

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: B4106 Zemědělská specializace  
Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů  
Katedra: Katedra biologických disciplín  
Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

Bakalářská práce

**Možnosti využití molekulárních markerů k identifikaci komodit  
podléhajících úmluvě CITES**

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.  
Konzultant diplomové práce: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Bc. Veronika Myšková

České Budějovice, 2015

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika MYŠKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z11705**  
Studijní program: **B4106 Zemědělská specializace**  
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**  
Název tématu: **Možnosti využití molekulárních markerů k identifikaci komodit  
podléhajících úmluvě CITES.**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických disciplin**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznámení se studovanou problematikou, význam a využití.
2. Zpracování podrobné literární rešerše k problematice detekce rostlinného a živočišného materiálu podléhající úmluvě o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (CITES), pomocí DNA technologií.
3. Sestavit ucelený přehled o dostupných molekulárně-genetických technikách používaných při prokazování přítomnosti/nepřítomnosti organismu (či produktu) podléhajícího úmluvě CITES.
4. Přehledné shrnutí získaných poznatků, doporučení vyplývající ze získaných informací.

Rozsah grafických prací: 3 - 5 stran  
Rozsah pracovní zprávy: 25 - 40  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná  
Seznam odborné literatury:

Alacs, E.A., Georges, A., FitzSimmons, N.N., Robertson, J. (2010): DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensic. Forensic Sci Med Pathol. DOI 10.1007/s12024-009-9131-7

Baker, C.S., Steel, D., Choi, Y., Lee, H., Kim, K.S., Choi, S.K., Ma, Y-U., Hambleton, C., Psihoyos, L., Brownell, R.L., Funahashi, N. (2010): Genetic evidence of illegal trade in protected whales links Japan with the US and South Korea. Biol. Lett. DOI:10.1098/rsbl.2010.0239

Gentile, G., Ciambotta, M., Tapia, W. (2013): Illegal wildlife trade in Galápagos: molecular tools help the taxonomic identification of confiscated iguanas and guide their rapid repatriation. Conservation Genet Resour 5:867-872

Lammers, Y., Peelen, T., Vos R.A., Gravendeel, B. (2014): The HTS barcode checker pipeline, a tool for automated detection of illegally traded species from high-throughput sequencing data. BMC Bioinformatics 15:44, 1-8.


Oliveira, R., Castro, D., Godinho, R. (2009): Species identification using a small nuclear gene fragment: application to sympatric wild carnivores from South-western Europe. Conserv Genet. DOI 10.1007/s10592-009-9947-4

Wozney, K.M., Wilson, P.J. (2012): Real-time PCR detection and quantification of elephantid DNA: Species identification for highly processed samples associated with the ivory trade. Forensic Science International 219:1-3,106-112.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.**  
Katedra rostlinné výroby a agroekologie  
Konzultant bakalářské práce: **doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.**  
Katedra biologických disciplin  
Datum zadání bakalářské práce: **14. května 2014**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2015**

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUĎEJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

  
doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. května 2014

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 22. 4. 2015

.....

podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Ing. Lence Havlíčkové Ph.D. za vhled do tajů molekulární biologie, který mi poskytla.

Největší dík pak patří muži mého života, který je mi vždy oporou a dodává mi sebevědomí i tehdy, kdy já ho jen těžko hledám. A v neposlední řadě děkuji své rodině za nemalou finanční podporu, lásku a trpělivost.

## **Abstrakt**

Tato práce se zaměřuje primárně na možnosti využití molekulárních markerů k identifikaci komodit podléhajícím úmluvě CITES. Nelegální obchod s těmito artikly je běžný i v České republice. Přehled nejvyžívanějších metod by mohl usnadnit boj s tímto druhem kriminality. Molekulární markery jsou ideální pro identifikaci druhu a jiných taxonomických jednotek, protože na rozdíl od morfologické identifikace nevyžadují neporušené vzorky. DNA lze získat z vysoce zpracovaných a degradovaných produktů, které se běžně vyskytují na trhu.

**Klíčová slova:** CITES, wildlife crime, identifikace, DNA, PCR, amplifikace, marker

## **Abstract**

This thesis is focused primarily on the possibilities of using molecular markers to identify the commodities subject to CITES. Illegal trade with these articles is common even in the Czech Republic. Overview the most used methods could facilitate the fight against this kind of crime. Molecular markers are ideal for the identification of species and other taxonomic units, because unlike the morphological identification does not require intact specimens. DNA can be extracted from highly processed and degraded products which are commonly found on the market.

**Key words:** CITES, wildlife crime, identification, DNA, PCR, amplification, marker

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Situace v České republice .....	11
2.1	Legislativa a kontrola zajišťující dodržování CITES v ČR .....	11
2.2	Nelegální obchod s exempláři uvedených v přílohách CITES v ČR .....	14
2.2.1	Rok 2010.....	16
2.2.2	Rok 2011 .....	17
2.2.3	Rok 2012.....	18
2.2.4	Rok 2013.....	19
2.2.5	Rok 2014.....	21
3	Metody determinace komodit nevyužívající molekulární techniky .....	23
3.1	Determinace na základě morfologických znaků .....	23
3.1.1	Využití muzejních sbírek .....	23
3.1.2	Osteologie .....	24
3.1.3	Determinace ptačích vajec .....	24
3.1.4	Určování výrobků z kůže plazů.....	25
3.1.5	Determinace rostlin na základě vegetativních znaků apod. ....	26
3.2	Determinace pomocí mikroskopie .....	27
3.2.1	Trichologie a determinace peří .....	28
3.2.2	Determinace dřeva .....	29
3.3	Determinace pomocí chemické analýzy.....	29
3.3.1	Toxikologie .....	29
3.3.2	Radioaktivní datování .....	30
3.4	Forenzní entomologie a parazitologie.....	31
4	Molekulární metody determinace organismů.....	32
4.1	Základní členění technik molekulárních markerů.....	33
4.1.1	Techniky založené na restričním štěpení a hybridizaci bez použití PCR.....	35
4.1.2	Techniky založené na principu polymerázové řetězové reakce (PCR).....	36
4.2	Konkrétní aplikace molekulárních markerů ve <i>wildlife crime</i> .....	47
4.2.1	Identifikace druhu .....	47
4.2.2	Identifikace geografického původu.....	54
4.2.3	Individuální identifikace .....	55
4.2.4	Určování příbuznosti.....	56
5	Diskuse.....	58
6	Závěr .....	61
7	Literatura a použité internetové zdroje: .....	62

## 1 Úvod

Naše planeta pro nás představuje zdroj všeho, co je pro naši existenci nezbytné. Najdeme zde vodu, vzduch, půdu, sluneční světlo a mnoho dalšího, co člověk ke svému životu více či méně potřebuje. Disponuje nepřeberným bohatstvím organismů od nejnižších až po ty nám nejpodobnější. Člověk se naučil je využívat stejně tak jako všechny ostatní „zdroje“. Jen stěží bychom dnešního pokroku dosáhli bez prvních ochočených zvířat, ať máme na mysli zvířata hospodářská nebo např. nepostradatelného psa domácího (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus 1758). Dnes je ale situace poněkud odlišná. Většinu zdrojů drancujeme neuváženým způsobem bez ohledu na budoucí generace. Se vzácnými druhy manipulujeme jako se zbožím za účelem zisku, aniž bychom zauvažovali nad tím, jaký dopad to může mít na životní prostředí i na nás samotné. Již teď některé druhy vidáme pouze v zoologických a botanických zahradách, zanedlouho je můžeme znát už jen z encyklopedií. Tato hrozba dala vzniknout největší mnohostranné dohodě o ochraně druhů regulující mezinárodní obchod s více než 30.000 druhy rostlin a živočichů prostřednictvím systému povolení.

Vědomí, že mezinárodní obchod může představovat rostoucí hrozbu pro mnoho druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin podnítilo konání konference vládních činitelů v roce 1973 ve Washingtonu, která vyústila ve vznik úmluvy CITES (Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin, jež nabyla platnosti v roce 1975). Jejím cílem je regulace obchodu s vybranými druhy a jejich deriváty přes hranice států tak, aby to bylo v souladu se zásadou trvale udržitelného rozvoje. Druhy jsou uvedeny v přílohách, na základě kterých jsou na různých úrovních prováděny obchodní kontroly (viz tabulka 1). Přílohy I, II a III v zásadě odpovídají dodatkům v evropském Wildlife Trade nařízení č. 338/97, jehož prostřednictvím je tato úmluva také realizována v rámci Evropské unie (Cooper a Rosser, 2002).



**Tabulka 1:** Znění jednotlivých příloh úmluvy CITES (<http://www.cites.org/>)

<b>PŘÍLOHA</b>	<b>ZNĚNÍ</b>
<b>I</b>	Zahrnuje všechny druhy ohrožené vyhynutím, které jsou nebo mohou být obchodem nepříznivě ovlivňovány. Obchod s exempláři těchto druhů musí být předmětem zvlášť přísných opatření, aby nebylo ohroženo jejich přežití, a povolen je pouze ve výjimečných případech.
<b>II</b>	Zahrnuje všechny druhy, které nejsou bezprostředně ohroženy vyhubením, ale tato situace může nastat, pokud obchod s exempláři těchto druhů nepodléhá přísné regulaci, aby nebyly využívány způsobem neslučitelným s jejich přežitím.
<b>III</b>	Zahrnuje všechny druhy, které jakákoliv smluvní strana identifikuje jako podléhající regulaci v rámci své jurisdikce za účelem zabránění nebo omezení využívání. Při kontrole obchodu je nutná spolupráce ostatních smluvních stran.

Při odhalení nelegálního obchodu s druhy nemusí být ale vždy jednoduché je určit a s jistotou tak prokázat, že jsou zahrnuty v úmluvě CITES. Obchod se netýká totiž pouze živých či neživých exemplářů snadno identifikovatelných podle viditelných morfologických znaků. Zmínit můžeme např. výrobky tradiční asijské a

orientální medicíny, jako jsou různé směsi bylin nebo samostatné části živočišných těl (oddělené rohy, kůže, kosti, žlučníky apod.). V takovýchto případech je vizuální identifikace velice obtížná ba dokonce nemožná. V posledních letech se tedy hledají jiné způsoby, jak jednotlivé organismy nebo jejich části s jistotou určovat.

V této práci se zaměřuji na identifikaci rostlinného a živočišného materiálu podléhající úmluvě CITES pomocí DNA technologií. Téma jsem zvolila jako zajímavé a přínosné již z toho důvodu, že i přes velikost České republiky je zde nelegální obchod s těmito artikly poměrně běžný (viz Kapitola 2) a znalost DNA technologií může zjednodušit a zefektivnit práci mnoha orgánů a činitelů zabývajících se touto problematikou. Metody navíc nemusí nalézt uplatnění pouze v tomto konkrétním sektoru. Význam mají i pro vědeckou veřejnost, jelikož mnoho druhů si je morfologicky velmi podobných a mohou být vzájemně zaměňovány. Jako příklad můžeme uvést rejnoka hladkého (*Dipturus batis*, Linnaeus 1758), u kterého došlo v posledních letech k dramatickým poklesům v populacích, jelikož byl nesprávně označován za druh jiný, a až molekulární analýzy prokázaly dva zřetelně odlišné klady<sup>1</sup>(Griffiths a kol., 2010). Taktéž využití např. při detekci falšování zemědělských komodit a rostlinných potravin (včetně koření) není zanedbatelné (Dhanya a Sasikumar, 2010).

**Cíl práce:** Vypracovat podrobnou literární rešerši k problematice detekce rostlinného a živočišného materiálu podléhající úmluvě o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (CITES) pomocí DNA technologií.

---

<sup>1</sup> označení pro monofyletickou vývojovou větev zahrnující společného předka a všechny z něho vzešlé potomky.

## 2 Situace v České republice

### 2.1 Legislativa a kontrola zajišťující dodržování CITES v ČR

V otázce CITES Česká republika postupuje podle nařízení (ES) č. 338/97 a podle dalších předpisů. Základním z nich je samozřejmě již výše zmíněná Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin. Dále můžeme zmínit zákon č. 100/2004 Sb. o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi a dalších opatřeních k ochraně těchto druhů a o změně některých zákonů (zákon o obchodování s ohroženými druhy), ve znění pozdějších předpisů, Zákon č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů a jiné. Podrobněji zmiňuji v Tab. 2.

**Tabulka 2:** Přehled nejdůležitějších legislativních předpisů ČR ve věci CITES, stav ke dni 5. 2. 2015 (MŽP, 2015)

NÁZEV PŘEDPISU	Č. CELEX *)	POZNÁMKA
Úmluva o mezinárodním obchodu ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin	21973A0303(01)	Úřední věstník L 384, 31/12/1982 str. 7 -54; zvláštní vydání v českém jazyce 2004, kapitola 11, svazek 15, str. 48-9
nařízení Rady (ES) č. 338/97 ze dne 9. prosince 1996 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi (ve znění podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 398/2009)	31997R0338	Úřední věstník L 61, 03/03/1997 str. 1- 18; zvláštní vydání i v českém jazyce 2004, kapitola 15, svazek 03, str. 136- 150, „nařízení Rady“- základní předpis;- novelizováno 32009R0398 (čl. 4, 5, 7, 15, 18, 19 a 21)- přílohy A až D se seznamy chráněných druhů byly již několikrát novelizovány

<b>Nařízení Komise (EU) č.1320/2014 ze dne 1. prosince 2014, kterým se mění nařízení Rady (ES) č. 338/97 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi</b>	32014R1320	Úřední věstník L361, 17/12/2014, str. 1- 93, - kompletní novela příloh A, B, C a D k nařízení Rady (ES) č. 338/97 se seznamy chráněných druhů živočichů a rostlin -platnost od 20. 12. 2014 -nahradilo předchozí 32013R0750
<b>Nařízení Komise (ES) č.865/2006 ze dne 4. května 2006 o prováděcích pravidlech k nařízení Rady (ES) č. 338/97 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi</b>	32006R0865	Úřední věstník L166,19/06/2006 str. 1-69 -„nařízení Komise“ -hlavní prováděcí předpis -platnost od 9. 7. 2006 -nahradilo předchozí 32001R1808 -novelizováno 32008R0100 -novelizováno 32012R0791 -novelizováno 32012R0792
<b>Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 888/2014 ze dne 14. srpna 2014 o zákazu dovozu exemplářů některých druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin do Unie</b>	32014R0888	Úřední věstník L 243,15.8.2014 str. 21-38 -„zákazové nařízení“ seznam druhů z příloh A a B, jejichž dovoz do EU je zakázán podle čl. 4 odst. 6 nařízení č. 338/97; -platnost od 4. 9. 2014; -nahradilo předchozí 32013R0578

Kontrolním orgánem ve věci CITES je podle zákona č. 100/2004 Sb. Česká inspekce životního prostředí (ČIŽP), která je rozdělena na hlavní ředitelství sídlící v Praze a deset oblastních inspektorátů (Praha, Brno, Plzeň, České Budějovice, Ústí n. L., Liberec, Hradec Králové, Havlíčkův Brod, Olomouc a Ostrava). V roce 2003 se zde CITES stal samostatným útvarům, který se věnuje pouze problematice ochrany ohrožených obchodovaných druhů živočichů a rostlin. V současné době je zde zaměstnáno sedm inspektorů, kteří zajišťují provoz detašovaného pracoviště na

mezinárodním letišti Václava Havla Praha, provádějí kontroly na vyclívací poště v hlavním městě, věnují se mezinárodní spolupráci a také poskytují odborný a metodický servis ostatním inspektorům. Inspekce provádí ročně celkem cca 700 – 900 kontrol v oblasti této problematiky (Kučera a kol., 2010).

Dalšími neméně důležitými orgány, které jsou dle nařízení (ES) č. 338/97 a zákona č. 100/2004 Sb. také oprávněny provádět kontrolu exemplářů při celním dohledu v okamžiku dovozu, vývozu, zpětného vývozu a tranzitu jsou orgány celní. Ve spolupráci s veterinární správou nebo orgánem rostlinolékařské péče kontrolují, zda exemplář odpovídá údajům uvedeným na dokladech a stanoveným veterinárním a rostlinolékařským podmínkám. V době, kdy Česká republika nebyla ještě členem Evropské unie (EU), prováděly se kontroly i na pozemních hraničních přechodech. V rámci zavedení pravidel společného trhu EU byly však zrušeny a hlavní objem činnosti je tedy soustředěn na letiště Václava Havla Praha, kde nalezneme detašované pracoviště ČIŽP – oddělení kontroly CITES (Kučera a kol., 2010).

Dovozy a vývozy probíhají v jakoukoli denní či noční dobu, inspektoři drží pohotovost na daném telefonním čísle. Průměrně je ročně zaznamenáno cca 100 konzultací a 20 mimořádných výjezdů. Kontrolovány jsou u nás též chovatelská a pěstební zařízení, prodejny, sklady, výstavy, burzy aj. Inspekce spolupracuje s krajskými úřady, v jejichž kompetenci je registrace exemplářů a vydávání výjimek ze zákazu obchodování. K obtížným případům mohou být posléze přizvány celní orgány (skupiny mobilního dohledu nebo útvary pátrání, které mají v rámci trestního řízení některé pravomoci, jako policie) nebo policisté. Naopak inspektoři se účastní jako odborní konzultanti akcí vedených celními orgány či policií při jejich vyšetřování nezákonností proti chráněným druhům. Pro účely trestních řízení specializovaní inspektoři zpracovávají analýzy zajištěné dokumentace, posuzují zabavené exempláře apod. Při podezření na porušení zákona má ČIŽP právo exempláře živočichů či rostlin zadržet. Pokud se porušení prokáže, dojde k zabavení a je uložena pokuta (dle zákona č. 100/2004 Sb. ve znění novely č. 346/2009 Sb. až do výše 1 500 000,- Kč). Při výkonu své pracovní činnosti mohou inspektoři vstupovat do objektů, chovatelských či pěstebních zařízení, na pozemky, kontrolovat identifikační označení exemplářů, odebírat vzorky (např. pro zjišťování paternity analýzou DNA), zajišťovat doklady apod. (Kučera a kol., 2010).

Každoročně jsou stanoveny speciální prioritní úkoly, v rámci kterých se celorepublikově systematictěji řeší určité vytipované problémy. V posledních letech byla např. provedena kontrola všech orlů skalních chovaných na území ČR spojená s odběry vzorků pro DNA analýzy, detailnější pozornost byla věnována značení ptáků pomocí kroužků, byly kontrolovány sokolnické exhibice, celorepublikově byl mapován a kontrolován chov ocelotů, systematicky byly sledovány burzy exotických ptáků, byl průběžně monitorován český internetový obchod s ohroženými druhy atd. Celkem se v České republice ochraně ohrožených druhů věnuje cca 15 inspektorů, což se jeví na účinný boj s nelegálním obchodem jako zoufale nedostačující. Je proto nutné zapojovat i další represivní složky, tj. Celní správu ČR a Policii ČR, které disponují mnohem větším počtem zaměstnanců i účinnějšími pravomocemi. Tyto orgány činné v trestním řízení mají možnost vyšetřovat neoprávněné nakládání s ohroženými druhy živočichů a rostlin podle trestního zákona, za což hrozí odnětí svobody až na 8 let, peněžitý trest či zákaz činnosti. Nelegální obchod s ohroženými druhy je však bohužel stále považován za minoritní a nedůležitou problematiku vedle jiných druhů kriminality. Policii i celníkům také mnohdy chybí odborné zázemí a vybavení. Přesto jsou však snahy tento přístup změnit (Kučera a kol., 2010).

Velmi důležitá je též zahraniční spolupráce, jelikož tento typ kriminality nabývá mezinárodního charakteru. Česká republika má proto svého zástupce ve speciální skupině Interpolu pro vyšetřování kriminality týkající se ohrožených druhů (Interpol Wildlife Working Group), účastní se i jednání obdobné Skupiny pro prosazování CITES při Evropské Komisi (EU CITES Enforcement Group), aktivně se podílí na Celoevropském systému výměny informací o nelegálním obchodu s ohroženými druhy (EU-TWIX), o úspěšných zásazích vydává informační materiály „CITES news“ atd. (Kučera a kol., 2010).

## **2.2 Nelegální obchod s exempláři uvedených v přílohách CITES v ČR**

Mohlo by se zdát, že v České republice vzhledem k její velikosti a poloze, není nelegální obchod s ohroženými a vzácnými druhy velkým problémem. Nicméně opak je pravdou. I přes veškerá již zmíněná zákonná a kontrolní opatření se občané České republiky podílejí na tomto druhu kriminality.

Podle statistiky kontrolních orgánů EU je mezinárodní letiště Václava Havla Praha druhým letištěm v Evropě (první příčku zaujímá Schiphol v Amsterdamu) s

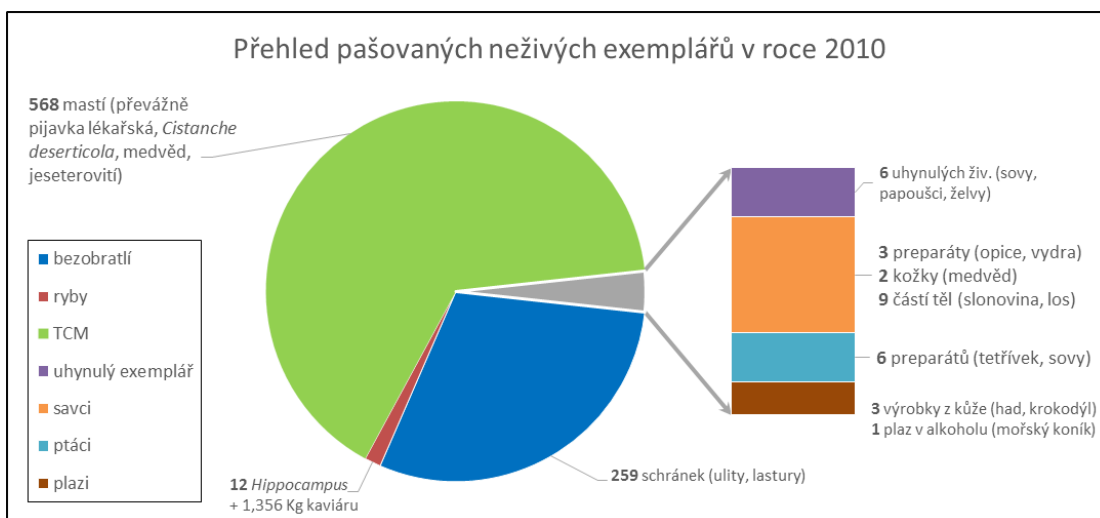
nejčastějšími záchyty nelegálně dovážených živočichů, rostlin či výrobků z nich (Kučera a kol., 2010). Čeští občané má taktéž již dlouhou dobu „dobré jméno“ ve světě nelegálního obchodu s exempláři CITES. Tuto skutečnost si můžeme demonstrovat na několika zprávách vyskytujících se v tisku. Např. již v roce 1997 lze nalézt tiskovou zprávu Ministerstva životního prostředí ČR o obvinění několika českých občanů v cizině v souvislosti s pašováním zvířat. Cituji: „Dne 26. září 1997 zadrželi holanští celníci na letišti Schiphol v Amsterdamu třiadvacetiletého českého občana a zabavili mu celkem 26 opiček (15 zvířat bylo již mrtvých), 15 kajmanů a 62 želv. Čech, který cestoval z Peru do České republiky, byl v Holandsku uvězněn a obviněn z porušování zákona CITES a trestného činu týrání zvířat.“ Dále: „Dne 18. září 1997 byl na letišti v Limě zadržen český turista z Ostrova nad Ohří, v jehož zavazadlech odhalila peruánská policie 13 živých opiček, jednoho tukana a 7 plazů. Zvířata byla zabalena do plastových pytlů a uspána omamnými látkami.“ (Lenz, 1997).

V roce 2009 se objevila tisková zpráva Celní správy České republiky informující o rozkrytí mezinárodní sítě pašeráků ohrožených ptáků, ve které byli zainteresováni i čeští občané. Cituji: „V rámci mezinárodní spolupráce s Federal Police Department, Head of enviromental Crimes Division, Brasilia, stát Brazílie, Celní správy České republiky a České inspekce životního prostředí začal v druhé polovině března 2009 zásah proti pašeráckému gangu, který se zabýval nelegálním dovozem ohrožených druhů živočichů uvedených v Úmluvě o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a rostlin (úmluva CITES). Hlavní organizátor pašování zvířat (Tomáš Novotný) byl zatčen v Brazílii. V Indonésii byl zadržen další z členů skupiny (Luděk Hovorka).“ V rámci tohoto šetření bylo orgány zabaveno celkem 9 exemplářů ohrožených druhů papoušků, kteří byli převezeni do záchranných center. Celková hodnota zajištěných exemplářů činila nejméně 550.000,- Kč (Barták, 2009).

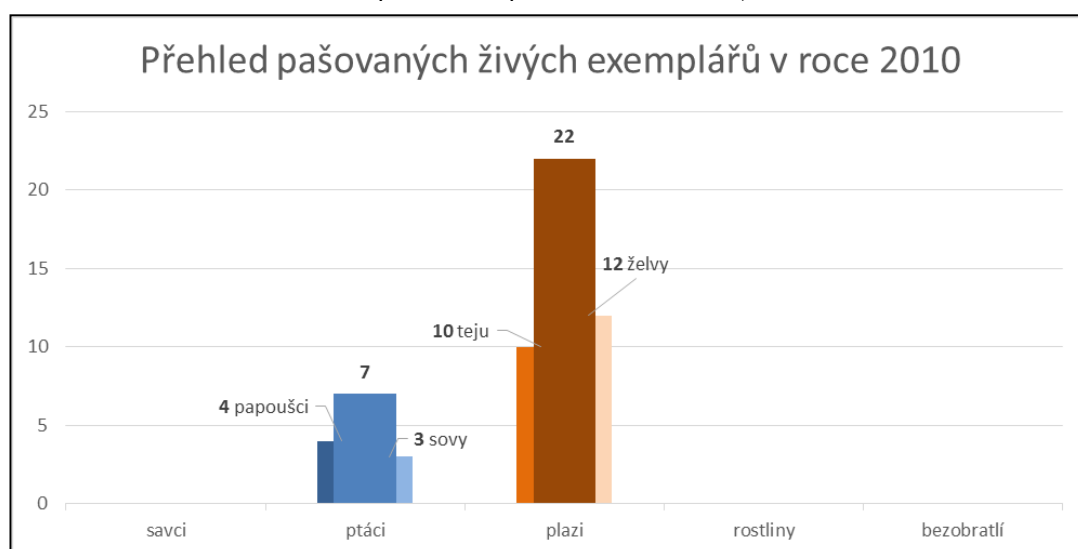
Tyto konkrétní případy zařazuji zejména pouze pro ilustraci, ve snaze ukázat, že tato problematika u nás rozhodně není žádnou „novinkou“. V rámci zachování aktuálnosti práce se nyní omezím na informace zveřejňované od roku 2010 do současnosti.

## 2.2.1 Rok 2010

V grafu 1 (Obr. č. 1) vidíme přehled pašovaných neživých exemplářů a graf 2 (Obr. č. 2) nám demonstruje exempláře živé.



**Obrázek č. 1:** Přehled pašovaných neživých exemplářů v roce 2010 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)



**Obrázek č. 2:** Přehled pašovaných živých exemplářů v roce 2010 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)

V tomto roce můžeme reflektovat několik významných záchytů. Např. v květnu bylo zadrženo 5 vzácných kakadu arových (*Probosciger aterrimus*, J. F. Gmelin 1788) nelegálně dovážených českým občanem z Ruska.

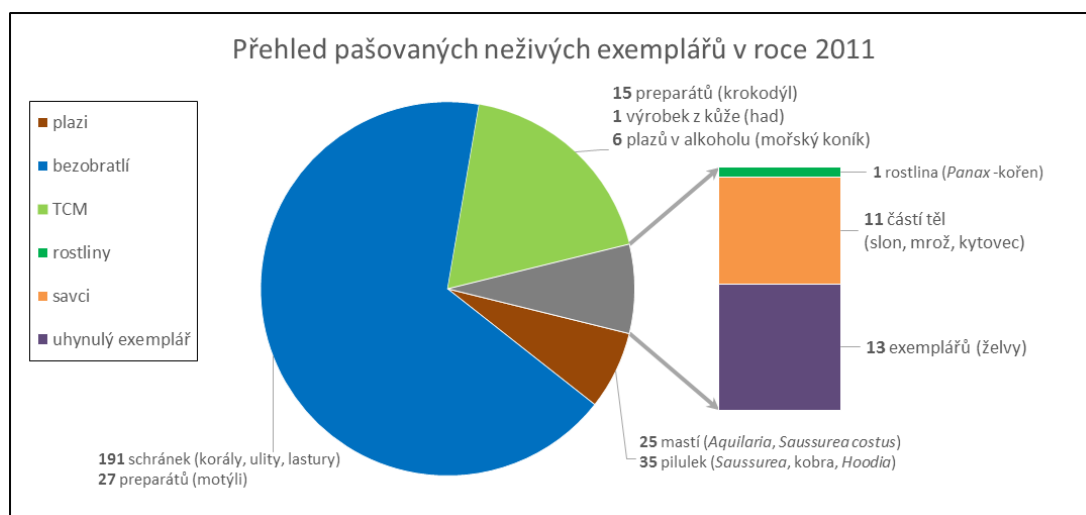
Zadrženi byli též čeští lovci přivážející ze Slovenska maso nelegálně ulovených medvědů.



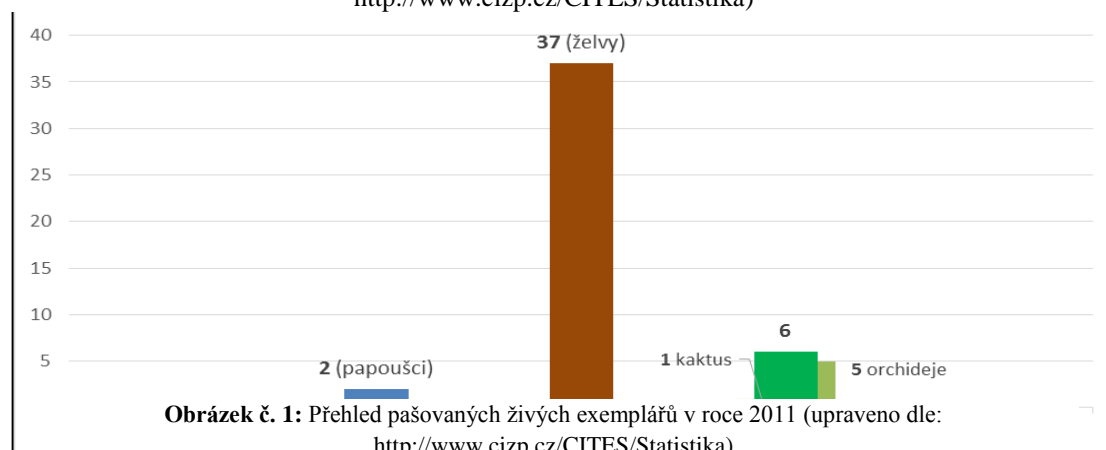
Nejvýznamnějším případem však byl záchyt extrémně vzácných papoušků druhu ara kobaltový (*Anodorhynchus leari*, Bonaparte 1856). Jedná se o jeden z nejohroženějších druhů světa, jehož v přírodě zbývá cca jen 750 jedinců. V zajetí prakticky není chován a cena ptáků je nevyčísitelná. Tři exempláři byli českými občany nelegálně dovezeni do ČR. Při následných domovních prohlídkách byli zadrženi i další vzácní papoušci, např. arové hyacintoví. Akci předcházelo několikaleté šetření, v jehož rámci bylo zjištěno, že nelegální obchod s papoušky je velmi sofistikovaná a dobře organizovaná činnost, která má mezinárodní charakter. Případ byl též široce medializován a to i na mezinárodní úrovni a Česká inspekce životního prostředí a Celní správa ČR následně obdržely od Sekretariátu Úmluvy CITES prestižní vyznamenání za příkladnou práci v oblasti prosazování úmluvy (ČIŽP, 2010).

### 2.2.2 Rok 2011

Na Obr. č. 3 a 4 opět vidíme přehled pašovaných komodit v tomto roce.



**Obrázek č. 2:** Přehled pašovaných neživých exemplářů v roce 2011 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)

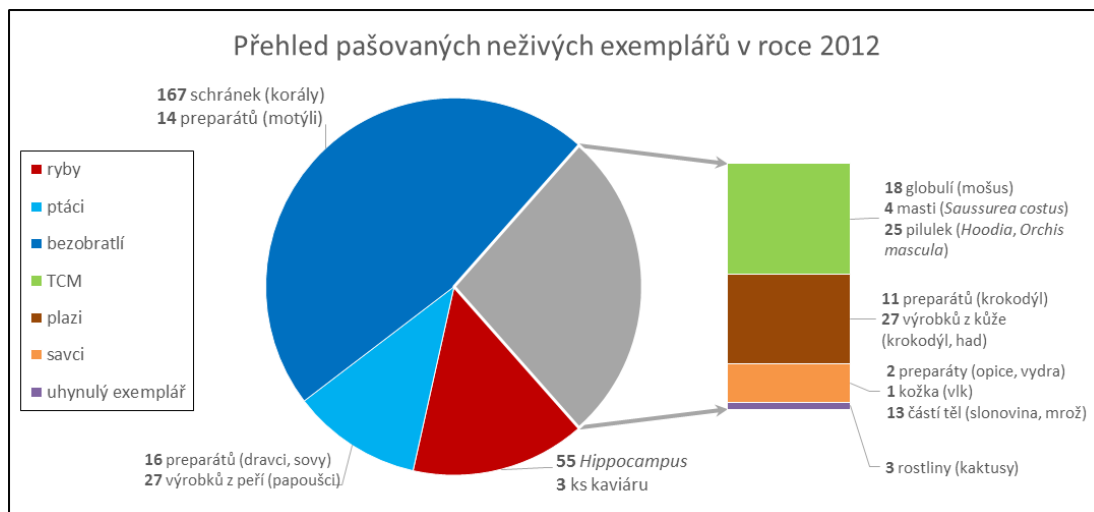


**Obrázek č. 1:** Přehled pašovaných živých exemplářů v roce 2011 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)

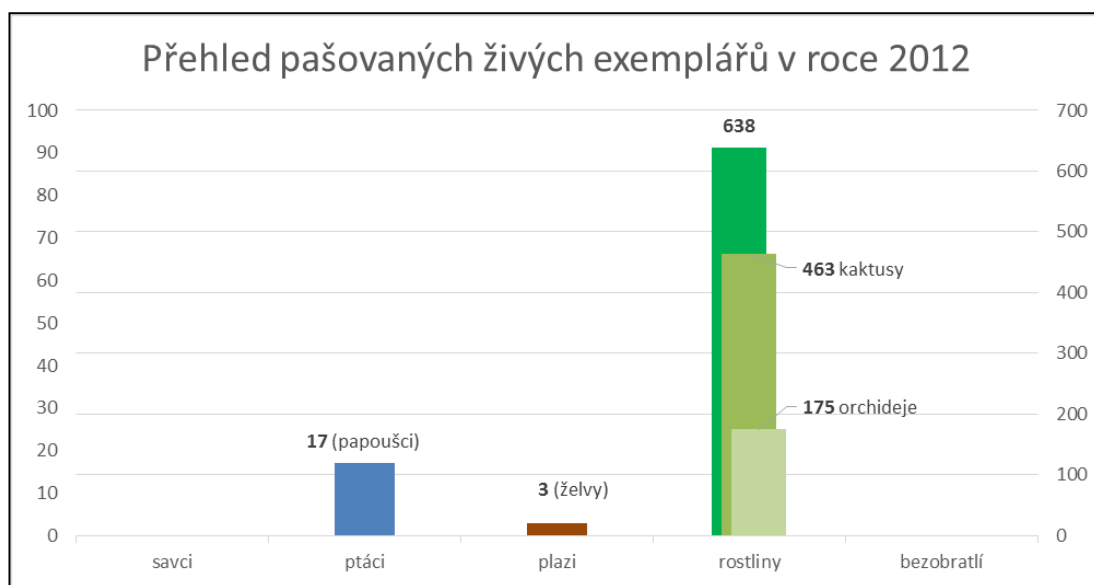
ČIŽP se v tomto opět výrazně podílí na rozkrývání nelegálního obchodování se vzácnými druhy papoušků, který je v ČR šetřen již několik let (ČIŽP, 2011).

### 2.2.3 Rok 2012

Grafy 5 a 6 (Obr. č. 5, 6) nám opět ilustrují situaci s pašováním exemplářů.



**Obrázek č. 3:** Přehled pašovaných neživých exemplářů v roce 2012 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)



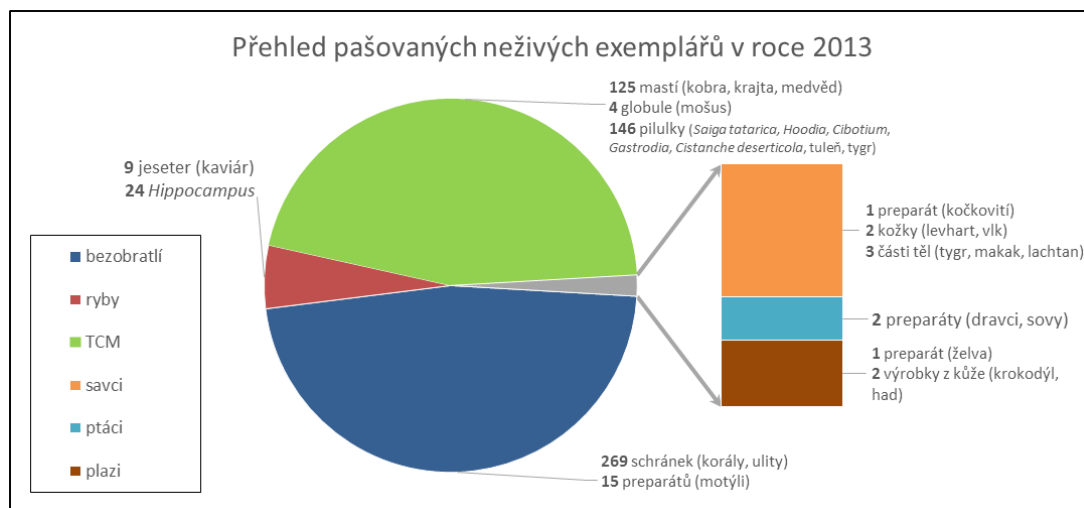
**Obrázek č. 4:** Přehled pašovaných živých exemplářů v roce 2012 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)

Ze zajímavých případů můžeme v tomto roce zmínit např. záchyt 5 starožitných sošek ze slonoviny dovážených ze spojených států. Zboží bylo zakoupeno přes portál eBay a některé bylo prodejcem zákazníkovi prezentováno jako výrobek z hovězích kostí. K zásilce nebyly připojeny žádné dokumenty a byla zabavena.

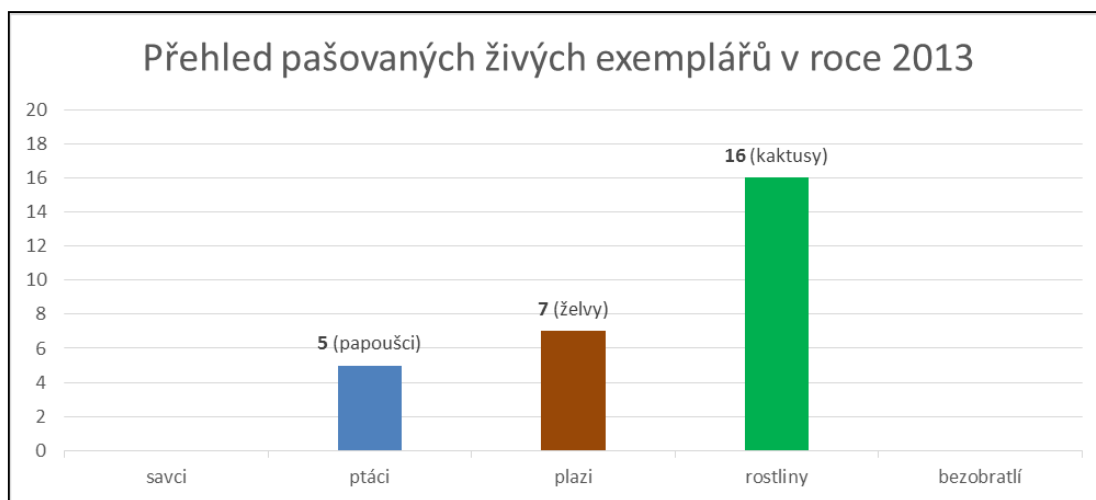
V dubnu pak ČIŽP zabavilo lebku lachtana Forsterova (*Arctocephalus forsteri*, Lesson 1828), putující z Nového Zélandu do České republiky a dovozce byl náležitě pokutován (Environmental Inspectorate, 2012).

#### 2.2.4 Rok 2013

Přehled míry pašování živých a neživých exemplářů v tomto roce je patrný na Obr. č. 7 a 8.



**Obrázek č. 5:** Přehled pašovaných neživých exemplářů v roce 2013 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)



**Obrázek č. 6:** Přehled pašovaných živých exemplářů v roce 2013 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)

Celníci a inspektoři ČIŽP v červnu tohoto roku na pražském letišti kontrolovali zásilku exportovanou Vietnamci, žijícími v České republice, do Vietnamu. Ta byla hlášena jako hrnce, pánve, skleničky, hudební přehrávače a další osobní věci.

Kontrolní orgány našly dvě kompletní kostry tygra (*Panthera tigris*, Linnaeus 1758) ukryté uvnitř hudebních reproduktorů. Na místě byly zbytky seschlých tkání a krve. Kostry velmi silně páchly. Plastové pytle s kostmi byly pokryty parfémovanými ubrousky, pravděpodobně aby bylo zabráněno možnému odhalení cvičenými psy. Byl to již druhý podobný případ zabavení tygří kostry v tomto roce v České republice (Environmental Inspectorate, 2013).

### **Operace RHINO- případ "pseudo lovu" nosorožců- září**

Kauza s rohy nosorožců tuponosých (*Ceratotherium simum simum*, Burchell 1817) je jedna z největších v Čechách na poli tohoto druhu kriminality. Vyšetřování trvá již dva roky a stále pokračuje.

Rohy měly být importovány do ČR z Jihoafrické republiky v podobě trofejí pro osobní účely (možno lovit v rámci povolených kvót a netřeba dovozní povolení do zemí EU) a odtud dále prodány do Vietnamu (zde je po rozích nepředstavitelná poptávka, v důsledku vzniku „uměle“ vytvořené fámy, že roh tohoto zvířete funguje mimo jiné jako prevence rakoviny).

Právě výjimka pro trofejní lov je v ČR hojně zneužívána. Organizátoři byli propojeni se zdejší vietnamskou komunitou, najímali lovce (české občany žijící většinou ve stejném městě), kteří nebyli profesionálními odborníky, neměli oprávnění k držení zbraně, ani nebyli členy žádného loveckého sdružení. Uhradili potřebné výdaje (cestovné, ubytování a povolení k odstřelu zvířete), výměnou za podepsaný souhlas, že se dotyčný vzdává nároku na daný exemplář, ale bude uveden jako majitel trofeje, která poputuje do ČR. Podezřelé navíc bylo, že většina nosorožců byla lovena na farmě jistého Dawie Groenewalda, který je nyní podezřelý z nezákonného zabíjení a obchodu s nosorožci.

Celkem bylo v období vyšetřování dovezeno do ČR 24 podezřelých zásilek s nosorožčími rohy. Česká inspekce životního prostředí z některých odebrala vzorky a poslala je na univerzitu v Pretorii a Sasa Wildlife forenzní oddělení ve Velké Británii, kde byla provedena analýza DNA.

Nyní se inspekce snaží sestavit kompletní seznam jmen českých občanů, podílejících se na nelegálním lovu v JAR (na listině je prozatím cca. 50 jmen). Nicméně v tomto rozsáhlém případě existuje stále mnoho nevyjasněných okolností (Environmental Inspectorate, 2013).

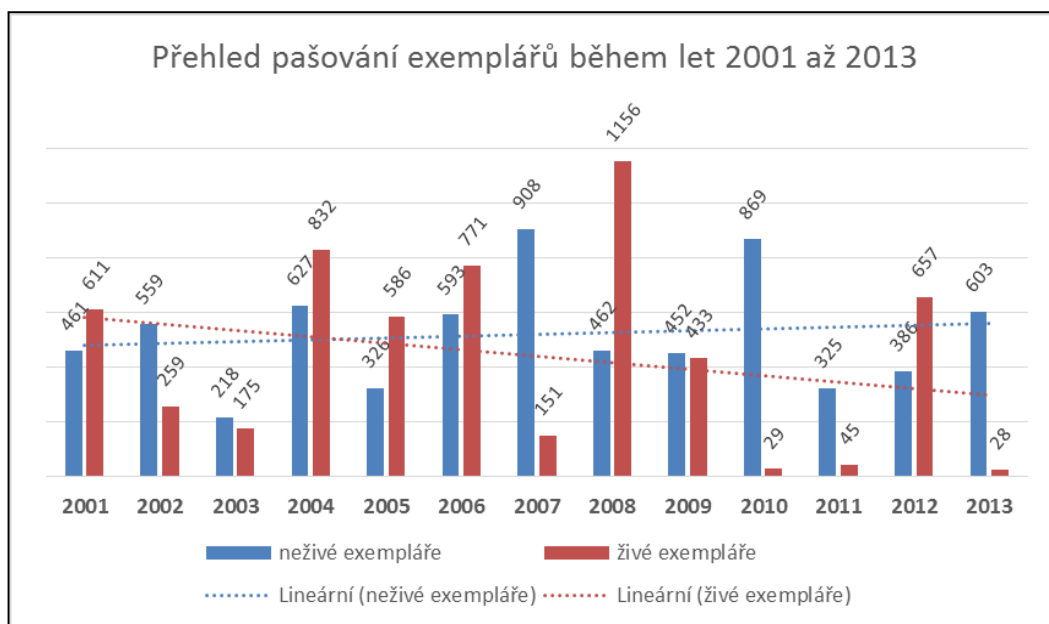
## 2.2.5 Rok 2014

V současné době nebyla ještě Českou inspekcí životního prostředí zveřejněna výroční zpráva za uplynulý rok 2014. Nicméně stále je u nás aktuální nelegální obchod s nosorožčími rohy, slonovinou, tygřími kostmi apod. (Říhová, 2014).

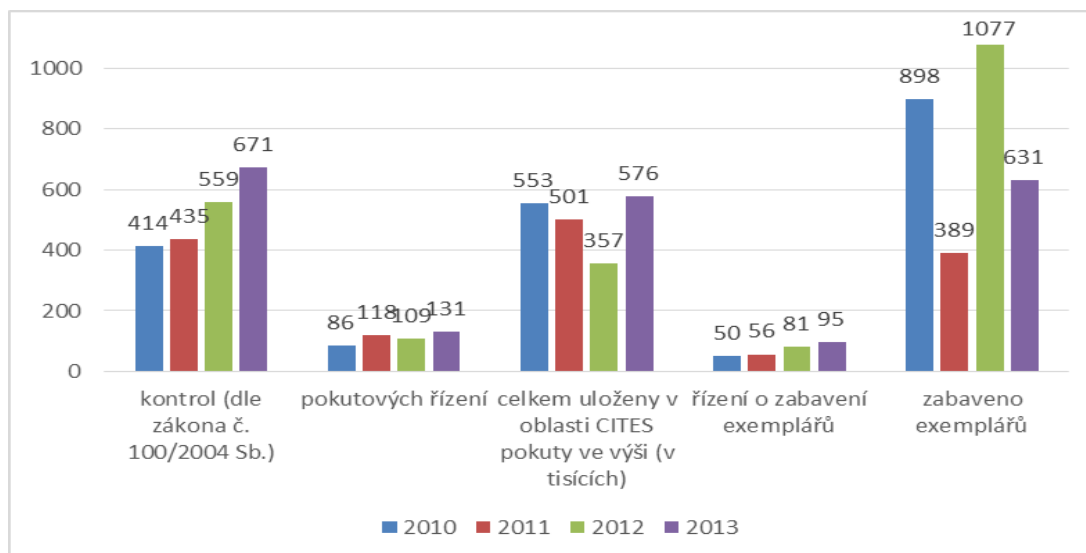
### 2.2.1 Nejčastěji obchodované komodity v období 2010-2014

Na otázku jaké jsou tedy u nás nejčastěji obchodované komodity CITES a do jaké míry je situace závažná, není snadné odpovědět. Na tuto skutečnost má vliv několik faktorů jako např. sezóna, současný trend, zájem mezi lidmi aj. ČIŽP uvádí, že celkem stabilně je u nás zájem o různé druhy papoušků, suchozemských želv a jiných i vzácnějších plazů. Se vstupem ČR do Evropské unie se usnadnil nelegální obchod s ostatními členskými státy, neboť se systematicky kontroluje již jen vývoz a dovoz přes vnější hranice. Zmínit můžeme např. lahve alkoholu s naloženými hady, korály, lastury, krunýře želv, vycpaniny a výrobky z kůží. Závažný je také problém s čížbou ptáků pro kulinářské účely a jejich vývozem do států západní Evropy, zejména Itálie (Kučera a kol., 2010).

Na grafu č. 9 (Obr. č. 9) můžeme vidět, že v průběhu let u nás stoupá pašování spíše neživých exemplářů, což může být spojeno s jejich lepší přenositelností apod. Graf č. 10 (Obr. č. 10) udává pouze pro zajímavost jakýsi souhrn aktivity odboru CITES ČIŽP.



**Obrázek č. 7:** Počet živých a neživých exemplářů pašovaných v letech 2001- 2013 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)



**Obrázek č. 8:** Přehled činnosti odboru CITES ČIŽP v období 2010- 2013 (upraveno dle: <http://www.cizp.cz/CITES/Statistika>)

V současné době je nejaktuálnější problematika záchytů a identifikace různých živočišných a rostlinných materiálů, které používají občané vietnamské národnosti jako tradiční medicínu. Jedna se převážně o tygří kosti, vousy, úlomky zubů, ovařené tkáně opic, opracované zuby různých savců, kořeny ženšenu. Stále zůstává aktuální identifikace vzorků nosorožčích rohů. V ČR je také hlášeno několik větších záchytů slonoviny, kde je potřeba zjistit alespoň rámcovou geografickou příslušnost tj. z které země či oblasti pocházeli upytlačení sloni (Říhová, 2014).

### **3 Metody determinace komodit nevyužívající molekulární techniky**

Ačkoliv se moje práce zaměřuje primárně na využití molekulárních technik k určování CITES komodit, zařazuji i krátkou kapitolu metod, které je nevyužívají, a to z důvodu čtenářova uceleného náhledu na danou problematiku.

#### **3.1 Determinace na základě morfologických znaků**

Mezi často zadržované komodity patří buďto celé exempláře živočichů a rostlin, jejich části nebo jednotlivé samostatné fragmenty (kosti, zuby, srst, kořeny, listy apod.). Takovéto případy lze velmi dobře určovat na základě morfologických znaků daného druhu. Metody jsou založeny na anatomické identifikaci tkání nebo tělesných prvků a vyžadují značné znalosti srovnávací anatomie na makroskopické a mikroskopické úrovni (Bell, 2011).

Někdy lze pomocí morfologických znaků určit věk - u ptáků dle peří, běháků, oční duhovky, u želv podle přírůstků na krunýři (Říhová, 2014).

##### **3.1.1 Využití muzejních sbírek**

Muzea mohou poskytovat obrovské úložiště exemplářů k porovnávání a odborného personálu, který je schopen nabídnout své služby.

Jen kupříkladu zoologické sbírky Národního muzea tvoří přes dva miliony předmětů. Nejpočetněji zastoupeny jsou některé skupiny bezobratlých (koráli, červi, měkkýši, pavouci, ostnokožci) a všechny třídy obratlovců. Sbírkové oddělení jsou rozděleny do šesti referátů: evertibratologie (vyjma hmyzu), ichtyologie, herpetologie, ornitologie, mammalogie a samostatná sbírka savčích kostí a koster (osteologie). Sbírkový fond hmyzu není součástí fondu zoologického oddělení, ale spravuje je samostatné entomologické oddělení Národního muzea (<http://www.nm.cz>).

Sbírkový fond botanického oddělení obsahuje v současné době téměř 2 miliony herbářových položek cévnatých rostlin, mechorostů a řas. Herbář cévnatých rostlin je rozdělen na tzv. československý a světový (<http://www.nm.cz>).

### 3.1.2 Osteologie

Hrubá osteologie využívá pro identifikaci jedinečný vzhled a morfologii prvků kostry. V případě zvířecích ostatků je identifikace mnohem obtížnější než u člověka, jelikož jsme zde nuceni brát v úvahu řadu vně a vnitrodruhových rozdílů (Bell, 2011).

Existuje již řada klíčů pro identifikaci kosterních pozůstatků např. pro medvědy či kočkovité šelmy (The Forensic Working Group, 2014).

Pokud máme k dispozici celé nebo dílčí kostěné fragmenty, můžeme jako diagnostické znaky využít klouby, celkovou velikost a tvar, či umístění úponů vazů. Je-li přítomen chrup, šance na správné určení se výrazně zvyšuje, jelikož ten je pro většinu druhů charakteristický. Identifikaci jediného kosterního prvku, jako je, řekněme pravý proximální femur, pak lze využít např. pro odhad minimálního počtu jednotlivců v případech, kde je shromážděno mnoho částí těl (např. při přepravě) a vyžaduje odhad množství zvířat. (Bell, 2011).

V případě ptačích koster lze určovat téměř vždy alespoň na úrovni čeledi, a to i za použití izolovaných kosterních prvků. Nicméně, přesnější identifikace závisí na přítomnosti charakteristických rysů kosti, a ne všechny prvky jsou stejně dobře použitelné. Vhodnými subjekty bývají hlavní kosti končetin, lebka, pánev, hrudní kosti a pletenec. Dokonce i neúplné příklady těchto kostí mohou přinést dobré výsledky (The Forensic Working Group, 2014).

Pro prosté určování do čeledi či druhu bývá osteologické vyšetření postačující, nicméně pokud potřebujeme blíže specifikovat, je lepší zvolit identifikaci pomocí DNA. V případě nelegálně obchodované slonoviny totiž pomocí osteologie například nerozlišíme africký a asijský druh, nicméně oba jsou uvedeny v seznamech CITES, tudíž i neúplná identifikace může být dostačující (The Forensic Working Group, 2014).

### 3.1.3 Determinace ptačích vajec

Dle The Forensic Working Group (2014) je sběr ptačích vajec spíše neobvyklý v oblasti *wildlife crime* a je obvykle motivován spíše potřebou osobního ocenění než pro finanční motiv. Identifikace ptačích vajec může být časově náročný a obtížný proces. Kromě základních otázek, existuje celá řada předmětů souvisejících se získáváním vajec, které mohou být užitečné při identifikaci. Např. vybavení pro sběr; nástroj na vyprazdňování vnitřku (obsahu) vajec (obecně známy jako *blowing kit* viz



Obr. č. 11); prověřování poznámek, dokumentů a kódovaných spisů; srovnání zabavených fotografií s vejci apod.

Referenční sbírky v muzeích a tamní specialisté jsou schopni poskytnout též cenné znalosti. Tyto kolekce bývají doplněny archívem dokumentů zahrnující datové karty a poznámky sběratelů. Proto je možné je využít nejen k identifikaci vzorků, ale mohou také poskytnout informace o původu materiálu. Ten bývá důležitou otázkou, jelikož není trestným činem vlastnit vejce, která nejsou zanesena v právních předpisech (The Forensic Working Group, 2014).



**Obrázek č. 9:** Souprava *blowing kit*, včetně trubky, pinzety a malých vrtáků. Šipky označují místa, ze kterých byly nakonec odebrány vzorky DNA ptáků (The Forensic Working Group, 2014).

### 3.1.4 Určování výrobků z kůže plazů.

Obchod s plazími kůžemi je značná součást mezinárodního trhu a dopad je znatelný. Miliony plazů zahynou každý rok i přes mezinárodní a národní úsilí o kontrolu obchodu. Jedním z nástrojů potřebných k boji proti vykořisťování druhů je spolehlivá metoda, jak je určovat. Nicméně pokud jsou kůže jakkoliv opracovány a přeměněny v konkrétní výrobek, mnohé z identifikačních morfologických znaků, které se dříve používaly u konkrétního druhu, již na daném předmětu nemusíme vůbec nalézt (Martin v Huffman a Wallace 2011).

Tradiční metody používané herpetology k určování jsou klíče a katalogy druhů s globálním, kontinentálním či regionálním rozsahem. V takovýchto případech potřebujeme znát alespoň geografický původ zvířete. Tyto příručky navíc často používají morfologické znaky, které jak již bylo zmíněno, nemusí být součástí analyzovaného důkazu (Martin v Huffman a Wallace 2011).

Identifikace nebo taxonomie druhů plazů je historicky založena na morfometrii a kvantifikaci pozorovatelných atributů na celých exemplářích. Konkrétně se jedná o standardizované měření těla, morfologii lebky a chrupu, morfologii hemipenisu<sup>2</sup>, počet šupin či tvar a rozměry kresby těla. Existuje několik příruček, které jsou speciálně navrženy tak, aby řešily problém nedostatku spolehlivých informací o geografii druhu, a zaměřují se na morfologické vlastnosti zvířete (např. Charette 1999, McCloud 2008). Ovšem pro identifikaci želv, ještěřů a hadů jsme již omezeni klíčem, který obsahuje jen několik komerčně využívaných druhů plazů. Navíc je zde využívána poněkud zastaralá taxonomie (Martin v Huffman a Wallace 2011).

Navzdory těmto nedostatkům tyto prameny poskytují některé z mála dostupných údajů o morfologických rysech kůže plazů, které mohou být užitečné při identifikaci nabízených produktů. Vyčíněné kožené výrobky bývají totiž zpravidla nevhodné pro genetickou analýzu v důsledku degradace materiálu díky chemickému zpracování během výrobního procesu (Martin v Huffman a Wallace 2011).

Říhová (2014) podotýká, že na kožené výrobky se neužívají pouze plazi kůže, ale také kožky obojživelníků (velké druhy ropuch), paryb (nejčastěji rejnoci), ptáků (pouze pštros) a savců (kopytníci, sloni).

Zvláštním případem jsou potom luskouni (*Pholidota*, Weber 1904), u kterých se celé kožky většinou nepoužívají, nicméně samostatné šupiny jsou velmi žádané na dekorace a šperky. Tato zvířata jsou údajně vybívána více než nosorožci či tygři (100 000 za rok), což má za následek, že všech osm druhů je ohrožených (z toho 2 asijské druhy kriticky). K vzestupu nelegálního obchodu s tímto zvířetem přispívá i fakt, že luskouni jsou v Asii vítanou delikatesou (Kehoe, 2015).

### **3.1.5 Determinace rostlin na základě vegetativních znaků apod.**

Na světě existuje cca 400.000 druhů kvetoucích rostlin, z čehož přibližně 30.000 je zaneseno v úmluvě CITES. To je 5x tolik než počet živočichů na těchto seznamech. Případy, kdy je vyžadováno jejich určení, jsou různé. Častý je dovoz rostlin lidmi z rekreací v zavazadlech. Kontrolovány jsou též složky olejů, parfémů a

---

<sup>2</sup> Hemipenis je část samčí pohlavní soustavy plazů. Pohlavní orgán samců plazů se skládá ze dvou hemipenisů, které jsou ukryty v kapsách za kloakou směrem k ocasu. Jedná se o duté, tupě zakončené útvary s charakteristickým členitým povrchem

léčiv, Může být nutná i identifikace velkých zásilek importovaných speciálními obchodníky pro květinové výstavy nebo pro komerční účely (The Forensic Working Group, 2014).

Jedna z klíčových charakteristik potřebných k určení je struktura květu. Nicméně při kontrolách nemusíme narazit vždy jen na rostlinu v tomto stavu. V takovém případě je možné porovnat další charakteristiky, jako je stavba kořene, listu, stonku, nebo DNA (popřípadě i chemické složení) se vzorky referenčních sbírek apod. Odborníci se znalostmi o určité skupině rostlin, mohou být schopni identifikovat rostlinu na úrovni druhu, i když rostlina není zrovna ve fázi květu (The Forensic Working Group, 2014).

### **3.2 Determinace pomocí mikroskopie**

Mikroskopická identifikace je možná, pokud izolujeme dílčí materiál, ze zadržených rostlinných či živočišných vzorků. Existuje množství literatury, která nám může být nápomocná. Zmínit lze Hillier a Bell (2007), kde jsou popsány různé mikroskopické morfologické prvky lišící se od sebe u zvířat a člověka (Bell, 2011). Hlavním omezením této techniky je fakt, že lze sice vylučovací metodou zařadit identifikovaný předmět do užší skupiny, nicméně zpravidla nedosáhneme konkrétní identity. Haversův systém, který se např. užívá při determinaci a o němž je známo, že se liší ve velikosti a frekvenci mezi druhy, též není zcela směrodatný. U některých druhů se tyto metriky totiž překrývají. Dalším problémem může být přístup k referenčním údajům pro druhy volně žijících živočichů. Pokud jsou k dispozici, bývají rozptýleny ve vědeckých pracích v časovém horizontu více než 150 let, a často navíc pouze v několika jazycích (Bell, 2011).

Jiným typem tkáně, kterou můžeme mikroskopicky identifikovat, je tkáň zubní (např. pomocí světelné nebo elektronové mikroskopie). Opět ale nastává problém s nedostatkem referenčního materiálu. Nicméně tato metoda se úspěšně používá k identifikaci slonoviny. Jedná se totiž o formu dentinu, jež disponuje jedinečnou mikrostrukturou známou jako Schregerovy linie, jejichž úhly jsou zřetelné a měřitelné. Bylo prokázáno, že se navíc liší u všech tří druhů (africký, asijský i mamut), bez překryvu (Bell, 2011; Singh a kol., 2006).



**Obrázek č. 10:** Řez slonovinou, na kterém jsou patrné charakteristické Schregerovy linie pod úhlem 115° a více (Říhová, 2014)

### 3.2.1 Trichologie a determinace peří

Tato determinační technika využívá jedinečné vlastnosti chlupů (popř. vlasů). Je totiž obtížné je zničit, zůstávají zachovány, dokonce jsou-li vystaveny vlhkosti a rozkladu doprovodné tkáně. Její historie sahá do 19. století, nicméně teprve s příchodem skenovací elektronové mikroskopie (SEM) se detailněji podařilo pochopit morfologii těchto kožních derivátů. Sledována je řada faktorů, včetně barvy, textury, rozložení granulí, průměr chlupu, váhy a přítomnosti či nepřítomnosti dřeně (Knecht in Huffman and Wallace, 2011).

Pro porovnávání vzorků existuje např. databáze ([www.iamaweb.com](http://www.iamaweb.com)) s fotografiemi zvířecích chlupů ze SEM a Gonzalez a Miller (2010) vyvinuli HAIRbaseTM, (<http://web.me.com/kwpmiller/HAIRbase/Welcome.html>), která ukazuje variabilitu a jemnost struktury srsti (Knecht v Huffman a Wallace, 2011).

V České republice existuje digitální atlas zvířecích chlupů zpracovaný Kriminologickým ústavem (tzv. T-DIAT), obsahující 314 druhů (72 čeledí) s fotografiemi chlupů pomocí optického mikroskopu a mikroskopu elektronového (Říhová, 2014).

Pokud se zaměříme na peří, je možné ho identifikovat buďto již pohledem na velikost, tvar a zbarvení a porovnat s referenčními sbírkami. V případech, kdy však nemáme k dispozici pero celé, je vhodné zvolit mikroskopické vyšetření, které může být užitečné pro detekci malých odchylek kresby péřových struktur mezi čeleděmi.

Technika funguje nejlépe na prachovém materiálu, protože na letkách často chybí diagnostické konstrukční detaily. Dokonce i malé množství takového perí může být obvykle identifikováno na úrovni čeledi. Přesnější určení až druhu je možné pomocí DNA technik (The Forensic Working Group, 2014).

### 3.2.2 Determinace dřeva

Jedná se snad o nejsložitější identifikaci, ke které je nutný opravdový znalec a srovnávací vzorky. Sleduje se uspořádání, počet a průměr pórů, nebo např. stavba parenchymu. Nápomocné ale mohou být i další charakteristiky jako hustota při 12% vlhkosti, hořlavost, lesk (u mahagonu), chuť (cedr hořký) či vůně (Říhová, 2014).

Určovat můžeme pouhým okem (k makroskopickému určení potřeba většího vzorku), lupou, mikroskopem (obvykle stačí vzorek do 1 cm<sup>3</sup>), chemickou analýzou, DNA a nově je zkoumána i možnost využití izotopů, které by mohly pomoci určovat zdroje dřeva. Barvený a lakovaný povrch identifikaci ztěžuje (Říhová, 2014).

K porovnávání vzorků slouží databáze CITESwoodID (Richter a kol., 2008).

## 3.3 Determinace pomocí chemické analýzy

### 3.3.1 Toxikologie

Dle Bella (2011) ve forenzní toxikologii obvykle můžeme rozlišit dvě odvětví: zaprvé, identifikace chemických sloučenin, které byly syntetizovány ze zvířat nelegálně; a za druhé, určení otrav. Analýzy obvykle zahrnují chromatografii na tenké vrstvě (TLC) nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC).

Tato metoda se velmi dobře osvědčila v případech zabíjení medvědů pro jejich žlučník. V Asii je žluč považována za účinný léčebný prvek v tradiční čínské medicíně. Při determinaci je opět hlavní otázkou o jaký se jedná druh a odkud pochází. Žlučové kyseliny: ursodeoxycholová (UDCA), chenodeoxycholová (CDCA), a cholová (CA), jsou považovány v lékařství za účinné látky. Obsah UDCA ve žluči mezi druhy kolísá. U medvědů je však koncentrace UDCA zvýšena v průběhu hibernace. Tato skutečnost použití této metody jako validní identifikace poněkud stěžuje (Bell, 2011).

Říhová (2014) zmiňuje také použití těchto metod u rostlin (zjišťování specifických látek např. saussuriny a kostunolidy u *Saussurea costus*), determinace pravosti kaviáru (podle složení bílkovin) apod.

### 3.3.2 Radioaktivní datování

Tato metoda využívá sledování stabilních lehkých izotopů (u člověka a savců), které zůstávají v geografickém prostoru. Potenciál těchto poznatků ve *wildlife crime* je zřejmý, jelikož může pomoci vyřešit otázku, odkud daný subjekt pochází (Bell, 2011).

Hlavním geolokačním nástrojem této techniky je stabilní izotop kyslíku ( $\delta^{18}\text{O}$ ), který může být získáván jako biomarker z jakékoliv tkáně. Izotop pochází hlavně z příjmu pitné vody v průběhu celého života savce, kde se ustálí ve tkáních. Nicméně pitná voda je odvozena z vody atmosférické, která se mění frakční destilací izotopů  $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$  a jako systém počasí cestuje napříč krajinou. S každým deštěm jsou hodnoty vyjádřeny jako změny v poměru  $\delta^{18}\text{O}$ . Tyto údaje o srážení byly mapovány na celém světě v průběhu desetiletí (Gnip databáze [www-naweb.iaea.org]). Existuje však řada faktorů životního prostředí, o nichž je známo, že frakční destilaci  $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$  ovlivňují. Např. vznik počasí samotného, orografie, teplota, vlhkost, a kontinentální oteplování. Tento fakt může zpochybnit použití tohoto izotopu jako validního důkazu (Bell, 2011).

Jiné stabilní izotopy jsou často označovány jako „potravinové“ a živočichové je získávají troficky skrze potravní řetězec. Tohoto faktu využila Schmied a kol. (2011) ve své práci, která řeší otázku obchodované slonoviny- konkrétně, zda můžeme určitý výrobek z této komodity označit za starožitný, či nikoliv.

Obchod se slonovinou podléhá různým omezením a předpisům ve všech zemích (které podepsaly CITES úmluvu) Nicméně na starožitnosti<sup>3</sup> v rámci EU nejsou uplatňovány. Předměty vyrobené před daným datem, díky kterému je můžeme nazvat starožitnými, tedy nepodléhají předpisům. Metoda popsána Schmied a kol. (2011) určuje, zda slon zahynul před rokem 1955, stanovením radionuklidů  $^{14}\text{C}$  a  $^{90}\text{Sr}$  z artefaktů slonoviny. Oba se vyskytují v biosféře díky jaderným testům v letech 1945 a 1980.  $^{14}\text{C}$  se vyskytuje přirozeně, ale  $^{90}\text{Sr}$  se v biosféře objevil až na začátku jaderného testování. Tudíž teoreticky, slonovina získaná před rokem 1955 by měla obsahovat přirozenou hladinu  $^{14}\text{C}$ , ale ne  $^{90}\text{Sr}$ .

---

<sup>3</sup> Starožitnosti, dle definice, jsou produkty vyrobené před datem 1. 6. 1947. (Schmied a kol., 2011)

Spolehlivost této metody se výrazně zvyšuje dvojitou analýzou radionuklidů, a proto je vhodná pro soudní znalecké posudky. Datování jedné nuklidové báze může totiž poskytovat nesprávné závěry. Je-li, například, vzorek fosilního uhlíku kontaminován formou lepidla z důvodu opravy.

### 3.4 Forenzní entomologie a parazitologie

Forenzní entomologie představuje použití hmyzu z živých či mrtvých lidí a živočichů, jako forenzních důkazů. Případy, kdy můžeme tuto metodu využít je kupříkladu vražda, zanedbávání v občanských věcech (např. napadení potravin nebo zanedbání povinné péče). U soudních líčení je forma důkazů tohoto typu velmi dobře přijímána, což je převážně způsobeno dlouhou historií použití entomologického materiálu. První případy se datují do třináctého století (Čína). Vyšetřování, při němž jsou používáni členovci, je obvyklejší v lidské kriminalistice, nicméně užití u zvířat se rychle rozmáhá (Tomberlin a Sanford v Huffman a Wallace, 2011).

Podstata této metody spočívá v různém zastoupení druhů hmyzu během fází rozkladu (můžeme označit též za sukcesi saprofágních organismů). Kdy se tyto druhy na těle exempláře střídají v tzv. sukcesních vlnách (Štefan a Hladík, 2012).

Konkrétně Anderson (1999) použil entomologii k určení času nezákonného usmrcení dvou mladých medvědů. Dvě mláďata byla nalezena zastřelena a vyvržena s odejmutými žlučníky. V pozůstatcích se vyskytovaly pouze dospělé mouchy z čeledi bzučivkovitých (*Calliphoridae*) s vajíčky. Vědci zaznamenali dobu vylíhnutí a hmyz byl dochován k dospělosti. Spolu s identifikací druhu, makro a mikro klimatem a laboratorními údaji o vývoji byla použita k určení doby usmrcení.

Pokud se zaměříme konkrétně na hmyz parazitický, druhy které jsou obligátně krev sající (např. vši, štěnice, klíšťata a komáři) mohou sloužit i jako rezervoár DNA. To může být užito k identifikaci druhů zvířat, na nichž členovci parazitovali (Tomberlin a Sanford v Huffman a Wallace, 2011).

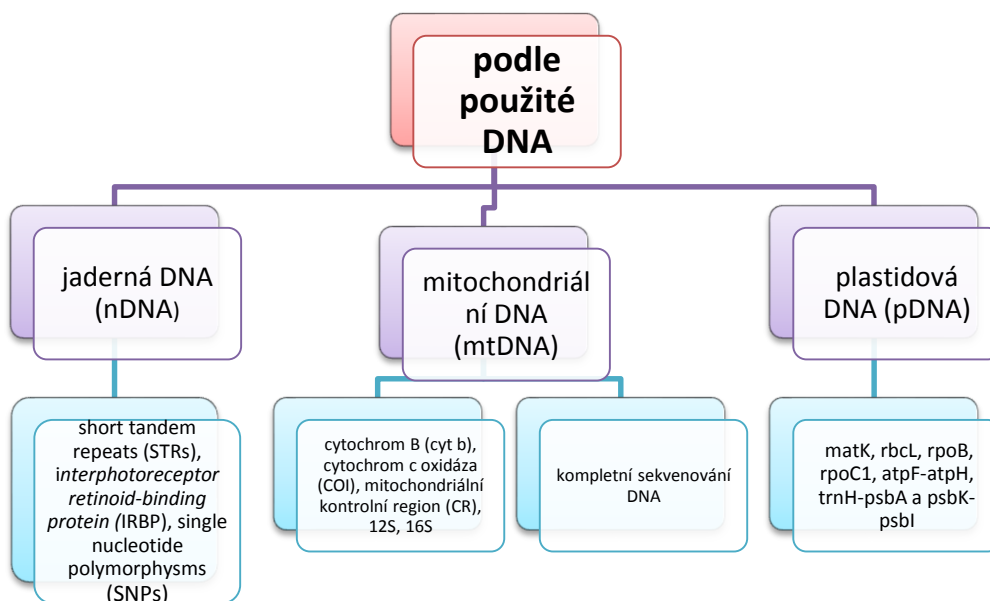
Říhová (2014) také poukazuje na možnost použití parazitů k rozlišení, zda je dané zvíře z volné přírody či z chovu. Parazitické druhy jsou totiž často vázány na specifické podmínky (teplota, vlhkost apod.) a po přenosu do odlišného prostředí hynou. Zvířata odchovávaná v zajetí navíc nemívají příliš mnoho parazitů (zvláště ne tropických druhů), jelikož bývají pravidelně podrobena veterinární péči.

## 4 Molekulární metody determinace organismů

Identifikace pomocí molekulárních metod je dnes jedním z nejnovějších a nejučinnějších trendů, které ovlivňují moderní kriminalistiku i objasňování zločinů páchaných na volně žijících organismech (wildlife crime).

Molekulární markery jsou ideální pro určení druhů i konkrétních exemplářů (individuů) na úrovni živých organismů či preparovaných/herbářovaných vzorků a produktů získaných z volně žijících organismů, jelikož na rozdíl od identifikace pomocí morfologických znaků nevyžadují neporušené vzorky. DNA lze extrahovat i z vysoce degradovaných a opracovaných produktů, které se na trhu běžně vyskytují. Příkladem může být vařené a sušené maso, samostatné drápy, sušené žraločí ploutve, vaječné skořápky, zvířecí chlupy, kosti, slonovina, rohy nosorožců, peří či rybí šupiny (Alac a kol., 2010).

Variabilitu daného organismu lze studovat v různých typech DNA s využitím široké škály markerů. Na Obr. č. 13 jsou uvedeny nejčastější možnosti analýzy DNA u rostlinných a živočišných vzorků včetně příkladů jednotlivých markerů. Pro účely této práce bylo zvoleno funkční rozdělení na základě určování jednotlivých kategorií nelegálně obchodovaných produktů.



**Obrázek č. 113:** Aplikace molekulárních markerů dle použité DNA; modře vyznačeny konkrétní příklady markerů.



#### 4.1 Základní členění technik molekulárních markerů

Techniky molekulárních markerů lze z pohledu historického vývoje dělit na techniky založené na hybridizaci bez použití PCR reakce (např. RFLP) a dále na techniky založené na PCR reakci, které hrají v současné době majoritní roli v oblasti molekulární biologie včetně forenzních analýz. V některých případech docházelo v rámci jednotlivých metod k postupnému vývoji a tudíž je lze řadit do více kategorií. V níže uvedeném přehledu jsou zahrnuty techniky a molekulární markery, které jsou nejčastěji aplikované k účelům identifikace CITES organismů (viz Tab. 3).

**Tabulka 3:** Deskripce jednotlivých typů markerů

MARKER	ZDROJOVÁ DNA	POUŽITÍ MARKERU	VÝHODY A NEVÝHODY POUŽITÍ
<b>RFLPs</b>	nDNA	-identifikace široké škály druhů pomocí modifikované techniky PCR-SSCP	-rychlá, levná metoda; všechny vzorky mohou být metodě podrobeny bez jakýchkoliv předchozích předpokladů založených na morfologické identifikaci; pomáhá řešit problém falešně negativních výsledků při druhově specifické PCR reakci bez potřeby doplnit další fragment pro kontrolu úspěšnosti metody; jediný pozitivní výsledek metody přímo identifikuje cílový druh; při tomto testu lze snadno rozlišit směs různé DNA, pokud se objeví více SSCP vzorů
<b>AFLPs</b>	nDNA	-vhodnější pro detekci hybridních jedinců díky jejich biparentálnímu způsobu dědičnosti	-metoda se jeví jako neúčinná v případě stopového množství vzorků nebo degradovaného materiálu
<b>VNTRs</b>	nDNA	-vhodné k identifikaci konkrétních exemplářů	-rozšířená díky své velké diskriminační síle  -nutné použití alespoň 3 různých enzymů-> neúplně specifické databáze pro jednotlivé případy  -praktická omezení: neschopnost analyzovat vzorky ve stejnou dobu jako vzorky referenční pro srovnání, velké množství relativně neporušené DNA a vysoce komplexní výklad
<b>IST region</b>	rRNA	-nejčastěji používané jaderné markery pro fylogenetické analýzy u mnoha eukar. Skupin včetně většiny rostlinných čeledí	-snadná amplifikace vzhledem k vysokému počtu kopií genového klastru; použití vysoce konzervativních primerů a nízkonákladových metod; silná variabilita mezi blízkými příbuznými druhy

<b>cyt b</b>	mtDNA	-identifikace druhů u rostlin, využití ve fylogenetických studiích	-problémem je odlišná schopnost diskriminace daných markerů v různých taxonomických skupinách (stupeň hybridizace, polyploidie, typ rozmnožování rostliny, životní historie druhu či historie druhu jako takového)
<b>COI</b>	mtDNA	-identifikace druhů s vysokou jistotou	-sekvence COI je lemována oblastmi konzervovaných sekvencí -> poměrně snadná izolace a analýza; velmi nízká sekvenční variabilita -> přesná identifikace druhů  -v některých skupinách, však COI není efektivním markerem a je nutné použít jinou standardní oblast
<b>12S a 16S</b>	mtDNA	-použity ve studiích zaměřených na vyšší kategoriální úrovně (kmen, čeleď, ...)	
<b>D- loop</b>	mtDNA	-široce používána na intra- a inter specifických fylogenetických studiích	-výhodné u blízké příbuzných linií, ale ne příliš pro identifikaci druhu, z důvodu zpětné a paralelní mutace
<b>SNPs</b>	nDNA	-k identifikaci druhů, bez nutnosti úplného sekvenování	-jejich testování -> řada výhod: př. výskyt variací většinou jen jednoho páru bází; schopnost rozlišit DNA ve směsi vzorků (posuzování směsí srsti, lebek nebo lastur); při identifikaci druhů ve směsi tradičních léčivých přípravků  -problém nastává, když jsou vzácné druhy nahrazeny těmi, které nejsou na seznamu CITES  -nevýhodou je rovněž nutnost použití specifických primerů pro každý testovaný druh, když ho nemáme, druh nebude detekován
<b>STRs</b>	nDNA	-statistické analýzy pro určení původu jedinců na základě porovnání jejich AFPL profilu a mikrosatelitů	-velmi přesné v případě, kdy byly odebrány vzorky ze všech potenciálních zdrojů populací, populační hranice jsou jasně definované, odběr vzorků je náhodný a v populaci existuje H-W rovnováha  -tyto předpoklady pro většinu populací nereálné -> pokud nemáme jasně definované hranice, osvědčily se metody shlukování

#### 4.1.1 Techniky založené na restrikčním štěpení a hybridizaci bez použití PCR

Tento typ analýzy DNA využívá polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP), vyplývající z přítomnosti či nepřítomnosti restrikčního místa. Při této technice se použijí enzymy k rozštěpení DNA v konkrétním místě (tzv. restrikční místo) a Southern blot hybridizace jaderných multi-locusových sond (MLPs). Pokud se takové místo v sekvenci nachází, dojde ke štěpení vysokomolekulární molekuly DNA za vzniku menších fragmentů. V případě že nikoliv, zůstane molekula DNA neštěpena. Vzniklé fragmenty jsou separovány pomocí gelové elektroforézy, přeneseny na membránu a hybridizovány se specifickou sondou. Vzniklý profil fragmentů o různé délce (tzv. polymorfní fragmenty) je druhově charakteristický (Alac a kol., 2010).

Metoda RFLP je dnes všeobecně nahrazována technikami založenými na PCR, mezi její nevýhody patří značná pracnost a vysoké nároky na kvalitu, čistotu a množství analyzované DNA. Problematická může být rovněž interpretace výsledků ve směsi vzorků, kdy zejména v případě použití degradované DNA mohou být generovány i překrývající se restrikční vzorce. (Tobe a kol., 2010). Navíc je třeba pro tuto techniku velké množství DNA (přibližně 10 ng) a i přes to můžeme získat výsledky nízké statistické významnosti (Wilson-Wilde, 2010).

##### • RFLPs

Oliveira a kol. (2010) vyvinuli např. molekulární test na základě zjištěného polymorfismu na malém fragmentu jaderného genu (221 bp na **IRBP - Interphotoreceptor retinoid-vázající protein** exonu 1) pro identifikaci 16 druhů šelem jihozápadní Evropy. SSCP (Single-Strand Conformational polymorfismus) technika gelové elektroforézy byla také optimalizována tak, aby umožňovala jednoduché a levné uplatňování tohoto molekulárního testu. Sekvence a SSCP profily byly konzistentní v identifikaci celkem 387 vzorků, včetně trusu (172) a srsti (17) získaných neinvazivním způsobem. Vzhledem ke své nízké ceně, jednoduchosti a široké škále identifikovatelných druhů, může tento test znamenat příslib v usnadnění studia molekulární ekologie, ochranné genetiky i forenzní analýzy.

Díky jednoduché analýze PCR a SSCP gelu může být současně porovnáváno minimálně 40 vzorků v závislosti na použitém přístroji elektroforézy, což umožňuje pětikrát snížit náklady oproti přímému sekvenování. Celý proces je také jednodušší než kupříkladu metoda RFLP, jež vyžaduje několik kroků (Oliveira a kol., 2010).

Přestože se většinou v podobných případech využívá mitochondriální DNA, IRBP jaderný fragment prokázal vysokou míru amplifikace, jak v případě vzorků trusu (průměrně 81,13%) tak srsti (100%). Autoři současně poukazují ještě na několik dalších potenciálních výhod: (1) všechny vzorky mohou být sekvenovány nebo podrobeny PCR-SSCP bez jakýchkoliv předchozích předpokladů založených na morfologické identifikaci (což je často využíváno u neinvazivně získaných vzorků před samotným PCR, z důvodu snížení nákladů a času); (2) pomáhá řešit problém falešně negativních výsledků při druhově specifické PCR reakci bez potřeby doplnit další fragment pro kontrolu úspěšnosti metody; (3), zatímco v druhově specifických testech negativní výsledky pro cílový druh neumožňují okamžité zjištění skutečné šelmy a jsou nutné další experimenty, zde jediný pozitivní výsledek PCR-SSCP přímo identifikuje cílový druh a (4) při tomto testu lze snadno rozlišit směs různé DNA (na rozdíl od přímého sekvenování), pokud se objeví více SSCP vzorů. (Oliveira a kol., 2010).

#### **4.1.2 Techniky založené na principu polymerázové řetězové reakce (PCR)**

Objevení polymerázové řetězové reakce vyřešilo mnohé z problémů technik založených na restričním štěpení a hybridizaci DNA. Jedná se o metodu amplifikace/kopírování DNA. Dvoušroubovici DNA nejprve zahřejeme na určitou teplotu, aby se vlákna oddělila (denaturace), poté ochladíme (opět na danou teplotu), kdy se přidané krátké úseky DNA (primery) vážou (annealing) na specifické sekvence. Aby mohl být každý úsek DNA analyzován, jsou zapotřebí dva primery (jeden z každého připojení po obou stranách v konkrétním místě molekuly DNA). Při třetí specifické teplotě enzym známý jako *Taq* polymeráza umožňuje kopírování DNA přidáním komponentů tak, aby se každé vlákno prodloužilo pomocí GC, AT párování. Na konci prodlužovacího procesu se komplementární jednořetězcové fragmenty DNA spojí (Wilson-Wilde, 2010).

Opakováním výše uvedených kroků může být DNA replikována exponenciálně *in vitro*. Lze tedy pouze z několika kopií vytvořit další miliony nebo miliardy přesných replik (Wilson-Wilde, 2010).

K PCR můžeme využít buďto nukleární či organelovou DNA. Některé postupy, jako je sekvenování, mohou být aplikovány na oba typy, zatímco jiné techniky jsou specifické pro jaderné DNA (Wilson-Wilde, 2010).

#### **4.1.2.1 Technika založená na restričním štěpení a následné PCR amplifikaci**

##### **• AFLPs**

Tato technika vytváří fragmenty DNA různé délky, které se liší mezi jednotlivci a druhy, a mohou být po elektroforetické separaci zobrazeny jako profil „proužků“. Genomová DNA je rozštěpena v určitých místech pomocí dvou restričních enzymů a vytváří stovky fragmentů. Podskupina z nich je poté specificky amplifikována a označena fluorescenčním barvivem, což umožňuje jejich detekci pomocí laseru při gelové elektroforéze.

Alacs a kol. (2010) zmiňuje, že ve srovnání s analýzou mitochondriální DNA, jsou AFLP markery vhodnější pro detekci hybridních jedinců díky jejich biparentálnímu způsobu dědičnosti. Tato metoda se ale bohužel jeví jako neúčinná v případě stopového množství vzorků nebo velmi degradovaného materiálu (potřeba alespoň 50 až 100 ng DNA s vysokou molekulovou hmotností). Hlavními zdroji chyb při stanovení genotypu AFLP mohou být rozdíly ve velikosti píků jednotlivých lokusů, což lze minimalizovat genotypizací replikátů na 5-10% vzorků a normalizací výšky píků vůči jejich průměrné intenzitě.

#### **4.1.2.2 Detekce pomocí klasické PCR**

##### **• VNTRs**

Pokrok v analýze RFLP znamenal objevení nekódujících oblastí DNA, které obsahují opakující sekvence, jež jsou vysoce polymorfní. Nazýváme je minisatelity (VNTRs). Skládají se ze základních jednotek opakujících se v tandemu (délku alely určuje, kolikrát se opakuje jednotka jádra) a dodržují přísné vzory dědičnosti, díky čemuž vykazují vysoký stupeň variability mezi jednotlivci. Z tohoto důvodu jsou vhodné k identifikaci konkrétních exemplářů (Wilson-Wilde, 2010). Na základě analýzy VNTR – satelitů byla vyvinuta technika DNA fingerprintingu (Kirby, 1990).

Po objevu PCR a následné separace pomocí gelové elektroforézy se VNTRs začaly detekovat i tímto způsobem (McGraw a kol. v Huffman a Wallace 2011)

Nekódující oblasti DNA mutují snadněji než oblasti kódující, proto zde neočekáváme obecně žádné fatální důsledky mutací. RFLP-VNTRs byly nejprve analyzovány na jednom místě a poté na multi lokusech, což vyústilo v obraz ve stylu čárového kódu. Single locus VNTR typizace se stala poměrně rozšířenou díky velké diskriminační síle, nicméně, problém je možné spatřovat v používání alespoň tří různých enzymů, což může mít za následek neúplné specifické databáze pro jednotlivé případy. Navíc k nejednotnosti analýzy přispěla četná praktická omezení, jako např. neschopnost analyzovat vzorky ve stejnou dobu jako vzorky referenční pro srovnání, velké množství relativně neporušené DNA a vysoce komplexní výklad. (Wilson-Wilde, 2010).

- **STRs/SSRs**

Jedná se o krátké sekvenční motivy dlouhé 1-6 nukleotidů (např. ATATATAT), které mají vysokou rychlost mutace převážně v důsledku prokluzu polymerázy během replikace DNA. To vede k prodloužení nebo zkrácení počtu opakujících se jednotek. Mikrosatelity představují kodominantní markery, ve kterých jsou pomocí PCR amplifikovány genové varianty (alely) zděděné po obou rodičích a následně vizualizovány. Homozygotní jedinci mají stejné velikosti STR repetice, naopak jedinci heterozygotní mají velikosti repetice různé. Na rozdíl od AFLPs se jedná o markery, kde alela buďto je přítomna nebo chybí (Alacs a kol., 2010).

V dnešní době se také často používá sada statistických analýz pro určení původů jedinců na základě porovnávání jejich AFLP profilu a mikrosatelitů. Velmi přesné je to v případě, kdy byly odebrány vzorky ze všech potenciálních zdrojů populací, populační hranice jsou jasně definované, odběr vzorků je náhodný, a v populacích existuje Hardy-Weinbergova rovnováha. Nicméně, tyto předpoklady jsou pro většinu populací nereálné. Pokud nemáme jasně definované hranice, osvědčily se metody shlukování. V takovém případě můžeme snadněji určit počet populací (tj. klastry) na základě multilokusových genotypů jedinců než podle předem stanovených hranic. Jednotlivcům pak přiřadíme určené populace, včetně těch, které nebyly ve vzorku zastoupeny (Alacs a kol., 2010).

- **SNPs**

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP) jsou nejčastější příčinou variability v DNA. Jedná se o zachycení změny jednotlivých párů bází v sekvenci různých jedinců. Každý nukleotid v daném lokusu může mít teoreticky 4 varianty (změny v adeninu, thyminu, cytosinu a guaninu), nicméně většinou výrazně převažují bialelické SNP (např. když se adenin mění na thymin) nazýváme je proto bialelickými markery (mají pouze dvě alternativy). SNP se běžně vyskytují v kódujících oblastech, díky čemuž mají relativně nízkou rychlost mutace. Vzhledem k jejich bialelické povaze disponují nízkou diskriminační hodnotou, pokud ale kombinujeme velké množství SNP, může být tato hodnota vyšší (Wilson-Wilde, 2010).

Testování jednonukleotidových polymorfismů má řadu výhod. Jednou z nich je výskyt variací většinou jen jednoho páru bází. Cílová sekvence pro analýzu je tedy relativně krátká, což umožňuje využít analýzu pro úspěšnou identifikaci degradovaných vzorků (Tobe a Linacre, 2010). SNPs mohou být také přímo použity k identifikaci druhů, bez nutnosti úplného sekvenování, za použití mnoha technik, které jsou nákladově efektivnější (Ogden a kol., 2009). Hlavním přínosem je ale pravděpodobně schopnost rozlišit DNA ve směsi vzorků. Tobe a Linacre (2010) ale poukazují na fakt, že tuto skutečnost není možné využít při posuzování směsí srsti, lebek nebo lastur. Nicméně užitečné by to mohlo být zejména v případě identifikace tradičních léčivých přípravků (TCM), kde může být v jednom vzorku přítomno mnoho druhů. Např. v částech jihovýchodní Asie se běžně distribuují produkty, které údajně obsahují jeden nebo více druhů uvedených v příloze CITES (levhart, tygr, medvěd, jelen, kabar apod.). Je velmi pravděpodobné, že v takovémto případě bude DNA z některého z těchto druhů přítomna pouze ve stopovém množství, což by nahrávalo použití právě SNPs. Nicméně problém nastává v okamžiku, kdy budou vzácné druhy nahrazeny těmi, které nejsou na seznamu CITES. Je běžnou praxí totiž např. tygří kosti nahrazovat kravskými apod. (Tobe a Linacre, 2010).

Detekovat jednonukleotidové polymorfismy v genomu studovaného organismu lze buď experimentálně, nebo *in silico* s použitím sekvenčních databází. Pro organismy u kterých není známa sekvence genomu, se nejčastěji využívá databází tzv. EST (expressed sequence tag) sekvencí, které pocházejí z exprimované části genomu a jsou tak obohaceny o genové oblasti (Christelová, 2011). V experimentálním přístupu můžeme jmenovat různé metody např. přímé sekvenování

či AFLP a RFLP, kdy převádíme jiný typ markeru na SNP pomocí SNP specifických primerů (Christelová, 2011).

Způsobů stanovení genotypu pomocí SNP markerů je rovněž několik. Christelová, (2001) zmiňuje např. alelově specifickou AS-PCR, kdy za použití speciálních primerů dochází k amplifikaci pouze jedné z variant. Dalším způsobem může být prodloužení specifického primeru o jeden nukleotid v místě SNP, který označíme pomocí fluorescence. Následně podle tohoto značení identifikujeme konkrétní variantu SNP. SNP mohou být analyzovány také pomocí pyrosekvenování (Wilson-Wilde, 2010). Dle Wilson-Wilde (2010) může být k detekci SNPs kombinována i real-time qPCR-HRM k tvorbě rychlé a efektivní analýzy, aniž by bylo nutné použít gelovou elektroforézou.

Nutnost použití specifických primerů je pravděpodobně největší nevýhodou této metody. Pro každý testovaný druh je potřeba konkrétní DNA primer a v případě, že jej neznáme, pak nebude detekován. Proto bychom měli do testu zahrnout všechny potenciální druhy, které jsou s největší pravděpodobností ve směsi přítomny. Nejideálnější je tato metoda pro jasně definovanou skupinu druhů (Tobe a Linacre, 2010). Aby byl test SNP co nejefektivnější, musí pracovat navíc všechny primery při teplotách, při nichž mají podobné vazebné afinity (Tobe a Linacre, 2010).

#### • ITS region

Ribozomální RNA genový klastr se skládá ze sedmi částí: 5' external transcribed spacer, 18S rDNA exon, ITS region 1 (ITS1), 5.8S rDNA exon, ITS region 2 (ITS2), 28S rDNA exon a 3' external transcribed spacer. rDNA exony jsou vysoce konzervativní napříč eukaryotickými organismy, ale regiony ITS se liší v délce v důsledku bodových mutací a inserce či delece bází DNA. ITS1 a ITS2 jsou nejčastěji používané jaderné markery pro fylogenetické analýzy u mnoha eukaryotických skupin včetně většiny rostlinných čeledí. Mezi výhody jejich použití patří: 1) snadná amplifikace vzhledem k vysokému počtu kopií genových klastrů, 2) použití vysoce konzervativních primerů a nízkonákladových metod 3.) silná variabilita mezi blízké příbuznými druhy (Edger a kol., 2014).



Snad nejčastěji se k identifikaci využívá mitochondriální DNA (viz Obr. č. 14). Důvodů je hned několik. Předně je mnohem jednodušší ji získat z vysoce zpracované a degradované tkáně, jelikož mitochondrie jsou přítomny v buňce ve více kopiích. Disponují navíc vlastní tuhou membránou s vysokým obsahem bílkovin, která je chrání před poškozením. Doba vývoje metod je také obvykle podstatně kratší, z důvodu existence univerzálních mtDNA primerů, které jsou k dispozici pro amplifikaci informativního segmentu mtDNA pro celou řadu taxonů (Alac a kol., 2010). Wilson-Wilde (2010) jako negativum použití zmiňuje, že analýza je časově náročná a nákladná, především vzhledem k mnoha opatřením nutných k minimalizaci kontaminace (ke které může dojít právě díky existenci více než 1000 kopií na buňku). Vzorky by měly být analyzovány jeden po druhém za důkladného čištění. Nicméně takovýto proces je velmi zdoluhavý. V mnoha zemích je tedy mtDNA analyzována dvakrát za uvedení souhlasných výsledků. Zanedbatelný není ani výskyt heteroplasmie<sup>4</sup>, kde může být vidět více než jedna alela v pořadí na určitém místě a v některých případech může jedinec zobrazovat různé alely v určitém místě v závislosti na testovaném biologickém materiálu. Tento fakt vede k problémům při výkladu, pokud se jedná např. o směsi vzorků. Statistická síla mtDNA navíc není tak vysoká jako u jaderné DNA. Mnoho profilů je v některých populacích relativně běžných vzhledem k přímé dědičnosti mtDNA podél mateřské linie a hodnota i vzácných typizací je omezena velikostí dostupných databází.

Úspěšná identifikace závisí na izolaci a analýze markerů, které ukazují rozdíly mezi druhy, ale také jsou obvykle v rámci druhu konzervovány. U živočichů jsou za těchto podmínek nejčastěji používány cytochrom b a cytochrom c oxidázy 1 (COI), neboť jejich rychlost mutace se zhruba shoduje s rychlostí evoluce druhů (Ogden a kol., 2009).

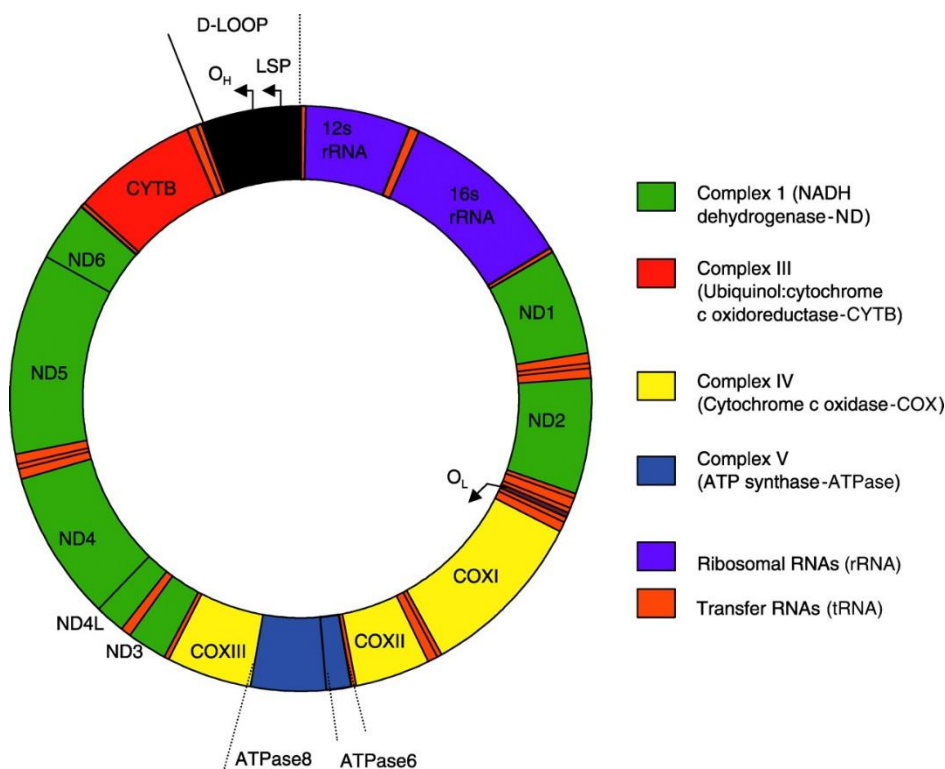
Výsledná sekvence mitochondriálních lokusů získaná z předložených vzorků musí být poté porovnána s referenční sekvencí DNA. Za tímto účelem byly vytvořeny DNA databáze, jako GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), BOLD (<http://www.boldsystems.org/index.php/databases>) apod. V mnoha případech byla GenBank obrovským přínosem, protože představuje rozsáhlé úložiště sekvenčních dat. U druhů které, jsou zastoupeny v takovýchto veřejných databázích, můžeme běžné

---

<sup>4</sup> Stav, kdy buňka obdrží směs normálních a mutovaných mitochondrií.

narazit na 100% shodu mezi neznámým vzorkem a referenčním druhem. Nicméně, vzhledem k sekvenčním variacím v rámci druhů, nemusíme vždy pozorovat přesný soulad a výsledkem může být i identifikace druhů na základě např. 98,5% shody (Ogden a kol., 2009). Nevýhodou, kterou je třeba si uvědomit je omezená regulace databází, což může znamenat výskyt i chybných sekvencí. V takovém případě je zapotřebí zkušeného analytika s příslušnými odbornými znalostmi, aby důsledně kontroloval kvalitu dat (Johnson a kol., 2014).

K omezení vzniku nesprávné identifikace v důsledku konkrétních chyb v databázích vyvinuli Lammers a kol. (2014) aplikaci s názvem „HTS barcode checker pipeline“ pro automatizované zpracování souborů sekvencí, kdy je možné určit, zda se jedná o sekvence získané z druhů uvedených v přílohách CITES.



**Obrázek č. 14:** Savčí mtDNA je dvouvláknová molekula složená ze H (těžkého) vlákna a L (lehkého) vlákna a je velká přibližně 16,5 kb. Počátek pro H-vlákna replikaci (OH) a HSP a LSP transkripční promotory jsou umístěny v D-loop. Počátek pro L-vlákna replikaci (OL), se nachází ve vzdálenosti asi dvou třetin genomu od D-smyčky. MtDNA kóduje třináct proteinů elektronového transportního řetězce (ETC). Dvanáct genů se nachází na H-vláknu a pouze jeden gen je umístěn na L-vláknu. MtDNA má také 22 tRNA a 2 rRNA zapojených do mtDNA výroby a zpracování přepisu (St. John a kol., 2004).

- **Cytochrom b**

Cytochrom b je jeden z 37 genů uvnitř kruhového mitochondriálního genomu, který je ideální pro identifikaci druhů, jelikož vykazuje omezenou vnitrodruhovou variabilitu a mnohem větší rozdíly mezi jednotlivými druhy (Cainé a kol., 2006).

- **Cytochrom c oxidáza I (COI)**

Již v roce 2003 skupina zoologů z Guelphské univerzity v kanadském Ontariu navrhla koncept tzv. „čárového kódu života“ (DNA Barcoding of Life) jako způsob identifikace organismů vyskytujících se na naší planetě. Ideální představou bylo vytvořit jakési zařízení, do kterého bychom mohly vložit vzorek zkoumaného organismu a výsledkem by byla přesná identifikace druhu, jeho zařazení, geografické rozšíření apod. (Záveská Drábková, 2012) USA s Japonskem údajně již navrhlo kufříkový DNA analyzátor (DNA mobile unit), který byl testován v terénu a je schopen poskytnout výsledky do 25 min. (Říhová, 2014; <http://phys.org/news/2012-11-nec-dna-nearly-instant-results.html>). Nicméně produktem snažení je oficiálně prozatím veřejně přístupná on-line databáze, která umožňuje jednoznačné srovnání druhů založené na digitální identifikaci, která je mnohem přesnější než dosud používaný analogový postup určování pomocí slov, tvarů a barev.

V rámci tohoto projektu vzniklo v květnu 2004 Konsorcium pro Barcode Life (CBOL), které nyní zahrnuje více než 120 organizací ze 45 zemí. CBOL je iniciativa podporující rozvoj mezinárodních výzkumných aliancí potřebných k vybudování „knihovny čárových kódů“ pro všechny eukaryotní organismy na Zemi, v průběhu příštích 20 let (Ratnasingham a Hebert, 2007).

Jako nejvhodnější oblast pro identifikaci byla vybrána "Folmer oblast" na 5' konci cytochromu c oxidázy I pro téměř všechny skupiny vyšších živočichů. U většiny je dlouhá 648 nukleotidových párů bází a lemována oblastmi konzervovaných sekvencí, což napomáhá její poměrně snadné izolaci a analýze. Rostoucí počet studií ukázal, že sekvenční variabilita u COI je velmi nízká (obvykle méně než 1 až 2%), a že sekvence i blízce příbuzných druhů se liší o několik procent, což umožňuje identifikovat druhy s vysokou jistotou. Pro ty skupiny, ve kterých je COI schopen určit rozdíly na úrovni druhu, CBOL doporučuje použití přídatné oblasti genu. V některých skupinách, však COI není efektivním markerem a je nutné použít jinou standardní oblast. Ve všech případech je však projekt DNA čárových kódů založen na použití

krátkého regionu, který umožňuje cenově efektivní identifikaci druhu (<http://barcoding.si.edu/Originalindex.html>).

- **Úseky 12S a 16S rDNA**

Mitochondriální 12S a 16S rDNA byly většinou použity ve studiích zaměřených na vyšší kategoriální úrovně, jako je např. kmen nebo čeleď, nicméně užitečné byly i při odvozování středně dlouhé doby divergence. Gen 16S rRNA kóduje u živočichů velké ribozomální podjednotky v mitochondriích (mt LSU), a byl široce používán k prozkoumání fylogenetických vztahů u členovců na většině úrovních (Panday a kol., 2014).

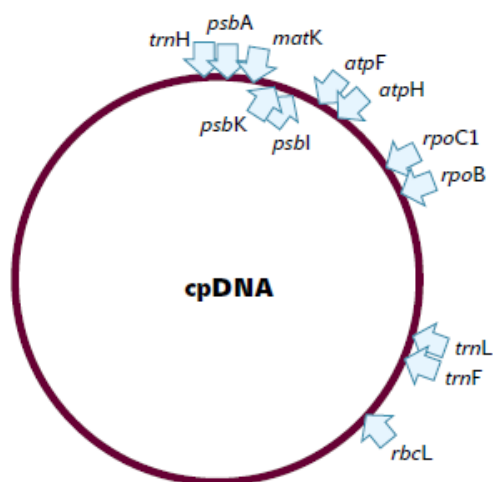
- **Kontrolní region (CR)**

Kontrolní region (CR) neboli D smyčka (D- loop) má u člověka dvě hypervariabilní oblasti (HV1 a HV2) s centrální oblastí umístěnou mezi nimi. Na D smyčku se váží proteiny zodpovědné za replikaci a transkripci. Nicméně u zvířat se CR skládá ze tří domén, včetně domén ETAS (rozšířené spojené terminační sekvence), centrální domény a domény CSB (konzervovaný sekvenční blok). Nicméně např. u tygra byl rozdělen do pěti částí: hypervariabilní oblast I (HVI), opakovací sekvence 2 (RS 2), konzervovaná kontrolní oblast (CCR), opakovací sekvence 3 (RS 3), a hypervariabilní (HVII ) oblast II (Panday a kol., 2014).

CR se klene mezi tRNA<sup>Phe</sup> a tRNA<sup>Pro</sup> geny a obsahuje iniciační místa pro transkripci obou řetězců. Tato oblast je obvykle považována za nejrychleji se rozvíjející část genomu a z tohoto důvodu se široce používá intra- a inter specifických fylogenetických studiích. To je výhodné v blízkce příbuzných liniích, ale pro identifikaci druhů ne příliš, z důvodu zpětné a paralelní mutace (Panday a kol., 2014).

Senzace v podobě čárového kódu (DNA barcoding) oslovila i botaniky. Nicméně schopnosti identifikace daného lokusu pomocí čárového kódu se u rostlin ukazují mnohem složitější než u živočichů. Rostlinné genomy jsou totiž komplexnější a hranice mezi jednotlivými druhy hůře definovatelné. COI např. není možné využít, protože rostlinný mitochondriální genom (viz Obr. č. 15) je nedostatečně mezidruhově variabilní. Jako vhodná alternativa byl vybrán genom chloroplastů. Chloroplastová DNA se totiž v buňce vyskytuje též ve více kopiích (Záveská Drábková, 2012). Na základě této skutečnosti doporučilo CBOL dvě kombinace markerů **rbcL** (ribuloso-1,5-bisfosfátkarboxyláza) a **matK** (maturáza K) jako pragmatické řešení kompromisu mezi univerzálností, kvalitou sekvence, mírou diskriminace, a požadovanými náklady (Maia a kol, 2012). Oba se běžně používají ve fylogenetických studiích rostlin. Celkem bylo úspěšně testováno 7 úseků (geny *matK*, *rbcL*, *rpoB* a *rpoC1*, nekódující úseky *atpF-atpH*, *trnH-psbA* a *psbK-psbI*) pro 400 druhů vyšších rostlin a nejvyšší rozlišovací schopnost měly nekódující oblasti *psbK-psbI* a *trnH-psbA* (68 a 69 % správně určených druhů), dále geny *matK* (66 %), *rbcL* (61 %) následované genem *rpoC1* (43%). Při větším počtu zvolených lokusů vzrostla i rozlišovací schopnost (Záveská Drábková, 2012).

Celá situace ovšem není tak jednoduchá. V různých taxonomických skupinách je totiž schopnost diskriminace daných markerů různá. Faktory, které mohou ovlivňovat variabilitu úseků, jsou stupeň hybridizace, polyploidie, typ rozmnožování rostliny, životní historie druhu či historie druhu jako takového (Záveská Drábková, 2012).



**Obrázek č. 15:** Diagram kruhové DNA chloroplastu puškvorce obecného (*Acorus calamus*) znázorňuje rozmístění úseků používaných pro DNA barcoding (Záveská Drábková, 2012)

Na problémy zmiňované Záveskou Drábovou (2012) upozorňuje i kolektiv autorů Maia a kol. (2012), který testoval účinnost navrhovaných markerů v identifikaci pro 46 vzorků z čeledi *Bromeliaceae*. Přestože autoři získali kvalitní sekvence s navrhovaným primery, úspěšnost diskriminace druhů byla v datovém souboru pouze 43,48%. Ani s použitím doplňkového lokusu (tak jak je doporučováno), trnH-psbA nevzniklo významné zlepšení (pouze 44,44%).

Vysvětlení můžeme spatřovat např. v nejasných hranicích mezi druhy. Taxonomii skupiny navíc komplikuje mezidruhová hybridizace, výskyt pohlavního i nepohlavního rozmnožování a druhová divergence (Maia a kol., 2012).

#### **4.1.2.3 Technika založená na PCR kvantifikaci v reálném čase**

Oproti tradiční PCR, kdy je konečný produkt (amplikon) detekován až po ukončení reakce, kvantitativní PCR umožňuje stanovit tvorbu produktu v průběhu reakce, a to i v raných fázích. Právě měření kinetiky v brzkých fázích reakce představuje zásadní výhodu v porovnání s tradiční PCR (Hrstka a kol., 2014).

Vysoce citlivý, druhově specifický real-time PCR test byl vyvinut např. pro detekci a kvantifikaci mitochondriální DNA z vysoce zpracovaných vzorků *Loxodonta africana*, *Elephas maximus* a *Mammuthus primigenius*. Tento test je užitečný zejména tam, kde nenalzáme žádné charakteristické morfologické znaky k identifikaci živočišného druhu. Pomocí druhově specifické *TaqMan* sondy zaměřené na oblast mitochondriálního cytochromu b, vznikl test, který lze použít k pozitivní identifikaci vzorků obsahujících DNA slona, nebo mamuta rychleji a efektivněji než tradiční metody sekvenování (Wozney a kol., 2012).

Závěry studie ukázaly, že real-time PCR představuje rychlou a nákladově efektivní metodu. Na rozdíl od tradičních způsobů identifikace slonoviny, může být potenciálně použita i k určování druhů ze všech sloních tkání, včetně kůže a srsti. Pozitivní výsledky navíc lze získat z malého vzorku za poměrně krátkou dobu. Kratší doba zpracování zvyšuje váhu výsledků, jelikož se snižuje možnost potenciální kontaminace, stejně jako výrazně klesají náklady spojené s analýzou DNA (Wozney a kol., 2012).

## 4.2 Konkrétní aplikace molekulárních markerů ve *wildlife crime*

### 4.2.1 Identifikace druhu

Běžnou dříve používanou identifikační metodou byla Ouchterlonyho dvojitá difúze, která funguje na principu reakce protilátky (antigenu) v gelovém prostředí. Tato technika byla např. aplikována při detekci medvědí žluči používané v tradiční čínské medicíně (TCM), kdy světová společnost na ochranu zvířat (WSPA) vyvinula imunotest pro zjišťování medvědího proteinu ve výrobcích, které údajně tento biologický materiál obsahují (Tobe a kol., 2010). Nicméně v důsledku míry ztráty biologické aktivity proteinů a úzkých parametrů pro optimální detekci je tento test ve své aplikaci značně omezen. Kromě toho je nutným předpokladem pro použití této metody dostupnost specifických antigenů, což znamená, že metoda je k dispozici pro velmi omezený počet druhů (přibližně 10). Pro srovnání a následné vyhodnocení jsou navíc třeba též kontrolní vzorky krve pro každý druh (Wilson-Wilde, 2010).

Z těchto důvodů je v současnosti stále větší pozornost věnována metodám založených na analýze DNA a vývoji druhově specifických markerů.

V následujícím přehledu jsou uvedeny metody molekulárních markerů, které jsou nebo byly používány pro identifikaci volně žijících organismů v kontextu *wildlife crime*.

Moore a kol. (2003) zvolili **RFLP** markery pro identifikaci vajec a masa mořských želv (identifikováno 11 z 12 předložených vzorků). Poukazují na to, že technika je velice úsporná a že v tomto případě nebyly zjištěny žádné nové RFLP haplotypy. Pokud by se tak stalo, zjištění by mohlo být považováno za neprůkazné a bylo by nutné pro přesvědčivější identifikaci přistoupit k sekvenování.

**AFLP** profilování bylo použito ve *wildlife* např. pro identifikaci druhů zákonem chráněných sov a jejich kříženců (Alacs a kol., 2010), kdy autoři zkoumali možnost konkurence puštíka proužkovaného (*Strix varia*, Barton 1799) s puštíkem západním (*S. occidentalis caurina*, Merriam 1898), který je již podle amerického zákona o ohrožených druzích (ESA) veden jako ohrožený. Vzhledem k běžnému křížení obou sov byla potřeba forenzní identifikace jejich kříženců značná. Autoři použili mitochondriální kontrolní oblast DNA a právě zmíněnou metodu analýzy AFLP k posouzení mateřského a biparentálního genového toku v procesu hybridizace. Sekvence mitochondriální DNA ukázala mezi oběma druhy značné rozdíly (13,9%).

Bylo také patrné, že vytvořily dva odlišné klady bez známek předchozí introgrese<sup>5</sup>(Haig a kol., 2004).

**Cytochrom b** využil např. Barker a kol. (2014) k identifikaci několika ohrožených druhů velryb, které byly uloveny v kontroverzním vědeckém programu v Japonsku, ale maso z těchto zvířat bylo prodáno do sushi restaurací v USA a Jižní Koreji. Konkrétně se jednalo o druhy plejtvák myšok (*Balaenoptera physalus*, Linnaeus 1758), plejtvák sejval (*Balaenoptera borealis*, Lesson 1828) a pletvák malý (*Balaenoptera acutorostrata*, Lacépède 1804). Profil plejtváka myšok prodávaného v Soulu tvořil navíc shodu s výrobky zakoupenými v Japonsku již dříve, což potvrdilo neoprávněný obchod mezi těmito dvěma zeměmi. Po identifikaci byly výrobky předány příslušným orgánům k dalšímu šetření. Nelegální obchod s chráněnými druhy velryb se zde rozšířil pravděpodobně na základě vnitrostátního povolení pro vědecký výzkum a je aktuální připomínkou o potřebě robustního sledování jakéhokoliv budoucího lovu.

Ciavaglia a kol. (2014) ve své studii popsal univerzální test založený na cytochromu b k identifikaci krajt rodu *Python*, které jsou běžně nelegálně obchodovány. Autoři čerpali z předchozích prací a na základě podobnosti uvedeného 278 bp regionu vhodného pro rozlišování druhů rodu *Morelia*, zkonstruovali identifikační test pro všechny krajty rodu *Python*. Dále byl vyvinut a validován PCR primer (MSFCB), který je schopen amplifikovat větší oblast mitochondriálního cytochromu b, čímž byla získána 300 bp sekvence zahrnující doporučenou oblast pro identifikaci kýžených druhů. Fylogenetická analýza nového většího mitochondriálního úseku produkuje vyšší statistickou podporu než menší DNA segment. Autoři poukazují na fakt, že ve většině příkladů se výsledné sekvence pouze porovnávají s referenčními. Nicméně umístění sekvenčního haplotypu do referenční sady pomocí sekvenčního sladění a následná fylogenetická rekonstrukce se zdá být výhodnější metodou, jelikož jednotlivé druhy mohou být identifikovány na základě vztahu k ostatním referenčním druhům a můžeme zde také posoudit statistickou podporu. Výsledky naznačují, že druhy které nejsou zaneseny v databázi, mohou být přesto přesně umístěny vzhledem k úzce příbuzným druhům, které se v databázi objevují.

---

<sup>5</sup> Vnesení genů jednoho druhu do genomu jiného mezidruhovým a následným zpětným křížením.



Tato metoda je vhodná pro identifikaci vzorků, které obsahují nízkou koncentraci DNA a degradovaných vzorků, s limitem detekce 30 FG a krátkých cílových amplikonů (Ciavaglia a kol., 2014).

V roce 2013 Gentile a kol. publikoval studii, ve které popsal identifikaci čtyř druhů volně žijících leguánů na Galapágách pomocí cytochromu b, které nelegálně převážel turista v roce 2012. Za účelem rychlé repatriace se kromě taxonomické identifikace stanovil i zeměpisný původ. Fylogenetická analýza sekvenčních dat přispěla k molekulárnímu označení čtyř zabavených leguánů, z nichž každý patřil k druhu *C. subcristatus*, Gray 1831. Genetická data navíc jednoznačně ukázala, že všichni jedinci pocházely z téže populace. Téměř okamžitých výsledků bylo možno dosáhnout také díky velké genetické databázi, jež je pro galapážské leguány k dispozici.

Značný přínos v boji proti nelegálnímu obchodu s ohroženými druhy představuje využití cytochromu b při identifikaci produktů ze slonoviny. Tento artikl je totiž žádaný téměř neustále a výjimkou není ani internetový prodej. Případ s využitím tohoto markeru byl publikován v roce 2013 v *Journal of Forensic and Legal Medicine*, kde autoři identifikovali opracovanou slonovinu ve formě pečeti (9 kusů), jež pachatel zakoupil přes internetovou nabídku v sousední zemi. Amplifikované produkty a nukleotidové sekvence mitochondriálního cytochromu b byly z těchto vzorků úspěšně získány pomocí PCR. Následně byly všechny sekvence seřazeny (pomocí MEGA 5.0 softwaru), z toho 8 vzorků o velikosti 357 bp a jeden vzorek o velikosti 297 bp (u něž se nepodařila získat sekvence požadované velikosti). Bylo detekováno šest haplotypů, které byly porovnány pomocí databáze BLAST. Ve výsledku sekvence získané ze sedmi vzorků vykazovaly 99,7% homologii s *L. cyclotis*, Matschie 1900. Druhá položka vykazovala 99,7% homologii s *L. africana*, Blumenbach 1797. Třetí položka se shodovala na 100% s *E. maximus*, Linneaus 1758, jež je od roku 1986 dle IUCN klasifikován jako ohrožený. *L. africana* je označován jako druh zranitelný. *E. maximus* a *L. africana* (s výjimkou populací v Botswaně, Namibii, Jihoafrické republice a Zimbabwe, které jsou zařazeny v příloze II), jsou uvedeny v příloze I mezinárodní úmluvy CITES. Zároveň s identifikací pomocí cytochromu b byl testován i zeměpisný původ vzorků s využitím D-smyčky (Lee a kol., 2009).

Nicméně identifikace druhů na základě mitochondriální DNA u *Elephantidae* ukázala jako problematická, jelikož samice po narození zůstávají se svou mateřskou skupinou, kdežto samci od nativního stáda dispergují a zprostředkovávají tak tok nukleárního genu mezi stády. Předpokládá se, že tyto rozdíly mezi pohlavími umožnily pozorovaný fylogeografický nesoulad v mito-nukleárních vzorcích. Ve forenzním vyšetřování, kde se obvykle setkáváme s malým množstvím použitelné DNA, je metoda pro identifikaci pomocí analýzy mtDNA běžnou praxí. Pokud bychom ale za těchto okolností použili nukleární markery, které jsou schopny detekovat DNA i z nízké kvality nebo množství templátu, bylo by možné získat přesnější výsledky (Lee a kol., 2013). Podobná studie s využitím cytochromu b byla autory publikována již v roce 2009, kdy využili strategii vnořené PCR amplifikace. Úspěšnost identifikace (z celkového počtu 382 zkoumaných vzorků) byla v konečné fázi 84.3%, z toho 97,9% zabavených vzorků slonoviny pocházelo z afrických druhů slonů (Lee a kol., 2009).

Stejně žádanou komoditou jako slonovina jsou nosorožčí rohy v jakékoliv podobě (viz Kapitola 2). Určitá DNA sekvence (v tomto případě konkrétně 402 bp fragmentu cytochromu b) může nejen pomoci při identifikaci neznámého vzorku, ale dokáže objasnit i fylogenetické vztahy jednotlivých druhů (Hsieh a kol., 2003)

Jedna z prvních studií kanadského zoologa Paula Heberta ukázala, že je pomocí **cytochrom c oxidázy I** můžeme rozeznat všech 260 ptačích druhů, které byly do studie zařazeny. Mezi dalšími skupinami, kde je COI vhodným markerem, můžeme jmenovat ryby a motýli. U skupin s nízkou sekvenční variabilitou (např. koráli a mořské sasanky) je určování stále problematické. Nelze u nich totiž blízce příbuzné druhy spolehlivě odlišit. Podobně je tomu s kříženci či s druhy nově vzniklými (Záveská Drábková, 2012).

Podobné závěry předkládá studie z roku 2007, která si kladla za cíl ověřit použití cytochromu c oxidázy I při genetické identifikaci druhů. Byla zkoumána reprodukovatelnost metody, heteroplazmie, smíšená DNA, koncentrace templátů, chemické ošetření, změna substrátu, podmínky životního prostředí a parametry termocyklování. Výsledky vyhledávání pomocí databází GenBank, BLAST a BOLD ukázaly, že tento marker pevně určuje druhy, tam kde existují ověřené referenční sekvence dat. Pokud v některém případě došlo k nesprávné identifikaci, příčinou byla buďto chybná referenční sekvence, se kterou byl vzorek srovnáván, nebo nedostatek specifičnosti použitého primeru. Přestože u některých vzorků bylo pozorováno selhání

amplifikace, neexistuje žádný důkaz o ekologicky vyvolané mutaci sekvencí, jež byly generovány (Dawnay a kol, 2007).

Použití univerzálních primerů je nezbytné pro retrospektivní identifikaci druhů, neboť umožňují amplifikaci v širokém taxonomickém rozmezí. Nicméně tato vlastnost komplikuje určení správných druhů, pokud jsou vzorky smíchány nebo kontaminovány. Výsledky testů směsí, koncentrace templátů a experimenty v oblasti životního prostředí upozorňují na případnou potřebu alternativních primerů pro použití např. k amplifikaci menších fragmentů aj. (Dawnay a kol, 2007).

Pokud bychom chtěli zmínit konkrétní použití cytochromu c oxidázy I ve *wildlife crime*, pak např. Liu a kol. (2013) mapovali druhovou skladbu trhu se žraločím masem na Tchaj-wanu. Tento ostrov se totiž pyšní 4. místem v komerčním lovu žraloků na světě, což představuje téměř 6% celosvětových údajů. Odhalení diversity žraloků zde spotřebovávaných hraje důležitou roli při plánování jejich ochrany. Vzhledem k tomu, že ploutve tvoří méně než 5% z celkové tělesné hmotnosti žraloka, a jejich těla jsou na trhu prodávány jako filé, je téměř nemožné určit druh podle morfologických znaků. Z těchto důvodů byl pro identifikaci vybrán 391 bp velký fragment mitochondriální cytochromu c I oxidázy (COI). Mezi 548 vzorky odebrané tkáně bylo podle fylogenetické analýzy zřejmých 20 hlavních klastrů, z nichž každý obsahuje jednotlivce, kteří patří ke stejnému druhu (což odpovídá 20 druhům žraloků). 80% vzorků bylo identifikováno jako *Alopias pelagicus*, Nakamura 1935, *Carcharhinus falciformis*, Müller & Henle 1839, *Isurus oxyrinchus*, Rafinesque 1810, a *Prionace glauca*, Linnaeus 1758. Tyto druhy zde mohou být tedy silně konzumovány. Přibližně 5% tkání použitých v této studii byly určeny jako druhy uvedené v příloze CITES II, včetně dvou druhů rodu *Sphyrna*, *C. Longimanus*, Poey 1861) a *Carcharodon Carcharias*, Linnaeus 1758.

Výsledky identifikace pomocí genetických čárových kódů jsou podobné seznamu druhů lovených během roku. Deset z 11 uvedených dominantních druhů jsou na seznamu identifikovaných, výjimkou je *Carcharhinus obscurus*, Lesueur 1818. Nicméně, podle dřívějších studií bylo zjištěno, že *C. obscurus* je geneticky podobný *C. galapagensis*, Snodgrass & Heller 1905. Je zde tedy vysoká pravděpodobnost, že jsou tyto dva druhy snadno zaměňovány (Liu a kol., 2013).

Jiný druh uplatnění nalézá COI v identifikaci muzejních vzorků. Obecně je obtížné rychle a levně obnovit sekvence čárových kódů muzejních exemplářů, které

jsou více než deset let staré, protože jejich DNA je silně se degradována. V důsledku toho, jak již bylo řečeno, tento projekt v současné době zaměřuje na analýzu nově odebraných vzorků nebo těch, které byly chráněny před degradací zmrazením, etanolem, nebo jinou konzervační metodou. Nicméně, bude nakonec nutné, sekvence z čerstvých vzorků porovnat se sekvencemi z milionů starších muzejních exemplářů. Takové srovnání je důležité, odhalujeme-li pomocí barcodingu několik kryptických druhů v rámci těch, které byly považovány za jeden druh, a není morfologicky zřejmé, který z nich odpovídá holotypu (Hajibabaei a kol., 2006).

Jelikož se jednalo o staré degradované vzorky, autoři použili kratších sekvencí pro identifikaci takových exemplářů (tj. ~100 bp - s jedním PCR cyklem). Krátké čárové kódy byly účinné při identifikaci exemplářů úzkých taxonomických skupin, což potvrzuje jejich uplatnění v situacích, kdy jsou kompletní čárové kódy příliš drahé. Avšak volba délky a polohy krátkých sekvencí je důležitá pro jejich schopnost rozlišovat mezi druhy (Hajibabaei a kol., 2006).

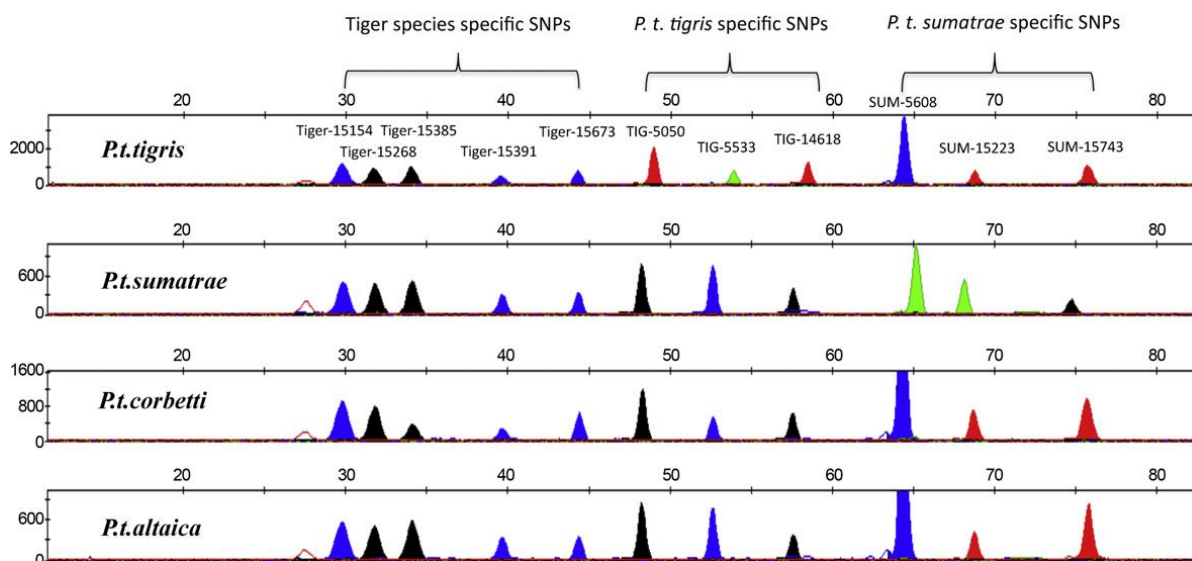
Jak již bylo zmíněno, Konsorcium navrhlo i pro skupiny, ve kterých je COI schopen určit rozdíly na úrovni druhu použití ještě další přídavné oblasti genu. Tohoto doporučení tedy využily některé následující studie.

Např. D'Amato a kol., (2013) kombinuje pro identifikaci autentičnosti masa na africkém trhu cytochrom c oxidázu 1 a cytochrom b. Byly získány DNA sekvence ze 146 vzorků (14 z hovězího a 132 z divokých zvířat), k následnému srovnání byla využita databáze BLAST. Kombinované použití markerů se při identifikaci druhů osvědčilo. Vzorky masa z divokých zvířat se ukázaly být ze 76,5 % nahrazeny řadou domácích druhů (skot, kůň, prase, ovce aj.). Pravděpodobně nejvýraznější omezení ovlivňující všechny metody včetně této je neúplné zastoupení druhů a taxonů v databázích. Přesto že Afrika vykazuje největší rozmanitost kopytníků na planetě, mnoho druhů je slabě zastoupeno v databázích.

Případ podobný předchozímu bylo testování výskytu nepravého černého kaviáru na trhu v New Yorku a následné vyhodnocení, zda úmluva CITES přispěla k omezení nelegálního obchodu s tímto artiklem (vzorky byly odebrány v období 1995-1996 a následně v době fungování CITES 2006- 2008). Využita byla ovšem kombinace markerů cytochromu b a D-smyčky (D-loop). Výsledky ukázaly pozitivní výsledek funkce CITES jako nástroje k omezení nelegálního obchodu s kaviárem (z původních 19% klesl v období 2006- 2008 výskyt na 10%), Nicméně tato metoda

nesprávně detekuje hybridy, které jsou ve volné přírodě vzácní, ale jejich výskyt se zvyšuje s odchylkami v oblasti životního prostředí (např. říční přehrady) a s vypouštěním nepůvodních druhů, které je v akvakultuře běžné. K celkovému zdokonalení metody by tedy mohlo přispět zahrnutí markerů pro označení kaviáru z hybridních druhů, testování původu populací a odlišení jedinců z farmového chovu od volně žijících (Phaedra a kol., 2012).

Shukla a kol. (2001) zvolil jako marker k molekulární a fylogenetické identifikaci muntžaka sudského (*Muntiacus muntjak*, Zimmermann 1780) **12S rDNA**. Částečná sekvence **16S rRNA** byla pro změnu použita k identifikaci druhů krokodýlů v Indii (Panday a kol., 2014). Bylo též prokázáno, že např. u druhů obojživelníků je pro identifikaci vhodnější sekvence 16S rRNA než COI. Amplifikace pro 16S byla v podstatě čerstvých a dobře zachovalých vzorků madagaskarských žab 100%, zatímco různé kombinace COI primerů měly nižší úspěšnosti. Navíc vykazoval vysokou variabilitu mezi obojživelníky a to jak na úrovni skupin tak i úzce příbuzných druhů (Vences a kol., 2005). Taktéž **SNPs** mají široké uplatnění. Kitpipit a kol. (2011) je použil k identifikaci a ověření jedenácti tygřích poddruhů. Byly získány mitochondriální DNA sekvence čtyř z pěti dochovaných domnělých poddruhů tygra a kombinovány se sekvenčními daty ze 492 jedinců a 349 dalších druhů savců. Celkem bylo identifikováno jedenáct SNP lokusů, z toho šest pro tygří poddruhy. Tři byly specifické pro *Panthera tigris sumatrae*, Pocock 1929 a tři pro *Panthera tigris Tigris*, Linnaeus 1758. Dalších pět bylo identifikováno jako haplotypy specifické pro všechny tygří poddruhy, jež nejsou k dispozici u jiných druhů savců. I když některé druhy savců v určitém SNP vykazují stejné nukleotidové báze jako tygři, lze je rozlišit pomocí těch zbývajících. V konečném důsledku byl test schopen spolehlivě identifikovat 15 vzorků potvrzených jako tygr a zařadit je ke kým poddruhům (viz Obr. č. 16).



Obrázek č. 16: Elektroforeogram ukazuje SNP čtyř existujících tygřích poddruhů (*P. t. Tigris*, *P. t. Sumatrae*, *P. t. Corbetti*, a *P. t. Altaica*) (Kitpipit a kol., 2011).

#### 4.2.2 Identifikace geografického původu

V mnoha případech obchodu s ohroženými druhy živočichů a rostlin je třeba stanovit zeměpisný původ. To lze pouze v případě, že známe genetickou strukturu v oblasti zájmu za použití fylogeografie nebo metod přiřazujících populace. Fylogeografické studie posuzují geografické rozložení genetických linií na základě specifických mtDNA haplotypů spojených s širokými zeměpisnými regiony (Alacs a kol., 2010).

Jemnější genetické rozdíly mohou být detekovány pomocí přidělování populace srovnávané s fylogeografickou analýzou. Tyto metody jsou založeny na alelických rozdílech hypervariabilních nDNA genetických markerů mezi skupinami jedinců (populace). Použity mohou být např. k odhadu pravděpodobnosti, že jedinec patří do každé z těchto domnělých populací, načež je pak přidělen k té nejpravděpodobnější. Naopak, vylučovací metodou můžeme zamítnout hypotézy, že vzorek pochází z určité konkrétní populace. Hypervariabilní markery nejčastěji používané pro přidělení nebo vyloučení populace jsou **AFLP** a **mikrosatelity** (Alacs a kol., 2010).

U populací v nichž nedochází k výměně genetického materiálu, se postupně hromadí genetické rozdíly v průběhu evoluce až do bodu, kdy členové izolovaného regionu, sdílí stejné typy genetického markeru (alely) v rámci své populace, ale mají

různé alely ve srovnání s ostatními. Markery, které vykazují tyto diskrétní změny, jsou velmi užitečné pro identifikaci populace. U velmi odlišných populací může být použita také již zmíněná hypervariabilní kontrolní oblast mtDNA, nebo **D-smyčka** (Ogden a kol., 2009).

#### 4.2.3 Individuální identifikace

Identifikace jednotlivých živočichů a rostlin je zpravidla pro ochranu ohrožených druhů méně významná, nicméně v otázce např. pytláctví, může být nutná, pokud je třeba prokázat, že roh, kel, kosti nebo kůže pochází z konkrétního upytlačeného jedince. Může také poskytovat ověření krádeže zvířat apod. (Ogden a kol., 2009).

Pro identifikaci jednotlivců můžeme použít **analýzu mikrosatelitů (SSR, STR, resp. PCR VNTR)**, což byla původně metoda aplikována na kódující oblasti DNA, nicméně se brzy rozšířila i na ty nekódující. Oproti systému RFLP-VNTR má mnoho výhod, včetně možnosti získat výsledky i z malého množství DNA (méně než 5 ng ve srovnání s více než 50 ng pro analýzu RFLP) a dokonce i z degradovaných vzorků. Proces je také rychlejší a cenově výhodnější.

Pro identifikaci jednotlivců jsou užitečné, protože pro každého jedince je profil repetitivních sekvencí – satelitů/mikrosatelitů unikátní. SSR/STR jsou hypervariabilní repetice, které převládají v genomu a jsou snadno amplifikovány pomocí PCR. Vzhledem k malé citlivosti na degradaci vzorků, jsou ve *wildlife crime* velmi užitečné. Spolehlivé výsledky můžeme získat již z méně než 2 ng.

Analýza mikrosatelitů disponuje ještě jednou velkou výhodou oproti klasické analýze VNTRs. Pomocí tzv. "multiplexní" PCR může být dosaženo analýzy vícenásobných mikrosatelitních lokusů v jedné reakční nádobě, pokud jsou použity sady primerů, které fungují za stejných podmínek. Tím se výrazně snižuje celkový čas analýzy a náklady. Před objevem reakce tohoto typu bylo nutné provést pro analýzu více mikrosatelitových lokusů každou reakci zvlášť (pokud bylo třeba zanalyzovat 10 lokusů, bylo nutné provést 10 PCR). S multiplexní PCR lze analyzovat vše najednou. Čím vyšší je navíc počet lokusů, tím vyšší je rozlišovací výkon systému a silněji pak rozlišuje mezi jednotlivci (Wilson-Wilde, 2010).

#### 4.2.4 Určování příbuznosti

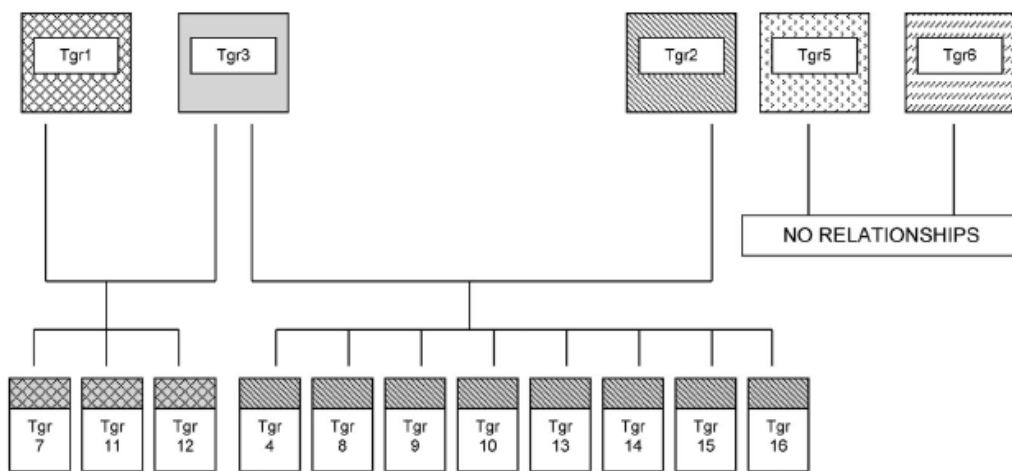
Přínos identifikace úrovně příbuznosti spočívá především v diferenciaci mezi exempláři chovanými v zajetí a volně žijícími zvířaty získanými nelegální cestou.

Při této identifikaci využíváme skutečnosti, že genetické markery se dědí z generace na generaci, což nám umožňuje použít DNA profily k ověření příbuzenských vztahů mezi potencionálními rodiči a potomky. Alely přítomné v profilu jednotlivce musí být také přítomny u domnělých rodičů. Jsou-li pozorovány alely, které neodpovídají těm v rodičovských profilech, pak je možnost jednotlivce jako jejich potomka vyloučit. Tento způsob vyvrácení příbuznosti nevyžaduje data z širší populace a je tedy relativně snadno použitelný. Nicméně, výsledky tohoto vylučovacího způsobu nejsou tak definitivní jako sestavení individuálního profilu k vyloučení příbuznosti a vyžadují další výklad. Základem variability genetického markeru je totiž výskyt dědičných mutací, kde se změna 1 alely přenáší mezi další generace. Takováto událost se sice zřídka kdy vyskytne, nicméně stále tato možnost existuje, což může způsobit nesoulad mezi profily rodičů a potomků. V ideálním případě by tedy u každého markeru měla být do analýzy rodičovství zahrnuta rychlost mutace. Řada systémů profilování forenzní DNA byly vyvinuty speciálně pro ověření rodičovství (Ogden a kol., 2009).

K analýze mateřské linie můžeme dle Wilson-Wilde (2010) použít **mtDNA**, jelikož jak již bylo řečeno, se dědí pouze od matky jedince. Naproti tomu **markery samčího pohlavního chromozomu** mohou být použity pro testování otcovství. V poslední době vzniká řada **STR markerů**, které byly vyvinuty za tímto účelem. STRs chromozomu Y jsou analyzovány stejným způsobem jako jaderné STRs. Hlavním problémem výsledků je ale nižší síla diskriminace z důvodu nižší úrovně variability (na rozdíl od jaderných STR).



Úspěšně byla tako metoda využita v případě prokázání nelegálního obchodu s želvami *Testudo graeca*, Linnaeus 1758. Šest jedinců bylo údajně ukradeno soukromému chovateli a následně údajným pachatelem nabízeno k prodeji na internetovém inzertním portálu. Želvy byly tedy zabaveny a k určení genotypu použit soubor 14 autosomálních mikrosatelitních lokusů. Do testu bylo zahrnuto i deset jedinců, které poškozený legálně vlastnil. Analýza spolehlivě prokázala vztahy mezi vlastněnými a ukradenými želvami (viz Obr. č. 17). Příbuznost byla identifikována u čtyř ze šesti ukradených želv (Mucci a kol., 2014).



**Obrázek č. 17:** Rodokmen z želv z této studie. Tři jedinci pocházeli od jednotlivců Tgr1 a Tgr3, zatímco zbývajících osm z Tgr2 a Tgr3. Jedinci Tgr5 a Tgr6 nevykazovali rodičovství (Mucci a kol., 2014).

## 5 Diskuse

Ačkoliv se to může zdát překvapivé, Česká republika je i přes svou velikost významnou zemí zapojující se do nelegálního obchodu s ohroženými druhy organismů. Z tohoto důvodu přistoupila 1. 1. 1993 (respektive 28. 5. 1992 ještě jako bývalá ČSFR) k úmluvě CITES, jejímž cílem je ochrana volně žijících druhů živočichů a planě rostoucích rostlin, které jsou ohroženy vyhubením zejména z důvodu jejich nadměrného využívání pro komerční účely. Nicméně abychom mohli cokoli efektivně chránit, musíme to nejdříve naprosto spolehlivě determinovat.

Tato práce se primárně zabývá identifikací pomocí molekulárních metod, avšak nemohu si odpuště, zařadit kapitolu pojednávající i o metodách, které molekulární markery nevyužívají. Důvodů je hned několik. Zaprvé tyto techniky stály v prvopočátku samotné identifikace, ještě před tím než byla samotná DNA objevena. Díky této dlouhotrvající historii se podařilo nashromáždit obrovské množství referenčních sbírek, ať míváme herbářové, či preparované položky nebo např. i osteologický materiál. V neposlední řadě, pokud to lze, a disponujeme-li potřebnými znalostmi, může být pro nás poměrně jednoduché exemplář identifikovat na základě morfologických znaků.

Identifikace pomocí molekulárních metod je dnes jedním z nejnovějších a nejúčinnějších trendů, které napomáhají objasňování zločinů páchaných na volně žijících organismech (wildlife crime), nicméně musíme si položit otázku, zda je to vždy třeba. Obzvláště zaměříme-li se na skladbu nelegálního obchodu s komoditami podléhajícími CITES v České republice, který hodnotím v druhé kapitole.

Z uvedených dat si můžeme povšimnout, že skladba trhu s těmito komoditami je víceméně podobná s tím, že se konkrétní čísla mění, pravděpodobně na základě mnoha faktorů (sezóna, momentální trendy apod.), které nejsme schopni předem odhadnout.

„Stálicemi“ mezi neživými exempláři jsou: TCM, kaviár, výrobky z plazí kůže, preparáty a části těl (kožky, kosti apod.). Mezi živými pak převážně vidíme papoušky, sovy, želvy a ostatní druhy plazů a z rostlin pak kaktusy a orchideje. Pro tyto komodity by tedy mohlo být vhodné použít některou ze jmenovaných molekulárních metod.

U TCM by bylo nasnadě využít např. markery SNPs, které jsou schopné rozlišit DNA ve směsi vzorků a to i ve stopovém množství. Nicméně problém nastává v okamžiku, kdy budou vzácné druhy nahrazeny těmi, které nejsou na seznamu CITES.

Je běžnou praxí totiž např. tygří kosti nahrazovat kravskými apod. (Tobe a Linacre, 2010).

Nevýhodu může představovat nutnost použití specifických primerů, kdy pro každý testovaný druh je potřeba konkrétní DNA primer a v případě, že jej neznáme, pak nebude detekován. Je tedy nutné do testu zahrnout všechny potenciální druhy, které jsou s největší pravděpodobností ve směsi přítomny (Tobe a Linacre, 2010).

V kombinaci s rostlinným materiálem, který se v TCM hojně vyskytuje, by byla situace ještě složitější. Pro identifikaci rostlin využíváme jiné typy markerů (matK, rbcL, rpoB apod.), jejichž diskriminační síla je v různých taxonomických skupinách odlišná. Faktory, které mohou ovlivňovat variabilitu úseků, jsou stupeň hybridizace, polyploidie, typ rozmnožování rostliny, životní historie druhu či historie druhu jako takového (Záveská Drábková, 2012).

Nicméně Říhová (2014), poukazuje na fakt, že pokud jsou produkty TCM řádně označeny (štítky se složením apod.), k zabavení a uložení pokuty je dostačující nalézt kýženou položku na etiketě a není již třeba zkoumat, zda ji preparát skutečně obsahuje.

K detekci kaviáru by bylo možno použít kombinaci mitochondriálních markerů (např. cytochrom b a D-loop), jako v případě studie Phaedra a kol. (2012). Ačkoliv tato metoda dle autorů nesprávně detekuje hybridní jedince, jejich výskyt ve volné přírodě není příliš častý.

Podíváme-li se však na určování výrobků z plazích kůží, narazíme na problém. Vyčiněné kožené výrobky totiž bývají zpravidla nevhodné pro genetickou analýzu v důsledku degradace materiálu díky chemickému zpracování během výrobního procesu (Martin v Huffman a Wallace 2011). K určování tedy nezbývá než sáhnout po metodách využívající morfologické znaky.

Artikl jako slonovina či rohy nosorožců u nás sice nejsou zcela běžné, nicméně jedná se o mezinárodní problematiku, do které je ČR výrazně zapojena. Identifikovat tento druh lze opět pomocí široce využívaných mitochondriálních markerů. Lee a kol. (2009) využil cytochromu b a k identifikaci zeměpisného původu pak D-loop. Nicméně identifikace na základě mitochondriální DNA není pravděpodobně v tomto případě šťastnou volbou z důvodu rozdílů mezi pohlavími, které jsou způsobené skutečností, že mtDNA se dědí po mateřské linii. Samice totiž po narození svou mateřskou skupinu neopouštějí, kdežto samci od nativního stáda dispergují a

zprostředkovávají tak tok nukleárního genu mezi stády. Z těchto důvodů by bylo vhodnější použít nukleární markery, které jsou schopné detekovat DNA i nízké kvality nebo množství templátu a získat tak přesnější výsledky.

Určit slonovinu můžeme i podle viditelných Schregerových linií. V CITESU jsou navíc uvedeny všechny tři druhy slonoviny. K zabavení a uložení pokuty není třeba znát její původ. Tato informace by však mohla být užitečná ke zhodnocení úspěšnosti lokální ochrany slonů. To znamená, že pokud bychom určily, že např. jedinec pochází z chráněné oblasti, lze přistoupit k příslušným opatřením. Využít k tomu můžeme např. metodu radioaktivního datování (Bell, 2011).

Výše zmiňované živé jedince lze jednoduše určit podle morfologických znaků. Pokud bychom však přesto chtěli přistoupit k molekulárním metodám, bylo by pravděpodobně vhodné zvolit některý z navrhovaných mitochondriálních markerů (COI, matK apod.).

Mnohem zajímavější je využití molekulárních metod k zjištění, zda živý konkrétní exemplář je legálně nabytý majitelem či zda je skutečně příbuzný s domnělými rodiči. V obou případech můžeme využít analýzu mikrosatelitů (STRs), díky jejich velké variabilitě mezi jedinci (Wilson-Wilde, 2010).

Jak tedy volit postup identifikace máme-li před sebou neznámý vzorek? Je třeba si uvědomit, že analýza DNA markerů nefunguje (zatím) v podobě nějaké „kouzelné krabičky“, kam vložíme vzorek a za chvíli se dočkáme výsledku. Celý proces je poměrně zdoluhavý, vyžaduje určité vybavení laboratoře a v neposlední řadě může při procesu dojít k lidskému pochybení (kontaminace během analýzy apod.). Stejně tak tomu může ale být v případě identifikace na základě metod nevyužívající molekulární markery.

Výhody určování na základě analýzy molekulárních markerů tkví především v poměrně silné validitě a schopnosti rozpoznat druh (a jiné taxonomické jednotky) i z vysoce degradovaného materiálu. Užitečné mohou být také rozsáhlé DNA databáze referenčních vzorků. Pokud bychom však chtěli nastavit plošné využívání molekulárních metod v boji proti nelegálnímu obchodu v ČR, bylo by třeba více studií zabývajících se využitím markerů v konkrétních případech aplikovatelných pro Českou republiku, ale také množství odborníků s potřebnými znalosti a kvalitně vybavené laboratoře pro tyto účely.

## 6 Závěr

V dnešní době nalézáme skutečně širokou škálu molekulárních markerů, které lze využít pro identifikaci komodit podléhajících úmluvě CITES. Dokazuje to i značné množství studií využívající jednotlivé typy nebo jejich kombinace. Nicméně nelze s určitostí říci, že by využití molekulárních metod identifikace nahrazovalo určování na základě morfologických znaků aj. Spíše se jedná o jakýsi vhodný doplněk do uceleného systému, který má značnou historii.

Díky své poloze je Česká republika též významně zapojena do nelegálního obchodu se zmíněnými artikly a příslušné orgány se musí téměř denně potýkat s ne vždy snadnou identifikací druhu apod. Využití některých molekulárních markerů by mohlo tento proces výrazně zjednodušit a zefektivnit tak i celkovou ochranu druhů uvedených v přílohách CITES.

Prvním krokem by mohlo být vymezení konkrétních případů, ve kterých zmiňované techniky uplatníme, protože jak již bylo řečeno, někdy je identifikace na základě jiných metod naprosto dostačující. Následovat by pak mohl podrobný výzkum těchto aplikací a potvrzení jejich účinnosti. Poslední by mohla být myšlenka zřízení speciální laboratoře pro účely *wildlife crime* a školeného personálu. Důležitá je také vzájemná spolupráce příslušných orgánů s odborníky, pořádání pravidelných školení a konferencí podávajících zprávy o současném stavu vývoje.

Tato opatření by nám měla pomoci efektivně bojovat proti nelegálnímu vykořisťování ohrožených druhů živočichů a rostlin.

## 7 Literatura a použité internetové zdroje:

ALACS, E., GEORGES, A., FITZSIMMONS, N. N. & ROBERTSON, J. (2010). DNA detective: A review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Sci. Med. Pathol.* **6**, 180–194

ANDERSON GS. (1999). Wildlife forensic entomology: determining time of death in two illegally killed black bear cus. *J Forensic Sci*;44(4):856–859

BAKER, C SCOTT, STEEL, DEBBIE, CHOI, YEYONG, LEE, HANG, KIM, KYUNG SEOK, CHOI, SUNG KYOUNG MA, YONG-UN HAMBLETON, CHARLES, LOUIE BROWNELL, R L FUNAHASHI, NAOKO (2010). Genetic evidence of illegal trade in protected whales links Japan with the US and South Korea. *Biol. Lett.* **6**, 647–650

BELL, L. S. (2011). Forensic science in support of wildlife conservation efforts- Morphological and chemical approaches (global trends); *Forensic Sci Rev* **23**: 29

CAINÉ, L. LIMA, G. PONTES, L. ABRANTES, D. PEREIRA, M. PINHEIRO, M. F. (2006). Species identification by cytochrome b gene: Casework samples. *Int. Congr. Ser.* **1288**, 145–147

Celní správa ČR (Praha). TISKOVÁ ZPRÁVA CELNÍ SPRÁVY ČESKÉ REPUBLIKY: Informace ze společné tiskové konference Celní správy ČR a České inspekce životního prostředí k rozkrytí mezinárodní sítě pašeráků ohrožených ptáků: *Pramenné dílo* [<http://www.celnisprava.cz/cz/tiskove-zpravy/2009/Stranky/090406-Info-k-tiskovce-CITES.aspx>]. 6. 4. 2009 [citováno 21. 2. 2015]. Dostupné z: <http://www.celnisprava.cz/cz/tiskove-zpravy/2009/Stranky/090406-Info-k-tiskovce-CITES.aspx>

CIAVAGLIA, S. A., TOBE, S. S., DONNELLAN, S. C., HENRY, J. M. & LINACRE, A. M. T. (2014). Molecular identification of python species: Development and validation of a novel assay for forensic investigations. *Forensic Sci. Int. Genet.* **16**, 64–70

COOPER, M. E. & ROSSER, A M. (2002). International regulation of wildlife trade: relevant legislation and organisations. *Rev. Sci. Tech.* **21**, 103–123

D'AMATO, M. E., ALECHINE, E., CLOETE, K. W., DAVISON, S. & CORACH, D. (2013). Where is the game? Wild meat products authentication in South Africa: a case study. *Investig. Genet.* **4**, 6

DAWNAY, N., OGDEN, R., MCEWING, R., CARVALHO, G. R. & THORPE, R. S. (2007). Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci. Int.* **173**, 1–6

- DHANYA, K. & SASIKUMAR, B. (2010). Molecular marker based adulteration detection in traded food and agricultural commodities of plant origin with special reference to spices. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* **4**, 454–489
- EDGER, PATRICK P. TANG, MICHELLE BIRD, KEVIN A. MAYFIELD, DUSTIN R. CONANT, GAVIN MUMMENHOFF, KLAUS KOCH, MARCUS A. PIRES, J. CHRIS. (2014). Secondary structure analyses of the nuclear rRNA internal transcribed spacers and assessment of its phylogenetic utility across the brassicaceae (mustards). *PLoS One* **9**, 3–9
- ENVIRONMENTAL INSPECTORATE. *CITES news- Prague*. 96. vyd. Praha: CITES Department, 2012.
- ENVIRONMENTAL INSPECTORATE. *CITES news- Prague*. 97. vyd. Praha: CITES Department, 2012.
- ENVIRONMENTAL INSPECTORATE. *CITES news- Prague*. 99. vyd. Praha: CITES Department, 2012.
- ENVIRONMENTAL INSPECTORATE. *CITES news- Prague: Seizure of two tiger skeletons in cargo shipment to Vietnam*. 104. vyd. Praha: CITES Department, 2013.
- ENVIRONMENTAL INSPECTORATE. *CITES news- Prague: Operation RHINO - case of „pseudo - hunting“ - seizure of 22 rhino horns*. 105. vyd. Praha: CITES Department, 2013
- GENTILE, G., CIAMBOTTA, M. & TAPIA, W. (2013). Illegal wildlife trade in Gallapagos: Molecular tools help the taxonomic identification of confiscated iguanas and guide their rapid repatriation. *Conserv. Genet. Resour.* **5**, 867–872
- GRIFFITHS, A. M., SIMS, D. W., COTTERELL, S. P., EL NAGAR, A., ELLIS, J. R., LYNHAMMAR, A., GENNER, M. J. (2010). Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturus batis*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**(1687), 1497–1503
- GONZALEZ, M.V. & MILLER, K.W.P. (2010) HAIRBase™. Dostupné na: <http://web.me.com/kwpmiller/HAIRbase/Welcome.html>.
- HAIG, S. M., MULLINS, T. D., FORSMAN, E. D., TRAIL, P. W. & WENNERBERG, L. (2004). Genetic identification of spotted owls, barred owls, and their hybrids: Legal implications of hybrid identity. *Conserv. Biol.* **18**, 1347–1357
- CHRISTELOVÁ, P. (2011). Analýza genetické diverzity a evoluce genomu banánovníku. Doktorská disertační práce.

MCGRAW, S. N., S. P. KEELER a J. E. HUFFMAN Forensic DNA Analysis of Wildlife Evidence. HUFFMAN, Jane E a John R WALLACE. Wildlife forensics: methods and applications. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2011, 253- 266. ISBN 9780470662595.

MEHRDAD HAJIBABAEI, M. ALEX SMITH, DANIEL H. JANZEN, JOSEPHINE J. RODRIGUEZ, J. B. W. PAUL D. N. H. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 959–964

Ministerstvo životního prostředí ČR (Praha). TISKOVÁ INFORMACE: Česká republika a pašování ohrožených druhů zvířat a rostlin: *Pramenné dílo* [<http://www-1.sysnet.cz/projects/env.ais/ais-i04-tisk.nsf/pages/5EA86D7F8CCBE367C12565310039A43D?OpenDocument>]. 15. 10. 1997 [citováno 19. 2. 2015]. Dostupné z: <http://www-1.sysnet.cz/projects/env.ais/ais-i04-tisk.nsf/pages/5EA86D7F8CCBE367C12565310039A43D?OpenDocument>

MUCCI, N., MENGONI, C. & RANDI, E. (2014). Author ' s personal copy Forensic Science International : Genetics Wildlife DNA forensics against crime : Resolution of a case of tortoise theft. *Forensic Sci. Int. Genet.* **8**, 200–202

HILLIER ML, BELL LS. (2007). Differentiating human bone from animal bone: a review of histological methods; *J Forensic Sci* 52:249

HSING-MEI HSIEH, LI-HUNG HUANG, LI-CHIN TSAI, YI-CHEN KUO, HSIEN-HUEI MENG, ADRIAN LINACRE, JAMES CHUN-I LEECORRESPONDENCE. (2003). Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene. *Forensic Sci. Int.* **136**, 1–11

HRSTKA R., KOLÁŘOVÁ T., MICHALOVÁ E., VOJTĚŠEK B. (2014). Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi Development of PCR Methods and Their Applications in Oncological Research and Practice. *Klin. Onkol.* **27**, 69–74

CHARETTE, R. (1999). CITES Identification Guide : Turtles and Tortoises. Ontario, Canada: Environment Canada

JOHNSON, R. N., WILSON-WILDE L., LINACRE A. (2014). Current and future directions of DNA in wildlife forensic science. *Forensic Sci. Int. Genet.* **10**, 1–11

KEHOE, LAURA. Meet The World's Most-Traded, Least-Known Mammal. In: *Iflscience.com* [online]. 2015 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: <http://www.iflscience.com/plants-and-animals/meet-world-s-most-traded-least-known-mammal>

KIRBY, Edited by Lorne T. DNA fingerprinting. Stockton: Macmillan, 1990. ISBN 0333540247.



- KITPIPIT, T., TOBE, S. S., KITCHENER, A. C., GILL, P. LINACRE, A. (2011). Where does this tiger come from?—A robust molecular technique for simultaneous identification of endangered species and subspecies. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* **3**, e532–e533
- KNECHT, L. (2011) The Use of Hair Morphology in the Identification of Mammals. HUFFMAN, Jane E a John R WALLACE. *Wildlife forensics: methods and applications*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 128- 143. ISBN 9780470662595.
- KUČERA JAN, MAGDALÉNA BOUČKOVÁ, ONDŘEJ KLOUČEK, ADAM KURZ, PAVLA ŘÍHOVÁ A MIROSLAVA PIKÁLKOVÁ. *Úmluva o mezinárodním obchodu ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin: základní informace se zaměřením na českou republiku a evropskou unii* [online]. 1. Praha: DRAGON PRESS, s.r.o., vydalo: Ministerstvo životního prostředí, se sídlem Vršovická 1442/65, Praha 10, www.mzp.cz, 2010[cit. 2015-02-14]. Dostupné z: [http://www.mzp.cz/osv/edice.nsf/9F55D385D64AF6ADC12576E300466C85/\\$file/OVV-CITES\\_na\\_CD\\_final\\_bez\\_orezovek\\_na\\_WEB-20100311.pdf](http://www.mzp.cz/osv/edice.nsf/9F55D385D64AF6ADC12576E300466C85/$file/OVV-CITES_na_CD_final_bez_orezovek_na_WEB-20100311.pdf)
- LEE EJ, LEE YH, MOON SH, KIM NY, KIM SH, YANG MS, CHOI DH, HAN MS. (2013). The identification of elephant ivory evidences of illegal trade with mitochondrial cytochrome b gene and hypervariable D-loop region. *J. Forensic Leg. Med.* **20**, 174–178
- LEE, J.; HSIEH, H.M.; HUANG, L.H.; KUO, Y.C.; WU, J.H.; CHIN, S.C.; LEE, A.H.; LINACRE, A.M.T. (2009). Ivory identification by DNA profiling of cytochrome b gene. *Int. J. Legal Med.* **123**, 117–121
- LIU, S. Y. V., CHAN, C. L. C., LIN, O., HU, C. S. & CHEN, C. A. (2013). DNA barcoding of shark meats identify species composition and CITES-listed species from the markets in Taiwan. *PLoS One*, **8**
- MAIA, VITOR HUGO DA MATA, CAMILA SOUZA FRANCO, LUCIANA OZÓRIO CARDOSO, MÔNICA AIRES CARDOSO, SÉRGIO RICARDO SODRÉ HEMERLY, ADRIANA SILVA FERREIRA, PAULO CAVALCANTI GOMES. (2012). DNA barcoding bromeliaceae: Achievements and pitfalls. *PLoS One* **7**, 1–6
- MARTIN, DAVID L. (2011). Identification of Reptile Skin Products Using Scale Morphology. Huffman, Jane E. Wallace John R. *Wildlife forensics: methods and applications*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, s. 160-194. ISBN 9780470662595.
- MCCLOUD, K. A. (2008). Photographic Identification Guide to Star-Patterned Tortoises. Identification Guides for Wildlife Law Enforcement No. 12. Ashland, OR: USF&WS, National Fish and Wildlife Forensics Laboratory

- MOORE, M. K., BEMISS, J. A., RICE, S. M., QUATTRO, J. M. WOODLEY, C. M. (2003). Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species. *Conserv. Genet.* **4**, 95–103
- MUCCI, N., MENGONI, C. & RANDI, E. (2014). Author ' s personal copy Forensic Science International : Genetics Wildlife DNA forensics against crime : Resolution of a case of tortoise theft. *Forensic Sci. Int. Genet.* **8**, 200–202
- MŽP [Ministerstvo životního prostředí] (2015) PŘEHLED LEGISLATIVY EVROPSKÉ UNIE A ČESKÉ REPUBLIKY v oblasti ochrany druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi včetně Úmluvy o mezinárodním obchodu ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (CITES) stav ke dni 5. 2. 2015, [cit. 9. 4. 2015 ]Dostupné z: [http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/cites\\_legislativni\\_zajisteni\\_umluvy/\\$FILE/ODOIMZ-prehled\\_legislativy\\_EU\\_a\\_CR-20150205.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/cites_legislativni_zajisteni_umluvy/$FILE/ODOIMZ-prehled_legislativy_EU_a_CR-20150205.pdf)
- OGDEN, R., DAWNAY, N. & MCEWING, R. (2009). Wildlife DNA forensics - Bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endanger. Species Res.* **9**, 179–195
- OLIVEIRA, R., CASTRO, D., GODINHO, R., LUIKART, G. & ALVES, P. C. (2010). Species identification using a small nuclear gene fragment: Application to sympatric wild carnivores from South-western Europe. *Conserv. Genet.* **11**, 1023–1032
- PANDAY, R., JHA, D. K., THAPA, N., POKHAREL, B. R. & ARYAL, N. K. (2014). Forensic Wildlife Parts and their Individualization Using DNA Barcoding Product Identification and. 6–13
- PHAEDRA PIKITCH, ELLEN K. ROTHSCHILD, ANNA DESALLE, ROB AMATO, GEORGE KOLOKOTRONIS, SERGIOS ORESTIS. (2012). Testing the effectiveness of an international conservation agreement: Marketplace forensics and CITES Caviar trade regulation. *PLoS One* **7**.
- RATNASINGHAM, S., HEBERT, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, **7**(3), 355–364. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- RICHTER, H.G. GEMBRUCH, K., KNOCH G. (2008). CITESwoodID: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Dostupné na: <ftp://delta-intkey.com/citesw/en/intro.htm>
- ŘÍHOVÁ, P. Determinace produktů z organismů chráněných CITES. (přednáška) České Budějovice: ZF JCU, 4. -5. 12. 2014.

SINGH R. R., GOYAL S. P., KHANNA P. P., MUKHERJEE P. K., SUKUMAR R. (2006). Using morphometric and analytical techniques to characterize elephant ivory; *Forensic Sci Int* 162:144

SHUKLA M.S., PIDIYAR V., BHAVE N.A., PATOLE M.S., SHOUCHE, Y.S. (2001). PCR amplification and sequencing of mitochondrial 12S rRNA gene fragment from *Muntiacus muntjac* (Indian muntjac). *Curr. Sci.*, **80**, 617-618

SCHMIED, S. A K., BRUNNERMEIER, M. J., SCHUPFNER, R. & WOLFBEIS, O. S. (2011). Age assessment of ivory by analysis of  $^{14}\text{C}$  and  $^{90}\text{Sr}$  to determine whether there is an antique on hand. *Forensic Sci. Int.* **207**, e1–e4 (2011).

ST. JOHN, J. C., LLOYD, R. E. I., BOWLES, E. J., THOMAS, E. C., EL SHOURBAGY, S. (2004). The consequences of nuclear transfer for mammalian foetal development and offspring survival. A mitochondrial DNA perspective. *Reproduction* **127**, 631–641

ŠTEFAN, Jiří a Jiří HLADÍK. *Soudní lékařství a jeho moderní trendy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2012, 437 s. ISBN 978-802-4735-948.

THE FORENSIC WORKING GROUP. (2014). *Wildlife Crime: A guide to the use of forensic and specialist techniques in the investigation of wildlife crime* [pdf]. 2. vyd. Crown copyright, 98 s. [cit. 9.4. 2015]. Dostupné z: <http://www.tracenet.org/wp-content/uploads/2012/08/Wildlife-Crime-use-of-forensics-FWG-April-2014.pdf>

TOBE, S. S. & LINACRE, A. (2010). DNA typing in wildlife crime: Recent developments in species identification. *Forensic Sci. Med. Pathol.* **6**, 195–206

TOMBERLIN, JEFFERY K. A MICHELLE R. SANFORD (2011) *Forensic Entomology and Wildlife*. HUFFMAN, Jane E a John R WALLACE. *Wildlife forensics: methods and applications*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 81- 102. ISBN 9780470662595.

VENCES, M., THOMAS, M., VAN DER MEIJDEN, A., CHIARI, Y. & VIEITES, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front. Zool.* **2**, 5.

Výroční zpráva 2010 Česká inspekce životního prostředí, Praha, ČÍŽP, 2010, 48-49s.

Výroční zpráva 2011 Česká inspekce životního prostředí, Praha, ČÍŽP, 2011, 44 s.

Výroční zpráva 2012 Česká inspekce životního prostředí, Praha, ČÍŽP, 2012, 58 s.

Výroční zpráva 2013 Česká inspekce životního prostředí, Praha, ČÍŽP, 2013, 45-46s.

WILSON-WILDE, L. M. (2010). *Species Identification in Wildlife Crime Investigation using Diprotodontia*. PhD Thesis.

WOZNEY, K. M. & WILSON, P. J. (2012). Real-time PCR detection and quantification of elephantid DNA: Species identification for highly processed samples associated with the ivory trade. *Forensic Sci. Int.* **219**, 106–112

ZÁVESKÁ DRÁBKOVÁ, L. (2012). Čárový kód života. *Vesmír* **91**, 96–99

<http://barcoding.si.edu/>

[www.biolib.cz](http://www.biolib.cz)

<http://www.boldsystems.org/index.php/databases>

<http://www.cites.org/>

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

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<http://www.nm.cz>

<http://phys.org>