

# Une nouvelle espèce pour le genre *Pseudombrophila* (Pezizales), *P. subalpina* (Jamoni) comb. nov.

Nicolas VAN VOOREN

Ascomycete.org, 10 (5) : 205–208

Mise en ligne le 04/11/2018

doi 10.25664/ART-0243



**Résumé :** la révision du matériel type de *Trichophaea subalpina*, associée à une analyse moléculaire, a permis de replacer cette espèce dans le clade *Pseudombrophila*, au sein des *Pyronemataceae s. lato*. L'espèce est combinée dans le genre *Pseudombrophila* malgré une taxinomie non totalement résolue par l'analyse phylogénétique.

**Mots-clés :** Ascomycota, Pézizomycètes, phylogénie moléculaire, *Pyronemataceae*, taxinomie.

**A new species of the genus *Pseudombrophila* (Pezizales), *P. subalpina* (Jamoni) comb. nov.**

**Abstract:** The review of the type material of *Trichophaea subalpina*, combined with a molecular analysis, repositioned this species in the *Pseudombrophila* clade into the *Pyronemataceae s. lato*. The species is combined in the genus *Pseudombrophila* despite a taxonomy not totally resolved through the phylogenetic analysis.

**Keywords:** Ascomycota, molecular phylogeny, *Pezizomycetes*, *Pyronemataceae*, taxonomy.

## Introduction

Dans le cadre de travaux préliminaires autour du genre *Trichophaea* Boud., nous avons été amenés à réviser le matériel-type de *Trichophaea subalpina* Jamoni, une espèce coprophile dont la description (JAMONI, 1998) nous a semblé peu conforme aux caractères reconnus de ce genre. Le substrat de ce champignon, ainsi que certains traits morphologiques, nous ont plutôt orienté vers le genre *Pseudombrophila* Boud. L'examen microscopique, associé à une analyse moléculaire, ont permis de confirmer cette hypothèse. Nous donnons ci-après le résultat de cette révision et les changements taxinomiques qui en découlent.

## Matériel et méthodes

**Morphologie et cytologie.** — Les observations ont été faites à partir de matériel sec, réhydraté dans l'eau, pendant environ 6 heures, et dans la potasse (KOH 5 %). Les milieux d'observation microscopique suivants ont été utilisés : eau, bleu coton (CB) au lactophénol, potasse (KOH 5 %) et solution de Lugol (IKI) pour le test d'amyloïdie. Les mesures ont été réalisées dans l'eau, sur ascospores libres, sous l'objectif à immersion  $\times 100$  à l'aide d'un microscope optique Olympus CX-31 ; « X » représente la valeur moyenne des dimensions sporales et « Q » le ratio entre la longueur et la largeur des

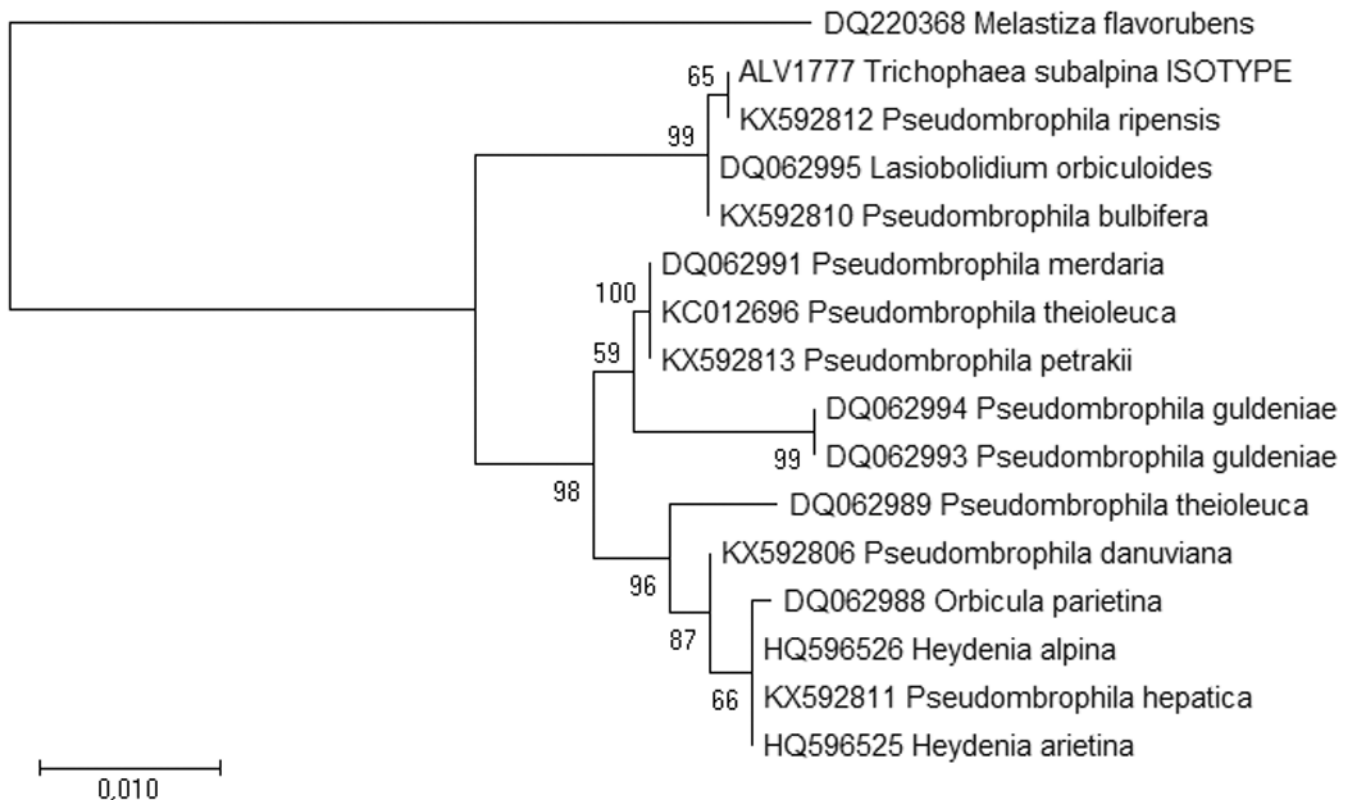
ascospores. Les dessins au trait ont été réalisés à l'échelle, à main levée.

**Extraction de l'ADN, amplification et séquençage.** — L'ADN a été extrait à partir d'un spécimen séché placé dans une solution tampon CTAB (CTAB 2 %, NaCl 1.4 M, EDTA pH 8.0 20 mM, Tris-HCl pH 8.0 100 mM). Ce mélange a été incubé pendant 15 min à 65 °C, complété ensuite par un mélange chloroforme:alcool isoamylique (24:1), puis émulsifié. Il a ensuite été centrifugé pendant 10 min à 13 000 g, puis l'ADN a été précipité grâce à un volume équivalent d'isopropanol. Après une deuxième centrifugation de 15 min à la même vitesse, la granule d'ADN a été lavé à froid dans de l'éthanol à 70 % et centrifugé encore 2 min, puis séché. Enfin, elle a été suspendue dans 200  $\mu$ l d'eau bidistillée. L'amplification PCR a été réalisée avec les amorces ITS1F et ITS4 (WHITE *et al.*, 1990 ; GARDES & BRUNS, 1993) pour la région de l'ITS, LR0R et LR5 (VILGALYS & HESTER, 1990) pour celle du LSU. Les réactions PCR ont été réalisées selon un programme consistant en un démarrage à chaud à 95 °C pendant 5 min, suivi par 35 cycles à 94 °C, 54 °C et 72 °C (45, 30 et 45 s respectivement) et une étape finale à 72 °C durant 10 min. Les produits PCR ont été vérifiés sur du gel d'agarose à 1 % (visualisé avec du colorant GelRed), et les réactions positives ont été séquencées avec les amorces correspondantes. L'ensemble de ce travail a été réalisé par le laboratoire ALVALAB (Espagne).

**Analyses phylogénétiques.** — Outre celles produites pour cette étude, nous avons utilisé des séquences provenant des publications

**Tableau 1** – Liste des collections utilisées pour l'analyse phylogénétique. Les numéros d'accension, en gras, concernent les séquences produites pour cette étude.

Espèce	N° échantillon	N° accession GenBank	
		ITS	LSU rDNA
<i>Trichophaea subalpina</i>	GMFN 2661 (type)	<b>MK119761</b>	<b>MK119760</b>
<i>Pseudombrophila theioleuca</i>	F-70057 (C)	-	DQ062989
<i>Pseudombrophila merdaria</i>	s.n., USA, VI.1979 (FH)	-	DQ062991
<i>Pseudombrophila guldeniae</i>	Kongsv. 85.10B (C)	-	DQ062993
<i>Pseudombrophila guldeniae</i>	s.n., Norway, VI.1985 (FH)	-	DQ062994
<i>Pseudombrophila petrakii</i>	N.H. COP 2012.05.001	-	KX592813
<i>Pseudombrophila hepatica</i>	U.L. 245	-	KX592811
<i>Pseudombrophila danuviana</i>	B, herb. Benkert (type)	-	KX592806
<i>Lasiobolidium orbiculoides</i>	CBS 344.73 (type)	-	DQ062995
<i>Pseudombrophila ripensis</i>	M.A.R. 180410 15	-	KX592812
<i>Pseudombrophila bulbifera</i>	U.L. 155	-	KX592810
<i>Orbicula parietina</i>	F-24441 (C)	-	DQ062988
<i>Pseudombrophila theioleuca</i>	DHP 3498 (FH)	-	KC012696
<i>Heydenia arietina</i>	AL-0701	-	HQ596525
<i>Heydenia alpina</i>	Myc 3556 (ZT)	-	HQ596526
<i>Melastiza flavorubens</i>	KS-94-075 (C)	-	DQ220368



**Fig. 1** – Phylogramme d'alignement LSU de *Pseudombrophila* et des genres voisins par la méthode de maximum de vraisemblance (ML).

de HANSEN *et al.* (2005), LEUCHTMANN & CLÉMENÇON (2012) et LINDEMANN & ALVARADO (2017). Le système BLAST® a été utilisé pour rechercher d'autres séquences similaires à partir des bases publiques de l'International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC). Les alignements de séquences ont été traités à l'aide du programme Muscle. Les analyses en maximum de vraisemblance (ML) ont été réalisées grâce au logiciel Mega X (KUMAR *et al.*, 2018) en utilisant un modèle GTR (NEI & KUMAR, 2000). Les niveaux de confiance des clades individuels ont été évalués par la méthode des bootstraps (SWOFFORD *et al.*, 1996) en utilisant 1000 répliques. L'arbre avec la plus grande vraisemblance logarithmique (-1635,25) est affiché. Les arbres initiaux pour la recherche heuristique ont été obtenus automatiquement en appliquant les algorithmes Neighbor-Join et BioNJ à une matrice de distances (comparaison par paires) estimées grâce à l'approche par probabilité composite maximale (MCL), puis en sélectionnant une valeur de log du type supérieure. Une distribution gamma discrète a été utilisée pour modéliser les différences de taux d'évolution entre les sites [5 catégories (+ G, paramètre = 0,4218)]. Le modèle de variation des taux a permis à certains sites d'être invariants sur le plan de l'évolution ([+ I], 66,04 % des sites). Un total de 869 positions a été retenu dans le jeu de données final.

Les séquences générées pendant cette étude ont été déposées dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ; les numéros d'accès sont reportés dans le tableau 1.

## Résultats

L'analyse phylogénétique sur le gène 28S nLSU place *Trichophaea subalpina* dans le clade *Pseudombrophila* (fig. 1) tel que défini par HANSEN *et al.* (2005, 2013) et LINDEMANN & ALVARADO (2017). Ce résultat vient conforter l'examen morphologique (voir ci-après), sans pour autant résoudre la taxinomie de ce clade. En effet, comme l'ont souligné HANSEN *et al.* (2005) et LINDEMANN & ALVARADO (2017), la redéfinition

des genres au sein de ce clade nécessite un échantillonnage plus important, notamment pour mieux évaluer les parentés entre espèces développant des apothécies (*Pseudombrophila*) et celles développant des cléistothèces (*Orbicula*, *Lasiobolidium*<sup>1</sup> et *Heydenia*). Au-delà de cet échantillonnage, il paraît nécessaire de produire une phylogénie multi-gènes car les analyses basées sur l'ITS et le LSU montrent des concordances à 100 % pour des espèces a priori bien distinctes (LINDEMANN & ALVARADO, 2017). Il y a donc fort à parier que la variabilité externe s'exprime sur d'autres gènes.

Dans ce contexte, nous adoptons une position conservatrice en combinant ce taxon dans le genre *Pseudombrophila*, dans l'attente de travaux donnant un éclairage nouveau sur la systématique de ce clade.

## Taxinomie

***Pseudombrophila subalpina*** (Jamoni) Van Vooren, *comb. nov.* – MB 828431

Basionyme : *Trichophaea subalpina* Jamoni, *Funghi e Ambiente*, 77 : 15 (1998).

### Description microscopique (fig. 2) :

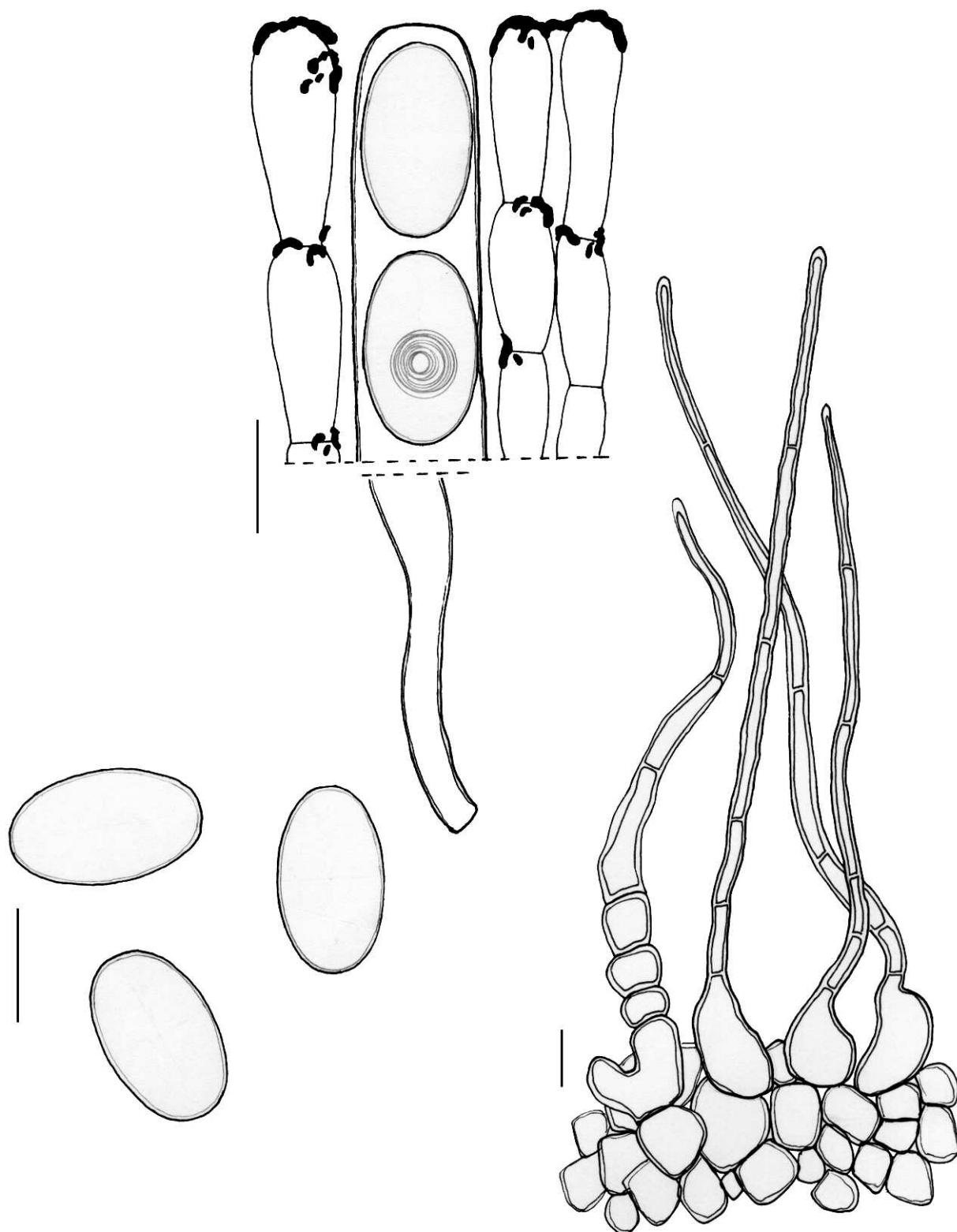
**Excipulum médullaire** de *textura intricata*, à hyphes hyalines ou jaune très pâle, étroites, accompagnées de cellules plus larges ou utriformes. **Excipulum ectal** de *textura angularis*, à cellules hyalines, à paroi assez épaisse et réfringente, devenant brunes dans la zone la plus externe, larges de 20–38 µm. **Marge** excédentaire, composée des mêmes cellules. **Poils excipulaires** 115–300 × 6–8 µm, superficiels, presque sétiformes, plus ou moins flexueux, plus ou moins intriqués, cloisonnés, subhyalins ou brun pâle, sans trace apparente de pigment externe, à sommet obtus ou subaigu, à base simple, bulbeuse (bulbe de 17–24 µm de diamètre), parfois prolongée par quelques cellules en chaînette, à paroi épaisse de 1,5–2 µm, réfringente. **Asques** cylindracés, 110–130 × 8–12 µm, atténués à la base,

<sup>1</sup> On notera que *L. orbiculoides* Malloch & Benny devrait être combiné dans un autre genre, l'espèce-type du genre *Lasiobolidium*, *L. spirale* Malloch & Cain (1971) étant phylogénétiquement située dans un autre clade au sein des *Pyronemataceae* s. str.

sans crochet, octosporés, inamyloïdes. **Paraphyses** élargies au sommet, voire ampullacées,  $\varnothing$  5–8  $\mu\text{m}$ , plus ou moins rétrécies aux cloisons, hyalines dans la partie inférieure, mais contenant un pigment brunâtre dans le dernier article et un pigment pariétal brun sombre, épais, formant une sorte d'épithécium. **Ascospores** ellipsoïdales, (15,5) 16–17  $\times$  (9) 9,5–10,2  $\mu\text{m}$  [ $X = 16,4 \times 9,9 \mu\text{m}$ ,  $n = 21$ ],  $Q = 1,6$ –1,7–1,8, hyalines, d'aspect réfringent et jaune dans le CB, lisse, ne contenant ni guttules, ni granulations, mais formant parfois des bulles de De Bary.

**Matériel étudié** : ITALIE – Piemonte, Valsesia, Alagna, Val d'Otro, alt. 1600 m, sur bouse de vache dans une prairie subalpine, leg. D. Garofoli & G. Baiano, 13 juin 1993, duplicata herb. GMFN n° 2661 (holotype).

**Commentaires** : notre révision du matériel type est conforme à la description originale, les quelques différences pouvant s'expliquer d'une part par un examen sur matériel réhydraté et d'autre part par le choix du spécimen examiné, par exemple pour la différence de longueur des poils (indiquée jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  dans la diagnose). On



**Fig. 2** – *Pseudombrophila subalpina* – Caractères microscopiques (vus dans l'eau). A : Sommet d'asque et paraphyses. B : base d'asque. C : Ascospores. D : Poils excipulaires. Barres d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ , sauf D = 20  $\mu\text{m}$ . Dessin N. Van Vooren

notera également qu'il n'existe pas d'illustration en couleur de cette espèce, publiée à ce jour.

## Discussion

Le genre *Trichophaea* comprend des espèces discoïdes ou cupuliformes, à hyménium pâle (blanc à grisâtre), plus rarement brunâtre, à surface externe et marges couvertes de poils bruns, sétiformes, plus ou moins denses, à base simple et, microscopiquement, par des asques avec crochet, des paraphyses non pigmentées et des ascospores guttulées, lisses ou verruqueuses. Bien que le genre soit paraphylétique (HANSEN *et al.*, 2013 ; PERIĆ *et al.*, 2015 ; VAN VOOREN, 2016), aucune des espèces actuellement rangées dans celui-ci ne présente des caractères similaires à *T. subalpina*. Au contraire, la marge débordante, la présence d'ascospores non guttulées, à contenu réfringent en présence de bleu coton et des paraphyses couvertes d'un pigment brun formant une sorte d'épithécium sont des caractères qui signent les espèces du genre *Pseudombrophila* (syn. *Fimaria* Velen.). L'auteur lui-même (JAMONI, 1998 : 14) formule brièvement cette possibilité : « [...] avrei dovuto ricercare questa specie in altri generi vicini, quali *Fimaria* e *Trichophaeopsis* in cui le ascospore hanno spesso un contenuto giallastro [...] ». Il est donc très étonnant que celui-ci ait finalement choisi le genre *Trichophaea* pour publier son espèce, hormis le fait d'avoir été influencé par la présence de poils presque sétiformes, colorés, un caractère peu fréquent chez les *Pseudombrophila* dont la surface externe est plutôt parsemée de poils hyphoïdes.

Les caractères observés placent ce taxon dans la section *Pseudombrophila* (BRUMMELEN, 1995), mais aucun taxon ne paraît correspondre à *P. subalpina*. On peut éventuellement citer *P. argentinensis* Brumm., mais ce dernier possède des ascospores de longueur un peu supérieure et des poils différents, ainsi que *P. cervaria* (W. Phillips) Brumm., mais ses ascospores sont plus étroites (ratio Q autour de 2,0) et les poils différents. Quant à *P. ripensis* (E.C. Hansen) Brumm. qui se situe dans le même groupe que notre taxon, il présente des ascospores de taille similaire et des poils à base bulbeuse émergent aussi de l'excipulum, mais il s'agit d'une espèce de taille relativement grande (jusqu'à 28 mm d'après BRUMMELEN, 1995) et émergeant d'un sclérote (BRUMMELEN, 1995 ; MOINGEON *et al.*, 2018).

## Remerciements

Nous remercions chaleureusement Pier Giovanni Jamoni d'avoir bien voulu nous confier un duplicata de sa récolte. Merci également à Pablo Alvarado (Alvalab) pour la réalisation du séquençage. Merci enfin à René Dougoud pour la révision du manuscrit.

## Bibliographie

BRUMMELEN J. (VAN) 1995. — A world-monograph of the genus *Pseudombrophila* (Pezizales, Ascomycotina). *Libri Botanici*, 14: 1–117.  
GARDES M. & BRUNS T.D. 1993. — ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2 (2) : 113–118.

HANSEN K., PERRY B.A. & PFISTER D.H. 2005. — Phylogenetic origins of two cleistothecial fungi, *Orbicula parietina* and *Lasiobolium orbiculoïdes*, within the operculate discomycetes. *Mycologia*, 97 : 1023–1033. doi: [10.1080/15572536.2006.11832752](https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832752)

HANSEN K., PERRY B.A., DRANGINIS A.W. & PFISTER D.H. 2013. — A phylogeny of the highly diverse cup-fungus family *Pyronemataceae* (Pezizomycetes, Ascomycota) clarifies relationships and evolution of selected life history traits. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67 : 311–335. doi: [10.1016/j.ympev.2013.01.014](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.01.014)

JAKLITSCH W., BARAL H.-O., LÜCKING R. & LUMBSCH H.T. 2016. — Ascomycota. In: FREY W. (éd.). *Syllabus of plant families — Adolf Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*. Stuttgart, Borntraeger.

JAMONI P.G. 1998. — Un nuovo discomicete coprofilo in Valsesia: *Trichophaea subalpina* spec. nov. *Funghi e Ambiente*, 77 : 13–17.

KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C. & TAMURA K. 2018. — MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35 (6) : 1547–1549. doi: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096)

LEUCHTMANN A. & CLÉMENÇON H. 2012. — The taxonomic position of the genus *Heydenia* (Pyronemataceae, Pezizales) based on molecular and morphological data. *Mycological Progress*, 11 (3) : 699–710. doi: [10.1007/s11557-011-0779-5](https://doi.org/10.1007/s11557-011-0779-5)

LINDEMANN U. & ALVARADO P. 2017. — Revision der Gattung *Kotlabaea*, Teil 2: *K. aurantiaca*, *K. carestiae*, *K. danuviana* und *K. trondii* nebst taxonomischen Bemerkungen zu *Boubovia vermiphila*, *Cheilymenia stercoraria* und zur Gattung *Pseudombrophila*. *Zeitschrift für Mykologie*, 83 (1) : 103–126.

MALLOCH D. & CAIN R.F. 1971. — Four new genera of cleistothecial Ascomycetes with hyaline ascospores. *Canadian Journal of Botany*, 49 (6) : 847–854. doi: [10.1139/b71-125](https://doi.org/10.1139/b71-125)

MOINGEON S., MOINGEON J.-M. & MOYNE G. 2018. — *Pseudombrophila ripensis* (Pezizales). Une espèce peu commune récoltée en Franche-Comté. *Bulletin mycologique et botanique Dauphiné-Savoie*, 228 : 11–14.

NEI M. & KUMAR S. 2000. — *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

PERIĆ B., VAN VOOREN N., HEALY R. & LAZAREVIĆ J. 2015 [2014]. — Une *Trichophaea* rare récoltée en France et au Monténégro : *T. flavobrunnea* comb. nov. (Pezizales). *Mycologia Montenegrina*, 17 : 65–87.

SWOFFORD D.L., OLSEN G.J., WADDELL P.J. & HILLIS D.M. 1996. — Phylogenetic inference. In: HILLIS D.M., MORITZ C. & MABLE B.K. (éd.). *Molecular systematics*. Sunderland MA, Sinauer Associates : 407–514.

VAN VOOREN N. 2016. — *Trichophaea dougoudii* sp. nov. (Pezizales), un nouveau discomycète de l'étage alpin. *Ascomycete.org*, 8 (5): 227–234. doi: [10.25664/art-0190](https://doi.org/10.25664/art-0190)

VILGALYS R. & HESTER M. 1990. — Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172 (8) : 4238–4246.

WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J.W. 1990. — Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J. & WHITE T.J. (éd.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York, Academic Press : 315–322.



1: N. Van Vooren — 36 rue de la Garde, 69005 Lyon, France — nicolas@vanvooren.info