ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství

Monitoring a zhodnocení ilegálního obchodu s luskouny

Bakalářská práce

Praha 2024

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Černá Bolfíková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Iva Bernáthová

Vypracovala: Linda Babiánková

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Monitoring a zhodnocení ilegálního obchodu s luskouny vypracovala samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedla v referencích.

V Praze dne 16. dubna 2024

.....

Linda Babiánková

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Mgr. Barboře Černé Bolfíkové, Ph.D. za odborné vedení, velkou trpělivost a pomoc při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své školitelce Ing. Ivě Bernáthové za cenné rady, spoustu trpělivosti, a nejen za pomoc při asistenci v laboratoři, ale taktéž při zpracování dat, jakožto i dalším z laboratorního týmu Molekulární genetiky, kteří se na analýze a zpracování dat do praktické části podíleli.

Abstrakt

Monitoring a zhodnocení ilegálního obchodu s luskouny

V posledních letech došlo k výraznému nárůstu nelegálního obchodu s luskouny, což vedlo k tomu, že jsou v současnosti nejčastěji lovenými savci na světě. Pokles populace tohoto druhu lze přičíst různým faktorům, včetně ztráty habitatu, fragmentace populací, intenzivnější zemědělské činnosti a zejména nadměrnému lovu. Od roku 2016 je všech osm druhů zařazeno do přílohy CITES I, čímž je na ně uvalen celosvětový zákaz mezinárodního obchodu. Tradiční medicína a léčitelství v Asii a Africe využívají šupiny a další části těla k řešení nejrůznějších zdravotních potíží. V asijských restauracích je jejich maso považováno za delikatesu, zatímco v Africe se konzumuje především jako bushmeat. Využití genetických technologií umožňuje dosáhnout jak identifikace druhu, tak určení původu jedince, což je zásadní pro následné snahy o ochranu a právní řízení, stejně jako pro sledování klíčových kanálů obchodu. Největší poptávka po šupinách i celých jedinců je v Asii. Značná část asijských druhů je předmětem obchodu v rámci asijského kontinentu. Většina afrických druhů je obchodována prostřednictvím námořní dopravy z Nigérie do asijských přístavů a poté do Číny. Získávání šupin a živočichů ze sousedních zemí je podstatnou součástí obchodu s luskouny, přičemž Nigérie je významným centrem této činnosti. V současné době nejvíce zabavených luskounů má původ v Kamerunu. Evropské země zaujímají významnou pozici v rámci ilegálního obchodu s luskouny zejména působením jako tranzitní místa. Tyto nezákonné aktivity se odhalují pomocí forenzních genetických metod. Praktická část je zaměřena na sekvenaci cytochromu b (*cytb*), který lze využít mimo jiné k trasování ilegálního obchodu s ohroženými druhy, včetně luskounů. Pomocí haplotypové sítě byla popsána genetická linie z Konga, která poukazuje na problematiku geneticky nezmapovaného území ohrožených druhů.

Klíčová slova: luskoun, ilegální obchod, ilegální trasy, forenzní analýza, genetické metody, cytochrom b

Author's abstract

Pangolin illegal trade, the assessment and monitoring

Over the recent years, there has been a notable surge in the illicit commerce of pangolins, leading to their current status as the most hunted mammal in the world. The fall in population numbers of these species can be attributed to various factors, including habitat loss, habitat fragmentation, intensified agricultural activities, and notably, excessive hunting. Since the year 2016, all eight species have been incorporated into CITES Appendix I, thereby imposing a global prohibition on their international commerce. Traditional medical techniques in Asia and Africa employ scales and other body parts to address a diverse range of health ailments. In Asian restaurants is their meat is considered a delicacy, while in Africa it is mainly eaten as bushmeat. The utilization of genetic technologies enables the achievement of both species' identification and individual origin determination, which are crucial for following conservation endeavours and legal proceedings, as well as the tracking of key trafficking channels. The region of Asia exhibits the highest level of demand for both scales and whole specimens. A significant proportion of Asian species are subject to commerce within the confines of the Asian continent. Most African species are acquired and traded through maritime transportation from Nigeria to Asian ports, and then to China. The acquisition of scales and fauna from neighbouring countries is a substantial component of the pangolin commerce, with Nigeria serving as a prominent hub for this activity. Currently, most of the seizures originate from Cameroon. European countries have a significant position in the illegal pangolin trade, in particular by acting as transit points. These illegal activities are detected using forensic genetic methods. The practical part focuses on the sequencing of cytochrome b (*cytb*), which can be used, among other things, to trace the illegal trade in endangered species, including pangolins. Using a haplotype network, a genetic lineage from the Congo was described, highlighting the issue of the genetically uncharted territory of endangered species.

Key words: pangolin, illegal trade, illegal routes, forensic analysis, genetic methods, cytochrome b

Obsah

1. Úvod ..... - 1 -

2. Cíle ..... - 2 -

3. Literární rešerše ..... - 3 -

3.1 Řád Pholidota ..... - 3 -

3.1.1 Fylogeneze řádu Pholidota ..... - 3 -

3.1.2 Současné rozšíření ..... - 5 -

3.1.3 Současný status ve volné přírodě ..... - 6 -

3.2 Ilegální obchod s luskouny ..... - 8 -

3.2.1 Ilegální obchod ..... - 8 -

3.2.2 Důvody lovu ..... - 9 -

3.2.2.1 Tradiční medicína ..... - 9 -

3.2.2.2 Bushmeat a jiné využití luskounů ..... - 11 -

3.2.2.3 Ochrana proti pytláctví ..... - 13 -

3.3 Monitorování obchodu s luskouny ..... - 13 -

3.3.1 Průzkumy vesnic a lokálních trhů ..... - 13 -

3.3.2 Monitorování pomocí molekulárních metod ..... - 15 -

3.3.2.1 Identifikace druhu ..... - 15 -

3.3.2.2 Identifikace geografického původu ..... - 15 -

3.3.3 Dynamika obchodu ..... - 18 -

3.3.3.1 Vývoj obchodu ..... - 18 -

3.3.3.2 Obchodní trasy a hlavní místa obchodu ..... - 20 -

3.3.3.3 Stanovení počtu ulovených zvířat ..... - 24 -

4. Metodika ..... - 25 -

4.1 Vzorky ..... - 25 -

4.2 Extrakce DNA ..... - 25 -

4.3 Polymerázová řetězcová reakce (PCR) ..... - 25 -

4.4 Purifikace ..... - 26 -

4.5 Sekvenace ..... - 26 -

4.6 Analýza dat ..... - 27 -

5. Výsledky ..... - 28 -

6. Diskuze ..... - 29 -

7. Závěr ..... - 31 -

8. Reference ..... - 33 -

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Status ochrany a populační trendy všech druhů luskounů podle Červeného seznamu IUCN (IUCN 2019).....- 7 -

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro PCR. .....- 26 -

Tabulka 3: Protokol pro PCR cycler použitý při amplifikaci. .....- 26 -

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Kompletní fylogenetický strom současných druhů luskounů a mapa s jejich areálem rozšíření. V červených čtvercích jsou znázorněny konkrétní časy divergence v milionech let (Autor: Gaubert et al. 2018).....- 4 -

Obrázek 2: Mapa oblasti rozšíření asijských druhů (a) a afrických druhů (b) luskounů (Autor: Heinrich et al. 2017).....- 6 -

Obrázek 3: Mapa šesti existujících genetických linií luskounů bělobřichých v Africe ve zvýrazněném areálu výskytu (Autor: Gaubert et al. 2016).....- 17 -

Obrázek 4: Grafické znázornění způsobu transportu derivátů z luskounů z Nigérie mezi lety 2010-2021 (A). Počet zabavených zásilek (B). Velikost zabavených zásilek (v kg) (Autor: Emogor et al. 2021).....- 19 -

Obrázek 5: Vyobrazení hlavních tras obchodu skrz Nigérii (Autor: Tinsman et al. 2023).....- 22 -

Obrázek 6: Vyobrazená mapa obchodu s luskouny mezi lety 2010 a 2015 (Autor: Heinrich et al. 2016). .....- 23 -

Obrázek 7: Obchodní trasy ilegálního obchodu s luskouními šupinami mezi rokem 2012 a 2018 (Autor: Ingram et al. 2019).....- 24 -

Obrázek 8: Haplotypová síť vytvořená z 357 sekvencí v programu TCS Beautifier. .....- 28 -

Seznam zkratek použitých v práci:

bp – komplementární pár bazí

CITES – Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin

COI – cytochromoxidáza I

cyt b – cytochrom b

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

IUCN – Mezinárodní svaz ochrany přírody

mtDNA – mitochondriální DNA

NCBI – National Center for Biotechnology Information

nDNA – jaderná DNA

PCR – polymerázová řetězová reakce

SNP – jednonukleotidový polymorfismus

STR – mikrostelity

WHO – Světová zdravotnická organizace

1. Úvod

Lidské populace lovily pro obživu divokou zvěř a využívaly ji v tradiční medicíně po tisíce let, ale v současné době jsou tyto důvody jednou z hlavních hrozeb způsobující pokles populací a vymírání druhů (Liu et al. 2016; Ingram et al. 2019). Luskouni (Pholidota) jsou savci, kteří mají pokryté tělo šupinami. Na celém světě existuje osm druhů luskounů, čtyři africké a čtyři asijské druhy (Challender et al. 2014). Jejich šupiny, stejně jako další jejich deriváty těla (kosti, krev, drápy, embrya a další) se využívají v tradiční asijské a africké tradiční medicíně k léčbě různých onemocněních či rituálních zvyklostí (Soewu a Ayodele 2009; Soewu a Adekanola 2011). Kromě toho je jejich maso velmi výživné a vnímané jako pochoutka. V asijských restauracích se maso luskounů konzumuje jako symbol statusu (Vallianos 2016; Xu et al. 2016). V Africe jsou luskouni převážně konzumováni jako často jediný zdroj bílkovin místními obyvateli či prodáváni na trzích (Ingram et al. 2021; Gaubert et al. 2024). Všech osm druhů je od roku 2016 zařazeno v příloze I CITES (Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin), což jim udělilo nejvyšší stupeň ochrany (Challender a Waterman 2017); i přes toto omezení obchod s luskouny stále přetrvává (Nash et al. 2018; Ingram et al. 2019; Gaubert et al. 2024).

Monitorování obchodu s luskouny je velmi důležité vzhledem k omezeným informacím o skutečném počtu jedinců v přírodě (Willcox et al. 2019). Pomocí různých metod lze obchod monitorovat a hodnotit současný stav ve volné přírodě. Forenzní genetické metody slouží především k identifikaci druhu a původu zabavených jedinců. Zabavení jedinci nemají často identický původ s místem odesláním ani zachycení zásilky, proto je důležité identifikovat odkud bylo zvíře uloveno a na místě s největším výskytem pytláků provádět ochranářské práce či navrátit zabavené jedince zpět do jejich přirozeného prostředí bez pytláků (Ingram et al. 2019; Tinsman et al. 2023). Identifikace druhu je nezbytným předpokladem pro následné právní kroky a prosazení legislativy (Priyambada et al. 2021). Pomocí genetických metod lze také odvodit dynamiku obchodu a určit hlavní obchodní trasy s luskouny (Ingram et al. 2019; Tinsman et al. 2023).

2. Cíle

Cílem literární rešerše bylo shrnutí poznatků o ilegálním obchodu s luskouny, zejména popsat jeho dynamiku a popsat jakou roli hrají luskouni v tradiční asijské medicíně a obchodu s bushmeat produkty. Práce se také věnuje forenzním genetickým metodám, které se využívají při monitorování obchodu s luskouny.

Cílem praktické části bylo ověřit, zda se genetická linie z luskouních vzorků z Konga popíše i pomocí sekvenace markeru *cytb*.

3. Literární rešerše

3.1 Řád Pholidota

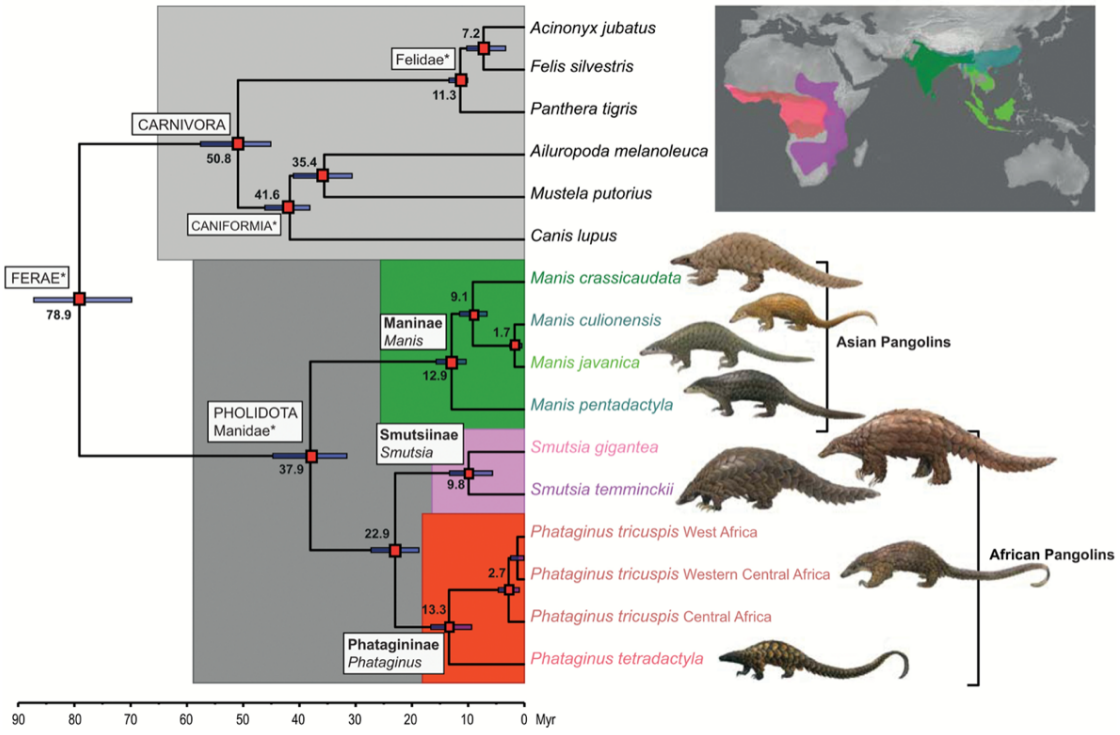
3.1.1 Fylogeneze řádu Pholidota

Luskouni patří do řádu Pholidota, který je laurasijského, konktrétně evropského původu (Gaudin et al. 2009). Nejstarší dochovaná fosilie luskouna*, S. olteniensis sp. nov*., pochází z Rumunska a datuje se do období Pleistocénu (Terhune et al. 2021). Laurasijský původ podporuje skutečnost, že řád Pholidota je velmi blízký s řádem Carnivora a s vyhynulou skupinou Palaeanodonta, které mají obě původ a známé zástupce na laurasijském kontinentu. Divergentní vývoj proběhl pravděpodobně před 56-87 miliony lety v Evropě (Choo et al. 2016; Kumar et al. 2018; Gaubert et al. 2018). Předpokládá se, že se předchůdci současných luskounů rozšířili z Evropy přes Afriku do jihovýchodní Asie pomocí pevninských mostů (Gaudin et al. 2009; Du Toit et al. 2014).

V současné době řád Pholidota zahrnuje osm žijících druhů a řadí se mezi jedny z nejmenších existujících řádů placentálních savců (Nowak 1999). Tento řád obsahuje tři čeledi: *Eomanidae*, *Patriomanidae* a *Manidae*. *Eomanidae* a *Patriomanidae* zahrnují pouze již vyhynulé druhy. Všech osm současně žijících druhů je zahrnuto v čeledi *Manidae* (Gaudin et al. 2009); čtyři z nich obývají Asii: luskoun indický (*Manis crassicuadata*), luskoun čínský (*Manis pentadactyla*), luskoun ostrovní (*Manis javanica*), luskoun filipínský (*Manis culionensis*) a čtyři druhy se vyskytují v Africe: luskoun velký (*Smutsia gigantea*), luskoun stepní (*Smutsia temminckii*), luskoun bělobřichý (*Phataginus tricupsis*), luskoun černobřichý (*Phataginus tetradactyla*) (viz Obrázek 1) (Challender et al. 2014).

Jednotlivé druhy se od sebe liší velikostí, zbarvením, stavbou lebky, rozložením šupin, směrem růstu šupin nebo preferencí stanovišť, navíc asijské druhy mají oproti africkým druhům štětiny mezi šupinami (Wang et al. 2016; Cota-Larson 2017; Ferreira-Cardoso et al. 2020). Rod *Smutsia* zahrnuje terestriální druhy a rod *Phataginus* arboreální druhy (Gaubert et al. 2018). Pokud jde o klasifikaci luskounů, stále existují nesrovnalosti, jde-li o počet druhů (Du Toit et al. 2017). V nedávné studii se objevil záznam o existenci devátého kryptického asijského druhu – *Manis mysteria*. Byl identifikován na základě

genomického sekvenování šupin, které byly zabaveny při pašování v Hongkongu na konci roku 2015. Gu et al. 2023 uvádí, že jejich analýzy poskytují spolehlivé a přesvědčivé důkazy, že druh *Manis mysteria* představuje samostatně se vyvíjející linii luskounů, jejíž demografická historie se liší od všech ostatních druhů luskounů.



Obrázek 1: Kompletní fylogenetický strom současných druhů luskounů a mapa s jejich areálem rozšíření. V červených čtvercích jsou znázorněny konkrétní časy divergence v milionech let (Autor: Gaubert et al. 2018).

Název pangolin je odvozen z malajského slova „pengguling“, což v překladu znamená „něco, co se sroluje“ (Choo et al. 2016). Na rozdíl od ostatních placentálních savců je luskouní kůže pokryta keratinovými šupinami (Meyer et al. 2013). Vznik tohoto unikátního znaku zůstává záhadou, ačkoli pozorování moderních druhů luskounů naznačuje, že tento unikátní znak slouží jako brnění před potenciálními predátory (Choo et al. 2016). Šupiny tvoří až 25 % hmotnosti zvířete a jejich počet zůstává během vývoje jedince stálý. Šupiny pokrývají celé tělo zvířete kromě spodní části hlavy, břišního trupu, vnitřního povrchu končetin a polštářků nohou (Wang et al. 2016). Všechny druhy se specializují na potravu složenou výhradně z termitů a mravenců. Nejdůležitějšími adaptacemi, které umožňují luskounům vyhledávat a konzumovat svou kořist patří silné

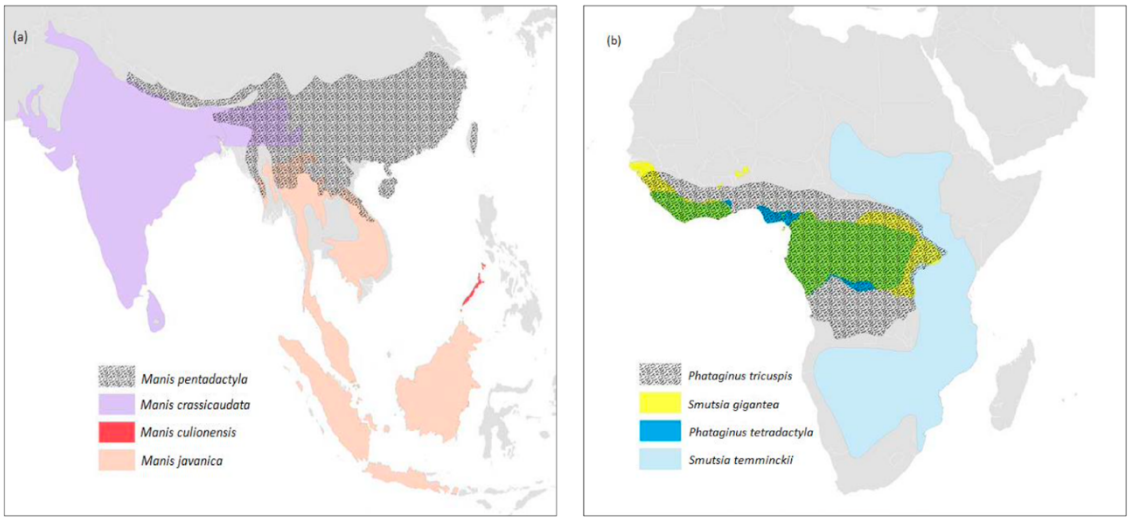
přední drápy, které slouží k zahrabávání se do nor a narušování termitišť, extrémně dlouhý jazyk, který dosahuje délky až jedné třetiny jejich těla a vysoce vyvinutý čichový systém (Challender et al. 2014). K zachycení potravy používají již zmíněný lepkavý dlouhý jazyk (Vallianos 2016). Se svou specializací hrají velmi důležitou roli v regulaci hmyzích populací v přírodních ekosystémech. Za rok zkonzumují až 70 milionů kusů hmyzu (Hua et al. 2015). Téměř všechny druhy vykazují určitý stupeň dimorfismu tělesné velikosti, přičemž samci jsou větší a delší než samice, i když stupeň tohoto dimorfismu se u jednotlivých druhů značně liší (Chao et al. 2020).

3.1.2 Současné rozšíření

Luskouni žijí v různých biotopech, které zahrnují subtropické a tropické lesy, savanové pastviny, smíšené lesy i obdělávané oblasti a další (Challender et al. 2014). Obecně platí, že bývají blízko vodních zdrojů a místa, kde se vyskytují ve velkém množství mravenci a termiti (Gaubert 2011). Oblasti rozšíření druhů jsou zobrazeny na obrázku 2. Celkem se luskouni vyskytují v 51 zemích, z nichž 19 leží v Asii a 32 v Africe.

Asijské druhy se nacházejí od indického subkontinentu přes Čínu do jihovýchodní Asie s podobnou velikostí areálu rozšíření tří druhů (luskoun čínský, luskoun indický, luskoun ostrovní). Luskoun filipínský je endemickým druhem Filipín.

Na západě a ve středu afrického kontinentu se vyskytují tři druhy (luskoun bělobřichý, luskoun černobřichý, luskoun velký), jejichž areály se překrývají. Luskoun bělobřichý obývá nejrozsáhlejší území a často se vyskytuje v sekundárních lesích (Heinrich et al. 2017). Oproti tomu luskoun stepní je jediným druhem luskouna, který vyhledává a preferuje převážně suché oblasti, lesní savany a písčitou půdu východní a jižní Afriky (Pietersen et al. 2021).



Obrázek 2: Mapa oblasti rozšíření asijských druhů (a) a afrických druhů (b) luskounů (Autor: Heinrich et al. 2017).

3.1.3 Současný status ve volné přírodě

V současné době jsou známy pouze omezené informace o stavu a velikosti populace z důvodu obtížného monitoringu (Willcox et al. 2019). Všechny druhy luskounů jsou však ohroženy ztrátou přirozeného prostředí, nadměrným lovem, zvyšující se poptávkou na mezinárodních trzích, fragmentací habitatů a zejména u afrických druhů zemědělskou intenzifikací. Jejich šupiny a další části těla se hojně využívají pro tradiční africkou i asijskou medicínu a jejich maso je považováno za delikatesu (Challender a Hywood 2012; Challender et al. 2014; Cota-Larson 2017; Zanvo et al. 2020).

Od roku 2016 jsou všechny druhy uvedeny v příloze I CITES, což znamená, že je celosvětově zakázáno s nimi mezinárodně obchodovat (CITES 2016). Jsou také uvedení v příloze A předpisů EU o obchodu s volně žijícími živočichy (Species+ 2020). Na Červeném seznamu ohrožených druhů Mezinárodního svazu ochrany přírody (IUCN) jsou klasifikováni následovně: dva africké druhy jsou klasifikováni jako zranitelné a dva druhy jako ohrožené, jeden asijský druh jako ohrožený a tři jsou klasifikovány jako kriticky ohrožené, viz. tabulka 1 (IUCN 2024).

Tabulka 1: Status ochrany a populační trendy všech druhů luskounů podle Červeného seznamu IUCN (IUCN 2024).

Kontinet	Druh latinsky	Druh česky	IUCN Red List status	Populační trend
Asie	*Manis crassicaudata*	luskoun indický	ohrožený	klesající
	Manis culionensis	luskoun filipínský	kriticky ohrožený	klesající
	Manis javanica	luskoun ostrovní	kriticky ohrožený	klesající
	Manis pentadactyla	luskoun čínský	kriticky ohrožený	klesající
Afrika	*Phataginus tetradactyla*	luskoun černobřichý	zranitelný	klesající
	Phataginus tricupsis	luskoun bělobřichý	ohrožený	klesající
	Smutsia gigantea	luskoun velký	ohrožený	klesající
	Smutsia temminckii	luskoun stepní	zranitelný	klesající

Zanvo et al. (2020) detailněji popsal stav afrických druhů, konkrétně luskouna bělobřichého a luskouna velkého. Z jeho studie vyplývá, že za posledních 20 let (od roku 1998 do roku 2018) došlo k výraznému zmenšení jejich areálu rozšíření. V případě luskouna velkého tvoří 100 % jeho výskytu v Beninu chráněné území, konktrétně lesní rezervace Alibori. Takový vzorec úbytku areálu a obsazování chráněných území je typický pro populace, které procházejí rychlým vymíráním v důsledku zhoršování stavu přirozeného prostředí a cíleného lovu, v případě luskounů za účelem využití v tradiční medicíně a pro maso (Bauer et al. 2015; Zanvo et al. 2020).

Luskoun bělobřichý je považován za nejběžnějšího afrického luskouna, ale předpokládá se, že jeho početnost v Ghaně a Guineji klesá a ve Rwandě se blíží vyhynutí (Pietersen et al. 2021). Ačkoli se tento druh vyskytuje převážně ve vlhkých tropických nížinných lesích, v posledních letech jej lze nalézt také v hustých lesích a druhotných porostech, jako jsou například opuštěné plantáže palmy olejné, což značí určitou úroveň adaptability na změnu biotopů vyvolanou lidskou činností (Gaubert 2011).

Populace luskouna čínského v Číně, zaznamenala od 60. let pokles o více než 90 % (Challender a MacMillann 2014; Yang et al. 2018). Pokles populace ve větší míře ovlivnil lidský faktor, ale také klimatické změny. Změna je zřejmá především v oblastech s vyšší nadmořskou výškou, což značí silný vliv lidského faktoru na jejich areál výskytu. Pravděpodobně se luskouni stěhují do vyšších nadmořských výšek z důvodu rozvinuté infrastruktury a snadné dopravy v nižších nadmořských výškách, jež usnadňuje přesun ulovených jedinců do jiných regionů ke konzumaci či jiné spotřebě. Mikroklima v norách může zůstat relativně stabilní, nicméně je důležité zdůraznit, že změna klimatu může mít pozitivní dopady na dostupnost potravy. Existující studie udávají, že tato změna může vést k rozšíření potravních zdrojů v norách (Yang et al. 2018). Například změna klimatu

může mít za následek rozšíření oblasti výskytu mravenců, čímž dochází k posílení jejich přístupu k potravním zdrojům (Bertelsmeier et al. 2015).

3.2 Ilegální obchod s luskouny

3.2.1 Ilegální obchod

Obchod s produkty volně žijících zvířat je celosvětově obzvláště velký problém, neboť se vedle obchodu s drogami, zbraněmi a lidmi stal jednou z největších a nejvýnosnějších organizovaných trestných činností (Wyatt 2013). Obchod s volně žijícími zvířaty a rostlinami je klíčovou hrozbou pro ochranu biologické diverzity, neboť mu podlehnou každoročně na celém světě miliardy exemplářů (Nijman a Shepherd 2011). Čísla, která se často udávají, zahrnují pouze živočichy, se kterými se obchoduje přes mezinárodní hranice, avšak uvnitř států existuje značná míra obchodu s volně žijícími živočichy, která není vždy zaznamenána a reportována. Dle neziskové organizace TRAFFIC, jsou hlavními spotřebiteli a hybateli nárůstu obchodu lidé z ekonomicky vyspělejších zemí, kteří si zvykli na životní styl, který zahrnuje produkty z volně žijících zvířat, například exotické pochoutky, kožené luxusní zboží a léky (TRAFFIC nedatováno).

Ilegální obchod není výlučně problém získávání produktů z volně žijících zvířat pro organizované zločinecké sítě, ale slouží také jako hlavní prvek pro získání obživy v některých chudých oblastech na Zemi (Roe et al. 2014). Středem mezinárodní pozornosti se často stávají velká zvířata, jako jsou sloni, nosorožci a tygři, ale ilegální obchod má negativní dopad i na další druhy. Ilegální obchod zahrnuje druhy, které nejsou ohroženy, stejně tak jako ty, kterým hrozí vyhynutí z důvodu obchodu či ztráty jejich přirozeného prostředí (Duffy et al. 2016).

Luskouni jsou označováni za nejvíce obchodované savce na světě (Challender et al. 2014). Jejich části těl, zejména šupiny, ale také kosti, drápy, krev a embrya se využívají v tradiční medicíně již po staletí (Wang et al. 2020). Jejich maso je považováno za delikatesu v restauracích, kde je jeho konzumace také symbolem bohatství a postavení (Shairp et al. 2016). Poptávka je nejsilnější ve východní Asii, zejména v Číně a Vietnamu, avšak je neudržitelná. Odhaduje se, že mezi lety 2000 a 2013 bylo uloveno více než milion jedinců, což může odrážet jen zlomek skutečného celosvětového obchodu. V současné

době se nejvíce obchoduje se šupinami, masem a živými luskouny (Challender et al. 2014; Heinrich et al. 2017; Zhang et al. 2022).

3.2.2 Důvody lovu

3.2.2.1 Tradiční medicína

V celé historii lidstva a prakticky v každé lidské kultuře byla zvířata využívána jako zdroj pro léčbu a zmírnění celé řady problémů. Některá zvířata byla také používána pro náboženské a kulturní účely (Costa-Neto 2005). Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je tradiční medicína jeden z nejjistějších prostředků k dosažení celkového pokrytí zdravotní péče a celosvětově dominuje systémům zdravotní péče, odhadem 60-80 % světové lidské populace využívá živočichy a rostliny jako hlavní zdroj léčiv (WHO 2002; Van a Tap 2008). Tradiční čínská medicína má historii delší než 4000 let a bylo zaznamenáno, že využívá asi 1574 živočišných druhů (Liu et al. 2016). Kromě toho byla tradiční medicína v důsledku pandemie SARS-Cov-2 navržena jako potenciální způsob léčby, což přivedlo další část celosvětové pozornosti k této možnosti zdravotní péče (Nadeem et al 2020; Ling, 2020), nicméně luskouni byly identifikováni jako potenciální zdroj pandemie (Zhang et al. 2020) a hráli klíčovou roli při zdůrazňování hygienických rizik souvisejících s obchodem a používáním léčiv obsahující šupiny či jiných léčiv tradiční medicíny (Borzeé et al. 2020; Sexton et al. 2021).

Ačkoli se v Číně luskouni využívají v tradiční čínské medicíně po tisíce let, současné vzrůstající bohatství obyvatel v Číně vedlo ke zvýšení poptávky po jejich produktech. Používání luskouních šupin v tradiční čínské medicíně se datuje už v roce 480 našeho letopočtu. Kromě nelegálních luskouních derivátů, které se nachází na trzích, existuje v Číně také legální trh s léky z luskouních šupin, které podporují používání tradiční čínské medicíny (Xing et al. 2020). Čína povolovala legální používání šupin jako oficiální lék v čínském lékopisu do roku 2020, přesto se šupiny stále používají jako přísada v některých patentovaných lécích, které jsou součástí lékopisu (Wang et al. 2020; Omifolaji et al. 2022).

Používají se při klinické léčbě, výrobě manufakturních a patentovaných léků nebo medicinálních lihovin v určitých nemocnicích. I přesto jsou produkty z luskounů stále široce dostupné v maloobchodních prodejnách a obchodech s tradiční medicínou po celé Číně (Vallianos 2016). Nejvíce využití mají šupiny, kosti a orgány. V každé zemi a oblasti

využívají šupiny i části těl jiným způsobem a na jiné onemocnění (Soewu & Ayodele 2009; Soewu a Adekanola 2011; Boakye et al. 2015). V celé Asii a Africe byly šupiny luskounů typicky využívány pro různé léčebné funkce, i když neexistuje žádný vědecký důkaz, který by potvrzoval léčebné vlastnosti. Šupiny jsou složeny z keratinu, stejného proteinu přítomného v lidských vlasech a nehtech (Soewu a Ayodele 2009; Meyer et al. 2013). Důležité je zmínit, že šupiny nelze v žádném případě odstranit bez usmrcení zvířete (Soewu et al. 2011).

Z pohledu tradiční asijské medicíny jsou šupiny obvykle používány k podpoře laktace a krevního oběhu, snižování otoků, podpoře výtoku hnisu, léčbě onemocnění jater, léčbě nádorů a ulevě od bolesti (Cheng et al. 2017; Wang et al. 2020; Sexton et al. 2021). Proto se šupiny používají k léčbě revmatických bolestí, toxikózy, zánětů, astmatu, kožních onemocnění a rakoviny. Šupiny se nejprve vysuší a uvaří, poté se rozdrtí na prášek, který se inhaluje, smíchává s jinými léky nebo upravuje jako pasta (Vallianos 2016; Sexton et al. 2021). Léčitelé pracující v nemocnicích nejvíce podporují a prodávají léky obsahující šupiny pro jejich léčebnou hodnotu. Někteří léčitelé věří, že šupiny lze nahradit jinými přísadami, jako jsou například semena *Vaccaria segetalis*, dřeň stonku *Tetrapanax papyriferus*, *Liquidambar formosana*, *Cistanche salsa*, kořen *Salvia miltiorrhiza*, kůra *Eucommia elmoides* a další. Jako náhražku ze zvířat používají krunýř želvy Reevesovy (*Mauremys reevesii*) a prasečí kopyto (Wang et al. 2020; Sexton et al. 2021). Používání šupin je nejen podporováno léčiteli, ale také online (Vallianos 2016; Wang et al. 2020). Pacienti a celkově široká veřejnost nemají velké povědomí o léčivých účincích luskounů, a proto léčitelé hrají klíčovou roli při rozhodování, zda jejich pacienti používají léky obsahující šupiny či nikoli. Mezinárodní webová stránka Massage Today donedávna uváděla doporučené dávkování a formu podávání šupin. Používání léčiv obsahující šupiny a různé části luskounů mají i vedlejší účinky zahrnující nadýmání, ztrátu chuti k jídlu, abnormální jaterní funkce, žloutenku, poškození jater a některé příznaky alergie (Vallianos 2016).

V Africe až 80 % místní populace spoléhá na tradiční léčbu jako hlavní způsob péče o zdraví (WHO 2008). Tradiční medicínu využívají jednak kvůli vysokým nákladům na konvenční medicínu a nedostupnosti moderních zdravotnických zařízení, ale také ji často považují za vhodnější způsob léčby (Marshall 1998). Tradiční africká medicína zahrnuje rozsáhlé využití domorodého bylinkářství v kombinaci s některými aspekty africké spirituality (Chaitanya et al. 2021). Značný počet lidí žijících na venkově se při

léčení spoléhá pouze na tradiční léky (Helwig 2005). Stánky prodávající rostliny a části zvířat pro léky jsou běžné na venkovských i městských trzích v mnoha afrických městech. Díky rostoucí poptávce po volně žijících živočiších, došlo k výraznému posunu motivace lovu od primární obživy k čistě obchodním účelům. Lovci kvůli vysoké poptávce často spojené se smluvním lovem, chodí lovit luskouny hlouběji do jejich přirozeného prostředí. Kromě lovení jedinců toto jednání představuje i narušení biotopu během pátrání (Newton et al. 2008; Soewu et al. 2011).

Luskouni jsou také široce využíváni i v tradičních afrických medicínách jako je například „muti" (Boakye et al. 2014). V „muti" se věří, že šupiny chrání před zlými znameními, odhánějí lvy, přinášejí štěstí a léčí srdeční choroby (Vallianos 2016). Šupiny jsou nejuniverzálnější částí těla luskouna pro léčbu různých onemocnění a jsou vysoce ceněny v lékopisu africké tradiční medicíny, kde jsou široce používány (Soewu a Adekanola 2011; Boakye et al. 2015). V Ghaně tradiční léčitelé používají až 13 částí těl luskounů k léčbě 35 onemocnění (Boakye et al. 2014). V Nigérii lidé Awori a lidé z Ijebu využívají luskouny k léčbě až 47 stavů (Soewu & Ayodele 2009; Soewu a Adekanola 2011).

Závěrem lze říci, že v celé oblasti rozšíření jsou luskouni využíváni pro mnoho léčitelských a spirituálních rituálů, ve které místní obyvatelé věří, i přestože se jejich léčivé účinky nepotvrdily.

3.2.2.2 Bushmeat a jiné využití luskounů

Kromě používání šupin a částí těl v tradiční medicíně, se luskouni loví také kvůli svému masu a kůži. Historicky se obchodovalo ve velkém s kůžemi luskounů na mezinárodní úrovni pro komerční účely, ačkoliv za posledních 20 let obchod s kůžemi poklesl a kůže jsou nahrazovány kůžemi jiných druhů zvířat či potištěnými kůžemi. Nejvíce se obchoduje s kůžemi asijských druhů, jako jsou luskoun ostrovní a luskoun čínský. Konečnou zemí ve většině případů jsou Spojené státy americké, Japonsko a Mexiko (obr. č.6) (Challender et al. 2015; Heinrich et al. 2016; Heinrich et al. 2019). Z kůže se vyrábí boty, peněženky, opasky a kabelky. Využívají se také šupiny a drápy, které se využívají k výrobě ozdob a hudebních nástrojů (Challender 2011; Heinrich et al. 2019).

Termín bushmeat označuje maso pocházející ze všech volně žijících živočichů. Nejvíce se termín bushmeat používá v souvislosti s Afrikou. Savci jsou považováni za hlavní zdroj bushmeat v celé Africe (Boakye et al. 2016). Nejvíce se loví primáti,

kopytníci, netopýři, hlodavci a masožravci (Ripple et al. 2016). Konzumace známých ohrožených druhů, jako jsou šimpanzi, gorily a sloni, je často spojována s osobními či kmenovými přesvědčeními, z těchto důvodů se je mnoho lidí bojí zabít nebo sníst kvůli následkům (např. nemoc nebo smrt). Navzdory nejvyššímu stupni ochrany patří luskouni k jedněm z nejkonzumovanějších druhů zvířat (Nguyen et al. 2021). Z hlediska primárně venkovských oblastí byl lov volně žijících živočichů vždy hlavním zdrojem živočišných bílkovin a také jediný zdroj příjmů pro obyvatele vesnic na africkém kontinentě, jelikož maso pocházející z domácích zvířat chybí a často je dražší, bez ohledu na infekční choroby a ilegalitu obchodu, s nimiž je konzumace bushmeat spojována (Ingram et al. 2021; Gaubert et al. 2024). Mezi hlavní důvody preference bushmeatu před domácími zvířaty patří cenová dostupnost, kulturní vlivy, zdraví, prestiž a chuť. Lidé vnímají bushmeat zdravější, bez tuku, bohatý na bílkoviny a vitamíny, přírodní, a tudíž čisté maso, považují ho za zdroj afrodiziak a antibiotik či za lék na rakovinu a jiné nemoci (Vallianos 2016; Nguyen et al. 2021). Bushmeat je také v některých částech světa považováno za luxusní kuchyni, zejména vzácné druhy (např. sloni, lidoopi) a druhy s ojedinělým vzhledem (např. luskouni).

Maso luskouna je považováno za pochoutku díky své chuti a vzácnosti, kterou konzumují bohatí jako symbol prestiže, statusu a bohatství, což řídí současnou poptávku (Vallianos 2016; Nguyen et al. 2021; Gaubert et al. 2024). Luskouni dokonce zásobují lukrativní evropský obchod s bushmeat založený na pašování zvířat (Chaber et al. 2010). Nejčastěji prodávaný na afrických trzích je luskoun bělobřichý (Zanvo et al. 2022; Tinsman et al. 2023). V luxusních čínských a vietnamských restauracích patří luskouní maso k nejdražším masům, které většinou konzumují státní zaměstnanci nebo podnikatelé. Aby restaurace zajistily jeho čerstvost, nabízejí usmrcení luskouna přímo u stolu před zákazníkem (Vallianos 2016). Někteří zákazníci pijí jejich krev, která má údajně afrodiziakální účinky (Fletcher 2015). Embrya se konzumují v polévkách, které mají mít také léčivé účinky. Mrtvá těla se někdy nakládají do rýžového vína a vytváří se z nich tonika (Vallianos 2016).

V Číně i v různých státech Afriky byla během epidemií SARS konzumace luskounů zakázaná, protože panovaly obavy, že zvířata by mohla být přenašečem onemocnění (Vallianos 2016; Gaubert et al. 2024). Stejně tak úbytek velkých savců, zejména selektivní úbytek primátů, velkých kopytníků a masožravců, může mít závažné

důsledky pro přenos zoonotických chorob, například eboly, HIV-1 a HIV-2, antraxu, salmonelózy, opičích neštovic a SARS-CoV-2 (Ripple et al. 2016; Sexton et al. 2021).

3.2.2.3 Ochrana proti pytláctví

Pytláctví je velkou hrozbou pro ohrožené druhy a ekosystémy (Yang et al. 2014). Pytláci v Africe mají často vojenský nebo policejní výcvik a používají návnady a pasti k nelegálnímu chytání zvířat (Kamminga et al. 2018). Hlídky vládních i nevládních agentur se snaží bránit pytláctví a shromažďují informace o chování pytláků. Chování pytláků se mění ve vztahu k přítomnosti rangerů, což je důležitý faktor při plánování hlídek (Fang et al. 2017). Kromě toho jsou k dispozici nástroje, jako je nástroj CAPTURE (Comprehensive Anti-Poaching tool with Temporaland observation Uncertainty Reasoning), který umožňuje analyzovat údaje o pytláctví a předvídat chování pytláků (Yang et al. 2014; Nguyen et al. 2016; Fang et al. 2017). Technologické prostředky, jako jsou kamerové systémy, drony a sledování pomocí GPS, také pomáhají v boji proti pytláctví. Tyto technologie umožňují sledovat pohyb pytláků a detekovat nezákonnou činnost. Například u nosorožců se do jejich rohů mohou implementovat kamery nebo zařízení GPS, což umožní dokumentovat přítomnost pytláků pomocí fotografií, avšak nezajišťuje přímou ochranu zvířete před zabitím (Kamminga et al. 2018). Při ochraně luskounů se často používá čipování a sledování jejich pohybu. Tato technologie se často uplatňuje v zařízeních pro záchranné a rehabilitační účely (Wright a Jimerson 2020).

3.3 Monitorování obchodu s luskouny

3.3.1 Průzkumy vesnic a lokálních trhů

Luskouni představují výzvu pro tradiční metody monitorování vzhledem k jejich skrytému způsobu života. V důsledku toho se často využívají alternativní metody, jako je využívání místních znalostí. Důležitým aspektem monitorování obchodu s volně žijícími živočichy je sběr informací na trzích či ve vesnicích prostřednictvím dotazníků nebo rozhovorů s vesničany, lovci a prodejci (Coad et al. 2013). I když je často kladen důraz na lovce, ve skutečnosti mají ve výměně těchto živočichů nejmenší roli a získávají nejnižší zisky (UNODC 2020).

Například Swiacká (2019) použila ke sběru dat na vesnicích v Kongu polostrukturované dotazníky, které se skládaly ze tří části. První část obsahovala charakterizaci respondentů (pohlaví, věk, etnická skupina, vzdělání, povolání a délka života ve vesnicích), druhá část se zaměřila na znalosti a postoj k luskounům (místní názvy druhů, četnost potenciálních pozorováních, jejich cena, lékařská hodnota, preference masa a status určení ve snaze analyzovat socioekonomické a kulturní role místních druhů). Poslední část byla věnována pouze lovcům a jejich osobním zkušenostem s lovem luskounů. Respondenti uváděli například, že nejvíce se setkávají s luskounem bělobřichým, a naopak luskouna černobřichého popisovali jako nepolapitelné zvíře (Swiacká 2019).

Coad et al. (2013) vyzpovídal lovce z vesnic Dibouka a Kouagna ve středním Gabonu za účelem analýzy změny v odběru a charakteristikách lovců v období mezi lety 2001 a 2010. Hlavními změnami byla zvýšená vzdálenost odchytů od vesnice a změny ve způsobu lovu. Postupně lovci přecházeli k lovení luskounů pomocí zbraní (Coad et al. 2013), avšak i přesto, že je používání drátěných nástrah zakázáno, pasti a nástrahy zůstávají nejčastějším způsobem lovu v lesích střední Afriky (Ingram et al. 2018).

Swiacká (2019) rovněž provedla dotazníkový průzkum s prodejci na městských tržištích v Kongu. Na tržištích jsou lidé méně ochotní sdílet informace a odpovídat na dotazy bez viditelného přínosu ve srovnání s vesnickým obyvatelstvem. Většina prodejců obchoduje s „menšími" druhy luskounů, jako jsou luskoun bělobřichý a luskoun černobřichý (Coad et al. 2013; Ingram et al. 2018; Swiacká 2019). Převážně se obchoduje s mrtvými, čerstvými nebo uzenými jedinci, ale někteří prodejci nabízejí také živé jedince a šupiny. Průměrná cena se pohybuje okolo 2 000 (3,3 dolarů) až 5 000 (8,3 dolarů) středoafrických franků za jednoho malého luskouna, zatímco velký luskoun se prodává průměrně za 20 000 (33 dolarů) až 50 000 (83 dolarů) středoafrických franků (Swiacká 2019; Swiacká et al. 2022). Hlavními zákazníky jsou převážně místní obyvatelé, avšak někteří prodejci také prodávají luskouny cizincům, především z Číny a Kamerunu. Obchod s luskouny není upřednostňován před obchodem s jinými druhy, jako jsou primáti či antilopy, kvůli obavám, že není tak výnosný a zároveň z důvodu nízkého prodeje, jelikož jsou ohroženým druhem a je rizikové se do obchodu zapojit (Swiacká 2019).

Nicméně při interpretace výsledků z dotazníků a rozhovorů je nutné vzít v potaz možnou neupřímnost a neochotu odhalit ilegální lov a následný obchod (Willcox et al. 2019).

3.3.2 Monitorování pomocí molekulárních metod

Využití forenzní analýzy u volně žijících živočichů umožňuje identifikaci druhu, původu, rodičů či pohlaví ze zabavených vzorků, což přispívá v boji proti ilegálnímu lovu a obchodu (Allendorf a Luikart 2012). Pro použití molekulárních metod ve forenzní analýze volně žijících zvířat je nezbytná znalost fylogeneze, fylogeografie a populační genetické struktury (Alacs et al. 2010).

3.3.2.1 Identifikace druhu

Identifikace druhu ze zabavených šupin či ze zabavených těl je nezbytným předpokladem pro prosazení příslušných vnitrostátních a mezinárodních právních předpisů a legislativy při úspěšném stíhání případů u soudu (Priyambada et al. 2021). Vzhledem k omezeným morfologickým znakům na šupinách nelze vždy přesně určit druh či původ luskounů obsažených v zabavených zásilkách. Z toho důvodu je nezbytné použít molekulární metody. DNA v keratinových šupinách bývá často degradovaná či ve stopových množstvích (Hsieh et al. 2011), proto je mitochondriální DNA (mtDNA) častěji upřednostňována jako genetický marker před jadernou DNA (nDNA) pro druhovou identifikaci volně žijících živočichů z důvodu snadnějšího získání dostatečného množství DNA ze zpracovaného či degradovaného vzorku. Další důvod, proč jsou mtDNA markery více využívané, je, že data pro markery odvozené z jaderných genů nejsou dostupná pro většinu volně žijících zvířat. Univerzální mtDNA markery jsou úspěšně aplikovány při identifikaci volně žijících zvířat pro forenzní případy, design mtDNA primerů je také výrazně jednodušší než u markerů nDNA.

Mezi obecně nejčastěji používané mtDNA markery patří geny cytochrom b (*cytb*) a cytochromoxidáza I (COI) (Alacs et al. 2010; Zhang et al. 2015; Mwale et al. 2017). Gen *cytb* je dlouhodobě jeden z nejpoužívanějších markerů při identifikaci mnoha druhů živočichů ze zabavených produktů včetně slonoviny (Ishida et al. 2013), žraloků (Clarke et al. 2006) a především z šupin či masa z luskounů (Hsieh et al. 2011; Gaubert et al. 2016). U luskounů se často využívá také mtDNA d-loop, který umožňuje identifikaci druhu a populace z velmi degradované DNA (Hsieh et al. 2011).

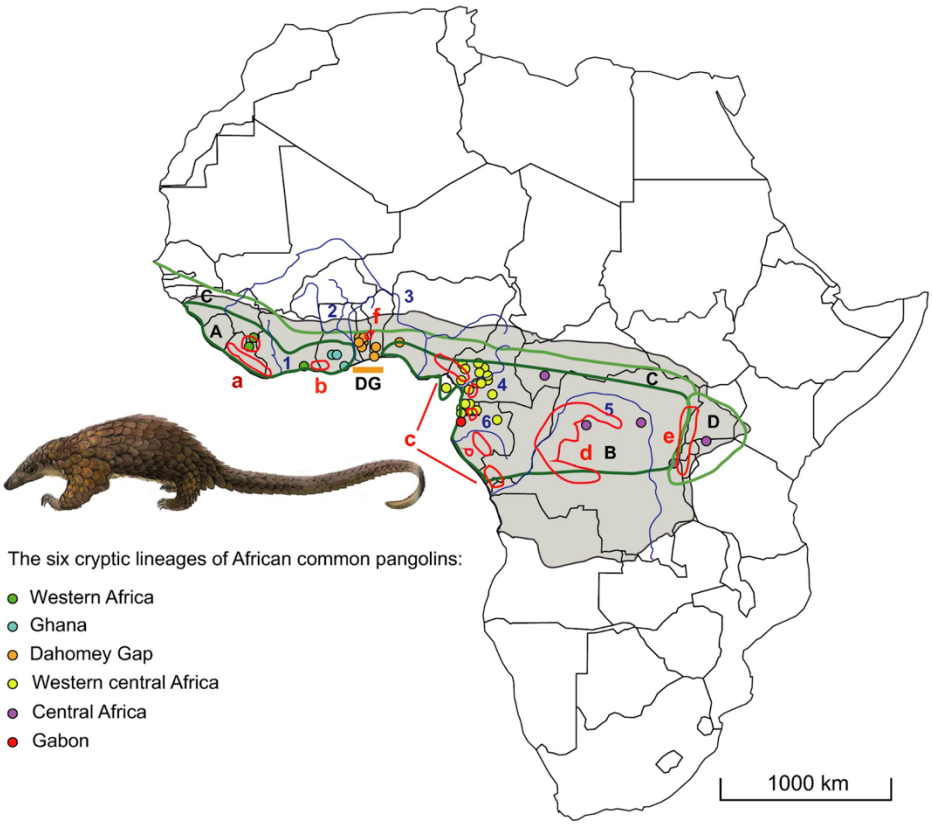
3.3.2.2 Identifikace geografického původu

Pašovaná zvířata obvykle nemají původ v místě, kde byla zabavena či odkud byla transportována. Přesná identifikace původu je klíčová, zejména s ohledem na zvýšenou

ochranu v daném místě a na případné právní kroky, které jsou řízeny legislativou dané země. Identifikace původu rovněž umožňuje smysluplný návrat zabavených luskounů zpět do přírody, neboť vypuštění na jiné místo může vést k mezi-liniovému křížení (Nash et al. 2018; Ingram et al. 2019; Tinsman et al. 2023).

Geografický původ lze identifikovat, pokud je známá populační genetická struktura v areálu rozšíření druhu. Původ se identifikuje pomocí genetických mtDNA markerů *cytb* a d-loop (Hsieh et al. 2011; Gaubert et al. 2016; Bernáthová 2020) a nDNA mikrosatelitů (neboli STR) a SNPs (Alacs et al. 2010; Nash et al. 2018; Aguillon et al. 2020).

Gaubert et al. (2016) kombinací mitochondriálních genů s nukleárními geny navrhl téměř plně vyřešený fylogenetický strom luskouna bělobřichého napříč jeho areálem výskytu. Určil existenci šesti odlišných geografických linií (Obrázek 3), což umožňuje identifikace původu luskounů ze zabavených zásilek. Této znalosti využili například Zhang et al. (2020), Ewart et (2021), Yeo et al. (2023) a identifikovali původ šupin v zabavených zásilkách. Zhang a Shi (1991) popsal na základě sekvence genu *cytb* genetickou diverzitu luskouna čínského.



Obrázek 3: Mapa šesti existujících genetických linií luskounů bělobřichých v Africe ve zvýrazněném areálu výskytu (Autor: Gaubert et al. 2016).

Využitím tzv. přiřazovacích testů mohou mikrosatelity a SNPs poskytnout informace o geografickém původu jedince. K identifikaci geografického původu a populační struktury luskounů lze využít mikrosatelity jako nDNA marker. Tato technika je založena na analýze délky mikrosatelitových alel. Díky své vysoké variabilitě a relativně snadné analýze se mikrosatelity staly užitečným nástrojem pro identifikaci původu luskounů, trasování ilegálního obchodu a pro studium jejich genetické diverzity (Nash et al. 2018; Aguillon et al. 2020). Aguillon et al. (2020) navrhl nových 20 mikrosatelitů z genomu luskouna bělobřichého, což umožňuje trasování lokálního i mezinárodního obchodu. Mohou být rovněž využity pro populačně genetické studie luskouna bělobřichého a pro ochranu tohoto druhu. Zjistili, že každý jedinec měl jedinečný genotyp, z čehož usuzují, že se luskouni vozí z různých oblastí, tj z různých populací, na místní trh v Kamerunu, odkud vzorky pocházely.

SNPs umožňují detailnější a přesnější trasování zabavených šupin, ale použití je náročnější a výrazně finančně dražší, oproti *cytb* a jiným mtDNA markerům (Liu 2007; Alacs et al. 2010). Genetické markery a specifické DNA sekvence z genových map jsou důležité nástroje pro identifikaci původu vzorků DNA a rozlišení mezi legálními a nelegálními zdroji. Srovnáním genetického materiálu vzorků s genetickými mapami různých druhů je možné zjistit, zda produkty pocházejí z chráněných nebo ohrožených druhů. Genetická analýza umožňuje vytvoření genetických profilů jednotlivých druhů, což usnadňuje identifikaci jejich původu. Tyto informace pomáhají sledovat pohyb genetického materiálu a odhalovat nelegální obchodní trasy. Celkově využití genových map a genetické analýzy při sledování obchodu je klíčové pro odhalování nelegálního obchodu se zvířaty a ochranu biodiverzity (Ogden a Linacre 2015; Sun et al. 2020; Dipita et al. 2022; Gu et al. 2023).

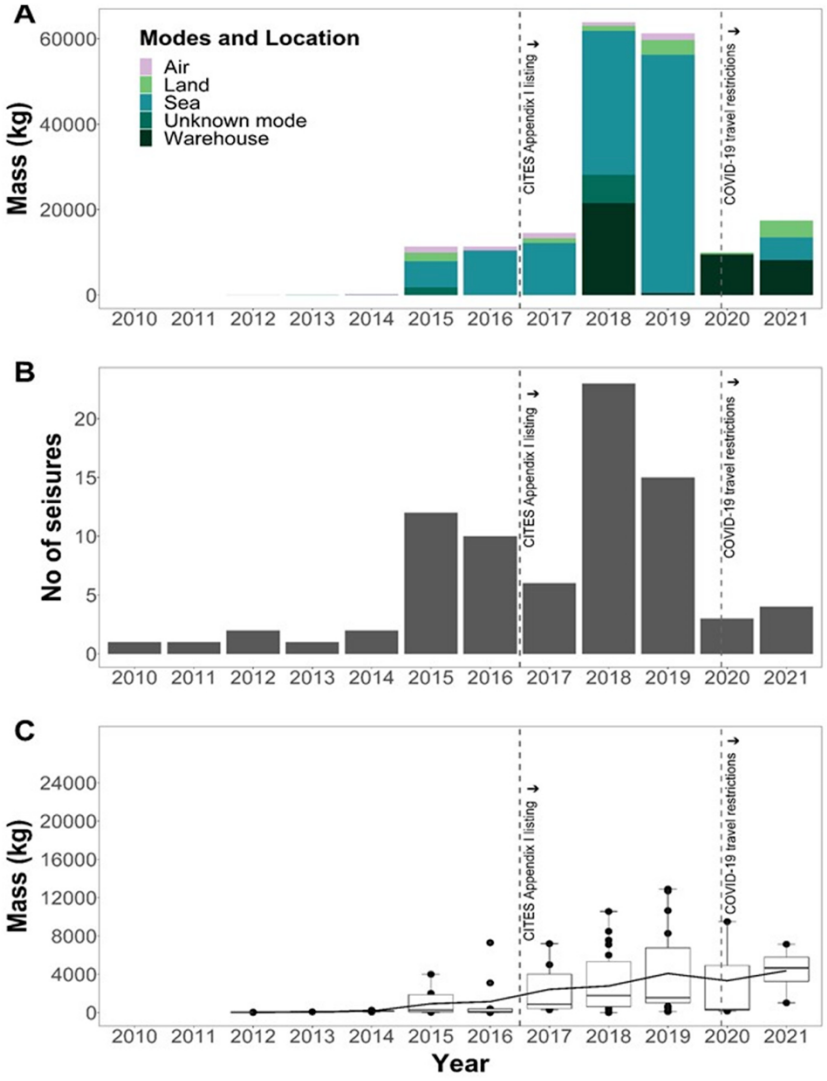
Pomocí identifikace geografického původu lze určit například dynamiku obchodu, obchodní trasy a místa s největším výskytem pytláků a dále provádět ochranářské práce v těchto oblastech (Tinsman et al. 2023).

3.3.3 Dynamika obchodu

3.3.3.1 Vývoj obchodu

Prostřednictvím kvalitního monitoringu ilegálního obchodu s ohroženými druhy zvířat lze zjistit jeho dynamiku. Odhaduje se, že v letech 2000 až 2013 bylo celosvětově obchodováno s více než milionem luskounů (Challender et al. 2014). Heinrich et al. (2017) sumarizovali zprávy o mezinárodních záchytech mezi lety 2010 a 2015 a zjistili, že bylo zabaveno více než 55 000 kg šupin, což dle přepočtu (průměrná hmotnost šupin na jednom luskounovi je 500 g (Challender a Waterman 2017)) znamená, že v tomto období bylo obchodováno odhadem s 100 000 luskouny. Hlavní cílová země byla Čína (Sexton et al. 2021). V roce 2017 bylo v provincii Guangdong odhaleno minimálně šest případů pašování derivátů z luskounů, včetně zabavených 11,9 tun šupin, což naznačuje, že obchod a spotřeba derivátů z luskounů nejen přetrvávají, ale rostou i přes zákaz z roku 2016 (Zhang et al. 2022). V letech 2018 a 2019 došlo k prudkému nárůstu obchodovaných derivátů z luskounů, což svědčí o nárůstu nezákonného obchodu s luskouny. Mezi lety 2016 a 2019 bylo celosvětově zabaveno odhadem 206,4 tun šupin (v přepočtu více než 410 000 luskounů), což je čtyřikrát více než mezi lety 2010 a 2015. Vietnam byl spojován

s téměř 70 % těchto záchytů, což představuje celkem 143,6 tun. Od roku 2018 se zabavené zásilky neomezovaly pouze na přepravované, ale zabaveny byly i luskouní deriváty uchovávané v skladech v Nigérii (Obrázek 4: A). Průměrná velikost zabavené zásilky šupin byla nejvyšší v roce 2019 a vážila 6,2 tun, což představuje nárůst oproti 2,2 tun v roce 2017. Počet záchytů v Nigérii se mezi lety 2015 a 2021 prudce měnil. Před rokem 2015 bylo zaznamenáno každoročně méně než 5 záchytů, avšak v roce 2018 tento počet vzrostl na 22 a následně v letech 2019 a 2021 klesl (Obrázek 4: B) (Emogor et al. 2021).



Obrázek 4: Grafické znázornění způsobu transportu derivátů z luskounů z Nigérie mezi lety 2010-2021 (A). Počet zabavených zásilek (B). Velikost zabavených zásilek (v kg) (Autor: Emogor et al. 2021).

Pandemie SARS-Cov-2 měla vliv na celý svět a nevyhnula se ani obchodu s volně žijícími živočichy. S příchodem pandemie se uvažovalo o zákazu obchodu s volně

žijícími živočichy a to zejména v Číně (Yang et al. 2020; Gaubert et al. 2024), ačkoliv byly i názory na zachování obchodu v zájmu sociálního rozvoje (Roe et al. 2020). Například Gaubert et al. (2024) uvádí, že pandemie měla negativní dopad na vývoj obchodu s masem luskounů v Kamerunu, Beninu a na Pobřeží slonoviny. Prodejci byli nuceni pozastavit svou činnost, přičemž délka tohoto opatření se v každé zemi lišila. Nejdéle trval zákaz na Pobřeží slonoviny, kde některé lokality byly postiženy zákazem více než tři měsíce. V Kamerunu a Beninu zákaz prodeje masa trval méně než dva měsíce. I přes delší zákaz na Pobřeží slonoviny, prodejci v Beninu uváděli nejvyšší dopad na prodej, a to z 84 %. Pokles ceny byl zaznamenán na Pobřeží slonoviny, zatímco v Kamerunu a Beninu cena zůstala stabilní. Většina prodejců ze všech tří zemí (až 96,8 %) uvedla, že v prodeji pokračovala z důvodu finanční potřeby (Gaubert et al. 2024).

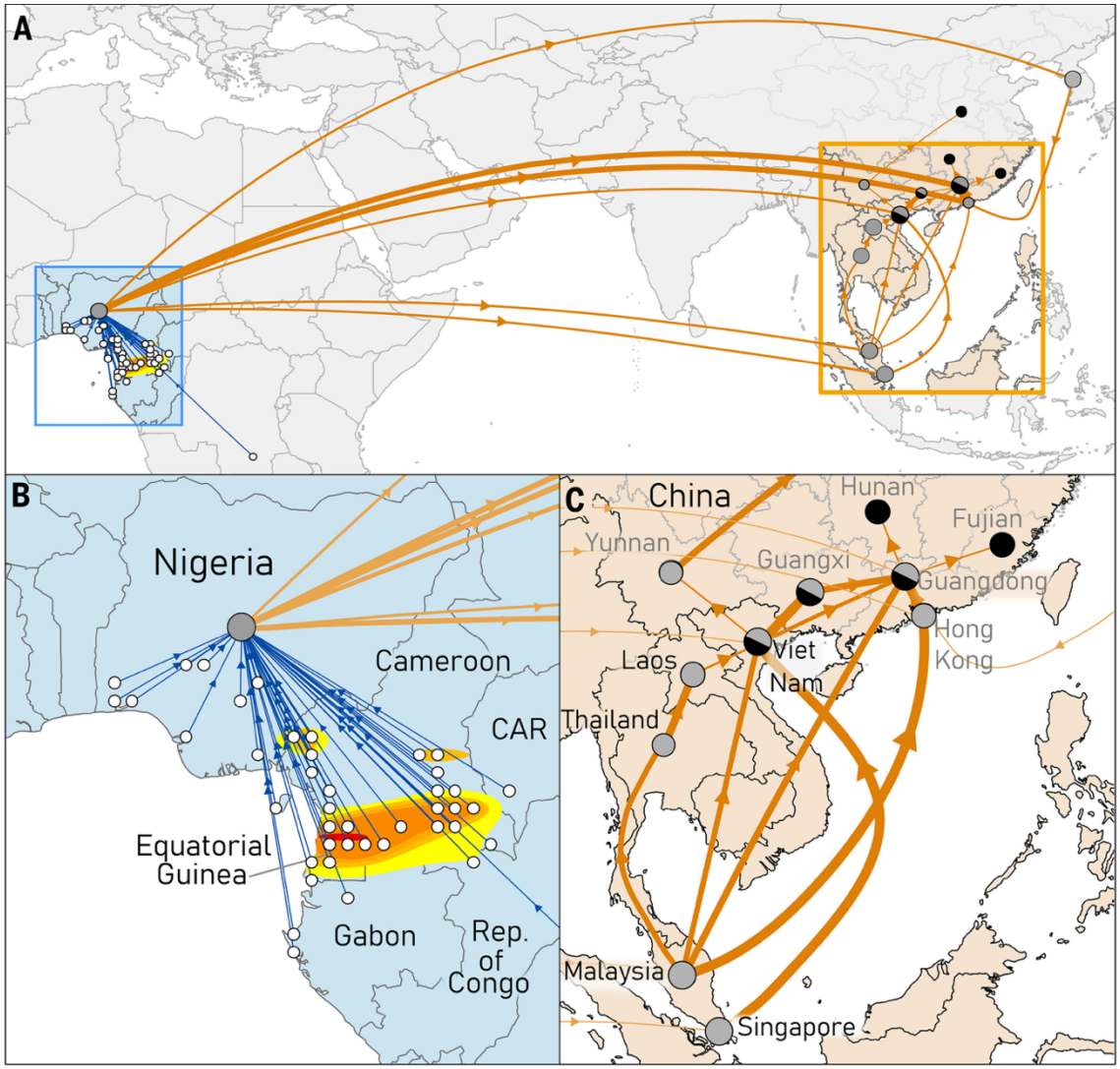
3.3.3.2 Obchodní trasy a hlavní místa obchodu

Mezinárodní obchod s luskouny je rozsáhlý a odhaduje se, že v letech 2010 až 2015 bylo zaznamenáno celkem 159 tras (Heinrich et al. 2017). Probíhá pomocí lodní dopravy, letecké dopravy a po zemi (Vallianos 2016; Ingram et al. 2019; Emogor et al. 2021). Komerční neudržitelný lov způsobil dramatický úbytek populace asijských luskounů. V důsledku toho v posledních dvou desetiletích výrazné narůstá mezikontinentální pašování afrických druhů na asijské trhy (Challender et al. 2014; Heinrich et al. 2016; Ingram et al. 2019; Omifolaji et al. 2022) a to pravděpodobně prostřednictvím stejných pašeráckých sítích, které využívají pašeráci při obchodu se slonovinou (Gaubert et al. 2016). Obchod probíhá přes několik hlavních pašeráckých tras. S asijskými druhy je obchodováno především v rámci kontinentu, tj. z jihovýchodní Asie do Číny a Vietnamu v lodních kontejnerech, v nichž se převážejí převážně zmražená holá těla a šupiny. Druhou významnou trasou je transport z Nepálu či Indie do Číny přes Myanmar, kde jsou hlavním pašovaným zbožím šupiny (Vallianos 2016).

Africké druhy jsou často přepravovány lodními kontejnery přes Hongkong do čínských přístavů či jiných zemí jihovýchodní Asie. Transport po moři zahrnuje tisíce mrtvých jedinců (Vallianos 2016; Ingram et al. 2019). Obchod a pytlácký tlak se postupem času přesunul ze západní do střední Afriky (Tinsman et al. 2023). Od roku 2012 se pytláctví luskounů přesunulo ze Sierra Leone a Ghany do Kamerunu. Konkrétně jižní hranice Kamerunu stala místem intenzivního pytláctví, většina ulovených luskounů pochází právě z Kamerunu (Emogor et al. 2021).

Nigérie, země výskytu tří druhů luskounů (luskouna bělobřichého, luskouna černobřichého a luskouna velkého), je jedním z nejvýznamnějších center pro obchod s luskouny a se slonovinou (Emogor et al. 2021; Tinsman et al 2023). Město Lagos v Nigérii hraje klíčovou roli v obchodu s luskouny a jinými volně žijícími živočichy z důvodu přístupu k průmyslovému přístavu v Guinejském zálivu, který má velký význam v mezinárodním obchodu, jelikož nejvíce zásilek opouští zemi pomocí lodní dopravy (Emogor et al. 2021; Omifolaji et al. 2022). Šupiny se zde shromažďují nejčastěji z jižního a západního Kamerunu, Rovníkové Guineji, Gabonu, Demokratické republiky Kongo a dále se transportují na trhy v Asii (Obrázek 4) (Emogor et al. 2021; Tinsman et al. 2023). Vysoký dovoz šupin či jedinců do Nigérie je primárně způsoben aktivitou Nigerijců, kteří působí jako prostředníci, kteří cestují do zemí záchytu luskounů a přivážejí šupiny či jedince do Lagosu, kde na ně čekají klienti z Číny nebo je dále transportují do Asie (Ingram et al. 2019). To jasně svědčí o slabých zákonech v námořních přístavech i na pozemních hranicích, což umožňuje volný pohyb ulovených luskounů či jejich derivátů (Omifolaji et al. 2022).

Čína je hlavní cílovou zemí ilegálního obchodu s volně žijícími živočichy (Obrázek 5,6,7) (Challender et al. 2015; Zhang et al. 2022). Provincie Guangdong je jednou z klíčových oblastí pro konzumaci volně žijících živočichů a také hlavním distribučním centrem pro pašování a obchod s luskouny (Cheng et al. 2017). Vedle Číny je také Vietnam jednou z hlavních cílových zemích pro ilegálně zabavené luskouny pocházejících z Nigérie (Obrázek 5) (Omifolaji et al. 2022).

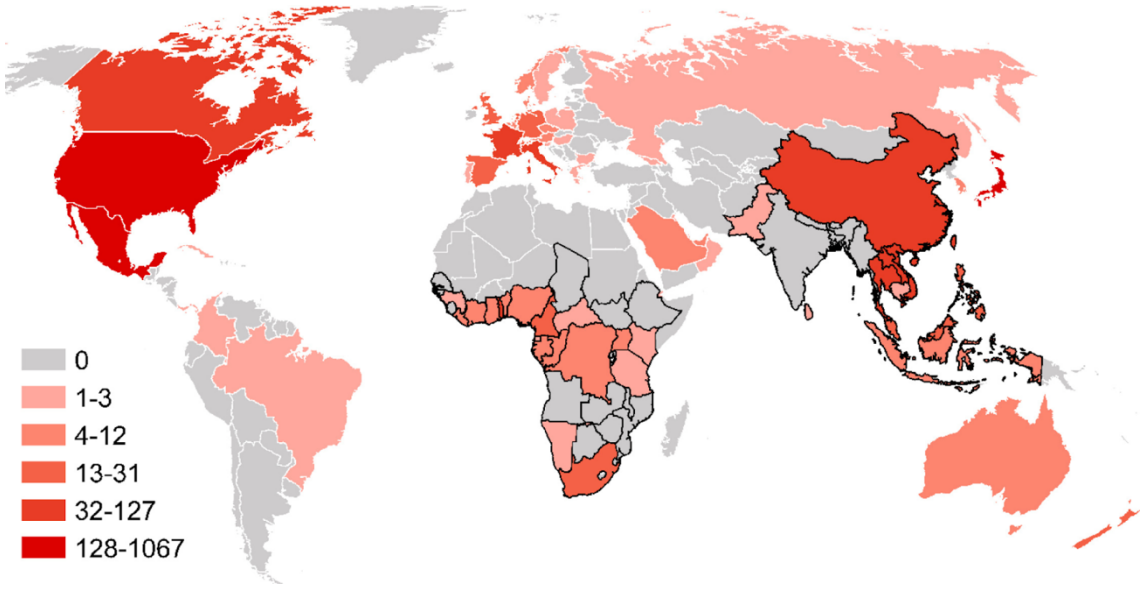


Obrázek 5: Vyobrazení hlavních tras obchodu skrz Nigérii (Autor: Tinsman et al. 2023).

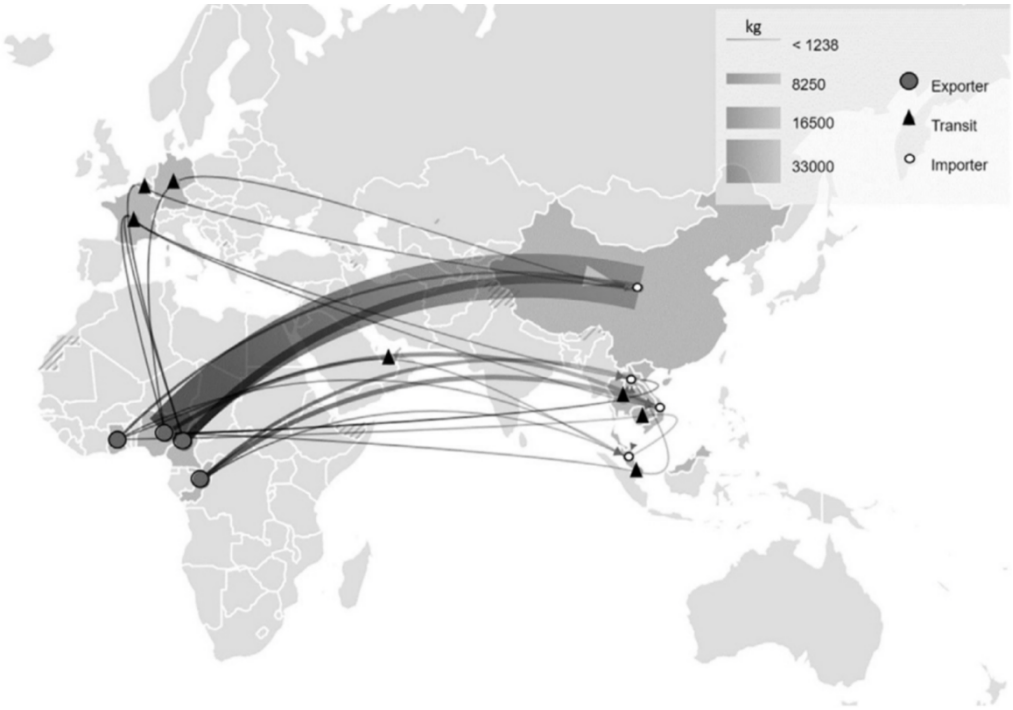
Na Obrázku 5 jsou hlavní trasy vedené skrz Nigérii znázorněny oranžovou barvou. Bílé tečky znázorňují odhadovaný původ luskounů, tranzitní místa jsou šedá a černá jsou tržiště či spotřebitelská místa. Šířka čar znázorňuje objem pašovaných luskounů (A). Modré čáry znázorňují trasy, kterými se sváží luskouni do Nigérie a následně do Asie (B). Hlavní trasy s africkými luskouny v jihovýchodní Asii (C).

Asie není jediná cílová destinace, ale také Spojené státy americké jsou častou koncovou zemí luskouních šupin a masa (Obrázek 6) (Heinrich et al. 2016). Jedinci či šupiny pocházející z Afriky putují přes různé tranzitní země, což často bývají země jihovýchodní Asie, jako je Hongkong, Singapur, Laos, Myanmar a Malajsie (Mwale et al. 2017; Omifolaji et al. 2022), ale také Spojené arabské emiráty a Evropa, konkrétně

Francie, Německo, Belgie (Obrázek 7), Nizozemsko a Turecko (Ingram et al. 2019; Emogor et al. 2021).



Obrázek 6: Vyobrazená mapa obchodu s luskouny mezi lety 2010 a 2015 (Autor: Heinrich et al. 2016).



Obrázek 7: Obchodní trasy ilegálního obchodu s luskounímí šupinami mezi rokem 2012 a 2018 (Autor: Ingram et al. 2019).

Šířka čar na Obrázku 7 znázorňuje množství (v kg) pašovaných šupin. Šedá tečka znázorňuje místo odkud jsou luskouni transportováni do Asie, šipka znázorňuje tranzitní zemi a bílá tečka cílovou destinaci.

3.3.3.3 Stanovení počtu ulovených zvířat

Monitoring luskounů ve volně přírodě je velmi obtížný a neexistují přesné odhady počtu jedinců v přírodě (Willcox et al. 2019), proto je velmi důležité zjistit počet ulovených jedinců v ilegálním obchodě. Existují studie, které se zaměřují na přepočet počtu šupin v zabavených zásilkách na počet celých jedinců (Priyambada et al. 2021). Objem zabavených šupin je obvykle tak vysoký, že orgány v trestním řízení často odhadují počet zabitých luskounů podle hmotnosti zabavené zásilky (Zhou et al. 2012).

4. Metodika

4.1 Vzorky

Vzorky luskouna bělobřichého použité v této práci pocházely od vesničanů a lovců z oblasti národního parku Odzala-Kokoua a jeho okolí na severu Konga, z několika vesnic a trhů s bushmeat na jihu Konga. Většina vzorků pochází ze zabitých zvířat na trzích nebo na vesnicích. Pro více informací viz studie Swiacká et al. 2023. Vzorky obsahovaly šupiny a tkáně (části jazyka, popř. jícnu).

4.2 Extrakce DNA

Genomická DNA získaná ze šupin a tkání byla extrahována pomocí sady DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) dle výrobcem doporučeného protokolu. Při extrakci DNA ze šupin bylo do procesu lýzy tkáně přidáno 30 µl dithiotreitholu k zajištění efektivní lýzy keratinu. V závěrečném kroku byla DNA eluována 2 × 30 µl pufru AE (Elution Buffer). Koncentrace extrahované genomické DNA každého vzorku byla následně měřena spektrofotometrem Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Po extrakci byla DNA uchována v mrazáku při teplotě -20 °C.

4.3 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

V této práci byl zvolen mitochondriální gen *cytb*, vzhledem k jeho vysoké přesnosti pro identifikaci původu afrických druhů luskounů.

K amplifikaci DNA byla použita kombinace primerů GVL 14724 a H15149 (Gaubert et al. 2015). Složení reakční směsi pro PCR je uvedeno v tabulce 2. Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena v BIO-RAD T100 Thermal Cycler ve 25 µl reakční směsi. Protokoly PCR jsou uvedeny v tabulce 3. Efektivita PCR reakcí byla stanovena za pomoci elektroforézy na 1% agarovém gelu v 10× naředěném TBE pufru a probíhala na 120 V/400 mA po dobu 35 minut.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro PCR.

PCR Master Mix	12,5 µl
Nuclear Free H_20	8,5 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
DNA	2 µl

Tabulka 3: Protokol pro PCR cycler použitý při amplifikaci.

krok	teplota (°C)	čas (min)
1.	95	10
2.	95	0:30
3.	57	0:45
4.	72	0:45
5.	go to step 2., 38x	
6.	72	10
7.	12	∞

4.4 Purifikace

Amplifikované úseky mtDNA byly purifikovány pomocí kitu QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) dle výrobcem doporučeného protokolu. V posledním kroku byla DNA vymyta z membrány 30 µl pufru AE. Koncentrace čistého PCR produktu byla změřena spektrofotometrem Nanodrop 2000.

4.5 Sekvenace

Sekvenační analýza byla provedena pomocí primeru *cytb*. Složení reakční směsi pro sekvenační analýzu je uvedeno v tabulce č. 4. Sekvenace probíhala na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

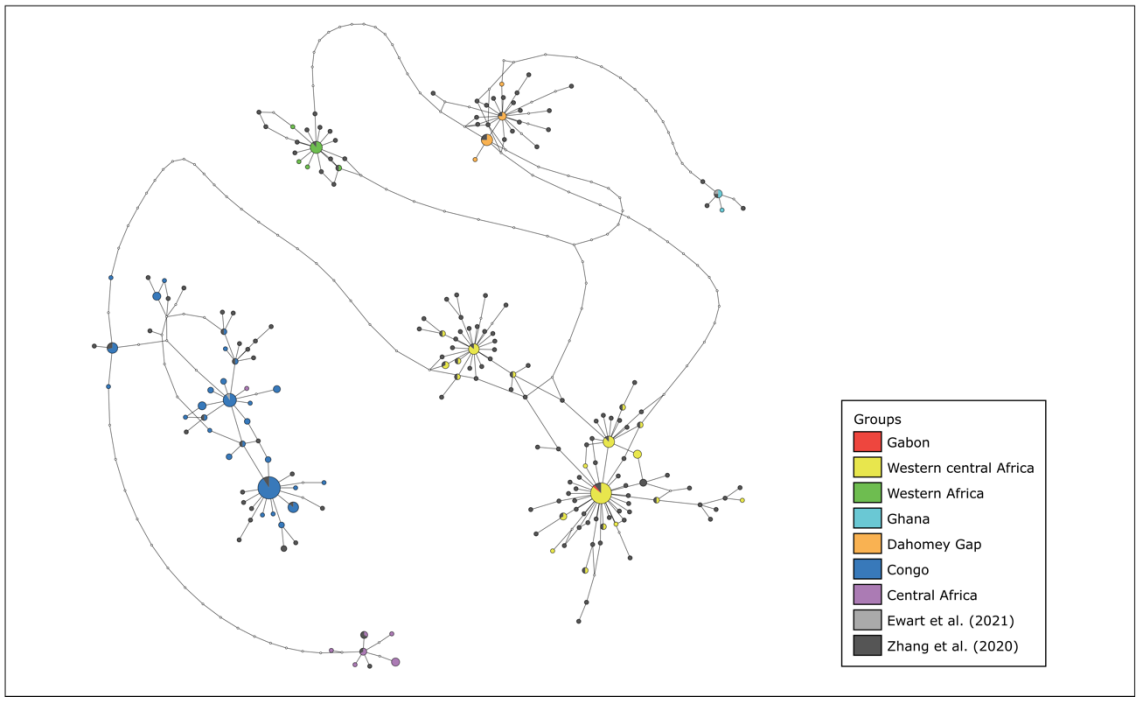
4.6 Analýza dat

Získané sekvence byly editovány v Geneious Prime 2023.1.2. (www.geneious.com). Byla využita srovnávací data z Gaubert et al. 2016 (n=98), který určil šest původních genetických linií luskounů bělobřichých (viz kapitola Identifikace geografického původu). Pro doplnění datasetu byla využita data ze zabavených zásilek z Zhang et al. 2020 (n=169) a Ewart et al. 2021 (n=2). Ze všech sekvencí byl vytvořen v programu Geneious Prime pomocí Clustal Omega 1.2.2. Alignment (Sievers et al. 2011; Sievers a Higgins, 2018; Sievers et al. 2020). Sekvence ve výsledném Alignmentu byly zkráceny na stejnou délku.

Pro vizualizaci fylogeografické struktury byla v programu TCS v1.23 (Clement et al. 2000) vypočtena haplotypová síť. Výstup z TCS byl poté graficky upraven pomocí TCS Beautifier (Múrias dos Santos et al. 2016) pro vytvoření výsledné haplotypové sítě.

5. Výsledky

V této práci bylo získáno 88 sekvencí *cytb* luskouna bělobřichého z oblastí Konga o délce 396 bp. Po přidání dat (viz kapitola Analýza dat) z Genové banky NCBI bylo vytvořeno celkem 357 sekvencí a z nich bylo detekováno 194 haplotypů. Vzorky z Konga vytvořily samostatnou haplotypovou skupinu (tmavě modrá na Obrázku 8) vzdálenou 15 mutačních kroků od haplotypové skupiny ze Střední Afriky (viz fialová na Obrázku 8) a 22 mutačních kroků od skupiny ze Středozápadní Afriky (žlutá na Obrázku 8). Jedinec z Gabonu (červená barva na Obrázku 8) sdílí haplotyp s jedinci ze Středozápadní Afriky. Jedinci ze studií Ewart et al. (2021) a Zhang et al. (2020) sdílejí haplotypy s jednotlivými liniemi a někteří také s jedinci z Konga.



Obrázek 8: Haplotypová síť vytvořená z 357 sekvencí v programu TCS Beautifier.

Srovnávací vzorky z Gaubert et al. (2016) jsou označeny červenou, žlutou, zelenou, světle modrou, oranžovou a fialovou barvou. Barvy odpovídají vyobrazeným genetickými liniím luskouna bělobřichého (viz Obrázek 4). Vzorky z této práce jsou uvedeny tmavě modrou barvou. Velikost kruhů odpovídá množství jedinců se stejným haplotypem. Bílé tečky na spojnicích značí mutační kroky mezi haplotypy.

6. Diskuze

V této práci byly porovnány vzorky luskouna bělobřichého z Konga se srovnávacími daty ze studie Gaubert et al. (2016), jelikož identifikoval linie u luskouna bělobřichého. Vytvořila se nová genetická linie zahrnující vzorky z Konga pomocí sekvenace *cytb*, která již byla popsána v práci Bernáthová (2020), která se věnovala sekvenaci identických vzorků z Konga, ale pomocí markeru d-loop.

Díky existenci linií, kdy každá linie má své geografické vymezení, je možné přiřadit původ u zabavených vzorků, avšak srovnávací data v původní studii od Gaubert et al. (2016) nepokrývají celý areál luskouna bělobřichého. Chybějí například z jižní části areálu, včetně oblasti Republiky Kongo, jižní části Demokratické republiky Kongo a severní Angoly.

Geneticky nezmapovaná území poté mohou zkreslovat další analýzy, které přiřazují vzorky s neznámým geografickým původem ke známým liniím. Důkazem toho jsou například také vzorky ze zabavených zásilek od Zhang et al. (2020) či Ewart et al. (2021), které sdílejí haplotypy s jedinci z Konga z této práce, ale podle analýz původní studie spadají tyto stejné vzorky do jedné z původních šesti linií. Vzorek přiřazený Gaubertem et al. (2016) do linie z Gabonu, sdílí stejný haplotyp s jedinci z linie ze Středozápadní Afriky v této studii, taktéž vzorek z linie Střední Afriky sdílí stejný haplotyp s linií z Konga. Již v haplotypové síti Bernáthové (2020) byl vzorek z Gabonu přiřazen blíže ke genetické linii Středozápadní Afriky.

Tyto mezi-liniové přesuny mohou být ovlivněny několika faktory. Za prvé, předchozí studie byly ovlivněny například absencí nových dat v datasetu, použitím jiného programu na identifikaci haplotypů s odlišným algoritmem a vzorky nebyly standardizovány na stejně dlouhé sekvence. Druhým faktorem, který mohl ovlivnit zařazení tohoto vzorku, bylo získání jedince s odlišným haplotypem na trhu. K tomu mohlo dojít v důsledku převozů jedinců z jednoho trhu na druhý.

Pro přesné trasování a monitorování obchodu je proto potřeba mít dostatečně pokrytý areál, aby nedocházelo k chybnému určování původu zabavených zvířat a jejich částí, jelikož rozšíření jednotlivých linií zabírá většinou území více než jednoho státu. V důsledku jejich ekologie a limitovaných disperzních schopností dochází k větší diverzifikaci v jednotlivých oblastech výskytu, jelikož nedochází ke kontaktu s jedinci z jiných oblastí. Rozvětvené haplotypové větve v haplotypové síti, zejména v případě

jedinců z Konga a Středozápadní Afriky, značí možnou rozrůstající se (geograficky či demograficky) populaci.

7. Závěr

V literární rešerši byla popsána role luskounů v tradiční medicíně a obchodu s bushmeat produkty. Luskouni se loví především pro jejich šupiny, které se využívají v tradičních medicínách společně s jejich částmi těl a pro jejich maso, které je považováno za pochoutku a symbol statusu v asijských restauracích (Soewu & Ayodele 2009; Soewu et al. 2011; Vallianos 2016). Oproti tomu v Africe jsou luskouni loveni jako bushmeat a jsou často jediným zdrojem příjmů pro obyvatele vesnic (Ingram et al. 2021; Gaubert et al. 2024). Zjistilo se, že nejčastěji vyskytujícím se luskounem na trzích je luskoun bělobřichý (Zanvo et al. 2022; Tinsman et al. 2023).

Byla popsána dynamika a vývoj ilegálního obchodu s luskouny zejména od roku 2000 do roku 2021. Ukázalo se, že obchod se přesunul z asijských na africké druhy luskounů, v důsledku velkého poklesu populace asijských druhů. I přes zákaz lovení luskounů v roce 2016 ilegální obchod roste (Emogor et al. 2021).

Byly ztrasovány současné hlavní obchodní cesty. Asijské druhy jsou obchodovány převážně vnitrokontinentálně. Africké druhy jsou nejvíce obchodovány do Asie a USA. Hlavní trasa vede z Nigérie přes Hongkong do čínských přístavů. Nigérie se stala v posledních letech jedním z nejvýznamnějších míst ilegálního obchodu s luskouny z důvodu shromažďování ulovených luskounů z jiných afrických zemí. Většina ulovených luskounů pochází z Kamerunu (Emogor et al. 2021; Omifolaji et al. 2022; Tinsman et al. 2023).

Byly popsány forenzní genetické metody, které se využívají při monitorování obchodu s luskouny. Identifikace druhu a geografického původu ze zabavených vzorků je klíčová pro následné právní kroky či ochranářské práce. Geografický původ lze identifikovat pomocí mtDNA markerů, jako je *cytb* a d-loop (Gaubert et al. 2016; Bernáthová, 2020) a nDNA marker, jako jsou mikrosatelity a SNPs (Nash et al. 2018; Aguillon et al. 2020); jestliže je známá populační genetická struktura v areálu rozšíření druhu. Gaubert et al. (2016) pomocí kombinace mtDNA a nDNA markerů navrhl šest genetických linií pro luskouna bělobřichého, které byly využity v praktické části této bakalářské práce.

V praktické části byla popsána genetická linie pomocí sekvenace *cytb* na vzorcích z Konga, která již byla zmíněna ve studii Bernáthová (2020), sekvenací identických vzorků pomocí markeru d-loop. Tato genetická linie pomohla znovu přiřadit původ

zabavených vzorků ze studie Zhang et al. (2020) a Ewart et al. (2021), které původně byly zařazeni do jedné z původních šesti genetických linií.

Tato práce zdůrazňuje důležitost dalšího genetického zmapování území, která stále nejsou dostatečně zmapována, aby nedocházelo k chybné identifikaci původu zabavených luskounů či jiných druhů zvířat.

8. Reference

Aguillon, S., Din Dipita, A., Lecompte, E., Missoup, A. D., Tindo, M., & Gaubert, P. 2020. Development and characterization of 20 polymorphic microsatellite markers for the white-bellied pangolin Phataginus tricuspis (Mammalia, Pholidota). Molecular Biology Reports, **47**: 4827-4833.

Alacs EA, Georges A, FitzSimmons NN, Robertson J. 2010. DNA detective: A review of molecular approaches to wildlife forensics. Forensic Science, Medicine, and Pathology **6**:180–194.

Allendorf, F. W., Luikart, G. H., & Aitken, S. N. 2012. Conservation and the genetics of populations. John Wiley & Sons.

Bauer, H., Chapron, G., Nowell, K., Henschel, P., Funston, P., Hunter, L. T., ... & Packer, C. 2015. Lion (Panthera leo) populations are declining rapidly across Africa, except in intensively managed areas. Proceedings of the National Academy of Sciences, **112**(48): 14894-14899.

Bernáthová, I. 2020. Genetic diversity of pangolins in Congo (Doctoral dissertation, Master's Thesis, Faculty of Tropical Agri Sciences, Czech University of Life).

Bertelsmeier, C., Luque, G. M., Hoffmann, B. D., & Courchamp, F. 2015. Worldwide ant invasions under climate change. Biodiversity and conservation, **24**: 117-128.

Boakye MK, Pietersen DW, Kotzé A, Dalton DL, Jansen R. 2014. Ethnomedicinal use of African pangolins by traditional medical practitioners in Sierra Leone. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine **10**: 76.

Boakye, M. K., Kotzé, A., Dalton, D. L., & Jansen, R. 2016. Unravelling the pangolin bushmeat commodity chain and the extent of trade in Ghana. Human ecology, **44**: 257-264.

Boakye, M. K., Pietersen, D. W., Kotzé, A., Dalton, D. L., & Jansen, R. 2015. Knowledge and uses of African pangolins as a source of traditional medicine in Ghana. PLoS One, **10**(1): e0117199.

CITES. 2016. Notification to the Parties No. 2016/063 – Amendments to Appendices I and II of the Convention. Geneva.

Clarke, S. C., McAllister, M. K., Milner-Gulland, E. J., Kirkwood, G. P., Michielsens, C. G., Agnew, D. J., ... & Shivji, M. S. 2006. Global estimates of shark catches using trade records from commercial markets. Ecology letters, **9**(10): 1115-1126.

Clement, M., Posada, D. C. K. A., & Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular ecology, **9**(10): 1657-1659.

Coad, L., Schleicher, J., MILNER-GULLAND, E. J., Marthews, T. R., Starkey, M., Manica, A., ... & Abernethy, K. A. 2013. Social and ecological change over a decade in a village hunting system, central Gabon. Conservation Biology, **27**(2): 270-280.

Costa-Neto, E. M. 2005. Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. Anais da Academia Brasileira de ciências, **77**: 33-43.

Cota-Larson, R. 2017. Pangolin Species Identification Guide.

Dipita, A. D., Missoup, A. D., Tindo, M., & Gaubert, P. 2022. DNA-typing improves illegal wildlife trade surveys: tracing the Cameroonian bushmeat trade. Biological Conservation, **269**: 109552.

Du Toit Z, Du Plessis M, Dalton DL, Jansen R, Paul Grobler J, Kotzé A. 2017. Mitochondrial genomes of African pangolins and insights into evolutionary patterns and phylogeny of the family Manidae. BMC Genomics, **18**: 746.

Du Toit, Z., Grobler, J. P., Kotzé, A., Jansen, R., Brettschneider, H., & Dalton, D. L. 2014. The complete mitochondrial genome of Temminck's ground pangolin (Smutsia temminckii; Smuts, 1832) and phylogenetic position of the Pholidota (Weber, 1904). Gene, **551**: 49-54.

Duffy, R. 2016. The illegal wildlife trade in global perspective. In Handbook of transnational environmental crime (pp. 109-128). Edward Elgar Publishing.

Emogor, C. A., Ingram, D. J., Coad, L., Worthington, T. A., Dunn, A., Imong, I., & Balmford, A. 2021. The scale of Nigeria's involvement in the trans-national illegal pangolin trade: Temporal and spatial patterns and the effectiveness of wildlife trade regulations. Biological Conservation, **264**: 109365.

Ewart, K. M., Lightson, A. L., Sitam, F. T., Rovie-Ryan, J., Nguyen, S. G., Morgan, K. I., ... & McEwing, R. 2021. DNA analyses of large pangolin scale seizures: Species identification validation and case studies. *Forensic Science International: Animals and Environments*, **1**:100014.

Fang, F., Nguyen, T. H., Sinha, A., Gholami, S., Plumptre, A., Joppa, L., ... & Beale, C. M. 2017. Predicting poaching for wildlife protection. IBM Journal of Research and Development, **61**(6): 3-1.

Ferreira-Cardoso, S., Billet, G., Gaubert, P., Delsuc, F., & Hautier, L. 2020. Skull shape variation in extant pangolins (Pholidota: Manidae): allometric patterns and systematic implications. Zoological Journal of the Linnean Society, **188**: 255-275.

Fletcher, M. 2015. The world’s most-trafficked mammal – and the scaliest. BBC News. Available from http://www.bbc.com/ news/magazine-30833685 (February 2024).

Gaubert P. 2011. Family Manidae. Pages 82-103 in Wilson DE, Mittermeier RA,editors.

Gaubert, P., Antunes, A., Meng, H., Miao, L., Peigné, S., Justy, F., ... & Luo, S. J. 2018. The complete phylogeny of pangolins: scaling up resources for the molecular tracing of the most trafficked mammals on earth. Journal of Heredity, **109**(4): 347-359.

Gaubert, P., Djagoun, C. A., Missoup, A. D., Ales, N., Amougou, C. V., Dipita, A. D., ... & Gonedelé-Bi, S. 2024. Vendors' perceptions on the bushmeat trade dynamics across West and central Africa during the COVID-19 pandemic: Lessons learned on sanitary measures and awareness campaigns. Environmental Science & Policy, **152**: 103649.

Gaubert, P., Njiokou, F., Ngua, G., Afiademanyo, K., Dufour, S., Malekani, J., ... & Antunes, A. 2016. Phylogeography of the heavily poached African common pangolin (Pholidota, Manis tricuspis) reveals six cryptic lineages as traceable signatures of Pleistocene diversification. Molecular Ecology, **25**(23): 5975-5993.

Gaubert, P., Njiokou, F., Olayemi, A., Pagani, P., Dufour, S., Danquah, E., ... & Antunes, A. 2015. Bushmeat genetics: setting up a reference framework for the DNA typing of African forest bushmeat. Molecular Ecology Resources, **15**(3): 633-651.

Gaudin T, Emry R, Wible J. 2009. The phylogeny of living and extinct pangolins (Mammalia, Pholidota) and associated taxa: a morphology based analysis. J Mamm Evol. **16**:235–305.

Gu, T. T., Wu, H., Yang, F., Gaubert, P., Heighton, S. P., Fu, Y., ... & Yu, L. 2023. Genomic analysis reveals a cryptic pangolin species. Proceedings of the National Academy of Sciences, **120**(40): e2304096120.

Heinrich S, Ross J V., Cassey P. 2019. Of cowboys, fish, and pangolins: US trade in exotic leather. Conservation Science and Practice **1**:1–10.

Heinrich S, Wittmann TA, Prowse TAA, Ross J V., Delean S, Shepherd CR, Cassey P. 2016. Where did all the pangolins go? International CITES trade in pangolin species. Global Ecology and Conservation **8**:241–253.

Heinrich S, Wittmann TA, Ross JV, Delean S, Shepherd ChR, Cassey P. 2017. The global trafficking of pangolins: A comprehensive summary of seizures and trafficking routes from 2010–2015. TRAFFIC, Southeast Asia. Available from https://www.traffic.org (accessed November 2023).

Helwig, D. 2005. Traditional African Medicine. Gale Encyclopedia of Alternative Medicine.

Hsieh, H. M., Lee, J. C. I., Wu, J. H., Chen, C. A., Chen, Y. J., Wang, G. B., ... & Tsai, L. C. 2011. Establishing the pangolin mitochondrial D-loop sequences from the confiscated scales. Forensic Science International: Genetics, **5**(4): 303-307.

Hua L, Gong S, Wang F, Li W, Ge Y, Li X, Hou F. 2015. Captive breeding of pangolins: current status, problems and future prospects. ZooKeys **507**: 99-114.

Chaber AL, Allebone-Webb S, Lignereux Y, Cunningham AA, Rowcliffe JM. 2010. The scale of illegal meat importation from Africa to Europe via Paris. Conservation Letters **3**(5): 317-321.

Chaitanya, M. V., Baye, H. G., Ali, H. S., & Usamo, F. B. 2021. Traditional African Medicine. In Natural Medicinal Plants. IntechOpen London.

Challender DWS, Hywood L. 2012. African pangolins under increased pressure from poaching and international trade. TRAFFIC Bulletin **24**(2): 53-55.

Challender DWS, MacMillan DC. 2014. Poaching is more than an enforcement problem. Conservation Letters **7**(5): 484–494.

Challender DWS, Waterman C, Baillie JEM. 2014. Scaling up pangolin conservation. IUCN SSC Pangolin Specialist Group Conservation Action Plan. Zoological Society of London, London. Available from https://www.pangolinsg.org (accessed November 2023).

Challender DWS, & Waterman C. 2017. Implementation of CITES Decisions 17.239 b) and 17.240 on Pangolins (Manis spp.). CITES SC69 Doc. 57 Annex 1. CITES, Geneva. Available from https://cites.org/sites/default/files/eng/com/sc/69/E-SC69-57-A.pdf (accessed January 2024).

Challender DWS. 2011. Asian pangolins: Increasing affluence driving hunting pressure. TRAFFIC Bulletin, **23**: 92-93.

Challender, D. W., Harrop, S. R., & MacMillan, D. C. 2015. Understanding markets to conserve trade-threatened species in CITES. Biological Conservation, **187**: 249-259.

Chao, J. T., Li, H. F., & Lin, C. C. 2020. The role of pangolins in ecosystems. In Pangolins (pp. 43-48). Academic Press.

Cheng, W., Xing, S., & Bonebrake, T. C. 2017. Recent pangolin seizures in China reveal priority areas for intervention. Conservation Letters, **10**(6): 757-764.

Choo, S. W., Rayko, M., Tan, T. K., Hari, R., Komissarov, A., Wee, W. Y., ... & Wong, G. J. 2016. Pangolin genomes and the evolution of mammalian scales and immunity. Genome research, **26**:1312-1322.

Ingram, D. J., Coad, L., Abernethy, K. A., Maisels, F., Stokes, E. J., Bobo, K. S., ... & Scharlemann, J. P. 2018. Assessing Africa-wide pangolin exploitation by scaling local data. Conservation Letters, **11**(2): e12389.

Ingram, D. J., Coad, L., Milner-Gulland, E. J., Parry, L., Wilkie, D., Bakarr, M. I., ... & Abernethy, K. 2021. Wild meat is still on the menu: Progress in wild meat research, policy, and practice from 2002 to 2020. Annual Review of Environment and Resources, **46**: 221-254.

Ingram, D. J., Cronin, D. T., Challender, D. W., Venditti, D. M., & Gonder, M. K. 2019. Characterising trafficking and trade of pangolins in the Gulf of Guinea. Global Ecology and Conservation, **17**: e00576.

Ishida, Y., Georgiadis, N. J., Hondo, T., & Roca, A. L. 2013. Triangulating the provenance of A frican elephants using mitochondrial DNA. Evolutionary Applications, **6**(2): 253-265.

IUCN. 2024. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2023-1. Available from https://www.iucnredlist.org (accessed February 2024).

Kamminga, J., Ayele, E., Meratnia, N., & Havinga, P. 2018. Poaching detection technologies—a survey. Sensors, **18**(5): 1474.

Kumar, V. P., Rajpoot, A., Srivastav, A., Nigam, P., Kumar, V., Madhanraj, A., & Goyal, S. P. 2018. Phylogenetic relationship and molecular dating of Indian pangolin (Manis crassicaudata) with other extant pangolin species based on complete cytochrome b mitochondrial gene. Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis, **29**:1276-1283.

Ling, C. Q. 2020. Traditional Chinese medicine is a resource for drug discovery against 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2). Journal of integrative medicine, **18**(2): 87.

Liu, Z. 2007. Single nucleotide polymorphism (SNP). Aquaculture genome technologies, **7**: 59-72.

Liu, Z., Jiang, Z., Fang, H., Li, C., Mi, A., Chen, J., ... & Meng, Z. 2016. Perception, price and preference: Consumption and protection of wild animals used in traditional medicine. PloS one, **11**(3): e0145901.

Marshall, N. T. 1998. Searching for a cure: conservation of medicinal wildlife resources in east and southern Africa. Traffic International.

Meyer, W., Liumsiricharoen, M., Suprasert, A., Fleischer, L. G., & Hewicker-Trautwein, M. 2013. Immunohistochemical demonstration of keratins in the epidermal layers of the Malayan pangolin (Manis javanica), with remarks on the evolution of the integumental scale armour. European Journal of Histochemistry: EJH, **57**(3).

Múrias dos Santos, A., Cabezas, M. P., Tavares, A. I., Xavier, R., & Branco, M. 2016. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. Bioinformatics, **32**(4): 627-628.

Mwale, M., Dalton, D. L., Jansen, R., De Bruyn, M., Pietersen, D., Mokgokong, P. S., & Kotzé, A. 2017. Forensic application of DNA barcoding for identification of illegally traded African pangolin scales. Genome, **60**(3): 272-284.

Nadeem, M. S., Zamzami, M. A., Choudhry, H., Murtaza, B. N., Kazmi, I., Ahmad, H., & Shakoori, A. R. 2020. Origin, potential therapeutic targets and treatment for coronavirus disease (COVID-19). Pathogens, **9**(4): 307.

Nash HC et al. 2018. Conservation genomics reveals possible illegal trade routes and admixture across pangolin lineages in Southeast Asia. Conservation Genetics **19**:1083 1095.

Newton, P., Van Thai, N., Roberton, S., & Bell, D. 2008. Pangolins in peril: using local hunters' knowledge to conserve elusive species in Vietnam. Endangered Species Research, **6**(1): 41-53.

Nguyen, L. B., Fossung, E. E., Affana Nkoa, C., & Humle, T. 2021. Understanding consumer demand for bushmeat in urban centers of Cameroon with a focus on pangolin species. Conservation Science and Practice, **3**(6): e419.

Nguyen, T. H., Sinha, A., Gholami, S., Plumptre, A., Joppa, L., Tambe, M., ... & Critchlow, R. 2016. Capture: A new predictive anti-poaching tool for wildlife protection.

Nijman, V., & Shepherd, C. R. 2011. The role of Thailand in the international trade in CITES-listed live reptiles and amphibians. PloS one, **6**(3): e17825.

Nowak, R. M. 1999. Walker's Mammals of the World (Vol. 1). JHU press.

Ogden, R., & Linacre, A. 2015. Wildlife forensic science: a review of genetic geographic origin assignment. Forensic Science International: Genetics, **18**: 152-159.

Omifolaji, J. K., Hughes, A. C., Ibrahim, A. S., Zhou, J., Zhang, S., Ikyaagba, E. T., & Luan, X. 2022. Dissecting the illegal pangolin trade in China: An insight from seizures data reports. Nature Conservation, **46**: 17-38.

Pietersen, D. W., Fisher, J. T., Glennon, K. L., Murray, K. A., & Parrini, F. 2021. Distribution of Temminck's pangolin (Smutsia temminckii) in South Africa, with evaluation of questionable historical and contemporary occurrence records. African Journal of Ecology, **59**(3): 597-604.

Priyambada, P., Jabin, G., Singh, A., Ghosh, A., Singh, S. K., Chatterjee, M., ... & Thakur, M. 2021. Digging out the keys in the heap of seized pangolin scales: up scaling pangolin conservation using wildlife forensics. Forensic Science International, **323**: 110780.

Ripple, W. J., Abernethy, K., Betts, M. G., Chapron, G., Dirzo, R., Galetti, M., ... & Young, H. 2016. Bushmeat hunting and extinction risk to the world's mammals. *Royal Society open science*, **3**(10): 160498.

Roe, D., Dickman, A., Kock, R., Milner-Gulland, E. J., & Rihoy, E. 2020. Beyond banning wildlife trade: COVID-19, conservation and development. World Development, **136**: 105121.

Roe, D., Milledge, S., Cooney, R., Sas-Rolfes, M., Biggs, D., Murphree, M., & Kasterine, A. 2014. The elephant in the room: sustainable use in the illegal wildlife trade debate. IIED Briefing Paper-International Institute for Environment and Development, (17205).

Sexton, R., Nguyen, T., & Roberts, D. L. 2021. The use and prescription of pangolin in traditional Vietnamese medicine. Tropical Conservation Science, **14**: 1940082920985755.

Shairp, R., Veríssimo, D., Fraser, I., Challender, D., & MacMillan, D. 2016. Understanding urban demand for wild meat in Vietnam: implications for conservation actions. PloS one, **11**(1): e0134787.

Sievers, F., & Higgins, D. G. 2018. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. Protein Science, **27**(1): 135-145.

Sievers, F., Barton, G. J., & Higgins, D. G. 2020. Multiple sequence alignments. Bioinformatics, **227**: 227-250.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Higgins, D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular systems biology, **7**(1): 539.

Soewu, D. A., & Adekanola, T. A. 2011. Traditional-medical knowledge and perception of pangolins (Manis sps) among the Awori people, Southwestern Nigeria. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, **7**: 1-11.

Soewu, D. A., & Ayodele, I. A. 2009. Utilisation of pangolin (Manis sps) in traditional Yorubic medicine in Ijebu province, Ogun State, Nigeria. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, **5**(1): 1-11.

Soewu, D. A., & Sodeinde, O. A. 2015. Utilization of pangolins in Africa: fuelling factors, diversity of uses and sustainability. International Journal of Biodiversity and Conservation, **7**(1): 1-10.

Species+. 2020. Manidae. Species+. Available from https://speciesplus.net/species (accessed April, 2024).

Sun, N. C. M., Chang, S. P., Lin, J. S., Tseng, Y. W., Pei, K. J. C., & Hung, K. H. 2020. The genetic structure and mating system of a recovered Chinese pangolin population (Manis pentadactyla Linnaeus, 1758) as inferred by microsatellite markers. Global Ecology and Conservation, **23**: e01195.

Swiacká, M. 2019. Market survey and population characteristics of three species of pangolins (Pholidota) in the Republic of the Congo (Doctoral dissertation, Master's Thesis, Faculty of Tropical Agri Sciences, Czech University of Life).

Swiacká, M., Ingram, D. J., Bohm, T., & Ceacero, F. 2022. Perceptions and uses of pangolins (Pholidota) among remote rural communities in the Republic of the Congo: A baseline study from the Odzala-Kokoua National Park. Conservation Science and Practice, **4**(12): e12839.

Terhune, C. E., Gaudin, T., Curran, S., & Petculescu, A. 2021. The youngest pangolin (mammalia, Pholidota) from Europe. Journal of Vertebrate Paleontology, **41**(4): e1990075.

Tinsman, J. C., Gruppi, C., Bossu, C. M., Prigge, T. L., Harrigan, R. J., Zaunbrecher, V., ... & Smith, T. B. 2023. Genomic analyses reveal poaching hotspots and illegal trade in pangolins from Africa to Asia. Science, **382**(6676): 1282-1286.

TRAFFIC (no date), 'Wildlife trade: What is it?' Available at http://www.traffic.org/trade/ (accessed January 2024).

UNODC, Wildlife Crime: Pangolin scales, 2020. United Nations Office on Drugs and Crime.

Vallianos Ch. 2016. Pangolins on the brink. WILDAID. Available from https://wildaid.org (accessed January 2024).

Van, N. D. N., & Tap, N. 2008. An overview of the use of plants and animals in traditional medicine systems in Viet Nam PDF, 1.2 MB.

Wang, B., Yang, W., Sherman, V. R., & Meyers, M. A. 2016. Pangolin armor: overlapping, structure, and mechanical properties of the keratinous scales. Acta biomaterialia, **41**:60-74.

Wang, Y., Turvey, S. T., & Leader-Williams, N. 2020. Knowledge and attitudes about the use of pangolin scale products in Traditional Chinese Medicine (TCM) within China. People and Nature, **2**(4): 903-912.

WHO. 2002. Traditional medicine: growing needs and potential (No. WHO/EDM/2002.4). World Health Organization.

WHO. 2008. Traditional medicine (Fact sheet N°134). World Health Organization. Available from http://www.siav-itvas.org/ (accessed January 2024).

Willcox, D., Nash, H. C., Trageser, S., Kim, H. J., Hywood, L., Connelly, E., ... & Challender, D. W. 2019. Evaluating methods for detecting and monitoring pangolin (Pholidata: Manidae) populations. Global Ecology and Conservation, **17**: e00539.

Wright, N., & Jimerson, J. 2020. The rescue, rehabilitation and release of pangolins. In Pangolins (pp. 495-504). Academic Press.

Wyatt, T. 2013. The security implications of the illegal wildlife trade. The Journal of Social Criminology, 130-158.

Xing, S., Bonebrake, T. C., Cheng, W., Zhang, M., Ades, G., Shaw, D., & Zhou, Y. 2020. Meat and medicine: historic and contemporary use in Asia. Pangolins, 227-239.

Yang, L., Chen, M., Challender, D. W., Waterman, C., Zhang, C., Huo, Z., ... & Luan, X. 2018. Historical data for conservation: reconstructing range changes of Chinese

pangolin (Manis pentadactyla) in eastern China (1970–2016). Proceedings of the Royal Society B, **285**(1885): 20181084.

Yang, N., Liu, P., Li, W., & Zhang, L. 2020. Permanently ban wildlife consumption. Science, **367**(6485): 1434-1434.

Yang, R., Ford, B. J., Tambe, M., & Lemieux, A. 2014. Adaptive resource allocation for wildlife protection against illegal poachers. In Aamas (pp. 453-460).

Yeo, D., Chan, A. H., Hiong, K. C., Ong, J., Ng, J. Y., Lim, J. M., ... & Er, K. B. 2024. Uncovering the magnitude of African pangolin poaching with extensive nanopore DNA genotyping of seized scales. *Conservation Biology*, **38**(2): e14162.

Zanvo, S., Djagoun, C. A., Azihou, A. F., Djossa, B., Afiademanyo, K., Olayemi, A., ... & Gaubert, P. 2022. Can DNA help trace the local trade of pangolins? Conservation genetics of white-bellied pangolins from the Dahomey Gap (West Africa). BMC Ecology and Evolution, **22**(1): 16.

Zanvo, S., Gaubert, P., Djagoun, C. A., Azihou, A. F., Djossa, B., & Sinsin, B. 2020. Assessing the spatiotemporal dynamics of endangered mammals through local ecological knowledge combined with direct evidence: the case of pangolins in Benin (West Africa). Global Ecology and Conservation, **23**: e01085.

Zhang H, Miller MP, Yang F, Chan HK, Gaubert P, Ades G, Fischer GA. 2015. Molecular tracing of confiscated pangolin scales for conservation and illegal trade monitoring in Southeast Asia. Global Ecology and Conservation **4**:414–422.

Zhang, F., Wu, S., & Cen, P. 2022. The past, present and future of the pangolin in Mainland China. Global Ecology and Conservation, **33**: e01995.

Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. 2020. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. Current biology, **30**(7): 1346-1351.

Zhang, Y. P., & Shi, L. M. 1991. Genetic diversity in the Chinese pangolin (Manis pentadactyla): inferred from restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs. Biochemical genetics, **29**(9): 501-508.

Zhou, Z. M., Zhao, H., Zhang, Z. X., Wang, Z. H., & Wang, H. 2012. Allometry of scales in Chinese pangolins (Manis pentadactyla) and Malayan pangolins (Manis javanica) and application in judicial expertise.