

JAK ŚLEDZIĆ PRZESZŁOŚĆ I PRZEPOWIADAĆ PRZYSZŁOŚĆ W LABORATORIUM? METABARKODING – UNIWERSALNE NARZĘDZIE DO BADANIA SKŁADU GATUNKOWEGO

JOANNA
KOŁODZIEJCZYK



1 | *Metabarkoding drogą do masowej
identyfikacji gatunków*
fot. Laris Koshkin (pobrane z Pixabay,
zmienione)

Metabarkoding to metoda umożliwiająca jednoczesną identyfikację wielu gatunków z jednej próbki za pomocą wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA. Dzięki niej, wykorzystując próby pobrane ze środowiska, możliwe jest ustalenie, jakie organizmy pozostawiły po sobie w środowisku DNA – ślad niewidzialny gołym okiem, lecz informujący o składzie gatunkowym danego miejsca. Metabarkoding znalazł zastosowanie w badaniach bio-

różnorodności, skutków zmian klimatu, oceny czystości środowiska, relacji między organizmami, diety zwierząt, a także w kryminalistyce, apiologii, przemyśle oraz naukach o zdrowiu. Z tej nowoczesnej metody korzysta coraz więcej naukowców z różnych dziedzin naukowych, wciąż jednak istnieją gałęzie nauki, w których metabarkoding będzie mógł zostać wykorzystany w przyszłości.

Genetyka molekularna znajduje coraz szersze zastosowanie w badaniach typowo środowiskowych. Po tym jak rozwinęły się i weszły do szerokiego użytku metody wykorzystujące zmienność genetyczną do określania stopnia izolacji czy kierunków migracji osobników z zagrożonych populacji i gatunków, przyszedł czas na wykorzystanie tzw. **barkodów DNA** do oceny składu gatunkowego organizmów obecnych w rozmaitych środowiskach z pobranych próbek.

eDNA

Badacze mikroorganizmów nie mogą obserwować swoich modeli badawczych „na żywo” w naturalnym miejscu występowania – są zbyt małe. Naukowcy zajmujący się badaniem większych organizmów lub relacji pomiędzy organizmami również coraz częściej wykorzystują genetykę molekularną i DNA pobrane bezpośrednio ze środowiska.

Każdy organizm (również człowiek) pozostawia po sobie ślad w środowisku w postaci fragmentów DNA, które można wyizolować i zidentyfikować, mimo szkodliwego wpływu czynników zewnętrznych. Po zbadaniu próbki ze środowiska, jesteśmy w stanie ocenić, jakie zwierzęta, rośliny czy grzyby były obecne w danym miejscu, nawet jeśli w danej chwili w badanej próbce znajdują się już tylko martwe szczątki, a nie żywe organizmy. W metodzie tej używa się eDNA (*environmental DNA* – **DNA „środowiskowe”**). Jest to DNA organizmów wyizolowane z próbek środowiskowych (w których każdy orga-

nizm pozostawia ślad), a nie bezpośrednio z konkretnego organizmu. Materiał genetyczny można izolować z wody, gleby, osadów, powietrza, biofilmu, czy szczątków organicznych i odchodów (Pawlowski i in. 2020). Dzięki temu można łatwiej i dokładniej określić skład gatunkowy niż na podstawie cech morfologicznych. Tradycyjne podejście często nie jest możliwe, ponieważ oznaczenie do poziomu gatunku może wymagać obecności konkretnego stadium rozwoju (Ruppert i in. 2019). Co również istotne, materiał genetyczny może pochodzić zarówno z fragmentów tkanek, włosów, śliny, odchodów, krwi, gamet, liści, owoców, pyłków, jak i z całych mikroorganizmów (Ruppert i in. 2019; Pawlowski i in. 2020).

Metabarkoding umożliwia identyfikację wielu gatunków na podstawie analizy jednej próbki za pomocą wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA. Sekwencjonowanie to poznanie kolejności par nukleotydów w cząsteczce DNA. Tradycyjne sekwencjonowanie metodą Sanger’a pozwala na odczytanie sekwencji tylko wówczas, gdy w badanej próbce znajduje się tylko jeden wariant danego fragmentu DNA. Natomiast przy użyciu wysokoprzepustowego sekwencjonowania możemy jednocześnie odczytać sekwencje danego fragmentu DNA występującego w wielu różnych wariantach, niezależnie czy pochodzą one od jednego czy od mieszaniny organizmów. Metabarkoding jest wykorzystywany m.in. do analizowania próbek środowiskowych, w przypadku których oznaczanie morfologiczne jest niemożliwe lub nieopłacalne (Liu i in. 2019). Dzięki

tej metodzie możemy wyciągać wnioski na temat poziomu bioróżnorodności ekosystemów czy siedlisk, skutków zmian klimatu, stanu czystości wód, relacji między organizmami czy diety zwierząt. Metabarkoding znajduje również zastosowanie w kryminalistyce – do poznania miejsca zbrodni, a także w apilogii, przemyśle spożywczym czy w ochronie zdrowia.

Do sekwencjonowania wykorzystuje się **barkody DNA – krótkie fragmenty DNA (markery), stanowiące „kod kreskowy”** – działający podobnie jak kody kreskowe umieszczane np. na opakowaniach produktów spożywczych. Barkody są bardzo zmienne międzygatunkowo, lecz niezmiennie wewnątrzgatunkowo dlatego umożliwiają identyfikację gatunków (Liu i in. 2019). Do każdej z grup organizmów (zwierzęta, rośliny, grzyby, bakterie) stosuje się różne, charakterystyczne fragmenty DNA. Najczęściej wykorzystywanymi markerami DNA są: dla zwierząt – fragment mitochondrialnego genu COI (ang. *cytochrome c oxidase subunit I*, gen podjednostki I oksydazy cytochromowej), dla roślin – plastydowy gen *rbcL* (*ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase*), dla bakterii – 16S oraz dla grzybów – gen jądrowy ITS (ang. *internal transcribed spacer*) (Cristescu 2014). Tego typu barkody pozwalają na jednoczesne zidentyfikowanie wielu gatunków należących do tej samej grupy (np. bakterii lub eukariontów). To odróżnia je od markerów specyficznych tylko dla jednego gatunku, a metabarkoding od popularnego wcześniej barkodingu, gdzie stosuje się barkody pozwalające na namnożenie fragmentu DNA specyficznego dla konkretnego gatunku.

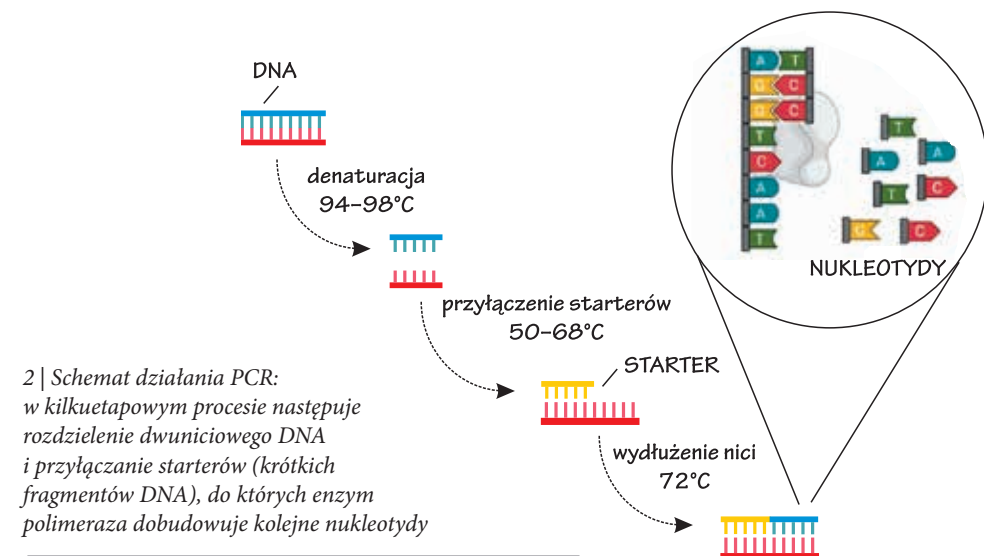
Jak przeprowadzić metabarkoding? Najpierw należy wyizolować materiał genetyczny z pobranych próbek, np. środowiskowych. W tym celu stosuje się zwykle komercyjne kity do izolacji, bo materiał w postaci prób środowiskowych należy do wymagających. Izolat trzeba poddać reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction*, łańcuchowa reakcja polimerazy), aby z wykorzystaniem odpowiednich starterów powielić wybrany region DNA, czyli nasz wybrany barkod. Obecnie prawdopodobnie każdy z nas zna pojęcie PCR, ale czy wiemy, w jaki sposób pozwala na uzyskanie bardzo dużej liczby kopi wybranego przez nas barkodu, co z kolei jest konieczne do przeprowadzenia sekwencjonowania? (ryc. 2).

Następnie należy zobrazować otrzymane powielone fragmenty, żeby się upewnić, czy reakcja zaszła prawidłowo. Do tego celu wykorzystuje się elektroforezę, czyli rozdzielanie fragmentów DNA dzięki ich dodatniemu naładowaniu w polu elektrycznym żelu agarozowym.

Kolejnym krokiem jest wykonanie sekwencjonowania następnej generacji i porównanie otrzymanych sekwencji (za pomocą narzędzi bioinformatycznych) z sekwencjami zdeponowanymi w ogólnodostępnych i darmowych bazach sekwencji nukleotydowych (np. GenBank, BOLD, SILVA).

Badania bioróżnorodności

Metabarkoding jest używany w wielu dziedzinach nauki. Należy do nich m.in. monitoring i ochrona bioróżnorodności. Przykładem mogą być tutaj badania



2 | Schemat działania PCR: w kilkietapowym procesie następuje rozdzielanie dwuniciowego DNA i przyłączanie starterów (krótkich fragmentów DNA), do których enzym polimeraza dobudowuje kolejne nukleotydy

bioróżnorodności organizmów glebowych. Wiedza o mikroorganizmach glebowych jest wciąż niezadawalająca poprzez ich ogromne zróżnicowanie i trudności w oznaczaniu morfologicznym. Metabarkoding jest szansą na dogłębne poznanie różnorodności mikroorganizmów glebowych oraz mechanizmów, które umożliwiają im prawidłowe funkcjonowanie (Francioli i in. 2021).

Nie tylko badacze skoncentrowani na organizmach glebowych odnaleźli zastosowanie dla metabarkodingu w swoich badaniach. Na przykład muchówki (rzęd: Diptera) nie są popularne wśród badaczy, mimo swojej istotnej roli w środowisku. Przez komplikacje napotymane przy oznaczaniu oraz występowanie gatunków kryptycznych (gatunki, które są bardzo podobne, co uniemożliwia ich rozróżnienie na podstawie cech morfologicznych) wiele grup tych owadów jest nieznanych, zwłaszcza tych zamieszkujących obszary tropikalne. Wykorzystanie metabarkodingu w badaniu organizmów, które zostały schwytane do pułapek, umożliwiło pozna-

nie znacznej różnorodności gatunkowej muchówek w tropikalnych rejonach Chin (Huang i in. 2022). Podobnie jest w przypadku tropikalnych płazów bezogonowych, których identyfikacja bez wykorzystania metabarkodingu jest utrudniona (Li i in. 2021).

Efektywny monitoring bioróżnorodności ekosystemów wodnych jest niezbędny do prowadzenia działań ochronnych. Podobnie jak w przypadku wyżej wymienionych ekosystemów, identyfikacja w sposób tradycyjny jest wymagająca, częściej stosowana do makrofauny i nie gwarantuje powtarzalności w przeciwieństwie do metabarkodingu (Klunder i in. 2022).

Badania środowiskowe

Metabarkoding jest używany również do oceny jakości środowiska, np. poprzez oznaczenie gatunków typowych dla wód o dobrej jakości. Bezkręgowce wodne mogą być trudne do oznaczenia, ponieważ często występują w stadiach larwalnych lub nie wykazują szczególnych cech umożli-

BIOINDYKATORY – organizmy, których występowanie informuje o jakości środowiska, ze względu na ich niską tolerancję na zmianę warunków otoczenia (Holt i Miller 2011)

PROTISTY – zróżnicowany zbiór organizmów eukariotycznych (posiadających jądro komórkowe): glonów, pierwotniaków i śluzowców (Finlay 2004)

liwiających rozróżnienie grup. Ponadto, oznaczanie ze względu na cechy morfologiczne jest czasochłonne i wymaga udziału szeregu specjalistów (Kuntke i in. 2020). Wykorzystanie metabarkodingu do oceny składu gatunkowego **bioindykatorów***, np. wodnych **protistów***, pozwala na poszerzenie wiadomości o biogeografii gatunków i ich ekologii (Pawlowski i in. 2016).

Jednymi z bioindykatorów czystości wód są okrzemki, będące ważnym ogniwem w ekosystemie – stanowią pożywienie dla innych organizmów. Niektóre gatunki żyją w szerokim zakresie warunków środowiska, natomiast inne preferują wąski zakres. Rozróżnienie tych gatunków bywa trudne i czasochłonne, stąd też badacze zdecydowali się na wykorzystanie metabarkodingu do zbadania jakości wód w rzekach zachodniej Polski: Odrze oraz Nysie Łużyckiej (Zimmermann i in. 2015).

Naukowcy zauważają jednak, że w bazach danych jest wciąż niewiele informacji o sekwencjach genetycznych protistów i podkreślają jak ważne jest poszerzanie ich o nowe gatunki, co w przyszłości znacząco usprawni identyfikację (Pawlowski i in. 2016).

Badania skutków zmian klimatu

Zmiany klimatu są uważane za jedne z największych niebezpieczeństw dla funkcjonowania ekosystemów, zwłaszcza w przypadku środowisk polarnych, wysokogórskich oraz wodnych (Guisan i in. 2019; Verrall i in. 2020; Gallego i in. 2020). Zwyczajowo badania wpływu zmian kli-

3 | *Metabarkoding jest wykorzystywany do badania wpływu zmian klimatu na funkcjonowanie ekosystemów środowisk wysokogórskich, polarnych i wodnych*
fot. Natalia Kollegova (pobrane z Pixabay)



matu prowadzi się w kontekście jednego gatunku, mimo że funkcjonowanie ekosystemów jest oparte na wzajemnych relacjach wielu grup organizmów. Użycie tradycyjnych metod oznaczania dla wielu gatunków jednocześnie jest trudne, dlatego do oceny ogólnego wpływu zmian klimatu na gatunki występujące w wodach przybrzeżnych wykorzystuje się metabarkoding (Gallego i in. 2020).

Poza badaniem zmian klimatu, które zagrażają bioróżnorodności, metabarkoding jest narzędziem do poznania zmian, które nastąpiły w przeszłości, co pozwala na modelowanie i przewidywanie dalszych zmian środowiskowych. Naukowcy przeanalizowali nunataki (odizolowane od siebie góry otoczone lodem), które reprezentują ekosystem wyspowy (dyspersja organizmów jest ograniczona, w tym przypadku przez lód). Zbadano DNA pozyskane z osadów i odtworzono przekształcenia roślinności na przestrzeni 130 lat. Wykazano, że zmiany klimatu zachodzą szybko i w ten sam sposób oddziałują na organizmy odizolowane od siebie (Jørgensen i in. 2012).

Dieta organizmów

Analiza diety organizmów dostarcza nie tylko informacji wprost o składnikach pożywienia konkretnych gatunków, ale również o funkcjonowaniu ekosystemu, stanie środowiska, wpływie zmian klimatu na gatunki, interakcji troficznych, sieci pokarmowych, czy wpływie degradacji siedlisk na zwierzęta. „Jesteśmy tym, co jemy” – zwierzęta są klasyfikowane ze względu

na sposób odżywiania, od typu pobieranego pokarmu zależy ich zachowanie i miejsce w sieci troficznej (Goldberg i in. 2020). Wykorzystanie metabarkodingu ułatwia i uszczegółowia analizę diety organizmów. Morfologiczne oznaczanie składu pokarmu jest pracochłonne, a czasami niemożliwe, ze względu na konieczność uśmiercenia zwierzęcia w celu zbadania zawartości jego żołądka (van Zinnicq i in. 2021). Ograniczenia występują szczególnie w przypadku zwierząt chronionych lub zagrożonych (Goldberg i in. 2020).

Wykorzystanie metabarkodingu w ustaleniu diety okazało się skuteczne w przypadku susłogona brunatnego (*Urocyonellus brunneus*) – gryzonia z rodziny wiewiórkowatych, chronionego w Stanach Zjednoczonych. Jego specyficzny tryb życia utrudnia możliwość obserwacji. Wykorzystanie innych metod niż metabarkoding wiąże się z potencjalnie niepoprawnym określeniem składu pokarmu roślinnego, który różni się stopniem strawienia resztek. Przez to występowanie pewnych gatunków roślin w diecie może być zawyżone, a innych – dokładniej strawionych – niedoszacowane. Metabarkoding ogranicza błędy wynikające ze zróżnicowanego poziomu strawienia pokarmu, ponieważ **eDNA pozostaje w próbce niezależnie od stopnia strawienia**. Analiza pokarmowa jest szczególnie ważna w przypadku zwierząt hibernujących, które w krótkim czasie muszą pobrać dużą ilość wysokoenergetycznego pokarmu, co może się okazać utrudnione na przykład ze względu na degradację siedlisk (Goldberg i in. 2020). Podobne problemy spotykali badacze dużych kręgowców wod-

3 | Obecność orzesznicy w diecie lisa rudego i kuny leśnej w Tatrzańskim PN wykazano przy wykorzystaniu metody metabarkodingu do analizy odchodów drapieżników
fot. Pixabay



nych. Ich żerowanie było trudne do obserwacji, a status ochronny nie pozwalał na bezpośrednie badanie treści żołądka. Van Zinnicq i współautorzy (2021) mogli określić dietę rekinów analizując materiał pochodzący z wymazów z kloaki. Wcześniej stosowane metody oceny diety na podstawie odchodów okazały się zawodne, gdyż wydaliny po zmieszaniu z wodą morską traciły wartości informatywne dla badaczy (Van Zinnicq i in. 2021).

Poznanie zwyczajów pokarmowych pozwala na zrozumienie roli zwierząt w ekosystemie i odwrotnie – jak zmieniający się ekosystem wpływa na organizmy. Szczególnie istotne jest to w środowiskach narażonych na zanikanie, jak np. lasy tropikalne (Hemprich-Bennett i in. 2021), ekosystemy morskie (Zamora-Terol i in. 2020) czy tereny arktyczne (Urban i in. 2021). Degradacja siedlisk w rejonach tropikalnych negatywnie wpływa na bioróżnorodność, co można udowodnić wykorzystując metabarkoding do analizy diety nietoperzy. Autorzy wykazali, że w przypadku nietoperzy żerujących w zanikających regionach lasów tropikalnych różnorodność dostępnego pokarmu jest istotnie uboższa w porównaniu do zwierząt żyjących w starodrzewach, co w konsekwencji wpływa na zmniejszenie stabilności populacji (Hemprich-Bennett i in. 2021).

Również na terenie Polski prowadzone są liczne badania z zastosowaniem metod metabarkodingu. Za ich pomocą udało się na przykład ustalić, że w diecie dwóch gatunków drapieżników żyjących w Tatrzańskim Parku Narodowym, lisa rudego i kuny

leśnej, występuje dość rzadki gryzoń – orzesznica leśniczowa. Obecność orzesznicy w pokarmie wykazano po raz pierwszy dopiero po przeanalizowaniu odchodów drapieżników, co dostarczyło informacji o sposobie polowania lisa i kuny w tym szczególnym górskim terenie (Cichocki i in. 2020).

W Polsce występuje populacja żubra, która z powodu zmian klimatu oraz presji człowieka musiała przenieść się z terenów otwartych do lasów. Badacze zadali sobie pytanie o wpływ, jaki na żubry ma ta wielka zmiana warunków, a także o to, czy zdołały się przystosować do funkcjonowania w tym środowisku. Przeanalizowano próbki odchodów żubrów żyjących w Puszczy Białowieskiej, aby za pomocą metabarkodingu odtworzyć dietę tych zwierząt. Okazało się, że dieta żubrów jest zmienna w zależności od sezonu, jednak w ciągu całego roku żubry żerowały na gatunkach drzew. Wykazano, że chociaż las nie jest optymalnym środowiskiem życia dla żubrów, pierwotnie przystosowanych do żerowania na łąkach, może zaoferować im schronienie przed wysokimi temperaturami, owadami, a także dużą dostępność do zróżnicowanego i łatwego do strawienia pokarmu. Metabarkoding umożliwił autorom przeprowadzenie dogłębnej analizy zwyczajów żubra, co jest szczególnie istotne ze względu na to, że populacja żubra jest bliska zagrożenia wymarciem (Kowalczyk i in. 2019).

Ponadto, metabarkoding jest używany do analizy diety w celu poznania zwyczajów konkretnych gatunków i ich behawioru, a wiedzę tę można wykorzystać do ochrony gatunków poprzez ochronę ich bazy żywieniowej. Do interesujących wniosków doszli da Silva i współautorzy (2020), którzy ustalili, że różnice w diecie białorzytki żałobnej (*Oenanthe leucura*), niewielkiego ptaka z rodziny mucholówkowatych, nie są związane z dymorfizmem płciowym, który u tego gatunku nie występuje, a ze względu na zróżnicowany behawior płciowy. Te wnioski mogą zmienić sposób postrzegania zwyczajów żywieniowych i behawioru również u innych gatunków (da Silva i in. 2020).

Relacje między organizmami

Wykorzystanie metabarkodingu dostarcza informacji o relacjach między organizmami. Między innymi może posłużyć do zbadania interakcji gospodarz-pasożyt i poznania różnorodności patogenów danych organizmów. Wiadomości na temat obecności i składu gatunkowego pasożytów są szczególnie ważne, ponieważ patogeny działając negatywnie na stan zdrowia gospodarzy zmniejszają ich dostosowanie. Ponadto, wiele zwierząt jest nosicielami pasożytów, które mogą się przenosić także na ludzi (Stensvold i in. 2021). Kompleksowa analiza patogenów jest trudna do przeprowadzenia z wykorzystaniem mikroskopii, stąd użycie metabarkodingu jest istotne w tej dziedzinie, przez umożliwienie wykrycia pasożytów na każdym etapie cyklu życiowego. Ponadto, uzyskanie sekwencji genetycznej może pozwolić na poznanie pokrewieństwa patogenów (Bourret i in. 2021).

Metabarkoding jest narzędziem w rękach badaczy zajmujących się nie tylko zwierzętami, ale także roślinami czy grzybami. Dzięki tej metodzie poznano zależności pomiędzy stawonogami a owocnikami grzybów, w których żyją (Lunde i in. 2022). Botanicy badają obecność i rozprzestrzenianie się roślinnych patogenów, aby zaproponować działania ochronne dla roślin. Wiele z chorób, które obecnie zagrażają uprawom rolniczym, jest spowodowanych wzmożonym przemieszczaniem się ludzi i związanym z tym transportem gatunków inwazyjnych, co również można wykazać za pomocą metabarkodingu (Bulman i in. 2018).

Kryminalistyka

Kolejne zastosowanie metabarkodingu znajduje w kryminalistyce. Dzięki identyfikacji zasiedlających włoki mikroorganizmów można określić czas zgonu czy miejsce zbrodni bądź ustalić przyczynę śmierci (Giampaoli i in. 2021). Poprzez porównanie pyłków roślin znalezionych na miejscu zbrodni i odzieży podejrzanego można nawet znaleźć sprawcę (Liu i in. 2021). Identyfikacja pyłku pozwala na określenie gatunków roślin charakterystycznych dla danego siedliska, co może wskazać miejsce popełnienia zbrodni i przyczynić się do odnalezienia sprawcy (Liu i in. 2021). Metabarkoding wymaga niewielkiej ilości DNA, co jest istotne zwłaszcza w przypadku rozwiązywania spraw kryminalnych, gdzie śledczy i badacze dysponują zaledwie śladową ilością materiału (Allwood i in. 2020).

Inne dziedziny

Zauważa się wzrost zainteresowania metabarkodingiem w apilogii (dział entomologii – nauka o pszczołach). Wykorzystując metabarkoding do badania prób miodu ocenia się jego pochodzenie geograficzne, zwyczaję żerowania pszczół, kwiatową kompozycję miodu, a w konsekwencji, zróżnicowanie roślin na terenie wykorzystywanym przez pszczoły (Hawkins i in. 2015; Milla i in. 2021). Analizować można nie tylko pyłek roślinny, ale również specyficzne mikroorganizmy zawarte w miodzie, które również mogą informować o pochodzeniu geograficznym (Wirta i in. 2021). Niewielkie zróżnicowanie gatunkowe pyłków roślin odnotowane w miodzie może świadczyć o zmniejszaniu się zróżnicowania bazy pokarmowej dla pszczół. Można więc oszacować presję antropogeniczną, poziom redukcji siedlisk, skutki ekspozycji pszczół na szkodniki i pestycydy (Hawkins i in. 2015). Jednak informacje o miodzie, które możemy pozyskać przy użyciu metabarkodingu są istotne nie tylko dla naukowców. Również pszczelarze, a także my wszyscy – miłośnicy miodu, możemy zyskać nową wiedzę.

Kolejnym zastosowaniem jest kontrola żywności i identyfikacja drobnoustrojów chorobotwórczych odpowiedzialnych np. za zatrucia pokarmowe. Wykorzystanie metabarkodingu identyfikuje wiele gatunków patogenów w krótkim czasie, co umożliwia szybką reakcję, która jest niezbędna podczas wystąpienia infekcji (Grützke i in. 2019). Ponadto, badacze wykorzystują metabarkoding do zapobiegania chorobom grzybiczym przez dogłębną analizę prawidłowego

i chorobowego mykobiomu (ogół gatunków grzybów obecnych w danym środowisku, np. w organizmie człowieka) u ludzi, jako że ze składem mykobiomu są związane choroby takie jak: stwardnienie boczne zanikowe, choroba Alzheimera, mukowiscydoza, astma, zespół jelita drażliwego, czy atopowe zapalenie skóry (Gnat i in. 2021).

Obecnie wiele się mówi o mikroorganizmach chorobotwórczych przenoszonych przez kleszcze, a do „najpopularniejszych” należy *Borrelia burgdorferi*, która wywołuje boreliozę. Badacze postanowili z użyciem metabarkodingu zbadać kleszcze występujące w parkach miejskich w Poznaniu, aby się dowiedzieć, które mikroorganizmy są przenoszone przez kleszcze i mogą mieć negatywny wpływ na ludzi. Wykazali, że kleszcz pospolity (ten sam, który przenosi krętki *Borrelia*), nie jest wektorem mikrosporydiów (pasożytów o niejasnej pozycji), ponieważ prawdopodobnie kleszcz wykształcił mechanizmy, które zwalczają mikrosporydia. Dzięki temu nie są przenoszone dalej, np. na ludzi czy psy (Trzebny i in. 2022).

Z tej nowoczesnej metody jaką jest metabarkoding już teraz korzysta wielu badaczy z różnych dziedzin naukowych. Zwracają oni jednak uwagę na potrzebę systematycznego rozwijania metody oraz wzbogacania w nowe sekwencje baz danych. Wciąż istnieją dziedziny, w których metabarkoding będzie mógł zostać wykorzystany w przyszłości.

Joanna Kołodziejczyk

kolodziejczyk@iop.krakow.pl

Zakład Ochrony Fauny

Instytut Ochrony Przyrody PAN

al. Adama Mickiewicza 33, 31-120 Kraków

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję
dr hab. Aleksandrze Biedrzyckiej, prof. IOP
PAN za konstruktywne uwagi do tekstu.

LITERATURA

Allwood J.S., Fierer N., Dunn R.R. 2020. The future of environmental DNA in forensic science. *Applied and Environmental Microbiology* 86 (2): e01504–19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01504-19>

Bourret V., Gutiérrez López R., Melo M., Loiseau C. 2021. Metabarcoding options to study eukaryotic endoparasites of birds. *Ecology and Evolution* 11 (16): 10821–10833.

Bulman S., McDougal R., Hill K., Lear G. 2018. Opportunities and limitations for DNA metabarcoding in Australasian plant-pathogen biosecurity. *Australasian Plant Pathology* 47 (5): 467–474.
<https://doi.org/10.1007/s13313-018-0579-3>

Cichocki J., Janik-Superson K., Królikowska K., Lach J., Rabiasz J., Zwijacz-Kozica T. 2020. Orzesznica leszczynowa *Muscardinus avellanarius* w pokarmie lisa rudego *Vulpes vulpes* i kuny leśnej *Martes martes* w Tatrzańskim Parku Narodowym. *Kulon* 25: 171–178.

Cristescu M.E. 2014. From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 29 (10): 566–571.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>

da Silva L.P., Mata V.A., Lopes P.B., Lopes R.J., Beja P. 2020. High-resolution multi-marker DNA metabarcoding reveals sexual dietary differentiation in a bird with minor dimorphism. *Ecology and Evolution* 10 (19): 10364–10373.
<https://doi.org/10.1002/ece3.6687>

Finlay B. J. 2004. Protist taxonomy: an ecological perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences* 359: 599–610.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1450>

Francioli D., Lentendu G., Lewin S. 2021. DNA metabarcoding for the characterization of terrestrial microbiota – pitfalls and solutions. *Microorganisms* 9 (2): 361.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361>

4 | Stosując metabarkoding do badania próbek miodu można ocenić m.in. jego pochodzenie geograficzne, zwyczaje żerowania pszczół, kwiatową kompozycję miodu, a w konsekwencji, zróżnicowanie roślin na terenie wykorzystywanym przez pszczoły
fot. Pixabay



- Gallego R., Jacobs-Palmer E., Cribari K., Kelly R.P. 2020. Environmental DNA metabarcoding reveals winners and losers of global change in coastal waters. *Proceedings of the Royal Society B* 287: 20202424. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2424>
- Giampaoli S., De Vittori E., Barni F., Anselmo A., Rinaldi T., Baldi M., Miranda K.C., Liao A., Brami D., Frajese G.V., Berti A. 2021. DNA metabarcoding of forensic mycological samples. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 11 (7): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s41935-021-00221-x>
- Gnat S., Łagowski D., Dyląg M., Nowakiewicz A. 2021. Human mycobiome in normobiosis and dysbiosis states characteristics and analysis methods/ludzki mykobiom w stanach normobiozy i dysbiozy – charakterystyka i metody analizy. *Postępy Mikrobiologii/Advancements of Microbiology* 60(1): 31–47.
- Goldberg A.R., Conway C.J., Tank D.C., Andrews K.R., Gour D.S., Waits L.P. 2020. Diet of a rare herbivore based on DNA metabarcoding of feces: Selection, seasonality, and survival. *Ecology and Evolution* 10 (14): 7627–7643. <https://doi.org/10.1002/ece3.6488>
- Grützkke J., Malorny B., Hammerl J.A., Busch A., Tausch S.H., Tomaso H., Deneke C. 2019. Fishing in the soup – pathogen detection in food safety using metabarcoding and metagenomic sequencing. *Frontiers in Microbiology*: 1805. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01805>
- Guisan A.A., Broennimann O., Buri A., Cianfrani C., D'amen M., Di Cola V., Fernandes R., Gray S.M., Mateo R.G., Pinto E., Pradervand J.-N., Scherrer D., Vittoz P., Von Däniken I., Yashiro E. 2019. Climate change impacts on mountain biodiversity. W: Lovejoy T.E., Lee H. *Biodiversity and climate change: transforming the biosphere*. Yale University Press, New Haven: 221–233. <https://doi.org/10.12987/9780300241198-026>
- Hawkins J., de Vere N., Griffith A., Ford C.R., Allainguillaume J., Hegarty M.J., Baillie L., Adams-Groom B. 2015. Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS One* 10 (8): e0134735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134735>
- Hemprich-Bennett D.R., Kemp V.A., Blackman J., Struebig M.J., Lwies, O.T., Rossiter S.J., Clare E.L. 2021. Altered structure of bat-prey interaction networks in logged tropical forests revealed by metabarcoding. *Molecular Ecology* 30 (22): 5844–5857. <https://doi.org/10.1111/mec.16153>
- Holt E.A., Miller S.W. 2011. Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge* 2(2): 8.
- Huang J., Miao X., Wang Q., Menzel F., Tang Pu, Yang D., Wu H., Vogler A.P. 2022. Metabarcoding reveals massive species diversity of Diptera in a subtropical ecosystem. *Ecology and Evolution* 12 (1): e8535. <https://doi.org/10.1002/ece3.8535>
- Jørgensen T., Kjær K.H., Haile J., Rasmussen M., Boessenkool S., Andersen K., Coissac E., Taberlet P., Brochmann Ch., Orlando L., Gilbert M.T.P., Willerslev E. 2012. Islands in the ice: detecting past vegetation on Greenlandic nunataks using historical records and sedimentary ancient DNA Meta-barcoding. *Molecular Ecology* 21 (8): 1980–1988. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05278.x>
- Klunder L., van Bleijswijk J.D.L., Schaars L.K., van deer Veer H.W., Luttikhuisen P.C., Bijleveld A.I. 2022. Quantification of marine benthic communities with metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 22 (3): 1043–1054. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13536>
- Kowalczyk R., Wójcik J., Taberlet P., Kamiński T., Miquel Ch., Valentini A., Craine J., Coissac É. 2019. Foraging plasticity allows a large herbivore to persist in a sheltering forest habitat: DNA metabarcoding diet analysis of the European bison. *Forest Ecology and Management*. 449: 117474. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117474>
- Kuntke F., de Jonge N., Hesselsoe M., Nielsen J.L. 2020. Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates. *Ecological Indicators* 111: 105982. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105982>
- Li W., Song T., Hou X., Qin M., Xu C., Li Y. 2021. Application of eDNA Metabarcoding for Detecting Anura on a Tropical Island. *Diversity* 13 (9): 440. <https://doi.org/10.3390/d13090440>
- Liu M., Clarke L.J., Baker S.C., Jordan G.J., Burridge C.P. 2019. A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. *Ecological Entomology* 45 (3): 373–385. <https://doi.org/10.1111/een.12831>
- Liu Y., Xu Ch., Dong W., Yang X., Zhou S. 2021. Determination of a criminal suspect using environmental plant DNA metabarcoding technology. *Forensic Science International* 324: 110828. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110828>
- Lunde L.F., Birkemoe T., Kauserud H., Boddy L., Jacobsen R.M., Morgado L., Sverdrup-Thygeson A., Maurice S. 2022. DNA metabarcoding reveals host-specific communities of arthropods residing in fungal fruit bodies. *Proceedings of the Royal Society B* 289 (1968): 20212622. <http://doi.org/10.1098/rspb.2021.2622>
- Milla L., Sniderman K., Lines R., Mousavi-Derazmahalleh M., Encinas-Viso F. 2021. Pollen DNA metabarcoding identifies regional provenance and high plant diversity in Australian honey. *Ecology and Evolution* 11 (13): 8683–8698. <https://doi.org/10.1002/ece3.7679>
- Pawlowski J., Apothéoz-Perret-Gentil L., Altermatt F. 2020. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology* 29 (22): 4258–4264. <https://doi.org/10.1111/mec.15643>
- Pawlowski J., Lejzerowicz F., Apothéoz-Perret-Gentil L., Visco J., Esling P. 2016. Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change. *European Journal of Protistology* 55: 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.02.003>
- Ruppert K.M., Kline R.J., Md Saydur Rahman. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17: e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Stensvold C.R., Jirků-Pomajbíková K., Tams K.W., Jokelainen P., Berg R.P.K.D., Marving E., Petersen R.F., Andersen L.O., Angen Ø., Nielsen H.V. 2021. Parasitic Intestinal Protists of Zoonotic Relevance Detected in Pigs by Metabarcoding and Real-Time PCR. *Microorganisms* 9 (6): 1189. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061189>
- Trzebny A., Liberska J., Slodkiewicz-Kowalska A., Dabert M. 2022. Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (*Ixodes ricinus*). *Parasites & Vectors* 15 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05150-9>
- Urban P., Praebel K., Bhat S., Dierking J., Wangenstein O.S. 2021. DNA metabarcoding reveals the importance of gelatinous zooplankton in the diet of *Pandalus borealis*, a keystone species in the Arctic. *Molecular Ecology* 31(5): 1562–1576. <https://doi.org/10.1111/mec.16332>
- van Zinnicq Bergmann M.P.M., Postaire B.D., Gastrich K., Heithaus M.R., Hoopes L.A., Lyons K., Papastamatiou Y.P., Schneider E.V.C., Strickland B.A., Talwar B.S., Chapman D.D., Bakker J. 2021. Elucidating shark diets with DNA metabarcoding from cloacal swabs. *Molecular Ecology Resources* 21(4): 1056–1067. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13315>
- Verrall B., Pickering C.M. 2020. Alpine vegetation in the context of climate change: A global review of past research and future directions. *Science of the Total Environment* 748 (2020): 141344. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141344>
- Wirta H., Abrego N., Miller K., Roslin T., Vesterinen E. 2021. DNA traces the origin of honey by identifying plants, bacteria and fungi. *Scientific Reports* 11 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84174-0>
- Zamora-Terol S., Novotny A., Winder M. 2020. Reconstructing marine plankton food web interactions using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 29 (17): 3380–3395. <https://doi.org/10.1111/mec.15555>
- 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>