



Société Mycologique de France
220 rue Rottembourg
75012 Paris



UMR 5175
CENTRE D'ÉCOLOGIE
FONCTIONNELLE
& EVOLUTIVE

Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive
1919 route de Mende
34293 Montpellier cedex 5

Projet MycoSeq

Programme n° 9. **Serge PREVOST**

Soumis le 12 mars 2016

BILAN

FR2016255_SP0003_15_Russula_sp. (cf. R. aerina)	ITS : succès	12 euros
	Analyse : <i>Russula integra</i>	
Total :		12 euros
Règlement au 12/3/2016		12 euros
Crédit :		0 euro

Barème :

Résultat	Tarif < 10 ans	Tarif > 10 ans
Echec séquençage (séquence contaminante)	0 €	12 €
Echec PCR (pas de bande sur gel)	0 €	6 €
Séquence exploitable	12 €	12 €
Séquence exploitable mais tronquée	6 €	12 €

MYCOSEQ
SYNTHESE DES RESULTATS

Région ITS

Générée avec les amorces ITS1F et ITS4B.

NB : les séquences contiennent les régions : 18S (partie terminale), ITS1 (complet), 5.8S (complet), ITS2 (complet), 28S (partie initiale).

Résumé :

La séquence obtenue a été comparée par BLAST aux séquences disponibles sur la base de séquences internationale GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) et UNITE (<https://unite.ut.ee/>). La sélection des séquences retenues pour l'analyse a été réalisée d'après la littérature disponible et selon la pertinence des résultats du BLAST.

Méthode :

- 1) Edition des séquences sous le logiciel libre BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)
- 2) Alignement et analyses phylogénétiques avec paramétrage par défaut (Maximum likelihood) sur le portail : phylogeny.lirmm.fr
- 3) Visualisation et édition de l'arbre phylogénétique sous TreeDyn, sur le même portail.
- 4) Annotations et légendes éditées sur Inkscape à partir d'exportation pdf (<https://inkscape.org/fr/>)

Note : les analyses présentées ici sont fournies à titre purement indicatif. Elles n'ont pas vocation à être publiées telles quelles. Pour l'élaboration d'analyses et de figures publiables, demandez-nous conseil !

FR2016255_SP0003_15_Russula_sp (hypothèse : *Russula aerina*)

La séquence ITS obtenue est de bonne qualité. La comparaison par BLAST confirme l'appartenance au genre *Russula*. L'alignement est assemblé avec une sélection de 21 séquences similaires disponibles dans GenBank à partir des résultats du BLAST. Aucune séquence proche ne figure dans la base UNITE.

Commentaires

La séquence générée apparaît identique à 100 % aux séquences AF418636 (Allemagne, U. Eberhart) et KT933984 (Allemagne, F. Hampe), identifiées « *Russula integra* ». L'analyse phylogénétique place ces séquences dans un clade fortement soutenu, incluant d'autres « *Russula integra* » dont les séquences sont identiques aux précédentes, à 1-2 incertitudes près qui ne remettent pas en cause leur identité.

La délimitation phylogénétique de *R. integra* par l'ITS semble robuste et sans ambiguïté. Les résultats obtenus, moyennant le faible nombre de séquences disponibles au regard de la fréquence et de la variabilité morphologique de l'espèce, suggère que *R. integra* ne présente pas de variabilité significative sur l'ITS.

Au vu de ces résultats, il est suggéré que la récolte séquencée puisse être rapportée à *Russula integra* (éventuellement f. *pseudoolivascens* d'après la détermination proposée originellement), si la microscopie se révèle compatible avec cette identification moléculaire.

MYCOSEQ

L'hypothèse d'une identité avec *Russula aerina* ne peut être vérifiée ici, le type de *R.aerina* n'ayant pas été séquencé ; la proximité de *R. aerina* par rapport à *R. integra* serait alors à réévaluer.

AVERTISSEMENT

La pertinence des identifications des séquences relève de l'unique responsabilité des auteurs de ces séquences. Il convient de vérifier de manière critique les informations pour chaque séquence (recherche par saisie du code), sur les bases de données correspondantes :

- UDB... : base UNITE, <https://unite.ut.ee/>; lien vers les informations détaillées et photos pour chaque récolte ;
- les autres : base GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; informations variables selon le dépositaire.

L'analyse présentée ici est réalisée au nom de la Commission des partenariats scientifiques de la SMF sur la base des données disponibles publiquement à la date de diffusion. Elle est rédigée à titre indicatif, et sa publication, en totalité ou en partie, sans l'autorisation de la SMF, contreviendrait au règlement du projet (<http://www.mycofrance.fr/projets/mycoseq/>).

Toute question relative à ces séquences ou leur analyse est à adresser à : mycoseq@gmail.com.

Séquences (format FASTA)

```
>FR2016255_SP0003_15_Russula_sp
TTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGTATA
ACCGAGGTGCAAGGGCTGTCGCTGACCTTTTAAAGGTTGTGCACGCCCAGCACTCTCACACAATC
CATCTCACCCCTTTTGTGCATCACCGCGTGGGCCCCCTTTGCAGGAGGGCTTGCCTTTTCACATAA
AACTTGATACAGTGTAGAATGTTCTTTTATTTATTTATTTTTCGGTCACACGCAATCAATACAAC
TTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGCATTCGAGGGGC
ACACCCGTTTGAGTGTGCGTGAATCATCAAAAACCTTTTGTGTTGAAAAGGATTTTGGACTTGGA
GGTTCCATGCTCGCCTTTGCTTTTGAAGGTGAGCTCCTCTCAAATAAATTAGTGGGGTCCGCTTTGC
TGATCCTTAATGTGATAAGATGTTTCTACATTTTGGATTTAGCACTGTCCCTTGGAAGCCTGCTCCT
AACTGTCTTTTGGACAATGATGGTGCTCCGGTCATCGCCATCTACATTGGCGGGAGGCTGGACCCA
CAAAGAYAACCTTGACCTCAAATCGGGTGAGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGG
AGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAA
AATCTGGTGGTCTTTGGCCATCCGAGTTGTAATTTAGAGAAGCGACTTCCGCGCTGGACCGTG
```

Les séquences sont également envoyées au format .fas (FASTA) au demandeur ; elles peuvent être éditées sous des logiciels spécifiques tels que BioEdit ou Mega7, mais aussi comme texte brut sous WordPad, BlocNotes etc.

Les chromatogrammes bruts fournis par le prestataire de séquençage sont disponibles sur demande auprès de MycoSeq.

INFORMATIONS TECHNIQUES

Méthodes d'analyse

L'extraction et l'amplification des régions ITS et 28S de l'ADN ribosomique nucléaire sont réalisées au CEFE de Montpellier (UMR 5175), sur matériel sec, avec le kit **redextract-n-Amptm Plant PCr Kit** (sigma-Aldrich, st. louis, Mo, usA), suivant les instructions du fournisseur et à l'aide du couple d'amorces ITS-1f/ITS-4 (ITS) et LR0R/LR7 (28S) (Gardes & Bruns, 1993; Vilgalys & Hester, 1990). Le séquençage des amplicons est réalisé dans les deux sens par la société Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). Les séquences sont ensuite éditées et assemblées sous Codon Code Aligner 4.1.1 (CodonCode Corp., Centerville, MA, USA).

GARDES M. & BRUNS T. D., 1993.- ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, p. 113-118.

VILGALYS R. & HESTER M., 1990.- Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172(8), p. 4238-4246.

Causes possibles des échecs Mycoseq (ITS)

- 1) Age et séchage des exsiccata (ADN dégradé, contamination par des moisissures)
- 2) Présence de composés inhibiteurs de la polymérase dans les extraits (souvent des pigments donc extraits très sombres pas de très bonne augure)
- 3) Contamination lors de la préparation des extraits, au laboratoire (peut arriver mais généralement négligeable si l'ADN de l'exsiccata n'est pas dégradé)

Mesures actuelles pour récupérer des séquences

- 1) Basidios : si échec PCR avec amorces ITS1F/ITS4B, ré-amplification du produit de PCR avec ITS1F/ITS4. Procédure efficace par effet de dilution des inhibiteurs + augmentation de la sensibilité de la PCR mais avec augmentation du risque d'amplifier un contaminant. Techniquement impossible à faire chez les ascos
- 2) Nettoyage des extraits sur silice pour éliminer les inhibiteurs potentiels. Procédure efficace sur extraits très mélanisés (Ex : Boletopsis)
- 3) Matériels types (ou très précieux) : amplification en 2 parties avec les amorces ITS1F/ITS2 et ITS3/ITS4. Procédure efficace mais coûteuse en temps et en argent (hors budget Mycoseq)