

**CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A
BIODIVERSITĂȚII FUNGICE ȘI
IDENTIFICAREA TIMPURIE A
CIUPERCILOR ASOCIATĂ CU
DEGRADAREA PALMIERULUI DE ULEI, IN
PARTICULAR *GANODERMA BONINENSE***

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
FUNGAL BIODIVERSITY AND EARLY
IDENTIFICATION OF FUNGI ASSOCIATED
WITH OIL PALM DECAY, PARTICULARLY
*GANODERMA BONINENSE***

Alba ZAREMSKI*

Dr.- Researcher – CIRAD, UMR AGAP
Adresa/Address: F 34398 Montpellier, France
E-mail: alba.zaremski@cirad.fr

Emeric LECOEUR

Researcher – CIRAD, UMR AGAP
Adresa/Address: F 34398 Montpellier, France

Frédéric BRETON

Researcher – CIRAD, UMR AGAP
Adresa/Address: F 34398 Montpellier, France

Hubert DE FRANQUEVILLE

Researcher – Société PalmElit
Adresa/Address: Bât 14 Parc Agropolis - 2214 Bd de la Lironde, 34980 Montferrier sur Lez, France

Rezumat:

*Până în prezent, nu au fost informații disponibile cu privire la diversitatea și caracterizarea moleculară a ciupercilor asociate cu degradarea palmierului de ulei. Acest studiu s-a realizat ca un răspuns la cerința de informații esențiale privind biodiversitatea fungică în general, la nivel mondial, asociată cu degradarea palmierului de ulei. În acest studiu, din 30 de probe proaspete (țesuturi proaspete infestate și corpuri fructifere), din plantațiile din Tanah-Gambus (Indonezia), 5 tulpini izolate au fost identificate ca fiind *Ganoderma boninense*. În general, tulpinile izolate au aparținut speciilor Ascomycetes și Mucorales. Unele dintre aceste tulpini au avut un ritm de creștere foarte rapid (48h), cum ar fi cele din genul *Trichoderma* sau *Fusarium*, ceea ce le face extrem de invazive. Mediul de creștere cel mai potrivit pare să fie PDA-Chloramfenicol. Adaptarea protocolului elaborat în acest studiu, ne-a permis extragerea ADN-ului din toate probele, folosind doar 40 mg de micelii de corpuri fructifere de *Ganoderma* și țesuturi noi de palmier de ulei. Până în prezent, rezultatul din analiza secvențială pentru 250 de probe, indică numele unei singure specii și criteriul de performanță BLAST foarte mari (e-valoare, procent de acoperire) din cele mai bune 10 rezultate. După BLAST, s-au obținut 17% genul *Ganoderma*, 41% Ascomycetes, drojdii și alte Basidiomycetes, 17% diverse (plante etc.) și 25% de secvențe inutilizabile. O analiză inițială a relațiilor interspecifice filogenetice a genului *Ganoderma*, bazat pe o comparație a secvențelor ADN, 5.8S și ITS2, a evidențiat în mod clar încrângături distincte în care speciile au avut tendința de a se grupa în funcție de natura probei și originea geografică, în special în cazul speciilor din Benin și Indonezia, și probelor liofilizate (uscate prin congelare) din Indonezia.*

Cuvinte cheie: biodiversitate fungică; palmier de ulei; caracterizare moleculară; ADN; *Ganoderma*.

Abstract:

*To date, there was no information available on the diversity and molecular characterization of fungi associated with oil palm decay. This study appeared as a response to that need for essential information on the overall, global biodiversity of fungi associated with oil palm decay. In this study, 5 isolates from 30 fresh samples from the Tanah-Gambus estates (infested fresh tissues and fruiting bodies) seemed to be *Ganoderma boninense*. In general, the strains isolated belonged to the class of the Ascomycetes and of the Mucorales. Some of these strains had a very fast growth rate (48h), making them highly invasive, such as the genera *Trichoderma* or *Fusarium*. The PDA-Chloramphenicol medium seemed to be the most appropriate. Adaptation of the protocol developed in this study enabled us to extract DNA from all our samples using just 40 mg of mycelium of *Ganoderma* fruiting bodies and of fresh oil palm tissues. To date, the sequencing result for 250 samples gives a single species name and very high BLAST performance criteria (e-value, % coverage) for the best 10 results. After BLAST, we obtained 17% the genus *Ganoderma*, 41% of Ascomycetes, yeasts and other Basidiomycetes, 17% miscellaneous (plants etc.) and 25% of unusable sequences. An initial analysis of the interspecific phylogenetic relations of *Ganoderma*, based on a comparison of rDNA sequences, 5.8S and ITS 2, revealed clearly distinct clades where the species tended to group according to the nature of the sample and the geographical origin, particularly the species from Benin and Indonesia, and the freeze-dried samples from Indonesia.*

Key words: fungi biodiversity; oil palm; molecular characterization; AND; *Ganoderma*.

* Autor corespondent / Author to whom all correspondence should be addressed

INTRODUCERE

Ganoderma boninense, o ciupercă de sol și care provoacă putregaiul de la baza tulpinei, distruge mii de hectare de palmieri de ulei din Asia de Sud-Est (Adaskaveg și Gilbertson 1994, Stalpers 1976). În Africa Centrală a început să provoace deteriorări serioase și reprezintă o potențială amenințare pentru plantațiile din America Latină, dintre care unele sunt deja afectate (FAO 2013). Dezvoltarea acestui flagel depinde în primul rând de numărul de cicluri succesive ale palmierului de ulei în aceeași zonă (Miller ș.a. 1999, Utomo și Niepold 2000, Paterson 2007).

Până în prezent, nu au existat informații disponibile cu privire la diversitatea și caracterizarea moleculară a ciupercilor asociată cu degradarea palmierului de ulei. Acest proiect a apărut ca răspuns la necesitatea de informații esențiale privind biodiversitatea fungică în general, la nivel mondial, asociată cu degradarea palmierului de ulei. De exemplu, a existat necesitatea de a constitui o colecție de sușe de referință de *Ganoderma boninense* pe baza unor criterii clasice (cultură, anatomie, morfologie etc.), precum și pe criterii moleculare (extracție ADN, secvențierea și filogenie).

Această lucrare a constatat în izolarea și purificarea în laborator (cultura *in vitro* în Franța și Indonezia), a ciupercilor responsabile pentru daunele observate în teren, și, de asemenea, a ciupercilor existente în mediul colateral (ex: tulpina de pădure), sau cele care nu cauzează simptome pe parcursul mai multor ani (palmieri, cu un aspect sănătos, dar care poartă corpurile fructifere, ce pot fi găsite în Indonezia).

Lucrarea s-a realizat pe ciuperci în creștere active (corp fructifer, miceliu). Sușele acestei colecții sunt menținute în cultură, în diferite laboratoare.

Studiile realizate pe parcursul acestei lucrări au avut mai multe obiective: 1) de a determina diversitatea fructificațiilor fungice din genul *Ganoderma* pe plantațiile de palmier de ulei din Tanah-Gambus și caracterizarea sa taxonomică; 2) de a crea o colecție de ciuperci izolate din acele fructificații și din tesuturi noi de palmier de ulei infestate cu *Ganoderma*; 3) de a realiza caracterizarea taxonomică a tulpinilor izolate.

Acest studiu nu a fost limitat totuși la observații morfologice, histologice și anatomice ale fructificațiilor, care rămân esențiale, chiar dacă sunt mari consumatoare de timp.

S-a ales să se lucreze în acest studiu în regiunea cea mai frecvent utilizată pentru arborii filogenetici și pentru a identifica tulpini. Primerii ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') și ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), specifici ciupercilor, au fost aleși pentru această analiză taxonomică a speciilor studiate. Acești primeri au fost concepuți pentru a amplifica zona cuprinzând spațiile interne transcrise ITS1 și ITS2, care sunt relativ variabile, și subunitatea ribozomală mică 5.8S, care nu este foarte variabilă (Gardes și Bruns 1993; Schmidt și Moreth 2000; Martin ș.a. 2002; Guerin-Laguette ș.a. 2003; Mitchell și Zuccaro 2006). Era de așteptat ca acest

INTRODUCTION

Ganoderma boninense, a soil-borne fungus and the cause of basal stem rot, destroys thousands of hectares of oil palms in Southeast Asia (Adaskaveg et Gilbertson 1994, Stalpers 1976). It has started to cause serious damage in central Africa and is a potential threat to Latin American plantations, some of which are already affected (FAO 2013). The development of this threat primarily depends on the number of successive oil palm cycles in the same zone (Miller *et al.* 1999, Utomo et Niepold 2000, Paterson 2007).

To date, there was no information available on the diversity and molecular characterization of fungi associated with oil palm decay. This project appeared as a response to that need for essential information on the overall, global biodiversity of fungi associated with oil palm decay. For instance, there was a need to constitute a collection of *Ganoderma boninense* reference strains based on conventional criteria (culturing, anatomy, morphology etc.) and on molecular criteria (DNA extraction, sequencing and phylogeny).

This work consisted in isolating and purifying in the laboratory (*in vitro* culture on media in France and Indonesia) the fungi responsible for damage seen in the field, and also fungi existing in the nearby environment (e.g. forest strain), or those not causing symptoms over several years (palms with a healthy appearance but bearing fruiting bodies can be found in Indonesia).

The work was carried out on actively growing fungi (fruiting body, mycelium). The strains of this collection are maintained in cultures in the different laboratories.

The studies undertaken during this work had multiple objectives: 1) to determine the diversity of fungal fructifications of the genus *Ganoderma* in the oil palm estates at Tanah-Gambus, and proceed with its taxonomic characterization; 2) to create a collection of fungus isolated from those fungal fructifications and from fresh oil palm tissues infested by *Ganoderma*; 3) to perform the taxonomic characterization of the isolates.

But this study was not limited to morphological, histological and anatomical observations of the fructifications, which remain essential even though they are very time-consuming.

In this study, it was chosen to work in the region most frequently used to identify strains and for phylogenetic trees. The primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), specific to fungi, were chosen for this taxonomic analysis of the studied species. These primers have been designed to amplify the zone comprising the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2, which are relatively variable, and the 5.8S small ribosomal subunit, which is not highly variable (Gardes and Bruns 1993; Schmidt and Moreth 2000; Martin *et al.* 2002; Guerin-Laguette *et al.* 2003; Mitchell and Zuccaro 2006). This study was expected to result in the identification and discrimination of most of these fungus species using a pure mycelium culture and contaminated oil palm tissue.

In addition to the previously listed objectives, this

studiu să conducă la identificarea și discriminarea celor mai multe dintre aceste specii de ciuperci utilizând o cultură de miceliu pur și țesut contaminat de palmier de ulei.

În plus față de obiectivele enumerate anterior, această abordare taxonomică a avut drept scop să conducă la o mai bună cunoaștere a ciupercilor care cauzează degradarea palmierilor de ulei, în special a celor din tipul Basidiomycete, *Ganoderma boninense*.

Principalele etape implicate în acest studiu au fost următoarele: 1) izolarea în culturi pure și obținerea de miceliu pur din corpuri fructifere și din țesuturi infestate de palmier de ulei; 2) dezvoltarea de tehnici de caracterizare moleculară: extracție și purificare a ADN-ului de ciupercă din miceliu pur, amplificarea ADN-ului; 3) analize secvențiale: compararea secvențelor și identificarea prin baza de date BLAST și GENBANK.

METODA ȘI MATERIALE

Material biologic

Probele din Tanah-Gambus, Indonezia

Au fost două seturi de probe:

Un prim set de 31 probe recoltate în septembrie 2010 și depozitate la -20°C (Tabelul 1): 17 probe au fost corpuri fructifere (notat "Ind."); 1 corp fructifer din pepinieră (notat "Ind.29N"); 13 au fost părți din tulpini de palmier de ulei suspectate de a fi infectate (identificate prin numere, de ex. "2.0" a fost primul fragment din tulpina Nr. 2). Au fost 62 de sub-eșantioane din tulpini, care se regăsesc în Tabelul 4.

Un al doilea set de 28 de probe prelevate în martie 2011 (Tabelul 2), a fost păstrat la 4°C: 16 au fost corpuri fructifere (notate "D") (Fig.1), 12 au fost părți din tulpină (notate "D").

Probele din Benin

Din Benin au sosit 12 probe, care au fost împărțite în trei categorii: 5 din parcele (notate "P"); 4 *oleifera* (notate "O") și 3 Benin (notate "B"). Această codificare a fost aleasă în conformitate cu indicațiile de pe fișele ciupercilor.

Probele analizate în 2010

Unele probe au provenit din analizele efectuate în 2010: 23 țesuturi infectate din palmierul de ulei și liofilizate. Nomenclatura a fost aceeași ca și în anul precedent.

Probe de control

Patru eșantioane de referință pozitive: *Ganoderma Lucidum* (notate "(+)G1"), *Ganoderma atkinsonii* (notate "t(+)Ga"), IC14, o ciupercă identificată în timpul studiului din 2010, și o probă NJ3 din martie 2010, colecțiile din Tanah-Gambus (Indonezia), aceasta fiind țesut proaspăt de palmier de ulei (notat "t (+) NJ3").

O probă de referință negativă: apa Millipore (apă pură notată "t -").

Toate aceste probe sunt prezentate în Tabelul 3.

Sub-eșantioane din tulpini de palmier de ulei din recolta din septembrie 2010

Secțiunile transversale ale țesuturilor palmierului de ulei au fost observate sub o lupă și s-au identificat unele zone de culori diferite, utilizând discuri

taxonomic approach aimed to lead to better knowledge of the fungi that cause damage to oil palms, particularly the Basidiomycete *Ganoderma boninense*.

The main stages involved in this study were as follows: 1) isolation in pure cultures and production of pure mycelium from fruiting bodies and from infested oil palm tissues; 2) development of molecular characterization techniques: extraction and purification of the DNA of the fungus from pure mycelium; development of DNA amplification; 3) sequence analyses: comparison of sequences and identification by BLAST and GENBANK.

METHOD AND MATERIALS

Biological material

Samples from Tanah-Gambus, Indonesia

There were two sets:

A first set of 31 samples collected in September 2010 and stored at -20°C: 17 were fruiting bodies (noted "Ind."); 1 fruiting body from the nursery (noted "Ind.29N"); 13 were pieces of oil palm stems suspected of being infected (identified by numbers, e.g. "2.0" was the first fragment of stem No. 2. There were 62 stem sub-samples presented in Table 4, and in Table 1 are shown the first set of samples.

A second set of 28 samples collected in March 2011 was stored at 4°C: 16 were fruiting bodies (noted "D") (Fig. 1), 12 were pieces of stem (noted "D"). This second set is presented in Table 2.

Samples from Benin

Twelve samples came from Benin; they were divided into three categories, thus: 5 plots (noted "P"); 4 *oleifera* (noted "O") and 3 Benin (noted "B"). This denomination was chosen in accordance with the indications given on the slips accompanying the fungi.

Samples analysed in 2010

Some samples were taken from the work performed in 2010: 23 infested and freeze-dried oil palm tissues. The nomenclature was the same as the previous year.

Control samples

Four positive control samples: *Ganoderma lucidum* (noted "(+) G.1"), *Ganoderma atkinsonii* (noted "t (+) G.a"), IC 14, a fungus identified during the 2010 study, and a sample NJ3 from March 2010, the Tanah-Gambus, (Indonesia) collections, this being a fresh oil palm tissue (noted "t (+) NJ3").

A negative control: Millipore water (noted "t -").

All these samples are listed in Table 3.

Sub-samples of oil palm stems from the September 2010 harvest

The cross-sections of oil palm tissues were observed under a magnifier and were identified some zones of different colours using numbered discs ("0" was attributed to the lighter area) in order to take some samples from those zones for extraction. The coloured areas could have been potentially infested by the fungus (see Fig. 2).

Here, the wood colours were numbered from 0 to 4, from the palest to the darkest.

numerotate ("0" a fost atribuită pentru zona cea mai deschisă), pentru a lua mostre pentru extracție din aceste zone. Zonele colorate ar fi putut fi potențial infestate de ciupercă (Fig. 2). Culoarele lemnului au fost numerotate de la 0 la 4, de la cele mai deschise la cele mai închise. Sub-eșantioanele studiate sunt prezentate în Tabelul 4.

The sub-samples studied are presented in Table 4.



Fig. 1.
Corpuri fructifere / Fruiting bodies.



Fig. 2.
Țesuturi de palmier de ulei cu unele zone diferit colorate, identificate prin discuri numerotate (de la 0 la 4, de la cea mai deschisă la cea mai închisă culoare - "0" atribuit zonei cu cea mai deschisă culoare) / Oil palm tissues with some areas of different colours identified by numbered discs (from 0 to 4, from the palest to the darkest colour - "0" was attributed to the palest area).

Tabelul 1 / Table 1

Probe din Indonezia, misiuni din Septembrie 2010 / Samples from Indonesia, September 2010 missions

Vârsta grupului în ani de plantație / Group age of planting years	Ziua - 1 / day – 1 / Mod de recoltare / Harvested way			Ziua - 2 / day – 2 / Mod de recoltare / Harvested way		
	Buldo-excavatoare /backhoe loader	Ferăstrău cu lanț / chainsaw	Corp fructifer / fruiting body	Buldo-excavatoare /backhoe loader	Ferăstrău cu lanț / chainsaw	Corp fructifer / fruiting body
	Parcelă - (ani de plantare) / Plot (block) (planting years)					
0 – 5				27 (2005)		
6 - 10	18 (2001)	13 A (2003)		7 A (2004)		
11 - 15		54 (1999)	23 (1996), 34 (1998), 54 (1999), 55 (1999)	43 (1996), 44 A (1996)	53 A (1997), 59 (1998)	
16 - 20		24 (1990)				41 A (1985), 57 (1986), 62 (1986), 65 (1988), 69 (1989)

Prepararea mediului de cultură

Toate probele au fost cultivate în vase Petri, pe trei medii de cultură diferite, la temperatura camerei (în jur de 20° C) și la întuneric.

Au fost selectate aceste trei medii pentru a compara creșterea miceliului și morfologia în funcție de mediu:

- WA-CS (apă-agar, cloramfenicol, streptomycină), a inhibat bacteriile și a activat creșterea miceliului; Mediul WA-CS (25g/L agar, 1L apă distilată, 0,5g/L streptomycină, 0,5g/L cloramfenicol). Streptomycină și cloramfenicol sunt antibiotice care inhibă creșterea bacteriilor prezente pe țesuturile proaspete.

- PDA-C: (cartof-dextroză-agar, cloramfenicol), a condus la o cantitate mai mare de micelium după recuperarea miceliului de la mediul WA-CS. Mediul PDA-C: 4g/L extract de cartof, 20g/L glucoză, 15g/L agar, 0,5g/L cloramfenicol. Glucoza și amidonul prezente în extractul de cartof servesc drept elemente nutritive pentru creșterea ciupercilor, în timp ce antibioticul inhibă bacteriile. Nota: *Inițiala "PDA" vine de la dextroză, care este un sinonim pentru glucoză atunci când este implicată D-glucoza.*

- MA (malț-agar), de asemenea, a condus la o cantitate mai mare de micelium după recuperarea miceliului de la mediul WA-CS. Mediul MA: 40g/L malț, 20g/L agar. Conținutul ridicat de carbohidrați ai malțului accelerează creșterea ciupercilor și pH-ul acid inhibă dezvoltarea bacteriilor. Acesta este parțial motivul pentru care nu s-a adăugat nici un antibiotic în mediul malț-agar (MA).

Culture medium preparation

All the samples were cultured in Petri dishes on three different culture media at room temperature (around 20°C) and in the dark.

These three media were selected to compare mycelium growth and morphology depending on the medium:

- WA-CS (Water-Agar, Chloramphenicol, Streptomycine), inhibited bacteria and activated mycelium growth; WA-CS (Agar 25g/L, distilled water 1L, Streptomycine 0.5g/L, Chloramphenicol 0.5g/L). Streptomycine and chloramphenicol are antibiotics that inhibit the growth of bacteria present on fresh tissues.

- PDA-C: (Potato Dextrose Agar, Chloramphenicol) resulted in a larger amount of mycelium after recovering the mycelium from the WA-CS medium. PDA-C: Potato Extract: 4g/L, Glucose: 20g/L, Agar: 15g/L, Chloramphenicol: 0.5g/L. The glucose and starch present in potato extract serve as nutrients for fungus growth, whilst the antibiotic inhibits bacteria. Note: *The initial "PDA" stands for dextrose, which is a synonym for glucose when D-glucose is involved.*

- M-A (Malt-Agar), also resulted in a larger amount of mycelium after recovering the mycelium from the WA-CS medium; M-A medium: Malt: 40g/L, Agar: 20g/L. The high carbohydrate content of malt speeds up fungus growth and the acid pH inhibits bacterial growth. This is partly the reason why it was not added any antibiotics to the Malt-Agar medium.

Tabelul 2 / Table 2

Lista probelor colectate în Indonezia, la Tanah-Gambus, în timpul misiunii din martie 2011: indentificare prin număr de izolare, descriere probă (corp fructifer sau țesut proaspăt), număr parcelă, număr palmier, vârsta și simptomele frunzei / List of samples collected in Indonesia at Tanah-Gambus, during the March 2011 mission: identification by the isolate number, sample description (fruiting body or fresh tissue), the plot number (Block), the palm number, age, and leaf symptoms

Număr de izolare / Isolate number	Descrierea probei / Sample description	Parcelă / Block	Număr palmier / Palm number	Vârstă (ani) / Age (years)	Simptome frunză / Leaf symptoms
D1	corp fructifer / fruiting body /	44	7	15	Substanțial /Substantial
D2	fruiting body	44	7	15	Substantial
D3	fruiting body	44	10	15	Substantial
D4	fruiting body	44	4	15	Substantial
D5	fruiting body	44	4	15	Substantial
D6	fruiting body	44	4	15	Substantial
D7	fruiting body	44	4	15	Substantial
D8	corp fructifer/ mucegai / fruiting body/mould	53	4	14	Ușor / Slight
D9	fruiting body	44	3	15	Ușor / Slight
D10	fruiting body	53	4	14	Substantial
D11	fruiting body	53	1	14	Ușor / Slight
D12	fruiting body	8	5	8	Substantial
D13	țesut proaspăt / fresh tissue	8	5	8	Substantial
D14	fresh tissue	8	5	8	Substantial
D15	fresh tissue	39	1	13	Substantial
D16	fruiting body	39	16	13	Substantial
D17	fresh tissue	39	16	13	Substantial
D18	fresh tissue	39	8	26	?
D19	fresh tissue	39	8	26	?
D20	fruiting body/mould	57	1	25	?
D21	fresh tissue	57	1	25	?
D22	fresh tissue	57	7	25	?
D23	fresh tissue	57	5	25	?
D24	fruiting body/mould	62	12	25	Ușor / Slight
D25	fresh tissue	62	10	25	Substantial
D26	fruiting body/mould	65	3	23	?
D27	fresh tissue	65	3	23	?
D28	fresh tissue	42(patologie lab. / lab. pathology)	1	14	Ușor / Slight
NJ 3	miceliu pur / pure mycelium				
NJ3-H1	pure mycelium				
NJ3-H2	pure mycelium				

Tabelul 3 / Table 3

Lista tuturilor probelor studiate / List of all the samples studied

Indonesia		Benin	Misiune 2010 / Mission 2010	Referințe / Controls	
Set 1	Set 2				
Ind.1	Fructificații / Fructification	B1	I 21	Pozitive / Positives: <i>G. lucidum</i> <i>G. athensorii</i> <i>G. boninense</i> Negative: t (-) cu apă pură Milipore / Negatives: t (-) with Millipore water	
2		B2	I 24		
3		B3	I 28		
4		D.1	I 28		
Ind.5		D.2	P1		I 35
6		D.3	P2		I 45
7		D.4	P3		I 47
Ind.8		D.5	P4		I 60
9a		D.6	P5		I 65
9b		D.7	O1		D II 43 (1)
9c		D.8	O2		D II 43 (2)
Ind.10		D.9	O3		D II 43 (3)
Ind.11		D.10	O4		D II 43 (4)
Ind.12		D.11			D II 43 (4)
Ind.13		D.12			D III 44
Ind.14		D.16			D III 44 (1)
Ind.15		D.20			D III 44 (2)
Ind.16	D.24		D III 53 (2)		
17	D.26				
18			RSSP3B1		
19	Țesut / Tissue		H70/11 TSSR		
Ind.20	D.13		H70/11 TSSR		
21	D.14		TSS H/R		
22	D.15		D 511		
Ind.23	D.17		85200 (3)		
Ind.24	D.18		86200 (2)		
Ind.25	D.19		86200 (3)		
Ind.26	D.21				
Ind.27	D.22				
Ind.28	D.23				
Ind.29N	D.25				
	D.27				
	D.28				

Tabelul 4 / Table 4

Lista sub-eșantioane, set 1 / List of set 1 sub-samples

Țesut nr. / Tissue No.	Set 1 sub-eșantioane: "0" atribuit zonei cu cea mai deschisă culoare / Set 1 sub-samples: "0" is attributed to the palest area					
	0	1	2	3	4	5
2	X	X	X	X	X	
3	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X			
6	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X
9a	X	X	X	X	X	X
9b	X	X	X	X		
9c	X	X	X	X		
17	X	X	X	X	X	

18	X	X	X	X		
19	X	X	X			
21	X	X	X	X		
22	X	X	X	X	X	X
Total	62 sub-eșantioane / 62 sub-samples					

Izolarea: cultura, obținerea de miceliu pur

Patru fragmente de țesut proaspăt și/sau de corp fructifer au fost luate din probă, sub nișă, folosind un bisturiu sterilizat într-un sterilizator. Două dintre aceste fragmente au fost sterilizate în 70% etanol. Prin sterilizarea suprafeței fragmentelor, bacteriile prezente au fost parțial eliminate. Cu toate acestea, ca măsură de precauție, celelalte două fragmente nu au fost sterilizate pentru a nu distruge toată flora fungică. Au fost utilizate prin urmare, pentru o probă, patru cutii Petri conținând mediul WA-CS. În această primă etapă de izolare au fost folosite în total 120 de vase.

Culturile au fost lăsate la incubare, la întuneric, la o temperatură de 20°C, realizându-se scoaterea lor la lumină numai pentru examinare. Ele au fost examinate în fiecare zi, timp de patru săptămâni (faza activă a miceliului). Culturile au fost examinate și identificate fie cu o lupă și la microscop, fie direct în vasele Petri sau în preparate speciale între lamele și pelicule (soluții Lugol, Cotton Blue).

Odată ce miceliul a acoperit o parte din suprafața mediului WA-CS, și morfologic se știe că ciuperca Basidiomycete *Ganoderma* are o suprafață netedă, plană, de miceliu alb, izolarea s-a putut efectua pe mediile MA și PDA-C.

Culturile au fost din nou lăsate la incubare, la întuneric, la 20°C, aducându-le la lumină numai pentru a le examina. Ele au fost examinate la fiecare două zile timp de șase săptămâni.

Pentru fiecare probă s-au folosit patru vase Petri, astfel încât să existe o șansă de succes mai bună pentru subculturi. Apoi, folosind o cultură în creștere, au fost obținute subculturi în formă de cuburi măsurând 2-3mm pe latură. Culturile au fost lăsate la incubare, la întuneric, la 20°C și au fost zilnic observate. De fiecare dată din miceliul dezvoltat, au fost create subculturi, pentru a-l izola de alte ciuperci susceptibile de a se dezvolta ulterior. Când s-a considerat că miceliul este pur, a fost transferat în 4 vase Petri pe malț-agar, apoi în final fiind menținut în două tuburi în frigider, la întuneric.

Producția de miceliu pentru studii moleculare

Miceliul pentru fiecare tulpină pură, s-a dezvoltat într-un vas Petri, pe un mediu de cultură malț-agar (4% - 2%) acoperit cu o folie de celofan (Lecellier și Silar 1994). Miceliul s-a recoltat după creștere timp de 10 zile la 20°C, la întuneric, având grijă să se îndepărteze toate urmele mediului de cultură, în special agarul de la

Isolation: culturing, obtaining pure mycelium

Four pieces of fresh tissue and/or fruiting body were taken from the sample under a sterile hood using a scalpel sterilized in a bead sterilizer. Two of the pieces were sterilized in 70% ethanol. By sterilizing the surface of the pieces, the bacteria present were partly eliminated. However, as a precaution, the other two pieces were not sterilized so that not to kill the entire fungal flora. Four Petri dishes containing the WA-CS medium were therefore used per sample. In all, 120 dishes were used in this first isolation step.

The cultures were left to incubate in the dark at a temperature of 20°C, bringing them out into the light only for examination. They were examined each day for four weeks (mycelium active phase). These isolations were examined and identified under a magnifier and under a light microscope, either directly in the Petri dishes or with special preparations between slides and covers (with Lugol, Cotton Blue).

Once mycelium covered part of the surface of the WA-CS medium, and it was morphologically that of the Basidiomycete *Ganoderma*, which has a smooth, flat, white mycelium, isolation could be carried out on the M-A and PDA-C media.

The cultures were once again left to incubate in the dark at 20°C, only bringing them out into the light to examine them. They were examined every two days for six weeks.

Four Petri dishes were used for each sample, so as to have a better chance of success for subcultures. Then, using a growing culture, subcultures were carried out in the form of cubes measuring 2-3mm per side. The cultures were left to incubate in the dark at 20°C and they were observed daily. Each time from the developed mycelium, it was subcultured, in order to isolate it from other fungi likely to develop afterwards. When the mycelium was found to be pure, it was transferred to 4 Petri dishes with Malt-Agar, then finally being maintained in two tubes in the refrigerator in the dark.

Mycelium production for molecular studies

For each pure strain, the mycelium was grown in a Petri dish on a malt-agar culture medium (4%-2%) covered with a sheet of cellophane (Lecellier and Silar 1994). After

implantul subculturii. Există o metodă de obținere a miceliului curat fără nici o urmă de mediu de cultură, în special agar. Înainte de a trece la etapa de purificare a ADN-ului nuclear, miceliul recoltat este plasat într-un tub Eppendorf, este înghețat în azot lichid, apoi depozitat în congelator la -80°C. În aceste condiții, miceliul poate fi păstrat timp de câțiva ani.

Extracția ADN-ului fungic utilizând kit-ul Invitrogen "TM PureLink Plant Total DNA Purification Kit" și cuantificarea ADN-urilor extrase.

Din țesuturi proaspete de palmier de ulei și corpuri fructifere: toate probele au fost transformate în pulbere cu azot lichid; au fost apoi supuse unui șoc termic și tasate mecanic; protocolul a fost urmat de extracția Invitrogen cu kitul "TM PureLink Plant Total DNA Purification Kit" (Fig. 3.).

Din miceliu pur: miceliul a fost separat de agar sub o hotă sterilă folosind un bisturiu steril și pensete, apoi a fost plasat într-un tub steril Eppendorf de 1,5ml; tubul a fost pus în azot lichid 2min; s-a adăugat 500μL de soluție tampon R2 din kitul Invitrogen, astfel încât miceliul a fost bine imersat; miceliul a fost manual măcinat în tubul Eppendorf, folosind un pistil steril; protocolul de extracție stabilit prin Invitrogen fost realizat cu kitul "TM PureLink Plant Total DNA Purification Kit" (Fig. 3.).

Etapele de preparare a lizatului sunt după cum urmează:

- se adaugă 250μl soluție tampon (R2) la temperatura camerei;
- se omogenizează soluția cu ajutorul agitatorului Vortex;
- se adaugă 15μl SDS 20% și 15μl de RNase A (20mg/ml) pentru a obține lizatul;
- se incubează la 55°C 15 minute pentru a finaliza lizatul celular;
- se centrifughează lizatul la 10.000rpm 5min pentru a elimina materialul insolubil;
- se transferă supernatantul într-un tub steril de 1,5ml, fără a perturba reziduu;
- se adaugă la lizat 100μl soluție de precipitare (N2). Se amestecă în agitator și se incubează în gheață timp de 5 min.
- în această etapă precipită proteinele și polizaharidele și toți pigmentii fotosintetici legați de proteine sunt de asemenea, precipitați. Pigmentii pot păta cartușele PurelinkTM și dau un eluat de culoare.
- se centrifughează la 15000rpm timp de 5min, la temperatura camerei, pentru a obține un lizat limpede. Notă: supernatantul trebuie să fie clar și nu vâscos după această etapă de precipitare.
- se transferă 250μl din lizat într-un tub steril de 1,5ml și se adaugă la 375μl liant (B4) conținând etanol. Se amestecă bine în Vortex.

Se continuă cu fixarea ADN-ului:

- se toarnă soluția într-o coloană de kit Invitrogen

culturing for 10 days at 20°C in the dark, the mycelium was harvested taking care to remove all traces of the culture medium, notably the agar of the subculture implant. There is a method for obtaining mycelium free of any trace of culture medium, notably agar. Before moving on to the nuclear DNA purification stage, harvested mycelia is placed in an Eppendorf tube, is frozen in liquid nitrogen, than stored in the freezer at -80°C. Under these conditions, mycelium can be stored for a few years.

Fungal DNA extraction using the Invitrogen "TM PureLink Plant Total DNA Purification Kit" and quantification of the extracted DNAs.

From fresh oil palm tissues and fruiting bodies: all the samples were reduced to powder with liquid nitrogen; they were then subjected to thermal shock and mechanically ground; the protocol was followed for Invitrogen extraction with the "TM PureLink Plant Total DNA Purification Kit" (See Fig. 3).

From pure mycelium: the mycelium was separated from the agar under a sterile hood using a sterile scalpel and tweezers, than it was placed in a sterile 1.5ml Eppendorf tube; the tube was placed in liquid nitrogen for 2min; 500μL of R2 suspension buffer from the InvitroGen kit was added so that the mycelium was well immersed in the buffer; the mycelium was ground by hand using a sterile pestle in the Eppendorf tube; the extraction protocol established by Invitrogen was done with "TM PureLink Plant Total DNA Purification Kit" (Fig. 3).

The stages for plant lysate preparation are as follows:

- add 250μl of suspension buffer (R2) at room temperature;
- homogenize the solution in a Vortex;
- add 15μl of 20% SDS and 15μl of RNase A (20mg/ml) to obtain the lysate;
- incubate at 55°C for 15 minutes to complete lysis;
- centrifuge the lysate at 10,000rpm for 5 minutes to eliminate insoluble material;
- transfer the supernatant to a 1.5ml sterile tube without disturbing the residue;
- add 100μl of precipitation buffer (N2) to the lysate. Mix in the Vortex and incubate in ice for 5 minutes;
- at this stage precipitates proteins and polysaccharides, and all the photosynthetic pigments linked to the proteins are also precipitated. Pigments can stain the PurelinkTM cartridges and give a coloured eluate;
- centrifuge at 15,000rpm for 5 minutes at room temperature to obtain a clear lysate. Note: the supernatant must be clear and not viscous after this stage of precipitation;

plasat într-un tub de 2ml și se centrifughează la 10000rpm, timp de 30 secunde la temperatura camerei;
- se îndepărtează tubul de 2ml cu filtratul și se plasează coloana într-un tub de 2ml curat, livrat cu kitul.

Spălare ADN:

- se adaugă 500μl de soluție tampon de spălare la coloana (W4);
- se centrifughează la 10000rpm timp de 30 secunde la temperatura camerei. Se îndepărtează filtratul și se înlocuiește coloana în tubul de 2ml;
- se adaugă în coloană 500μl soluție de spălare (W5) conținând etanol;
- se centrifughează la 10000rpm timp de 30 secunde la temperatura camerei. Se îndepărtează filtratul și se înlocuiește coloana în tubul de 2ml;
- se repetă etapele 3 și 4 încă o dată;
- se centrifughează la 15000rpm timp de 2 minute la temperatura camerei, pentru a elimina orice reziduu de soluție de spălare (W5). Se aruncă tubul de 2ml.

Se continuă cu eluarea ADN-ului:

- se așează coloana într-un tub steril de 1,5ml;
- se adaugă 100μl de soluție de eluare (E1) sau apă distilată (pH>7);
- se incubează la temperatura camerei timp de 1min, apoi se centrifughează la 15000rpm timp de 1min. Tubul conține apoi ADN purificat.

Opțiunea: pentru a recupera mai mult ADN, se efectuează o a doua etapă de eluare cu 100μl de soluție de eluare (E1) sau apă distilată. A doua eluție poate fi realizată folosind același tub de eluție sau un tub diferit.

- se centrifughează coloana la 15000rpm timp de 1 minut, la temperatura camerei.

Tubul conține astfel ADN purificat. Se scoate și se aruncă coloana. Tuburile sunt apoi stocate în congelator la -20°C pentru a se evita orice deteriorare a ADN-ului.

ADN-ul tulpinilor extrase a fost cuantificat prin spectrometrie la un spectrofotometru Shimadzu. S-a măsurat concentrația și puritatea ADN-ului extras cu 2μl de probă. Indicele purității a fost calculat din rapoartele dintre măsurătorile absorbantei la 260 și 280nm. Acest raport trebuie să se apropie de 1,8 pentru ca proba să fie calificată drept pură. Valori mai mici au indicat prezența impurităților sau a proteinelor absorbante la aproximativ aceleași lungimi de undă.

- transfer 250μl of the lysate to a 1.5ml sterile tube and add to the lysate 375μl of binding buffer (B4) containing ethanol. Mix well in the Vortex.

Proceed with DNA fixation:

- pour the solution into an Invitrogen kit column placed in a 2ml tube supplied with the kit and centrifuge at 10,000rpm for 30 seconds at room temperature.
- discard the 2ml tube with the filtrate and place the column in a clean 2ml tube supplied with the kit.

DNA washing:

- add 500μl of washing buffer to the column (W4);
- centrifuge at 10,000rpm for 30 seconds at room temperature. Remove the filtrate and replace the column in the 2ml tube;
- add to the column 500μl of washing buffer (W5) containing ethanol;
- centrifuge at 10,000rpm for 30 seconds at room temperature. Remove the filtrate and replace the column in the 2ml tube;
- repeat stages 3 and 4 one more time;
- centrifuge at 15,000rpm for 2 minutes to eliminate any washing buffer (W5) residue at room temperature. Discard the 2ml tube.

Proceed with DNA elution:

- place the column in a 1.5ml sterile tube.
- add 100μl of elution buffer (E1) or distilled water (pH>7).
- incubate at room temperature for 1 minute then centrifuge at 15,000rpm for 1 minute. The tube then contains purified DNA.
- Option: to recover more DNA, it is performed a second elution stage using 100μl of elution buffer (E1) or distilled water. The second elution can be carried out using the same elution tube or a different tube.*
- centrifuge the column at 15,000rpm for 1 minute at room temperature.

Thus, the tube then contains purified DNA. Remove and discard the column. The tubes are then stored in the freezer at -20°C to avoid any deterioration of the DNA.

The DNA of the extracted strains was quantified by spectrometry on a Shimadzu spectrophotometer. It measured the concentration and purity of the DNA extracted with 2μl of sample. The purity index was calculated from the ratios of the absorbance measurements at 260 and 280nm. This ratio needs to approach 1.8 for the sample to be qualified as pure. Smaller values indicated the presence of impurities or absorbent proteins at around the same wavelengths.

PCR (reacție în lanț a polimerazei) amplificarea ADNr nuclear ITS (spații transcrise intern)

S-a utilizat un protocol de amplificare adaptat la ciupercile mycorrhizal, inspirat de la White ș.a. (1990) și dezvoltat în Laboratorul Symbionts and Roots (INRA în Montpellier, Franța).

Ciupercile, care sunt organisme eucariote, nu au aceleași ARNs ribozomal (Acid ribonucleic) ca bacteriile, care sunt organisme procariote. Prin urmare, acestea trebuie să fie analizate separat. Totuși, studiind diversitatea prin biologia moleculară, acesta este mai puțin răspândită în eucariote, în special în ciuperci. Este încă în discuție alegerea primerilor, deci a genei țintă de amplificat, pentru a identifica ciupercile unei probe de mediu. Cu toate acestea, astăzi, este stabilită regiunea de ADN care codifică subunitățile ribozomale. În Fig. 3 se prezintă o reprezentare schematică a operonului ribozomal cu situri ale diferiților primeri utilizați sau utilizabili pentru studierea ADN-ului ribozomal nuclear. Reacțiile de amplificare au fost efectuate în plăci PCR curate. Volumul de reacție a fost după cum urmează: 4μl de dNTP, 10μl 5 X soluție tampon, 2μl din fiecare primer (20pmol/μl): ITS1-myc (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGC 3') și ITS4-myc (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), 5μl extras total ADN (în jur de 50ng), 26.7μl de apă Millipore sau apă sterilă (până la 50μl), 0.30μl de polimerază Taq.

S-au făcut unele controale fără ADN pentru a testa existența oricărei contaminări în reactivii și soluții tampon.

S-a acoperit apoi 50μl de amestec, cu o picătură de ulei mineral, pentru a preveni evaporarea și condensarea în tuburi. Apoi, placa a fost acoperită cu hârtie adezivă și s-a plasat într-un termociclu programat astfel:

- o fază de denaturare inițială la 96°C timp de 5min;
- 30 cicluri cuprinzând o fază de denaturare la 96°C timp de 30sec, o fază de hibridizare la 55°C timp de 30sec, apoi o fază de extensie la 72°C timp de 1:30min;
- prelungirea fazei de extensie sau fază finală de elongare la 72°C timp de 7min;
- depozitarea produsului de amplificare la 4°C, sau congelare la -20°C.

Acest protocol a permis amplificarea corespunzătoare a regiunii care ne interesează. Cu toate acestea, a fost necesară căutarea concentrației ADN-ului care a permis să se obțină o reacție de amplificare optimă.

S-a verificat dacă reacția de amplificare a funcționat bine prin vizualizarea moleculelor amplificate pe un gel de control. O cantitate de 10μl de amplificate a fost depus pe un gel de agaroză 0,8% într-o soluție tampon TAE 1X. Migrația a fost efectuată prin electroforeză la 120V timp de o oră.

PCR (polymerase chain reaction) amplification of the nuclear rDNA ITS

An amplification protocol adapted to mycorrhizal fungi, inspired from White *et al.* (1990) and developed at the Symbionts and Roots Laboratory (INRA in Montpellier, France) was used.

Fungi, which are eukaryotic organisms, do not have the same ribosomal RNAs as bacteria, which are prokaryotic organisms. They therefore have to be analysed separately. However, studying diversity by molecular biology, this is less widespread in eukaryotes, especially in fungi. The choice of primers, hence of the target gene to be amplified to identify the fungi of an environmental sample, is still under discussion. However, the region of the DNA encoding the ribosomal sub-units is established today. Fig. 3 shows a diagrammatic representation of the ribosomal operon with the sites of the different primers used or usable for studying nuclear ribosomal DNA. The amplification reactions were carried out in clean PCR plates. The reaction volume was as follows: 4μl of dNTP, 10μl 5X buffer, 2μl of each primer (20pmol/μl): ITS1-myc (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGC 3') and ITS4-myc (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), 5μl extracted total DNA (around 50ng), 26.7μl of Millipore or sterile water (to top up to 50μl), 0.30μl of Taq polymerase.

Some controls without DNA were done to test the existence of any contaminations in the reagents and buffers.

The 50μl of mixture was then covered with a drop of mineral oil to prevent evaporation and condensation in the tubes. Next, the plate was covered with adhesive paper and placed in a thermocycler programmed as follows:

- an initial denaturation phase at 96°C for 5 min;
- 30 cycles comprising a denaturation phase at 96°C for 30sec, a hybridization phase at 55°C for 30sec, then an extension phase at 72°C for 1:30min;
- elongation of the extension phase or final elongation phase at 72°C for 7min;
- storage of the amplification product at 4°C or freezing at -20°C.

This protocol enabled to properly amplify the region we were interested in. However, it was necessary to search for the DNA concentration that enabled an optimum amplification reaction to be obtained.

It was checked that the amplification reaction functioned well by visualizing amplicates on a control gel. Ten μl of amplicates was deposited on an agarose gel at 0.8% in a TAE 1X buffer. Migration was carried out by electrophoresis at 120V for one hour.

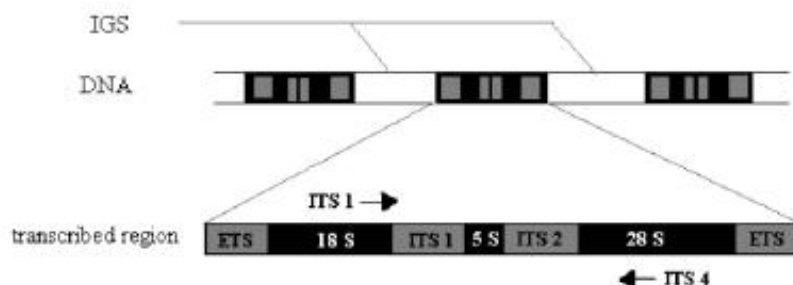


Fig. 3.

Operonul ARN-ului ribozomal al unei gene de eucariote. Operonul cuprinde trei gene principale (molecule de ARNr 5.8S, 18S și 25S sau 28S) și interspații amestecate (IGS – spațiu intergenic, NTS – spațiu non-transcris, ETS – spațiu transcris extern) / The operon of the ribosomal rRNA gene of eukaryotes. The operon comprises three main genes (molecules of 5.8S, 18S and 25S or 28S rRNA), and tangled “inter-spaces” (IGS – intergenic spacer, NTS – non-transcribed spacer, ETS – external transcribed spacer).

Secvențierea

Probele amplificate au fost trimise pentru secvențiere la compania MacroGen în Coreea de Sud, care utilizează secvențiatorul 3730XL. În studiul nostru, după obținerea și corectarea secvențelor pe baza interpretării electroforetogramelor cu software-ul CHROMAS Plus, s-a trecut la compararea secvențelor obținute cu cele existente în biblioteci, cu programul BIASTn (nucleotid) de pe Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Criteria de asemănare: analiza secvențială, prin comparație cu baza de date - BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*), (Altschul ș.a. 1997) este o metodă care a fost special dezvoltată pentru a compara o secvență nucleică sau proteică necunoscută cu toate acelea care se găsesc în baza de date nucleică (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Scopul programelor de comparare a secvențelor este de a identifica locurile în care se găsesc regiuni identice sau foarte asemănătoare între două secvențe și de a deduce acelea care sunt semnificative și corespund într-un sens biologic cu cele observate la întâmplare. BLAST detectează segmente scurte (unsprezece nucleotide identice sau două tripeptide similare) care sunt local omoloage cu secvența necunoscută (Altschul ș.a. 1997).

Un scor este întotdeauna asociat cu o anumită aliniere. Un program de aliniere, oricare ar fi, caută întotdeauna să maximizeze acest scor. Se poate imagina, cu cât este mai mare scorul, cu atât alinierea este mai semnificativă. Un astfel de raționament este valabil în cazul în care se ia în considerare o familie uniformă în care toate secvențele sunt aproximativ de aceeași lungime: în acest caz, cu cât e mai mare scorul, cu atât mai mare este asemănarea, deși acest lucru nu ne spune dacă acesta este semnificativ (Risler ș.a. 2003).

În studiul nostru, în locul utilizării scorurilor, am folosit procente de identitate sau similitudine între

Sequencing

The amplified samples were sent for sequencing to the MacroGen Company in South Korea, which uses the 3730XL DNA SEQUENCER. In our study, after obtaining and correcting the sequences based on the interpretation of the electrophoretograms with CHROMAS PLUS software, we proceeded with BIASTn (Nucleotide) on the Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) to compare the sequences obtained with those existing in the libraries.

Resemblance criteria: sequence analysis by comparison with databases – BLAST

BLAST, *Basic Local Alignment and Search Tool*, (Altschul *et al.* 1997) is a method that has been especially developed to compare an unknown nucleic or protein sequence with all those that are found in nucleic databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

The purpose of sequences comparison programs is to identify the places in which identical or very similar regions are found between two sequences and to deduce those of them that are significant and correspond in a biological sense to those observed by chance. BLAST detects short segments (eleven identical nucleotides or two similar tripeptides) that are locally homologous to the unknown sequence (Altschul *et al.* 1997).

A score is always associated with a given alignment. An alignment program, whichever it may be, always seeks to maximize that score. It can be imagined that the higher the score is, the more the alignment is significant. Such reasoning is valid if a uniform family is being considered where all the sequences are roughly of the same length: in this case the higher the score is, the greater the resemblance is, though this does not tell us whether it is significant (Risler *et al.* 2003).

două secvențe și criteriile de interpretare au fost după cum urmează: în cazul în care cele mai apropiate secvențe extrase din baza de date au avut peste 90% similitudine și dacă aceste secvențe au dat același gen și nume speciei, rezultatul obținut s-a potrivit cu identificarea noastră inițială, bazată pe criterii morfologice și anatomice pentru gen și specii.

Constituția unui fișier de secvență de referință

Toate secvențele de referință apropiate de tulpinile noastre au fost extrase din baza de date NCBI, atunci când s-au efectuat cercetări în BLAST. S-a format astfel o sursă de secvențe de referință, un instrument esențial pentru realizarea pe viitor de studii taxonomice și filogenetice.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Izolarea: cultivarea, obținerea de miceliu pur

Miceliul anticipat al *Ganodermei* în procesul de creștere pe un mediu de cultură, se prezintă sub formă de filamente miceliene fine, compactate, de culoare albă, cu marginile ușor portocaliu-marou.

S-a dovedit necesar, căutarea un mediu de cultură, care să conducă la creșterea miceliului, în special pentru cele mai multe din probele care au prezentat dificultăți în creștere pe mediul MA (malț-agar), utilizat în mod convențional în laborator. S-a ales mediul PDA (cartof-dextroză-agar), care conține antibioticul streptomycină.

Totuși, s-au observat numeroase contaminări în cutiile Petri, în timpul izolării. Acestea au fost cauzate în principal de prezența bacteriilor, mușcăturilor, insectelor și acarienilor din probe. Contaminanții s-au dezvoltat, în general, în colonii sau ca miceliu radiu în afara mediului. Adesea, contaminanții au urmat evoluția miceliului și au rezistat efectiv antibioticelor. Insectele și acarienii au introdus odată cu ei forme de mușcătură, în aceste cazuri fiind dificil de realizat izolarea.

În acest context, datorită numărului mare de contaminări în timpul izolării, s-au efectuat și subculturi succesive înainte de a se obține o tulpină pură: din cele 30 de probe, cinci au dat un miceliu de ciupercă pură.

Principalii contaminanți găsiți au prezentat aspecte morfologice diferite pe mediile de cultură și aceștia sunt: *Rhodotorula sp.*, *Trichoderma sp.*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium*, *Alternaria tenuis*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Epicoccum purpurescens*, *E.nigrum*, *Fusarium*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor bisporus*.

Se pare că a fost esențială efectuarea aceste izolații, în 24 de ore de la recoltare din plantații, în caz contrar, probele, în special din țesuturile proaspete de palmier de ulei, putrezind foarte repede. Alte tehnici de izolare vor fi explorate pentru acest tip de izolare (protocoale pentru uscarea țesuturilor proaspete după recoltare, pregătirea altor medii de cultură, adăugarea altor antibiotice, substanțe acaricide în mediul de cultură etc.).

In our study, rather than using scores, we used percentages of identity or similarity between two sequences and our likelihood criteria were as follows: if the nearest sequences extracted from the databases had over 90% similarity, and if those sequences gave the same genus and species name, the result obtained complied with our initial identification based on the morphological and anatomical criteria for the genus and for the species.

Constitution of a reference sequence file

When the BLAST searches were carried out, all the reference sequences close to our strains were extracted from the NCBI databases. Thus it was formed a source of reference sequences, an essential tool for the taxonomic and phylogenetic studies to be undertaken in the future.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation: culturing, obtaining pure mycelium

The mycelium expected from *Ganoderma* when growing on a culture medium takes the form of white, tightly packed and fine mycelia filaments, with slightly orange brown edges.

It was proved the necessity to search for a culture medium conducive to mycelium growth, notably for most of the samples which revealed difficulties in growing on the M.A (Malt Agar) medium conventionally used in the laboratory. It was the PDA (Potato Dextrose Agar) medium containing the antibiotic streptomycin that was chosen.

However, numerous contaminations were encountered in the Petri dishes during isolation. These were mainly caused by the presence of bacteria, moulds, insects and mites from the samples. The contaminants generally developed in colonies or as mycelium radiating out into the medium. Often, the contaminants followed the evolution of the mycelium and effectively have resisted to the antibiotics. Insects and mites often brought moulds with them, being difficult to achieve isolation in those cases.

In this context, due to the large number of contaminations during isolations, also the successive subcultures were carried out before a pure strain to be obtained: out of the 30 samples, five gave a pure fungus mycelium.

The main contaminants found, displayed different morphological appearances on the culture media, and they are: *Rhodotorula sp.*; *Trichoderma sp.*; *Botrytis cinerea*; *Penicillium*; *Alternaria tenuis*; *Alternaria*, *Trichoderma*; *Epicoccum purpurescens*; *E.nigrum*; *Fusarium*; *Aureobasidium pullulans*; *Cladosporium herbarum*; *Mucor bisporus*.

It appeared that it was essential to carry out these isolations within 24 hours after harvesting in the plantations, otherwise the samples,

Extracția și purificarea ADN-ului

Adaptarea kit-ului Invitrogen la laborator a permis extracția optimă. A fost astfel posibil să se extragă și să se amplifice ADN-ul tuturor probelor studiate.

A fost evaluată concentrația și puritatea ADN-ului total extras. Cantitățile de ADN obținute au variat în funcție de probe, de la 0,120 la 110,44 μ g/ml, și sunt prezentate în Tabelul 5. Aceste rezultate pot fi explicate prin prezența impurităților care "au influențat" măsurătorile luate cu spectrofotometrul. În acest din urmă caz, va trebui luată în considerare o etapă suplimentară de spălare a rezidului în timpul extracției ADN-ului.

especially the fresh oil palm tissues, rotting very quickly. Other isolation techniques will be explored for this type of isolation (protocols for fresh tissue drying after harvesting, preparation of other media, addition of other antibiotics, acaricides in the culture media etc.).

DNA extraction and purification

Adaptation of the Invitrogen kit to the laboratory enabled optimum extraction. It was thus possible to extract and amplify the DNA of all the samples studied.

The concentration and purity of the extracted total DNAs was assessed. The quantities of DNA obtained varied depending on the samples, from 0.120 to 110.44 μ g/ml, and they are presented in Table 5. These results can be explained by the presence of impurities, which "biased" the measurements taken with the spectrophotometer. In the latter case, an additional stage, of residue washing during DNA extraction, will have to be considered.

Tabelul 5 / Table 5

Rezultatele cuantificării AND-ului total în μ g/ml / Results of total DNA quantification in μ g/ml

Categorii / Category	Valoare maximă / Maximum value	Valoare minimă / Minimum value	Media / Mean	Deviație standard / Std. deviation
Corp fructifer Set1 / Fruiting body, Set 1	110.44	0.244	12.98	13.81
Tulpină Set 1 / Stem, Set 1	17.3	0.549	4.80	3.88
Probă control corp fructifer Set1 / Duplicate fruiting body, Set 1	55.5	2.2	13.01	14.68
Probă control tulpină Set1 / Duplicate stem, Set 1	4.94	0.85	3.03	1.14
Corp fructifer Set2 / Fruiting body, Set 2	5.43	0.12	2.32	2.14
Tulpină Set2 / Stem, Set 2	19.3	0.31	5.86	6.57
Nedeterminate / Indeterminates, 2010	8.667	0.244	3.39	2.55
Ecuador	30.92	6.226	13.08	10.94
Probe 2010 / Samples, 2010	198.3	1.7	38.52	33.26

Analiza produșilor de amplificare

Marker-ul de masă moleculară a fost vizualizat corespunzător, împreună cu o bandă clară cu o masă moleculară de aproximativ 700 perechi de baze.

Analyses of the amplification products

The molecular weight marker was properly visualized, along with a clear band with a molecular weight of approximately 700 base

Cu toate acestea, alte benzi, cum mult sub 700 de perechi de baze și peste, au fost de asemenea vizibile. Aceasta ar însemna că au existat mai multe specii de ciuperci prezente în probe, sau primerii aleși nu au fost suficienți de specifici speciilor de ciuperci și au amplificat ADN-ul palmierului de ulei și cel al drojdiilor, ciupercilor și bacteriilor.

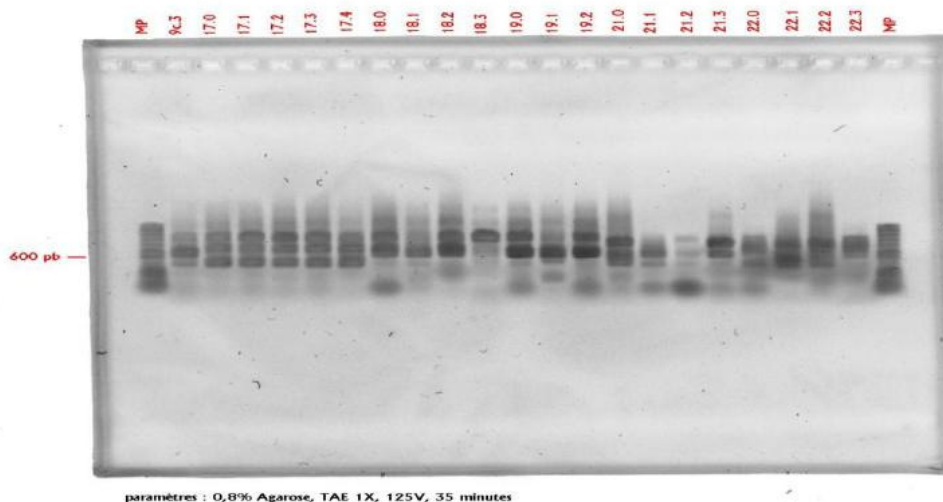
- probele din Benin și cele nedeterminate, din setul 1 din cele 148 depozite de gel, la 40 de depozite s-a descoperit contaminarea, adică 27% din totalul depozitelor. Cu toate acestea, astfel de contaminări ar putea fi din replicarea artefactelor sau, în cazul lemnului de palmier de ulei, din amplificarea altor ciuperci. Benzile suplimentare într-adevăr, au fost la fel de vizibile ca și banda 700bp (Fig. 4). Din setul 2, din cele 93 depozite de gel, 12 depozite au prezentat contaminari, adică 11,16% din totalul depozitelor.

pairs.

Nevertheless, some other bands, as much under 700 base pairs, as over, were also visible. That would seem to mean that there were several fungus species present in the samples, or that the primers chosen were not specific enough to the fungus species and amplified oil palm DNA and that of yeasts, fungi and bacteria.

- Out of the 148 gel deposits for set 1, the samples from Benin and the Indeterminates, 40 deposits revealed contaminations, i.e. 27% of the total deposits. However, these contaminations could be from replication artifacts or, in the case of oil palm wood, the amplification of other fungi. Indeed, the additional bands were as visible as the 700bp band (Fig. 4).

- Out of the 93 gel deposits for set 2, 12 deposits revealed contaminations, i.e. 11.16% of the total deposits.



paramètres : 0,8% Agarose, TAE 1X, 125V, 35 minutes

Fig. 4.
Produse PCR din gel Nr. 09 / PCR products of gel No. 09.

Analiza secvențială în comparație cu baza de date - BLAST

Pe baza alinierii unor criterii de calitate (e-valoare, identitate maximă, acoperire etc.), alegerea celei mai relevante secvențe s-a făcut pe primele zece rezultate BLAST făcând posibilă identificarea secvenței și, prin urmare, a genului și speciei probei de palmier infestate, corpuri fructifere și tulpini pure.

Rezultatul secvențierii a fost după cum urmează: genul *Ganoderma* 17%; Ascomycetes, drojzii, alte Basidiomycetes 41%; diverse (plante etc.) 17%; secvențele inutilizabile 25%.

Tabelul 6 prezintă un rezumat al celor 247 de rezultate.

Sequence analysis by comparison with databases – BLAST

Based on alignment quality criteria (e-value, maximum identity, coverage etc.), the choice of most relevant sequence was made on the first ten BLAST results making it possible to identify the sequence and thereby the genus and species of the sample of infested oil palm, fruiting bodies and pure strains.

The sequencing result was as follows: 17% genus *Ganoderma*; 41% Ascomycetes, yeasts, other Basidiomycetes; 17% miscellaneous (plants etc.); 25% unusable sequences.

Table 6 gives a summary of the 247 results.

Tabelul 6 / Table 6

Rezumatul rezultatelor pentru 247 de probe pe baza criteriilor de mare performanță BLAST (e-valoare, % acoperire) pentru cele mai bune 10 rezultate / Summary of the results for the 247 samples based on very high BLAST performance criteria (e-value, % coverage) for the best 10 results

Organism / Organism	<i>Ganoderma</i>	Alte ciuperci în afară de <i>Ganoderma</i> / Fungi other than <i>Ganoderma</i>	Plante / Plants	Neutilizabile / Unusable	Altele / Others
Total / Total	42	103	19	14	7
Procent / Percentage	17.0	41.7	7.69	5.67	2.83

- din cele 18 corpuri fructifere din setul 1, au fost identificate 5 din genul *Ganoderma*, în timp ce morfologic, toate probele au fost luate deoarece au aparținut de genul *Ganoderma*;

- din cele 23 de probe neidentificate în anul 2010, 21 au fost din genul *Ganoderma*. Acest rezultat arată că metodele de extracție și amplificare au fost bine adaptate la țesuturile contaminate și liofilizate de palmier de ulei;

- nici unul din fragmentele de țesuturi din setul 1 nu a dat un rezultat *Ganoderma*. Acest studiu, efectuat cu primeri universali, a relevat existența altor ciuperci de tipul Basidiomycetes și Ascomycetes. Prezența acestor ciuperci în acest tip de probe poate fi explicat fie prin interacțiuni fungice (competitive sau necompetitive), sau prin atacuri succesive în timp, ca urmare a variațiilor condițiilor de mediu din cadrul probei: a durat prea mult timp pentru a transporta țesuturile proaspete din Indonezia spre Franța (3 săptămâni). Este necesar, de acum încolo, să se ia măsuri pentru conservarea mai bună a probelor. Soluția constă în uscarea sau congelarea probelor imediat ce au fost colectate, la locurile de colectare.

Reconstrucția unui arbore filogenetic pentru secvența ribozomală nucleară 5.8S adăugând ITS2 (studiu preliminar)

O analiză inițială a fost efectuată pe toate secvențele identificate după BLAST ca fiind genul *Ganoderma*.

Arborele filogenetic al speciilor din genul *Ganoderma* bazat pe compararea secvențelor de ADN, 5.8S și ITS2, este prezentat în Fig. 5. Acest copac ilustrează relațiile de rudenie dintre cele mai apropiate tulpini din genul *Ganoderma* extrase din NCBI. Se prezintă cinci grupe principale și distincte: 3 grupe de "nedeterminate din 2010", 2 grupe pentru țesuturi proaspete infestate de palmier de ulei și 1 grup de miceliu pur *Ganoderma* liofilizat, 1 grup de tulpini din Benin și 1 grup de tulpini din Indonezia, setul 1.

- of the 18 fruiting bodies in set 1, 5 were identified as the genus *Ganoderma*, whereas morphologically, all the samples were taken because they belonged to the genus *Ganoderma*;

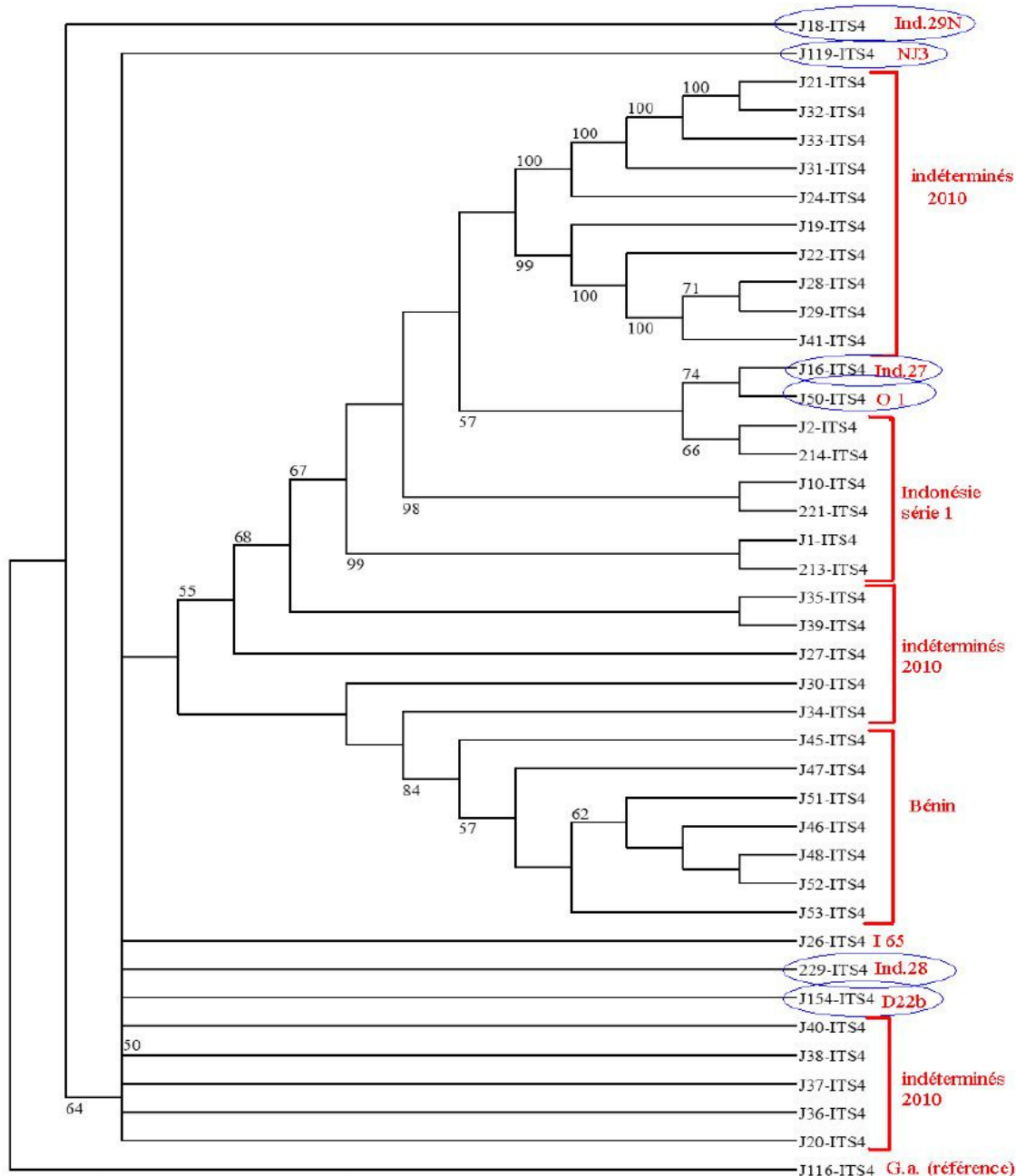
- of the 23 samples not identified in 2010, 21 were of the genus *Ganoderma*. This result shows that the extraction and amplification methods were well adapted to contaminated and freeze-dried oil palm tissues;

- none of the fragments of tissues in set 1 gave a *Ganoderma* result. This study, carried out with universal primers, revealed the existence of other Basidiomycetes and Ascomycetes. The presence of these fungi in this type of samples can be explained either by fungal interactions (competitive or non-competitive), or by successive attacks over time due to variations in the environmental conditions within the sample: it took too long to transport the fresh tissues from Indonesia to France (3 weeks). From now on steps need to be taken for better samples preservation. The solution is that once samples have been collected, they should be immediately dried or frozen at the collection sites.

Reconstrucția a unui arbore filogenetic pentru secvența ribozomală nucleară 5.8S adăugând ITS2 (studiu preliminar)

An initial analysis was carried out on all the sequences identified after BLAST as the genus *Ganoderma*.

The phylogenetic tree of the species of the genus *Ganoderma* based on the comparison of rDNA sequences, 5.8S and ITS 2, is presented in Fig. 5. This tree shows the kinship relations between closest strains of the genus *Ganoderma* extracted from NCBI. It presents five main and distinct groups: 3 groups of "2010 indeterminates", 2 groups for infested fresh oil palm tissues and 1 group for freeze-dried pure *Ganoderma* mycelia; 1 group of strains from Benin and 1 group of strains from Indonezia, set 1.



.indéterminés = indeterminates, Bénin = Benin, Indonésie = Indonesia

Fig. 5.

Poziția filogenetică a speciilor din genul *Ganoderma* bazată pe o compararea secvențelor ADN_r, ITS1, 5.8S și ITS2. Arborele a fost construit de Neighbour Joining, în sistem bootstrap (buclă) cu re-șanționarea a 1000 de replici (valorile bootstrap sunt indicate în principalele noduri ale arborelui) / Phylogenetic position of species of the genus *Ganoderma* based on a comparison of rDNA sequences, ITS1, 5.8S and ITS 2. The tree was constructed by Neighbour Joining, with bootstrap resampling of 1000 replications (the bootstrap values are indicated at the main nodes of the tree).

Această primă analiză a relațiilor interspecificice filogenetice ale *Ganodermei*, bazată pe o comparația secvențelor ADN_r, 5.8S și ITS2, dezvăluie încrângături foarte distincte în care speciile tind să se grupeze în funcție de natura probei și originea geografică, în special speciile din Benin și Indonezia și probele liofilizate din Indonezia.

CONCLUZII

Metoda dezvoltată în această lucrare va fi extinsă la întreaga colecție de *Ganoderma* din laborator, pentru a stabili o bază de date pentru ciuperci, asociată cu degradarea palmierului de ulei. O astfel de bază de date este necesară pentru a realiza o depistarea precoce și o metodă de identificare precisă a acestor ciuperci direct din țesuturile arborelui de palmier de ulei și de asemenea, va face posibilă recomandarea unor tratamente adecvate pentru o mai bună gestionare fitosanitară a plantațiilor de palmier de ulei.

Conform rezultatelor actuale, se va observa variația în ITS1 și ITS2 în cadrul genului *Ganoderma* și se vor aborda analize ale proceselor evolutive.

Unele studii vor evalua de asemenea interspecificitatea probelor de *Ganoderma* prelevate din țesuturile palmierului de ulei cu diferite origini geografice (site-uri, locații), de vârste diferite (de la 0 la 25 de ani), și din diferite generații.

Explorarea altor tehnici de izolare vor fi, de asemenea, luate în considerare pentru acest tip de izolare (protocoale pentru uscarea țesutului proaspăt după colectare, pregătirea altor medii, adaosul de alte antibiotice și produse acaricide în mediul de cultură etc.).

Abrevieri

- **ADN** Acid dezoxiribonucleic
- **PCR** Reacție în lanț a polimerazei (reacție de polimerizare în lanț)
- **ITS** Spațiu transcris intern
- **IGS** Spațiu intergenetic
- **pb** pereche de bază
- **BSR** Putregai la baza tulpinii
- **USR** Putregai tulpină superioară
- **TAE** Triacetat EDTA
- **SDS** dodecil sulfat de sodiu
- **EDTA** etilen diamină tetra-acid acetic
- **BLAST** Program - Basic Local Alignment Search Tool
- **NCBI** Centrul Național pentru Informații Biotehnologice Baza de date

This first analysis of the interspecific phylogenetic relations of *Ganoderma*, based on a comparison of rDNA sequences, 5.8S and ITS 2, reveals very distinct clades where the species tend to group according to the nature of the sample and the geographical origin, particularly the species from Benin and Indonesia, and the freeze-dried Indonesian samples.

CONCLUSIONS

The method developed during this work will be extended to the laboratory's entire *Ganoderma* collection in order to establish a database for fungi associated with oil palm decay. Such a database is needed to develop an early detection and a precise identification method for these fungi directly inside oil palm tissues and will also make it possible to recommend appropriate treatments for better phytosanitary management of oil palm plantations.

According to the current results, variation in the ITS1 and ITS2 will be observed within the genus *Ganoderma* and analyses of the evolutionary processes will be touched upon.

Some studies on the interspecificity of *Ganoderma* samples taken from oil palm tissues of different geographical origins (sites, locations), of different ages (from 0 to 25 years), and from different generations will also be assessed.

Exploration of other isolation techniques will also be considered for this type of isolation (protocols for fresh tissue drying after collection, preparation of other media, addition of other antibiotics and acaricides in the culture media etc.).

Abbreviations

- **ADN** Acide Désoxyribonucléique
- **PCR** Polymerase Chain Reaction
- **ITS** Internal Transcribed Spacer
- **IGS** Intergenic Spacer
- **pb** paire de bases
- **BSR** Basal Stem Rot (pourriture de la base du stipe)
- **USR** Upper Stem Rot (pourriture du haut du stipe)
- **TAE** Tris Acetate EDTA
- **SDS** Sodium Dodécyl Sulfate
- **EDTA** Ethylen Diamine Tetra-acetic Acid
- **BLAST** Basic Local Alignment Search Tool
- **NCBI** National Center for Biotechnology Information

BIBLIOGRAFIE / REFERENCES

- Adaskaveg JE, Gilbertson RL (1994) Wood decay caused by *Ganoderma* species in the *G. lucidum* complex. In: Buchanan PK, Hseu RS, Moncalvo JM, eds. *Ganoderma: systematics, phytopathology and pharmacology*. Proceedings of contributed symposium 59A, B, 5th International Mycological Congress. Vancouver, August 14–21, 1994. pp. 79–93.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.
- FAO (2013) FAOSTAT, <http://faostat3.fao.org/home/index.html#HOME>. 31/01/2013.
- Gardes M, Bruns T (1993) ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-118.
- Guerin-Laguette A, Conventi S, Ruiz G, Plassard C, Mousain D (2003) The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza* 13:17-25.
- Lecellier G, Silar P (1994) Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Current Genetics* 25:122-123.
- Martin F, Diez J, Dell B, Delaruelle C (2002) Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytol.* 153:345-357.
- Mitchell JI, Zuccaro A (2006) Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, 20(2):62-74.
- Moreth U, Schmidt O (2000) Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzforschung* 54:1-8.
- Miller RNG, Holderness M, Bridge PD, Chung GF, Zakaria MH (1999) Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. *Plant Pathol.* 48:595–603.
- Paterson RRM (2007) *Ganoderma* disease of oil palm - A white rot perspective necessary for integrated control. *Crop Protection*, 26(9):1369-1376.
- Risler JL, Louis A, Mohsenizadeh S, Brezellec P, Diaz-Lazcoz Y (2003) Les comparaisons massives de séquences. *Laboratoire Génome et Informatique*. Document pp. 23.
- Stalpers JA (1978) Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Stud. Mycol. Centraalb. Schimmelcult. Baarn* 16:1-248.
- Utomo C, Niepold F (2000) Development of Diagnostic Methods for Detecting *Ganoderma*-infected Oil Palms. *Journal of Phytopathology*, 148:507–514.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols. A guide to methods and applications*, Edition Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ Academic press, San Diego, USA, pp. 315-322.