

Protocole de prélèvement pour envoi d'échantillon à séquencer via Funif-Col

Dans le contexte de la recherche moléculaire en mycologie, les tissus conservés dans le tampon CTAB donnent actuellement les meilleurs résultats pour une extraction d'ADN de bonne qualité. Dans ce but, je vous ai fourni (si besoin me redemander) des tubes Eppendorf de 2 ml contenant 0,5 ml du tampon CTAB. Il est bon de rappeler ici quelques points importants pour cet échantillonnage (bien lire l'ensemble des étapes avant de commencer pour comprendre la procédure !). Il est important également que **pour chaque échantillon** pour laquelle une séquence est demandée, il faut nous fournir :

- ➔ un **exsiccata de qualité** en vue de rejoindre la collection Funif-Col dans l'herbier national du Muséum de Paris
- ➔ Des **photos** (préférentiellement *in situ*) de l'échantillon pour pouvoir être associée à la fiche numérique de l'échantillon
- ➔ Un **tube CTAB** contenant le matériel frais à séquencer

1. *Partie terrain* (informations à fournir : voir fichier Excel)

- 1) Bien noter les informations importantes concernant la localisation → Liens utiles pour obtention données GPS d'un lieu et conversion données GPS : <https://www.geoportail.gouv.fr/> , <https://www.coordonnees-gps.fr/carte/pays/FR>
- 2) Bien noter les informations quant au milieu de récolte (types de forêts ou écosystèmes, écologie générale et/ou spécificité d'hôte)
- 3) Notez les **caractères essentiels** de la récolte (odeur, saveur, changements de couleur, réactions macrochimiques, etc.)
- 4) **Prenez des photos** in situ pour la couleur et la forme + caractères importants qui pourraient disparaître après séchage

2. *Mise en CTAB d'un morceau de l'échantillon pour séquençage*

- 1) Procédez **le plus tôt possible** après la récolte pour éviter la prolifération de bactéries, levures ou autres contaminants présents dans les tissus
- 2) Utilisez des **pincettes bien nettoyées** avant chaque prélèvement et entre les prélèvements (une stérilisation n'est pas nécessaire, mais essuyez avec un papier bien propre, éventuellement humidifié avec de l'alcool à 70% ou plus)
- 3) Choisissez des parties de lames parfaitement intactes et **non contaminées ni salies** (à défaut, on peut prendre des parties de **la chair la plus ferme** prise à l'intérieur du chapeau ou du pied après coupe en longueur)

- 4) Prenez et transférez dans le tube CTAB une quantité de tissu de lames ou de la chair qui correspond à **la moitié** du volume du tampon dans le tube...**pas plus**
- 5) **Fermez le tube soigneusement** en appuyant fermement sur le couvercle et notez son **numéro** sur le côté du tube au moyen d'un feutre indélébile. Il est **préférable que ce soit un numéro court** (voir Point 3.)
- 6) Répétez les étapes 2 - 5 pour remplir un **deuxième tube avec le même nr** pour le même échantillon (c'est mieux d'en avoir 2 au moins par échantillon en cas d'échec pour le premier séquençage, 3-4 pour les espèces rares si le matériel le permet)
- 7) **Séchez** le reste du champignon rapidement à 45°C, en vue de le conserver dans un sachet plastique en tant que récolte témoin. Cet exsiccata sera conservé ensuite dans l'herbier national au travers de la collection Funif-Col. Les informations que vous nous transmettez (ainsi que les photos) serviront pour créer des fiches des échantillons dans la base internet du muséum, visualisable par tous et avec votre nom associé à la fiche

3. Listing des échantillons récoltés/séchés et annotations

Afin de faciliter le travail de synthèse de l'ensemble des envois d'échantillons, Il est demandé de remplir un fichier Excel comme suit :

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	N° Photos	N° échantillon donateur	Identification initiale	Déterminateur	Collecteur	Date de collecte	Altitude	Coordonnées GPS							Pays	Département	Ville	Lieu-dit	L'hôte - l'écologie - Type de Sol	
2	Chrgros_PH2024110601	PH2024110601	Chrysomphalina grossula	Pascal Heriveau	Pascal Heriveau	05/11/2024	40	47	26	32	N	2	8	7	O	France	44 Loire-Atlantique	Calvaire de Pontchâteau	Le château	Sous Cyprès
3	Sacfar_CH24090402	CH24090402	Saccosoma farinaceum	Carole Hanneire	Carole Hanneire	04/09/2024	2000	45	22	48	N	7	4	16	E	France	73 Savoie	Bessans	Pont Saint-Clair (l'écot)	Sur branches mortes de Salix sp ou Alnus viridis. Autnaire d'altitude
4																				
5																				

Ces données peuvent être renseignées dans un tableau Excel, qui peut être imprimé et joint en copie du spécimen séché et du tube de CTAB contenant de l'échantillon frais. Merci également de me faire parvenir une copie du tableau renseigné par mail.

Recommandations : Comme vous êtes beaucoup à m'envoyer des récoltes, je vous recommande d'utiliser toujours **vos initiales** dans vos numéros.

Merci pour votre collaboration !

Adresse mail de contact : matthieu.jerusalem@mnhn.fr

Adresse d'envoi des tubes et exsiccata correspondant :

JERUSALEM Matthieu
Chargé d'études scientifiques/Mycologie
Coordinateur projet FUNIF-COL

MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
Ensemble Botanique - Direction Générale Déléguée aux Collections
Herbier national - CP 39 - 57 rue Cuvier
75231 Paris cedex 05 - France