

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Dominika Chromková

CITES organismy a tradiční čínská medicína
CITES organisms and traditional Chinese medicine

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala 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, 1.6.2020

Podpis

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala panu RNDr. Danielu Vaňkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a připomínky, který mi během zpracování mé bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla vyjádřit své díky panu Mgr. Zdeňku Novákovi z České inspekce životního prostředí za jeho vstřícný přístup.

Abstrakt

Nelegální obchod s volně žijícími živočichy a rostlinami je jedním z nejlukrativnějších zločinů na světě. Hnací silou této nekalé praktiky ohrožující mnoho druhů na přežití je z velké části stále se zvyšující poptávka po surovinách k přípravě tradiční čínské medicíny (TCM). Její léčebné přípravky přitom zahrnují mimo jiné i organizmy, s nimiž je obchod zakázán, nebo regulován podle úmluvy CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Tato mezinárodní dohoda jasně definuje pravidla obchodu s volně žijícími druhy i výrobky z nich. Jejich porušení se trestá na základě legislativy konkrétního státu. K zefektivnění potírání tohoto typu kriminality je zapotřebí snadno standardizovatelných a přesných technik druhové identifikace. Ve své práci uvádím souhrn a zhodnocení metod DNA identifikace založených na principu hybridizace, polymerázové řetězové reakce nebo sekvenaci, a to i pro vzorky s degradovanou DNA, nebo komplexní vzorky s obsahem směsi různých druhů. DNA barcoding se zdá být optimálním nástrojem k detekci zdrojových organizmů čínské medicíny. Text je doplněn o výčet nejčastěji zadržovaných exemplářů CITES organizmů využívaných pro účely TCM s fotografiemi artefaktů zabavených Českou inspekcí životního prostředí. Tato práce by tak mohla sloužit celním orgánům při výběru vhodné metody k průkazu přítomnosti CITES organizmů v surovinách a přípravcích TCM.

Klíčová slova: CITES, tradiční čínská medicína, DNA identifikace, druhová identifikace, komplexní vzorky, DNA barcoding

Abstract

The illegal trade of wildlife animal and plant species is one of the most lucrative crimes in the world. The driving force behind this unfair practice of threatening many species for survival is the largely increasing demand for raw materials used to prepare traditional Chinese medicine (TCM). Its medicinal preparations include, among others, organisms with which trade is prohibited or regulated under the CITES convention (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). This international agreement clearly defines the rules of trade of wild species and products thereof, the violation of which is punishable on the basis of the legislation of a particular country. Easily standardized and accurate species identification techniques are needed to make more effective the prosecution of this type of crime. In my bachelor's thesis I am representing a summary and evaluation of DNA identification methods, which are based on the principle of hybridization, polymerase chain reaction or sequencing, including samples with degraded DNA or complex samples containing a mixture of different species. DNA barcoding is currently proven to be an optimal tool to detect the source organisms of Chinese medicine. The text is supplemented by the list of the most commonly confiscated specimens of animals and plants used for the purpose of TCM with photographs of artifacts seized by the Czech Environmental Inspectorate. This work thus could serve for customs authorities in selecting the appropriate method to prove the presence CITES organisms in raw materials and TCM preparations.

Keywords: CITES, traditional Chinese medicine, DNA identification, species identification, complex samples, DNA barcoding

Obsah

1	Úvod	1
2	CITES	2
2.1	<i>CITES v praxi</i>	2
2.2	<i>CITES v Evropské unii</i>	3
2.3	<i>CITES v České Republice</i>	4
3	Tradiční čínská medicína	5
3.1	<i>Nebezpečí spojené s užíváním přípravků TCM</i>	6
3.2	<i>Obchod s TCM s obsahem CITES organismů</i>	7
3.2.1	Identifikace CITES organismů v TCM	7
3.2.1.1	Identifikace surové a patentní TCM	8
3.2.2	Nejčastější záchyty ve světě a v ČR	8
3.2.2.1	Zvířata	8
3.2.2.2	Rostliny	11
4	Metody laboratorního průkazu přítomnosti biologického materiálu CITES organismů	13
4.1	<i>Makroskopické a mikroskopické metody</i>	13
4.2	<i>Proteomika</i>	13
4.3	<i>Chemická analýza</i>	14
4.4	<i>DNA analýza</i>	15
4.4.1	Metody izolace DNA z forezních vzorků	15
4.4.2	Klasifikace původu vzorku	15
4.4.3	Polymorfismy využívané ve forezním vyšetřování	15
4.4.3.1	Repetitivní sekvence	15
4.4.3.2	Jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)	16
4.4.3.3	Inzerce a delece (In/Dels)	16
4.4.3.4	Sekvenční polymorfismus	16
4.4.4	DNA hybridizační metody	18
4.4.4.1	RFLP – Restriction fragment length polymorphisms	18
4.4.4.2	DNA Microarrays (DNA Chip)	18
4.4.5	PCR metody	18
4.4.5.1	RFLP – PCR	19
4.4.5.2	RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA	19
4.4.5.3	AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism	20
4.4.5.4	RT PCR – Real Time PCR	20
4.4.5.5	SPInDel – SPecies Identification by Insertions/Deletions	21
4.4.5.6	SNaPshot	21
4.4.5.7	STR – Short Tandem Repeats, SSR – Simple Sequence Repeats	21
4.4.5.8	Druhově specifická PCR	21
4.4.5.9	Délkový polymorfismus kontrolní oblasti mtDNA	22
4.4.6	DNA sekvenace	22
4.4.6.1	Next Generation Sequencing (NGS)	23
4.4.6.2	Third Generation Sequencing (TGS), Long Read Sequencing	23
4.4.7	DNA barcoding	25
4.4.7.1	Vlastnosti a výběr ideálního barcodu	25
4.4.7.2	Design primerů	26

4.4.7.3	Barcoding živočichů	26
4.4.7.4	Barcoding rostlin.....	28
4.4.7.5	DNA metabarcoding	29
4.4.7.6	Databáze	30
4.4.7.7	Fylogenetická analýza.....	31
5	Závěr.....	32
6	Seznam použité literatury	33

Seznam použitých zkratek

AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných úseků	Amplified Fragment Length Polymorphism
AOPK ČR	Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky	
As₄S₄	tetrasulfid tetraarsenu, realgar	
BLAST	program porovnávající podobnost dvou sekvencí	Basic Local Alignment Search Tool
BOLT	databáze a online platforma k analýze barcodů	The Barcode of Life Data System
bp	páry bazí	base pair
BRI	Iniciativa pás a cesta	Belt and Road Initiative
CBOL	Konsorcium pro barcode života	The Consortium for the Barcode of Life
CCD		Charge-Coupled Device
CE	kapilární elektroforéza	Capillary Electrophoresis
CITES	Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin	the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
COI	gen kódující podjednotku I cytochrom c oxidázy	gene encoding subunit I of cytochrome c oxidase
cpDNA	chloroplastová DNA	chloroplast DNA
CR	kontrolní oblast	Control Region
CytB	gen kódující cytochrom B	gene encoding cytochrome B
ČIŽP	Česká inspekce životního prostředí	
ddATP	2',3'-dideoxyadenin trifosfát	2',3'-dideoxyadenosine triphosphate
ddCTP	2',3'-dideoxycytosin trifosfát	2',3'-dideoxycytidine triphosphate
ddGTP	2',3'-dideoxyguanin trifosfát	2',3'-dideoxyguanosine triphosphate
ddNTP	2',3'-dideoxythymidin trifosfát	2',3'-dideoxythymidine triphosphate
ddTTP	2',3'-dideoxynukleotid trifosfát	2',3'-dideoxynucleotide triphosphate
D-loop	D-smyčka	displacement loop
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát	deoxyribonucleotide triphosphate
dsDNA	dvouvlákná DNA	double stranded DNA
ELISA	analytický imunoenzymatický test	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ES	Evropské společenství	
GBIF	globální informační nástroj pro biologickou rozmanitost	Global Biodiversity Information Facility
GC	plynová chromatografie	Gas Chromatography
HgS	sulfid rtuťnatý	

HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie	High Performance Thin-Layer Chromatography
HRMA	analýza bodů tání molekul DNA	High Resolution Melting Analysis
H-strand	těžký řetězec	heavy strand
IDS	identifikační systém platformy BOLD	BOLD IDentification System
indel	inzerce/delece nukleotidů	insertion/deletion of nucleotides
IR	invertovaná repetice	Inverted Repeat
IRA	invertovaná repetice A	Inverted Repeat A
IRB	invertovaná repetice B	Inverted Repeat B
ITS	vnitřní přepisovaný spacer	Internal Transcribed Spacer
ITS2	vnitřní přepisovaný spacer 2	Internal Transcribed Spacer 2
IUCN	Mezinárodní svaz ochrany přírody	the International Union for Conservation of Nature
JAR	Jihoafrická republika	
kbp	kilo párů bází	kilo base pairs
LSC	dlouhá jednokopiová oblast	Large Single Copy region
L-strand	lehký řetězec	light strand
matK	gen kódující maturázu K	gene encoding maturase K
Mb	mega párů bází	mega base pairs
ML	maximální věrohodnost	maximum likelihood
MMDBD	databáze DNA barcodů léčebných materiálů	Medical Materials DNA Barcode Database
MP	maximální úspornost	maximum parsimony
mtDNA	mitochondriální DNA	mitochondrial DNA
MŽP	Ministerstvo životního prostředí	
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace	National Center for Biotechnology Information
NGS	sekvenování nové generace	Next Generation Sequencing
NJ	spojování sousedů	Neighbor-Joining
PacBio		Pacific Biosciences
PCR	polymerázová řetězová reakce	Polymerase Chain Reaction
pH		potential of hydrogen
Ple46	mikrosatelitní oblast	microsatellite locus
QH₂	ubichinol	
RAPD	náhodná amplifikace polymorfní DNA	Randomly Amplified Polymorphic DNA
rbcL	gen kódující velkou podjednotku ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylázy/oxygenázy	gene encoding the large subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů	Restriction Fragment Length Polymorphism

rpoC1	gen kódující podjednotku gamma DNA dependentní RNA polymerázy	gene encoding the subunit gamma of the DNA dependent RNA polymerase
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina	ribosomal ribonucleic acid
RT PCR	PCR v reálném čase	Real Time PCR
RuBisCO	ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SARS-CoV-2	těžký akutní respirační syndrom koronaviru 2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SMRT	metoda sekvenace jedné molekuly DNA v reálném čase	single-molecule real-time sequencing
SNP	jednonukleotidový polymorfismus	Single Nucleotide Polymorphism
SOLiD	metoda sekvenace ligací a detekcí oligonukleotidů	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection
SPIInDEL	metoda druhové identifikace pomocí délkového polymorfismu způsobeného indely	SPecies Identification by Insertions/Deletions
SRS ČR	Státní rostlinolékařská správa ČR	
SSC	krátká jednokopiová oblast	Small Single Copy region
ssDNA	jednovlákná DNA	single stranded DNA
SSR	jednoduchá sekvenční repetice	Simple Sequence Repeats
STR	krátké tandemové repetice	Short Tandem Repeats
SVS ČR	Státní veterinární správa ČR	
Taq	tepelně stabilní DNA polymeráza izolovaná z bakterie <i>Thermus aquaticus</i>	thermostable DNA polymerase isolated from the bacteria <i>Thermus aquaticus</i>
Tb	tera páry bází	tera base pairs
TCM	tradiční čínská medicína	Traditional Chinese Medicine
TGS	sekvenování třetí generace	Third Generation Sequencing
tRNA	transferová ribonukleová kyselina	transfer ribonucleic acid
trnH-psbA	mezigenová oblast chloroplastového genomu	intergenic spacer of the chloroplast genome
trnL	intron genu kódující tRNA ^{Leu}	intron of the gene encoding tRNA ^{Leu}
UNEP-WCMC	Světové monitorovací středisko ochrany přírody	The United Nations Environment Programme World Conservation Monitoring Centre
VNTR	variabilní počet tandemových repetice	Variable Number Tandem Repeat
WHO	Světová zdravotnická organizace	World Health Organization
ZMW	vlnovod nultého modu	Zero-Mode Waveguide

1 Úvod

Mezi dva nejvýznamnější faktory silně ohrožující přežití mnoha volně žijících druhů patří ničení jejich přirozených stanovišť a neudržitelný obchod s nimi. Právě ochranou volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin před nadměrným využíváním pro komerční a osobní účely se zabývá mezinárodní úmluva CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), jejímiž členy jsou téměř všechny státy na světě včetně České republiky. Více než 35 tisíc druhů živočichů a rostlin CITES řadí do příloh I, II a III podle stavu velikosti populací ve volné přírodě a tím i míry jejich ohrožení mezinárodním obchodem. S organizmy zahrnutými v příloze I je obchod zcela zakázán, v případě příloh II a III tento obchod podléhá regulacím vydáváním tzv. „CITES permit“ (CITES, 2020).

Tradiční čínská medicína (Traditional Chinese Medicine, TCM) se od medicíny západní liší kromě pohledu na lidské zdraví také použitím pouze látek přírodního původu k léčebným účelům, jako jsou nejrůznější části rostlinných a živočišných těl nebo nerosty. Obliba této alternativy roste celosvětově, ačkoliv většina surovin TCM pozbývá jakýchkoliv vědecky podložených léčebných účinků. Tyto zdroje jsou i nadále používány pro jejich přípravu, a to včetně druhů pod přísnou ochranou CITES.

Pokud zabavený exemplář TCM bez permitu deklaruje přítomnost CITES organismu, je dle znění Úmluvy brán za jeho skutečný obsah. V případě neoznačených a podezřelých artefaktů TCM z obsahu těchto chráněných druhů je však pro důkazní účely a následovně vymáhání práva nezbytné určit jeho přesnou druhovou identitu (Cameron *et al.*, 2004). Pro vydání forenzního posudku se stává stěžejním výběr časově nenáročné a především dostatečně spolehlivé a reprodukovatelné identifikační techniky. Ta musí poskytovat dostatek relevantních informací k přesnému druhovému určení i ze směsných a degradovaných vzorků TCM. V současné době se kvůli vysoké informativnosti a množství dostupných metod využívá zejména technik založených na analýze genetické informace uložené v molekulách DNA. Mezi tyto techniky řadíme metody založené na hybridizaci, polymerázové řetězové reakci nebo sekvenaci. Objevení polymerázové řetězové reakce (Mullis & Faloona, 1987) umožnilo exponenciální namnožení DNA i ze stopových vzorků. To vedlo k vytvoření množství odvozených identifikačních metod vhodných pro forenzní účely, které cílí na různé typy polymorfismů genomu. Sekvence vybraných krátkých úseků mitochondriálního, chloroplastového nebo jaderného genomu neboli tzv. DNA barcoding (Hebert *et al.*, 2003) se ukazuje jako možná alternativa ke klasickému celogenomovému sekvenování. Druhy jsou přitom určeny porovnáním podobnosti barcodů se sekvencemi v referenčních databázích a provedením fylogenetické analýzy.

Cílem mé práce je vytvořit seznam živočichů a rostlin využívaných pro účely TCM a současně chráněných úmluvou CITES. Dále pak zhodnotit možnosti DNA identifikačních metod schopných určení druhové identity zabavených exemplářů TCM, a to i pro směsné vzorky v případě patentní medicíny nebo vzorky s obsahem degradované DNA následkem přípravy vařením, louhováním nebo sušením.

2 CITES

CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), nebo také Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin, či Washingtonská smlouva, byla ujednána ve Washingtonu D. C. ve Spojených státech amerických dne 3. března 1973. V platnost vešla 1. července 1975.

Mezi prvními stranami úmluvy byly státy Chile, Kypr, Ekvádor, Nigérie, Švédsko, Švýcarsko, Tunisko, Sjednocené arabské emiráty, USA a Uruguay. Československo se stalo smluvní stranou 28. února 1992 celkem jako 114. stát a vstoupila v platnost 28. května 1992. Česká republika je smluvní stranou od 1. 1. 1993. K dnešnímu dni má úmluva 183 smluvních stran (Kučera & Boučková, 2010; *CITES*, 2020).

CITES představuje mezinárodní dohodu mezi Stranami o ochraně volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin před nadměrným mezinárodním obchodem s nimi, jejich částmi nebo výrobky z nich, který by jinak mohl vést společně s destrukcí přírodních stanovišť až na pokraj vyhynutí některých druhů a vážně ohrozit jejich přežití na Zemi. Úmluva má tedy za úkol kontrolovat obchod za účasti signatářských států a zajistit tak udržitelné využívání těchto přírodních zdrojů (*CITES*, 2020).

2.1 CITES v praxi

Signatářské země jsou Stranami a svým podpisem se zavázaly k dodržování předpisů daných dohodou. Úmluva neslouží jako náhrada za vnitrostátní právní předpisy, pouze Stranám vymezuje rámec, který svým souhlasem potvrdily dodržovat. Strany musí přijmout státní legislativu, aby byly schopny vykonávat úmluvu i na vnitrostátní úrovni. Povinností každé Strany je jmenovat nejméně jeden národní výkonný orgán, který bude zajišťovat administrativní část a jeden nebo více vědeckých orgánů pro posouzení vlivu dovozu a vývozu exemplářů na volně žijící populace (*CITES*, 2020).

Dovoz a vývoz organismů zahrnutých v CITES nebo výrobků z nich podléhá kontrolám realizovaných zejména skrze povolení, též „CITES permit“. Tato povolení vydávaná výkonnými orgány smluvních stran jsou kontrolována celními orgány členů úmluvy, mezi kterými obchod probíhá. Vědecký orgán hraje zásadní roli ve vydávání povolení. Rozhoduje se na základě stavu velikosti populace organismu ve volné přírodě, tedy sleduje, zda odběrem jedinců nedojde k ohrožení druhu na přežití (Kučera & Boučková, 2010; Klouček, 2017).

Úkolem smluvních stran je také shromažďovat informace o schválených a provedených dovozech a vývozech, které každý rok odevzdávají Sekretariátu CITES. Výroční zprávy jsou uloženy ve Světovém monitorovacím středisku ochrany přírody (UNEP-WCMC) a po zpracování se poskytují výkonným orgánům, vědeckým radám a Sekretariátu CITES (Kučera & Boučková, 2010).

Pod ochranu CITES spadá zhruba 5800 druhů živočichů a 30 000 druhů rostlin. CITES organismy jsou na základě stupně ohrožení mezinárodním obchodem rozděleny do tří kategorií uvedených v přílohách I, II a III CITES – viz Tab. 1 (Kučera & Boučková, 2010; *CITES*, 2020).

Tab. 1 Tabulka shrnující řazení druhů chráněných CITES a požadavky na jejich dovoz a vývoz (CITES, 2020).

Příloha	Zahrnuje	Dovoz a vývoz
I	druhy přímo ohrožené vyhynutím, na které by mezinárodní obchod mohl mít fatální dopad	je zakázán, pokud je prováděn za primárně obchodním účelem, nebo ohrožuje přežití druhu a je povolován jen výjimečně
II	druhy, které nejsou ohroženy přímo vyhynutím, ale je potřeba obchod s nimi kontrolovat, aby nedošlo nadměrnému využívání ohrožující je tak přežít	vývozní povolení je vydáváno v případě, že exemplář byl získán legálním způsobem a jeho vývozem nedojde k narušení populace, dovozní povolení není potřeba, pokud není vyžadováno národní legislativou
III	druhy, které jsou přímo ohroženy mezinárodním obchodem jen v určité zemi, a tato země požádala strany CITES o dozor nad jejich využíváním	vyžadováno je pouze vývozní povolení konkrétní země, na jejímž území druh žije, z ostatních států je nutné mít certifikát původu

2.2 CITES v Evropské unii

Z důvodu společného evropského obchodu a absence systematických hraničních kontrol je vykonávána úmluva CITES jednotně již od roku 1984. Pro CITES představuje EU celek a v současné době se úmluva v ní realizuje na základě nařízení Rady (ES) č. 338/97, které se zabývá ochranou druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi, a nařízení Komise (ES) č. 865/2006 o pravidlech vykonávání nařízení Rady (ES) č. 338/97 a praktických aspektech jeho provádění. Nařízení EU je zákonem platným pro všechny občany, fyzické i právnické osoby všech států unie (Kučera & Boučková, 2010; *European Commission - Environment*, 2019; *AOPK ČR*, 2020).

Evropská unie má vlastní řazení CITES organizmů v mnoha ohledech striktnější než samotné přílohy I, II, III CITES, resp. zahrnuje i druhy původně úmluvou nechráněné. Řadí mezi ně organizmy nechráněné CITES, ale ohrožené vyhynutím, druhy podobné zařazeným druhům k usnadnění sledování stavu jejich ohrožení. Dále pak druhy s vyšší úrovní ochrany podle evropských směrnic o ochraně přírodních stanovišť a ochraně volně žijících ptáků a potenciálně invazní druhy, které by mohly znamenat ohrožení pro původní evropskou faunu a flóru (*AOPK ČR*, 2020; *CITES.es*, 2020). Seznamy organizmů se rozdělují do příloh A, B, C a D, přičemž příloha D slouží především ke sledování úrovně dovozu do EU – viz Tab. 2. Pokud ze získaných ročních dat o celkovém dovozu vyplyne možné ohrožení nadměrným obchodem, je zvažováno přeřazení daného druhu do přílohy B (*The Differences between EU and CITES Provisions*, 2020).

Tab. 2 Tabulka shrnující řazení CITES organizmů a požadavky na vývoz a dovoz CITES exemplářů podle nařízení Evropské unie (*European Commission - Environment, 2019; The Differences between EU and CITES Provisions, 2020*).

Příloha	Zahrnuje	Dovoz a vývoz
A	všechny CITES druhy přílohy I, některé druhy příloh II a III, pro které si EU zvolila přísnější zařazení a druhy mimo úmluvu	je pro komerční účely zakázán v případě organizmů současně řazených v příloze I CITES, v jiných případech je vyžadováno vývozní a dovozní povolení
B	všechny druhy přílohy II, některé druhy přílohy III a druhy mimo úmluvu	je vyžadováno vývozní povolení v případě, pokud se jedná o exemplář přílohy II CITES a dovozní povolení
C	zbylé druhy přílohy III mimo vyjmenované v přílohách A, B	je vyžadováno vývozní povolení v případě, že vývozní země řadí exemplář do přílohy III CITES, jinak stačí certifikát původu, vždy je však nezbytné mít oznámení o dovozu
D	druhy z přílohy III, pro které jeden nebo více členských států EU vyžádaly výhradu, druhy jejichž dovoz do EU je zapotřebí sledovat	je vyžadováno pouze oznámení o dovozu

2.3 CITES v České Republice

Po vstupu České republiky do Evropské unie dne 1. května 2004 se stal platným zákon č. 100/2004 Sb. o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi a dalších opatřeních k ochraně těchto druhů a o změně některých zákonů (zákon o obchodování s ohroženými druhy), nařízení (ES) č. 338/97 a další předpisy EU. Vyhláškou č. 210/2010 Sb. se provádějí některá ustanovení zákona č. 100/2004 Sb. (Kučera & Boučková, 2010; *AOPK ČR, 2020*).

Hlavním výkonným orgánem CITES v ČR je Ministerstvo životního prostředí (MŽP) a národním vědeckým orgánem se stala Agentura ochrany přírody a krajiny ČR (AOPK ČR). Kontrolu dodržování nařízení (ES) č. 338/97 a zákona č. 100/2004 Sb. provádí Česká inspekce životního prostředí (ČIŽP), která za porušení zákona uděluje pokuty, ve spolupráci s Policií ČR a Celní správou ČR. Krajské úřady regulují vnitrostátní a vnitrouní obchod vydáváním povolení k obchodu. Důležitou roli plní také Státní veterinární správa ČR (SVS) a Státní rostlinolékařská správa ČR (SRS) (Kučera & Boučková, 2010; *ČIŽP, 2020*).

Za nedodržení zákona může být osobě, jež se dopustila přestupku, udělena pokuta v maximální výši 1,5 milionu korun, a to jak fyzickým osobám, tak i podnikatelským subjektům. V jiném případě dochází k zabavení exemplářů. Závažnější případy neoprávněného nakládání s chráněnými volně žijícími živočichy a planě rostoucími rostlinami řeší Celní správa a Policie ČR dle § 299 a § 300 zákona č. 40/2009 Sb. Pachatel pak může být potrestán zákazem činnosti, odnětím svobody až na dobu osmi let nebo propadnutím věci (*Zákon č. 40/2009 Sb – Trestní zákoník, 2009; ČIŽP, 2020*).

3 Tradiční čínská medicína

Tradiční čínská medicína je jedním z nejstarších komplexních zdravotních systémů na světě. Je hluboce zakořeněná v tamní kultuře a od západní medicíny se výrazně liší v pohledu na člověka. Vnímá jej jako funkčně propojený celek, zatímco západní medicína jako jednotlivé části. Qi, neboli životní energie představující základní kámen TCM, se pohybuje napříč tělem po neviditelné mapě procházejícími jednotlivými orgány – po meridiánech. Tyto energetické dráhy koordinují práci jednotlivých orgánů a udržují tak tělo v rovnováze. Podle TCM je člověk zdravý pokud Qi volně protéká meridiány a orgány harmonicky pracují. Z různých příčin však může dojít k zablokování meridián a tím i k zamezení proudění energie, což ovlivní funkci konkrétního orgánu a tím i duševní stav jedince. Pohyb energie v meridiánech lze stimulovat využitím některé nebo kombinací vícero způsobů léčby TCM. Mezi ně patří akupunktura, akupresura (tuina), cvičení (qigong), speciální strava nebo čínská bylinná léčba. Všechny tyto metody napomáhají znovuuznání rovnováhy, a tím i celkovému uzdravení jedince. Pro porozumění, diagnostiku a léčbu jsou zásadní dvě teorie, vycházející ze středověké čínské filosofie: teorie protikladných energií Yin a Yang a teorie pěti elementů (Five Element Theory), která poukazuje na dynamické propojení našeho těla s přírodou (Hu & Liu, 2012; *ATCM*, 2020; *TCM World*, 2020).

Poptávka po čínské medicíně celosvětově roste, navzdory stále chybějícím prokazatelným důkazům o její účinnosti a bezpečnosti. Dnes se TCM exportuje do více než 183 zemí a regionů, s roční hodnotou obchodu přes 3 miliardy dolarů (*Traditional Chinese Medicine in China*, 2016; Cyranoski, 2018).

Za silné podpory současného prezidenta Xi Jinpinga byla vytvořena národní strategie zaměřující se na zvýšení vnitrozemního TCM turismu. Ambice Číny však sahají dál za její hranice. Globalizace TCM se stala klíčovým pilířem čínské tzv. Iniciativy Pás a cesta (Belt and Road Initiative, BRI), označované za novodobou Hedvábnou stezku, jejímž cílem je infrastrukturní propojení Afriky, Evropy a Asie a tím i rozšíření ekonomického a politického vlivu Číny. Více než 60 zemí, představující tři čtvrtiny světové populace, se připojilo k této iniciativě, a tím paradoxně otevřelo cesty vstupu TCM na svůj trh (Chatzky & McBride, 2020; Kuo & Kommenda, 2018). Prodej TCM přípravků se v těchto zemích mezi lety 2016 a 2017 zvýšil o 54 % a celkově dosáhl hodnoty 295 milionů dolarů. Jedním z cílů BRI je také do konce roku 2020 vytvořit 30 TCM klinik a center, poskytujících lékařské služby a vzdělávání za účelem celosvětového šíření TCM (Cyranoski, 2018).

Centrum Tradiční čínské medicíny v rámci Fakultní nemocnice v Hradci Králové bylo otevřeno v září roku 2015 a patřilo mezi vůbec první TCM centra ve střední a východní Evropě (Yiran, 2019). Za dobu své tříleté existence jím prošlo přes 3000 pacientů, kterým čínští specialisté nabízeli pomoc zejména od chronické bolesti využitím metod akupunktury nebo cvičení. K 28. únoru 2019 česko-čínské centrum činnost ukončilo z důvodu neukotvení TCM praktik v české legislativě (*Fakultní nemocnice Hradec Králové*, 2020).

Navzdory regulacím daných CITES i zákazu odchytu a zabíjení mnoha druhů zahrnutých v TCM, černý obchod s nelegálně získanými živočišnými produkty jen vzkvétá. Momentálně je, hned po nelegálním obchodování s drogami, zbraněmi a lidmi, čtvrtým nejlukrativnějším celosvětovým zločinem. Roční zisk tohoto obchodu se pohybuje mezi 7 až 23 miliardami dolarů (Lehmacher, 2016; *TRAFFIC*, 2020). Není asi překvapením, že primárním hybatelem nelegálního obchodu s volně žijícími druhy je právě tradiční čínská medicína. Díky podpoře TCM BRI a uznáním tradiční medicíny Světovou zdravotnickou organizací (World Health Organization, WHO) lze očekávat další nárůst zájmu o čínskou medicínu během této dekády, který u mnoha druhů povede až na hranici vyhubení (Munton-Baker, 2019).

3.1 Nebezpečí spojené s užíváním přípravků TCM

Tradiční čínská medicína je kvůli svému přírodnímu původu často vnímána jako bezpečná alternativa bez vedlejších účinků. Existuje však nespočet studií na výskyt nebezpečných látek i přímo zaznamenaných případů vedlejších účinků TCM. Mezi nežádoucí příměsi v TCM patří toxické druhy rostlin (Cosyns *et al.*, 1999), těžké kovy (Cooper *et al.*, 2007), syntetická léčiva (Ching *et al.*, 2018), pesticidy (Harris *et al.*, 2011) nebo mykotoxiny (Zhao *et al.*, 2016). S konzumací produktů vyrobených z volně žijících živočichů také hrozí přenos zoonóz na člověka (Smith *et al.*, 2012).

Neúmyslná záměna bylin rodu *Stephania* za *Aristolochia* v přípravcích na hubnutí vedla mezi lety 1990 až 1992 k selhání ledvin a rakovině močových cest u více než 100 žen v Belgii, z nichž třetina musela podstoupit transplantaci ledvin. Důvodem nefrotoxicity a karcinogenity přípravků byla přítomnost kyseliny aristolochové (z rostlin *Aristolochia*), která tvoří adukty s DNA (Cosyns *et al.*, 1999).

Zvýšený obsah toxických těžkých kovů bylinné TCM nemusí být jen důsledek znečištěné půdy, ale i úmyslného přidání sloučenin těžkých kovů jako je realgar (As₄S₄) nebo sulfid rtuťnatý (HgS) do určitých přípravků podle čínského lékopisu (Rai *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2007). Příkladem úmyslné kontaminace je falšování přípravků Cordyceps. Cordyceps patří mezi nejdražší a nejjazácnější TCM, jedná se o larvy napadené houbou, využívané zejména k prevenci proti onemocnění. Za účelem zvýšení váhy a tím vyššího výdělku, jsou do Cordyceps vkládány olověné drátky, které mohou být následně rozemlety při zpracovávání do finální podoby (Wu *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2015).

Falšování TCM léky na předpis, jejich analogy nebo zakázanými léčivy pod záminkou zvýšení účinnosti nebo zamaskování nežádoucích účinků jiných příměsí je poměrně běžnou praxí. Mezi nejčastěji detekovanými substancemi v retrospektivní studii TCM byly nesteroidní protizánětlivá léčiva, anorektika, kortikosteroidy, diuretika a projímadla, antidiabetika a léky na erektilní dysfunkci. Nevědomá konzumace léků však může vést k vedlejším až toxickým účinkům s fatálními následky. Při současném užívání léků západní medicíny hrozí též riziko předávkování (Ching *et al.*, 2018).

Současné propuknutí pandemie nového koronaviru SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) s Wuhanským trhem jako možným epicentrem nákazy, názorně demonstruje nebezpečí spojené s konzumací volně žijících živočichů. Wassenaar & Zou (2020) navrhli na základě podobnosti nukleotidových sekvencí koronavirů u netopýrů s SARS-CoV-2, že pravděpodobným původcem nákazy je druh *Rhinolophus sinicus*. Trus tohoto netopýra je přitom surovinou pro výrobu TCM. Je tedy možné, že zdrojem nákazy byla TCM připravená z infikovaných netopýrů. Tento návrh podporuje také fakt, že první pacient se symptomy SARS-CoV-2 neměl vazby k Wuhanskému tržišti (Huang *et al.*, 2020).

Aby se zamezilo opakování podobných případů, je zapotřebí vytvořit sofistikované kontroly kvality a bezpečnosti. Ačkoliv Čína, jako největší výrobce TCM, zpřísnila kontroly kvality, a to zejména na obsah zbytků pesticidů, těžkých kovů a mikroorganismů, stále existuje velká mezera mezi čínskými a mezinárodními standardy (Chan *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2018).

3.2 Obchod s TCM s obsahem CITES organismů

Mezinárodní úmluva CITES chrání nespočet druhů používaných v čínské medicíně. Zakazuje komerční obchod s druhy zahrnutými do přílohy I a zároveň reguluje obchod s těmi v přílohách II a III. S veškerým zbožím deklarujícím obsah jakéhokoliv CITES organismu, by podle úmluvy mělo být zacházeno jako s jeho skutečným obsahem, i přestože tomu tak nemusí být. Přípravky s obsahem CITES I organismů jsou stále k sehnání v obchodech po celém světě a to i navzdory tomu, že je tato činnost nelegální (Cameron *et al.*, 2004).

Mnoho zemí se rozhodlo omezit obchod s ohroženými druhy i na vnitrostátní úrovni, čímž zajistily sekundární kontrolu při selhání kontrol dovozních. Kvůli obavám z ohrožení volně žijících populací tygrů a nosorožců vydala v roce 1993 Čínská lidová republika zákon zakazující vnitrostátní obchodování s tygřími kostmi a nosorožčími rohy a jejich deriváty. Zároveň byly tyto suroviny odstraněny ze seznamu léčebných přípravků oficiálního čínského lékopisu. Podobné nařízení přijalo i Japonsko, Taiwan a USA. O krok dál šli ve Velké Británii a EU, kde je povolen prodej TCM pouze rostlinného původu (Still, 2003; Cameron *et al.*, 2004).

3.2.1 Identifikace CITES organismů v TCM

Více než dvanáct tisíc druhů rostlin, živočichů a minerálů tvoří základ nejen léků na předpis, ale i patentní medicíny (Liu *et al.*, 2016). Surovinami na předpis jsou části rostlin nebo živočichů, které mohou být přímo konzumovány po úpravě vařením, sušením nebo drcením (Cameron *et al.*, 2004). K docílení lepších účinků předepisují často TCM léčitelé surové složky v různé kombinaci šité přímo na míru konkrétnímu pacientovi (*TCM World*, 2020). Patentní medicína představuje TCM zpracovanou již do finální užívací podoby pilulek, tablet, kapslí, prášku, náplastí nebo tinktur

balených v krabičkách pro vnitrostátní a celosvětovou distribuci (Koh & Woo, 2000; Cameron *et al.*, 2004).

Druhá identifikace tak rozmanitého materiálu se stává nesmírně obtížnou a často vyžaduje posudek odborníka. Původ většiny surovin bývá určen na základě označení pytlů, krabic či nádob určených k převozu nebo dlouhodobému uchování. V případě patentní medicíny pak na základě obsahu ingrediencí na baleních. Tato označení jsou často v čínských znacích, proto je alespoň jejich základní znalost pro výkonné orgány nezbytná. Pokud suroviny nenesou viditelné označení, ale existuje podezření na jejich přítomnost nebo původ, je třeba přizvat odborníky z řad botaniků a zoologů k detailnější identifikaci. Padělání nejcennějších a špatně dostupných surovin TCM zůstává poměrně častou praktikou. Pro důkazní účely, zabavení a případné stíhání musí být potvrzena přesná druhová identita předložené suroviny nebo produktu v závislosti na vnitrostátních předpisech. Jedinou možností, jak získat naprostou jistotu o původu daného exempláře, je tak získání znaleckých posudků od forenzních specialistů (Cameron *et al.*, 2004).

3.2.1.1 Identifikace surové a patentní TCM

Obecně je identifikace surovin živočišného původu v nezpracované podobě jednodušší než v případě rostlin. Nosorožčí rohy, tygří kosti, želví krunýře nebo medvědí žlučníky lze určit na základě morfologických znaků typických pro daný druh. V případě jejich zpracování do podoby prášku nebo hoblin je však taková identifikace nemožná a je nutné přistoupit k forenzním metodám analýzy.

Z bylin se nejčastěji obchoduje se sušenými stonky, listy, kořeny, nebo plody v různé fázi zpracování. Zdánlivě tak i zcela nepříbuzné druhy mohou vypadat nerozeznatelně a je proto důležité k přesné identifikaci využít moderních analytických metod.

Patentní TCM bývá často směsí vysoce zpracovaných rostlinných a živočišných druhů, jejichž identitu je tak ztrátou morfologických znaků nemožné určit. DNA metody se stávají často jediným způsobem identifikace takto degradovaného materiálu (Cameron *et al.*, 2004).

3.2.2 Nejčastější záchyty ve světě a v ČR

3.2.2.1 Zvířata

Tygr – *Panthera tigris* – Hu Gu (CITES I/A)

Tygři patří mezi ohrožené endemické kočkovité šelmy Asie. Ve volné přírodě se vyskytuje celkem 6 poddruhů z původních devíti. Aktuálně čítají dohromady asi 3 tisíce jedinců ze 100 000 na počátku dvacátého století. Tento rapidní propad početnosti je způsoben zejména masovým vybíjením v minulosti, ztrátou přírodních stanovišť a pytláčením (Morell, 2007; Moyle, 2008). Mezi nejcennější části tygra patří podle TCM kosti tradičně užívané k léčbě revmatismu a dalších nemocí spojených s pohybovým aparátem. Kostí se nejčastěji používají ve formě náplastí nebo tygřího vína, připravovaného louhováním tygří kostry v rýžovém víně. Jako náhrada za tygří se v tradiční medicíně

používají kosti levhartí, údajně však mají nižší účinnost. Levhart (*Panthera pardus*) je, stejně jako tygr, zařazen v příloze I CITES, obchod s ním je tedy na mezinárodní úrovni zakázán (Gratwicke *et al.*, 2008; Moyle, 2008).

Nosorožci – Rhinocerotidae – Xi Niu Jiao (CITES I,II/A,B)

Na světě žije celkem pět druhů nosorožců, dva v Africe a tři v Asii. Všichni tvoří součást přílohy I CITES s výjimkou populací Svazilska a Jihoafrické republiky, kde se řadí do přílohy II CITES k umožnění mezinárodního obchodu s loveckými trofejemi (*Checklist of CITES species*, 2020). Nosorožci jsou zabíjeni především pro své rohy, které jsou v zemích Asie vnímány jako symbol bohatství a zdraví. Nosorožčí roh tvoří součást TCM více než 2000 let. Konzumace odvarů z rozemletých rohů slouží k léčbě horečky, dny, revmatismu nebo rakoviny. Stav populací asijských druhů nosorožců je kvůli vysoké poptávce kritický. Z tohoto důvodu je dnes trh zásoben rohy z Afriky, zejména pak z JAR, která je domovem naprosté většiny nosorožců (*Save the Rhino International*, 2020).

Medvědi – Ursidae – Xiong Dan (CITES I,II/A,B)

Nejcennější částí medvěda v TCM je žlučník a sušená žluč získávaná především z medvěda tibetského a ušatého, v poslední době i z ostatních druhů čeledi Ursidae. Všech osm druhů z celkem pěti rodů medvědů je zahrnuto v přílohách CITES (Feng *et al.*, 2009). Tradičně se medvědí žluč a žlučník užívají k detoxikaci, zlepšení zraku a zmírnění křečí. Podávají se ve formě prášku, tablet nebo kapslí.



Obr. 1 TCM deklarující obsah medvědí žluče

K omezení pytláčení a nasycení trhu s produkty z jejich těl se v Číně od roku 1980 provozuje farmový chov medvědů, spočívající v odebrání žluči ze živých zvířat. Více než 7 000 medvědů je drženo v malých klecích s trvale katetrizovaným žlučníkem pod značnými dávkami antibiotik a sedativ. Možnou alternativu bez týrání a ohrožování na přežití představuje synteticky připravená kyselina ursodeoxycholová, aktivní složka medvědí žluči s prokázanými léčebnými účinky na některá onemocnění jater a žlučových kamenů (Feng *et al.*, 2009; *The Journal of Chinese Medicine & TCM*, 2020).

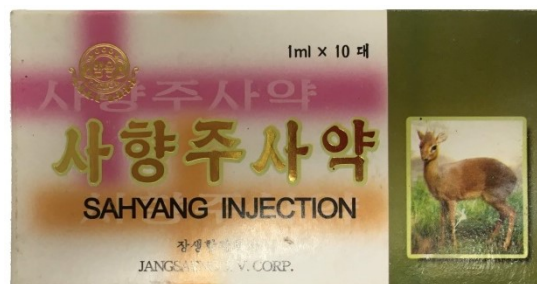
Luskouni – *Pholidota* – Chuan Shan Jia (CITES I/A)

Luskouni jsou šupinatá zvířata živící se zejména mravenci a termity. Všech osm druhů luskounů, zahrnující 4 druhy z Afriky a 4 z Asie, chrání úmluva CITES (*Checklist of CITES species*, 2020). I přes zákaz obchodu s těmito zvířaty, jen za poslední desetiletí z volné přírody zmizelo více než milion luskounů a stali se tak vůbec nejobchodovanějšími volně žijícími savci na světě (Gaubert *et al.*, 2018). Jsou loveni zejména pro maso a šupiny využívané v TCM. Šupiny údajně

podporují krevní oběh a laktaci, používají se také k léčbě otoků a zánětů. Maso luskounů představuje v čínské kultuře symbol luxusu a poukazuje na sociální statut dané osoby (Xu *et al.*, 2016).

Kabaři – *Moschus* – She Xiang (CITES I,II/A,B)

Tito drobní jeleni s výrazně dlouhými špičáky rodu *Moschus* se stali součástí úmluvy CITES v důsledku úbytku jejich populací vlivem odlesňování a zvýšené poptávce po mošusu čínskou medicínou. Mošus, výměšek pižmových žláz samců kabarů, se přidává do více než 300 produktů TCM. Typicky se prodává ve formě olejů, sprejů, prášku, pilulek nebo



Obr. 2 TCM deklarující obsah mošusu

náplastí k podpoře krevního oběhu, léčbě otoků a jako afrodisiakum nebo sedativum (Ng & Burgess, 2004; *The Journal of Chinese Medicine & TCM*, 2020). Jen v Číně je ročně k výrobě TCM spotřebováno přibližně 1000 kg mošusu, což představuje obsah žláz získaný z asi 100 000 jedinců. Farmové chovy kabarů poskytují jen 20 kg mošusu za rok, což ani zdaleka nepokrývá jeho poptávku (Meng *et al.*, 2012).

Sajga tatarská – *Saiga tatarica* – Ling Yang Jiao (CITES II/B)

Sajga je kriticky ohroženou antilopou stepí a polopouští jihovýchodní Evropy a centrální Asie. Rohy sajk jsou nejcennější částí antilop v TCM. Prodávají se celé, jako hoblíny nebo prášek. V moderní podobě poté jako pilulky či populární tzv. cooling water



Obr. 3 TCM deklarující obsah rohu antilopy *Saiga tatarica*

k léčbě horečky, bolesti v krku, kašle nebo chřipky. V 90. letech utrpěl tento druh náhlý pokles populací, přičemž více než 95 % jedinců zmizelo z přírody vlivem pytláčení a lovu pro maso. Hlavními důvody tohoto masového vybití sajk byly kolaps regulací kontrolovaného lovu a rostoucí chudoba na venkově po rozpadu Sovětského svazu (Chen *et al.*, 2015; Doughty *et al.*, 2019). Populace sajk se v nedávné době potýkala také s bakteriální nákazou, na jejíž následky zemřelo více než 200 tisíc jedinců představující až 62 % jejich světové populace (Kock *et al.*, 2018; *Checklist of CITES species*, 2020; *IUCN Red List of Threatened Species*, 2020).

Mořští koníci – *Hippocampus* – Hai Ma (CITES II/B)

Zařazení celého rodu *Hippocampus* do přílohy CITES bylo reakcí na nadměrný rybolov ohrožující tyto ryby na přežití. Více než 20 milionů jedinců se každoročně prodá na celosvětovém trhu. Koníci jsou prodáváni jako akvarijní ryby, nebo sušení ke konzumaci v čínské medicíně. Kromě tradičního využití k léčbě erektilních dysfunkcí, mají některé látky v nich obsažené prokázané protinádorové

vlastnosti, zpomalují stárnutí a dovedou potlačit zánět nervové tkáně (Chang *et al.*, 2013; *Checklist of CITES species*, 2020).

Gekon obrovský – *Gekko gecko* – Ge Jie (CITES II/B)

Jeho domovem jsou tropické regiony jižní Číny a jihovýchodní Asie. Pro účely TCM jsou jedinci vykucháni, nataženi a sušeni, nebo jsou macerováni v rýžovém víně a následně konzumováni. Využívají se zejména v Číně a Vietnamu, a to k léčbě diabetes, astmatu nebo rakoviny (Bauer, 2009; Gu *et al.*, 2011; *Checklist of CITES species*, 2020).

Krajty – *Python sebae*, *Python molurus* (CITES II/B)

Krajtí tuk se získává především z volně žijících krajt druhů *Python sebae* a *Python molurus*. Olej zlatožluté barvy se tradičně používá k léčbě revmatismu, keloidů a zlomenin (Ugwudike *et al.*, 2013).



Obr. 4 TCM deklarující obsah krajtího tuku

3.2.2.2 Rostliny

Dendrobium officinale – Shi Hu (CITES II/B)

Tato kriticky ohrožená bylina patří do čeledi Orchidaceae obsahující více než 1500 druhů často komerčně pěstovaných, ale i využívaných v TCM. Sušené nebo čerstvé stonky Shi Hu se považují za výborný lék při onemocnění ledvin, plic a žaludku jako je horečka, diabetes nebo gastritida. Alkaloidy obsažené v těchto orchidejích mají slabé antipyretické a analgetické účinky, podporují imunitu, snižují oxidativní stres a mají protirakovinnou aktivitu (Bulpitt *et al.*, 2007; Lehr & Jaramillo, 2017; Cheng *et al.*, 2019).

Saussurea costus – Mu Xiang (CITES I/A)

Saussurea costus je kriticky ohroženou endemickou bylinou Himaláji. Její sušený kořen tvoří od nepaměti součást nejen čínské medicíny ale i indické ayurvedy pro své antiseptické účinky a léčbu astmatu. Olej z kořene je údajně efektivní k léčbě lepry a pro své aroma se přidává do parfémů. *Saussurea* bývá často nahrazována nechráněnými morfologicky podobnými rostlinami *Vladimiria souliei*, *Aristolochia contorta*



Obr. 5 TCM deklarující obsah bylin *Saussurea*

a *Aristolochia debilis* s obsahem karcinogenních aristocholových kyselin (Pandey, Rastogi & Rawat, 2007; Shum *et al.*, 2007; *TRAFFIC India*, 2011).

Aquilaria – Chen Xiang (CITES II/B)

Aquilaria je jedním ze dvou rodů stromů produkujících agarové dřevo, jednu z nejvíce ceněných přírodních látek. Agarové dřevo vzniká po napadení stromu hmyzem, bakteriemi nebo houbami,

příčemž obraná pryskyřice se vpíjí do dřeva, které se následně zpracovává do různých forem. Používá se jako kadidlo, esenciální olej, přísada do parfémů a v tradiční medicíně. Chen Xiang je tradičně používán k úlevě od žaludečních potíží, kašle, revmatismu, bolesti a vysoké horečky. Má také prokázané antibakteriální, protirakovinné a sedativní účinky. Dnes jsou stromy *Aquilaria* pěstovány na plantážích a tvorba „agarwood“ se v nich uměle vyvolává (Lehr & Jaramillo, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Gastrodia elata – Tian Ma (CITES II/B)

Je saprofytickou vytrvalou bylinou čeledi Orchidaceae. Hlízky těchto orchidejí údajně léčí nemoci způsobující vysoký krevní tlak, závratě, křeče a mrtvici. Gastrodin představuje hlavní aktivní látku obsaženou v Tian Ma s experimentálně prokázanými účinky na léčbu epilepsie a stavů deliria. Komerční pěstování této byliny bylo započato již v roce 1970 v Číně (Bulpitt *et al.*, 2007; Lehr & Jaramillo, 2017).

Cistanche deserticola – Rou Cong Rong (CITES II/B)

Cistanche je rod parazitických rostlin vyskytujících se na suchých stanovištích a pouštích severní polokoule. V tradiční čínské medicíně se používají suché stonky těchto sukulentních rostlin na chronická onemocnění ledvin, impotenci, ženskou neplodnost nebo zácpu. Aktivní látky obsažené v těchto rostlinách mají prokázané neuroprotektivní a paměť zlepšující účinky. Posilují imunitu a díky fytoestrogenní aktivitě napomáhají k předcházení osteoporózy (Wang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016).



Obr. 6 TCM deklarující obsah bylin *Cistanche*

4 Metody laboratorního průkazu přítomnosti biologického materiálu CITES organismů

4.1 Makroskopické a mikroskopické metody

Druhová identifikace organismů pomocí charakteristických morfologických a mikroskopických znaků je tradiční a stále používanou metodou (Zhao *et al.*, 2005, 2017). Například Liu *et al.* (2011) představil snadnou metodu autentifikace surové medicíny *Cordyceps sinensis* od 5 nejčastějších padělků podle typického tvaru těla larvy, stroma a některých mikroskopických vlastností. Blízce příbuzné druhy rostlin jsou často rozeznávány podle délky stonku, listů, počtu internodií stonku a jejich délky a průměru (Joshi & Khan, 2005; Zhao *et al.*, 2017). Běžněji se však využívá mikroskopie anatomických znaků jako je počet vrstev felému, tvar škrobových zrn, počet a lignifikace cévních svazků, přítomnost nebo absence křemičitých vrstev, kamenných buněk nebo krystalů oxalátů (Liang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017). Mikroskopické techniky nabízejí jednoduchou, rychlou a především cenově dostupnou metodu identifikace rostlinného a živočišného materiálu v TCM (Yu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015). Tyto metody jsou ale neaplikovatelné na patentní medicínu, kde jsou různé směsi surovin rozemlety na prášek a pozbývají tak většiny charakteristických rysů (Xu *et al.*, 2015). Zároveň přesnost určení těmito metodami primárně závisí na znalostech a zkušenostech odborníka (Han *et al.*, 2016).

4.2 Proteomika

Proteomické identifikační přístupy založené na druhově specifických peptidech a protilátkách se využívají zejména při kontrolách kvality potravin a TCM (Lum *et al.*, 2002; Sentandreu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2017). Mohou však sloužit i k určení druhů s nedostatkem referenčních sekvencí v DNA databázích (López *et al.*, 2002). K nalezení peptidových markerů je třeba veškeré extrahované a redukované proteiny z tkáně podrobit digesci trypsinem. Vzniklé krátké peptidy jsou analyzovány pomocí chromatografických technik a metod hmotnostní spektrometrie a následně vyhodnocovány dostatečně specifické peptidy srovnáním jejich aminokyselinových sekvencí s databází. Ačkoliv tato metoda vykazuje vysokou citlivost a spolehlivost i při stopovém množství vzorku, díky značné homologii sekvencí proteinů mezi druhy může být objevení takového peptidu značně problematické (Sentandreu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2017).

K vytvoření protilátek schopných odlišit druhy od sebe je zapotřebí nalézt druhově specifický antigen, nejčastěji protein. To se provádí srovnáním distribuce proteinů mezi různými druhy daného taxonu z map dvoudimenzionální elektroforézy. Takový antigen pak lze použít k vytvoření ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) testu, který tak značně urychlí proces identifikace (Lum *et al.*, 2002). Protilátky a antigeny jsou však, stejně jako většina proteinů, jen omezené stability. Navíc

je jejich výroba nákladná, obvykle nejsou dostatečně specifické a u blízce příbuzných druhů často dochází ke křížovým reakcím (Parson *et al.*, 2000).

4.3 Chemická analýza

Analýza profilů chemického složení bylin TCM se aplikuje zejména při kontrolách kvality. Ty zahrnují odlišení bylin od blízce příbuzných náhražek, detekci jedovatých druhů nebo odlišení kultivovaných jedinců od chráněných planě rostoucích (Schaneberg & Khan, 2004; Chen *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2017). K současnému určení mnoha složek zároveň se používají chromatografické metody HPLC, GC, CE a HPTLC (Xie *et al.*, 2006). HPLC přitom patří mezi vůbec nejčastěji využívanou techniku chemického profilování mnohdy ve spojení s dalšími technikami umožňujícími strukturální objasnění přítomných látek (Wang *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2017). Druhy jsou od sebe odlišeny na základě charakteristických píků ve srovnávaných chromatogramech. Ačkoliv se identifikace pomocí HPLC ukázala jako vysoce efektivní a robustní metodou, největší překážkou její standardizace pro forenzní účely je nestálé fytochemické složení rostlin. Obsah fytochemických látek závisí nejen na podmínkách pěstování, stáří rostliny, době sběru a podmínkách skladování, ale liší se i v rámci jednotlivých částí rostlin (Lazarowych & Pecos, 1998; Kindlovits *et al.*, 2014; Kang & Kim, 2016; Hend, Ibrahim & Mohamed, 2018). Je proto lepší tyto metody kombinovat například s DNA barcodingem (Palhares *et al.*, 2015).

4.4 DNA analýza

4.4.1 Metody izolace DNA z forenzních vzorků

Izolace DNA v dostatečném množství a kvalitě, bez přítomnosti inhibitorů PCR a s minimální šancí kontaminace z okolí je stěžejním bodem pro její další analýzu (Yang *et al.*, 1998).

Fenol-chloroformová extrakce DNA ve spojení s předchozí digescí buněčného obsahu proteinázou K patří mezi tradiční a stále často používané metody izolace (Lee *et al.*, 2010). Její princip je založen na rozdílné rozpustnosti DNA a ostatních složek buněk mezi více nepolární směsí fenol-chloroform a polárním vodním prostředím. Tato metoda je však poměrně časově náročná. Zahrnuje použití zdraví škodlivých látek a není proveditelná v jedné mikrozkušence, což zvyšuje možnost kontaminace z okolí (Hoff-Olsen *et al.*, 1999). Mezi další aplikované techniky patří Chelex a izolace založené na silice. Chelex se skládá z kopolymerů styrenu divinylbenzenu s navázanými ionty schopnými chelatace polyvalentních iontů. Odstraněním iontů ze směsi tak zabraňuje degradaci DNA při vysokých teplotách používaných při izolaci (Boom *et al.*, 1990; Walsh, Metzger & Higuchi, 1991). Obecně extrakční metody založené na silice využívají vlastnosti silika částic specificky vázat molekuly DNA v přítomnosti vysokých koncentrací chaotropních molekul. Extrakce DNA je po promytí možná elučními roztoky (Boom *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2010).

4.4.2 Klasifikace původu vzorku

Před samotným výběrem vhodné DNA identifikační metody je nezbytné nejprve zjistit původ neznámého vzorku. Triplex PCR test představuje rychlou klasifikační metodu, která využívá celkem tři páry primerů. Dva z nich jsou specifické pro sekvence genů (COI živočichů a rbcL rostlin) a jeden slouží k detekci PCR inhibitorů. Vizualizací PCR produktů na gelu je tak možné detekovat přítomnost rostlinného, nebo/a živočišného materiálu a PCR inhibitorů na základě rozdílných délek amplifikovaných úseků (Sasková, Votrubová & Vaněk, 2017).

4.4.3 Polymorfismy využívané ve forenzním vyšetřování

4.4.3.1 Repetitivní sekvence

Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) a Short Tandem Repeat (STR) se řadí mezi repetitivní sekvence nacházející se napříč celým eukaryotním genomem. VNTR nebo také minisatelity, představují tandemově se opakující krátké úseky DNA o 11–60 bp dosahující celkové délky až několika kilobází (Jeffreys, Wilson & Thein, 1985; Nakamura *et al.*, 1987). Naproti tomu délka STR repeticí, či mikrosatelitů, se pohybuje jen okolo 2–4 bp a obvykle není delší než 100 bp (Tautz & Renz, 1984; Edwards *et al.*, 1991). Variabilita v délce těchto sekvencí tak odráží různý počet opakování krátkých repeticí v nich. Což může být způsobeno sklouznutím DNA polymerázy během replikace nebo chybami při rekombinaci (Jeffreys, Wilson & Thein, 1985; Nakamura *et al.*, 1987). Minisatelity byly prvním navrženým genetickým markerem pro DNA fingerprinting k individuální

identifikaci osob ve forenzním vyšetřování (Gill, Jeffreys & Werrett, 1985; Jeffreys, Wilson & Thein, 1985). V současné době je k individuální identifikaci lidí i zvířat upřednostňováno STR profilování kvůli jeho vyšší variabilitě a kratší délce usnadňující jeho amplifikaci (Edwards *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 2005; Zahra *et al.*, 2018).

4.4.3.2 Jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

SNP představuje záměnu jednoho nukleotidu na konkrétním místě genomu, která následně vede k polymorfismu mezi jedinci. Tyto substituce jsou transverze, při nichž dochází k záměně pyrimidinu za purin (či naopak). Nebo v častějších případech tranzice představující substituci pyrimidinu za pyrimidin a purinu za purin. Substituce patří k vůbec nejčastějším změnám nukleotidových sekvencí u člověka (Wolfe, Li & Sharp, 1987). Jedná se přitom o bialelické záměny, tedy pouze 2 ze 4 nukleotidů mohou být nalezeny v této pozici. Naprostá většina SNP se nachází v nekódujících oblastech. Ty, jež jsou lokalizovány v kódujících a regulačních oblastech, mohou způsobit změny aminokyselinového složení proteinů nebo ovlivnit expresi a translaci genových produktů (French *et al.*, 2002; Mooney, 2005).

4.4.3.3 Inzerce a delece (In/Dels)

Jedná se o mutační události, při nichž dochází k inzerci nebo deleci jednoho nebo více nukleotidů v sekvenci DNA. Indely jsou asi 10krát méně časté než substituce. Zároveň zpětná mutace u nich není obvyklá, což vede k jejich značné stabilitě v rámci genomu (Saitou & Ueda, 1994; Carneiro, Pereira & Amorim, 2012).

4.4.3.4 Sekvenční polymorfismus

Ve forenzní analýze živočišných a rostlinných vzorků se obvykle využívá sekvenčního polymorfismu lokusů mtDNA a cpDNA. V případě mtDNA je tento typ polymorfismu způsoben mnohem vyšší mutační rychlostí v důsledku nedostatečného opravného systému mtDNA, který tak vede k rychlé akumulaci substitucí a indelů nukleotidů ve srovnání s jaderným genomem (Brown, George & Wilson, 1979; Tzen, Wu & Liu, 2001; Liu *et al.*, 2019). Ačkoliv cpDNA nevykazuje vyšší substituční rychlost než jaderná DNA rostlin, je často využíváno právě této konzervovanosti lokusů. Tyto vlastnosti společně s vysokým počtem kopií na buňku dělají z mtDNA i cpDNA optimální nástroj k identifikačním účelům (Wolfe, Li & Sharp, 1987; Hsieh *et al.*, 2003; Fazekas *et al.*, 2008).

Mitochondriální DNA

Mitochondriální genom je u vyšších živočichů cirkulární dvouvláknou molekulou DNA. U člověka o celkové délce 16 569 bp. Skládá se z těžkého (H-strand) a lehkého (L-strand) řetězce DNA, které se liší obsahem purinů, respektive pyrimidinů. Kóduje celkem 37 genů, z toho 13 proteinů oxidativního řetězce, 22 tRNA, 12S rRNA a 16S rRNA. L-strand je kódujícím řetězcem pro všechny rRNA, většinu tRNA a proteinů, které jsou přepisovány z H řetězce. Mitochondriální genom vykazuje až extrémní

úspornost vzhledem k obsahu nekódujících sekvencí. Ty byly nalezeny pouze v oblasti D-loop, kde se mimo jiné nachází také replikační počátek H řetězce. Replikační počátek lehkého řetězce se nachází asi dvě třetiny od počátku syntézy těžkého řetězce (Anderson *et al.*, 1981). Mitochondriální genom se v rámci jedné mitochondrie vyskytuje průměrně ve 4–5 kopiích. Počet mitochondrií na jednu buňku může převyšovat stovky, tedy průměrná buňka obsahuje asi 500 kopií mtDNA (Sato a Kuroiwa, 1991). Mitochondrie se i s celou svou genetickou výbavou dědí striktně maternálně. Tím se liší od jaderné DNA, která je kombinací genomů od obou rodičů a s každou novou generací podléhá rekombinaci (Giles *et al.*, 1980).

Chloroplastová DNA

Genom chloroplastu vyšších rostlin tvoří kružnicová molekula o velikosti 120–160 kbp obsahující obvykle dvě rozsáhlé invertní repetice (inverted repeats, IR) o délce zhruba 22 kbp. Repetice IRA a IRB jsou od sebe odděleny oblastmi tzv. small single-copy region (SSC) a large single-copy region (LSC). Chloroplastová DNA kóduje přibližně 100 genů zahrnující chloroplastové rRNA geny a tRNA geny a dále pak geny kódující proteiny. Některé z chloroplastových genů obsahují introny, podobně jako je tomu v jaderných eukaryotních genomech. Genom chloroplastu je děděn až na výjimky striktně maternálně (Shinozaki *et al.*, 1986; Maier *et al.*, 1995).

4.4.4 DNA hybridizační metody

4.4.4.1 RFLP – Restriction fragment length polymorphisms

Restrikční endonukleázy katalyzují štěpení dvoušroubovice DNA na rozpoznávacích palindromických sekvencích, nejčastěji 4–6 bází dlouhých (Kelly & Smith, 1970; Nathans & Smith, 1975). Podstata metody RFLP spočívá v produkci fragmentů DNA různé délky. Rozdíly v délkách mezi dvěma jedinci mohou být způsobeny změnou jedné nebo více bází, které vedou k zániku nebo vzniku nové štěpné sekvence. Dále pak inzercí či delecí v úsecích DNA mezi rozpoznávacími místy. Sekvenční změny vedoucí k rozdílné délce fragmentů se projeví na odlišné mobilitě fragmentů při elektroforéze. Konkrétní sekvence jsou detekovány využitím metody Southern blot, jež spočívá v rozdělení fragmentů na gelu, přenesení DNA na nitrocelulózu a hybridizaci s radioaktivně značenými sekvenčně specifickými sondami (Botstein *et al.*, 1980). Tato metoda je schopná generovat fragmenty téměř z každé genomické DNA, vzniklé fragmenty však vypovídají pouze o pozici štěpných míst. Druhy s krátkou evoluční vzdáleností nemusejí být odlišeny na základě fragmentů, i přesto že mají odlišné sekvence DNA. Potřeba velkého počátečního množství nedegradované DNA a pracná hybridizace patří mezi další nevýhody RLFP (Michaels & Amasino, 1998; Zehner, Zimmermann & Mebs, 1998).

4.4.4.2 DNA Microarrays (DNA Chip)

Princip DNA mikročipů spočívá v hybridizaci molekul DNA značených fluorescenční značkou a oligonukleotidy ukotvenými na čipu s následnou detekcí emitovaného fluorescenčního signálu (Fodor *et al.*, 1991; Pease *et al.*, 1994). Tisíce odlišných krátkých molekul DNA o známé sekvenci jsou natištěny na přesně definované místo skleněné destičky. Na tu je poté nanesen náš vzorek DNA značený jednou či více fluorescenčními sondami. Síla vazby mezi DNA a oligonukleotidy se projeví na intenzitě fluorescence snímané laserovými skenery (Pease *et al.*, 1994; Shalon, Smith & Brown, 1996; Zhu, Fushimi & Komatsu, 2008). Multilokusový záběr této techniky umožňuje studovat expresi, polymorfismus nebo sekvenci až tisíce genů najednou (Pease *et al.*, 1994; Schena *et al.*, 1995; Lipshutz *et al.*, 1999).

Tuto metodu lze aplikovat také k autentifikaci, nebo identifikaci zejména rostlinných druhů využitím druhově specifických DNA sekvencí (Zhu, Fushimi & Komatsu, 2008). Analýza vzorků pomocí DNA čipů představuje levný, rychlý a vysoce výkonný nástroj, umožňující současnou identifikaci více druhů najednou s možným použitím při kontrolách kvality a bezpečnosti léčebných přípravků (Carles *et al.*, 2005).

4.4.5 PCR metody

PCR (Polymerase Chain Reaction) slouží k enzymatickému namnožení specifického úseku DNA. Vybraný úsek DNA musí být ohraničen primery, krátkými jednovláknými oligonukleotidy

hybridizujícími s komplementárními úseky na templátové DNA. Templátová DNA s navázanými primery slouží jako substrát pro DNA polymerázu katalyzující syntézu odpovídajících bází uvnitř primery ohraničeného úseku. Pro provedení je nezbytné mít alespoň malé množství DNA a znát dvě ohraničující sekvence našeho úseku zájmu pro syntézu primerů. PCR stojí na třech periodicky se opakujících cyklech zahrnujících denaturaci, hybridizaci (annealing) a extenzi (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987). Každý nový cyklus začíná denaturací, rozvolněním vláken DNA probíhající typicky při teplotách 92–96 °C. Při snížení teploty cca na 55–60 °C nasedají primery na komplementární sekvence templátové DNA a při opětovném zvýšení teploty na 72 °C nastává elongace primerů, dosyntetizování chybějícího úseku DNA polymerázou (Mullis & Faloona, 1987; Arnheim & Erlich, 1992). Pravidelným opakováním těchto tří kroků dochází k exponenciálnímu namnožení daného úseku DNA (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987). Tepelná stabilita Taq polymerázy napomohla plné automatizaci PCR použitím specializovaných přístrojů pro cyklické zahřívání a chlazení – thermo cyclerů (Saiki *et al.*, 1988; Arnheim & Erlich, 1992). Pro ověření kvantity i kvality amplifikace se využívá gelové elektroforézy a barvení interkalačními barvivy (Mullis & Faloona, 1987). Existuje nespočet identifikačních metod odvozených od PCR.

4.4.5.1 RFLP – PCR

RFLP ve spojení s předchozí amplifikací vybraných úseků DNA pomocí PCR, vyřešila problém s nutností až mikrogramových množství DNA u samotné RFLP (Uryu *et al.*, 1990; Michaels & Amasino, 1998). Hybridizace se značenými sondami již není nutná, rozdělené fragmenty mohou být vizualizovány přímo na gelu (Uryu *et al.*, 1990). RFLP-PCR se poměrně hojně používá k druhové identifikaci bylin v tradiční medicíně, například u rostlin *Dendrobium* (Peyachoknagul *et al.*, 2014), *Ephedra* (Guo *et al.*, 2006), nebo *Codonopsis* (Fu *et al.*, 1999).

4.4.5.2 RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA

Technika RAPD spočívá v amplifikaci genomické DNA použitím primerů náhodné sekvence. Primery s maximální délkou 10 nukleotidů v kombinaci s nízkou teplotou při nasedání dovolují hybridizaci s mnoha místy DNA a tím i syntézu fragmentů DNA různých délek. Produkty reakce jsou následně rozděleny elektroforézou na agarózovém gelu a barveny interkalačními barvivy. Rozdílné délky fragmentů mohou být způsobeny hned několika důvody: delecí v komplementární sekvenci k primeru, inzercí způsobující příliš velkou vzdálenost primerových míst vedoucí k selhání namnožení daného úseku, nebo inzercí, která mění velikost segmentu DNA, ale nebrání amplifikaci. Na základě délkových polymorfismů amplifikovaných segmentů je možné odlišit jednotlivé druhy (Williams *et al.*, 1990). RAPD patří mezi poměrně jednoduché a rychlé metody, bez potřeby předchozí znalosti sekvence DNA. Značným omezením v používání RAPD však zůstává její nízká reprodukovatelnost, která se ukázala silně závislou nejen na kvalitě DNA ve vzorku (Lee & Chang, 1994), ale i na značce Taq polymerázy či nastavení thermocycleru (Meunier & Grimont, 1993).

4.4.5.3 AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

AFLP byla zejména v minulosti poměrně často využívanou technikou DNA fingerprintingu čínských bylin a představuje kombinaci technik RFLP a PCR (Vos *et al.*, 1995; Ha *et al.*, 2002; Yuan & Hong, 2003). Sestává ze tří jednoduchých kroků: sestřihání DNA a ligace adaptérů, selektivní amplifikace restrikčních fragmentů a analýzy rozdělených fragmentů na gelu. Sestřihání genomické DNA se provádí pomocí dvou restrikčních endonukleáz. Vzniklé restrikční fragmenty jsou ligovány dohromady s dvouvláknovými adaptéry přes komplementární jednovlákný přesah restrikčních fragmentů a adaptérů. Adaptéry poskytují sekvenci pro hybridizaci komplementárních primerů, a tak lze vybrané úseky DNA o zcela neznámé sekvenci amplifikovat. Výsledné fragmenty s navázanými fluorescenčními značkami podléhají separaci na polyakrylamidovém gelu a následně vizualizaci (Vos *et al.*, 1995; Hartl & Seefelder, 1998). K provedení AFLP stejně jako u RAPD není třeba znát sekvenci DNA. AFLP se však liší od RAPD ve výrazně vyšší reprodukovatelnosti, spolehlivosti a přesnosti, díky přesně daným reakčním podmínkám (Vos *et al.*, 1995).

4.4.5.4 RT PCR – Real Time PCR

Tato časově nenáročná metoda umožňuje stanovení počátečního množství DNA před PCR i kvantifikaci DNA v průběhu procesu amplifikace měřením emise fluorescenčního záření (Higuchi *et al.*, 1992, 1993). K vizualizaci DNA se využívá nejčastěji fluorescenčních barviv nebo sekvenčně specifických sond. Síla fluorescenčního signálu roste úměrně s přibývajícím množstvím DNA v reakční směsi (Higuchi *et al.*, 1992; Heid *et al.*, 1996; Ririe, Rasmussen & Wittwer, 1997). RT PCR ve spojení s analýzou křivek tání DNA lze použít k detekci druhově specifických SNP. Mezi tyto metody patří HyBeacon a High Resolution Melting Analysis (HRMA) (Ririe, Rasmussen & Wittwer, 1997; French *et al.*, 2001; Wittwer *et al.*, 2003).

HyBeacon sondy, SNP specifické oligonukleotidy s navázaným fluoroforem, hybridizují s amplifikovanou DNA. Při hybridizaci sond dochází k emisi fluorescence, vyšší než v nevázaném stavu. Přítomnost SNP se prokazuje měřením bodů tání duplexů sonda-DNA, přičemž teplota tání sond hybridizovaných s plně komplementární sekvencí je mnohem vyšší (French *et al.*, 2001, 2002).

U HRMA krátké amplifikované úseky se SNP podléhají přímo analýze teplot tání využitím dsDNA specifických fluorescenčních barviv. PCR produkty stejné délky lze od sebe navzájem odlišit na základě tvaru křivek tání, který závisí nejen na poměru AT:GC, ale i distribuci GC párů v rámci zkoumané sekvence (Ririe, Rasmussen & Wittwer, 1997). Charakteristické profily teplot tání sledovaných úseků DNA jsou u obou technik získávány měřením úbytku fluorescence při denuraci duplexů (French *et al.*, 2001; Wittwer *et al.*, 2003). HyBeacon i HRMA jsou rychlé a levné identifikační metody proveditelné v jedné mikrozkušnici. HyBeacon a HRMA byly využity k identifikaci druhů a poddruhů rodu *Panthera*, nosorožců a luskounů nelegálně lovených a využívaných pro přípravu TCM (Buddhakosai *et al.*, 2014; George, Masters & Dawnay, 2019).

4.4.5.5 SPInDel – SPecies Identification by Insertions/Deletions

Metoda SPInDel využívá polymorfismu v délce genu pro rRNA k druhové identifikaci. V sekvenci genů kódujících rRNA v rámci různých druhů se střídají oblasti s nízkou nebo vůbec žádnou variabilitou. Jedná se o tzv. konzervované domény a hypervariabilní oblasti s vyšším výskytem inzercí a delecí, které umožňují diferenciaci na základě rozdílné délky sekvence. Jako primer vazebná místa jsou vybírány sekvence konzervovaných oblastí právě pro svůj mezidruhový sekvenčně neměnný charakter. Každý druh vytváří unikátní kombinaci délek hypervariabilních sekvencí, tzv. SPInDel profile, který lze v podobě různě dlouhých PCR produktů analyzovat gelovou či kapilární elektroforézou, hmotností spektrometrií nebo HPLC. Identifikace druhů probíhá srovnáním tzv. SPInDel numeric profile, který odkazuje na druhově jedinečnou kombinaci délek hypervariabilních oblastí, s referenční databází dostupnou v softwaru SPInDel workbench. SPInDel představuje časově nenáročnou a poměrně levnou metodu schopnou identifikace druhů i ve směsných, či degradovaných vzorcích (Pereira *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2017).

4.4.5.6 SNaPshot

SNaPshot slouží k detekci SNP a zahrnuje dva jednoduché kroky: amplifikaci vybraných úseků DNA a extenzi primeru. PCR produkty podstupují jednonukleotidovou extenzi neznačených primerů v přítomnosti čtyř ddNTP s navázanými fluorofory. SNP, které představuje zainkorporovaný nukleotid, následně podléhá analýze kapilární elektroforézou (Kuppuswamy *et al.*, 1991; Piggee *et al.*, 1997). Prodloužením primerů různě dlouhým poly(dT) ocasem připojeným k 5' konci lze testovat více SNP zároveň (Tully *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2009). Tato citlivá a vysoce specifická metoda se, díky krátké sekvenci používané k detekci polymorfismu, ukázala účinným prostředkem k druhové identifikaci degradované DNA ze stop krve, slonoviny a produktů slonoviny při vyšetřování případů pytláctví (Kitpipit *et al.*, 2017) a k identifikaci poddruhů tygra (Kitpipit *et al.*, 2012).

4.4.5.7 STR – Short Tandem Repeats, SSR – Simple Sequence Repeats

SSR jsou dalším označením pro mikrosatelity. K amplifikaci STR se využívá primerů ohraničujících tyto repetice. PCR produkty jsou následně rozděleny gelovou elektroforézou na základě odlišné délky způsobené různým počtem opakování krátkých sekvencí (Tautz & Renz, 1984; Weber & May, 1989). Analýzou polymorfismu mikrosatelitního lokusu Ple46 se povedlo identifikovat kočkovité šelmy žijící v Indii (Singh *et al.*, 2004).

4.4.5.8 Druhově specifická PCR

Technika druhově specifické PCR umožňuje přímou identifikaci druhu ve vzorku pozorováním amplifikovaných úseků mtDNA na gelu bez potřeby sekvenování a následné sekvenční analýzy. Druhově specifické primery jsou připravovány podle sekvence konzervovaných oblastí specifických pro daný druh. K nalezení takových úseků je nezbytné porovnat sekvence mezi různými druhy a jedinci téhož druhu. Úskalím této metody zůstává především množství testovatelných druhů. Není

možné navrhnout primery pro všechny druhy, které by měly být zahrnuty ve forenzním vyšetřování. Proto bývá analýza vzorků druhově specifickými primery prováděna jen v případech, kdy se přítomnost určitého druhu ve vzorku předpokládá a slouží tak pouze k potvrzení hypotézy (Wan & Fang, 2003; Imaizumi *et al.*, 2007). Mezi další nedostatky patří nemožnost rozlišit, zda neúspěšnost PCR byla způsobena inhibičním efektem, nebo nedostatkem počáteční DNA (Imaizumi *et al.*, 2007). Druhově specifické primery byly využity například k autentifikaci masa prodávávaného členem cirkusu na tržišti v Číně, u nějž bylo podezření, že pochází z tygra. Což bylo za využití této metody nakonec skutečně potvrzeno. Analýzou kontrolního úseku mtDNA z nalezeného chlupu se podařilo přiřadit identitu tygra k jedinci chovaném v cirkusu (Wan & Fang, 2003).

4.4.5.9 Délkový polymorfismus kontrolní oblasti mtDNA

Hojný výskyt indelů a různý počet opakování tandemových repetit v kontrolní oblasti (control region, CR) mtDNA vede ke značné variabilitě délky této sekvence mezi druhy (Saccone, Pesole & Sbisà, 1991; Fumagalli *et al.*, 1996). Pun *et al.* (2009) využil druhově specifického délkového polymorfismu CR k vytvoření identifikační metody savců ve směsných vzorcích. Nejprve je celá levá hypervariabilní doména CR veškeré savčí DNA přítomné ve vzorku amplifikována jedním párem primerů. Odlišně dlouhé amplikony podléhají separaci buď na agarózovém gelu, nebo citlivější kapilární elektroforézou. K určení druhů dochází srovnáním délek PCR produktů s homologními sekvencemi DNA z referenčních databází. Tato technika tak poskytuje snadnou, reprodukovatelnou a přesnou identifikaci savců pomocí jediného univerzálního páru primerů, bez potřeby předchozí znalosti druhů ve vzorku. Vysoká variabilita sekvencí CR rovněž umožňuje jednoznačnou identifikaci blízce příbuzných druhů savců (Pun *et al.*, 2009).

4.4.6 DNA sekvenace

Mezi první a nejdéle používané techniky k určování přesného pořadí nukleotidů v molekule DNA patří Sangerova metoda, představená poprvé v roce 1977 (Sanger, Nicklen & Coulson, 1977). Tato technika využívá specifických inhibitorů prodlužování řetězce k jeho sekvenování následujícím způsobem: v reakční směsi se nacházejí dNTP, jeden ze čtyř 2',3'-dideoxynukleotidů (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) a DNA polymeráza. Zainkorporování ddNTP namísto dNTP způsobí ukončení syntézy rostoucího řetězce z důvodu chybějící 3'-OH skupiny. Směs fragmentů DNA s odlišným nukleotidovým složením 3' konce jsou rozděleny elektroforézou na gelu. Opakování celého procesu s obměnou ddNTP lze na základě odlišné délky fragmentů se znalostí přidaného inhibitoru určit sekvenci DNA (Sanger, Nicklen & Coulson, 1977). Revoluci v sekvenování přinesl první DNA sekvenátor využívající kapilární elektroforézu, který tak značně zrychlil a zpřesnil sekvenaci (Liu *et al.*, 2012). Příchod technik sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS)

a třetí generace (Third Generation Sequencing, TGS) umožnilo paralelní čtení velkého množství úseků DNA najednou s vyšší rychlostí a za kratší čas (Ansorge, 2009; van Dijk *et al.*, 2018).

4.4.6.1 Next Generation Sequencing (NGS)

Všechny NGS techniky jsou založeny na podobném principu: DNA určená k sekvenaci je nejprve nastříhána na množství fragmentů, poté dochází k ligaci adaptérů, amplifikaci pomocí PCR a sekvenaci úseků. NGS platformy Roche 454 a SOLiD byly z trhu vytlačeny levnějšími a méně pracnějšími platformami Illumina a IonTorrent s relativně delším čtením (~200–400 bp) (Mardis, 2008; Ansorge, 2016).

Illumina

Illumina technologie patří do skupiny sekvenování syntézou. Nastříhané DNA fragmenty s připojenými adaptéry jsou po denaturaci jedním koncem imobilizovány k sekvenační destičce (flow cell) a druhým hybridizují s komplementárními adaptéry již přítomnými na povrchu flow cell. Adaptéry současně slouží jako primery pro můstkovou PCR. Klastry s až tisíci identickými molekulami podléhají sekvenaci za použití DNA polymerázy a čtyř odlišně fluorescenčně značených nukleotidů s reverzibilně terminační aktivitou. Fluorescenční signál emitovaný po inkorporaci nukleotidu je, stejně jako jeho pozice na flow cell, snímán CCD kamerou. Inhibiční skupina i fluorofor je odstraněn z 3' konce a proces se opakuje s dalším nukleotidem (Ansorge, 2009). Nejnovější Illumina platformy umožňují až bilion čtení s generací až 6Tb sekvenačních dat v jednom kole (Illumina, 2020).

Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific)

Ion Torrent detekuje uvolněný proton při inkorporaci nukleotidu do řetězce. Fragmenty DNA s adaptéry jsou připojeny na povrch kuliček a následně klonálně amplifikovány. Samotná sekvenace knihovny probíhá v proton-detekčních jamkách čipu. Jednotlivé nukleotidy jsou přidávány postupně. Pokud dojde k jejich zabudování do řetězce DNA polymerázou, uvolněný proton způsobí změnu pH roztoku snímanou citlivým pH senzorem na dně jamek. Síla snímaného signálu odpovídá celkovému počtu zabudovaných nukleotidů. Přímý převod jednotlivých inkorporačních událostí nukleotidů na elektrický signál (dále zpracovaný na digitální sekvenační data) celý proces sekvenace značně zjednodušuje. Bez použití nákladné optiky a fluorescenčně značek se též sníží výdaje za jeho průběh (Rothberg *et al.*, 2011; Ansorge, 2016).

4.4.6.2 Third Generation Sequencing (TGS), Long Read Sequencing

Mezi nesporné výhody TGS technik oproti NGS sekvenování patří (kromě absence kroku amplifikace a real-time monitorování sekvenace umožňující přístup k datům přímo během sekvenování) také produkce dlouhých čtení. První TGS platforma byla na trh uvedena firmou Pacific

Biosciences v roce 2011, následovaná nanopórovým sekvenováním od Oxford Nanopore Technologies (van Dijk *et al.*, 2018; *Oxford Nanopore Technologies*, 2020).

PacBio (Pacific Biosciences)

PacBio používá technologii single-molecule real-time sequencing (SMRT). Templátovou DNA, nebo také SMRTbell tvoří uzavřená kruhová ssDNA vzniklá připojením vlásečkových adaptérů ke každému konci fragmentů dsDNA. SMRTbell knihovna se nanáší na čip SMRTcell a difunduje do jednotlivých nanofotonických sekvenačních komůrek nazývaných zero-mode waveguide (ZMW). Ty jsou schopné detekce jednoho fluoroforu v přítomnosti relativně vysokých koncentrací značených dNTP. Ke dnu každé ZMW je imobilizována DNA polymeráza, která váže SMRTbell adaptér a začíná replikaci DNA (Eid *et al.*, 2009; Travers *et al.*, 2010; Rhoads & Au, 2015). Inkorporace jednoho ze čtyř odlišně fluorescenčně značených nukleotidů na fosfátové skupině umožňuje kontinuální sekvenaci. Dochází při ní k excitaci laserem, kamerovému snímání intenzity a doby trvání emitovaného záření a následnému odštěpení fluoroforu z nukleotidu. Kružnicová forma templátové ssDNA dovoluje kontinuální syntézu DNA využitím adaptéru a druhého vlákna jako předlohy. Tak lze sekvenovat oba řetězce několikrát za sebou, což značně zpřesňuje sekvenování (Eid *et al.*, 2009; Rhoads & Au, 2015; van Dijk *et al.*, 2018). Nejnovější sekvenátory by měly umožnit opakované čtení DNA o délce desítek kilobází s přesností vyšší než 99,9 % (*PacBio*, 2020).

MinIon (Oxford Nanopore Technologies)

MinIon platforma využívá techniku nanopórového sekvenování založenou na analýze sekvence DNA při průchodu řetězce pórem umístěným v membráně (Kasianowicz *et al.*, 1996). Tato membrána odděluje dvě iontová prostředí a při průchodu iontů nanopórem je generován stabilní iontový proud. Detekce pořadí bází v řetězci se uskutečňuje na základě změn proudu v póru snímaných senzorem až tisíckrát za sekundu. Příprava DNA knihovny spočívá v ligaci adaptérů, DNA-proteinových komplexů s pevně navázanou helikázou zajišťující rozplétání dvoušroubovice a postupné protáhnutí DNA skrz nanopór. Ke zvýšení přesnosti sekvenování existují specializované adaptéry podporující vstup i druhého vlákna hned po přečtení vlákna prvního. Nanopórové sekvenování dovoluje čtení až 1Mb dlouhých řetězců, avšak s poměrně vysokou chybovostí (Ansonge, 2016; van Dijk *et al.*, 2018).

4.4.7 DNA barcoding

Termín barcoding byl poprvé použit ve studii Hebert *et al.* (2003) ve spojení se sekvencí COI genu jako univerzálního identifikačního markeru pro všechny druhy živočichů. Původně bylo využito krátké sekvence COI genu (~600 bp) jako genetického čárového kódu jedinečného pro každý druh. Obdobně, jako je tomu v případě univerzálních kódů používaných k identifikaci prodávaných výrobků.

Princip barcodingu spočívá ve výběru krátkého a dostatečně variabilního úseku jaderné (Yao *et al.*, 2010), mitochondriální (Parson *et al.*, 2000) nebo chloroplastové DNA (Kress *et al.*, 2005). Tato oblast je následně amplifikována univerzálními primery syntetizovaných na základě oblastí, které ohraničují námi zvolené úseky genomů. K dosažení identifikace druhu je zapotřebí získané sekvence porovnat s referenční databází DNA, a to buď na základě podobnosti dvou sekvencí (Parson *et al.*, 2000), nebo fylogenetickou rekonstrukcí (Hsieh *et al.*, 2001; Dawnay *et al.*, 2007). Tato metoda je časově nenáročná, spolehlivá, a především použitelná na širokou škálu organismů. Představuje tak cenný nástroj k určení druhové identity i pro forenzní využití (Verma & Singh, 2003).

4.4.7.1 Vlastnosti a výběr ideálního barcodu

Ideálním barcodem je sekvence, která vykazuje vysokou mezidruhovou, ale nízkou vnitrodruhovou variabilitu. Je krátké délky usnadňující amplifikaci (s následnou sekvenací) a ohraničena konzervovanými oblastmi pro design univerzálních primerů (Kress *et al.*, 2005).

V barcodingu živočichů jsou obvykle upřednostňovány úseky mitochondriálního genomu před jaderným zejména kvůli jeho vyšší mutační rychlosti (Brown, George & Wilson, 1979). Dalšími důvody k výběru mtDNA jako hlavního zdroje barcodů v živočišné říši je maternální dědičnost (Giles *et al.*, 1980), omezená rekombinace (Saccone *et al.*, 1999), téměř žádné nekódující oblasti (s výjimkou kontrolní oblasti) (Anderson *et al.*, 1981) a více kopii na buňku (Satoh & Kuroiwa, 1991). Všechny tyto vlastnosti ve spojení s jednoduchou extrakcí a sekvenováním díky haploidní povaze mtDNA dělají z mitochondriálního genomu užitečný nástroj nejen v taxonomických a fylogenetických studiích, ale i při druhové identifikaci vzorků ve forenzním vyšetřování (Butler & Levin, 1998; Kuwayama & Ozawa, 2000; Hsieh *et al.*, 2001).

V případě rostlin je situace složitější. Ačkoliv se sekvence genu COI ukázala efektivní v identifikaci živočichů (Hebert, Ratnasingham & DeWaard, 2003), u rostlin ji mtDNA k identifikačním účelům nelze využít zejména kvůli mnohem nižší substituční rychlosti a častým změnám v uspořádání genů mtDNA (Wolfe, Li & Sharp, 1987; Palmer & Herbon, 1988). Protože jednotlivé lokusy obvykle nesplňují obecné požadavky pro ideální barcode, jsou používány různé kombinace kódujících i nekódujících oblastí chloroplastové i jaderné DNA (Kress *et al.*, 2005). Jako univerzální barcode pro všechny suchozemské rostliny byla navržena CBOL Plant Working Group (the Consortium for the Barcode of Life) kombinace dvou kódujících genů plastidové DNA,

a to *rbcL* s *matK* (Hollingsworth *et al.*, 2009). Mezi další navržené kombinace lokusů u rostlin patří například *trnH-psbA* společně s ITS nebo *rbcL* (Kress *et al.*, 2005; Kress & Erickson, 2007) a ITS2 s komplementárním barcodem *trnH-psbA* (Yao *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2019).

4.4.7.2 Design primerů

K návrhu univerzálního primeru je zapotřebí referenčních databází ke srovnání homologních sekvencí mezi několika široce divergovanými taxony. Nukleotidové složení primerů je vybíráno na základě konzervovaných oblastí obklopujících naši sekvenci zájmu. Takových sekvencí je v mtDNA velké množství, proto lze amplifikovat téměř každý úsek mitochondriálního genomu. Zejména jsou vybírány evolučně stabilní a jinak neměnné úseky kódující rRNA, antikodonové smyčky tRNA nebo aktivní místa enzymů. 3' konce primerů obvykle leží na první nebo druhé bázi kodónu pro aminokyselinu. Úsek může být amplifikován i v přítomnosti několika nepárujících nukleotidů, pokud však 3' konec primeru absolutně hybridizuje s templátem (Kocher *et al.*, 1989). V případě cpDNA rostlin se u některých lokusů může vyskytnout problém s nalezením konzervovaných oblastí, které by obklopovaly nejvariabilnější úseky (Kress & Erickson, 2007), nebo je zapotřebí použít více párů primerů k amplifikaci celé sekvence (Fazekas *et al.*, 2008).

4.4.7.3 Barcoding živočichů

Vedle již zmíněné sekvence COI genu se k druhové identifikaci hojně využívá také sekvence genu *cytB* (Parson *et al.*, 2000; Verma & Singh, 2003), ale i dalších genů a nekódujících oblastí mitochondriální DNA. Jsou jimi například geny pro 16S rRNA (Imaizumi *et al.*, 2007) a 12S rRNA (Liu *et al.*, 2001), nebo sekvence hypervariabilní oblasti D-loop (Wu *et al.*, 2005).

Cytochrom B (*cytB*)

Cytochrom B je transmembránový protein tvořící komplex III elektron transportního řetězce a jako jediný z tohoto polypeptidu je kódován mitochondriální DNA. Jeho role přitom spočívá v přenosu elektronu z ubichinolu (QH₂) na cytochrom c (Hatefi, 1985; Howell, 1989). *CytB* patří mezi první a nejdéle využívané oblasti mtDNA k fylogenetickým i identifikačním účelům (Kocher *et al.*, 1989; Parson *et al.*, 2000). Sekvenci *cytB* o celkové délce přibližně 1140 bp ohraničují úseky DNA kódující tRNA pro threonin a kyselinu glutamovou, které jsou často využívanými jako primer vazebná místa (Irwin, Kocher & Wilson, 1991). *CytB* v porovnání s COI u savců vykazuje, kromě kratší délky, také podstatně nižší počet konzervovaných pozic nukleotidů, a to 22,4 % (257 bp) ve srovnání se 43,7 % u COI (680 bp) (Tobe, Kitchener & Linacre, 2009). Analýza sekvencí *cytB* u savců také odhalila vyšší počet variabilních nukleotidů oproti COI a vyšší schopnost rozlišit, zda daný vzorek pochází z jednoho, nebo více druhů (Tobe, Kitchener & Linacre, 2010). Tyto vlastnosti je proto nutné uvážit při výběru optimálního barcodu k druhové identifikaci vzorků (Tobe, Kitchener & Linacre, 2009). Sekvence *cytB* byla navržena jako vhodný barcode k identifikaci surovin TCM připravených

ze CITES organismů, jako je například prášek z nosorožčích rohů (Hsieh *et al.*, 2003), úlomky krunýřů chráněných želv (Lee *et al.*, 2009) nebo těla sušených mořských koníků (Chang *et al.*, 2013).

Cytochrom c oxidáza I (COI)

COI tvoří součást čtvrtého a zároveň posledního komplexu elektron transportního řetězce, který katalyzuje redukci molekulárního kyslíku elektrony dodanými cytochromem c (Hatefi, 1985). K identifikačním účelům je obvykle využívána pouze část genu COI (~650 bp), kvůli jeho poměrně dlouhé sekvenci (~1540 bp) (Hebert, Ratnasingham & DeWaard, 2003; Tobe, Kitchener & Linacre, 2009). Sekvence COI genu dosáhla vysokého úspěchu druhové identifikace TCM produktů připravených z rohů ohrožených druhů čeledi Cervidae (jelenovití) a Bovidae (turovití) včetně jejich častých nelegálních náhražek (Yan *et al.*, 2013). COI v kombinaci s cytB patří mezi doporučené barcody k forenznímu užití při vyšetřování zločinů spáchaných na divoké přírodě (Wilson-Wilde *et al.*, 2010).

Kontrolní oblast (CR, D-loop)

Kontrolní oblast představuje nejrychleji se vyvíjející část mitochondriálního genomu. Její délka činí přibližně 1100 bp a nachází se mezi geny pro tRNA fenylalanin a prolin (Anderson *et al.*, 1981; Sbisà *et al.*, 1997). Kontrolní oblast je místem replikačního počátku těžkého řetězce a promotorů pro transkripci obou řetězců mtDNA. Název „D-loop“ nebo také displacement loop se vztahuje k replikaci H řetězce, při níž nově syntetizované vlákno vytlačuje rodičovský H řetězec a vytváří tak trojšroubovici. Navíc obsahuje hypervariabilní úseky, vysoce proměnlivé jak v nukleotidovém složení, tak i délce (Saccone, Attimonelli & Sbisà, 1987). Této vlastnosti se proto využívá k identifikačním účelům (Viñas & Tudela, 2009; Alisha *et al.*, 2014). Wu *et al.* (2005) využili DNA analýzy kontrolní oblasti a fylogenetické analýzy k identifikaci dvou zabavených kůží jelena Sika, které byly podezřelé, že pocházejí z přísně chráněného poddruhu *Cervus nippon kopschi*. Ačkoliv lovec tvrdil, že kůže pochází z poddruhu *Cervus nippon hortulorum*, který je v Číně chován v zajetí a legálně využíván pro účely tradiční čínské medicíny, výsledky testu skutečně ukázaly na původ z chráněných jelenů.

12S rRNA a 16S rRNA

Geny pro 12S a 16S rRNA, nezbytné pro translaci mRNA v mitochondriální proteiny, jsou v mtDNA uspořádány za sebou. Jsou ohraničeny geny pro tRNA fenylalanin a leucin a navzájem od sebe odděleny tRNA pro valin (Anderson *et al.*, 1981). V rámci sekvencí genů pro 12S rRNA (~900 bp) a 16S rRNA (~1600 bp) byly nalezeny vysoce konzervované oblasti, které jsou přítomny zejména ve smyčkách a kmenech sekundárních struktur a jsou pravděpodobně zásadní pro jejich vytvoření a zachování (Anderson *et al.*, 1982; Kitano *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014). Tyto konzervované oblasti tak mohou být využity k navržení univerzálních primerů amplifikujících pouze krátké a dostatečně informativní úseky obou genů (Yang *et al.*, 2014). Při výběru takto krátkých sekvencí je ale zapotřebí si uvědomit možnou amplifikaci mitochondriálních pseudogenů v jaderné

DNA. Tyto úseky DNA lze poměrně snadno odlišit na základě sekvence, jelikož díky chybějícímu evolučnímu omezení mutují celé stejnou rychlostí včetně původně konzervovaných oblastí (Wang *et al.*, 2000). Část sekvence pro 16S rRNA byla využita k identifikaci přítomnosti CITES organismů v 15 přípravcích TCM zabavených celníky na hranicích Austrálie (Coghlan *et al.*, 2012). Analýza úseku o délce 400 bp 12S rRNA se ukázala efektivním řešením při autentifikaci sušených Gecko přípravků TCM (Liu *et al.*, 2001).

4.4.7.4 Barcoding rostlin

Ačkoliv byla snaha naleznout ideální jednolokusový barcode k identifikaci většiny rostlin s vysokou diskriminační silou, jako je tomu u COI nebo *cytB* živočichů, žádný z úseků chloroplastové DNA se neukázal dostatečně efektivním. Úspěšnost druhové identifikace pomocí jediného lokusu *cpDNA* se přitom pohybovala pouze od 43 % (*rpoC1*) do 69 % (*trnH-psbA*) mezi 397 zkoumanými vzorky reprezentujícími hlavní linie suchozemských rostlin (Hollingsworth *et al.*, 2009). Při použití dvou a více lokusů nedosahuje míra úspěšnosti identifikace ani z daleka takových hodnot, jako je tomu u barcodů živočichů (Parson *et al.*, 2000; Hebert, Ratnasingham & DeWaard, 2003; Fazekas *et al.*, 2008). Důvodem neúspěchu barcodingu u rostlin pravděpodobně není nedostatek variability v sekvencích *cpDNA*, ale spíše jejich častá parafyletičnost (Fazekas *et al.*, 2008).

Kombinace lokusů *rbcL* a *matK* byla v roce 2009 navržena jako univerzální barcode pro všechny suchozemské rostliny. Dosahuje diskriminace 72 % mezi 907 vzorky z 550 druhů hlavních linií suchozemských rostlin. Důvodem výběru právě těchto dvou lokusů byla zejména snadná amplifikovatelnost *rbcL* a vysoká diskriminační síla *matK* (Hollingsworth *et al.*, 2009). *RbcL*, kódující velkou podjednotku enzymu *RuBisCo*, patří k nejsnadněji amplifikovatelným a sekvenovatelným úsekům *cpDNA*. Jeho velmi nízká divergence a poměrně dlouhá sekvence (~1400 bp) patří však mezi největší překážky, s nimiž je nutno se vypořádat (Kress *et al.*, 2005; Fazekas *et al.*, 2008). Naopak je tomu v případě genu pro maturázu *K* (*matK*). Sekvence *matK* představuje jednu z nejvariabilnějších oblastí *cpDNA*, ale kvůli nedostatečné univerzálnosti dosud navržených primerů je amplifikace i sekvenace problematická (Yu, Xue & Zhou, 2011).

Kress *et al.* (2005) navrhli oblast jaderného ribozomálního cistronu 18S–5.8S–26S tzv. internal transcribed spacer (ITS) společně s nekódující mezigenovou oblastí *trnH-psbA cpDNA* jako potenciálně užitečné sekvence pro DNA barcoding krytosemenných rostlin. Tato dvojice barcodů byla schopná rozlišit 99 druhů z celkem 80 rodů a 53 čeledí kvetoucích rostlin. ITS patří mezi rychle se vyvíjející úseky s poměrně vysokou mezidruhovou variabilitou. Jedná se však o jadernou sekvenci s omezeným počtem kopií na buňku, a tak proveditelnost PCR může být obtížná zejména u degradovaných vzorků nebo vzorků se stopovým množstvím DNA. Oblast *trnH-psbA* vykazuje vysokou úspěšnost amplifikace, ideální délku a dostatečnou mezidruhovou variabilitu. Patří proto mezi často využívané oblasti k identifikaci rostlin (Kress *et al.*, 2005; Kress & Erickson, 2007; Pang *et al.*, 2012).

Jako univerzální barcode pro všechny suchozemské rostliny včetně bylin byla doporučena také část *rbcL* genu a nekódující oblast *trnH-psbA* cpDNA. Snadná amplifikace obou segmentů společně se schopností *rbcL* zařadit vzorek do čeledi a rodu, včetně správné druhové identifikace vysoce variabilním úsekem *trnH-psbA*, nabízí poměrně spolehlivý prostředek k určování široké škály rostlin (Kress & Erickson, 2007).

Skupina Yan *et al.* (2010) srovnávala celkem 7 sekvencí k možnému využití pro DNA barcoding léčivých druhů rostlin. Úsek ITS2 se ukázal nejlepší volbou. Úspěšně identifikoval 92,7 % ze 4800 druhů patřících do 753 rodů ve více než 6600 vzorcích zahrnujících jak vyšší, tak i nižší rostliny. Tohoto úspěchu bylo dosaženo díky krátké délce barcodů o 160–320 bp, které tak lze amplifikovat pouze jedním univerzálním párem primerů, a vysoké mezidruhové a nízké vnitrodruhové variability. Jako komplementární barcode k ITS2 byl navržen *trnH-psbA* pro identifikaci širší škály rostlinných taxonů s mírou identifikace 96,5 % na úroveň rodu a 72,8 % na úroveň druhu. Výsledky tohoto výzkumu jsou v souladu se závěry nedávné studie skupiny Liu *et al.* (2019). Ta zkoumala identifikační úspěšnost 4 nejčastěji používaných barcodů – ITS2, *psbA-trnH*, *matK* a *rbcL* – mezi 106 druhy z celkem 65 rodů jedovatých bylin zahrnutých v čínském lékopisu včetně příbuzných jedovatých rostlin a častých příměsí. ITS2 sekvence přitom průměrně identifikovala 92,6 % a *trnH-psbA* zhruba 86 % všech zkoumaných druhů rostlin.

4.4.7.5 DNA metabarcoding

DNA metabarcoding je novým a efektivním přístupem schopným identifikace mnoha druhů zároveň v komplexních a degradovaných vzorcích. Tato metoda kombinuje výhody vysoké diskriminační síly klasického barcodingu s možností paralelního sekvenování mnoha úseků DNA současně (za využití NGS a TGS technik sekvenování). Obvykle jsou vybírány celé sekvence běžných barcodů nebo jejich části, které podléhají masivní amplifikaci univerzálními primery. Získané produkty jsou následně sekvenovány a porovnávány s DNA referenčními databázemi. Metabarcoding tak obchází problémy s potřebou neporušené DNA a omezeným počtem jednotlivých vzorků DNA, které lze současně analyzovat při klasickém barcodingu. Analýza více lokusů zároveň také zvyšuje pravděpodobnost identifikace všech DNA sekvencí přítomných ve vzorku (Taberlet, Coissac & Pompanon, 2012; Arulandhu *et al.*, 2017).

Skupina Arulandhu *et al.* (2019) použili DNA metabarcoding k ověření přítomnosti CITES organismů v 18 zabavených a zakoupených přípravcích TCM podezřelých z jejich obsahu. Mini barcodey ITS2, mini-*rbcL*, *trnL* a mini-16S z celkem 12 aplikovaných poskytly nejvíce informací k určení do druhu či rodu. Vysoká úspěšnost právě krátkých barcodů odkazuje na degradovaný stav DNA ve vzorku, který při výrobě prošel mnoha úpravami způsobující toto částečné rozložení. ITS2 se ukázal jako jediný barcode schopný druhové identifikace většiny rostlin, v případě živočichů pak mini-16S. Metabarcoding je tak vhodným a dostatečně informativním nástrojem pro autentifikaci a identifikaci široké taxonomické škály živočichů a rostlin zahrnutých v TCM. Může tak složit

příslušným orgánům při ověřování kvality a pravosti produktů a celním orgánům v boji proti nezákonnému používání chráněných organismů v TCM (Arulandhu *et al.*, 2019).

4.4.7.6 Databáze

Referenční databáze se uplatňují při mapování polymorfních míst ve vybraných lokusech, přípravě univerzálních i druhově specifických primerů, v konečném screeningu podobnosti amplifikovaného úseku se sekvencemi databází, nebo k provedení fylogenetické analýzy (Hebert, Ratnasingham & DeWaard, 2003; Wu *et al.*, 2005). Vybudováním vlastní referenční knihovny DNA sekvencí je možné se vyhnout případným nesrovnalostem a chybným identifikacím, které mohou nastat při použití veřejně dostupných DNA databází. Zejména pak při identifikaci nedostatečně geneticky zmapovaných druhů (Li *et al.*, 2011).

GenBank

GenBank je volně přístupnou databází nukleotidových sekvencí vytvořenou a spravovanou National Center for Biotechnology Information (NCBI). V době vzniku v roce 1982 obsahovala 606 vstupních sekvencí, aktuálně k únoru 2020 je zde více než 216 milionů sekvencí z přibližně 420 000 formálně popsaných druhů (Sayers *et al.*, 2019; *GenBank Overview*, 2020). Kvalita vkládaných sekvencí je před zveřejněním v databázi kontrolována. Vzhledem k množství uploadovaných úseků nukleotidových kyselin však jejich věrohodnost závisí především na spolehlivosti samotného autora (Zhang *et al.*, 2013; Sayers *et al.*, 2019). Je proto důležité brát v potaz možný výskyt chybně identifikovaných sekvencí, které by mohly vést k zavádějícím výsledkům v publikacích (Zhang *et al.*, 2013). K vyhledávání podobných sekvencí k námi dotazované lze použít program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nabízený NCBI (Sayers *et al.*, 2019). BLAST porovnává nukleotidové sekvence s celou databází GenBank a propočítává statistickou významnost shod (*GenBank Overview*, 2020).

BOLT - The Barcode of Life DataSystems

BOLD byl vytvořen za spolupráce CBOL, NCBI a Global Biodiversity Information Facility (GBIF). Tato volně přístupná platforma se zaměřuje nejen na uložení, analýzu a publikaci DNA barcode sekvencí, ale i poskytnutí informací o vzorku včetně fotografií (Ratnasingham & Hebert, 2007). Aktuálně (k 18. 3. 2020) obsahuje přes 8 milionů sekvencí barcodů z více než 309 tisíc druhů. BOLD akceptuje jako barcode pouze sekvence COI živočichů, rbcL a matK rostlin a ITS hub (*Bold Systems V4*, 2020). Vkládané sekvence barcodů jsou schvalovány na základě splnění několika požadavků, mezi nimiž je například i minimální délka 500 bp nebo povinnost uvést použité primery. Následně BOLD ověřuje původ úseku a kontroluje celkovou kvalitu sekvencí před zveřejněním. Takto schválené záznamy a sekvence barcodů jsou kopírovány a ukládány do GenBank, kde jsou označeny klíčovým slovem BARCODE (Ratnasingham & Hebert, 2007; Porter & Hajibabaei, 2018). BOLD Identifikační systém (IDentification System, IDS) slouží k porovnání neznámé sekvence s BOLD

databázi. Neznámá sekvence přitom musí splnit kritéria délky pro COI, rbcL a matK minimálně 500 bp a pro ITS více než 100 bp (Ratnasingham & Hebert, 2007; *Bold Systems V4*, 2020).

MMDBD - Medical Materials DNA Barcode Database

MMDBD byla založena skupinou Lou *et al.* v roce 2010 za účelem vytvoření specializované databáze sekvencí druhů využívaných v medicíně. Tato databáze zahrnuje jak druhy čínského a amerického lékopisu, tak i jejich časté příměsi a blízce příbuzné druhy. K dnešnímu dni (19. 3. 2020) zde lze najít více než 65 tisíc sekvencí barcodů z 2225 druhů rostlin, živočichů a hub (*Medicinal Materials DNA Barcode Database*, 2020). Shromažďuje barcody mtDNA (COI, CytB, 12S a 16S rRNA), cpDNA (rbcL, matK, trnH-psbA) i jaderné DNA (ITS). Kromě sekvencí barcodů obsahuje také informace o primerech, včetně použitých podmínek při PCR, vědecké i lékařské názvy, klasifikaci materiálu podle CITES a IUCN, informace z lékopisů a fotografie vzorků. MMDBD používá k vyhledání podobnosti sekvencí s databází software BLAST (Lou *et al.*, 2010; *Medicinal Materials DNA Barcode Database*, 2020).

Loxodonta Localizer

Mapuje lokalizaci afrických slonů *Loxodonta africana* a *Loxodonta cyclotis* pomocí 316 bp dlouhého úseku mitochondriální kontrolní oblasti (*Loxodonta Localizer*, 2020). Původ afrických slonů nebo jejich slonoviny lze určit díky faktu, že mtDNA je děděna maternálně a samice slonů většinou neopouštějí svá stáda. Proto je variabilita v mtDNA vázána ke geografickému rozmezí pobytu stáda. Určením geografického původu analýzou kontrolní oblasti mtDNA ze zabavené nelegálně získané slonoviny a výrobků z ní tak lze cílit vymáhání práva přímo na pytlácké hotspoty (Ishida *et al.*, 2013).

4.4.7.7 Fylogenetická analýza

Princip fylogenetické analýzy spočívá v zarovnání sekvencí a hledání informativních homologních míst, které podstupují další rozbor. Následně jsou konstruovány fylogenetické stromy využitím některé z metod: maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) nebo Bayesian analysis. Tyto stromy tak odráží evoluční historii dané taxonomické skupiny. K identifikaci druhů se využívá především distančních metod, jejichž princip je založen na porovnávání genetických vzdáleností mezi neznámou DNA a referenčními druhy a neodráží tak evoluční vztahy jako u výše zmíněných metod (Li *et al.*, 2011). Nejužívanější distanční metodou v DNA barcodingu je neighbor-joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987; Hsieh *et al.*, 2001; Hajibabaei *et al.*, 2006, 2007). NJ vypočítává genetickou vzdálenost na základě podobností mezi neznámou sekvencí a referenční knihovnou provedením množství sekvenčních zarovnání. Výsledný kladogram tak vyjadřuje vztah podobnosti druhů získaný na základě párových distančních hodnot (Li *et al.*, 2011). Fylogenetická analýza je využívána zejména k ověření platnosti výsledků získaných sekvenční analýzou (Thakur *et al.*, 2017).

5 Závěr

Ačkoliv se na první pohled zdá, že ohrožení volně žijících populací v důsledku nelegálního obchodu pro nasycení trhu s TCM zůstává záležitostí především asijských druhů, lze pozorovat jistý přesun zájmu také na africký kontinent. Ten se aktuálně stal hlavním zdrojem nosorožčích rohů a z nemalé části i luskouních šupin. Důsledným dodržováním předpisů stanovených úmluvou CITES a kvalitním monitoringem stavu populací ve volné přírodě by se mohlo do jisté míry předcházet nebo zpomalit vymírání některých organismů – nikoli však zcela zastavit.

Existuje nespočet různorodých DNA identifikačních metod a lze poměrně s jistotou říci, že mnoho dalších v rámci následujících let přibude.

Pokud je možné předpovídat identitu zabaveného exempláře TCM na základě typických morfologických nebo mikroskopických znaků, dá se k rychlému průkazu přítomnosti konkrétního druhu ve vzorku využít druhově specifickou PCR nebo metodu SNaPshot.

U mechanicky zpracovaných surovin TCM a nejrůznějších výluhů a vývarů, které pozbývají veškerých charakteristických rysů, se DNA barcoding jeví optimální identifikační metodou. Použití univerzálních primerů umožňuje identifikaci mnoha druhů zároveň, což je uplatnitelné v případě komplexní povahy patentní medicíny. Sekvence genů pro *cytB* a *COI mtDNA* se zdá být dostatečně spolehlivým nástrojem k identifikaci poměrně široké škály živočišných druhů v TCM. Univerzálním barcodem k identifikaci bylin čínské medicíny by se mohl stát úsek *ITS2* jaderné DNA s komplementární sekvencí nekódující oblasti chloroplastového genomu *trnH-psbA*.

Doplnění dalších často používaných sekvencí do referenční databáze barcodů BOLD by velmi napomohlo standardizaci barcodingu ve forenzním vyšetřování.

Tato práce by tímto mohla sloužit celním orgánům jako podklad při výběru vhodné druhově specifické DNA identifikační techniky k průkazu přítomnosti CITES organismů v surovinách a přípravcích TCM.

6 Seznam použité literatury

(* sekundární zdroj)

- Alisha, A., Minakshi, P., Ranjan, K. & Prasad, G. (2014) „Comparison of D-Loop Gene for Subspecies Confirmation of Tigers (*Panthera Tigris*)”, *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 2(2), s. 116–119.
- Alves, C., Pereira, R., Prieto, L., *et al.* (2017) „Species identification in forensic samples using the SPInDel approach: A GHEP-ISFG inter-laboratory collaborative exercise”, *Forensic Sci. Int. Genet.*, 28, s. 219–224.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., *et al.* (1981) „Sequence and organization of the human mitochondrial genome”, *Nature*, 290(5806), s. 457–465.
- Anderson, S., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., *et al.* (1982) „Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome”, *J. Mol. Biol.*, 156(4), s. 683–717.
- *Ansoerge, W. (2016) „Next Generation DNA Sequencing (II): Techniques, Applications”, *Next Gener. Seq. Appl.*, 1, s. 1–10.
- *Ansoerge, W. J. (2009) „Next-generation DNA sequencing techniques”, *N. Biotechnol.*, 25(4), s. 195–203.
- *Arnheim, N. & Erlich, H. (1992) „Polymerase Chain Reaction Strategy”, *Annu. Rev. Biochem.*, 61(1), s. 131–156.
- Arulandhu, A. J., Staats, M., Hagelaar, R., *et al.* (2017) „Development and validation of a multi-locus DNA metabarcoding method to identify endangered species in complex samples”, *Gigascience*, 6(10), s. 1–25.
- Arulandhu, A. J., Staats, M., Hagelaar, R., Peelen, T. & Kok, E. J. (2019) „The application of multi-locus DNA metabarcoding in traditional medicines”, *J. Food Compos. Anal.*, 79, s. 87–94.
- Bauer, A. (2009) „Geckos in traditional medicine: forensic implications”, *Appl. Herpetol.*, 6(1), s. 81–96.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., *et al.* (1990) „Rapid and simple method for purification of nucleic acids”, *J. Clin. Microbiol.*, 28(3), s. 495–503.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. & Davis, R. W. (1980) „Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms”, *Am. J. Hum. Genet.*, 32(3), s. 314–331.
- Brown, W. M., George, M. & Wilson, A. C. (1979) „Rapid evolution of animal mitochondrial DNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76(4), s. 1967–1971.
- Buddhakosai, W., Sukmak, M., Klinsawat, W., *et al.* (2014) „Discrimination of tiger using a novel high resolution melting (HRM) and multiplex SNP-specific HRM (MSS-HRM) technique”, *Forensic Sci. Int. Genet.*, 13, s. 30–33.
- *Bulpitt, C. J., Li, Y., Bulpitt, P. F. & Wang, J. (2007) „The use of orchids in Chinese medicine”, *J. R. Soc. Med.*, 100(12), s. 558–563.
- *Butler, J. M. & Levin, B. C. (1998) „Forensic applications of mitochondrial DNA”, *Trends Biotechnol.*, 16(4), s. 158–162.
- Cameron, G., Pendry, S., Allan, C. & Wu, J. (2004) „Traditional Asian Medicine Identification Guide for Law Enforcers: Version II”, *Her Majesty's Cust. Excise, London TRAFFIC Int. Cambridge, UK*.
- Carles, M., Cheung, M. K. L., Moganti, S., *et al.* (2005) „A DNA microarray for the authentication of toxic traditional Chinese medicinal plants”, *Planta Med.*, 71(6), s. 580–584.
- Carreiro, J., Pereira, F. & Amorim, A. (2012) „SPInDel: A multifunctional workbench for species identification using insertion/deletion variants”, *Mol. Ecol. Resour.*, 12(6), s. 1190–1195.
- *Chan, G. K. L., Wang, H. Y., Wong, Z. C. F., *et al.* (2015) „Quality Control of Chinese Medicine”, *Recent Adv. Chinese Med.*, s. 1–15.
- Chang, C. H., Jang-Liaw, N. H., Lin, Y. S., Fang, Y. C. & Shao, K. T. (2013) „Authenticating the use of dried seahorses in the traditional Chinese medicine market in Taiwan using molecular forensics”, *J. Food Drug Anal.*, 21(3), s. 310–316.
- Chen, J., Jiang, Z., Li, C., *et al.* (2015) „Identification of ungulates used in a traditional Chinese medicine with DNA barcoding technology”, *Ecol. Evol.*, 5(9), s. 1818–1825.
- Chen, Y., Yan, T., Shang, L., Fu, Y. & Li, G. (2017) „Distinguish the Wild from Cultivated Agarwood by Using HPLC Combined with PCA”, *Asian J. Plant Sci. Res.*, 7(2), s. 23–31.
- *Cheng, J., Dang, P. P., Zhao, Z., *et al.* (2019) „An assessment of the Chinese medicinal Dendrobium industry: Supply, demand and sustainability”, *J. Ethnopharmacol.*, 229, s. 81–88.
- Ching, C. K., Chen, S. P. L., Lee, H. H. C., *et al.* (2018) „Adulteration of proprietary Chinese medicines and health products with undeclared drugs: experience of a tertiary toxicology laboratory in Hong Kong”, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 84(1), s. 172–178.
- Coghlan, M. L., Haile, J., Houston, J., *et al.* (2012) „Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns”, *PLoS Genet.*, 8(4).
- Cooper, K., Noller, B., Connell, D., *et al.* (2007) „Public health risks from heavy metals and metalloids present in traditional Chinese medicines”, *J. Toxicol. Environ. Health*, 70(19), s. 1694–1699.
- Cosyns, J. P., Jadoul, M., Squifflet, J. P., Wese, F. X. & De Strihou, C. V. Y. (1999) „Urothelial lesions in Chinese-herb nephropathy”, *Am. J. Kidney Dis.*, 33(6), s. 1011–1017.
- Cyranoski, D. (2018) „Why Chinese medicine is heading for clinics around the world”, *Nature*, 561(7724), s. 448–450.
- Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G. R. & Thorpe, R. S. (2007) „Validation of the barcoding gene COI for use in forensic

- genetic species identification", *Forensic Sci. Int.*, 173(1), s. 1–6.
- *van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D. & Thermes, C. (2018) „The Third Revolution in Sequencing Technology", *Trends Genet.*, 34(9), s. 666–681.
- Doughty, H., Verissimo, D., Tan, R. C. Q., *et al.* (2019) „Saiga horn user characteristics, motivations, and purchasing behaviour in Singapore", *PLoS One*, 14(9), s. 1–18.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A. & Caskey, T. (1991) „DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats", *Am. J. Hum. Genet.*, 49(4), s. 746–756.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., *et al.* (2009) „Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules", *Science*, 323(5910), s. 133–138.
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., *et al.* (2008) „Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well", *PLoS One*, 3(7).
- *Feng, Y., Siu, K., Wang, N., *et al.* (2009) „Bear bile: Dilemma of traditional medicinal use and animal protection", *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 5(1), s. 2.
- Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirrung, M. C., *et al.* (1991) „Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis", *Science*, 251(4995), s. 767–773.
- French, D. J., Archard, C. L., Andersen, M. T. & McDowell, D. G. (2002) „Ultra-rapid DNA analysis using HyBeacon™ probes and direct PCR amplification from saliva", *Mol. Cell. Probes*, 16(5), s. 319–326.
- French, D. J., Archard, C. L., Brown, T. & McDowell, D. G. (2001) „HyBeacon™ probes: A new tool for DNA sequence detection and allele discrimination", *Mol. Cell. Probes*, 15(6), s. 363–374.
- Fu, R. Z., Wang, J., Zhang, Y. B., *et al.* (1999) „Differentiation of medicinal *Codonopsis* species from adulterants by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism", *Planta Med.*, 65(7), s. 648–650.
- Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L. & Hausser, J. (1996) „Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews", *Mol. Biol. Evol.*, 13(1), s. 31–46.
- *Gaubert, P., Antunes, A., Meng, H., *et al.* (2018) „The Complete Phylogeny of Pangolins: Scaling Up Resources for the Molecular Tracing of the Most Trafficked Mammals on Earth", *J. Hered.*, 109(4), s. 347–359.
- George, K., Masters, A. & Dawnay, N. (2019) „Development of HyBeacon® probes for the forensic detection of *Panthera*, rhinoceros, and pangolin species", *Mol. Cell. Probes*, 48, s. 101450.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. & Wallace D., C. (1980) „Maternal inheritance of human mitochondrial DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77(11), s. 6715–6719.
- Gill, P., Jeffreys, A. J. & Werrett, D. J. (1985) „Forensic application of DNA „fingerprints“", *Nature*, 318(6046), s. 577–579.
- *Gratwicke, B., Mills, J., Dutton, A., *et al.* (2008) „Attitudes toward consumption and conservation of tigers in China", *PLoS One*, 3(7), s. e2544.
- Gu, H. F., Xia, Y., Peng, R., *et al.* (2011) „Authentication of Chinese Crude Drug Gecko by DNA barcoding", *Nat. Prod. Commun.*, 6(1), s. 67–71.
- Guo, Y., Tsuruga, A., Yamaguchi, S., *et al.* (2006) „Sequence analysis of chloroplast chlB gene of medicinal *Ephedra* species and its application to authentication of Ephedra Herb", *Biol. Pharm. Bull.*, 29(6), s. 1207–1211.
- Ha, W. Y., Shaw, P. C., Liu, J., Yau, F. C. F. & Wang, J. (2002) „Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD)", *J. Agric. Food Chem.*, 50(7), s. 1871–1875.
- *Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. & Hickey, D. A. (2007) „DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics", *Trends Genet.*, 23(4), s. 167–172.
- Hajibabaei, M., Smith, M. A., Janzen, D. H., *et al.* (2006) „A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded", *Mol. Ecol. Notes*, 6(4), s. 959–964.
- Han, J., Pang, X., Liao, B., *et al.* (2016) „An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding", *Sci. Rep.*, 6, s. 18723;
- Harris, E. S. J., Cao, S., Littlefield, B. A., *et al.* (2011) „Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese Herbal Medicines", *Sci. Total Environ.*, 409(20), s. 4297–4305.
- Hartl, L. & Seefelder, S. (1998) „Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs", *Theor. Appl. Genet.*, 96(1), s. 112–116.
- *Hatefi, Y. (1985) „The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System", *Annu. Rev. Biochem.*, 54(1), s. 1015–1069.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & DeWaard, J. R. (2003) „Biological identifications through DNA barcodes", *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 270(1512), s. 313–321.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & DeWaard, J. R. (2003) „Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species", *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.*, 270(SUPPL. 1), s. S96–S99.
- Heid, A. C., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996) „Real time quantitative PCR", *Genome Res.*, 6(10), s. 986–994.
- Hend, E. W., Ibrahim, M. E. & Mohamed, M. A. (2018) „Effect of Post Harvest Storage on the Oil Constituents of *Laurus Nobilis L.* Plant", *J. Mater. Environ. Sci.*, 9(6), s. 1735–1740.

- Higuchi, R., Dollinger, G., Sean Walsh, P. & Griffith, R. (1992) „Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences“, *Bio/Technology*, 10(4), s. 413–417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993) „Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions“, *Bio/Technology*, 11(9), s. 1026–1030.
- Hoff-Olsen, P., Mevåg, B., Staalstrøm, E., *et al.* (1999) „Extraction of DNA from decomposed human tissue: An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing“, *Forensic Sci. Int.*, 105(3), s. 171–183.
- Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., *et al.* (2009) „A DNA barcode for land plants“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(31), s. 12794–12797.
- Howell, N. (1989) „Evolutionary conservation of protein regions in the protonmotive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis“, *J. Mol. Evol.*, 29(2), s. 157–169.
- Hsieh, H. M., Chiang, H. L., Tsai, L. C., *et al.* (2001) „Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals“, *Forensic Sci. Int.*, 122(1), s. 7–18.
- Hsieh, H. M., Huang, L. H., Tsai, L. C., *et al.* (2003) „Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene“, *Forensic Sci. Int.*, 136(1–3), s. 1–11.
- *Hu, J. & Liu, B. (2012) „The basic theory, diagnostic, and therapeutic system of traditional Chinese medicine and the challenges they bring to statistics“, *Stat. Med.*, 31(7), s. 602–605.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., *et al.* (2020) „Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China“, *Lancet*, 395(10223), s. 497–506.
- Imaizumi, K., Akutsu, T., Miyasaka, S. & Yoshino, M. (2007) „Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA“, *Int. J. Legal Med.*, 121(3), s. 184–191.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. & Wilson, A. C. (1991) „Evolution of the cytochrome b gene of mammals“, *J. Mol. Evol.*, 32(2), s. 128–144.
- Ishida, Y., Georgiadis, N. J., Hondo, T. & Roca, A. L. (2013) „Triangulating the provenance of African elephants using mitochondrial DNA“, *Evol. Appl.*, 6(2), s. 253–265.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, S. L. (1985) „Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA“, *Nature*, 314(6006), s. 67–73.
- Jiang, L. L., Lo, Y. T., Chen, W. T. & Shaw, P. C. (2016) „DNA authentication of animal-derived concentrated Chinese medicine granules“, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 129, s. 398–404.
- Joshi, V. C. & Khan, I. (2005) „Macroscopic and microscopic authentication of Chinese and North American species of *Ephedra*“, *J. AOAC Int.*, 88(3), s. 707–713.
- Kang, O. J. & Kim, J. S. (2016) „Comparison of ginsenoside contents in different parts of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)“, *Prev. Nutr. Food Sci.*, 21(4), s. 389–392.
- Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D. & Deamer, D. W. (1996) „Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(24), s. 13770–13773.
- Kelly, T. J. & Smith, H. O. (1970) „A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*“, *J. Mol. Biol.*, 51(2), s. 393–409.
- Kindlovits, S., Radácsi, P., Sárosi, S., *et al.* (2014) „Effect of Weather Conditions on the Morphology, Production and Chemical Composition of Two Cultivated Medicinal and Aromatic Species“, *Eur. J. Hort. Sci.*, 79(2), s. 76–83.
- Kitano, T., Umetsu, K., Tian, W. & Osawa, M. (2007) „Two universal primer sets for species identification among vertebrates“, *Int. J. Legal Med.*, 121(5), s. 423–427.
- Kitpipit, T., Thongjued, K., Penchart, K., Ouithavon, K. & Chotigeat, W. (2017) „Mini-SNaPshot multiplex assays authenticate elephant ivory and simultaneously identify the species origin“, *Forensic Sci. Int. Genet.*, 27, s. 106–115.
- Kitpipit, T., Tobe, S. S., Kitchener, A. C., Gill, P. & Linacre, A. (2012) „The development and validation of a single SNaPshot multiplex for tiger species and subspecies identification - Implications for forensic purposes“, *Forensic Sci. Int. Genet.*, 6(2), s. 250–257.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., *et al.* (1989) „Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86(16), s. 6196–6200.
- *Kock, R. A., Orynbayev, M., Robinson, S., *et al.* (2018) „Saigas on the brink: Multidisciplinary analysis of the factors influencing mass mortality events“, *Sci. Adv.*, 4(1), s. eaao2314.
- *Koh, H.-L. & Woo, S. (2000) „Chinese Proprietary Medicine in Singapore“, *Drug Saf.*, 23(5), s. 351–362.
- Kress, W. J. & Erickson, D. L. (2007) „A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region“, *PLoS One*, 2(6).
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. & Janzen, D. H. (2005) „Use of DNA barcodes to identify flowering plants“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(23), s. 8369–8374.
- *Kučera, J. & Boučková, M. (2010) „Úmluva o mezinárodním obchodu ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin základní informace se zaměřením na Českou republiku a Evropskou unii“, Praha, Ministerstvo životního prostředí.
- Kuppuswamy, M. N., Hoffmann, J. W., Kasper, C. K., *et al.* (1991) „Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: Experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88(4), s. 1143–1147.
- Kuwayama, R. & Ozawa, T. (2000) „Phylogenetic relationships among European red deer, wapiti, and sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences“, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 15(1), s. 115–123.

- Lazarowycz, N. J. & Pekos, P. (1998) „Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: Strategies for applying pharmaceutical hplc analysis to herbal products", *Drug Inf. J. DIJ/Drug Inf. Assoc.*, 32(2), s. 497–512.
- Lee, H. Y., Park, M. J., Kim, N. Y., *et al.* (2010) „Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns", *Forensic Sci. Int. Genet.*, 4(5), s. 275–280.
- Lee, J. C. I. & Chang, J. G. (1994) „Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification", *Forensic Sci. Int.*, 67(2), s. 103–107.
- Lee, J. C. I., Tsai, L. C., Liao, S. P., Linacre, A. & Hsieh, H. M. (2009) „Species identification using the cytochrome b gene of commercial turtle shells", *Forensic Sci. Int. Genet.*, 3(2), s. 67–73.
- *Lehr, H. & Jaramillo, L. (2017) „Applicability of traceability systems for CITES-Listed medicinal and ornamental plants (Appendices II and III) Preliminary Assessment: Key findings", United States, UNCTAD.
- *Li, M., Zhang, K. Y. B., But, P. P. H. & Shaw, P. C. (2011) „Forensically informative nucleotide sequencing (FINS) for the authentication of Chinese medicinal materials", *Chin. Med.*, 6(1), s. 42.
- Li, X., Shi, F., Gong, L., *et al.* (2017) „Species-specific identification of collagen components in *Colla corii asini* using a nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry proteomics approach", *Int. J. Nanomedicine*, 12, s. 4443–4454.
- *Li, Z., Lin, H., Gu, L., Gao, J. & Tzeng, C. M. (2016) „Herba Cistanche (*Rou Cong-Rong*): One of the best pharmaceutical gifts of traditional Chinese medicine", *Front. Pharmacol.*, 7, s. 41.
- Liang, Z., Sze, K., Leung, Y., *et al.* (2006) „Authentication and differentiation of two easily confusable Chinese materia medica: Herba *Solani Lyrati* and Herba *Aristolochiae Mollissimae*", *J. Food Drug Anal.*, 14(1), s. 36–43.
- *Lin, A. X., Chan, G., Hu, Y., *et al.* (2018) „Internationalization of traditional Chinese medicine: Current international market, internationalization challenges and prospective suggestions", *Chin. Med.*, 13(1), s. 9.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T. R. & Lockhart, D. J. (1999) „High density synthetic oligonucleotide arrays", *Nat. Genet.*, 21(1), s. 20–24.
- Liu, H., Hu, H., Chu, C., Li, Q. & Li, P. (2011) „Morphological and microscopic identification studies of *Cordyceps* and its counterfeits", *Acta Pharm. Sin. B*, 1(3), s. 189–195.
- *Liu, L., Li, Y., Li, S., *et al.* (2012) „Comparison of next-generation sequencing systems", *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012.
- Liu, M., Li, X. W., Liao, B. S., Luo, L. & Ren, Y. Y. (2019) „Species identification of poisonous medicinal plant using DNA barcoding", *Chin. J. Nat. Med.*, 17(8), s. 585–590.
- *Liu, S. H., Chuang, W. C., Lam, W., Jiang, Z. & Cheng, Y. C. (2015) „Safety Surveillance of Traditional Chinese Medicine: Current and Future", *Drug Saf.*, 38(2), s. 117–128.
- *Liu, Z., Jiang, Z., Fang, H., *et al.* (2016) „Perception, price and preference: Consumption and protection of wild animals used in traditional medicine", *PLoS One*, 11(3), s. e0145901.
- Liu, Z., Wang, Y., Zhou, K., *et al.* (2001) „Authentication of Chinese Crude Drug, Gecko, by Allele-Specific Diagnostic PCR", *Planta Med.*, 67(4), s. 385–387.
- López, J. L., Marina, A., Álvarez, G. & Vázquez, J. (2002) „Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species", *Proteomics*, 2(12), s. 1658–1665.
- Lou, S. K., Wong, K. L., Li, M., *et al.* (2010) „An integrated web medicinal materials DNA database: MMDBD (Medicinal Materials DNA Barcode Database)", *BMC Genomics*, 11(1), s. 402.
- Lum, J. H. K., Fung, K. L., Cheung, P. Y., *et al.* (2002) „Proteome of oriental ginseng *Panax ginseng* C. A. Meyer and the potential to use it as an identification tool", *Proteomics*, 2(9), s. 1123–1130.
- Ma, Z. G., Yang, Z. L., Li, P. & Li, C. H. (2008) „Simultaneous determination of eight phenylethanoid glycosides in different species of the genus *Cistanche* by high performance liquid chromatography", *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 31(18), s. 2838–2850.
- Maier, R. M., Neckeremann, K., Igloi, G. L. & Koëssel, H. (1995) „Complete sequence of the maize chloroplast genome: Gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing", *J. Mol. Biol.*, 251(5), s. 614–628.
- *Mardis, E. R. (2008) „Next-Generation DNA Sequencing Methods", *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9(1), s. 387–402.
- *Meng, X., Liu, D., Feng, J. & Meng, Z. (2012) „Asian Medicine: Exploitation of wildlife", *Science*, 335(6073), s. 1168.
- Meunier, J. R. & Grimont, P. A. D. (1993) „Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting", *Res. Microbiol.*, 144(5), s. 373–379.
- Michaels, S. D. & Amasino, R. M. (1998) „A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR", *Plant J.*, 14(3), s. 381–385.
- *Mooney, S. (2005) „Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis", *Brief. Bioinform.*, 6(1), s. 44–56.
- *Morell, V. (2007) „Can the Wild Tiger Survive?", *Science*, 317(5843), s. 1312–1314.
- *Moyle, B. J. (2008) „The Black Market in China for Tiger Products", *Glob. crime*, 10(1–2), s. 124–143.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987) „Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction", *Methods Enzymol.*, 155, s. 335–350.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., *et al.* (1987) „Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping",

Science, 235(4796), s. 1616–1622.

Nathans, D. & Smith, H. O. (1975) „Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules", *Annu. Rev. Biochem.*, 44(1), s. 273–293.

*Ng, D. & Burgess, E. A. (2004) „Against the grain : trade in musk deer products in Singapore and Malaysia", *TRAFFIC Southeast Asia*.

Palhares, R. M., Drummond, M. G., Brasil, B. D. S. A. F., *et al.* (2015) „Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality", *PLoS One*, 10(5), s. e0127866.

Palmer, J. D. & Herbon, L. A. (1988) „Plant mitochondrial DNA evolved rapidly in structure, but slowly in sequence", *J. Mol. Evol.*, 28(1–2), s. 87–97.

*Pandey, M. M., Rastogi, S. & Rawat, A. K. S. (2007) „*Saussurea costus*: Botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant", *J. Ethnopharmacol.*, 110(3), s. 379–390.

Pang, X., Liu, C., Shi, L., *et al.* (2012) „Utility of the trnH-psbA Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis", *PLoS One*, 7(11), s. e48833.

Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M. & Steinlechner, M. (2000) „Species identification by means of the cytochrome b gene", *Int. J. Legal Med.*, 114(1–2), s. 23–28.

Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., *et al.* (1994) „Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(11), s. 5022–5026.

Pereira, F., Carneiro, J., Matthiesen, R., *et al.* (2010) „Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences", *Nucleic Acids Res.*, 38(22), s. e203.

Peyachoknagul, S., Mongkolsiriwatan, C., Wannapinpong, S., Huehne, P. S. & Srikulnath, K. (2014) „Identification of native *Dendrobium* species in Thailand by PCR-RFLP of rDNA-ITS and chloroplast DNA", *ScienceAsia*, 40(2), s. 113–120.

Piggee, C. A., Muth, J., Carrilho, E. & Karger, B. L. (1997) „Capillary electrophoresis for the detection of known point mutations by single-nucleotide primer extension and laser-induced fluorescence detection", *J. Chromatogr. A*, 781(1–2), s. 367–375.

Porter, T. M. & Hajibabaei, M. (2018) „Over 2.5 million COI sequences in GenBank and growing", *PLoS One*, 13(9), s. e0200177.

Pun, K. M., Albrecht, C., Castella, V. & Fumagalli, L. (2009) „Species identification in mammals from mixed biological samples based on mitochondrial DNA control region length polymorphism", *Electrophoresis*, 30(6), s. 1008–1014.

Rai, V., Kakkar, P., Khatoon, S., Rawat, A. K. S. & Mehrotra, S. (2001) „Heavy Metal Accumulation in Some Herbal Drugs", *Pharm. Biol.*, 39(5), s. 384–387.

*Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2007) „The Barcode of Life Data System", *Mol. Ecol. Notes*, 7, s. 355–364.

*Rhoads, A. & Au, K. F. (2015) „PacBio Sequencing and Its Applications", *Genomics, Proteomics Bioinforma.*, 13(5), s. 278–289.

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. & Wittwer, C. T. (1997) „Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction", *Anal. Biochem.*, 245(2), s. 154–160.

Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., *et al.* (2011) „An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing", *Nature*, 475(7356), s. 348–352.

Saccone, C., Attimonelli, M. & Sbisà, E. (1987) „Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA", *J. Mol. Evol.*, 26(3), s. 205–211.

*Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G. & Reyes, A. (1999) „Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system", *Gene*, 238(1), s. 195–209.

Saccone, C., Pesole, G. & Sbisà, E. (1991) „The Main Regulatory Region of Mammalian Mitochondrial DNA: Structure-Function Model and Evolutionary Pattern", *J. Mol. Evol.*, 33(1), s. 83–91.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., *et al.* (1988) „Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase", *Science*, 239(4839), s. 487–491.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* (1985) „Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia", *Science*, 230(4732), s. 1350–1354.

Saitou, N. & Nei, M. (1987) „The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.", *Mol. Biol. Evol.*, 4(4), s. 406–425.

Saitou, N. & Ueda, S. (1994) „Evolutionary rates of insertion and deletion in noncoding nucleotide sequences of primates.", *Mol. Biol. Evol.*, 11(3), s. 504–512.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74(12), s. 5463–5467.

Saskova, L., Votrubova, J. & Vanek, D. (2017) „Rapid classification of unknown biological material using a novel triplex assay", *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, 6, s. e132–e134.

Satoh, M. & Kuroiwa, T. (1991) „Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell", *Exp. Cell Res.*, 196(1), s. 137–140.

Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., *et al.* (2019) „GenBank", *Nucleic Acids Res.*, 47(D1), s. D94–D99.

Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G. & Saccone, C. (1997) „Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: Identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications", *Gene*, 205(1), s. 125–140.

- Schaneberg, B. T. & Khan, I. A. (2004) „Analysis of products suspected of containing *Aristolochia* or *Asarum* species", *J. Ethnopharmacol.*, 94(2–3), s. 245–249.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995) „Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray", *Science*, 270(5235), s. 467–470.
- Sentandreu, M. A., Fraser, P. D., Halket, J., Patel, R. & Bramley, P. M. (2010) „A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes", *J. Proteome Res.*, 9(7), s. 3374–3383.
- Shalon, D., Smith, S. J. & Brown, P. O. (1996) „A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization", *Genome Res.*, 6(7), s. 639–645.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., *et al.* (1986) „The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression", *EMBO J.*, 5(9), s. 2043–2049.
- Shum, K. C., Chen, F., Li, S. L., *et al.* (2007) „Authentication of *Radix Aucklandiae* and its substitutes by GC-MS and hierarchical clustering analysis", *J. Sep. Sci.*, 30(18), s. 3233–3239.
- Singh, A., Gaur, A., Shailaja, K., Bala, B. S. & Singh, L. (2004) „A novel microsatellite (STR) marker for forensic identification of big cats in India", *Forensic Sci. Int.*, 141(2–3), s. 143–147.
- Smith, K. M., Anthony, S. J., Switzer, W. M., *et al.* (2012) „Zoonotic viruses associated with illegally imported wildlife products", *PLoS One*, 7(1), s. e29505.
- *Still, J. (2003) „Use of animal products in traditional Chinese medicine: Environmental impact and health hazards", *Complement. Ther. Med.*, 11(2), s. 118–122.
- *Taberlet, P., Coissac, E. & Pompanon, F. (2012) „Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding", *Mol. Ecol.*, 21(8), s. 2045–2050.
- Tautz, D. & Renz, M. (1984) „Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes", *Nucleic Acids Res.*, 12(10), s. 4127–4138.
- Thakur, M., Javed, R., Kumar, V. P., *et al.* (2017) „DNA forensics in combating food frauds: A study from China in identifying canned meat labelled as deer origin", *Curr. Sci.*, 112(12), s. 2449–2452.
- Tobe, S. S., Kitchener, A. C. & Linacre, A. M. T. (2010) „Reconstructing mammalian phylogenies: A detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit i mitochondrial genes", *PLoS One*, 5(11), s. e14156.
- Tobe, S. S., Kitchener, A. & Linacre, A. (2009) „Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification-An answer to the debate", *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, 2(1), s. 306–307.
- Travers, K. J., Chin, C. S., Rank, D. R., Eid, J. S. & Turner, S. W. (2010) „A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection", *Nucleic Acids Res.*, 38(15), s. e159.
- Tully, G., Sullivan, K. M., Nixon, P., Stones, R. E. & Gill, P. (1996) „Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing", *Genomics*, 34(1), s. 107–113.
- Tzen, C. Y., Wu, T. Y. & Liu, H. F. (2001) „Sequence polymorphism in the coding region of mitochondrial genome encompassing position 8389-8865", *Forensic Sci. Int.*, 120(3), s. 204–209.
- Ugwudike, P. O., Okaka A. N., Ezeonu, F. E. & Neboh Emeka, E. (2013) „Python fat : effect on collagen levels of human keloid tissue .", *Int. J. Biol. Med. Res.*, 4(2), s. 3219–3221.
- Uryu, N., Maeda, M., Ota, M., Tsuji, K. & Inoko, H. (1990) „A simple and rapid method for HLA-DRB and -DQB typing by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases", *Tissue Antigens*, 35(1), s. 20–31.
- Verma, S. K. & Singh, L. (2003) „Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application", *Mol. Ecol. Notes*, 3(1), s. 28–31.
- Viñas, J. & Tudela, S. (2009) „A Validated Methodology for Genetic Identification of Tuna Species (Genus *Thunnus*)", *PLoS One*, 4(10), s. e7606.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., *et al.* (1995) „AFLP: A new technique for DNA fingerprinting", *Nucleic Acids Res.*, 23(21), s. 4407–4414.
- *Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. (1991) „Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material", *Biotechniques*, 10(4), s. 506–513.
- Wan, Q. H. & Fang, S. G. (2003) „Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species", *Forensic Sci. Int.*, 131(1), s. 75–78.
- Wang, H. Y., Tsai, M. P., Tu, M. C. & Lee, S. C. (2000) „Universal primers for amplification of the complete mitochondrial 12S rRNA gene in vertebrates", *Zool. Stud.*, 39(1), s. 61–66.
- *Wang, L., Ding, H., Yu, H., *et al.* (2015) „Cistanches Herba: Chemical Constituents and Pharmacological Effects", *Chinese Herb. Med.*, 7(2), s. 135–142.
- Wang, L., Xiao, H., Liang, X. & Wei, L. (2007) „Identification of phenolics and nucleoside derivatives in *Gastrodia elata* by HPLC-UV-MS", *J. Sep. Sci.*, 30(10), s. 1488–1495.
- *Wang, S., Yu, Z., Wang, C., *et al.* (2018) „Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and aquilaria plants", *Molecules*, 23(2), s. 342.
- Wassenaar, T. M. & Zou, Y. (2020) „2019_nCoV/SARS-CoV-2: rapid classification of betacoronaviruses and identification of Traditional Chinese Medicine as potential origin of zoonotic coronaviruses", *Lett. Appl. Microbiol.*, 70(5), s. 342–348.

- Weber, J. L. & May, P. E. (1989) „Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction", *Am. J. Hum. Genet.*, 44(3), s. 388–396.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990) „DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", *Nucleic Acids Res.*, 18(22), s. 6531–6535.
- Wilson-Wilde, L., Norman, J., Robertson, J., Sarre, S. & Georges, A. (2010) „Current issues in species identification for forensic science and the validity of using the cytochrome oxidase I (COI) gene", *Forensic Sci. Med. Pathol.*, 6(3), s. 233–241.
- Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteent, J. G. & Pryor, R. J. (2003) „High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen", *Clin. Chem.*, 49(6), s. 853–860.
- Wolfe, K. H., Li, W. H. & Sharp, P. M. (1987) „Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84(24), s. 9054–9058.
- Wu, C. C., Lu, Y. C., Chen, P. J., *et al.* (2009) „Application of SNaPshot multiplex assays for simultaneous multigene mutation screening in patients with idiopathic sensorineural hearing impairment", *Laryngoscope*, 119(12), s. 2411–2416.
- Wu, H., Wan, Q. H., Fang, S. G. & Zhang, S. Y. (2005) „Application of mitochondrial DNA sequence analysis in the forensic identification of Chinese sika deer subspecies", *Forensic Sci. Int.*, 148(2–3), s. 101–105.
- Wu, T. N., Yang, K. C., Wang, C. M., *et al.* (1996) „Lead poisoning caused by contaminated Cordyceps, a Chinese herbal medicine: Two case reports", *Sci. Total Environ.*, 182(1–3), s. 193–195.
- Xie, P., Chen, S., Liang, Y. Z., *et al.* (2006) „Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine", *J. Chromatogr. A*, 1112(1–2), s. 171–180.
- *Xu, L., Guan, J., Lau, W. & Xiao, Y. (2016) „An Overview of Pangolin Trade in China", *Beijing, TRAFFIC*.
- Xu, Y., Song, W., Zhou, P., Li, P. & Li, H. (2015) „Morphological and microscopic characterization of five commonly-used testacean traditional Chinese medicines", *Acta Pharm. Sin. B*, 5(4), s. 358–366.
- Yan, C. X., Li, B., Wan, S. L., *et al.* (2005) „Individualization of tiger by using microsatellites", *Forensic Sci. Int.*, 151(1), s. 45–51.
- Yan, D., Luo, J. Y., Han, Y. M., *et al.* (2013) „Forensic DNA Barcoding and Bio-Response Studies of Animal Horn Products Used in Traditional Medicine", *PLoS One*, 8(2), s. e55854.
- Yang, D. Y., Eng, B., Wayne, J. S., Dudar, J. C. & Saunders, S. R. (1998) „Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns", *Am. J. Phys. Anthropol.*, 105(4), s. 539–543.
- Yang, L., Tan, Z., Wang, D., *et al.* (2014) „Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis", *Sci. Rep.*, 4, s. 4089.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., *et al.* (2010) „Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals", *PLoS One*, 5(10), s. e13102.
- Ye, Z., Dai, J. R., Zhang, C. G., *et al.* (2017) „Chemical Differentiation of *Dendrobium officinale* and *Dendrobium devonianum* by Using HPLC Fingerprints, HPLC-ESI-MS, and HPTLC Analyses", *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, 2017.
- Yu, J., Xue, J. H. & Zhou, S. L. (2011) „New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms", *J. Syst. Evol.*, 49(3), s. 176–181.
- Yu, K. Z., Liu, J., Guo, B. L., *et al.* (2014) „Microscopic research on a multi-source traditional Chinese medicine, Astragali Radix", *J. Nat. Med.*, 68(2), s. 340–350.
- Yuan, M. & Hong, Y. (2003) „Heterogeneity of Chinese medical herbs in Singapore assessed by fluorescence AFLP analysis", *Am. J. Chin. Med.*, 31(5), s. 773–779.
- Zahra, A., Hussain, B., Jamil, A., Ahmed, Z. & Mahboob, S. (2018) „Forensic STR profiling based smart barcode, a highly efficient and cost effective human identification system", *Saudi J. Biol. Sci.*, 25(8), s. 1720–1723.
- Zehner, R., Zimmermann, S. & Mebs, D. (1998) „RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: Methodology and forensic application", *Int. J. Legal Med.*, 111(6), s. 323–327.
- Zhang, S., Zhang, Y. J., Liu, X. Z., Zhang, H. & Liu, D. S. (2013) „On the reliability of DNA sequences of *Ophiocordyceps sinensis* in public databases", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 40(3–4), s. 365–378.
- Zhao, S. P., Zhang, D., Tan, L. H., Yu, B. & Cao, W. G. (2016) „Analysis of aflatoxins in traditional Chinese medicines: Classification of analytical method on the basis of matrix variations", *Sci. Rep.*, 6, s. 1–9.
- Zhao, Y., Han, B., Peng, H., *et al.* (2017) „Identification of “Huoshan shihu” Fengdou: Comparative authentication of the Daodi herb *Dendrobium huoshanense* and its related species by macroscopic and microscopic features", *Microsc. Res. Tech.*, 80(7), s. 712–721.
- Zhao, Z. Z., Hu, Y. N., Wong, Y. W., *et al.* (2005) „Application of microscopy in authentication of Chinese Patent Medicine - Bo Ying Compound", *Microsc. Res. Tech.*, 67(6), s. 305–311.
- Zhu, S., Fushimi, H. & Komatsu, K. (2008) „Development of a DNA microarray for authentication of ginseng drugs based on 18S rRNA gene sequence", *J. Agric. Food Chem.*, 56(11), s. 3953–3959.

Internetové zdroje

Bold Systems V4 (2020). Dostupné z: <http://www.boldsystems.org/> (Viděno: 25. duben 2020).

Fakultní nemocnice Hradec Králové (2020). Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/> (Viděno: 17. únor 2020).

Chatzky, A. & McBride, J. (2020) *China's Massive Belt and Road Initiative*. Dostupné z: <https://www.cfr.org/background/chinas-massive-belt-and-road-initiative> (Viděno: 26. únor 2020).

Checklist of CITES species (2020). Dostupné z: <http://checklist.cites.org/#/en> (Viděno: 27. únor 2020).

CITES.es - Portal of the CITES management authority in Spain (2020). Dostupné z: <http://www.cites.es/en/Pages/default.aspx> (Viděno: 13. duben 2020).

AOPK ČR (2020). Dostupné z: <http://www.ochranaprirody.cz/> (Viděno: 30. leden 2020).

ČIŽP (2020). Dostupné z: <http://www.cizp.cz/> (Viděno: 30. leden 2020).

Oxford Nanopore Technologies (2020). Dostupné z: <https://nanoporetech.com/> (Viděno: 20. únor 2020).

GenBank Overview (2020). Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Viděno: 25. duben 2020).

TCM World (2020). Dostupné z: <https://www.tcmworld.org/> (Viděno: 25. únor 2020).

Illumina (2020). Dostupné z: <https://www.illumina.com/> (Viděno: 21. únor 2020).

IUCN Red List of Threatened Species (2020). Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/> (Viděno: 27. únor 2020).

The Journal of Chinese Medicine & Traditional Chinese Medicine (2020). Dostupné z: <https://www.jcm.co.uk/> (Viděno: 7. březen 2020).

Klouček, O. (2017) *CITES-základní informace*. Dostupné z: https://www.mzp.cz/cz/cites_obchod_ohrozenymi_druhy (Viděno: 30. leden 2020).

Kuo, L. & Kommenda, N. (2018) *What is China's Belt and Road Initiative?* Dostupné z: <https://www.theguardian.com/cities/ng-interactive/2018/jul/30/what-china-belt-road-initiative-silk-road-explainer> (Viděno: 26. únor 2020).

Loxodonta Localizer (2020). Dostupné z: <https://www.loxodontalocalizer.org/> (Viděno: 25. duben 2020).

Medicinal Materials DNA Barcode Database (2020). Dostupné z: <https://rdccm.cuhk.edu.hk/mherbsdb/> (Viděno: 25. duben 2020).

Munton-Baker, C. (2019) *Traditional Chinese medicine is driving extinction*. Dostupné z: <https://southeastasiaglobe.com/prescription-for-extinction/> (Viděno: 25. únor 2020).

European Commission - Environment (2019). Dostupné z: https://ec.europa.eu/environment/index_en.htm (Viděno: 12. duben 2020).

Save the Rhino International (2020). Dostupné z: <https://www.savetherhino.org/> (Viděno: 9. březen 2020).

PacBio (2020). Dostupné z: <https://www.pacb.com/> (Viděno: 23. duben 2020).

The Differences between EU and CITES Provisions in a Nutshell (2020). Dostupné z: https://ec.europa.eu/environment/cites/legislation_en.htm (Viděno: 30. leden 2020).

Traditional Chinese Medicine in China, The State Council Information Office of the People's Republic of China (2016). Dostupné z: http://english.www.gov.cn/archive/white_paper/2016/12/06/content_281475509333700.htm (Viděno: 9. březen 2020).

TRAFFIC (2020). Dostupné z: <https://www.traffic.org/> (Viděno: 4. březen 2020).

TRAFFIC India (2011) *A Review of the Status of Saussurea costus (Nineteenth meeting of the Plants Committee)*. Dostupné z: <https://www.cites.org/sites/default/files/common/com/pc/19/E19i-07.pdf>. (Viděno: 6. březen 2020).

CITES (2020). Dostupné z: <https://www.cites.org/> (Viděno: 30. leden 2020)

ATCM | Traditional Chinese Medicine & Acupuncture (2020). Dostupné z: <https://www.atcm.co.uk/> (Viděno: 16. únor 2020).

Lehmacher, W. (2016) *Wildlife crime: a \$23 billion trade that's destroying our planet*. Dostupné z: <https://www.weforum.org/agenda/2016/09/fighting-illegal-wildlife-and-forest-trade/> (Viděno: 25. únor 2020).

Yiran, Z. (2019) *A healthy way of nursing the world*. Dostupné z: <https://www.chinadaily.com.cn/a/201908/12/WS5d50a0b6a310cf3e35565167.html> (Viděno: 17. únor 2020).

Zákon č. 40/2009 Sb – Trestní zákoník (2009). Dostupné z: <http://zakony.centrum.cz/trestni-zakonik/> (Viděno: 23. březen 2020).