

CONVENTION SUR LE COMMERCE INTERNATIONAL DES ESPECES
DE FAUNE ET DE FLORE SAUVAGES MENACEES D'EXTINCTION



Dix-septième session du Comité pour les plantes
Genève (Suisse), 15 – 19 avril 2008

Questions d'identification

DEVELOPPEMENT DES TECHNIQUES GENETIQUES POUR L'IDENTIFICATION LEGISTE
DES BOIS ET DES PRODUITS DU BOIS DE *GONYSTYLUS* (RAMIN)

1. Le présent document est soumis par l'autorité scientifique du Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord.
2. Introduction
 - a) Le commerce de *Gonystylus* spp. est caractérisé par le passage d'une large gamme de parties et de produits par les frontières internationales. L'identification de ces parties et produits s'est avérée difficile pour les agences chargées de la lutte contre la fraude touchant à la CITES des pays d'importation et d'exportation.
 - b) Comme les espèces individuelles ne peuvent pas être distinguées de manière fiable, l'inscription du genre *Gonystylus* a facilité l'identification du matériel dans le commerce, par des techniques traditionnelles axées sur l'anatomie du bois. Les anatomistes spécialisés dans les bois peuvent procéder rapidement et de manière fiable à l'identification anatomique d'échantillons uniques. Les derniers développements au niveau de *CITESwoodID* (Richter, Gembruch and Koch, 2005) – clé morphologique sur ordinateur – combinés à un cours de formation de deux jours, ont beaucoup amélioré le potentiel d'analyse des risques et l'identification initiale par les agents de la lutte contre la fraude de bon nombre d'espèces produisant du bois présentes dans le commerce. Pour compléter ces ressources, il faut de plus en plus pouvoir disposer d'une méthode rapide, performante et incontestable pour identifier le ramin, qui soit utilisable comme un outil de laboratoire courant, facile à transférer d'un pays à l'autre, et capable de fournir des preuves recevables par les tribunaux. Pour étudier ces options, l'organe de gestion CITES du Royaume-Uni, le *Department for Environment, Food and Rural Affairs* (Defra) a financé un projet pilote visant à étudier l'utilisation de techniques génétiques dans l'identification des bois couverts par la CITES. Ce projet a été réalisé par *Wildlife DNA Services* et les Jardins botaniques royaux de Kew (Royaume-Uni), l'autorité scientifique CITES du Royaume-Uni chargée des plantes.
3. Buts
 - a) Le but de ce projet était de produire une méthode validée pour l'identification génétique légale du bois de ramin (*Gonystylus* spp.) et de ses produits à l'intention des services de lutte contre la fraude (douanes, inspection aux frontières) et des négociants. Le projet a été conçu comme une étude pilote devant valider le concept en vue d'un essai pratique. Il a donc une portée taxonomique limitée, axée sur un seul genre, mais inclut tous les stades d'un essai – prélèvement de l'échantillon, extraction de l'ADN, sélection d'un marqueur, conception et validation de l'essai. Il importe de noter que la recherche était motivée par les besoins de

l'utilisateur final, en l'occurrence, *Her Majesty's Revenue and Customs* (Royaume-Uni). Cette approche implique que les critères d'application pratique de l'essai étaient spécifiés dès le départ, y compris la transférabilité, le coût par échantillon, la capacité de l'échantillon, la rapidité de l'essai et la fiabilité de la technique à donner des preuves recevables en cas de poursuites judiciaires.

- b) Les méthodes et les résultats sont présentés dans l'annexe au présent document (en anglais et en espagnol).

4. Conclusions

La recherche a démontré que les échantillons de bois et de produits du bois peuvent être identifiés rapidement et à moindre coût en recourant à des techniques d'analyse génétique modernes largement disponibles. Le développement de ces techniques est relativement simple, et comme de plus en plus de données génétiques sont disponibles pour de nombreuses espèces, il devrait être possible de reproduire ce type de test pour une grande partie des bois commercialisés. Les méthodes analytiques sont faciles à transférer entre laboratoires et donnent des résultats suffisamment fiables pour être utilisés comme preuves légales.

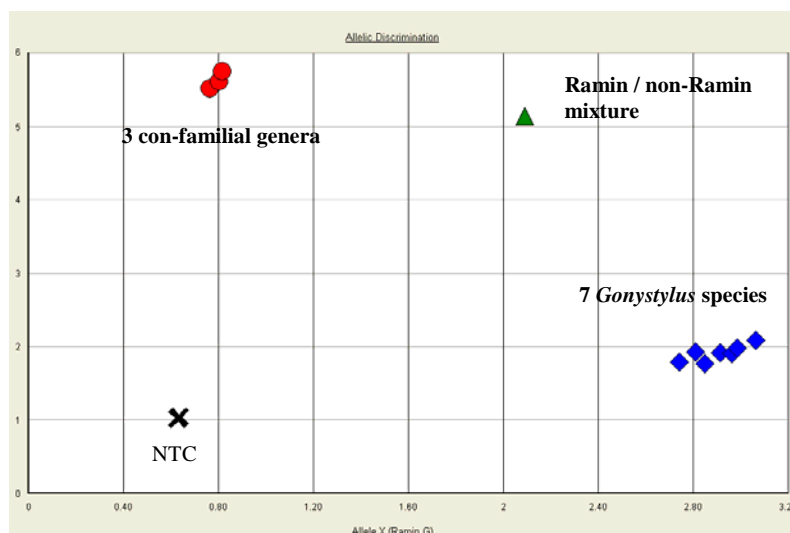


Figure 1: Résultats de l'essai TaqMan montrant la différenciation entre sept espèces du genre ramin (*Gonystylus*) à partir des trois espèces le plus étroitement apparentées. Le triangle représente un contrôle de mélange d'ADN 1:1, les croix (en bas à gauche) sont des contrôles négatifs.

5. Applications pratiques

Concrètement, le test comporte trois stades: le prélèvement de l'échantillon, l'extraction de l'ADN et l'analyse génétique. Le prélèvement de l'échantillon a lieu au point d'inspection et peut être pratiqué par l'enquêteur avec un minimum de formation et de matériel. Les échantillons sont ensuite transportés au laboratoire. L'ADN en est extrait par une méthode qui a été optimisée durant le projet pour plusieurs types de produits du bois. Le stade suivant de l'analyse génétique est basé sur une technique industrielle standard et donne rapidement une identification indubitable de l'ADN du ramin. Le stade en laboratoire prend moins de six heures du début à la fin; 96 échantillons (ou 384 avec certains instruments) peuvent être traités simultanément.

6. Moyens requis

Prélèvement de
l'échantillon:

Équipement de base pour prélever ~ 1cm³ de matériel: couteau ou scie
Formation de l'agent (1 à 2 heures)

Analyse en laboratoire: Kits et réactifs pour l'extraction de l'ADN, disponibles dans le commerce
Système d'analyse génétique PCR en temps réel
Protocole librement disponible (SOP) pour réaliser l'analyse

Installations: Pour le travail d'étude, le test peut être fait par tout laboratoire disposant de l'équipement nécessaire (> 50 au Royaume-Uni). Pour les investigations légales, les installations disponibles sont limitées aux laboratoires garantissant la qualité (> 5 au Royaume-Uni). Il existe des installations similaires partout dans le monde.

Coûts estimés:

N.B. Les coûts sont sujets à de fortes économies d'échelle
Coûts d'achat par le laboratoire (1500 tests) GBP 500
Coûts des réactifs par échantillon (sans le temps du personnel et les frais généraux) GBP 3
Prix réaliste pour l'étude par l'agence de suivi GBP 20
Prix réaliste pour l'analyse légiste pour la lutte contre la fraude GBP 50

7. Références

Richter H.G., Gembruch K, & Koch G. (2005). Software program: *CITESwoodID* version 1.0, *BFH German Federal Agency for Nature Conservation*. Disponible sur CD-ROM.

Weising, K. & Gardener R.C. (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genome of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42, 9-19.

8. Remerciements

Les partenaires du projet tiennent à remercier pour leur assistance les personnes suivantes: Lillian Chua (*Forest Research Institute*, Malaisie) et Oliver Gailing (*Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding*, Université de Göttingen, Allemagne), ainsi que le *Department for Environment, Food and Rural Affairs* (Defra), l'organe de gestion CITES du Royaume-Uni qui a financé le travail.

9. Personne à contacter pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur la réalisation du test, contacter:

Dr Rob Ogden, Wildlife DNA Services

Téléphone: +44 1506 424290

Fax: +44 1506 424280

Courriel: rob-ogden@wdnas.com

10. Tous les détails sur l'élaboration et la réalisation du test figurent dans l'annexe au présent document et seront publiés dans un prochain numéro de la revue *Endangered Species Research*.

METHODS AND RESULTS OF THE PROJECT

Methods*Sample collection*

1. Authenticated reference samples were obtained from material kindly provided by the Forest Research Institute of Malaysia (FRIM) and from the collection held at the Royal Botanic Gardens, Kew. The reference samples were divided into three categories: *Gonystylus* (seven target species including those commonly traded); genetically-related species (representatives of all three con-familial genera to *Gonystylus*); and anatomically similar species (examples of 17 species that may confound ramin identification). In addition, a range of sample types was obtained including dried leaf material, unprocessed timber and a variety of worked products such as dowels, window blinds and tool handles.

DNA-extraction

2. Two commercial DNA-extraction kits designed for plant material were tested: the Tepnel Nucleon Phytopure kit based on a simple salt extraction method, and the Tepnel GMO BioKit based on magnetic bead DNA capture. Both kits were employed following manufacturers' protocols. The quality of DNA recovered from both the leaf and processed timber was assessed through PCR amplification. The DNA from processed wood was expected to be of inferior quality (reduced yield and fragmented) compared to fresh leaf material. The extent of the fragmentation was assessed using PCR amplification of two different sequence length products (200 and 800 bp) from the plastid *matK* gene.

Genetic marker selection

3. Five candidate gene regions found in plastid DNA had been pre-selected for investigation as potential discriminatory markers for use as a universal plant DNA barcode: *matK*, *rpoC1*, *rpoB*, *accD* and *YCF5*. DNA sequences were produced for each region for the *Gonystylus* species samples and the three genetically-related species.
4. Sequences were aligned to allow identification of individual nucleotide positions that vary among species. These positions within the sequences, known as Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), were then evaluated to select SNPs that show the same DNA type across all ramin species, but different DNA types in non-ramin species. From the resulting diagnostic SNPs a single genetic marker was chosen for use in the assay design phase.

Assay development

5. The basis for the assay is a DNA identification method known as TaqMan, which allows the genetic variation at the target SNP to be detected using different coloured probes. The probes are then read by a machine that allows the test sample to be identified as originating from a ramin or non-ramin species.

Validation

6. The final TaqMan assay was investigated to examine its performance with different sample types, different species and different DNA concentrations. In addition to validation of the assay itself, an internal control was developed alongside the probe to demonstrate the presence of DNA in samples that show no result with the TaqMan probe. This may occur with samples that are very genetically distinct from ramin. The internal control consists of a second genetic marker, a plastid microsatellite locus (CCPR2) (Weising, & Gardener, 1999), that will give a standard result for almost all tree species to show that the test is working correctly.

Assay results

7. DNA was successfully recovered and PCR-amplified from both fresh plant material and specimens of worked ramin. In all cases the short DNA fragment was amplified; the large fragment was only amplified in fresh leaf material, as expected. The best performing DNA extraction technique was the Tepnel Phytopure kit based on DNA recovery and cost.
8. Evaluation of the DNA sequences produced for each of the five candidate gene regions indicated that the marker *matK* was most suitable for use in distinguishing ramin from non-ramin samples. The *matK* region contained three separate SNP positions that could discriminate the two groups.
9. The SNP assay performed as predicted, correctly discriminating ramin from non-ramin samples. Sample identification was definitive in all cases, with distinct clusters formed for both sequence types (Figure 1).
10. Validation tests showed that the assay worked with DNA recovered from all sample types tested, including the worked products. The assay displayed no false positive results across the 20 non-ramin species tested (three genetically similar and 17 morphologically similar). The TaqMan assay returns consistent results down to a level of 0.01ng/μl of template DNA.