



Société Mycologique de France  
220 rue Rottembourg  
75012 Paris

MYCOSEQ



UMR 5175  
CENTRE D'ÉCOLOGIE  
FONCTIONNELLE  
& ÉVOLUTIVE

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

## Projet MycoSeq

Programme MycoSeq20 novembre 2021 Hervé Cochard

Soumis le 9/10/2021

### BILAN

Hypothèse (genre)	Hypothèse (épithète)	N° herbier	Code MycoSeq	Séquence	Proposition	Facturation
Mycena	septentrionalis	HC21100501	FR2021641	ITS		
Mycena	cf. atrochalybea	HC21100401	FR2021642	ITS		
Crédit			0 euros			
Total facturé			0 euros			
Règlement			24 euros			
Crédit			0 euros			

#### Rappels :

- je m'engage à signaler à la SMF les projets de publication ou de dépôt public des séquences ;
- je m'engage à citer dans toute publication utilisant les séquences obtenues, la mention :  
« Les analyses moléculaires [préciser éventuellement : séquençage, phylogénie, interprétation] ont été réalisées [en partie/en totalité] dans le cadre du projet MycoSeq, Société Mycologique de France - Paris /CEFE UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier -Université Paul-Valéry Montpellier – EPHE - INSERM » (adaptée en fonction des circonstances)

#### Barème :

## MYCOSEQ

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 €

## SYNTHESE DES RESULTATS

### Région ITS

Générée avec les amorces ITS1F/ITS4B ou ITS5/ITS4 en cas d'échec.

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

### Résumé :

Les séquences obtenues ont été comparées par BLAST aux séquences disponibles sur la base de séquences internationale GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), UNITE (<https://unite.ut.ee/>), ainsi qu'aux séquences inédites générées au CEFE.

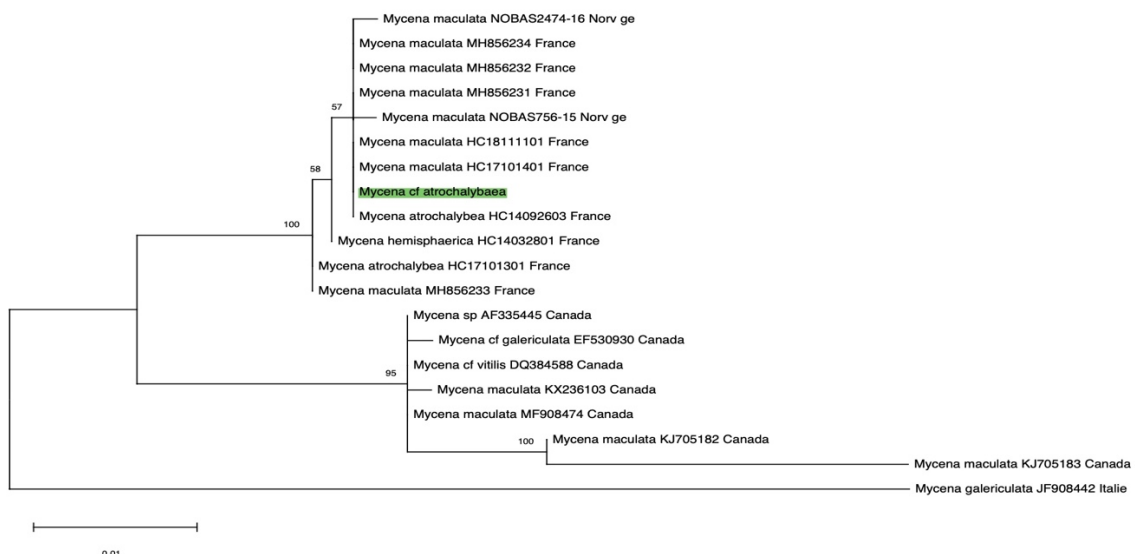
### Méthode :

- 1) Edition des séquences sous le logiciel CodonCode Aligner
  - 2) Aligement 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.
- Les analyses phylogénétiques seront fournies sur demande ; une aide pourra être apportée à leur mise en forme en vue de publication.

### Observations :

#### 1) Séquence FR2021642

Cette séquence présente une très forte similitude (>99.8%) avec les espèces du groupe *maculata*. L'analyse de la variabilité de la séquence ITS ne permet pas de distinguer les différentes espèces de ce groupe (*maculata*, *atrochalybea*, *hemisphaerica*).

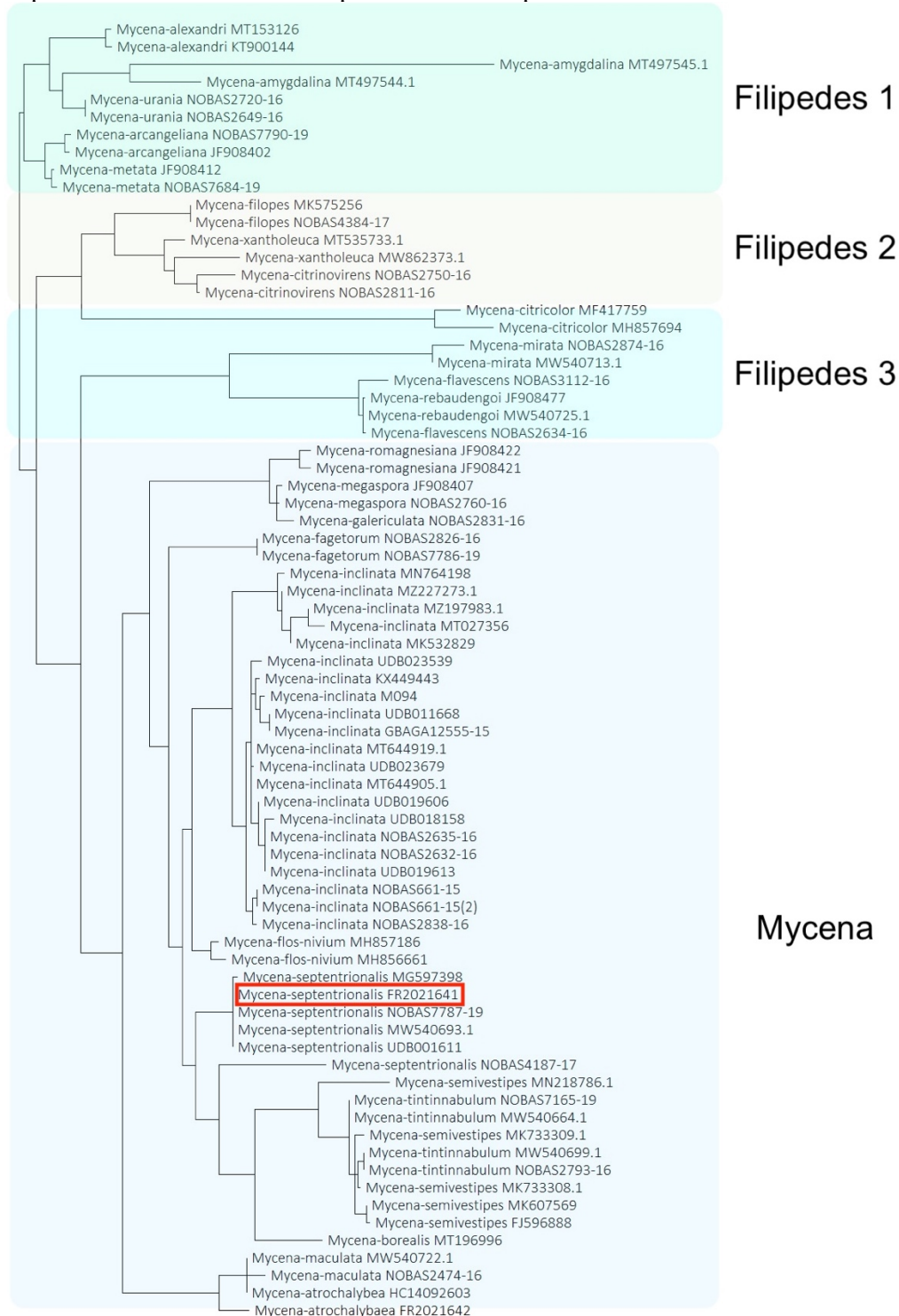


## 2) Séquence FR2021641

Cette séquence présente une similitude parfaite (100%) avec une séquence de *M. septentrionalis* de Finlande disponible dans GenBank ([MW540693.1](#)).

Cinq séquences de *M. septentrionalis* sont disponibles dans les banques en ligne, dont quatre très proches de celle de FR2021641.

Du point de vue phylogénétique, *M. septentrionalis* se situe dans un clade formé d'espèces de la section *Mycena* (*inclinata*, *flos-nivium*, *tintinnabulum*), très éloigné donc des *Filipedes*, section dans laquelle *septentrionalis* est classiquement placé. La forme des cystides des *Mycena* est probablement un caractère plus secondaire pour la délimitation des sections de ce genre.



**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](mailto:mycoseq@gmail.com).

**Séquences (format FASTA)**

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 CEFÉ 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(B) (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)