

Wykorzystanie roślinnego DNA w postępowaniu sądowym



W świecie roślin istnieje ogromna zmienność na poszczególnych szczeblach systematyki. Zróżnicowanie fenotypowe i genotypowe występuje nie tylko między rodzajami czy gatunkami, ale także w ich obrębie. Dzięki rozwojowi genetyki molekularnej, biotechnologii i hodowli roślin otrzymywane są nowe odmiany zarówno roślin uprawnych, jak i ozdobnych. W obrębie gatunku wyróżnia się odmiany zbliżone do siebie, ale zawsze różniące się przynajmniej jedną cechą, często niewidoczną lub mało widoczną. Dotychczas gatunki i odmiany były odróżniane na podstawie cech morfologicznych, lecz w licznych przypadkach klasyfikacja oparta na cechach morfologicznych nie jest wystarczająca do odróżnienia wielu gatunków w obrębie rodzaju czy też odmian należących do tego samego gatunku.

Do niedawna materiał pochodzenia roślinnego analizowano metodami morfologicznymi lub rzadziej biochemicznymi. W badaniach naukowych korzystano z analizy kariotypu techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH – ang. Fluorescent *in situ* hybridization) [4]. Elementem krytycznym w tych badaniach jest wielkość materiału roślinnego. Z tego względu wiele próbek materiału roślinnego, będących śladem pochodzącym z miejsca przestępstwa, nie mogło być identyfikowanych.

Do identyfikacji i oceny pokrewieństwa genetycznego coraz częściej stosuje się techniki oparte na PCR, a szczególnie metodę losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (RAPD). Na podstawie analizy bardzo niewielkich ilości roślinnego DNA można określić, z jakiej rodziny i ga-

tunku pochodzi dana próbka tkanki roślinnej [26]. Technika RAPD jest też używana w badaniach dotyczących identyfikacji oraz ustalenia różnic między morfologicznie nierozróżnialnymi odmianami [28; 31]. Markery RAPD ze względu na możliwość szybkiego wykrywania polimorfizmu genetycznego są bardzo przydatne, zwłaszcza w odniesieniu do gatunków o dużym genomie [7].

Charakterystyka roślinnego DNA

Gatunki roślin charakteryzują się dużą różnorodnością zarówno na poziomie fenotypu, jak również genomu jądrowego. Genomy roślin różnią się nie tylko zawartością DNA, ale także liczbą chromosomów i ich morfologią. Jedną z przyczyn jest występowanie powtarzalnych sekwencji, które mogą stanowić ponad 90% genomu jądrowego. Sekwencje te można podzielić na klasy w zależności od długości, położenia i specyfiki występowania. Pewne typy sekwencji są podobne u wszystkich organizmów, podczas gdy inne są specyficzne dla gatunku lub nawet chromosomu. Poszczególne typy sekwencji mają charakterystyczne rozmieszczenie w chromosomach. W związku z powyższym struktura chromosomu nie jest homogenna, ale składa się z szeregu chromatynowych domen. Długość sekwencji powtarzalnych może wynosić od dwóch lub kilkunastu nukleotydów przez sekwencje wynoszące od 180 do kilku tysięcy par zasad. Pozostałą część genomu stanowią sekwencje kodujące, które występują w jednej lub w kilku kopiach [2; 14].

Wielkość genomu jądrowego określona została dla około 3000 ga-

tunków roślin. Różnice w zawartości DNA u tych gatunków wynoszą około tysiąca razy. Podobne różnice dotyczą liczby chromosomów od 2 do kilkuset. Nie znaleziono u roślin gatunku o liczbie chromosomów $n = 1$. Maksymalna liczba chromosomów opisana dla roślin okrytonasiennych wynosi $2n = 600$ u palmy madagaskarskiej *Vaonniola gerardii*. Morfologia, a szczególnie rozmiary chromosomów wykazują dużą różnorodność zarówno w obrębie jednego genotypu, jak i między gatunkami. Chromosomy jednych gatunków są małe i nieodróżniane morfologicznie, u innych natomiast poszczególne pary chromosomów homologicznych różnią się i są łatwe do identyfikacji. Mimo tak znacznych różnic w wielkości genomów wydaje się, że liczba genów może być podobna u różnych gatunków [2; 14].

Charakterystycznym elementem genomu roślinnego są ruchome elementy określone jako retrotranspozony mające zdolność do transpozycji przez RNA i odwrotną transkrypcję do DNA w wyniku działania odwrotnej transkryptazy [14]. W komórkach roślinnych obecne są 3 formy DNA: jądrowe, mitochondrialne i chloropladowe. Do sekwencjonowania i analiz wykonywanych przy identyfikacji gatunku używane jest najczęściej jądrowe DNA [17].

Zawartość mtDNA w roślinach stanowi od 0,3 do 1% całkowitego DNA w zależności od rodzaju tkanki i okresu rozwoju. Wielkość DNA mitochondrialnego roślin wyższych mieści się w przedziale od około 200 do 2400 kpz. Duże różnicowanie wielkości cząsteczek daje się zauważyć nawet u roślin blisko ze sobą spokrewnio-

nych. Mitochondrialne DNA występuje w formie kołistej, a informacja genetyczna zawarta w DNA jest podobna dla wszystkich organizmów zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych. Wielkość chloroplastowego DNA (ctDNA) mieści się w granicach od 85 do 292 kpz. Większość roślin wyższych ma ctDNA w granicach od 140 do 160 kpz [1].

W ostatnich latach powstały nowe możliwości oznaczenia zmienności genetycznej roślin. Ma to ścisły związek z wykorzystaniem wyników badań DNA w genetyce i hodowli roślin. Wszystkie zastosowania można podzielić na dwie grupy. Pierwsza polega na trawieniu badanego DNA enzymami restrykcyjnymi i oznaczaniu specyficznych fragmentów bezpośrednio po hybrydacji techniką Southern (RFLP). W drugiej wykorzystuje się reakcję enzymatyczną amplifikacji w obecności specyficznych oligonukleotydowych starterów (DNA-RAPD) [2].

Metody analizy DNA roślinnego

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – losowo amplifikowane polimorficzne DNA)

Analiza RAPD polega na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR – Polymerase Chain Reaction), a następnie poszukiwaniu polimorfizmu DNA skrajnie różniących się pod względem danej cechy linii [25]. To, czy polimorfizm wystąpił lub nie, określa się na podstawie wyników elektroforezy na żelu agarozowym, na którym fragmenty rozdzielają się w zależności od rozmiaru (wielkość warunkuje prędkość migracji). Specyficzność hybrydacji zależy m.in. od sekwencji i składu nukleotydów, siły jonowej stosowanych buforów i temperatury. Operowanie tymi parametrami daje możliwość uzyskania hybrydacji cząsteczek, których homologia nie przekracza 50% nukleotydów (ryc. 1) [29].

10–50 ng pobieżnie oczyszczonego DNA wystarczy do przeprowadzenia pojedynczej reakcji.

W technice tej matrycę amplifikacyjną stanowi całkowite DNA badanego osobnika [15]. W celu amplifikacji DNA wykorzystuje się reakcję PCR. Każdy cykl PCR składa się z trzech etapów:

- termicznej denaturacji powielanego DNA (około 90°C),
- asocjacji starterów z matrycą w temperaturze obniżonej do 35–60°C,
- polimeryzacji DNA w temperaturze około 72°C.

Liczba syntetyzowanych fragmentów rośnie wykładniczo jak 2^n , gdzie (n) oznacza liczbę cykli – po 30–40 cyklach fragmenty DNA ulegają powieleniu kilka milionów razy [15; 29]. W kolejnych cyklach reakcji DNA jest poddawane losowej hybrydacji ze starterem. Startery są długości 10–15 nukleotydów i ich sekwencje są homologiczne do odcinków DNA. Do namnożenia fragmentów DNA dochodzi w miejscach, gdzie sekwencja cząsteczki startera pozwala na jego przyłączenie do komplementarnych nici DNA, w odległości nieprzekraczającej kilku tysięcy nukleotydów. Produktami kilkudziesięciu cykli reakcji amplifikacji jest kilka lub kilkanaście namnożonych fragmentów roślinnego DNA. Produkty PCR są różnej długości i są poddawane elektroforezie – rozdzielane na żelu agarozowym, wcześniej barwionym brom-

kiem etydy (EtBr). Oceny dokonuje się w świetle UV, wizualizacja powoduje powstawanie prążków na żelu. Każdy prążek jest związany z określonym lokusem.

Technika ta dostarcza dużej liczby markerów o długości 100–2000 par zasad i pozwala badać cały genom dzięki dominującemu charakterowi markerów.

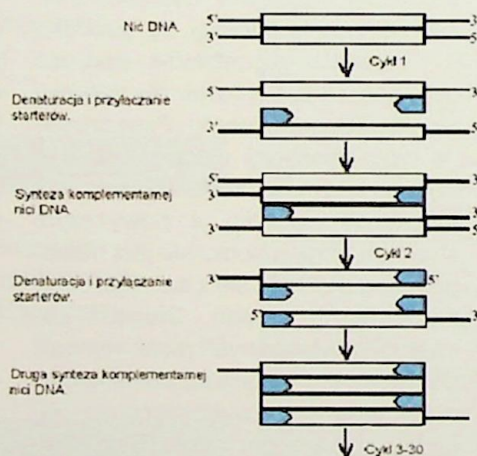
Niestety metoda ta, choć stosunkowo niedroga, szybka i łatwa w wykonaniu, jest często mało powtarzalna w testach międzylaboratoryjnych. Kontaminacja obcym DNA czy nawet niewielkie zmiany warunków reakcji mogą prowadzić do obniżonej powtarzalności, co może wynikać z różnej szybkości reakcji w różnych cyklach, a to z kolei może mieć wpływ na przyłączanie starterów. Znacznie lepsze, lecz niestety również dużo droższe jest wykonanie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym (wykorzystywanym np. w technice DAF-DNA Amplification Fingerprinting czy AP-PCR- Arbitrarily Primed PCR). Jest on około 100 razy bardziej czuły niż żel agarozowy. Barwienie wykonuje się za pomocą azotanu srebra (AgNO_3) [15; 29].

Słabo widoczny wzór prążków na żelu może być różnie interpretowany przez analityków.

Metoda ta jest zaakceptowana przez sądownictwo i używana zarówno w kryminalistycznych, jak i w cywilnych sprawach [17].

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – polimorfizm amplifikowanych fragmentów DNA)

Markery AFLP używane były do identyfikowania osobników wielu gatunków roślin oraz owadów, ptaków, ryb i bakterii. Markery te stosowane są zwłaszcza do rozdzielania osobników blisko spokrewnionych np. z linii wsobnych oraz próbek pochodzących z jednego źródła [18]. Jest to metoda oparta na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Polega na trawieniu wyizolowanego DNA enzymami restrykcyjnymi w miejscach restrykcyjnych. Następnie do obu końców



Ryc. 1. Schemat reakcji PCR (źródło: Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology edited by P.C. Shaw, J. Wang & P.P.H. But (The Chinese University of Hong Kong))
Fig. 1. PCR diagram

powstałych przez rozcięcie fragmentów nici DNA przyłączany jest adaptor (oligonukleotyd o znanej sekwencji). Kolejnym etapem jest przyłączenie starterów. Starter skonstruowany jest w ten sposób, że jego koniec 5' komplementarny jest do sekwencji adaptora, a na końcu 3' znajduje się kilka dodatkowych nukleotydów, co ogranicza liczbę namnażanych fragmentów. Z kolei pozwala to na uzyskanie na żelu wyraźnych prążków. Zachodzi reakcja PCR. Namnożeniu ulegają tylko te odcinki, których końce są komplementarne do dodatkowych nukleotydów startera. Po reakcji fragmenty są wizualizowane na żelu poliakrylamidowym (ryc. 2).

Do wykrywania fragmentów DNA wykorzystuje się metodę fluorescencyjną. W tej metodzie produkty PCR są rozdzielane przy użyciu elektroforezy kapilarnej lub płytowej i wykrywane przez odczyt wartości fluorescencji barwnika wbudowanego w analizowane fragmenty DNA. Fluorescencja barwnika jest rejestrowana przez kamerę CCD w postaci wzoru prążków. Oprogramowanie komputerowe używane jest podczas analizy wyników [17]. Metoda ta umożliwia analizę fragmentów restrykcyjnych, bez konieczności pracy z substancjami radioaktywnymi. Wymaga ona jednak skonstruowania specyficznych dla danego enzymu restrykcyjnego adaptora i startera oraz dość dużej ilości dobrze oczyszczonego DNA 500 ng.

Procedurę AFLP akceptuje amerykański wymiar sprawiedliwości, ale jest bardziej skomplikowana niż RAPD czy STR i droższa.

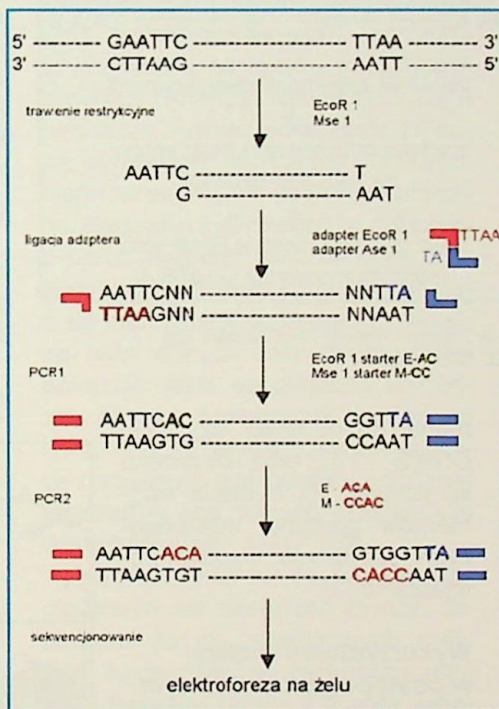
STR (ang. – short tandem repeats)
– **krótkie powtórzenia tandemowe**
używane jako markery DNA

Tego typu krótkie powtórzenia tandemowe zostały odkryte przez Webera i May. W 1989 roku Litt i Luty zaproponowali dla tych sekwencji nazwę mikrosatelity dla odróżnienia od grupy sekwencji minisatelitarnych. W 1991 roku Edwards i wsp. wprowadzili określenie STR. Weisenbach i wsp. zidentyfikowali w genomie człowieka 2 995 mikrosatelitów, z czego około 2 330 wykazuje polimorfizm. Używane są również inne określenia sekwencji mikrosatelitarnych: SSRs (ang. simple sequences repeats) proste sekwencje powtarza-

ne, SSLPs (ang. simple sequences length polymorphisms) polimorfizm długości prostych, sekwencji. Technika ta jest również modyfikacją łańcuchowej reakcji polimerazy PCR. Typowa reakcja STR polega na zastosowaniu PCR z użyciem starterów PCR, określonych dla specyficznych sekwencji, które będą rozpoznawane i wiązane, w obrębie jądrowego DNA. Stosuje się ją do oznaczania polimorfizmów długości. Sekwencje krótsze niż 300 pz można oznaczyć bardzo dokładnie i w krótkim czasie. Powtórzeniami są krótkie jednostki dwu-, trzy- lub czternukleotydowe rozprzeszczone w całym genomie. Typowy STR zawiera 10–30 kopii powtarzalnej sekwencji, nie dłuższej niż

4 pz [4]. Różnorodność w ilości powtarzających się sekwencji daje możliwość rozróżnienia osobników w populacji. Mikrosatelity występują z dużą częstością w genomach większości badanych eukariotów i są w nich równomiernie rozmieszczone. Poszczególne rodzaje mikrosatelitów występują z różną częstością u różnych gatunków. Częstość mutacji w obrębie tych sekwencji jest niewielka. Te same sekwencje znaleziono w innych organizmach, również w roślinach [20]. Markery STR są najpopularniejszą metodą analizy DNA przy identyfikacji osób. Charakterystykę sekwencji powtarzalnych zawiera tabela 1.

Markery genetyczne wykorzystywane w badaniach medycznych i sądowych muszą spełniać określone kryteria. Wielkość alleli amplifikowanych w reakcji PCR nie może przekraczać od 100 do 500 pz. Allele muszą różnić się co naj-



Ryc. 2. Schemat reakcji AFLP
(źródło:
<http://www.wzw.tum.de/pbpz/bambara/ttml/aflp.htm>)
Fig. 2. AFLP diagram

Tabela 1

Zestawienie różnic w sekwencjach powtarzalnych
Collation of differences in repeatable sequences

Charakterystyka	Satellity	Minisatellity	Mikrosatellity
Częstość powtórzeń	10 ³ -10 ⁷	2-400	5-100
Liczba loci	1-2/chromosom	400	10 ⁴ -10 ⁵
Jednostka powtórzenia	200-5000 pz	7-100 pz	1-6 pz
Lokalizacja	heterochromatyna, centromery	rozproszone, telomery	równomierne

mniej dwoma nukleotydami, ułatwia to proces detekcji na żelach. W populacji powinna występować duża liczba alleli warunkująca zróżnicowanie osobników. W obrębie locus danego markera częstość mutacji powinna być mniejsza niż 10^{-2} do 10^{-3} . Dotychczas nie znaleziono takiego idealnego markera [12].

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych)

W genetyce roślin metoda RFLP znalazła zastosowanie od połowy lat osiemdziesiątych, kiedy to Helentjaris i wsp. wykorzystali tę metodę do badania genomu kukurydzy i pomidora. Polimorfizm RFLP jest związany z naturalną zmiennością w obrębie gatunku.

W metodzie RFLP wykorzystywane są enzymy restrykcyjne, które rozpoznają określoną 4–6-nukleotydową sekwencję DNA i rozcinają cząsteczkę w tym miejscu, w wyniku czego powstają fragmenty o różnej długości od kilku do ponad 20 tysięcy nukleotydów [4].

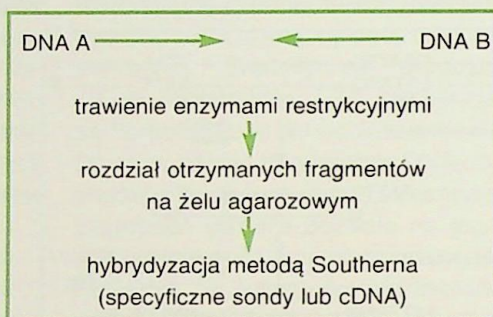
Powstałe fragmenty rozdzielane są za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym. Rozdział następuje zależnie od długości fragmentów, krótsze przemieszczają się szybciej.

Następnie fragmenty DNA, zachowując porządek rozdziału, przenoszone są na membranę metodą Southern blotting, kapilarnie podsiąkający bufor wymywa fragmenty z żelu i przenosi na membranę. Tu następuje najpierw prehybrydacja – zablokowanie miejsc na membranie, zdolnych do niespecyficznego przyłączania DNA, i kolejno hybrydacja ze znakowaną radioaktywnie sondą. Przyłączenie sondy zachodzi w miejscach komplementarnych do sekwencji powtórzonych loci. Można również stosować znaczniki nieizotopowe, np. biotynę, hapteny, fluorofory. Użycie odpowiedniej sondy wielolokusowej pozwala na wykrycie licznych fragmentów restrykcyjnych zawierających powtarzający się fragment obecny w wielu loci na wielu

chromosomach. Badania polimorfizmu można podzielić na dwa rodzaje: analizę pojedynczego locus (single locus system) i analizę wielolokusową (multilocus system). Zasada tych badań jest właściwie taka sama i polega na hybrydacji specyficznej sondy molekularnej z fragmentem DNA uzyskanym w wyniku działania enzymów restrykcyjnych.

Kolejnym etapem jest płukanie w roztworze soli i wizualizacja za pomocą autoradiografii (ryc. 3).

Metoda ta jest bardzo dokładna i ma wysoką powtarzalność, pozwala wykrywać allele zajmujące ten sam locus. Niestety jest dość pracochłonna, kosztowna i skomplikowana, wy-



Ryc. 3. Schemat metody RFLP (źródło: [2])
Fig. 3. RFLP diagram

maga dużej ilości czystego DNA 2–10 µg, oraz nie można jej używać do badania fragmentów genomu, zawierających sekwencje wysoko powtarzalne [2].

Wykorzystanie analizy w postępowaniu sądowym

Użycie analizy DNA roślinnego jako dowodu w sprawie zabójstwa

Analizy DNA roślinnego jako dowodu w śledztwie po raz pierwszy użyto w 1992 roku w sprawie o zabójstwo w Arizonie, w hrabstwie Maricopa.

Zwłoki kobiety znaleziono na pustyni po drzewem Palo Verde (*Cercidium texanum*). Obok ciała znaleziono też pager, należący do Marka Bogana podejrzanego o dokonanie tego zabójstwa. Bogan nie przyznawał się

do winy, chociaż twierdził, że przebywał w miejscu zbrodni i tam zgubił pager. Trudno było jednoznacznie powiązać miejsce zbrodni z podejrzanym. Wokół znalezionego ciała leżały strąki z nasionami pochodzące z drzewa Palo Verde (*C. texanum*). Kilka strąków z drzewa Palo Verde znaleziono także w bagażniku ciężarówki podejrzanego. Funkcjonariusze postanowili sprawdzić, czy znalezione w bagażniku strąki pochodzą z tego samego drzewa, pod którym znaleziono zwłoki (ryc. 4).

Analizę wykonała dr T. Helentjaris z Uniwersytetu Arizona, użyła techniki RAPD do porównania materiałów genetycznych pochodzących z kilku-nastu drzew. Oprócz analizy DNA ze strąków z bagażnika i z drzewa rosnącego na miejscu zbrodni przebadła również niewielką populację drzew Palo Verde, aby z całą pewnością ustalić identyczność DNA i wykluczyć pochodzenie strąków z innego drzewa (ryc. 5).

Jej przekonujące zeznanie potwierdzone wynikami analizy DNA pomogło skazać Marka Bogana za popełnione morderstwo [6; 16].

Roślinne DNA ponownie zostało użyte w sprawie morderstwa trzech



Ryc. 4. Gałązka *C. texanum* wraz z nasionami (źródło: http://www.public.iastate.edu/~bot356/species/species/a_eSpecie/CercFlor.html, Fot. Dr. D. Farrar and A. Gardner)

Fig. 4. Part of *C. texanum* with seeds (by Dr. D. Farrar and A. Gardner)

osób w 1999 r., w Norwegii. Podczas śledztwa na skarpce podejrzanego znaleziono igły sosnowe. Analizując ten ślad pobrano igły z 42 sosen otaczających szopę, w której znaleziono ciało. Po badaniach DNA okazało się



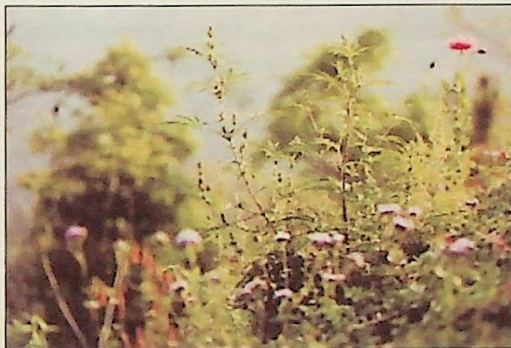
Ryc. 5. *Cercidium floridum* (niebieskie Palo Verde) (źródło: <http://www.aridzonetrees.com/cercidflorig2.htm>, Fot. Arid Zone Trees)

Fig. 5. *Cercidium floridum* (blue Palo Verde) (by Arid Zone Trees)

jednak, że żaden z profili nie odpowiada profilowi DNA z igły sosny pobranej ze skarpetki podejrzanego. W ten sposób udało się podważyć linię oskarżyciela, szukającego jakiegokolwiek powiązania podejrzanego z miejscem zbrodni. Oskarżony cały czas twierdził, że nie był na miejscu przestępstwa. Do analizy zostało użyte DNA chloroplastowe [21].

Analiza DNA roślinnego w sprawach związanych z handlem narkotykami

Marihuana (*Cannabis sativa* L.) znana i używana jest od czasów starożytności. Stosowana była jako środek na różne dolegliwości np. przeciw jaskrze, bólowi, mdłościom, astmie, depresji itp. Jak wiele roślin uprawnych w środowisku naturalnym występowała jako gatunek chwastu (ryc. 6).



Ryc. 6. *Cannabis sativa* var. *indica* w warunkach naturalnych (źródło: http://www.ibiblio.org/pub/academic/medicine/alternative-healthcare/herbal-medicine/SWSBM/Images/New9-2001/Cannabis_sativa-2.jpg, Fot. Jocelyn Peña)

Fig. 6. *Cannabis sativa* var. *indica* in natural conditions (by Jocelyn Peña)

Halucynogenne właściwości marihuany pochodzą od THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinolu) i tzw. silnego THC (high THC level). Różne części rośliny zawierają zróżnicowaną ilość THC. Najwięcej zawierają kwitnące wierzchołki roślin, następnie liście, łodyga, korzenie i nasiona.

Stanowe Laboratorium Nauk Kryminalistycznych w Connecticut wraz z kilkoma innymi ośrodkami w USA tworzą bazę DNA roślinnego, a zwłaszcza DNA marihuany [19; 17].

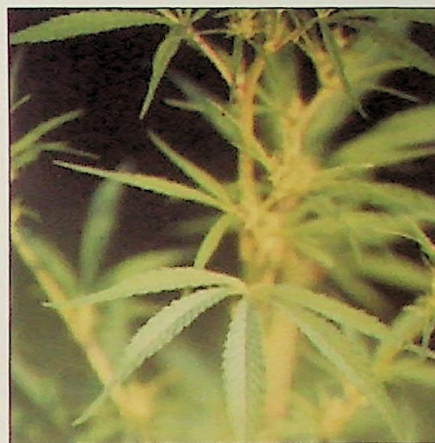
Do analiz wykorzystywane jest DNA wyizolowane z materiału roślinnego znalezionej na miejscu przestępstwa. Baza danych łączy wszystkich zainteresowanych, zarówno użytkowników narkotyku, jak i dystrybutorów. Analiza roślinnego DNA umożliwia również połączenie ze sobą hodowców marihuany. Udowodniono na podstawie analizy genetycznej materiału roślinnego, że hodowcy z przeciwległych końców USA kontaktowali się między sobą i wymieniali się materiałem hodowlanym. Analiza bazy danych zebranych próbek pokazuje, jakie są aktualne tendencje, ile jest dostępnych odmian na rynku i czy są prowadzone jakieś prace hodowlane nad nowymi odmianami oraz w jaki sposób odbywa się dystrybucja (ryc. 7) [17; 19].

Na profil AFLP nie ma wpływu źródło tkanki ani zawartość żywicy. Testowano to na pojedynczych roślinach z uprawy hydroponicznej. Pobrano próbki z tkanek kwiatów żeńskich, z dojrzałego liścia i z łodygi. Stwierdzono, że tkanki te mają identyczne profile DNA. Dzięki temu technika AFLP może być wykorzystywana w śledztwie do analiz mających na celu powiązanie próbki pochodzącej z przechwyconej marihuany, przygotowanej do sprzedaży, z konkretną rośliną, której genotyp jest zapisany w bazie danych, oraz z hodowcą i miejscem uprawy [18].

Analizy DNA użyto do wykrycia marihuany na skórze rąk

osoby, która ostatnio trzymała w ręku liście. Badana osoba była poproszona o wytarcie rąk w spodnie i włożenie do kieszeni, a następnie umycie rąk mydłem. DNA wykryto po wytarciu rąk w spodnie i włożeniu do kieszeni, jednak po umyciu rąk mydłem nie znaleziono śladów marihuany [30].

Przeprowadzono również doświadczenie, porównując próbki pobrane z roślin uprawianych w dwóch różnych miejscach. W miejscu pierwszym uprawa prowadzona była w gruncie na wolnym powietrzu, rośliny były różnych rozmiarów i pokroju. W miejscu drugim uprawa roślin była wysoko wyspecjalizowana, hydroponiczna, rośliny były duże, rozrośnięte a ich wzrost wyrównany, różniły się



Ryc. 7. *Cannabis sativa* var. *indica* (źródło: http://www.ibiblio.org/pub/academic/medicine/alternative-healthcare/herbal-medicine/SWSBM/Images/New9-2001/Cannabis_sativa-3.jpg, Fot. Jocelyn Peña)

Fig. 7. *Cannabis sativa* var. *indica* (by Jocelyn Peña)

znacznie od roślin skonfiskowanych w miejscu pierwszym. Po wykonaniu analizy DNA i porównaniu profili AFLP okazało się, że są identyczne. Był to dowód na to, że są to rośliny rozmnożone wegetatywnie, tzw. kłony, a hodowcy wymieniają się materiałem roślinnym i współpracują.

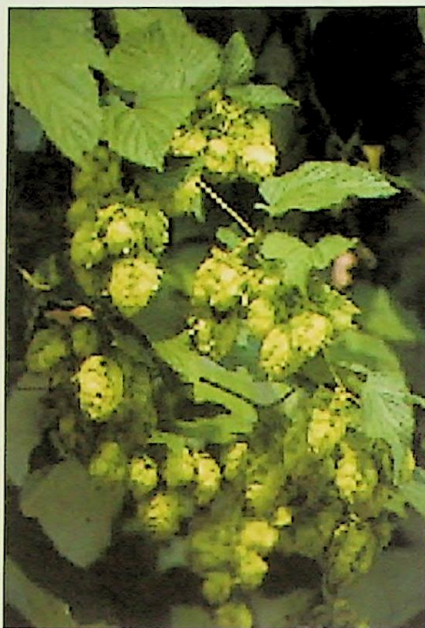
Metody analizy DNA w identyfikacji i indywidualizacji marihuany

W badaniu próbek marihuany używany jest klasyczny schemat składający się z dwóch etapów.

Pierwszy etap dotyczy identyfikacji próbek. Wykonuje się identyfikację botaniczną przez zbadanie nienaruszonych fragmentów morfologicznych rośliny, mikroskopowe badanie liści pod kątem obecności włosków, sprawdza się siłę wzrostu, następnie przeprowadza się testy chemiczne (np. Duquenois-Levine test [5; 16], THC – test, identyfikujący substancję) i test DNA (sekwencjonowanie), aby zidentyfikować próbkę jako *Cannabis* sp. przez rozpoznanie sekwencji DNA homologicznej do znanych sekwencji z próbek wcześniej zidentyfikowanych. Drugim etapem jest indywidualizacja próbki, czyli określenie pochodzenia próbki. Do badania pochodzenia marihuany dostosowano kilka metod analizy DNA. Do identyfikacji i indywidualizacji *Cannabis sativa* najlepiej dostosowano metody analizy DNA oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy, takie jak: RAPD, AFLP i STR. Materiałem genetycznym wykorzystywanym do techniki AFLP mogą być liście, nasiona, kwiaty oraz łodygi zarówno świeże, jak i wysuszone. Analiza DNA techniką AFLP pozwala określić, czy próbki pochodzące z przejęcia narkotyku z dwóch lub więcej rejonów geograficznych pochodzą z tego samego źródła. Tego typu dowód może być pomocny przy ustaleniu szlaków przemytu narkotyku i ilustracji stopnia organizacji hodowców i sieci dystrybucji.

Do podstawowych testów identyfikacyjnych DNA są włączane analizy rybosomalnego ITS1 i ITS2. ITS1 (First Internal Transcribed Spacer) znajduje się między 18S i 5.8S rybosomalnym genem jądrowym. Początkowo proponowano użycie ITS1 do badań nad roślinami stojącymi niżej w hierarchii taksonomicznej i szeroko wykorzystywano w studiach filogenetycznych. Ostatnie badania wykazały, że drugorzędowa struktura regionu ITS1 jest niezmienna u wyżej usytuowanych jednostek taksonomicznych, a pierwszorzędowa jest bardzo zróżnicowana [3; 8]. Struktura drugorzędowa ITS1 może być przydatna przy rozpoznawaniu gatunków i powiązań między osobnikami spokrewnionymi. Prowadzono badania nad

strukturą ITS1 i jej znaczeniem u wielu rodzin roślin np. *Boraginaceae*, *Ehretiaceae*, *Heliotropiaceae*. Przykładowo duża delecja znaleziona u gatunku *Heliotrop* (*Heliotropium*) z rodziny *Heliotropiaceae*, usytuowana między pozycją 61 a 111, może być interpretowana jako zasadnicze skrócenie I helisy. Oznacza to, że jest to strukturalna apomorficzna cecha nie



Ryc. 8. *Humulus lupulus* (chmiel)

(źródło, Fot. H. Kress)

Fig. 8. *Humulus lupulus* (hop) (by H. Kress)

znaleziona nigdzie indziej [23]. U *Cannabis* prowadzono badania nad strukturą zarówno ITS1, jak i ITS2 (Internal Transcribed Spacer II). ITS2 położony jest w rybosomalnym DNA jądrowym. Badano konstrukcje profili restrykcyjnych ITS2, używając określonej liczby restrykcyjnych endonukleaz do trawienia. Metoda ta sugeruje, że mogłaby być wykorzystana do identyfikacji podejrzanych próbek marihuany przez porównanie ich profili restrykcyjnych z profilami restrykcyjnymi znanego wcześniej materiału marihuany [16]. Rybosomalny DNA może być więc wykorzystany do identyfikacji *Cannabis sativa* L. przez porównanie sekwencji ITS2 rybosomalnego DNA z nieznaną próbką. ITS2 haszyszu nie jest bardzo zróżnicowany wśród odmian uprawnych, natomiast bardzo różni

się od ITS2 chmielu (*Humulus lupulus* L.), który należy do tej samej rodziny *Cannabinaceae*. Porównano produkty reakcji ITS1 PCR i ITS2 PCR, 5 próbek marihuany i 1 próbki chmielu i okazało się, iż długość regionu ITS2 marihuany i chmielu jest zupełnie inna. Tak więc analiza ta może służyć do wykluczania bliskiego pokrewieństwa w obrębie jednej rodziny (ryc. 8) [9; 10].

Poza jądrowym DNA wykorzystano do identyfikacji test DNA z użyciem regionu trnL (transfer RNA leucine) (UAA) z plastydowego DNA. Metoda ta polega na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) i RFLP. Metoda analizy molekularnej używana do identyfikacji musi spełniać określone wymagania dla specyficznej amplifikacji roślinnego DNA i wykazywać dużą elastyczność i czułość pozwalającą na odróżnienie gatunku [17].

TrnL (UAA) intron z plastydowego DNA daje możliwości porównywalne do jądrowego międzygenowego regionu DNA i może determinować taksony na poziomie rodzaju czy gatunku w badaniach wykorzystujących RFLP. TrnL intron był wykorzystywany do identyfikacji gatunków drzew na podstawie drobnych fragmentów korzeni zebranych w Alpach. Różnorodność sekwencji w intronie trnL używana była również podczas identyfikacji gatunków *Cinnamomum species* i cyjanobakterii. Prowadzone badania nad identyfikacją gatunków na podstawie korzeni wskazują, że heterogenność długości produktu trnL PCR i maksymalnie dwa trawienia restrykcyjne mogą odseparować 14 powszechnie występujących gatunków traw. Korzenie traw, których nie udało się dopasować do opisanych typów były identyfikowane przez porównanie sekwencji rybosomalnego ITS z bazą danych w banku genów. Dodatkowo stosując kapilarną fluoroscencyjną elektroforezę do produktów trnL PCR, można rozróżnić wszystkie gatunki zidentyfikowane na danym obszarze. Ostatnie badania dotyczą głównie korzeni traw. Z wykorzystaniem trnL intron i techniki PCR-RFLP tworzona jest baza danych do identyfikacji powszechnie

występujących gatunków traw. Technika ta może pozwolić na rozwój badań w zakresie ryzosfery, gdzie identyfikacja morfologiczna jest niemożliwa, nie tylko w przypadku traw [22]. Badania trnL intronu dotyczą również marihuany i wykazują, że metoda ta może być użyteczna dla celów kryminalistycznych [17].

Metody biochemiczne a metody analizy DNA

Metody biochemiczne nie zawsze są dość czułe, aby mogły być wykorzystywane przy identyfikacji i indywidualizacji materiału roślinnego, chociaż zanieczyszczenia czy opakowania często mogą wskazywać źródło. Biochemicznymi metodami można odróżnić żywiczną i włókienniczą postać marihuany oraz podgrupy narkotyków i płeć rośliny, z której pochodzą. Jednak przy roślinach rozmnażanych wegetatywnie do stwierdzenia ich bliskiego pokrewieństwa potrzebna jest znajomość genotypu, a do tego konieczne jest wykonanie analizy DNA. W przypadku gdy próbki marihuany zawierają śladowe ilości THC lub w ogóle brak THC, nie mogą być identyfikowane chemicznie. Chemiczne metody zawodzą również, gdy w miejscu przestępstwa jedynym materiałem roślinnym są fragmenty korzeni, w takiej sytuacji niezastąpione są testy DNA. Przeprowadzono badania porównujące metodę biochemiczną HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – wysoko sprawną chromatografię cieczową z metodami analizy genetycznej. HPLC wykorzystuje efekt rozdzielania chromatograficznego z użyciem cieczy jako fazy ruchomej do analiz złożonych próbek, zwłaszcza zawierających nietłoczne, wielkocząsteczkowe związki chemiczne, a szczególnie substancje biologicznie czynne np. kannabinoidy zawarte w *Cannabis sativa* [24; 32]. Analizę DNA przeprowadzono techniką RAPD na próbkach pobranych z 17 roślin marihuany. Jednocześnie z 16 tych samych roślin pobrano próbki do analizy HPLC. Metoda HPLC pozwoliła na wyróżnienie 3 grup roślin, lecz nie

udało się odróżnić poszczególnych roślin w obrębie tych grup. Technika RAPD, do której użyto specjalnie dobranej kombinacji starterów, umożliwiła odróżnienie wszystkich roślin z wyjątkiem dwóch. Tak więc RAPD umożliwia odróżnienie próbek, które nie mogą być zidentyfikowane przy użyciu analizy HPLC [11].

Sprawy patentowe

Analiza genetyczna stała się potężnym narzędziem sądowym używanym w sprawach przeciwko nieuczciwym koncernom spożywczym, np. technika RAPD stosowana jest w sprawach cywilnych. Hodowcy, którzy poświęcili 10 lat na wyhodowanie nowej odmiany, nie mogli do tej pory w pełni udowodnić nielegalnego wykorzystania wyhodowanych roślin bez ich zgody. Dzięki metodom analizy DNA, stosowanym w sprawach cywilnych, mogą dochodzić swoich praw. Wykorzystując analizę DNA można dokładnie udowodnić, skąd pochodzi dana roślina. W sądach cywilnych w USA rozpatrywane były sprawy, wytoczone przez hodowców nowych odmian kukurydzy i pomidorów, o kradzież własności intelektualnej i ochronę patentową.

Biotechnologiczny koncern Monsanto wytoczył sprawę sądową farmerowi z Saskatchewan w Kanadzie, który rzekomo wykorzystywał opatentowane nasiona canoli (*Brassica napus* L.) bez zezwolenia firmy. Nasiona tej genetycznie zmodyfikowanej rośliny są odporne na herbicyd Roundup® firmy Monsanto, przez to walka z chwastami jest o wiele łatwiejsza, a rośliny dają dużo większe plony i zyski. Farmer rozmnożył rośliny, a uzyskane nasiona wykorzystał do ponownego zasiewu. W przypadku nasion opatentowanych jest to nielegalne. Oskarżyciele z ramienia Monsanto wykorzystali testy DNA roślin znajdujących się na polu farmera. Wykazały one, że na polu farmera

znajdowała się genetycznie zmodyfikowana canola (*B. napus* L.) odporna na herbicyd Roundup® (ryc. 9).

Badania i analizy genetyczne wykazały także, że nie mogło nastąpić przepylenie z pola innego farmera uprawiającego tę samą roślinę. Plon został uzyskany nielegalnie, ponieważ farmer nie posiadał zezwolenia od firmy. Jednak sąd zakwestionował ten dowód z powodu sposobu jego uzyskania. Okazało się, że próbki roślin z pola farmera zostały pobrane bez jego zgody, potajemnie przez prywatnych detektywów wynajętych przez firmę Monsanto [27].



Ryc. 9. Canola (*Brassica napus* L.)
(źródło: <http://www.angelfire.com/sk/cmwinter/>)
Fig. 9. Canola (*Brassica napus* L.)

We Włoszech użycie techniki RAPD pozwoliło rozstrzygnąć sprawę dotyczącą nielegalnej komercjalizacji opatentowanej odmiany truskawek Marmolada [16].

W Indiach dzięki technikom analizy DNA rozstrzygnięto spór dotyczący handlu fałszywymi nasionami chili (*Capsicum annum*) pod markową nazwą. Do odróżnienia 4 spornych próbek użyto metod opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy (SSR-PCR i FISSR-PCR) [13].

Wnioski

- Genetyczna analiza śladów pochodzenia roślinnego stwarza duże, nie w pełni dotychczas wykorzystane, możliwości w uzyskiwaniu cen-

ných dowodów w sprawach sądowych.

● Genetyczna analiza umożliwia identyfikację i indywidualizację próbek w sprawach związanych z handlem narkotykami, która nie jest możliwa przy użyciu metod biochemicznych.

● Badania materiału botanicznego powinny być wykonywane przez wykwalifikowany personel i przy użyciu sprzętu laboratoryjnego mogącego zapewnić powtarzalne i wiarygodne wyniki.

BIBLIOGRAFIA

1. Augustyniak H.: Specyfika genów organellowych. Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie. Pod redakcją Barciszewskiego J., Łastowskiego K., Twardowskiego T., wyd. Sorus 1996, s. 81–97.
2. Bartkowiak S.: Wykorzystanie metod biologii molekularnej w badaniach genetycznych i hodowli roślin. Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie. Pod redakcją Barciszewskiego J., Łastowskiego K., Twardowskiego T., wyd. Sorus 1996, s. 493–506.
3. Bever R, Cimino M.: Forensic Molecular Botany: Identification of plants from trace evidence. Twelfth International Symposium on Human Identification Biloxi, MI; 2001.
4. Brown T.A.: Genomy, PWN, Warszawa 2001, 18–21; 45–48.
5. Butler W.: Duquenois-Levine test for marijuana, „J. Assoc. of Anal. Chem.”, 1962; 45: 597–600.
6. Court of Appeals of Arizona Division 1, Department C. STATE of Arizona, Appellee, v. Mark Alan BOGAN, Appellant. No. 1 CA-CR 93-0453. April 11, 1995. As Corrected April 13, 1995. Review Granted Nov. 21, 1995.
7. Degani C., Rowland L.J., Levi A., Hortyński J.A., Galletta G.J.: DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, „Euphytica” 1998.
8. Gigliano G.S.: Identification of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) using restriction profiles of the Internal Transcribed Spacer II (ITS2), „Sci Justice” 1998, Oct–Dec; 38 (4): 225–30.
9. Gigliano G.S., Caputo P., Cozzolino S.: Ribosomal DNA analysis as a tool for the identification of *Cannabis sativa* L. specimens of forensic interest, „Sci Justice” 1997 Jul–Sep; 37 (3): 171–4.
10. Gigliano G.S., Di Finizio A.: The *Cannabis sativa* L. fingerprint as a tool in the forensic investigations, „Bull. Narc.”, 1997; 49: 1–10.
11. Gillan R., Cole M. D., Linacre A., Thorpe J.W., Watson N.D.: 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.
12. Gilmore S., Peakall R., Robertson J.: Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations, „Forensic Sci. Int.” 2003, Jan 9; 131 (1): 65–74.
13. Kumar L.D., Kathirvel M., Rao G.V., Nagaraju J.: DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays, Laboratory of Molecular Genetics, Center for DNA Fingerprinting and Diagnostics, 4–87/1 Nacharam India.
14. Małuszyńska J.: Porównawcze badania organizacji genomu roślinnego, „Postępy biologii komórki” 1999, vol. 26, issue 3, s. 507–522.
15. Michalik B.: Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin, Drukrol. Kraków 1996, 103–105.
16. Miller Coyle H., Ladd C., Palmbach T., Lee H.C.: The green revolution: botanical contributions to forensics and drug enforcement, „Croat. Med. J.” 2001, 42 (3): 340–345.
17. Miller Coyle H., Palmbach T., Julian N., Ladd C., Lee H.C.: An Overview of DNA Methods for the Identification and Individualization of Marijuana, „Croat. Med. J.” 2003, Jun; 44 (3): 315–21.
18. Miller Coyle H., et al.: A Simple DNA Extraction Method for *Cannabis sativa* samples useful for AFLP analysis, „J. Forensic Sci.” 2002.
19. Miller Coyle H., Germano-Presby J., Ladd C., Palmbach T., Lee H.C.: Tracing clonal marijuana using amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis an overview, www.promega.com/geneticid-proc/ussymp13proc/contents/miller_coyle_manuscript1.pdf.
20. Rajora O.P., Rahman M.H., Dayanandan S., Mosseler A.: Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species, „Mol. Gen. Genet.” Feb; 264 (6): 871–82, 2001.
21. Reuters: Norwegian pine tree DNA taped for murder evidence, Wednesday, March 13, 2002.
22. Ridgway K.P., Duck J.M., Young J.P.W.: Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron, „BMC Ecology” 2003, 3:8.
23. Shen Y., Newbury H.J., Ford-Lloyd B.V.: Identification of Taxa in the Genus *Beta* using ITS1 Sequence Information, „Plant Molecular Biology Reporter” 1998, 16: 147–155.
24. Szczepanik W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. PWN, Warszawa 1999.
25. Śmiech M., Świąder M., Pawlak J., Niemirowicz-Szczytt K.: Ocena wyrównania i identyfikacji kufi i mieszkańców kawona [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum et Nakai] techniką RAPD. „Folia Horticulturae” Ann. 2001, 13/1A: 169–176.
26. Tomaszewska M., Włodarczyk Z., Szelaąg M., Sołtyśzewski I.: Ślady pochodzenia botanicznego w ekspertyzach kryminalistycznych, „Problemy Kryminalistyki” 2003, 242, s. 16–22.
27. Weiss R.: Monsanto Investigators Accused of Trespassing, „Washington Post” 1999, May; 2.
28. Welsh, J., i Mc Clelland M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, „Nucleic Acids Research” 1990, 18: 7213–7218.
29. Węgleński P., Fikus M.: Rekombinowanie i klonowanie DNA. W: Genetyka molekularna, PWN, Warszawa 2000, s. 156–190.
30. Wilkinson M., Linacre A.M.: The detection and persistence of *Cannabis sativa* DNA on skin, „Sci Justice” 2000 Jan–Mar; 40 (1): 11–4.
31. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.: DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, „Nucleic Acids Research” 1990, 18: 6531–6535.
32. Witkiewicz Z.: Podstawy chromatografii, WNT, Warszawa 1995.