



WYKORZYSTANIE GENOTYPOWANIA ROŚLIN  
W KRYMINALISTYCE

Dzięki rozwojowi metod biologii molekularnej, w medycynie sądowej powstaje nowa dziedzina, której celem jest stworzenie narzędzi umożliwiających dowodzenie prawdy obiektywnej w oparciu o badania biochemiczne i genetyczne roślin i grzybów. Dziedzina ta doskonale uzupełnia znaną od lat **palinologię** sądową<sup>1</sup>, która zajmuje się badaniem niezwykle trwałych zarodników i pyłków (sporumorf) oraz innych mikroskopijnych części roślin w materiale dowodowym. Podstawą tych badań jest mikroskopowa ocena pyłku lub zarodników, stąd badania te wymagają dokładnej znajomości unikalnej budowy ziaren, ich kształtu, wielkości, wyglądu i struktury, pozwalającej na przyporządkowanie do konkretnego gatunku, zajmującego zwykle określone obszary geograficzne. Jedną z najbardziej znanych analiz palinologicznych dotyczyła badania Całunu Turyńskiego<sup>2</sup>. W latach 70-tych ubiegłego wieku, Max Freisulzer badał próbki pyłków pobranych za pomocą folii adhezyjnej, ujawniając 58 gatunków roślin, na podstawie których określono historyczne miejsca przebywania Całunu<sup>3</sup>. Po raz pierwszy, w procesie sądowym, palinologia została wykorzystana w 1959 roku w Szwecji, gdzie ślady pyłków umożliwiły ustalenie, że znalezione włókna kobiety zostały przeniesione pośmiertnie celem ukrycia rzeczywistego miejsca zbrodni<sup>4</sup>. W Polsce, o badaniach palinologicznych, opinia publiczna usłyszała po raz pierwszy w 2003r, za sprawą śledztwa dotyczącego zabójstwa z okolic Złotowa. Palinologia umożliwiła ustalenie, że zabójca po popełnieniu zbrodni usiłował ukryć ciało w leśnym bagnie<sup>4</sup>.

W przypadku badań genetycznych, znajomość cech morfometrycznych mikrośladów roślin i grzybów nie jest konieczna, gdyż bio-informatyczne porównanie uzyskanej sekwencji DNA z bazą sekwencji referencyjnych umożliwia szybkie i jednoznaczne określenie gatunków, a nawet odmian tych organizmów. Analizy genetyczne znajdują także zastosowanie w identyfikacji fragmentów roślin odpowiedzialnych za syntezę niedozwolonych substancji psychoaktywnych, w tym z rodzaju konopi, zawierających tetrahydrokannabinol (THC).

**SNP** (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*)

- polimorfizm pojedynczego nukleotydu, to niewielkie różnice w sekwencji DNA, które w kryminalistyce stanowią podstawę gatunkowej identyfikacji genetycznej bakterii, roślin i grzybów. SNP wykorzystuje się także w badaniach filogenetycznych tych organizmów.

### Czym jest genotypowanie?

Identyfikacja roślin i grzybów, podobnie jak bakterii, polega na określeniu ich genotypu, czyli zespołu specyficznych cech w sekwencji DNA, które umożliwiają przyporządkowanie badanego organizmu do odpowiedniego gatunku, odmiany lub szczepu wzorcowego. W badaniach wykorzystuje się zwykle techniki łańcuchowej Reakcji Polimerazy - PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), które ujawniają drobne zmiany typu SNP, najczęściej w obrębie regionu rDNA, obejmującego kodujące części jądrowego, rybosomalnego RNA wraz z rozdzielającymi je sekwencjami niekodującego DNA - ITS1 oraz ITS2 (ang. *Internal Transcribed Spacers*)<sup>5,6</sup>. Rejony te charakteryzuje wystarczająca zmienność sekwencyjna by móc jednoznacznie określić gatunek, co umożliwia np. rozróżnienie fenotypowo podobnych roślin tj. *Cleome hassleriana* (rośliny ozdobnej) mylonej często z *Cannabis sativa* ssp. *indica* (marihuana). Dodatkowe badania fragmentów genomu chloroplastów w rejonach genów *rbcl*, *matK* oraz intronu *trnL-trnF* ułatwiają określanie odmian i szczepów, umożliwiając ustalenie pochodzenia badanego materiału. Mieszanina fragmentów różnych roślin lub grzybów o nieznanym składzie, nie stanowi przeszkody w identyfikacji gatunków. W takim przypadku stosuje się metody powielania fragmentów DNA z wykorzystaniem oligonukleotydów (starterów) specyficznie rozpoznających poszczególne grupy organizmów. Możliwość rozdzielania oraz identyfikacji tych roślin może stanowić dodatkową wartość dowodową w dochodzeniu do prawdy dotyczącej popełnionego przestępstwa, jego czasu, przebiegu oraz innych okoliczności zdarzenia.



1. Identyfikacja genetyczna roślin i grzybów zawierających substancje psychoaktywne,
2. Określanie składu biologicznego na poziomie gatunkowym z mieszaniny materiałów roślinnych,
3. Analiza porównawcza mikrośladów roślin i grzybów zabezpieczonych z materiałów dowodowych.

### Molekularna botanika systematyczna -

w medycynie sądowej, umożliwia rozdzielenie mieszaniny fragmentów roślin o nieznanym składzie, rozróżnienie odmian marihuany, tytoniu oraz ustalenie ich pochodzenia.

### Genotypowanie roślin w kryminalistyce.

Bazy danych w bankach genów zawierają liczne sekwencje DNA roślin, które mogą być wykorzystywane w kryminalistyce w celach porównawczych. Sekwencje te obejmują zarówno DNA jądrowe, chloroplastowe jak i mitochondrialne. W identyfikacji roślin i grzybów najczęściej wykorzystuje się modelowy region ITS, który w jądrowym DNA występuje w dużej liczbie kopii (do 30 000 na pojedynczą komórkę)<sup>6,7</sup>, co umożliwia oznaczenie gatunku nawet przy mocno zniszczonych śladach dowodowych (*ITStest-plant & fungi* Kit). W analizie uzyskanych sekwencji wykorzystuje się metody filogenetyczne, oparte na modelu ewolucji sekwencji DNA, który umożliwia ustalenie relacji między różnymi organizmami. Sekwencje uzyskane z materiałów dowodowych wskazują zwykle gatunek organizmu, którego występowanie może ograniczać się do określonych miejsc geograficznych. Lista gatunków zdefiniowanych na podstawie badanej próbki może zatem wskazywać pochodzenie materiałów dowodowych. Poziom użyteczności tych badań jest wprost proporcjonalny do częstości występowania i kombinacji zidentyfikowanych roślin. Obecność rzadkich gatunków i odmian może znacznie skrócić czas poszukiwania rzeczywistego miejsca zdarzenia, a także umożliwić wykluczenie odniesienia próbki do miejsca przestępstwa. Metody te mogą zatem ułatwić prace w postępowaniach dotyczących przestępstw takich jak zabójstwa, rozboje, kradzieże, gwałty, porwania, ataki terrorystyczne, handel narkotykami, przemyt czy też wypadki drogowe. Identyfikacja genetyczna może także pomóc w ustalaniu drogi przemieszczania się sprawcy, transportu narkotyków lub pochodzenia roślin i grzybów zawierających niedozwolone substancje psychoaktywne. W większości przypadków, materiał roślinny, który trafia do laboratoriów, jest rozdrobniony, co uniemożliwia przeprowadzenie mikroskopowej i makroskopowej oceny morfologicznej, a tym samym ustalenia gatunku według systematycznego podejścia botanicznego. Ten klasyczny sposób identyfikacji roślin i grzybów nie jest ani skuteczny, ani wiarygodny, zwłaszcza gdy materiał jest martwy. Ponadto, cechy morfologiczne, uważane za charakterystyczne dla konopi, mogą występować u kilkudziesięciu innych gatunków. Chociaż badania te mogą uzupełniać metody chromatograficzne np. HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa), która wykrywa substancję czynną (THC) konopi, ich mała ilość uniemożliwia wykonanie analizy<sup>8</sup>. Śladowe ilości tego materiału wystarczają jednak do przeprowadzenia identyfikacji genetycznej, którą można wykonać w oparciu o DNA wyizolowane z resztkowego materiału roślinnego obecnego np. w kieszeniach lub znajdujące się na przedmiotach i banknotach, które wcześniej miały kontakt z materiałem roślinnym. Konopie charakteryzuje duża zmienność genetyczna, dzięki czemu możliwe jest określenie geograficznego pochodzenia zebranych materiałów dowodowych<sup>8</sup>.

Już w 1995 r., Gillian i wsp. wykazali przewagę technik biologii molekularnej nad wysokosprawną chromatografią cieczową, dowodząc, że w przeciwieństwie do HPLC, metody genetyczne umożliwiają rozróżnienie poszczególnych okazów<sup>9</sup>, jak również populacji zbieranych z różnych plantacji konopi<sup>10</sup>. W kolejnych pracach naukowych wykazano, że analiza DNA może być stosowana do identyfikacji różnych typów materiałów z roślin i grzybów, w tym halucynogennych z rodziny *Panaeolus* i *Psilocybe*<sup>11</sup>, jak również do kontroli bezpieczeństwa żywności<sup>12</sup> i monitorowania obrotu tytoniem<sup>13</sup>. Postęp w rozwoju technik analizy DNA umożliwił opracowanie zestawu uniwersalnych markerów obejmujących m.in. jądrowy *ITS* oraz chloroplastowy *trnH-psbA spacer*<sup>13</sup>, pełniących funkcję kodu paskowego DNA roślin, który w ocenie dostępnych materiałów dowodowych zwykle ma charakter rozstrzygający<sup>14,15</sup>.

#### Literatura:

- <sup>1</sup>Walsh KA, Horrocks M. Palynology: its position in the field of forensic science. *J Forensic Sci.* 2008 Sep;53(5):1053-60.
- <sup>2</sup>Frei-Sulzer M. *Wissenschaftliche Probleme um das Grabtuch von Turin.* *Naturwissenschaftliche Rundschau* 1979, vol. 32, no.4, p. 133-135.
- <sup>3</sup>Frei-Sulzer M. *Nine Years of Palynological Studies on the Shroud.* *Shroud Spectrum International.* June, 1982, vol. 1, no. 3, p. 3-7.
- <sup>4</sup>Zepek M (redakcja). *III Dni Kryminalistyki.* Referaty wygłoszone przez uczestników konferencji „III Dni Kryminalistyki Wydziału Prawa i Administracji Uniwersytetu Rzeszowskiego”, 27–29.4.2009 r. Rzeszów. ISBN 978-83-7269-304-4. Wydział Prawa i Administracji Uniwersytet Rzeszowski, 2009.
- <sup>5</sup>Nybohm H, Weising K, Rotter B. DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investig Genet.* 2014 Jan 3;5(1):1.
- <sup>6</sup>Dubouzet JG, Shinoda K. Relationships among old and new world Alliums according to ITS DNA sequence analysis. *Theor Appl Genet.* 1999;98:422–433.
- <sup>7</sup>Balasubramani SP, Goraya GS, Venkatasubramanian P. Development of ITS sequence-based markers to distinguish *Berberis aristata* DC. from *B. lycium* Royle and *B. asiatica* Roxb. *3 Biotech.* 2011 Jul;1(1):11-19.
- <sup>8</sup>Linacre A., Thorpe J.: *Detection and identification of cannabis by DNA,* *Forensic science international* 1998, 91: 71-76.
- <sup>9</sup>Gillan R, Cole MD, Linacre A, Thorpe JW, Watson ND. Comparison of *Cannabis sativa* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and HPLC of cannabinoids: a preliminary study. *Sci Justice.* 1995 Jul-Sep;35(3):169-77.
- <sup>10</sup>Jagadish V, Robertson J, Gibbs A. RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources. *Forensic Science International.* 1996 May; Volume 79, Issue 2, 113 - 121.
- <sup>11</sup>Lee JC, Cole M, Linacre A. Identification of members of the genera *Panaeolus* and *Psilocybe* by a DNA test. A preliminary test for hallucinogenic fungi. *Forensic Sci Int.* 2000 Aug 14;112(2-3):123-33. PubMed PMID: 10940597.
- <sup>12</sup>Alapont C, López-Mendoza MC, Gil JV, Martínez-Culebras PV. Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2014;31(1):93-104.
- <sup>13</sup>Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 7;102(23):8369-74.
- <sup>14</sup>Bever R., Cisino M.: *Forensic Molecular Botany: Identification of plants from trace evidence,* *International Journal of Legal Medicine* 2009, 123: 395-401.
- <sup>15</sup>Henry R.J.: *Plant genotyping. The DNA fingerprinting of plants.* Volume I, CABI Publishing 2001.

Przykład struktury ziarna pyłku →

