

**DIAGNOSTIC MOLECULAR PRIN  
TEHNICA PCR-DHPLC A CIUPERCILOR  
CE DEGRADEAZĂ LEMNUL ÎN  
CLĂDIRILE ISTORICE DIN ITALIA**

**MOLECULAR DIAGNOSIS BY PCR-  
DHPLC TECHNIQUE OF WOOD-DECAY  
FUNGI IN HISTORICAL BUILDINGS IN  
ITALY**

**Alba ZAREMSKI**

Dr. - Campus International de Baillarguet  
Adresa/Address: 34398 Montpellier Cedex 5 France  
E-mail: [alba.zaremski@cirad.fr](mailto:alba.zaremski@cirad.fr)

**Sabrina PALANTI**

Researcher – CNR IVALSA, Laboratorio Biodegradamento e Preservazione  
Adresa/Address: Via Madonna del Piano 10 Sesto Fiorentino, 50019 FI, Italy  
E-mail: [palanti@ivalsa.cnr.it](mailto:palanti@ivalsa.cnr.it)

**Massimo MANNUCCI**

PhD. - LegnoDOC s.r.l.  
Adresa/Address: Via Borgo Valsugana 11 59100, Prato, Italy  
E-mail: [massimo.mannucci@legnodoc.com](mailto:massimo.mannucci@legnodoc.com)

**Louis GASTONGUAY**

Researcher - Institut de Recherche d'Hydro-Québec, Sciences des matériaux  
Adresa/Address: 1800 Lionel-Boulet, Varennes, Québec, Canada, J3X 1S1  
E-mail: [gastonguay.louis@ireq.ca](mailto:gastonguay.louis@ireq.ca)

**Gaétan LE FLOCH**

Researcher - Université de Brest, EA3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne,  
ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise  
Adresa/Address: 29280, Plouzané, France  
E-mail: [gaetan.lefloch@univ-brest.fr](mailto:gaetan.lefloch@univ-brest.fr)

**Rezumat:**

Ciupercile ce colonizează lemnul cauzează reale probleme în conservarea lemnului și sunt responsabile pentru deteriorarea patrimoniului cultural. Identificarea fungilor pe baza caracteristicilor morfologice este încă o problemă de actualitate. Cu toate acestea, aceste metode sunt limitate la caracterizarea și identificarea la un nivel intraspecific și chiar uneori la un nivel interspecific. Diferențierea pe baza acestor caracteristici nu este întotdeauna clară și de aceea unele fungii rămân neidentificate sau confundate. Obiectivul acestui studiu a fost de a elimina aceste limitări prin utilizarea unei noi abordări moleculare care să permită detectarea și identificarea fungilor la clădirile istorice din Italia. Colonizarea cu fungii a fost evaluată utilizând tehnica amplificării PCR (tehnică de biologie moleculară pentru amplificarea ADN) și separarea ampliconilor (piese de ADN) prin cromatografie de lichide de înaltă performanță denaturată. Datorită acestei performanțe, tehnica PCR-DHPLC a fost optimizată pentru a determina profilul comunității de fungii în putregaiul lemnului precum și contaminanții omniprezenți.

**Cuvinte cheie:** clădire istorică; ciuperci lignicole; amplificare PCR; cromatografie de lichide de înaltă performanță; PCR-DHPLC.

**Abstract:**

Wood inhabiting fungi cause real problems in the preservation of wooden surfaces and are responsible for the deterioration of cultural heritage. The identification of fungi based on morphological characteristics is still a topical issue. Nevertheless, they are limited for characterization and identification on an intraspecific level and even sometimes on an interspecific level. It is not always evident and thus many fungi remain unnamed or confused. The objective of this study was to circumvent these limitations by using a new molecular approach allowing fungal detection and identification in historic buildings in Italy. Fungal colonization was assessed by using PCR amplification and amplicons separation by Denaturing High Performance Liquid Chromatography. Due to its high sensitivity, the PCR-DHPLC technique was optimised to profile fungal communities in wood decay as well as ubiquitous contaminants.

**Key words:** historical building; wood inhabiting fungi; PCR amplification; Denaturing High Performance Liquid Chromatography; PCR-DHPLC.

## INTRODUCERE

Fungiile au jucat un rol important pentru funcționarea ecosistemului, cum ar fi putrezirea lemnului și reciclarea materiilor organice din mediul înconjurător. În contrast cu numeroasele efecte benefice, fungiile au fost asociate și cu biodegradarea materialelor lemnoase din interior (Zaremski ș.a. 2005).

Biodegradarea caselor de către ciuperci a fost observată frecvent, dar uneori acest proces conduce la distrugerea valorii istorice și culturale. Deși lemnul rezistă de-a lungul unor perioade mari de timp, expunerea accidentală sau permanentă în condiții umede va favoriza creșterea microbiană rezultând pierderi ale patrimoniului cultural (Fazio ș.a. 2010).

## METODĂ ȘI MATERIALE

### 1. Prelevarea probelor

Probele din diverse medii evaluate în acest studiu au fost furnizate de către CNR IVALSA Florența (Italia) și LegnoDoc srl. Cele mai multe dintre probe au fost prelevate din clădiri istorice italiene. Acestea sunt prezentate în Tabelul 1 și Fig. 1 și 2. Fiecare dintre ele corespunde unei probe unice pentru identificare. Probele prelevate a fost sub formă de lemn putrezit provenit din clădiri. Majoritatea probelor nu au avut atac activ de fungi la momentul prelevării.

## INTRODUCTION

Fungi have been playing a considerable role for ecosystem functioning e.g. wood-decay and recycling of organic matter in the environment. In contrast to their numerous beneficial effects, fungi were also associated to biodeterioration of indoor wooden materials (Zaremski et al. 2005).

Biodeterioration of houses by mould was frequently reported but sometimes this process leads to destruction of historic and cultural value. Although wood persists for long periods of time, accidentally or permanent exposure to humid conditions will favor microbial growth resulting in loss of cultural heritage (Fazio et al. 2010).

## METHOD AND MATERIALS

### 1. Samples collections

Environmental samples analysed in this study were supplied by the CNR IVALSA of Firenze (Italy) and LegnoDoc srl. Most of the samples were collected from Italian historical buildings. There are given in Table 1 and presented in Fig. 1 and 2. Each one corresponds to a unique sampling spot. The samples collected were in the form of decaying wood from buildings. Most of the samples had fungal attack not active at moment of the collecting.

Tabelul 1 / Table 1

**Cele mai probabile fungi conform BLAST responsabile pentru atacul probelor prelevate rezultate în urma analizei BLAST PCR-DHPLC / Best hit from BLAST results for sequences collected by PCR-DHPLC analysis**

Nr.	Wood/Lemn	Origin/Proveniența	Fungal identification/ Fungii identificate
12	Poplar/Plop	Chiesa Certaldo, Firenze	1. <i>Botryobasidium botryosum</i> 2. <i>Phanerochaete sordida</i>
13	Chestnut/Castan	Church Montalcino, Siena	1. <i>Scytalidium lignicola</i> 2. <i>Donkioporia expansa</i>
16	n.d.	Church S. Stefano Rotondo, Roma	1. <i>Trametes palisotii</i> 2. <i>Oidiodendron griseum</i> 3. <i>Candida digboiensis</i>
18	Beam/Grindă	Castello Carrarese, Padova	1. <i>Sistotrema brinkmannii</i>

Note: BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

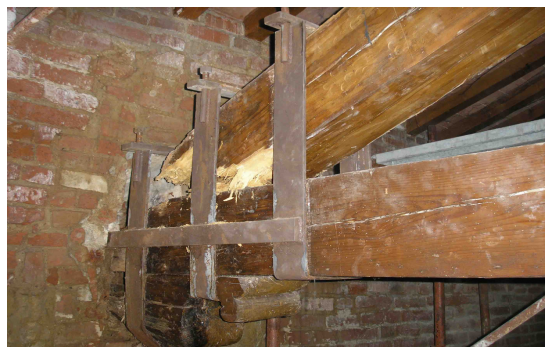
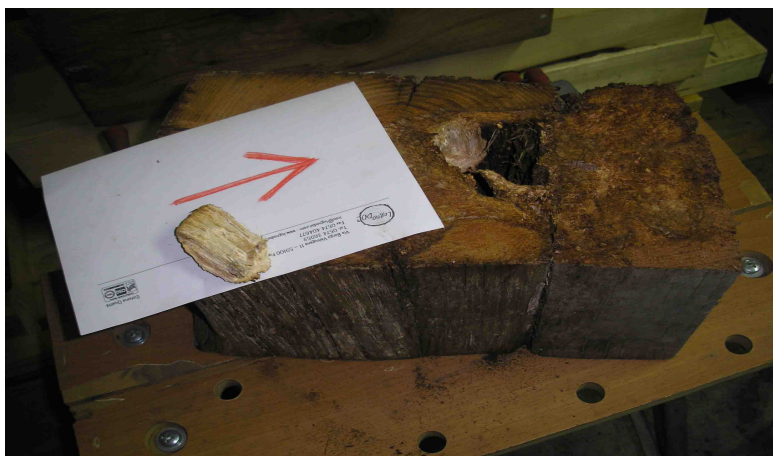


Fig. 1.

**Fungii care colonizează lemnul la o clădire istorică italiană în Biserica Montalcino, Siena/ Wood inhabiting fungi Italian historical building in the Church Montalcino, Siena**



**Fig. 2.**  
**Probă din lemn pentru analiză / Sample of wood for analysis**

## 2. Extracția AND-ului și amplificarea PCR

AND-ul genomic a fost extras din probe utilizând echipamentul FastDNA SPIN pentru sol (MP Biomedicals, Illkirch), cu ușoare modificări față de instrucțiunile producătorului. Ambele metode au fost aplicate conform protocoalelor descrise anterior (Sterflinger ș.a. 2010).

### 2.1 Extracția ADN-ului din probe de lemn

Probele de lemn au fost reduse la dimensiuni de așchii cu ajutorul unui burghiu. Probele au fost manipulate în cele mai sterile condiții posibile (arzător cu benzen, alcool, etc.) și s-a acordat cea mai mare atenție încălzirii probelor. Reziduurile au fost apoi mărunțite suplimentar prin mojarare după tratare în azot lichid. ADN-ul a fost extras din circa 200 mg de așchii utilizând Fast DNA SPIN pentru sol (Quiagen MP Biomedicals). În prealabil probele au trecut prin faza de descompunere a celulelor (acțiune rezultată în urma agitării puternice în instrumentul Fast Prep în prezența unei soluții tampon). Proteinele au fost apoi precipitate cu PPS (soluție de precipitare a proteinelor) și eliminate prin centrifugare. ADN-ul a fost fixat pe o matrice solubilă (matrice de legătură) reținută de un filtru după trecerea soluției conținând ADN prin centrifugă. În cele din urmă, ADN-ul a fost eluat cu 60  $\mu$ L DES: Astfel, fracția recuperată a putut fi apoi utilizată pentru diferite operații, precum PCR (tehnică de biologie moleculară pentru amplificarea ADN) sau cuantificarea spectrofotometrică. Aceasta poate fi, de asemenea, depozitată la -20°C.

### 2.2. Cuantificarea totală a ADN-ului pe aparatul NanoDrop 1000

Spectrofotometrul UV-VIS Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, SUA) oferă posibilitatea unor determinări foarte exacte și reproductibile pentru probe mici (microvolum). Doar 1 $\mu$ L din proba de

## 2. DNA extraction and PCR amplification

Genomic DNA was extracted from environmental samples using the FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, Illkirch) with slight modifications to the manufacturer's instructions. Both methods were applied according to the protocols previously described (Sterflinger et al.2010).

### 2.1 DNA extraction from wood samples

The timber samples were reduced to chips with a drill. They were handled under the most sterile conditions possible (benzene burner, alcohol, etc.) and the greatest attention was paid to sample heating. The residues were then refined by crushing in liquid nitrogen with a mortar. DNA was extracted from around 200 mg of chips using a Fast DNA SPIN Kit for Soil (Quiagen MP Biomedicals). Prior to that, the samples underwent lysis (combined action of the beads in the kit and vigorous stirring of the FastPrep in the presence of buffer). Proteins were then precipitated by PPS (Protein Precipitation Solution) and eliminated by centrifugation. DNA was fixed on a soluble matrix (Binding Matrix) retained by a filter after passage of the solution containing DNA by centrifugation. Lastly, DNA was eluted by 60  $\mu$ L of DES. Thus, the fraction recovered could then be used for different operations such as PCR or quantification by spectrophotometry. It could also be stored at -20°C.

### 2.2 Total DNA quantification on a Nanodrop 1000

The NanoDrop 1000 UV-Visible spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) provides particularly precise measurements of microvolumes of samples with optimum reproducibility. Just 1 $\mu$ L of the analysis sample is deposited on the inner measuring surface. A magnet system is activated and the arm compresses the drop of liquid, forming a column of liquid. The sample is held

analizat este plasată pe suprafața interioară de măsură. Se activează un sistem magnetic iar brațul special comprimă picătura de lichid, formând o coloană de lichid. Proba este reținută între două suprafețe de citire prin tensiune superficială, făcând posibilă înregistrarea spectrului. Rezultatul determinării se dă în ng/μL. De asemenea, sunt furnizate date precum absorbanta și rapoartele absorbțiilor 260:280 și 260:230 nanometri, care reflectă contaminarea probei cu proteine și respectiv alți compuși.

### 2.3. Amplificarea PCR și analiza CE-SSCP

Regiunea ITS a ADN-ului ribosomal a fost amplificată cu primerii ITS1 și ITS 2. ITS 2 a fost etichetat la 5' cu 6-carboxyfluoresceine (FAM-coloranți fluorescenți) pentru a analiza produsele PCR prin SSCP. S-au folosit două tipuri de amplificări: fie în volum total de 15 μL, conținând 3 μL de 5X soluție-tampon, 1.17 μL de MgCl<sub>2</sub> la 25 mM, 1.2 μL de dNTP la 2.5 mM, 1 μL din fiecare primer la 10 μM, 0.75 unități de GoTaq Polymerase, 6.48 μL apă distilată și 1 μL de ADN sau în volum total de 50 μL, conținând 10 μL soluție tampon 5X, 4 μL soluție MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 4 μL de dNTPs 2.5 mM, 1 μL din fiecare din cei doi primeri la concentrație 10 μM, 2 μL de DMSO, 25.8 μL de apă distilată, 1 unitate de GoTaq Polymerase și 2 μL de DNA.

Probele au fost supuse apoi unui program de aplicare începând cu trei minute de denaturare (schimbare moleculară) inițială la 94°C timp de 1 minut, apoi 35 de cicluri de denaturare la 95°C timp de 1 minut, hibridizare la 60°C timp de 1 minut și alungire la 72°C timp de 1 minut. Programul de aplicare s-a încheiat cu 10 minute de alungire finală la 72°C. Calitatea amplificării a fost apoi verificată prin transfer electroforetic pe gel de agar 8% la 100 V, timp de o oră și imersie în BET timp de 20 minute pentru a releva ADN-ul.

### 2.4. Analiza statistică

Datele colectate în acest mod au fost standardizate, spre exemplu toate valorile pentru o probă au fost împărțite la media acelei probe. S-au elaborat apoi profilele și s-a determinat OTUs (ordonare pe grupe de similaritate). Au fost caracterizate treizeci și unu de OTUs, considerând toate vârfurile cu fluorescență de intensitate peste 2. S-a obținut un tabel reprezentând diferitele probe și OTUs.

Pentru a realiza analiza principalelor componente tabelul a fost transpus și s-au prelucrat valorile utilizând software-ul StatBox 6.6. Astfel s-au obținut toate datele necesare pentru utilizarea rezultatelor (lanțul corelațiilor, distribuția indivizilor).

### 3. Condițiile analizei DHPLC, colectarea fracțiilor și succesiunea ampliconilor

Pentru a separa fragmente de gene amplificate de ITS1 rADN, PCR (Transgenomic, Omaha, NE) s-

between the two reading surfaces by surface tension, enabling the spectrum to be measured. The measurement result is given in ng/μL. It also provides information such as absorbance, and the 260:280 and 260:230 nanometre ratios, which reflect sample contamination by proteins and other compounds respectively.

### 2.3 PCR amplification and CE-SSCP analysis

The ITS region of ribosomal DNA was amplified with ITS 1 and ITS 2 primers. The ITS 2 primer was labelled at 5' with 6-carboxyfluoresceine (FAM) to analyse the PCR products by SSCP. Two types of amplification were carried out: either in a total volume of 15 μL, comprising 3 μL of 5X buffer, 1.17 μL of MgCl<sub>2</sub> at 25 mM, 1.2 μL of dNTP at 2.5 mM, 1 μL of each of the primers at 10 μM, 0.75 Units of GoTaq Polymerase, 6.48 μL of sterile water and 1 μL of DNA, or in a volume of 50 μL, comprising 10 μL of 5X buffer, 4 μL of MgCl<sub>2</sub> at 25 mM, 4 μL of dNTPs at 2.5 mM, 1 μL of each of the primers at 10 μM, 2 μL of DMSO, 25.8 μL of sterile water, 1 Unit of GoTaq Polymerase and 2 μL of DNA.

They then followed an amplification programme starting with three minutes of initial denaturation at 94°C, then 35 denaturation cycles at 95°C for one minute, hybridization at 60°C for one minute and elongation at 72°C for one minute. Amplification ended with ten minutes of final elongation at 72°C. Amplification quality was then checked by electrophoretic transfer to 8% agarose gel at 100 V for one hour and immersion in BET for twenty minutes to reveal the DNA.

### 2.4 Statistical analysis

The data collected in this way were standardized, i.e. all the values for a sample were divided by the mean of that sample. We then produced the profiles and determined the OTUs. Thirty-one OTUs were characterized, considering all the peaks with fluorescence intensity over 2. A table representing the different samples and OTUs was obtained.

The table was transposed and we exploited the values using StatBox 6.6 software to carry out the principal components analysis. We thus obtained all the data needed to make use of the results (correlation circle, distribution of individuals, etc.)

### 3. DHPLC analysis conditions, fraction collection and sequencing of amplicons

Denaturing High Pressure Liquid Chromatography (DHPLC) assay was developed to separate the ITS1 rDNA PCR amplified gene

a dezvoltat tehnica de cromatografie cu lichide la presiune ridicată (DHPLC). Ampliconii corespunzători picurilor (fracțiilor) au fost colectați și re-amplificați după o metodă identică folosind aceeași pereche de primeri (ITS1/ITS2). Studiile efectuate cu ITS1 și ITS2 au arătat că, în general, metoda este suficientă pentru caracterizarea genului și a speciei (Zaremski ș.a. 2005).

Separarea pe mase a fost realizată prin electroforeză capilară utilizând un capilar secvențial ABI 3130 (Biosisteme aplicate). Separarea pe mase s-a făcut în ambele direcții pentru a asigura fidelitatea rezultatelor (Bigdye Terminator V3.1).

Analiza succesiunii secvențelor a constat într-o eliminare manuală a capetelor de calitate scăzută urmată de o revizie a fiecărei nucleotide cu ajutorul unui software de bază pentru analiza ADN (HeracleSoftware v2.6, Germania). Compararea secvențelor s-a bazat pe rezultatele obținute cu ajutorul căutării BLAST (bază de date pentru căutarea alinierii locale de bază) pentru compararea similitudinii cu secvențele cunoscute din Banca de gene GenBank. Au fost luate în considerare doar cazurile în care analizele au atins aceeași țintă (96 până la 100% similaritate la speciile existente față de datele din baza de date).

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 1. Realizarea profilului comunității fungice determinând putrezirea lemnului

Condițiile optimizate din analizele utilizând amplificarea PCR și tehnica DHPLC au condus la analizarea populațiilor fungice din probe de lemn putrezite.

În Fig.3 sunt prezentate profilele de eluție la analiza cromatografică pentru două probe (#12 și #13), care arată diferențe ale timpului de eluție și intensitate relativă ale diferitelor picuri de pe diagramă.

În mod normal, fiecare vârf corespunde unei specii, iar mai multe vârfuri au fost divizate în două vârfuri separate datorită ciclului de amplificare prea puternic.

### 2. Identificarea fungiilor prin succesiune fracțiilor colectate

Rezultatele obținute cu ajutorul Blast au permis identificarea unor specii de fungii diferite aparținând basidiomicetelor, în mod particular, fungii responsabile pentru putrezirea lemnului. Pentru o aceeași probă s-au descris, pentru prima dată, asocierea sau succesiunea de fungii. În general, simptomele putregaiului pe lemn (putregai brun, moale sau alb) au fost asociate cu o infestare fungică singulară. La proba 16, ciuperca de putregai alb *Trametes* a fost asociată în atac cu *Oidiodendron griseum*, o ciupercă de putregai moale.

fragments (Transgenomic, Omaha, NE). The amplicons from peak fractions were collected and re-amplified as a template with the same primer pair (ITS1/ITS2). Studies conducted with ITS1 and ITS2 showed that are generally sufficient for characterizing strains on a genus and species (Zaremski *et al.* 2005).

Mass sequencing was performed by capillary electrophoresis using a ABI 3130 capillary sequencer (Applied Biosystems). Sequencing was realized in both direction to assure fidelity (Bigdye Terminator V3.1).

Sequence analysis consisted of a manual trimming of low quality ends followed by a revision of each nucleotide with DNA baser software (HeracleSoftware v2.6, Germany). Sequence comparison was based on the results of BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) searches for homology comparison with known sequences in GenBank. Only cases where analyses yielded the same hit were taken into account (96 to 100% similarity existing species were retrieved from the database).

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Profiling fungal community of wood rot

The optimised conditions in PCR amplification and DHPLC analysis allowed the analysis of fungal populations from decayed wood samples.

Fig. 3 represents the elution profiles of two samples (#12 and #13), which shows differences in elution time and relative intensities related to different peaks.

Normally, each peak corresponds to a species, but many peaks were splitted in two separated peaks due to amplification cycle too important.

### 2. Fungal identification by sequencing of collected fractions

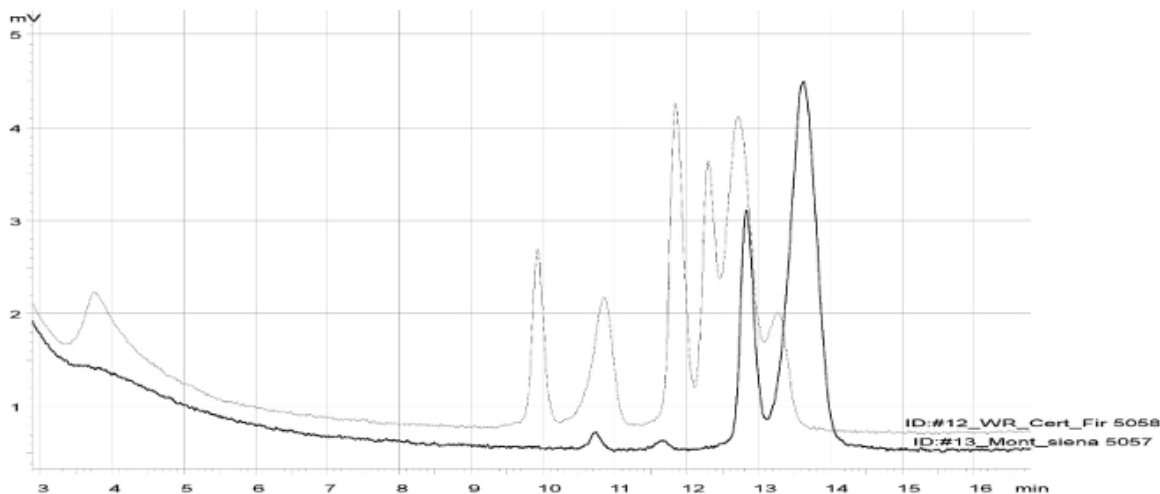
Blast results have identified different species belonging to the basidiomycetes, particularly, known fungi to be responsible for wood decay. For a same sample, fungal associations or succession were described for the first time. Generally, wood decay symptoms (brown, soft and white -rot) were associated to a single infestation by a fungus. In sample 16, white rotting fungus *Trametes* was associated with *Oidiodendron griseum*, a soft rotting fungus.

## CONCLUZII

Prin urmare, este important să se caracterizeze tipul de biodegradare pentru a evalua impactul asupra stării de conservare a obiectelor din lemn. Pasul următor va fi selecția markerilor moleculari implicați în detectarea moleculară *in situ* a unor fungii basidiomicete de putregai alb și putregai brun care colonizează clădirile istorice din Italia.

## SUMMARY

Therefore, it is important to characterize the type of biodeterioration in order to assess the impact on the state of conservation of a wooden object. The setting of molecular markers involved *in situ* molecular detection of some white-rot and brown-rot basidiomycetes infecting historic buildings in Italy will be the next step.



**Fig. 3.**

**Amprentele rezultate din analiza DHPLC a probelor 12 (gri) și 13 (negru). Toate fracțiile din vârfurile obținute au fost colectate, amplificate analizate pentru determinarea și succesiunea datelor pentru analiza secvenței ITS1 rADN /**

**DHPLC fingerprints of sample 12 (grey) and 13 (black). All the peaks obtained were collected, followed by amplification and sequencing of the ITS1 rDNA.**

## BIBLIOGRAFIE / REFERENCES

FAZIO, A.T., PAPINUTTI, L., GOMEZ, B.A., PARERA, S.D., RODRIGUEZ, A., SIRACUSANO, G., MAIER, M.S. (2010). Fungal deterioration of a Jesuit South American polychrome wood sculpture, *Int Biodet Biodeg* 2010; 64(8):694-701.

MAURICE, S., LE FLOCH, G., LE BRAS, M., BARBIER, G. (2010). Improved molecular methods to characterise *Serpula lacrymans* and other Basidiomycetes involved in wood decay. *J Microbiol Meth* 2010; In Press.

STERFLINGER, K. (2010). Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage, *Fung Biol Rev* 2010; 24(1-2):47-55.

ZAREMSKI, A., DUCOUSSO, M., DOMERGUE, O., FARDOUX, J., RANGIN, C., FOUQUET, D., JOLY, H., SALES, C., DREYFUS, B., PRIN, Y. (2005). In situ molecular detection of some white-rot and brown-rot basidiomycetes infecting temperate and tropical woods. *Can j For Res* 2005; 35:12.

*Traducerea articolului în limba română a fost realizată de /  
Translation into Romanian performed by:  
Lect.dr.eng. Emanuela BELDEAN*