

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

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Jana Mat'átková**

**Porovnání metod druhové identifikace (barcoding) živočichů**

The comparison of animal species determination (barcoding) methods

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D

Praha, 2024

## **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, 29. 4. 2024

Podpis

### **Poděkování**

Chtěla bych upřímně poděkovat svému školiteli RNDr. Danielu Vaňkovi, Ph.D za jeho cenné rady, rychlou komunikaci a hlavně za čas, který věnoval mé bakalářské práci při kontrolách. Zároveň bych chtěla vyjádřit poděkování mé rodině a přátelům, kteří mi poskytovali podporu a porozumění během mého studia.

## **Abstrakt**

Druhová identifikace je klíčovým prvkem v mnoha vědních oborech, od studia diverzity až po forenzní vědy a potravinářský průmysl. Tradiční morfologické metody založené na vizuálním rozlišení anatomických rysů často narážejí na limity spojené s určováním morfologicky podobných živočichů. S nástupem molekulárních metod se však objevila nová perspektiva, a to analýza DNA, která nabízí vyšší přesnost a nezávislost na vnějších faktorech. V této bakalářské práci je popsán podrobný přehled a srovnání různých molekulárních metod, které slouží k identifikaci živočichů. Zaměřuje se na důkladné zhodnocení principů fungování těchto metod a jejich efektivity. Zvláštní pozornost je věnována cílovým sekvencím spojeným s DNA barcodingem, jeho univerzálnímu využití a omezením, která mohou vzniknout v závislosti na konkrétním druhu živočichů. Důležitým prvkem úspěšné identifikace je existence a využívání databází, které slouží jako zdroj referenčních dat pro porovnání sekvencí z neznámých vzorků.

## **Klíčová slova**

druhová identifikace, DNA barcoding, molekulární metody, cílové sekvence, databáze

## **Abstract**

Species identification is the key element in many scientific fields, from diversity studies to forensic science and the food industry. Traditional morphological methods based on the visual distinction of anatomical features often encounter limits associated with distinguishing morphologically similar animals. However, with the rise of molecular methods, a new perspective has emerged, namely DNA analysis, which offers higher accuracy and independence from external factors. This bachelor's thesis presents a detailed overview and a comparison of various molecular methods used to identify animals. It focuses on a thorough evaluation of the principles of these methods and their effectiveness. Special attention is paid to target sequences associated with DNA barcoding, its universal use and limitations that may arise depending on specific animal species. An important element of successful identification is the existence and use of databases that serve as a source of reference data to compare sequences from unknown samples.

## **Keywords**

species identification, DNA barcoding, molecular methods, target sequences, databases

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. DNA barcoding</b> .....	<b>2</b>
2.1. <i>Cílové sekvence</i> .....	2
2.1.1. <i>Cílová sekvence u živočichů</i> .....	2
2.1.1.1. CO1 .....	2
2.1.1.2. Alternativní cílové sekvence .....	3
2.1.1.3. Mini-barcodes.....	3
2.1.2. <i>Cílová sekvence u rostlin</i> .....	4
2.1.2.1. ITS – internal transcribed spacer.....	4
2.1.2.2. Mat K – Maturáza K.....	4
2.1.2.3. RbcL .....	4
2.1.2.4. Specifické čárové kódy .....	5
<b>3. Metody používané pro identifikaci živočichů</b> .....	<b>5</b>
3.1. <i>Molekulární techniky založené na analýze DNA</i> .....	6
3.1.1. <i>Techniky založené na PCR</i> .....	7
3.1.1.1. RAPD .....	7
3.1.1.2. qPCR-HRMA .....	8
3.1.1.3. SPInDel .....	9
3.1.1.4. Délkový polymorfismus pro mtDNA.....	9
3.1.1.5. SNaPshot .....	10
3.1.2. <i>Metody založené na kombinaci PCR a restrikčních endonukleáz</i> .....	10
3.1.2.1. PCR-RFLP .....	10
3.1.2.2. AFLP .....	11
3.1.3. <i>Metody využívající izotermální reakci</i> .....	12
3.1.3.1. LAMP.....	12
3.1.4. <i>Metody založené na sekvenování</i> .....	14
3.1.4.1. Sangerovo sekvenování.....	14
3.1.4.2. NGS – Next generation sequencing, 2. generace sekvenování .....	14
3.1.4.2.1. Ion Torrent .....	15
3.1.4.2.2. Illumina.....	15
3.1.4.3. TGS – Third-generation sequencing .....	16
3.1.4.3.1. SMRT.....	16
3.1.4.3.2. Nanopórové sekvenování .....	17
<b>4. Porovnání molekulárních metod</b> .....	<b>17</b>
<b>5. Databáze sekvencí</b> .....	<b>19</b>
5.1. <i>GenBank</i> .....	19
5.2. <i>CBOL</i> .....	20
5.2.1. BOLD .....	20
<b>6. Závěr</b> .....	<b>21</b>
<b>7. Použitá literatura</b> .....	<b>22</b>

## Seznam použitých zkratek

<b>A, C, G, T</b>	adenin, cytosin, guanin, thymin	adenine, cytosine, guanine, thymine
<b>AFLP</b>	polymorfismus délky amplifikovaných úseků	Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>CBOL</b>	Konsorcium pro barcode života	Cornsortium for the Barcode of Life
<b>CO1</b>	gen pro cytochrom c oxidázy podjednotky I.	gene for cytochrome c oxidase subunit I.
<b>CO2</b>	gen pro cytochrom c oxidázy podjednotky II.	gene for cytochrome c oxidase subunit II.
<b>cyt b</b>	gen pro cytochrom b	gene for cytochrome b
<b>ddATP</b>	2',3'-dideoxyadenin trifosfát	2',3'-dideoxyadenosine triphosphate
<b>DDBJ</b>	DNA Data Bank of Japan	
<b>ddCTP</b>	2',3'-dideoxycytosin trifosfát	2',3'-dideoxycytidine triphosphate
<b>ddGTP</b>	2',3'-dideoxyguanin trifosfát	2',3'-dideoxyguanine triphosphate
<b>ddNTP</b>	2',3'-dideoxynukleotid trifosfát	2',3'-dideoxynucleotide triphosphate
<b>ddTTP</b>	2',3'-dideoxythimidin trifosfát	2',3'-dideoxythymidin triphosphate
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyseliny	deoxyribonucleic acid
<b>dNTP</b>	2'-deoxynukleosid trifosfát	2-deoxynucleoside triphosphate
<b>dsDNA</b>	dvouvláknová DNA	double stranded DNA
<b>EBI</b>	European Bioinformatics Institute	
<b>EMBL</b>	Evropská laboratoř pro molekulární biologii	European Molecular Biology Laboratory

<b>FIP</b>	forward inner primer	
<b>HRMA</b>	analýza bodů tání DNA	High Resolution Melting Analysis
<b>ITS</b>	Internal Transcribed Spacer	
<b>ITS2</b>	Internal Transcribed Spacer II.	
<b>INSDC</b>	International Nucleotide Sequence Database Collaboration	
<b>LAMP</b>	Izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou	Loop-mediated isothermal amplification
<b>mat K</b>	maturáza K	maturase K
<b>NCBI</b>	Národní centrum pro biotechnologické informace	National Center for Biotechnology Information
<b>NGS</b>	sekvenování nové generace	Next Generation Sequencing
<b>qPCR</b>	kvantitativní PCR	real-time PCR
<b>RAPD</b>	náhodná amplifikace polymorfní DNA	Randomly Amplified Polymorphic DNA
<b>rbcL</b>	gen pro velkou podjednotku ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylázy/oxygenázy	gene for the large subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
<b>RFLP</b>	polymorfismus délky restričních fragmentů	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
<b>rRNA</b>	ribosomální ribonukleová kyselina	ribosomal ribonucleic acid
<b>RuBisCO</b>	ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

<b>SMRT</b>	jednomolekulové sekvenování v reálném čase	single-molecule real-time sequencing
<b>SNP</b>	jednonukleotidový polymorfismus	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SPIInDel</b>	Identifikace druhů podle inzerce/delece	Species Identification by Insertions/Deletions
<b>ssDNA</b>	jednovláknová DNA	single stranded DNA
<b>TGS</b>	třetí generace sekvenování	Third Generation Sequencing
<b>ZNW</b>	vlnovod s nulovým režimem	zero-mode wave-guide

# 1. Úvod

Pro popsání diverzity života na Zemi v minulosti sloužil pouhý morfologický popis, který mohl být zkreslený mnohými faktory, jako je vnější prostředí, životní stádium jedince nebo subjektivní pozorování výzkumníka. Morfologické znaky druhu se mohou lišit u konkrétních jedinců v populaci nebo v rámci podnebného pásu, ve kterém se pohybují. S objevem molekulárních metod se tyto omezující limity zmírnily. Popis na základě unikátní sekvence DNA druhu vede k sestavení fylogenetického stromu, jenž spojuje evoluční poznatky se skutečnou morfologií. Na základě těchto poznatků se povedlo rozlišit zdánlivě podobné organismy, které se ale od sebe evolučně oddálily již před tisíci lety – proslulý případ cichlid v jezeře Malawi a Tanganika (Kocher D. Thomas et al. 1993).

Identifikace živočichů není nedílnou součástí pouze taxonomického určování, ale důležitou roli hraje i v rámci forenzního vyšetřování, kde sehrává klíčovou úlohu při odhalování nelegálního obchodu s chráněnými živočichy nebo nelegálně pěstovanými rostlinami (Iyengar 2014). Identifikace živočichů našla své uplatnění i v potravinářském průmyslu, kde odhaluje výrobce, kteří na svých produktech uvádějí podvodné informace nebo do nich dokonce přidávají chráněné druhy (Denyinghot et al. 2021). Tato nekalá praktika je často poháněna poptávkou tradiční čínské medicíny, která využívá chráněné živočichy jako surovinu pro výrobu některých léčivých přípravků (Yang et al. 2018).

Studium sekvence DNA našlo uplatnění i v zemědělském průmyslu, zejména při identifikaci škůdců, kde znalost jejich genetického složení je klíčová pro uplatnění ochranné strategie nebo zavedení preventivních opatření. Zemědělci neustále bojují s úhynem svých plodin, který pro ně může představovat značné ekonomické ztráty. Díky molekulárním metodám mohou riziko včasné rozpoznat a následně adekvátně reagovat (Tahir et al. 2018; Javal et al. 2021).

Jelikož se vědecká společnost snaží analýzy unifikovat, tak v roce 2003 Dr. Paul Hebert navrhl porovnávat univerzální sekvenci CO1, která by měla odrážet diverzitu všech skupin. Na základě těchto okolností vzešel nápad DNA barcodingu, který dokáže propojit sekvenci DNA s referenčním vzorkem v databázi. V podstatě funguje na podobném principu jako čárové kódy na zboží v obchodě, které po naskenování identifikují produkt (Hebert et al. 2003a; 2003b). Ve své bakalářské práci se zaměřuji právě na tuto metodiku. Popisuji molekulární techniky, kterými je možné docílit identifikace živočichů. Soustředím se na jejich výhody a nevýhody a popisuji jejich různé aspekty, podle kterých se výzkumníci rozhodují, jaká technika pro ně bude nejvhodnější.

## 2. DNA barcoding

Základním nástrojem DNA barcodingu je využití informace obsažené v jednom genovém segmentu, který je sdílený napříč všemi taxony. Optimální úsek by měl obsahovat DNA sekvenci, která je dostupná prostřednictvím univerzálních metod a zároveň dosahuje vhodné mutační rychlosti. Jinými slovy, mutace by měla postupovat dostatečně rychle, aby odhalila rozdíl mezi blízce příbuznými druhy, ale zároveň dostatečně pomalu, aby minimalizovala variabilitu na úrovni jedinců (Hebert et al. 2003a).

Princip DNA barcodingu může být přirovnán k „čárovým kódům“ v obchodech, které slouží k označení jednotlivých produktů a tím umožňují jednoduchou orientaci v sortimentu. V obchodech se kód skládá z 10 číslic na 11 možných pozicích, což nám poskytuje  $10^{11}$  možných variant. Genomické čárové kódy tvoří 4 nukleotidy, avšak jejich potenciální počet pozic je teoreticky nekonečný. Tímto vzniká širší pole teoretických variant než celkový počet druhů, který byl a je znám na Zemi (Hebert et al. 2003a).

### 2.1. Cílové sekvence

Výběr cílové sekvence s přihlédnutím k výše uvedeným kritériím dovedl Dr. Paula Heberta a jeho tým k mitochondriálnímu genomu (Hebert et al. 2003a). Mitochondriální genom umožňuje analýzu výhradně na exonech a současně je omezen při rekombinaci, přičemž na rozdíl od jaderného genomu využívá haploidní způsob dědičnosti a navíc se vyskytuje v mnohonásobně větším počtu kopií v buňce (Saccone et al. 1999).

#### 2.1.1. Cílová sekvence u živočichů

##### 2.1.1.1. CO1

Pro identifikaci živočichů se využívá univerzální sekvence – **cytochrom c oxidáza podjednotky I** ve směru  $5' \rightarrow 3'$  (označovaná CO1). Jedná se o 648 bp dlouhý fragment, který zahrnuje přibližně 40 % celkové délky genu (Hebert et al. 2003a). CO1 byla vybrána, protože je obklopena vysoce konzervativními úseky po obou stranách, na něž mohou nasedat univerzální primery umožňující snadnou amplifikaci a sekvenování (Folmer et al. 1994). V současné době se CO1 široce využívá při identifikaci některých skupin obratlovců (např. u ptáků a savců) a některých skupin bezobratlých, např. u hmyzu (Erpenbeck et al. 2006).

### 2.1.1.2. Alternativní cílové sekvence

Univerzální využití CO1 pro celou živočišnou říši se ovšem setkala s kritikou, neboť mnohé studie naznačují, že u některých druhů živočichů nevykazuje CO1 významnou mezidruhovou variabilitu (Nichols 2001; Erpenbeck et al. 2006). Proto v roce 2007 Amanda D. Roa a Felix A. H. Sperling detailně prostudovali sekvence napříč CO1-CO2, aby odhalili oblast, která by byla pro DNA barcoding vhodnější. Bohužel nenalezli žádnou jinou sekvenci o délce alespoň 600 bp, která by vykazovala dostatečnou míru variability. Proto navrhli, aby omezení CO1 u problematických druhů bylo kompenzováno hledáním alternativního cíle, případně aby sekvence CO1 byla doplněna o další molekulární marker (Roe a Sperling 2007).

Mezi takové druhy patří hlístice, houbovci a žahavci (Moura et al. 2008), žebernatky (Ortman et al. 2010), vložkovci (Signorovitch et al. 2006), které nevykazují dostatečnou míru diverzity CO1. Proto se při jejich studiu využívá alternativní sekvence **16S ribozomální RNA (rRNA)** (Shearer a Coffroth 2008).

Mezi další alternativy patří sekvence **cytochromu b (cyt b)**, která byla navržena pro identifikaci savců (Kocher et al. 1989). Při porovnání cyt b a CO1 u savců vykazují sekvence podobné výsledky. Cyt b ale navíc dosahuje nižší míry falešné positivity a vyšší diverzity v párech bází u kratších fragmentů. Při aplikování na jiné skupiny živočichů cyt b nedosahuje vhodné míry diverzity, aby mohl fungovat jako univerzální marker. (Tobe et al. 2010; Parson W. et al. 1999). Proto je potřeba vždy zvážit, který živočišný druh je předmětem studia, a na základě toho zvolit, jaký marker bude při výzkumu využit.

### 2.1.1.3. Mini-barcodes

Cílové sekvence uvedené výše se primárně využívají u nedávno nasbíraných vzorků nebo vzorků sbíraných metodami, při nichž se šetrně zacházelo s DNA. Rozsáhlé a cenné taxonomické znalosti jsou zachovány i v muzejních sbírkách. Většina těchto exemplářů nebyla původně shromážděna za účelem genetického výzkumu, a proto mohou obsahovat částečně degradovanou DNA nebo pouze malé stabilní fragmenty DNA (Hajibabaei et al. 2006). Vzhledem k tomu, že oprava DNA *in vitro* není příliš ekonomická ani účinná (Zimmermann et al. 2008), navrhl Dr. Mehrdad Hajibabaei využít tzv. **mini-barcodes**. Mini-barcodes představují malé fragmenty DNA dlouhé okolo 200 bp, které se porovnají v rámci užší skupiny. Z jeho výzkumu vyplývá, že úspěšnost identifikace je srovnatelná s dlouhými fragmenty s tím rozdílem, že nový přístup nemá univerzální využití (Hajibabaei et al. 2006).

### 2.1.2. Cílová sekvence u rostlin

Od počátku existuje snaha aplikovat DNA barcoding i v rámci fylogenetického výzkumu rostlin. Na rozdíl od živočichů, u kterých lze využít CO1, v případě rostlin neexistuje prozatím žádná univerzální sekvence, která by dosahovala adekvátní mutační rychlosti. Jediný případ, kde se CO1 setkala s úspěchem, jsou červené řasy (Saunders 2005).

#### 2.1.2.1. ITS – internal transcribed spacer

Pro identifikaci rostlin se využívá sekvence z jaderného genomu pro ribozom, konkrétně gen kódující 18S, 26S a 5.8S rRNA. Tyto sekvence jsou oddělené nekódujícími oblastmi nazývanými **internal transcribed spacer** (ITS). Pomocí ITS bylo identifikováno více než 21 tisíc druhů rostlin. Přesto ITS nebyla společností CBOL (Consortium for the Barcode of Life) doporučena pro univerzální využití. Brání tomu komplikace ITS, jako jsou paralogy genů a tvorba sekundárních struktur (CBOL Plant Working Group 2009). Jedním z alternativních způsobů, kterým lze předejít některým nevýhodám, je využití podjednotky **ITS2**. Přestože ITS2 má mnoho předností, není vhodnou volbou pro všechny rostliny. U některých rostlin úsek vykazuje vysokou míru vnitrodruhové variability (Chen et al. 2010; Zhang et al. 2015).

#### 2.1.2.2. Mat K – Maturáza K

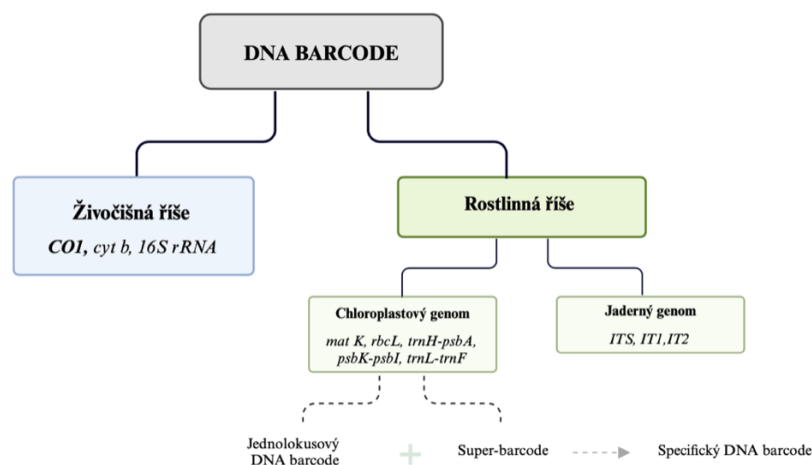
Další navrhovanou sekvencí je *matK* patřící mezi nejvíce se vyvíjející gen plastidu nevykazující významnou míru transverze ani transpozice. Gen *matK* je přibližně 1 570 bp dlouhý a kóduje protein maturázu. Kódující oblast je obvykle součástí intronu chloroplastového genu *trnK*, výjimkou jsou kapradiny, kde kóduje tRNALys (Neuhaus a Link 1987). *MatK* je vhodný při identifikaci nahosemenných i krytosemenných rostlin, avšak jeho všestrannému využití brání vyšší míra substituce (CBOL Plant Working Group 2009; Lahaye et al. 2008).

#### 2.1.2.3. RbcL

Další častou volbou při identifikaci je sekvence *rbcL*, která se nachází na plastidovém genomu mezi malou a velkou podjednotkou enzymu RuBisCO a dosahuje délky 1 430 bp (Brodie et al. 1998). Tato sekvence splňuje většinu požadovaných kritérií, aby mohla fungovat jako fylogenetický marker. Využívá se při identifikaci řas, výtrusných a nahosemenných rostlin. U některých rostlin však *rbcL* naráží na problém pomalé evoluční rychlosti (Chase et al. 2005).

#### 2.1.2.4. Specifické čárové kódy

V současné době se navrhuje využít tzv. **specifické čárové kódy**, které jsou kompromisem mezi jednolokusovými markery a sekvenováním celého genomu. Specifické čárové kódy jsou vybrány přímo na plastidových genomech cílových čeledí nebo druhů. Díky tomu je možné se vyhnout problémům při PCR a zároveň navrhnout metodu, která je optimalizována pro laboratoře s horším vybavením (Li et al. 2015).

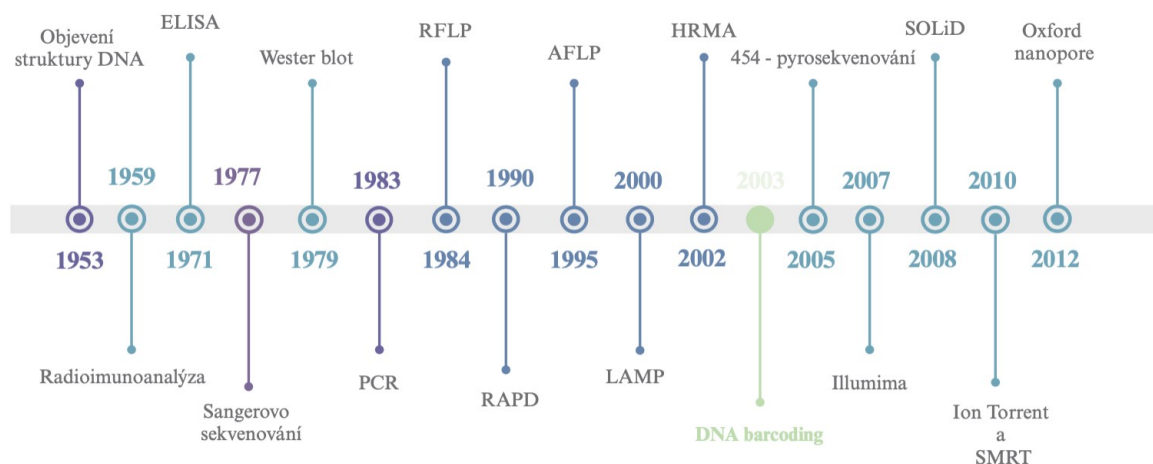


**Obr. 1:** Schéma DNA barcode pro živočišnou a rostlinnou říši.

*přepřacováno podle:* (Letsiou et al. 2024)

### 3. Metody používané pro identifikaci živočichů

Před objevem molekulárních metod nebylo možné analyzovat sekvence DNA, natož je porovnávat s referenční databází. Mezi hlavní nástroje identifikace patřily morfologické klíče, podle nichž bylo možné rozpoznat daný druh. Jak již bylo uvedeno, morfologický popis má svá omezení a nemusí odrážet skutečnou příbuznost. V historii se postupně začaly využívat mikroskopické techniky, které mohly odhalit rozdíl vysoce příbuzných živočichů, ale vždy se mohlo jednat například o vliv vnějšího prostředí. Proto se začaly využívat i jiné metody založené na chemické analýze nebo proteomice. Při vytváření referenčního vzorku je vhodné kombinovat tento postup s molekulárními metodami, aby bylo o vzorku nashromážděno co nejvíce možných informací. S objevem Sangerova sekvenování a PCR se dostaly do popředí molekulární metody založené na analýze DNA.



**Obr. 2.:** Časová osa vývoje molekulární biologie, vlastní zpracování

### 3.1. Molekulární techniky založené na analýze DNA

Postup při identifikaci živočichů zahrnuje několik klíčových kroků, které vedou k přesnému určení jedince či druhu. Prvním krokem je odběr vzorku, který je možné získat prakticky z jakýchkoliv buněk, v nichž je zachovaná DNA. Pokud se jedná o jednobuněčný organismus, je vhodné odebrat celého jedince. V tomto případě se musí počítat s častější nežádoucí kontaminací – zbytky potravy, symbionty, případně i parazity. Pro samotnou analýzu postačí přibližně 10 – 20 mg vzorku. Pokud odběr neprobíhá přímo v laboratoři, je nutné buňky zafixovat. Zafixováním se pozastaví biochemické procesy, ale přitom nedojde k výrazné degradaci DNA. Existují mnohé metody fixování, včetně použití chemických fixačních látek, zamrazení nebo uchování ve speciálních médiích.

Po odběru následuje izolace DNA z buněk. Buňky jsou přeneseny do vhodné mikrozkušavky a jsou k nim přidány detergenty, které mají schopnost rozrušovat buněčnou membránu a uvolnit DNA z buněk. Spolu s DNA se uvolní i RNA, proteiny, enzymy a další látky, které by mohly bránit následné analýze. Proto je nutné tyto látky degradovat přidáním RNáz a proteáz. Samotnou purifikaci DNA lze provádět více způsoby, – fenol-chloroformovou extrakcí (Barnett a Larson 2012), Chelexem (Walsh P. Sean et al. 1991) nebo adsorpcí na silikáty (Todorova et al. 2002). Další kroky při identifikaci se rozcházejí v závislosti na využívané metodě. Právě těmto odlišnostem se budu věnovat v následujících podkapitolách.

### 3.1.1. Techniky založené na PCR

Do roku 1983 bylo prakticky nemožné namnožit úsek DNA, dokud Kary B. Mullis nepřišel s vylepšením **polymerázové řetězcové reakce (PCR)**, která umožnila *in vitro* amplifikovat specifické úseky DNA. Princip této metody spočívá ve třech klíčových krocích. Prvním je denaturace čisté dsDNA při teplotě 94 – 98 °C po dobu 20 – 30 sekund. Tím dochází k rozrušení vodíkových můstků mezi oběma vlákny za vzniku jednovláknové ssDNA, která je schopná následně navázat specifické primery. Druhým krokem je hybridizace, při níž se sníží teplota na 50 – 60 °C, což umožní vazbu mezi specifickými sekvencemi a primery. V posledním kroku se teplota opět zvyšuje podle teplotního optima DNA polymerázy, která nasedá na -OH 3' konce primerů, kde začne syntetizovat komplementární vlákno na základě templátu. Obvykle se využívá Taq polymeráza, která vyžaduje teplotu mezi 75 – 80 °C. Opakováním cyklů lze získat velké množství nově nasyntetizovaných molekul dsDNA. Výpočet probíhá pomocí vzorce  $2^n - 1$ , kdy  $n$  je počet cyklů. Na základě tohoto výpočtu je teoreticky možné již při 30. cyklu získat více než 1 milion nových molekul DNA (Mullis 1990).

#### 3.1.1.1. RAPD

Molekulární technika **Random Amplification Polymorphic DNA** (zkráceně RAPD) využívá při PCR reakci nnespecifické primery dlouhé mezi 8 – 12 nukleotidy, které se na DNA vážou náhodně. Takto amplifikovaný vzorek je nanesen na gelovou elektroforézu a vizualizován. V rámci RAPD se pozorují mutace, inserce nebo delece charakteristické pro daný živočišný druh (Williams et al. 1990; Lynch a Milligan 1994). Mutace se projeví absencí na gelové elektroforéze, neboť tento úsek nebyl amplifikován. Inserce spočívá v přidání nukleotidů do sekvence a při vizualizaci se projeví delším fragmentem. Opakem je delece, která obsahuje méně nukleotidů a tudíž má i kratší fragment.

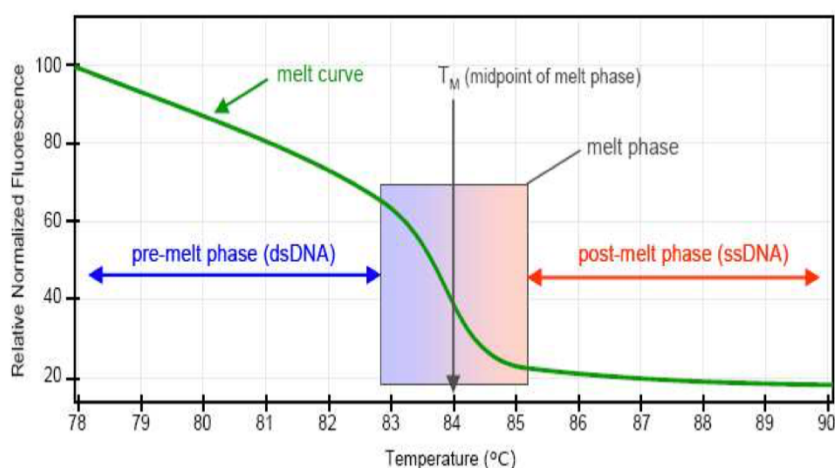
Používání metody RAPD bylo doporučeno k identifikaci živočichů výzkumnou skupinou Dr. Mu-Chia Huanga, která se zaměřovala na ptáky. Prokázali, že RAPD je vysoce efektivní a dostatečná pro jejich identifikaci (Huang et al. 2003). Jako vhodná se metoda ukázala i při DNA barcodingu ryb z rodu *Epinephelus* (Noikotr et al. 2013) a při identifikaci červeného masa (Koh et al. 1998). V současnosti existují alternativní metody, které využívají specifické primery, a tato metoda se již příliš nevyužívá. Metoda RAPD má mnoho nevýhod – náhodné primery jsou dominantní, to znamená, že nedokáží odlišit heterozygota od homozygota (Kumar et al. 2009). Postup se sice špatně replikuje, ale zato teoreticky odráží variabilitu celého genomu

(Koh et al. 1998). Zároveň se ukázalo, že přesnost analýzy je závislá na kvalitě vzorku, a proto není vhodné používat degradovanou DNA (Lee a Changb 1994).

### 3.1.1.2. qPCR-HRMA

Metoda kombinuje qPCR (real-time PCR) a HRMA (High Resolution Melting Analysis). Při qPCR se využívá standardní PCR reakce s tím rozdílem, že se sleduje amplifikace cílové molekuly v reálném čase. Na molekuly DNA jsou navázané specifické fluorescenční sondy, které jsou analyzovány po každém cyklu PCR. Sonda se naváže do sekvence DNA a tím se aktivuje fluorofor, čímž dojde k fluorescenci, která je detekována (Higuchi et al. 1992).

HRMA zaznamenává s vysokou přesností křivku teploty tání. Princip spočívá v postupném zvyšování teploty, při které se DNA postupně denaturuje. Pokud se na sekvenci nachází mutace v heterozygotní podobě, tak dochází ke špatnému párování. Taková oblast je nestabilní a denaturuje se při nižší teplotě tání. Pokud má DNA mutaci v homozygotní podobě, projeví se to posunem křivky tání oproti standardní křivce (Wittwer et al. 2003). Jelikož se HRMA využívá spolu s qPCR, tak při denuraci je uvolněna fluorescence, která je detektorem zaznamenána. HRMA je natolik senzitivní, že umožňuje rozpoznat o jakou záměnu nukleotidů se jedná. Největší teplotní změna (0,5 °C) se vyskytuje při substituci C → T a G → A, jedná se také o nejčastější záměnu. Naopak nejmenší teplotní změny sebou nese substituce A → T, která je méně častá (Venter et al. 2001).



**Obr. 3:** Křivka tání při qPCR – HRMA, zahrnuje tři fáze: 1. pre-melt – výskyt pouze dsDNA, intenzita fluorescence je nejvyšší, 2. melt (fáze tání) – částečně dsDNA a částečně ssDNA, velký pokles fluorescence, 3. post-melt pouze ssDNA s minimální fluorescencí.

*Převzaté:* (Bassam et al. 2006)

PCR-HRMA byla úspěšně využita při identifikaci masitých výrobků v Thajsku, kde identifikovala 100 % vzorků. Vykazuje tedy vysokou detekční schopnost, ale vyžaduje speciální vybavení a profesionální obsluhu (Denyinghot et al. 2021). Umožňuje rychlou a ekonomicky výhodnou volbu pro studium mutací (Er a Chang 2012). Metoda našla své uplatnění i při rozlišování parazitických roztočů napadajících larvy včel (Del Cont et al. 2021).

### 3.1.1.3. SPInDel

Metoda **SPecies Identification by Insertions/Deletions** zkráceně SPInDel, představuje inovativní přístup v taxonomii, který umožňuje identifikovat živočišné druhy prostřednictvím analýzy genu kódující ribozomální RNA (rRNA). Studované sekvence obsahují vysoce konzervované oblasti, které jsou střídány s hypervariabilními oblastmi. Hypervariabilní oblasti se vyznačují vysokým výskytem inserce a delece, na něž se metoda SPInDel soustředí (Pereira et al. 2010).

Metoda spočívá ve vybrání vhodných PCR-primerů, které se vážou do konzervovaných úseků rRNA. Tyto sekvence jsou konzervované napříč různými druhy, což zajišťuje sekvenční stálost. Během následného PCR jsou vytvořeny fragmenty různých délek, které jsou vizualizovány pomocí kapilární nebo gelové elektroforézy. Výsledkem je SPInDel profil, který je porovnán s referenční databází, která je dostupná prostřednictvím softwaru SPInDel workbench. Tento software umožňuje snadnou analýzu založenou na porovnání délek fragmentů (Pereira et al. 2010; Carneiro et al. 2012).

Jedním z benefitů SPInDel je jeho schopnost pracovat s genetickým materiálem různé kvality. To znamená, že může být uplatněn pro směsné vzorky nebo vzorky s částečně degradovanou DNA. Využívá se při prokazování přítomnosti zvířete na místě trestného činu. Takto byl odhalen případ pytláka, u kterého se prokázala přítomnost krve chráněné kozy na kalhotách (Pereira et al. 2019). Díky jednoduchému konceptu může být SPInDel využíván i pro vysokokapacitní analýzu s nízkými náklady na vzorek (Pereira et al. 2010; Alves et al. 2017).

### 3.1.1.4. Délkový polymorfismus pro mtDNA

Kontrolní oblast mitochondriálního DNA je bohatá na přítomnost indelů a tandemových repetitiv, což vede k délkovým polymorfismům, které se napříč savci liší (Pun et al. 2009; Fumagalli et al. 1996). Metoda spočívá v jednoduchém postupu, při kterém je amplifikována levá doména kontrolní oblasti mtDNA pomocí jednoho páru primerů. Získané fragmenty jsou následně odděleny gelovou nebo kapilární elektroforézou (Pun et al. 2009).

Metoda se využívá zejména pro směsné vzorky, neboť podle jednotlivých délek polymorfismů lze od sebe odlišit konkrétní živočichy. Postup je rychlý a jednoduše reprodukovatelný. Metoda založená na studiu délkových polymorfismů mtDNA umožňuje analýzu problematických vzorků, které mají degradovanou nebo nízkou koncentraci DNA, s vysokou citlivostí (Pun et al. 2009; Imaizumi et al. 2007). V mnoha případech byla tato metoda, použita pro průkaz specifického živočišného materiálu ve vztahu k trestnému činu (Fumagalli et al. 2009).

### **3.1.1.5. SNaPshot**

Metoda **SNaPshot** nabízí efektivní způsob detekce jednobodových polymorfismů (SNP) napříč celým genomem. Klíčovým principem je použití speciálně navržených primerů, které končí těsně před očekávaným SNP. Do SNaPshot reakce jsou přidávány pouze fluorescenčně označené dideoxynukleotidy (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), kde každý má přiřazenou jinou fluorescenční barvu. Důležité je, že přidáním dideoxynukleotidů dojde ihned k inhibici elongace, neboť na svém 3' konci neobsahují -OH skupinu, která by sloužila jako „očko“ pro navázání dalšího nukleotidu. Obvykle na 5' konci primeru existuje nekomplementární extenze, která prodlužuje délky fragmentů, aby se daly lépe rozlišovat. Poté již následuje kapilární elektroforéza, která umožňuje detekci jednotlivých SNP (Kuppuswamy et al. 1991; Piggee et al. 1997).

Metoda se stala vhodnou pro částečně degradovanou DNA, jelikož je vysoce citlivá a ekonomicky přijatelná. SNaPshot je snadno reprodukovatelný a poskytuje jednoznačný výsledek. Metoda byla úspěšně aplikována při určování slonoviny a celkovém určení druhového původu slonů (Kitpipit et al. 2017). Nalezla též uplatnění i při dalších studiích – identifikace much (Park et al. 2018) nebo kočkovitých šelem (Kitpipit et al. 2012). Ukazuje se, že je cenově dostupnější než sekvenování a disponuje i podobnou přesností (Park et al. 2018).

## **3.1.2. Metody založené na kombinaci PCR a restrikčních endonukleáz**

### **3.1.2.1. PCR-RFLP**

Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism je molekulární metoda, která umožňuje detailní analýzu DNA prostřednictvím restrikčních endonukleáz. Tato metoda používá kombinaci dvou klíčových postupů: PCR pro amplifikaci úseků DNA a RFLP k analýze délek fragmentů po jejich štěpení restrikčními endonukleázami. Enzymy jsou schopné rozpoznat restrikční místa a štěpit DNA na menší fragmenty. Tyto

restrikční oblasti obvykle obsahují palindromatické<sup>1</sup> sekvence o délce 4 – 6 bp (Kelly a Smith 1970). Po restrikci mohou vznikat dva typy konců – tupý a kohezní. Tupé konce vznikají, když je DNA štěpena na obou vláknech ve stejném místě, zatímco u kohezních konců vzniká jednovláknový převis. Následně je vzorek nanesen na gelovou elektroforézu, kde jsou jednotlivé fragmenty seřazeny podle velikosti. Po vizualizaci a analýze je možné stanovit přesné délky DNA a identifikovat podle nich konkrétního živočicha.

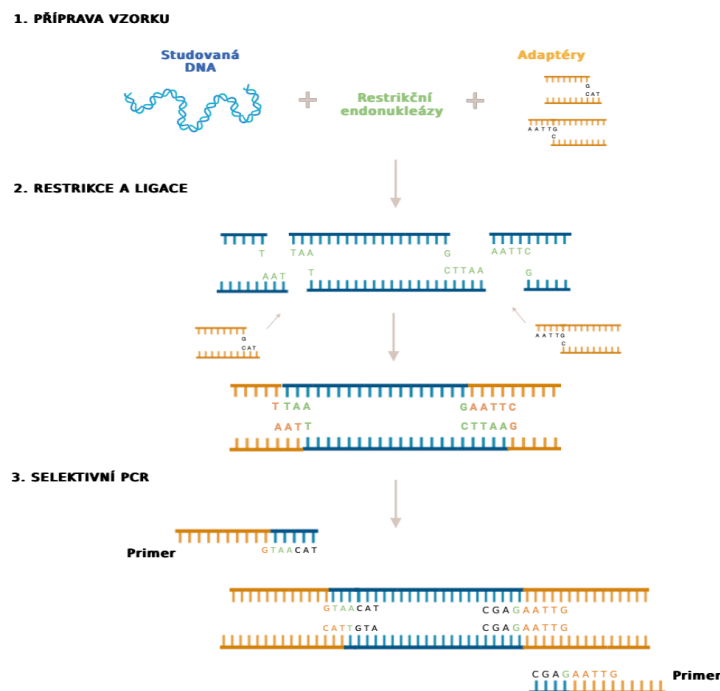
PCR-RFLP přináší řadu výhod – je snadno opakovatelná, nevyžaduje velké množství DNA a zároveň je časově nenáročná (Boonphakdee a Sawangwong 2008). V roce 2012 bylo PCR-RFLP úspěšně využito k identifikaci masa s použitím cílové sekvence CO1. Výzkum ukázal, že při využití kombinace lokusu CO1 a restrikčního enzymu *HpaII* (tvoří kohezní konce) je možné rozpoznat jednotlivé živočichy. Proto je tato metoda doporučena pro laboratoře zabývající se kontrolou potravin (Haider et al. 2012). Jelikož výsledek je určen pouze délkou amplikonu, je někdy nutné potvrdit, zda není produktem nespecifické reakce. Nejlepším způsobem ověření je sekvenování, které ale není vhodné pro rutinní testování (Shinoda Naoki et al. 2001).

### 3.1.2.2. AFLP

Metoda **Amplified fragment length polymorphism** (AFLP), představená roku 1995 Pieterem Vosem a jeho kolegy, poskytuje efektivní nástroj při identifikaci živočichů (Vos et al. 1995). Metodu lze rozdělit do čtyř fází. První zahrnuje působení dvou odlišných restrikčních endonukleáz na vzorek se studovanou DNA, čímž vzniknou dva různě dlouhé kohezní přesahy. Na volné konce jsou navázány adaptéry, které jsou následně spojeny ligázou. Ve druhé fázi probíhá preselektivní PCR, při kterém jsou přidány dva PCR-primery komplementární k adaptorům, které jsou navrženy tak, aby obsahovaly jeden selektivní nukleotid navíc. Tím se amplifikují pouze fragmenty s komplementárními čtyřmi nukleotidy, tedy každý 16. fragment. Třetí fáze v sobě zahrnuje selektivní PCR, při kterém se postup opakuje, pouze jsou přidány PCR-primery, které mají tři selektivní nukleotidy. Tím se redukuje počet amplifikovaných fragmentů na každý 256. fragment. Jelikož jsou PCR-primery obvykle označeny fluorescenční značkou, je možné v poslední fázi vzorek separovat pomocí automatických sekvenátorů s kapilární elektroforézou (Vos et al. 1995; Hartl a Seefelder 1998).

---

<sup>1</sup> palindromatické sekvence – identická oblast v obou směrech DNA, místo které je rozpoznáváno restrikčními endonukleázami



Obr. 4: Princip AFLP,  
vlastní zpracování

AFLP byla úspěšně využita při identifikaci plemen koz v Albánii (Hoda et al. 2012). Též se ukázala významnou při určování živočichů pocházejících z Antarktidy. Autoři této studie ale zdůrazňují že ekonomičtější variantou pro identifikaci bude NGS (Hoffman et al. 2012). AFLP umožňuje analýzu více lokusů najednou a odráží variabilitu v rámci celého genomu. Další výhodou je rychlost a nepotřebnost velkého vzorku DNA. Stejně jako u RAPD jsou primery dominantní, takže v rámci této metody není možné rozpoznat heterozygota a homozygota (Paglia a Morgante 1998). Sice není nutná předchozí znalost sekvence, ale to znamená, že není ani známý lokus, ze kterého pochází fragment (Vos et al. 1995).

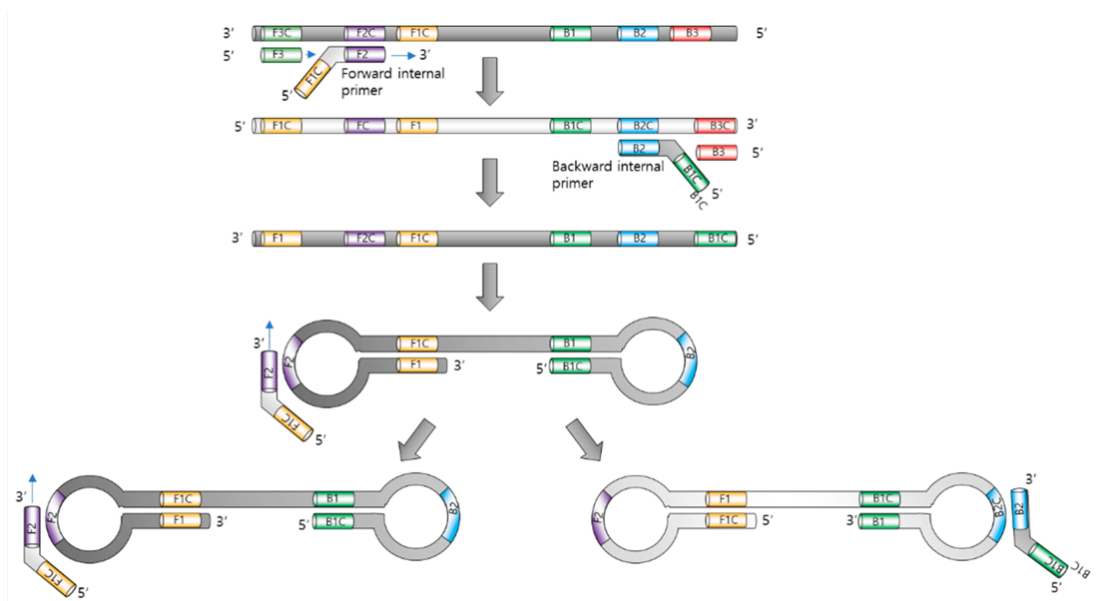
### 3.1.3. Metody využívající izotermální reakci

#### 3.1.3.1. LAMP

Metoda **Loop-mediated isothermal amplification** byla navržena v roce 2000 pro snadnější a rychlejší amplifikaci bez použití termocykléru. Na rozdíl od PCR není zapotřebí speciálního vybavení laboratoře. Celá reakce je uskutečněna při konstantní teplotě 60 – 65 °C, což umožňuje využití základního zařízení, jako je vyhřívací blok nebo vodní lázeň. Primery jsou navrženy tak, aby při této teplotě měly jednovláknovou podobu. Samotná LAMP je iniciována přidáním DNA polymerázy s vytěšňovací aktivitou, jako je Bst polymeráza (Notomi et al. 2000).

Princip LAMP spočívá v nasednutí vnitřního primeru FIP (forward inner primer) na komplementární sekvenci F2c na studované DNA. Následně je přidána do reakce Bst polymeráza, která je schopna syntetizovat zbývající část. Na komplementární sekvenci F3c nasedne i vnější primer F3, který umožní vytěsnění FIP fragmentu pomocí Bst polymerázy. Ekvivalentní postup probíhá zároveň i na druhém konci s využitím vnitřního B2 primeru a vnějšího B3 primeru. Výsledkem je ssDNA, která má na obou stranách smyčky, jež slouží jako templát pro syntézu DNA pomocí cyklické amplifikace. V této fázi jsou využívány už pouze vnitřní primery. Takto připravený vzorek může být vizualizován například detekcí pomocí gelové elektroforézy (Notomi et al. 2000) nebo fluorescencí (Arimatsu et al. 2012).

Kromě již jmenovaných výhod s sebou metoda LAMP přináší vysokou specifitu pro cílové lokusy, což ale znamená nutnou předešlou znalost genomu. Jedná se o ekonomicky výhodnou metodu, která je při úpravě schopna amplifikovat s vysokou přesností i RNA (Notomi et al. 2000). Pro identifikaci byla úspěšně využita při stanovení pohlaví u několika druhů papoušků (Elnomrosy et al. 2022) a při pozorování invazních ryb v Malajsii (Vythalingam et al. 2021).



Obr. 5: Princip metody LAMP,  
převzato: (Park 2022)

### 3.1.4. Metody založené na sekvenování

Prostřednictvím sekvenování je možné odhalit primární strukturu DNA – pořadí jednotlivých nukleotidů za sebou. Průlom v sekvenování provedl Frederick Sanger v roce 1977, který odhalil metodu Sangerova sekvenování, za kterou o tři roky později získal Nobelovu cenu. Jeho metoda byla masivně využívána, ale i přes postupné odstraňování nevýhod – radioaktivní označení nahrazeno fluorescenčním (Smith M. Lloyd et al. 1986) nebo modernizace při zavedení kapilární elektroforézy (Piggee et al. 1997), neuspokojila poptávku. Proto bylo představeno sekvenování *Next generation sequencing* (NGS), které umožnilo sekvenovat paralelně více DNA s vyšší rychlostí za kratší čas.

#### 3.1.4.1. Sangerovo sekvenování

**Sangerovo sekvenování** je klíčové pro sekvenování DNA. Využívají se při něm fluorescenčně označené ddNTP, které jsou spolu s templátem, DNA polymerázou, sekvenačními primery, dNTP, ionty a stabilizátory míchány v mastermix. Při procesu sekvenování DNA polymeráza syntetizuje vlákno standardním způsobem, dokud se nepřipojí ddNTP. Náhodně zařazený ddNTP ukončí reakci, a tím uvolní různě dlouhé fragmenty (Sanger et al. 1977). Tyto fragmenty jsou odděleny pomocí kapilární elektroforézy a seřazeny podle délky. Výsledné pořadí nukleotidů se určuje podle uspořádání fluorescenčních piků, které jsou analyzovány počítačovým programem. Každému fluorescenčnímu píku je přiřazen jeden nukleotid (Piggee et al. 1997). Pro zajištění přesnosti se provádí sekvenování v obou směrech, což umožňuje porovnání výsledků a zachycení případných chyb.

#### 3.1.4.2. NGS – Next generation sequencing, 2. generace sekvenování

Sekvenování nové generace umožňuje zpracovat velké množství dat najednou a porovnat je s referenčními daty, jedná se o tzv. masivní paralelní sekvenování. Pro řadu metod vyžaduje NGS předešlou zevrubnou znalost studované sekvence. Princip všech metod NGS spočívá ve stejných krocích. Nejprve je DNA rozdělena na fragmenty, které se pomocí ligázy napojují na adaptéry. Takto připravený vzorek je podroben amplifikaci PCR a následně osekvenován. V 2. generaci sekvenování byla představena řada technik, kterými lze docílit masivního sekvenování, ale kvůli rychlosti a jednoduchosti provedení vstoupily do popředí Ion Torrent a Illumina (Mardis 2008).

#### **3.1.4.2.1. Ion Torrent**

Přístrojová platforma **Ion Torrent** (Thermo Fisher Scientific, USA) zaujímá významné místo v oblasti sekvenování DNA. Přináší inovativní přístup založený na detekci uvolněných protonů během inkorporace nukleotidů do komplementárního templátu. V prvním kroku jsou fragmenty DNA spojené s adaptéry připojeny na povrch kuliček substrátu a následně jsou klonálně amplifikovány. Proces sekvenace pak probíhá na polovodičovém čipu v jednotlivých jamkách, z nichž každá obsahuje pouze jednu kuličku s navázanou DNA. Princip samotné sekvenace spočívá v postupném přidávání nukleotidů do těchto jamek, přičemž detekce uvolněných protonů indukuje snížení pH. Snížené pH roztoku v jamce je zaznamenáno citlivým detektorem pH umístěným na dně jamky. Tento signál je převeden do napěťového signálu, který je digitálně zpracován (Rothberg et al. 2011).

Při odhalování klamavých informací na produktech byla úspěšně využita metoda Ion Torrent pro detekci masných výrobků. Jelikož nezahrnuje fluorescenční značení ani nákladnou optiku, patří mezi cenově dostupnější metody NGS (Kattoor et al. 2024).

#### **3.1.4.2.2. Illumina**

Přístrojová platforma **Illumina** (Illumina, USA) vychází z principu sekvenování pomocí syntézy, která umožňuje rychlou a citlivou analýzu DNA. Nejprve je DNA templát namnožen pomocí můstkového PCR na speciální destičce tzv. flow-cell. Samotná sekvenace probíhá pomocí DNA polymerázy, která přidává fluorescenčně značené nukleotidy (<https://www.illumina.com>).

Během přípravy fragmentů jsou k DNA ligovány adaptéry, které jsou později komplementárně připojeny k flow-cell destičce. Templát je následně ohnut mezi primery a syntetizován. Po několika cyklech PCR vznikají klastry obsahující okolo 1000 kopií původní molekuly. Sekvenace klastrů probíhá za použití DNA polymerázy a fluorescenčně značených nukleotidů s reverzibilní terminační aktivitou. Po přidání každého nukleotidu je detekována vlnová délka fluorescenčního záření a zaznamenána CCD kamerou. Následně je na 3' konci odštěpen fluorofor, což umožňuje nasednutí dalšího fluorescenčně označeného nukleotidu a celý proces se opakuje (Adessi Celine et al. 2006; Bentley et al. 2008, [www.illumina.com](http://www.illumina.com)).

Illumina se osvědčila při tzv. metabarcodingu<sup>2</sup>, což umožňuje identifikaci jednotlivých organismů v komplexních směsných vzorcích. Konkrétně byla aplikována pro směsný vzorek mletého masa, kde umožnila identifikaci jednotlivých složek. Je známá svou vysokou senzitivitou a schopností poskytnout rychlý výsledek. Mezi její nevýhody patří cenová náročnost a potřeba speciálního vybavení laboratoře (Sundaram et al. 2020).

### 3.1.4.3. TGS – Third-generation sequencing

Třetí generace sekvenování s sebou přináší řadu výhod – nevyžaduje amplifikaci a přenáší data již při sekvenování. První technologie TGS byla představena v roce 2010 společností Pacific Biosciences of California. Tato technologie byla na komerční trh uvedena až o rok později pod názvem SMRT (single-molecule real-time sequencing). Následovala ji technologie Oxford nanopore.

#### 3.1.4.3.1. SMRT

Při technologii **Single-molecule real-time sequencing** (Pacific Biosciences, USA) je klíčovým prvkem detekce fluorescenčně značených nukleotidů přidávaných DNA polymerázou v reálném čase. Pro přípravu templátové DNA jsou nejprve na oba konce dsDNA navázány adaptérové vlásenky, které se spojují a vytváří ssDNA. Tato úprava je následně aplikována na čip SMRTcell a rovnoměrně rozprostřena do jamek o velikosti 10-50 nm nazývaných zero-mode wave-guide (ZMW). Jamky jsou vybaveny nanofotonickou strukturou, čímž maskují pozadí fluorescence, a proto je možné využívat při sekvenování vysokou koncentraci nukleotidů. V každé jamce je na dně umístěná DNA polymeráza, na niž je navázána cirkulární ssDNA, která je následně podrobena syntéze (Eid John et al. 2009). Každý přiřazený fluorescenčně značený nukleotid generuje rozdílné emisní spektrum, které je detektorem rozpoznáno. Během syntézy je fluorofor navázán na gama fosfát a je odstraněn při začlenění nukleotidu spolu s pyrofosfátem (Flusberg et al. 2010). Proto syntéza může probíhat nepřetržitě, což vede k analýze dlouhých čtecích rámců. Obvykle je cirkulární molekula sekvenována několikrát za sebou, aby se minimalizovala možnost chyb.

Nezanedbatelnou nevýhodou této technologie je vysoká počáteční investice do samotného přístroje. Nicméně je třeba zdůraznit, že se vyznačuje vysokou citlivostí, která

---

<sup>2</sup> **metabarcoding** – molekulární metoda identifikující komplexní směsné vzorky

dosahuje až 99,9 % (Eid John et al. 2009, www.pacb.com). Pokud jde o identifikaci živočichů, je však z hlediska nákladů nevýhodná.

#### **3.1.4.3.2. Nanopórové sekvenování**

Základním principem nanopórového sekvenování je průchod DNA přes nanopór umístěný v membráně, přičemž na obou stranách nanopóru existují odlišná iontová prostředí. Toto nastavení vytváří stabilní iontový proud, který je zachován během průchodu DNA. Když se sekvence DNA pohybuje pórem, dojde k zeslabení tohoto proudu specificky pro každý nukleotid. Nicméně samotný pohyb DNA je příliš rychlý na to, aby bylo možné provést přesnou sekvenaci (Branton et al. 2008). Proto byla do metody integrována DNA polymeráza, která zpomaluje průchod nově syntetizovaného vlákna asi čtyřikrát. Tímto způsobem se proces sekvenování stává přesnějším (Cherf et al. 2012). Aby se zabránilo předčasné aktivaci DNA polymerázy, je na ní připojen syntetický oligonukleotid komplementární k templátu. Tento oligonukleotid se uvolní při aktivaci napětí a navede DNA polymerázu k nanopóru (Cherf et al. 2012; Branton et al. 2008).

Nanopórové sekvenování je prováděné pomocí mobilního malého zařízení MinIon (Oxford Nanopore, Velká Británie), které je snadné přenést. Proto je skvělou volbou pro práci v terénu, čehož využila společnost NASA pro mikrobiální barcoding ve vesmíru na Mezinárodní vesmírné stanici umístěné na oběžné dráze kolem Země (Castro-Wallace et al. 2017). Předešlé metody byly závislé na kultuře, která vyžadovala vrácení na Zemi. Nanopórové sekvenování umožňuje jednoduchou analýzu uskutečnitelnou i neodbornou posádkou (Stahl-Rommel et al. 2021).

### **4. Porovnání molekulárních metod**

Od objevení prvních molekulárních metod uběhla řada let. Technologie se posouvají a vyvíjí se nové metody nebo jsou zdokonalované ty staré. Přesto nelze určit jednu jedinou, která by byla vhodnou volbou pro každý vzorek při identifikaci. Při výzkumu musí být zvaženo mnoho okolností – stav odebraného vzorku, zda je vzorek zcela neznámý, vybavení laboratoře, časový prostor pro analýzu aj. Podle studií se ukazuje, že nejčastěji jsou pro identifikaci používány metody založené na analýze DNA (Hoffman et al. 2012; Haider et al. 2012; Denyinghot et al. 2021). Některé jsou natolik přesné, že umožňují stejnou citlivost jako při sekvenování, ale za nižší cenu (Hoffman et al. 2012). Sekvenování je navíc obvykle doprovázeno vysokou pořizovací cenou přístrojů (Eid John et al. 2009). Pro snadnou orientaci byla sestavena tabulka metod,

uvádějící podrobný přehled výhod a nevýhod. Pro každou metodu jsou uvedeny příklady studií, u nichž se využila pro identifikaci živočichů.

Metoda	Výhody	Nevýhody	Studie využívající metodu pro identifikaci živočichů
<b>RAPD</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. odráží variabilitu celého genomu</li> <li>2. není nutná předchozí znalost sekvence</li> <li>3. časově nenáročná metoda</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. dominantní primery nerozlišují homozygoty od heterozygotů</li> <li>2. špatně reprodukovatelná</li> <li>3. nevhodná pro degradovanou DNA</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- identifikace ptáků (Huang et al. 2003)</li> <li>- identifikace červeného masa (hovězí, vepřové, klokaní, zvěřina, koňské, buvolí, králíčí, psí a kočičí) (Koh et al. 1998)</li> <li>- rozlišení druhů ryby <i>Epinephelus</i> (Noikotr et al. 2013)</li> </ul>
<b>qPCR-HRMA</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. vysoká citlivost</li> <li>2. přináší rychlý výsledek</li> <li>3. rozlišuje homozygota od heterozygota</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. vyžaduje speciální vybavení s profesionální obsluhou</li> <li>2. vyžaduje předchozí znalost sekvence</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- identifikace složení halal masných výrobků (Denyinghot et al. 2021)</li> <li>- identifikace kočky, potkana a prasete (Denyinghot et al. 2017)</li> <li>- identifikace druhů parazitů z rodu <i>Tropilaelaps</i> (Del Cont et al. 2021)</li> </ul>
<b>SPIInDel</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. možnost analyzovat i nekvalitní vzorek</li> <li>2. časově nenáročná metoda</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. vyžaduje předchozí znalost sekvence</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- identifikace směsných vzorků (detekován člověk, prase, pes, kůň, kočka, ovce, jelen, daněk, liška a hnědý medvěd) (Pereira et al. 2019)</li> </ul>
<b>Délkový polymorfismus mtDNA</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. vysoká citlivost</li> <li>2. možnost využití i degradované DNA</li> <li>3. jednoduchý postup</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. problém při přítomnosti většího počtu druhů ve směsném vzorku</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- doporučeno pro identifikaci velkých koček (Vaňková a Vaněk 2024)</li> <li>- identifikace živočichů na místě trestného činu (Fumagalli et al. 2009)</li> </ul>
<b>SnaPshot</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. snadno reprodukovatelná</li> <li>2. nízká chybovost</li> <li>3. možnost využití pro degradovanou DNA</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. vyžaduje předchozí znalost sekvence</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- identifikace much (Park et al. 2018)</li> <li>- mapování druhového původu slonů (Kitpipit et al. 2017)</li> <li>- identifikace kočkovitých šelem (Kitpipit et al. 2012)</li> </ul>
<b>PCR-RFLP</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. časově nenáročný postup</li> <li>2. snadno reprodukovatelná</li> <li>3. vysoká přesnost</li> <li>4. možnost využití i znehodnoceného vzorku</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. složitější interpretace</li> <li>2. náchylnost k chybám</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- odlišení kozy, ovce, buvoly, jelena, skotu, jaka, prasete a velblouda (Guan et al. 2018)</li> <li>- rozlišení složek v mletém mase (Haider et al. 2012)</li> <li>- identifikace druhů mořských okurek (Lv et al. 2014)</li> <li>- odlišení hlavonožců (Chapela et al. 2003)</li> </ul>
<b>AFLP</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. není nutná předchozí znalost sekvence</li> <li>2. odráží variabilitu celého genomu</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. nerozliší homozygota od heterozygota</li> <li>2. náchylnost k chybám</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- identifikace plemen koz (Hoda et al. 2012)</li> <li>- identifikace živočichů na Antarktidě (Hoffman et al. 2012)</li> <li>- rozlišení druhů žraloků (Zenger et al. 2006)</li> </ul>
<b>LAMP</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. nevyžaduje speciální vybavení</li> <li>2. vysoce citlivá metoda</li> <li>3. možnost využití v terénu</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. u směsných vzorků komplikovanější interpretace</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- identifikace pohlaví papoušků</li> <li>- identifikace invazních druhů ryb (Vythalingam et al. 2021)</li> <li>- rozlišení směsného vzorku masa</li> </ul>

**Tab. 1: Porovnání metod využívaných při druhové identifikaci**

V tabulce nejsou uvedeny metody založené na sekvenování, protože nejsou vždy pro DNA barcoding efektivní. Nabízejí vysokou přesnost, ale za poměrně vysokou cenu (např. Illumina) a časově náročný proces. Přesto byly úspěšně využity pro identifikaci lososů (Sundaram et al. 2020), patogenů kuřat (Hinsu et al. 2018) nebo při analýze masných vzorků (Sundaram et al. 2020).

## 5. Databáze sekvencí

Pro správnou interpretaci výsledků analýzy je nezbytné porovnat získané údaje s rozsáhlou a komplexní databází sekvencí DNA (Hebert et al. 2003b). V současné době jsou nejčastěji využívány tři volně dostupné a revidované databáze – **GenBank** spravovaná Národním centrem pro biotechnologické informace (NCBI), **EMBL** spravovaná Evropským institutem pro bioinformatiku (EBI) a **DDBJ** spravovaná Národním ústavem genetiky v Japonsku. Všechny tyto databanky jsou členy tzv. International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC), což umožňuje vzájemné sdílení dat a informací. Tento systém umožňuje snadné vyhledávání shodných genových sekvencí v jakékoli z nich.

Údaje do databází jsou nahrávány rozsáhlou komunitou vědců a výzkumníků, kteří se zabývají různorodými oblastmi biologie. I přes pečlivou kontrolu kvality záznamů není možné zaručit absolutní správnost každého nahraného údaje. S každodenním přílivem velkého množství dat se může objevit nesrovnalost nebo chyba v interpretaci. Z toho důvodu je nutné, aby vědci přispívající do databáze pracovali s maximální pečlivostí a zdatností, aby zajistili co nejvyšší kvalitu a spolehlivost dat (Zhang et al. 2013).

### 5.1. GenBank

GenBank je volně dostupná anotovaná databáze nukleotidových sekvencí, kterou vytvořilo NCBI v roce 1982 a ve svých počátcích obsahovala 606 vstupních sekvencí. Od té doby však výrazně vzrostla a k dubnu 2024 zahrnuje přes 250 miliónů sekvencí, včetně záznamů kompletních genomů (GenBank Overview, 2024). GenBank se tak stala klíčovým zdrojem informací pro výzkum ve všech oblastech biologie. Mnohé renomované časopisy již v současné době vyžadují vložení sekvence do GenBank, jako podmínku pro zveřejnění článku, což zvyšuje transparentnost a ostatním výzkumníkům umožňuje přístup k primárním datům (Sayers et al. 2019, GenBank Overview, 2024).

GenBank se stala nedílnou součástí DNA barcodingu při vyhodnocování. Pro porovnání zkoumané sekvence je využíván program BLAST. Tento nástroj je schopen porovnat vložená data s veškerým obsahem GenBank a následně sdělit uživateli statisticky významné schody. Ačkoliv GenBank uplatňuje standardizované postupy vkládání dat a snaží se o jejich co možná nejvyšší kontrolu, je vhodné údaje porovnat i s jinými databázemi pro získání přesnějších výsledků (Sayers et al. 2019, GenBank Overview, 2024).

## 5.2. CBOL

V květnu roku 2004 byla založena organizace nazvaná **The Consortium for the Barcode of Life** (CBOL), která si klade za cíl standardizovat čárové kódy pro globální identifikaci živočišných druhů (Hebert et al. 2003a). Spolupracuje s univerzitami, experty i přírodovědnými muzei ve snaze propojit informace a vytvořit volně dostupnou nekomerční databázi. CBOL se soustředí na vývoj nových postupů a primerů, které by měly DNA barcoding učinit levnější, přesnější a dostupnější. Podporuje nové projekty a pořádá workshopy, které zvyšují povědomí o DNA barcodingu.

Aby se sekvence mohla označit jako „BARCODE“, musí splňovat následující podmínky (Hanner 2009):

1. Každý záznam musí disponovat unikátním identifikátorem, který slouží k propojení sekvence s informacemi o tomto vzorku v databázi.
2. Záznam musí definovat, o jaký druh se jedná.
3. Záznam musí obsahovat kód státu, podle pravidel stanovených GenBank
4. Sekvence musí být získána z genu CO1 a musí mít délku 648 bp (počínaje pozicí 58 a končící na pozici 705).
5. Minimálně 500 pozic musí být jednoznačně určených v obou směrech.
6. V každém záznamu musí být uvedeno, které primery byly použity při amplifikaci DNA (pravých a levých).
7. Nesmí obsahovat více než 1 % nejednoznačných pozic.
8. Musí být propojen s trasovacím souborem v NCBI.
9. Záznam musí disponovat názvem sekvence, ze které byl získán.

### 5.2.1. BOLD

**Barcode of Life Data System** (BOLD) je uznávaná databáze vzniklá ve spolupráci CBOL s NCBI a GBIF (Global Biodiversity Information Facility). Představuje volně přístupnou platformu, která shromažďuje barcodové sekvence doplněné o fotografie a údaje o daných druzích (Ratnasingham a Hebert 2007). CBOL uznává sekvence označené jako barcode, pouze pocházející z CO1 pro živočišné druhy, matK a rbcL pro rostliny a ITS pro houby. Před nahráním dat do databáze projdou všechny sekvence přísnou kontrolou, aby bylo ověřeno, zda splňují stanovená kritéria. Ty, které splní kritéria, jsou uveřejněny v rámci databáze GenBank jako barcode ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)).

## 6. Závěr

V průběhu let se DNA barcoding etabloval jako spolehlivý a efektivní přístup pro druhovou identifikaci. DNA barcoding však není uzavřená disciplína, nýbrž neustále dynamicky se vyvíjející soubor mnoha metod a postupů, které lze zvolit v závislosti na tom, co je předmětem identifikace. Volba metody užitá k identifikaci konkrétního vzorku však není nahodilá, ale je nutné přihlížet k jejím vlastnostem a možnostem. Při volbě konkrétní metody je nezbytné zvažovat, zda je vzorek zcela neznámý, nebo máme o jeho původu a vlastnostech alespoň přibližnou představu.

Podrobný přehled porovnání molekulárních metod je uveden v tabulce 1., kde jsou zohledněny výhody a nevýhody spojené s jejich používáním. Pro druhovou identifikaci zcela neznámého vzorku se využívají hlavně metody RAPD a AFLP, které jsou bez předešlé znalosti schopné rozlišit živočichy, ač s vysokou chybovostí. Pro analýzu vzorků s degradovanou DNA se osvědčují metody SNaPshot, SPInDel a PCR-RFLP, kterými je možné rozlišit organismy i při použití malého množství poškozené DNA. To umožňuje zkoumání muzejních sbírek nebo starých forenzních důkazů, které mohou poskytnout cenné informace. Sekvenační metody, ačkoliv nabízejí vysokou přesnost, se pro rutinní testování mohou jevit jako ekonomicky nevýhodné a časově náročné. Jako jejich alternativa se nabízí metoda LAMP, která poskytuje přesné výsledky bez nutnosti využití speciálního vybavení. To umožňuje její využití i v terénních podmínkách, což tuto metodu činí ideální pro studium organismů v jejich přirozeném prostředí.

Pro taxonomické určování se stal DNA barcoding významným nástrojem, avšak jeho použití je nezbytné kombinovat s dalšími postupy, aby se minimalizovalo riziko chybných identifikací a závěrů. Je proto důležité, aby databáze obsahovaly komplexní informace o jednotlivých vzorcích, jako je jejich morfologický popis, místo výskytu a cílová sekvence, aby bylo možné dosáhnout přesného určení druhů. DNA barcoding nachází široké uplatnění i v dalších disciplínách, jako jsou forenzní vědy, kde může pomáhat odhalit nekalé praktiky obchodníků a ochránit zemědělské plodiny před škůdci. Vzhledem k rostoucímu využití je nezbytný další vývoj metodiky spojený s DNA barcodingem a zdokonalení technik pro zajištění přesných výsledků a interpretací.

## 7. Použitá literatura

- ADESSI CELINE, KAWASHIMA ERIC, MAYER PASCAL, MERMOD JEAN-JACQUES a TURCATTI GERARDO, 2006. *Methods of nucleic acid amplification and sequencing*.
- ALVES, Cíntia, Rui PEREIRA, Lourdes PRIETO, Mercedes ALER, Cesar R.L. AMARAL, Cristina ARÉVALO, Gabriela BERARDI, Florencia DI ROCCO, Mariela CAPUTO, Cristian Hernandez CARMONA, Laura CATELLI, Heloísa Afonso COSTA, et al., 2017. Species identification in forensic samples using the SPInDel approach: A GHEP-ISFG inter-laboratory collaborative exercise. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **28**, 219–224. ISSN 18780326. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsigen.2017.03.003
- ARIMATSU, Yuji, Sasithorn KAEWKES, Thewarach LAHA, Sung Jong HONG a Banchob SRIPA, 2012. Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* copro-DNA using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitology International* [online]. **61**(1), 178–182. ISSN 13835769. Dostupné z: doi:10.1016/j.parint.2011.08.009
- BARNETT, Ross a Greger LARSON, 2012. A phenol-chloroform protocol for extracting DNA from ancient samples. *Methods in Molecular Biology* [online]. **840**, 13–19. ISSN 10643745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-516-9\_2
- BASSAM, Brant, Valin REJA a Corbett LIFE SCIENCE, 2006. *HRM™ High Resolution Melt Assay Design and Analysis CorProtocol™ 6000-1-July06*.
- BENTLEY, David R., Shankar BALASUBRAMANIAN, Harold P. SWERDLOW, Geoffrey P. SMITH, John MILTON, Clive G. BROWN, Kevin P. HALL, Dirk J. EVERS, Colin L. BARNES, Helen R. BIGNELL, Jonathan M. BOUTELL, Jason BRYANT, Richard J. CARTER, 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* [online]. **456**(7218), 53–59. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/nature07517
- BOONPHAKDEE, Chuta a Pichan SAWANGWONG, 2008. *Discrimination of Anemonefish Species by PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial Gene Fragments* [online]. Dostupné z: www.tshe.org/EA
- BRANTON, Daniel, David W. DEAMER, Andre MARZIALI, Hagan BAYLEY, Steven A. BENNER, Thomas BUTLER, Massimiliano DI VENTRA, Slaven GARAJ, Andrew HIBBS, Xiaohua HUANG, Stevan B. JOVANOVIĆ, Predrag S. KRSTIĆ, Stuart LINDSAY, Xinsheng Sean LING, Carlos H. MASTRANGELO, Amit MELLER, John S. OLIVER, Yuriy V. PERSHIN, J. Michael RAMSEY, Robert RIEHN, Gautam V. SONI, Vincent TABARD-COSSA, Meni WANUNU, Matthew WIGGIN a Jeffery A. SCHLOSS, 2008. *The potential and challenges of nanopore sequencing* [online]. říjen 2008. ISSN 10870156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.1495
- BRODIE, Juliet, Paul K. HAYES, Gary L. BARKER, Linda M. IRVINE a Inka BARTSCH, 1998. A reappraisal of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophyceae, Rhodophyta) in the northeast Atlantic based on the *rbcL-rbcS* intergenic spacer. *Journal of Phycology* [online]. **34**(6), 1069–1074. ISSN 00223646. Dostupné z: doi:10.1046/j.1529-8817.1998.341069.x
- CARNEIRO, João, Filipe PEREIRA a António AMORIM, 2012. SPInDel: A multifunctional workbench for species identification using insertion/deletion variants. *Molecular Ecology Resources* [online]. **12**(6), 1190–1195. ISSN 1755098X. Dostupné z: doi:10.1111/1755-0998.12011
- CASTRO-WALLACE, Sarah L., Charles Y. CHIU, Kristen K. JOHN, Sarah E. STAHL, Kathleen H. RUBINS, Alexa B.R. MCINTYRE, Jason P. DWORKIN, Mark L. LUPISELLA, David J. SMITH, Douglas J. BOTKIN, Timothy A. STEPHENSON, Sissel JUUL, Daniel J. TURNER, Fernando IZQUIERDO, Scot FEDERMAN, Doug STRYKE, Sneha SOMASEKAR, Noah ALEXANDER, Guixia YU, Christopher E. MASON a Aaron S.

BURTON, 2017. Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station. *Scientific Reports* [online]. 7(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-18364-0

CBOL PLANT WORKING GROUP, 2009. *A DNA barcode for land plants Communicated by.*

DEL CONT, Aur Crossed D.sign©lie, Benjamin DE GEORGES, Anthea HULEUX a Veronique DUQUESNE, 2021. Rapid Identification of Tropilaelaps Mite (Mesostigmata: Laelapidae) Species Using a COI Barcode-HRM. *Journal of Economic Entomology* [online]. 114(2), 520–529. ISSN 1938291X. Dostupné z: doi:10.1093/jee/toaa330

DENYINGYHOT, Anat, Chirapiphat PHRAEPHAISARN, Mongkol VESARATCHAVEST, Winai DAHLAN a Suwimon KEERATIPIBUL, 2017. SIMULTANEOUS DETECTION OF THREE FORBIDDEN ANIMALS (PORCINE, CANINE, AND RAT) IN HALAL FOOD BY USING HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies* [online]. XXI. ISSN 2285-1364.

DENYINGYHOT, Anat, Chirapiphat PHRAEPHAISARN, Mongkol VESARATCHAVEST, Winai DAHLAN a Suwimon KEERATIPIBUL, 2021. A new tool for quality control to monitor contamination of six non-halal meats in food industry by multiplex high-resolution melting analysis (HRMA). *NFS Journal* [online]. 25, 31–40. ISSN 23523646. Dostupné z: doi:10.1016/j.nfs.2021.09.002

EID JOHN, FEHR ADRIAN, GRAY JEREMY, LUONG KHAI a LYLE JOHNJ, 2009. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* [online]. 323(5910), 130–133. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1166256

ELNOMROSY, Sara M., Naglaa M. HAGAG, Mohamed I. ABDALLAH, Rafał KOLENDA a Maciej ZACHARSKI, 2022. Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) in Sex Identification of Parrots Bred in Egypt. *Biology* [online]. 11(4). ISSN 20797737. Dostupné z: doi:10.3390/biology11040565

ER, Tze Kiong a Jan Gowth CHANG, 2012. *High-resolution melting: Applications in genetic disorders* [online]. 24. prosinec 2012. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18733492. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2012.09.012

ERPENBECK, D., J. N.A. HOOPER a G. WÖRHEIDE, 2006. CO1 phylogenies in diploblasts and the „Barcoding of Life" - Are we sequencing a suboptimal partition? *Molecular Ecology Notes* [online]. 6(2), 550–553. ISSN 14718278. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01259.x

FLUSBERG, Benjamin A., Dale R. WEBSTER, Jessica H. LEE, Kevin J. TRAVERS, Eric C. OLIVARES, Tyson A. CLARK, Jonas KORLACH a Stephen W. TURNER, 2010. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature Methods* [online]. 7(6), 461–465. ISSN 15487091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1459

FOLMER, O, M BLACK, W HOEH, R LUTZ a R VRIJENHOEK, 1994. *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.*

FUMAGALLI, Luca, Catherine Jan CABRITA a Vincent CASTELLA, 2009. Simultaneous identification of multiple mammalian species from mixed forensic samples based on mtDNA control region length polymorphism. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* [online]. 2(1), 302–303. ISSN 18751768. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsigss.2009.08.009

FUMAGALLI, Luca, Pierre TABERLET, -F-Laurence FAVRE a Jacques HAUSSE, 1996. *Origin and Evolution of Homologous Repeated Sequences in the Mitochondrial DNA Control Region of Shrews* [online]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/mbe/article/13/1/31/1055506>

- GUAN, Feng, Yu Ting JIN, Jin ZHAO, Ai Chun XU a Yuan Yuan LUO, 2018. A PCR Method That Can Be Further Developed into PCR-RFLP Assay for Eight Animal Species Identification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* [online]. **2018**. ISSN 20908873. Dostupné z: doi:10.1155/2018/5890140
- HAIDER, Nadia, Imad NABULSI a Bassam AL-SAFADI, 2012. Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. *Meat Science* [online]. **90**(2), 490–493. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/j.meatsci.2011.09.013
- HAJIBABAEI, Mehrdad, M. Alex SMITH, Daniel H. JANZEN, Josephine J. RODRIGUEZ, James B. WHITFIELD a Paul D.N. HEBERT, 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* [online]. **6**(4), 959–964. ISSN 14718278. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x
- HANNER, Robert, 2009. *Data Standards for BARCODE Records in INSDC (BRIs)*.
- HARTL, L a · S SEEFELDER, 1998. *Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs*. B.m.: Springer-Verlag.
- HEBERT, Paul D.N., Alina CYWINSKA, Shelley L. BALL a Jeremy R. DEWAARD, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **270**(1512), 313–321. ISSN 09628452. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2002.2218
- HEBERT, Paul D.N., Sujeevan RATNASINGHAM a Jeremy R. DEWAARD, 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **270**(SUPPL. 1). ISSN 14712970. Dostupné z: doi:10.1098/rsbl.2003.0025
- HIGUCHI RUSSEL, DOLLINGER GAVIN, WALSH P. SEAN a GRIFFITH ROBERT, 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.
- HINSU, Ankit T., Jalpa R. THAKKAR, Prakash G. KORINGA, Vladimir VRBA, Subhash J. JAKHESARA, Androniki PSIFIDI, Javier GUITIAN, Fiona M. TOMLEY, Dharamsibhai N. RANK, Muthusamy RAMAN, Chaitanya G. JOSHI a Damer P. BLAKE, 2018. Illumina Next Generation Sequencing for the Analysis of Eimeria Populations in Commercial Broilers and Indigenous Chickens. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. **5**. ISSN 22971769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2018.00176
- HODA, Anila, Lumturi SENA a Gentian HYKAJ, 2012. Genetic diversity revealed by AFLP markers in Albanian goat breeds. *Archives of Biological Sciences* [online]. **64**(2), 799–808. ISSN 03544664. Dostupné z: doi:10.2298/ABS1202799H
- HOFFMAN, J. I., M. S. CLARK, W. AMOS a L. S. PECK, 2012. Widespread amplification of amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) in marine Antarctic animals. *Polar Biology* [online]. **35**(6), 919–929. ISSN 07224060. Dostupné z: doi:10.1007/s00300-011-1139-2
- HUANG, Mu-Chiou, Yan-Ming HORNG, Hsiu-Lin HUANG, Yen-Long SIN, Ming-Jaw CHEN, Corresponding AUTHOR, Chun VILLAGE a Chang HUA, 2003. *RAPD Fingerprinting for the Species Identification of Animals*.
- CHAPELA, María José, Carmen G. SOTELO a Ricardo I. PÉREZ-MARTÍN, 2003. Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment. *European Food Research and Technology* [online]. **217**(6), 524–529. ISSN 14382377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-003-0788-y

- CHASE, Mark W., Nicolas SALAMIN, Mike WILKINSON, James M. DUNWELL, Rao Prasad KESANAKURTHI, Nadia HAIDAR a Vincent SAVOLAINEN, 2005. Land plants and DNA barcodes: Short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **360**(1462), 1889–1895. ISSN 09628436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2005.1720
- CHEN, Shilin, Hui YAO, Jianping HAN, Chang LIU, Jingyuan SONG, Linchun SHI, Yingjie ZHU, Xinye MA, Ting GAO, Xiaohui PANG, Kun LUO, Ying LI, Xiwen LI, Xiaocheng JIA, Yulin LIN a Christine LEON, 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* [online]. **5**(1). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0008613
- CHERF, Gerald M., Kate R. LIEBERMAN, Hytham RASHID, Christopher E. LAM, Kevin KARPLUS a Mark AKESON, 2012. Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-Å precision. *Nature Biotechnology* [online]. **30**(4), 344–348. ISSN 10870156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.2147
- IMAZUMI, Kazuhiko, Tomoko AKUTSU, Sachio MIYASAKA a Mineo YOSHINO, 2007. Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine* [online]. **121**(3), 184–191. ISSN 09379827. Dostupné z: doi:10.1007/s00414-006-0127-5
- IYENGAR, Arati, 2014. *Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A review* [online]. 2014. B.m.: Urban und Fischer Verlag GmbH und Co. KG. ISSN 16171381. Dostupné z: doi:10.1016/j.jnc.2013.12.001
- JAVAL, Marion, John S. TERBLANCHE, Desmond E. CONLONG, Norbert DELAHAYE, Elizabeth GROBBELAAR, Laure BENOIT, Carlos LOPEZ-VAAMONDE a Julien M. HARAN, 2021. DNA barcoding for bio-surveillance of emerging pests and species identification in Afrotropical Prioninae (Coleoptera, Cerambycidae). *Biodiversity Data Journal* [online]. **9**, 1–16. ISSN 13142828. Dostupné z: doi:10.3897/BDJ.9.e64499
- KATTOOR, J. J., J. GUAG, S. M. NEMSER a R. P. WILKES, 2024. Development of ion torrent-based targeted next-generation sequencing panel for identification of animal species in pet foods. *Research in Veterinary Science* [online]. **167**. ISSN 15322661. Dostupné z: doi:10.1016/j.rvsc.2023.105117
- KELLY, Thomas J a Hamilton O SMITH, 1970. *A Restriction Enzyme from Hemophilus influenzae II. Base Sequence of the Recognition Site.*
- KITPIPIT, Thitika, Kantima THONGJUED, Kitichaya PENCHART, Kanita OUTHAVON a Wilaiwan CHOTIGEAT, 2017. Mini-SNaPshot multiplex assays authenticate elephant ivory and simultaneously identify the species origin. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **27**, 106–115. ISSN 18780326. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsigen.2016.12.007
- KITPIPIT, Thitika, Shanan S. TOBE, Andrew C. KITCHENER, Peter GILL a Adrian LINACRE, 2012. The development and validation of a single SNaPshot multiplex for tiger species and subspecies identification - Implications for forensic purposes. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **6**(2), 250–257. ISSN 18724973. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsigen.2011.06.001
- KOH, M C, C H LIM, S B CHUA, S T CHEW a S T W PHANG, 1998. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fingerprints for Identification of Red Meat Animal Species.*
- KOCHER D. THOMAS, CONROY A. JANET, MCKAYE R. KENNETH a STAUFFER R. JAY, 1993. Similar Morphologies of Cichlid Fish in Lakes Tanganyika and Malawi Are Due to Convergence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* . **2**, 158–165.

KOCHER, T D, W K THOMAS, A MEYER, S V EDWARDS, S PAABO, F X VILLABLANCATT a A C WILSON, 1989. *Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers (cytochrome b/12S ribosomal DNA/control region/evolutionary genetics/molecular phylogenies)* [online]. Dostupné z: <https://www.pnas.org>

KUMAR, P, V K GUPTA, A K MISRA, D R MODI a B K PANDEY, 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal Southern Cross Journals*©2009 [online]. **2**(4), 141–162. ISSN 1836-3644. Dostupné z: [www.pomics.com](http://www.pomics.com)

KUPPUSWAMY, Mohan N, Joseph W HOFFMANN, Carol K KASPERT, Silvia G SPITZER, Stephanie L GROCE a S PAUL BAJAJ, 1991. *Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: Experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes (polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism/denaturing polyacrylamide gel electrophoresis/sickle cell mutation/ras oncogenes)* [online]. Dostupné z: <https://www.pnas.org>

LAHAYE, Renaud, Michelle VAN DER BANK, Diego BOGARIN, Jorge WARNER, Franco PUPULIN, Guillaume GIGOT, Olivier MAURIN, Sylvie DUTHOIT, Timothy G BARRACLOUGH a Vincent SAVOLAINEN, 2008. *DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots*.

LEE JAMES CHUN a CHANGB JAN GOWTH, 1994. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification.

LETSIOU, Stavroula, Panagiotis MADESIS, Efstathios VASDEKIS, Cinzia MONTEMURRO, Maria E. GRIGORIOU, George SKAVDIS, Vassilios MOUSSIS, Antonios E. KOUTELIDAKIS a Andreas G. TZAKOS, 2024. DNA Barcoding as a Plant Identification Method. *Applied Sciences* [online]. **14**(4), 1415. Dostupné z: [doi:10.3390/app14041415](https://doi.org/10.3390/app14041415)

LI, Xiwen, Yang YANG, Robert J. HENRY, Maurizio ROSSETTO, Yitao WANG a Shilin CHEN, 2015. *Plant DNA barcoding: from gene to genome* [online]. 1. únor 2015. ISSN 1469185X. Dostupné z: [doi:10.1111/brv.12104](https://doi.org/10.1111/brv.12104)

LV, Yingchun, Rong ZHENG, Tao ZUO, Yuming WANG, Zhaojie LI, Yong XUE, Changhu XUE a Qingjuan TANG, 2014. Identification of five sea cucumber species through PCR-RFLP analysis. *Journal of Ocean University of China* [online]. **13**(5), 825–829. ISSN 19935021. Dostupné z: [doi:10.1007/s11802-014-2276-3](https://doi.org/10.1007/s11802-014-2276-3)

LYNCH, M a B G MILLIGAN, 1994. *Analysis of population genetic structure with RAPD markers*.

MARDIS, Elaine R., 2008. *Next-generation DNA sequencing methods* [online]. 2008. ISSN 15278204. Dostupné z: [doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359](https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359)

MOURA, Carlos J., David J. HARRIS, Marina R. CUNHA a Alex D. ROGERS, 2008. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zoologica Scripta* [online]. **37**(1), 93–108. ISSN 03003256. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1463-6409.2007.00312.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2007.00312.x)

MULLIS, Kary B, 1990. *The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction*.

NEUHAUS, Heike a Gerhard LINK, 1987. *The chloroplast tRNALys(UUU) gene from mustard (Sinapis alba) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide*.

NICHOLS, Richard, 2001. *Gene trees and species trees are not the same* [online]. Dostupné z: <http://tree.trends.com>

NOIKOTR, K., A. CHAVEERACH, K. PINTHONG, A. TANOMTONG, R. SUDMOON a T. TANEE, 2013. RAPD and barcode analyses of groupers of the genus *Epinephelus*. *Genetics and Molecular Research* [online]. **12**(4), 5721–5732. ISSN 16765680. Dostupné z: [doi:10.4238/2013.November.18.21](https://doi.org/10.4238/2013.November.18.21)

- NOTOMI, Tsugunori, Hiroto OKAYAMA, Harumi MASUBUCHI, Toshihiro YONEKAWA, Keiko WATANABE, Nobuyuki AMINO a Tetsu HASE, 2000. *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*.
- ORTMAN, Brian D., Ann BUCKLIN, Francesc PAGÈS a Marsh YOUNGBLUTH, 2010. DNA Barcoding the Medusozoa using mtCOI. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* [online]. **57**(24–26), 2148–2156. ISSN 09670645. Dostupné z: doi:10.1016/j.dsr2.2010.09.017
- PAGLIA, Gianpaolo a Michele MORGANTE, 1998. *PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes*.
- PARK, Jee Woong, 2022. *Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests* [online]. 1. říjen 2022. B.m.: MDPI. ISSN 20796374. Dostupné z: doi:10.3390/bios12100857
- PARK, Ji Hye, Sang Eon SHIN, Kwang Soo KO a Seong Hwan PARK, 2018. Identification of Forensically Important Calliphoridae and Sarcophagidae Species Collected in Korea Using SNaPshot Multiplex System Targeting the Cytochrome c Oxidase Subunit i Gene. *BioMed Research International* [online]. **2018**. ISSN 23146141. Dostupné z: doi:10.1155/2018/2953892
- PARSON W., PEGORARO K., NIEDERSTÄTTER H., FÖGER M. a STEINLECHNER M., 1999. Species identification by means of the cytochrome b gene.
- PEREIRA, Filipe, Cíntia ALVES, Cátia COUTO, Lourdes López DÍAZ, David PARRA, Sandra FURFURO, Mercedes ALER, Luis Burillo BORREGO, Tereza OLEKŠÁKOVÁ, Filipa BALSÁ, Lisa SAMPAIO, Maria João Anjos PORTO, Heloisa Afonso COSTA, Cristina Arévalo VOSS, Mariela CAPUTO, Daniel CORACH, Óscar GARCÍA, Susana Pedrosa MORO, Rui PEREIRA a António AMORIM, 2019. Species identification in routine casework samples using the SPInDel kit. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* [online]. **7**(1), 180–181. ISSN 1875175X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsigss.2019.09.070
- PEREIRA, Filipe, João CARNEIRO, Rune MATTHIESEN, Barbara VAN ASCH, Nádía PINTO, Leonor GUSMÃO a António AMORIM, 2010. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Research* [online]. **38**(22). ISSN 03051048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq865
- PIGGEE, Christine A, Jochen MUTH, Emanuel CARRILHO a Barry L KARGER, 1997. *Capillary electrophoresis for the detection of known point mutations by single-nucleotide primer extension and laser-induced fluorescence detection*.
- PUN, Ka Man, Catherine ALBRECHT, Vincent CASTELLA a Luca FUMAGALLI, 2009. Species identification in mammals from mixed biological samples based on mitochondrial DNA control region length polymorphism. *Electrophoresis* [online]. **30**(6), 1008–1014. ISSN 15222683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200800365
- RATNASINGHAM, Sujeevan a Paul D.N. HEBERT, 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding. *Molecular Ecology Notes* [online]. **7**(3), 355–364. ISSN 14718278. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
- ROE, Amanda D. a Felix A.H. SPERLING, 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. **44**(1), 325–345. ISSN 10557903. Dostupné z: doi:10.1016/j.ympev.2006.12.005
- ROTHBERG, Jonathan M., Wolfgang HINZ, Todd M. REARICK, Jonathan SCHULTZ, William MILESKI, Mel DAVEY, John H. LEAMON, Kim JOHNSON, et al., 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* [online]. **475**(7356), 348–352. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/nature10242

SACCONI, Cecilia, Carla DE GIORGI, Carmela GISSI, Graziano PESOLE a Aurelio REYES, 1999. *Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system* [online]. Dostupné z: [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene)

SANGER, F, S NICKLEN a A R COULSON, 1977. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)* [online]. Dostupné z: <https://www.pnas.org>

SAUNDERS, Gary W., 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: A preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **360**(1462), 1879–1888. ISSN 09628436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2005.1719

SAYERS, Eric W., Mark CAVANAUGH, Karen CLARK, James OSTELL, Kim D. PRUITT a Ilene KARSCHMIZRACHI, 2019. GenBank. *Nucleic Acids Research* [online]. **47**(D1), D94–D99. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gky989

SHEARER, T. L. a M. A. COFFROTH, 2008. Barcoding corals: Limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources* [online]. **8**(2), 247–255. ISSN 1755098X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01996.x

SHINODA NAOKI, HASHIMOTO YOSHIYASU, TAKAGI MASAMI, KOJIMA FUMIO, ONODERA TAKASHI a SUGIURA KATSUAKI, 2001. *PCR-RFLP Identification of Prohibited Animal Derived DNA in Animal Feed*. B.m.: Iowa State University Press. ISBN 0813825563.

SIGNOROVITCH, Ana Y, Stephen L DELLAPORTA, Leo W BUSS a Yale UNIVERSITY, 2006. *Caribbean Placozoan Phylogeography*.

SMITH M. LLOYD, SANDERS Z. JANE, KAUSER J. ROBERT, HUGHES PETER, DODD CHRIS, CORNELL R. CHARLES, HEINER CHERYL, KENT B. H. STEPHEN a HOOD E. LEROY, 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **321**.

STAHL-ROMMEL, Sarah, Miten JAIN, Hang N. NGUYEN, Richard R. ARNOLD, Serena M. AUNON-CHANCELLOR, Gretta Marie SHARP, Christian L. CASTRO, Kristen K. JOHN, Sissel JUUL, Daniel J. TURNER, David STODDART, Benedict PATEN, Mark AKESON, Aaron S. BURTON a Sarah L. CASTRO-WALLACE, 2021. Real-time culture-independent microbial profiling onboard the international space station using nanopore sequencing. *Genes* [online]. **12**(1), 1–18. ISSN 20734425. Dostupné z: doi:10.3390/genes12010106

SUNDARAM, Arvind Y.M., Åse Helen GARSETH, Giuseppe MACCARI a Unni GRIMHOLT, 2020. *An Illumina approach to MHC typing of Atlantic salmon* [online]. 1. únor 2020. B.m.: Springer. ISSN 14321211. Dostupné z: doi:10.1007/s00251-019-01143-8

TAHIR, Hafiz Muhammad, Alina NOOR, Sana MEHMOOD, Sher Muhammad SHERAWAT a Muhammad Akram QAZI, 2018. Evaluating the accuracy of morphological identification of insect pests of rice crops using DNA barcoding. *Mitochondrial DNA Part B: Resources* [online]. **3**(2), 1220–1224. ISSN 23802359. Dostupné z: doi:10.1080/23802359.2018.1532334

TOBE, Shanan S., Andrew C. KITCHENER a Adrian M.T. LINACRE, 2010. Reconstructing mammalian phylogenies: A detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit i mitochondrial genes. *PLoS ONE* [online]. **5**(11). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0014156

TODOROVA, Kristina, Vihren KOLEV, Genoveva NACHEVA a Ivan G. IVANOV, 2002. Isolation of plasmid dna by adsorption on glass fibers. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* [online]. **16**(1), 145–147. ISSN 13102818. Dostupné z: doi:10.1080/13102818.2002.10819170

- VAŇKOVÁ, Lenka a Daniel VANĚK, 2024. Capillary-Electrophoresis-Based Species Barcoding of Big Cats: CR-mtDNA-Length Polymorphism. *Life* [online]. **14**(4), 497. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life14040497
- VENTER, J Craig, Mark D ADAMS, Eugene W MYERS, Peter W LI, Richard J MURAL, Granger G SUTTON, Hamilton O SMITH, Mark YANDELL, Cheryl A EVANS, Robert A HOLT, Jeannine D GOCAYNE, Peter AMANATIDES, Richard M BALLEW, et al., 2001. *The Sequence of the Human Genome*.
- VOS, Pieter, Rene HOGERS, Marjo BLEEKER, Martin REIJANS, Theo VAN DE LEE, Miranda HORNES, Adrie FRIJTERS, Jerina POT, Johan PELEMAN, Martin KUIPER a Marc ZABEAU, 1995. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*.
- VYTHALINGAM, Lavanya Malini, M. A.Motalib HOSSAIN a Subha BHASSU, 2021. Rapid in-situ detection kit (Risk): Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid identification of selected invasive alien fish in Malaysian freshwaters. *Molecular and Cellular Probes* [online]. **55**. ISSN 10961194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcp.2020.101683
- WALSH P. SEAN, METZGER DAVID A. a HIGUCHI RUSSELL, 1991. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* .
- WILLIAMS, John G K, Anne R KUBELIK, Kenneth J LIVAK, J Antoni RAFALSKI a Scott V TINGEY, 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers* [online]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article/18/22/6531/1054266>
- WITTEWER, Carl T, Gudrun H REED, Cameron N GUNDRY, Joshua G VANDERSTEEN a Robert J PRYOR, 2003. *High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen* [online]. Dostupné z: <http://web.mit.edu/osp/www/melt.html>
- YANG, Fan, Fei DING, Hong CHEN, Mingqi HE, Shixin ZHU, Xin MA, Li JIANG a Haifeng LI, 2018. *DNA Barcoding for the Identification and Authentication of Animal Species in Traditional Medicine* [online]. 22. duben 2018. B.m.: Hindawi Limited. ISSN 17414288. Dostupné z: doi:10.1155/2018/5160254
- ZENGER, Kyall R., Adam J. STOW, Victor PEDDEMORS, David A. BRISCOE a Robert G. HARCOURT, 2006. Widespread utility of highly informative AFLP molecular markers across divergent shark species. *Journal of Heredity* [online]. **97**(6), 607–611. ISSN 00221503. Dostupné z: doi:10.1093/jhered/esl044
- ZHANG, Jian, Min CHEN, Xiaoyu DONG, Ruozhu LIN, Jianhua FAN a Zhiduan CHEN, 2015. Evaluation of four commonly used DNA barcoding loci for Chinese medicinal plants of the family Schisandraceae. *PLoS ONE* [online]. **10**(5). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0125574
- ZHANG, Shu, Yong Jie ZHANG, Xing Zhong LIU, Hong ZHANG a Dian Sheng LIU, 2013. On the reliability of DNA sequences of *Ophiocordyceps sinensis* in public databases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. **40**(3–4), 365–378. ISSN 13675435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-012-1228-4
- ZIMMERMANN, Juergen, Mehrdad HAJIBABAEI, David C. BLACKBURN, James HANKEN, Elizabeth CANTIN, Janos POSFAI a Thomas C. EVANS, 2008. DNA damage in preserved specimens and tissue samples: A molecular assessment. *Frontiers in Zoology* [online]. **5**. ISSN 17429994. Dostupné z: doi:10.1186/1742-9994-5-18

**Elektronické zdroje:**

[www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

[www.pacb.com](http://www.pacb.com)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) - GenBank Overview, 2024