Zastosowanie analiz DNA drewna w postępowaniu karnym

DNA druk.indd 1 2014-05-26 09:21:51

Podziękowania

Autorzy kierują wyrazy wdzięczności za pomoc w pozyskaniu materiału dowodowego i porównawczego do pracowników Nadleśnictwa Kozienice w Pionkach, nadleśnictw: Brzeziny, Chojnów, Gołdap, Olecko i Oława; oraz do pracowników Komendy Wojewódzkiej Policji w Radomiu. Szczególne podziękowania należą się również Koleżankom i Kolegom zaangażowanym w analizy laboratoryjne DNA w Zakładzie Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych Instytutu Badawczego Leśnictwa: Jolancie Bieniek (starszemu technologowi), mgr Małgorzacie Borys, mgr Anecie Michalskiej, mgr. Marcinowi Kliszowi, mgr inż. Ewie Aniśko, mgr. inż. Markowi Bodyłowi, mgr. inż. Władysławowi Kantorowiczowi, dr. inż. Janowi Kowalczykowi, dr. inż. Janowi Matrasowi, Jerzemu Przyborowskiemu i mgr. inż. Pawłowi Przybylskiemu.

Badania przeprowadzono na zlecenie Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych w ramach grantu badawczego BLP-333 „Metody identyfikacji drewna na podstawie analizy DNA dla potrzeb procesowych Straży Leśnej".

DNA druk.indd 2 2014-05-26 09:21:51

Justyna A. Nowakowska
Instytut Badawczy Leśnictwa
Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych

Tadeusz Pasternak
Dyrekcja Generalna Lasów Państwowych

§ Zastosowanie analiz DNA drewna w postępowaniu karnym

Centrum Informacyjne
Lasów Państwowych

DNA druk.indd 3 2014-05-26 09:21:51

Wydano na zlecenie Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych
Warszawa 2014

© Centrum Informacyjne Lasów Państwowych
ul. Bitwy Warszawskiej 1920 r. nr 3
02–362 Warszawa
tel. 22 822 49 31, faks 22 823 96 79
e-mail: cilp@cilp.lasy.gov.pl
www.lasy.gov.pl

Recenzje
prof. dr hab. Karol Sławik
inż. Zbigniew Litwin

Redaktor prowadzący
Maria Mozolewska-Adamczyk

Redakcja
Ewa Sulejczak

Zdjęcia
Justyna A. Nowakowska, Marcin Klisz, archiwum IBL

Zdjęcie na okładce
Justyna A. Nowakowska

Korekta
Małgorzata Zygmont

ISBN 978-83-63895-18-1

Projekt graficzny, skład i przygotowanie do druku
EDO – Jakub Łoś

Druk i oprawa
Ośrodek Rozwojowo-Wdrożeniowy Lasów Państwowych w Bedoniu

DNA druk.indd 4 2014-05-26 09:21:51

Spis treści

Od autorów 7

1. Wstęp 9

2. Prawne aspekty identyfikacji drewna metodą DNA 15

2.1. Statystyka zwalczania szkodnictwa leśnego 15
2.2. Uprawnienia karnoprocesowe Straży Leśnej 20
2.3. Postępowanie dowodowe 23
2.4. Oględziny 25
2.5. Czynności kryminalistyczne 27
2.6. Opinia biegłych 32
2.7. Analiza śladów biologicznych 34
2.8. Ekspertyza na podstawie analizy DNA 34
2.9. Opinia biegłych i badanie DNA w orzecznictwie sądowym 35
2.10. Stwierdzenia końcowe i wnioski 45

3. Identyfikacja drewna na podstawie analiz DNA 47

3.1. Podstawy analiz cząsteczek DNA 49
3.1.1. Zasady prawidłowego zabezpieczania w terenie materiału dowodowego i porównawczego do badań DNA 49
3.1.2. Ekstrakcja DNA genomowego i ocena jakościowa 52
3.1.3. Analiza markerów DNA w reakcji PCR 57

3.1.4. Statystyczna analiza danych 60
3.1.5. Identyfikacja próbek materiału na podstawie profili DNA 60
3.2. Identyfikacja próbek drewna sosny zwyczajnej 62
3.3. Identyfikacja próbek drewna świerka pospolitego 73
3.4. Identyfikacja próbek drewna dębu szypułkowego i dębu bezszypułkowego 81
3.5. Identyfikacja próbek drewna buka zwyczajnego 89
3.6. Identyfikacja próbek drewna olszy czarnej 97
3.7. Identyfikacja próbek drewna brzozy brodawkowatej 105

4. Podsumowanie 113

5. Piśmiennictwo 117

6. Słownik pojęć genetycznych i prawniczych 125

Od autorów

Od pewnego czasu leśnicy poszukują nowoczesnych metod ochrony drewna przed kradzieżą. W profilaktyce oraz w walce z nielegalnym obrotem drewnem coraz częściej wykorzystuje się wyniki badań naukowych i nowoczesne zdobycze techniki. Przykładem jest znakowanie kłód czy dłużyc wartościowych gatunków drewna środkami fluorescencyjnymi, których nie widać w normalnym, dziennym świetle, ale są za to widoczne po oświetleniu drewna promieniami ultrafioletowymi. Inną metodą zabezpieczany jest składowany surowiec. Oprócz jego cechowania stosuje się monitorowanie złożonego drewna niewidoczną siecią przewodów tworzących obwód zamknięty. W chwili jego przerwania do Straży Leśnej dociera sygnał świadczący o naruszeniu zabezpieczenia. W miejsce tradycyjnego cechowania drewna wprowadza się również umieszczanie na pojedynczych sztukach surowca chipów – niewidocznych, a pozwalających na ich identyfikację nawet ze znacznej odległości. Zastosowanie tej metody rozważają instytucje międzynarodowe i organizacje certyfikujące drewno, głównie w krajach, które stanowią źródło nielegalnego handlu cennymi gatunkami drewna tropikalnego.

Od niedawna nowoczesne metody oparte na identyfikacji DNA mogą być bardzo pomocne w rozstrzygnięciu wątpliwości Straży Leśnej dotyczących kradzieży drewna, a nawet stanowić dowód w postępowaniu procesowym. Analiza DNA materiału organicznego jest metodą powszechnie stosowaną w kryminalistyce i medycynie sądowej, ponieważ dostarcza dowodów rozstrzygających wątpliwości w identyfikacji badanych prób materiału dowodowego, często pobranego w ilości śladowej. Jest to możliwe, ponieważ genom DNA drzewa zawiera tak samo niepowtarzalne informacje jak u człowieka odciski palców z indywidualizującymi liniami papilarnymi.

Obecnie w Instytucie Badawczym Leśnictwa wykonuje się analizy porównawcze DNA drewna pochodzącego z następujących gatunków drzew: sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L., świerka pospolitego *Picea abies* (L.) Karst., dębu szypułkowego *Quercus robur* L., dębu bezszypułkowego *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., buka zwyczajnego *Fagus sylvatica* L., olszy czarnej *Alnus glutinosa* Gaertn., brzozy brodawkowatej

Betula pendula Roth, jesionu wyniosłego *Fraxinus excelsior* L., jodły pospolitej *Abies alba* L., modrzewia europejskiego *Larix decidua* Mill. i modrzewia japońskiego *Larix kaempferi* Sorg. Badania innych gatunków drzewiastych są na tyle zaawansowane, że niebawem dostarczą pozytywnych wyników.

Prace nad identyfikacją osobniczą na podstawie struktury łańcuchów DNA to dynamicznie rozwijająca się dziedzina badań, obejmująca coraz więcej gatunków organizmów, która dostarcza cennych dowodów w licznych postępowaniach karnych. Prowadzone są m.in. analizy umożliwiające identyfikację patogenów grzybowych *Heterobasidion annosum* i *H. parviporum*, powodujących rozkład drewna i zamieranie drzew. To także ma znaczenie w orzecznictwie sądowym. Na przykład stwierdzenie obecności tych patogenów w materiale dowodowym uniewinniło oskarżonego o spowodowanie zagrożenia dla życia ludzi przez przewrócony na posesji żywopłot świerkowy, gdyż okazało się, że przyczyną była groźna choroba – huba korzeni, wywołana przez te patogeny, a nie zaniedbanie ludzkie.

W badaniach genomu najczęściej stosuje się markery DNA, które są obecnie najprecyzyjniejszym narzędziem identyfikacji gatunkowej i osobniczej wszystkich organizmów żywych. W analizach porównawczych materiału pobranego z drewna drzew leśnych, które charakteryzuje bogata pula genowa, najbardziej przydatne są markery DNA mikrosatelitarnego, a to ze względu na ich wysoki polimorfizm (zróżnicowanie) oraz automatyzację detekcji w laboratorium biochemicznym.

Atutami analiz DNA są szybkość ich wykonania oraz to, że budowa sekwencji DNA nie zależy od wieku i cech morfologicznych drzew. W badaniach DNA kryterium oceny stanowią profile genetyczne, tworzące niejako „odcisk palca" każdego drzewa; takie profile są wykorzystywane w analizie porównawczej materiału dowodowego, np. pniaka w lesie lub kawałków drewna zabezpieczonych u podejrzanego.

Niniejsze opracowanie zawiera szczegółowy opis prawnych aspektów kradzieży drewna oraz prezentację wyników kilkuletniej pracy nad określeniem markerów DNA najbardziej użytecznych do identyfikacji drewna na potrzeby procesowe Straży Leśnej w Polsce. Autorzy szczególnie dziękują recenzentom prezentowanego opracowania, prof. dr. hab. Karolowi Sławikowi z Wydziału Prawa i Administracji Uniwersytetu Szczecińskiego oraz inż. Zbigniewowi Litwinowi, Komendantowi Posterunku Straży Leśnej z Nadleśnictwa Włoszczowa za merytoryczną ocenę pracy i mają nadzieję, że publikacja okaże się przydatna szerokiemu gronu odbiorców, w tym pracownikom Straży Leśnej, funkcjonariuszom Policji, naukowcom, studentom i praktykom leśnym, zainteresowanym tematyką kradzieży drewna.

DNA druk.indd 8 2014-05-26 09:21:51

1.

Wstęp

Drewno jest niezastąpionym materiałem w budownictwie, ciepłownictwie i wielu innych dziedzinach. Nielegalny obrót drewnem najbardziej dotyka szybko rozwijające się kraje Ameryki Południowej i Azji, o dużym potencjale sektora leśnego. Każdego roku, podobnie jak na świecie, tak i w polskich lasach mają miejsce kradzieże drewna. Szacuje się, że generują one w Lasach Państwowych straty większe niż powstałe z innych powodów (kłusownictwa, pożarów spowodowanych bezmyślnym zachowaniem w lesie, niszczeniem mienia nadleśnictw); określa się je na 3–5,3 mln zł rocznie (Pasternak 2008, 2011). Poza stratami materialnymi nielegalne pozyskiwanie drewna często niesie ze sobą naruszenie, a nawet zniszczenie równowagi gatunkowej ekosystemu leśnego.

W okresie 1992–2011 maksimum szkód przypadło na lata 1994–1996 (powyżej 13 tys. zanotowanych przypadków). Później liczba kradzieży zmalała (do 6893 w 2008 r.), następnie wzrosła o 16,4%: do 8878 przypadków, w których wyniku Państwowe Gospodarstwo Leśne Lasy Państwowe straciło 26 939,41 m^3 drewna o wartości 5 323 200 zł (Pasternak 2011). Niejednokrotnie sprawcy szkód pozostają bezkarni, gdyż są coraz lepiej zorganizowani i wyposażeni w profesjonalny sprzęt, a sposoby, jakimi maskują ślady przestępstwa, uniemożliwiają udowodnienie im winy w sądzie (Jaroń 2006, Nowak 2003, 2006).

Głównymi metodami stosowanymi dotąd w identyfikacji skradzionego drewna są mechanoskopia i dendrochronologia.

Identyfikacja mechanoskopowa polega m.in. na porównaniu wspólnych cech, np. krążka drewna pochodzącego z pniaka z krążkiem z dolnej części ściętego drzewa. W mechanoskopii porównuje się słoje przyrostów rocznych, sęki, zabarwienia i korę w materiale dowodowym, np. u sosny, świerka, jodły, dębu, buka i olszy, z materiałem porównawczym – najczęściej pniakiem pozostawionym w lesie. W metodzie tej można również dopasować do kawałków drewna fragmenty desek

i bali lub sęki czy porównać profile przyrostów na podstawie szczegółowych badań dendrochronometrycznych.

Pozostawione w lesie pniaki stanowią materiał porównawczy w postępowaniu, a pobrane z niego próbki są niezbędne do identyfikacji drewna przy prowadzeniu dochodzenia o kradzież i udowodnieniu winy. Informacje uzyskane z materiału dowodowego są źródłem wiedzy o tym, jakie drzewo rosło w danym miejscu, w jakim było wieku i jaką przedstawiało wartość.

Szacowanie strat wynikających z kradzieży jest możliwe dzięki tablicom, które pozwalają określić miąższość skradzionego drewna dla kilkunastu gatunków drzew leśnych na podstawie grubości podstawy (bez kory) i wysokości pniaka (Bruchwald i in. 2002). Możliwe jest również określenie wysokości drzewa oraz związku między pierśnicą drzewa a grubością jego podstawy w celu ustalenia miąższości drzew skradzionych z lasu lub terenu otwartego.

W ustaleniu tożsamości drzew może być pomocny również precyzyjny odczyt budowy słoi drewna, powiązany z danymi klimatycznymi (susze, opady) oraz innymi czynnikami biotycznymi (np. gradacjami owadów i patogenów grzybowych). Z przyrostów rocznych można wyczytać zmiany składu atmosfery, wywołane np. wybuchem wulkanu, oraz kolejne rytmy aktywności i spoczynku danego drzewa (Zielski i Krąpiec 2004). Otrzymany wzór przyrostowy próbek drewna, przyporządkowany konkretnym wydarzeniom kalendarzowym, jest istotą metody dendrochronologicznej w identyfikacji kradzionego drewna.

Obecnie pomocne są również nowoczesne metody oparte na identyfikacji DNA, które pomagają w rozstrzygnięciu wątpliwości Straży Leśnej i Policji w sprawach dotyczących kradzieży drewna.

Badanie struktury genetycznej materiału organicznego (w tym drewna) przeprowadzone na podstawie badania DNA jest metodą powszechnie stosowaną w kryminalistyce i medycynie sądowej, ponieważ dostarcza dowodów rozstrzygających wątpliwości co do identyfikacji i pochodzenia danej próbki, często pobranej w ilości śladowej (Bal 2006). Aby ująć sprawcę kradzieży, wystarczającym materiałem dowodowym w postępowaniu Straży Leśnej i Policji w sprawach karnych są niewielkie kawałki drewna lub części drzew pozyskanych nielegalnie.

Molekularna analiza DNA roślin drzewiastych jest z powodzeniem stosowana do określania genotypów i charakterystyki populacji wielu gatunków drzew leśnych, głównie do badań genetycznych na poziomie wewnątrz- i międzypopulacyjnym, np. rodzajów *Quercus*, *Populus*, *Fraxinus*, *Fagus*, *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Ulmus*, *Betula*, *Malus* i *Prunus* (Demesure i in. 1995, Dumolin-Lapègue i in. 1997, Petit i in. 1997, Petit 1999, Vendramin i in. 1996, Oddou-Muratorio i in. 2001, Morand i in. 2002, Wunsch i Hormaza 2002, Rajora i Rahman 2003, Nowakowska i in. 2005).

Współczesne badania w dziedzinie genetyki molekularnej umożliwiają precyzyjną identyfikację leśnych zasobów genowych w celu określenia ich filogenezy oraz poziomu zróżnicowania genetycznego na poziomie informacji genetycznej zawartej w DNA

jądrowym, mitochondrialnym i chloroplastowym (Hamrick i in. 1992, Newton i in. 1999, Soranzo i in. 2000, Petit i in. 2002a, 2002b, Kremer i Reviron 2004).

Atutem analiz DNA jest względna szybkość ich wykonania oraz to, że budowa sekwencji DNA nie zależy od wieku i cech morfologicznych badanego drzewa. W badaniach DNA kryterium oceny stanowią profile genetyczne, tworzące niejako „odcisk palca" każdego drzewa. Takie profile są wykorzystywane w analizie porównawczej materiału dowodowego – czyli kawałków drewna zabezpieczonych u podejrzanego z materiałem porównawczym, np. pniakiem w lesie.

W identyfikacji genotypu danego organizmu na poziomie DNA stosuje się markery genetyczne, czyli fragmenty DNA o wielkości od kilkudziesięciu do kilkuset par zasad, które umożliwiają precyzyjną i szybką charakterystykę pojedynczych organizmów lub całych populacji. Najczęściej stosowane są markery DNA mikrosatelitarnego (ang. SSR lub STR), które dotyczą wysoce polimorficznych (zróżnicowanych) regionów genomu (całego DNA) i stanowią obecnie jedno z najprecyzyjniejszych narzędzi badawczych stosowanych w celu określenia struktury genetycznej badanych osobników.

Inny typ markerów, które mogą znaleźć zastosowanie w identyfikacji DNA drewna, stanowią markery DNA organellowego, np. markery STS i PCR-RFLP, zlokalizowane w mitochondriach i chloroplastach.

Dużym atutem stosowania markerów DNA jest szybkość wykonania analiz, na które składają się trzy podstawowe etapy: izolacja DNA, powielanie fragmentów DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. PCR) i analiza porównawcza otrzymanych profili genetycznych. DNA pozyskane z materiału roślinnego jest poddawane wielokrotnemu namnażaniu w termocyklerach, gdzie zachodzi reakcja PCR. W czasie takiej reakcji powielane są te fragmenty wybrane z całego DNA, dzięki którym otrzymuje się obraz (profil) charakterystyczny dla każdej próbki. Wydajność i precyzja reakcji PCR są niezwykle wysokie, teoretycznie pozwalają na uzyskanie milionów kopii wyjściowej matrycy cząsteczki DNA pochodzącej z próbki (Sambrook i Roussel 2001).

Ponieważ każde drzewo ma inny, prawie niepowtarzalny wzorzec markerów DNA, w badaniach porównawczych naukowcy koncentrują się na tych fragmentach genomu, które pozwalają z największym prawdopodobieństwem odróżnić drewno pochodzące od danego osobnika od innego. Jeśli oba profile genetyczne są identyczne, metody oparte na analizach DNA umożliwiają dopasowanie do siebie badanych próbek materiału dowodowego i porównawczego z prawie 100-procentową pewnością. „Prawie", bo mimo identyczności dwóch profili genetycznych drewna (z materiału dowodowego i materiału porównawczego), istnieje bardzo nikłe (rzędu $1 \cdot 10^{-4}$), tzw. przypadkowe, prawdopodobieństwo wystąpienia identycznego profilu genetycznego w innym pniaku w lesie. Przypadkowa identyczność badanych prób wynika m.in. z procesów przepływu genów pomiędzy badanymi drzewami (np. przez pyłek tylko z jednego lub kilku ojców) oraz zmiany idące w kierunku

zwiększenia występowania „korzystnych" alleli w populacji w wyniku selekcji adaptacyjnej gatunku do danego siedliska.

Istotą badań porównawczych opartych na analizach DNA jest opracowanie takiego zestawu markerów genetycznych, które optymalizują szansę wykrycia różnic, innymi słowy – mają wysoką siłę dyskryminacji między osobnikami. W populacji ludzkiej siła dyskryminacji określonego zestawu markerów SSR sięga wartości 0,949156 (94,92%), pozwala więc zaklasyfikować ten zestaw markerów jako użyteczny w identyfikacji osobniczej dla potrzeb kryminalistyki oraz rozstrzygnięcia spornego ojcostwa (Konarzewska i in. 2006). Markery mikrosatelitarne są tak wysoce zmienne w badanych populacjach organizmów żywych, że wystarczy analiza tylko paru *loci* mikrosatelitarnych, aby uzyskać łączną wartość prawdopodobieństwa genetycznego na poziomie wyższym niż 99%. Największa wartość siły dyskryminacji markerów DNA osiągana w badaniach materiału organicznego to 0,99999 (99,99%; Wysocka i in. 2008).

W Instytucie Badawczym Leśnictwa prowadzone są od lat analizy struktury genetycznej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) Karst.), modrzewia japońskiego (*Larix kaempferi* Sorg.) i europejskiego (*Larix decidua* Mill.), dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) i bezszypułkowego (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) i buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.). Celem tych analiz jest zbadanie markerów DNA jądrowego i mitochondrialnego, m.in. RAPD, STS, PCR-RFLP i SSR (Szyp-Borowska 2005, Nowakowska 2006, 2007a, 2009, Nowakowska i in. 2007, Jagielska 2008, Sułkowska i in. 2008).

Dotąd nie przeprowadzono w Polsce wielu szczegółowych badań poświęconych identyfikacji drewna podstawowych gatunków lasotwórczych, wykorzystujących markery polimorfizmu DNA (Dzialuk i Burczyk 2005, Nowakowska 2011). Niniejsze opracowanie uzupełnia tę lukę, przedstawiając analizy identyfikacji materiału dowodowego z porównawczym, w których wykorzystuje się zestawy markerów DNA sześciu podstawowych gatunków lasotwórczych.

Celem badań było opracowanie techniki opartej na kombinacji markerów DNA jądrowego i organellowego, przydatnych do identyfikacji materiału dowodowego i porównawczego drewna: sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) Karst.), dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) i dębu bezszypułkowego (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.), buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.), olszy czarnej (*Alnus glutinosa* Gaertn.) i brzozy brodawkowatej (*Betula pendula* Roth). W związku z matecznym sposobem dziedziczenia markerów organellowych u drzew leśnych przetestowano przydatność markerów DNA mitochondrialnego do określenia wzorców genetycznych (tu: haplotypów) dłużyc i pniaków sosny i świerka oraz DNA chloroplastowego – dla drewna dębu, buka, olszy i brzozy.

Głównym założeniem badań było opracowanie metody identyfikacji drewna przydatnej do szybkiej i praktycznej diagnostyki molekularnej osobników, opartej

na wzorcach wybranych alleli, uwzględniającej prawdopodobieństwo przypadkowego wystąpienia w drzewostanie identycznych osobników.

Takie badania DNA mogą z powodzeniem stanowić uzupełnienie stosowanych dotąd metod wykrywania sprawców kradzieży sortymentu drzewnego (mechanoskopii, dendrochronologii i obliczeń miąższości). Ponadto wpisują się w podejmowane na poziomie Unii Europejskiej akcje FLEGT[1], LULUCF[2] i REDD[3], których głównym celem jest monitoring nielegalnego handlu drewnem między krajami pozaeuropejskimi a Europą oraz promowanie importu surowca drzewnego ze źródeł legalnych.

Dane uzyskane dzięki badaniom posłużyły do opracowania:

- wytycznych dla pracowników Straży Leśnej z zakresu wykorzystania analiz DNA do identyfikacji drewna;
- zasad pobierania próbek do analiz genetycznych.

Zawarte w wytycznych szczegółowe opisy postępowania przy prawidłowym pobieraniu próbek materiału dowodowego oraz porównawczego będą pomocne w identyfikacji pochodzenia drewna badanych gatunków na potrzeby procesowe.

Ponadto szczegóły analiz DNA służących identyfikacji drewna na potrzeby Straży Leśnej oraz metodykę zabezpieczania próbek drewna w terenie przedstawiono w filmie „Analizy DNA w walce z nielegalnym obrotem drewna" (Nowakowska i Górniak 2010).

Wszelkie używane skróty i terminy genetyczne oraz pojęcia prawne zawarto w słowniku.

[1] FLEGT – Forest Law Enforcement, Governance and Trade.

[2] LULUCF – Land Use and Land Use Change and Forestry.

[3] REDD – Reducing Emissions from Deforestation and Forest Degradation in Developing Countries.







2.

Prawne aspekty identyfikacji drewna metodą DNA

2.1. Statystyka zwalczania szkodnictwa leśnego

Szkodnictwo leśne jest zjawiskiem znanym w polskich lasach od kilku wieków, przynoszącym znaczne straty w wymiarach rzeczowym, finansowym i przyrodniczym. Chociaż charakter popełnianych w lasach szkód nieco się zmienił, to od lat Skarb Państwa ponosi z ich powodu wielomilionowe straty.

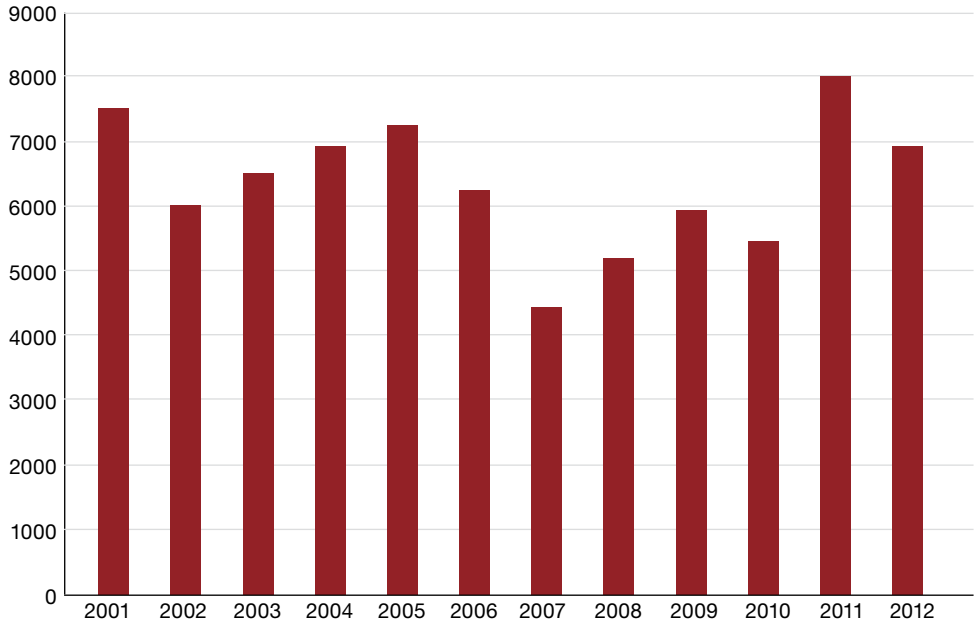
Na podstawie informacji z nadleśnictw z całego kraju corocznie sporządza się analizę zwalczania szkodnictwa leśnego dla centralnych (w tym rządowych) instytucji państwowych. Szkodnictwo leśne ujęte jest w niej według czterech grup rodzajowych: **bezprawnego korzystania z lasu**, **kłusownictwa**, **kradzieży albo zniszczenia mienia** oraz **kradzieży drewna**. W 2012 r. w wyniku 56 137 zanotowanych przypadków szkodnictwa leśnego ogólna wartość szkód wyniosła ponad 7 mln zł (dane z lat 2001–2012 przedstawia tab. 1).

Tabela. 1. Szkodnictwo leśne w 2012 r. na tle lat 2005–2011

Wyszczególnienie	Liczba przypadków	Wartość szkód (tys.)	Masa skradzionego drewna (m^3)	Restytucja (windykacja) (tys.)
Kradzież drewna	6451	3906,65	19 715,60	1324,87
Kłusownictwo	331	1398,90	x	80,17
Kradzież i zniszczenie mienia	1337	1335,63	x	69,84
Bezprawne korzystanie z lasu	48 018	398,13	x	43,72
2012	**56 137**	**7039,30**	**19 715,60**	**1518,59**
2011	*52 336*	*8141,65*	*26 939,41*	*2127,73*
2010	*62 821*	*5559,98*	*20 628,75*	*2347,81*
2009	*55 429*	*5986,58*	*22 238,66*	*1545,55*

Wyszczególnienie	Liczba przypadków	Wartość szkód (tys.)	Masa skradzionego drewna (m^3)	Restytucja (windykacja) (tys.)
2008	*58 450*	*5263,71*	*18 495*	*1773,46*
2007	*43 747*	*7073,73*	*19 164*	*2508,50*
2006	*14 435*	*6438,38*	*25 035*	x
2005	*14 114*	*7419,90*	*27 900*	x

Kradzież drewna to proceder szkodnictwa leśnego, który – spośród wszystkich grup szkodnictwa – generuje corocznie największe straty ponoszone przez Lasy Państwowe. Wysokość strat w poprzednich latach przedstawia ryc. 1.



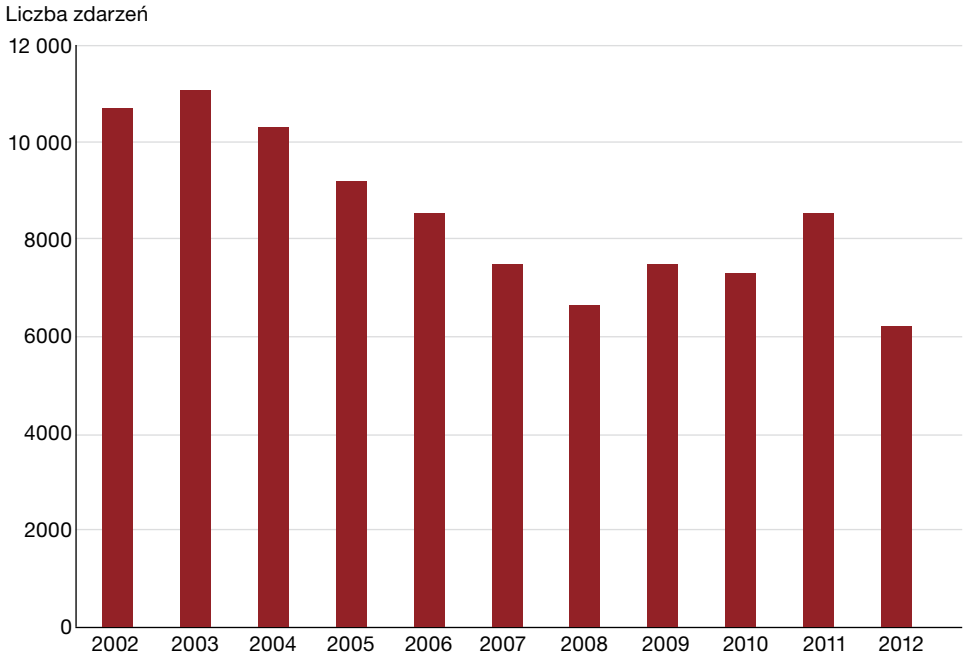
Ryc. 1. Wysokość strat w wyniku szkodnictwa leśnego w latach 2001–2012 (w tys. zł)

W 2012 r. odnotowano w Lasach Państwowych 6451 przypadków kradzieży drewna; skradziono 19 715,60 m^3 drewna o wartości 3 906 650 zł. W porównaniu z rokiem poprzednim oznacza to spadek:

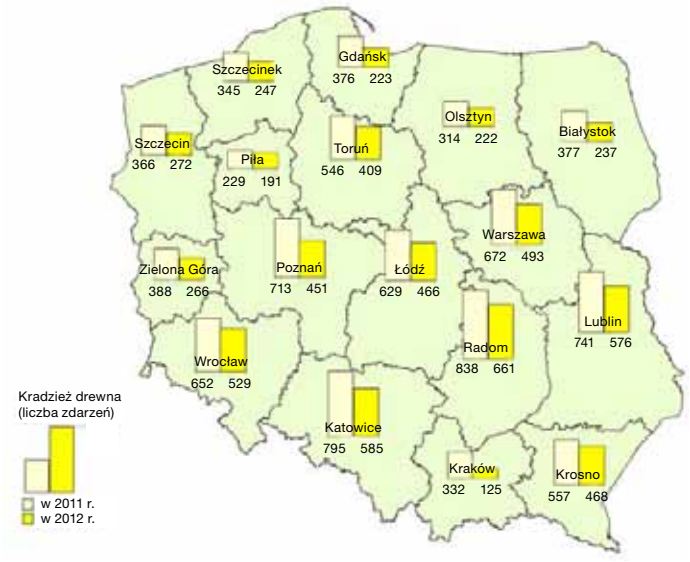
1) liczby odnotowanych przypadków kradzieży o 27,27%,
2) ilości (masy) skradzionego drewna o 23,42%,
3) strat z tego tytułu o 37,28%.

Liczba przypadków kradzieży drewna w 2012 r. jest najniższa od co najmniej 21 lat. Do takiego spadku, który zanotowano na terenach wszystkich regionalnych dyrekcji Lasów Państwowych, przyczyniło się coraz powszechniejsze stosowanie monitoringu wizyjnego oraz zastosowanie techniki kryminalistycznej w postaci analizy

DNA drewna w postępowaniu dowodowym prowadzonych spraw. Liczbę zanotowanych przypadków kradzieży drewna z Lasów Państwowych w latach 2002–2012 przedstawia ryc. 2.



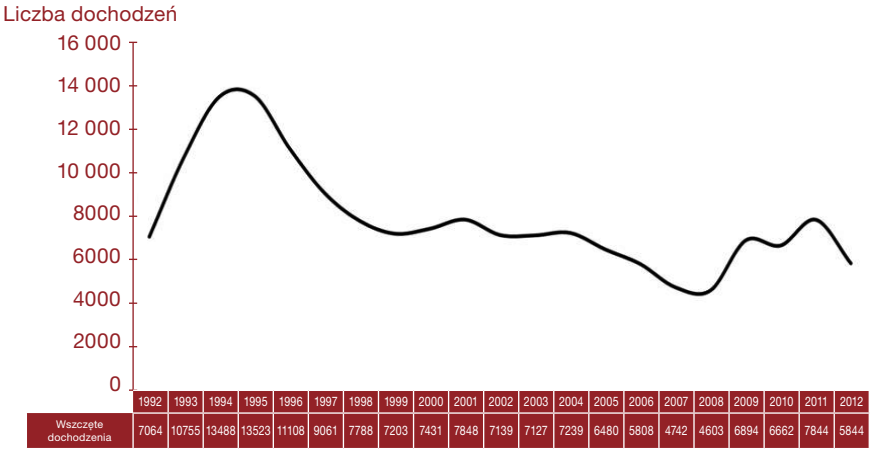
Ryc. 2. Kradzież drewna w Lasach Państwowych w latach 2002–2012



Ryc. 3. Kradzież drewna według województw w latach 2011 i 2012

Prezentowane dane odnoszą się do zdarzeń odnotowanych przez Straż Leśną na terenach leśnych zarządzanych przez Lasy Państwowe, jednak należy pamiętać, że problem ten dotyczy także terenów leśnych mających innych właścicieli. Zagrożenie kradzieżami drewna w skali Polski jest największe w środkowej i południowo-zachodniej części kraju (ryc. 3).

Do zwiększenia skuteczności działań Straży Leśnej przyczynia się również wzrost liczby ujawnianych przypadków szkodnictwa i wzrost wykrywalności sprawców. W 2012 r. ujawniono 2627 sprawców kradzieży drewna. Dane dla lat 1992–2012 przedstawia ryc. 4; wynika z niej, że Straż Leśna może pochwalić się wzrostem wykrywalności sprawców kradzieży drewna z 28,9% w 1993 r. do 54,60% w roku 2007 (ryc. 5).

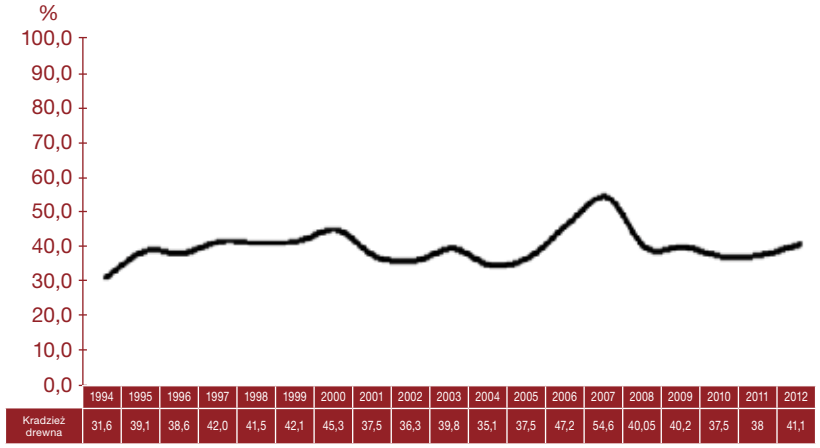


	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Wszczęte dochodzenia	7064	10755	13488	13523	11108	9061	7788	7203	7431	7848	7139	7127	7239	6480	5808	4742	4603	6894	6662	7844	5844

Ryc. 4. Dochodzenia w sprawach o kradzież drewna wszczęte przez Straż Leśną w latach 1992–2012

We wszystkich przypadkach kradzieży drewna wszczęto postępowania przygotowawcze. Straż Leśna w 2012 r. prowadziła 5844 postępowania (w tym 4627 dochodzeń), w 2011 r. – 7844 postępowań, w tym 5692 dochodzenia. Umorzono ogółem 4196 postępowań karnych.

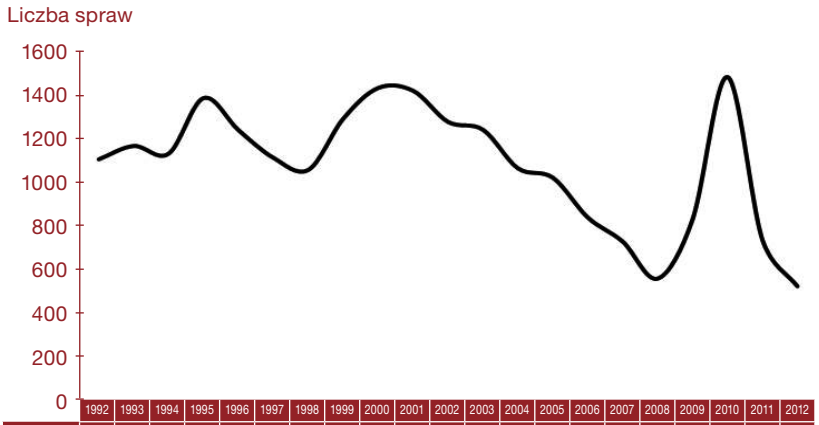
W 2012 r. z 1177 spraw wniesionych z aktem oskarżenia sądy umorzyły postępowanie lub uniewinniły sprawców w 51 sprawach. W 2011 r. z 1467 spraw sądy umorzyły postępowanie w 68 sprawach. Świadczy to o wysokim poziomie prowadzenia dochodzenia i sporządzenia aktu oskarżenia, a także o dużej skuteczności w postępowaniu sądowym. W 2010 r. z 2016 spraw umorzono 35, w 2009 r. z 1365 spraw wniesionych z aktem oskarżenia sądy umorzyły postępowanie lub uniewinniły sprawców w 66 sprawach (w 2008 r. było to odpowiednio 1893 i 51, w 2007 r. – 1317 i 67). W 2012 r. postępowanie odwoławcze zostało wniesione w 35 sprawach, natomiast w 2011 r. – w 20 sprawach (w 2010 r. w 22, w 2009 r. w 44, w 2008 r. w 42).



	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Kradzież drewna	31,6	39,1	38,6	42,0	41,5	42,1	45,3	37,5	36,3	39,8	35,1	37,5	47,2	54,6	40,05	40,2	37,5	38	41,1

Ryc. 5. Wykrywalność sprawców kradzieży drewna w sprawach wszczętych przez Straż Leśną w latach 1994–2012

Strażnicy leśni są, na podstawie art. 47 ust. 2 pkt 7 ustawy o lasach[4], upoważnieni do popierania oskarżenia (mają uprawnienia oskarżyciela publicznego), dlatego efektywność prowadzonych postępowań karnych o kradzież drewna jest wzmocniona także popieraniem aktu oskarżenia poprzez osobisty udział strażnika leśnego w rozprawie sądowej (ryc. 6).



	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Liczba spraw	1116	1177	1142	1396	1249	1123	1068	1302	1442	1429	1287	1251	1075	1032	850	740	571	842	1492	747	536

Ryc. 6. Udział Straży Leśnej w roli oskarżyciela publicznego w sprawach karnych w latach 1992–2012

Analiza wyników szkodnictwa leśnego wykazuje, że coraz większej liczby kradzieży surowca drzewnego dokonują wyspecjalizowane i zorganizowane grupy

[4] Ustawa z dnia 28 września 1991 r. o lasach (tekst jednolity: Dz.U. 2011 r. Nr 12, poz. 59).

przestępcze. Dysponują one samochodami ciężarowymi do wywozu drewna oraz sprzętem do jego ścinki i zrywki. Poważnym problemem stały się ostatnio kradzieże pozyskanego surowca, wyrobionego i zmagazynowanego w stosach lub mygłach. Z jednej strony zjawisko kradzieży jest wynikiem zubożenia ludności, z drugiej strony wzrasta liczba kradzieży drewna na zamówienie. Jej przedmiotem stają się pojedyncze, wcześniej upatrzone i starannie wybrane, szczególnie wartościowe drzewa, a nawet wycinane są całe fragmenty lasu, bez specjalnego wyboru drzew, z jednoczesną dewastacją terenu. Analizując wymierność strat, należy mieć na uwadze, że niekiedy po prostu nie da się ich wycenić. Kradzież wybranych drzew z lasu powoduje nierzadko nieodwracalne zniszczenie całego drzewostanu, a strata jest wciąż mierzona tylko wartością drewna, które sprawca przywłaszczył i wywiózł. Wyposażenie grup przestępczych w nowoczesne środki łączności, odpowiedni tabor i podrobioną dokumentację, zdobycie zaufanych odbiorców itd. powodują ogromne trudności w zwalczaniu tego procederu. Ilość skradzionego drewna wyrobionego zaczyna przewyższać ilość drewna skradzionego „z pnia", a w takich przypadkach wykrycie sprawcy jest znacznie trudniejsze. Wzrost cen drewna powoduje, że pomimo spadku liczby odnotowanych kradzieży wartość kradzionego drewna sukcesywnie rośnie. W najbliższej perspektywie należy liczyć się ze zwiększonym popytem na surowiec drzewny, co może sprzyjać procederowi.

Za popełnienie przestępstwa kradzieży drewna grożą sankcje: grzywna, areszt, ograniczenie wolności, nawiązka w wysokości podwójnej wartości skradzionego drewna, przepadek narzędzi i sprzętów użytych do kradzieży, wreszcie pozbawienie wolności do lat pięciu. Lecz to nie odstrasza sprawców. By mogli oni ponieść konsekwencje, należy ich ujawnić, a popełnienie przestępstwa kradzieży drewna im udowodnić.

2.2. Uprawnienia karnoprocesowe Straży Leśnej

Upoważnienie strażnika leśnego do wszczęcia i prowadzenia dochodzenia oraz popierania oskarżenia w sprawach o kradzież drewna pochodzącego z lasów stanowiących własność Skarbu Państwa zawarte jest w art. 47 ust. 2 pkt 7 ustawy o lasach. Ustawa stanowi, że **strażnik jest uprawniony do prowadzenia dochodzenia oraz wnoszenia i popierania wniesionej skargi w postępowaniu uproszczonym** w trybie i na zasadach określonych w kodeksie postępowania karnego. Upoważnienie obejmuje również żądanie kontroli zasadności orzeczenia sądu pierwszej instancji[5].

Katalog przestępstw, w przedmiocie których strażnik leśny może wszcząć i prowadzić dochodzenie oraz popierać akt oskarżenia to: kradzież (art. 278 § l k.k.),

[5] Postanowienie SN z 21 maja 1999 r., V KKN 85/99, OSNKW 1999 r. Nr 9–10, poz. 64; Biul. SN 1999 r. Nr 9, poz. 14; Prok. i Pr. 1999 r. Nr 11–12, poz. 5; OSP 2000 r. Nr 4, poz. 48.

wyrąb drzewa w lesie (art. 290 § l k.k.), zniszczenie lub uszkodzenie mienia (art. 288 § l k.k.), paserstwo umyślne (art. 291 § l k.k.) oraz paserstwo nieumyślne (art. 292 k.k.). Zawiadomienia o przestępstwie lub informacje od pracowników Służby Leśnej są najczęstszymi przesłankami inicjowania postępowania. **Zawiadomienie o przestępstwie** przewiduje wspólny protokół z przyjęcia ustnego zawiadomienia o przestępstwie i przesłuchania w charakterze świadka osoby zawiadamiającej, a także wniosek o ściganie (art. 304a k.p.k.).

Po przeprowadzeniu czynności sprawdzających (art. 307 k.p.k.), gdy zachodzi uzasadnione podejrzenie popełnienia przestępstwa, wszczynane jest dochodzenie (art. 303 k.p.k.). **Dochodzenie** to uproszczona forma **postępowania przygotowawczego**. Zadaniem dochodzenia (art. 297 k.p.k.) jest wykrycie sprawcy: zebranie danych o podejrzanym i wyjaśnienie okoliczności sprawy, w tym ustalenie rozmiarów szkody. W przestępstwach szkodnictwa leśnego przeprowadza się w tym zakresie **postępowanie dowodowe**, polegające m.in. na przesłuchaniu świadków, oględzinach miejsca i drewna, obliczeniu wartości zagarniętego drewna, konfrontacji, okazaniu itp.

Jeśli istnieje potrzeba podjęcia czynności procesowych niecierpiących zwłoki, określanych dochodzeniem w niezbędnym zakresie, strażnik leśny może na podstawie art. 308 k.p.k. dokonać m.in. oględzin, przeszukania, przesłuchania świadka, a nawet przesłuchania podejrzanego ujętego na gorącym uczynku lub w bezpośrednio podjętym pościgu. Faktyczne wszczęcie postępowania przygotowawczego następuje w momencie dokonania każdej z tych czynności. Poprzedzają one formalne wszczęcie, polegające na wydaniu postanowienia o wszczęciu dochodzenia, a są konieczne dla zabezpieczenia śladów i dowodów przestępstwa przed ich utratą, zniekształceniem lub zniszczeniem. W ciągu pięciu dni strażnik leśny jest wówczas zobligowany wydać postanowienie o wszczęciu dochodzenia. Decyzja strażnika nie wymaga uzasadnienia ani powiadomienia prokuratora.

W ramach gromadzenia dowodów w prowadzonej sprawie kradzieży drewna strażnik leśny jest upoważniony do przeprowadzenia oględzin oraz przesłuchania świadków i podejrzanych. Z oględzin sporządzany jest protokół oględzin miejsca kradzieży oraz drewna. Protokół powinien zawierać dokładne informacje dotyczące zagarniętego drewna oraz opisanie wszystkich śladów i danych, jakie uda się ustalić przy ujawnieniu przestępstwa, w tym obliczenie ilości (masy) i wartości drewna. Ilość drewna skradzionego z pnia jest ustalana na podstawie tablic A. Buchwalda, służących do określania pierśnicy i miąższości drzewa na podstawie pomiaru średnicy pniaka. Ilość drewna skradzionego z zapasu (stosu) określa się na podstawie tablic miąższości, z zastosowaniem obowiązującej klasyfikacji jakościowo-wymiarowej, lub na podstawie dokumentów przychodu drewna. Masę drewna skradzionego podaje się w jednostkach objętościowych (m^3). W czasie oględzin zabezpiecza się dowody poprzez odcięcie i odrys pnia po skradzionym drewnie w lesie oraz części odziomkowej skradzionego drzewa. Wyniki porównania odciętych elementów drzewa są dowodami w sprawie kradzieży drewna.

Strażnicy leśni są, w ramach prowadzonego dochodzenia, uprawnieni do przeprowadzenia przeszukania. Na podstawie art. 219 k.p.k. przeszukanie jest czynnością zmierzającą do wykrycia, zatrzymania albo przymusowego doprowadzenia osoby podejrzanej, a także do znalezienia rzeczy mogących stanowić dowód w sprawie lub podlegających zajęciu w postępowaniu karnym. Osobę, u której ma być przeprowadzone przeszukanie, powiadamia się o jego celu i wzywa do wydania poszukiwanych przedmiotów. Od przeszukiwania należy odstąpić, gdy osoba wyda poszukiwaną rzecz. Z czynności tej należy sporządzić protokół, który powinien zawierać m.in. dokładny opis czasu, miejsca i rzeczy (w tym wynik pomiaru odebranego drewna). Podczas przeszukania mają prawo być obecne osoba, u której przeprowadza się przeszukanie, oraz osoba przez nią wskazana. Osobie, u której ma być przeprowadzone przeszukanie, należy okazać postanowienie sądu lub prokuratora albo polecenie nadleśniczego. W przypadkach niecierpiących zwłoki, na podstawie art. 308 k.p.k., można dokonać przeszukania bez nakazu, jednakże strażnik leśny winien okazać osobie, u której na być przeprowadzone przeszukanie, legitymację służbową. Niezwłocznie potem winien zwrócić się do prokuratora o zatwierdzenie przeszukania. Rzeczy wydane lub znalezione w czasie przeszukania poddaje się oględzinom, z których sporządza się protokół oględzin (art. 143 § 1 k.p.k.). Przedmioty zabezpieczone w czasie przeszukania spisuje się, a osobie, której je odebrano, wydaje się pokwitowanie. Przedmioty winny być dokładnie opisane, a następnie zabrane lub oddane na przechowanie osobie godnej zaufania, z zaznaczeniem w pokwitowaniu, że nie wolno tych przedmiotów zbyć ani przekształcać, oraz z pisemnym poinformowaniem o obowiązku przedstawienia ich – na każde żądanie – prowadzącemu dochodzenie lub sądowi. Protokół przeszukania, protokół oględzin rzeczy i protokół zatrzymania rzeczy podpisują wszystkie osoby biorące udział w przeszukaniu. Na zgłoszone do protokółu przeszukania żądanie osoby, u której dokonano przeszukania, należy w terminie siedmiu dni dostarczyć postanowienie prokuratora lub sądu w przedmiocie zatwierdzenia tej czynności.

Osoby mające jakiekolwiek informacje o popełnieniu przestępstwa winny być przez prowadzącego postępowanie przesłuchane w charakterze świadków. Przesłuchanie świadka stanowi osobowe źródło dowodowe w sprawie. Przed przesłuchaniem taką osobę należy poinformować o jej prawach i obowiązkach, a także o odpowiedzialności karnej za mówienie nieprawdy lub zatajenie informacji określonej w art. 233 § 1 k.k. Świadek potwierdza to podpisem. Jeżeli w zeznaniach świadków lub pomiędzy zeznaniem świadka a wyjaśnieniem podejrzanego występują sprzeczności, prowadzący dochodzenie strażnik leśny może dokonać konfrontacji tych osób. Z przesłuchania i konfrontacji sporządza się protokół.

Kiedy już w dochodzeniu zebrano informacje dostatecznie uzasadniające podejrzenie, że czyn popełniła określona osoba, strażnik leśny winien ją przesłuchać w charakterze podejrzanego. Wyjaśnienia podejrzanego mogą stanowić istotne źródło informacji o przestępstwie oraz okolicznościach jego popełnienia. Istnieje

obowiązek poinformowania podejrzanego, przed przystąpieniem do przesłuchania, o przysługujących mu uprawnieniach i obowiązkach. W trakcie przesłuchania przedstawia się zarzuty, po czym osoba przesłuchiwana formalnie uzyskuje status procesowy podejrzanego. Podejrzany ma prawo do końcowego zaznajomienia się z materiałami ukończonego dochodzenia.

Jeśli konieczne jest wyjaśnienie okoliczności, które mogą istotnie wpłynąć na rozstrzygnięcie sprawy, a wymagają wiedzy specjalistycznej, strażnik leśny może przeprowadzić dowód z opinii biegłego (art. 193 k.p.k.). Opinia specjalisty brakarza bywa decydująca np. na okoliczność określenia klasy, sortymentu i wartości drewna, a analiza genetyczna może doprowadzić do identyfikacji drewna i określenia jego pochodzenia.

Jeżeli postępowanie przygotowawcze pozwoliło na zgromadzenie dostatecznego materiału do ustalenia popełnienia przestępstwa i ujawnienia osoby sprawcy, strażnik leśny sporządza i wnosi do sądu akt oskarżenia. **Sporządzenie skargi i wniesienie jej do sądu** kończy etap dochodzenia. Postępowanie przechodzi ze stadium postępowania przygotowawczego w stadium **postępowania sądowego**. Akt oskarżenia musi odpowiadać ustawowym wymaganiom, m.in. określać oskarżonego, opisywać czyn i wysokość szkody oraz podawać kwalifikację prawną czynu. Wraz z aktem oskarżenia przesyła się sądowi akta postępowania przygotowawczego, zawierające cały materiał dowodowy zgromadzony w stadium dochodzenia.

2.3. Postępowanie dowodowe

W postępowaniu karnym postępowanie dowodowe ma decydujące znaczenie dla wyników i jakości **śledztwa** lub dochodzenia. Szczególnie dotyczy to etapu postępowania przygotowawczego. Elementarnym zadaniem tego stadium postępowania jest udzielenie odpowiedzi na pytanie, czy przestępstwo w ogóle zostało popełnione, a jeżeli tak, to kto jest jego sprawcą.

Dowód to każdy dopuszczalny przez prawo karne procesowe środek, który służy ustaleniu okoliczności mających znaczenie w postępowaniu karnym.

Postępowanie dowodowe jest uregulowane w Kodeksie postępowania karnego w dziale V Dowody (art. 167–242 k.p.k.)[6]. Na postępowanie dowodowe w postępowaniu przygotowawczym składają się m.in:

1) przesłuchanie podejrzanego,
2) przesłuchanie świadków, w tym pokrzywdzonego,
3) oględziny miejsca przestępstwa, rzeczy lub osoby,
4) ujawnienie dowodów rzeczowych i dokumentów pisemnych,

[6] Ustawa z dnia 6 czerwca 1997 r. Kodeks postępowania karnego (Dz.U. z 1997 r. Nr 89, poz. 555 ze zm.).

5) opinia biegłego (przeprowadzenie ekspertyzy),
6) eksperyment procesowy.

Spośród wymienionych dowodów nadal powszechnie i najczęściej wykorzystywany w praktyce sądowej i śledczej jest dowód z zeznań świadków. Coraz większego znaczenia nabierają jednak naukowe metody zbierania dowodów. Szczególną uwagę należy zwrócić na pierwszy etap postępowania, to jest na czynności dowodowe na miejscu zdarzenia, gdyż tam, jak wskazuje praktyka, można znaleźć większość informacji o przestępstwie będącym przedmiotem postępowania. W postępowaniu karnym dowody przeprowadza się na wniosek stron lub z urzędu (art. 167 k.p.k.).

Gromadzenie dowodów z urzędu ma z reguły miejsce na etapie postępowania przygotowawczego. Wówczas uprawniony organ dochodzeniowy sam wyszukuje i gromadzi dowody *ex officio* (z urzędu). Zasada domniemania niewinności (*in dubio pro reo)* pociąga za sobą konieczność ponoszenia ciężaru dowodu, która funkcjonuje w procesie karnym jako zasada nieskodyfikowana, wynikająca z innych, wyraźnie ujętych w kodeksie zasad procesowych. Oskarżyciel musi udowodnić zaistnienie czynu wypełniającego znamiona określonego przestępstwa, sprawstwo oskarżonego oraz zdolność ponoszenia przez niego odpowiedzialności karnej, musi więc obalić domniemanie niewinności wobec podejrzanego. Sam oskarżony nie ma przy tym obowiązku dostarczania dowodów przeciwko sobie (art. 74 § 1 k.p.k.).

Na etapie postępowania sądowego przeważa przeprowadzanie dowodów na wniosek (Grzegorczyk 1998). Oskarżyciel publiczny, którym może być strażnik leśny, składa stosowny wniosek już w akcie oskarżenia (art. 333 § 1–2 k.p.k.). Należy podkreślić, że prawo przeprowadzenia dowodu przysługuje stronom procesu w ramach zasady kontradyktoryjności oraz sądowi, który – jako organ procesowy – może z urzędu przeprowadzić każdy dowód (art. 167 k.p.k.). Tak więc wniosek dowodowy stanowi żądanie strony procesowej zgłoszone organowi kierującemu procesem, domagające się przeprowadzenia dowodu z określonego środka dowodowego na oznaczoną tezę dowodową.

W tym zakresie w postępowaniu w sprawie o przestępstwo kradzieży drewna strażnik leśny prowadzący dochodzenie może np. zebrane próbki drewna przesłać do analizy porównawczej metodą DNA już na etapie postępowania przygotowawczego albo wnioskować o taką analizę w trakcie procesu, aż do zamknięcia przewodu sądowego w pierwszej instancji (art. 405 k.p.k.).

W polskich procedurach (zarówno cywilnej, jak i karnej) obowiązuje swobodna ocena dowodu. O tym, czy dany dowód w postępowaniu będzie uwzględniony oraz czy na nim będzie oparte ewentualne rozstrzygnięcie, każdorazowo decyduje sąd. Aby jednak mieć pewność, że ten konkretny dowód będzie uznany przez sąd, należy dopełnić wszystkich formalności – dopilnować, by został on uzyskany legalnie, z zachowaniem procedury i zasad gromadzenia dowodów, oraz odpowiednio przedstawiony sądowi; w postępowaniu karnym bowiem, zasadnicze znaczenie ma kwestia gromadzenia dowodów o podstawowym znaczeniu dla wyniku rozstrzygnięcia.

2.4. Oględziny

Na podstawie art. 207 § 1 k.p.k. w razie potrzeby dokonuje się oględzin miejsca, osoby lub rzeczy. Oględziny stanowią pierwszą i podstawową czynność dowodową, od której w dużej mierze zależy wykrywalność oraz skuteczność procesu dowodowego. Oględziny są prawnym sposobem uzyskiwania informacji o przestępstwie. Z punktu widzenia procedury karnej stanowią one zmysłowe zapoznanie się przez organ procesowy z miejscem, ciałem osoby lub rzeczą w celu ujawnienia cech charakterystycznych, istotnych dla rozstrzygnięcia sprawy, lub ujawnienia źródła dowodu (Grzegorczyk 1998). W rozumieniu kryminalistycznym oględziny to przede wszystkim obserwacja przeprowadzana przez człowieka za pomocą zmysłów, z wykorzystaniem środków technicznych.

Zadania oględzin to:

1) wykrycie śladów mających związek ze zdarzeniem i ich zabezpieczenie;
2) utrwalenie wyglądu i stanu przedmiotu oględzin, ze szczególnym uwzględnieniem miejsca znalezienia śladów;
3) rekonstrukcja przebiegu badanego zdarzenia i wnioskowanie prowadzące do ustalenia jego skutków.

Oględziny (miejsca przestępstwa, rzeczy i ciała) mają na celu wykrycie w terenie, w pomieszczeniu, na rzeczach oraz na ciele i odzieży człowieka takich znaków, cech, stanów i układów przedmiotów, które mogą być pomocne w ustaleniu i wyjaśnieniu okoliczności istotnych dla sprawy.

Oględziny miejsca obejmują zarówno pomieszczenia, jak i otwartą przestrzeń. Oczywiście może to być także las. Oględziny miejsca są dokonywane w początkowej fazie postępowania przygotowawczego – często na etapie postępowania sprawdzającego, w sytuacji niecierpiącej zwłoki, lub tuż po wszczęciu dochodzenia. Istotne jest, by przeprowadzenie najistotniejszych czynności odbyło się w odpowiednio krótkim czasie od zdarzenia. Wszelka zwłoka może pociągać za sobą nieodwracalne skutki, dlatego szybkość i poprawność działań (logiczne rozumowanie oraz użyte środki kryminalistyczne) mają zasadnicze znaczenie, zgodnie z kryminalistyczną regułą mówiącą, że powodzenie całego postępowania karnego zależy od pierwszych czynności. Praktyka śledcza sytuuje oględziny jako jedną z szeregu czynności wykonywanych przez organy ścigania w ramach badania miejsca zdarzenia.

Oględziny rzeczy to czynności przeprowadzane najczęściej wobec dowodów rzeczowych odnalezionych na miejscu oględzin miejsca przestępstwa lub ujawnionych i zajmowanych podczas przeszukania albo znalezionych przy osobie podejrzanej (Grzegorczyk 1998). Oględziny rzeczy obejmują czynność zapoznania się z dowodem (przedmiotem lub dokumentem). Może on być poddany dalszym badaniom, np. w celu ustalenia obecności krwi lub odcisków palców na

przedmiocie. Oględziny rzeczy z założenia przeprowadza organ procesowy, tam zaś, gdzie łączą się one z dalszym badaniem, stają się elementem opinii biegłego (Grzegorczyk 2004).

Zasady przeprowadzania oględzin, poza ogólnymi przypadkami, nie są określone w kodeksie postępowania karnego. Kodeks w art. 207 i 208 k.p.k. określa jedynie ogólne wytyczne do przeprowadzania tej czynności procesowej, a ponadto sposoby jej dokumentowania (art. 143, 147, 148, 150 k.p.k.). Podstawowe zasady obowiązujące przy oględzinach to:

- właściwe zabezpieczenie miejsca przed dostępem osób trzecich oraz osób nieprowadzących bezpośrednio działań procesowo-kryminalistycznych w związku z badaniem miejsca zdarzenia i oględzinami *sensu stricto*;
- prowadzenie czynności procesowo-kryminalistycznych związanych z oględzinami przez osobę przygotowaną merytorycznie do prowadzenia takich czynności;
- analiza wszystkich rodzajów śladów mogących mieć wpływ na ustalenie sprawcy przestępstwa lub stopnia jego winy w związku z określonym *modus operandi*.

Elementami oględzin mogą być m.in.: penetracja miejsca zdarzenia, przeszukanie, odtworzenie przebiegu zdarzenia, sekcja zwłok, obdukcja, ekshumacja, porównanie odciętych krążków drewna.

Oględzinom mogą towarzyszyć inne czynności: odtworzenie przebiegu zdarzenia, eksperyment procesowy, przesłuchanie świadka lub podejrzanego, użycie psa tropiącego itd. Odtworzenie przebiegu zdarzenia jest jego kryminalistyczną rekonstrukcją, odnoszącą się do ustalenia np. sposobu zadawania ciosów lub zdejmowania znaczników z cechowanego drewna i nanoszenia ich na drewno będące przedmiotem kradzieży czy techniki ścinania drzewa. Celem **eksperymentu procesowego** jest wyjaśnienie okoliczności istotnych dla sprawy. Eksperyment procesowy uważa się za czynność niepowtarzalną. Może on być przeprowadzony zarówno w toku postępowania sądowego, jak i w toku postępowania przygotowawczego. Decyzja o jego przeprowadzeniu zapada w drodze postanowienia. Tak jak każda czynność dowodowa może on być przeprowadzony z urzędu przez organ prowadzący postępowanie lub na wniosek każdej ze stron. Z przebiegu eksperymentu sporządza się protokół, który jest obowiązkową formą dokumentowania przebiegu oraz wyników oględzin (art. 143 § 1 k.p.k.). Jest on zarazem podstawowym sposobem zabezpieczenia formalnego dowodu. Podpisują go wszystkie osoby biorące udział w czynności (art. 150 § 1 k.p.k.), chyba że oględziny zostały dokonane w czasie rozprawy głównej i utrwalono je w protokóle rozprawy (art. 149 § 1 k.p.k.).

Dowody rzeczowe zebrane w toku oględzin lub zatrzymane w wyniku przeszukania w związku z postępowaniem załącza się do akt sprawy. Jeśli jest to możliwe, to umieszcza się je we wszytej do akt kopercie, na której zaznacza się zawartość i datę przyjęcia dowodu, a także nazwę organu lub imię i nazwisko osoby, która go

złożyła. Jeżeli dowody rzeczowe nie mogą być dołączone do akt sprawy ze względu na ich rozmiar, wartość lub znaczenie, to wtedy przechowuje się je w odpowiednio zabezpieczonym pomieszczeniu.

2.5. Czynności kryminalistyczne

Zasady przeprowadzania oględzin nie są określone w kodeksie postępowania karnego (poza ramowymi wytycznymi). Metodyka ich przeprowadzania jest natomiast określona w kryminalistyce, dlatego oględziny są instytucją z pogranicza procedury karnej i kryminalistyki.

Kryminalistyka jest definiowana jako samodzielna dyscyplina naukowa zajmująca się wykrywaniem przestępstw i identyfikacją ich sprawców; to nauka o rozpoznawaniu, wykrywaniu i udowadnianiu przestępstw oraz zapobieganiu im, o prognozowaniu przestępczości, a także o innych kryminogennych zjawiskach społecznych, za pomocą specjalistycznych metod i środków taktyczno-technicznych, służących głównie identyfikacji sprawców czynów przestępczych w ramach: procesu karnego, procesu cywilnego, innych dziedzin nauk penalnych oraz działań operacyjno-rozpoznawczych (Grzeszczyk 2004). Jest też określana jako nauka o zasadach taktycznych, sposobach i technicznych metodach oraz środkach rozpoznawania i wykrywania prawnie określonych negatywnych zjawisk społecznych, szczególnie przestępstw (i ich sprawców) oraz udowadniania istnienia związku – lub jego braku – między osobami a zdarzeniami (Hanausek 2005).

Oględziny *sensu stricto* są częścią składową kryminalistycznego badania miejsca zdarzenia. Należą do najistotniejszych czynności procesowo-kryminalistycznych zmierzających do uzyskania rzeczowego materiału dowodowego.

Kryminalistyczne badanie miejsca zdarzenia to zespół wzajemnie powiązanych działań o charakterze procesowym i pozaprocesowym prowadzonych przez organy ścigania w celu wszechstronnego wyjaśnienia okoliczności zaistniałego zdarzenia, ustalenia jego charakteru, wskazania ewentualnych sprawców oraz zebrania materiału dowodowego na podstawie ustaleń poczynionych na miejscu jego ujawnienia (Widacki i in. 1999). Podstawowym zadaniem oględzin jest ujawnienie, utrwalenie i zabezpieczenie śladów kryminalistycznych oraz włączenie ich – po wykorzystaniu w eksperymencie przeprowadzonym w ramach dochodzenia i ekspertyz – do materiału dowodowego (Gorazdowski 2002); ślady popełnionego przestępstwa (w tym ślady sprawcy) są bowiem najbardziej podatne na zniszczenie (Gutekunst 1974).

Śladem w pojęciu kryminalistyki jest szczególna, dająca się spostrzec pozostałość zdarzeń. Analiza śladów pozwala na identyfikację osób, zwierząt i rzeczy, które w zdarzeniu uczestniczyły (Widacki i in. 1999). Kryminalistyczna definicja śladu zawiera się w twierdzeniu, że śladem jest zmiana w obiektywnej rzeczywistości,

która – jako spostrzegalne znamiono po zdarzeniach – może umożliwić odtworzenie i ustalenie zgodnego z rzeczywistością przebiegu tych zdarzeń (Pływaczewski, Kędzierska 2001).

Ślady dzielą się na:

1) ślady obejmujące m.in. odbitki linii papilarnych palców, plamy substancji chemicznych lub biologicznych będące elementami obcymi, ale **nienaruszającymi jego struktury czy kształtu**. Do tej grupy można także zaliczyć zjawiskowe ślady cieplne (np. na miejscach pożaru): ślady zwęglenia, nadpalenia, stopienia, okopcenia, zgięcia i pęknięcia pod wpływem wysokiej temperatury. Ślady cieplne, powstające na skutek ciepła, zmieniają rozmieszczenie, stan skupienia, postać, kształt czy wygląd substancji (ciał, przedmiotów). W wielu wypadkach można je dostrzec, nie znikają samoistnie i są trwałe. Należą do dwóch kategorii. Jeśli powstają, gdy obiekt będący czynnikiem sprawczym śladu cieplnego pozostawał w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią chłodniejszego lub cieplejszego od niego ciała – nośnika zjawiskowego śladu cieplnego – są śladami kontaktowymi powierzchniowymi, jeśli natomiast bezpośredniego kontaktu nie było, ślady należą do bezkontaktowych powierzchniowych;
2) ślady **zdeformowania kształtu podłoża** (np. ślady narzędzi w drewnie) bądź naruszenia jego wewnętrznego układu strukturalnego (np. ślady użycia materiałów wybuchowych czy chemicznych środków żrących);
3) odrębne od podłoża **przedmioty zagubione lub porzucone**, mające związek z popełnionym przestępstwem (Hołyst 2010).

Odpowiednio zabezpieczone ślady są obiektywnym materiałem dowodowym, nieosiągalnym w czasie późniejszym. Ekspertyzy kryminalistyczne wykonywane na materiale dowodowym zabezpieczonym podczas oględzin (miejsca, osób i rzeczy), dostarczając cennych informacji o zdarzeniu i jego uczestnikach, prowadzą do identyfikacji sprawcy czynu zabronionego. Jako czynność dowodowa oględziny stanowią istotne źródło pozyskiwania dowodów rzeczowych, umożliwiają ustalenie rzeczywistego przebiegu zdarzeń (por. art. 2 § 2 k.p.k.) i mają wpływ na prawidłowe rozstrzygnięcie sprawy (Lisiecki, Jaguszewska 2002).

Ujawnione w trakcie oględzin ślady winny być niezwłocznie przebadane i zinterpretowane. Szczegółowa analiza powinna wskazać założenia i wersje przebiegu zdarzenia. W tym celu dowody powinny trafić możliwie najszybciej do właściwego laboratorium, a ich wyniki – wpływać na ustalenie kierunku prowadzenia dochodzenia.

Poza udokumentowaniem ujawnienia śladu w protokóle oględzin winien on być zabezpieczony w sposób chroniący jego cechy identyfikacyjne przed naturalnymi czynnikami zewnętrznymi oraz uszkodzeniem w czasie transportu i przechowywania. Opakowany winien być w sposób jednorazowy, tak aby każda próba jego naruszenia powodowała nieodwracalne i widoczne uszkodzenia. Ślad winien być trwale oznaczony na zewnętrznym opakowaniu lub załączonej metryczce. Do protokółu winna być dołączona dokumentacja poglądowa: fotografie, film, mapka oraz szkic.

W przestępstwach szkodnictwa leśnego najczęściej stosowanymi technikami kryminalistycznymi są: mechanoskopia, traseologia i ekspertyzy biologiczne (daktyloskopia i osmologia).

Mechanoskopia jest działem kryminalistyki zajmującym się ujawnianiem i badaniem przedmiotów, w tym narzędzi służących do popełnienia przestępstwa. W ramach mechanoskopii stosowana jest badawcza metoda „na całość". Przedmioty lub narzędzia, których części zostały zabezpieczone jako materiał dowodowy, porównuje się z przedmiotami lub elementami (ich częściami) na podstawie cech grupowych, cech identyfikacyjnych lub cech charakterystycznych (Widacki i in. 1999). W badaniach identyfikacyjnych „na całość" do cech grupowych porównywanych części zalicza się m.in.: kształt, grubość (średnicę), strukturę, sposób obróbki, a także rodzaj, gatunek, kolor czy nawet wiek. Do cech indywidualnych należą makro- i mikronierówności zewnętrznych powierzchni badanych części przedmiotów (narzędzi) oraz cechy mikrostrukturalne utworzone na powierzchniach rozdzielenia przedmiotu w trakcie przecinania, łamania, pękania, odłamywania itp. Do cech charakterystycznych należą walory lub wady indywidualizujące strukturę drewna, np. przebarwienia, utlenienia, zabitki.

Do badań identyfikacyjnych „na całość" najczęściej trafiają:

1) odłamki lub odpryski uzębienia piłek do cięcia metali albo odłamki metali; przykład: znalezione ząbki (materiał dowodowy) porównuje się z wyszczerbieniami na piłce (materiał porównawczy), dzięki czemu ustala się, z którego brzeszczotu pochodzą, a tym samym – czy dane narzędzie, zabezpieczone jako materiał porównawczy, było użyte do popełnienia przestępstwa włamania;
2) kawałki szkła, głównie szyb okiennych i rozbitych szyb reflektorowych, oraz odpryski powłok lakierowych zabezpieczonych w trakcie oględzin miejsca wypadku w komunikacji;
3) kawałki (krążki) drewna, szczególnie w wypadkach dotyczących kradzieży drzewa z lasu; przy ustalaniu, czy dwa kawałki drewna (lub więcej) stanowiły przed rozdzieleniem jedną całość (drzewo), analizuje się wiek drzewostanu, gatunek drzewa, średnicę pnia, przebieg krawędzi powierzchni rozdzieleń, a także elementy makroskopowej struktury i ewentualne nieprawidłowości (sęki, kształt twardzieli, promienie i plamki rdzeniowe, przerosty żywiczne oraz wszelkie inne indywidualizujące nieprawidłowości i wady budowy drzewa).

W ramach oględzin przeprowadzanych w lesie z pniaka, z którego po ścięciu skradziono drzewo, odcina się krążek o grubości 4–8 cm, a to w celu porównania z drewnem zabezpieczonym u sprawcy, ujawnionym w trakcie przeszukania. Jeżeli w miejscu kradzieży w lesie pozostał wierzchołek drzewa, wówczas z części wierzchołkowej także pobiera się krążek jako materiał porównawczy. Zastosowanie metody polega na fizycznym porównaniu krążków i stosownym udokumentowaniu w protokóle oględzin. Krążki drewna zabezpiecza się przed zniszczeniem lub przekształceniem, opisując i oznaczając metryczkami jako materiał dowodowy,

do dalszego postępowania procesowego. Ta metoda jest stosowana od połowy XIX w., czyli od czasu stosowania w leśnictwie pił tnących, które pozostawiały ślady umożliwiające porównywanie powierzchni ściętych drzew (metoda jest nieprzydatna w wypadku zniszczenia części drzewa w obrębie miejsca ścięcia lub przerobienia drzewa np. na tarcicę, materiał budowlany, galanterię).

Technika kryminalistyczna zwana **ekspertyzą traseologiczną** obejmuje badanie śladów powstających w wyniku przemieszczania się człowieka zarówno pieszo (ślady stóp obutych i bosych), jak i środkiem transportu (ślady opon, płóz, kopyt koni itp.). Ślady traseologiczne mają postać odcisków, odwarstwień i nawarstwień. Ich dokładna analiza pozwala na grupowe lub indywidualne zidentyfikowanie przedmiotu, który je pozostawił, jeśli tylko zostaną prawidłowo zabezpieczone. W badaniach ścieżki chodu ludzkiego, czyli ichnogramu, ustala się kierunek przemieszczania się człowieka, typ obuwia, a także szerokość i długość kroku, co pozwala na ustalenie płci i wagi osoby. Na podstawie takich śladów można ustalić indywidualne cechy obuwia, powstałe w procesie produkcji lub w następstwie jego używania. Badając ślady pojazdów i biorąc pod uwagę rozstaw kół, wymiar opon, rzeźbę bieżnika oraz kierunek jazdy, ustala się rodzaj pojazdu. W przypadku kłusownictwa (w pobliżu sideł, wnyków itp.) lub ścinki drzew i kradzieży drewna sprawca zwykle pozostawia w miękkim podłożu lub na śniegu ślady obuwia, które w wielu wypadkach prowadzą wprost do zabudowań.

Zabezpieczenie śladów do dalszych badań następuje poprzez:

- zabranie przedmiotu, na którym znajduje się pozostawiony ślad;
- wyodrębnienie i zabranie płaszczyzny, na której ślad pozostawiono;
- sfotografowanie śladu;
- wykonanie szkicu i mapki przebiegu (sytuacyjnej);
- odwzorowanie śladu za pomocą gipsu, masy dentystycznej albo masy silikonowej z użyciem katalizatora.

Daktyloskopia polega na identyfikacji osoby na podstawie odbitki wzoru linii papilarnych palców dłoni pozostawionych na miejscu zdarzenia. Wzór linii papilarnych jest niepowtarzalny dla każdego człowieka, gdyż składa się z określonych indywidualnie elementów, tzw. minucji. W celu identyfikacji śladów daktyloskopijnych wykorzystuje się: ogólny układ linii papilarnych tworzący wzory, minucje, rozmieszczenie i kształt porów oraz nieregularności kształtu krawędzi linii papilarnych. Oprócz daktyloskopii istnieje też podoskopia (badanie odcisków stóp), chejroskopia (badanie odcisków dłoni) oraz chejloskopia (badanie śladów czerwieni wargowej).

Osmologia to nauka o zapachach, z powodzeniem wykorzystywana w kryminalistyce. Ślady zapachowe powstają na skutek bezpośredniego kontaktu osoby z przedmiotem lub miejscem. Zapach może być zdjęty tylko z miejsca, z którym zetknął się sprawca: z klamek, ścian, chodników, siedzeń samochodowych, ze sznurów, z drewna, krwi, potu, innych wydzielin, włosów, niedopałków papierosów, narzędzi, ze śladów na ziemi i śniegu. Do takiego miejsca przykłada się (najczęściej)

wyjałowioną gazę i na ok. pół godziny przykrywa aluminiową folią. Potem gazę przenosi się do słoika. Tak powstaje pierwsza „konserwa zapachowa". Zdjęty zapach można powielać (wystarczy włożyć do naczynia czysty pochłaniacz) i przechowywać wiele lat. W drugiej „konserwie" umieszcza się zapach podejrzanego, pobierany przeważnie z rąk, nóg, kieszeni i spod pachy. Zadaniem psa, któremu daje się do powąchania zapach podejrzanego, jest odnalezienie takiej samej woni (wśród kilku słoików) pobranej na miejscu przestępstwa, czyli wykrycie zgodności zapachowej. Z tego wynika, że bardzo pomocny w ściganiu sprawców przestępstw jest pies służbowy.

W Straży Leśnej psy służbowe wykorzystuje się do: tropienia śladów osób, przeszukiwania terenu i pomieszczeń w celu odnalezienia osób lub przedmiotów, pościgu za osobami dokonującymi przestępstwa, ponadto do odpierania czynnej napaści i pokonywania czynnego oporu oraz jako środek przymusu bezpośredniego. Psy mają za zadanie ustalenie drogi dojścia i odejścia sprawcy z miejsca przestępstwa oraz miejsc ukrycia lub porzucenia przedmiotów mających związek ze zdarzeniem. W przypadku przestępstwa strażnicy leśni winni zabezpieczyć miejsce zdarzenia i ślady (przedmioty) przydatne do rozpoczęcia tropienia przez psa. Zabezpieczane są wszystkie ślady zapachowe pozostawione przez sprawców lub przedmioty. W czasie tropienia śladów przewodnicy z psami tropiącymi ubezpieczani są przez wyznaczonych funkcjonariuszy, ponieważ przewodnicy muszą skupić uwagę na śladach i psie, a nie na otoczeniu. Tropienie po śladach odbywa się zwykle aż do zatrzymania osoby poszukiwanej – jeśli znajduje się ona w rejonie działania jednostki organizacyjnej Lasów Państwowych – lub do momentu, gdy pies utraci trop. Po zakończoniu tropienia z pozytywnym rezultatem przewodnicy wraz z funkcjonariuszami ubezpieczającymi zatrzymują, identyfikują oraz przeszukują osoby i pomieszczenia, do których doprowadziły psy tropiące. W uzasadnionych przypadkach dokonują jedynie obserwacji do chwili przybycia wsparcia lub policji. Jeśli odnaleziono ukryte przedmioty mające związek z przestępstwem, w miejscu ich ukrycia organizuje się zasadzkę lub obserwacje.

Ostatnio skutecznym źródłem dowodowym i źródłem informacji o przestępstwie okazał się **monitoring wizyjny**. Rejestracja obrazu ma na celu zachowanie kontroli nad określonym obszarem lub obiektem w celu zapewnienia szeroko pojętego bezpieczeństwa. Systemy monitoringu wizyjnego znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach. Najpopularniejszymi i najczęściej spotykanymi rozwiązaniami są systemy telewizji przemysłowej z wykorzystaniem kamer analogowych lub cyfrowych, rejestratorów i wielokanałowych kart akwizycji obrazu oraz oprogramowania umożliwiającego przetwarzanie i rejestrację obrazu. Systemy wizyjne to nie tylko telewizja przemysłowa i rejestracja zdarzeń; nowocześniejszym rozwiązaniem są sieciowe systemy monitoringu wizyjnego CCTV (ang. *Closed Circuit TeleVision*), które pozwalają na tworzenie bardzo rozległych instalacji dozorowych. Przykładowo: monitoring IP pozwala na scentralizowanie nadzoru wizyjnego nad praktycznie

nieograniczoną liczbą kamer oddalonych od siebie o setki kilometrów. Monitoring wizyjny zwiększa bezpieczeństwo danego obszaru lub obiektu, obniża koszty pracy oraz poprawia efektywność działań w zakresie profilaktyki. Jest przydatny zwłaszcza w miejscach szczególnego zagrożenia, nadaje się do ochrony mienia i osób, ponadto znajduje zastosowanie w ochronie przeciwpożarowej i ochronie środowiska.

2.6. Opinia biegłych

Miejsce przestępstwa, rzecz lub osoba poddane oględzinom są źródłem materiału dowodowego. Ślady zabezpieczone na miejscu przestępstwa lub poszukiwane w związku z popełnionym przestępstwem nie są jeszcze dowodami, a jedynie materiałem, który jest poddawany badaniom przez biegłego. Dopiero wyniki tych badań i późniejsza ich ocena przez prowadzącego dochodzenie decydują o zaliczeniu uzyskanych w trybie art. 192a k.p.k. materiałów w poczet dowodów (Kurzępa 2002).

W postępowaniu karnym powoływanie biegłych jest niejednokrotnie koniecznością, albowiem bez ich udziału w wielu wypadkach nie udałoby się ustalić istotnych okoliczności mających wpływ zarówno na dowodzenie sprawstwa, jak i wpływających na wymiar kary w związku z popełnionym przestępstwem. W kodeksie postępowania karnego, w dziale V rozdz. 22, zawarto przepisy obejmujące trzy instytucje: biegłych (art. 193–203 k.p.k.), tłumaczy (204 k.p.k.) i specjalistów (art. 205 k.p.k.). Wymienione instytucje są zróżnicowane ze względu na swą specyfikę, rolę, znaczenie i użyteczność dla praktyki karnej; są wyjątkowo przydatne i użyteczne jednocześnie w postępowaniu przygotowawczym i jurysdykcyjnym. Biegli dysponują wiedzą i umiejętnościami umożliwiającymi stwierdzenie lub wyjaśnienie istotnych okoliczności mających znaczenie dla rozstrzygnięcia sprawy (Sławik 2002). Opinii biegłego zasięga się, gdy stwierdzenie okoliczności mającej istotne znaczenie dla rozstrzygnięcia sprawy wymaga, jak określa kodeks postępowania karnego, wiadomości specjalnych (art. 193 § 1 k.p.k.). Nie ma znaczenia, czy organ procesowy sam posiada taką wiedzę, czy jej nie posiada. Wiadomości specjalne to takie wiadomości i umiejętności, które wykraczają poza wiedzę przeciętną i dostępną dla dorosłego człowieka o odpowiednim doświadczeniu życiowym, wykształceniu i zasobie wiedzy ogólnej. Organ procesowy nie może zastępować biegłego i rezygnować z jego opinii. Sąd nie może odrzucić opinii specjalistycznych i przyjąć w sprawie własnego, odmiennego stanowiska wobec faktów, dla których niezbędna jest specjalna wiedza biegłego.

Na podstawie art. 193 § 2 k.p.k. w celu wydania opinii można też zwrócić się do instytucji naukowej lub specjalistycznej, np. uczelni państwowej lub prywatnej (w tym katedry kryminalistyki, katedry medycyny sądowej) czy instytutu branżowego, m.in. Instytutu Ekspertyz Sądowych lub Instytutu Badawczego Leśnictwa

(w dziedzinie biogenetyki, w tym badań DNA). W postanowieniu o zasięgnięciu opinii instytucji organ procesowy wskazuje jej zakres.

Opinia biegłego jest jednym ze środków dowodowych w procesie karnym. Jej wartość, a co za tym idzie przydatność do ustalenia okoliczności mających istotne znaczenie dla rozstrzygnięcia konkretnej sprawy, podlega ocenie organu procesowego, zgodnie z zasadą swobodnej oceny dowodów. W myśl tej zasady organ procesowy ocenia dowody i wyciąga z nich wnioski według swego wewnętrznego przekonania, niekrępowany regułami prawnymi. Swoboda organu procesowego w ocenianiu dowodów odnosi się zarówno do wiarygodności źródła dowodowego i przekazywanych przez to źródło informacji, jak i do wyprowadzania wniosków. O wartości opinii dla postępowania decydują jej poziom merytoryczny i formalny oraz wiedza i doświadczenie wykonawcy ekspertyzy. Zasada swobodnej oceny dowodów nie oznacza całkowitej swobody organu procesowego, obowiązujące przepisy (art. 7 k.p.k.) wskazują bowiem na obowiązek uzasadniania zajętego przez organ procesowy stanowiska.

Kodeks nie przewiduje prymatu opinii instytucji nad opinią biegłego indywidualnego. Pomimo równorzędnego traktowania w postępowaniu karnym dowodów osobowych z zeznań świadków i pokrzywdzonych oraz dowodów rzeczowych, czyli śladów kryminalistycznych, za tzw. mocne dowody uznaje się dowody techniczno-kryminalistyczne wynikające z ekspertyz. Warunkiem jest jednak właściwe zbadanie śladów i poprawna interpretacja wyników badania przez biegłych o wysokich kwalifikacjach merytorycznych. Ekspertyza sądowa (opinia) – jako samoistny dowód w procesie karnym – jest wnioskiem wysnutym na podstawie badań i wiedzy specjalistycznej eksperta w dziedzinie mającej istotne znaczenie dla rozstrzygnięcia merytorycznego sprawy. Przebieg badania winien być opisany i objaśniony, a wnioski powinny zawierać wynik badań.

Dowód z opinii biegłego (ekspertyza, opinia) jest uznany przez sąd w drodze postanowienia.

W ekspertyzie po części badawczej następuje część sprawozdawcza: sporządzenie dokumentu dotyczącego przebiegu badań i zawierającego opinię. W postępowaniu jurysdykcyjnym biegły ustnie potwierdza wnioski zawarte w opinii i ich broni.

Dopiero po uzyskaniu opinii organ procesowy ustala faktyczny stan sprawy. Ekspertyza nie może zawierać ustalenia o winie lub niewinności, ponieważ biegły czy ekspert nie może w procesie zastąpić organu orzekającego. Trafnie ujął ten problem Tadeusz Tomaszewski: „Opinia biegłego jest jednym z licznych możliwych do otrzymania w procesie karnym środków dowodowych, dlatego organ procesowy oceny ich przydatności w konkretnej sprawie musi dokonać na tle całokształtu okoliczności ujawnionych w toku postępowania. Bowiem decyzja sądu ferującego wyrok lub organu wydającego postanowienie o umorzeniu postępowania przygotowawczego musi być wynikiem analizy wszystkich ujawnionych okoliczności, zarówno tych, które tezę oskarżenia potwierdzają, jak i tych, które ją podważają" (Tomaszewski 1998).

2.7. Analiza śladów biologicznych

Współczesna biologia, a zwłaszcza jej dział – genetyka molekularna – to nauka, której dorobek znalazł zastosowanie w naukach prawnych. W praktyce badanie śladów biologicznych najczęściej sprowadza się do badania śladów krwi, nasienia, śliny i włosów, ale każda wydzielina ciała ludzkiego (np. pot, mocz) może być potraktowana jako ślad biologiczny. Także komórki naskórka. Aby takie ślady zbadać, należy je najpierw znaleźć oraz prawidłowo zabezpieczyć i rozpoznać. Analizy śladów dokonuje się poprzez:

1) ujawnianie śladów biologicznych i mikrośladów za pomocą zestawu optycznego w zakresie od UV do podczerwieni, by następnie takie ślady (głównie krwi i śliny) zidentyfikować, stosując testy mikroskopowe, biochemiczne i fizyko-chemiczne;
2) ekstrakcję DNA z wszystkich rodzajów tkanek i śladów biologicznych.

Kryminalistyka wykorzystuje ekspertyzy biologiczne przy badaniu krwi (w celu określenia układu grupowego i podgrup, wieku krwi, jej pochodzenia i zawartych w niej substancji, np. toksyn), spermy, śliny, wydzielin i wydalin ciała, włosów, naskórka itp. Przy przestępstwach szkodnictwa leśnego ekspertyzy biologiczne dotyczą badania próbek wody, badań bakteriologicznych oraz analizy dendrogenetycznej DNA.

2.8. Ekspertyza na podstawie analizy DNA

Postęp w metodach badawczych, intensywny rozwój nauk przyrodniczych i technicznych, odkrywanie nowych technik identyfikacyjnych – wszystko to sprawia, że do arsenału kryminalistycznych metod identyfikacji człowieka dołączają metody nowe, coraz bardziej szczegółowe i dokładne. Należą do nich badania DNA. Od kilkunastu lat ślady biologiczne bezapelacyjnie zdobywają przewagę, gdyż analiza DNA materiału zabezpieczonego jako ślad kryminalistyczny daje podstawę do wysokiej indywidualizacji jego cech (Wójcikiewicz 2002).

Po raz pierwszy badania genetyczne znalazły procesowe zastosowanie w 1986 r. w Wielkiej Brytanii, w sprawie karnej prowadzonej przeciwko oskarżonemu o zabójstwo i gwałt, w której zabezpieczono ślady biologiczne zawierające materiał genetyczny (Branicki, Kupiec, Wolańska-Nowak 2008). W polskiej procedurze karnej pierwsza ekspertyza kryminalistyczna z zakresu badań genetycznych została opracowana w 1989 r. przez ekspertów z Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Komendy Głównej Policji przy współpracy pracowników naukowych Zakładu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk (Sołtyszewski 2007). Obecnie badania DNA są już w sprawach karnych rutynową procedurą identyfikacji sprawcy czynu na podstawie śladów biologicznych, nie tylko w stosunku do człowieka, lecz także

organizmów roślinnych; z powodzeniem wykorzystuje się je w procesach sądowych. Pierwsze takie badania przeprowadzono w Arizonie (Stany Zjednoczone) w sprawie State *v*. Bogan (1995), kiedy to analiza DNA części drzewa *Palo verde* (*Cercidium spp*.) umożliwiła udowodnienie winy sprawcy zabójstwa kobiety (Wójcikiewicz 2008).

Kryminalistyczna analiza DNA opiera się zasadniczo na badaniu zróżnicowania długości fragmentów odpowiednio zhydrolizowanego DNA. W badaniach kryminalistycznych porównywane są różne formy genów (allele), zawarte w materiale dowodowym i porównawczym. Możliwości identyfikacyjne zwiększyło opracowanie metody łańcuchowej polimerazy DNA (PCR). Reakcja PCR pozwala na zwielokrotnienie allelu nawet ponad milion razy, dzięki czemu wzrasta skuteczność jego oznaczania. Jest to istotne w stosunku do materiału w postaci bardzo drobnych fragmentów tkanek lub takiego, który uległ degradacji, a nawet częściowej destrukcji. Do badań identyfikacyjnych na podstawie analizy DNA wystarczają nawet niewielkie ilości śladów pochodzenia biologicznego, np. plamka krwi, kilka włosów, ślad śliny, fragment tkanki, liść, kilka igieł, łyko czy fragment jakiejkolwiek tkanki.

Zastosowanie analizy DNA w celach identyfikacyjnych na potrzeby postępowania karnego radykalnie zmieniło możliwości opiniowania. Początkowo dotyczyło to badań krwi, a obecnie odnosi się do innych śladów biologicznych, bowiem ze względu na swoją złożoność DNA opisuje konkretny organizm w sposób indywidualny, ponadto występuje w każdej komórce i daje się replikować. Badania DNA dają zatem możliwość identyfikacji śladów biologicznych, co odgrywa szczególne znaczenie w prawie i postępowaniu karnym (Girdwoyń 2006).

Podstawą prawną postanowienia o wydaniu opinii biegłych w zakresie przeprowadzenia identyfikacji drewna na podstawie analizy DNA jest art. 193 § 1 k.p.k.

2.9. Opinia biegłych i badanie DNA w orzecznictwie sądowym

Postępowanie karne odwołuje się do opinii biegłych, gdy prowadzenie postępowania wymaga szczególnej wiedzy. Dotyczy to zazwyczaj skomplikowanych spraw oraz sytuacji, gdy sprawca nie przyznaje się do popełnienia zarzucanego mu czynu. Ponadto w wielu przypadkach bez opinii biegłych nie udałoby się ustalić istotnych okoliczności umożliwiających udowodnienie sprawstwa. Znajduje to potwierdzenie w dorobku orzecznictwa w tym zakresie, wyjaśniając istotę stosowania i znaczenia opinii biegłych w postępowaniu karnym zarówno na etapie postępowania przygotowawczego, jak i procesowego.

Podstawa prawna wydania opinii, zawarta w art. 193 § 1 k.p.k, reguluje konieczność stwierdzenia faktów istotnych dla rozstrzygnięcia sprawy na podstawie wiadomości specjalnych. Z dotychczasowych doświadczeń w tym zakresie

wynikają wnioski istotne dla procesu karnego. Przedstawione orzeczenia zawierają najbardziej istotne tezy z tego obszaru prawa.

1. Oceniając wniosek o dopuszczenie dowodu z opinii biegłego, zgłoszony przez stronę w trybie art. 176 § 1 k.p.k. z 1969 r. (por. obecny art. 193 § 1 k.p.k.), sąd musi wziąć pod uwagę to, czy istnieją realne możliwości opracowania opinii przez biegłego i czy taka opinia będzie przydatna do stwierdzenia okoliczności, w związku z którymi powinna być przeprowadzona (wyrok SN z 27 kwietnia 1984 r., **I KR 72/84**, OSNKW 1985 Nr 1–2, poz. 13).
2. W sprawach wymagających wiedzy specjalistycznej sąd nie powinien rezygnować z powołania biegłych, choćby skład sądu dysponował wiedzą specjalną (postanowienie SN z 14 listopada 1968 r., **Z 46/68**, OSNKW 1969 Nr 3, poz. 34).
3. Należy wykorzystywać wyniki najnowszych badań naukowych, jeśli tylko te wyniki są dostatecznie pewne (wyrok SN z 25 lutego 1975 r., **II CR 898/74**; Lex Nr 7663).
4. Do wiadomości specjalnych należy zaliczyć wszelkie wiadomości i umiejętności, które wykraczają poza przeciętne i praktyczne (wyrok SN z 23 listopada 1982 r., **II KR 186/82**, OSNPG 1983 Nr 3, poz. 59).
5. Wiadomości specjalne to takie, które wykraczają poza normalną, powszechną wiedzę człowieka wykształconego, o odpowiednim doświadczeniu życiowym. Chodzi o wiadomości fachowe z określonej dziedziny: nauki, techniki, gospodarki, sztuki, rzemiosła czy ruchu drogowego. Do wiadomości specjalnych nie należą wiadomości dostępne dla dorosłego człowieka o odpowiednim doświadczeniu życiowym, wykształceniu i zasobie wiedzy ogólnej (wyrok SN z 15 kwietnia 1976 r., **II KR 48/76**, OSNKW 1976 Nr 10–11, poz. 133; Lex Polonica Nr 306666).
6. Wiadomości specjalne to z założenia wiadomości dotyczące faktów, a nie prawa. Wiedza na temat obowiązującego prawa jest domeną organów stosujących prawo. Interpretacja norm prawa krajowego nie może więc być przedmiotem opinii biegłych (wyrok SN z 17 stycznia 1987 r., **V KRN 474/86**, OSNPG 1988 Nr 3, poz. 29).
7. Korzystanie w znacznie szerszym zakresie z wiedzy specjalistycznej i według jej aktualnego stanu i poziomu w różnych dziedzinach powinno należeć do podstawowych elementów postępowania karnego (…) zwłaszcza zaś postępowania dowodowego w sprawach złożonych pod względem faktycznym i dowodowym (wyrok SN z 17 października 1979 r., **I KR 140/79**, OSNPG 1980 Nr 6, poz. 86).
8. Nie należy do kompetencji stron decydowanie, jakie metody badawcze dla stwierdzenia okoliczności mających istotny wpływ na rozstrzygnięcie sprawy okażą się przydatne w razie konieczności wykorzystania wiadomości specjalnych posiadanych przez powołanych biegłych (art. 176 § 1 k.p.k. z 1969 r., por. obecny art. 193 § 1 k.p.k.). Decydują o tym biegli, mając na względzie podlegające ocenie okoliczności, zebrany w sprawie materiał dowodowy, aktualny stan nauki

i stosowane w konkretnej dyscyplinie nauki dostępne metody badawcze (wyrok SN z 6 listopada 1987 r., **IV KR 502/86**, OSPiKA 1989 Nr 7–12, poz. 152).

9. Organ procesowy, sąd, nie może samodzielnie, bez korzystania z opinii biegłego, dokonywać ustaleń co do okoliczności, których stwierdzenie wymaga wiadomości specjalnych; jeżeli więc sąd nawet ma wiadomości specjalne, to i tak, zgodnie z brzmieniem § 1 art. 193 k.p.k., powinien zasięgnąć opinii biegłego, gdyż nie może występować w podwójnej roli – organu procesowego i źródła dowodowego (wyrok SN z 1 kwietnia 1988 r., **IV KR 281/87**, OSNKW 1988 Nr 9–10, poz. 69; Lex Polonica Nr 306692).
10. Organ procesowy, jakim jest sąd, nie może zastępować biegłego i rezygnować z jego opinii, mimo że ustalenie danej okoliczności wymaga określonej wiedzy specjalistycznej (wyrok SN z 20 maja 1984 r., **I KR 102/84**, OSNPG 1984 Nr 12, poz. 112).
11. Sąd nie może odrzucić wszystkich opinii specjalistycznych i oprzeć się na własnym odmiennym stanowisku (wyrok SN z 3 marca 1981 r., **IV KR 271/80**, OSNPG 1981 Nr 8–9, poz. 101; Lex Polonica Nr 357732).
12. Obowiązkiem sądu korzystającego z dowodu z opinii biegłego jest przeprowadzenie analizy i oceny przy stosowaniu kryterium „aktualnego stanu wiedzy w danej dziedzinie" czy też „obecnego stanu nauki" (wyrok SN z 6 listopada 2000 r., **IV KKN 477/99**, Prokuratura i Prawo 2001, dod. „Orzecznictwo" Nr 4, poz. 9; Lex Nr 51136).
13. Jeżeli stwierdzenie pewnej okoliczności istotnie wymaga wiadomości specjalnych, to przeprowadzenie dowodu z opinii biegłego jest konieczne, chociażby w konkretnej sytuacji dana okoliczność stanowiła przedmiot innego dowodu (dokumentu, zeznań świadka); opinii biegłego nie można zastępować zeznaniami świadka, który ma wiadomości specjalne, albo ekspertyzą pozasądową (wyrok SN z 8 maja 1996 r., **II KKN 11/96**, niepubl.).
14. Organowi procesowemu nie wolno zastępować wymaganej opinii biegłego innymi dowodami (wyrok SN z 20 sierpnia 1980 r., **V KR 178/80**, OSNPG 1981 Nr 5, poz. 52).
15. Powołani biegli z zakresu różnych specjalności mogą przeprowadzić badania wspólne i wydać jedną wspólną opinię (tzw. opinię kompleksową) albo opinie odrębne; decyduje o tym organ procesowy powołujący biegłych. Za dopuszczeniem dowodu z opinii kompleksowej może przemawiać charakter sprawy. Kompleksowa opinia niekoniecznie musi wyrażać jednolitą i zgodną ocenę jej autorów. Brak opinii kompleksowej, nawet przy sprzecznych opiniach wydanych przez różne zespoły biegłych, nie jest sam w sobie naruszeniem przepisów procesowych (wyrok SN z 8 kwietnia 1999 r., **IV KKN 653/98**, Prokuratura i Prawo 1999 Nr 10, poz. 12 – dod.; Lex Polonica Nr 343098).
16. Biegłym jest osoba powołana przez organ procesowy. Opinia uzyskana w trybie pozaprocesowym nie jest dowodem w rozumieniu art. 193 k.p.k. Nie może

ona być podstawą do ustaleń faktycznych, natomiast może być impulsem do dalszych ustaleń – żądania uzupełnienia już uzyskanej opinii lub powołania nowych biegłych (wyrok SN z 29 października 1990 r., **V KO 8/90**, OSNPG 1991 Nr 4–5, poz. 32; Lex Polonica Nr 420220).

17. Pozaprocesowa opinia biegłego zgodnie z ustaloną praktyką sądową nie może stanowić dowodu będącego podstawą oceny, albowiem dowód ten nie został przeprowadzony w sposób przewidziany przez kodeks postępowania karnego i strony nie miały możności ustosunkowania się do tego dowodu. Nie można jednak takiego dokumentu pominąć w postępowaniu odwoławczym, gdyż zawiera on informację o dowodzie, który nie jest pozbawiony znaczenia dla prawidłowego rozstrzygnięcia sprawy (wyrok SN z 6 maja 1985 r., **I KR 105/85**, OSNPG 1986 Nr 5, poz. 66).
18. Opinia opracowana na zlecenie uczestnika postępowania, przedstawiona przez niego sądowi, stanowi jego oświadczenie zawierające informację o dowodzie złożoną na podstawie art. 453 § 2 k.p.k., podlegające ujawnieniu w trybie przewidzianym przez ten przepis (postanowienie SN z 4 stycznia 2005 r., **V KK 388/04**, OSNKW 2005 Nr 1, poz. 12; Lex Polonica Nr 373855).
19. Opinia powinna zawierać opis metod i sposobu przeprowadzania badań, określenie porządku, w jakim je przeprowadzono, oraz przytaczać wszystkie argumenty oparte na stwierdzonych okolicznościach, które mają związek z badanymi faktami, a które podbudowane są fachowymi wyjaśnieniami biegłych. W tej części biegli powinni uzasadnić swoje poglądy wyrażone w końcowych wnioskach (wyrok SN z 19 września 1973 r., **III KR 187/73**, OSNKW 1974 Nr 1, poz. 18; Lex Polonica Nr 306678).
20. Jeżeli materiał dowodowy dostarcza argumentów przemawiających za różniącymi się od siebie wersjami przebiegu zdarzenia, opinia biegłych także powinna być opracowana wariantowo z pozostawieniem wyboru wariantu sądowi, w zależności od oceny dowodów przez niego dokonanej (wyrok SN z 8 listopada 1994 r., **III KRN 157/94**, OSNKW 1994 Nr 11–12, poz. 71; Lex Polonica Nr 298829).
21. Należy unikać odwoływania się do dalszych opinii innych jeszcze biegłych, a tym bardziej zwracania się o opinię specjalistyczną o opiniach dotychczas złożonych (uchwała Zgromadzenia Ogólnego SN z 15 lipca 1974 r., **Kw. Pr. 2/74**, OSNKW 1974 Nr 10, poz. 179).
22. Nie ma żadnej różnicy w traktowaniu i ocenie opinii wydanej przez biegłego sądowego lub innego biegłego powołanego w określonej sprawie przez organ procesowy (wyrok SN z 5 lutego 1974 r., **III KR 371/73**, OSNKW 1974 Nr 6, poz. 117).
23. O przydatności biegłego, a pośrednio o wartości opinii, decyduje jego wiedza i jakość oraz sposób sporządzenia opinii podlegającej – jak każdy zresztą dowód w sprawie – ocenie sądu (wyrok SN z 31 lipca 1981 r., **IV KR 166/81**, OSNPG 1982 Nr 2, poz. 25).

24. Dowód z opinii biegłego oceniony być musi z zachowaniem następujących wskazań:
    1) czy biegły dysponuje wiadomościami specjalnymi, niezbędnymi do stwierdzenia okoliczności mających istotny wpływ dla rozstrzygnięcia sprawy (art. 176 § 1 k.p.k. z 1969 r., por. obecny art. 193 § 1 k.p.k.);
    2) czy opinia biegłego jest logiczna, zgodna z doświadczeniem życiowym i wskazaniami wiedzy (art. 4 § 1 k.p.k. z 1969 r., por. obecny art. 7 k.p.k.);
    3) czy opinia ta jest pełna i jasna i nie zachodzi niewyjaśniona sprzeczność pomiędzy nią a inną opinią ujemną w toku przewodu sądowego (art. 182 k.p.k. z 1969 r., por. obecny art. 201 k.p.k., arg. *a contrario* (wyrok SN z dnia 6 maja 1989 r., **IV KR 74/83**, PiZ 1983/48).
25. Każda opinia biegłych podlega ocenie sądu, jak każdy inny dowód w sprawie. Sąd jest przecież powołany do skontrolowania logicznego biegu przesłanek opinii i do sprawdzenia jej wyników na podstawie materiału dowodowego sprawy. Stąd też zaniechanie takiej oceny przedłożonych opinii w kontekście ujawnionych w sprawie dowodów stanowi istotne uchybienie regułom określonym w art. 7 i 410 k.p.k. (wyrok SN z 12 października 2006 r., **IV K 236/06**, OSNwSK 2006 Nr 1, poz. 1958).
26. Organ prowadzący postępowanie przygotowawcze – podobnie jak sąd orzekający – ma obowiązek poddania każdego dowodu rzeczowej ocenie, a gdy chodzi o opinię biegłego – w ocenie tej uwzględniać, czy biegły dysponował materiałem niezbędnym do jej wydania w sposób zgodny z wymaganiami współczesnej wiedzy (postanowienie SN z 20 lipca 1977 r., **V KZ 54/77**, Lex Polonica Nr 306676; Nowe Prawo 1980 Nr 5, s. 162; OSNKW 1977 Nr 9, poz. 108; OSNPG 1977 Nr 12, poz. 125; Państwo i Prawo 1979 Nr 6, poz. 175).
27. Przy ocenie nowego rodzaju dowodu niezbędne jest wyjaśnienie, czy rzeczona ekspertyza opiera się na jednolitej i powszechnie przyjętej metodzie badawczej (wyrok SN z 12 grudnia 1974 r., **III CRN 305/74**, niepubl.).
28. Wdrożenie do praktyki sądowej w sprawach o ustalenie ojcostwa, w miarę rozwoju nauk biologicznych, środków dowodowych o charakterze przyrodniczym (badanie kodu genetycznego DNA) nie może prowadzić do naruszenia zasad procesowych przez ograniczenie zakresu postępowania dowodowego i sędziowskiej oceny dowodów. Rozstrzygające znaczenie nowego środka dowodowego nie zwalnia sądu od obowiązku oceny całokształtu materiału dowodowego w ramach art. 233 § 1 k.p.c. (wyrok SN z 16 lutego 1994 r., **II CRN 176/93**, Lex Polonica Nr 300765; OSNCP 1994 Nr 10, poz. 197; Palestra 1995 Nr 3–4, s. 269; Prokuratura i Prawo 1995 Nr 7–8, s. 93; Przegląd Sądowy 1998 Nr 2, s. 97; Rejent 1995 Nr 5, s. 159; Wokanda 1994 Nr 6, s. 6).
29. Do oceny nowej, niezweryfikowanej metody kryminalistycznej należy zastosować kryterium metodologicznej nienaganności metody, a organy postępowania

mają obowiązek oceny opinii biegłego w świetle wymagań współczesnej wiedzy (wyrok SN z 5 listopada 1999 r., **V KKN 440/99**, Lex Polonica Nr 343019; Biul. SN 1999 Nr 11 s. 19; Krakowskie Zeszyty Sądowe 1999, Nr 12, poz. 18; OSNKW 1999 Nr 11–12, poz. 76; Palestra 2000 Nr 2–3, s. 172; Palestra 2000 Nr 5–6, s. 246; Państwo i Prawo 2000 Nr 4, s. 109; Prokuratura i Prawo – dod. 2000 Nr 2, poz. 15; Wokanda 2000 Nr 4, s. 22).

W stosunkowo krótkim czasie ekspertyzy sporządzane przez biegłych z zakresu genetyki sądowej znalazły zastosowanie procesowe i uznanie orzecznictwa sądowego.

1. Część DNA jest identyczna dla wszystkich ludzi, co jest oczywiste, bo wszyscy ludzie należą do jednego gatunku. Istnieją jednak jego fragmenty wyjątkowe dla każdej osoby. Niepowtarzalność takich fragmentów jest o wiele większa niż używane powszechnie do identyfikacji odciski palców (wyrok Sądu Apelacyjnego w Białymstoku z 11 stycznia 2007 r., **II AKa 265/06**, Prokuratura i Prawo 2007, dod. „Orzecznictwo" Nr 12, poz. 30).
2. Oczekiwanie na sporządzenie opinii z zakresu badań genetycznych DNA stanowi w myśl art. 263 § 4 k.p.k. podstawę do przedłużenia stosowania tymczasowego aresztowania wobec podejrzanego na okres oznaczony, przekraczający terminy określone w § 2 i 3 powołanego powyżej przepisu (postanowienie SN z 29 czerwca 2000 r., **IV KZ 47/00**, niepubl.).
3. Jeśli objęte treścią zarzutu działanie skazanego nie musiało doprowadzić do pozostawienia przez niego śladów krwi i nasienia na odzieży pokrzywdzonej, to pominięcie przez sąd *meriti* dowodu z opinii biegłych z zakresu badań genetycznych nie miało wpływu na treść wyroku (postanowienie SN z 6 listopada 2007 r., **III KK 372/07**, Lex Nr 351227).
4. Badanie DNA jest tylko jednym z dowodów podlegających ocenie na tle całokształtu zebranego w sprawie materiału dowodowego. Wynik badań genetycznych DNA nie może w sprawie być oceniany w oderwaniu od innych dowodów (postanowienie SN z 25 stycznia 2004 r., **II KK 141/03**, Lex Nr 83741).
5. Opinia z zakresu hemogenetyki wydana przez biegłych dotyczyła pochodzenia śladów krwi zabezpieczonych na butach i odzieży oskarżonych. Biegli stwierdzili, iż zabezpieczone ślady krwi są śladami krwi ludzkiej pochodzącej od różnych osób, ale należy wykluczyć, aby pochodziły od ofiar. Profile genetyczne śladów nie były zgodne z profilem DNA krwi pokrzywdzonych. (…) Pominięcie treści tych opinii (także traseologicznej – przyp. aut.) w materiale dowodowym, który podlegał ocenie sądu, i brak podjęcia próby pogłębionej ich oceny poprzez bezpośrednie przesłuchanie biegłych wydających te opinie stanowi istotne naruszenie obowiązku wszechstronnego wyjaśnienia sprawy i uwzględniania dowodów zarówno na korzyść, jak i niekorzyść oskarżonych. Wykluczenie pochodzenia śladów krwi zabezpieczonych na butach i odzieży oskarżonych od pokrzywdzonych oraz fakt, iż jedyny zabezpieczony na miejscu zdarzenia nadający się do

traseologicznych badań identyfikacyjnych odcisk buta nie pochodzi od zabezpieczonych butów oskarżonych, stanowią okoliczności, które muszą podlegać ocenie sądu *meriti*. Na obecnym etapie postępowania czynienie jakichkolwiek ocen w tym zakresie przez sąd odwoławczy naruszałoby zasadę dwuinstancyjności, a bez uzyskania wiadomości specjalnych od biegłych, np. w zakresie możliwości i skuteczności usuwania śladów krwi z butów i odzieży czy też nakładania się kolejnych śladów na poprzednie i wpływ tego na badanie profilu genetycznego, byłoby czystą spekulacją. Kwestie te winny być przedmiotem szczegółowych ustaleń sądu I instancji, a nie oceny Sądu Apelacyjnego na obecnym etapie postępowania. Stąd bardziej szczegółowe odniesienie się do tych kwestii nie jest możliwe (wyrok Sądu Apelacyjnego w Katowicach z 8 marca 2007 r., **II AKa 305/06**, Prokuratura i Prawo 2007, dod. „Orzecznictwo" Nr 11, poz. 18).

6. Dla identyfikacji ludzkich zwłok w kontekście dowodowym sprawy znaczenie mają badania genetyczne DNA, jednak istnieją inne możliwości identyfikacji zwłok, a brak w tym zakresie dowodu z badań genetycznych nie może podważać wiarygodności tej innej czynności dowodowej (wyrok Sądu Apelacyjnego w Katowicach z 25 stycznia 2006 r., **II AKa 436/05**, Prokuratura i Prawo 2006, dod. „Orzecznictwo" Nr 11, poz. 25).

Pozytywne wyniki badań nad markerami DNA drzew pozwoliły na wyodrębnienie cech gatunkowych i osobniczych. Wyniki badań zostały wykorzystane jako metoda identyfikacji drewna pochodzącego z kradzieży w postępowaniach karnych. Sporządzone w tym zakresie opinie znalazły zastosowanie w postępowaniach dowodowych. Przykłady:

1. Opinia „Czy materiał dowodowy w postaci dwóch fragmentów drewna sosny pochodzi z jednego pnia", wykonana na zlecenie Sądu Rejonowego w Radzyniu Podlaskim, V Wydział Grodzki (**V K 255/07/R**).
2. Opinia „Czy materiał dowodowy w postaci dwóch fragmentów drewna brzozy jest tożsamy genetycznie i czy pochodzi z tego samego drzewa", wykonana na zlecenie Sądu Rejonowego w Złotowie, Wydział II Karny (**II K 349/07**). Sprawca kradzieży został skazany prawomocnym wyrokiem.
3. Opinia „Czy DNA drewna zabezpieczonego na posesjach oskarżonego odpowiada DNA drewna pochodzącego z oddziału 49m i 49i", wykonana na zlecenie Sądu Rejonowego w Zielonej Górze (**VII K 246/06**). Sprawca kradzieży został skazany prawomocnym wyrokiem.
4. Opinia „Czy materiał dowodowy w postaci fragmentów drewna olszy czarnej zabezpieczonych na terenie posesji podejrzanego pochodzi z drzew Lasów Państwowych (LP) administrowanych przez Nadleśnictwo Płońsk", wykonana na zlecenie Nadleśnictwa Płońsk, potwierdziła pochodzenie materiału dowodowego i materiału porównawczego z tego samego drzewa (**S-10/06**).

5. Opinia „Czy materiał dowodowy w postaci fragmentów drewna świerka pospolitego oraz brzozy zabezpieczony na podwórzu osoby podejrzanej pochodzi z drzew Lasów Państwowych (LP) gospodarowanych przez Nadleśnictwo Kolbudy", wykonana na zlecenie Nadleśnictwa Kolbudy, potwierdziła pochodzenie materiału dowodowego i materiału porównawczego z tego samego drzewa brzozy. W sprawie rozpatrywanej przez Sąd Rejonowy w Kartuzach (**II K 88/08**) zapadł wyrok skazujący.
6. Dopuszczenie przez Sąd Rejonowy w Lubartowie, II Wydział Karny dowodu w postaci ekspertyzy Zakładu Genetyki Uniwersytetu im. Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy w sprawie o kradzież drewna dębu spowodowało przyznanie się podejrzanego do winy i dobrowolne poddanie się karze (**V K 216/09**).
7. Opinia „Czy igły świerka kłującego zabezpieczone w bagażniku samochodu podejrzanego pochodzą z drzew poszkodowanego", wykonana na zlecenie Policji we Wrocławiu. Sprawa została wniesiona do sądu (sygn. akt **VII K 106/09**).
8. Strażnicy leśni Nadleśnictwa Durowo (RDLP w Pile), prowadząc postępowanie przygotowawcze w sprawie o kradzież z pnia drewna olchowego, przesłali pobrany w lesie materiał do badań genetycznych DNA. Opinia biegłych przeprowadzona w sprawie (**VI K 602/08**) wykazała, że pobrane próbki materiału porównawczego są tożsame genetycznie (prawdopodobieństwo pierwszej próby wyniosło 99,999999866%, a drugiej 99,999999982%). Sąd Rejonowy w Wągrowcu uznał oskarżonego winnym dokonania kradzieży drewna z lasu państwowego.
9. Pozytywne wyniki analiz DNA drewna, zakwestionowanego na terenie firmy, a także w trakcie kontroli transportu na terenie Nadleśnictwa Ruszów (RDLP we Wrocławiu), były podstawą wyroków skazujących wobec sprawców jego kradzieży (**II K 902/11** oraz **II K 941/11**).
10. Opinia Instytutu Genetyki Sądowej w Bydgoszczy (IGS-140/2011) z 14 października 2011 r. dla Sądu Rejonowego w Braniewie do sprawy karnej o bezprawny wyrąb i kradzież drewna z art. 278 § 1 k.k. (**II K 777/10**) zawierała wnioski:
    1) próby oznaczenia profilu genetycznego fragmentu kory sosnowej w zakresie *loci* STR *Pinus s*. dały wynik negatywny z powodu zbyt małej ilości lub degradacji DNA;
    2) fragment, a mianowicie szczapa drewna sosnowego, charakteryzuje się profilem genetycznym w zakresie *loci* STR *Pinus s.* zgodnym z profilem genetycznym materiału referencyjnego zabezpieczonego z pnia sosny.

    Częstość profilu genetycznego oznaczonego we fragmencie drewna zabezpieczonego i w materiale referencyjnym wynosi 0,00000000000000081, tj. 1 na 1 234 567 901 234,57.
11. Wyrok Sądu Rejonowego w Końskich z 30 maja 2012 r. (**II K 197/12**) – uznanie oskarżonego Marka D. za winnego popełnienia przestępstwa wyrębu

i kradzieży drzewa. Opinię opracowano po przeprowadzeniu badań DNA drewna wykonanych w Laboratorium Genetyki Molekularnej Zakładu Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym z 29 lutego 2012 r. do sprawy nr NS-026–1/12, dotyczącej przeprowadzenia badań metodą DNA brzozy brodawkowatej *Betula pendula* w celu potwierdzenia bądź wykluczenia tożsamości genetycznej dwóch próbek drewna brzozowego. Wnioski: próbki materiału porównawczego mają identyczny profil genetyczny z próbką materiału dowodowego. W opinii stwierdzono, że materiał dowodowy z pnia brzozy stanowił przed rozdzieleniem z materiałem porównawczym w postaci próbki drewna brzozowego jedną całość z 98-procentowym prawdopodobieństwem.

12. Wyrok Sądu Rejonowego we Włoszczowie z 11 maja 2012 r. (**II K 805/10**) – uznanie oskarżonego Mirosława M. za winnego popełnienia przestępstwa wyrębu i kradzieży drzewa. Opinię opracowano po przeprowadzeniu badań DNA drewna wykonanych w Laboratorium Genetyki Molekularnej Zakładu Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym z 15 kwietnia 2011 r. do sprawy nr NS-16–16–026/S/24/2010, dotyczącej przeprowadzenia badań metodą DNA sosny pospolitej *Pinus sylvestris* w celu potwierdzenia bądź wykluczenia tożsamości genetycznej dwóch próbek drewna sosnowego. Na podstawie wyników analizy wielkości fragmentów DNA stwierdzono, że próbki materiału dowodowego mają profil genetyczny identyczny z próbkami materiału porównawczego. Według opinii materiał porównawczy z pnia sosny oznaczony nr 1 przed rozdzieleniem z materiałem dowodowym w postaci próbki drewna sosnowego nr 2 stanowił jedną całość z prawdopodobieństwem 99,51%.
13. Wyrok Sądu Rejonowego we Włoszczowie z 29 maja 2012 r. (**II K 796/11**) – uznanie oskarżonego Andrzeja M. za winnego popełnienia przestępstwa wyrębu i kradzieży drzewa. Badania DNA drewna wykonano w Laboratorium Genetyki Molekularnej Zakładu Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym z 15 listopada 2011 r. i na ich podstawie opracowano opinię do sprawy nr NS-16–16–026––14/2011, dotyczącej przeprowadzenia badań metodą DNA brzozy brodawkowatej *Betula pendula* w celu potwierdzenia bądź wykluczenia tożsamości genetycznej dwóch próbek drewna brzozowego. Na podstawie wyników analizy wielkości fragmentów DNA stwierdzono, że próbki materiału dowodowego mają identyczny profil genetyczny z próbkami materiału porównawczego. Według opinii materiał porównawczy oznaczony nr 1 przed rozdzieleniem z materiałem dowodowym w postaci próbki drewna brzozowego nr 2 stanowił jedną całość, z prawdopodobieństwem 99,89%. IX Wydział

Karny-Odwoławczy Sądu Okręgowego w Kielcach wyrokiem z 8 listopada 2012 r. (**IX K 131/12**) utrzymał zaskarżony wyrok w mocy, uznając apelację za oczywiście bezzasadną.

14. Wyrok Sądu Rejonowego we Włoszczowie z 19 czerwca 2012 r. (**II K 281/12**) – uznanie oskarżonego Stanisława T. za winnego popełnienia przestępstwa wyrębu i kradzieży drzewa. Badania DNA drewna wykonano w Laboratorium Genetyki Molekularnej Zakładu Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym z 26 kwietnia 2012 r. do sprawy nr NS-16–16–026–8/2012, dotyczącej przeprowadzenia badań metodą DNA olszy czarnej *Alnus glutinosa* Gaertn. w zakresie potwierdzenia bądź wykluczenia tożsamości genetycznej obydwu próbek drewna olszowego. Na podstawie wyników badania stwierdzono, że próbki materiału dowodowego mają identyczny profil genetyczny z próbkami materiału porównawczego, z prawdopodobieństwem 99,88%. Wniosek: materiał porównawczy z pnia olszy oznaczony nr 1 przed rozdzieleniem z materiałem dowodowym w postaci próbki drewna olszowego nr 2 stanowił jedną całość z prawdopodobieństwem 99,88%.
15. Opinia Instytutu Genetyki Sądowej w Bydgoszczy nr IGS-334/2010 z 16 lipca 2010 r., wydana dla Nadleśnictwa Dębica na podstawie profilowania polimorfizmu DNA przesłanego materiału dowodowego – krążków drewna jodłowego. Z zabezpieczonego materiału przekazano do ekspertyzy:
    1) materiał dowodowy (zabezpieczony na posesji sprawcy) – dwa krążki drewna jodłowego,
    2) materiał porównawczy (pobrany w lesie z wierzchołków bezprawnie ściętych drzew) – dwa krążki drewna jodłowego.

Porównanie oznaczonych profili genetycznych pozwoliło na uzyskanie wyniku, który z wysokim prawdopodobieństwem (powyżej 99%) potwierdził pochodzenie krążka drewna jodłowego zabezpieczonego na posesji z jodły z lasu państwowego, z którego pobrano materiał porównawczy. Przeprowadzenie ekspertyzy kryminalistycznej do sprawy S-6–2/1/10 i pozytywny wynik badania odegrały decydującą rolę w wydaniu wyroku skazującego przez Sąd Rejonowy w Dębicy – wyrokiem nakazowym z 2 września 2010 r. uznał on Zbigniewa S. za winnego z art. 290 § 1 k.k. w zw. z art. 278 § 1 k.k. (**II K 696/10**).

Przedstawione fragmenty orzeczeń Sądu Najwyższego i sądów apelacyjnych, a także sądów I instancji odnośnie do dowodowej roli opinii z badań DNA w trakcie procesu karnego potwierdzają, że takie badania dostarczają istotnych dowodów, których wartość dla poczynienia ustaleń w toku postępowania karnego jest niepodważalna. Taki dowód nie może być jednak oceniany w oderwaniu od innych dowodów ujawnionych w trakcie postępowania. Organy procesowe nie mogą *a priori* przyjmować ani odrzucać wyników opinii z badań DNA; wyniki te muszą znaleźć odzwierciedlenie w materiale dowodowym. Chociaż podlegają one, tak jak inne dowody, swobodnej ocenie sądu (Grzeszczyk 2005), to organ procesowy, oceniając

materiał dowodowy, w każdym przypadku powinien brać pod uwagę opinię opracowaną na podstawie badań DNA (jeżeli została w sprawie uzyskana). Nieuzyskanie w toku procesu karnego opinii z badań DNA lub brak jej oceny mogą stać się podstawą do sformułowania zarzutów w postępowaniu odwoławczym.

2.10. Stwierdzenia końcowe i wnioski

Od 1984 r., kiedy to sir Alec J. Jeffreys, uczony z angielskiego Uniwersytetu w Leicester, wpadł na pomysł identyfikacji człowieka na podstawie jego niepowtarzalnego łańcucha DNA, rozwój genetyki sprawił, że kryminalistyka zaczęła z powodzeniem wykorzystywać badania DNA. Pozwalają one na odtworzenie przebiegu zdarzenia oraz niekwestionowane powiązanie ofiary lub podejrzanego z konkretnym przestępstwem. Metoda ta zrewolucjonizowała nauki sądowe co najmniej tak jak daktyloskopia wiek wcześniej (Wójcikiewicz 2008). Wyniki badań DNA służą realizacji celów procesu karnego, ponieważ można zaliczyć je do materiału dowodowego będącego podstawą orzeczenia o winie i karze (Klejnowska 2006). Analiza śladów genetycznych (DNA), pomimo równorzędnego traktowania dowodów w postępowaniu karnym, jest uznawana za dowód trudny do podważenia, gdyż poziom błędu takich badań jest bardzo niski. W rezultacie analizy wyników testów ze 160 laboratoriów z 31 krajów, przeprowadzonych w latach 1993–2003 przez GEDNAP *(German DNA Profiling Group)*, ustalono średni poziom błędu na 0,89%, czyli od 2,1% do 0,4%, z tendencją malejącą (Wójcikiewicz 2008). To powoduje, że opinie opracowywane na podstawie badań genetycznych zyskują na randze i często w powszechnym rozumieniu są utożsamiane z dowodem ostatecznym, przesądzającym o winie lub niewinności oskarżonego (Kowalczyk 2011). O zwiększającej się roli opinii z badań genetycznych w procesie karnym świadczą także dane statystyczne, z których wynika, że w sprawach karnych systematycznie rośnie liczba ekspertyz dotyczących takich badań (Sołtyszewski 2007).

Należy jednak pamiętać, że świetle art. 92 k.p.k. podstawę orzeczenia może stanowić tylko całokształt okoliczności ujawnionych w postępowaniu, mających znaczenie dla rozstrzygnięcia. Przepis ten, oprócz wskazania faktycznej podstawy orzeczeń, wraz z zasadą legalizmu (art. 10 § 1 k.p.k.), zobowiązuje także organ procesowy do przeprowadzenia postępowania dowodowego w każdej sprawie ściganej z urzędu – art. 9 § 1 k.p.k. (Lisiecki, Jaguszewska 2002). Ponadto w obowiązującym stanie prawnym orzeczenia Sądu Najwyższego nie są bezwzględnie obowiązujące dla organów procesowych, chociaż bez wątpienia mają istotny wpływ na praktykę stosowania prawa, stanowią jego wykładnię i określają kierunek orzekania sądowego. Podkreślić wszak należy, że opinia biegłych lub placówki naukowej wydana w jakiejkolwiek sprawie i dotycząca jakiegokolwiek problemu procesowego nie może być bezkrytycznie przyjmowana przez organy procesowe. Wnioski wynikające z opinii

powinny być zawsze umieszczone w sprawie w kontekście dowodowym, skonfrontowane z innymi dowodami, a sama metoda dojścia przez biegłych lub specjalistyczną placówkę naukową do określonych konkluzji także musi być weryfikowana, albowiem przyjęta metoda badawcza oraz sposób przeprowadzenia badań rzutują na merytoryczną treść opinii.

Polska jest prawdopodobnie jednym z pierwszych krajów na świecie dysponujących możliwością analiz DNA drzew leśnych w kryminalistyce. Sprzyja temu struktura własności lasów, których ponad 83% należy do Skarbu Państwa i jest administrowane przez Lasy Państwowe. Trudno sobie wyobrazić prowadzenie podobnych badań w krajach, w których większość lasów jest prywatna, np. w Austrii i Portugalii. Możliwy będzie również powrót do spraw, które znalazły się w archiwum (Bosakowska 2011).

Dowód z badań DNA został uznany za jeden z niewielu obiektywnych środków dowodowych, co znalazło uznanie m.in. w prawie Unii Europejskiej, zalecającym, aby „badania DNA wykonywane były w każdym możliwym przypadku, bez względu na wagę popełnionego czynu" (Lewandowska 2006). Rekomendacja Ministrów Rady Europy Nr R (92) 1 w sprawie wykorzystania analizy kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) w postępowaniu karnym, którą przyjęto 10 lutego 1992 r., określa: zasady pobierania próbek do analizy DNA, warunki dopuszczalności przeprowadzania takich analiz, wymogi, jakim powinny odpowiadać laboratoria lub inne instytucje przeprowadzające badania, oraz zasady ochrony danych, a także przechowywania próbek i wyników analiz.

Analiza DNA jako środek dowodowy otwiera nowe możliwości w sprawach karnych o kradzież drewna prowadzonych przez Straż Leśną lub Policję. Metoda ta doskonale wpisuje się w ewolucję polskiej procedury karnej w kierunku nadania większego znaczenia zasadzie kontradyktoryjności. Oznacza to, że oprócz zyskania środka dowodowego to oskarżyciel, w ramach zasady konfrontacji stron, będzie musiał wykazać się większą aktywnością i inicjatywą dowodową niż organ procesowy. W postępowaniu procesowym sąd będzie przeprowadzać dowody tylko w szczególnych wypadkach, a gromadzenie dowodów znajdzie się w gestii stron.

DNA druk.indd 46 2014-05-26 09:21:54

3.

Identyfikacja drewna na podstawie analiz DNA

Pierwsze podstawy genetyki sądowej opracował już w 1900 r. Karl Landsteiner dzięki odkryciu grup krwi ABO, identyfikujących pokrewieństwo między osobami. Po odkryciu w 1953 r. zapisu kodu genetycznego w komórkach ludzkich pod postacią cząsteczek DNA (Watson i Crick, Nagroda Nobla w 1954 r.), już w 1984 r. zastosowano porównanie struktury cząsteczek DNA w celu potwierdzenia pochodzenia skazanego. W 1986 r. analiza DNA pozwoliła zidentyfikować sprawcę dwóch morderstw w Wielkiej Brytanii, po uprzednim przebadaniu 5000 podejrzanych (Seton 1988). Obecnie analiza profili DNA jest powszechnie stosowaną metodą identyfikacji osób i stanowi mocny dowód w procesach karnych.

Cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) są nośnikiem informacji genetycznej (inaczej kodu genetycznego) określającej wszystkie cechy strukturalne i funkcjonalne danego organizmu. Precyzyjny układ kombinacji czterech par zasad nukleinowych: A – adeniny, T – tyminy, C – cytozyny i G – guaniny, stanowi unikalny zapis informacji genetycznej, charakterystycznej dla danego gatunku, a nawet osobnika. Dzięki informacji genetycznej zakodowanej w sekwencjach zbudowanych z par zasad nukleinowych A, T, C i G powstają białka, których podstawowymi funkcjami są kształtowanie struktury materii organicznej oraz kataliza (jako enzymy) wszystkich reakcji biochemicznych zachodzących w komórkach. Poza fragmentami łańcucha DNA kodującymi informację o funkcjonalnych białkach (strukturalnych i enzymatycznych) tzw. niekodujące fragmenty DNA są źródłem zmienności (polimorfizmu) w budowie, a co za tym idzie – precyzyjnej charakterystyki osobniczej badanej próbki. Zmiany osobnicze powstają w cząsteczkach DNA w wyniku mutacji pojedynczych par zasad lub większych sekwencji kwasów nukleinowych. Prowadzi to do utrwalenia zmian np. w DNA mitochondrialnym, do dziś najczęściej badanym materiale genetycznym potwierdzającym pokrewieństwo ludzi i zwierząt w linii matecznej.

DNA druk.indd 47 2014-05-26 09:21:54

Genetyka sądowa ma na celu dostarczenie dowodów w sprawie karnej na podstawie charakterystyki kodu genetycznego materiału dowodowego (pobranego na miejscu przestępstwa) i porównawczego (referencyjnego, pobranego od domniemanego sprawcy).

W genetyce sądowej badane są profile genetyczne organizmów, począwszy od ludzi i zwierząt, skończywszy na roślinach i mikroorganizmach. Sposób pobrania materiału biologicznego do badań jest kluczowym elementem umożliwiającym wykonanie analiz cząsteczek DNA w laboratorium.

Przede wszystkim przy zabezpieczaniu materiału do badań DNA na miejscu przestępstwa należy zachować podstawowe zasady czystości (rękawiczki) i przestrzegać właściwych warunków przechowywania próbek, cząsteczki DNA są bowiem bardzo wrażliwe na działanie czynników atmosferycznych i ulegają natychmiastowej degradacji w temperaturze powyżej 4°C, głównie na skutek działania enzymów proteolitycznych (tnących łańcuch DNA na małe kawałki). W warunkach trwania procesów życiowych, dzięki energii pozyskanej z procesu oddychania, integralność cząsteczek DNA jest chroniona i podtrzymywana przez szereg białek i reakcji biochemicznych. Degradacja nośnika informacji genetycznej po ustaniu funkcji życiowych organizmu stanowi swoiste zabezpieczenie przed wydostaniem się tej informacji poza środowisko komórkowe. Tym niemniej zawsze jakaś część łańcuchów DNA może pozostać w dobrym stanie nawet w obumarłych komórkach (w skamieniałościach, środowisku beztlenowym na dnie jezior), które są cennym źródłem informacji służących identyfikacji szczątków materii organicznej.

Materiał przeznaczony do analiz sądowych jest następnie przesyłany do laboratorium, w którym pozyskuje (ekstrahuje) się i analizuje cząsteczki DNA, aby uzyskać profil genetyczny danej próbki. Najczęściej badanymi w celu identyfikacji osobniczej fragmentami DNA są tzw. regiony krótkich powtórzeń, zwane także sekwencjami mikrosatelitarnymi (ang. SSR lub STR). Sekwencje te, położone w niekodujących regionach genomu, są zbudowane z długich tandemowych powtórzeń, najczęściej dwóch, trzech lub czterech par zasad, a długość powtórzeń jest cechą charakterystyczną danego gatunku i osobnika. W populacji ludzkiej wystarczy analiza dziewięciu *loci* STR, aby z prawdopodobieństwem bliskim 1 : 106 określić profil genetyczny. W przypadku analizy materiału roślinnego (np. drewna pobranego z miejsca kradzieży) analiza czterech *loci* DNA mikrosatelitarnego umożliwia wykluczenie bądź potwierdzenie identyczności materiału dowodowego z porównawczym nawet na poziomie 99,99%.

Na strukturę genetyczną populacji danego gatunku ma wpływ szereg czynników biotycznych (mutacje, selekcja naturalna i dryf genetyczny) oraz czynników abiotycznych, związanych z działalnością człowieka. W genetyce populacyjnej przyjmuje się, że populacje drzew leśnych znajdują się w tzw. równowadze Hardy'ego-Weinberga, która zakłada m.in. zachowanie tego samego poziomu częstości alleli

i genotypów w populacji w kolejnych pokoleniach, głównie dzięki udziałowi wszystkich osobników danego gatunku w reprodukcji. Ponadto równowaga Hardy'ego-Weinberga zakłada brak selekcji, mutacji i migracji, które w znaczący sposób zmieniają częstość występowania alleli w populacji (King i Stanfield 2002). Prawidłowo zaplanowany i przeprowadzony zbiór materiału roślinnego z pojedynczych drzew umożliwia miarodajną analizę DNA, z minimalnym ryzykiem pominięcia alleli charakterystycznych dla puli genowej danego gatunku.

3.1. Podstawy analiz cząsteczek DNA

3.1.1. Zasady prawidłowego zabezpieczania w terenie materiału dowodowego i porównawczego do badań DNA

Do badań DNA wystarczy niewielka ilość materiału organicznego, gdyż rodzaj tkanek (liść, igły, drewno, korzeń) oraz cechy ilościowe (pierśnica, wysokość i miąższość) próbek drewna nie wpływają na wynik badania. Każda komórka organizmu (poza komórkami rozrodczymi, które mają połowę informacji genetycznej) ma identyczny profil DNA, co jest ogromną zaletą w procesie identyfikacji poszczególnych fragmentów danego osobnika. Dużą zaletą tych analiz jest także szybkość ich wykonania oraz niezależność ich wyników od wieku drzewa, z którego pobrano próbki. Do badań DNA wystarczy niewielka ilość materiału zebranego w terenie. Na ogół wymagane jest dostarczenie ok. 100 mg drewna, nasion, liści lub igieł (ramka 1).

Ramka 1. Przykłady materiału dowodowego i porównawczego, który można pobierać do analiz DNA

Materiał dowodowy	Przykłady
Wyrzynki (najlepiej z łykiem) z drewna stosowego (wałków, dłużyc itd.)	 
Sortyment tartaczny	 

Materiał dowodowy	Przykłady
Igły drzew iglastych (sosny, świerka)	 
Blaszki liściowe (dębu, buka, olszy, brzozy)	 
Materiał porównawczy	**Przykłady**
Pniaki drzew na zrębie, z których pozyskano próbki drewna do analiz	 

Fot. J. A. Nowakowska, M. Klisz

Najwięcej DNA znajduje się w tkankach żywych, w których dokonują się podziały komórkowe, a więc w pąkach, liściach i igłach młodych pędów oraz w kambium pnia lub gałęzi. Pozyskanie kwasów nukleinowych z innego typu materiału, czyli uśpionych pąków, rozwiniętych liści i igieł, zrzezów, nasion i drewna jest również możliwe, ale wymaga dodatkowej ostrożności w czasie przechowywania od zbioru do ekstrakcji cząsteczek DNA. Te cząsteczki szybko ulegają degradacji, np. w usychających czy gnijących tkankach, głównie z powodu działania enzymów proteolitycznych, aktywnych w dodatnich temperaturach. Zebrany materiał roślinny (pąki, liście, igły, drewno) powinien być zatem przed wykonaniem analiz przechowywany w środowisku suchym (przy wilgotności powietrza nie większej niż 40%) oraz w niskiej temperaturze (najlepiej poniżej 0°C). Przechowywanie tkanek roślinnych w alkoholu lub formalinie jest odradzane, gdyż może powodować uszkodzenia łańcucha DNA (Qiagen 2002).

W celu identyfikacji materiału dowodowego i porównawczego dla potrzeb procesowych opracowano dla Straży Leśnej podręczny zestaw IBL DNA-1 (ryc. 7), służący do prawidłowego zabezpieczenia materiału dowodowego i porównawczego w terenie. Na zestaw składają się: pilarka spalinowa, siekierka, dłutko, torby papierowe, taśma miernicza, latarka elektryczna, aparat fotograficzny, lupa, wodoodporne pisaki, wodoodporna taśma klejąca, rękawiczki gumowe, skalowana linijka,

numerki plastikowe, opakowania z folii na metryczki, lak, sznurek pakowy, nóż oraz komplet druków procesowych.

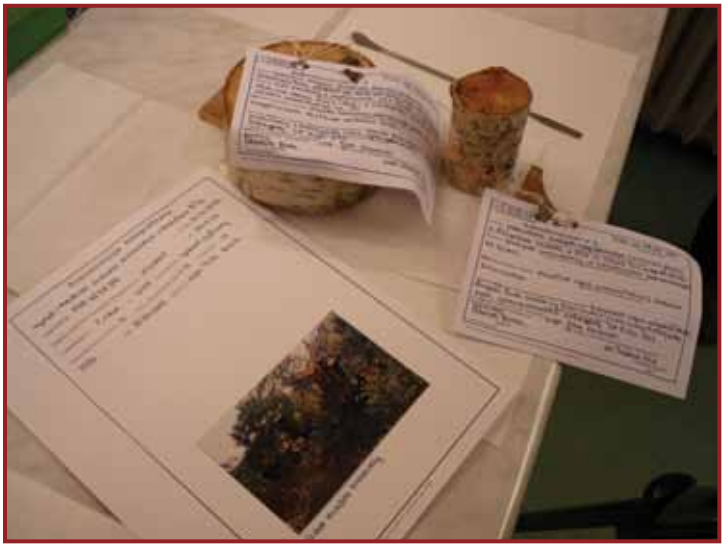


Ryc. 7. Podręczny zestaw IBL DNA-1 do pobierania materiału do analiz DNA (fot. J. A. Nowakowska)

Podczas oględzin miejsca kradzieży drewna dla potrzeb procesowych Straży Leśnej powinny być zachowane następujące zasady:

- Minimalna ilość wymaganego do analiz DNA materiału to 100 mg (dwie igły, jeden liść, kawałek drewna wielkości zapałki). Najlepiej odciąć i zabezpieczyć krążki lub wyrzynki drewna wielkości od kilku do kilkunastu centymetrów.
- Próbki materiału roślinnego powinny być umieszczone w papierowych kopertach opisanych wodoodpornym pisakiem.
- Do próbek powinna zostać dołączona również dokumentacja fotograficzna z opisem wykonanym na policyjnych metryczkach (na podstawie art. 207 § 1 i art. 143 § 1 pkt 3 k.p.k.).
- Pobrany materiał przed wysyłką najlepiej przechowywać w niskiej temperaturze (w przenośnym termosie z suchym lodem), chroniąc go przed wilgocią i ekspozycją na światło słoneczne.
- Pobrany w terenie materiał dowodowy i porównawczy nie powinien być starszy niż:
  – cztery lata dla drewna suchego,
  – trzy–cztery miesiące dla materiału porównawczego (pniaki w terenie).
- Okres przechowywania materiału organicznego w niskich temperaturach (–70°C) nie powinien przekraczać trzech lat.

Przykładowy materiał przywiezionego do laboratorium drewna brzozowego zabezpieczonego w terenie, wraz z prawidłowym opisem, przedstawiono na ryc. 8.



Ryc. 8. Prawidłowo opisany materiał roślinny wraz z dokumentacją pisemną i fotograficzną, przesłany do laboratorium analiz DNA (fot. J. A. Nowakowska)

3.1.2. Ekstrakcja DNA genomowego i ocena jakościowa

Analizy DNA są wykonywane w laboratoriach dysponujących odpowiednią aparaturą badawczą i doświadczeniem w badaniu DNA drewna.

Istnieje szereg technik ekstrakcji DNA (Dellaporta i in. 1983, Bowtell 1987, Doyle i Doyle 1990, Qiagen 2002). Ich pierwszym etapem jest zniszczenie (liza) ścian komórkowych, umożliwiające wydzielenie kwasów nukleinowych z tkanek roślinnych, grzybowych i zwierzęcych (Sambrook i Russell 2001).

Ekstrakcja DNA z tkanek diploidalnych (z podwójnym garniturem chromosomów – 2n), czyli z igieł, liści, zrzezów, kambium i bielu, umożliwia zarówno analizy DNA jądrowego, jak i organellowego. Ekstrakcja DNA z tkanek haploidalnych (czyli mających pojedynczy komplet chromosomów – n), np. z prabielma nasion nagonasiennych, ogranicza badania jedynie do połowy informacji genetycznej, w tym przypadku do drzewa matecznego. Tkanki triploidalne – 3n – znajdują się w bielmie u okrytonasiennych.

Do często stosowanych metod pozyskiwania kwasów nukleinowych z tkanek roślinnych (i innych) należą: CTAB (Doyle i Doyle 1990) oraz metody opisane w publikacjach: Dumolin i in. (1995), Bowtell (1987) i Dellaporta (1983). Dobrej

jakości DNA do analiz porównawczych pozwalają pozyskać również inne metody (Asif i Cannon 2005, Tibbits i in. 2006).

Bardzo dobrą wydajność ekstrakcji gwarantują gotowe zestawy do izolacji DNA, np. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) lub NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel), o sprawdzonej przydatności dla „trudnych" tkanek roślinnych, takich jak igły drzew iglastych oraz tkanki zdrewniałe. Zaletą tych zestawów jest duża wydajność i czystość otrzymanych ekstraktów DNA, wolnych od takich komponentów komórkowych jak np. obecne w komórkach roślinnych polisacharydy, które mogą hamować działanie polimerazy w reakcji PCR.

Na ogół we wszystkich tych metodach pierwszym etapem w pozyskaniu cząsteczek DNA z tkanek roślinnych jest wstępna homogenizacja mechaniczna lub rozcieranie materiału w ciekłym azocie. Ciekły azot mechanicznie uszkadza ściany komórkowe, co ułatwia dostęp do łańcuchów DNA zawartych w jądrze komórkowym i organellach, przy równoczesnej stabilizacji tych cząsteczek w niskiej temperaturze (–196°C).

Jakość pozyskanych cząsteczek DNA w wyniku ekstrakcji jest następnie badana spektrofotometrycznie, np. za pomocą aparatu NanoDrop® ND-1000 (Wilmington, USA). Dla każdej z prób określany jest stopień zanieczyszczenia białkami (stosunek absorbancji A_{260}/A_{280}) oraz innymi składnikami komórkowymi (A_{260}/A_{230}). Jeśli stosunek A_{260}/A_{280} jest bliski wartości 1,80, to oznacza, że dana próba zawiera DNA wolne od zanieczyszczeń białkowych. Stosunek A_{260}/A_{230} od 1,8 do 2,0 pozwala uznać, że próby nie zawierają innych komponentów komórkowych.

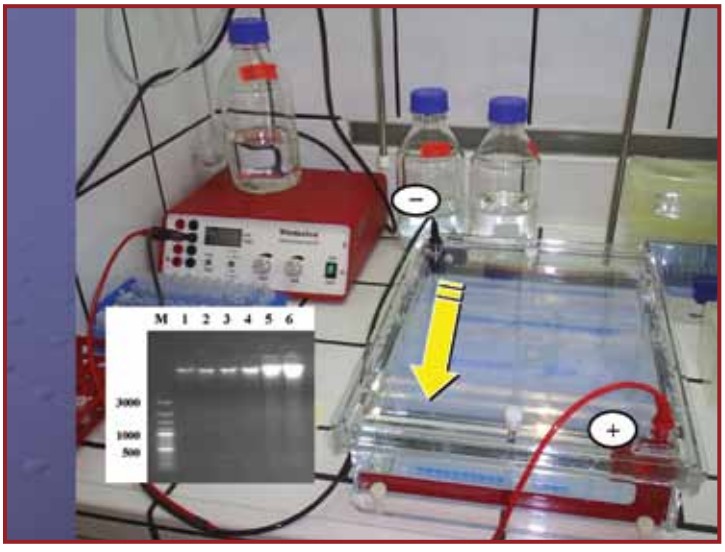
Pomiar spektrofotometryczny nie gwarantuje jednak, że wyekstrahowane DNA jest integralne, czyli że jego długie łańcuchy nie zostały rozerwane w trakcie naturalnej degradacji przez czynniki pozakomórkowe lub przez mechaniczną homogenizację w trakcie ekstrakcji. Zalecana jest zatem dodatkowa ocena wizualna otrzymanego DNA za pomocą migracji elektroforetycznej, np. w 1-procentowym żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny (0,5 μg/ml) lub barwnikiem Nancy-520 (Sigma), w buforze EDTA – TBE (45 mM Tris-kwas borowy, pH 8,3; 1 mM EDTA), przy napięciu 70 V. Szybkość ruchu cząsteczek DNA w polu elektrycznym zależy od ich wielkości: im są większe, tym wolniej migrują od bieguna ujemnego do dodatniego.

Wyekstrahowane cząsteczki DNA mogą być przechowywane przez wiele miesięcy (a nawet lat) w buforze stabilizującym Tris-EDTA (pH 7,0) w temperaturze –75°C.

W celu optymalizacji metody izolacji kwasów nukleinowych z tkanek drewna z materiału dowodowego pobierane są próbki o masie 100 mg, za pomocą wiertła o średnicy 4 mm (ryc. 9). Po rozdrobnieniu materiału roślinnego w ciekłym azocie (temperatura –196°C) przeprowadzana jest ekstrakcja cząsteczek DNA, np. za pomocą zestawów DNeasy Plant Mini Kit 250 (Qiagen), do której wprowadzono modyfikacje, aby zoptymalizować wydajność ekstrakcji z tkanek zdrewniałych.

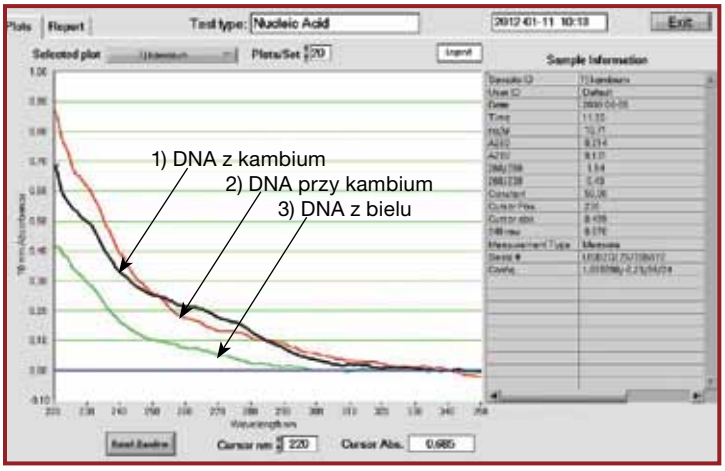


Ryc. 9. Pobieranie próbki za pomocą wiertła i przekrój pniaka z oznaczeniem miejsc, w których zaleca się pobieranie tkanek drewna do izolacji DNA w laboratorium: 1 – kambium; 2 – biel, ok. 1 cm od kambium; 3 – biel ok. 2 cm od kambium (fot. i rys. J. A. Nowakowska)



Ryc. 10. Migracja elektroforetyczna cząsteczek DNA w żelu agarozowym. M – marker wielkości fragmentów DNA 1kB Ladder Plus (Fermentas). 1–6 – fragmenty DNA z poszczególnych prób (fot. J. A. Nowakowska)

Integralne DNA, nadające się do dalszych analiz biochemicznych w laboratorium, jest widoczne po migracji elektroforetycznej w postaci jasnych i wyraźnych prążków w żelu agarozy (ryc. 10). Inne zestawy do komercyjnej izolacji cząsteczek DNA z tkanek roślinnych – NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel), MasterPure Plant Leaf DNA Purification Kit (Epicentre, an Illumina company) lub UltraClean Plant DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) – mają podobną wydajność i mogą być stosowane w pozyskiwaniu DNA z tkanek zdrewniałych.

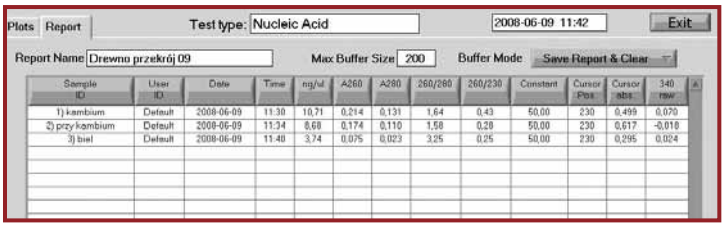


Ryc. 11. Oszacowanie stężenia zawartości kwasów nukleinowych w trzech próbach pobranych z pniaka (według opisu na ryc. 9); pomiar absorpcji wiązki światła przy długości fali 260 nm w spektrofotometrze NanoDrop ND-1000 (źródło: archiwum IBL)

Badając poszczególne rodzaje tkanek drewna (ryc. 9), najwięcej DNA otrzymano z tkanek kambium (10,71 ng/µl), mniej – z bielu położonego tuż przy kambium (8,68 ng/µl), a najmniej – z bielu położonego głębiej w pniu (3,74 ng/µl). Badane tkanki pniaka cechowało średnie stężenie DNA 7,71 ng/µl w 100 mg (ryc. 11), wystarczające do przeprowadzenia analiz.

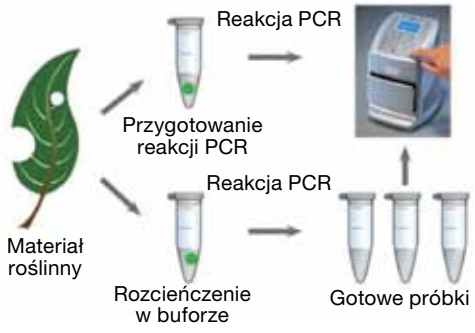
Najczystsze DNA uzyskuje się na ogół z tkanki kambium. Czystość, określana na podstawie stosunku absorbancji A_{260}/A_{280} jest bliska 1,80, co oznacza, że dana próba jest pozbawiona zanieczyszczeń białkowych. Próbki drewna są zwykle zanieczyszczone wieloma związkami fenolowymi, dlatego w przypadku analizy DNA z tkanek pobranych z kambium A_{260}/A_{280} wynosi 1,64, a z tkanek pobranych z bielu A_{260}/A_{280} = 1,58 i A_{260}/A_{280} = 3,25 (ryc. 12).

Materiał badawczy przysłany do analiz biochemicznych w laboratorium jest poddawany opisanej ocenie jakości i ilości cząsteczek DNA przed podjęciem dalszych (właściwych) analiz, mających na celu identyfikację każdej próbki na podstawie powielania wybranych fragmentów DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).



Ryc. 12. Wyniki spektrofotometrycznej oceny zawartości (w ng/µl) i czystości (260/280 i 260/230) DNA w badanych tkankach drewna, na podstawie pomiaru w spektrofotometrze NanoDrop ND-1000 (źródło: archiwum IBL)

Ramka 2. Bezpośrednia reakcja PCR z tkanek roślinnych

Przygotowanie reakcji	Produkty PCR rozdzielone po migracji elektroforetycznej
	

Źródło: Thermo Fisher Scientific Inc. 2011 (www.finnzymes.com)

Źródło: archiwum IBL

M – marker wielkości FastRuler™ DNA Ladder (Fermentas)
1 – buk zwyczajny (liść), marker DNA jądrowego
2 – brzoza brodawkowata (drewno), marker DNA jądrowego
3 – sosna zwyczajna (igły), marker DNA chloroplastowego
4 – sosna zwyczajna (drewno), marker DNA chloroplastowego
5 – sosna zwyczajna (igły), marker DNA jądrowego
6 – sosna zwyczajna (drewno), marker DNA jądrowego

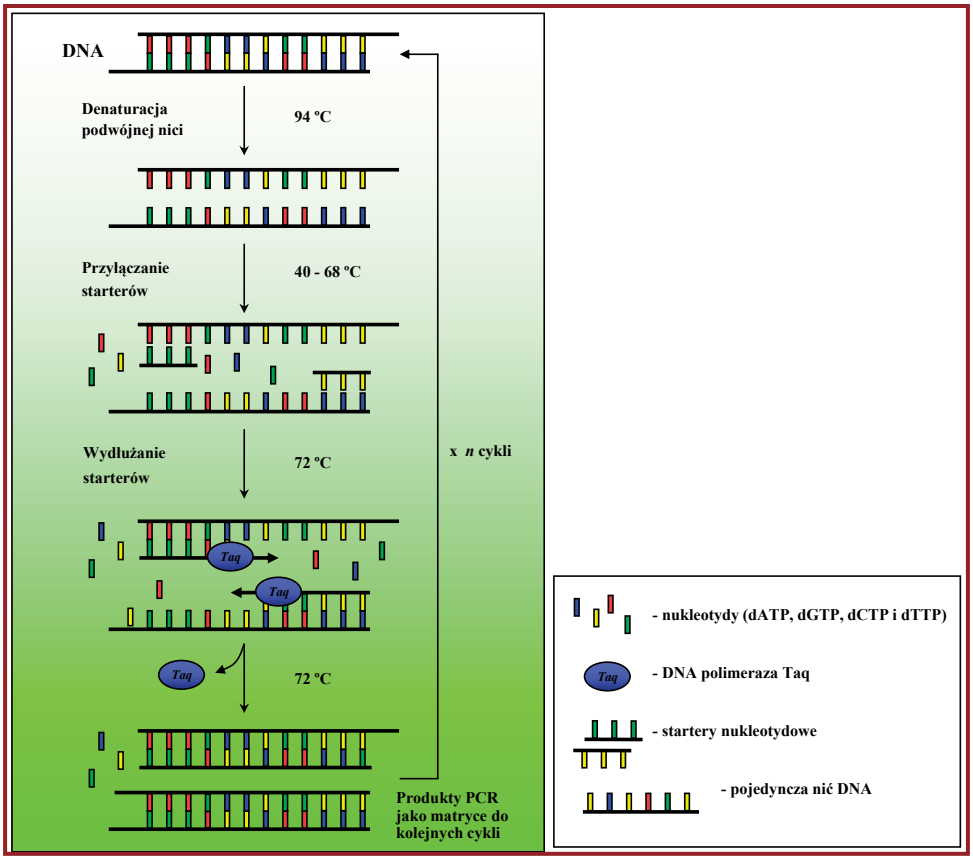
Ostatnio interesującą metodą analiz DNA z materiału roślinnego jest bezpośrednia reakcja PCR z pominięciem etapu żmudnej ekstrakcji za pomocą dodatkowych procedur. Ta metoda, stosowana za pomocą zestawu Phire® Plant Direct PCR Kit (FINNZYMES), polega na bezpośrednim namnażaniu wybranych fragmentów DNA po umieszczeniu zdrewniałej tkanki w buforze rozcieńczającym i dodaniu

odczynników zawierających komponenty niezbędne do reakcji PCR (ramka 2). Mieszaninę umieszcza się w termocyklerze zaprogramowanym na 40 cykli, dobierając temperaturę, w której następuje przyłączanie starterów Tm, wyliczoną dla każdej pary starterów. Zaletą tej metody jest szybkie (w ciągu ok. 1 godziny) uzyskanie wyraźnych prążków produktów PCR charakterystycznych dla danego gatunku oraz ograniczenie powstawania niespecyficznych produktów PCR dzięki zastosowaniu termowrażliwej polimerazy typu *hot start*, która optymalizuje warunki reakcji wykonywanej na trudnym materiale roślinnym (ramka 2).

3.1.3. Analiza markerów DNA w reakcji PCR

Prawie wszystkie techniki analizy struktury genetycznej organizmów żywych polegają na powielaniu fragmentów kwasów nukleinowych z wyekstrahowanych łańcuchów DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. PCR) przy użyciu termostabilnego

Ramka 3. Schemat reakcji PCR, w której namnażane są wybrane fragmenty łańcucha DNA



Źródło: J. A. Nowakowska

enzymu (Taq polimerazy) uzyskiwanego z ciepłolubnej bakterii *Thermus aquaticus*. Reakcja PCR polega na umieszczeniu wyizolowanego DNA-matrycy w następującej mieszaninie reakcyjnej: startery oligonukleotydowe (o długości od 10 do 24 par zasad), cztery rodzaje wolnych nukleotydów (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), jony magnezu ($MgCl_2$), bufor reakcyjny (wyrównujący pH) oraz Taq polimeraza. Reakcja namnażania DNA przebiega w termocyklerze zaprogramowanym na wiele cykli amplifikacji DNA (zwykle od 30 do 40). Pierwszy etap amplifikacji trwa ok. 1 min i prowadzi do denaturacji dwuniciowej matrycy DNA w temp. 94°C (ramka 3). Potem następuje etap przyłączania starterów do rozdzielonych nici DNA (temp. 32––42°C; od 30 s do kilku minut) i amplifikacja komplementarnych do matrycy nici DNA (72°C, 2 min). Temperatura i czas trwania poszczególnych etapów zależą od wielu czynników, przede wszystkim od składu nukleotydów G/C i A/T w starterze oraz wielkości powielanych fragmentów DNA. Wydajność i precyzja reakcji PCR jest bardzo wysoka; teoretycznie pozwala ona na powielenie wyjściowej cząsteczki DNA-matrycy obecnej w ekstrakcie nawet do 10^9 kopii (Sambrook i Russell 2001).

Następnie otrzymane w reakcji PCR fragmenty DNA są rozdzielane w procesie migracji elektroforetycznej w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Podczas elektroforezy naładowane ujemnie cząsteczki DNA migrują w żelu umieszczonym w buforze pod napięciem w stronę dodatniej elektrody z prędkością proporcjonalną do ich wielkości i masy cząsteczkowej. W ten sposób w ciągu paru godzin następuje rozdział puli namnożonych fragmentów DNA na poszczególne odcinki.

Jakość powielonych fragmentów DNA jest oceniana np. za pomocą programu BIO-PROFIL Bio-Gene Windows Application V99.05, a wielkość otrzymanych fragmentów DNA – za pomocą elektroforezy chipowej (Bioanalyser®, Agilent).

3.1.3.1. Analizy markerów DNA jądrowego (SSR)

Genomy drzew leśnych należą do największych wśród wszystkich organizmów żywych, dlatego w analizach porównawczych między osobnikami bada się jedynie wybrane fragmenty cząsteczek DNA. Wybiera się te fragmenty, zwane markerami, które najpełniej charakteryzują różnice między osobnikami tego samego gatunku (w populacji ludzkiej markerami są np. geny *brca*, *ela2* i *gstp*, których mutacje warunkują podatność na raka).

U drzew leśnych takie cechy jakościowe, jak np. gęstość włókien i miąższość, są warunkowane ekspresją wielu genów, co utrudnia przeprowadzenie identyfikacji osobniczej na podstawie pojedynczych genów kodujących białka odpowiedzialne za te cechy drewna. W identyfikacji poszczególnych drzew badacze koncentrują się zatem na nielicznych fragmentach zlokalizowanych w różnych, najczęściej niekodujących miejscach łańcucha DNA, charakteryzujących się wysokim polimorfizmem (zmiennością strukturalną), co znacznie obniża koszty genotypowania

danego drzewa. Badając niekodujące sekwencje genomu (np. DNA mikrosatelitarne), przyjmuje się, że skład i frekwencja poszczególnych alleli nie zależą od czynników klimatycznych i siedliskowych oraz że nie są powiązane z żadną cechą morfologiczną drzew.

Sekwencje mikrosatelitarne, zlokalizowane w jądrze komórkowym oraz mitochondriach i chloroplastach, składają się z długich tandemowych powtórzeń, od jednego (np. A) do sześciu nukleotydów (ATACGT). U sosny zwyczajnej stanowią one aż 75% całego genomu, u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* L.) – 10%, u człowieka – ok. 3%. Duży polimorfizm jądrowych markerów SSR przejawia się występowaniem średnio od 8 do 40 alleli w *locus*.

U sosny DNA mikrosatelitarne jest zbudowane głównie z wielokrotnych powtórzeń motywów dwóch lub trzech par zasad, np. (AT)*n*, (ATC)*n*, gdzie *n* może przybierać wartość od kilkudziesięciu do kilkuset. Sekwencje te są zlokalizowane w niekodujących regionach genomu, o dotychczas nieznanej funkcji w komórce (Robledo-Arnuncio i in. 2004).

Dużą zaletą markerów mikrosatelitarnych jest ich przydatność do identyfikacji organizmów wynikająca z:

- bardzo wysokiego stopnia wykrywania zmian strukturalnych na poziomie pojedynczych nukleotydów;
- ich dziedziczenia kodominującego, czyli przekazywania potomstwu alleli od obojga rodziców.

3.1.3.2. Analizy markerów DNA organellowego

Mateczne dziedziczenie markerów organellowych umożliwia szybkie porównanie identyczności dłużycy i pniaka, lecz mała zmienność tych markerów (na ogół od dwóch do sześciu wariantów alleli w *locus*) wymaga stosowania większej ich ilości do analiz porównawczych. Ponadto markery DNA organellowego umożliwiają identyfikację rzadkich haplotypów oraz porównanie filogenetycznych powiązań między populacjami drzew leśnych, wynikających z różnych dróg migracji polodowcowej gatunków w Europie.

DNA organellowe jest zwykle dobrze zachowane i występuje w wielu kopiach w zdrewniałych tkankach drzew leśnych, co może być przydatne do identyfikacji pojedynczych osobników.

Badania genetycznego pokrewieństwa drzew iglastych koncentrują się głównie na zmienności mitochondrialnych genów NADH dehydrogenazy (*nad*) i oksydazy cytochromowej (*cox*), w tym sekwencji *nad*1 egzon B, *nad*4 egzon 1 i 2, *rp*S14 (Demesure i in. 1995), *nad*4 / 2–3, 3–4 i 4–5, *nad*5 / 1–2 i 4–5, *nad*7 / 1–2, 2–3 i 3–4, *cox*2 / 1–2 (Dumolin-Lapègue i in. 1997). Badania gatunków drzew liściastych polegają w większości na analizie polimorficznych *loci* DNA chloroplastowego,

np. *trnC*, *trnD*, *trnT* intronu tRNA^{Leu1}, które wykazują dużą zmienność w obrębie haplotypów (Demesure i in. 1995, Dumolin-Lapègue i in. 1997).

Do celów porównawczych materiału sądowego odczytuje się informacje uzyskane dzięki markerom DNA jądrowego i organellowego w automatycznym sekwenatorze, np. CEQ™8000 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) lub ABI 3500 (Life Technologies, UK). Dużym atutem takich analiz jest szybka i precyzyjna detekcja fragmentów poszczególnych markerów DNA dzięki możliwości łączenia po trzy lub więcej *loci* w reakcji typu multipleks.

3.1.4. Statystyczna analiza danych

Polimorfizm badanych *loci* DNA najczęściej określany jest na podstawie średniej wartości *PIC* (*Polymorphism Information Content*) za pomocą programu MolKin wersja 2.0 (Gutiérez i in. 2005).

Na podstawie frekwencji alleli występujących we wszystkich *loci* określa się pozostałe parametry zmienności genetycznej: obserwowaną (n_a) i oczekiwaną (n_e) średnią liczbę alleli w *locus*, indeks zmienności genetycznej (*I*) Shannona (Lewontin 1972), oczekiwaną (H_E) i obserwowaną (H_O) średnią heterozygotyczność, średnią zmienność wewnątrzpopulacyjną (H_S) i całkowitą zmienność w populacjach (H_T), procent alleli null. Umożliwiają to programy obliczeniowe PopGen wersja 1.32 (Yehi Boyle 1997), GenePop v.4.0.10 (Raymond i Rousset 1995), Fstat v.2.9.1 (http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html) i PHYLIP v.3.6b (http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html), na podstawie założeń opisanych w publikacjach Nei (1978, 1987) oraz Nei i Kumar (2000).

3.1.5. Identyfikacja próbek materiału na podstawie profili DNA

Identyfikacja osobnicza stanowi część medycyny sądowej, gdyż pozwala na wnioskowanie o pochodzeniu dowodów rzeczowych zabezpieczonych na miejscu przestępstwa. Od końca XIX w. identyfikacja osobnicza dostarczała dowodów w kryminalistyce głównie dzięki daktyloskopii, jak donosił w swoim opracowaniu z 1892 r. sir Francis Galton. Potem rozwinięto inne techniki doskonalące poziom identyfikacji osobniczej i gatunkowej: grafologię, analizę grup krwi, traseologię[7], biometrię[8]

[7] Patrz rozdział 2.5.

[8] Biometryczne metody badają takie cechy fizyczne, jak tęczówka oka, siatkówka (dno oka), linie papilarne, układ naczyń krwionośnych na dłoni lub przegubie ręki, kształt dłoni, ucha, twarz, rozkład temperatury na twarzy, oraz cechy behawioralne, tzn. związane z zachowaniem (np. sposób chodzenia, podpis odręczny lub na klawiaturze komputera, głos, a nawet sposób reakcji mózgu na pewne bodźce).

oraz chromatografię gazową[9]. W kryminalistyce przydatne okazały się również dendrochronologia i paleontologia, bazujące na odczycie przyrostów rocznych i danych archiwalnych materiału organicznego w skamieniałościach. Od kilkudziesięciu lat odczyt profili DNA uzupełnił te techniki o nowe, precyzyjne możliwości identyfikacji osobników.

Niepowtarzalny profil markerów DNA tworzy wzorzec identyfikujący materiał roślinny, na ogół złożony z alleli występujących w poszczególnych *loci* zarówno DNA jądrowego, jak i organellowego. Eksperci szacują, że tylko 5–10% wszystkich spraw karnych prowadzonych w Stanach Zjednoczonych opierało się na biologicznych dowodach, które były poddane testom DNA. W pozostałych 90–95% przestępstw wymiar sprawiedliwości opierał się głównie na innych rodzajach materiału dowodowego (Garrett i Neufeld 2009). Wiele spraw kryminalistycznych można byłoby wzbogacić o badania genetyczne, podnosząc w ten sposób wiarygodność i niezawodność dostarczanych dowodów.

W rękach biegłego wyniki analizy DNA są potężnym narzędziem, którym należy jednak posługiwać się bardzo rozważnie. Każda nadinterpretacja wyniku może mieć poważne skutki prawne i przyczynić się do skazania niewinnego człowieka lub uniewinnienia rzeczywistego sprawcy. Bardzo ważne w sądowych analizach próbek DNA jest zatem obliczanie prawdopodobieństwa przypadkowej identyczności prób zabezpieczonych w postępowaniu dowodowym. Ponadto należy brać pod uwagę możliwość istnienia pewnego pokrewieństwa między badanymi osobnikami (np. potomstwo tych samych rodziców), jednak u drzew leśnych, które w większości należą do gatunków wiatropylnych, potomstwo (nasiona i powstałe z nich drzewa) ma bardzo zróżnicowane genotypy (matka wspólna, wielu ojców). Jedynie podobieństwo alleli DNA organellowego (chloroplastowego i mitochondrialnego) dziedziczone tylko w linii matecznej lub tylko w ojcowskiej mogą wykazać pokrewieństwo osobników.

Ponadto podobieństwo genetyczne drzew (mających tę samą liczbę par alleli jednakowych) może być duże nie tylko na skutek spokrewnienia rodziców. Taki sam skutek może mieć długotrwała selekcja, ukierunkowana na zwiększenie adaptacji do danych warunków klimatycznych i siedliskowych, prowadząca do genetycznego wyrównania populacji.

Z tych powodów ważnym elementem analiz laboratoryjnych jest badanie fragmentów DNA, które precyzyjnie określą podobieństwo genetyczne, minimalizując efekt przypadkowego podobieństwa, pokrewieństwa czy selekcji. Takimi fragmentami są np. wysoce polimorficzne *loci* DNA mikrosatelitarnego (zwane markerami zmienności), często wykorzystywane w medycynie sądowej. Im wyższa jest siła dyskryminacji danej grupy markerów dla badanych gatunków drzew (np. sosny,

[9] Metoda szybkiej analizy złożonych mieszanin związków chemicznych, w kryminalistyce stosowana np. do analizy substancji lotnych wyczuwanych przez psy śledcze.

świerka, dębu, buka, olszy i brzozy), tym niższe prawdopodobieństwo przypadkowej identyczności. Prawdopodobieństwo identyczności (P_{ID}) wylicza się dla każdego wzorca identyfikującego pojedyncze drzewa według uproszczonego wzoru Hedricka (2000):

$$P_{G_{hj/k_j}} = \prod_{i \in \Omega_h}^{\text{samples in } \Omega_h} P_{g_{ij/k_j}}$$

gdzie $P_{g_{ij/k_j}}$ oznacza frekwencje poszczególnych alleli *ij* w *k loci*.

Średnia wartość P_{ID} określona np. dla 100 drzew każdego z badanych gatunków drewna pozwala określić siłę dyskryminacji danego markera DNA, czyli jego moc w rozróżnieniu DNA poszczególnych próbek. Jeśli dla testowanych markerów DNA otrzymano np. P_{ID} = 0,002, to oznacza, że prawdopodobieństwo wystąpienia identycznego genotypu wśród 100 badanych drzew jest bardzo małe (0,2%); wówczas profile genetyczne odczytane dla materiału dowodowego (np. dłużycy) i porównawczego (pniaka w lesie) są identyczne w 99,8%. Waits i in. (2001) sugerują stosowanie takich markerów (dominujących bądź kodominujących), dla których wartość P_{ID} jest niewielka, np. 0,01–0,0001(czyli od 1% do 0,01%); to gwarantuje ich przydatność w identyfikacji osobniczej.

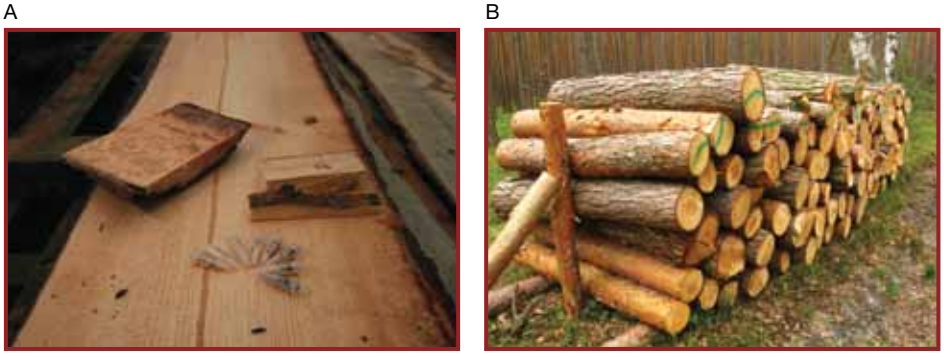
Oceniając celowość badań DNA, warto pamiętać, że według badań przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych najczęściej wykorzystywany w sądach materiał dowodowy – zeznania naocznych świadków – jest wiarygodny jedynie w 50%, podczas gdy prawidłowo wykonany test DNA daje pewność identyfikacji zbliżoną nawet do 99,999% (Garrett i Neufeld 2009).

3.2. Identyfikacja próbek drewna sosny zwyczajnej

Do laboratorium analiz DNA w IBL w Sękocinie Starym przesłano 16 próbek drewna sosny z wałków i desek (materiał dowodowy) i 10 próbek materiału porównawczego – kawałków drewna pobranych z pni w lesie, zabezpieczonych na terenie Nadleśnictwa C. (ryc. 13 i 14). Przed wykonaniem analiz DNA, w tym przed ekstrakcją łańcuchów DNA, przesłane tkanki drewna przechowywano w temperaturze –75°C. Otrzymane cząsteczki DNA charakteryzowały się dobrą jakością i ilością (ryc. 15 i 16), przy czym średnia zawartość DNA genomowego dla wszystkich prób wynosiła 26,89 ng/µl ± 19,0 S.E.

Analizę profili genetycznych wszystkich 26 próbek drewna sosnowego przeprowadzono na podstawie czterech markerów DNA jądrowego i ośmiu markerów

DNA organellowego. Badanie DNA mikrosatelitarnego przysłanych próbek drewna sosny zwyczajnej przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Soranzo i in. (1998) przy użyciu dwóch markerów – SPAG 7.14 i SPAC 12.5 – a także według procedury Chagné i in. (2004) oraz Elsik i in. (2000) dla dwóch markerów – SsrPt-ctg4363 i PtTX3025. Wybór markerów był podyktowany wynikami wcześniejszych badań nad zmiennością genetyczną w 56 populacjach sosny zwyczajnej (ok. 2500 przeanalizowanych drzew) z różnych regionów Polski (Nowakowska 2010). Cząsteczki DNA mikrosatelitarnego sosny są zbudowane z wielokrotnych powtórzeń dwóch lub trzech par zasad, zlokalizowanych w niekodujących regionach genomu, o nieznanej dotąd funkcji w komórce (Robledo-Arnuncio i in. 2004). Reakcje łańcuchowej polimerazy (PCR) przygotowano, stosując metodę multipleks, w której łączono w mieszaninie reakcyjnej po dwa markery: SPAG 7.14 i SPAC 12.5 oraz SsrPt-ctg4363 i PtTX3025.



Ryc. 13. Materiał dowodowy – próbki pobrane w lesie. A – próbki pobrane z desek, B – wałki na mygle (fot. M. Klisz i J. A. Nowakowska)

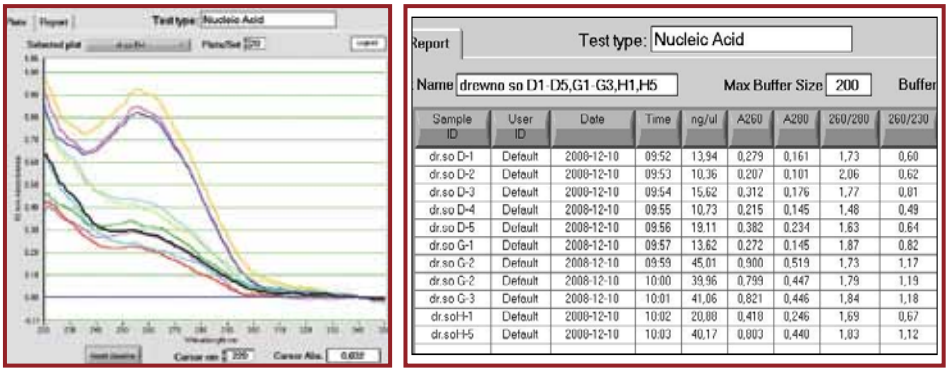


Ryc. 14. Materiał porównawczy. Pniak nr 1 na zrębie w lesie (fot. M. Klisz)



Ryc. 15. Elektroforegram DNA izolowanego z pniaków sosny z Nadleśnictwa C. M – marker wielkości fragmentów DNA 1kB Ladder Plus (Fermentas). 1–19 – próby izolowanego DNA z poszczególnych pniaków (z powtórzeniami), (źródło: archiwum IBL)

A B



Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
dr.so D-1	Default	2008-12-10	09:52	13,94	0,279	0,161	1,73	0,60
dr.so D-2	Default	2008-12-10	09:53	10,36	0,207	0,101	2,06	0,62
dr.so D-3	Default	2008-12-10	09:54	15,62	0,312	0,176	1,77	0,81
dr.so D-4	Default	2008-12-10	09:55	10,73	0,215	0,145	1,48	0,49
dr.so D-5	Default	2008-12-10	09:56	19,11	0,382	0,234	1,63	0,64
dr.so G-1	Default	2008-12-10	09:57	13,62	0,272	0,145	1,87	0,82
dr.so G-2	Default	2008-12-10	09:59	45,01	0,900	0,519	1,73	1,17
dr.so G-2	Default	2008-12-10	10:00	39,96	0,799	0,447	1,79	1,19
dr.so G-3	Default	2008-12-10	10:01	41,06	0,821	0,446	1,84	1,18
dr.sol-H1	Default	2008-12-10	10:02	20,88	0,418	0,246	1,69	0,67
dr.sol-H5	Default	2008-12-10	10:03	40,17	0,803	0,440	1,83	1,12

Ryc. 16. Ocena jakości i ilości otrzymanego DNA. A – wyniki pomiaru absorpcji 10 mm przy długości fali 260 nm, B – stężenie kwasów nukleinowych w 10 próbkach pobranych z pniaków (źródło: archiwum IBL)

Wyniki pozwoliły stwierdzić, że genotypowane drzewa wykazywały obecność zarówno heterozygot, jak i homozygot dla danego *locus* DNA jądrowego. Dla wszystkich czterech markerów DNA mikrosatelitarnego otrzymano wysokie wartości parametrów genetycznych, a mianowicie: średnią obserwowaną liczbę alleli w *locus* n_a = 21,500; średnią oczekiwaną liczbę alleli w *locus* n_e = 11,553; indeks zmienności Shannona I = 2,324; heterozygotyczność obserwowaną H_O = 0,796 i oczekiwaną H_E = 0,811 (Nowakowska 2010). Średnia heterozygotyczność dla markerów SPAG 7.14, SPAC 12.5, PtTX3025 i SsrPt-ctg4363 była wysoka i wynosiła H_T = 0,807, co świadczy o dużym stopniu polimorfizmu DNA w badanych próbach.

Wszystkie cztery markery mikrosatelitarnego DNA jądrowego (SPAG 7.14, SPAC 12.5, PtTX3025 i SsrPt-ctg4363) charakteryzował wysoki polimorfizm: PIC (odpowiednio) 95,13%, 94,63%, 56,56% i 67,39%. Średni PIC dla zastosowanych markerów DNA mikrosatelitarnego był wysoki (78,42%). Ponadto badane markery SSR charakteryzowała niska wartość P_{ID} (0,0129), obliczona na podstawie wzoru Hedricka (2000) dla 100 losowo wybranych pniaków w lesie, a zatem siła dyskryminacji użytych do identyfikacji markerów SSR była wysoka i wynosiła 98,7%.

Analizy DNA organellowego w zdrewniałych tkankach sosny zwyczajnej przeprowadzono, badając jeden mitochondrialny marker STS oraz 13 markerów chloroplastowego DNA. Metodę STS, która polega na namnażaniu B/C pierwszej podjednostki mitochondrialnego genu NADH dehydrogenazy *nad*1, przeprowadzono metodą opisaną w publikacji Soranzo i in. (2000). Analizy DNA chloroplastowego w zdrewniałych tkankach sosny zwyczajnej przeprowadzono, wykorzystując następujące *loci* chloroplastowego DNA mikrosatelitarnego (cpSSR): PCP26106, PCP30277, PCP4113, PCP87314, PCP45071, PCP71987, PCP41131, PCP63771, Pt15169, Pt36480, PCP87314, Pt30204 i Pt71936 (Provan i in. 1998, Vendramin i in. 1996).

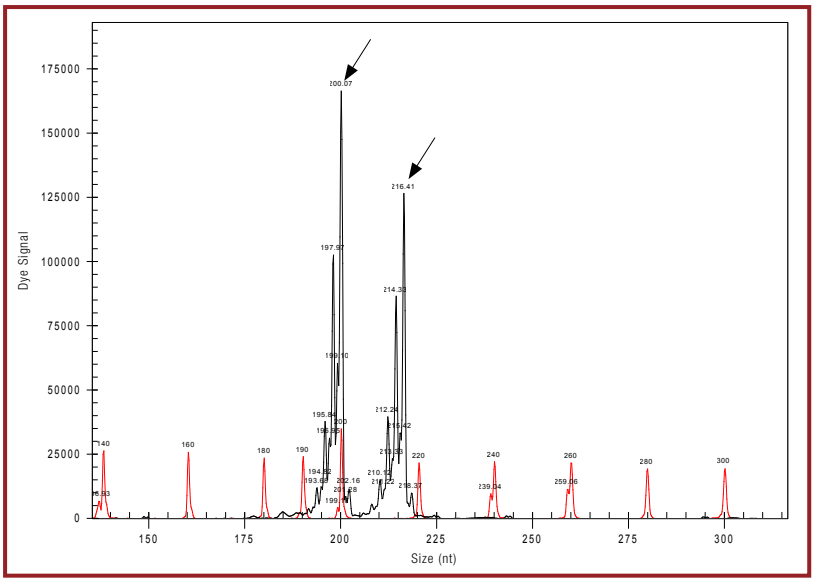
Analiza mitochondrialnego *locus* genu *nad*1 w 100 próbach drewna sosny wykazała obecność tylko dwóch wariantów haplotypów: „a" i „b". Markery STS genu *nad*1 u sosny miały bardzo niskie parametry zmienności genetycznej genu *nad*1: A = 196; n_a = 2,000; n_e = 1,041; I = 0,098 i h = 0,039; to wskazuje na bardzo małe zróżnicowanie haplotypów genu *nad*1 (Nowakowska 2010). Haplotyp „a" występował z 99-procentową frekwencją, a haplotyp „b" miał tylko 1% udziału w badanych próbkach drewna sosnowego. Wartość PIC dla tego markera zmienności mtDNA w badanych próbkach była więc bardzo niska (3,77%), a wartość P_{ID} = 0,097 dla 100 losowo wybranych drzew w lesie wskazywała, że badane próbki drewna różniły się od siebie tylko w 9,7%. Siła dyskryminacji użytych markerów STS do identyfikacji tych próbek drewna wynosiła zatem 90,3%.

Większe wartości parametrów genetycznych otrzymano dla chloroplastowych *loci* SSR. Spośród nich wybrano osiem, które generowały najbardziej zmienne profile DNA badanych próbek drewna: PCP45071, PCP4113, PCP30277, PCP71987, PCP26106, Pt30204, PCP87314 i Pt71936.

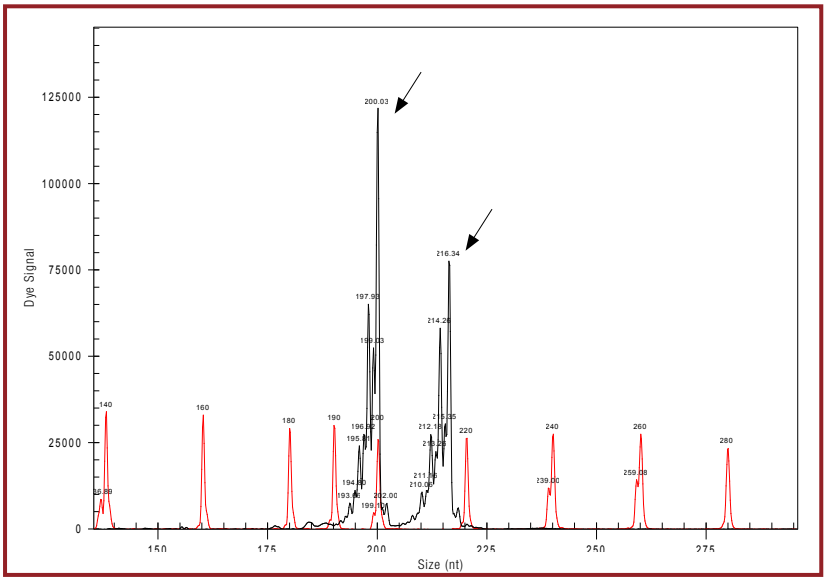
Średnia heterozygotyczność chloroplastowych *loci* była wysoka i wynosiła H_T = 0,593; to świadczy o dużym stopniu polimorfizmu DNA w badanych próbach. Średni polimorfizm wszystkich ośmiu markerów mikrosatelitarnego DNA chloroplastowego wynosił 51,42%. Obliczona na ich podstawie wartość P_{ID} = 0,0431 świadczy o tym, że siła dyskryminacji użytych do identyfikacji markerów cpSSR wynosiła 95,69%. W tym przypadku analizowane pniaki były wyłącznie homozygotyczne dla markerów DNA chloroplastowego.

Wnioski i opinia końcowa

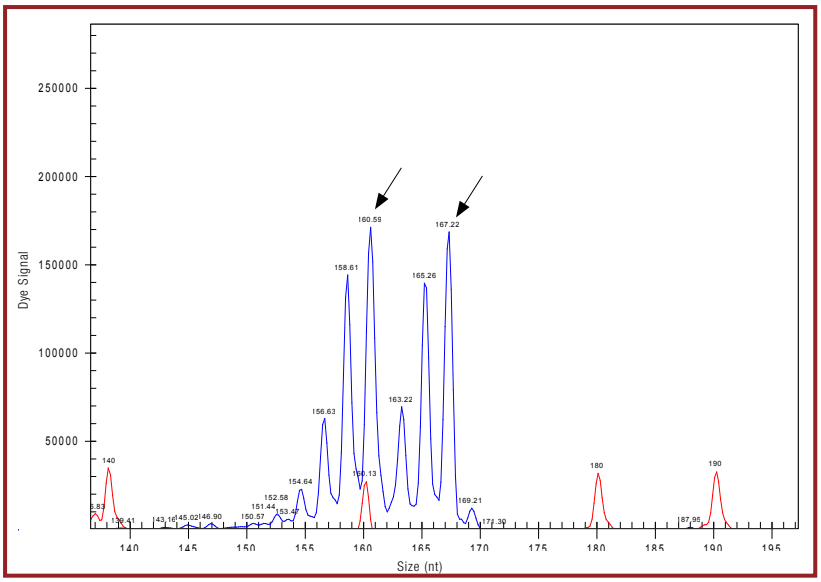
Analiza profili genetycznych 16 prób drewna sosny z wałków i desek (materiał dowodowy), przeprowadzona na podstawie czterech markerów DNA jądrowego (ryc. 17–22) i ośmiu markerów cpSSR (ryc. 23 i 24) umożliwiła porównanie materiału dowodowego z próbkami drewna z 10 pniaków sosny (materiał porównawczy) zabezpieczonych w terenie. Mitochondrialny marker *nad*1 miał tylko jeden wariant haplotypu „a" we wszystkich próbach (ryc. 25), nie był więc brany pod uwagę w porównaniu profili genetycznych próbek drewna.



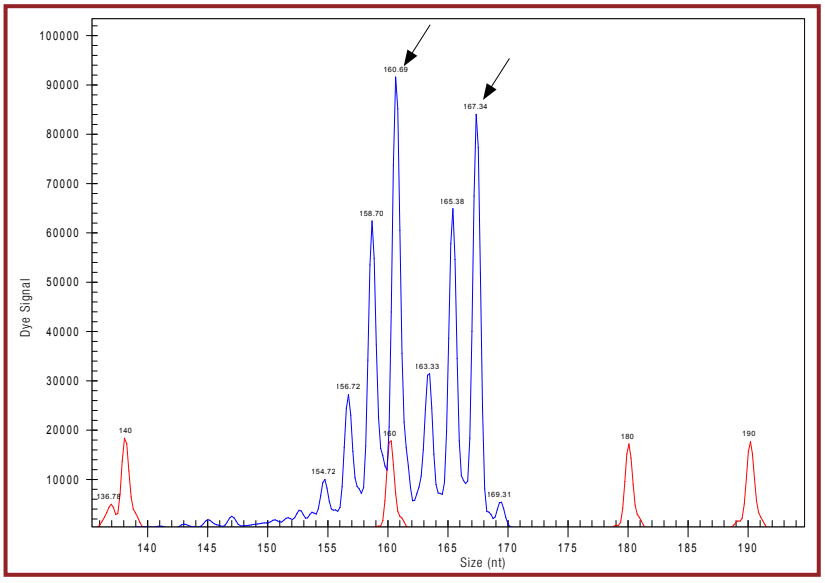
Ryc. 17. Profil genetyczny materiału dowodowego (sosna, próbka nr 11) w mikrosatelitarnym *locus* SPAG 7.14: allele 200 i 216 pz oznaczono strzałkami (źródło: archiwum IBL)



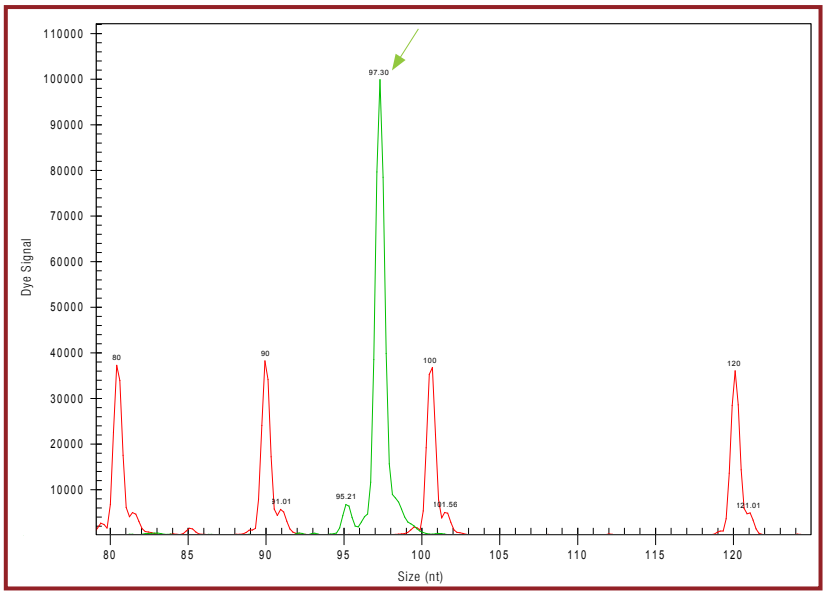
Ryc. 18. Profil genetyczny materiału porównawczego (sosna, próbka nr 8) w mikrosatelitarnym *locus* SPAG 7.14: allele 200 i 216 pz oznaczono strzałkami (źródło: archiwum IBL)



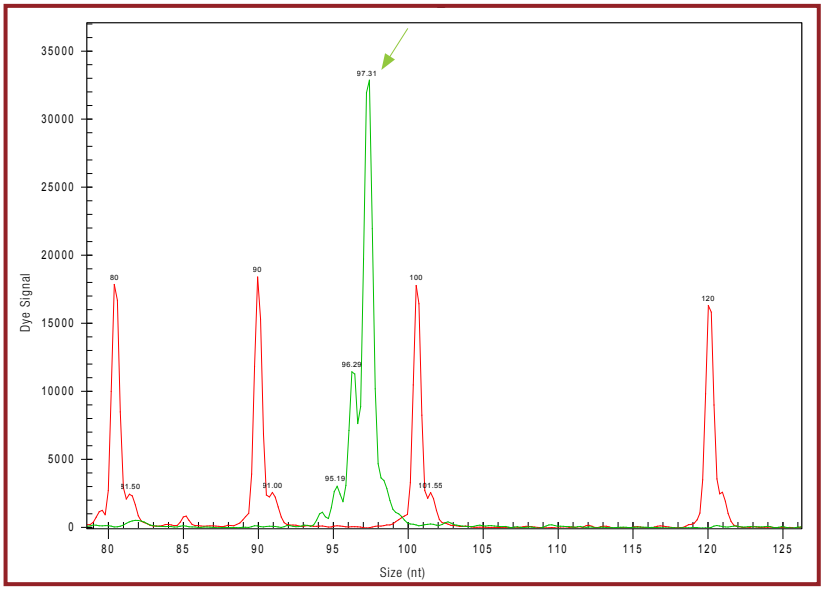
Ryc. 19. Profil genetyczny materiału dowodowego (sosna, próbka nr 11) w mikrosatelitarnym *locus* SPAC 12.5 (kolor niebieski): allele 161 i 167 pz oznaczono strzałkami (źródło: archiwum IBL)



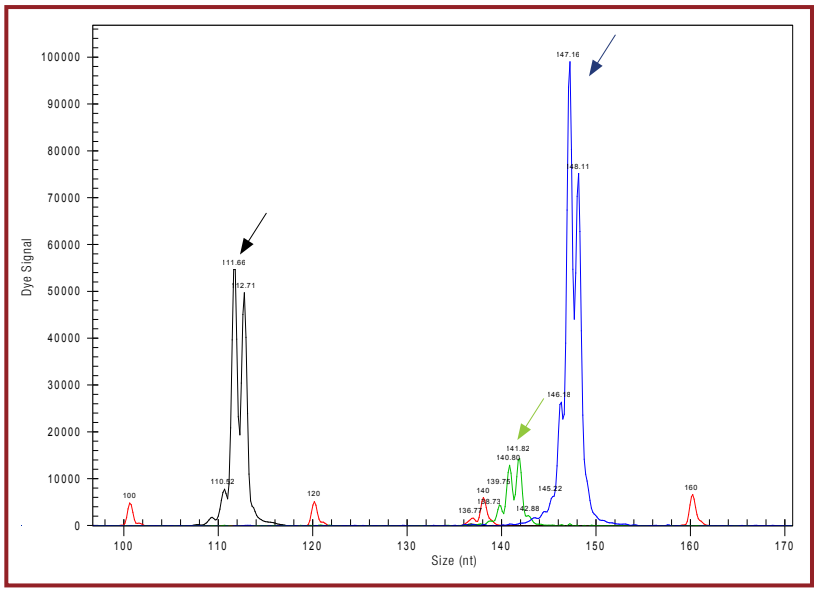
Ryc. 20. Profil genetyczny materiału porównawczego (sosna, próbka nr 8) w mikrosatelitarnym *locus* SPAC 12.5 (kolor niebieski): allele 161 i 167 pz oznaczono strzałkami (źródło: archiwum IBL)



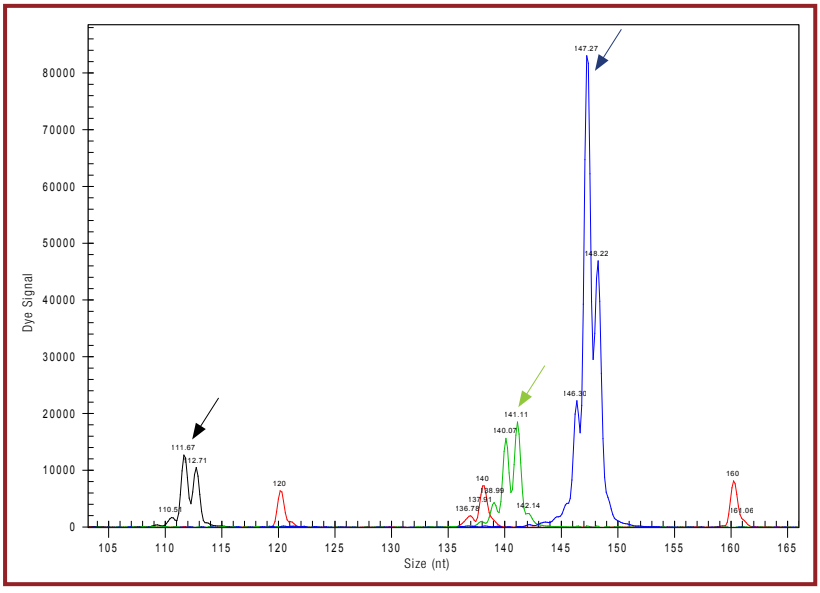
Ryc. 21. Profil genetyczny materiału dowodowego (sosna, próbka nr 18) w mikrosatelitarnym *locus* SsrPt-ctg4363: allel 97 pz – kolor zielony (źródło: archiwum IBL)



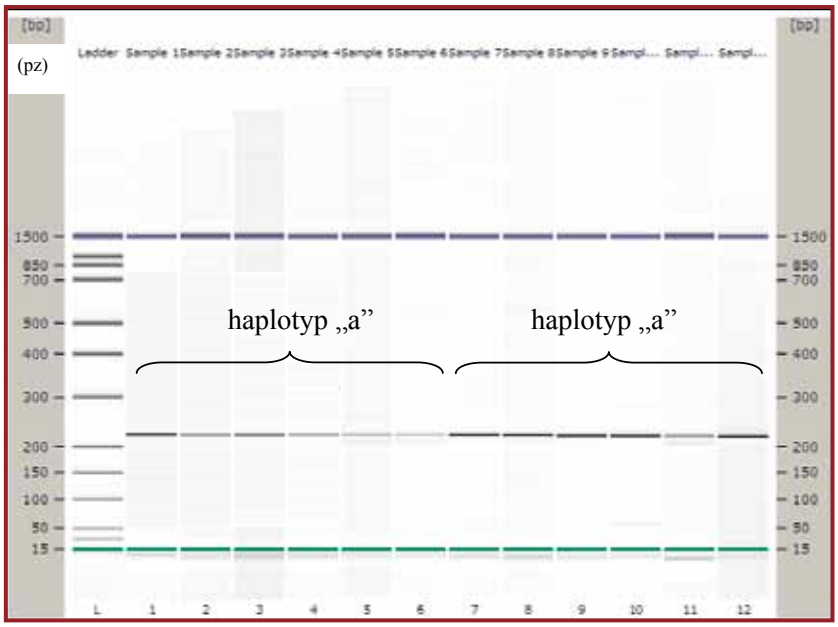
Ryc. 22. Profil genetyczny materiału porównawczego (sosna, próbka nr 4) w mikrosatelitarnym *locus* SsrPt-ctg4363: allel 97 pz – kolor zielony (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 23. Profil genetyczny materiału dowodowego (sosna, próbka nr 19) w chloroplastowych *loci* cpSSR. *Locus* PCP87314: allel 112 pz (kolor czarny); *locus* Pt30204: allel 142 pz (kolor zielony); *locus* Pt71936: allel 147 pz (kolor niebieski), (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 24. Profil genetyczny materiału porównawczego (sosna, próbka nr 4) w chloroplastowych *loci* cpSSR. *Locus* PCP87314: allel 112 pz (kolor czarny); *locus* Pt30204: allel 142 pz (kolor zielony); *locus* Pt71936: allel 147 pz (kolor niebieski), (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 25. Analiza wielkości fragmentów mtDNA za pomocą elektroforezy chipowej dla badanych 12 prób drewna sosny – materiału dowodowego i porównawczego. Linie 1–6 – fragmenty DNA z haplotypem „a” (220 pz) w próbkach materiału dowodowego, linie 7–12 – w próbkach materiału porównawczego. Ladder: standard wielkości Agilent (Bioanalyser®). Standardy wielkości: 15 par zasad (kolor zielony) i 1500 pz (kolor fioletowy), (źródło: archiwum IBL)

Wśród otrzymanych profili DNA materiału dowodowego dwie próbki miały ten sam profil – deski nr 18 i 19. Pozostałe profile różniły się od siebie. Każdy profil DNA materiału porównawczego (numery od 1 do 10) różnił się od pozostałych (tab. 2).

Na podstawie otrzymanych wzorów alleli dla 12 rodzajów markerów, w tym czterech markerów jądrowych (SPAG 7.14, SPAC 12.5, PtTX3025 i SsrPt-ctg4363) oraz ośmiu chloroplastowych markerów SSR (PCP45071, PCP4113, PCP30277, PCP71987, PCP26106, Pt30204, PCP87314 i Pt71936), stwierdzono, że:

- próbka drewna nr 11 z wałka (materiał dowodowy) miała taki sam profil genetyczny (200, 216, 161, 167, 276, 276, 97, 111, 113, 155, 111, 135, 149, 112, 141, 147) jak próbka drewna nr 8 z pniaka stanowiącego materiał porównawczy (ryc. 11–14);
- dwie próbki drewna – nr 18 i 19 z desek z tartaku (materiał dowodowy) – miały taki sam profil genetyczny (200, 216, 129, 149, 276, 291, 97, 97, 214, 155, 110, 135, 149, 112, 142, 147) jak próbka drewna nr 4 z pniaka będącego materiałem porównawczym (ryc. 15–18).

DNA druk.indd 71

Tabela 2. Zestawienie profili genetycznych materiału dowodowego i porównawczego badanych próbek drewna sosny zwyczajnej

Lp.	Typ materiału	Marker SPAG 7.14		Marker SPAC 12.5		Marker PtTX3025		Marker SsrPt--ctg4363		Marker *nad*1	Marker PCP 45071	Marker PCP 4113	Marker PCP 30277	Marker PCP 71987	Marker PCP 26106	Marker PCP 87314	Marker Pt 30204	Marker Pt 71936
1	porównawczy	206	216	167	167	276	312	97	99	a	113	155	109	136	148	112	141	147
2	porównawczy	194	216	123	177	276	276	101	105	a	113	155	111	137	148	112	142	147
3	porównawczy	206	212	114	187	276	276	97	99	a	113	155	110	138	149	112	142	148
4	porównawczy	200	216	129	149	276	291	97	97	a	214	155	110	135	149	112	142	147
5	porównawczy	206	226	161	187	276	291	b.d.	b.d.	a	113	155	109	136	148	112	142	146
6	porównawczy	214	224	153	159	276	291	103	103	a	113	156	111	136	149	112	143	147
7	porównawczy	192	222	147	157	276	276	97	103	a	b.d.	155	111	136	148	112	143	148
8	porównawczy	200	216	161	167	276	276	97	111	a	113	155	111	135	149	112	141	147
9	porównawczy	226	232	153	171	276	291	103	103	a	113	155	110	135	147	112	143	147
10	porównawczy	226	240	155	165	276	291	103	103	a	112	155	110	135	147	b.d.	b.d.	b.d.
11	dowodowy	200	216	161	167	276	276	97	111	a	113	155	111	135	149	112	141	147
12	dowodowy	180	210	157	159	276	276	92	92	a	113	155	109	136	148	112	b.d.	148
13	dowodowy	206	208	151	157	288	288	97	103	b.d.	113	154	110	136	148	112	141	148
14	dowodowy	228	228	157	173	276	288	99	103	a	114	156	110	138	149	113	142	147

2014-05-26 09:22:11

cd. tabeli 2

Lp.	Typ materiału	Marker SPAG 7.14		Marker SPAC 12.5		Marker PtTX3025		Marker SsrPt--ctg4363		Marker *nad*1	Marker PCP 45071	Marker PCP 4113	Marker PCP 30277	Marker PCP 71987	Marker PCP 26106	Marker PCP 87314	Marker Pt 30204	Marker Pt 71936
15	dowodowy	186	180	153	161	276	288	95	97	a	113	156	110	136	b.d.	112	143	147
16	dowodowy	212	224	135	153	276	291	97	113	a	113	155	109	136	148	112	141	147
17	dowodowy	226	228	161	169	276	276	97	105	a	113	155	109	136	148	112	142	147
18	dowodowy	200	216	129	149	276	291	97	97	a	214	155	110	135	149	112	142	147
19	dowodowy	200	216	129	149	276	291	97	97	a	214	155	110	135	149	112	142	147
20	dowodowy	192	196	137	137	276	291	97	103	a	113	156	110	136	148	112	141	148
21	dowodowy	206	208	153	161	291	291	99	99	a	112	156	111	138	149	113	b.d.	148
22	dowodowy	228	228	147	159	276	288	92	103	a	214	156	110	140	149	112	141	146
23	dowodowy	212	212	123	169	276	276	97	103	a	113	156	110	136	148	112	b.d.	147
24	dowodowy	202	230	145	153	276	288	92	103	b.d.	113	156	110	136	148	112	142	149
25	dowodowy	210	228	149	163	276	312	97	103	a	112	155	112	139	149	113	142	147
26	dowodowy	212	218	147	159	276	312	103	109	a	114	155	111	140	150	112	141	148

b.d. – brak danych
Kolorami wyróżniono identyczne profile genetyczne

DNA druk.indd 72 2014-05-26 09:22:11

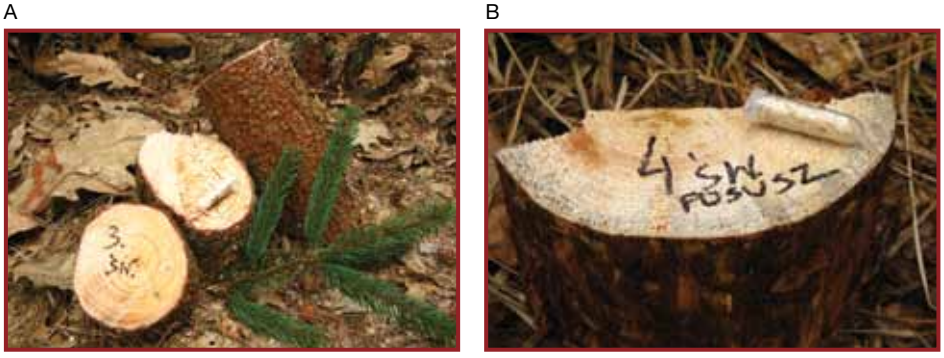
Pozostałe badane próbki drewna materiału dowodowego (o numerach od 12 do 17 oraz od 20 do 26) nie wykazały podobieństwa do którejkolwiek z próbek drewna materiału porównawczego (tab. 2). Wartość prawdopodobieństwa identyczności P_{ID} obliczona dla wszystkich testowanych markerów w 100 próbkach drewna sosny wyniosła 0,051, a siła dyskryminacji użytych do identyfikacji markerów – 0,949 (94,90%). Na podstawie analizy prawdopodobieństwa identyczności P_{ID}, obliczonej metodą Hedricka (2000) dla wszystkich badanych markerów, oprócz genu *nad*1, otrzymano mniejszą wartość: P_{ID} = 0,0280, zatem siła dyskryminacji użytych czterech markerów SSR i ośmiu markerów cpSSR w identyfikacji wzrosła do 0,972.

Tak więc opinia końcowa opracowana na podstawie wykonanych analiz porównawczych próbek drewna sosnowego brzmi:

- próbka drewna oznaczona nr 11 (materiał dowodowy) przed rozdzieleniem z próbką drewna nr 8 (materiałem porównawczym) stanowiła jedną całość z prawdopodobieństwem 97,2%;
- próbki drewna nr 18 i nr 19 (materiał dowodowy) przed rozdzieleniem z próbką drewna nr 4 (materiałem porównawczym) stanowiły jedną całość z prawdopodobieństwem 97,2%.

3.3. Identyfikacja próbek drewna świerka pospolitego

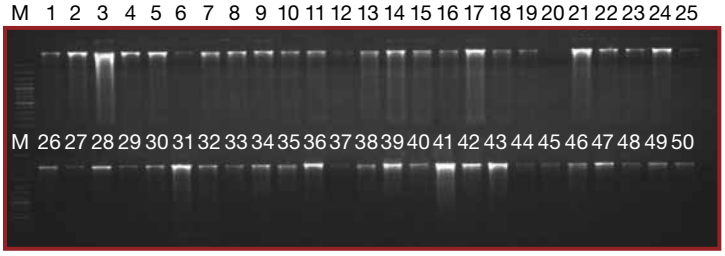
W celu identyfikacji genetycznej próbek drewna świerkowego przeanalizowano pobrany w terenie materiał dowodowy złożony z próbek pochodzących z 16 wyrzynków składowanych w lesie w Nadleśnictwie G. (ryc. 26) i materiał porównawczy pozyskany z ośmiu pniaków w lesie (ryc. 27). Wyizolowane cząsteczki DNA charakteryzowały dobra jakość (ryc. 28–30) i średnia zawartość DNA genomowego dla wszystkich prób 15,06 ng/µl ± 6,0 S.E.



Ryc. 26. Materiał dowodowy – próbki pobrane w terenie. A – próbka nr 3, pobrana z wierzchołka świerka, B – próbka nr 4 z wyrzynka składowanego w lesie (fot. M. Klisz)



Ryc. 27. Materiał porównawczy – pniak nr 9 na zrębie w lesie (fot. M. Klisz)

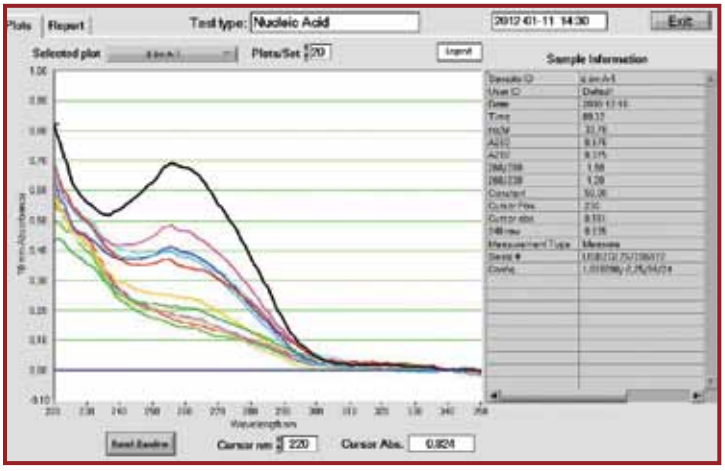


Ryc. 28. Elektroforegram DNA wyizolowanego z drewna świerkowego, z materiału dowodowego i porównawczego przesłanego z Nadleśnictwa G. M – marker wielkości fragmentów DNA 1kB Ladder Plus (Fermentas). 1–50 – cząsteczki izolowanego DNA z poszczególnych drzew (każdą próbkę nakładano na żel kilka razy), (źródło: archiwum IBL)

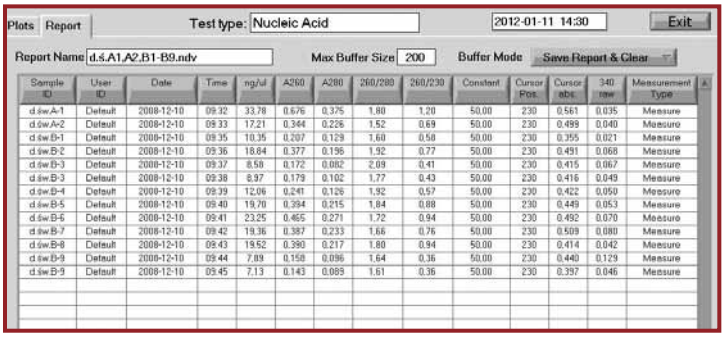
Profile genetyczne prób przysłanych do porównania DNA wykonano na podstawie analizy sekwencji mikrosatelitarnych (SSR) według zmodyfikowanej procedury Pfeiffera i in. (1997) oraz Yazdaniego i in. (2003), za pomocą czterech markerów mikrosatelitarnych: SpAG-C1, SpAC1-H8, SpA-G2 i SpAG-D1. Jako marker DNA mitochondrialnego przebadano drugi intron genu *nad*1 (Sperisen i in. 2001), którego duży polimorfizm potwierdzono w poprzednich badaniach w 70 polskich populacjach świerka (Nowakowska 2009, 2010). Podziału alleli na klasy haplotypów dokonano według kryteriów Sperisena i in. (2001), a dla allela o wielkości 355 pz utworzono nową nazwę „a1". Badanie markerów DNA jądrowego w próbkach wykazało obecność zarówno heterozygot, jak i homozygot.

Dla wszystkich czterech markerów jądrowych SSR otrzymano wysokie wartości parametrów genetycznych: średnią obserwowaną liczbę alleli w *locus* n_a = 28,750; średnią oczekiwaną liczbę alleli w *locus* n_e = 12,481; indeks zmienności Shannona I = 2,701; heterozygotyczność obserwowaną H_O = 0,789 i oczekiwaną H_E = 0,865. Średnia heterozygotyczność Nei dla wszystkich *loci* była wysoka i wynosiła H_T = 0,860

(Nowakowska 2010). Poszczególne cztery markery jądrowego DNA mikrosatelitarnego – SPAG-C1, SpAC1-H8, SpA-G2 i SpAG–D1 – charakteryzował wysoki polimorfizm, odpowiednio: 63,44%, 95,87%, 77,13% i 97,54%. Średni PIC dla wszystkich markerów DNA mikrosatelitarnego był bardzo wysoki (83,49%). Badane markery charakteryzowała niska wartość prawdopodobieństwa przypadkowego podobieństwa genetycznego, obliczona na podstawie wzoru Hedricka (2000) dla 100 losowo wybranych drzew świerka na gnieździe zrębowym (P_{ID} = 0,0037), siła dyskryminacji użytych do identyfikacji markerów SSR była zatem bardzo wysoka i wynosiła 99,63%.



Ryc. 29. Oszacowanie stężenia kwasów nukleinowych w próbach pobranych z 13 pniaków świerka; pomiar absorpcji 10 mm przy długości fali 260 nm (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 30. Zawartość wyizolowanego DNA i parametry czystości kwasów nukleinowych w próbkach z 13 pniaków świerka (źródło: archiwum IBL)

Amplifikacja drugiego intronu genu *nad*1 w próbkach poddanych analizie DNA wykazała obecność trzech różnych haplotypów: „a”, „a1”, i „c” (tab. 2), które charakteryzował znaczny polimorfizm (PIC = 0,25).

W badaniach przeprowadzonych dla 2500 drzew świerka z różnych regionów Polski populacje świerka z południowego zachodu (z regionów nr 702, 701, 503, 555, według Regionalizacji Nasiennej, Załęski i in. 2000) charakteryzowały wysokie parametry zmienności genetycznej: n_a = 7,000; n_e = 1,521; I = 0,674; h = 0,343. Drzewostany świerkowe ze wschodu Polski, położone w regionach nr 208, 207, 253 i 456, miały najwyższe współczynniki zmienności genetycznej: n_a = 3,000; n_e = 1,976; I = 0,705; h = 0,494. Najmniejszą zmienność genetyczną, określoną na podstawie markera *nad*1, wykazują populacje świerka z południa Polski, w regionach nr 801, 802 i 808, w których dominuje haplotyp „a", charakterystyczny dla hercyńsko-karpackiego zasięgu świerka w Europie (Sperisen i in. 2001). Te ostatnie populacje wykazywały niski stopień polimorfizmu genu *nad*1: n_a = 4,000; n_e = 1,011; I = 0,040; h = 0,011.

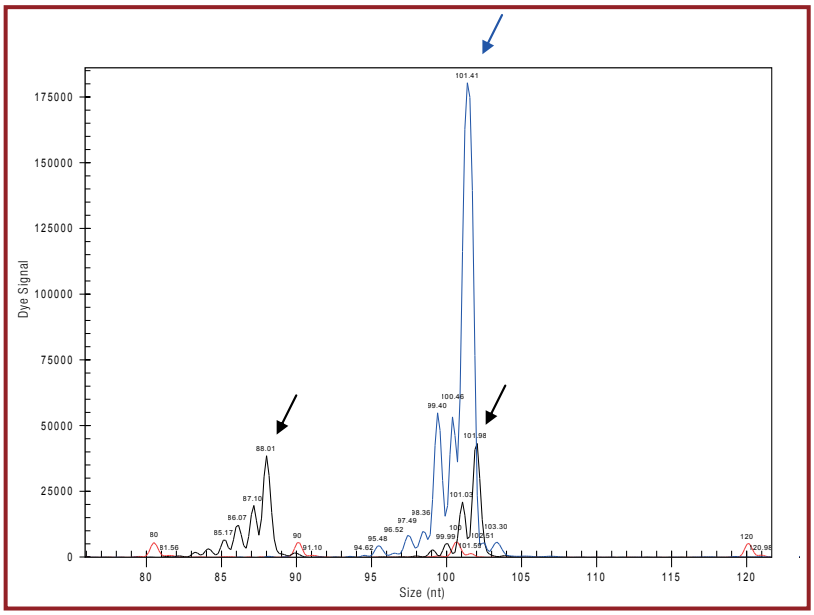
Na podstawie dotychczasowych badań (Nowakowska 2009, Lewandowski 2009) stwierdzono, że częstość występowania poszczególnych haplotypów mitochondrialnych genów u świerka zależy od regionu pochodzenia badanych prób. W populacjach z północnego wschodu odnotowano występowanie sześciu różnych haplotypów: „a", „b", „b1", „c", „d" i „d1", z których najczęściej występuje haplotyp „c" (frekwencja 96,9%), a najrzadziej – haplotyp „b1" (0,2%). Populacje ze wschodniej Polski charakteryzuje obecność trzech różnych haplotypów mitochondrialnego genu *nad*1: „a", „a1" i „c"; haplotypy „c" i „a" są dominujące (frekwencja 57,7% i 41,9%), zaś haplotyp „a1" – najrzadszy (0,4%; Nowakowska 2010).

Drzewostany świerkowe z południa Polski są najmniej zmienne genetycznie. Mimo obecności czterech wariantów haplotypów genu *nad*1 („a", „a1", „b" i „d1") we wszystkich badanych populacjach dominuje haplotyp „a" ze średnią frekwencją 99,4%, a pozostałe haplotypy („a1", „b" i „d1") występują bardzo rzadko – ze średnią frekwencją 0,2% (Nowakowska 2010).

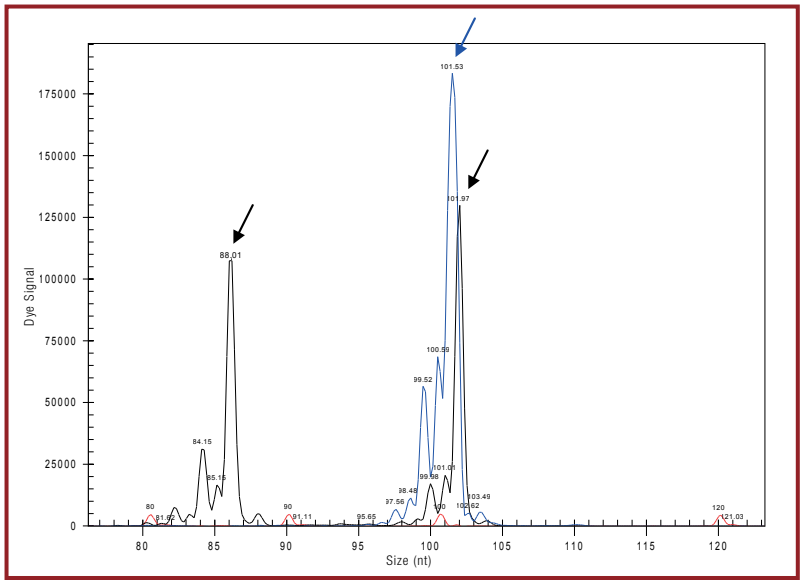
Uprawnione jest zatem stwierdzenie, że wartość parametru P_{ID} dla mitochondrialnego genu *nad*1 zależy od regionu, z którego pochodzą próbki drewna świerkowego. Dla 100 prób zebranych w Nadleśnictwie G. z północno-wschodniej Polski wartość P_{ID} = 0,039, a zatem siła dyskryminacji markerów SSR użytych do identyfikacji tych próbek drewna wynosiła 96,1%.

Wnioski i opinia końcowa

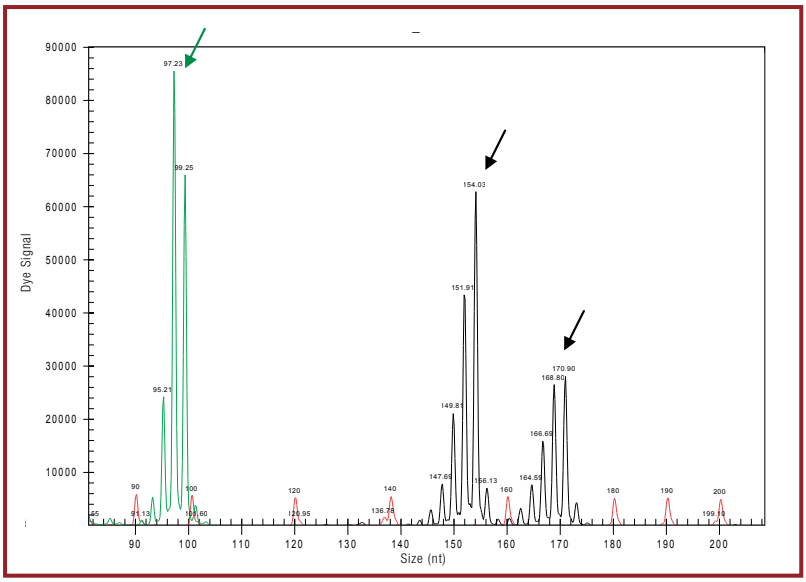
Badania wykazały przydatność markerów mikrosatelitarnego DNA jądrowego i mitochondrialnego markera STS do identyfikacji próbek drewna z materiału dowodowego i porównawczego. Analiza profili genetycznych 15 wyrzynków ze świerka (materiał dowodowy), przeprowadzona na podstawie czterech markerów DNA jądrowego (ryc. 31–34) i jednego markera mitochondrialnego (ryc. 35 i 36) umożliwiła porównanie materiału dowodowego z próbkami drewna z dziewięciu pniaków świerka (materiał porównawczy) zabezpieczonymi w terenie.



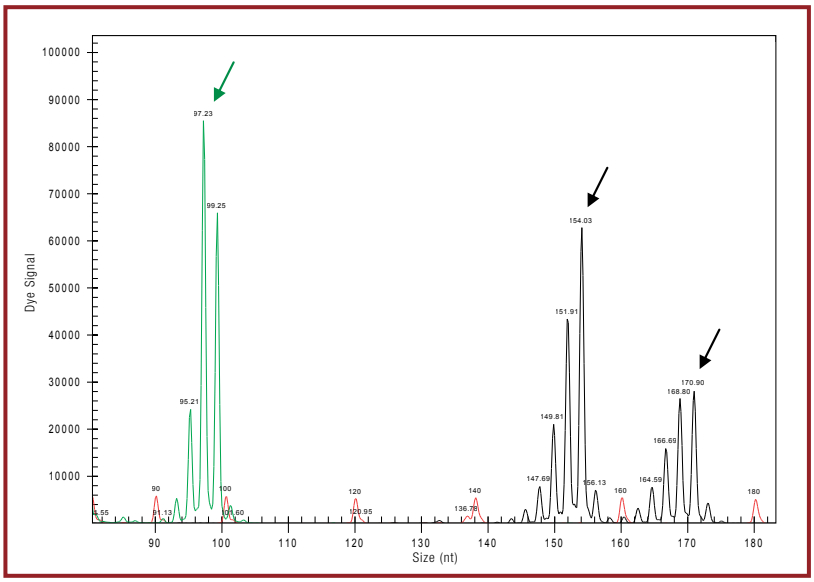
Ryc. 31. Profil genetyczny materiału dowodowego (świerk, próbka nr 9) w mikrosatelitarnych *loci* – SpAC1: allele 88 i 102 (kolor czarny); SpAC1-H8 – allel 101 pz (kolor niebieski), (źródło: archiwum IBL)



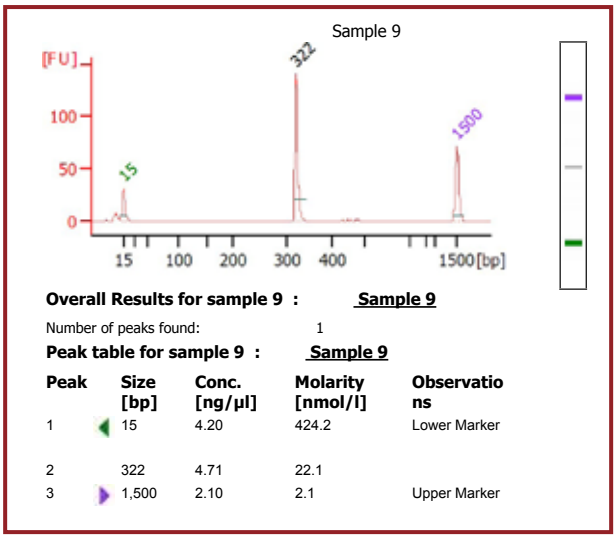
Ryc. 32. Profil genetyczny materiału porównawczego (świerk, próbka nr 2) w mikrosatelitarnych *loci*: SpAC1 – allele 88 i 102 (kolor czarny); SpAC1-H8 – allel 101 pz (kolor niebieski), (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 33. Profil genetyczny materiału dowodowego (świerk, próbka nr 9) w mikrosatelitarnych *loci*: SpA-G2 – allel 97 pz (kolor zielony); SpAG-D1 – allele 154 i 170 pz (kolor czarny), (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 34. Profil genetyczny materiału porównawczego (świerk, próbka nr 2) w mikrosatelitarnych *loci*: SpA-G2 – allel 97 pz (kolor zielony); SpAG-D1 – allele 154 i 170 pz (kolor czarny), (źródło: archiwum IBL)



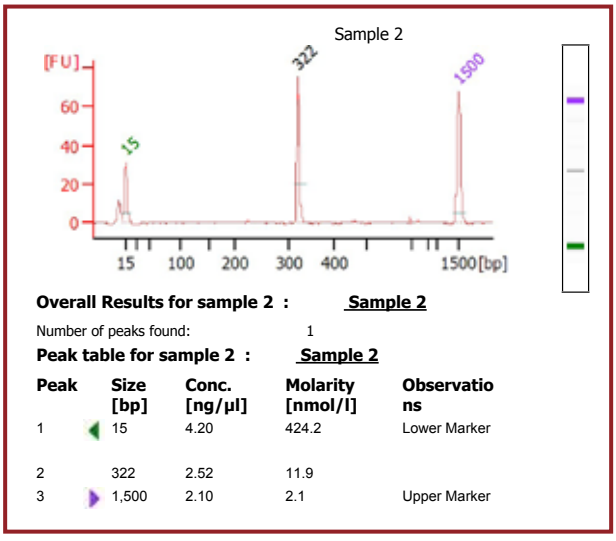
Overall Results for sample 9 : **Sample 9**

Number of peaks found: 1

Peak table for sample 9 : **Sample 9**

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/µl]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	322	4.71	22.1	
3	1,500	2.10	2.1	Upper Marker

Ryc. 35. Profil genetyczny materiału dowodowego (świerk, próbka nr 9) w mitochondrialnym *locus nad*1: haplotyp „a" o wielkości 322 pz (źródło: archiwum IBL)



Overall Results for sample 2 : **Sample 2**

Number of peaks found: 1

Peak table for sample 2 : **Sample 2**

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/µl]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	322	2.52	11.9	
3	1,500	2.10	2.1	Upper Marker

Ryc. 36. Profil genetyczny materiału porównawczego (świerk, próbka nr 2) w mitochondrialnym locus *nad*1: haplotyp „a" o wielkości 322 pz (źródło: archiwum IBL)

Wszystkie otrzymane profile DNA materiału dowodowego z próbek drewna o numerach 9–24 różniły się między sobą, podobnie jak profile DNA materiału porównawczego w próbkach od 1 do 8 (tab. 3).

Tabela 3. Zestawienie profili genetycznych materiału dowodowego i porównawczego badanych próbek drewna świerka pospolitego

Lp.	Typ materiału	Marker SpAG-C1		Marker SpAC1-H8		Marker SpA-G2		Marker SpAG-D1		Marker *nad*1
1	porównawczy	78	104	93	119	107	111	159	183	a
2	porównawczy	88	102	101	101	97	97	154	170	a
3	porównawczy	98	98	101	155	79	97	165	169	a
4	porównawczy	102	104	149	197	89	93	151	b.d.	a
5	porównawczy	88	102	101	123	95	95	127	147	c
6	porównawczy	102	102	115	125	91	99	141	179	a
7	porównawczy	76	98	101	119	95	105	157	159	c
8	porównawczy	92	102	105	121	87	87	147	147	a1
9	dowodowy	88	102	101	101	97	97	154	170	a
10	dowodowy	102	102	101	143	85	111	135	154	a1
11	dowodowy	80	102	98	101	95	105	183	185	a
12	dowodowy	98	102	103	137	95	107	151	205	a
13	dowodowy	102	102	98	125	97	97	171	173	b.d.
14	dowodowy	82	98	101	123	95	97	127	127	c
15	dowodowy	102	120	105	157	95	99	169	189	a1
16	dowodowy	102	104	94	101	95	101	145	145	c
17	dowodowy	102	102	105	195	107	111	159	183	c
18	dowodowy	88	102	b.d.	157	89	103	167	187	a
19	dowodowy	102	102	105	119	107	107	147	149	a
20	dowodowy	102	102	101	101	97	97	154	154	a
21	dowodowy	98	102	101	121	95	107	127	157	a1
22	dowodowy	88	102	107	121	87	99	154	170	a
23	dowodowy	98	98	101	121	95	101	169	189	a
24	dowodowy	102	102	98	101	95	107	169	189	a

b.d. – brak danych
Kolorem wyróżniono identyczny profil genetyczny

Na podstawie otrzymanych wzorów alleli dla pięciu rodzajów markerów, w tym czterech markerów jądrowych – SPAG-C1, SpAC1-H8, SpA-G2 i SpAG-D1 – oraz

mitochondrialnego markera genu *nad*1, stwierdzono, że próbka drewna nr 9 z wyrzynka (materiał dowodowy) miała taki sam profil genetyczny (88, 102, 101, 101, 97, 97, 154, 170, a) jak próbka drewna nr 2 z pniaka, stanowiąca materiał porównawczy (tab. 3; ryc. 31–36).

Pozostałe badane próbki drewna z materiału dowodowego nie wykazały podobieństwa do którejkolwiek próbki drewna z materiału porównawczego. Wartość prawdopodobieństwa identyczności P_{ID} (Hedrick 2000) dla wszystkich pięciu markerów w próbkach drewna świerkowego wyniosła 0,0021, zatem siła dyskryminacji użytych do identyfikacji pięciu markerów (SSR i STS) była wysoka i wynosiła 0,9979.

Wniosek: prawdopodobieństwo tego, że materiał dowodowy (próbka drewna nr 9) stanowił przed rozdzieleniem z materiałem porównawczym (próbka drewna nr 2) jedną całość, wynosiło 99,79%.

3.4. Identyfikacja próbek drewna dębu szypułkowego i dębu bezszypułkowego

Do Laboratorium Genetyki Molekularnej IBL w Sękocinie Starym przysłano z Nadleśnictwa O. 22 próbki drewna dębów szypułkowego i bezszypułkowego. Celem była analiza porównawcza na podstawie profili DNA. Materiał dowodowy stanowiły próbki pobrane z 16 różnych desek z tartaku (ryc. 37), a materiał porównawczy uzyskano z sześciu pniaków w lesie (ryc. 38). Numery 1 i 2 pochodziły z dębu bezszypułkowego, a 3, 4, 5 i 6 – z dębu szypułkowego. Przed wykonaniem analiz próbki przechowywano w temperaturze –75°C.



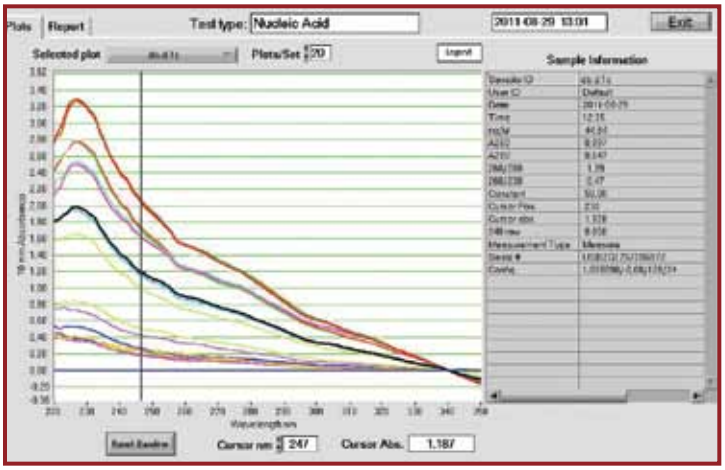
Ryc. 37. Materiał dowodowy – próbki pobrane w tartaku (fot. M. Klisz i J. A. Nowakowska)



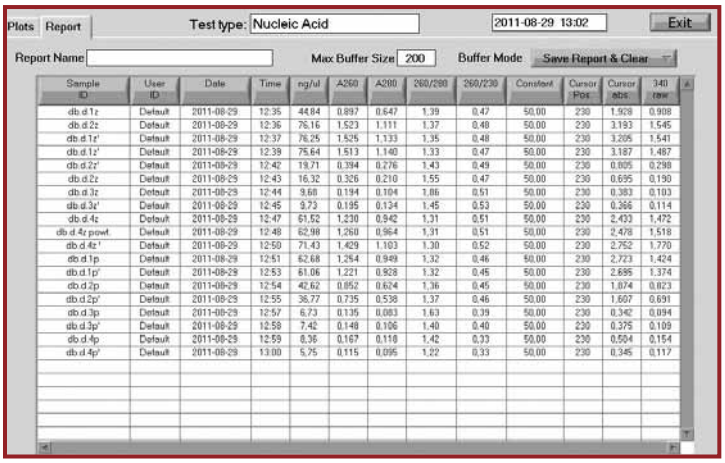
Ryc. 38. Materiał porównawczy – dębowy pniak (nr 2) w lesie (fot. M. Klisz)



Ryc. 39. Elektroforegram DNA izolowanego z próbek pobranych z 22 dębów, objętych analizą DNA na zlecenie Nadleśnictwa O. M – marker wielkości fragmentów DNA 1kB Ladder Plus (Fermentas). 1–25 – cząsteczki DNA wyizolowanego z poszczególnych drzew (z powtórzeniami), (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 40. Ocena jakości kwasów nukleinowych w próbach pobranych z pniaków dębu szypułkowego i bezszypułkowego. Pomiar absorpcji 10 mm przy długości fali 260 nm (źródło: archiwum IBL)



Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
db.d.1z	Default	2011-08-29	12:35	44,84	0,897	0,647	1,39	0,47	50,00	230	1,928	0,908
db.d.2z	Default	2011-08-29	12:36	76,16	1,523	1,111	1,37	0,48	50,00	230	3,193	1,545
db.d.1z'	Default	2011-08-29	12:37	76,25	1,525	1,133	1,35	0,48	50,00	230	3,205	1,541
db.d.1z'	Default	2011-08-29	12:39	75,64	1,513	1,140	1,33	0,47	50,00	230	3,187	1,487
db.d.2z'	Default	2011-08-29	12:42	19,71	0,394	0,276	1,43	0,49	50,00	230	0,805	0,298
db.d.2z	Default	2011-08-29	12:43	16,32	0,326	0,210	1,55	0,47	50,00	230	0,695	0,190
db.d.3z	Default	2011-08-29	12:44	9,68	0,194	0,104	1,86	0,51	50,00	230	0,383	0,103
db.d.3z'	Default	2011-08-29	12:45	9,73	0,195	0,134	1,45	0,53	50,00	230	0,366	0,114
db.d.4z	Default	2011-08-29	12:47	61,52	1,230	0,942	1,31	0,51	50,00	230	2,403	1,472
db.d.4z powt	Default	2011-08-29	12:48	62,98	1,260	0,964	1,31	0,51	50,00	230	2,478	1,518
db.d.4z'	Default	2011-08-29	12:50	71,43	1,429	1,103	1,30	0,52	50,00	230	2,752	1,770
db.d.1p	Default	2011-08-29	12:51	62,68	1,254	0,949	1,32	0,46	50,00	230	2,723	1,424
db.d.1p'	Default	2011-08-29	12:53	61,06	1,221	0,928	1,32	0,45	50,00	230	2,695	1,374
db.d.2p	Default	2011-08-29	12:54	42,62	0,852	0,624	1,36	0,45	50,00	230	1,874	0,823
db.d.2p'	Default	2011-08-29	12:55	36,77	0,735	0,538	1,37	0,46	50,00	230	1,607	0,691
db.d.3p	Default	2011-08-29	12:57	6,73	0,135	0,083	1,63	0,39	50,00	230	0,342	0,094
db.d.3p'	Default	2011-08-29	12:58	7,42	0,148	0,106	1,40	0,40	50,00	230	0,375	0,109
db.d.4p	Default	2011-08-29	12:59	8,36	0,167	0,116	1,42	0,33	50,00	230	0,504	0,154
db.d.4p'	Default	2011-08-29	13:00	5,75	0,115	0,095	1,22	0,33	50,00	230	0,345	0,117

Ryc. 41. Zawartość wyizolowanego DNA i określenie parametrów czystości kwasów nukleinowych w próbach drewna dębu szypułkowego i bezszypułkowego (źródło: archiwum IBL)

Jakość wyizolowanego DNA była dobra (ryc. 39–41); średnie stężenie DNA w 100 mg tkanki wynosiło 18,43 ng/µl ± 12,0 S.E. Profile genetyczne wszystkich 22 próbek drewna opracowano na podstawie analizy sekwencji mikrosatelitarnych (SSR) u dębów szypułkowego i bezszypułkowego według zmodyfikowanej procedury opisanej w publikacjach: Kampfer i in. (1998), Steinkellner i in. (1997) oraz Muir i Schlötterer (2005), stosując dziewięć markerów DNA mikrosatelitarnego: 36, 58, 102, ssrQrZAG7, ssrQrZAG9, ssrQrZAG108, ssrQrZAG110, MSQ4 i MSQ13.

Analizy zmienności genetycznej cpDNA przeprowadzono na podstawie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) dzięki zastosowaniu dwóch markerów DNA chloroplastowego: „DT" (trnD [tRNA-Asp(GUC)] – trnT [tRNA-Thr(GGU)]) i „CD" (trnC [tRNA-Cys(GCA)] – trnD [tRNA-Asp(GUC)]) metodą opisaną przez Demesure'a i in. (1995). Wybrane regiony DNA powielano za pomocą specyficznych starterów, po czym analizowano polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych metodą PCR-RFLP. Po oszacowaniu zawartości DNA genomowego w każdym pniaku, próbki poddawano amplifikacji w termocyklerze Biometra Gradient zgodnie z procedurą opisaną dla techniki PCR-RFLP w publikacjach Dumolin-Lapègue i in. (1997) oraz Nowakowska i in. (2007). Genotypowane drzewa wykazywały obecność zarówno heterozygot, jak i homozygot dla danego *locus* DNA jądrowego. Badane próbki drewna cechowały wysokie wartości parametrów genetycznych: średnia obserwowana liczba alleli w *locus* n_a = 15,600; średnia oczekiwana liczba alleli w *locus* n_e = 8,985; indeks zmienności Shannona I = 2,380; heterozygotyczność obserwowana H_O = 0,788 i oczekiwana H_E = 0,892. Średnia heterozygotyczność dla pięciu markerów SSR była

wysoka i wynosiła H_T = 0,887 (Nowakowska 2010). Wszystkie pięć markerów mikrosatelitarnego DNA jądrowego (MSQ4, MSQ13, ssrQrZAG7, ssrQrZAG9 i 102) charakteryzował wysoki polimorfizm, odpowiednio: 86,33%, 86,76%, 88,54%, 91,01% i 90,28%. Średni PIC zastosowanych markerów DNA mikrosatelitarnego był wysoki (70,87%).

Wszystkie badane markery SSR charakteryzowała niska wartość P_{ID} (0,0138) obliczona na podstawie wzoru Hedricka (2000) dla 100 losowo wybranych pniaków na zrębie, a zatem siła dyskryminacji użytych markerów SSR do identyfikacji była wysoka; wynosiła 0,9862 (98,62%). Badane próby charakteryzowało występowanie różnych genotypów jądrowych markerów SSR oraz sześciu wariantów haplotypów w *locus* DT („1", „4", „5", „7", „10" i „12") oraz dwóch haplotypów („1" i „3") w chloroplastowym *locus* CD (tab. 3). Petit i in. (2002a) stwierdzili, że populacje z dużym udziałem haplotypu „1" wywodzą się z Półwyspu Apenińskiego, natomiast haplotypy „4", „5" i „7" – z Półwyspu Bałkańskiego. Populacje, w których przeważają haplotypy „10" i „12" prawdopodobnie rozprzestrzeniły się w Europie z Półwyspu Iberyjskiego.

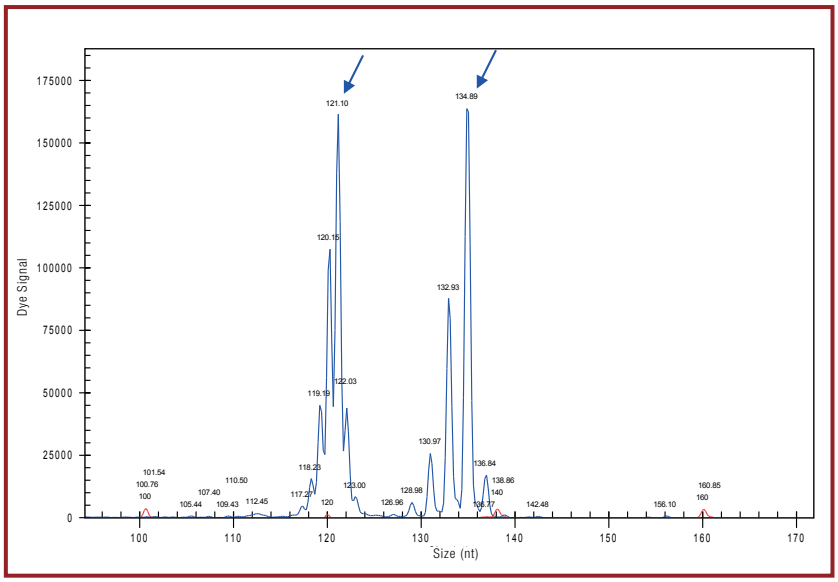
Wyniki analizy DNA drewna są zgodne z wynikami badań populacji dębowych z Polski (Csaikl i in. 2002, Nowakowska i in. 2005), gdzie drzewostany dębowe charakteryzuje również wysoka frekwencja haplotypów „7" (35%), „12" (20%) i „10" (14%). Badania (Głaz 2000) wykazały, że 3/4 populacji dębowych, głównie z południowej i zachodniej Polski, pochodzi z refugium polodowcowego na Półwyspie Bałkańskim.

Dla prób drewna dębowego wartość P_{ID} osiągnęła 0,0372, a zatem siła dyskryminacji chloroplastowych markerów PCR-RFLP użytych do identyfikacji próbek drewna dębowego wynosiła 0,9663 (96,63%).

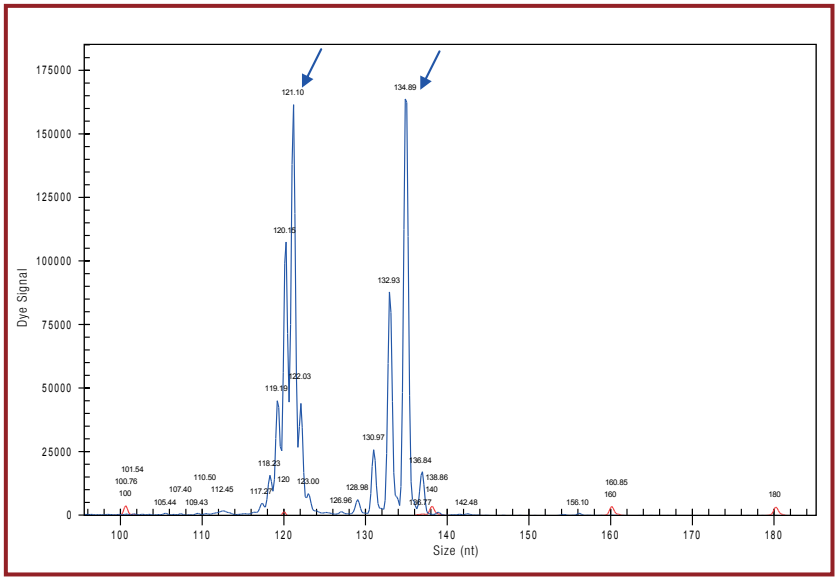
Wnioski i opinia końcowa

Analiza profili genetycznych 16 próbek pobranych z desek dębowych w tartaku (materiał dowodowy), przeprowadzona na podstawie pięciu markerów DNA jądrowego (ryc. 42–45) i dwóch markerów chloroplastowych „DT" i „CD" (ryc. 46–48), umożliwiła porównanie nadesłanego do analiz materiału dowodowego z próbkami drewna z sześciu pniaków dębów (materiał porównawczy).

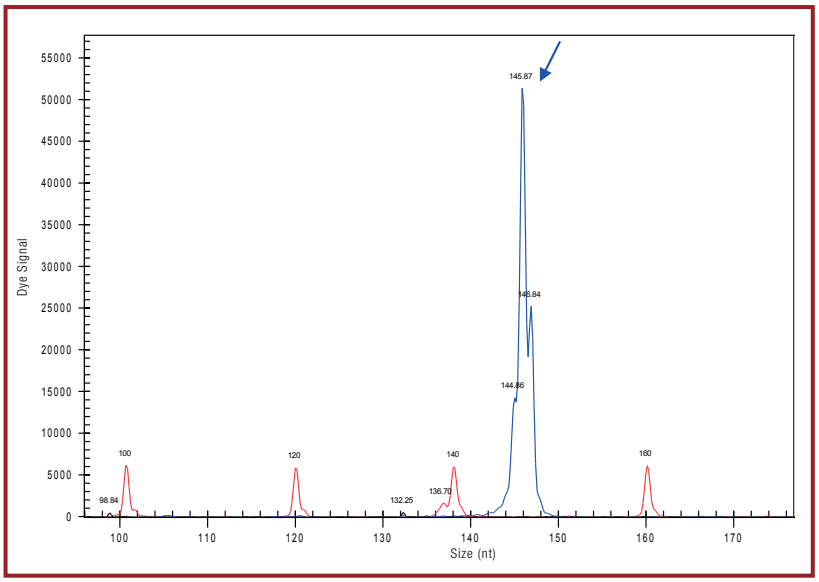
Wszystkie otrzymane profile DNA materiału dowodowego z próbek drewna o numerach 7–22 różniły się między sobą (tab. 3), podobnie jak profile DNA materiału porównawczego (próbki nr 1–6) miały inne profile genetyczne.



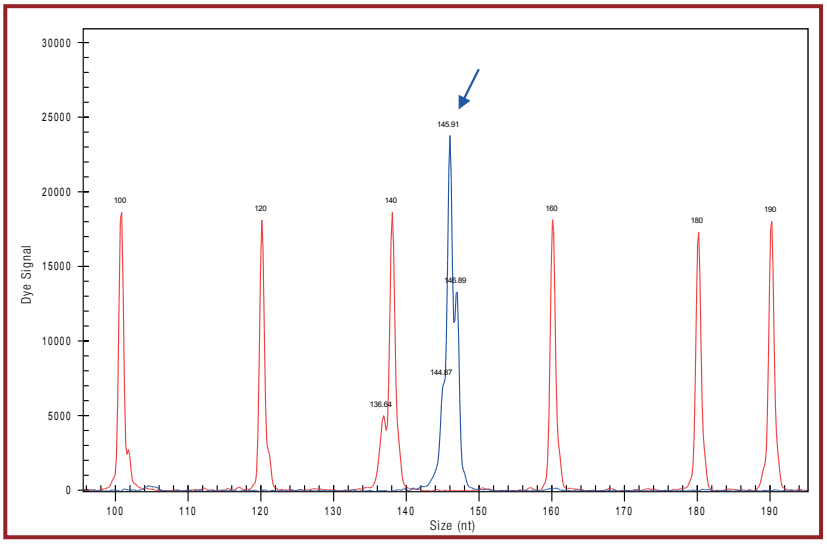
Ryc. 42. Profil genetyczny materiału dowodowego dębu (próbka nr 9) w mikrosatelitarnym *locus* 102: allele 121 i 135 pz oznaczono strzałkami (kolor niebieski). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 43. Profil genetyczny materiału porównawczego dębu (próbka nr 6) w mikrosatelitarnym *locus* 102: allele 121 i 135 pz oznaczono strzałkami (kolor niebieski). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 44. Profil genetyczny materiału dowodowego (próbka nr 9) w mikrosatelitarnym *locus* ssrQrZAG7: allel 146 pz (kolor niebieski). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



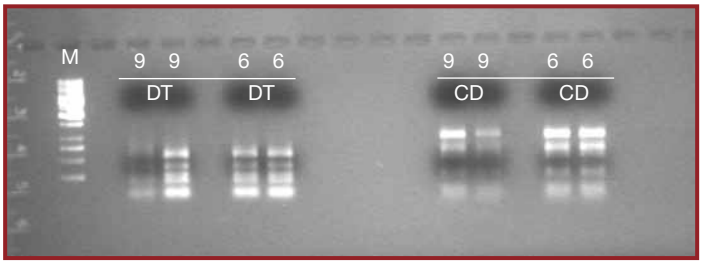
Ryc. 45. Profil genetyczny materiału porównawczego (próbka nr 6) w mikrosatelitarnym *locus* ssrQrZAG7: allel 146 pz (kolor niebieski). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)

Tabela 4. Zestawienie profili genetycznych materiału dowodowego i porównawczego badanych próbek drewna dębu

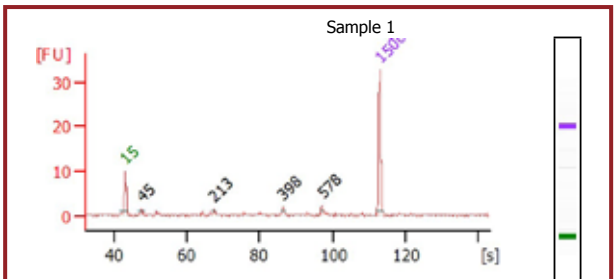
Lp.	Typ materiału	Marker MSQ4		Marker MSQ13		Marker ssrQrZAG7		Marker ssrQrZAG9		Marker 102		Marker DT	Marker CD
1	porównawczy	220	232	222	232	132	132	178	216	103	113	12	3
2	porównawczy	220	230	222	222	116	130	186	192	117	127	4	3
3	porównawczy	216	220	224	230	130	134	190	212	125	127	12	3
4	porównawczy	212	214	220	334	132	132	192	214	113	119	12	3
5	porównawczy	220	228	224	228	134	134	188	188	b.d.	b.d.	7	1
6	porównawczy	220	230	222	228	146	146	178	184	121	135	4	3
7	dowodowy	212	212	226	226	126	134	190	190	115	127	12	3
8	dowodowy	216	224	238	246	128	134	188	188	111	125	b.d.	3
9	dowodowy	220	230	222	228	146	146	178	184	121	135	4	3
10	dowodowy	216	224	220	220	124	124	192	192	113	115	7	3
11	dowodowy	222	226	216	226	118	118	190	200	109	119	7	b.d.
12	dowodowy	206	210	220	224	116	130	190	200	115	117	7	3
13	dowodowy	218	220	224	230	118	134	190	212	111	119	5	1
14	dowodowy	218	218	224	228	126	134	184	194	113	115	7	1
15	dowodowy	220	230	222	222	116	130	186	192	117	127	4	3
16	dowodowy	220	230	218	216	138	192	184	194	111	111	5	3
17	dowodowy	218	218	222	234	132	136	190	190	127	149	4	3
18	dowodowy	212	212	222	222	124	124	178	184	115	115	7	1
19	dowodowy	220	228	224	224	126	134	184	184	99	113	1	1
20	dowodowy	216	224	226	228	134	134	188	188	117	123	1	1
21	dowodowy	216	224	224	230	118	204	190	212	113	119	1	1
22	dowodowy	220	230	224	224	138	206	178	184	119	164	10	1

b.d. – brak danych

Kolorami wyróżniono identyczne profile genetyczne



Ryc. 46. Porównanie profili genetycznych materiału dowodowego (próbka nr 9) i dowodowego (próbka nr 6) dla chloroplastowych *loci* PCR-RFLP: haplotypy „DT" i „CD" (źródło: archiwum IBL)



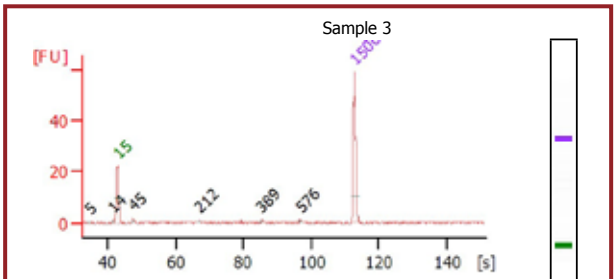
Overall Results for sample 1 : **Sample 1**

Number of peaks found: 4

Peak table for sample 1 : **Sample 1**

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/µl]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	45	0.25	8.5	
3	213	0.10	0.7	
4	398	0.16	0.6	
5	578	0.15	0.4	
6	1,500	2.10	2.1	Upper Marker

Ryc. 47. Profil genetyczny materiału porównawczego (próbka nr 15) w chloroplastowym *locus* „DT": wariant „4" składa się z haplotypów o wielkości 45 pz, 213 pz, 398 pz i 578 pz. Standardy wielkości: 15 pz (zaznaczony kolorem zielonym) i 1500 pz (kolor fioletowy), (źródło: archiwum IBL)



Overall Results for sample 3 : **Sample 3**

Number of peaks found: 4

Peak table for sample 3 : **Sample 3**

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/µl]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	5	0.00	0.0	
2	14	0.00	0.0	
3	15	4.20	424.2	Lower Marker
4	45	0.11	3.8	
5	212	0.03	0.2	
6	389	0.04	0.1	
7	576	0.03	0.1	
8	1,500	2.10	2.1	Upper Marker

Ryc. 48. Profil genetyczny materiału dowodowego (próbka nr 2) w chloroplastowym *locus* „DT": wariant „4" złożony z haplotypów o wielkości 45 pz, 212 pz, 389 pz i 576 pz. Standardy wielkości: 15 pz (zaznaczony kolorem zielonym) i 1500 pz (kolor fioletowy), (źródło: archiwum IBL)

Na podstawie wzorów alleli siedmiu rodzajów markerów, w tym pięciu markerów jądrowych – MSQ4, MSQ13, ssrQrZAG7, ssrQrZAG9 i 102 – oraz dwóch chloroplastowych – PCR-RFLP („DT" i „CD") – stwierdzono, że:

- próbka drewna nr 9 (materiał dowodowy) ma taki sam profil genetyczny (220, 230, 222, 228, 146, 146, 178, 184, 121, 135, 4, 3) jak próbka drewna nr 6 z pniaka, stanowiąca materiał porównawczy (tab. 4; ryc. 42–46);
- próbka drewna nr 15 (materiał dowodowy) miała taki sam profil genetyczny (220, 230, 222, 222, 116, 130, 186, 192, 117, 127, 4, 3) jak próbka drewna nr 2 z pniaka stanowiącego materiał porównawczy (tab. 4; ryc. 47 i 48).

Pozostałe badane próbki drewna z materiału dowodowego nie wykazały podobieństwa do którejkolwiek z próbek drewna z materiału porównawczego. Wartość prawdopodobieństwa identyczności P_{ID} obliczona wg Hedricka (2000) dla wszystkich siedmiu markerów zmienności DNA wynosi 0,0255, zatem siła dyskryminacji czterech markerów SSR i jednego STS użytych do identyfikacji jest wysoka: 0,9745.

Wnioski:

- prawdopodobieństwo tego, że próbka nr 9 materiału dowodowego pochodzi z materiału porównawczego (próbka drewna nr 6), wynosi 97,45%;
- próbka materiału dowodowego nr 15 stanowiła przed rozdzieleniem jedną całość z materiałem porównawczym nr 2 z prawdopodobieństwem 97,45%.

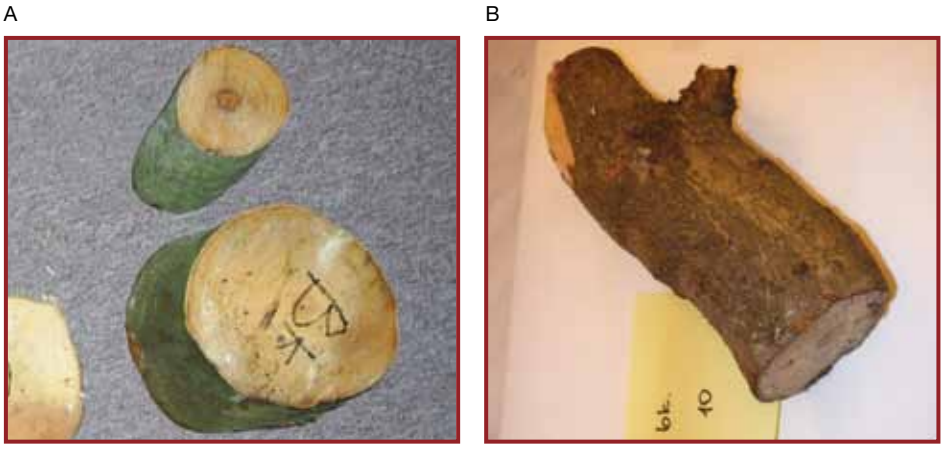
3.5. Identyfikacja próbek drewna buka zwyczajnego

Analizę profili DNA drewna bukowego wykonano dla 10 próbek materiału dowodowego i siedmiu próbek materiału porównawczego, przesłanych do laboratorium z Nadleśnictwa B. Materiał dowodowy stanowiły wałki drewna stosowego z lasu (ryc. 49), a materiał porównawczy pobrano z siedmiu pniaków w lesie (ryc. 50).

Do analizy DNA posłużono się czterech markerami jądrowego DNA mikrosatelitarnego: FS1–03, FS1–25, FCM5 i mcf11 (Pastorelli i in. 2003, Vornam i in. 2004), natomiast do analizy zmienności genetycznej – trzema mikrosatelitarnymi markerami DNA chloroplastowego(ccmp4, ccmp7 i ccmp10), wzorując się na doniesieniach Griveta i in. (2001) oraz Weisinga i Gardnera (1999). Testowano również przydatność chloroplastowych markerów PCR-RFLP – „DT", „CD" i „OA" – metodą Vettoriego i in. (2004) dla drewna bukowego.

Otrzymane stężenia DNA cechowała dobra średnia zawartość DNA genomowego: 20,19 ng/µl ± 15,0 S.E, potwierdzona spektrofotometrycznie (ryc. 51–53). Badane próbki drewna wykazywały obecność zarówno heterozygot, jak i homozygot dla każdego markera DNA jądrowego. Dla wszystkich czterech zastosowanych markerów SSR buka otrzymano wysokie wartości parametrów genetycznych: A = 172; średnią obserwowaną liczbę alleli na *locus* n_a = 14,750; średnią oczekiwaną liczbę alleli na *locus* n_e = 7,424; indeks zmienności Shannona I = 2,218; heterozygotyczność

obserwowaną H_O = 0,715 i oczekiwaną H_E = 0,857. Średnia heterozygotyczność dla pięciu *loci* SSR była wysoka; wyniosła H_T = 0,852.



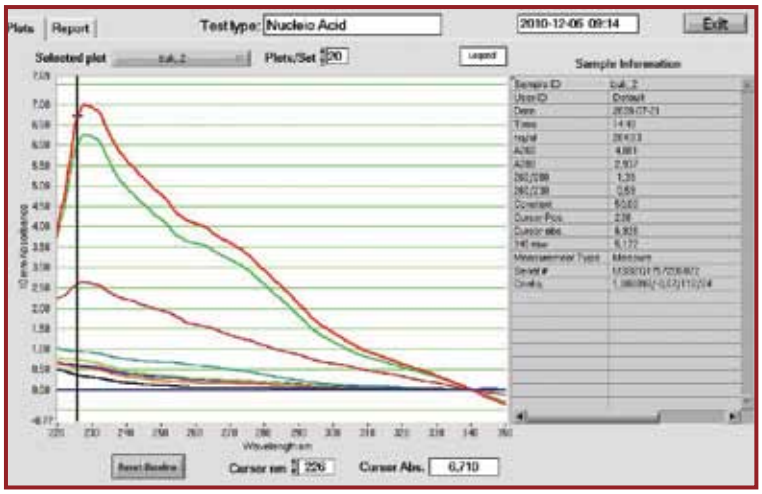
Ryc. 49. Materiał dowodowy – próbki pobrane w terenie. A – próbka pobrana z wierzchołka buka w lesie, B – próbka nr 10 z wałka składowanego w lesie (fot. J. A. Nowakowska)



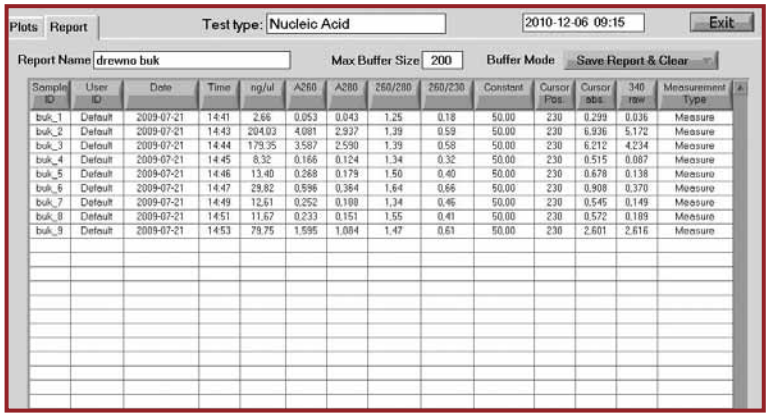
Ryc. 50. Materiał porównawczy. Pniak nr 7 na zrębie w lesie (fot. M. Klisz)



Ryc. 51. Elektroforegram DNA izolowanego z próbek drewna bukowego, przesłanych do analiz z Nadleśnictwa B. M – marker wielkości fragmentów DNA 1kB Ladder Plus (Fermentas). 1–17 – cząsteczki izolowanego DNA z poszczególnych drzew (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 52. Oszacowanie stężenia kwasów nukleinowych w próbkach pobranych z pniaków buka; pomiar absorpcji 10 mm przy długości fali 260 nm (źródło: archiwum IBL)



Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs	340 raw	Measurement Type
buk_1	Default	2009-07-21	14:41	2,66	0,053	0,043	1,25	0,18	50,00	230	0,299	0,036	Measure
buk_2	Default	2009-07-21	14:43	204,03	4,081	2,937	1,39	0,59	50,00	230	6,936	5,172	Measure
buk_3	Default	2009-07-21	14:44	179,35	3,587	2,590	1,39	0,58	50,00	230	6,212	4,234	Measure
buk_4	Default	2009-07-21	14:45	8,32	0,166	0,124	1,34	0,32	50,00	230	0,515	0,087	Measure
buk_5	Default	2009-07-21	14:46	13,40	0,268	0,179	1,50	0,40	50,00	230	0,678	0,138	Measure
buk_6	Default	2009-07-21	14:47	29,82	0,596	0,364	1,64	0,66	50,00	230	0,908	0,370	Measure
buk_7	Default	2009-07-21	14:49	12,61	0,252	0,188	1,34	0,46	50,00	230	0,545	0,149	Measure
buk_8	Default	2009-07-21	14:51	11,67	0,233	0,151	1,55	0,41	50,00	230	0,572	0,189	Measure
buk_9	Default	2009-07-21	14:53	79,75	1,595	1,084	1,47	0,61	50,00	230	2,601	2,616	Measure

Ryc. 53. Zawartość wyizolowanego DNA i parametry czystości kwasów nukleinowych w wybranych próbkach drewna buka zwyczajnego (źródło: archiwum IBL)

Wszystkie markery mikrosatelitarnego DNA jądrowego (FS1–03, FS1–25, FCM5 i mcf11) charakteryzował wysoki polimorfizm, odpowiednio: PIC = 79,33%; PIC = 82,64%; PIC = 82,77% i PIC = 83,01%. Średni PIC wszystkich markerów DNA mikrosatelitarnego był wysoki (PIC = 81,94%), a wartość P_{ID} = 0,0117, obliczona na podstawie wzoru Hedricka (2000) dla 100 losowo wybranych pniaków buka na zrębie, okazała się niska, zatem siła dyskryminacji użytych do identyfikacji markerów SSR była wysoka i wyniosła 0,9883 (98,83%). Chloroplastowy marker ccmp4 charakteryzowało występowanie sześciu wariantów alleli (od 120 do 134 pz), marker ccmp7 – występowanie czterech wariantów (od 160 do 164 pz), a marker ccmp10 – sześciu wariantów

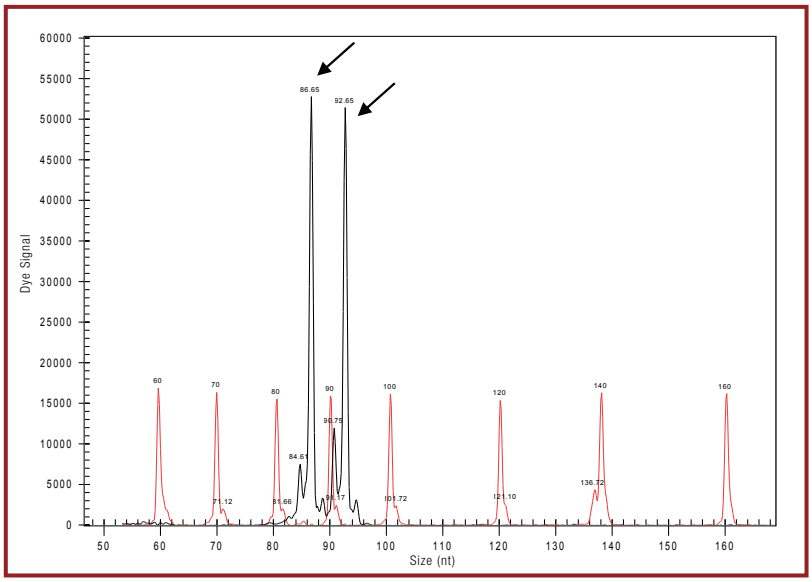
(od 129 do 134 pz). Średnia dla trzech markerów cpSSR osiągnęła średni poziom: n_a = 5,667; n_e = 4,055; I = 1,502; H_T = 0,739; PIC = 71,28% (Nowakowska 2010).

W badaniach ok. 300 europejskich osobników buka zwyczajnego, na podstawie analizy czterech markerów (ccmp4, ccmp6, ccmp7 i ccmp10), stwierdzono łącznie 24 warianty alleli (Magri i in. 2006). Najwięcej wariantów alleli wykazuje *locus* ccmp7 w populacjach włoskich (Vettori i in. 2004), *locus* ccmp10 był natomiast monomorficzny (miał tylko jeden wariant allela). Można zatem przypuszczać, że zmienność chloroplastowych markerów ccmp4, ccmp7 i ccmp10 wykazuje w Europie zróżnicowanie regionalne.

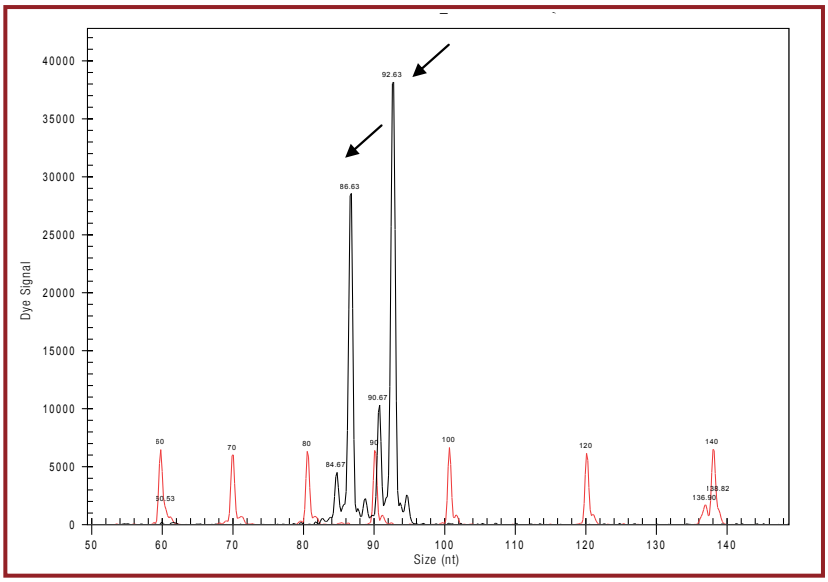
Dla prób drewna bukowego z Nadleśnictwa B. wartość P_{ID} wyniosła 0,0127, co oznacza, że siła dyskryminacji markerów cpSSR użytych do identyfikacji próbek drewna osiągnęła 0,9830 (98,30%).

Wnioski i opinia końcowa

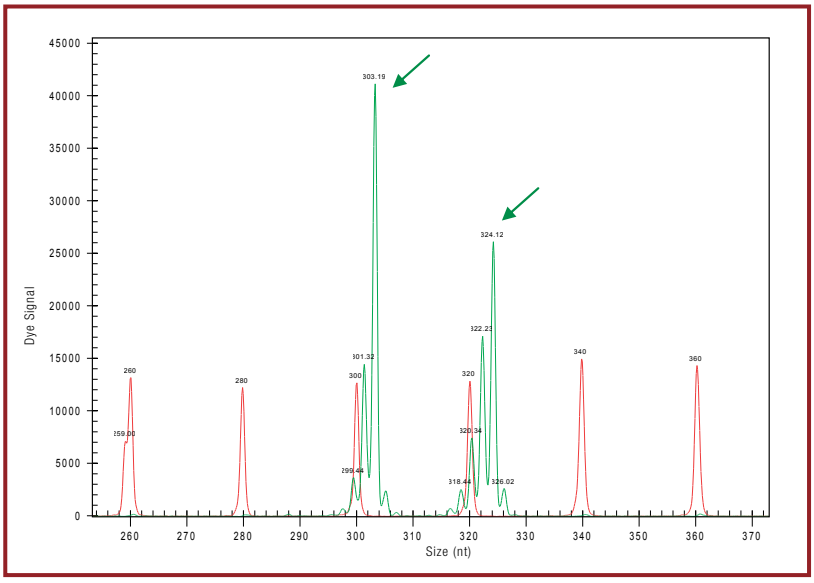
Analiza profili genetycznych 17 próbek drewna bukowego na podstawie czterech markerów DNA jądrowego (ryc. 54–57) i trzech markerów chloroplastowych (ryc. 51–54) umożliwiła porównanie materiału dowodowego z próbkami drewna z pniaków bukowych w terenie (materiał porównawczy).



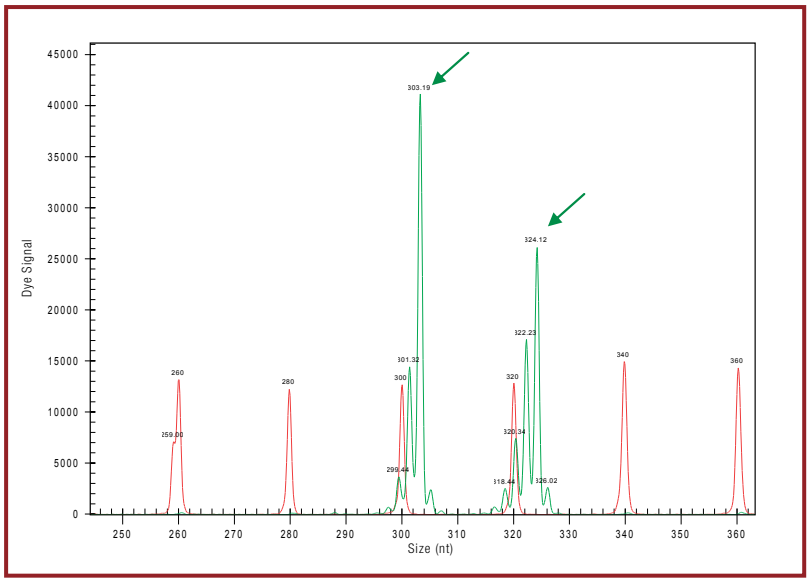
Ryc. 54. Profil genetyczny materiału dowodowego (buk, próbka nr 8) w mikrosatelitarnym *locus* FS1-01: allele 87 i 93 pz oznaczono strzałkami, standard wielkości – kolorem czerwonym (źródło: archiwum IBL)



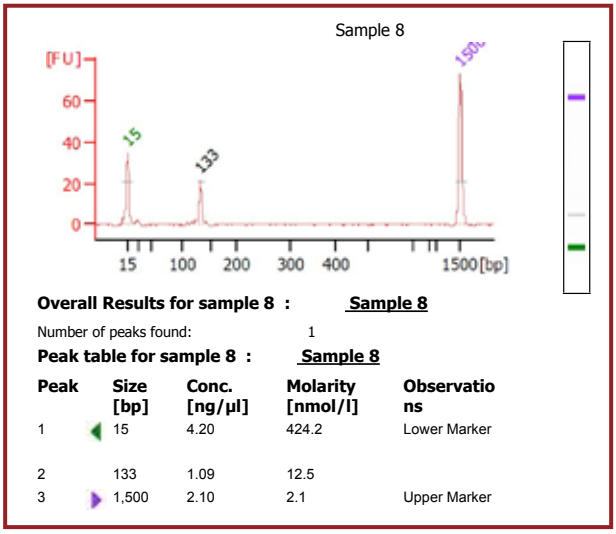
Ryc. 55. Profil genetyczny materiału porównawczego (buk, próbka nr 7) w mikrosatelitarnym *locus* FS1-01: allele 87 i 93 pz oznaczono strzałkami, standard wielkości – kolorem czerwonym (źródło: archiwum IBL)



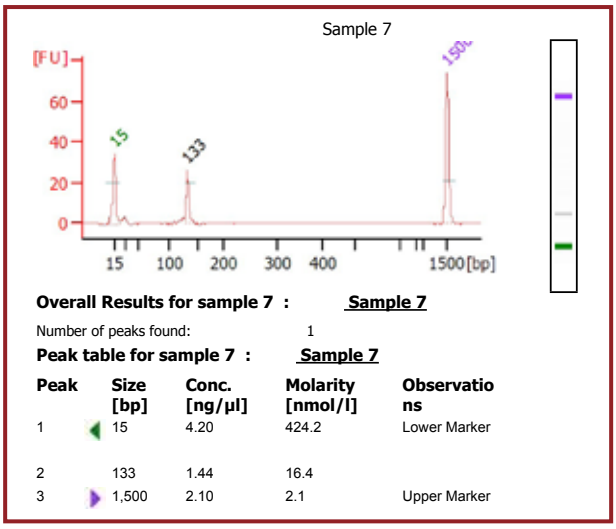
Ryc. 56. Profil genetyczny materiału dowodowego (buk, próbka nr 8) w mikrosatelitarnym *locus* FCM5: allele 303 i 324 pz oznaczono kolorem zielonym, standard wielkości – czerwonym (źródło: archiwum IBL)



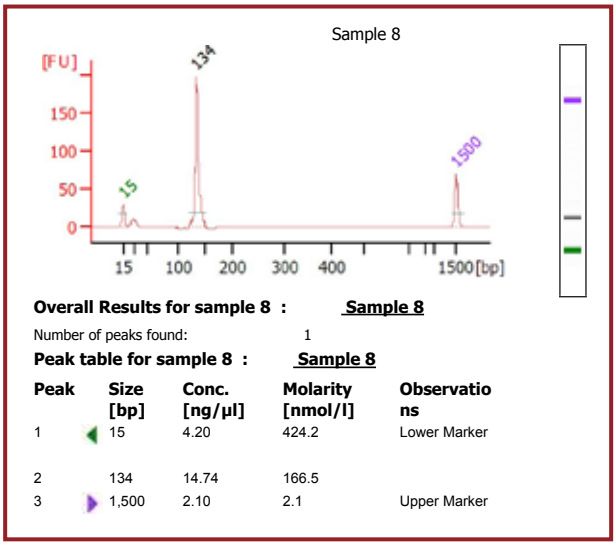
Ryc. 57. Profil genetyczny materiału porównawczego (buk, próbka nr 7) w mikrosatelitarnym *locus* FCM5: allele 303 i 324 pz oznaczono kolorem zielonym, standard wielkości – czerwonym (źródło: archiwum IBL)



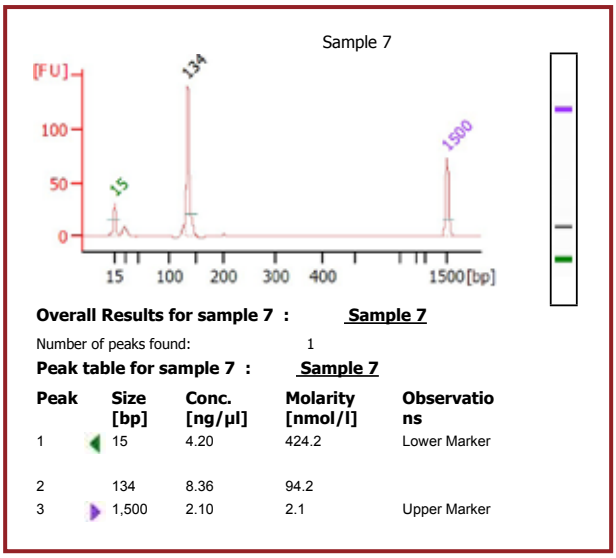
Ryc. 58. Profil genetyczny materiału porównawczego (próbka nr 8) w chloroplastowym *locus* ccmp4: haplotyp 133 pz. Standardy wielkości: 15 pz (kolor zielony) i 1500 pz (kolor fioletowy), (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 59. Profil genetyczny materiału dowodowego (próbka nr 7) w chloroplastowym *locus* ccmp4: haplotyp 133 pz. Standardy wielkości: 15 pz (kolor zielony) i 1500 pz (kolor fioletowy), (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 60. Profil genetyczny materiału porównawczego (próbka nr 8) w chloroplastowym *locus* ccmp10: haplotyp 134 pz. Standardy wielkości: 15 pz (kolor zielony) i 1500 pz (kolor fioletowy), (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 61. Profil genetyczny materiału dowodowego (próbka nr 7) w chloroplastowym *locus* ccmp10: haplotyp 133 pz. Standardy wielkości: 15 pz (kolor zielony) i 1500 pz (kolor fioletowy), (źródło: archiwum IBL)

Wszystkie otrzymane profile DNA materiału dowodowego z próbek drewna o numerach 8–17 różniły się między sobą. Każdy z profili DNA materiału porównawczego (numery 1–7) także różnił się od innych (tab. 5).

Na podstawie wzorów alleli siedmiu rodzajów markerów, w tym czterech markerów jądrowych (FS1–03, FS1–25, FCM5 i mcf11) oraz trzech chloroplastowych cpSSR (ccmp4, ccmp7 i ccmp10) stwierdzono, że próbka drewna nr 8 (materiał dowodowy) miała taki sam profil genetyczny (87, 93, 87, 102, 303, 324, 291, 308, 133, 162, 134) jak próbka drewna nr 7 z pniaka, stanowiąca materiał porównawczy (tab. 5; ryc. 54–61).

Pozostałe badane próbki drewna z materiału dowodowego nie wykazały podobieństwa do żadnej z próbek drewna z materiału porównawczego (tab. 5). Wartość prawdopodobieństwa identyczności PID obliczona metodą Hedricka (2000) dla wszystkich siedmiu markerów zmienności DNA wyniosła 0,0122. Siła dyskryminacji użytych do identyfikacji drewna bukowego czterech markerów SSR i trzech cpSSR jest zatem wysoka i wynosi 0,9878.

Wniosek: materiał dowodowy oznaczony numerem 8 stanowił przed rozdzieleniem z materiałem porównawczym oznaczonym numerem 7 jedną całość z prawdopodobieństwem 98,78%.

Tabela 5. Zestawienie profili genetycznych materiału dowodowego i porównawczego badanych próbek drewna buka zwyczajnego

Lp.	Typ materiału	Marker FS1–03		Marker FS1–25		Marker FCM5		Marker Mcf11		Marker ccmp4	Marker ccmp7	Marker ccmp10
1	porównawczy	95	95	87	87	303	324	308	330	133	162	133
2	porównawczy	95	95	93	93	303	324	308	331	133	161	b.d.
3	porównawczy	93	93	100	100	289	301	292	306	133	164	133
4	porównawczy	87	87	104	106	311	311	317	317	133	164	133
5	porównawczy	87	93	100	102	305	317	b.d.	b.d.	133	164	134
6	porównawczy	87	125	104	106	324	324	332	332	134	162	134
7	porównawczy	87	93	87	102	303	324	291	308	133	162	134
8	dowodowy	87	93	87	102	303	324	291	308	133	162	134
9	dowodowy	87	93	83	106	b.d.	b.d.	318	330	132	162	133
10	dowodowy	87	93	102	112	305	324	310	318	131	162	133
11	dowodowy	93	125	100	102	301	309	306	331	132	162	132
12	dowodowy	93	96	87	93	303	303	308	314	b.d.	161	132
13	dowodowy	87	125	99	106	324	324	330	330	133	161	131
14	dowodowy	91	107	100	102	313	313	318	318	134	160	132
15	dowodowy	93	100	100	102	307	319	b.d.	b.d.	120	161	129
16	dowodowy	87	97	83	104	b.d.	b.d.	298	312	128	161	133
17	dowodowy	87	105	99	102	317	324	b.d.	b.d.	133	161	133

b.d. – brak danych
Kolorami wyróżniono identyczne profile genetyczne

3.6. Identyfikacja próbek drewna olszy czarnej

W celu identyfikacji porównawczej do laboratorium przesłano materiał dowodowy złożony z próbek pobranych z 10 różnych wyrzynków z drewna stosowego (ryc. 62) w Nadleśnictwie C. oraz materiał porównawczy pobrany z czterech pniaków w lesie (ryc. 63), który przed wykonaniem analiz przechowywano w temperaturze –75°C.

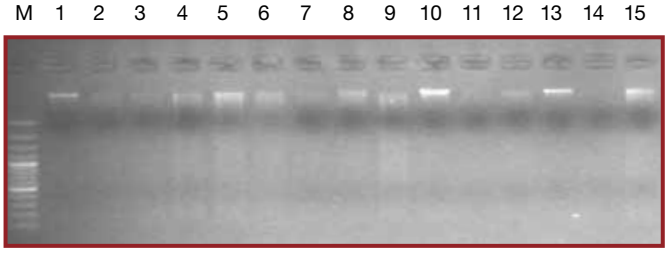
Analizy DNA przeprowadzono, wykorzystując pięć markerów jądrowego DNA mikrosatelitarnego: L2.3, L2.7, L5.5, L7.8 i L022, według procedury opisanej przez Kulju i in. (2004). Analizy trzech chloroplastowych markerów mikrosatelitarnych cpSSR: trn1, psb1 i matK, przeprowadzono metodą opisaną przez Zhuka i in. (2008).



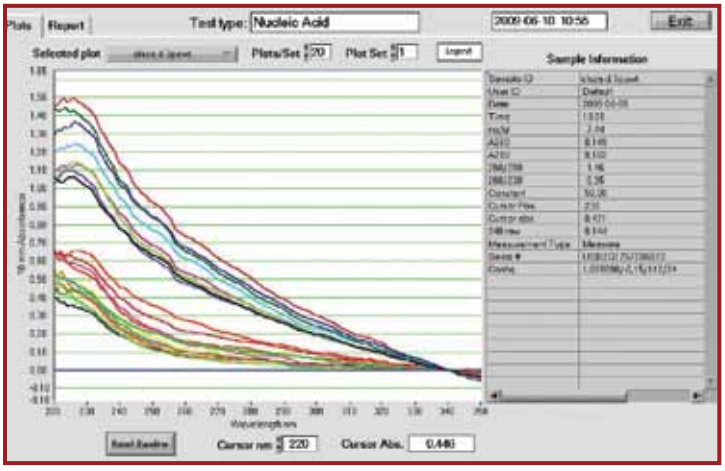
Ryc. 62. Materiał dowodowy: kawałki drewna olszowego z wałka nr 1 drewna stosowego w lesie (fot. J. A. Nowakowska)



Ryc. 63. Materiał porównawczy: próbki drewna nr 8, pobrane z pniaka pozostawionego w lesie (fot. M. Klisz)



Ryc. 64. Elektroforegram DNA izolowanego z 14 prób drewna olszowego, przesłanego do analiz z Nadleśnictwa C. M – marker wielkości fragmentów DNA 1kB Ladder Plus (Fermentas). 1–15 – cząsteczki izolowanego DNA z drewna pobranego z poszczególnych drzew (z powtórzeniami), (źródło: archiwum IBL)

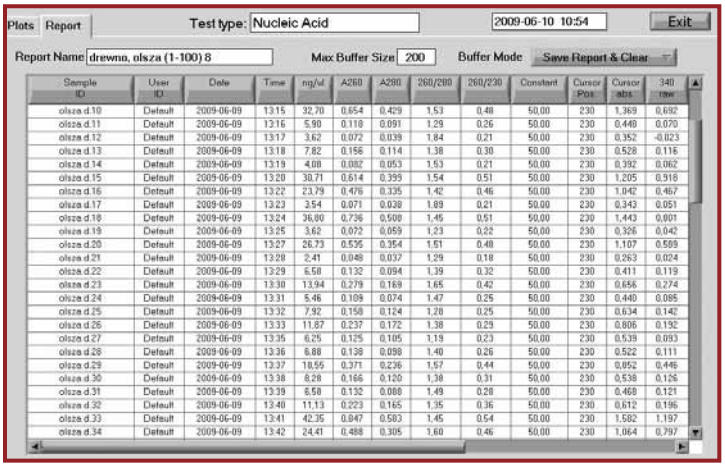


Ryc. 65. Oszacowanie stężenia zawartości kwasów nukleinowych w próbach pobranych z badanych kawałków drewna olszy. Pomiar absorpcji 10 mm przy długości fali 260 nm (źródło: archiwum IBL)

Średnia czystość kwasów deoksyrybonukleinowych w próbkach DNA olszy była dobra i wynosiła 1,5 dla absorpcjiA_{260}/A_{280} oraz 0,38 dla absorpcjiA_{260}/A_{230} (ryc. 64–66).

Analizowane próbki wykazywały obecność zarówno heterozygot, jak i homozygot w DNA jądrowym oraz wysokie parametry zmienności genetycznej: średnią obserwowaną liczbę alleli na *locus* n_a = 14,200; średnią oczekiwaną liczbę alleli na *locus* n_e = 6,087; indeks zmienności Shannona I = 1,935; heterozygotyczność obserwowaną H_O = 0,703 i oczekiwaną H_E = 0,765. Średnia heterozygotyczność pięciu markerów SSR była wysoka i wynosiła H_T = 0,768 (Nowakowska 2010).

Wszystkie zastosowane markery mikrosatelitarnego DNA jądrowego (L2.3, L2.7, L5.5, L7.8 i L022) charakteryzował wysoki polimorfizm, odpowiednio: PIC = 54,98%; PIC = 84,33%; PIC = 60,29%, PIC = 83,02% i PIC = 90,03%. Średni polimorfizm był wysoki (PIC = 74,53%), przy czym wszystkie badane markery SSR charakteryzowała niska wartość P_{ID} = 0,0012, obliczona na podstawie wzoru Hedricka (2000) dla 100 losowo wybranych pniaków olszy na zrębie. Siła dyskryminacji użytych do identyfikacji markerów SSR była zatem wysoka – wynosiła 0,9988 (99,88%).



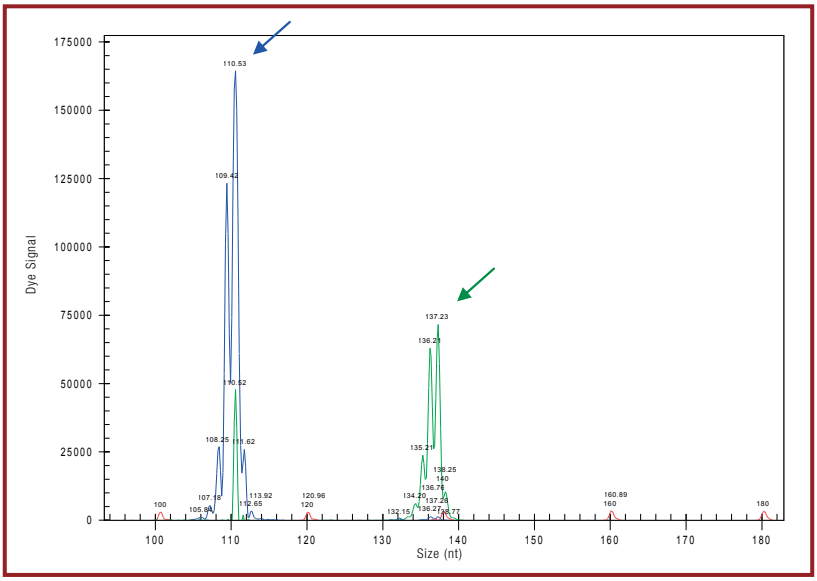
Ryc. 66. Zawartość wyizolowanego DNA i określenie parametrów czystości kwasów nukleinowych w próbach drewna olszy czarnej (źródło: archiwum IBL)

Dla próbek drewna olszowego analizowanych na podstawie markerów cpDNA wartość P_{ID} = 0,0401, a zatem siła dyskryminacji użytych do identyfikacji próbek drewna markerów cpSSR wynosiła 0,9599 (95,99%).

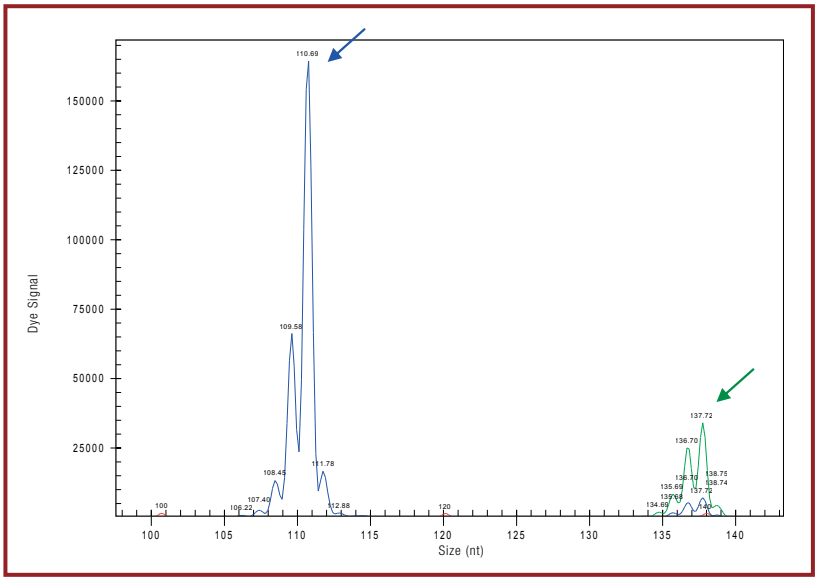
Wnioski i opinia końcowa

Analiza profili genetycznych, przeprowadzona na podstawie pięciu markerów DNA jądrowego (ryc. 67–70) i trzech markerów chloroplastowych (ryc. 71 i 72), umożliwiła porównanie materiału dowodowego z próbkami drewna z pniaków olszowych (materiał porównawczy) pobranych w terenie w Nadleśnictwie C.

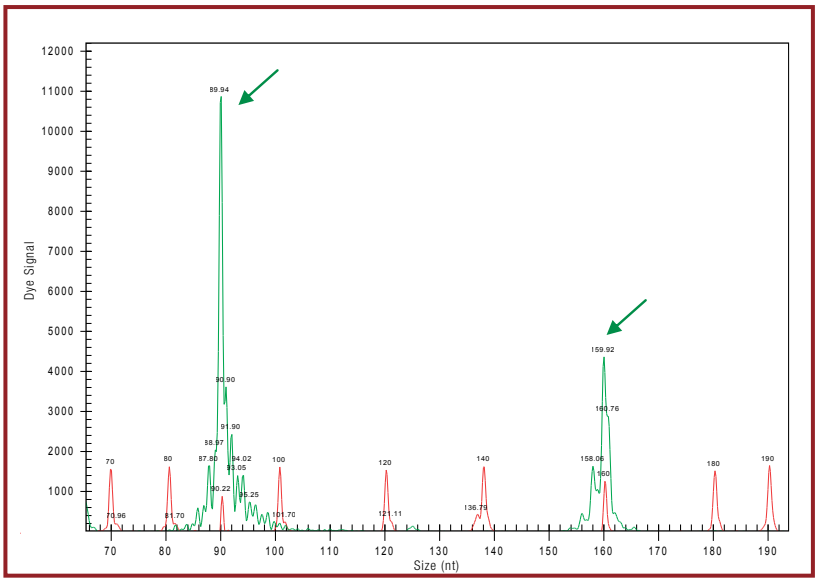
Wszystkie otrzymane profile DNA materiału dowodowego z próbek drewna o numerach 5–14 różniły się między sobą (tab. 6), podobnie jak profile DNA materiału porównawczego (numery 1–4).



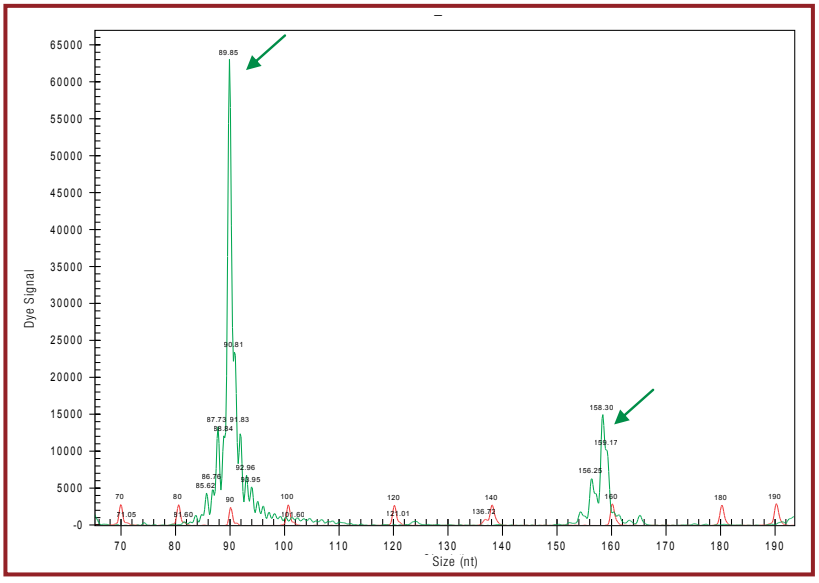
Ryc. 67. Profil genetyczny materiału dowodowego (olsza, próbka nr 11) w mikrosatelitarnym *locus* L5.5: allel 111 pz (kolor niebieski) i *locus* L022: allel 137 pz (kolor zielony). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



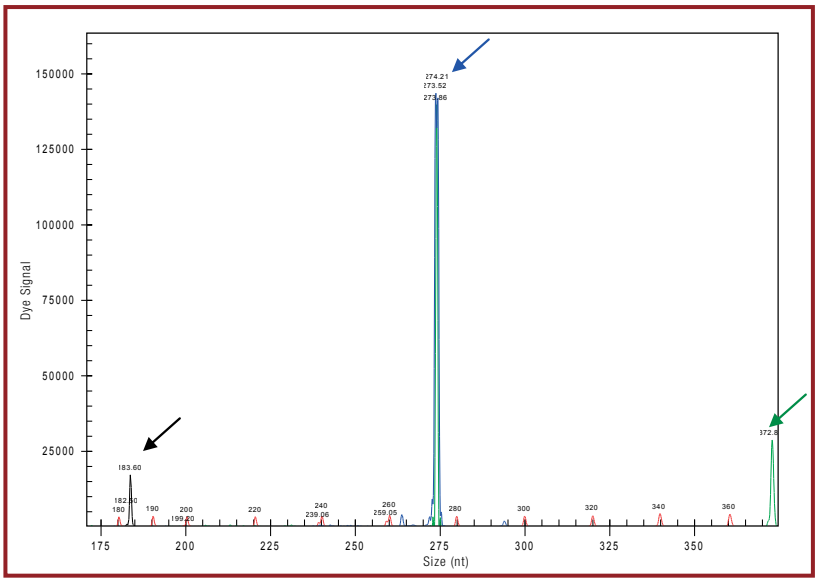
Ryc. 68. Profil genetyczny materiału porównawczego olszy (próbka nr 3) w mikrosatelitarnym *locus* L5.5: allel 111 pz (kolor niebieski) i *locus* L022: allel 137 pz (kolor zielony). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



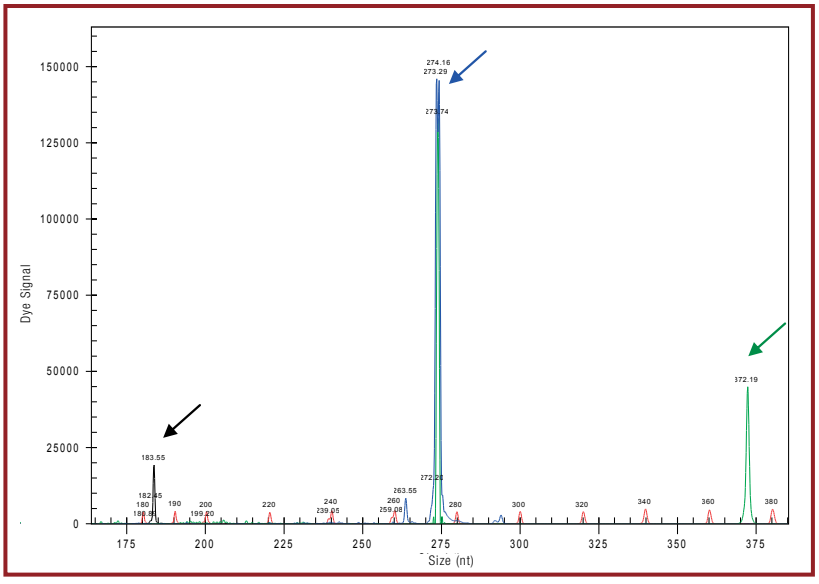
Ryc. 69. Profil genetyczny materiału dowodowego (olsza, próbka nr 11) w mikrosatelitarnym *locus* L7.8: allele 90 i 160 pz (kolor zielony). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 70. Profil genetyczny materiału porównawczego (olsza, próbka nr 3) w mikrosatelitarnym *locus* L7.8: allele 90 i 160 pz (kolor zielony). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 71. Profil genetyczny materiału dowodowego (olsza, próbka nr 11) w chloroplastowym *locus* trn1: allel 184 pz (kolor czarny); *locus* matK: allel 274 pz (kolor niebieski) i *locus* psb1: allel 372 pz (kolor zielony). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 72. Profil genetyczny materiału dowodowego (olsza, próbka nr 3) w chloroplastowym *locus* trn1: allel 184 pz (kolor czarny); *locus* matK: allel 274 pz (kolor niebieski) i *locus* psb1: allel 372 pz (kolor zielony). Standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)

Na podstawie wzorów alleli ośmiu rodzajów markerów, w tym pięciu markerów jądrowych (L2.3, L2.7, L5.5, L7.8 i L022) oraz trzech chloroplastowych cpSSR (trn1, psb1 i matK5), stwierdzono, że próbka drewna nr 11 (materiał dowodowy) miała taki sam profil genetyczny (201, 201, 177, 181, 111, 111, 90, 160, 137, 137, 184, 274, 372) jak próbka drewna nr 3 z materiału porównawczego (tab. 6; ryc. 67–72).

Pozostałe badane próbki drewna z materiału dowodowego nie wykazały podobieństwa do którejkolwiek z próbek drewna z materiału porównawczego.

Wartość prawdopodobieństwa identyczności P_{ID}, obliczona metodą Hedricka (2000) dla wszystkich ośmiu markerów zmienności DNA, wyniosła 0,02065, co oznacza, że siła dyskryminacji użytych do identyfikacji drewna olszowego pięciu markerów SSR i trzech cpSSR osiągnęła 0,9794. Ponieważ prawdopodobieństwo identyczności jest wyższe (99,88%), gdy weźmie się pod uwagę wyłącznie markery mikrosatelitarne (dla których P_{ID} = 0,0012), końcowa opinia brzmiała: materiał dowodowy (próbka drewna nr 11) stanowiła przed rozdzieleniem z próbką materiału porównawczego (próbka drewna nr 3) jedną całość z prawdopodobieństwem 99,88%.

Tabela 6. Zestawienie profili genetycznych materiału dowodowego i porównawczego badanych próbek drewna olszy czarnej

Lp.	Typ materiału	Marker L2.3		Marker L2.7		Marker L5.5		Marker L7.8		Marker L022		Marker trn1	Marker matK5	Marker psb1
1	porównawczy	197	197	177	177	121	123	90	90	192	196	186	275	b.d.
2	porównawczy	201	201	177	179	121	123	90	158	192	192	185	275	373
3	porównawczy	201	201	177	181	111	111	90	160	137	137	184	274	372
4	porównawczy	197	197	177	179	119	123	90	154	192	192	186	274	373
5	dowodowy	97	97	158	158	121	123	90	158	192	196	185	274	371
6	dowodowy	201	205	162	177	123	125	90	157	192	196	185	274	371
7	dowodowy	199	199	177	184	121	123	90	158	192	196	185	274	372
8	dowodowy	201	205	177	191	121	123	90	90	192	196	186	275	373
9	dowodowy	201	205	175	177	121	126	90	90	192	192	b.d.	b.d.	373
10	dowodowy	201	203	b.d.	b.d.	121	123	90	90	b.d.	b.d.	185	273	373
11	dowodowy	201	201	177	181	111	111	90	160	137	137	184	274	372
12	dowodowy	201	203	152	154	121	125	90	167	192	196	185	274	373
13	dowodowy	199	201	177	191	119	123	91	165	190	196	185	273	373
14	dowodowy	203	203	152	154	123	125	90	152	192	196	185	273	373

b.d. – brak danych

Kolorami wyróżniono identyczne profile genetyczne

3.7. Identyfikacja próbek drewna brzozy brodawkowatej

Z Nadleśnictwa K. przesłano do Laboratorium Biologii Molekularnej IBL w Sękocinie Starym próbki drewna brzozowego w celu identyfikacji: materiał dowodowy, złożony z próbek pobranych z ośmiu różnych wyrzynków z drewna stosowego w lesie i z siedmiu desek w tartaku (ryc. 73), oraz materiał porównawczy (dziewięć pniaków zabezpieczonych w lesie; ryc. 74).

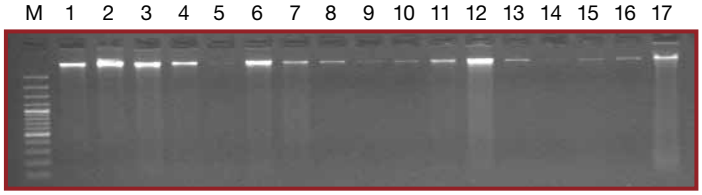
Aby utworzyć profile genetyczne próbek drewna brzozy, przeprowadzono analizy na podstawie pięciu markerów jądrowego DNA mikrosatelitarnego: L2.3, L2.7, L5.5, L7.8 i L022, według procedury opisanej przez Kulju i in. (2004). Amplifikacja markerów DNA organellowego została przeprowadzona dla trzech markerów chloroplastowego DNA mikrosatelitarnego: trn1, psb1 i matK (Zhuk i in. 2008). Średnia zawartość DNA w pobranych próbkach drewna brzozowego wynosiła 11,04 ng/µl ± 9,2 S.E. w 100 mg tkanki. Wyekstrahowane DNA było dobrej jakości, jak stwierdzono na podstawie elektroforezy (ryc. 75) i analizy spektrofotometrycznej (ryc. 76 i 77).



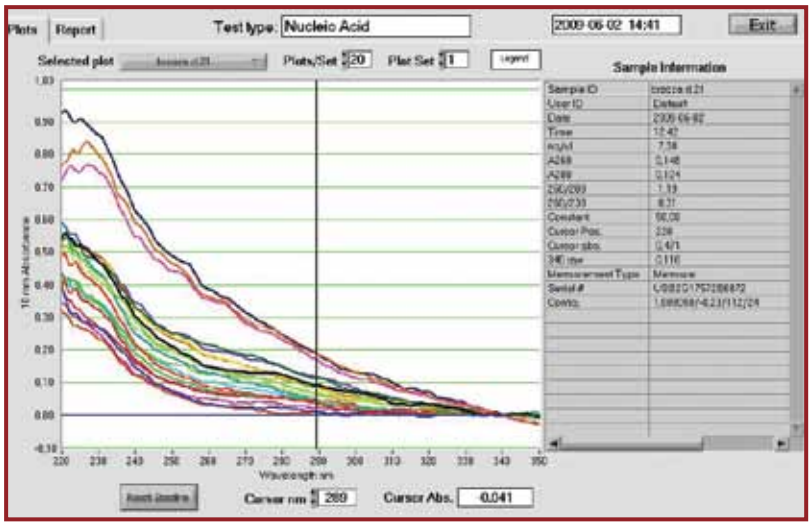
Ryc. 73. Materiał dowodowy. A – wałki na stosie, B – próbka nr 23 z tartaku (fot. M. Klisz)



Ryc. 74. Materiał porównawczy. Pniak nr 5 na zrębie w lesie (fot. M. Klisz)



Ryc. 75. Elektroforegram DNA izolowanego z pierwszych 17 prób drewna brzozowego, przesłanych do analiz z Nadleśnictwa K. M – marker wielkości fragmentów DNA 1kB Ladder Plus (Fermentas). 1–17 – cząsteczki DNA wyizolowane z poszczególnych kawałków drewna (źródło: archiwum IBL)



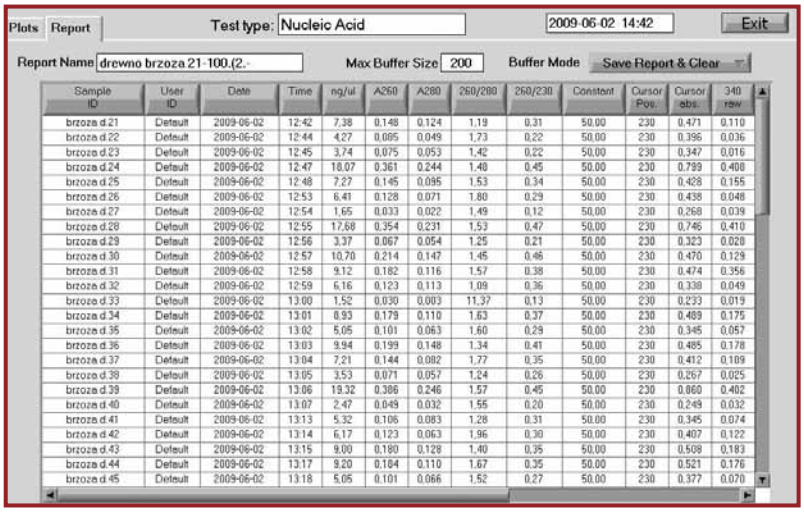
Ryc. 76. Oszacowanie stężenia zawartości kwasów nukleinowych w próbach pobranych z analizowanych kawałków brzozy z Nadleśnictwa K. Pomiar absorpcji 10 mm przy długości fali 260 nm (źródło: archiwum IBL)

Badane próbki drewna wykazywały obecność zarówno heterozygot, jak i homozygot dla poszczególnych markerów DNA jądrowego oraz wysokie wartości parametrów genetycznych: średnią obserwowaną liczbę alleli na *locus* n_a = 15,000; średnią oczekiwaną liczbę alleli na *locus* n_e = 7,031; indeks zmienności Shannona I = 2,103; heterozygotyczność obserwowaną H_O = 0,731 i oczekiwaną H_E = 0,814. Średnia heterozygotyczność pięciu markerów SSR była wysoka i wynosiła H_T = 0,809 (Nowakowska 2010).

Wszystkie markery mikrosatelitarnego DNA jądrowego (L2.3, L2.7, L5.5, L7.8 i L022) charakteryzował wysoki polimorfizm, odpowiednio: PIC = 53,75%; PIC = 81,07%; PIC = 82,13%; PIC = 84,98% i PIC = 91,02%. Średni PIC badanego DNA mikrosatelitarnego był wysoki (78,59%). Zastosowane markery SSR charakteryzowała niska wartość P_{ID} = 0,0011, obliczona na podstawie wzoru

Hedricka (2000) dla 100 losowo wybranych pniaków brzozy na zrębie, a zatem siła dyskryminacji użytych do identyfikacji markerów SSR była wysoka – 0,9989 (99,89%).

W próbkach badanych na podstawie DNA chloroplastowego średnia dla trzech markerów cpSSR była niska: n_a = 4,667; n_e = 2,066; I = 0,940; H_T= 0,495; PIC = 44,73%. Wartość P_{ID} wyniosła 0,0389, siła dyskryminacji użytych do identyfikacji próbek drewna markerów cpSSR wynosiła więc 0,9611 (96,11%).



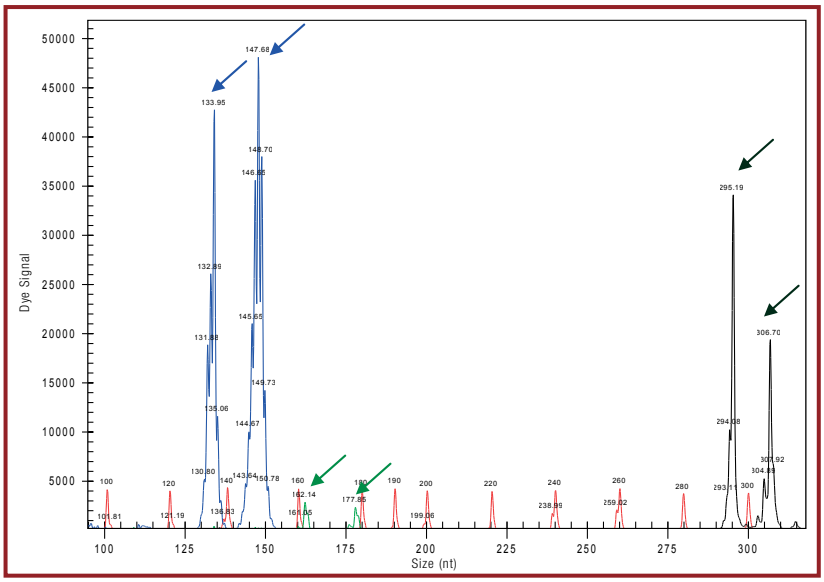
Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
brzoza d 21	Default	2009-06-02	12:42	7,38	0,148	0,124	1,19	0,31	50,00	230	0,471	0,110
brzoza d 22	Default	2009-06-02	12:44	4,27	0,085	0,049	1,73	0,22	50,00	230	0,396	0,036
brzoza d 23	Default	2009-06-02	12:45	3,74	0,075	0,053	1,42	0,22	50,00	230	0,347	0,016
brzoza d 24	Default	2009-06-02	12:47	18,07	0,361	0,244	1,48	0,45	50,00	230	0,799	0,408
brzoza d 25	Default	2009-06-02	12:48	7,27	0,145	0,095	1,53	0,34	50,00	230	0,428	0,155
brzoza d 26	Default	2009-06-02	12:53	6,41	0,128	0,071	1,80	0,29	50,00	230	0,438	0,048
brzoza d 27	Default	2009-06-02	12:54	1,65	0,033	0,022	1,49	0,12	50,00	230	0,268	0,039
brzoza d 28	Default	2009-06-02	12:55	17,68	0,354	0,231	1,53	0,47	50,00	230	0,746	0,410
brzoza d 29	Default	2009-06-02	12:56	3,37	0,067	0,054	1,25	0,21	50,00	230	0,323	0,028
brzoza d 30	Default	2009-06-02	12:57	10,70	0,214	0,147	1,45	0,46	50,00	230	0,470	0,129
brzoza d 31	Default	2009-06-02	12:58	9,12	0,182	0,116	1,57	0,38	50,00	230	0,474	0,356
brzoza d 32	Default	2009-06-02	12:59	6,16	0,123	0,113	1,09	0,36	50,00	230	0,338	0,049
brzoza d 33	Default	2009-06-02	13:00	1,52	0,030	0,003	11,37	0,13	50,00	230	0,233	0,019
brzoza d 34	Default	2009-06-02	13:01	8,93	0,179	0,110	1,63	0,37	50,00	230	0,489	0,175
brzoza d 35	Default	2009-06-02	13:02	5,05	0,101	0,063	1,60	0,29	50,00	230	0,345	0,057
brzoza d 36	Default	2009-06-02	13:03	9,94	0,199	0,148	1,34	0,41	50,00	230	0,485	0,178
brzoza d 37	Default	2009-06-02	13:04	7,21	0,144	0,082	1,77	0,35	50,00	230	0,412	0,109
brzoza d 38	Default	2009-06-02	13:05	3,53	0,071	0,057	1,24	0,26	50,00	230	0,267	0,025
brzoza d 39	Default	2009-06-02	13:06	19,32	0,386	0,246	1,57	0,45	50,00	230	0,860	0,402
brzoza d 40	Default	2009-06-02	13:07	2,47	0,049	0,032	1,55	0,20	50,00	230	0,249	0,032
brzoza d 41	Default	2009-06-02	13:13	5,32	0,106	0,083	1,28	0,31	50,00	230	0,345	0,074
brzoza d 42	Default	2009-06-02	13:14	6,17	0,123	0,063	1,96	0,30	50,00	230	0,407	0,122
brzoza d 43	Default	2009-06-02	13:15	9,00	0,180	0,128	1,40	0,35	50,00	230	0,508	0,183
brzoza d 44	Default	2009-06-02	13:17	9,20	0,184	0,110	1,67	0,35	50,00	230	0,521	0,176
brzoza d 45	Default	2009-06-02	13:18	5,05	0,101	0,066	1,52	0,27	50,00	230	0,377	0,070

Ryc. 77. Zawartość wyizolowanego DNA i parametry czystości kwasów nukleinowych w kawałkach drewna brzozy brodawkowatej przesłanych do badań z Nadleśnictwa K. (źródło: archiwum IBL)

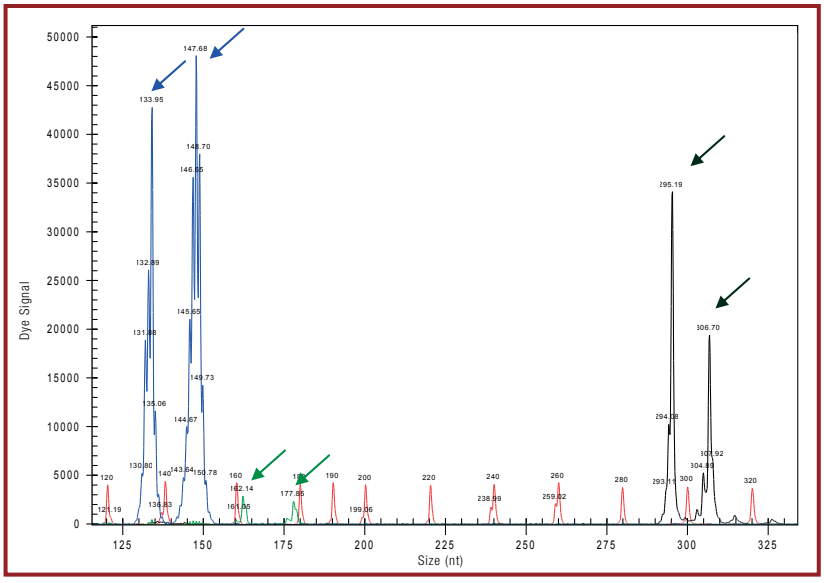
Wnioski i opinia końcowa

Analiza profili genetycznych, przeprowadzona na podstawie pięciu markerów DNA jądrowego (ryc. 78–81) i trzech markerów chloroplastowych (ryc. 82 i 83), umożliwiła porównanie materiału dowodowego z próbkami drewna z pniaków brzozowych zabezpieczonych w terenie (materiał porównawczy).

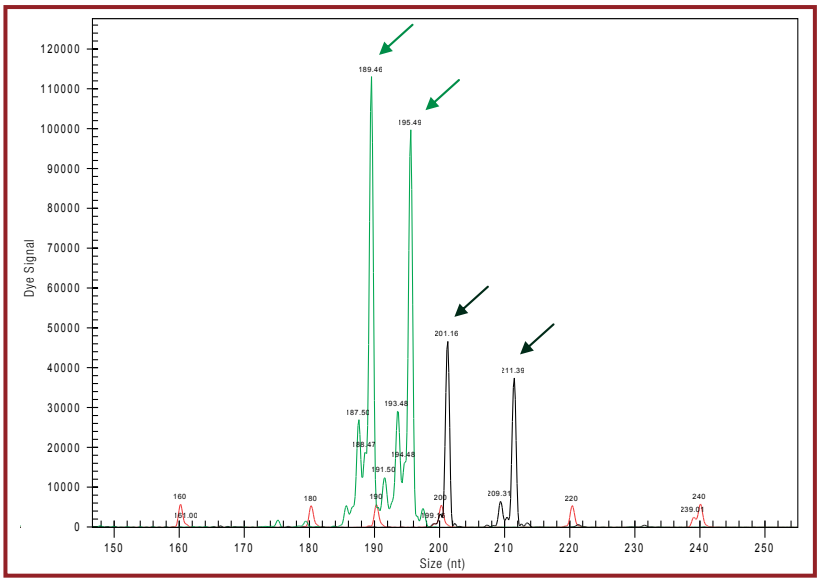
Wszystkie otrzymane profile DNA materiału dowodowego z próbek drewna o numerach 10–24 różniły się między sobą (tab. 7), podobnie jak profile DNA materiału porównawczego (numery 1–9).



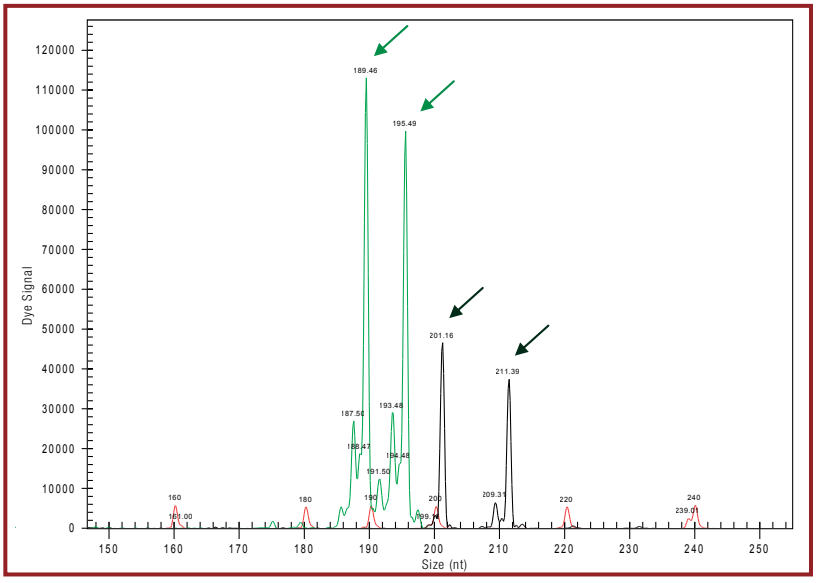
Ryc. 78. Profil genetyczny materiału dowodowego (brzoza, próbka nr 23) w mikrosatelitarnym *locus* L5.5: allele 134 i 148 pz (kolor niebieski); *locus* L2.7: allele 162 i 178 pz (kolor zielony); *locus* L7.8: allele 295 i 307 pz (kolor czarny); standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



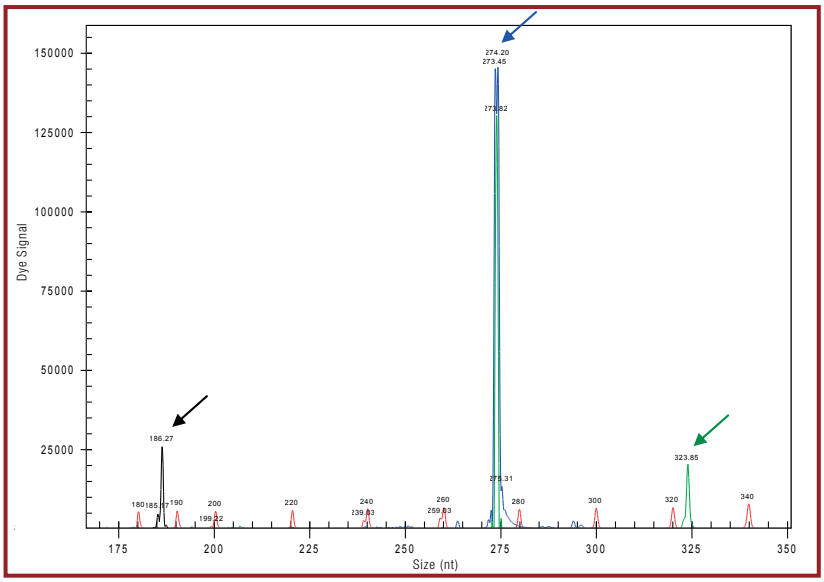
Ryc. 79. Profil genetyczny materiału porównawczego (brzoza, próbka nr 5) w *locus* L5.5: allele 134 i 148 pz (kolor niebieski); *locus* L2.7: allele 162 i 178 pz (kolor zielony); *locus* L7.8: allele 295 i 307 pz (kolor czarny); standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



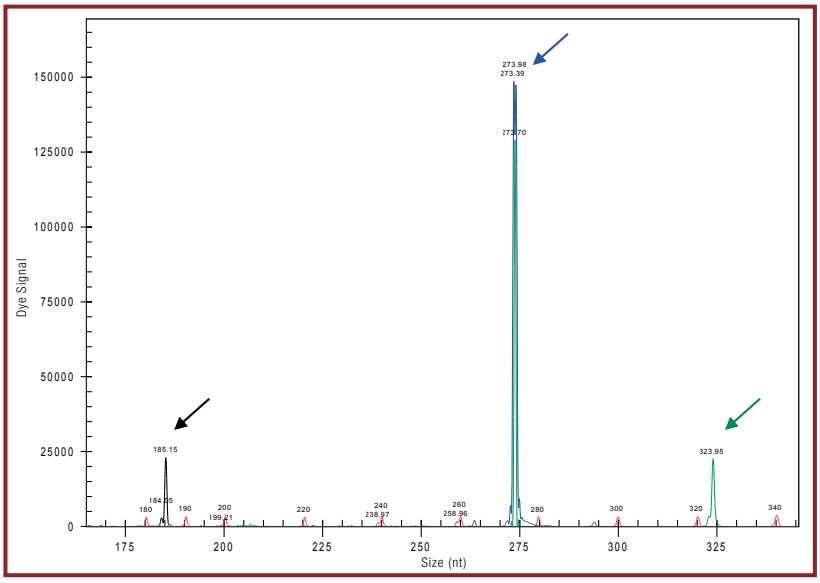
Ryc. 80. Profil genetyczny materiału dowodowego (brzoza, próbka nr 23) w mikrosatelitarnym *locus* L022: allele 189 i 195 pz (kolor zielony) i *locus* L2.3: allele 201 i 211 pz (kolor czarny); standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 81. Profil genetyczny materiału porównawczego (brzoza, próbka nr 5) w mikrosatelitarnym *locus* L022: allele 189 i 195 pz (kolor zielony); *locus* L2.3: allele 201 i 211 pz (kolor czarny); standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 82. Profil genetyczny materiału dowodowego (brzoza, próbka nr 23) w chloroplastowym *locus* trn1: allel 186 pz (kolor czarny); *locus* matK: allel 274 pz (kolor niebieski) i *locus* psb1: allel 324 pz (kolor zielony); standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)



Ryc. 83. Profil genetyczny materiału dowodowego (brzoza, próbka nr 5) w chloroplastowym *locus* trn1: allel 186 pz (kolor czarny); *locus* matK: allel 274 pz (kolor niebieski); *locus* psb1: allel 324 pz (kolor zielony); standard wielkości – kolor czerwony (źródło: archiwum IBL)

Tabela 7. Zestawienie profili genetycznych materiału dowodowego i porównawczego badanych próbek drewna brzozy brodawkowatej

Lp.	Typ materiału	Marker L2.3		Marker L2.7		Marker L5.5		Marker L7.8		Marker L022		Marker trn1	Marker psb1	Marker matK5
1	porównawczy	201	201	177	177	136	136	295	303	191	199	186	275	b.d.
2	porównawczy	203	211	177	177	136	152	281	292	183	193	185	275	325
3	porównawczy	197	201	177	177	123	144	307	317	165	177	185	274	325
4	porównawczy	201	201	177	177	134	136	297	303	183	191	185	273	324
5	porównawczy	201	211	162	178	134	148	295	307	189	195	186	274	324
6	porównawczy	201	201	162	177	134	148	295	307	183	191	185	273	325
7	porównawczy	201	201	177	184	138	148	299	299	b.d.	b.d.	185	273	325
8	porównawczy	216	224	177	191	134	148	301	301	179	191	186	275	322
9	porównawczy	201	201	175	177	134	148	285	295	177	179	185	273	325
10	dowodowy	201	211	177	180	132	158	299	301	175	181	185	273	323
11	dowodowy	191	197	177	180	134	140	299	301	181	191	187	273	324
12	dowodowy	201	201	160	160	134	146	295	301	193	193	185	274	325
13	dowodowy	203	211	b.d.	b.d.	130	138	299	309	187	191	185	273	324
14	dowodowy	201	201	152	154	138	138	299	305	179	195	187	273	0
15	dowodowy	201	214	152	160	138	138	299	307	179	193	185	274	324
16	dowodowy	203	203	177	180	138	138	301	303	179	195	185	274	324
17	dowodowy	201	224	160	162	138	140	297	303	177	191	185	273	323
18	dowodowy	201	201	177	177	134	138	305	307	177	191	187	273	324
19	dowodowy	201	224	154	158	134	144	299	301	181	191	185	275	324
20	dowodowy	197	201	b.d.	b.d.	123	144	297	301	181	191	185	273	324
21	dowodowy	201	224	164	164	134	140	307	309	179	185	274	285	b.d.
22	dowodowy	201	201	162	164	134	146	299	301	185	191	b.d.	b.d.	324
23	dowodowy	201	211	162	178	134	148	295	307	189	195	186	274	324
24	dowodowy	201	224	164	164	134	134	307	309	179	185	185	274	324

b.d. – brak danych
Kolorami wyróżniono identyczne profile genetyczne

Na podstawie wzorów alleli ośmiu rodzajów markerów, w tym pięciu markerów jądrowych (L2.3, L2.7, L5.5, L7.8 i L022) oraz trzech chloroplastowych cpSSR (trn1, psb1 i matK5) stwierdzono, że próbka drewna nr 23 (materiał dowodowy) miała taki sam profil genetyczny (201, 211, 162, 178, 134, 148, 295, 307, 189, 195, 186, 274, 324) jak próbka drewna nr 5 z pniaka stanowiącego materiał

porównawczy (ryc. 78–83). Pozostałe badane próbki drewna z materiału dowodowego nie wykazały podobieństwa do którejkolwiek z próbek drewna z materiału porównawczego.

Wartość prawdopodobieństwa identyczności P_{ID}, obliczona metodą Hedricka (2000), dla wszystkich ośmiu markerów zmienności DNA wyniosła 0,0200. To oznacza, że siła dyskryminacji użytych do identyfikacji drewna brzozy brodawkowatej markerów SSR i cpSSR wyniosła 0,98, a zatem prawdopodobieństwo, że materiał dowodowy (próbka nr 23) pochodzi z materiału porównawczego (próbka nr 5) osiągnęło 98,00%. Ta wartość jest wyższa (99,89%), jeśli uwzględni się wyłącznie markery mikrosatelitarne, dla których P_{ID} = 0,0011.

Oto opinia końcowa: materiał dowodowy (próbka nr 23) przed rozdzieleniem z próbką materiału porównawczego (próbka nr 5) stanowiła jedną całość z prawdopodobieństwem 99,89%.

4.

Podsumowanie

Szkodnictwo leśne, zwłaszcza kradzieże drewna z pnia czy też gotowego surowca, są przyczyną wielomilionowych strat Skarbu Państwa. Zmiana sytuacji na lepszą wymaga opracowania strategii i zdecydowanych działań powołanych do tego instytucji i formacji. Potrzebne jest poszukiwanie różnych metod identyfikacji sprawców, w tym wykorzystujących nowe technologie. Na terenach leśnych pilotażowo wprowadzono monitoring wizyjny w miejscach zagrożonych szkodnictwem; ponadto analizuje się zastosowanie systemu zabezpieczenia i identyfikacji metodą RFID. W tej sytuacji za zdecydowanie trafną należy uznać decyzję Lasów Państwowych zlecenia Instytutowi Badawczemu Leśnictwa badań naukowych nad wykorzystaniem analizy DNA do identyfikacji drewna. Metody identyfikacji drewna oparte na badaniu DNA stanowią nowoczesne narzędzie, pomocne w rozstrzygnięciu wątpliwości Policji i Straży Leśnej w sprawach dotyczących kradzieży drewna. Może się to okazać szczególnie przydatne w przypadkach zatarcia śladów kradzieży poprzez zniszczenie (spalenie) pniaka przez sprawców lub wówczas, gdy materiału dowodowego nie wystarcza do sporządzenia wzoru przyrostowego drzewa, czyli do wykorzystania mechanoskopii. Do badań DNA wystarczy niewielka ilość materiału organicznego, gdyż rodzaj tkanek (liść, igły, drewno, korzeń) oraz cechy ilościowe drzewa (pierśnica, wysokość i miąższość) nie mają tu znaczenia, ponieważ każda komórka organizmu zawiera identyczny kod genetyczny. To znakomicie ułatwia identyfikację osobników na podstawie DNA.

W analizach porównawczych profili DNA zestawia się co najmniej po jednej próbce materiału dowodowego i porównawczego, podobnie jak w metodach badania DNA w celu ustaleniu ojcostwa (Bal 2006). Materiałem dowodowym pobieranym do analiz DNA dla potrzeb procesowych Straży Leśnej mogą być wszelkie części organiczne drzewa: wyrzynki (najlepiej z łykiem) z drewna stosowego (wałki, dłużyce itp.) czy sortymentu tartacznego, a także igły i blaszki liściowe. W analizach

DNA druk.indd 113 2014-05-26 09:22:43

DNA kradzionego drewna materiał porównawczy zawsze stanowią pozostawione w lesie pniaki.

Na podstawie badań sosny, świerka, dębu, buka, olszy i brzozy wynika, że do pobrania materiału porównawczego do analiz DNA wystarczy kilka (6–10 sztuk) pniaków wskazanych przez Straż Leśną w miejscu kradzieży. Materiałem dowodowym może być np. wałek drewna stosowego czy dłużyca ze składnicy. W badaniach laboratoryjnych osiąga się wysokie prawdopodobieństwo identyczności dzięki stosowaniu markerów wybranych zależnie od gatunku drzewa (tab. 8).

Tabela 8. Markery DNA zalecane do precyzyjnej identyfikacji materiału dowodowego i porównawczego pochodzącego z drzew poszczególnych gatunków

Gatunek drzewa	Markery DNA			Prawdopodobieństwo identyczności (%)
	jądrowego	mitochondrialnego	chloroplastowego	
Sosna zwyczajna	SPAG 7.14 SPAC 12.5 PtTX3025 SsrPt-ctg4363	*nad*1	PCP45071 PCP4113 PCP30277 PCP71987 PCP26106 PCP87314 Pt30204 Pt71936	97,20
Świerk pospolity	SpAG-C1 SpAC1-H8 SpA-G2 SpAG-D1	*nad*1	–	99,79
Dąb szypułkowy Dąb bezszypułkowy	MSQ4 MSQ13 ssrQrZAG7 ssrQrZAG9102	–	DT CD	97,45
Buk zwyczajny	FS1–03 FS1–25 FCM5 Mcf11	–	ccmp4 ccmp7 ccmp10	98,78
Olsza czarna	L2.3 L2.7 L5.5 L7.8 L022	–	trn1 matK5 psb1	99,88
Brzoza brodawkowata	L2.3 L2.7 L5.5 L7.8 L022	–	trn1 matK5 psb1	99,89

Trwają badania naukowe nad identyfikacją i indywidualizacją gatunkową i jednostkową kolejnych gatunków drzew. Ponadto przed nauką stoją inne zadania, np. odkrycie takich markerów DNA sosny, świerka, dębu, buka, olszy i brzozy, które precyzyjnie wskazałyby miejsce pochodzenia kradzionego drewna w skali leśnictwa. Znane są jedynie markery DNA świerka pospolitego zdolne wykryć, skąd pochodzi badana próbka: z północnego wschodu czy południa Polski (Dering i Lewandowski 2009, Nowakowska 2009, 2010).

W **pobieraniu próbek drewna** przez pracowników Straży Leśnej w terenie należy kierować się ogólnymi przepisami zabezpieczania materiału do badań DNA stosowanymi przez techników Policji, uwzględniając ponadto kluczowe wskazówki wynikające z właściwości tkanek drewna.

Prawidłowa identyfikacja materiału dowodowego i porównawczego wymaga odpowiednich środków umożliwiających pobieranie próbek w terenie. Do pobrania próbek służy zestaw podręczny IBL DNA-1, na który składają się:

- pilarka spalinowa, siekierka, dłutko;
- taśma miernicza trzymetrowa, latarka elektryczna, aparat fotograficzny, lupa, plastikowe pojemniki na trociny, wodoodporna taśma klejąca, rękawiczki gumowe, skalówka, numerki plastikowe;
- torby papierowe, dwa wodoodporne pisaki, opakowania z folii na metryczki, lak, sznurek pakowy, nóż;
- komplet druków procesowych.

Pobieranie próbek wymaga zachowania podstawowych zasad BHP, zwłaszcza przy odcinaniu próbek drewna za pomocą pilarki spalinowej, siekiery lub dłuta. Niezachowanie ostrożności i praca niezgodna z instrukcją obsługi oraz przepisami BHP grozi uszczerbkiem na zdrowiu osoby pobierającej materiał.

Minimalna ilość materiału umożliwiająca analizę DNA to 100 mg, co odpowiada dwóm igłom sosnowym lub kawałkowi drewna wielkości zapałki. Materiał należy oznaczyć skalówką, nadać mu numer, wykonać zdjęcie i wypisać metryczkę.

Próbki powinny być umieszczone w kopertach papierowych opisanych wodoodpornym pisakiem, wraz z dokumentacją fotograficzną i opisem na policyjnych metryczkach. Dowody rzeczowe powinny znajdować się w przeznaczonym do tego celu magazynie. Przed wysyłką najlepiej przechowywać pobrany materiał w niskiej temperaturze, np. w przenośnym termosie z suchym lodem, unikając przy tym wysokiej wilgotności i ekspozycji próbek na światło słoneczne. Tak zabezpieczony materiał porównawczy i dowodowy można przesłać w zaadresowanej przesyłce pocztą kurierską do Laboratorium Genetyki Molekularnej.

Długoterminowe przechowywanie próbek – nawet do trzech – lat jest możliwe, ale wymaga temperatury rzędu –70°C. Wiek materiału pobranego w terenie wynosi do czterech lat dla drewna suchego i do paru miesięcy dla pniaków w lesie.

Czas wykonania ekspertyzy to od trzech do pięciu dni dla pojedynczych prób. Większa liczba przysłanych próbek może wymagać nawet dwóch tygodni. Warto

podkreślić, że dobrze zabezpieczony materiał roślinny gwarantuje wysoką precyzję i krótki czas oczekiwania na wyniki badań DNA drewna na potrzeby procesowe.

Szczegółową instrukcję zabezpieczania w terenie próbek drewna do analiz DNA przedstawiono w wytycznych opracowanych w 2010 r. dla DGLP w Warszawie oraz w filmie szkoleniowym *Analizy DNA drewna w walce z nielegalnym obrotem drewnem* (Nowakowska i Górniak 2010).

5.

Piśmiennictwo

Asif M. J., Cannon C. H. 2005. *DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species* (Gonystylus bancanus). Plant Molecular Biology Reporter 23: 185–192.

Avise J. C. 2008. *Tożsamość genetyczna i pochodzenie* [w:]*Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja*. Przekład pod red. J. M. Szymury. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego: 149–225.

Bal J. 2006. *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, wyd. 2.

Bowtell D. D. 1987. *Rapid isolation of eukaryotic DNA*. Analalytical Biochemistry 162: 463–465.

Branicki W., Kupiec T., Wolańska-Nowak P. 2008. *Badania DNA dla celów sądowych.* Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych. Kraków: 9–10.

Bruchwald A., Rymer-Dudzińska T., Dudek A., Michalak K., Wróblewski L., Zasada M., Tomusiak R. 2002. *Tablice miąższości grubizny drzewa oparte na średnicy pniaka*. Sylwan 1: 5–16.

Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M. T., Vendramin G. G., Garcia V., Frigerio J.-M., Echt C., Richardson T., Plomion C. 2004. *Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines*. Theoretical and Applied Genetics 109: 1204–1214.

Csaikl U. M., Glaz I., Baliuckas V., Petit R. J., Jensen J. S. 2002. *Chloroplast DNA variation of white oak in the Baltic countries and Poland*. Forest Ecology Management 156: 21–-222.

Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B. 1983. *A plant DNA minipreparation: version II*. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19–21.

Demesure B., Sodzi N., Petit R. J. 1995. *A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants*. Molecular Ecology 4: 129–131.

Dering M., Lewandowski A. 2009. *Finding the meeting zone: Where have the northern and southern ranges of Norway spruce overlapped?* Forest Ecology Management 259: 229–235.

Doyle J. J., Doyle J. L. 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. BRL Focus 12: 13–15.

Dumolin-Lapègue S., Pemonge M. H., Petit R. J. 1997. *An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants*. Molecular Ecology 6: 393–397.

Dzialuk A., Burczyk J. 2005. *Examination of chloroplast and nuclear microsatellite DNA sequences for individual identification of coniferous trees*. Problems of Forensic Sciences LXIV: 395–400.

Elsik C. G., Minan V. T., Hall S. E., Scarpa A. M., Williams C. G. 2000. *Low-copy microsatellite markers for* Pinus taeda *L*. Genome 43: 550–555.

Galton F. 1892. *Finger Prints*. http: //galton.org/books/finger-prints/.

Garrett B. L., Neufeld P. J. 2009. *Invalid Forensic Science Testimony and Wrongful Convictions*. Virginia Low Review 95 (1): 1–97.

Girdwoyń P. 2006. *Badania DNA we współczesnym niemieckim procesie karnym*. Studia Iuridica XLVI.

Głaz I. 2000. *Genetic cartography of oaks in Poland using PCR-RFLP markers of the chloroplast DNA*. Glas Šumary Pokuse 37: 481–487.

Grivet D., Heinze B., Vendramin G. G., Petit R. 2001. *Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA*. Molecular Ecology Notes 1: 345–349.

Gruza E., Goc M., Moszczyński J. 2008. *Kryminalistyka – czyli rzecz o metodach śledczych*. Wydawnictwa Akademickie i Profesjonalne. Warszawa: 518–539.

Grzegorczyk T. 1998. *Polskie postępowanie karne*. Wydawnictwa Prawnicze PWN. Warszawa: 438–477.

Grzegorczyk T. 1998. *Dowody w procesie karnym*. Warszawa: 84.

Grzegorczyk T. 2004. *Kodeks postępowania karnego*. Wydawnictwo Zakamycze: 564.

Grzeszczyk W. 2005. *Problematyka wykorzystania analizy DNA w postępowaniu karnym w świetle przepisów ustawy z dnia 17 grudnia 2004 r.* Prokuratura i Prawo 2005 1.

Grzeszyk Cz. 2004. *Kontrowersje w podejmowaniu opinii w kryminalistycznych ekspertyzach pismoznawczych (pisma ręcznego i podpisów)*. Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Handlu i Prawa. Warszawa: 216.

Gutekunst W. 1974. *Kryminalistyka.* Warszawa: 62.

Gutiérez J. P., Royo L. J., Álvarez I., Goyache F. 2005. *MolKin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information*. Journal of Heredity 96 (6): 718–721.

Hamrick J. L., Godt M. J. W., Sherman-Broyles S. L. 1992. *Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species*. New Forests 6: 95–124.

Hanausek T. 2005. *Kryminalistyka – zarys wykładu*. Wydawnictwo Zakamycze: 23.

Hedrick P. W. 2000. *Genetics of population*. Jones and Bartlett Publ. Boston USA.

Hołyst B. 2010. *Kryminalistyka*. Wyd. 12. Wydawnictwo Prawnicze LexisNexis. Warszawa.

Jagielska A. 2008. *Zastosowanie markerów genetycznych w identyfikacji gatunkowej modrzewia europejskiego (*Larix decidua *Mill.) i japońskiego (*Larix kaempferi *Sorg.) oraz ich mieszańców.* Leśne Prace Badawcze 69 (1): 21–25.

Jaroń W. 2006. *Szkodnictwo leśne w katowickiej dyrekcji Lasów Państwowych* [w:] *Problematyka współczesnych zagadnień szkodnictwa leśnego*. Postępy Techniki w Leśnictwie 94. Wydawnictwo Świat, SITLiD DGLP. Warszawa.

Kampfer S., Lexer C., Glossl J., Steinkellner H. 1998. *Characterizarion of* $(GA)_n$ *microsatellite* loci *from* Quercus robur. Hereditas 129: 193–196.

Kasprzak J. 2001. *Biegły i specjalista przed sądem – wybrane aspekty taktyczne*. Zeszyty Metodyczne 13: 72.

King R. C., Stanfield W. D. 2002. *Słownik terminów genetycznych.* Przekład zbiorowy pod red. W. Prus-Głowackiego. Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN. Poznań.

Klejnowska M. 2006. *Analiza śladów genetycznych jako dowód w procesie karnym. Cz. I.* Problemy Kryminalistyki 252.

Konarzewska M., Spólnicka M., Sołtyszewski I., Berent J. 2006. *Polimorfizm* locus *HUMHUU w populacji polskiej – doniesienie wstępne*. Archiwum Medyczne Sądownictwa Kryminalistycznego LVI: 99–102.

Kowalczyk P. 2011. *Badania DNA w orzecznictwie sądowym w sprawach karnych.* Prokuratura i Prawo 3.

Kremer A., Reviron M. P. 2004. *Dynamics and conservation of genetic diversity in forest ecosystems*. Forest Ecology Management 197: 1–2.

Kryszkiewicz M. 2011. *Sąd nie będzie szukał dowodów za prokuratora*. Dziennik Gazeta Prawna 246: B8.

Kulju K. K. M., Pekkinen M., Varvio S. 2004. *Twenty-three microsatellite primer pairs for* Betula pendula (Betulaceae). Molecular Ecology Notes 4: 471–473.

Kuryłowicz M. 1995. *Słownik łacińskich terminów, zwrotów i sentencji prawniczych.* Lubelskie Wydawnictwa Prawnicze.

Kurzępa B. 2004. *Zmiany w przepisach regulujących problematykę dowodów w procesie karnym w rozdziałach 19–21 kodeksu postępowania karnego wprowadzone nowelą z 10 stycznia 2003 r.* [w:] Sobolewski Z., Artymiak G., Kłak C. (red.). *Problemy znowelizowanej procedury karnej*. Wydawnictwo Zakamycze: 129–147.

Kwiatkowska-Darul V. 2004. *Czynności procesowo-kryminalistyczne w polskich procedurach. Materiały z konferencji naukowej i IV Zjazdu Katedr Kryminalistyki*. Wydawnictwo UMK. Toruń.

Lewandowska M. 2006. *Analiza DNA w świetle ustawy z dna 17 grudnia 2004 roku o zmianie ustawy o Policji oraz ustawy – Kodeks postępowania karnego*. Prokuratura i Prawo 6: 115.

Lewandowski A. 2010. *Materiały konferencyjne pt. „Potrzeby i możliwości zmian obszarów regionów pochodzenia leśnego materiału podstawowego oraz wykorzystania leśnego materiału rozmnożeniowego poza regionem jego pochodzenia"*. Biuro Nasiennictwa LP, DGLP, IBL. Sękocin Stary.

Lewontin R. C. 1972. *The apportionment of human diversity*. Evol. Biol. 6: 381–398.

Lisiecki M. J., Jaguszewska J. 2004. *Efektywność wykorzystania śladów kryminalistycznych* [w:] *Czynności procesowo-kryminalistyczne w polskich procedurach*. Wydawnictwo UMK. Toruń: 208–209.

Łukaszewicz A. 2011. *Sprawniejsze procesy*. Prawo co Dnia 296: C2.

Magri D., Vendramin G. G., Comps B., Dupanloup I., Geburek T., Gömöry D., Latałowa M., Litt T., Paule L., Roure J. M., Tantau I., van der Knaap W. O., Petit R., Beaulieu J. L. 2006. *A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences*. New Phytologist 171 (1): 199–221.

Morand M.-E., Brachet S., Rossignol P., Dufour J., Frascaria-Lacoste N. 2002. *A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations*. Molecular Ecology 11: 377–385.

Muir G., Schlötterer C. 2005. *Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite* loci *differentiating two hybridizing oaks (*Quercus *spp.).* Molecular Ecology 14: 549–561.

Nei M. 1978. *Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals*. Genetics 89: 583–590.

Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.

Nei M., Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press Inc. Oxford: 87–264.

Newton A. C., Allnutt T. R., Gillies A. C. M., Lowe A. J., Ennos R. A. 1999. *Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species*. Tree 14 (4): 140–141.

Nowak Z. 2003. *Szkodnictwo leśne. Poradnik dla Służby Leśnej, w tym dla Straży Leśnej, oraz dla innych przyrodniczych służb ochronnych*. Wydawnictwo Świat, ZG SITLiD: 174.

Nowak Z. 2006. *Rodzaje szkodnictwa leśnego w Lasach Państwowych* [w:] *Problematyka współczesnych zagadnień szkodnictwa leśnego*. Postępy Techniki w Leśnictwie 94. Wydawnictwo Świat, SITLiD DGLP. Warszawa.

Nowakowska J. A. 2006. *Zastosowanie markerów DNA (RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS) w genetyce drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i łowiectwie*. Leśne Prace Badawcze 1: 73–101.

Nowakowska J. 2007a. *Zmienność genetyczna polskich wybranych populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris *L.) na podstawie analiz polimorfizmu DNA*. Rozprawa habilitacyjna, IBL Warszawa: 118.

Nowakowska J. 2007b. *Czy istnieją różnice między świerkiem pospolitym z północnego i południowego zasięgu występowania w Polsce na podstawie analiz DNA?* Notatnik Naukowy IBL 2 (76): 4.

Nowakowska J. A. 2009. *Mitochondrial and nuclear DNA differentiation of Norway spruce* (Picea abies *[L.] Karst.*) *populations in Poland.* Dendrobiology 61: 119–129.

Nowakowska J. 2010. *Określenie struktury genetycznej populacji sosny zwyczajnej i świerka pospolitego w wybranych regionach pochodzenia z weryfikacją granic regionów po uwzględnieniu zróżnicowania genetycznego populacji*. Dokumentacja naukowa z tematu badawczego BLP-309. Sękocin Stary: 217.

Nowakowska J. A. 2011. *Application of DNA markers against illegal logging as a new tool for the Forest Guard Service*. Folia Forestalia Polonica, series A, 53 (2): 142–149.

Nowakowska J., Bastien C., Musch B. 2005. *Genetic variability of Polish Scots pine provenances assessed with microsatellite markers*. Proceedings from International Workshop „Analysis of microsatellite sequences in Scots pine". Sękocin-Las,

24–27.08.2004, Nowakowska J. (red.). FRI, PROFOREST Centre of Excellence. Warszawa: 79–88.

Nowakowska J., Górniak A. 2010. *Analizy DNA drewna w walce z nielegalnym obrotem drewna*. Film ze środków DGLP w ramach tematu badawczego BLP-333. Realizacja Skrzat Fotografia Film Sławomir Wąsik. IBL Sękocin Stary.

Nowakowska J. A., Oszako T., Bieniek J., Rakowski K. 2007. *Charakterystyka genetyczna PCR-RFLP oraz ocena zdrowotności wybranych populacji dębu elbląskiego i krotoszyńskiego*. Leśne Prace Badawcze 3: 33–51.

Nowakowska J. A., Oszako T. 2008. *Stan zdrowotny buków w Nadleśnictwie Siewierz a ich zróżnicowanie genetyczne określone na podstawie analiz chloroplastowego DNA*. Sylwan 152 (9): 11–20.

Oddou-Muratorio S., Petit R. J., Le Guerroué B., Guesnet D., Demesure B. 2001. *Patterns of seed dispersal in a scattered forest tree (*Sorbus torminalis*) based on multi-scale investigation of population genetic structure for chloroplast DNA* [w:] *Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions*. Müller-Starck G., Scubert R. (red.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht-Boston-London 271–280.

Pasternak T. 2006a. *Zarys historii Straży Leśnej* [w:] *Problematyka współczesnych zagadnień szkodnictwa leśnego*. Postępy techniki w leśnictwie 94, Warszawa.

Pasternak T. 2006b. *Ochrona przed szkodnictwem leśnym w wybranych krajach Europy* [w:] *Problematyka współczesnych zagadnień szkodnictwa leśnego*. Postępy techniki w leśnictwie 94. Warszawa.

Pasternak T. 2007. *Ochrona lasów przed szkodnictwem leśnym* [w:] *Raport o stanie lasów w Polsce 2006*. Warszawa.

Pasternak T. 2010. *Raport zwalczania szkodnictwa leśnego za 2010 rok*. DGLP, www.lasy.gov.pl.

Pasternak T. 2012. *Raport zwalczania szkodnictwa leśnego za 2011 rok – część analityczna*. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, www.lasy.gov.pl.

Pastorelli R., Smulders M. J. M., Westende Van't W. P. C., Vosman B., Giannini R., Vettori C. Vendramin G. G. 2003. *Characterization of microsatellite markers in* Fagus sylvatica *L.,* Fagus orientalis *Lipsky*. Molecular Ecology Notes 3: 76–78.

Pawelec K. J. 2010. *Proces dowodzenia w postępowaniu karnym*. Wydawnictwo Prawnicze LexisNexis. Warszawa.

Petit R. J. 1999. *Diversité génétique et histoire des populations d'arbres forestières*. Rozprawa habilitacyjna. Université de Paris-Sud, France.

Petit R. J., Brewer S., Bordács S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csaikl U. M., van Dam B., Deans J. D., Espinel S., Fineschi S., Finkeldey R., Glaz I., Goicoechea P. G., Jensen J. S., König A. O., Lowe A. J., Madsen S. F., Mátyás G., Munro R. C., Popescu F., Slade D., Tabbener H., Taurchini D., de Vries S. G. M., Ziegenhagen B., Beaulieu J. L., Kremer A. 2002a. *Identification of refugia and post-glacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence*. Forest Ecology Management 156: 49–74.

Petit R. J., Csaikl U. M., Bordács S., Burg K., Coart E., Cottrell J., van Dam B., Deans J. D., Dumolin-Lapègue S., Fineschi S., Finkeldey R., Gillies A., Glaz I., Goicoechea P. G., Jensen J. S., König A. O., Lowe A. J., Madsen S. F., Mátyás G., Munro R. C., Olalde M.,

Pemonge M.-H., Popescu F., Slade D., Tabbener H., Taurchini D., de Vries S. G. M., Ziegenhagen B., Kremer A. 2002b. *Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations*. Forest Ecology Management 156: 5–26.

Petit R. J., Csaikl U. M., Bordács S., Burg K., Coart E., Cottrell J., van Dam B., Deans J. D., Dumolin-Lapègue S., Fineschi S., Finkeldey R., Gillies A., Glaz I., Goicoechea P. G., Jensen J. S., König A. O., Lowe A. J., Madsen S. F., Mátyás G., Munro R. C., Olalde M., Pemonge M.-H., Popescu F., Slade D., Tabbener H., Taurchini D., de Vries S. G. M., Ziegenhagen B., Kremer A. 2003. *Corrigendum to „Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations".* Forest Ecology Management 156, 157: 595–599.

Petit R. J., Pineau E., Demesure B., Bacilieri R., Ducousso A. 1997. *Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94: 9996–10001.

Pfeiffer A., Olivieri A. M., Morgante M. 1997. *Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce* (Picea abies *K.*). Genome 40: 411–419.

Pływaczewski W., Kędzierska G. (red.). 2001. *Leksykon policyjny*. Wyższa Szkoła Policji w Szczytnie. Szczytno: 321.

Provan J., Soranzo N., Wilson N. J., McNicol J. W., Forrest G. I., Cottrell J. 1998. *Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris *L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats.* Proceedings of the Royal Society of London B 265: 1697–1705.

Qiagen. 2002. *Genomic DNA purification. Technical hints, applications, and protocols*. www.qiagen.com.

Rajora O. P., Rahman M. H. 2003. *Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus x canadensis*) cultivars*. Theoretical and Applied Genetics 106: 470–477.

Raymond M., Rousset F. 1995. *GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism*. Journal of Heredity 86: 248–249.

Robledo-Arnuncio J. J., Smouse P. E., Gil L., Alía R. 2004. *Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris *L.) in central Spain*. Forest Ecology and Management 197: 245–255.

Sambrook J., Russell D. W. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, Vol. 1, 2.

Seton C. 1988. *Life for sex killer who sent decoy to take genetic test.* The Times (London).

Sławik K. 2004. *Wybrane aspekty z działalności biegłych, tłumaczy i specjalistów* [w:] *Czynności procesowo-kryminalistyczne w polskich procedurach*. Wydawnictwo UMK. Toruń: 47.

Sławik K. 2005. *Kryminalistyka w związku z procesem karnym, kryminologia i wiktymologią*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego. Szczecin: 174–176.

Sławik K. 2010. *Prawno-kryminalistyczne środki przeciwdziałania zagrożeniom (zwłaszcza osób starszych)*. Wydawnictwo Naukowe Semper, Warszawa.

Sołtyszewski I. (red.). 2007. *Badania kryminalistyczne. Wybrane aspekty*. Olsztyn: 11–34.

Stojanowska W. 2000. *Uwagi do Rekomendacji Komitetu Ministrów Rady Europy Nr (92) 1 z 10 lutego 1992 r. w sprawie wykorzystania analizy DNA w postępowaniu karnym*. Prawo i Medycyna 5.

Soranzo N., Alia R., Provan J., Powell W. 2000. *Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site* locus *provides new insights into the postglacial history of European* Pinus sylvestris *populations*. Molecular Ecology 9: 1205–1211.

Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. *Characterization of microsatellite* loci *in* Pinus sylvestris *L.* Molecular Ecology 7: 1260–1261.

Sperisen C., Büchler U., Gugerli F., Mátyás G., Geburek T. 2001. *Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce*. Molecular Ecology 10: 257–263.

Steinkellner H., Fluch S., Turetschek E., Lexer C., Streiff R., Kremer A., Burg K., Glossl J. 1997. *Identification and characterization of* $(GA/CT)_n$ *– microsatellite* loci *from* Quercus-petraea. Plant Molecular Biology 33: 1093–1096.

Sułkowska M., Kowalczyk J., Przybylski P. 2008. *Zmienność genetyczna i ekotypowa buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica *L.) w Polsce*. Leśne Prace Badawcze 69 (2): 133–142.

Szyp-Borowska I., 2005. *Mapowanie* loci *cech ilościowych jako nowe narzędzie w hodowli selekcyjnej drzew leśnych*. Leśne Prace Badawcze 1: 99–107.

Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. *Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA*. Plant Molecular Biology 17: 1105–1109.

Tibbits J. F. G., McManus L. J., Spokevicius A. V., Bossinger G. 2006. *A rapid method for tissue collection and high throughput of genomic DNA from mature trees*. Plant Molecular Biology Reporter 24: 1–11.

Tomaszewski T. 1998. *Dowód z opinii biegłego w procesie karnym*. Kraków: 112.

Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. 1996. *A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in* Pinaceae. Molecular Ecology 5: 595–598.

Vettori C., Vendramin G. G., Anzidei M., Pastorelli R., Paffetti D., Giannini R. 2004. *Geographic distribution of chloroplast variation in Italian populations of beech (*Fagus sylvatica *L.).* Theoretical and Applied Genetics 109: 1–9.

Vornam B., Decarli N., Gailing O. 2004. *Spatial distribution of genetic variation in natural beech stands (*Fagus sylvatica *L.) based on microsatellite markers*. Conservation Genetetics 5: 561–570.

Waits L. P., Luikart G., Taberlet P. 2001. *Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines*. Molecular Ecology 10 (1): 249–256.

Weising K., Gardner R. C. 1999. *A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms*. Genome 42: 9–19.

Widacki J. (red.). 1999. *Kryminalistyka*. Wydawnictwo C.H. Beck, Warszawa: 16; 157; 236; 290 i nast.

Wójcikiewicz J. 2004. *„Trałowanie" w polskim procesie karnym (art. 192a k.p.k.)* [w:] *Czynności procesowo-kryminalistyczne w polskich procedurach*. Wydawnictwo UMK. Toruń: 60.

Wójcikiewicz J. 2008. *Badania DNA dla celów sądowych*. Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych. Kraków.

Wunsch A., Hormaza J. I. 2002. *Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium *L.) genotypes using peach* (Prunus persica *(L.) Batsch*) *SSR sequences*. Heredity 89: 56–63.

Wysocka J., Kapińska E., Cybulska L., Rebała K., Szczerkowska Z. 2008. *Identyfikacja osobnicza w oparciu o analizę 11 polimorficznych* loci *DNA typu STR. Badania populacji Polski północnej z wykorzystaniem zestawu AmpFISTR® SEfiler™ kit*. Annales Academiae Medicae Gedanensis 38: 91–96.

Yazdani R., Scotti I., Jansson G., Plomion C., Mathur G. 2003. *Inheritance and diversity of simple sequence repeat (SSR) microsatellite markers in various families of* Picea abies. Hereditas 138: 219–227.

Yeh F. C., Boyle T. J. B. 1997. *Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits*. Belgian Journal of Botany 129: 157.

Załęski A., Zajączkowska B., Matras J., Sabor J. 2000. *Leśna regionalizacja nasienna dla nasion i sadzonek w Polsce*. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, DGLP, IBL. Warszawa.

Zhuk A., Veinberga I., Daugavietis M., Rungis D. 2008. *Cross-species amplification of* Betula pendula *Roth. Simple sequence repeats markers in* Alnus *species*. Baltic Forestry 14(2/27): 116–121.

Zielski A., Krąpiec M. 2004. *Dendrochronologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 328.

6.

Słownik pojęć genetycznych i prawniczych

a contrario (łac.) – wnioskowanie z przeciwieństwa; prowadzi do wniosków przeciwnych w porównaniu z wnioskowaniem z analogii

allel – jedna z możliwych, różniących się budową → DNA form genu

amplifikacja – namnażanie fragmentu → DNA z jednej nici (matrycy) do wielu tysięcy kopii

CCTV (ang. *Closed Circuit TeleVision*) – telewizja przemysłowa, monitoring; system nadzorowania obszaru za pomocą kamer w celu zwiększenia bezpieczeństwa; podgląd z kamer zwykle jest udostępniany wyłącznie na stanowiskach ochrony w celu monitorowania potencjalnie niebezpiecznych zachowań

czynności sprawdzające – formalne czynności organów uprawnionych podejmowane przed wszczęciem postępowania w celu ustalenia, czy popełniono przestępstwo, i zebrania dowodów

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy, substancja chemiczna będąca nośnikiem informacji genetycznej, występująca we wszystkich żywych organizmach w jądrze komórkowym (DNA jądrowe) i w organellach (→ DNA organellowe); łańcuch DNA tworzy podwójną, skręconą nić – podwójną helisę, zbudowaną z wielu pojedynczych par zasad A, T, C i G

DNA organellowe – DNA zawarte w chloroplastach i mitochondriach

dochodzenie – forma prowadzenia postępowania przygotowawczego w sprawach o przestępstwa niezakwalifikowane do prowadzenia w formie → śledztwa; wszczynane przez prokuratora, policję lub inny uprawniony organ; nie wymaga sporządzenia postanowienia o przedstawieniu zarzutów ani o zamknięciu dochodzenia (jeśli podejrzany nie jest zatrzymany ani tymczasowo aresztowany); jego cele to: ustalenie, czy przestępstwo zostało popełnione; wyjaśnienie okoliczności sprawy, wykrycie i (w razie potrzeby) ujęcie sprawcy; zebranie informacji o podejrzanym oraz utrwalenie dowodów dla sądu

ex officio (łac.) – z urzędu

fenotyp – zespół cech morfologicznych pojedynczego organizmu

genom – całość informacji genetycznej organizmu zawartej w → DNA jądrowym i organellowym (w chloroplastach i mitochondriach)

genotyp – charakterystyka genetyczna osobnika zawierająca informację genetyczną pochodzącą od obydwojga rodziców

G_{ST}, F_{ST} – współczynniki zmienności genetycznej, wyrażające stosunek → zmienności międzypopulacyjnej do → zmienności całkowitej

haplotyp – kombinacja → alleli na poziomie pojedynczej liczby chromosomów, np. w → mtDNA

***h* Nei** – heterozygotyczność danego → *locus*, określona metodą Nei (1987)

H_S – średnia → zmienność wewnątrzpopulacyjna

H_T – całkowita → zmienność międzypopulacyjna

in dubio pro reo (łac.) – domniemanie niewinności: zasada, według której wątpliwości należy rozstrzygać na korzyść oskarżonego

locus (łac., l. mn. ***loci***) – region/regiony (miejsca) → DNA, w których występują → allele

marker genetyczny – fragment → DNA wykorzystywany do identyfikacji gatunków, osobników i populacji

migracja elektroforetyczna (elektroforeza) – rozdział ujemnie naładowanych cząsteczek → DNA umieszczonych w żelu i poddanych migracji w polu elektrycznym

mikrosatelitarne DNA (ang. *Simple-Sequence Repeat*) – sekwencje krótkich powtórzeń par zasad nukleinowych w łańcuchu → DNA

modus operandi (łac.) – sposób postępowania; charakterystyczny, powtarzający się sposób działania sprawcy przy popełnianiu przestępstw, a także przed jego popełnieniem oraz po nim; poznanie takiego samego sposobu postępowania w wypadku kilku przestępstw ułatwia wykrycie sprawcy

mtDNA – mitochondrialne DNA

mutacja genowa – zmiana w budowie łańcucha DNA; może być korzystna, niekorzystna lub obojętna, dziedziczna lub niedziedziczna

PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy, metoda amplifikacji polimorficznych sekwencji → DNA, polegająca na powieleniu odcinka DNA bez klonowania, umożliwiająca jego szybkie zwielokrotnienie i skracająca tym samym czas badań DNA; jej zastosowanie pozwala na określenie → genotypów → *loci*, nawet w wypadku bardzo starych i niewielkich śladów biologicznych; do analizy wykorzystuje się np. krew, ślinę, włosy z cebulkami, kości i zęby

postępowanie przygotowawcze – faza postępowania karnego obejmująca → śledztwo lub → dochodzenie, czynności niecierpiące zwłoki oraz przygotowanie i wniesienie do sądu aktu oskarżenia. Jest wszczynane, jeśli istnieje podejrzenie popełnienia przestępstwa, w celu: ustalenia, czy został popełniony czyn zabroniony i czy stanowi on przestępstwo; wykrycia i w razie potrzeby ujęcia sprawcy; zebrania danych o nim; wyjaśnienia okoliczności sprawy; zabezpieczenia i utrwalenia dowodów. Obejmuje m.in. przesłuchania i opinie biegłych, zakończone skierowaniem akt sprawy do sądu (wraz z aktem

oskarżenia) lub umorzeniem postępowania, prowadzone przez prokuratora, a w pewnym zakresie także przez inne organy (np. przez strażników leśnych na podstawie ustawy o lasach)

PIC (ang. *Polymorphism Information Content*) – procent → *loci* → polimorficznych, miara przydatności danego → markera do badań porównawczych

polimorfizm – występowanie różnych form → alleli w danym → *locus*; szerzej – zmienność genetyczna gatunku

pz – pary zasad, jednostka długości fragmentów → DNA

RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) – → polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, czyli sekwencji → DNA, które są rozpoznawane i cięte przez specyficzne enzymy (restryktazy)

sąd *meriti* – sąd właściwy do rozpoznania sprawy

sekwencja DNA – fragment → DNA złożony z par zasad A (adenina), T (tymina), C (cytozyna) i G (guanina)

SSR (ang. *Simple-Sequence Repeat*) – → mikrosatelitarne DNA

starter nukleotydowy – niewielki fragment jednoniciowego → DNA, komplementarny do DNA matrycy, od którego bierze początek → amplifikacja łańcucha DNA w reakcji → PCR

STS (ang. *Sequence-Tagged-Site*) – miejsca znaczone sekwencyjnie; fragmenty → DNA różnicujące osobniki na podstawie obecności lub braku kilkunastu par zasad

śledztwo – forma prowadzenia postępowania przygotowawczego w sprawach o najpoważniejsze przestępstwa (określonych w art. 309 § 1 pkt 1 do 5 k.p.k.), np. zbrodni i występków, gdy osobą podejrzaną jest sędzia, prokurator, funkcjonariusz Policji, ABW, AW, CBA, SG, ŻW, finansowych organów dochodzenia lub nadrzędnych, a także innych, uznanych przez prokuratora za sprawy zawiłe lub o dużej wadze

środki odwoławcze – środki służące kontroli nieprawomocnych orzeczeń, zarządzeń lub czynności procesowych, obejmujące środki zwyczajne (apelacja, zażalenie, sprzeciw od wyroku nakazowego) i nadzwyczajne (kasacja, wznowienie postępowania)

zabezpieczenie majątkowe – środek karnoprocesowy służący zapewnieniu wykonalności przyszłego orzeczenia w zakresie kar i środków karnych o charakterze majątkowym lub roszczeń o naprawienie szkody; środek przymusu stosowany wobec osoby podejrzanej lub oskarżonej o popełnienie przestępstwa lub wykroczenia przeciwko mieniu, polegający na ograniczeniu możliwości dysponowania majątkiem przez podejrzanego (zabezpieczenie mienia), tak aby nie mógł się go pozbyć i uniemożliwić wykonanie orzeczenia

zmienność międzypopulacyjna – występowanie różnych form → alleli różnicujących dane populacje

zmienność całkowita – zmienność fragmentów → DNA w obrębie danej populacji