



Praca oryginalna  
Original paper

Bartosz M. Pencakowski<sup>1</sup>, Miron Tokarski<sup>2</sup>, Anna Jonkisz<sup>2</sup>, Matylda Czosnykowska-Lukacka<sup>2</sup>, Ewa Lenard<sup>3</sup>, Małgorzata Małodobra-Mazur<sup>2</sup>

## Profilowanie genetyczne dębów (*Quercus* spp.) DNA profiling of oaks (*Quercus* spp.)

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

<sup>2</sup>Zakład Technik Molekularnych, Katedra Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

<sup>3</sup>Herbarium Muzeum Przyrodniczego Uniwersytetu Wrocławskiego, Polska

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Biotechnology, Wrocław Medical University, Poland

<sup>2</sup>Molecular Techniques Unit, Department of Forensic Medicine, Wrocław Medical University, Poland

<sup>3</sup>Herbarium of Museum of Natural History, Wrocław University, Poland

### Streszczenie

**Cel pracy:** Botanika sądowa potrzebuje narzędzi do weryfikacji wartości, jaką materiał pochodzenia roślinnego wnosi do postępowania dochodzeniowego. Biologia molekularna dostarcza technik umożliwiających porównywanie materiału pobranego z miejsca zdarzenia z innym biologicznym materiałem dowodowym. W pracy zaproponowano zestaw siedmiu *loci* markerów wykorzystujących krótkie powtórzenia tandemowe (STR), służących do profilowania genetycznego dębów (*Quercus* spp.). Przy ich doborze kierowano się kryterium najwyższej heterozygotyczności stwierdzonej w literaturze. Powodem, dla którego wybrano dęby na przedmiot badań, jest ich rozpowszechnienie na półkuli północnej oraz potrzeba opracowania metody otrzymywania porównywalnych profili genetycznych materiału dochodzeniowego pochodzenia roślinnego.

**Materiał i metody:** W ramach badania przeprowadzono weryfikację specyficzności starterów względem wybranych gatunków dębu. Przeanalizowano 23 gatunki, w tym większość wcześniej badanych, w kierunku obecności wybranych *loci*. Po izolacji DNA sekwencje STR zostały poddane amplifikacji przy wykorzystaniu reakcji multipleksowej PCR. Produkty amplifikacji oznaczono metodą elektroforezy kapilarnej. Częstość genotypów obliczono za pomocą testu  $\chi^2$ .

**Wyniki:** Kompletne profile genetyczne uzyskano dla 13 spośród 23 przeanalizowanych gatunków dębu.

**Wnioski:** Niekompletne profile genetyczne mogą być wynikiem degradacji DNA lub mniejszej homologii w miejscach wiązania starterów. Kompletne profile uzyskano dla większości analizowanych gatunków, jednak otrzymano także niekompletne profile dla gatunków, u których spodziewano się uzyskania pełnych profili. Może to wynikać z utraty jakości DNA na skutek procesów starzenia obejmujących badany materiał roślinny oraz nieodpowiednich warunków jego przechowywania lub metody konserwacji.

**Słowa kluczowe:** profilowanie DNA, multipleks PCR, STR, dęby, *Quercus*.

### Abstract

**Aim of the study:** Forensic botany demands tools to verify the value of plant-origin evidence brought into the process of criminal investigation. Molecular biology provides techniques for comparing material from the crime scene with other biological material of evidence. In this paper, we propose a set of seven markers based on Short Tandem Repeats (STRs) *loci* for DNA profiling of *Quercus* spp. STR markers of the highest observed heterozygosity were selected, according to available literature. Oaks were chosen due to their wide dissemination in the northern hemisphere. They served as an object of study to develop a method for obtaining comparable genetic profiles of plant evidence material.

**Material and methods:** In the study, we verified the specificity of primers towards selected species of oaks. Twenty-three species, including most of those previously studied, were investigated for the presence of selected *loci*. After

DNA extraction, STR sequences were amplified using multiplex PCR, and amplification products were then analysed with capillary electrophoresis. The frequency of genotypes was tested with the  $\chi^2$  test.

**Results:** Out of 23 investigated species of oak, full genetic profiles were obtained for 13 species.

**Conclusions:** An incomplete genetic profile may result from DNA degradation or lower homology in primer binding sites. Full profiles were successfully obtained for most of the species tested; however, deficient profiles were yielded in species for which a full profile was expected. This may be due to the loss in DNA quality caused by ageing processes of plant material and inappropriate storage conditions or method of preservation.

**Key words:** DNA profiling, multiplex PCR, STR, oaks, *Quercus*.

## Wprowadzenie

Gatunki należące do rodzaju *Quercus* występują głównie na półkuli północnej. Spotyka się je w różnych siedliskach od strefy klimatu umiarkowanego aż po górskie regiony strefy tropikalnej. Do dziś opisano ok. 600 gatunków dębu. Większość z nich ma postać drzew, tylko część występuje jako krzewy. Liście wykazują różnice morfologiczne, a owoce, zwane żołędziami, składają się z orzecha i miseczki owocowej [1]. W Polsce występują trzy gatunki dębu: *Q. robur*, *Q. petraea* i *Q. pubescens*. Poza nimi analizie poddano również gatunki, które nie rosną w Polsce w stanie dzikim, jednak występują w innych regionach Europy, w Azji lub Ameryce Północnej, w stanie dzikim lub w uprawie, w parkach, arboretach i zieleni miejskiej.

Celem badania była weryfikacja specyficzności zastosowanych starterów względem największej możliwej liczby gatunków dębu. Analizie poddano próbki następujących gatunków: *Q. alba*, *Q. cerris*, *Q. coccifera*, *Q. coccinea*, *Q. dentata*, *Q. falcata*, *Q. frainetto*, *Q. griffithii*, *Q. ilex*, *Q. imbricaria*, *Q. infectoria*, *Q. libani*, *Q. macranthera*, *Q. magnoliifolia*, *Q. nigra*, *Q. palustris*, *Q. petraea*, *Q. phellos*, *Q. pubescens*, *Q. rotundifolia*, *Q. robur*, *Q. rubra*, *Q. serrata*, *Q. shumardii*, *Q. suber*, *Q. trojana*, *Q. × schochiana*, *Q. × hispanica*.

W badaniu zastosowano siedem markerów wykorzystujących krótkie powtórzenia tandemowe (STR), wytypowanych na podstawie omówionej w literaturze największej obserwowanej heterozygotyczności [2]. Zestaw starterów do reakcji multipleksowej obejmował cztery EST-STR (obecne w cDNA) [3] oraz trzy genomowe STR (obecne wyłącznie

## Introduction

Representatives of the genus *Quercus* mainly inhabit the Northern Hemisphere. They are found in various habitats, from the temperate climatic zone to the mountainous tropical regions. Over 600 oak species have been discovered to date. Most species are trees, some are shrubs, with leaves characterised by various morphologies, but with a specific type of fruit, the acorn, which is a type of nut embedded in a cupule [1]. In Poland, three species of oaks are found: *Q. robur*, *Q. petraea*, and *Q. pubescens*. In addition to these, the subject of this study also encompasses species not found in the wild in Poland but present in other parts of Europe or in Asia or North America, wild or cultivated, found in parks, arboreta, and urban greenery.

Therefore, the aim of the research was to verify the specificity of the primers used in this study in relation to the greatest possible number of species. The samples were from the following species: *Q. alba*, *Q. cerris*, *Q. coccifera*, *Q. coccinea*, *Q. dentata*, *Q. falcata*, *Q. frainetto*, *Q. griffithii*, *Q. ilex*, *Q. imbricaria*, *Q. infectoria*, *Q. libani*, *Q. macranthera*, *Q. magnoliifolia*, *Q. nigra*, *Q. palustris*, *Q. petraea*, *Q. phellos*, *Q. pubescens*, *Q. rotundifolia*, *Q. robur*, *Q. rubra*, *Q. serrata*, *Q. shumardii*, *Q. suber*, *Q. trojana*, *Q. × schochiana*, and *Q. × hispanica*.

For research purposes, seven markers based on Short Tandem Repeats (STRs) were utilised, typed according to the available literature by the highest observed heterozygosity [2]. The set of primers in multiplex is composed of four EST-STRs (present in cDNA) [3] and three genomic STRs (present in gDNA only) [4]. Forensic botany, which is constant-

w gDNA) [4]. Dynamicznie rozwijająca się botanika sądowa często korzysta z technik stosowanych w biologii molekularnej do precyzyjnej analizy śladów występujących na miejscu zdarzenia. Techniki biologii molekularnej są np. używane przy identyfikacji roślin psychoaktywnych [5]. Podjęto udane próby profilowania DNA z materiału dochodzeniowego pochodzącego z dębu [6] i opracowano profilowanie techniką multiplex dla *Olea europaea* [7]. Ze względu na szeroki zasięg występowania dębu istotne znaczenie ma opracowanie zestawu markerów do profilowania jak największej liczby gatunków.

Dotychczas przeprowadzono kilka badań populacji dębów przy wykorzystaniu markerów STR. Opracowano zestawy markerów EST-STR pod kątem dokładniejszego zbadania genetyki populacji *Fagaceae* [8]. Przeprowadzono badania różnorodności genetycznej populacji gatunków takich jak *Q. acutissima* [9], *Q. petraea* [10] i *Q. mongolica var. crispula* [11]. Markery mogą być też wykorzystywane z dobrym skutkiem w badaniach przepływu genów pomiędzy drzewostanami dębu [12] oraz hybrydyzacji różnych gatunków dębu [13]. Analizy mikrosatelitów ujawniły np. hybrydyzację między *Q. petraea* i *Q. robur* [14] oraz między gatunkami dębów ze strefy śródziemnomorskiej: *Q. suber* i *Q. ilex* [15].

## Material i metody

### Liście dębu

Autorzy pracy pozyskali materiał do izolacji DNA z próbek *Q. robur* oraz kilku innych gatunków dębu, zbierając opadłe liście we wrocławskich parkach oraz przy Pałacu w Rogalinie (oddziale Muzeum Narodowego w Poznaniu). Materiał do sporządzenia próbek niektórych gatunków pochodził z kolekcji zgromadzonej w Zielniku Muzeum Przyrodniczego Uniwersytetu Wrocławskiego. Wszystkie liście zabezpieczono w suchym miejscu lub – gdy było to możliwe – niezwłocznie zamrożono w temp.  $-22^{\circ}\text{C}$ .

### Izolacja DNA

Na wstępnym etapie badań zebrane liście rozdrobiono w moździerzu w obecności ciekłego azotu. Materiał genetyczny izolowano przy wykorzystaniu dwóch metod. W jednej zastosowano zestaw do izolacji DNA GeneMATRIX Plant & Fungi DNA

ly evolving, often uses techniques of molecular biology enabling traces found on-site to be properly examined. Molecular biology techniques are often employed in the identification of narcotic plants [5]. Successful approaches to the DNA profiling of evidence of oak origins have been conducted [6], and multiplex profiling has been developed for *Olea europaea* [7]. Given the wide range of occurrence of species of oaks, it would seem important to develop a set of markers for profiling the greatest available number of species.

To date, several STR-based studies have been performed for oak populations. Sets of EST-STR markers were developed for improved study of *Fagaceae* population genetics [8]. Studies of the genetic diversity of the population of species such as *Q. acutissima* [9], *Q. petraea* [10], and *Q. mongolica var. crispula* [11] have been carried out and have been used with good results in studies of gene flow between stands of oaks [12] and of the hybridisation of various oak species [13]. For example, microsatellite studies have revealed hybridisation between *Q. petraea* and *Q. robur* [14] as well as between two species of Mediterranean oak, *Q. suber* and *Q. ilex* [15].

## Material and methods

### Oak leaves

The authors of this publication obtained material for DNA isolation from samples of *Q. robur* as well as from some other species, by collecting falling leaves in Wrocław parks and at the Rogalin Palace Museum, a branch of the National Museum in Poznań. Materials for samples from some species come from the collection of the Herbarium of the Museum of Natural History of Wrocław University. All leaves were preserved in a dry place or, if possible, immediately frozen at  $-22^{\circ}\text{C}$ .

### DNA isolation

In the preliminary stage, the collected leaves were crushed in a mortar in the presence of liquid nitrogen. Genetic material was isolated using two different methods. One involved using the GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland). The procedure was

Purification Kit (EURx, Gdańsk). Procedurę wykonano zgodnie z instrukcją producenta. Druga metoda opierała się na procesie izolacji DNA z grzybów opracowanym przez Murraya i Thomsona. Po pomyslniej izolacji oznaczono stężenie i czystość DNA metodą spektrofotometryczną przy użyciu aparatu NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

performed according to the manufacturer's instructions. The other method utilised the Murray-Thomson process of fungal DNA isolation. Following successful isolation, DNA concentration and purity was measured using the spectrophotometric method with a NanoDrop 1000 apparatus (Thermo Fisher Scientific).

## Reakcja łańcuchowa polimerazy

Przy multiplikacji fragmentów DNA do elektroforezy kapilarnej wykorzystano zestaw starterów (tab. I). Każdy starter znakowano znacznikiem fluorescencyjnym *Fam* lub *Joe*. Reakcję przeprowadzono w aparatach S1000 Thermal Cycler (Biorad) i Multiplex PCR Master Mix (Qiagen). Reakcja PCR miała następujący przebieg: wstępna denaturacja (15 min w temp. 95°C), a następnie 30 cykli reakcji: denaturacja (30 s w temp. 94°C), przyłączanie (60 s w temp. 56°C), wydłużanie (45 s w temp. 72°C). Ostatnim etapem była inkubacja próbek w temp. 60°C przez 10 min.

## Polymerase chain reaction

A specified starter set (Table I) was used to multiply DNA fragments for capillary electrophoresis. Each starter was marked with fluorescent dye: *Fam* or *Joe*. Reaction was performed using an S1000 Thermal Cycler (Biorad) and Multiplex PCR Master Mix (Qiagen). The PCR conditions were as follows: introductory denaturation: 15 min at 95°C, followed by 30 reaction cycles: denaturation, 30 sec at 94°C; annealing, 60 sec at 56°C; elongation, 45 sec at 72°C. The final step of PCR consisted of sample incubation at 60°C for 10 min.

## Elektroforeza kapilarna

Produkty PCR wstępnie przygotowano do elektroforezy kapilarnej poprzez wprowadzenie mieszaniny

## Capillary electrophoresis

PCR products for CE procedure were pre-treated by adding a mixture of formamide and the

**Tabela I.** Charakterystyka zastosowanych starterów  
**Table I.** Characteristic of applied primers

Locus	Sekwencja startera przedniego Forward starter sequence	Sekwencja startera wstecznego Reverse starter sequence	Znacznik fluorescencyjny Dye marker	Oczekiwana wielkość produktu (pz) Expected product size (bp)	Motyw Motif	Źródło literaturowe Reference
PIE258	TTCTCGATCTCA-AAACAAAACCA	TTTGATTTGTTAAG-GAAAATTGGA	FAM	128–159	TC	Durand et al. 2010
PIE267	TCCAACCAATCAAG-GCCATTAC	GTGCGAACAGATCC-CTTGTC	JOE	80–105	AG	Durand et al. 2010
PIE242	TGGAGGGAAAAGA-ACAATGC	TTGCAATCCTCCA-AATTAATG	FAM	102–128	TA	Durand et al. 2010
PIE152	TGTACCTCTTTC-CTCTCTCTAAAAC	GAATTTCTAAACCAC-TAGCATTGAC	FAM	230–260	TA	Durand et al. 2010
QrZAG7	CAACTTGGTGTTTCG-GATCAA	GTGCATTTCTTTA-TAGCATTAC	JOE	115–153	TC	Kampfer et al. 1998
QrZAG20	CCATTAAGAAG-CAGTAAGTATTC	GCAACACTCAGCCTA-TATCTAGAA	JOE	160–200	TC	Kampfer et al. 1998
QRZAG11	CCTTGAACCTCGAAG-GTGTC	TGGTTGACTAAAG-TATGAACTGTTG	JOE	238–267	TC	Kampfer et al. 1998

formamidu i wzorca wewnętrznego ROX 400 (Applied Biosystems) do poddawanego multiplikacji materiału. Przygotowane mieszaniny poddano denaturacji w temp. 95°C przez 3 min w termocyklerze S1000 Thermal Cycler (Biorad). Elektroforezę kapilarną wykonano aparatem ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Wyniki procesu separacji poddano analizie za pomocą oprogramowania GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems).

## Wyniki

Po wyizolowaniu DNA z badanych próbek uzyskano materiały w stężeniach od 17,1 do 103,3 ng<sub>DNA</sub>/μl. Choć w analizach wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw do ekstrakcji kwasów nukleinowych z tkanek roślinnych, otrzymane roztwory DNA były wyraźnie zanieczyszczone. Wskazywały na to niskie wartości  $A_{260/230}$  (0,74–1,74) – prawidłowe wartości tego stosunku w DNA powinny mieścić się w przedziale 2,0–2,2. Po ekstrakcji próbki nadal były zanieczyszczone, prawdopodobnie węglowodanami lub odczynnikami wykorzystywanymi w procesie izolacji.

Wyniki reakcji PCR (tab. II) poddano analizie metodą elektroforezy kapilarnej, uzyskując 55 kompletnych profili STR na podstawie 7 wytypowanych *loci*. W niektórych elektroferogramach wystąpiły piki typu stutter, które odrzucono ze względu na niską siłę sygnału. Grupa kontrolna obejmowała 34 profile *Q. robur* i 1 profil *Q. petraea*. Dla pozostałych gatunków wyniki były następujące:

- *Q. cerris*: dla 1 próbki (materiał zebrany w 2007 r.) uzyskano pełny profil dla wszystkich siedmiu *loci*, dla 3 pozostałych próbek (z 1900 i 1903 r.) otrzymane profile były niekompletne;
- *Q. frainetto*: dla 2 próbek otrzymano kompletne profile, a dla 1 (z 1903 r.) wyłącznie w *locus* QrZAG11;
- *Q. macranthera*: uzyskano 2 kompletne profile dla obu badanych próbek;
- *Q. palustris*: analizie poddano łącznie 3 próbki, kompletne profile uzyskano dla 1 (z 1995 r.), a w przypadku 2 pozostałych (z 1894 i z 2007 r.) otrzymane profile były niekompletne;
- *Q. phellos*: przeanalizowano 3 próbki, otrzymując 2 pełne profile;
- kompletne profile uzyskano dla gatunków: *Q. coccifera*, *Q. imbricaria*, *Q. infectoria*, *Q. libani*, *Q. magnoliifolia*, *Q. nigra*, *Q. × schochiana*

internal standard ROX 400 (Applied Biosystems) to the multiplied material. Prepared mixtures were then denatured at 95°C for three min using an S1000 Thermal Cycler (Biorad). Capillary electrophoresis was performed using an ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Results of the separation process were analysed with GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems).

## Results

Following isolation of DNA from examined samples, materials at concentrations ranging from 17.1 to 103.3 ng<sub>DNA</sub>/μl were obtained. Despite the use of a commercial kit for the extraction of nucleic acids from plant tissues, the obtained solutions of DNA were distinctly impure. Contamination was indicated by low values of  $A_{260/230}$  (0.74–1.74), whereas appropriate scores for this ratio in DNA should be 2.0–2.2. Following extraction, samples were still contaminated, probably with carbohydrates or reagents used in the process of isolation.

PCR results (Table II) analysed using capillary electrophoresis yielded 55 complete STR-based profiles on the basis of seven applied *loci*. In some electropherograms, stutter peaks emerged, which were then rejected based on their low signal strength. The control group consisted of 34 profiles of *Q. robur* and one of *Q. petraea*. For other species, the results were as follows:

- *Q. cerris*: one sample (collected in 2007) revealed a full profile for all seven *loci*; for three other samples the profiles were incomplete (collected in 1900 and 1903).
- *Q. frainetto*: two samples yielded full profiles; one sample (collected in 1903) showed a presence only in *locus* QrZAG11.
- *Q. macranthera*: two complete profiles were revealed for both tested samples.
- *Q. palustris*: three samples were tested; a complete profile was revealed by one sample (collected in 1995); two samples (collected in 1894 and 2007) yielded incomplete profiles.
- *Q. phellos*: three samples were tested, with two complete profiles obtained.
- Moreover, complete profiles were obtained for the following species: *Q. coccifera*, *Q. imbricaria*, *Q. infectoria*, *Q. libani*, *Q. magnoliifolia*, *Q. nigra*,



**Tabela II.** Wyniki amplifikacji w badanych *loci*  
**Table II.** Results of amplification in tested *loci*

Gatunek Species	PIE267	PIE242	QrZAG7	PIE258	QrZAG20	QrZAG11	PIE152	Liczba próbek Number of samples
<i>Q. cerris</i>	•	•	•	•	•	•	•	4
<i>Q. coccifera</i>	•	•	•	•	•	•	•	1
<i>Q. coccinea</i>	–	•	•	•	•	•	•	1
<i>Q. frainetto</i>	•	•	•	•	•	•	•	3
<i>Q. imbricaria</i>	•	•	•	•	•	•	•	3
<i>Q. infectoria</i>	•	•	•	•	•	•	•	1
<i>Q. libani</i>	•	•	•	•	•	•	•	1
<i>Q. maccranthera</i>	•	•	•	•	•	•	•	2
<i>Q. magnoliifolia</i>	•	•	•	•	•	•	•	1
<i>Q. nigra</i>	•	•	•	•	•	•	•	1
<i>Q. palustris</i>	•	•	•	•	•	•	•	3
<i>Q. petraea</i>	•	•	•	•	•	•	•	1
<i>Q. phellos</i>	•	•	•	•	•	•	•	3
<i>Q. pubescens</i>	•	•	•	•	•	•	•	1
<i>Q. robur</i>	•	•	•	•	•	•	•	34
<i>Q. rotundifolia</i>	–	•	•	–	•	–	•	1
<i>Q. trojana</i>	–	•	•	•	•	–	•	1
<i>Q. x hispanica</i>	•	•	•	•	•	•	•	1
<i>Q. x schochiana</i>	•	•	•	•	•	•	•	1

- produkt amplifikacji obecny w wybranym locus, – brak wyników amplifikacji w wybranym locus
- product of amplification present in selected locus, – no results of amplification in selected locus

(*Q. phellos* × *Q. palustris*) oraz *Q. x hispanica* (*Q. cerris* × *Q. suber*);

- niekompletne profile ujawniono dla gatunków *Q. coccinea* (materiał z 2004 r.), *Q. rotundifolia* (z 1892 r.) i *Q. trojana* (z 1900 r.);
- niekompletne profile lub całkowity brak wyników odnotowano w analizie gatunków, w przypadku których spodziewano się uzyskać kompletny profil, czyli *Q. alba* (1900, 1903, 1995 r.), *Q. ilex* (próbka z ok. 1900 r.), *Q. suber* i *Q. rubra*.

Przy niekompletnym profilu lub nieobecności wszystkich 7 *loci* w uzyskanych wynikach reakcję PCR powtarzano pojedynczo dla każdego brakującego *locus* oraz w reakcji multiplexowej dla wszystkich analizowanych *loci*.

Odnotowano ponadto produkty PCR, których wielkość odbiegała od danych literaturowych. Dla *locus* PIE242 uzyskano 32 sygnały od produktów o długości mniejszej niż 102 pz (od 98 do 100 pz), dla *locus* QrZAG11 – 10 sygnałów od produktów

*Q. x schochiana* (*Q. phellos* × *Q. palustris*), and *Q. x hispanica* (*Q. cerris* × *Q. suber*).

- Incomplete profiles were revealed for the species *Q. coccinea* (collected in 2004), *Q. rotundifolia* (collected in 1892), and *Q. trojana* (collected in 1900).
- Incomplete profiles or absolute lack of scores were also yielded by species from which complete results were expected, namely: *Q. alba* (1900, 1903, 1995), *Q. ilex* (collected ca. 1900), *Q. suber*, and *Q. rubra*.

In the case of an incomplete profile or absence of all seven *loci* from the results, PCR was repeated for each absent *locus* individually and in multiplex for all *loci* studied.

Likewise, PCR products with sizes differing from those suggested in the literature were noted. For the PIE242 *locus*, we received 32 signals from products shorter than 102 bp (from 98 to 100 bp), for the QrZAG11 *locus*, 10 signals from products shorter

o długości mniejszej niż 238 pz (od 226 do 237 pz), a dla *locus* PIE152 – pojedynczy produkt o długości przekraczającej 260 pz (266 pz).

Przy wykorzystaniu testu  $\chi^2$  przeprowadzono analizę częstości wszystkich genotypów dla każdego pojedynczego *locus* według wielkości produktów amplifikacji. Wyniki pokazały (przy poziomie istotności statystycznej 0,05), że obserwowany rozkład genotypów nie różni się od rozkładu oczekiwanego dla wszystkich *loci*.

## Dyskusja

Wyniki przeprowadzonego badania stanowią uzupełnienie wcześniejszych analiz. Pomyślnie próby uzyskania kompletnego profilu przy użyciu m.in. zastosowanych starterów przeprowadzono dotychczas dla gatunków: *Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. pyrenaica*, *Q. alba*, *Q. rubra*, *Q. faginea*, *Q. suber* i *Q. ilex* [2]. Na podstawie wyników naszego badania można uznać, że pełne profilowanie przy wykorzystaniu tych *loci* jest też możliwe w przypadku *Q. infectoria*, *Q. phellos*, *Q. magnoliifolia*, *Q. nigra*, *Q. macranthera*, *Q. coccifera*, *Q. × schochiana* Dieck., *Q. cerris*, *Q. imbricaria*, *Q. palustris*, *Q. libani* Oliv. oraz *Q. frainetto*.

Niepowodzenie profilowania nie musi być skutkiem braku poszukiwanego *locus* w analizowanym gatunku. Najprawdopodobniej wynika z degradacji DNA spowodowanej długim okresem przechowywania w niewłaściwych warunkach. Wbrew wcześniejszym oczekiwaniom w badaniu nie uzyskano np. profili takich gatunków jak *Q. suber*, *Q. rubra*, *Q. alba* i *Q. ilex*. Zasadne wydaje się więc ustalenie, jaki wpływ na jakość kwasów nukleinowych mają różne metody preparowania i przechowywania tkanek roślinnych.

Warto też zwrócić uwagę na czystość izolowanego DNA. Jak już wspomniano, mimo zastosowania komercyjnie dostępnego zestawu do ekstrakcji DNA wyizolowane kwasy odznaczały się niskim stężeniem i były w znacznym stopniu zanieczyszczone. Brak wyników dla niektórych *loci*, zwłaszcza w przypadkach, w których, wbrew oczekiwaniom, nie otrzymano najdłuższych produktów PCR, wskazuje na częściową degradację DNA spowodowaną wiekiem niektórych próbek. Uzasadnione jest zatem wykonanie kolejnych analiz z uwzględnieniem większej puli próbek dla poszczególnych gatunków. Ma to również istotne znaczenie dla wiarygodności analizy statystycznej.

Należy ponadto uwzględnić możliwość hybrydyzacji zachodzącej pomiędzy różnymi gatunkami

than 238 bp (between 226 and 237 bp), and for the PIE152 *locus*, a single product longer than 260 bp (266 bp).

Frequency analysis of all genotypes for each individual *locus*, based on the emerging sizes of amplification products, was performed using the  $\chi^2$  test. The results showed (with statistical significance equal to 0.05) that the observed distribution of genotypes did not differ from the expected distribution for all *loci*.

## Discussion

The results of our studies constitute a continuation of previous studies. To date, successful attempts at full profiling using, *inter alia*, applied primers have been conducted for *Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. pyrenaica*, *Q. alba*, *Q. rubra*, *Q. faginea*, *Q. suber*, and *Q. ilex* [2]. According to the results of our tests, full profiling with these *loci* is also available for *Q. infectoria*, *Q. phellos*, *Q. magnoliifolia*, *Q. nigra*, *Q. macranthera*, *Q. coccifera*, *Q. × schochiana* Dieck., *Q. cerris*, *Q. imbricaria*, *Q. palustris*, *Q. libani* Oliv., and *Q. frainetto*.

Failed profiling may not be a consequence of the absence of the *locus* we were seeking from the studied species. Rather, these failures are probably the results of DNA degradation caused by long periods of storage in inappropriate conditions. As we can see, some expected profiles were not revealed for species such as *Q. suber*, *Q. rubra*, *Q. alba*, and *Q. ilex*. Thus, it appears important to identify the influence of various ways of preparing and storing plant tissues on the quality of nucleic acids.

Moreover, the purity of isolated DNA is worth monitoring. As mentioned earlier in this paper, despite the use of a commercial kit for DNA extraction, the isolated acids attained low concentrations and were conspicuously contaminated. The age of some samples is evident as partial degradation of DNA, shown by the lack of results for some *loci*, especially in cases where the expected longest products of PCR were not obtained. Thus, it is important to perform further tests with larger pools of samples for each species. This is also important for conducting credible statistical analysis.

Moreover, we have to consider the possibility of hybridisation between different oak species. Therefore, given a low number of available samples for

dębu. Biorąc pod uwagę niewielką liczbę próbek dostępnych dla poszczególnych gatunków, otrzymanie kompletnego profilu może być wynikiem krzyżowania, przy założeniu, że morfologia próbki może nie pozwolić na jednoznaczny identyfikację. Częstsze występowanie homozygotyczności w *loci* nieoczekiwanych dla badanych gatunków może wskazywać na krzyżowanie.

Podsumowując, zastosowany zestaw *loci* jest odpowiednim narzędziem do profilowania DNA w próbkach pochodzących z różnych gatunków dębu. Otrzymanie pełnego profilu w niektórych *loci* wydaje się możliwe nawet po długim okresie przechowywania. Świadczą o tym np. wyniki uzyskane dla dwóch próbek *Q. macranthera*, gdzie w pierwszej (pochodzącej z 1917 r.) wykazano pojedynczy allel w *locus* PIE152 o długości 232 pz, a w drugiej (z 2007 r.) w tym samym *locus* stwierdzono dwa allele o długości 232 i 240 pz. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że obie próbki pochodzą z jednego osobnika. Zgodnie z dokumentacją sprzed II wojny światowej w Parku Szczytnickim (*Scheitinger Park*) posadzono dwa dęby, jednak tylko jeden z nich przetrwał wojnę. Można założyć, że w ciągu 97-letniego okresu przechowywania DNA w starszych próbkach uległo częściowej degradacji, o czym świadczy brak jednego allelu. Warto też podkreślić, że badanie STR dębu może być przydatne nie tylko w celach dochodzeniowych, ale także w badaniach ekologii populacji dębów.

## Wnioski

Proponowany zestaw markerów obejmujący 7 *loci* STR stanowi wystarczające narzędzie do profilowania genetycznego dębów. Kompletny profil uzyskano dla większości badanych gatunków, aczkolwiek niezbędne są dalsze badania z uwzględnieniem większej liczby próbek zarówno gatunków już badanych, jak i dotychczas nieanalizowanych.

Należy podkreślić, że w większości przypadków możliwe jest otrzymanie kompletnych wyników niezależnie od wieku próbek. Konieczne jest jednak badanie i standaryzacja warunków przechowywania materiału roślinnego, aby zapobiegać utracie jakości DNA i odpowiednio zabezpieczać je na potrzeby badań realizowanych w różnych dziedzinach nauki.

every species, acquisition of a full profile may be the result of cross-breeding, assuming that the morphology of the specimen may not allow for unambiguous identification. More frequent homozygosity in *loci* that were not expected for tested species may suggest interbreeding.

In conclusion, the applied set of *loci* is an appropriate tool for DNA profiling of samples from different oak species. Even after long-term storage, obtaining a full profile in selected *loci* seems possible, for example, in the results for two samples of *Q. macranthera*, where the first sample (collected in 1917) showed a single allele in *locus* PIE152 measuring 232 bp and the second sample (collected in 2007) in the corresponding *locus* showed two alleles measuring 232 and 240 bp. It is highly probable that both samples originated from a single specimen. According to documentation from before World War II, two specimens were planted in Szczytnicki Park (*Scheitinger Park*), of which only one survived the war. We can assume that during 97 years of storage older samples of DNA became partially degraded, as demonstrated by the absence of one allele. Testing of oak STRs can be useful for solving any investigatory problems as well as for the study of the ecology of oak populations.

## Conclusions

The proposed seven-*loci* STR marker set is generally a sufficient tool for the profiling of oak DNA. Full profiles were successfully obtained for most of the species tested, but there is still a need to study this case further, with more samples from both studied and untested species.

Furthermore, achievement of complete results is attainable in most cases despite the age of the samples. Therefore, there is a need to study and standardise plant material storage conditions in order to avoid loss of DNA quality and to preserve DNA for studies in various fields of science.



## Podziękowania

Badanie sfinansowano z funduszy statutowych Zakładu Technik Molekularnych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

*Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.*

## Acknowledgements

The study was financed from the statutory funds of the Molecular Techniques Unit of Wrocław Medical University.

*The authors declare no conflict of interest.*

## Piśmiennictwo

### References

1. Seneta W, Dolatowski K. Dendrologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008; 142-153.
2. Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Lèger P, Petit RJ. Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). Mol Ecol Resour 2011; 11: 578-585.
3. Durand J, Bodenes C, Chancerel E, Frigerio J-M, Vendramin G, Sebastiani F, et al. A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. BMC Genomics 2010; 11: 570.
4. Kampfner S, Lexer C, Glössl J, Steinkellner H. Characterization of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci from *Quercus robur*. Hereditas 1998; 129: 183-186.
5. Gilmore S, Peakall R, Robertson J. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. Forensic Sci Int 2003; 131: 65-74.
6. Craft KJ, Owens JD, Ashley MV. Application of plant DNA markers in forensic botany: Genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to a crime scene trees using microsatellites. Forensic Sci Int 2007; 165: 64-70.
7. Štambuk S, Sutlović D, Bakarić P, Petričević S, Andlinović Š. Forensic Botany: Potential Usefulness of Microsatellite-based Genotyping of Croatian Olive (*Olea europaea* L.) in Forensic Casework. Croat Med J 2007; 48: 556-552.
8. Bodénes C, Chancerel E, Gailing O, Vendramin GG, Bagnoli F, Durand J, et al. Comparative mapping in the *Fagaceae* and beyond with EST-SSRs. BMC Plant Biology 2012; 12: 153.
9. Zhang YY, Fang YM, Yu MK, Li X, Xia T. Molecular characterization and genetic structure of *Quercus acutissima* germplasm in China using microsatellites. Mol Biol Rep 2013; 40: 4083-4090.
10. Alberto F, Niort J, Derory J, Lepais O, Vitalis R, Galop D, Kremer A. Population differentiation of sessile oak at the altitudinal front of migration in the French Pyrenees. Mol Ecol 2010; 19: 2626-2639.
11. Uneo S, Taguchi Y, Tsumura Y. Microsatellite markers derived from *Quercus mongolica* var. *crispula* (*Fagaceae*) inner bark expressed sequence tags. Genes Genet Syst 2008; 83: 179-187.
12. Chybicki JJ, Burczyk J. Realized gene flow within mixed stands of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) L. revealed at the stage of naturally established seedling. Mol Ecol 2010; 19: 2137-2151.
13. Curtu AL, Gailing O, Finkeldey R. Evidence for hybridization and introgression within a species-rich oak (*Quercus* spp.) community. BMC Evol Biol 2007; 7: 218.
14. Gugerli F, Wälsler J-C, Dounavi K, Holderegger R, Finkeldey R. Coincidence of small scale spatial discontinuities in leaf morphology and nuclear microsatellite variation of *Quercus petraea* and *Quercus robur* in mixed forest. Ann Bot 2007; 99: 713-722.
15. Burgarella C, Lorenzo Z, Jabbour-Zahab R, Lumaret R, Guichoux E, Petit RJ, et al. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). Heredity 2009; 102: 442-452.

### Adres do korespondencji

Bartosz M. Pencakowski  
Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej  
Uniwersytet Wrocławski  
ul. Borowska 211A  
50-556 Wrocław, Polska  
e-mail: bartosz.pencakowski@umed.wroc.pl

**Nadesłano:** 6.04.2017

**Zaakceptowano:** 5.03.2018

### Address for correspondence

Bartosz M. Pencakowski  
Department of Pharmaceutical Biotechnology  
Wrocław Medical University  
211A Borowska St.  
50-556 Wrocław, Poland  
e-mail: bartosz.pencakowski@umed.wroc.pl

**Submitted:** 6.04.2017

**Accepted:** 5.03.2018

