

**MONITORIZAREA DIVERSITĂȚII
FUNGICE PENTRU DETERMINAREA
ORIGINII GEOGRAFICE A CHERESTELEI
DIN SPECII EXOTICE**

**MONITORING FUNGAL DIVERSITY TO
DETERMINE THE GEOGRAPHICAL
ORIGIN OF EXOTIC TIMBERS**

Alba ZAREMSKI*

Dr. - UR GFP-Diversité génétique et amélioration des espèces forestières
CIRAD BIOS; TA A-108/C Campus International de Baillarguet
Adresa/Address: 34398 Montpellier Cedex 5, France
E-mail: alba.zaremski@cirad.fr

Renaud HENRY

Researcher - Université Européenne de Bretagne, France
Université de Brest, EA3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESMISAB,
Technopôle de Brest Iroise
Adresa/Address: 29280, Plouzané, France

Gaetan LE FLOCH

Researcher - Université Européenne de Bretagne, France
Université de Brest, EA3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESMISAB,
Technopôle de Brest Iroise
Adresa/Address: 29280, Plouzané, France

Louis GASTONGUAY

Researcher - Institut de Recherche d'Hydro-Québec, Sciences des matériaux
Adresa/Address: 1800 Lionel-Boulet, Varennes (Québec) J3X1S1, Canada

Rezumat:

Lemnul este o resursă economică importantă pentru multe țări tropicale. Printre beneficiile aduse de cele mai multe specii tropicale, se pot menționa durabilitatea lor naturală și capacitatea de a rezista în mediul exterior fără a utiliza substanțe chimice de protecție. De asemenea multe dintre aceste specii tropicale prezintă proprietăți incontestabile, pe care oamenii le caută, cum ar fi aspectul estetic și proprietăți mecanice bune. Sunt disponibile diferite sisteme de marcare pentru a facilita trasabilitatea lemnului dar acestea au unele limite în utilizarea lor pe scară largă. Acest studiu are drept scop dezvoltarea unei tehnici viabile pentru a evalua originea geografică a diferitelor specii lemnoase. Lemnul poate fi colonizat de microorganismele de distrugere fungice cunoscute sub numele endofite. Principalul obiectiv al acestei lucrări este de a utiliza aceste microorganisme ca un marker molecular. S-a realizat o amplificare a regiunii ITS (spații transcrise intern necodificatoare ce pot fi utilizate în diferențierea speciilor înrudite strâns din interiorul unui gen fungic), utilizând tehnica de analiză structurală CE-SSCP pe trei specii tropicale diferite, din 6 țări: Limba (*Terminalia superba*), Limbali (*Gilbertiodendron dewerei-preussii*) și Teak (*Tectona grandis*). Rezultatele arată o grupare între diferite profile microbiene legate de specia lemnoasă și diferența între speciile Limba și Limbali. Se pune în

Abstract:

Wood is an important economical resource for many tropical countries. Among the benefits of most of the tropical woody species, we can mention their natural durability and their capacity of withstanding outside environment without the use of chemical preservatives. Also, many of these tropical species show undeniable properties that people looked for such as aesthetic appearance and good mechanical property. Different marking systems are available in order to facilitate the traceability of wood but they present some limitations in their use at a larger scale. This study aims at developing a reliable technique to assess the geographical origin of different wood species. Wood can be colonized by destroying fungal microorganisms known as endophyte. The main objective of this work is to use these microorganisms as a molecular marker. An amplification of the ITS region has been done and used with CE-SSCP on tree different tropical species from 6 countries: Limba (*Terminalia superba*), Limbali (*Gilbertiodendron dewerei-preussii*) and Teak (*Tectona grandis*).

Results show a grouping among different microbial profiles related to the wood species and discernment between Limba and Limbali. We show that microbial profiles could be used as a marker to ensure the proper origin of wood as part of an eco-certification for sustainable management of the

* Autor corespondent / Corresponding author

evidență faptul că profilele microbiene ar putea fi utilizate ca markeri pentru a garanta originea corectă a lemnului, ca părți ale unei eco-certificări pentru un management sustenabil al pădurii. De asemenea acestea vor ajuta în controlarea traseului produsului din lemn de la pădure la consumator.

Cuvinte cheie: specii exotice; marker molecular; origine cherestea; amplificare PCR; analiza CE-SSCP; analiză D-HPLC; trasabilitate.

INTRODUCERE

De mai mulți ani, mediul industrial a trebuit să fie capabil să ateste originea produselor sale pentru a-și satisface clienții. Într-adevăr, pentru un anumit produs, trebuie să fie posibilă urmărirea tuturor etapelor din procesul de fabricație, precum și originea tuturor componentelor sale. Acest sistem poartă numele de trasabilitate. Aceasta servește, de exemplu, pentru a găsi furnizorii de materii prime, locurile diferite unde produsul a fost depozitat, modul de manipulare și echipamentele utilizate în fabricarea sa.

Scopul trasabilității este, de altfel, stabilirea unei legături între produs, originea sa și procesul de fabricație. Aceasta implică un sistem care utilizează coduri de bare sau alte etichete care oferă maximum de informații cu privire la produsul în cauză. Totuși, aceste metode administrative sunt nepotrivite în cazuri în care originea geografică a fost falsificată. Prin urmare, este importantă găsirea unui instrument analitic credibil, care să poată identifica cu certitudine originea geografică a unui produs.

Exportul de cherestea reprezintă una din principalele surse de venit pentru anumite țări tropicale. Într-adevăr multe din casele noastre conțin elemente de lemn din aceste țări, care este utilizat pentru structură, pardoseală sau mobilier, motivul fiind calitățile estetice incontestabile și rezistența ridicată. Standardul NF EN 350-1 definește clasele de durabilitate naturală a lemnului la atacul de ciuperci (cinci clase, de la foarte durabil la nedurabil). Avantajele celor mai multe specii tropicale sunt în mod cert legate de buna lor durată de viață și capacitatea de a rezista în exterior fără substanțe chimice de protecție, care sunt dăunătoare pentru om și mediul înconjurător.

Lemnul din specia Afara (*Terminalia superba*) este folosit în principal pentru placaj, construcții de interior, sau instrumente muzicale precum chitara. Lemnul din specia Limbali (*Gilbertiodendron dewevrei*) este specific structurilor tip cadru din lemn datorită rezistenței mecanice ridicate. Se poate de asemenea utiliza pentru realizarea pardoselilor dacă este foarte bine uscat. Lemnul de Teak (*Tectona grandis*) este considerat ca un lemn valoros și rezistent la putrezire. Este potrivit de altfel, pentru asamblarea punților ambarcațiilor sau pentru mobilier de exterior (mese de grădină, șezlonguri, umbrare de grădină etc.)

forest. Also, they will help in controlling the itinerary of a wood product from forest to consumer.

Key words: exotic species; molecular marker; timber origin; PCR amplification; CE-SSCP analysis; D-HPLC analysis; traceability.

INTRODUCTION

For several years, industries have had to be able to certify the origin of their products in order to satisfy their customers. Indeed, for a given product, it has to be possible to track down all the stages of its manufacturing process as well as the origin of all its components. This is called traceability. It serves, for example, to find the suppliers of raw materials, the different places where the product has been stored, and the handling and equipment used in its manufacture.

The purpose of traceability is therefore to establish a link between the product, its origin and its manufacturing process. It involves a system using bar codes or other labels that provide maximum information about the product in question. However, these administrative methods seem to be unsuited to cases where geographical origin has apparently been falsified. Therefore it seems important to find an analytical tool that can identify the geographical origin of a product with certainty and reliability.

Timber exports are one of the main sources of income for certain tropical countries. Indeed, many of our homes contain timbers from those countries, which are used for structural frameworks, flooring or furniture, as they offer undeniable aesthetic qualities and high resistance. Standard NF EN 350-1 defines classes of natural timber durability in relation to wood-decaying fungi (five classes ranging from highly durable to not durable). The advantages of most tropical timbers are precisely their good life expectancy and their ability to resist in an outside environment without chemical preservatives that are harmful to human life and the environment.

Afara (*Terminalia superba*) is mostly used for plywood, indoor woodwork or musical instruments such as guitars. Limbali (*Gilbertiodendron dewevrei*) is often specific to framework timber for its very high mechanical resistance. It can also be used to make flooring if it is very well dried. And lastly Teak (*Tectona grandis*) is considered as a valuable and rot-proof timber. It is therefore suitable for assembling boat decks or for outside furniture (garden tables, loungers, garden sheds, etc.).

Different systems for physically marking timber and enabling its traceability are available today, but their uses can be limited. They range from bar codes to radio frequencies, and including paint

Diferite sisteme de marcare fizică a cherestelei sunt astăzi disponibile, acestea permit trasabilitatea, dar utilizarea lor este limitată. Acestea variază de la coduri de bare, la frecvențe radio, inclusiv marcaje cu vopsea și UV. Totuși aceste metode sunt limitate la anumite părți ale ciclului de viață a lemnului și prin urmare nu certifică originea geografică în cazul unei fraude. Diferențierea genetică a fost de asemenea investigată cu ajutorul markerilor, poliformism cu lungimi de fragment amplificat al ADN-ului cloroplastic și care în general ține de evaluările taxonomice tradiționale (Cao ș.a. 2006). Harvard ș.a. (2007) au utilizat recent izotopul de stronțiu pentru a determina originea geografică a lemnului tropical, dar metoda rămâne costisitoare și necesită actualizarea bazei de date.

El Sheikhia ș.a. (2009) au arătat că este posibil să se determine originea coacăzei cu pelerină, din patru regiuni diferite ale Egiptului, utilizând ADN-ul 26S de la colonizarea drojdiei de fructe ca și marker microbiologic. Aceeași abordare a fost utilizată pentru trasabilitate în acvacultură. Studiind flora bacteriană de *Pangasius hypophthalmus* din branhiile și intestine, Le Nguyen (2008) a arătat că flora este specifică habitatului unui pește (regiuni diferite din sudul Vietnamului).

Codul de bare al ADN-ului este un concept relativ nou pentru diferențierea speciilor, bazat pe segmentele țintă ale unui genom (nuclear, cloroplast, sau mitocondrial) (Taberlet ș.a. 2007, Kress ș.a. 2006, Hebert ș.a. 2003, 2005). Codul de bare ADN, care este în mod curent utilizat de taxonomiști pentru criminalistică, biotehnologie și de industria alimentară (Chase ș.a. 2005, Janzen ș.a. 2004, 2005 și Kress 2004), prezintă un mare potențial pentru diferențierea speciilor în viitor, deși probleme legate de variația limitată și hibridare trebuie să fie luate în mod serios în considerare.

Regiunea tmH-psbA (Hamilton 1999) permite amplificarea simplă și robustă a fragmentelor scurte (≈500bp). Regiunea este simplă la secvențiere și oferă variații suficiente pentru diferențieri între specii. Kress ș.a. (2005) au îmbogățit fragmentele doar pentru 8 genuri și 19 specii ale acestei regiuni deoarece aceasta arată cea mai mare variație. În opinia lor, trnH-psbA locus are cel mai mare potențial pentru distincția speciilor, față de toate celelalte zone ale genelor utilizate până acum pentru diferențierea speciilor.

Alte aplicații sunt prezentate luând exemple din Germania, unde s-au dezvoltat mecanisme pentru îmbunătățirea controlului comerțului cu semințe forestiere și material săditor și din comerțul cu lemn dintr-o specie importantă din Asia de Sud-Est, familia Dipterocarpaceae (Finkeldey ș.a. 2009).

De-a lungul duratei sale de viață, lemnul este supus colonizării cu endofite și atacului ciupercilor de putrezire. Scopul proiectului a fost prin urmare, de a utiliza flora fungică ca un marker microbiologic pentru a identifica originea geografică a cherestelei

and UV markings. However, such methods are limited to certain parts of the wood's life cycle, and they do not therefore certify geographical origin in the event of fraud. Genetic differentiation was also investigated by using amplified fragment length polymorphism markers of chloroplast DNA and generally support the traditional taxonomic assessments (Cao *et al.* 2006).

Harvard *et al.* (2007) recently used the strontium isotope to determine the geographical origin of tropical timber, but the method remains expensive and requires database updating.

El Sheikhia *et al.* (2009) showed that it is possible to determine the origin of the cape gooseberry from four different regions of Egypt, using 26S DNA of the yeast colonizing the fruit as a microbiological marker. The same approach has been used for traceability in aquaculture. When studying the bacterial flora of *Pangasius hypophthalmus* in its gills and gut, Le Nguyen (2008) showed that the flora was specific to fish's habitat (different regions of southern Vietnam).

DNA-barcoding is a relatively new concept for the differentiation of species based on target segments of the genome (nuclear, chloroplast or mitochondria) (Taberlet *et al.* 2007, Kress *et al.* 2006, Hebert *et al.* 2003, 2005). DNA-barcoding, which is currently mainly used by taxonomists, for forensics, biotechnology and by the food industry (Chase *et al.* 2005; Janzen *et al.* 2004, 2005 and Kress 2004) shows great potential for species differentiation in the future, although issues of limited variation and introgression need to be taken into account seriously.

The trnH-psbA region (Hamilton 1999) allows robust and simple amplification of short fragments (≈500bp). The region is simple to sequence and offers sufficient variations for a distinction between species. Kress *et al.* (2005) enriched fragments for only 8 genera and 19 species for this region, whereas the region shows the highest variation. In their opinion, the trnH-psbA locus has a greater potential for species distinction than all the other gene areas used for species differentiation to date.

Other applications are illustrated taking examples from Germany, where mechanisms have been developed to improve the control of the trade with forest seeds and seedlings, and from the trade with wood of the important Southeast Asian tree family Dipterocarpaceae (Finkeldey *et al.* 2009).

Throughout its life span, wood is subjected to colonization by endophytes and to attacks by wood-decaying fungi. The aim of the project was therefore to use fungal flora as a microbiological marker to identify the geographical origin of timber imported from tropical countries. Many molecular tools share the common approach of detecting genetic variations within microbial communities. The DNA Single Strand Conformation Polymorphism analysis technique (SSCP) is considered simple, inexpensive,

importată din țările tropicale. Multe instrumente moleculare împărtășesc abordarea comună de detectare a variației genetice dintr-o comunitate microbială. Tehnica de analiză SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (utilă în detectarea poliformismului determinat de cel puțin o nucleotidă) este considerată simplă, ieftină, rapidă și sensibilă la variațiile de secvență a fragmentelor de ADN (Sunnucks ș.a. 2000). Această tehnică poate fi completată de analiza D-HPLC (cromatografie lichidă de înaltă performanță de denaturare) și secvențiere pentru identificarea speciilor. Regiunea aleasă a fi de interes taxonomic este regiunea ITS (Spații transcrise intern) al ADN-ului ribozomal. Într-adevăr această regiune este suficient de discriminantă pentru a identifica ciupercile după specii (White ș.a. 1990).

În prezenta lucrare se propune identificarea speciilor de ciuperci existente în cheresteaua din trei specii lemnoase: Afara (Limba), Limbali and Teak. Probele au provenit din șase țări diferite: Republica Central Africană, Benin, Coasta de Fildeș, Congo, Camerun și Polinezia.

Prima secțiune a lucrării prezintă o cercetare a literaturii de specialitate privind utilizarea PCR (reacția în lanț a polimerazei) la cherestea, având în vedere că această matrice particulară poate conține inhibitori de amplificare. Secțiunea a doua descrie metodele utilizate pentru a obține profilele SSCP, care au fost procesate prin analiza multi-factor. Secțiunea a treia descrie rezultatele obținute și secțiunea finală discută despre diversitatea fungică existentă în cherestea în funcție de originea lor geografică.

MATERIALE ȘI METODE

Alegerea speciilor pentru acest studiu: Afara (L, Limba), Limbali (Li) și Teak (T).

Aceste specii provin din șase țări diferite: Republica Central Africană, Benin, Coasta de Fildeș, Congo, Camerun și Polinezia. Speciile Afara (L) și Limbali (Li) sunt din pădurile africane unde se asigură regenerabilitatea și sustenabilitatea lor. Lemnul de Teak (T) provine din plantațiile din Polinezia și Coasta de Fildeș. De obicei speciile utilizate în acest studiu sunt cele mai solicitate pentru mobilier și construcții. Aceste specii au un bun potențial de a fi utilizate ca lemn pentru construcții (ușor de tratat, durabilitate naturală bună, disponibile rapid).

Speciile analizate în acest studiu au fost aprovizionate din ierbarul CIRAD (Montpellier). Originea și codul asociat cherestelei sunt prezentate în Tabelul 1.

rapid and sensitive to the sequence variations of a DNA fragment (Sunnucks *et al.* 2000). This technique can be completed by D-HPLC analysis and sequencing to identify species. The region chosen to be of taxonomic interest is the ITS region (Internal Transcribed Spacer) of ribosomal DNA. Indeed, this region is sufficiently discriminant to identify fungi by species (White *et al.* 1990).

We proposed in this project to identify fungal species existing in three timber species: Afara (Limba), Limbali and Teak. The samples came from six different countries: Central African Republic, Benin, Ivory Coast, Congo, Cameroon and Polynesia.

The first section presents a literature search section on PCR use in timber, as this particular matrix can contain amplification inhibitors. The second section describes the methods used to obtain SSCP profiles, which were processed by multi-factor analysis. The third section describes the results obtained, and the final section discusses the fungal diversity existing in our timbers depending on their geographical origin.

MATERIALS AND METHODS

Choice of species for this study: Afara (L, Limba), Limbali (Li) and Teak (T).

These species come from six different countries: Central African Republic, Benin, Ivory Coast, Congo, Cameroon and Polynesia. Afara (L) and Limbali (Li) are from African forests in which their renewal and sustainability are assured. Finally, Teak (T) comes from plantations in Polynesia and Ivory Coast. Usually the species used in this study are the most requested for furniture and construction. These species show good capability for use in lumber (easily treated, good natural durability, readily available,).

The timbers analysed in this study were supplied by the CIRAD herbarium (Montpellier). The origin of the timbers and their associated codes are listed in Table 1.

Tabelul 1 / Table 1

**Codul și originea cherestelei analizată în acest studiu /
Code numbers and origin of the timbers analysed in this study**

Referință CIRAD / CIRAD reference	Nume comercial / (nume științific) Trade name (scientific name)	Proveniență / Provenance	Cod / Code
18122	Afara (<i>Terminalia superba</i>)	Central African Republic	L RCA
29151		Benin	L Be
23730		Ivory Coast	L Ci
5256		Congo	L Co
18571		Cameroon	L Ca
6070	Limbali Vaa (<i>Gilbertiodendron dewevrei</i>)	Central African Republic	Li RCA
30235		Ivory Coast	Li Ci
18865		Cameroon	Li Ca
5473		Central African Republic	Li RCA
34090	Teak (<i>Tectona grandis</i>)	Polynesia	T Pol
16476		Ivory Coast	T Ci

Extracția ADN din probele de cherestea

Probele de cherestea au fost transformate în aşchii. Au fost manipulate în cele mai sterile condiții posibile (arzător cu benzen, alcool etc.) și cea mai mare atenție a fost acordată încălzirii probelor. Reziduurile au fost apoi rafinate prin zdrobire în mojar steril cu un pistil după tratare în azot lichid.

DNA-ul a fost extras din aprox. 200mg aşchii utilizând kitul Fast DNA SPIN Kit pentru sol (Qiagen MP Biomedicals). Înainte de acesta, probele au fost supuse unei faze de liză (acțiune combinată și agitare puternică în prezența unei soluții tampon). Proteinele au fost apoi precipitate prin PPS (Soluție de Precipitare a Proteinei) și eliminate prin centrifugare. ADN-ul a fost fixat într-o matrice solubilă (Binding matrix) reținută de un filtru după trecerea soluției conținând ADN-ul prin centrifugare. În cele din urmă ADN-ul a fost eluat de 60µL DES. Astfel fracția recuperată ar putea fi utilizată apoi pentru diferite operații cum ar fi PCR (reacție în lanț a polimerazei) sau cuantificare prin spectrofotometrie. Poate fi depozitată de asemenea la -20°C.

Amplificarea PCR și analiza CE-SSCP

Regiunea ITS al ADN-ului ribozomal a fost amplificată cu primerii ITS 1 și ITS 2. Primerul ITS 2 a fost etichetat la 5' cu 6-carboxyfluoresceine (FAM) pentru a analiza produsele PCR prin SSCP. S-au realizat două tipuri de amplificare:

- fie într-un volum total de 15 µL, cuprinzând 3µL de 5X soluție tampon, 1.17µL de MgCl₂ la 25mM, 1.2µL de dNTP at 2.5mM, 1µL din fiecare primer la 10µM, 0.75 unități de GoTaq Polymerase, 6.48µL apă distilată și 1µL de ADN;
- fie într-un volum de 50µL, cuprinzând 10µL de 5X soluția tampon, 4µL de MgCl₂ la 25mM, 4µL de dNTPs la 2.5mM, 1µL din fiecare primer la 10µM, 2µL de DMSO, 25.8µL de apă distilată, 1 unitate de GoTaq Polymerase și 2µL de ADN (20ng.µL⁻¹).

DNA extraction from timber samples

The timber samples were reduced to chips. 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 pestle and sterile mortar.

DNA was extracted from around 200mg of chips using a Fast DNA SPIN Kit for Soil (Qiagen 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 60µL 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.

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 3µL of 5X buffer, 1.17µL of MgCl₂ at 25mM, 1.2µL of dNTP at 2.5mM, 1µL of each of the primers at 10µM, 0.75 Units of GoTaq Polymerase, 6.48µL of sterile water and 1µL of DNA;
- in a volume of 50µL, comprising 10µL of 5X buffer, 4µL of MgCl₂ at 25mM, 4µL of dNTPs at 2.5mM, 1µL of each of the primers at 10µM, 2µL of DMSO, 25.8µL of sterile water, 1 Unit of GoTaq Polymerase and 2µL of DNA (20ng.µL⁻¹).

Apoi a urmat un program de amplificare începând cu trei minute de denaturare inițială la 94°C, apoi 35 cicluri de denaturare la 95°C pentru un minut, hibridizare la 60°C un minut și alungire la 72°C un minut. Amplificarea s-a încheiat cu 10 minute de alungire la 72°C. Calitatea amplificării a fost apoi controlată prin transfer electroforetic cu 8% gel de agar la 100 V o oră și imersie în BET, 20 minute pentru a releva ADN-ul.

Fiecare produs amplificat (1μL) a fost amestecat cu 18.5μL de formamidă și 0.5μL marker Gene*scan-400 ROX (Applied Biosystems) înainte de tratamentul de încălzire la 95°C cinci minute, apoi răcit în gheață, 10 minute. Moleculele ADN denaturate în forme de fâșii singulare au fost separate prin electroforeza capilară utilizând un secvențier automat ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Condițiile de migrare au fost 15kV la 32°C. Fâșiile ADN la ieșirea din capilare au fost detectate prin etichetarea ITS 2 cu FAM fluoroforă. Diferitele profile obținute au fost calibrate cu software-ul GeneMapper 4.0 prin mărimea markerului conținut în fiecare probă. Profilele SSCP au fost convertite în valori numerice de software-ul SAFUM 2.0.

Analiza D-HPLC

Toate probele ADN (lemn, tulpina pură și sol) au fost analizate prin D-HPLC (Denaturing-High Performance Liquid Chromatography - cromatografie lichidă de înaltă performanță cu denaturare). Condițiile utilizate pentru analiza D-HPLC, pentru acest studiu, pe diferite comunități fungice, sunt prezentate în Tabelul 2.

D-HPLC este o variantă a tehnicii standard HPLC utilizată pentru separarea ADN-ului. ADN-ul este introdus într-o coloană termoreglată. Variația temperaturii aplicate în coloană a permis să se lucreze în condiții de denaturare și ne-denaturare. Nulul și faza staționară hidrofobică sunt compuse din particule alchil neporoase (stiren/vinil benzen). TEAA este amfifilică (lipofilă și hidrofilă) și adsorbită ușor la suprafața fazei staționare cu sarcină pozitivă pe suprafața ei. Aceste particule vor atrage și fixa negativ sarcina AND-ului. Eluția ei este realizată prin utilizarea acetonitrilelor. Un detector UV este utilizat pentru măsurarea semnalului.

Then it was followed by 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.

Each amplification product (1μL) was mixed with 18.5μL of formamide and 0.5μL of Gene*scan-400 ROX size marker (Applied Biosystems) before undergoing heat treatment at 95°C for five minutes then cooling in ice for ten minutes. The denatured DNA molecules in single strand forms were separated by capillary electrophoresis using an ABI PRISM 310 Applied automatic sequencer (Applied Biosystems). The migration conditions were 15kV at 32°C. DNA strands exiting the capillary were detected by labelling the ITS 2 primer with FAM fluorophore. The different profiles obtained were calibrated by GeneMapper 4.0 software by way of the size marker contained in each sample. The SSCP profiles were converted into numerical values by SAFUM 2.0 software.

D-HPLC analysis

All the DNA samples (wood, pure strain and soil) were analysed by D-HPLC (Denaturing-High Performance Liquid Chromatography). Conditions used for D-HPLC analysis, for this study on different fungal communities, are presented in Table 2.

D-HPLC is a variation of the standard HPLC technique used for the separation of the DNA. DNA is introduced in a thermoregulated column. The variation in the applied temperature of the column allows us to work in denaturing as well as non-denaturing conditions. The electrically neutral and hydrophobic stationary phase is composed of non porous alkyl particles (styrene/di vinyl benzene). TEAA is amphiphilic, and adsorb easily on the surface of the stationary phase with a positive charge on its surface. These particles will then attract and fix negatively charge DNA. Its elution is done by using acetonitrile. A UV-detector is used to measure the signal.

Tabelul 2 / Table 2

**Condițiile D-HPLC utilizate pentru acest studiu pe comunități fungice /
D-HPLC conditions used for this study on fungal communities**

	Timp / Time (min)	Soluție tampon A / Buffer A	Soluție tampon B / Buffer B
Incărcare / Loading	0	55	45
Start gradient	0,1	48	52
Stop gradient	18,1	39	61
Start curățire/ Start clean	18,2	55	45
Stop curățire/ Stop clean	18,7	55	45
Start echilibrare/ Start echilibrate	18,8	55	45
Stop echilibrare/ Stop echilibrate	20,3	55	45

Pentru analiza PCR a produsului, 5 μ L sunt injectate în coloană la temperatura de 50°C la un flux al solventului de 0,5mL/min. Soluția tampon A conține 0.1M TEAA iar soluția tampon B conține 0.1M TEAA și 25% acetonitrile (faza mobilă).

Analiza statistica

Datele colectate în acest mod au fost standardizate, adică toate valorile unei probe au fost împărțite la media acelei probe. S-au realizat apoi profilurile și s-a determinat OTUs. Treizeci și unu OTUs au fost caracterizate, luând în considerare toate vârfurile cu o intensitate fluorescentă de peste 2 (Fig. 6). S-a obținut un tabel reprezentând diferite probe și OTUs. Tabelul a fost transpus și s-au interpretat valorile utilizând software-ul StatBox 6.6 pentru a efectua analiza principalelor componente.

S-au obținut astfel toate datele necesare pentru utilizarea rezultatelor (cercul corelației, distribuția indivizilor etc).

REZULTATE

CUANTIFICAREA AND-ULUI TOTAL

Au fost analizate unsprezece probe de cherestea (Tabelul 3). Două operațiuni de extracție independente au fost efectuate și unele probe au fost extrase, în două exemplare (un A și un B au fost adăugate la codul lor).

For the PCR products analysis, 5 μ L are injected in the column at a temperature of 50°C at a solvent flow rate of 0,5mL/min Buffer A contains 0.1M TEAA and buffer B de 0.1M TEAA and 25% of acetonitrile (mobile phase).

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 (Fig. 6). 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.).

RESULTS

TOTAL DNA QUANTIFICATION

Eleven timber samples were analysed (Table 3). Two independent extraction operations were carried out and some samples were extracted in duplicate (an A and a B were added to their code).

Tabelul 3 / Table 3

**Rezultatele extracției ADN-ului și cuantificarea cu spectrofotometru /
Results of DNA extraction and quantification on the spectrophotometer**

Referințe / References	Coduri / Codes	Extracția 1 / Extraction 1		Extracția 2 / Extraction 2	
		ADN / [DNA] în ng.μL ⁻¹	260/280 (nm)	ADN / [DNA] în ng.μL ⁻¹	260/280
34090 A	T Pol A	11.3	1.62	77.09	1.45
5473	Li RCA 2	12.34	2.56	12.45	2.18
18571	L Ca	147.52	0.93	32.95	1.17
23730	L Ci	324.8	0.96	31.43	1.59
34090 B	T Pol B	9.16	3.5	nd	nd
30235	Li Ci A	11.56	1.85	11.24	5.7
18865	Li Ca	13.56	1.94	10.27	2.85
16476	T Ci	14.25	2.13	12.94	2.26
6070	Li RCA 1	10.87	1.96	111.30	1.51
18122	L RCA	184.09	0.81	23.48	1.33
5256	L Co	33.1	1.24	27.11	1.39
29151	L Be	150.63	0.82	8.77	0.98
23730B	L Ci B	nd	nd	26.93	1.19

**INFLUENȚA UNOR PARAMETRI ASUPRA PCR
Efectul diluției probei de ADN în DMSO (dimetil-
sulfoxid)**

O gamă de concentrații au fost testate pe probe din prima extracție, în funcție de concentrația inițială determinată pe spectrofotometrul Nanodrop. De exemplu, trei concentrații au fost testate pe proba numărul 1 (34090A): Pură (11.3ng.μL⁻¹); Jumătate (5.65ng.μL⁻¹); Sfert (2.83ng.μL⁻¹)

**INFLUENCE OF SEVERAL PARAMETERS ON
PCR
Effect of DNA sample dilution in DMSO (Dimethyl
Sulphoxide)**

A range of concentrations was tested on the samples of the first extraction depending on the initial concentration determined by the Nanodrop. For example, three concentrations were tested on sample number one (34090A): Neat (11.3ng.μL⁻¹); Half (5.65ng.μL⁻¹); Quarter (2.83ng.μL⁻¹).

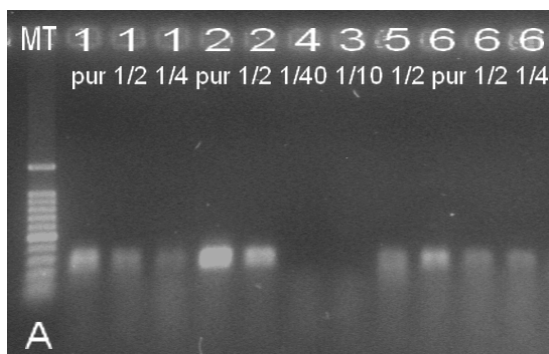


Fig. 1

**Gelurile electroforezei ilustrând efectul cantității de ADN asupra amplificării/
Electrophoresis gels illustrating the effect of the quantity of DNA on amplification**
A - 1, 34090A; 2, 5473; 3, 18571; 4, 23730; 5, 34090B; 6, 30235; B - 7, 18865; 8, 16476; 9, 6070; 10, 18122; +, positive control.

În general s-a constatat că amplificarea este mai bună în teste pure decât în teste diluate pentru probele cu concentrație scăzută (în jur de 10ng.μL⁻¹), ca în Fig. 1, unde probele 1, 2, 6 și 9 afișează o bandă de intensitate mai mare pentru concentrații mai mari. Cu toate acestea, diluarea a fost necesară pentru probe cu o concentrație inițială mai mare.

Generally speaking, we found that amplification seemed better in the neat assays than in the diluted assays for the low-concentration samples (around 10ng.μL⁻¹), as in Fig. 1 where samples 1, 2, 6 and 9 display a band of greater intensity for the higher concentrations. However, dilution was necessary for the samples with a higher initial concentration.

Efectul DMSO

După testarea acestei game de concentrații, s-a efectuat în continuare PCR utilizând trei probe, pentru care amplificarea a dat un rezultat pozitiv: Proba 1 (pură); Proba 2 (pură); Proba 6 (pură). Totuși, de data aceasta s-a adăugat DMSO la amestecul de reacție.

DMSO effect

After testing this range of concentrations, further PCR were carried out using three samples for which amplification gave a positive result: Sample 1 (neat); Sample 2 (neat); Sample 6 (neat). However, this time, we did not add DMSO to the reaction mixture.

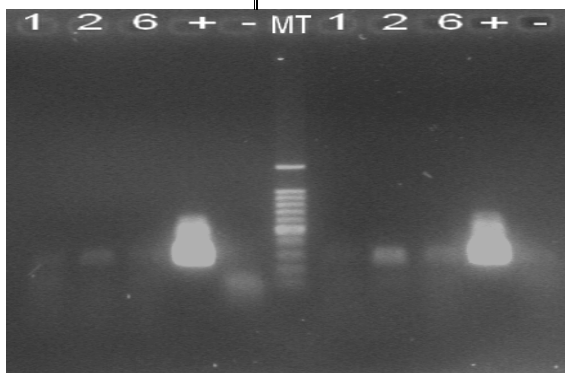


Fig. 2.

**Gelul electroforezei ilustrând influența DMSO asupra PCR /
Electrophoresis gel showing the influence of DMSO on PCR
(1, 34090A; 2, 5473; 6, 30235; +, positive control; -, negative control).**

Fig. 2 arată că DMSO poate avea un efect pozitiv asupra amplificării. Într-adevăr, intensitatea benzii pare a fi mai mare pentru amplificări efectuate cu DMSO (Fig. 2), ceea ce dovedește că au fost prezenți cu siguranță câțiva inhibitori.

Fig. 2 shows that DMSO can have a positive effect on amplification. Indeed, the band intensity seems greater for the amplifications carried out with DMSO (Fig. 2), which is proof that some inhibitors were definitely present.

Efectul volumului amestecului de reacție

Un alt parametru care poate afecta, de asemenea, rezultatele PCR, este volumul final din amestecul de reacție. De fapt, s-au realizat două tipuri de PCR, unul cu un volum final de 50μL (1) sau cu un volum final de 15μL (2).

Effect of the reaction mixture volume

Another parameter which can also affect PCR results is the final volume of the reaction mixture. In fact, we carried out two types of PCR either with a final volume of 50μL (1) or with a final volume of 15μL (2).

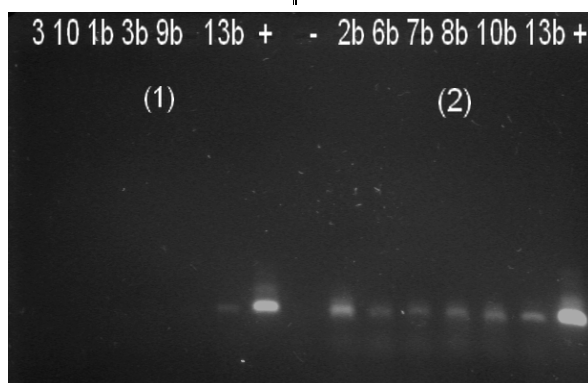


Fig. 3.

**Gelul electroforezei indicând efectul volumului amestecului de reacție /
Electrophoresis gel indicating the effect of the reaction mixture volume
(3, 18571; 10, 18122; 1b, 34090 bis; 3b, 18571 bis; 9b, 6070 bis; 13b, 23730 B; 2b, 5473 bis; 6b, 30235 bis; 7b, 18865 bis; 8b, 16476 bis; 10b, 18122 bis; +, positive control; -, negative control).**

PCR efectuat într-un volum de 15µL a relevat o amplificare mai bună decât în 50µL. Fig. 3 confirmă acest lucru, după cum cele două probe în general (13b și control pozitiv) arată intensitatea benzii mai mare pentru PCR în 15µL.

PCR carried out in a volume of 15µL revealed better amplification than in 50µL. Fig. 3 confirms this, as the two samples in common (13b and positive control) show greater band intensity for PCR in 15µL.

PROFILELE COMUNITĂȚII FUNGICE

Toate profilele pentru aceeași extracție au fost cumulate pe același grafic pentru a determina numărul de vârfuri decisive sau OTUs (Unitatea de Taxonomie Operațională). OTUs au fost caracterizate de poziția lor pe profil și de intensitatea fluorescenței lor.

FUNGAL COMMUNITY PROFILES

All the profiles for the same extraction were cumulated on the same graph to determine the number of decisive peaks or OTUs (Operational Taxonomy Unit). The OTUs were characterized by their position on the profile and the intensity of their fluorescence.

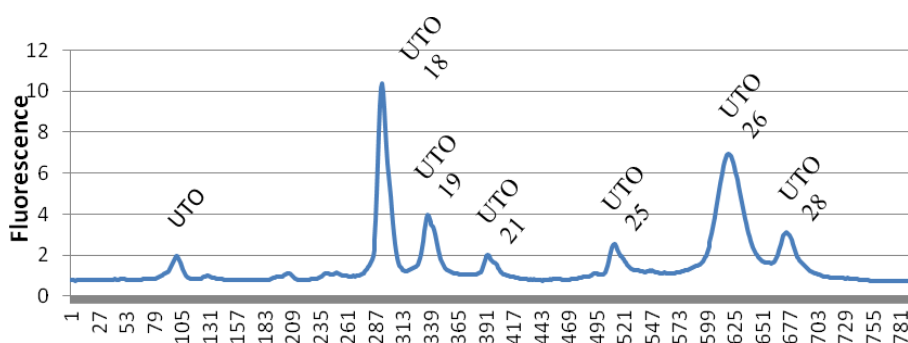


Fig. 4.
Exemplul profilului SSCP (proba 5473 bis) /
Example of a SSCP profile (sample 5473 bis).

ANALIZA COMPONENTILOR PRINCIPALI (PCA)

Datele obținute după separarea ampliconului în CE-SSCP au fost prelucrate utilizând o abordare multifactorială pentru a releva orice corelații dintre OTUs (variabile) și dintre indivizi (cherestea analizată).

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA)

The data obtained after amplicon separation in CE-SSCP were processed taking a multifactor approach to bring out any correlations between the OTUs (variables) and between individuals (timbers analysed).

Investigarea corelației dintre indivizi și OTUs.

Search for correlations between individuals and OTUs.

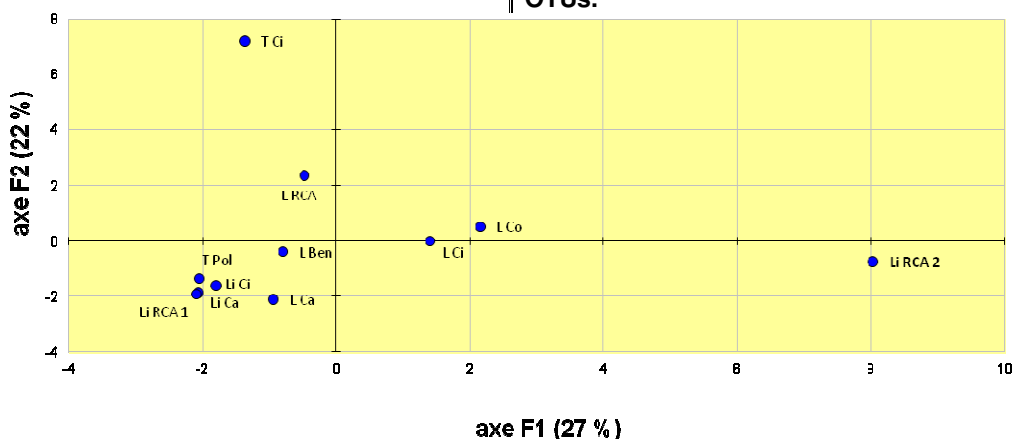


Fig. 5.
Reprezentarea indivizilor în conformitate cu axele F1 și F2 (49%) /
Representation of individuals according to axes F1 and F2 (49%).

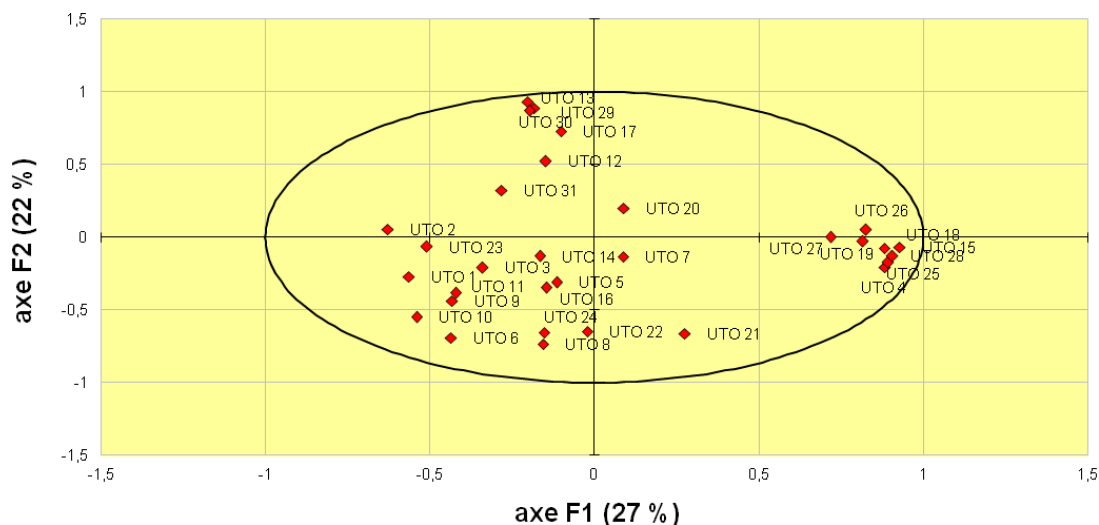


Fig. 6.

Cercul corelației variabilelor în conformitate cu axele F1 și F2 (49%) / Correlation circle for the variables according to axes F1 and F2 (49%).

Fig. 5 nu aduce nici o informație importantă cu privire la corelarea între diferiți indivizi, în ciuda unei ușoare tendințe care poate fi văzută între cele două specii, Afara și Limbali. Într-adevăr, aceasta din urmă pare a fi în continuare lăsată pe axa F1 decât Afara, sugerând că axa F1 ar putea reprezenta specia. În plus, Fig. 6 arată că anumite OTUs au contribuit foarte mult la această axă, cum ar fi de ex. OTU 15, 18, 25 și 26.

Fig. 5 does not bring out any major information on the correlation between the different individuals, despite a slight tendency that can be seen between the two species, Afara and Limbali. Indeed, the latter seems further left on axis F1 than Afara, suggesting that axis F1 might represent the species. In addition, Fig. 6 shows that certain OTUs greatly contributed to this axis, such as OTU 15, 18, 25 and 26, for example.

INVESTIGAȚII PRIVIND CORELĂRILE UTILIZÂND DATE PRIMARE

Cum definiția OTUs este subiectivă, s-a decis să se repete analiza folosind datele primare (una din 10 valori a fost utilizată ca variabilă).

SEARCH FOR CORRELATIONS USING RAW DATA

As the definition of OTUs is subjective, we decided to repeat the analysis using raw data (one out of 10 values was used as a variable).

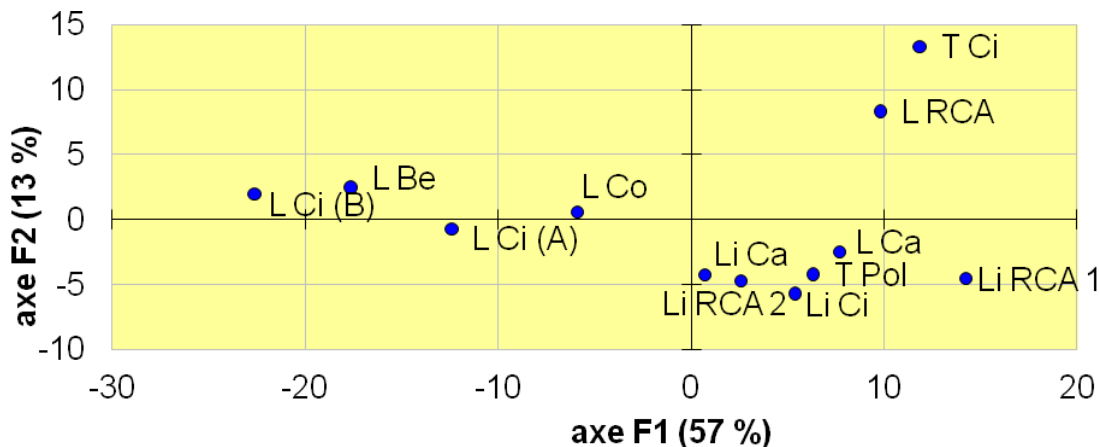


Fig. 7.

Reprezentarea indivizilor în conformitate cu axele F1 și F2 (70%) / Representation of the individuals according to axes F1 and F2 (70%).

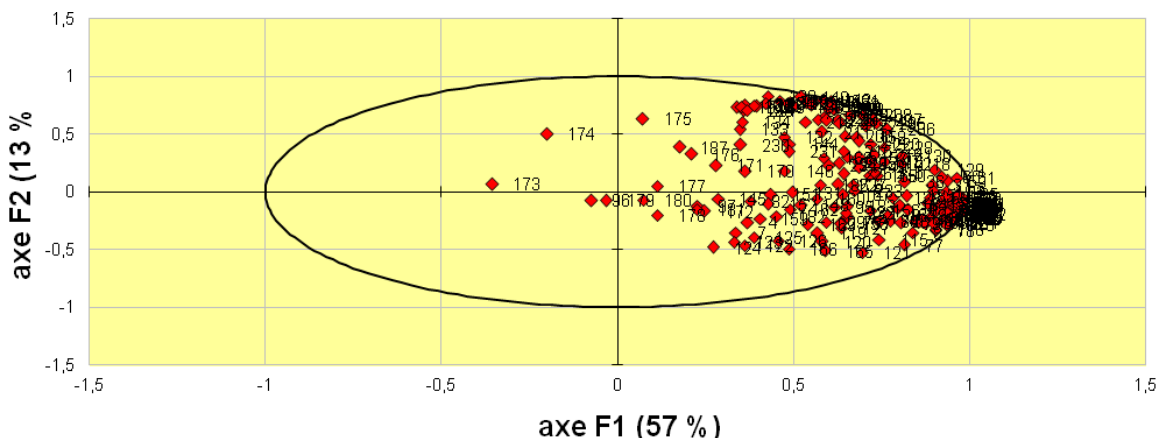


Fig. 8.
Cercul corelației variabilelor în conformitate cu axele F1 și F2 (70%) /
Correlation circle for the variables according to axes F1 and F2 (70%).

S-a găsit din nou tendința deja menționată, cu separarea celor două specii Afara și Limbali (Fig. 7). Specia Afara (L) a fost găsită preferențial pe partea stângă a axei F1 și Limbali pe dreapta, exceptând Afara (L) din Camerun, care s-a regăsit în același grup ca Limbali.

Cercul de corelație (Fig. 8) indică încă o dată faptul că variabilele au avut o contribuție importantă la construirea axei F1, cum acestea au apărut mai ales la marginea cercului pe această axă.

DISCUTII

Extracția ADN

Cuantificarea pe Nanodrop a furnizat informații privind calitatea ADN-ului extras. Dintre toate extracțiile, doar o probă a avut un raport de 260:280 între 1,6 și 1,8, rezultând existența certă a proteinelor, în toate celelalte probe. Faza de precipitare a proteinelor în timpul extracției, prin urmare, ar putea fi considerată insuficientă.

Sub aspect cantitativ, cele mai multe probe din prima extracție au avut o concentrație de aproximativ 10ng.μL⁻¹, în afară de patru probe a căror concentrație a fost de peste 100ng.μL⁻¹. Distribuția a fost mai uniformă pentru a doua extracție, cu 10 probe care arată o concentrație între 10 și 30ng.μL⁻¹. Cantitățile de ADN extrase par suficiente. Totuși, în timpul extracției, ADN-ul din cherestea a fost izolat în același mod ca și ADN-ul fungic. În timpul cuantificării, deosebirea dintre cele două tipuri de ADN nu a fost dezvăluită în mod evident prin spectrofotometrie. Nu s-a putut stabili, prin urmare, cantitatea de ADN fungic, comparativ cu cantitatea de ADN din cherestea. În cazul în care ultimul ar fi în majoritate, amplificarea materialului fungic ar fi mult mai dificilă.

Inhibitori în cherestea

Existența inhibitorilor depinde de matricea folosită în timpul extracției. De fapt, în probele

We found again the tendency already mentioned, with a separation of the two species Afara and Limbali (Fig. 7). Afara (L) was found preferentially on the left of axis F1 and Limbali on the right, though with an exception for Afara (L) from Cameroon, which fell into the same group as Limbali.

The correlation circle (Fig. 8) indicates once again that the variables strongly contributed to the construction of axis F1, as they mostly occurred at the edge of the circle on this axis.

DISCUSSION

DNA extraction

Quantification on the Nanodrop provided information on the quality of the extracted DNA. Over all our extractions, only one sample had a 260:280 ratio between 1.6 and 1.8, resulting in a definite existence of proteins in all the other samples. The protein precipitation phase during extraction could therefore be considered insufficient.

In terms of quantity, most of the samples of the first extraction had a concentration of around 10ng.μL⁻¹, apart from four samples for which the concentration was over 100ng.μL⁻¹. The distribution was more uniform for the second extraction, with 10 samples showing a concentration of between 10 and 30ng.μL⁻¹. The quantities of DNA extracted appeared sufficient. However, during extraction, the timber DNA was isolated in the same manner as the fungal DNA. During quantification, the distinction between the two types of DNA was obviously not revealed by spectrophotometry. We could not therefore ascertain the amount of fungal DNA compared to the amount of timber DNA. If the latter were in the majority, amplification of the fungal material would be more difficult.

Timber inhibitors

The existence of inhibitors depends on the

prelevate de la plante, s-au găsit compuși precum fenoli și polizaharide, în timp ce în probele de sol, acidul humic a fost majoritar. În cherestea, compușii fenolici sunt printre cei mai frecvenți inhibitori prezenți (ex. taninuri). Ultimii sunt antioxidanții și asociațiile lor, prin legăturile covalente cu proteinele și acizii nucleici, reduc puritatea ADN-ului de extracție și astfel reduc randamentul. În plus, aceasta poate provoca negative false în cazul detectării ciupercilor prin PCR.

Cu toate acestea, există componente care pot fi adăugate în timpul extracției sau în amestecul de reacție, pentru a elimina acțiunea inhibitorilor. Acidul humic poate fi precipitat în timpul extracției de CaCl_2 și ulterior eliminat de etanol. Polizaharidele pot reacționa cu CTAB (bromura de hexadeciltrimetilamoniu), prin legătură ionică. În cele din urmă, DMSO (dimetil-sulfoxid) și albumina au capacitatea de a inhiba compuși fenolici. DMSO, de asemenea, reduce formarea de hibridizări non-specifice, crescând rigurozitatea reacției. Cu toate acestea, în cazul în care concentrația în amestec este de peste 10%, prezența sa poate reduce activitatea de polimerizare a ADN-ului.

În scopul de a evidenția prezența inhibitorilor de amplificare, s-a efectuat un PCR pe probe cu o cantitate identică de ADN tulpină pură în toate tuburile, adăugând, de asemenea, proba ADN-ului de mediu, pentru a fi amplificate, la concentrații mai mari. De fapt, două probe: (29151 $150.63\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ și 5256: $33.1\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) au fost testate într-un amestec de reacție de $15\mu\text{L}$ cu $1\mu\text{L}$ de ADN și $1\mu\text{L}$ de ADN tulpină pură. Prima probă nu a dat nici un rezultat și s-ar putea prin urmare imagina că au fost prezenți inhibitori în soluția ADN-ului recuperată după extracție, cum tulpina pură nu a fost amplificată. Pe de altă parte, cealaltă probă a prezentat o bună amplificare pentru toate concentrațiile de tulpină pură testate.

O gamă de concentrații a fost apoi testată pe aceleași două probe. Proba 29151 a afișat o bandă pornind de la o concentrație de aproximativ $25\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ până la $1.30\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, în timp ce proba 5256 a afișat o bandă pentru toate concentrațiile. Am putea considera, prin urmare, că, amplificarea s-a realizat mai bine atunci când probele, cu o concentrație inițială mare, au fost diluate. Acest lucru a fost posibil poate din cauza faptului că, prin diluarea ADN-ului, am diluat de asemenea orice inhibitori. Prezența inhibitorilor poate fi, de asemenea, demonstrată cu ajutorul DMSO. Fig. 4 arată într-adevăr că, atunci când compusul a fost folosit, benzile au fost mai intense. Aceasta poate datorită faptului că DMSO face ADN-ul mai accesibil pentru polimerizare prin compușii fenolici inhibitori.

În cele din urmă, o singură serie de amplificare a fost adoptată pentru analiza SSPC, care a fost efectuată pe a doua extracție, într-un volum de $15\mu\text{L}$.

matrix used during extraction. In fact, for samples taken from plants, compounds such as phenols and polysaccharides are found, whereas for soil samples, it is humic acid that will be in the majority. In timber, phenolic compounds are among the inhibitors most frequently present (such as tannins, for example). The latter are antioxidants, and their associations by covalent bonding with proteins and nucleic acids reduce the purity of DNA extraction and thereby reduce the yield. In addition, it can cause false negatives in the case of fungus detection by PCR.

However, constituents exist that can be added during extraction or in the reaction mixture, to eliminate the action of inhibitors. Humic acid can be precipitated during extraction by CaCl_2 and subsequently removed by ethanol. Polysaccharides can chelate with CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) by ionic bonding. Lastly, DMSO (dimethyl sulphoxide) and albumin have the ability to inhibit phenolic compounds. DMSO also reduces the formation of non-specific hybridization, increasing reaction stringency. However, if its concentration in the mix is over 10%, its presence can reduce DNA polymerase activity.

In order to reveal the presence of amplification inhibitors, we carried out a PCR on our samples with an identical quantity of pure strain DNA in all the tubes, also adding the environmental DNA sample to be amplified, at increasing concentrations. In fact, two samples ($29151: 150.63\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ and $5256: 33.1\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) were tested in a $15\mu\text{L}$ reaction mixture with $1\mu\text{L}$ of sample DNA and $1\mu\text{L}$ of pure strain DNA. The first sample did not give any result, and it could therefore be imagined that inhibitors were present in the DNA solution recovered after extraction, as the pure strain was not amplified. On the other hand, the other sample exhibited good amplification for all the pure strain concentrations tested.

A range of concentrations was then tested on the same two samples. Sample 29151 displayed a band starting from a concentration of around $25\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ up to $1.30\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, whereas sample 5256 displayed a band for all the concentrations. We could therefore consider that amplification worked better when samples with a high initial concentration were diluted. This may have been due to the fact that by diluting the DNA, we also diluted any inhibitors. The presence of inhibitors could also be demonstrated using DMSO. Indeed, Fig. 4 shows that when the compound was used, the bands were more intense. This may be because DMSO made the DNA more accessible to the polymerase by inhibiting phenolic compounds.

Lastly, a single amplification series was adopted for SSPC analysis, which was carried out on the second extraction, in a volume of $15\mu\text{L}$.

Analiza SSPC

Profilul obținut a condus la detectarea a 31 de OTUs (unități operaționale taxonomice) pe setul de probe, de ex. în jurul a 2,8 OTUs (sau phylotypes) pe probă. S-ar putea considera că probele au fost lipsite de diversitatea materială pentru analiza SSPC.

La observarea profilului, nu a fost de asemenea, posibil să se vadă nici o confuzie între probe, care ar fi putut modifica rezultatele statistice obținute ulterior.

Analiza statistică: analiza componentelor principali (PCA)

Nici o concluzie semnificativă statistic nu poate fi trasă din analiza pe bază de OTU (Fig. 5). Într-adevăr, a fost imposibil să se grupeze originile geografice ale fiecăruia. În plus, în această figură, diferența între specii, nu este la fel de clar vizibilă ca în Fig. 7. Efectiv, în această figură, faptul de a fi realizat un PCA cu date brute luate la întâmplare a făcut posibil să se scoată în evidență mai bine cele două grupuri (Afara și Limbali). Totuși, proba Afara din Camerun a fost localizată în grupul Limbali. Cu toate acestea, există o modalitate de a verifica dacă poziția sa în plan poate fi considerată corectă. Pentru a face acest lucru, s-a observat valoarea pătratului cosinusului și dacă este peste 0.4 se poate considera că punctul de referință al probei a fost în locul potrivit. Valoarea pentru această probă a fost de 0,39, adică sub valoarea de prag, dar suficient de aproape pentru a exprima o îndoială cu privire la interpretarea acestui rezultat. Prin urmare, a fost dificil să se concluzioneze asupra poziției reale a acestei probe.

Ceea ce se poate spune este că, în general, probele aflate la dreapta axei F1 au aparținut speciei Limbali, în timp ce, cele de pe cealaltă parte a axei în cea mai mare parte au aparținut speciei Afara.

În concluzie, s-a investigat astfel tehnica SSPC pentru a determina originea geografică a cherestelei din specii exotice. După analizele statistice ale datelor SSPC, am avut posibilitatea de a vedea o tendință care a părut să grupeze probele în funcție de specie.

Se poate imagina cheresteaua colonizată de diferite comunități, cum ar fi cele specifice speciei, locului de producție, sau de depozitare, în cazul depozitării pe termen lung. Prin urmare, ar fi dificil să se determine efectiv originea geografică folosind toate comunitățile existente în cherestea. Ideal ar fi să se știe taxonii prezenți în probe, pentru ca analiza statistică să se bazeze exclusiv pe cei de interes și nu pe contaminanți. Pentru a realiza acest lucru, ar fi de preferat să efectueze clonarea ampliconului înainte de secvențiere. O altă tehnică ar duce aparent la același rezultat: D-HPLC. Această tehnică face posibilă recuperarea fracțiilor specifice unui vârf în funcție de timpul de retenție (Troedsson ș.a. 2008) făcând astfel posibilă secvența probei.

SSCP analysis

The profile obtained led to the detection of 31 OTUs on the set of samples, i.e. around 2.8 OTUs (or phylotypes) per sample. We could consider that the samples possessed not insubstantial diversity for SSPC analysis.

When observing the profile, we were also able to see any staggering between the samples, which might have modified the statistical results obtained thereafter.

Statistical analysis: principal components analysis (PCA)

No statistically significant conclusions could be drawn from the OTU-based analysis (Fig. 5). Indeed, it was impossible to group the geographical origins with each other. In addition, in this figure, the distinction between species is not as clearly visible as in Fig. 7. In effect, in that figure, the fact of having carried out a PCA with raw data taken at random made it possible to bring out the two groups more effectively (Afara and Limbali). However, the Afara sample from Cameroon was located in the Limbali group. Nevertheless, there was one way of checking whether its position in the plane could be considered correct. To do this, we observed the value of the squared cosines and if it was over 0.4 we could consider that the point referencing the sample was in the right place. The value for this sample was 0.39, i.e. below the threshold value but close enough to express a doubt as to the interpretation of this result. It was therefore difficult to conclude on the true position of that sample.

What we can say is that, all in all, the samples located to the right of axis F1 belonged to the Limbali species, whereas those on the other side of the axis mostly belonged to the Afara species.

In conclusion, we thus investigated the SSPC technique for determining the geographical origin of exotic timbers. After statistical analyses of SSPC data, we were only able to see a tendency that seemed to group samples according to timber type.

It can be imagined that timber is colonized by different communities, such as those specific to the species, production site or storage site in the event of long-term storage. It may therefore be difficult to successfully determine geographical origin using all the communities existing in timber. The ideal thing would be to know the taxa present in samples, in order to base the statistical analysis solely on those of interest, and not on contaminants. To achieve that, it would be preferable to carry out amplicon cloning prior to sequencing. Another technique would apparently lead us to the same result: D-HPLC. This technique makes it possible to recover the specific fractions of a peak according to its retention time (Troedsson *et al.* 2008) thereby making it possible to sequence the sample.

Abrevieri

CE-SSCP: Electroforeză Capilară- tehnică de analiză (utilă în detectarea poliformismului determinat de cel puțin o nucleotidă)
D-HPLC : Cromatografie lichidă de înaltă performanță de denaturare
DNA: acid dezoxiribonucleic
dNTP: Deoxyribonucleotide Trifosfat
OTU: Unități taxonomice operaționale
PCA: Analiza Componentelor Principali
PCR: Reacție în lanț a polimerazei
RT-PCR: Reacție de polimerizare în lanț cu detecție în timp real
UV: Ultra Violet

Abbreviations

CE-SSCP: Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism
D-HPLC : Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DNA: Deoxyribonucleic Acid
dNTP: Deoxyribonucleotide Triphosphate
OTU: Operational Taxonomic Unit
PCA: Principal Components Analysis
PCR: Polymerase Chain Reaction
RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction
UV: Ultra Violet

BIBLIOGRAFIE / REFERENCES

- CAO, C.P., GAILING, O., SIREGAR, I., INDRIKO, S., FINKELDEY, R. (2006). Genetic variation at AFLPs for the Dipterocarpaceae and its relation to molecular phylogenies and taxonomic subdivisions. *Journal of Plant Research* 119(5):553-558.
- CHASE, M.W., SALAMIN, N., WILKINSON, M., DUNWELL, J.M., KESANAKURTHI, R.P., HAIDAR, N., SAVOLAINEN, V. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 360:1889-1895.
- EL SHEIKHA, A.F., CHALIER C., ZAREMSKI, A., MONTET, D. (2009). Determination of the geographical origin of timber by using an innovative molecular tool "PCR-DGGE": Preliminary application to tropical timber. In Conference "How to trace the origin of food?", 2009-12-02/2009-12-03, Brussels, Belgium.
- EL SHEIKHA, A.F., CONDUR, A., MÉTAYER, I., LE NGUYEN, D.D., LOISEAU, G., MONTET, D. (2009). Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: preliminary application to *Physalis* fruits from Egypt. *Yeast* 26: 567 – 573.
- LE NGUYEN, D.D., NGOC H.H., DIJOUX, D., LOISEAU, G., MONTET, D. (2006). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on *Pangasius* fish from Viet Nam. *Food Control* 19:454–460.
- FINKELDEY, R., LEINEMANN, L., GAILING, O. (2009). Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85(5):1251–1258.
- HAMILTON, M.B. (1999). Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol Ecol* 8:513-525.
- HARVARD, M.L., DEFRÉMOND, E., ZAREMSKI, A., SALES, C. (2007). Using strontium isotopes to determine the provenance of tropical timber Bois et forêts des tropiques. n°294.
- HOFFMAN, M.T., ARNOLD, E. (2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological research*, 112:331-344.
- HEBERT P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L., DE WAARD, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the royal society of London series B-Biological Sciences* 270: 313-321.
- HEBERT, P.D.N., GREGORY, T.R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54:852-859.
- JANZEN, D.H.: 2004. Now is the time. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 359:731-732.
- JANZEN, D.H. (2005). In *Plant Conservation: A natural History Approach*, eds. Krupnick, G.A., & Kress, W.J. (Univ. Chicago Press, Chicago), pp. IX-XIII.
- KRESS, W.J., WURDACK, K.J., ZIMMER, E.A., WEIGT, L.A., JANZEN, D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS* 23:8369-8374.
- ORITA, M., SUZEKI, Y., SEKIYA, T., HAYASHI, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879.
- TABERLET, P., COISSAC, E., POMPANON, F., GIELLY, L., MIQUEL, C., VALENTINI, A., VERMAT, T., CORTIHER, G., BROCHMANN, C., WILLERSLEV, E. (2007). Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* 35:e14; doi:10.1093/nar/gkl938.
- TROEDSSON, C., LEE, R., STOKES, V., WALTERS, T., SIMONELLI, P., FRISCHER, M. (2008). Development of a denaturing high-performance liquid chromatography method for detection of protist parasites of metazoans. *Appl Environ Microbiol*, 74:4336-4345.
- VAINIO, E.J., HANTULA, J. (2000). Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel

electrophoresis of amplified ribosomal DNA. Mycological research 104:927-936.
WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322 In: PCR protocols: a guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ eds), Academic Press, New York.