59 % taxonů molekulárními i mikroskopickými metodami a na úrovni druhů to bylo jen 13 % ze zjištěných druhů s tím, že více druhů bylo vždy určeno mikroskopicky než molekulárními metodami, což je naprosto opačný výsledek než u výše zmíněné studie.

Během dvou let studovali Gran-Stadniczeňko et al., 2019 složení a sezónní dynamiku společenstva planktonních protist v úžině Skagerrak molekulárními i mikroskopickými metodami. Podle jejich výsledků složení společenstva protist a abundance jednotlivých druhů závisí na sezóně i na hloubce, ve které se vyskytují. Většina variability společenstva protist na tomto místě jde vysvětlit faktorem teploty. Nejvíce se ve společenstvu nacházelo *obrněnek*, *nálevníků* a *rozsivek*.

Výsledky těchto studií ukazují, že pro získání reálných představ o diverzitě protist vyskytujících se na nějaké lokalitě je vhodné použít nejen metodu metabarcodingu, ale i tradiční mikroskopické metody, jelikož ani jednou metodou nejsme schopni zachytit veškerou jejich diverzitu.

## 6 Závěr

I přestože jsou protista na Zemi hojně rozšířená a zastávají mnoho důležitých rolí v ekosystémech, o jejich diverzitě toho stále příliš mnoho nevíme. Dříve hojně využívané mikroskopické techniky založené především na morfologickém určování druhů nám mohou poskytnout lepší informace o vzhledu a ekologii jednotlivých druhů. V současné době s rozvojem sekvenačních metod je populární zkoumat diverzitu protist například metodou metabarcodingu. Tato metoda se ukazuje jako levná, rychlejší a v některých případech i přesnější a spolehlivější alternativa k tradičním technikám. Jednou z jejích hlavních výhod je to, že získá veškeré DNA ze vzorku nám může pomoci odhalit i kryptické a invazní druhy, které se v prostředí vyskytují jen v malých koncentracích a při pozorování mikroskopem je do vzorku vůbec nemusíme nabrat. Metabarcoding nám též získkem obrovského množství sekvencí nabízí reálnější pohled na diverzitu v dané lokalitě. Výsledky některých studií (Groendahl et al., 2017; Rippin et al., 2018) nám však ukazují, že metabarcodingem se zatím nedaří zachytit veškerou diverzitu zkoumané lokality, a je proto výhodné zkoumat prostředí i tradičními mikroskopickými technikami.

Metabarcoding je stále relativně nová metoda, tudíž se průběžně vyvíjí a vědci mají snahu minimalizovat její problémy a nedostatky. Jedním z nedostatků je nekvalitní taxonomické určení sekvencí v některých referenčních databázích a jejich nekompletnost. Tento nedostatek se v poslední době daří řešit zaměřením databází na některé skupiny, případně opravami ve stávajících databázích.

Jedním z hlavních nedostatků metabarcodingu jsou primery, které často buď nenasedají vůbec, nebo nasedají na jiná místa v genomu atd. Též se nám zatím nepodařilo nalézt primer specifický pro všechna protista a myslím, že takový primer se ani nalézt nepodaří, jelikož protista jsou parafyletickou skupinou nacházející se napříč celým eukaryotickým stromem života. Pro studium celkové diverzity protist mi metabarcoding nepřijde moc vhodnou metodou, ale při studiu jednotlivých skupin nám může přinést kvalitní a důležité poznatky k lepšímu porozumění jejich fungování.

V diplomové práci bych chtěla použít metabarcoding a tradiční mikroskopické techniky ke studiu společenstva *chrysomád* na vybrané lokalitě v čase. Přítomnost chrysomád se tradičně studuje podle šupinek nacházejících se ve vodním sloupci či v sedimentech. Metodou metabarcodingu a mikroskopickým pozorováním bych chtěla zjistit jaké živé *chrysomády* se v prostředí vyskytují a jak tento výskyt souvisí s šupinkami nalezenými v okolí.

## 7 Zdroje

- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., ... Zhang, Q. (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., ... Spiegel, F. W. (2012). The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), 429–514.  
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
- Alsos, I. G., Lammers, Y., Yoccoz, N. G., Jørgensen, T., Sjøgren, P., Gielly, L., & Edwards, M. E. (2018). Plant DNA metabarcoding of lake sediments: How does it represent the contemporary vegetation. *PLoS ONE*, 13(4), e0195403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195403>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data*.  
[www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc)
- Anslan, S., Bahram, M., Hiiesalu, I., & Tedersoo, L. (2017). PipeCraft: Flexible open-source toolkit for bioinformatics analysis of custom high-throughput amplicon sequencing data. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e234–e240. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12692>
- Banchi, E., Ametrano, C. G., Stanković, D., Verardo, P., Moretti, O., Gabrielli, F., Lazzarin, S., Borney, M. F., Tassan, F., Tretiach, M., Pallavicini, A., & Muggia, L. (2018). DNA metabarcoding uncovers fungal diversity of mixed airborne samples in Italy. *PLoS ONE*, 13(3).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194489>
- Behnke, A., Engel, M., Christen, R., Nebel, M., Klein, R. R., & Stoeck, T. (2011). Depicting more accurate pictures of protistan community complexity using pyrosequencing of hypervariable SSU rRNA gene regions. *Environmental Microbiology*, 13(2), 340–349.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02332.x>
- Berney, C., Ciuprina, A., Bender, S., Brodie, J., Edgcomb, V., Kim, E., Rajan, J., Parfrey, L. W., Adl, S., Audic, S., Bass, D., Caron, D. A., Cochrane, G., Czech, L., Dunthorn, M., Geisen, S., Glöckner, F. O., Mahé, F., Quast, C., ... de Vargas, C. (2017). UniEuk: Time to Speak a Common Language in Protistology! *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(3), 407–411.  
<https://doi.org/10.1111/jeu.12414>
- Bilofsky, H., Burks, C., Fickett, J., Goad, W., Lewitter, F., Rindone, W., Swindell, C. D., & Tung, C.-S. (1986). The GenBank Genetic sequence databank. *Nucleic Acids Research*, 14, 1–4.  
<https://doi.org/10.1093/nar/14.1.1>
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Bourland, W., Rotterová, J., & Čepička, I. (2018). *Morphologic and molecular characterization of Brachonella pulchra (Kahl, 1927) comb. nov.* <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002888>
- Bourlat, S. J., Borja, A., Gilbert, J., Taylor, M. I., Davies, N., Weisberg, S. B., Griffith, J. F., Lettieri, T., Field, D., Benzie, J., Glöckner, F. O., Rodríguez-Ezpeleta, N., Faith, D. P., Bean, T. P., & Obst, M.

- (2013). Genomics in marine monitoring: New opportunities for assessing marine health status. *Marine Pollution Bulletin*, 74(1), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.042>
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). Obitools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 176–182. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12428>
- Brannock, P. M., Ortmann, A. C., Moss, A. G., & Halanych, K. M. (2016). Metabarcoding reveals environmental factors influencing spatio-temporal variation in pelagic micro-eukaryotes. *Molecular Ecology*, 25(15), 3593–3604. <https://doi.org/10.1111/mec.13709>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pěa, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. In *Nature Methods* (Vol. 7, Issue 5, pp. 335–336). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Caron, D. A., Countway, P. D., Jones, A. C., Kim, D. Y., & Schnetzer, A. (2012). Marine Protistan Diversity. *Annual Review of Marine Science*, 4(1), 467–493. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142802>
- Čertnerová, D., Čertner, M., & Škaloud, P. (2019). Molecular phylogeny and evolution of phenotype in silica-scaled chrysophyte genus *Mallomonas*. *Journal of Phycology*, 55(4), 912–923. <https://doi.org/10.1111/jpy.12882>
- Céza, V., Pánek, T., Smejkalová, P., & Čepička, I. (2015). Molecular and morphological diversity of the genus *Hypotrichomonas* (Parabasalia: Hypotrichomonadida), with descriptions of six new species. *European Journal of Protistology*, 51(2), 158–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2015.02.003>
- Chariton, A. A., Court, L. N., Hartley, D. M., Colloff, M. J., & Hardy, C. M. (2010). Ecological assessment of estuarine sediments by pyrosequencing eukaryotic ribosomal DNA. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8(5), 233–238. <https://doi.org/10.1890/090115>
- Chretiennot-Dinet, M. J., Courties, C., Vaquer, A., Neveux, J., Claustre, H., Lautier, J., & Machado, M. C. (1995). A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia*, 34(4), 285–292. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-34-4-285.1>
- Corinaldesi, C., Barucca, M., Luna, G. M., & Dell'Anno, A. (2011). Preservation, origin and genetic imprint of extracellular DNA in permanently anoxic deep-sea sediments. *Molecular Ecology*, 20(3), 642–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04958.x>
- Corliss, J. O. (2001). Have the Protozoa Been Overlooked? *BioScience*, 51(6), 424–425. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0424:htpbo\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0424:htpbo]2.0.co;2)
- Deagle, B. E., Chiaradia, A., McInnes, J., & Jarman, S. N. (2010). Pyrosequencing faecal DNA to determine diet of little penguins: Is what goes in what comes out? *Conservation Genetics*, 11(5), 2039–2048. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0096-6>
- Decelle, J., Romac, S., Stern, R. F., Bendif, E. M., Zingone, A., Audic, S., Guiry, M. D., Guillou, L., Tessier, D., Le Gall, F., Gourvil, P., Dos Santos, A. L., Probert, I., Vaultot, D., de Vargas, C., &

- Christen, R. (2015). PhytoREF: A reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1435–1445. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12401>
- Deiner, K., & Altermatt, F. (2014). Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE*, 9(2), e88786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>
- Deininger, P. L. (1983). Random subcloning of sonicated DNA: Application to shotgun DNA sequence analysis. *Analytical Biochemistry*, 129(1), 216–223. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90072-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90072-6)
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., & Miaud, C. (2011). Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398>
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49(4), 953–959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x>
- del Campo, J., Kolisko, M., Boscaro, V., Santoferrara, L. F., Nenarokov, S., Massana, R., Guillou, L., Simpson, A., Berney, C., de Vargas, C., Brown, M. W., Keeling, P. J., & Wegener Parfrey, L. (2018). EukRef: Phylogenetic curation of ribosomal RNA to enhance understanding of eukaryotic diversity and distribution. *PLoS Biology*, 16(9), e2005849. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005849>
- Dunthorn, M., Klier, J., Bunge, J., & Stoeck, T. (2012). Comparing the Hyper-Variable V4 and V9 Regions of the Small Subunit rDNA for Assessment of Ciliate Environmental Diversity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(2), 185–187. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00602.x>
- Dupont, A. Ö. C., Griffiths, R. I., Bell, T., & Bass, D. (2016). Differences in soil micro-eukaryotic communities over soil pH gradients are strongly driven by parasites and saprotrophs. *Environmental Microbiology*, 18(6), 2010–2024. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13220>
- Epp, L. S., Gussarova, G., Boessenkool, S., Olsen, J., Haile, J., Schrøder-Nielsen, A., Ludikova, A., Hassel, K., Stenøien, H. K., Funder, S., Willerslev, E., Kjær, K., & Brochmann, C. (2015). Lake sediment multi-taxon DNA from North Greenland records early post-glacial appearance of vascular plants and accurately tracks environmental changes. *Quaternary Science Reviews*, 117, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2015.03.027>
- Ficetola, Gentile F., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessière, J., Taberlet, P., & Pompanon, F. (2010). An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11(1), 434. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-434>
- Ficetola, Gentile Francesco, Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Geisen, S., Vaultot, D., Mahé, F., Lara, E., Vargas, C. de, & Bass, D. (2019). A user guide to environmental protistology: primers, metabarcoding, sequencing, and analyses. *BioRxiv*, 850610. <https://doi.org/10.1101/850610>
- Giguet-Covex, C., Pansu, J., Arnaud, F., Rey, P. J., Griggo, C., Gielly, L., Domaizon, I., Coissac, E., David, F., Choler, P., Poulénard, J., & Taberlet, P. (2014). Long livestock farming history and human landscape shaping revealed by lake sediment DNA. *Nature Communications*, 5(1), 1–7.

<https://doi.org/10.1038/ncomms4211>

- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., & Field, K. G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, *345*(6270), 60–63. <https://doi.org/10.1038/345060a0>
- Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2011). Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLoS ONE*, *6*(7), e22746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746>
- Gran-Stadniczeňko, S., Egge, E., Hostyeva, V., Logares, R., Eikrem, W., & Edvardsen, B. (2019). Protist Diversity and Seasonal Dynamics in Skagerrak Plankton Communities as Revealed by Metabarcoding and Microscopy. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *66*(3), 494–513. <https://doi.org/10.1111/jeu.12700>
- Green, H. C., Shanks, O. C., Sivaganesan, M., Haugland, R. A., & Field, K. G. (2011). *Differential decay of human faecal Bacteroides in marine and freshwater environments*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02549.x>
- Groendahl, S., Kahlert, M., & Fink, P. (2017). The best of both worlds: A combined approach for analyzing microalgal diversity via metabarcoding and morphology-based methods. *PLoS ONE*, *12*(2), e0172808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172808>
- Guardiola, M., Uriz, M. J., Taberlet, P., Coissac, E., Wangensteen, O. S., & Turon, X. (2015). Deep-Sea, Deep-Sequencing: Metabarcoding Extracellular DNA from Sediments of Marine Canyons. *PLOS ONE*, *10*(10), e0139633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139633>
- Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boutte, C., Burgaud, G., de Vargas, C., Decelle, J., Del Campo, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Holzmann, M., Kooistra, W. H. C. F., Lara, E., Le Bescot, N., Logares, R., ... Christen, R. (2013). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D597-604. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1160>
- Guiry, M. D., & Guiry, G.M. 2020., N. U. of I. (2020). *AlgaeBase. World-wide electronic publication.*
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T. Z., Petrosino, J. F., Knight, R., & Birren, B. W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, *21*(3), 494–504. <https://doi.org/10.1101/gr.112730.110>
- Hajibabaei, M. (2012). The golden age of DNA metasystematics. In *Trends in Genetics* (Vol. 28, Issue 11, pp. 535–537). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.08.001>
- Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A. C., & Baird, D. J. (2011). Environmental barcoding: A next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS ONE*, *6*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017497>
- Hamm, G. H., & Cameron, G. N. (1986). The EMBL data library. *Nucleic Acids Research*, *14*(1), 5–9. <https://doi.org/10.1093/nar/14.1.5>
- Howe, A. T., Bass, D., Vickerman, K., Chao, E. E., & Cavalier-Smith, T. (2009). Phylogeny, Taxonomy, and Astounding Genetic Diversity of Glissomonadida ord. nov., The Dominant Gliding Zooflagellates in Soil (Protozoa: Cercozoa). *Protist*, *160*(2), 159–189. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2008.11.007>



- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, *36*(Web Server issue), W5-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
- Krejčí A, Müller P, & Vojtěšek B. (2015). Bioinformatika a sekvenování nové generace Bioinformatics and Next-generation Sequencing. *Klin Onkol*, *28*(2), 2–91. <https://doi.org/10.14735/amko20152S91>
- Krienitz, L., Bock, C., Luo, W., & Pröschold, T. (2010). Polyphyletic origin of the dictyosphaerium morphotype within chlorellaceae (trebouxiophyceae). *Journal of Phycology*, *46*(3), 559–563. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00813.x>
- Lanzén, A., Lekang, K., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2016). High-throughput metabarcoding of eukaryotic diversity for environmental monitoring of offshore oil-drilling activities. *Molecular Ecology*, *25*(17), 4392–4406. <https://doi.org/10.1111/mec.13761>
- Larsen, B. B., Miller, E. C., Rhodes, M. K., & Wiens, J. J. (2017). Inordinate fondness multiplied and redistributed: The number of species on earth and the new pie of life. *Quarterly Review of Biology*, *92*(3), 229–265. <https://doi.org/10.1086/693564>
- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., Hart, M. M., Powell, J. R., Klironomos, J. N., Pauls, K. P., Swanton, C. J., Trevors, J. T., & Dunfield, K. E. (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*(12), 2977–2991. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020>
- Liu, L., Liu, M., Wilkinson, D. M., Chen, H., Yu, X., & Yang, J. (2017). DNA metabarcoding reveals that 200- $\mu$ m-size-fractionated filtering is unable to discriminate between planktonic microbial and large eukaryotes. *Molecular Ecology Resources*, *17*(5), 991–1002. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12652>
- Logan, J. (Julie M. J. ., Edwards, K. (Kirstin J. ., & Saunders, N. (Nick A. . (2009). *Real-time PCR : current technology and applications*. Caister Academic Press.
- Longmire, J. (1997). *Use of "Lysis Buffer" in DNA isolation and its implication for museum collections*. Museum of Texas Tech University.
- López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C., & Moreira, D. (2001). Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, *409*(6820), 603–607. <https://doi.org/10.1038/35054537>
- Magurran, A. E., & McGill, B. J. (2011). *Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment*.
- Marcelino, V. R., Irinyi, L., Eden, J. S., Meyer, W., Holmes, E. C., & Sorrell, T. C. (2019). Metatranscriptomics as a tool to identify fungal species and subspecies in mixed communities – A proof of concept under laboratory conditions. *IMA Fungus*, *10*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0012-8>
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G., & Catroux, G. (2001). DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods.

- Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2354–2359.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001>
- Massana, R., Gobet, A., Audic, S., Bass, D., Bittner, L., Boutte, C., Chambouvet, A., Christen, R., Claverie, J. M., Decelle, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Forn, I., Forster, D., Guillou, L., Jaillon, O., Kooistra, W. H. C. F., Logares, R., ... de Vargas, C. (2015). Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. *Environmental Microbiology*, 17(10), 4035–4049. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12955>
- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., & Lehto, R. (2014). Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3(1), 38–45.  
<https://doi.org/10.2174/1874940201003010038>
- Metz, S., Singer, D., Domaizon, I., Unrein, F., & Lara, E. (2019). Global distribution of Trebouxiophyceae diversity explored by high-throughput sequencing and phylogenetic approaches. *Environmental Microbiology*, 21(10), 3885–3895. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14738>
- Moreira, D., & López-García, P. (2002). The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends in Microbiology*, 10(1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02257-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02257-0)
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, 155(C), 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Němcová, Y., Kalina, T., & Neustupa, J. (2000). *Chrysomonády a slunivky s křemitými šupinami montánních a subalpinských rašelinišť Krkonoš.*
- Neustupa, J., & Němcová, Y. (2001). *Morphological and taxonomic study of three terrestrial eustigmatophycean species.*
- Ogram, A., Sayler, G. S., & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7(2–3), 57–66. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X)
- Pace, N. R. (1997). A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5313). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.276.5313.734>
- Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S. S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A. M., Gile, G. H., Holzmann, M., Jahn, R., Jirků, M., Keeling, P. J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., ... de Vargas, C. (2012). CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. *PLoS Biology*, 10(11), e1001419. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001419>
- Pawlowski, J., Christen, R., Lecroq, B., Bachar, D., Shahbazkia, H. R., Amaral-Zettler, L., & Guillou, L. (2011). Eukaryotic Richness in the Abyss: Insights from Pyrotag Sequencing. *PLoS ONE*, 6(4), e18169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018169>
- Pawlowski, J., Esling, P., Lejzerowicz, F., Cedhagen, T., & Wilding, T. A. (2014). Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1129–1140. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12261>
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. (2009),

- February). Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3), 219–235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Pinseel, E., Kulichová, J., Scharfen, V., Urbánková, P., Van de Vijver, B., & Vyverman, W. (2019). Extensive Cryptic Diversity in the Terrestrial Diatom *Pinnularia borealis* (Bacillariophyceae). *Protist*, 170(2), 121–140. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2018.10.001>
- Pompanon, François, Coissac, É., & Taberlet, P. (2011). Metabarcoding, a new way of analysing biodiversity. *Biofutur*, 30–32.
- Pompanon, Francois, Deagle, B. E., Symondson, W. O. C., Brown, D. S., Jarman, S. N., & Taberlet, P. (2012). Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 1931–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x>
- Porazinska, D. L., Giblin-Davis, R. M., Esquivel, A., Powers, T. O., Sung, W., & Thomas, W. K. (2010). Ecometagenetics confirm high tropical rainforest nematode diversity. *Molecular Ecology*, 19(24), 5521–5530. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04891.x>
- Pospíšilová, Š., Tichý, B., & Mayer, J. (2009). Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace aneb budeme rutinně sekvenovat lidské genomy? *Časopis Lékařů Českých*.
- Prosser, J. I. (2010). Replicate or lie. *Environmental Microbiology*, 12(7), 1806–1810. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02201.x>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., & Coissac, É. (2011). EcoPrimers: Inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 39, e145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr732>
- Rippin, M., Borchhardt, N., Williams, L., Colesie, C., Jung, P., Büdel, B., Karsten, U., & Becker, B. (2018). Genus richness of microalgae and Cyanobacteria in biological soil crusts from Svalbard and Livingston Island: morphological versus molecular approaches. *Polar Biology*, 41(5), 909–923. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2252-2>
- Rivera, S. F., Vasselon, V., Ballorain, K., Carpentier, A., Wetzel, C. E., Ector, L., Bouchez, A., & Rimet, F. (2018). DNA metabarcoding and microscopic analyses of sea turtles biofilms: Complementary to understand turtle behavior. *PLoS ONE*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195770>
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. In *Global Ecology and Conservation* (Vol. 17). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>

- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Selinger, D. W., Saxena, R. M., Cheung, K. J., Church, G. M., & Rosenow, C. (2003). Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Research*, *13*(2), 216–223. <https://doi.org/10.1101/gr.912603>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. In *Nature Biotechnology* (Vol. 26, Issue 10, pp. 1135–1145). <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Škaloud, P., & Rindi, F. (2013). Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: A case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *60*(4), 350–362. <https://doi.org/10.1111/jeu.12040>
- Škaloud, P., Škaloudová, M., Jadrná, I., Bestová, H., Pusztai, M., Kapustin, D., & Siver, P. A. (2020). Comparing morphological and molecular estimates of species diversity in the freshwater genus *Synura* (Stramenopiles): a model for understanding diversity of eukaryotic microorganisms. *Journal of Phycology*, 0–3. <https://doi.org/10.1111/jpy.12978>
- Šlapeta, J., Moreira, D., & López-García, P. (2005). The extent of protist diversity: Insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *272*(1576), 2073–2081. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3195>
- Smets, W., Leff, J. W., Bradford, M. A., McCulley, R. L., Lebeer, S., & Fierer, N. (2016). A method for simultaneous measurement of soil bacterial abundances and community composition via 16S rRNA gene sequencing. *Soil Biology and Biochemistry*, *96*, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.003>
- Smith, O., Momber, G., Bates, R., Garwood, P., Fitch, S., Pallen, M., Gaffney, V., & Allaby, R. G. (2015). Sedimentary DNA from a submerged site reveals wheat in the British Isles 8000 years ago. *Science*, *347*(6225), 998–1001. <https://doi.org/10.1126/science.1261278>
- Sønstebo, J. H., Gielly, L., Brysting, A. K., Elven, R., Edwards, M., Haile, J., Willerslev, E., Coissac, E., Rioux, D., Sannier, J., Taberlet, P., & Brochmann, C. (2010). Using next-generation sequencing for molecular reconstruction of past Arctic vegetation and climate. *Molecular Ecology Resources*, *10*(6), 1009–1018. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02855.x>
- Stein, E. D., Martinez, M. C., Stiles, S., Miller, P. E., & Zakharov, E. V. (2014). Is DNA barcoding actually cheaper and faster than traditional morphological methods: Results from a survey of freshwater bioassessment efforts in the United States? *PLoS ONE*, *9*(4), e95525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095525>
- Sweeney, B. W., Battle, J. M., Jackson, J. K., & Dapkey, T. (2011). Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? *Journal of the North American Benthological Society*, *30*(1), 195–216. <https://doi.org/10.1899/10-016.1>
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. In *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001>
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. In *Molecular Ecology* (Vol. 21, Issue 8, pp. 1789–1793). John Wiley & Sons, Ltd.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>

- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Nowak, V., Regnier, T., Bachar, D., Plassart, P., Wincker, P., Jolivet, C., Bispo, A., Lemanceau, P., Maron, P. A., Mougel, C., & Ranjard, L. (2012). Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microbial Biotechnology*, *5*(1), 135–141. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00307.x>
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. In *Biological Conservation* (Vol. 183, pp. 4–18). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Tong, X., Xu, H., Zou, L., Cai, M., Xu, X., Zhao, Z., Xiao, F., & Li, Y. (2017). High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep39606>
- Tringe, S. G., Von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A. A., Chen, K., Chang, H. W., Podar, M., Short, J. M., Mathur, E. J., Detter, J. C., Bork, P., Hugenholtz, P., & Rubin, E. M. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, *308*(5721), 554–557. <https://doi.org/10.1126/science.1107851>
- Tsuji, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2017). Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnology*, *18*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10201-016-0483-x>
- Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M. A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J. E., & Taberlet, P. (2009). New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: The trnL approach. *Molecular Ecology Resources*, *9*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02352.x>
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, *25*(4), 929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
- Vasselon, V., Rimet, F., Tapolczai, K., & Bouchez, A. (2017). Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France). *Ecological Indicators*, *82*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.024>
- Von Der Heyden, S., Chao, E. E., Vickerman, K., & Cavalier-Smith, T. (2004). Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonad flagellates and the evolution of euglenozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *51*(4), 402–416. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00387.x>
- Waidele, L., Korb, J., Voolstra, C. R., Künzel, S., Dedeine, F., & Staubach, F. (2017). Differential Ecological Specificity of Protist and Bacterial Microbiomes across a Set of Termite Species. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02518>
- Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, *345*(6270), 63–65. <https://doi.org/10.1038/345063a0>
- Wetzel, R. G. (2001). Protists: Key Ecosystem Regulators. *BioScience*, *51*(12), 997–997. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0997:pkcr\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0997:pkcr]2.0.co;2)

- White, T. J., Arnheim, N., & Erlich, H. A. (1989). The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics*, 5(C), 185–189. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90073-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90073-5)
- Willerslev, E., Hansen, A. J., Binladen, J., Brand, T. B., Gilbert, M. T. P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D. A., & Cooper, A. (2003). Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. *Science*, 300(5620), 791–795. <https://doi.org/10.1126/science.1084114>
- Wright, E. S., Yilmaz, L. S., & Noguera, D. R. (2012). DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), 717–725. <https://doi.org/10.1128/AEM.06516-11>
- Wurzbacher, C., Attermeyer, K., Kettner, M. T., Flintrop, C., Warthmann, N., Hilt, S., Grossart, H.-P., & Monaghan, M. T. (2017). DNA metabarcoding of unfractionated water samples relates phyto-, zoo- and bacterioplankton dynamics and reveals a single-taxon bacterial bloom. *Environmental Microbiology Reports*, 9(4), 383–388. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12540>
- Yoccoz, N. G., Bråthen, K. A., Gielly, L., Haile, J., Edwards, M. E., Goslar, T., Von Stedingk, H., Brysting, A. K., Coissac, E., Pompanon, F., Sonstebo, J. H., Miquel, C., Valentini, A., De Bello, F., Chave, J., Thuiller, W., Wincker, P., Cruaud, C., Gavory, F., ... Taberlet, P. (2012). DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. *Molecular Ecology*, 21(15), 3647–3655. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05545.x>
- Yu, D. W., Ji, Y., Emerson, B. C., Wang, X., Ye, C., Yang, C., & Ding, Z. (2012). Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4), 613–623. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x>
- Zimmerman, R. C., & Robertson, D. L. (1985). Effects of El Niño on local hydrography and growth of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, at Santa Catalina Island, California. *Limnology and Oceanography*, 30(6), 1298–1302. <https://doi.org/10.4319/lo.1985.30.6.1298>
- Zimmermann, J., Glöckner, G., Jahn, R., Enke, N., & Gemeinholzer, B. (2015). Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 526–542. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12336>
- Zinger, L., Chave, J., Coissac, E., Iribar, A., Louisanna, E., Manzi, S., Schilling, V., Schimann, H., Sommeria-Klein, G., & Taberlet, P. (2016). Extracellular DNA extraction is a fast, cheap and reliable alternative for multi-taxa surveys based on soil DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, 96, 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.01.008>