

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Využití DNA barcodingu k detekci falšování potravin

Bakalářská práce

Tereza Mikysková

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Ing. Jakub Vašek, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití DNA barcodingu k detekci falšování potravin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu této bakalářské práce panu Ing. Jakubovi Vaškovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky.

Využití DNA barcodingu k detekci falšování potravin

Souhrn

Za falšování potravin je považováno úmyslné klamání zákazníka, nejčastěji za účelem ekonomického zisku. Může jím být například substituce, ředění, přidávání nežádoucích a nedeklarovaných příměsí a nesprávné označování. Nejčastěji jsou falšovány drahé komodity, jako je víno a ryby. Dnes se pro autentizaci potravin využívá mnoho metod, ale pozornost je věnována zejména metodám molekulárním, jako je např. DNA barcoding.

DNA barcoding je molekulární metoda, která byla poprvé navržena v roce 2003. Využívá krátkých úseků DNA, které slouží jako „čárové kódy“ pro identifikaci biologických druhů.

Pro živočišnou říši je nejčastěji aplikován barcode COI nebo cytb, díky kterým je možné identifikovat téměř všechny živočišné druhy. Pro rostlinnou říši byly barcodes navrženy později než pro říši živočišnou a dodnes neexistuje jediný barcode, který by bylo možné uplatnit pro identifikaci všech rostlinných druhů. Využívány jsou zejména barcodes rbcL, matK, trnH-psbA a ITS.

Extrakce DNA je prvním krokem DNA barcodingu. Je to proces separace DNA od buněčných membrán a lze ho provést řadou metod, jako je fenol-chloroformová metoda, chromatografické metody nebo CTAB. Volba metody extrakce DNA z potravin závisí na druhu potravin, neboť prochází různou mírou zpracování a může obsahovat látky, jako jsou alkaloidy nebo tuky, které ovlivňují množství a kvalitu extrahované DNA. Tato DNA je dále amplifikována pomocí klasické PCR nebo qPCR, která umožňuje sledování produktů reakce v reálném čase. Pořadí jednotlivých bází DNA je možné zjistit pomocí sekvenačních metod. Tyto metody se rozdělují na metody první generace, mezi které řadíme především Sangerovu metodu, která je stále nejvyužívanější metodou pro analýzu COI a metody nové generace, z nichž nejvyužívanější jsou Illumina a Ion Torrent. Posledními kroky v procesu DNA barcodingu je úprava dat ze sekvenace pomocí různých bioinformatických nástrojů a jejich srovnání se sekvencemi v referenční databázi.

Díky DNA barcodingu je možné identifikovat potraviny rostlinného původu, jako jsou luštěniny, olivový olej, koření a ovoce, i živočišného původu, jako jsou ryby, mořské plody a mléko a mléčné výrobky.

Klíčová slova: DNA barcoding, falšování potravin, NGS, qPCR

Application of DNA barcoding for food fraud detection

Summary

Food fraud is considered to be the intentional deception of a customer, usually for economic gain. This may include, for example, substitution, dilution, addition of undesirable and undeclared additives and mislabeling. Most commonly adulterated commodities include expensive commodities such as wine and fish. Today, many methods are used to authenticate food, but the focus is on molecular methods such as DNA barcoding.

DNA barcoding is a molecular method first introduced in 2003. It uses short parts of DNA that serve as „barcodes“ for the identification of species. For the animal kingdom, the most commonly applied barcodes are the COI and cytb barcodes, which make it possible to identify almost all animal species. Barcodes for plants were proposed later than for the animal species and there is no single barcode that can be applied for the identification of all plant species to date. In particular, the barcodes rbcL, matK, trnH-psbA and ITS have been used.

DNA extraction is the first step of DNA barcoding. It is the process of separating DNA from cell membranes and can be performed by various methods such as the phenol-chloroform method, chromatographic methods or CTAB. The choice of method for extracting DNA from food depends on the type of food, as it undergoes varying degrees of processing and it may contain substances such as alkaloids or fats that affect the quantity and quality of the extracted DNA. Further, extracted DNA is amplified by conventional PCR or qPCR, which allows real-time monitoring of the reaction products. The order of the DNA bases can be determined by sequencing methods. These methods are divided into first-generation methods, which include mainly the Sanger method, which is still the most frequently used method for COI analysis, and next generation sequencing methods, of which the most used are Illumina and Ion Torrent. The final steps in the DNA barcoding process are the editing of the sequencing data using various bioinformatics tools and their comparison with the sequences in reference databases.

DNA barcoding makes it possible to identify foods of plant origin, such as legumes, olive oil, spices and fruits, as well as foods of animal origin, such as fish, seafood and dairy products.

Keywords: DNA barcoding, food fraud, NGS, qPCR

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Falšování potravin	10
3.1.1 Substituce.....	10
3.1.2 Ředění a přidávání složek.....	10
3.1.3 Padělání.....	11
3.1.4 Nesprávné označování	11
3.2 DNA barcoding	11
3.2.1 DNA mini-barcoding	12
3.2.2 DNA metabarcoding	13
3.3 Metody DNA barcodingu	13
3.3.1 Extrakce DNA	13
3.3.1.1 Fenol-chloroformová extrakce.....	13
3.3.1.2 Chromatografické metody extrakce DNA	14
3.3.1.3 Cetyltrimethylamoniumbromidová metoda extrakce (CTAB)	14
3.3.1.4 Magnetická separace.....	14
3.3.1.5 Extrakce za pomoci silikátů.....	15
3.3.1.6 Extrakce DNA z potravin	15
3.3.2 Polymerázová řetězová reakce	16
3.3.2.1 Komponenty reakční směsi PCR	18
3.3.2.2 qPCR.....	19
3.3.3 Sekvenace DNA.....	20
3.3.3.1 Sekvenování první generace	20
3.3.3.2 Sekvenování nové generace.....	22
3.3.4 Bioinformatické zdroje	25
3.3.5 Referenční databáze	26
3.4 Využití DNA barcodingu v potravinářském průmyslu	27
3.4.1 DNA barcoding luštěnin	27
3.4.2 DNA barcoding olivového oleje.....	27
3.4.3 DNA barcoding koření	28
3.4.4 DNA barcoding ovoce	28
3.4.5 DNA barcoding ryb a mořských plodů.....	29
3.4.6 DNA barcoding mléka a mléčných výrobků	29
4 Závěr	31

5 Literatura.....	32
6 Seznam použitých zkratk 40	40
7 Seznam obrázků a tabulek..... 41	41

1 Úvod

Jedním z hlavních cílů kontroly kvality potravin je ověření souladu informací uvedených na obalu výrobku s jeho skutečným obsahem. Během všech fází výroby se mohou do potravin, ať již úmyslně nebo neúmyslně, dostat kontaminanty. Tyto kontaminanty mohou představovat nebezpečí pro konzumenty, omezit potenciální zdravotní benefity potravin a způsobovat alergické reakce (Valentini et al. 2017). Stále častější případy falšování potravin proto zvyšují zájem o kontrolu autenticity potravin a ověřování jejich původu. Například skandál z roku 2013, kdy bylo objeveno koňské maso v produktech z hovězího masa, snížil důvěru konzumentů v označování potravin (Salihah et al. 2016).

Spolu se vzrůstající produkcí potravin pokračuje i vývoj nových technologií a biotechnologií ke zvýšení údržnosti a zlepšení organoleptických vlastností potravin (Galimberti et al. 2013), ale také metod kontroly kvality (Bruno et al. 2019). Dnes se využívá řada metod, jako například metody založené na morfologii, analýze složení a metody využívající analýzy bílkovin. Nicméně tyto metody jsou časově náročné, pro rozlišení jednotlivých druhů je třeba práce zkušeného technologa a jsou méně efektivní u zpracovaných potravin. Proto se dnes věnuje pozornost především metodám založeným na analýze DNA, které jsou více efektivní a mohou být použity na širší škálu produktů (DawanS & Ahn 2022).

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo seznámení se současnými možnostmi využití molekulární metody DNA barcodingu pro kontrolu kvality a detekci falšování potravin. Náplň dílčích cílů reflektuje témata jednotlivých kapitol, která se zaměřují na definici falšování potravin, princip metody DNA barcodingu, popsání nejběžněji využívaných metod DNA barcodingu a jeho aplikaci v různých oblastech potravinářského průmyslu.

3 Literární rešerše

3.1 Falšování potravin

S falšováním potravin se lidstvo potýká již po staletí, a to už od dob, kdy začaly být vyráběny za účelem ekonomického zisku. Ten je také nejčastějším důvodem falšování, proto se nejčastěji falšují komodity drahé nebo naopak ty, které se prodávají ve velkých množstvích (Čížková et al. 2012). Dle Státní zemědělské a potravinářské inspekce je to nejčastěji víno, lihoviny, med, džem a ryby (Kopřiva 2015). V české ani evropské legislativě není pojem „falšování potravin“ či „food fraud“ přesně definován, ale dle zákona o potravinách a tabákových výrobcích je zakázáno na trh uvádět potraviny, které jsou klamavě označené nebo nabízené ke spotřebě klamavým způsobem (Čížková et al. 2012). Kromě finančních ztrát může mít falšování za následek i závažné újmy na zdraví. Jedním z nejzávažnějších případů, s 1200 mrtvými, byl incident v roce 1981 ve Španělsku, kdy byl za olivový olej vydáván olej pro technické využití (Visciano & Schirone 2021).

Obecně je tedy za falšování potravin považováno úmyslné klamání zákazníka v jakékoliv části výrobního procesu potraviny. Může jím být substituce, ředění, přidávání nežádoucích a nedeklarovaných příměsí, ale také nesprávné označení původu, doby trvanlivosti nebo vydávání produktu za produkt jiné značky (Čížková et al. 2012; Spink et al. 2017).

3.1.1 Substituce

Substituce spočívá v nahrazení složek potraviny složkou s nižší nutriční hodnotou nebo složkou levnější. Tento druh falšování je jedním z nejčastějších a byl popsán u nejvíce kategorií potravin. Přestože nařízení Evropské unie (EU) nařizuje uvádět na etiketě nebo štítku produktů rybolovu a akvakultury obchodní označení příslušného druhu a jeho vědecký název, jsou ryby jednou z nejčastěji falšovaných kategorií potravin (Visciano & Schirone 2021). Například v roce 2007 se vyskytly dva případy otravy tetrodotoxinem způsobené nahrazením mořského d'asa rybou z čeledi čtverzubcovití, které tento toxin produkují (Cohen et al. 2009).

3.1.2 Ředění a přidávání složek

Typickým příkladem ředění a přidavku složek je přidávání vody nebo rostlinných olejů do mléka. Jako znehodnocujících látek v mléce se také využívá sójových a hrachových prášků, z důvodu jejich nízké ceny. Zároveň jsou to ale časté alergeny a mohou tedy být nebezpečné pro alergiky (Montgomery et al. 2020).

3.1.3 Padělání

Padělky jsou výrobky, které napodobují originální výrobek. Padělání se může vztahovat k obalu, etiketě nebo ochranným známkám. Často padělanými výrobky jsou víno, pivo, olivový olej a produkty z ekologického zemědělství (Visciano & Schirone 2021).

3.1.4 Nesprávné označování

Nesprávné označování je nejčastějším typem falšování v EU. V roce 2015 tvořilo 33,3 % všech případů falšování a v roce 2019 tvořilo už 47 %, přičemž nejčastějšími kategoriemi jsou ryby a pekařské produkty. Nebezpečné jsou zejména nedeklarované ingredience nebo alergenů (Visciano & Schirone 2021).

3.2 DNA barcoding

DNA barcoding je metoda používaná pro identifikaci různých biologických druhů – rostlin, živočichů i hub. Uplatňuje metody jako polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a DNA amplifikaci. V posledním desetiletí se používal především při výzkumu, ale začíná nacházet i praktická využití. Je doporučován pro svou finanční nenáročnost, rychlost a úspěšnost až 80 %.

Základním principem DNA barcodingu je amplifikace vybraných genů nebo jejich částí pomocí PCR, následné sekvenování získaných DNA fragmentů a identifikace druhu na základě porovnání získaných sekvencí se sekvencemi v referenční databázi. Sekvence tak slouží jako „čárový kód“ (barcode) pro ověření původu vzorku. DNA barcode je standardizovaná sekvence DNA o délce přibližně 400-800 párů bazí (bp), která může být zadána do digitální knihovny (Nehal et al. 2021). Ideální barcode by měl mít nízkou vnitrodruhovou variabilitu, ale vysokou mezidruhovou variabilitu, většinou alespoň 3 % mezi blízkými příbuznými druhy, což se ale může lišit u různých taxonomických skupin.

Hebert et al. v roce 2003 navrhli použití mitochondriální DNA pro identifikaci živočišných druhů. Důvodem je, že četnost rekombinace je u mitochondriální DNA nízká, na rozdíl od jaderné DNA neobsahuje introny a je pouze maternálního původu. Předchozí výzkum se často zaměřoval na mitochondriální ribozomální DNA (12S, 16S), ta ale často podléhá inzercím a delecím. Mitochondriální genom obsahuje 13 genů kódujících proteiny, inserce a delece jsou u něj vzácné a jeho evoluce je rychlá, výsledkem je tedy vyšší variabilita mezi blízkými příbuznými druhy (Hebert et al. 2004). Jako nejvhodnější gen byl doporučen 658 bp dlouhý (Yang et al. 2018) mitochondriální gen pro podjednotku I cytochrom oxidázy (COI), protože univerzální primery pro tento gen jsou velice robustní a lze díky nim úspěšně

amplifikovat tento úsek u většiny živočišných druhů. COI vykazuje vysokou diskriminační sílu u ptáků (98-100% úspěšnost identifikace) (Hebert et al. 2004), ryb (93-98% úspěšnost identifikace) (Ward et al. 2005), pavouků (100% úspěšnost identifikace) (Barrett & Hebert 2005) a plazů (72,7-100% úspěšnost identifikace) (Nagy et al. 2012). Další barcode, mitochondriální oblast pro cytochrom b (cytb), byl využit pro autentizaci zvěřiny (D'Amato et al. 2013; Galimberti et al. 2013), a to hlavně z praktických důvodů, neboť brzká dostupnost univerzálních primerů pro cytb zapříčinila depozici několika tisíců cytb sekvencí pro savce do veřejných databází.

Na rozdíl od živočišné říše, pro kterou byly navrženy univerzální oblasti pro DNA barcoding přijaty už v prvních letech tohoto tisíciletí, pro botanické druhy byly uplatněny až o několik let později. COI gen se u rostlin ukázal jako nepoužitelný, kvůli pomalé evoluci mitochondriální DNA (Kress 2017). Genom chloroplastů je strukturně stálý a, podobně jako u mitochondriálního, je uniparentálně děděný a nepodléhá rekombinaci, proto se stal ideálním kandidátem pro barcoding (Nehal et al. 2021). Bylo zvažováno několik nadějných chloroplastových sekvencí, ale ukázalo se, že žádný úsek není možné uplatnit jako univerzální barcode pro všechny rostlinné druhy. Jako barcodingy se ujaly především kombinace čtyř oblastí genů, a to chloroplastový gen pro velkou podjednotku enzymu rubisco (*rbcL*), maturáza K (*matK*), nekódující oblast *trnH-psbA* a vnitřní přepisovaný mezerník (Internal transcribed spacer; ITS) (Shneyer & Rodionov 2019). *RbcL* barcode je 599 bp dlouhý úsek na 5' konci genu, je lehce amplifikovatelný a lze jednoduše určit jeho sekvenci u většiny suchozemských rostlin, ale má jen nízkou diskriminační sílu (Staats et al. 2016). *Mat K* barcode je 841 bp dlouhá oblast uprostřed genu a má jednu z nejrychlejších evolucí v genomu plastidů. Je zřejmě také nejbližším rostlinným analogem k živočišnému barcodu COI (Hilu & Liang 1997). Jeho amplifikace je ale obtížnější, především u výtrusných rostlin, kvůli nedostatku vhodných univerzálních primerů (Kress & Erickson 2007). ITS a *psbA-trnH* jsou nejčastěji využívané jako doplňkové oblasti, ale mají potenciál i jako samostatné barcodingy (Staats et al. 2016). DNA barcoding umožnil univerzální identifikaci rostlinných druhů, především díky potenciálu získat DNA prakticky z jakékoliv části rostliny, včetně semen, natrávených částí obsažených v žaludcích zvířat nebo zbytků z jejich exkrementů (Kress 2017).

3.2.1 DNA mini-barcoding

Alternativou pro DNA barcoding je mini-barcoding. Využívá kratších úseků DNA (<200 bp) v případech, kdy je obtížné získat z analyzovaného vzorku DNA z důvodu její degradace, což může snížit účinnost PCR. Díky jejich velikosti jsou lépe amplifikovatelné, ale je možné je

využít pouze na užší škálu druhů (Gao et al. 2019). Mini-barcody založené na 12S a 16S rDNA byly použity v několika studiích pro identifikaci několika druhů zvířat ve zpracovaných potravinách a produktů tradiční medicíny (Tillmar et al. 2013; Cheng et al. 2014; Sarri et al. 2014).

3.2.2 DNA metabarcoding

DNA metabarcoding kombinuje metodu DNA barcodingu s novými metodami sekvenace DNA. Pomocí univerzálních PCR primerů je možné amplifikovat jeden nebo více cílových sekvencí různých biologických druhů v jednom vzorku (Fernandes et al. 2021). Tyto metody mohou být použity pro identifikaci druhů ve vysoce zpracovaných potravinách (Staats et al. 2016).

3.3 Metody DNA barcodingu

3.3.1 Extrakce DNA

Extrakce DNA je metoda, díky které je možné separovat DNA od buněčných membrán, bílkovin a dalších buněčných složek vzorku. Jako první provedl izolaci DNA Friedrich Miescher v roce 1869 (Gupta 2019). Je to pravděpodobně nejzásadnější krok v analýze DNA z komplexnějších druhů potravin, jehož standardizace a optimalizace je kvůli rozmanitosti vzorků obtížná.

Metod pro extrakci DNA je mnoho, ale volba metody by měla vést k efektivní extrakci s vysokou kvantitou a kvalitou DNA. Dále by měl být zohledněn čas, cena, potenciální toxicita látek, vybavení laboratoře a potřebné zkušenosti (Griffiths & Chacon-Cortes 2014). K extrakci může být použita konvenční metoda, využívající různé chemikálie, které vyžadují přípravu před samotnou extrakcí, nebo komerční extrakční sady (Sajali et al. 2018). Často využívané sady pro analýzu potravin zahrnují Wizard Genomic DNA (Promega), DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen), DNeasy Plant kit (Qiagen), NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) (Maestri & Marmioli 2016).

Extrakce DNA probíhá v několika krocích, a to rozrušení buněčných a jaderných membrán, odstranění membránových lipidů, bílkovin a RNA a purifikace DNA (Ali et al. 2017).

3.3.1.1 Fenol-chloroformová extrakce

Při této metodě jsou buněčné stěny rozrušeny pomocí pufu s obsahem tenzidu, nejčastěji dodecylsírany sodného a přidávkem enzymu proteinázy. K se lýze buněk usnadní.

Dále následuje denaturace bílkovin pomocí směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 25:24:1. Izoamylalkohol se přidává pro lepší oddělení fází a zároveň předchází pění. Složky jsou promíchány a vytváří emulzi, která se po centrifugaci rozdělí do dvou fází – horní vodní fáze s rozpuštěnou DNA a spodní hydrofobní fáze s denaturovanými bílkoviny a organickými rozpouštědly. Za pomoci pipety se horní fáze přemístí do čisté zkumavky. DNA může vlivem fenolu degradovat, proto se vzorek ještě promývá čistým chloroformem. DNA může být vysrážena přidáním octanu sodného a etanolu v poměru 2:1 nebo 1:1. Centrifugací se vysráží DNA, která je dále promyta 70% etanolem pro odstranění zbytku soli. Následuje další centrifugace pro odstranění etanolu. Čistá DNA může být dále rozpuštěna v destilované vodě nebo pufru (Shetty 2020).

Fenol-chloroformová metoda je zlatým standardem extrakce DNA, může být aplikována na širokou škálu vzorků, poskytuje vysoký výtěžek DNA a je relativně nenákladná (Shetty 2020). Fenol a chloroform jsou ale toxické látky, při jejichž použití je zapotřebí využívat ochranných prostředků (Evans et al. 2001).

3.3.1.2 Chromatografické metody extrakce DNA

Chromatografické metody zahrnují gelovou filtrační chromatografii, ionexovou chromatografii a afinitní chromatografii (Shetty 2020). Gelová filtrační chromatografie separuje molekuly na základě jejich velikosti a tvaru. Využívá porézního gelu umístěného ve svislé koloně, na jehož povrch se umístí vzorek. Když vzorek prochází přes gel, menší molekuly (mRNA, bílkoviny) pronikají do pórů, zatímco větší molekuly (DNA) gelem projdou (Almeida et al. 2020).

3.3.1.3 Cetyltrimethylamoniumbromidová metoda extrakce (CTAB)

Při této metodě se ke vzorku přidá 2% roztok CTAB. Extrakční pufr vysráží DNA a polysacharidy od ostatních buněčných komponent. Dále je přidán roztok s vysokým obsahem soli, který oddělí DNA od polysacharidů. DNA je následně přečištěna organickým rozpouštědlem (např. etanolem nebo chloroformem) (Shetty 2020).

3.3.1.4 Magnetická separace

Tato metoda využívá magnetických nanočástic vyrobených z magnetitu nebo maghemitu, pokrytých povrchem ze silikátu či s funkčními skupinami, které na sebe vážou DNA (Saiyed & Ramchand 2007). Separace magnetických kuliček z lyzátu se dosáhne aplikací magnetického

pole na vnější část dna zkumavky. Kuličky se usadí na dně a zbylý roztok se může odstranit. DNA je pak vysrážena etanolem.

Výtěžek DNA pomocí magnetické separace je srovnatelný s ostatními konvenčními metodami, navíc provedení trvá méně než 15 minut, ostatní metody mohou zabrat až několik hodin. Nevýhodou je ale vyšší cena (Shetty 2020).

3.3.1.5 Extrakce za pomoci silikátů

Při extrakci silikáty se využívá selektivní vazby negativně nabitě DNA s pozitivními náboji na silikátovém povrchu. Po navázání DNA na povrch je možné vymýt kontaminanty destilovanou vodou nebo puftrem, např. Tris-EDTA (tris(hydroxymethyl)aminomethan-ethylendiaminotetraoctová kyselina) (Woodard et al. 1993). Tato metoda je jednoduchá na provedení, cenově nenáročná s velkým výtěžkem a může být i automatizována (Shetty 2020).

3.3.1.6 Extrakce DNA z potravin

Zelenina obsahuje vysoké množství polysacharidů a fenolických sloučenin, které mohou narušovat aktivitu DNA polymerázy při PCR a musí být tedy odstraněny během izolace DNA (Costa et al. 2012). Přítomnost sekundárních metabolitů, jako alkaloidů, flavonoidů a terpenů, může také inhibovat amplifikaci DNA. Dle Pinto et al. (2007) jsou extrakční sady založené na extrakci pomocí silikátů, jako například Promega Wizard, efektivní při izolaci DNA ze zeleniny. Mafra et al. (2008) provedli studii několika komerčních extrakčních sad (např. Nucleospin, Genespin) a jejich účinnosti na extrakci DNA z vysoce i lehce zpracovaných sójových produktů. Vysoký výtěžek i kvalita DNA byla získána z tofu, sójové mouky a izolovaného sójového proteinu. Naproti tomu ze sójové omáčky bylo získáno velmi málo DNA s nízkou kvalitou, což autoři vysvětlují vysokou mírou zpracování, které zahrnuje fermentaci, rafinaci a tepelné ošetření.

U potravin, které prošly tepelnou úpravou pečením dochází k Maillardově reakci, při které dochází k produkci různých sensoricky aktivních látek, například enzymatických inhibitorů. Tyto inhibitory mohou ovlivňovat další kroky analýzy. Extrakce pomocí silikátů je vhodná u zrn pšenice seté (*Triticum aestivum*), která byla pečena na 200 °C po dobu 1 hodiny (Giles & Brown 2008).

Vysoký obsah aldehydů, fenolů a pektinu v lesním ovoci je hlavním faktorem ovlivňujícím extrakci DNA, protože inhibují rozklad buněčné membrány nebo činnost

polymerázy. Proto je, oproti běžným chemickým metodám extrakce, vhodnější zvolit metody ionexové chromatografie nebo magnetické separace (Wu et al. 2018).

Přítomnost tuku v rybách a mořských plodech může komplikovat izolaci DNA (Sajali et al. 2018). Ve studii Piskata et al. (2017) porovnali 3 extrakční metody DNA tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus alacares*) a vliv míry zpracování na izolaci DNA. Nejvyšší koncentrace DNA byla získána ze syrové svaloviny, následovala vařená a uzená svalovina, dále produkty konzervované, přičemž nižší výtěžek byl z produktů mletých v konzervě než celých v konzervě. Nejnižší výtěžek byl z pomazánek a paštik. Vzorky obsahující olej byly ponořeny do směsi chloroformu, methanolu a vody. Nejlepší výsledky měla extrakční sada DNeasy mericon Food od firmy QIAGEN.

3.3.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je enzymatický proces, ve kterém jsou specifické úseky DNA opakovaně duplikovány k získání milionů kopií v průběhu několika hodin (Reynolds et al. 1991). PCR byla poprvé popsána Kary Mullisem v roce 1985 (Mullis & Faloona 1987) a způsobila převrat v molekulární biologii.

Většina metod PCR amplifikuje fragmenty DNA o délce mezi 0,1 a 10 kb, avšak některé metody jsou schopné amplifikace fragmentů až 40 kb dlouhých (Cheng et al. 1994). PCR probíhá ve 4 krocích, a to počáteční denaturaci, denaturaci, nasednutí primerů (annealing) a elongaci. Princip metody PCR je znázorněn na obrázku 1.

Počáteční denaturace je potřebná pro PCR využívající DNA polymerázu, která vyžaduje teplotní aktivaci, tzv. horký start. Reakce probíhá při 94-96 °C 2-8 minut.

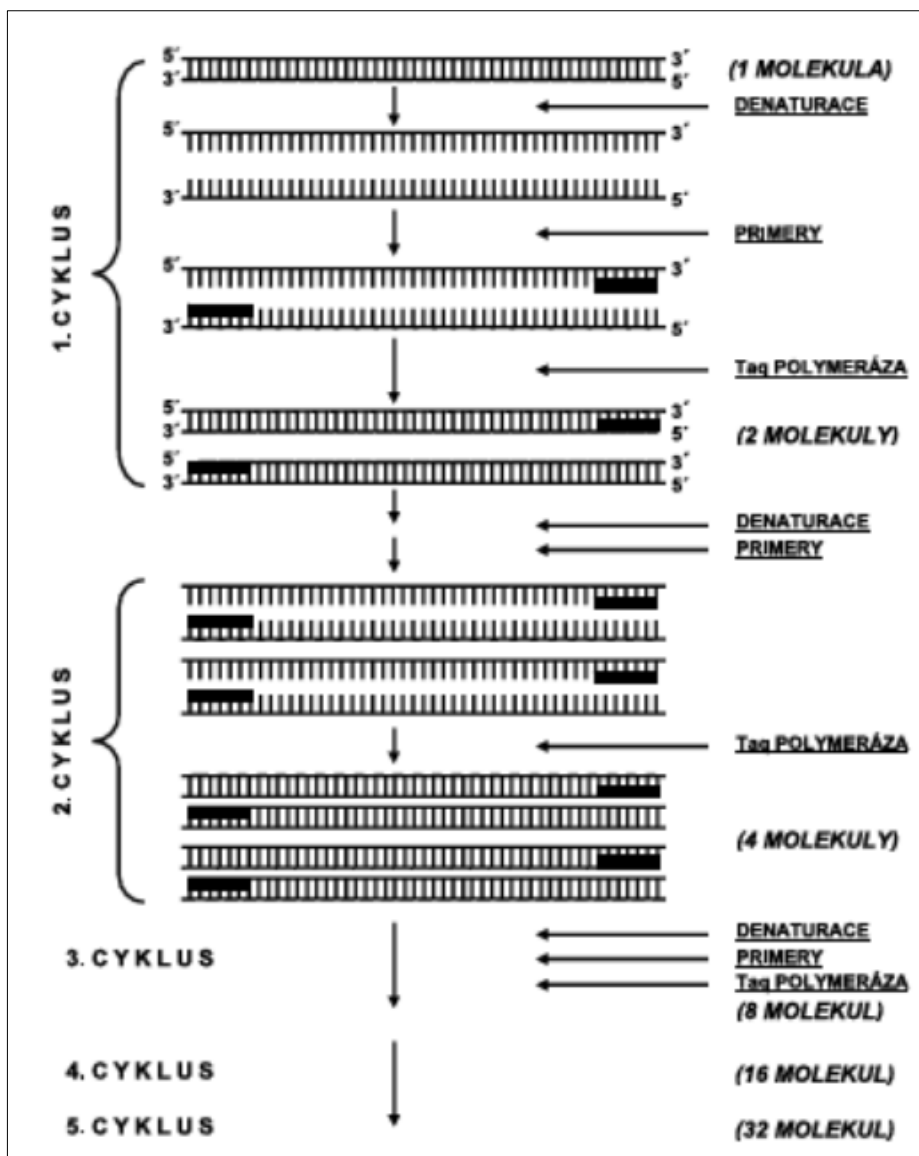
Denaturace probíhá při 90-98 °C 20-30 sekund. Výše teploty je dána obsahem guaninu (G) a cytosinu (C), čím je obsah vyšší, tím je i potřebná teplota vyšší. Pokud by byla teplota pro denaturaci příliš nízká nebo by trvala krátkou dobu, docházelo by jen k denaturaci úseků s adeninem a thyminem. Vysokou teplotou dochází k rozpojení vláken DNA porušením vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi (Green & Sambrook 2018).

Annealing většinou probíhá při teplotě 55-70 °C 20-40 sekund. Dvojice primerů nasedá na denaturovaný templát DNA. Určení optimální annelační teploty pro dané primery je často nutné empiricky testovat, protože nižší teploty oproti optimální teplotě způsobují tvorbu nespecifického produktu a při vyšších teplotách se často vytvoří nedostatečné množství požadovaného amplikonu.

Teplota **elongace** závisí na použité DNA polymeráze. Taq (z lat. *Thermus aquaticus*) polymeráza má optimum mezi 70 °C a 78 °C. Ideální je zahřívání na 72 °C po dobu 45 sekund

(Verma et al. 2014). V tomto kroku dochází k syntéze nového vlákna DNA dle templátové molekuly.

PCR se obvykle skládá ze 25-32 opakujících se cyklů se 3 teplotními fázemi v termocykleru, programovatelném přístroji, který kontroluje teplotu a čas jednotlivých kroků v cyklu. Produktem prvního cyklu jsou dvě dceřiné molekuly DNA, které v dalším cyklu slouží jako templát. Syntéza nových molekul začíná od primeru, nové produkty jsou tedy kratší než templát, ale delší než úsek vymezený primery. S průběhem reakce přibývá množství specifických produktů o délce vymezené primery exponenciálně, zatímco delších produktů přibývá lineárně (Green & Sambrook 2018).



Obrázek 1: Princip metody PCR (Otová & Mihalová 2013)

3.3.2.1 Komponenty reakční směsi PCR

Pro průběh reakce jsou potřebné následující složky:

Templát

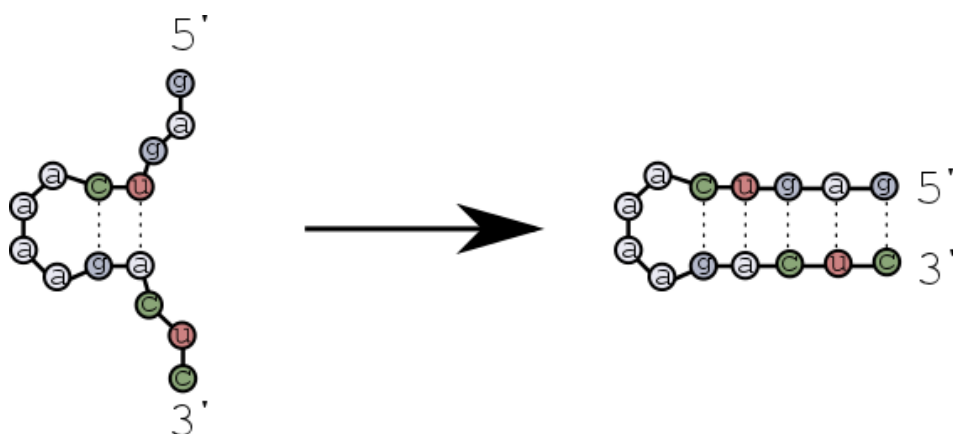
DNA s cílovou sekvencí k amplifikaci, čím čistší je DNA, tím bude výsledný produkt PCR kvalitnější (Verma et al. 2014).

DNA polymeráza

Enzymů zajišťujících syntézu DNA je dnes na trhu mnoho, pro rutinní PCR je stále využívána Taq polymeráza, původně izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, žijící v horkých pramenech Yellowstoneského národního parku.

Primery

Jako primery se využívají syntetické oligonukleotidy. Standardní reakce obsahuje nadbytečné množství primerů, obvykle 0,1-0,5 μM od každého. Vyšší koncentrace může vést k nespecifické amplifikaci. Obsah G a C by měl být mezi 40 až 60 % a všechny čtyři báze by měly být rovnoměrně rozvrženy po celé délce primeru. Délka primeru by se měla pohybovat v rozmezí 18-30 nukleotidů a oba primery by se neměly lišit o více než 3 báze. Primery kratší než 18 nukleotidů mají tendenci se vázat nespecificky a delší než 30 mohou vytvářet druhotné struktury, např. tzv. hairpin loops (vlásenky), viz obrázek 2. Přítomnost guaninu nebo cytosinu v posledních pěti nukleotidech na 3' konci primeru zajišťuje těsnou vazbu na templát, ale nemělo by jich být více než tři (Green & Sambrook 2018).



Obrázek 2: Hairpin loop (vlásenka), dostupné z www.multistrand.org/tutorials/Tutorial%2001%20-%20How%20do%20hairpins%20form.html

Pufrační směs

Látky udržující optimální pH pro optimální funkci DNA polymerázy, většinou obsahují látku Tris a chlorid draselný, udržují pH 7,6 při 72 °C.

Chlorid hořečnatý

Hořečnaté ionty jsou důležitými kofaktory pro DNA polymerázu, jen změna koncentrace hořečnatých iontů o 0,25 mmol/l může z reakce s výborným výtěžkem vytvořit reakci s nulovým výtěžkem.

Stabilizátory

Bovinní sérový albumin, glycerol a betain mohou být přidány do reakční směsi pro stabilizaci DNA polymerázy nebo zvýšení specifčnosti produktu (Verma et al. 2014).

3.3.2.2 qPCR

Metoda kvantitativní PCR (qPCR), nazývaná také real-time PCR, kombinuje technologii PCR s fluorescenčními látkami ke sledování produktů reakce v reálném čase během amplifikačního cyklu. Oproti klasické PCR nabízí vysokou citlivost a specifitu, nízké riziko křížové kontaminace, nižší čas analýzy, ale především schopnost kvantifikace výchozího množství cílové DNA. K monitoringu průběhu amplifikace je možné využít technologií, které lze rozdělit do dvou základních typů, a to dsDNA interkalační barviva nebo fluorescenčně značené sondy nebo primery (např. TaqMan) (Navarro et al. 2015).

Z interkalačních barviv je v různých oblastech výzkumu, včetně identifikace druhů masa, nejčastěji využíván SYBR® Green 1 (Ballin et al. 2009), jehož fluorescence se zvýší, když se naváže na menší žlábek DNA (Wittwer et al. 2013). Protože může docházet k tvorbě nespecifických produktů a dimerů primerů (Chou et al. 1992), doporučuje se zkontrolovat specifitu produktu pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání (high resolution melting curve analysis; HRM). Při této metodě je zachycována křivka tání (denaturace) dvoušroubovice DNA se zvyšující se teplotou a je sledována síla fluorescence. Při denaturaci dvoušroubovice dochází k prudkému poklesu fluorescenčního signálu, kvůli odloučení barviva z vlákna DNA a nespecifické produkty a dimery primerů denaturují při nižší teplotě než produkty specifické (Ririe et al. 1997).

TaqMan sondy jsou sondy označené fluorofory, což jsou molekuly, které absorbují světlo o určité vlnové délce, ale emitují světlo jiné vlnové délky. Jsou to oligonukleotidy, které mají na 5' konci reportérovou molekulu s fluorescenční značkou a na 3' konci „zhášec“ (quencher)

a vážou se na specifický úsek DNA. Zhášeč v blízkosti reportéru redukuje jeho fluorescence a v momentě, kdy je sonda štěpena aktivitou Taq DNA polymerázy, dojde k emitaci záření (Navarro et al. 2015).

3.3.3 Sekvenace DNA

Za počátek DNA sekvenování lze považovat uvedení dvou základních metod, a to Sangerovy a Maxam-Gilbertovy. Vývoj PCR, dostupnost kvalitních enzymů a fluorescenční automatické sekvenování umožnily určit sekvenci prvního lidského genomu v roce 2001 (Lander et al. 2001), čímž započala revoluce v sekvenačních metodách (Pervez et al. 2022).

3.3.3.1 Sekvenování první generace

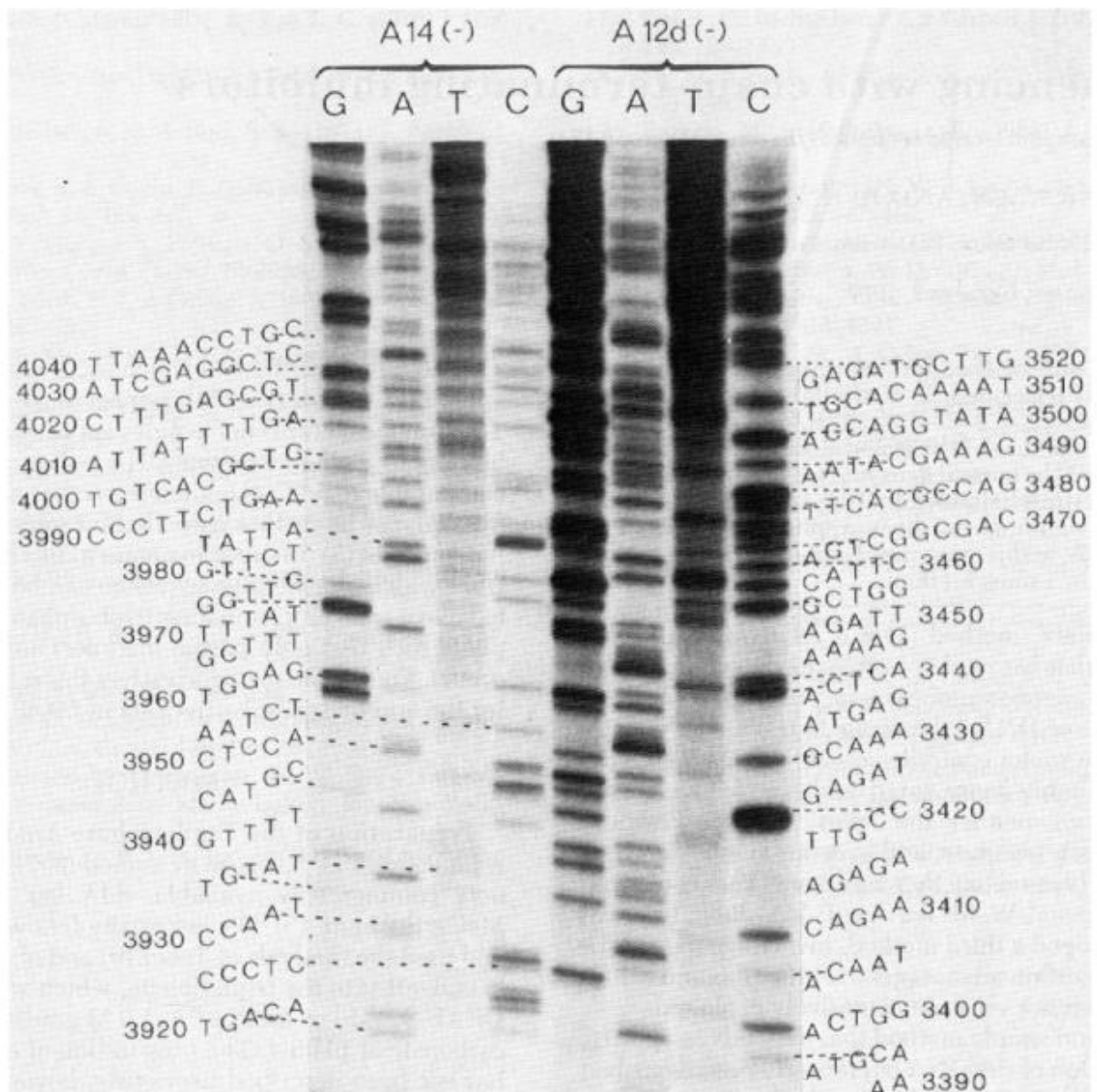
Metody sekvenování první generace zahrnují dvě metody: Maxam-Gilbertovu metodu chemického štěpení a Sangerovu metodu (dideoxy terminační metoda), které jsou založeny na amplifikaci DNA a gelové elektroforéze. Byly publikovány přibližně ve stejnou dobu, ale Sangerova metoda výrazně převládla.

Maxam-Gilbertova metoda byla popsána Maxamem a Gilbertem v roce 1977. Principem této metody je označení molekuly DNA radioaktivním izotopem fosforu, většinou na 5' konci, ale může být označen i 3' konec. Dále je denaturována a po amplifikaci je DNA rozštěpena pomocí čtyř různých chemikálií, štěpení se tedy provádí ve čtyřech různých zkumavkách. Každá z chemikálií štěpí DNA jen v místech určitých bází. Nanesením na gel vedle sebe a provedením elektroforézy se fragmenty rozdělí podle délky a fragmenty jsou zobrazeny autoradiograficky (Maxam & Gilbert 1977). Dnes se této metody využívá jen zřídka, a to z mnohých důvodů. Především je to vysoká toxicita izotopu fosforu, časová náročnost a možnost určení sekvence pouze krátkých úseků (Eren et al. 2022).

Sangerova metoda byla uvedena v roce 1977 (Sanger et al. 1977). Je založena na terminaci elongace vlákna DNA za pomoci polymerázy a derivátů nukleotidů. Na 3' konec jednovláknové DNA nasedá radioaktivně označený primer. DNA polymeráza prodlužuje řetězec, terminace je zajištěna syntetickými 2',3'-dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP) tzv. terminátory, které oproti deoxynukleotidtrifosfátům (dNTP) neobsahují volnou hydroxylovou skupinu na 3' konci. Tato skupina je nezbytná pro funkci DNA polymerázy, protože bez ní nemůže polymeráza přidávat další nukleotidy. Reakce probíhá ve čtyřech zkumavkách, do každé je přidána templátová DNA, polymeráza, primer, dNTP a jeden druh ddNTP. Vznikají tedy čtyři různé sekvenační směsi, každá s různými délkami fragmentů

zakončených stejnou bází podle použitých ddNTP. Jednotlivé reakce jsou naneseny na gel a elektroforeticky separovány (viz obrázek 3). Tato metoda mohla být v dalších letech díky technologickému vývoji modifikována. Dnes se místo radioaktivně značených terminátorů používají fluorescenčně značené terminátory v kombinaci s kapilární elektroforézou. Není tedy nutné používat čtyři různé zkumavky a reakce mohou probíhat pouze v jedné.

COI je nejčastějším cílem barcodingu a Sangerovo sekvenování zůstává nejvíce využívanou metodou pro jeho analýzu (Fernandes et al. 2021). I přes přínos, který tato metoda přivedla, má i své nevýhody. Podle Kumar & Kocour (2017) je to především časová náročnost a vyšší cena. Metody první generace také využívají delších úseků DNA, které často nejsou zachovány ve zpracovaných potravinách.



Obrázek 3: Autoradiograf akrylamidového gelu (Sanger 1977)

3.3.3.2 Sekvenování nové generace

Pro překonání nedostatků metod první generace byly vyvinuty nové technologie sekvenování DNA. Tyto technologie se označují jako metody nové generace (next generation sequencing; NGS) a díky jejich vývoji se výrazně snížila cena sekvenování i čas potřebný k osekvenování celých genomů (Weier 2012). Jsou rozdělovány na metody druhé a třetí generace. Srovnání generací sekvenování je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1: Srovnání generací sekvenování (Pervez et al. 2022)

Generace sekvenování	Technologie	Výhody	Nevýhody
První generace	Maxam-Gilbertova metoda Sangerova metoda	Vysoká přesnost Nápomocné k ověření výsledků NGS	Vysoká cena Čtení pouze jedné molekuly
Druhá generace	Pyrosekvenace Illumina Ion Torrent	Čtení velkého množství vláken zároveň Nízká cena Vysoká rychlost	Čtení krátkých segmentů Obtížná příprava vzorků Nutná PCR amplifikace Nízká rychlost
Třetí generace	Pacific Bioscience Oxford Nanopore	Není potřeba PCR amplifikace Čtení delších sekvencí Velmi nízká cena Nízká chybovost při přípravě knihovny	Vysoká chybovost sekvenace (až 20 %) Databáze a statistické nástroje jsou omezené

Výběr technologie pro metabarcoding závisí na několika parametrech, a to délce barcodu, počtu použitých barcodů a počtu analyzovaných vzorků (Staats et al. 2016). Technologie pyrosekvenování od firmy Roche byla první komerčně dostupnou technologií NGS a měla největší potenciál k identifikaci druhů. V dnešní době se však tato metoda používá jen zřídka,

jelikož byla nahrazena cenově výhodnějšími alternativami, především technologií od firmy Illumina. Největšími výhodami pyrosekvenování byla rychlost a kapacita čtení, spolu s vysokou přesností a možností automatizace. Jeho principem je obecně detekce pyrofosfátu, který je uvolňován při začleňování nukleotidů DNA polymerázou, v reálném čase. Molekuly pyrofosfátu následně započnou sled enzymatických reakcí, které vedou k vyzáření světla enzymem luciferázou a toto světlo je detekováno kamerou (Rasmussen Hellberg & Morrissey 2011).

Illumina je nejčastěji využívanou skupinou platforem NGS. Tyto technologie využívají k sekvenaci reverzně vázané fluorescenční dideoxy terminátory. Dnes Illumina nabízí řadu různých platforem, které jsou popsány v tabulce 2.

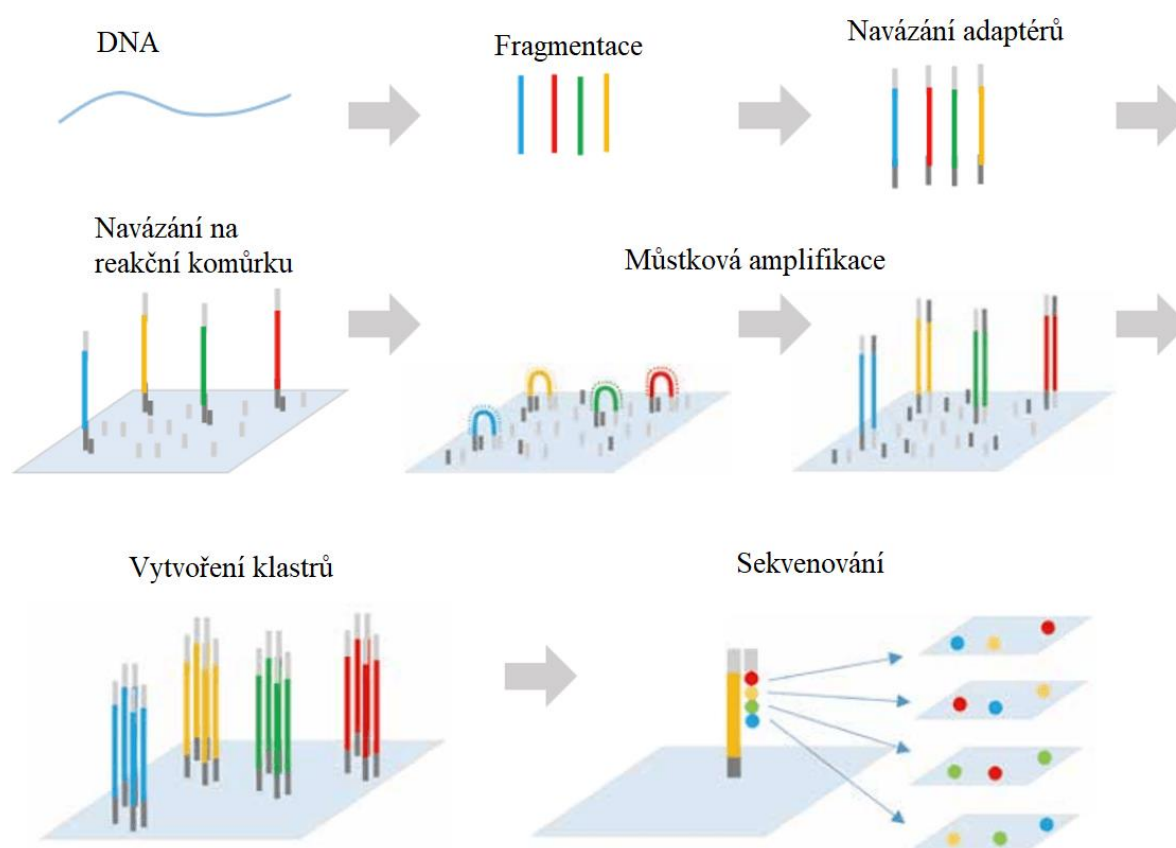
Tabulka 2: Srovnání momentálně dostupných sekvenačních platforem Illumina (www.illumina.com)

Platforma	iSeq 100	MiniSeq	MiSeq Series	NextSeq 550 Series	NextSeq 1000 & 2000
Doba sekvenace	9,5-16 hodin	4-24 hodin	4-55 hodin	12-30 hodin	11-48 hodin
Maximální výstup	1,2 Gb	7,5 Gb	15 Gb	120 Gb	360 Gb
Maximum čtení	4 miliony	25 milionů	25 milionů	400 milionů	1,2 miliardy
Maximální délka čtení	2 x 150 bp	2 x 150 bp	2 x 300 bp	2 x 150 bp	2 x 300 bp

Samotnému sekvenování předchází tzv. příprava knihovny, při které je DNA fragmentována a na konce fragmentů jsou přidány adaptéry. Tyto adaptéry obsahují sekvence, které jsou komplementární s primery a umožňují imobilizaci fragmentů na povrch reakčních komůrek (flow cells). Reakční komůrky obsahují dva typy oligonukleotidů, které slouží jako primery a navážou se na adaptéry. Následně DNA polymeráza vytváří komplementární vlákno. Dvouvláknová molekula je poté denaturována a původní templátové vlákno je odmyto. Vlákna jsou klonálně amplifikována pomocí můstkové amplifikace, která vede k formaci tzv. klastrů (viz obrázek 4) a nakonec jsou odstraněna všechna vlákna, která obsahují jeden druh adaptérů. Samotné sekvenování začíná tehdy, když jsou ke vzorku přidány primery a fluorescenčně označené nukleotidy. Sekvenace probíhá v cyklech, přičemž v každém cyklu je čten pouze jeden nukleotid, který navíc slouží jako terminátor a zabraňuje začlenění více nukleotidů

najednou. Světelné záblesky emitované při inkorporaci jsou detekovány kamerou, fluorescenční značení se odštěpí, terminátor deaktivuje a pokračuje nový cyklus (Illumina Inc 2018).

Ion Torrent je technologie podobná pyrosekvenaci, s tím rozdílem, že sekvenace není založena na detekci pyrofosfátu, ale na detekci vodíkových iontů, které jsou uvolňovány při zabudování nukleotidu do komplementárního vlákna, čímž dochází ke změně pH (Hellberg et al. 2016). Tato změna je potom přímo chemicky detekována a není třeba kamery pro zachycení signálu, jako je tomu u pyrosekvenace. To také snížilo cenu a čas sekvenace (Shendure & Ji 2008). Před sekvenováním je opět nutné vytvořit knihovnu, čehož se docílí pomocí emulzní PCR, při které jsou fragmenty DNA navázány na speciální kuličky pomocí adaptéru. Ion Torrent technologie od firmy Thermo Fisher Scientific využívá polovodičových čipů, které obsahují velké množství jamek. Na čip se napipetují kuličky a do každé jamky zapadne jedna. Následně je čip zaplaven jedním ze čtyř nukleotidů a pokaždé, když je nukleotid navázán, je zaznamenána změna pH a převedena na změnu napětí. Proces je opakován každých 15 sekund s jiným nukleotidem (Thermo Fisher Scientific 2020).



Obrázek 4: Základní princip přípravy knihovny a sekvenování pomocí technologie Illumina (<https://blogs.iu.edu>)

Speranskaya et al. (2018) porovnali Ion torrent platformu Ion S5 s platformou MiSeq od Illuminy k identifikaci rostlinných komponentů bylinných čajů, a i přes rozdíly v přípravě vzorků a principu sekvenování obě metody dosáhly podobných výsledků. Obě metody mají vysokou přesnost, ale vykazují chyby specifické pro danou platformu. Pro Illuminu jsou to invertované repetice a sekvence bohaté na C a G, jako např. GGC, které zvyšují frekvenci substitucí (Schirmer et al. 2015). U Ion Torrent způsobuje největší chybovost čtení homopolymerů (Bragg et al. 2013)

Aplikace NGS pro kontrolu autenticity potravin závisí na získání dostatečně kvalitní DNA, aby mohla být amplifikována a identifikována. Přestože je dnes možné extrahovat DNA z téměř jakéhokoliv typu produktu, je nutné brát v potaz, že složení vzorku pro analýzu může mít významný vliv na detekci cílové složky. Pro každou látku mohou být potřebné jiné postupy a množství potřebného materiálu se může lišit. Také je nutné odstranit veškeré inhibitory, které by mohly ovlivnit průběh reakce. Některé potraviny obsahují velmi malé množství DNA nebo pouze degradovanou DNA, což může vést k neúplné amplifikaci fragmentů s nízkým zastoupením.

3.3.4 Bioinformatické zdroje

Bioinformatika zahrála ve vývoji DNA barcodingu zásadní roli a v posledních letech bylo vyvinuto a vylepšeno mnoho nástrojů pro účinné provedení různých kroků v procesu metabarcodingu. Prvním krokem po získání dat z NGS je jejich filtrace podle kvality, protože je nutné odstranit chybná data, která by mohla potenciálně vést k nesprávné identifikaci druhu. Pravděpodobnost chybných bází v sekvenci je udávána pomocí Phred skóre. Phred skóre 20 odpovídá 1% chybovosti bází, tedy jedna ze sta bází bude chybná. Na tuto hodnotu je často pohlíženo jako na minimální v kontrole kvality sekvence. Nejčastěji využívanými softwarovými nástroji jsou Geneious, PRINSEQ a Trimmomatic (Bokulich et al. 2013). Po kontrole kvality může být sekvence přímo porovnána s referenční knihovnou nebo dále zpracována pomocí shlukové analýzy, nejčastěji pomocí algoritmů CD-HIT (Fu et al. 2012) nebo BlastClust (Altschul et al. 1997). Shluková analýza člení sekvence do operačních taxonomických jednotek (operational taxonomic unit; OTU) na základě jejich podobnosti s ostatními sekvencemi ve vzorku. OTU je definována jako shluk čtení s 97% podobností a předpokládá se tedy, že čtení patří stejnému druhu. Tato hodnota je ale jen přibližná, protože některé biologické druhy mohou mít identickou sekvenci DNA barcodu (Stoeckle et al. 2011). Klasifikace sekvencí je v praxi nejčastěji prováděna pomocí BLASTu (Basic Local Alignment Search Tool), který uspořádává cílovou sekvenci se sekvencemi ve vybrané databázi

ve dvou řádcích pod sebou podle krátkých identických fragmentů. Je vypočítán stupeň podobnosti fragmentů a je určena referenční sekvence s nejvyšší celkovou podobností (Altschul et al. 1997).

3.3.5 Referenční databáze

Správná identifikace druhů pomocí DNA barcodingu zcela závisí na pokrytí sekvencí barcodů v referenčních databázích. Pokud v databázi není možné vyhledat sekvenci náležící stejnému druhu jako je cílový vzorek, identifikace není možná (Staats et al. 2016).

Velké množství sekvencí obsahuje veřejná databáze GenBank, která je součástí Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI). Do této databáze mohou data přidávat jen vybrané osoby, jako jsou výzkumní pracovníci, pracovníci laboratoří, sekvenačních center apod. a NCBI je následně zodpovědné za zpracování těchto dat. Zpracování zahrnuje automatické i manuální kontroly pro zajištění kvality a věrohodnosti sekvencí. Na webových stránkách NCBI je dostupný i nástroj BLAST (NCBI 2023).

The Barcode of Life Database (BOLD) je databáze vedena projektem International Barcode of Life. Obsahuje sekvence čtveřice barcodů – COI pro identifikaci živočichů, ITS pro identifikaci hub a pro rostlinnou říši rbcL a matK. Momentálně obsahuje barcody 344 tisíc biologických druhů, z čehož rostliny a houby tvoří jen velice malou část, a také databázi primerů (Boldsystems 2014). Přestože odpovědnost za kvalitu dat náleží autorům, BOLD uplatňuje několik nástrojů pro identifikaci nepřesností nebo nízkou kvalitu záznamů. COI sekvence jsou například převedeny na aminokyseliny a porovnány s proteiny pocházejícími z COI (Ratnasingham & Hebert 2007).

FISH-BOL je kampaň zaměřující se na barcody COI, která sdružuje výzkumné pracovníky s cílem zajistit standardizované sekvence všech druhů ryb (Ward 2012). Sekvence získané FISH-BOL jsou uloženy v dalších veřejných databázích, včetně GenBank (Ward et al. 2009). FishTrace je projekt pro identifikaci mořských ryb z evropských vod a ryb prodávaných na evropském trhu. Dal vznik veřejné databázi se standardizovanými daty, která ale neobsahuje sekvence COI, namísto toho obsahuje sekvence genů pro cytb a rodopsin (FishTrace 2023).

3.4 Využití DNA barcodingu v potravinářském průmyslu

3.4.1 DNA barcoding luštěnin

Fabaceae neboli bobovité rostliny, jsou po obilninách druhou nejvýznamnější plodinou pro lidskou výživu. Semena kvalitních odrůd jsou často nahrazována méně kvalitními semeny stejného druhu nebo semeny druhu jiného, který má podobný vzhled. Toto nahrazení nemůže být odhaleno pomocí metod založených na morfologii. Kombinací metody DNA barcodingu a metody HRM je metoda Bar-HRM. Ta se ukázala jako vhodnou pro rozlišení druhů luštěnin. Tato kombinace zahrnuje amplifikaci DNA pomocí real-time PCR a následné barcodování s HRM. Jako markery mohou být použity například chloroplastový rpoC1, díky kterému lze rozlišit čočku kuchyňskou (*Lens culinaris*) od vikve seté (*Vicia sativa*), která může obsahovat toxické látky (Nehal et al. 2021). Hrachor popínavý (*Lathyrus clymenum*) je významnou luštěninou středomořské kuchyně a díky chráněnému označení původu, a tedy i vyšší ceně, často dochází k jejímu zaměňování s jinými druhy rodu hrachoru (*Lathyrus*), které mohou obsahovat neurotoxickou β -diaminopropionovou kyselinu způsobující až paralýzu zvanou neurolathyrismus. Ve studii Ganopoulos et al. (2012) byla úspěšně použita oblast chromozomové DNA trnL a metoda Bar-HRM pro rozpoznání hrachoru popínavého od 17 dalších druhů.

3.4.2 DNA barcoding olivového oleje

Olivový olej je populární pro své účinky na lidské zdraví, především ve vztahu k vysokému krevnímu tlaku a LDL cholesterolu. Až polovina celkového tuku konzumovaného ve středomořské dietě pochází právě z olivového oleje. Obchod s olivovým olejem je velice lukrativní a je častým předmětem falšování. Naproti tomu slunečnicový a řepkový olej jsou až desetkrát levnější (Kumar et al. 2011). Autenticita olejů je nejčastěji ověřována chemickými analytickými metodami, zejména plynovou chromatografií, kapalinovou chromatografií nebo spektroskopickými metodami. Tyto metody poskytují informace o poměru mastných kyselin v oleji, ale vychází z předpokladu, že poměr mastných kyselin se u různých olejů výrazně liší. Například lískoořechový olej má složení téměř nerozlišitelné od oleje olivového. Proto je také nejčastějším olejem používaným při falšování olivového oleje. Problematické je také šlechtění nových odrůd rostlin nebo jejich genetická modifikace na rostliny s požadovaným složením, tedy vysokým obsahem kyseliny olejové, jako je tomu u olivového oleje (Uncu et al. 2017). Ve studii Kumar et al. (2011) byly vytvořeny DNA barcodey pro řepkový, slunečnicový a olivový olej s použitím psbA-trnH a matK primerů. Zde metoda DNA barcodingu dokázala

odhalit přídavek řepkového a slunečnicového oleje od 5 %. V další studii (Ganopoulos et al. 2013) byla použita metoda Bar-HRM pro odhalení řepkového oleje v olivovém. Limit detekce byl udán jako 1 %. Dnes se DNA barcodingu využívá jako citlivé a spolehlivé metody pro ověření autenticity olivového oleje (Nehal et al. 2021).

3.4.3 DNA barcoding koření

Koření je různorodá skupina rostlinných částí – plodů, semen, květů, listů, stonků, kořenů, kůry, celých rostlin, využívaných v potravinářství jako aditivum. K falšování koření dochází často, kvůli jeho vysoké ceně, ale děje se i neúmyslně. Například badyán (*Illicium verum*) a *Illicium lanceolatum* mají velice podobný vzhled, ale *I. lanceolatum* je toxický. Přestože morfologické rozlišení je u těchto rodů možné, často se prodávají v podobě prášku, u kterého nelze morfologickou identifikaci ze zřejmých důvodů aplikovat. Ve studii Zhang et al. (2019) byly použity sekvence ITS2 a trnH-psbA pro analýzu 91 vzorků jednodruhového koření u 16 druhů, přičemž 42,9 % vzorků bylo zfalšováno, tedy obsahovaly přidané složky. Zejména to byly příbuzné druhy a druhy z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), např. ve vzorcích kurkumy (*Curcuma longa*) byla detekována kukuřice (*Zea mays*). Kombinací ITS2 a trnH-psbA bylo možné rozeznat všech 16 druhů koření od jejich znehodnocujících látek.

Nejdražším kořením na světě je šafrán. Je získáván sklízením stigmat šafránu setého (*Crocus sativus*). Villa et al. (2016) aplikovali metodu real-time PCR v kombinaci s HRM u markerů v oblastech ITS1, ITS2 a matK pro rozlišení *C. sativus* od příbuzných druhů a ověření jeho autenticity. ITS1 a matK markery se ukázaly jako specifické pro rod *Crocus* a ITS2 druhově specifický pro *C. sativus* a *C. carwrightianus*.

3.4.4 DNA barcoding ovoce

DNA barcoding je možné použít pro hodnocení autenticity čerstvého ovoce, ale i ovoce zpracovaného. Wu et al. (2018) použili sedm rostlinných barcodů (včetně rbcL, matK a psbA-trnH,) pro identifikaci produktů vyrobených z lesního ovoce. Kombinací rbcL, matK a psbA-trnH bylo možné rozpoznat sledované druhy v čerstvých i vysokou teplotou ošetřených ovocných šťávách. Dále provedli hodnocení správnosti složení uvedeného na obalu. Z 33 vzorků bylo nesprávně označeno 45,4 %. Zatímco všechny vzorky sušeného ovoce byly označeny správně, džemy a džusy často obsahovaly nedeklarované složky nebo neobsahovaly druhy uvedené ve složení. Nejčastějším substituentem byly plody révy vinné.

3.4.5 DNA barcoding ryb a mořských plodů

Zdravotní benefity konzumace ryb oproti jiným zdrojům bílkovin, zejména červenému masu, zvýšily poptávku po rybách (Maestri & Marmiroli 2016). Obchod s rybami se v posledních letech významně rozrůstá, světová produkce byla v roce 2018 odhadována na 178,8 milionů tun. S tímto rozvojem se zároveň zvyšuje i četnost případů falšování. Nesprávné označování ryb a produktů z ryb je obzvláště důležitým tématem, protože představuje nebezpečí pro lidské zdraví spojené s přítomností kontaminantů, jako například parazitů a alergenů. Pro identifikaci druhů ryb a mořských plodů mohou být použity morfologické druhově specifické znaky (velikost, tvar, barva apod.), ty ale většinou po zpracování nejsou rozpoznatelné a rozlišení druhů je potom problematické.

Pro identifikaci druhů ryb bylo testováno mnoho genetických markerů, z nichž nejpoužívanější jsou COI, cytochrom b a 16S rRNA (Fernandes et al. 2021). Barcodování pomocí COI umožnilo jasnou identifikaci všech druhů ryb, problematická byla pouze identifikace některých druhů slávek a koryšů (Harris et al. 2016). Barcode COI byl také úspěšně zkombinován s dalšími metodami, jako je HRM (Fernandes et al. 2021).

Přestože COI a cytochrom b jsou efektivní barcody pro identifikaci ryb a mořských plodů, mají svá omezení, například nedostatečnou variabilitu u blízce příbuzných druhů. Jako alternativa byly navrženy geny 12S rRNA a 16S rRNA (Wang et al. 2017; Shi et al. 2020).

Faktorem limitujícím analýzu pomocí DNA barcodingu může být zpracování daného rybího produktu. Během zpracování dochází k degradaci DNA, a navíc se do těchto produktů často přidávají konzervanty, barviva apod., které mohou ovlivnit kvalitu a kvantitu extrahované DNA. Shokralla et al. (2015) provedli studii 44 vysoce zpracovaných produktů v různých baleních (konzervy, sklenice apod.) z nichž pouze 9 (20,5 %) bylo možné identifikovat s pomocí standartních COI barcodů, pravděpodobně právě z důvodu degradace DNA během zpracování. Naproti tomu, 41 vzorků z 44 bylo možno osekvenovat s pomocí mini-barcode primerů.

3.4.6 DNA barcoding mléka a mléčných výrobků

Další potenciální oblastí pro uplatnění DNA barcodingu je mléko a mléčné výrobky. Přestože nejsou studie, které by se zabývaly původem mléka s využitím DNA barcodingu, je několik studií, které se zabývají analýzou mikrobioty v mléčných výrobcích. Zago et al. (2021) například analyzovali mikrobiologické složení sýru Grana Padano s chráněným označením původu v porovnání s podobnými tvrdými sýry. Celkem 168 vzorků podrobili metabarcodingu sekvenací úseku 16S rRNA a uvádí, že tato metoda by potenciálně mohla

napomáhat autentizaci těchto výrobků. Podobné studie byly provedeny i na vzorcích jogurtu, sýru cottage a majonézy (Syromyatnikov et al. 2018) a dalších druhů sýra (Raymond-Fleury et al. 2022). Dále je také možné DNA barcoding použít k detekci rostlinných olejů v mléce a přepuštěném másle (Uncu & Uncu 2020).

4 Závěr

Metoda DNA barcodingu se od svého vzniku v roce 2003 stala spolehlivou metodou pro kontrolu kvality a odhalení falšování potravin. Dnes je nejčastěji využívána společně s novými metodami sekvenování, které výrazně snižují cenu a čas analýzy a umožňují identifikaci druhů ve smíšených vzorcích. Lze ji kombinovat i s dalšími metodami, jako je například HRM. V potravinářském průmyslu má širokou škálu využití, především v odhalení záměny biologických druhů v potravinách živočišného i rostlinného původu. Nejvýznamněji limitovanou oblastí jsou pro DNA barcoding vysoce zpracované potraviny, ze kterých je obtížnější získat kvalitní DNA, ale s pomocí vhodně zvolené metody extrakce je možné identifikovat biologický druh téměř ze všech druhů potravin.

5 Literatura

- Ali N, Rampazzo RDCP, Costa ADT, Krieger MA. 2017. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International* (e9306564) DOI: 10.1155/2017/9306564.
- Almeida AM, Eusébio D, Queiroz JA, Sousa F, Sousa A. 2020. The use of size-exclusion chromatography in the isolation of supercoiled minicircle DNA from *Escherichia coli* lysate. *Journal of Chromatography A* (e460444) DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460444.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**:3389–3402.
- Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. 2009. Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science* **83**:165–174.
- Barrett RDH, Hebert PDN. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* **83**:481–491.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods* **10**:57–59.
- Boldsystems. 2014. Databases. Available from <https://www.boldsystems.org/index.php> (accessed April 15, 2023).
- Bragg LM, Stone G, Butler MK, Hugenholtz P, Tyson GW. 2013. Shining a Light on Dark Sequencing: Characterising Errors in Ion Torrent PGM Data. *PLoS Computational Biology* (e1003031) DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003031.
- Bruno A, Sandionigi A, Agostinetto G, Bernabovi L, Frigerio J, Casiraghi M, Labra M. 2019. Food tracking perspective: Dna metabarcoding to identify plant composition in complex and processed food products. *Genes* (e248) DOI: 10.3390/genes10030248.
- Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:5695–5699.

- Cheng X, Su X, Chen X, Zhao H, Bo C, Xu J, Bai H, Ning K. 2014. Biological ingredient analysis of traditional Chinese medicine preparation based on high-throughput sequencing: the story for Liuwei Dihuang Wan. *Scientific Reports* (e5147) DOI: 10.1038/srep05147.
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* **20**:1717–1723.
- Čížková H., Ševčík R., Rajchl L., Pivoňka J., Voldřich M. 2012. Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické listy* **106**:903–910. Available from <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/830> (accessed June 28, 2022).
- Cohen NJ et al. 2009. Public health response to puffer fish (Tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product. *Journal of Food Protection* **72**:810–817.
- Costa J, Mafra I, Oliveira MBPP. 2012. Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. *Trends in Food Science and Technology* **26**:43–55.
- D'Amato ME, Alechine E, Cloete KW, Davison S, Corach D. 2013. Where is the game? Wild meat products authentication in South Africa: A case study. *Investigative Genetics* DOI: 10.1186/2041-2223-4-6.
- DawanS J, Ahn J. 2022. Application of DNA barcoding for ensuring food safety and quality. *Food Science and Biotechnology* **31**:1355–1364.
- Eren K, Taktakoglu N, Pirim I. 2022. DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *The Eurasian Journal of Medicine* **54**:47–56.
- Evans JP, Skrzynia C, Burke W. 2001. The complexities of predictive genetic testing. *British Medical Journal* **322**:1052–1056.
- Evropská komise. 2002. FishTrace. Available from <https://fishtrace.jrc.ec.europa.eu/> (accessed April 15, 2023).
- Fernandes TJR, Amaral JS, Mafra I. 2021. DNA barcode markers applied to seafood authentication: an updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **61**:3904-3935.
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. 2012. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **28**:3150–3152.
- Galimberti A, De Mattia F, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, Martellos S, Labra M. 2013. DNA barcoding as a new tool for food traceability **50**:55-63.

- Ganopoulos I, Bazakos C, Madesis P, Kalaitzis P, Tsaftaris A. 2013. Barcode DNA high-resolution melting (Bar-HRM) analysis as a novel close-tubed and accurate tool for olive oil forensic use. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**:2281–2286.
- Ganopoulos I, Madesis P, Darzentas N, Argiriou A, Tsaftaris A. 2012. Barcode High Resolution Melting (Bar-HRM) analysis for detection and quantification of PDO “fava Santorinis” (*Lathyrus clymenum*) adulterants. *Food Chemistry* **133**:505–512.
- Gao Z, Liu Y, Wang X, Wei X, Han J. 2019. DNA Mini-Barcoding: A Derived Barcoding Method for Herbal Molecular Identification. *Frontiers in Plant Science* (e987) DOI: 10.3389/fpls.2019.00987.
- Giles RJ, Brown TA. 2008. Improved methodology for extraction and amplification of DNA from single grains of charred wheat. *Journal of Archaeological Science* **35**:2585–2588.
- Green MR, Sambrook J. 2018. The basic polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols* (e95117) DOI: 10.1101/pdb.prot095117.
- Griffiths L, Chacon-Cortes D. 2014. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* **2**:1-9.
- Gupta N. 2019. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology* **36**:116–117.
- Harris DJ, Rosado D, Xavier R. 2016. DNA Barcoding Reveals Extensive Mislabeling in Seafood Sold in Portuguese Supermarkets. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **25**:1375–1380.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**:313–321.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* (e312) DOI: 10.1371/journal.pbio.0020312.
- Hellberg RS, Pollack SJ, Hanner RH. 2016. Seafood Species Identification Using DNA Sequencing. Pages 113–132 *Seafood Authenticity and Traceability: A DNA-based Perspective*. Elsevier Inc., Orange.
- Hilu KW, Liang H. 1997. The matK gene sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany* **84**:830–839.
- Illumina Inc. 2018. Illumina. Available from <https://www.illumina.com/> (accessed March 15, 2023).
- Kopřiva P. 2015. Falšování potravin – aktuální problém? Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/> (accessed August 25, 2022).

- Kress WJ. 2017. Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *Journal of Systematics and Evolution* **55**:291–307.
- Kress WJ, Erickson DL. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS ONE* (e508) DOI: 10.1371/journal.pone.0000508.
- Kumar G, Kocour M. 2017. Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review. *Fisheries Research* **186**:11–22.
- Kumar S, Kahlon T, Chaudhary S. 2011. A rapid screening for adulterants in olive oil using DNA barcodes. *Food Chemistry* **127**:1335–1341.
- Lander ES et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860–921.
- Maestri E, Marmiroli N. 2016. Advances in polymerase chain reaction technologies for food authenticity testing. Pages 285–309 *Advances in Food Authenticity Testing*, Belgrade.
- Mafra I, Silva SA, Moreira EJMO, da Silva CSF, Beatriz M, Oliveira PP. 2008. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control* **19**:1183–1190.
- Maxam AM, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**:560–564.
- Montgomery H, Haughey SA, Elliott CT. 2020. Recent food safety and fraud issues within the dairy supply chain (2015–2019). *Global Food Security* DOI: 10.1016/j.gfs.2020.100447.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335–350.
- Nagy ZT, Sonet G, Glaw F, Vences M. 2012. First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of madagascar, based on newly designed COI primers. *PLoS ONE* (e34506) DOI: 10.1371/journal.pone.0034506.
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* **439**:231–250.
- NCBI. 2023. National Center for Biotechnology Information. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed April 15, 2023).
- Nehal N, Choudhary B, Nagpure A, Gupta RK. 2021. DNA barcoding: a modern age tool for detection of adulteration in food. *Critical Reviews in Biotechnology* **41**:767–791.
- Otová B, Mihalová R. 2013. *Základy Biologie a Genetiky Člověka*. Karolinum Press, Praha.

- Pervez MT, Hasnain MJU, Abbas SH, Moustafa MF, Aslam N, Shah SSM. 2022. A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *BioMed Research International* (e3457806) DOI: 10.1155/2022/3457806.
- Pinto A Di, Forte VT, Guastadisegni MC, Martino C, Schena FP, Tantillo G. 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control* **18**:76–80.
- Piskata Z, Pospisilova E, Borilova G. 2017. Comparative study of DNA extraction methods from fresh and processed yellowfin tuna muscle tissue. *International Journal of Food Properties* **20**:5430–5443.
- Rasmussen Hellberg RS, Morrissey MT. 2011. Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. *Journal of Laboratory Automation* **16**:308–321.
- Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding. *Molecular Ecology Notes* **7**:355–364.
- Raymond-Fleury A, Lessard MH, Chamberland J, Pouliot Y, Dugat-Bony E, Turgeon SL, St-Gelais D, Labrie S. 2022. Analysis of Microbiota Persistence in Quebec’s Terroir Cheese Using a Metabarcoding Approach. *Microorganisms* **10**:1381.
- Reynolds R, Sensabaugh G, Blake E. 1991. Analysis of Genetic Markers in Forensic DNA Samples Using the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry* **63**:2–15.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**:154–160.
- Saiyed ZM, Ramchand CN. 2007. Extraction of genomic DNA using magnetic nanoparticles (Fe₃O₄) as a solid-phase support. *American Journal of Infectious Diseases* **3**:225–229.
- Sajali N, Wong SC, Hanapi UK, Abu Bakar @ Jamaluddin S, Tasrip NA, Mohd Desa MN. 2018. The Challenges of DNA Extraction in Different Assorted Food Matrices: A Review. *Journal of Food Science* **83**:2409–2414.
- Salihah NT, Hossain MM, Lubis H, Ahmed MU. 2016. Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Science and Technology* **53**:2196–2209.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**:5463–5467.

- Sarri C, Stamatis C, Sarafidou T, Galara I, Godosopoulos V, Kolovos M, Liakou C, Tastsoglou S, Mamuris Z. 2014. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control* **43**:35–41.
- Schirmer M, Ijaz UZ, D'Amore R, Hall N, Sloan WT, Quince C. 2015. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Research* (e37) DOI: 10.1093/nar/gku1341.
- Shendure J, Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **26**:1135–1145.
- Shetty PJ. 2020. The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research* DOI: 10.34297/ajbsr.2020.08.001234.
- Shi R, Xiong X, Huang M, Xu W, Li Y, Cao M, Xiong X. 2020. High resolution melting (HRM) analysis of a 12S rRNA mini barcode as a novel approach for codfish species authentication in processed fish products. *European Food Research and Technology* **246**:891–899.
- Shneyer VS, Rodionov A V. 2019. Plant DNA Barcodes. *Biology Bulletin Reviews* **9**:295–300.
- Shokralla S, Hellberg RS, Handy SM, King I, Hajibabaei M. 2015. A DNA Mini-Barcoding System for Authentication of Processed Fish Products. *Scientific Reports* DOI: 10.1038/srep15894.
- Speranskaya AS, Khafizov K, Ayginin AA, Krinitsina AA, Omelchenko DO, Nilova M V., Severova EE, Samokhina EN, Shipulin GA, Logacheva MD. 2018. Comparative analysis of Illumina and Ion Torrent high-throughput sequencing platforms for identification of plant components in herbal teas. *Food Control* **93**:315–324.
- Spink J, Ortega DL, Chen C, Wu F. 2017. Food fraud prevention shifts the food risk focus to vulnerability. *Trends in Food Science and Technology* **62**:215–220.
- Staats M, Arulandhu AJ, Gravendeel B, Holst-Jensen A, Scholtens I, Peelen T, Prins TW, Kok E. 2016. Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408**:4615–4630.
- Stoeckle MY, Gamble CC, Kirpekar R, Young G, Ahmed S, Little DP. 2011. Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. *Scientific Reports* DOI: 10.1038/srep00042.
- Syromyatnikov MY, Kokina A V, Savinkova O V, Panevina A V, Solodskikh SA, Orlova M V, Grabovich MY, Starkov AA, Popov VN. 2018. Study of the microbiological composition of dairy products and mayonnaise using dna barcoding and metabarcoding. *Foods and Raw Materials* **6**:144–153.

- Thermo Fisher Scientific. 2020. Ion Torrent Next-Generation Sequencing. Available from <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html> (accessed April 4, 2023).
- Tillmar AO, Dell'Amico B, Welander J, Holmlund G. 2013. A universal method for species identification of mammals utilizing next generation sequencing for the analysis of DNA mixtures. *PLoS ONE* (e83761) DOI: 10.1371/journal.pone.0083761.
- Uncu AO, Uncu AT. 2020. A barcode-DNA analysis method for the identification of plant oil adulteration in milk and dairy products. *Food Chemistry*
DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126986.
- Uncu AT, Uncu AO, Frary A, Doganlar S. 2017. Barcode DNA length polymorphisms vs fatty acid profiling for adulteration detection in olive oil. *Food Chemistry* **221**:1026–1033.
- Valentini P, Galimberti A, Mezzasalma V, De Mattia F, Casiraghi M, Labra M, Pompa PP. 2017. DNA Barcoding Meets Nanotechnology: Development of a Universal Colorimetric Test for Food Authentication. *Angewandte Chemie – International Edition* **56**:8094–8098.
- Verma K, Dalal J, Sharma S. 2014. Scientific concepts of polymerase chain reaction (PCR). Article in *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **5**:3086–3095.
- Villa C, Costa J, Meira L, Oliveira MBPP, Mafra I. 2016. Exploiting DNA mini-barcodes as molecular markers to authenticate saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Control* **65**:21–31.
- Visciano P, Schirone M. 2021. Food frauds: Global incidents and misleading situations. *Trends in Food Science and Technology* **114**:424–442.
- Wang HY, Dong CA, Lin HC. 2017. DNA barcoding of fisheries catch to reveal composition and distribution of cutlassfishes along the Taiwan coast. *Fisheries Research* **187**:103–109.
- Ward RD. 2012. FISH-BOL, A case study for DNA barcodes. *Methods in Molecular Biology* **858**:423–439.
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* **74**:329–356.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN, B PTRS. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B* **360**:1847–1857.
- Weier HUG. 2012. *Bioinformatics for High Throughput Sequencing*. Springer Science+Business Media, New York.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 2013. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques* **54**:130–138.

- Woodard DL, Howard AJ, Down JA, of Assignee all N. 1993. United States Patent 19) Process for purifying DNA on hydrated silica. 5342931. The United States Patent and Trademark Office, USA.
- Wu Y, Li M, Yang Y, Jiang L, Liu M, Wang B, Wang Y. 2018. Authentication of Small Berry Fruit in Fruit Products by DNA Barcoding Method. *Journal of Food Science* **83**:1494–1504.
- Yang F, Ding F, Chen H, He M, Zhu S, Ma X, Jiang L, Li H. 2018, April 22. DNA Barcoding for the Identification and Authentication of Animal Species in Traditional Medicine. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2018**:1–18.
- Zago M, Rossetti L, Bardelli T, Carminati D, Nazzicari N, Giraffa G. 2021. Bacterial community of grana padano PDO cheese and generical hard cheeses: DNA metabarcoding and DNA metafingerprinting analysis to assess similarities and differences. *Foods* **10**:1826.
- Zhang M, Shi Y, Sun W, Wu L, Xiong C, Zhu Z, Zhao H, Zhang B, Wang C, Liu X. 2019. An efficient DNA barcoding based method for the authentication and adulteration detection of the powdered natural spices. *Food Control* (e127010) DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127010.

6 Seznam použitých zkratek

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	pár bází
C	cytosin
COI	podjednotka I cytochrom oxidázy
CTAB	Cetyltrimethylamoniumbromidová metoda extrakce DNA
cytb	cytochrom b
ddNTP	2',3'-dideoxynukleosidtrifosfát
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EU	Evropská unie
G	guanin
HRM	vysokorozlišovací analýza křivek tání (z angl. high resolution melting curve analysis)
ITS	vnitřní přepisovaný mezerník (z angl. Internal transcribed spacer)
matK	maturáza K
NGS	metody nové generace (z angl. next generation sequencing)
OTU	operační taxonomická jednotka (z angl. operational taxonomic unit)
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní PCR
rbcL	velká podjednotka enzymu rubisco
Tris-EDTA	tris(hydroxymethyl)aminomethan- ethylendiaminotetraoctová kyselina

7 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Princip metody PCR.....	17
Obrázek 2: Hairpin loop (vlásenka).....	18
Obrázek 3: Autoradiograf akrylamidového gelu	21
Obrázek 4: Základní princip přípravy knihovny a sekvenování pomocí technologie Illumina	24
Tabulka 1: Srovnání generací sekvenování	22
Tabulka 2: Srovnání momentálně dostupných sekvenačních platforem Illumina	23