



IDENTIFICATION DE 10 SOUCHES DE CHAMPIGNONS PAR AMPLIFICATION ET SEQUENCAGE DE LA REGION ITS

Cliant : LABORATOIRE INRAE Guadeloupe – Domaine Duclos- Prise d'eau Petit Bourg 97170

Contact : Mme PESTON Aurélie

Email : aurelie.peston-comminges@inrae.fr; aurelie.peston@gmail.com

**Service : Identification de 10 Souches de Champignons par Amplification du gène ITS et
Séquençage Sanger**

Date de réception des ADNg extraits : 14/08/2020

Réfèrent Technique : Mme Farida MEBARKI

PROTOCOLE DE L'ANALYSE

- 1- Amplification du locus ITS avec les amorces universelles ITS1 et ITS4
- 2- Contrôle Qualité de ces produits PCR sur QIAXCEL pour validation qualité et quantité de produit PCR (Une seule bande bien spécifique de taille : environ 400 à 700 pb)
- 3- Purification de ces produits PCRs (purification par méthode Exosap)
- 4- Séquençage de ces produits PCRs avec les amorces de PCR
- 5- Analyse et Alignement des séquences pour créer un Contig correspondant à la séquence complète du locus ITS
- 6- Blast sur 2 Bases de données publiques pour identification des souches analysées

Rmq : Suite aux difficultés rencontrées pour l'amplification du locus ITS, des portions des gènes 18S et 28S ont aussi été tentés en amplification.

RESULTATS LIVRES : Ce Rapport, compte rendu de l'Analyse + les chromatogrammes bruts des séquences Sanger réalisées + Les séquences consensus « Contig ITS »

CONDITIONS DES AMPLIFICATIONS PCR

Les conditions de la PCR sont:

Pour la réalisation des Mix :

Extraits ADNg : 2µl
Mix PCR 5X: 6µl
Primer 16S-27F : 1µl
Primer 16S-1492R : 1µl
H2O qsp 30µl : 20 µl

Cycles de PCR : 96°C 12 min (activation du Mix HS)

Puis 35 cycles de 96°C 20sec- 56°C 20sec-
72°C 1min30
Extension finale à 72°C – 5 min

Un Contrôle Positif (ADNg de E.Coli) ainsi qu'un Contrôle Négatif (H2O) sont systématiquement amplifiés dans les mêmes conditions que le/les ADNs à analyser.

L'ADN de la souche 235 n'est pas amplifiable malgré 4 essais.

Les ADNs des souches 23 ; 73 ne donnent pas d'amplification sur le gène ITS, seul les gènes 28S et 18S ont pu être amplifiés.

PURIFICATION DES AMPLICONS OBTENUS ET MISE EN SEQUENCAGE

Purification des amplicons avec le kit **ExoSap-It (USB)**

Les produits PCR ont été mis en séquençage avec le kit **BigDyeV3.1 Dye Terminator Kit** (Thermo Fisher Scientific).

Les réactions de séquence ont ensuite été purifiées avec le kit **BigDye Xterminator** (Thermo Fisher Scientific) avant analyse sur un **séquenceur 96 capillaires ABI3730XL**

****Les Séquences vérifiées par un technicien ont été alignées avec le logiciel CHROMAS Pro pour vérifier leurs Homologies.**

RESULTATS DES ANALYSES Blast

Les Contigs Obtenus pour les 10 souches ont été Blastés sur 2 Banques Publiques de Données ITS: BlastN de NCBI et UNITE

Les résultat des analyses Blast sont donnés en résumé dans le tableau Excel ci-dessous :

#	Nom Echantillon	Vol gDNA fournit	Espèce/Genre attendu	Espèce/Genre identifié	Commentaire
1	23	40µl	C.gloeosporioides	Bionectria = clonostachys	Les souches 23 et 73 sont identiques à 100% sur leur gène 28S
2	73	40µl	G.cingulata	Bionectria = clonostachys	
3	118	40µl	C.gloeosporioides	Gibberella fujikuroi/Gibberella intricans	
4	164	40µl	C.gloeosporioides	Curvularia lunata	Aucun résultat
5	221	40µl	C.gloeosporioides	Gibberella thapsina	
6	224	40µl	C.gloeosporioides	Colletotrichum gloeosporioides	
7	235	40µl	C.gloeosporioides	non amplifiable	
8	240	40µl	C.gloeosporioides	Lasiodiplodia pseudotheobromae	
9	JeVi16	15µl	Colletotrichum spp	Nigrospora oryzae; Nigrospora sp	Les souches 118 et NaLa8 sont identiques à 100% sur leur gène ITS
10	NaLa8	15µl	Colletotrichum spp	Gibberella fujikuroi/Gibberella intricans	

Rapport d'Analyse établi à Vaulx-en-Velin : le 25 Juillet 2020

Mme MEBARKI Farida
Directeur Scientifique

BIOFIDAL (SARL Themis)
170 Av. Gabriel Péri
69120 VAULX EN VELIN
Tél. 04 37 45 02 96 Fax 04 37 45 02 97
SIRET 422 943 599 000 24

Laboratoire BIOFIDAL (Partenaire des Hospices Civils de Lyon et de l'Université Claude Bernard)

170, Avenue Gabriel Péri 69518 Vaulx en Velin Cedex – www.biofidal.com

Tél : 00-33-(0)4-3745-0296 / Fax : 00-33-(0)4-3745-0297- Email : info@biofidal.com