



EXAMINATION OF CHLOROPLAST AND NUCLEAR MICROSATELLITE DNA SEQUENCES FOR INDIVIDUAL IDENTIFICATION OF CONIFEROUS TREES

Artur DZIALUK, Jarosław BURCZYK

Department of Genetics, Kazimierz Wielki University, Bydgoszcz

Abstract

The paper presents analyses of microsatellite sequences present in chloroplast and nuclear DNA of the Blue spruce carried out for the purpose of individual identification and determination of origin of collected evidence plant material. The performed analysis confirmed the hypothesis of the investigation and became evidence in the case.

Key words

Forensic genetics; Microsatellite sequences; DNA analysis; Genetic identification.

Received 10 March 2006; accepted 26 July 2006

1. Introduction

Highly polymorphic microsatellite sequences occurring in chloroplast and nuclear DNA of forest trees enable identification of unique genotypes for particular individuals and may be analysed on the basis of any tissue type. Comparison of genotypes established in plant specimens collected at the scene of the crime with genotypes characteristic for reference material enables fast testing of the investigation hypotheses. Although such variable sequences are known for many species of forest trees, they are very rarely examined in Poland for forensic purposes. This paper presents application of analysis of microsatellite DNA for individual identification of Blue spruce needles collected in a car belonging to an alleged perpetrator of an act of plants destruction. The aim of the examination was to ascertain whether the analysed evidence needles come from trees belonging to the injured party.

2. Case description

An official complaint was lodged concerning an act of destruction of six coniferous trees on private property in W. in Poland. The injured party indicated the suspect, and the Police secured (coniferous tree) needles from the suspect's car boot. However, the suspect denied being the perpetrator of the act. The dry needles from the boot as well as twigs from the victim's trees and trees of the same species growing in his neighbour's garden were delivered to the Department of Genetics at the Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz in order to perform comparative analysis and establish their origin.

3. Materials and methods

From amongst the needles collected from the suspect's car boot, twenty four undamaged specimens were selected and numbered from X1 to X24. Since it

was assumed that each needle could come from a different tree, the process of genotyping was performed for each needle separately. The laboratory was also provided with 6 twigs with needles originating from the victim's trees (numbered consecutively from P1 to P6) and 3 specimens from the neighbour's trees (S1 to S3).

Analyses were carried out separately for each sample. Each needle was homogenised in a mill (Mixer Mill MM301; Retsch) and subjected to DNA isolation with the standard CTAB based method of DNA extraction from plant material [1]. The DNA concentration was measured with a DNA calculator (BioPhotometr, Eppendorf). PCR reactions were carried out in a total volume of 10 μ l. Since no research has yet been performed on microsatellite variation of the Blue spruce, in this study markers were used that had been developed for other related species such as pines, Norway spruce (*Picea abies*) and White spruce (*Picea glauca*). Genetic examinations were based on microsatellite DNA markers – 4 chloroplast loci: Pt63718, Pt26081, Pt30204, Pt71936 [4] and 2 nuclear loci: UAPs TG25 [2] and PAAC23 [3] (Table I). Unlike the nuclear genome, the chloroplast genome is haploid. In the case of coniferous trees, chloroplast DNA is paternally inherited and because of a lack of recombination processes it has a clonal mode.

TABLE I. MICROSATELLITE MARKERS

Primer	Fluorescent dye	Concentration	Reference
Pt 63718	NED	25 nM	–
Pt 26081	FAM	25 nM	[5]
Pt 30204	NED	125 nM	–
Pt 71936	HEX	40 nM	–
UAPsTG25	HEX	500 nM	[3]
PAAC23	NED	500 nM	[4]

The reaction mixture consisted of 20 ng of template DNA, 1 μ l PCR buffer (Qiagen), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 5 μ g/ μ l BSA and 0.25 U Taq polymerase (Qiagen). Chloroplast microsatellite loci were amplified in multiplex PCR reactions and nuclear loci were amplified in monoplex reactions (Table I). PCR reactions were carried out in a thermocycler PCT-200 (MJ Research). The PCR program consisted of initial denaturation (94°C for 30 s) followed by 30 amplification cycles: 94°C for 30 s, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min. The final elongation step was carried out for 10 min at 72°C. Products of the PCR reaction were

mixed with Size Standard HD 400 ROX marker and resolved on an ABI Prism 310 capillary genetic analyser using the GeneScan programme (all Applied). The determined genotypes were used to attempt to identify the needles collected in the suspect's boot. The discrimination power for the analysed set of markers was assessed by the value of probability of identity P_{ID} , calculated according to the formula [2, modified]:

$$P_{ID} = \sum_{k=1}^m p_h^2 + \sum_{k=1}^m 2p_i p_j \quad \{1\},$$

where p_h is the frequency of the haplotype cpDNA, while for every k^{th} nuclear locus (from m possible loci) for homozygotes $P_k = p_i^2$, and for heterozygotes $P_k = 2p_i p_j$ (where p_i and p_j are frequencies of the respective alleles). Since there is no data relating to reference populations for the examined species, in the present paper allele frequencies of the nuclear loci and haplotype frequencies of the cpDNA were determined merely on the basis of the trees from the victim's garden. In the discussed case, the P_{ID} parameter describes the probability that, assuming genetic variation characteristic for a particular population, a given sample (e.g. a needle) may originate from another unidentified (unknown) individual. This parameter was calculated on the basis of data gathered for both chloroplast and nuclear loci.

4. Results

Morphological studies confirmed that all the provided material originates from the species *Picea pungens* (Blue spruce). This decorative tree is not native to Poland, but because of its high ornamental value is often planted in parks and gardens. Each of the six trees of the injured party had a unique genotype that enabled differentiation of the individuals from each other (table II). All the needles collected from the suspect's car boot genetically matched the victim's trees, but not the neighbour's trees. Unequivocal identification of origin was made for most of the evidence needles. Performed analyses revealed that 17 out of 24 needles may originate from tree P6, 3 additional ones from tree P3 and single needles were associated with trees P4 and P5. Two needles may originate from tree P1 or P6. In this case, an incomplete genotype prevented unambiguous identification of two evidence needles, X7 and X20, which may be ascribed to two trees (P1 and P6), revealing the same genotype except for locus PAAC23. None of the needles collected from the suspect's boot matches the genotype of tree P2.

TABLE II. GENOTYPES OF THE VICTIM'S TREES (P1–P6) AND THE NEIGHBOUR'S TREES (S1–S3) AND ALSO EVIDENCE NEEDLES (X1–X24) COLLECTED FROM THE SUSPECT'S CAR BOOT REVEALED BY EXAMINATION OF MICROSATELLITE MARKERS OF THE CHLOROPLAST AND NUCLEAR GENOMES

Tree	Chloroplast loci				Nuclear loci		Inferred origin of the needles (No. of the tree)
	Pt63718	Pt26081	Pt30204	Pt71936	UAPsTG25	PAAC23	
Victim							
P1	95	108	138	144	96/100	275/275	
P2	97	109	138	145	96/96	275/283	
P3	95	109	138	144	96/100	281/281	
P4	95	108	138	144	94/96	275/275	
P5	95	109	137	144	94/96	275/275	
P6	95	108	138	144	96/100	281/281	
Victim's neighbour							
S1	97	109	138	145	96/96	275/283	
S2	97	109	138	145	96/96	275/283	
S3	97	109	138	145	96/96	275/283	
Evidence material collected in the suspect's car boot (single needles)							
X1	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X2	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X3	95	109	138	144	96/100	281/281	P3
X4	95	108	138	144	94/96		P4
X5	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X6	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X7	95	108	138	144	96/100		P1 or P6 ^a
X8	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X9	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X10	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X11	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X12	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X13	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X14	95	109		144	96/100		P3
X15	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X16	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X17	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X18	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X19	95	109	137	144	94/96	275/275	P5
X20	95	108		144	96/100		P1 or P6 ^a
X21	95	108	138	144		281/281	P6
X22	95	109		144	96/100	281/281	P3
X23	95	108	138	144	96/100	281/281	P6
X24	95	108	138	144	96/100	281/281	P6

(–) – Precise determination of genotype impossible; a – match with genotype of trees P1 and P6. Incomplete data does not allow unambiguous identification.

TABLE III. ALLELIC FREQUENCIES OF PARTICULAR LOCI AND THE PROBABILITY OF GENETIC IDENTITY P_{ID} CALCULATED FOR PARTICULAR TREES OF THE INJURED PARTY

Individual	Allelic frequencies and haplotype frequencies for a particular locus									Probability of identity P_{ID}
	Pt63718	Pt26081	Pt30204	Pt71936	Haplotype frequency cpDNA	UAPsTG25		PAAC23		
						Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	
P1	0.833	0.5	0.833	0.833	0.500	0.583	0.250	0.583	0.583	0.050
P2	0.167	0.5	0.833	0.167	0.167	0.583	0.583	0.583	0.083	0.006
P3	0.833	0.5	0.833	0.833	0.167	0.583	0.250	0.333	0.333	0.005
P4	0.833	0.5	0.833	0.833	0.500	0.167	0.583	0.583	0.583	0.033
P5	0.833	0.5	0.167	0.833	0.167	0.167	0.583	0.583	0.583	0.011
P6	0.833	0.5	0.833	0.833	0.500	0.583	0.250	0.333	0.333	0.016
Average:									0.020	

However, all the samples from the neighbour's trees matched the genotype of P2. The investigation revealed that they (the neighbour's trees) originate from grafts provided by the victim, and thus must have the same genotypes.

The power of discrimination calculated for the applied genetic markers should be regarded as high, because the probability of identity P_{ID} has relatively low values (0.005–0.05; average 0.02). This means that the probability that the studied evidence needles originate from the injured party's trees equals 98% (Table III).

5. Conclusions

On the basis of genotype analysis of the studied evidence samples, it can not be excluded that the needles collected from the suspect's car boot originate from the victim's trees. Moreover, there is a relatively high probability (98%) that the examined needles come from the victim's trees. The prepared expert report was admitted as evidence and, on its basis, an indictment was issued by the prosecuting authority.

References

1. Doyle J. J., Doyle J. L., Isolation of plant DNA from plant tissue, *Focus* 1990, 12, 13–15.
2. Hedrick P. W., Genetics of populations, Jones & Bartlett Pub., Boston 2000.
3. Hodgetts R. B., Aleksziuk M. A., Brown A. [et al.], Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species, *Theoretical and Applied Genetics* 2001, 102, 1252–1258.

4. Scotti I., Magni F., Fink R. [et al.], Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies*) expressed sequences, *Genome* 2000, 43, 41–46.
5. Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P. [et al.], A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae, *Molecular Ecology* 1996, 5, 595–598.

Corresponding author

Artur Działuk
Zakład Genetyki
Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego
ul. Chodkiewicza 30
PL 85-064 Bydgoszcz
e-mail: dzialuk@ukw.edu.pl

WYKORZYSTANIE CHLOROPLASTOWYCH I JĄDROWYCH SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH DO USTALENIA POCHODZENIA MATERIAŁU Z DRZEW IGLASTYCH

1. Wstęp

Wysoce polimorficzne sekwencje mikrosatelitarne występujące w chloroplastowym i jądrowym DNA drzew leśnych dają możliwość uzyskania unikalnych genotypów dla poszczególnych osobników na podstawie analizy dowolnej tkanki. Porównanie genotypów materiału roślinnego zabezpieczonego na miejscu zdarzenia z jego domniemanym źródłem pochodzenia pozwala na szybkie testowanie hipotez śledczych. Chociaż sekwencje takie znane są dla szeregu gatunków drzew leśnych, w Polsce badania tego typu wykonywane są niezwykle rzadko. W pracy przedstawiono zastosowanie analizy sekwencji mikrosatelitarnych do identyfikacji pochodzenia igieł świerka srebrnego zabezpieczonych w samochodzie domniemanego sprawcy zniszczenia roślin w celu stwierdzenia, czy pochodzą one z drzewek należących do poszkodowanego.

2. Opis przypadku

W miejscowości W. zgłoszony został fakt zniszczenia sześciu drzewek iglastych na terenie prywatnej posesji. Właściciel wskazał podejrzanego, a w bagażniku jego samochodu policja zabezpieczyła igły drzewa. Podejrzaný zaprzeczył, aby był sprawcą zarzucanego mu czynu. Suche igły zebrane w bagażniku samochodu podejrzanego oraz gałązki z drzew poszkodowanego i drzew tego samego gatunku rosnących na sąsiedniej posesji zostały przesłane do Zakładu Genetyki Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy w celu ustalenia ich pochodzenia.

3. Materiały i metody

Spośród igieł zebranych w bagażniku podejrzanego wybrano 24 nieuszkodzone sztuki (od X1 do X24). Przyjęto, że każda igła mogła pochodzić z innego drzewa, stąd genotypy ustalono osobno dla każdej z igieł. Do badań dostarczono również 6 gałązek z igliwem z drzew poszkodowanego (od P1 do P6) oraz 3 próby sąsiada (od S1 do S3). Analizy prowadzono oddzielnie dla każdej próby. Po homogenizacji igieł w młynku Mixer Mill (MM301; Retsch) DNA izolowano według standardowej procedury izolacji z materiału roślinnego, wykorzystując metodę CTAB [1]. Stężenie DNA mierzono za pomocą kalku-

latora DNA (BioPhotometr; Eppendorf), zaś reakcje PCR prowadzono w objętości 10 μ l. Z uwagi na fakt, że badania zmienności mikrosatelitarnej u świerka kłującego nie były jak dotąd prowadzone, do badań wykorzystano markery opracowane dla sosen, świerka pospolitego *Picea abies* oraz świerka białego *Picea glauca*. Do analiz genetycznych wykorzystano markery mikrosatelitarne DNA – 4 *loci* chloroplastowe: Pt63718, Pt26081, Pt30204, Pt71936 [4] oraz 2 *loci* jądrowe: UAPsTG25 [2] i PAAC23 [3] (tabela I). W przeciwieństwie do genomu jądrowego, genom chloroplastowy jest haploidalny. U drzew iglastych dziedziczony jest ojcowsko, a z uwagi na brak rekombinacji ma charakter klonalny.

Mieszanina reakcyjna zawierała 20 ng DNA, 1 PCR buffer (Qiagen), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 5 μ g/ μ l BSA oraz 0,25 U polimerazy Taq (Qiagen). Chloroplastowe *loci* mikrosatelitarne amplifikowano w reakcjach multipleks PCR, natomiast *loci* jądrowe w reakcjach pojedynczych (tabela I). Mieszaninę reakcyjną umieszczano na termocyklerze PCT-200 (MJ Research), gdzie po wstępnej denaturacji (94°C przez 30 s) następowało 30 cykli amplifikacji. Każdy cykl obejmował: 94°C przez 30 s, 50°C przez 1 min i 72°C przez 1 min. Końcowe wydłużanie prowadzono w temperaturze 72°C przez 10 min.

Produkty reakcji PCR mieszano z markerem wielkości HD 400 ROX Size Standard (Applied) i analizowano na sekwenatorze kapilarnym ABI Prism 310 (Applied), wykorzystując program GeneScan (Applied).

Uzyskane genotypy wykorzystano do próby określenia pochodzenia igieł zebranych w bagażniku podejrzanego. Do określenia siły dyskryminacyjnej zestawu markerów użytych do badań obliczono tzw. prawdopodobieństwo identyczności genetycznej P_{ID} , korzystając ze wzoru [2, zmodyfikowane]:

$$P_{ID} = \sum_k p_h^m P_k \quad \{1\}$$

gdzie p_h oznacza częstość haplotypu cpDNA, natomiast dla każdego k -tego *locus* jądrowego (z m możliwych) dla homozygot $P_k = p_i^2$, natomiast dla heterozygot $P_k = 2p_i p_j$ (gdzie p_i oraz p_j oznaczają częstości odpowiednich alleli). W niniejszej pracy częstości alleli *loci* jądrowych oraz częstości haplotypów cpDNA oznaczone były jedynie na podstawie próby drzew poszkodowanego, bowiem nie istnieją jeszcze odpowiednie dane dotyczące populacji referencyjnych dla badanego gatunku.

W omawianym przypadku parametr P_{ID} mówi, jakie jest prawdopodobieństwo, że przy takiej zmienności genetycznej, jak obserwowana w danej populacji, dana próba (np. igła) może pochodzić od innego niezidentyfikowanego (nieznanego) osobnika. Wskaźnik ten został policzony w oparciu o *loci* chloroplastowe i jądrowe łącznie.

4. Wyniki

Badania morfologiczne dostarczonego materiału potwierdziły, że pochodzi on z tego samego gatunku *Picea pungens* (świerk kłujący, odmiana srebrna). Jest to drzewo ozdobne, niewystępujące naturalnie w Polsce, jednakże z uwagi na walory dekoracyjne, często spotykane w parkach oraz przydomowych ogrodach. Każde z sześciu drzew poszkodowanego posiada unikalny genotyp umożliwiający odróżnienie tych osobników od siebie (tabela II). Wszystkie igły zabezpieczone w bagażniku podejrzanego odpowiadają genetycznie drzewom poszkodowanego, natomiast nie są zgodne z drzewami sąsiada. Dla większości igieł dokonano jednoznacznego przypisania pochodzenia. Z 24 igieł 17 może pochodzić z drzewa P6, 3 z drzewa P3, po jednej z drzewa P4 i P5 oraz dwie igły z drzewa P1 lub P6. Jedynie dwie igły (X7 i X20), z uwagi na niekompletny genotyp, mogą być przypisane do dwóch drzew P1 i P6 (o takim samym genotypie, wykluczając lokus PAAC23). Żadna z igieł zebranych w bagażniku podejrzanego nie odpowiada genetycznie drzewu P2. Z kolei odpowiadają mu wszystkie próby z drzew sąsiada. W trakcie czynności śledczych okazało się, że pochodzą one ze szczepki otrzymanych od poszkodowanego, co tłumaczy identyczność ich genotypów.

Siła dyskryminacji stosowanych markerów genetycznych jest duża, bowiem prawdopodobieństwo identyczności genetycznej P_{ID} przyjmuje stosunkowo niskie wartości (0,005–0,05; średnia 0,02). Tym samym prawdopodobieństwo, że badana próba igieł pochodzi z drzew poszkodowanego, wynosi 98% (tabela III).

5. Wnioski

Na podstawie analizy genotypów dostarczonych prób, nie można wykluczyć, że igły zebrane w bagażniku podejrzanego pochodzą z drzew poszkodowanego. Istnieje stosunkowo duże prawdopodobieństwo (98%), że badana próba igieł pochodzi z drzew poszkodowanego.

Przeprowadzona ekspertyza została potraktowana jako dowód w sprawie i stała się podstawą do wniesienia aktu oskarżenia przez prokuraturę.