

Introduction de *Coccoloba uvifera* (L.) et son
champignon ectomycorhizien *Scleroderma*
***bermudense* au Sénégal**

Dédicaces

A mon père Iba CISSE,

A ma mère Fatou SECK,

A mes frères et sœurs : Momar, Daba, Awa, Aissatou, Aly, Abdoulaye et Pape,

A mes amours Abdalah, Mame Ami, bébé Fatou, Afia, Tapha et Ibou

Pour ces bons moments passés ensemble, et votre soutien. Trouvez ici le témoignage de mon amour.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD de Bel Air Dakar Sénégal dirigé par le Pr. Amadou Moustapha Bâ.

Cette réalisation, je la considère comme étant l'aboutissement d'un travail d'équipe, c'est pour cela que je tiens à remercier profondément tous ceux qui de près ou de loin, m'ont apporté enseignement, conseil et encouragement.

Je remercie les enseignants et le personnel de la FST-UCAD pour tout ce qu'ils m'ont apporté et plus particulièrement ceux du département de Biologie Végétale qui ont permis d'acquérir les bases scientifiques nécessaires aux travaux de recherche.

Je tiens à remercier Pr. Amadou BA et Dr. Abdala Gamby DIEDHIOU pour m'avoir confié ce travail aussi passionnant et m'avoir initié patiemment à la recherche. Leur intérêt porté à mes travaux de recherche, leur rigueur pour le travail scientifique, leur regard très critique, leur sympathie, leur enthousiasme et leur soutien moral ont fait que ce travail a pu aboutir.

Mes vifs et sincères remerciements

- au Pr. Léonard Elie AKPO, responsable du master d'Agroforesterie Ecologie et Adaptation, qui a toujours été à notre écoute. Qu'il trouve ici ma très haute attention.

- au Dr. Sékouna DIATTA pour son attention et sa disponibilité.

- aux chercheurs du Laboratoire Commun de Microbiologie : Dr. Antony CHAMPION, Dr. Tatiana Krasova WADE, Dr. Alexandre TROMAS, Dr. Dioumacor FALL, Dr. Saliou FALL, Dr. Laurent LAPLAZE pour leur soutien.

- à tout le personnel du Laboratoire Commun de Microbiologie : spécialement à Cheikh NDIAYE à qui je souhaite longue vie et beaucoup de succès dans toutes ses entreprises ; Mathieu FAYE ; Jean Bakhom, Anna M. KONTE ; Francis DOREGO ; Paul TENDENG ; Marie Claire DASYLVA ; Maïmouna CISSOKHO, Omar TOURE ... avec qui j'ai passé des moments très enrichissants.

- aux stagiaires et étudiants du Laboratoire Commun de Microbiologie : Seynabou SENE, Michaella EBENYE, Mariama NGOM, Babacar THIOYE, Fatou DIOUF, Ablaye SOUMARE, Niokhor BAKHOUM, Issa DIEDHIOU, Hermann PROGINOTO, Christine OUATARA, Haro HADO, Fatoumata FALL, Godar SENE, Amadou DIENG, Ibou DIOP. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sympathie.

- à mes camarades de promotion : Alassane W. NGOM, Babacar THIOYE, Emile C. AGBANGBA, Eric KALY, Fanta WOLOGUEME, Ganna NDONG, Hamdani MKOUFOUNDI, Oumar NIANG, Rouba DIOP.

Bref à tous ceux qui m'ont soutenu jusque là, ceux qui ont tout donné pour m'aider à traverser les moments difficiles de la vie, je leur adresse mes sincères remerciements.

Enfin, je n'en serai jamais arrivée sans l'amour et le soutien moral et financier d'une famille exceptionnelle, qu'il trouve ici la marque de ma profonde gratitude et reconnaissance. À mes amis pour leur soutien moral ; à mon oncle Seyni SECK qui m'a toujours soutenu et encouragé ; à mon beau frère Birame SY pour son soutien ; à mon oncle Talla MBOUP ; à ma tante Fatou CISSE pour son soutien et ses conseils.

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION	1
Chapitre 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Symbiose mycorhizienne	3
2. Symbiose ectomycorhizienne	5
2.1 Diversité des champignons ectomycorhiziens	5
2.2 Diversité des ectomycorhizes	6
2.3 Caractérisation moléculaire de la diversité fongique	7
3. Introduction des plantes et de leurs symbiotes fongiques	8
4. <i>Coccoloba uvifera</i> (L.)	10
4.1 Classification et description botanique	10
4.2 Origine et répartition géographique	11
4.3 Quelques usages de <i>Coccoloba uvifera</i>	11
4.4. Les champignons associés à <i>Coccoloba uvifera</i>	12
Chapitre 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	13
1. Sites d'échantillonnage des graines et sols	13
2. Graines de <i>C. uvifera</i>	13
2.1 Observation des spores en microscopie électronique à balayage (MEB)	13
2.2 Observation de spores en microscopie optique (MO)	13
2.3 Viabilité des spores de <i>S. bermudense</i>	13
3. Diversité des champignons ectomycorhiziens des sols d'origine versus sols d'introduction	15
3.1 Diversité des champignons ectomycorhiziens des sols d'origine	15
3.2 Diversité et spécificité d'hôtes des champignons ectomycorhiziens des sols d'introduction	15
4. Morphotypage et conservation des ECMs	16
5. Caractérisation moléculaire des champignons ectomycorhiziens	17
5.1 Extraction de l'ADN total	17
5.2 Amplification de l'ITS par la réaction de polymérase en chaîne (PCR)	17
5.3 Contrôle de l'amplification	17
5.4 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ITS	17
5.5 Purification des produits d'amplification de l'ITS pour le séquençage	18
5.6 Analyse des séquences	18

6. Analyse statistique.....	18
Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	19
1. Graines de <i>C. wifera</i>	19
1.1. Observation des spores sur les graines.....	19
1.2. Viabilité des spores.....	19
2. Diversité des champignons ectomycorhiziens des sols d'origine <i>versus</i> sols d'introduction.....	21
3. Etude de la spécificité d'hôte de <i>S. bermudense</i>	22
4. Génotypage des morphotypes	25
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	I
BIBLIOGRAPHIE	II
ANNEXE	VI

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figures

- Figure 1:** Schéma d'une coupe transversale montrant les principaux types d'associations symbiotiques entre des champignons du sol et des racines de végétaux. (Duhoux & Nicole, 2004).....5
- Figure 2 :** Représentation schématique de l'ITS (ITS1, ITS2 et 5.8S) de l'unité répétée de l'ADN ribosomique chez les champignons. (Tedersoo *et al.*, 2007).8
- Figure 3 :** Schéma conceptuel des processus et mécanismes intrinsèques et extrinsèques impliqués dans l'introduction des champignons ectomycorhiziens [Adaptée par Lockwood *et al.* (2007)]10
- Figure 4 :** *Coccoloba wifera* (L.) en bordure de mer (A) ; Fruits verts immature (B) ; Fruits rouge violacés mature (C) ; Graines sèches (D).11
- Figure 5 :** Plantations ornementales de *C. wifera* en bordure de route (A) en Guadeloupe (France) et dans des sites touristiques (B) à Saly (Sénégal).12
- Figure 6 :** Diversité de champignons ectomycorhiziens identifiés des sporophores et ECMs de *C. wifera* en Guadeloupe (Avril, 2009).12
- Figure 7 :** Schéma récapitulatif des expériences réalisées avec des graines de trois provenances de *Coccoloba wifera* (Guadeloupe).14
- Figure 8 :** Plants de *C. wifera*, d'*E. camaldulensis* et de *C. equisetifolia* cultivés en serre sur du sol prélevé sous *C. wifera* à Potou (Sénégal).15
- Figure 9 :** Schéma récapitulatif des expériences réalisées avec des sols prélevés sous *Coccoloba wifera* dans des sites en zones d'origine (Guadeloupe) et d'introduction (Sénégal).16
- Figure 10 :** Spores dans des cavités du tégument des graines de *C. wifera* (provenance Bois Jolan) observé au microscope électronique à balayage (A) ; (B) et au microscope optique (C).19
- Figure 11:** Fréquence du MT blanc brillant de 3 provenances de graines de *C. wifera* (Viard, Deshaies et Bois Jolan) dont les téguments présentent des spores.....20
- Figure 12 :** Fréquence du MT blanc brillant de 3 provenances de *C. wifera* (Viard, Deshaies et Bois Jolan) inoculées avec des grattures de téguments de graines renfermant des spores..20
- Figure 13 :** Schéma hypothétique de la transmission verticale de l'infection ectomycorhizienne de *C. wifera* par *S. bermudense*.22
- Figure 14 :** Fréquence du MT blanc brillant et du MT brun foncé poilu de *C. wifera* inoculée avec du sol provenant de Viard, Deshaies ou Bois Jolan (Guadeloupe).....23
- Figure 15 :** Fréquence du MT blanc brillant de *C. wifera* cultivée dans des sols rhizosphériques de plantations de *C. equisetifolia*, *E. camaldulensis* ou *C. wifera* provenant de Tivaouane Peul, Thiaroye et Bel air (région de Dakar).....23

Figure 16 : Fréquence du MT blanc brillant de <i>C. wifera</i> cultivée dans des sols rhizosphériques de plantations de <i>C. equisetifolia</i> , <i>E. camaldulensis</i> ou <i>C. wifera</i> provenant de Potou (région de Louga)..	24
Figure 17 : MT blanc brillant (A) et MT brun foncé poilu (B) de <i>C. wifera</i>	24
Figure 18 : Profils des ITS des MTs digérés avec <i>MspI</i> (A) ou <i>HaeIII</i> (B).	25
Figure 19 : Profils des ITS des MTs brun foncé poilu digérés avec <i>MspI</i> (A) ou <i>HaeIII</i> (B).	25
Figure 20 : Arbre phylogénétique construit à partir de séquences ITS des ECMs et sporophores récoltés en Guadeloupe et au Sénégal.....	26

Tableau

Tableau 1. Tableau récapitulatif de l'analyse moléculaire des sporophores de <i>S. bermudense</i> et ECMs récoltés sous <i>C. wifera</i> dans différents sites du Sénégal et de Guadeloupe.....	27
--	----

Abstract

Coccoloba uvifera L., also named seagrape, was introduced in Senegal for edible fruits and ornamental plantings in touristic sites and home gardens. In native area (Guadeloupe), it grows along the sea and on sandy, salty and nutrient-poor soils. It is associated with a diversity of soil fungi with which it forms ectomycorrhizas (ECMs). In introduction area (Senegal), *C. uvifera* is often planted near two other ectomycorrhizal exotic trees (*Eucalyptus camaldulensis* and *Casuarina equisetifolia*) and would be naturalized with one ectomycorrhizal fungus, *Scleroderma bermudense*, originated from Guadeloupe.

The objectives of this study were to (i) investigate the presence of spores on seeds tegument harvested in Guadeloupe and to assess their ability to colonize *C. uvifera* in introduction zone (ii) to highlight the presence of propagules of *S. bermudense* in rhizospheric soil of *C. uvifera* from Guadeloupe, (iii) to study the specificity of *S. bermudense* on *C. equisetifolia* and *E. camaldulensis* and ectomycorrhizal fungi of these two species of trees on *C. uvifera*.

Seeds of *C. uvifera* from three sites in Guadeloupe (Bois Jolan, Deshaies and Viard) were observed in scanning electron microscopy (SEM) and sown in plastic bag containing sterilized soil. Scarified seeds were sown on rhizospheric soil from the three sites in Guadeloupe but also in rhizospheric soils of *C. uvifera*, *E. camaldulensis* and *C. equisetifolia* from two sites in Senegal (Dakar and Potou). After 4 to 6 months of culture in greenhouse, ECMs were morphotyped and characterized by PCR/RFLP and sequencing of the ITS.

The observation of *C. uvifera* seeds revealed that spores of *S. bermudense* were embedded in seed coats. These spores were viable and only the bright white (BW) morphotype (MT) was observed on seedlings growing in sterilized soils. The MT was identified as *S. bermudense*. In the three rhizospheric soils from Guadeloupe, hairy dark brown (HDB) MTs, identified as Thelephorale, and BW MT were in the same proportions on seedlings. By contrast, only the MT BW was on seedlings growing in the two planting soils from Senegal.

These results suggest that *S. bermudense* was introduced through embedded spores in seed coats of *C. uvifera*. This fungus is specific to *C. uvifera*.

Keywords: *Coccoloba uvifera*, *Scleroderma bermudense*, ectomycorrhizae, seeds, spores.

INTRODUCTION

D'une manière générale, l'introduction, volontaire ou fortuite, d'espèces animales comme végétales dans un milieu entraîne un déséquilibre de l'écosystème naturel. Ce déséquilibre peut avoir des conséquences positives comme négatives. L'introduction d'espèces végétales peut comporter des risques écologiques, comme l'introduction de maladies, la perte de biodiversité et la destruction des habitats (Lockwood *et al.*, 2007). Par exemple, l'introduction volontaire ou fortuite du myriophylle du Brésil, plante aquatique invasive originaire d'Amérique tropicale et subtropicale, a provoqué en France une réduction de la biodiversité de la faune végétale et de la faune animale, une augmentation des risques d'inondation et une réduction des capacités de drainage des fossés (Muller, 2004). Les introductions volontaires d'espèces végétales ont été motivées par des finalités utilitaires (agricoles, écologiques, etc.) et économiques (Gargominy *et al.*, 1996). C'est le cas de l'introduction en Afrique des espèces végétales à usage alimentaire, médicinal, ornemental, économique, et/ou énergétique telles que le bananier, les bambous, la canne à sucre, la pomme de terre, l'hibiscus, les pins pour ne citer que quelques exemples (MacKee, 1994).

Toutefois, certaines introductions végétales comme les pins (ex. *Pinus caribaea*) en Afrique tropicale ont échoué jusqu'à ce qu'on se rende compte de la nécessité d'introduire en même temps leurs champignons ectomycorhiziens (Pringle *et al.*, 2009 ; Bâ *et al.*, 2011). En effet, l'inoculation avec des propagules de champignons ectomycorhiziens a permis de réussir les premières plantations de pin en Afrique tropicale (Vellinga *et al.*, 2009). La symbiose ectomycorhizienne a été donc d'une importance capitale pour l'introduction des pins en général et du pin des Caraïbes en particulier pour le reboisement en Afrique tropicale.

La symbiose ectomycorhizienne est décrite comme une association de type mutualiste entre la racine d'une plante et le mycélium d'un champignon du sol pour former un nouvel organe mixte appelé ectomycorhize (ECM) à l'origine de la partie fructifère du champignon appelée sporophore. Les champignons ectomycorhiziens améliorent la nutrition hydrominérale des plantes et reçoivent en retour le carbone dont ils ont besoin pour leur métabolisme. Ils renforcent également la tolérance des plantes face aux stress salin et hydrique. C'est le cas du champignon ectomycorhizien, *Scleroderma bermudense*, vis-à-vis de *Coccoloba uvifera*, Polygonacée originaire d'Amérique tropicale (Bandou *et al.*, 2006), introduite dans des régions tropicales d'Asie, d'Australie et d'Afrique pour ses intérêts multiples (ex : fruits comestibles, plante d'ornement, plante antiérosive) (Perrotta *et al.*, 1994 ; Bandou *et al.*, 2006). En zone d'origine, *C. uvifera* forme des associations symbiotiques avec des champignons ectomycorhiziens dont la diversité est encore peu connue (Pegler, 1983 ; Bandou, 2005 ; Avril, 2009).

En zone introduite et notamment au Sénégal, *C. uvifera* est utilisée comme plante d'ornement et fruitier en bordure de route, dans des concessions familiales et sites touristiques sur le littoral (DEFCCS, 2003). Elle serait aussi potentiellement intéressante dans les programmes de diversification des plantations forestières existantes de *Casuarina equisetifolia* et d'*Eucalyptus camaldulensis* pour fixer les dunes mobiles du littoral dans la zone des Niayes.

Au Sénégal, *S. bermudense* serait le seul symbiote fongique qui forme des ECMs et sporophores sous *C. uvifera* (Sène, 2010).

Les plantations de *C. uvifera* se trouvent souvent à proximité de plantations de deux autres espèces à ECMs introduites, *C. equisetifolia* et *E. camaldulensis*. Cependant, *S. bermudense* ne ferait pas d'ECMs avec ces deux espèces d'arbre dont les symbiotes fongiques ne formeraient pas d'ECMs avec *C. uvifera* (Sène, 2010). *S. bermudense* aurait donc co-évolué avec sa plante hôte d'origine *C. uvifera* en dehors de son aire de distribution.

Trois hypothèses non exclusives sont proposées pour expliquer l'origine des propagules (spores en particulier) de *S. bermudense* et sa persistance en zone d'introduction : (i) des immigrants auraient introduit de jeunes plants poussant en pot sur des sols pourvus en propagules, (ii) des spores seraient présentes sur les téguments des graines de *C. uvifera* importées, (iii) la microflore ectomycorhizienne native ou cosmopolite des zones de plantation ne serait pas compatible avec *C. uvifera*.

Pour vérifier les trois hypothèses, notre étude avait pour objectifs : (i) de rechercher la présence de spores sur les téguments de graines récoltées en zone d'origine et d'évaluer leur aptitude à coloniser *C. uvifera* en zone d'introduction, (ii) de mettre en évidence la présence de propagules de *S. bermudense* dans des sols rhizosphériques de *C. uvifera* en zone d'origine, (iii) d'étudier la spécificité de *S. bermudense* vis-à-vis de *C. equisetifolia* et d'*E. camaldulensis*, et des champignons ectomycorhiziens de ces deux espèces d'arbres vis-à-vis de *C. uvifera*.

Chapitre 1 : **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Symbiose mycorhizienne

Dans la nature, la majorité des végétaux terrestres vit en symbiose avec des champignons mycorhiziens (Bâ *et al.*, 2011). La symbiose mycorhizienne est une association de type mutualiste entre une plante supérieure et un champignon du sol. Cette étroite relation s'élabore au niveau des racines. Les organes résultant de cette association sont appelés mycorhizes, du grec *mukês* pour champignon et *rhiza* pour racine. Le rôle majeur des mycorhizes est le prélèvement et le transport vers la plante des éléments nutritifs très peu mobiles dans le sol, principalement le phosphore (Bolan, 1991 ; Gianinazzi & Schüepp, 1994 ; Lambers *et al.*, 2008). L'impact des champignons mycorhiziens sur la plante hôte ne se limite pas à une amélioration de l'acquisition de minéraux (micro et macro-éléments) par le végétal mais ces symbiotes exercent également une pression sélective sur les microorganismes saprophytes du sol tant au niveau de leur diversité génétique que de leur diversité fonctionnelle (Klett *et al.*, 2005). Ils ont aussi un rôle significatif dans l'organisation spatiale et temporelle de l'évolution de l'écosystème. La structure mycélienne propre aux champignons fournit aux végétaux un bien meilleur accès à ces minéraux que ne le ferait le système racinaire nu. On estime à 86% la proportion de familles de plantes possédant des représentants pouvant former des associations mycorhiziennes (Brundrett, 2009 ; Tedersoo *et al.*, 2010). La symbiose mycorhizienne est donc un phénomène général chez les plantes à l'exception de quelques familles comme les *Brassicaceae*, les *Caryophyllaceae*, les *Cyperaceae*, les *Juncaceae*, les *Chenopodiaceae* et les *Amaranthaceae* qui présentent peu ou pas d'associations mycorhiziennes (Strullu, 1991). On distingue sept types d'associations mycorhiziennes classés selon leur écologie, leur morphologie et leur structure : les mycorhizes à vésicules et à arbuscules (MVAs), les ECMs, les ectendomycorhizes, les mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes, éricoïdes et orchidoïdes (Duhoux & Nicole, 2004).

Les mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes et éricoïdes concernent quelques familles de plantes (Bryophytes, *Ericaceae* et *Monotropaceae*). Ils ont en commun des pelotons d'hyphes cloisonnés à l'intérieur des cellules.

Les mycorhizes orchidoïdes sont également des champignons dont les hyphes se développent en pelotons à l'intérieur des cellules de racines, rhizomes et bulbes. Les champignons impliqués dans la différenciation de ces structures sont très proches des *Rhizogtonia* (Arditti, 1992) et appartiennent principalement à la famille des *Ceratobasidiaceae*, *Tulasnellaceae* et *Sebacinaceae*.

Les MVAs ne sont pas visibles à l'œil nu. Elles sont colorées suite à l'éclaircissement de la racine pour révéler deux structures typiques observées en microscopie photonique : les vésicules et les arbuscules. Les vésicules sont un lieu de stockage des lipides nécessaires au métabolisme du champignon alors que les arbuscules sont le lieu d'échanges entre les deux partenaires de la symbiose. Les MVAs ou mycorhizes à arbuscules (MA) impliquent généralement des champignons appartenant au phylum des Glomeromycota. Ils ne peuvent se développer sans la plante hôte. Les hyphes du champignon pénètrent à l'intérieur des cellules racinaires et forment des structures caractéristiques en forme d'arbuscules et de vésicules. Le champignon colonise l'intérieur des cellules du cortex en repoussant le plasmalemme sans le traverser.

Les MAs regroupent 86% des taxons végétaux (ex. arbres, arbustes, plantes annuelles) et sont universellement répandues dans tous les écosystèmes terrestres (Wang & Qiu, 2006). Les MAs et les ECMs sont les principaux types de mycorhizes des écosystèmes forestiers et cultivés (Bâ *et al.*, 2011). Elles se distinguent par leur structure et leur morphologie.

Les ECMs dériveraient des MA *via* des associations relictuelles où coexisteraient les deux types de symbiose (Brundrett, 2009). Les ECMs sont formées par des champignons dont le mycélium colonise la surface des cellules racinaires pour former un manteau fongique et pénètre entre les premières couches du cortex pour former le réseau de Hartig (Smith & Read, 2008). Cette symbiose est surtout localisée sous les latitudes tempérées et boréales, et concerne environ 90% des espèces d'arbres de ces régions (Smith & Read, 2008). Les champignons impliqués appartiennent soit au phylum des Ascomycota (ex. la truffe), soit au phylum des Basidiomycota (ex. cèpe, girolle, amanites). Les ECMs peuvent faciliter la croissance des plantes à travers l'échange des éléments nutritifs mais aussi par leur contribution dans la lutte contre les agents pathogènes (Whipps, 2004). En retour, le végétal fournit le carbone nécessaire sous forme de sucres issus de la photosynthèse, à son partenaire fongique hétérotrophe (Gagné, 2005).

A côté de ces deux grands groupes de symbioses mycorhiziennes (ECMs et MA), il existe un type de mycorhize intermédiaire, les ectendomycorhizes chez qui le champignon forme des pelotons intracellulaires et un manteau fin autour de la racine (Figure 1).

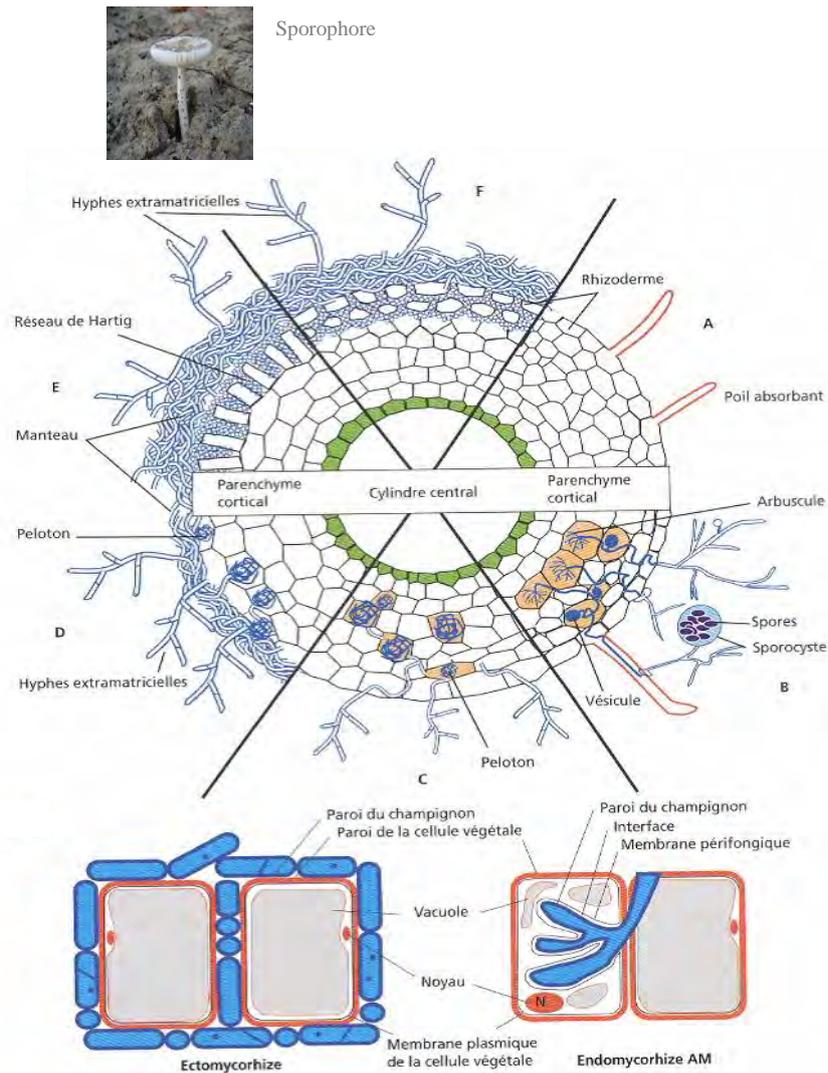


Figure 1: Schéma d'une coupe transversale montrant les principaux types d'associations symbiotiques entre des champignons (en bleu) du sol et des racines de végétaux. (A) racine sans mycorhize, (B) endomycorhizes à vésicules et à arbuscules, (C) endomycorhizes à pelotons, (D) ectendomycorhizes, (E) ectomycorhizes chez les angiospermes, (F) ectomycorhizes chez les gymnospermes (Duhoux & Nicole, 2004).

2. Symbiose ectomycorhizienne

2.1 Diversité des champignons ectomycorhiziens

La symbiose ectomycorhizienne concerne 3 à 5% des plantes vasculaires et se rencontre principalement chez les dicotylédones. Cette symbiose ectomycorhizienne entraîne d'importantes modifications dans la morphologie des racines : les poils absorbants disparaissent et un manteau d'hyphes ou manteau fongique entoure les racines nourricières. De ce manteau partent des hyphes qui s'insèrent entre les cellules corticales de la racine pour former le réseau de Hartig. Vers l'extérieur, des hyphes prolifèrent à partir du manteau fongique et colonisent le milieu environnant en formant le réseau extramatriciel (Smith & Read, 2008).

Les champignons ectomycorhiziens sont présents dans le sol sous forme de propagules de conservation et de dissémination (spores, fragments de mycorhizes, cordons mycéliens) (Bâ *et al.*, 2012).

C'est sous ces différentes formes que les champignons se maintiennent dans le sol à l'état de vie ralentie en période sèche notamment. Quand les conditions sont favorables, les propagules produisent des hyphes qui poussent et se ramifient pour donner un mycélium. Ce dernier est ainsi capable de coloniser le système racinaire de la plante pour former des ECMs. La germination des propagules marque le début du cycle de développement des Basidiomycota auxquels appartient la plupart des champignons ectomycorhiziens. Ce cycle se résume en deux phases principales : une phase végétative comprenant la formation et le développement du mycélium ou thalle à partir de la germination des spores, et une phase fructifère marquée par l'apparition de sporophores érigés ou hypogés, et la production de spores. Chez les champignons ectomycorhiziens, le sporophore est la partie visible de l'organisme que l'on appelle couramment « champignon ». Il est constitué de filaments ou d'hyphes groupés en amas ou mycélium. La présence de sporophores est associée automatiquement à la présence de mycélium à la base du pied, mais l'absence de sporophores ne signifie pas nécessairement l'absence de mycélium dans le sol. Le sporophore, constitué d'un chapeau et d'un pied, est un organe éphémère où se déroule la reproduction sexuée. Les champignons ectomycorhiziens sont des symbiotes obligatoires qui bouclent leur cycle de développement en fructifiant notamment grâce aux ECMs qu'ils contractent avec la plante hôte. La formation de sporophores requiert la présence d'ECMs. A l'inverse on peut observer des ECMs sans sporophores correspondants. En effet, des champignons comme *Thelephora* et *Cenococcum* forment des ECMs avec peu ou pas de fructifications et sont souvent dominants sur les racines de leurs plantes hôtes (Henkel *et al.*, 2002 ; Diédhiou *et al.*, 2004). La fructification des champignons est un processus complexe et coûteux en énergie pour la plante, qui dépend de l'espèce de champignon, de facteurs climatiques, de l'âge des peuplements et de traitements sylvicoles (fertilisation). La formation de sporophores, difficile à obtenir en conditions contrôlées, dépend du champignon impliqué, de la qualité du substrat, des conditions de culture (humidité, lumière, température) et de la production de métabolites par la plante hôte. *Hebeloma cylindrosporum* en symbiose avec *Pinus pinaster*, fructifie *in vitro* sur un milieu de culture approprié et dans des conditions de lumière et de température bien définies (Débaud & Gay, 1987). Dans les régions boréales et tempérées, de nombreuses communautés de champignons ectomycorhiziens ont été décrites sur la base d'inventaires de sporophores (Ferris *et al.*, 2000). On estime la diversité des champignons ectomycorhiziens entre 10000 et 15000 espèces (Smith & Read, 2008). Ce chiffre n'est pas exhaustif car il ne prend pas en compte la diversité encore peu connue des champignons des régions tropicales. Les champignons sont le plus souvent des Basidiomycota (Amanites, Bolets, Lactaires, Girolles, Russules) et plus rarement des Ascomycota (*Cenococcum*, Truffes). Certains d'entre eux sont comestibles et à forte valeur ajoutée (ex. Matsutake, Truffes).

2.2 Diversité des ectomycorhizes

L'inventaire des ECMs est aussi une approche qui permet d'accéder à la composition des communautés fongiques (Agerer, 1991). L'identification des ECMs reste cependant très aléatoire du fait qu'elle est basée sur des caractères morphologiques, anatomiques et histologiques. Elle repose notamment sur la couleur et la texture du manteau fongique et sur la présence ou non de cordon mycélien. La couleur du manteau peut changer en fonction de l'environnement ou de l'âge de la plante hôte (Thoen & Bâ, 1989 ; Diédhiou *et al.*, 2004). Les clés d'identification des ECMs proposées jusqu'ici se sont avérées dans l'ensemble insuffisantes pour identifier un champignon à partir d'une ECM à l'exception des ECMs typiques du genre *Cenococcum* (Agerer, 1991).

Les caractères macroscopiques et microscopiques des ECMs s'avèrent peu concluants pour remonter aux sporophores. Des champignons différents peuvent former des ECMs similaires sur le plan morphologique. De plus, un champignon peut former des ECMs dont la morphologie change selon l'hôte ou quelquefois en fonction de l'âge de l'hôte. L'abondance des sporophores ne donne pas assez d'informations sur la fréquence des ECMs. En effet, des champignons comme *Suillus* fructifient abondamment et forment peu d'ECMs. À l'inverse, les *Thelephora* forment jusqu'à 40 % des ECMs en fructifiant peu ou pas (Diédhiou *et al.*, 2010). Il est rarement possible d'observer des connexions entre le mycélium à la base du pied des sporophores et celui des ECMs (Thoen & Bâ, 1989 ; Rivière *et al.*, 2007). L'identification de la composante fongique doit être complétée par des méthodes de biologie moléculaire.

2.3 Caractérisation moléculaire de la diversité fongique

Les méthodes moléculaires permettant l'identification de la composante fongique de l'ECM, sont basées sur l'existence d'une variabilité génétique de l'ADNr au sein des espèces de champignons ectomycorhiziens. Différentes techniques de biologie moléculaire (PCR-RFLP, séquençage), basées sur l'analyse de l'ADNr, ont été développées ces dernières années pour étudier la diversité génétique des sporophores, identifier la composante fongique des ECMs et suivre la persistance des souches fongiques introduites en pépinière et en plantation (Gardes *et al.*, 1991 ; Rivière *et al.*, 2007 ; Sanon *et al.*, 2009). La technique PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Réaction en Chaîne par Polymérase) est utilisée pour amplifier différentes parties du génome en ayant pour cibles l'ADN total, l'ADNr nucléaire ou l'ADNr mitochondrial. L'ADN total est analysé par des techniques comme l'AFLP (« Amplified Fragment Length Polymorphism »), l'ISSR (« Inter Simple Sequence Repeat »), la RAPD (« Random Amplified Polymorphism DNA ») ou les microsatellites pour accéder au polymorphisme de larges portions d'ADN (Redecker *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2001). L'ADNr mitochondrial possède des entités qui sont en plusieurs copies indépendantes du génome nucléaire et utilisées pour des études sur la structuration des communautés de champignons. Le gène de la grande sous-unité de l'ARNr mitochondrial (« mtLSU rRNA ») en particulier le fragment d'environ 450 pb amplifié par les amorces ML5/ML6, est souvent utilisé en phylogénie des champignons ectomycorhiziens (Bruns *et al.*, 1998 ; Rivière *et al.*, 2007). Bien que cette région soit peu évolutive au niveau de l'espèce, elle permet néanmoins de différencier sans ambiguïté les familles voire les genres (p.ex. *Russula*, *Amanita*, *Cantharellus*, *Thelephora*, *Tricholoma*). De plus, il existe sur cette région une base de données de plus d'une centaine de séquences référencées dans NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi). L'ADNr nucléaire existe en plusieurs copies (50 à 100 copies par cellule) et se trouve donc déjà préamplifié dans les extraits d'ADN. Il comprend des régions codantes pour les ARNr (18S, 5.8S, 25S et 5S) très conservées au niveau spécifique et des espaceurs intergéniques, soit transcrit (ITS, « Internal Transcribed Spacer »), soit non transcrit (IGS, « Intergenic Spacer »), moins conservés évolutivement. L'espaceur transcrit ITS (ITS1 et ITS2) conjointement amplifié avec le gène 5.8S, est un bon marqueur spécifique, mais très rarement au sein de l'espèce. L'espaceur ITS, d'environ 600 à 1000 pb, est amplifié par des amorces universelles (ITS1/ITS4), spécifiques aux champignons (p.ex. ITS1f/ITS4) ou spécifiques au Basidiomycota (p.ex. ITS1f/ITS4b) (White *et al.*, 1990 ; Gardes *et al.*, 1991). L'amplification de l'ITS est souvent couplée à l'étude du polymorphisme de longueurs des fragments de restriction (RFLP) et son utilisation en identification repose sur le séquençage nucléotidique. Il existe une importante base de données sur les séquences des ITS des champignons dans NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et UNITE (<http://unite.ut.ee/>).

Actuellement, la plupart des études d'écologie et de taxonomie moléculaires sur les champignons ectomycorhiziens sont basées sur l'analyse des régions ITS (Tedersoo *et al.*, 2007 ; Sanon *et al.*, 2009).

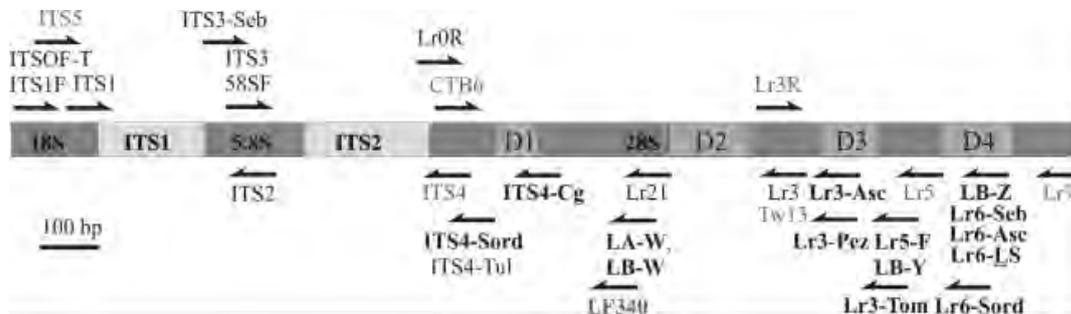


Figure 2 : Représentation schématique de l'ITS (ITS1, ITS2 et 5.8S) de l'unité répétée de l'ADN ribosomique chez les champignons. Les flèches représentent les sites de fixation des amorces les plus utilisées en écologie moléculaire des champignons (Tedersoo *et al.*, 2007).

3. Introduction des plantes et de leurs symbiotes fongiques

L'introduction de plantes exotiques remonte à l'antiquité avec les déplacements de l'homme pour des activités de chasse et de cueillette. L'introduction de nouvelles espèces végétales s'est énormément accentuée avec l'amélioration des moyens de transport (Jauzen, 1998). Ces introductions ont été soit involontaires ou fortuites (principalement liés au trafic international de marchandises) soit volontaires (du fait de leur valeur ornemental ou utilitaire : alimentaires, médicinales, fourragères etc.) (Di Castri, 1989).

L'introduction d'espèces végétales a été motivée par des finalités utilitaires. C'est ainsi que plusieurs espèces ont été introduites un peu partout dans le monde. En Afrique de l'Ouest et du centre, des espèces de pins (ex. *P. caribaea*) et d'*Eucalyptus* ont été introduites pour leur bois (ex. fabrication de pâte à papier, bois de chauffe). D'autres ont été également utilisées pour la restauration des sols dégradés ; on peut citer par exemple *Acacia mangium*, une des essences exotiques les plus plantées en Afrique de l'Ouest particulièrement en Côte d'Ivoire et en Guinée (Galiana *et al.*, 1996). Ces espèces d'intérêt à croissance rapide sont plantées depuis plusieurs années sur des milliers d'hectares par les services forestiers africains pour répondre à la demande en bois et préserver ainsi les forêts naturelles de la pression anthropique. Au Sénégal, les espèces comme *E. camaldulensis*, *C. equisetifolia* et *C. wifera* sont plantées le long du littoral pour la fixation des dunes mobiles et comme plante d'ornement.

Si les plantes exotiques sont souvent les bienvenues, certaines d'entre elles ne sont pas bénéfiques (perte de biodiversité, modification des écosystèmes...) (Lockwood *et al.*, 2007). L'introduction d'espèces dans un milieu entraîne un déséquilibre de l'écosystème naturel ; ainsi celles qui parviennent à s'adapter aux facteurs environnementaux de leurs nouveaux habitats et à se multiplier, peuvent devenir invasives. Selon l'évaluation des écosystèmes pour le millénaire (Millennium Ecosystem Assessment) publiée par les Nations Unies en 2005, les invasions biologiques sont considérées comme la deuxième cause d'érosion de la biodiversité à l'échelle mondiale, après la destruction et la dégradation des habitats naturels. C'est le cas du Mimosa d'hiver (*Acacia dealbata*) qui est originaire du sud-est de l'Australie et de Tasmanie ; il a été introduit en Angleterre en 1792 pour ses qualités ornementales (Casal *et al.*, 1985) et est cultivé depuis 1841 au Jardin des Plantes de Montpellier.

Cet arbre est actuellement cultivé pour son bois et ses fleurs qui sont utilisées en fleuristerie et en parfumerie. En zone introduite, il forme des peuplements denses qui entrent en compétition avec la flore indigène, émet des substances toxiques qui limitent la germination et la croissance racinaire de la végétation locale. Les colonies qu'il forme perturbent la dynamique naturelle de formations végétales littorales ou rivulaires (oueds thermo-méditerranéens à Laurier rose). Le système racinaire d'*Acacia dealbata* est superficiel et lorsqu'il s'installe le long des cours d'eau, il peut être déraciné lors des crues et conduire à la formation d'embâcles. Ce phénomène peut ensuite entraîner l'érosion des berges. De plus, cette espèce très inflammable, augmente les risques d'incendie (Carballeira & Reigosa, 1998).

Beaucoup de plantes dépendent de champignons mycorhiziens pour leur croissance et leur survie. Les champignons mycorhiziens sont particulièrement importants dans les écosystèmes pauvres en éléments nutritifs (Richardson *et al.*, 2000). Ces champignons peuvent être introduits accidentellement avec l'introduction d'essences d'arbres exotiques. En effet, les plantes peuvent être introduites avec leur associé fongique d'origine sous forme de propagules (ex. filaments mycéliens, hyphes, spore) dans le sol ou sous forme d'ECM au niveau des racines des plantes. Quelques introductions accidentelles de champignons ont été étudiées en Europe. Elles étaient causées principalement par l'introduction d'essences d'arbres exotiques comme le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) et le Mélèze (*Larix decidua*). Ces arbres ont été accompagnés hors de leur aire naturelle par des *Suillus* et certains *Rhizopogon* (Selosse, 1998).

La symbiose mycorhizienne est parfois indispensable pour la croissance de l'espèce en zone introduite. En effet, l'implantation de *P. caribaea*, dans de nombreuses régions en Afrique tropicale a échoué en raison de l'absence de champignons ectomycorhiziens (Pringle *et al.*, 2009). L'inoculation des propagules de champignons ectomycorhiziens a largement surmonté cet obstacle (Vellinga *et al.*, 2009), ce qui suggère que la symbiose est importante à l'établissement de cette espèce et pour sa croissance. Dans le domaine de la foresterie, de nombreux résultats expérimentaux ont montré que le développement normal des arbres était atteint lorsque la mycorhization est élevée et que l'efficacité de la symbiose en termes de bénéfice pour la plante hôte dépendait du champignon associé (Smith & Read, 2008). L'effet positif du champignon se manifeste principalement lorsque la fertilité du sol en phosphore est très faible. Cette carence permet une meilleure efficacité de l'apport volontaire de champignon mycorhizien qui procure ainsi un gain significatif de production pour la plantation. La mycorhization contrôlée est donc particulièrement adaptée aux opérations de réhabilitation de sols dégradés qui présentent généralement de fortes carences en éléments minéraux et plus particulièrement en phosphore assimilable. Au Sénégal, l'effet de la mycorhization d'*Acacia holosericea*, par des champignons ectomycorhiziens appartenant aux genres *Pisolithus* et *Scleroderma* a été étudié en conditions contrôlées et en conditions naturelles. Les résultats obtenus montrent que l'inoculation fongique stimule de manière efficace la croissance des plants en pépinière et plantation (Duponnois *et al.*, 2005, 2007).

Un champignon introduit dans un nouvel environnement est confronté au moins à l'un des processus suivants : transport, établissement, propagation et impact (Vellinga *et al.*, 2009) (Figure 3). Plusieurs paramètres intrinsèques (ex. viabilité des propagules) et extrinsèques (ex. perturbation du milieu) conditionnent la capacité du champignon introduit à s'établir et à persister dans son nouvel environnement.

Selon Lockwood *et al.* (2007), cinq scénarios sont envisageables quant au devenir des champignons introduits : (i) le champignon introduit avec sa plante hôte d'origine, ne s'établit pas, (ii) le champignon s'établit avec sa plante hôte d'origine mais est remplacé par des champignons natifs, (iii) le champignon persiste sur sa plante hôte d'origine mais ne colonise pas les plantes natives, (iv) le champignon persiste sur sa plante hôte d'origine et sur les plantes natives (v) le champignon persiste sur les plantes natives et non sur sa plante hôte d'origine.

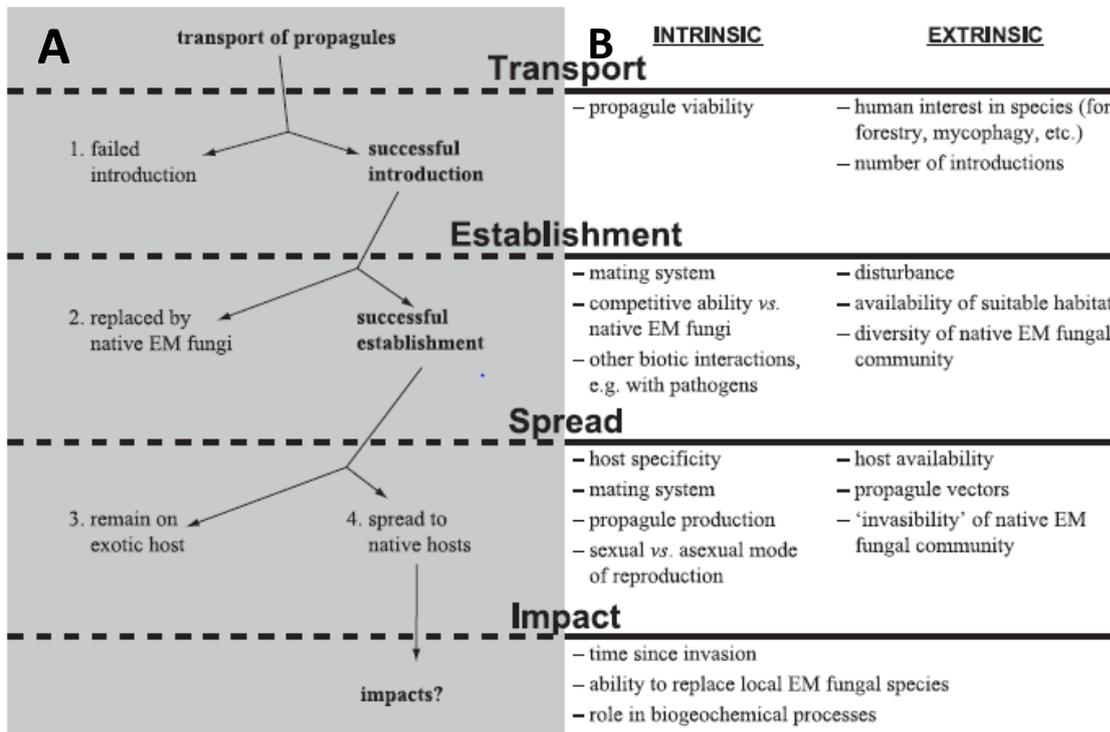


Figure 3 : Schéma conceptuel des processus (A) et mécanismes (B) intrinsèques et extrinsèques impliqués dans l'introduction des champignons ectomycorhiziens [Adaptée par Lockwood *et al.* (2007)]

4. *Coccoloba uvifera* (L.)

4.1 Classification et description botanique

C. uvifera, communément appelée « Raisinier bord de mer » ou « Seagrape » en anglais (*Coccoloba uvifera*) est une plante arborescente de la famille des Polygonaceae. Elle doit son nom « Raisinier bord de mer » à ses fructifications ressemblant à des grappes de raisins. C'est un arbre pouvant atteindre une dizaine de mètres de hauteur, mais présente généralement des dimensions plus réduites dans certaines zones exposées au vent en bordure de mer. Les branches de *C. uvifera* sont étalées ou tentaculaires et les racines ligneuses. Les tiges sont dressées ou étalées, glabres ou pubescentes distalement. Les feuilles, pouvant mesurer jusqu'à une vingtaine de centimètres de largeur, sont persistantes, caulinaires, alternées, pétiolées, ocrées souvent caduques, membraneuses à coriaces (Portecop et Petit Le Brun, 2003). Ces feuilles sont rondes à transversalement elliptiques et présentent une base cordiforme, de longueur équivalente ou inférieure à la largeur. Les fleurs de *C. uvifera* sont unisexuées; certaines plantes ont uniquement des fleurs mâles, et d'autres des fleurs femelles. Le périanthe est glabre, de couleur blanc ou blanc verdâtre, campanulé.

La floraison est étalée à la période de janvier à mai et les fruits arrivent en maturité en juillet-août. Les fruits (1 à 2 cm de diamètre) sont sphériques à ovoïdes et disposés en grappe. Ces fruits sont comestibles. Le fruit du Raisinier est une drupe. Il est formé de l'ensemble de sépales accrescents, épaissis et colorés ; à maturité, ils prennent une couleur rouge violacé (Figure 4).

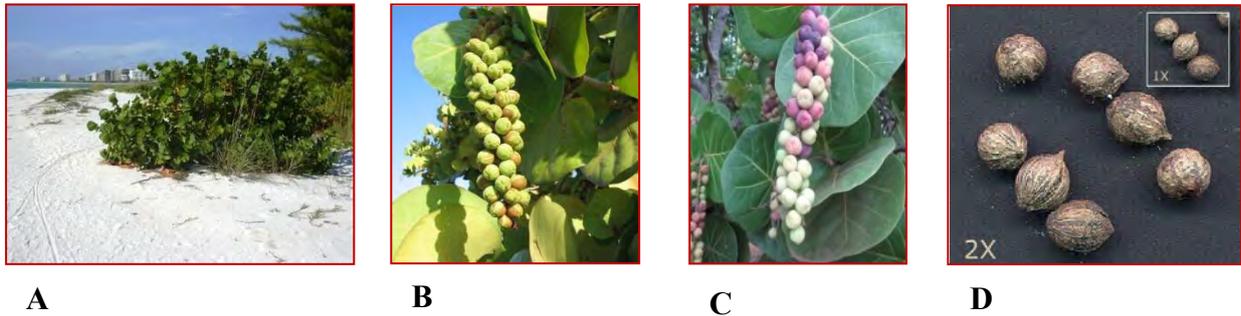


Figure 4 : *Coccoloba uvifera* (L.) en bordure de mer (A) ; Fruits verts immature (B) ; Fruits rouge violacés mature (C) ; Graines sèches (D).

4.2 Origine et répartition géographique

Le Raisinier bord de mer est un arbre originaire des Antilles, de la côte de l'Amérique Centrale, et de la côte nord-est de l'Amérique du Sud. Il s'étend vers le sud aussi loin que le nord du Pérou et du Brésil. *C. uvifera* occupe naturellement les cordons sableux des forêts littorales du bassin caribéen (Portecop & Petit Le brun, 2003) et est résistant au sel et aux embruns marins, mais ne tolère pas le gel, ce qui limite son extension vers le nord au niveau de la Floride. Il a été introduit dans des régions tropicales d'Asie, d'Australie et d'Afrique comme plante ornementale et plante antiérosive. Dans les tropiques, il est planté le long des rues, dans les régions côtières, comme protection contre le vent ou comme haie vive. Largement distribuée à l'échelle de la planète, le genre *Coccoloba* reste exclusivement néo-tropical et regroupe plus de 400 espèces (De Mélo, 2000). Les plus grandes diversités spécifiques à l'intérieur du genre ont été décrites en Amazonie avec 44 espèces recensées. Dans les Caraïbes, dix espèces de *Coccoloba* ont été répertoriées, parmi lesquels *Coccoloba uvifera*, l'espèce la plus connue.

4.3 Quelques usages de *Coccoloba uvifera*

Les fruits de *C. uvifera* sont comestibles et sont utilisés pour fabriquer des produits de gelé et du vin. Dans les îles du Nord de la Caraïbe, ils entrent dans la composition de certains rhums arrangés et nombreux sont les îliens qui les grignotent lorsqu'ils sont bien mûrs. On peut également en faire une confiture. La sève rouge obtenue en découpant l'écorce a été utilisée dans le commerce pour le tannage et la teinture. Le bois est utilisé comme bois de feu ou pour la fabrication du charbon de bois. Le bois rouge veiné est aussi apprécié en ébénisterie (Perrotta, 1994). En pharmacopée traditionnelle, un extrait aux propriétés astreignantes est obtenu par décoction de feuille et d'écorce et est commercialisé. La décoction de feuille et d'écorce est indiquée pour traiter la dysenterie (Portecop & Petit Le Brun, 2003). Il est utilisé comme plante d'ornement dans les jardins publics en ville, en bordure des routes, on le retrouve également dans les concessions familiales, dans l'aménagement du littoral notamment pour la lutte contre l'érosion côtière et comme brise-vent pour fixer les dunes mobiles. Il protège également la ponte des tortues marines dans le Golfe du Mexique, aux Antilles, en Afrique et en Océanie (Moreno-Casasola & Espejel, 1986 ; Tuxbury & Salmon, 2005).

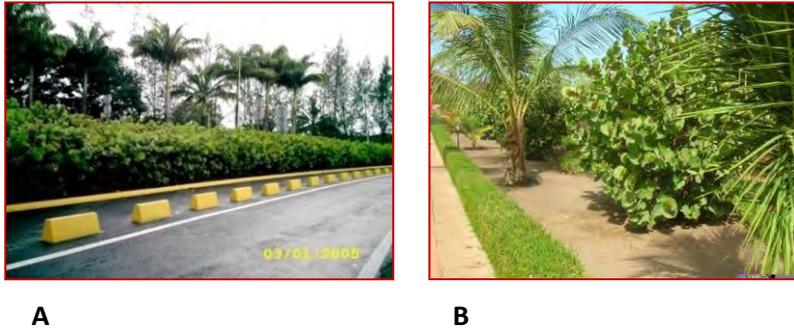


Figure 5 : Plantations ornementales de *C. uvifera* en bordure de route (A) en Guadeloupe (France) et dans des sites touristiques (B) à Saly (Sénégal).

4.4. Les champignons associés à *Coccoloba uvifera*

La diversité morphologique et génétique des champignons ectomycorhiziens et des ectomycorhizes associées à *C. uvifera* a été étudiée en Guadeloupe et au Sénégal. Huit espèces; *Amanita arenicola*, *Inocybe littoralis*, *Inocybe xerophytica*, *Cantharellus cinnabarinus*, *Russula cremeolilacina*, *Scleroderma bermudense*, et deux espèces de Thelephoraceae qui ne forment pas de sporophores ont été répertoriés en Guadeloupe (Avril, 2009) (Figure 6). Au Sénégal, *Scleroderma bermudense* serait le seul symbiote fongique qui forme des ECMs et fructifie sous *C. uvifera* (Sène, 2010). Cependant, il ne fructifie pas au voisinage de deux arbres à ECMs, *C. equisetifolia* et *E. camaldulensis*, qui poussent pourtant à proximité des plantations de *C. uvifera*. Les champignons ectomycorhiziens de *C. equisetifolia* et *E. camaldulensis* ne seraient également pas compatibles avec *C. uvifera* (Sène, 2010). *S. bermudense* serait spécifique de *C. uvifera* en zone d'introduction.



Figure 6 : Diversité de champignons ectomycorhiziens identifiés des sporophores et ECMs de *C. uvifera* en Guadeloupe (Avril, 2009).

Chapitre 2 : **MATERIELS ET METHODES**

1. Sites d'échantillonnage des graines et sols

Des graines de *Coccoloba uvifera* ont été échantillonnées en Guadeloupe dans trois sites : Bois Jolan (16°14'09.0" N, 61°21'08.6" W), Deshaies (16°21'12.5" N, 61°45'14.2" W) et Viard (16°10'01.4" N, 61°35'06.9" W). Les graines ont été ramassées sous le houppier de *C. uvifera* en janvier 2012 pendant la saison des pluies. Elles ont été ensachées, transportées et conservées à 4°C en laboratoire.

Des sols rhizosphériques ont été également échantillonnés au même endroit dans les trois sites de Guadeloupe. Ils ont été ensachés, transportés et conservés à 4°C en laboratoire. Ils ont servi d'inoculum dans des expériences de piégeage.

En zone d'introduction (Sénégal), des sols rhizosphériques ont été prélevés sous des *C. uvifera* adultes dans deux sites : Potou et Dakar. Ils ont été ensachés, transportés et conservés à 4°C en laboratoire. Les sols ont servi d'inoculum dans des expériences de piégeage.

2. Graines de *C. uvifera*

2.1 Observation des spores en microscopie électronique à balayage (MEB)

L'observation des spores sur les graines a été réalisée au Laboratoire de Physique de l'UAG en Guadeloupe. Des graines des trois sites ont été cassées et leurs téguments observés en MEB. Deux types d'échantillons ont été analysés : des morceaux de tégument et des spores d'un sporophore du champignon *S. bermudense*. Les échantillons ont été recouverts d'une couche d'or, grâce au métalliseur ("sputter coater" en anglais) BIO RAD Microscience division, SC 500 et observés en mode High Vac (vide important de l'ordre de 6×10^{-4} Pa). Les clichés de MEB ont été acquis en mode électrons secondaires à l'aide du détecteur Everhart-Thornley, donnant un contraste de topographie de la surface de l'échantillon. La tension d'accélération des électrons a été de 10 kV. L'appareil utilisé est un Quanta Scanning Electron Microscope 250.

2.2 Observation de spores en microscopie optique (MO)

Pour chacune des trois provenances de *C. uvifera* (Deshaies, Viard et Bois Jolan), les téguments de dix graines de *C. uvifera* ont été soigneusement grattés avec un scalpel stérilisé. Les grattures (1,39 g en poids frais) ont été mises en solution dans 100 ml d'eau ultrapure stérile sous la hotte. Les solutions ainsi obtenues ont été conservés en chambre froide à 6°C jusqu'à leur utilisation. Une partie de la solution a été montée entre lame et lamelle puis observée en MO. L'autre partie de la solution a été utilisée comme inoculum.

2.3 Viabilité des spores de *S. bermudense*

La viabilité des spores sur les graines et dans les grattures de téguments de graines a été évaluée (Figure 7). Pour cela, 100 graines non traitées de chaque provenance ont été semées dans un germoir sur du sol stérilisé de Sangalkam. Quatre traitements (10 répétitions par traitement) ont été comparés : graines de Viard non traitées, graines de Deshaies non traitées, graines de Bois Jolan non traitées et graines de Viard scarifiées pendant 2 h avec H₂SO₄ (95%), rincées à l'eau déminéralisée stérile et mises à germer (témoin négatif).

Parallèlement, des graines pré-germées de *C. wifera* (provenance Bel Air, Dakar) scarifiées comme précédemment ont été cultivées dans des sachets en plastique contenant 1kg de sol stérilisé de Sangalkam et inoculées avec 10 ml de grattures de graines en solution de chaque provenance. Quatre traitements (07 répétitions par traitement) ont été ainsi comparés : (i) grattures des graines de Viard, (ii) grattures des graines de Deshaies, (iii) grattures des graines de Bois Jolan, (iv) suspension de 1 mg de spores d'un sporophore de *S. bermudense* (témoin positif), (v) solution sans gratture (témoin négatif). Les différents traitements ont été mis en culture en serre et des observations (taux de mycorhization) réalisées une fois par mois pendant 5 mois. Les ECMs récoltées ont été morphotypées et séquencées.

Les caractéristiques physico-chimiques du sol de Sangalkam sont en annexe.

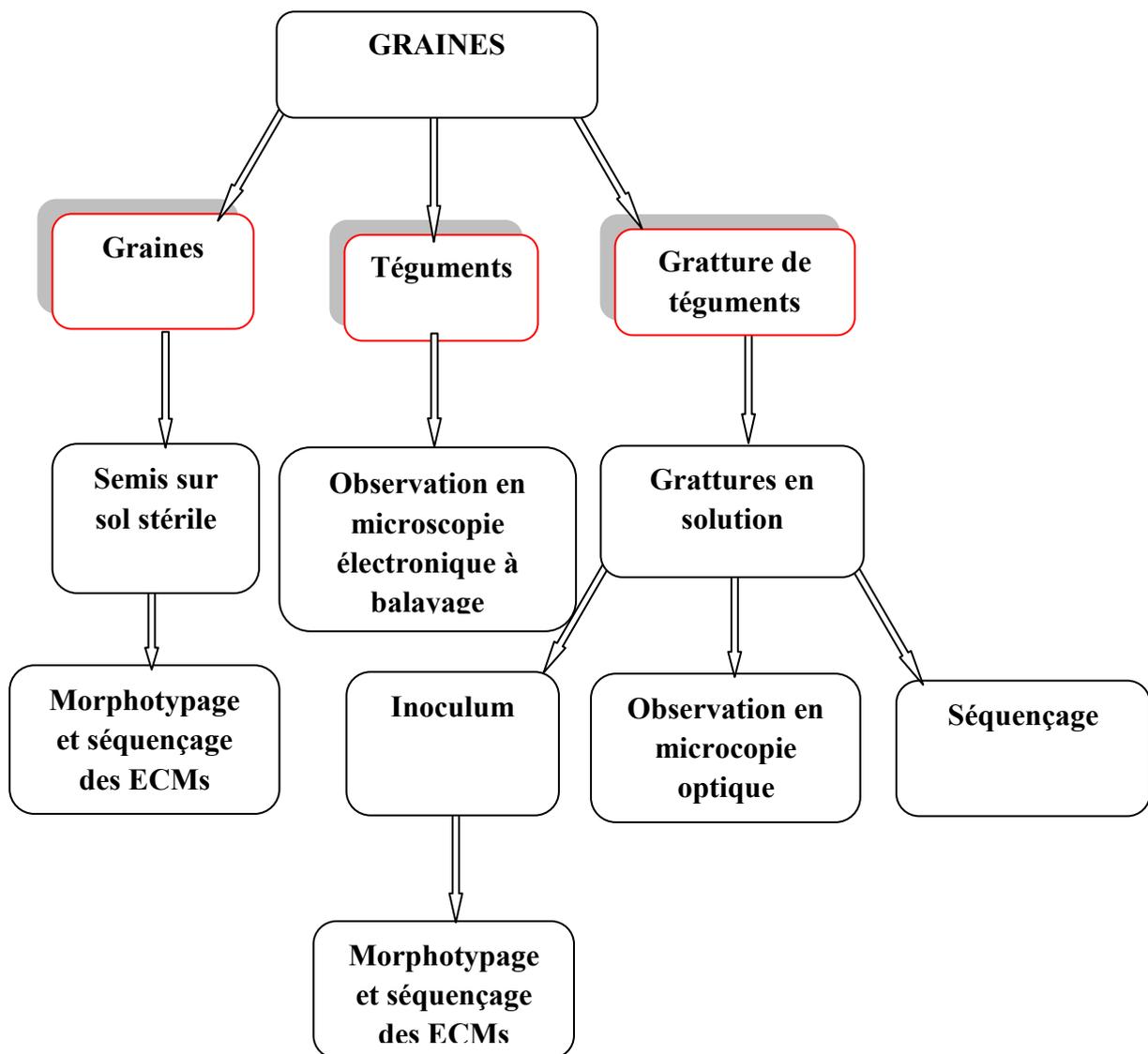


Figure 7 : Schéma récapitulatif des expériences réalisées avec des graines de trois provenances de *Cocoloba wifera* (Guadeloupe).

3. Diversité des champignons ectomycorhiziens des sols d'origine versus sols d'introduction

3.1 Diversité des champignons ectomycorhiziens des sols d'origine

Des graines pré-germées de *C. uvifera* (provenance Bel Air, Dakar) scarifiées comme précédemment ont été cultivées dans des sachets en plastique contenant 1 kg de sol stérilisé de Sangalkam et inoculées avec 10 g (en poids frais par sachet) de sol (tamisé à 2 mm) provenant des trois sites de Guadeloupe. Quatre traitements (07 répétitions par traitement) ont été ainsi comparés : (i) *Coccoloba* inoculée avec du sol de Viard, (ii) *Coccoloba* inoculée avec du sol de Deshaies, (iii) *Coccoloba* inoculée avec du sol de Bois Jolan (iv) *Coccoloba* non inoculée (témoin négatif). Les cultures ont été maintenues en serre et une récolte suivie d'une observation des racines a été effectuée une fois par mois pendant 5 à 6 mois.

3.2 Diversité et spécificité d'hôtes des champignons ectomycorhiziens des sols d'introduction

Des graines pré-germées de *C. uvifera* (provenance Bel Air, Dakar), de *C. equisetifolia* et d'*E. camaldulensis* ont été cultivées séparément dans des sachets en plastique contenant 1 kg des sols provenant de deux sites (Potou, Dakar) d'introduction des trois espèces au Sénégal. Ces sols ont été prélevés dans la rhizosphère de trois individus de chaque espèce, tamisés (2 mm) et mélangés par espèce pour servir d'inoculum. Neuf traitements (07 répétitions par traitement) ont été comparés : (i) *Coccoloba* cultivé sur sol *Coccoloba*, (ii) *Coccoloba* cultivé sur sol *Eucalyptus*, (iii) *Coccoloba* cultivé sur sol *Casuarina*, (iv) *Eucalyptus* cultivé sur sol *Coccoloba*, (v) *Eucalyptus* cultivé sur sol *Casuarina*, (vi) *Eucalyptus* cultivé sur sol *Eucalyptus*, (vii) *Casuarina* cultivé sur sol *Coccoloba*, (viii) *Casuarina* cultivé sur sol *Casuarina*, (ix) *Casuarina* cultivé sur sol *Eucalyptus*.



Figure 8 : Plants de *C. uvifera*, d'*E. camaldulensis* et de *C. equisetifolia* cultivés en serre sur du sol prélevé sous *C. uvifera* à Potou (Sénégal).

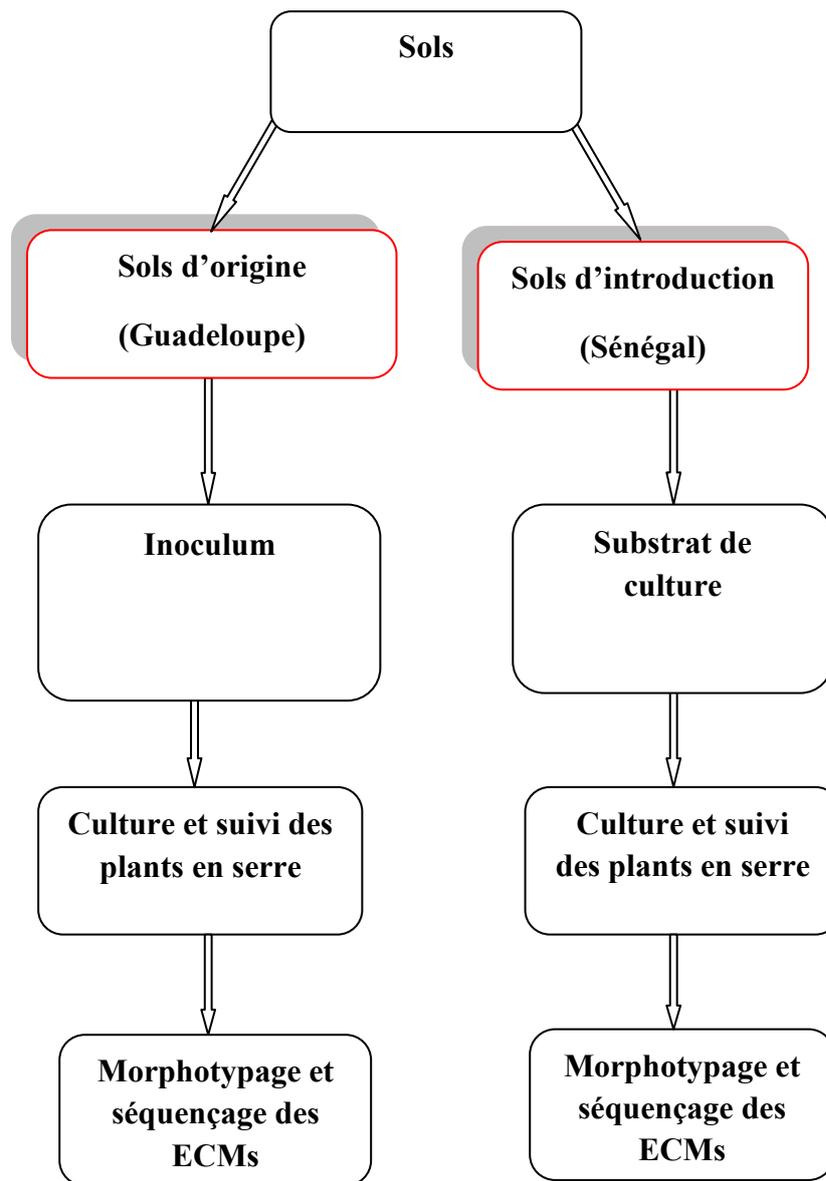


Figure 9 : Schéma récapitulatif des expériences réalisées avec des sols prélevés sous *Coccoloba uvifera* dans des sites en zones d'origine (Guadeloupe) et d'introduction (Sénégal).

4. Morphotypage et conservation des ECMs

Pour chaque récolte, le système racinaire de chaque plant a été soigneusement débarrassé de sa motte de terre à l'eau courante. Les racines latérales de chaque plant ont été séparées du pivot et observées dans de l'eau sous la loupe binoculaire et au microscope optique. Les morphotypes ectomycorhiziens ont été différenciés par des caractères macroscopiques et microscopiques : couleur et texture du manteau fongique, présence d'anses d'anastomoses, de cordons mycéliens et de sclérotés. Dix racines latérales sont prélevées du pivot de chaque plant et les apex mycorhizés ou non sont comptés (au moins 100 apex). Les morphotypes sont conservés dans des tubes Eppendorff de 1,5 ml contenant du CTAB 2x (Annexe) jusqu'à leur utilisation pour des analyses moléculaires.

5. Caractérisation moléculaire des champignons ectomycorhiziens

5.1 Extraction de l'ADN total

L'extraction d'ADN des ECMs s'est faite à l'aide du kit d'extraction d'ADN Dneasy de QIAGEN dans les conditions décrites par le fournisseur (Annexe).

5.2 Amplification de l'ITS par la réaction de polymérase en chaîne (PCR)

L'amplification a été réalisée dans un micro tube PCR de 0,2 ml avec un volume réactionnel de 25 µl. Le mélange réactionnel comprend : 2,5 µl de chaque amorce (10 mM) ITS_{1F} et ITS₄, 3 µl d'ADN, 18 µl d'eau ultra pure et des billes lyophilisées de « Taq Ready-To-Go » fabriquées par Amersham Pharmacia Biotech. Chacune des billes lyophilisées contient 2,5 unité de Taq ADN polymérase, 10 Mm Tris-HCL (pH 9,0 à température ambiante), 50 Mm KCL, 1,5 Mm MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP (dATP, dGTP, dTTP et dCTP) et des stabilisateurs BSA (Bovine Serum Albumin) pour une plus grande efficacité de la PCR. Chaque série d'amplification comprend un témoin négatif sans ADN (on remplace le volume de l'ADN par un volume égal d'eau ultra pure) ; ceci permet de détecter d'éventuels contaminants dans l'eau, les tampons ou les réactifs. Les séquences nucléotidiques du couple d'amorce utilisé pour l'amplification de l'ITS sont définies ci-après : ITS_{1F} (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') ; ITS₄ (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'). L'amplification de la région de l'ITS par la PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) selon un programme (Annexe).

5.3 Contrôle de l'amplification

Le contrôle a été fait par électrophorèse sur gel d'agarose (BIO-RAD) à 1 % dans un tampon de migration tris borate (Annexe). Pour cela 3 µl d'amplifiat ont été additionnés à 3 µl de bleu de charge (Annexe) et déposés dans un puits du gel. Un volume de 3 µl de marqueur de taille moléculaire 100Pb (SIGMA) est additionné à 3 µl de bleu de charge, et le mélange est déposé dans un puits pour déterminer la taille des fragments d'ADN amplifiés. La migration a été réalisée dans une petite cuve d'électrophorèse (Embi Tec) à 100 volts pendant 30 mn. Cette technique repose sur la migration et la séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille grâce à un courant électrique. La vitesse de migration des fragments d'ADN est proportionnelle à leur taille, les fragments les plus petits migrent plus vite que les fragments de grandes tailles. L'ADN étant chargé négativement va se déplacer du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode) sous l'effet du courant électrique. Le gel a été ensuite coloré pendant 15 mn dans une solution de bromure d'éthidium (BET 0.1 µl/ml), puis rincé pendant 20 mn dans de l'eau déminéralisée. Les produits d'amplification ont été visualisés sous une lumière UV par la fluorescence du BET qui s'intercale entre les bases de l'ADN, et photographiés avec un Gel Doc 1000 (Major Science). Les échantillons amplifiés ont été choisis pour être digérés avec des enzymes de restrictions.

5.4 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ITS

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RLFP) consiste à digérer des produits PCR avec des enzymes de restriction (endonucléases). En utilisant les enzymes *Msp* I et *Hae* III (Amersham Pharmacia Biotec) reconnaissant spécifiquement les sites (5'-C/CGG-3') et (5'-GG/CC-3') respectivement et suivant l'intensité des bandes obtenus lors du contrôle de la PCR, des aliquotes de 8 à 12 µl d'amplifiat ont été digérés. Le volume du mélange réactionnel est de 20µl et comprend : 8 à 12 µl de produit PCR, 1 µl de l'enzyme de restriction (10 unités) pour 2 µl du tampon de l'enzyme (10X) et 9 à 5 µl d'eau ultra pure.

Le mélange réactionnel obtenu a été mis à incuber à 37° C dans l'étuve pendant trois heures. La totalité de la digestion, additionnée à 6 µl de bleu de charge, est déposée dans un puits d'un gel horizontal d'agarose de 2%. Le marqueur de taille moléculaire (100 pb) est déposé en même temps que les produits de digestion pour apprécier la taille de ces derniers. La migration des fragments a été réalisée sous une tension 100 volts pendant trois heures. Le gel a été coloré au BET et les profils visualisés selon le protocole utilisé pour le contrôle de l'amplification sont comparés aux profils obtenus à partir de la souche de référence de *C. uvifera*.

5.5 Purification des produits d'amplification de l'ITS pour le séquençage

La purification a été réalisée selon les recommandations du fournisseur (annexe). L'ADN purifié a été quantifié avec un spectrophotomètre GeneQuant 1300.

5.6 Analyse des séquences

La correction des séquences brutes a été réalisée avec le logiciel Chromas Lite 2.01. Les séquences (fronts et reverses) ont été alignées avec le logiciel ClustalX ver.2.0.10 pour obtenir des séquences consensus. Un blast a été effectué sur chaque séquence pour les comparer avec des séquences de référence dans la base de données de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les séquences consensus obtenus ont été alignées en utilisant le logiciel BioEdit ver 3.3.19.0, puis l'alignement est optimisé manuellement pour la construction d'arbres phylogénétiques.

La reconstruction phylogénétique a été faite avec le logiciel Mega5 et la mise en forme avec le logiciel FigTree ver.1.3.1.

6. Analyse statistique

Les valeurs de taux de mycorhization ont été transformées avec la fonction arcsin \sqrt{x} pour normaliser les distributions obtenues, analysées avec le logiciel XLSTAT 6.1.9 et comparées à l'aide du test de Tukey ($p \leq 5\%$).

Chapitre 3 : **RESULTATS ET DISCUSSION**

1. Graines de *C. uvifera*

1.1. Observation des spores sur les graines

L'observation en microscopie optique des grattures de téguments de trois provenances de graines (Viard, Deshaies et Bois Jolan) a montré la présence de spores (Figure 10 C). L'observation des graines en microscopie électronique à balayage a également montré la présence de spores dans les cavités des téguments (Figures 10 A et B). Ces spores de texture homogène ont été morphologiquement très proches des spores de *S. bermudense* (Bandou, 2006).

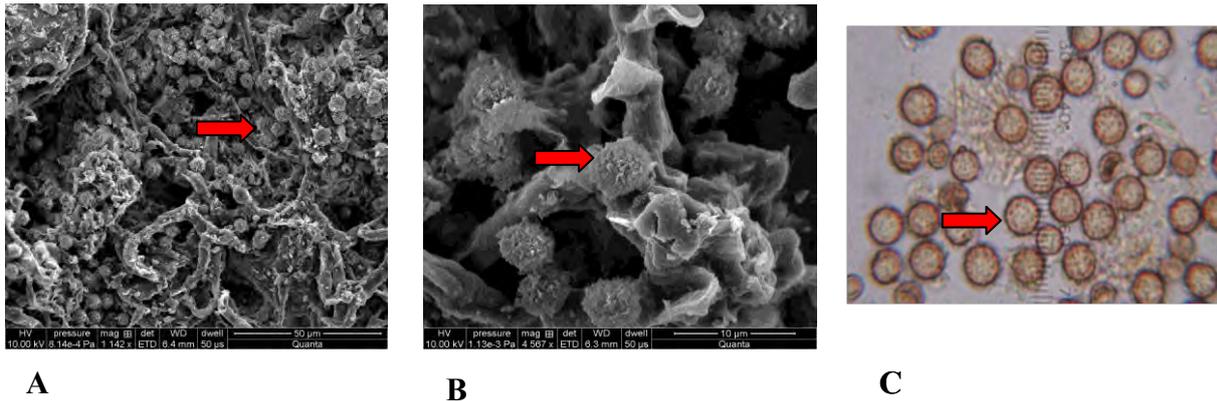


Figure 10 : Spores dans des cavités du tégument des graines de *C. uvifera* (provenance Bois Jolan) observé au microscope électronique à balayage (A) (Gr. x 1142) ; (B) Gr. x 4567) et au microscope optique (C) (Gr. x 200).

1.2. Viabilité des spores

Pour évaluer la viabilité des spores observées précédemment, des graines de 3 provenances de *C. uvifera* ont été semées séparément dans un germeoir contenant du sol stérile de Sangalkam en serre pendant 6 mois. Quatre mois après le semis, des ECMs blanc brillant ont été observées sur les racines des 3 provenances de *C. uvifera* dans des proportions comparables (Figure 11). On note, cependant, qu'au bout de 6 mois les fréquences du MT blanc brillant ont été plus importantes sur les jeunes plants provenant de Viard. Les ECMs blanc brillant obtenues ont été morphologiquement comparables à celles de *S. bermudense* (Sène, 2010). Les jeunes plants issus de graines préalablement scarifiées, servant de témoin négatif, ont été exempts d'ECMs.

Des ECMs blanc brillant ont été obtenues sur des jeunes plants de *C. uvifera* inoculés séparément avec une suspension de grattures de téguments des 3 provenances de graines. Les fréquences du MT blanc brillant ont varié selon l'origine des grattures et en fonction du temps (Figure 12). Au bout de 5 mois, les fréquences ont été à peu près les mêmes sauf avec la suspension sporale de *S. bermudense* (témoin positif). Les ECMs blanc brillant obtenues des grattures ont été morphologiquement comparables à celles des téguments de graines et de la suspension sporale de *S. bermudense*. Les spores des graines et des grattures de tégument de graines seraient donc des spores de *S. bermudense*.

Ces résultats suggèrent que des spores viables ont été présentes dans les téguments des graines de *C. uvifera* transportées en zone d'introduction. Le champignon ectomycorhizien *S. bermudense* aurait été donc introduit *via* les graines de *C. uvifera*.

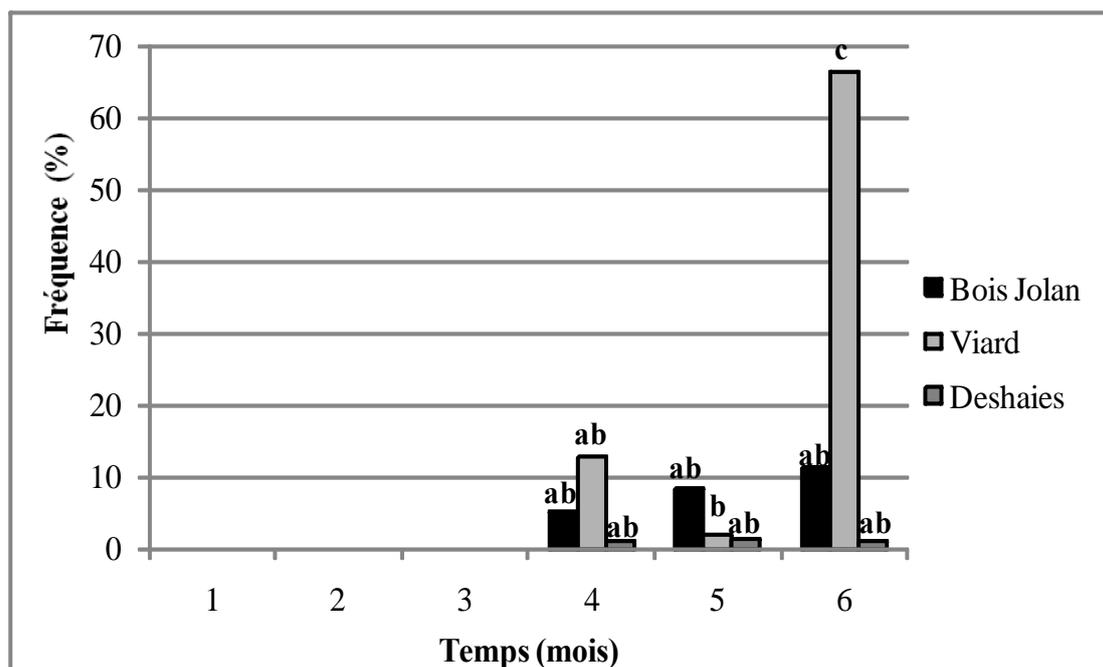


Figure 11: Fréquence du MT blanc brillant de 3 provenances de graines de *C. wifera* (Viard, Deshaies et Bois Jolan) dont les téguments présentent des spores. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 5\%$).

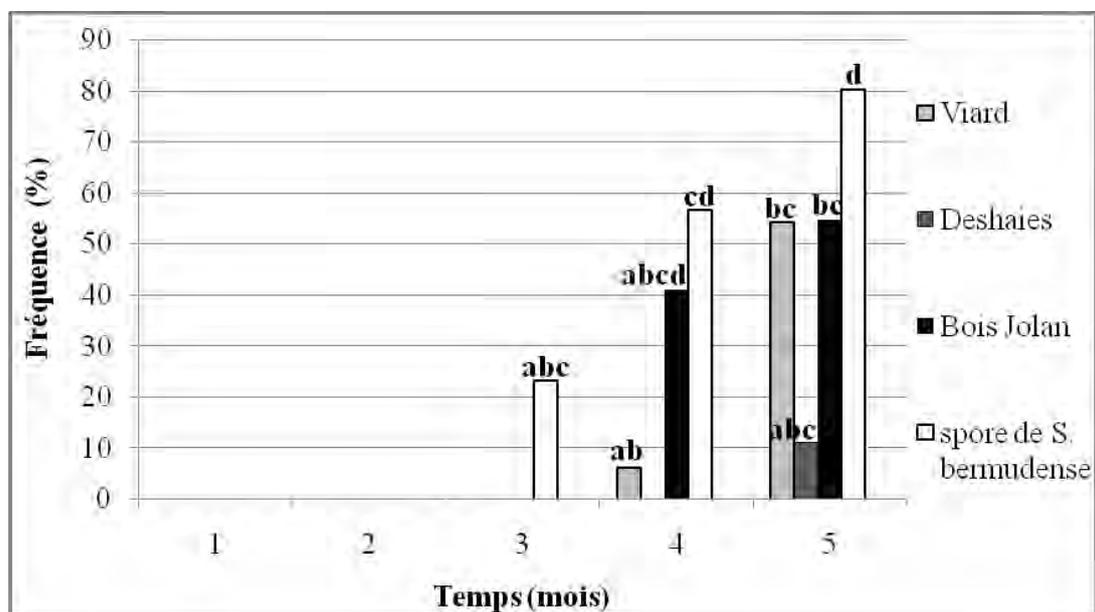


Figure 12 : Fréquence du MT blanc brillant de 3 provenances de *C. wifera* (Viard, Deshaies et Bois Jolan) inoculées avec des grattures de téguments de graines renfermant des spores. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 5\%$).

2. Diversité des champignons ectomycorhiziens des sols d'origine *versus* sols d'introduction

En utilisant les 3 sols d'origine comme inoculum, deux morphotypes (MT) ont été observés sur les racines des jeunes plants de *C. uvifera* dans des proportions comparables en zone d'introduction : le MT blanc brillant (BB) et le MT brun foncé poilu (BFP) (Figure 14). Par contre, seul apparaît le MT blanc brillant sur les plants de *C. uvifera* cultivés dans les 2 sols d'introduction (Figure 15 et 16). Ces résultats suggèrent une diversité de MT (au moins 2 MT) dans les 3 sols d'origine alors que le MT BB était le seul MT présent sur *C. uvifera* dans les 2 sols d'introduction. L'hypothèse que des immigrants auraient introduit des jeunes plants poussant en pot sur des sols d'origine pourvus en propagules apparaît peu probable. En effet, si des plants de *C. uvifera* avaient été introduits en pot avec du sol d'origine pourvu en propagules, on aurait observé en plus du MT BB, le MT BFP dans les sites d'introduction. Or dans les 2 sites d'introduction, nous n'avons observé que des MTs BB. Ces résultats confirment ceux obtenus par Séné (2010) dans les sites de Mbour et de Potou. En effet, seul des MTs BB ont été observés dans ces deux sites (Potou et Mbour) aussi bien sur des arbres matures de *C. uvifera* que sur des jeunes plants en régénération. En plus, les MTs blanc brillant ont été reliées aux sporophores de *S. bermudense* dans ces sites d'introduction de *C. uvifera* (Sène, 2010).

En zone d'origine, *C. uvifera* est associée à une diversité de 8 espèces de champignon dont *S. bermudense* (Avril, 2009). Deux (Thelephorales) de ces 8 espèces ne fructifient pas alors que les 6 autres espèces (*Russula cremeolilacina*, *Amanita arenicola*, *Scleroderma bermudense*, *Cantharellus cinabarinus*, *Inocybe littoralis*, *Inocybe xerophytica*) produisent des fructifications. Les russules, chanterelles et amanites, champignons souvent dominants dans les forêts, sont réputés produire peu de spores avec un pouvoir germinatif très faible (5%) même en présence de la plante hôte (Nara, 2009). Les *Inocybe*, champignons pionniers, produisent peu de spores avec un pouvoir germinatif relativement élevé (60%) en présence de la plante hôte. Les sclérodermes qui fructifient abondamment en situation de stress, ont, cependant, un pouvoir germinatif relativement faible (7%) en présence de l'hôte (Nara, 2009). Pourtant, parmi les 8 espèces fongiques, *S. bermudense* est le seul symbiote d'origine co-introduit avec *C. uvifera* au Sénégal. On pourrait penser que le nombre de spores produit par *S. bermudense* lui conférerait un avantage comparatif par rapport aux autres champignons. Les spores de *S. bermudense* se seraient disséminées en masse sur les graines de *C. uvifera* à même le sol par le vent et/ou par des jeunes mammifères. Le transport des graines et donc des spores aurait permis l'introduction de *S. bermudense* avec sa plante hôte selon le schéma hypothétique proposé ci-après (Figure 13).

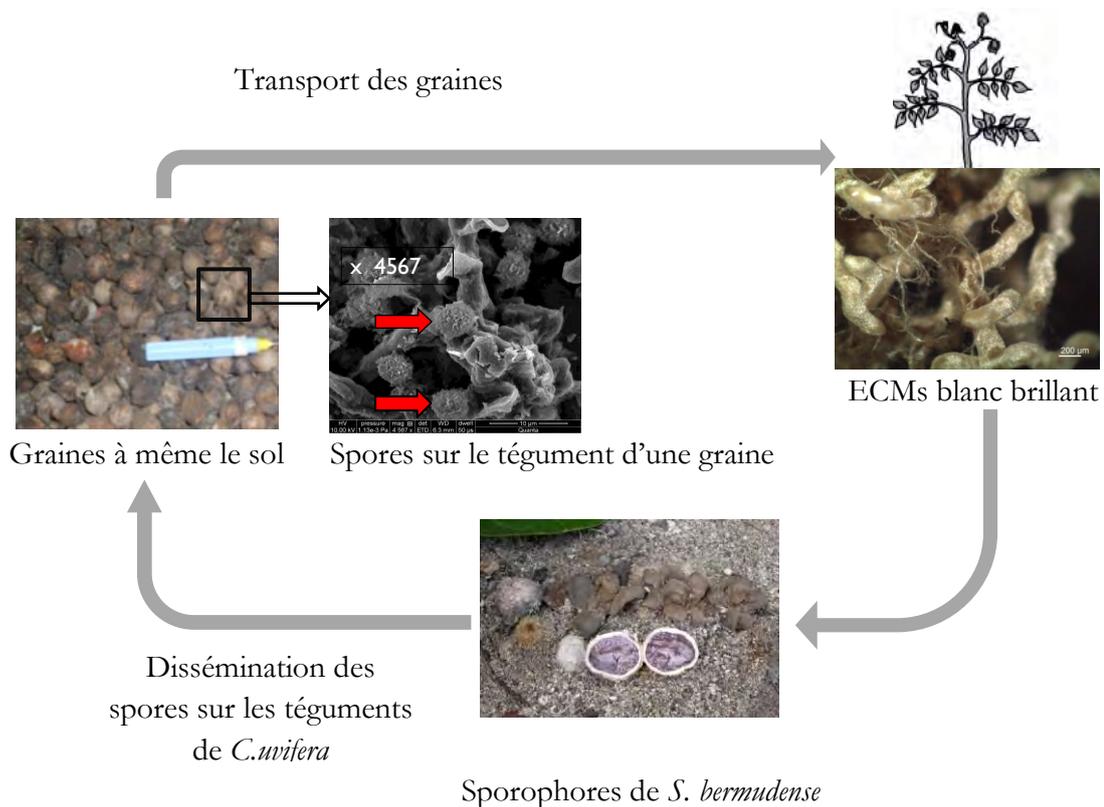


Figure 13 : Schéma hypothétique de la transmission verticale de l'infection ectomycorhizienne de *C. uvifera* par *S. bermudense*.

3. Etude de la spécificité d'hôte de *S. bermudense*

C. uvifera et son symbiote *S. bermudense* ont été introduits à proximité des plantations de *C. equisetifolia* et d'*E. camaldulensis* en bordure du littoral au Sénégal. La question posée était de savoir si *C. uvifera* était capable de contracter des ECMs avec des souches fongiques de ces deux arbres et si ces derniers contractent des ECMs avec *S. bermudense*. Des ECMs blanc brillant ont été observées sur *C. uvifera* cultivée sur des sols prélevés dans la rhizosphère de *C. uvifera*, d'*E. camaldulensis*, ou de *C. equisetifolia* dans les 2 sites (Dakar et Potou) d'introduction. Par contre, aucun champignon ectomycorhizien n'avait colonisé *E. camaldulensis* et *C. equisetifolia*. Cela suggère que *S. bermudense* est le symbiote ectomycorhizien présent sur les racines de *C. uvifera* et absent des racines d'*E. camaldulensis* et de *C. equisetifolia*. En plus, *S. bermudense* n'avait fructifié qu'au voisinage de *C. uvifera* mais ses spores s'étaient disséminées à quelques mètres (3 à 10 m) dans la rhizosphère d'*E. camaldulensis* et de *C. equisetifolia* sans coloniser leurs racines. Pourtant, dans le sol de Potou, Sène (2010) avait identifié sur des jeunes plants d'*E. camaldulensis* âgés de trois mois un morphotype blanc matte différent du MT blanc brillant. Au Sénégal, *E. camaldulensis* a été trouvée en symbiose avec *Pisolithus* sp, *S. verrucosum*, *Phlebopus sudanicus* et *S. capense* alors que *C. equisetifolia* a été trouvé en symbiose avec *Pisolithus* sp. et *Phlebopus sudanicus* au Sénégal (Bâ *et al.*, 2011). Tout compte fait, *S. bermudense* serait spécifique de *C. uvifera* et aurait une capacité de dissémination limitée à sa plante hôte. Il y aurait au moins 200 espèces de champignons ectomycorhiziens introduits (Vellinga *et al.*, 2009). La majorité des champignons introduits sont associés aux eucalyptus et pins dans l'hémisphère Sud. Plusieurs de ces champignons restent inféodés à leurs plantes hôtes comme dans le cas de la symbiose *C. uvifera*/*S. bermudense*.

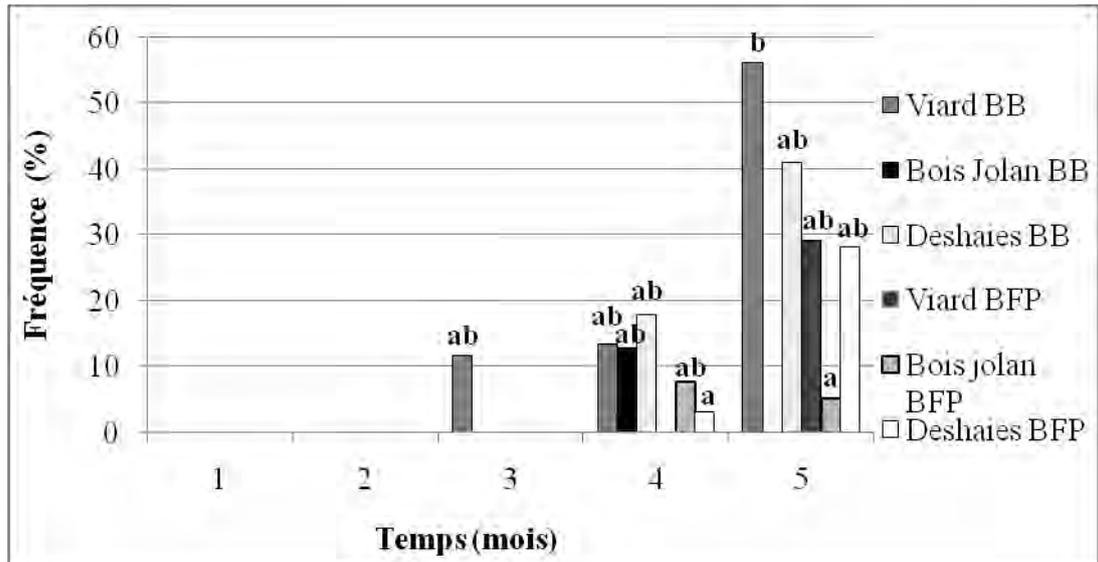


Figure 14 : Fréquence du MT blanc brillant et du MT brun foncé poilu de *C. wifera* inoculée avec du sol provenant de Viard, Deshaies ou Bois Jolan (Guadeloupe). Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 5\%$). BB=Morphotype blanc brillant ; BFP=Morphotype brun foncé poilu.

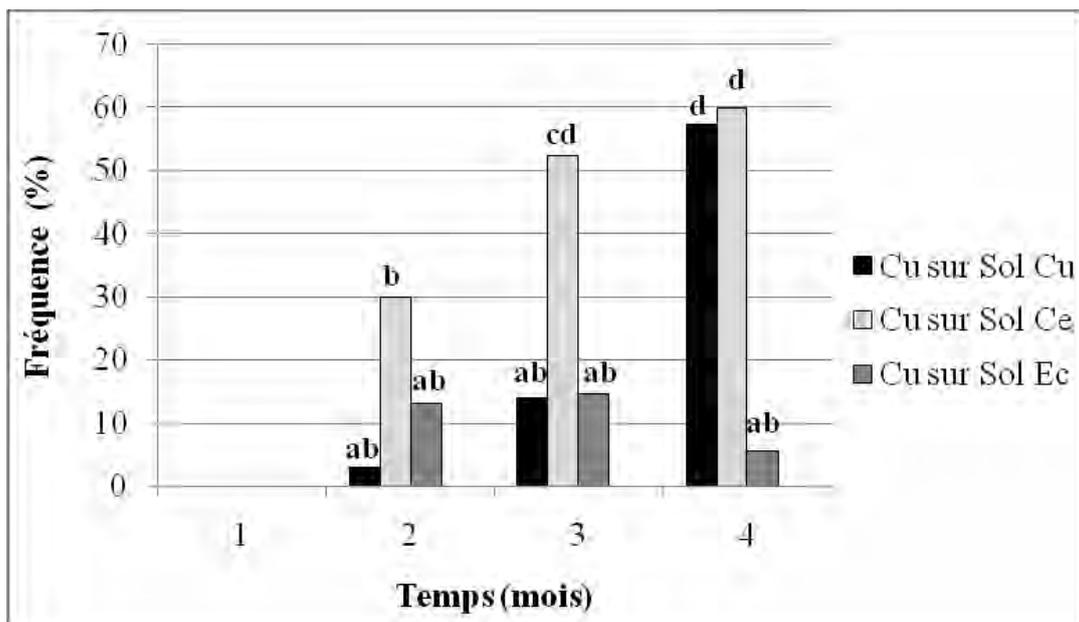


Figure 15 : Fréquence du MT blanc brillant de *C. wifera* cultivée dans des sols rhizosphériques de plantations de *C. equisetifolia*, *E. camaldulensis* ou *C. wifera* provenant de Tivaouane Peul, Thiaroye et Bel air (région de Dakar). Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 5\%$).

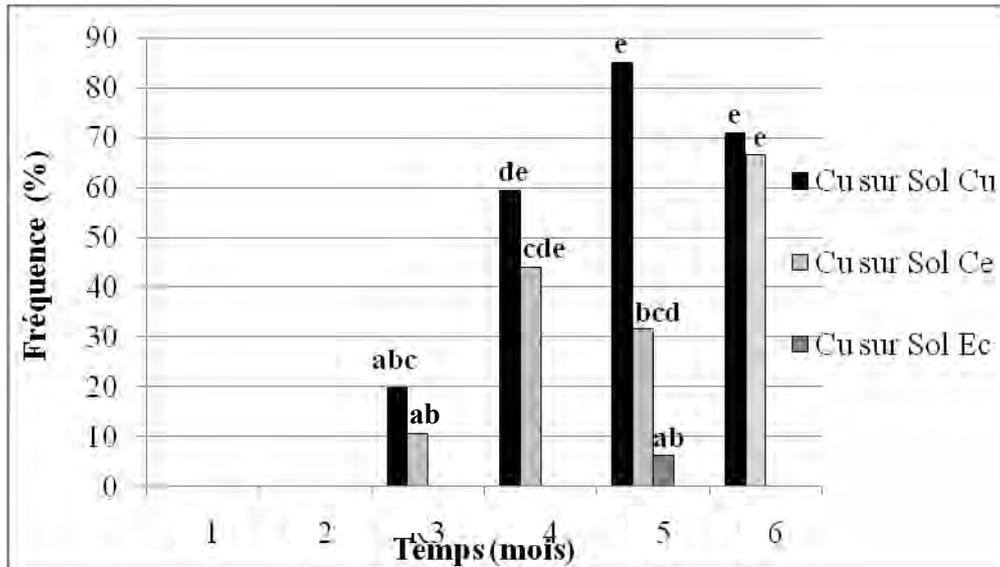


Figure 16 : Fréquence du MT blanc brillant de *C. wifera* cultivée dans des sols rhizosphériques de plantations de *C. equisetifolia*, *E. camaldulensis* ou *C. wifera* provenant de Potou (région de Louga). Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 5\%$).



(A)



(B)

Figure 17 : MT blanc brillant (A) et MT brun foncé poilu (B) de *C. wifera*

4. Génotypage des morphotypes

Les profils de restriction de l'ITS des MT BB digérés avec les enzymes *MspI* (Figure 18A) et *HaeIII* (Figure 18B) ont été identiques dans les sites d'origine et d'introduction. Par contre, ils ont été différents des profils de restriction de l'ITS des MT BFP. Ces résultats suggèrent que les MTs BB étaient identiques entre eux mais différents des MTs BFP. Ces derniers apparaissent beaucoup plus hétérogènes que ne le laissent penser leur phénotype. En effet, les MTs BFP de Bois Jolan étaient identiques alors que ceux de Viard ont montré un polymorphisme de longueurs de fragments de restriction (Figures 19A et 19B). On a également noté que le MT BFP de Deshaies était présent dans le site de Viard. Au total, il y a eu donc 1 espèce fongique à Bois Jolan, 3 à Viard et 1 à Deshaies identique à l'une des espèces de Viard. Ces MTs BFP rappellent les MTs des Thelephorales des forêts tropicales d'Afrique (Bâ *et al.*, 2012).

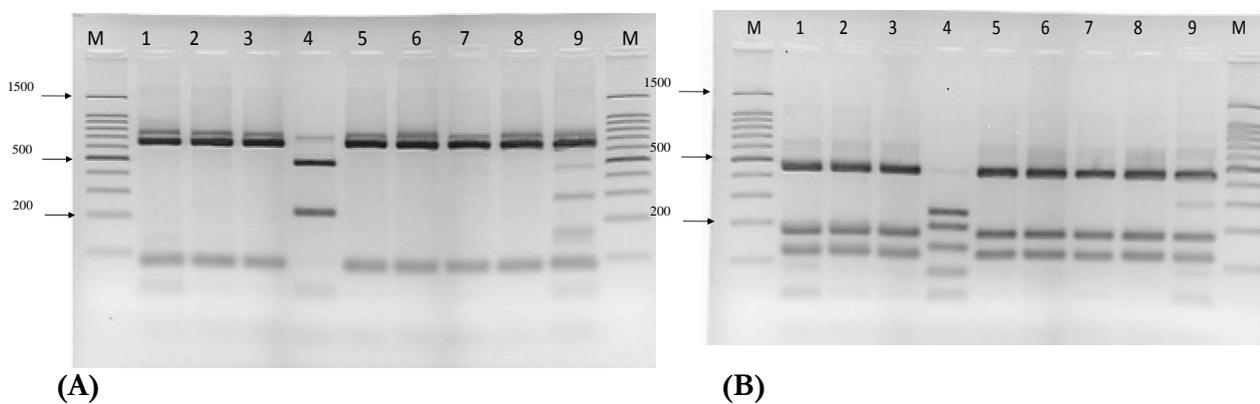


Figure 18 : Profils des ITS des MTs digérés avec *MspI* (A) ou *HaeIII* (B). 1= Ecu 5 BB Mbour ; 2= Ecu 6 BB Bel-air; 3= Ecu 424 BB Dakar; 4= Ecu 426 BFP Bois Jolan; 5= Ecu 430 BB Dakar; 6= Ecu 431 BB Potou; 7= Ecu 432 BB Viard; 8= Ecu 435 BB Deshaies; 9= Ecu 437 BB Bois Jolan ; M= Marqueur de poids moléculaire (pb). BB= blanc brillant; BFP= brun foncé poilu.

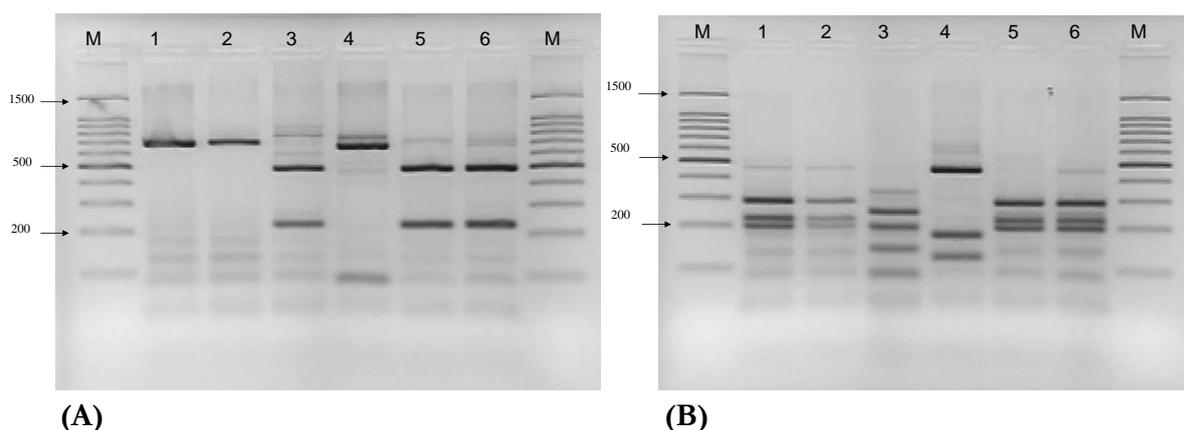


Figure 19 : Profils des ITS des MTs brun foncé poilu digérés avec *MspI* (A) ou *HaeIII* (B). 1= Ecu 438 Bois Jolan, 2= Ecu 439 Bois Jolan ; 3= Ecu 433 Viard; 4= Ecu 264 Viard; 5= Ecu 433 Viard; 6= Ecu 436 Deshaies. ; M=Marqueur de poids moléculaire (pb).

L'analyse des séquences a montré que les MTs BB étaient phylogénétiquement très proches de *S. bermudense* alors que les MTs BFP représentaient différentes espèces de Thelephorales (Figure 20).

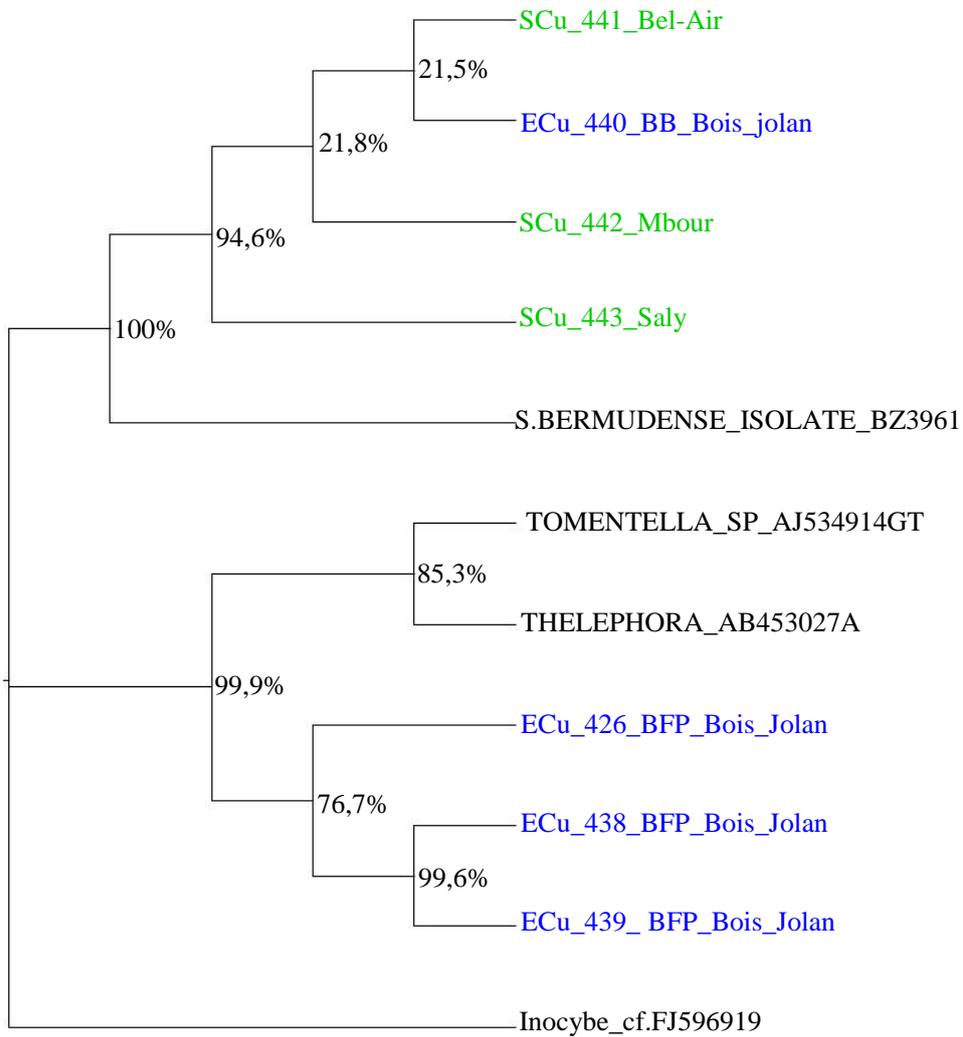


Figure 20 : Arbre phylogénétique construit à partir de séquences ITS des ECMs et sporophores récoltés en Guadeloupe (bleu) et au Sénégal (vert).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de l'analyse moléculaire des sporophores de *S. bermudense* et ECMs récoltés sous *C. uvifera* dans différents sites du Sénégal et de Guadeloupe

Lieu de récolte	Date de récolte	Echantillon	Taille des bandes RFLP après digestion enzymatique de PITS (pb)		Résultats du blast
			<i>MspI</i>	<i>HeaIII</i>	
Bois Jolan (Guadeloupe)	-	ECu 438 Brun	1(700pb)	3(300-220-200pb)	Thelephorales
Bois Jolan (Guadeloupe)	-	ECu 439 Brun	1(700pb)	3(300-220-200pb)	Thelephorales (<i>Tomentella sp</i>)
Bois Jolan (Guadeloupe)	-	MT blanc brillant ECu 440	2(650-100pb)	3(400-250-100pb)	<i>S. bermudense</i>
Bois Jolan (Guadeloupe)	2012	MT brun foncé poilu ECu 426	2(500-200)	4(250-200-150-100)pb	Thelephorales
Bel-Air Dakar (Sénégal)	-	<i>S. bermudense</i> SCu 441	2(650-100pb)	3(400-250-100pb)	<i>S. bermudense</i>
Mbour (Sénégal)	-	<i>S. bermudense</i> SCu 442	2(650-100pb)	3(400-250-100pb)	<i>S. bermudense</i>
Saly Mbour (Sénégal)	2006	<i>S. bermudense</i> SCu 443	2(650-100pb)	3(400-250-100pb)	<i>S. bermudense</i>

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les téguments des graines de *C. wifera* ont présenté dans leurs cavités des spores de *S. bermudense*. Lorsque les graines ont été introduites, les spores viables ont été capables de germer et former des MTs BB sur les racines de *C. wifera*.

C. wifera est probablement introduite au Sénégal via les graines et il existerait une transmission verticale de l'infection ectomycorhizienne de *C. wifera* par *S. bermudense* en zone d'introduction.

Cependant, dans des sols d'origine, *C. wifera* avait contracté des ECMs BB et BFP, ce qui rend peu probable son introduction avec *S. bermudense* par le biais de pots contenant des sols pourvus de propagules.

Par ailleurs, ce travail nous a permis de noter que *C. wifera* ne formait pas d'ectomycorhizes avec les symbiotes fongiques des espèces végétales ectomycorhiziennes du Sénégal à savoir : *E. camaldulensis* et *C. equisetifolia*. En effet, sur les plants de *C. wifera* semés sur sol des sols rhizosphériques de *C. wifera*, *E. camaldulensis* et *C. equisetifolia* des ECMs blanches ont été répertoriées et correspondaient au *S. bermudense*. Il existe une spécificité étroite du *S. bermudense* vis-à-vis de son hôte d'origine malgré la diversité des champignons ectomycorhiziens associés à cette espèce en zone d'origine.

D'autres sites d'introduction de l'espèce doivent être étudiés pour approfondir les résultats déjà obtenus. Dans cette logique, un autre site d'introduction de *C. wifera* (île de La Réunion) est en cours d'étude.

Une importante régénération naturelle à partir de semis est observée sous le houppier des arbres-mères de *C. wifera*. Par le biais des réseaux ectomycorhiziens, les arbres établis peuvent aider de différentes façons les plantules. Les champignons déjà nourris par les arbres représentent un inoculum peu coûteux en photosynthétats pour les plantules dont ils assurent la survie et la régénération. Il serait intéressant d'étudier l'impact de ces réseaux ectomycorhiziens sur la régénération des plantules de *C. wifera* par des méthodes isotopiques (C13 N15).

BIBLIOGRAPHIE

- Agerer R (1991).** Characterization of ectomycorrhiza. In Norris JR, Read DJ, Varma AK (eds): Techniques for the study of mycorrhiza. *Methods Microbiology*. 23: 25-73
- Arditti J (1992).** Fundamentals of orchid biology. John Wiley, New York, New York, USA.
- Avril R (2009).** Analyse de la diversité des champignons ectomycorhiziens et des ectomycorhizes du Raisinier bord de mer (*Coccoloba uvifera* L.) le long d'un gradient de salinité en forêt littorale. Master, biodiversité tropicale, Spécialité : Ecosystèmes Naturels et Exploités, Université des Antilles Guyane 42 p.
- Bâ AM, Duponnois R, Diabaté M & Dreyfus B (2011).** Les champignons ectomycorhiziens des arbres forestiers en Afrique de l'Ouest : méthodes d'étude, diversité, écologie, utilisation en foresterie et comestibilité. Editions IRD 250 p.
- Bâ AM, Duponnois R, Moyersoën B & Diédhiou A (2012).** Ectomycorrhizal symbiosis of tropical African trees. *Mycorrhiza* 22: 1-29.
- Bandou E (2005).** Diversité et fonctionnement des symbioses ectomycorhiziennes de *Coccoloba uvifera* (L.) L. en situation de stress salin et hydrique. DEA, Environnement tropical et valorisation de la biodiversité, Université des Antilles et de la Guyane, 36 p.
- Bandou E, Lebailly F, Muller F, Dulormne M, Toribio A, Chabrol J, Courtecuisse R, Plenchette C, Prin Y, Duponnois R, Thiao M, Sylla SN, Dreyfus B & Bâ AM (2006).** The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. *Mycorrhiza* 16: 559-565.
- Bolan NS (1991).** A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134:189-207.
- Bruns TD, Szaro TM, Gardes M, Cullings KW, Pan JJ, Taylor DL, Horton TR, Kretzer A, Garbelotto M & Li Y (1998).** A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology* 7: 257-272.
- Brundrett MC (2009).** Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plant: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and soil* 320: 37-77.
- Casal JJ, Deregibus, VA, Sanchez, RA (1985).** Variations in tiller dynamics and morphology in *Lolium multiflorum* Lam vegetative and reproductive plants as affected by differences in red far-red irradiation. *Annals of Botany* 56: 553-559.
- DEFCCS (2003).** Elaboration d'un plan d'aménagement, de cogestion et d'utilisation durable des ressources naturelles des aires protégées et de leurs périphéries intégrant les terroirs villageois et les réserves naturelles communautaires : l'écosystème des Niayes. *Rapport du projet de gestion intégrée des écosystèmes du Sénégal*, 129p.
- Débaud JC & Gay G (1987).** In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytologist* 105: 429-435.
- Diédhiou AG, Bâ AM, Sylla SN, Dreyfus B, Neyra M & Ndoye I (2004).** The early-stage ectomycorrhizal Thelephoroid fungal sp. is competitive and effective on *Azizelia africana* Sm. In nursery conditions in Senegal. *Mycorrhiza* 14: 313-322.

- Diédhiou AG, Selosse M-A, Galiana A, Diabaté M, Dreyfus B, Bâ AM, de Faria SM & Béna G (2010).** Multi-host ectomycorrhizal fungi are predominant in a Guinean tropical rainforest and shared between canopy trees and seedlings. *Environmental Microbiology* 12: 2219-2232.
- Ducouso M, Bâ AM & Thoen D (2003).** Les champignons ectomycorhiziens des forêts naturelles et des plantations d'Afrique de l'Ouest : une source de champignons comestibles. *Bois et Forêts des Tropiques* 275 (1) : 51-63.
- Duhoux E & Nicole M (2004).** Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes (éd. Dunod), 166 p.
- Duponnois R, Colombet A, Hien V & Thioulouse J (2005).** The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. *Soil Biol Biochem* 37: 1460-1468.
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clause M-L, Courrier S, Le Roux C, Raaijmakers J, et al. (2005).** Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165: 317–328.
- Ferris R, Peace AJ & Newton AC (2000).** Macrofungal communities of lowland Scots pin (*Pinus sylvestris* L.) and norway spruce (*Picea abies* (L.) Kartsen.) plantations in England: relationships with the site factors and stand structure. *Forest Ecology and Management* 131: 255-267.
- Gagné A (2005).** Etude moléculaire du cortège ectomycorhizien de plantations de conifères sur des sites forestiers après coupes à blanc. *Mémoire de maîtrise en sciences forestières, Faculté des études supérieures, Université Laval*, 90 p.
- Galiana A, N'Guessan KA, Gnahoua GM, Balle P, Dupuy B, Domenach AM & Mallet B (1996).** Fixation de l'azote chez *Acacia mangium* en plantation. *Bois et Forêts des Tropiques* 249: 51-62
- Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD & Taylor TW (1991).** Identification of indigenous and introduced symbiotic in ectomycorrhizae by amplification of the nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* 69: 180-190.
- Gargominy O, Bouchet P, Pascal M, Jaffré T, & Tourneur JC (1996).** Conséquences des introductions d'espèces animales et végétales sur la biodiversité en Nouvelle-Calédonie. *Revue d'Ecologie (La Terre et la Vie)* 51: 375-401.
- Gianinazzi S & Schhepp H (1994).** Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural ecosystems. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. 226 pp.
- Henkel TW, Terborgh J & Vilvalys R (2002).** Ectomycorrhizal fungi and their leguminous hosts in the Pakaraima Mountain of Guyana. *Mycological Research* 106: 515-531.
- Jauzen Ph (1998).** Bilan des espèces naturalisées en France méditerranéenne. In: Proceedings 6^{ème} Symposium Méditerranéen EWRS, Montpellier, France, p.18-25
- Lambers H, Raven JA, Shaver GR & Smith SE (2008).** Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology & Evolution*. 23: 95-103.
- Lockwood JL, Hoopes MF & Marchetti MP (2007).** Invasion ecology. Blackwell Publishing: Oxford, UK, p. 21-30

- MacKee HS (1994).** Catalogue des plantes introduites et cultivées en Nouvelle-Calédonie, 2nd edn. MNHN, Paris.
- Moreno-Casasola P & Espejel I (1986).** Classification and ordination of coastal sand dune vegetation along the Gulf and Caribbean Sea of Mexico. *Vegetatio* 66:147–182.
- Muller S (2004).** Plantes invasives en France. *Muséum d'Histoire Naturelle*, Paris.
- Nara K (2009).** Spores of ectomycorrhizal fungi: ecological strategies for germination and dormancy. *New Phytologist* 181: 245-248.
- Pegler DN (1983).** Agaric Flora of the Lesser Antilles. London, Royal Botanic Garden, 668 p.
- Perrotta JA (1994).** *Coccoloba uvifera* (L.) L. Sea grape. Uva de playa. Reseach Note SOITFSM-74. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment station. New Orleans, LA, 5 p.
- Portecop J & Le Brun P (2003).** Arbres indigènes des Antilles, Tome I, p 14-15.
- Pringle A, Adams RI, Cross HB & Bruns TD (2009a).** The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America. *Molecular Ecology* 18: 817-833.
- Pringle A, Bever JD, Gardes M, Parrent JL, Rillig MC & Klironomos JN (2009b).** Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Reviews in Ecology, Evolution and Systematics* 40: 699-715.
- Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ & Bruns TD (2001).** Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Molecular Ecology* 10: 1025-1034.
- Rhodes LH & Gerdemann JW (1975).** Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytologist* 75: 555-561.
- Richardson DM, Allsopp N, D'Antonio CM, Milton SJ & Rejmánek M (2000).** Plant invasions — the role of mutualisms. *Biological Reviews* 75: 65–93.
- Rivière T, Diédhiou AG, Diabaté M, Senthilarasu K, Natarajan K, Ducouso M, Verbeken A, Buyck B, Dreyfus B, Béna G & Bâ AM (2007).** Genetic diversity of ectomycorrhizal Basidiomycetes in West African and Indian tropical rain forests. *Mycorrhiza* 17: 415-428.
- Sanon BK, Bâ AM, Delaruelle C, Duponnois R & Martin F (2009).** Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* species associated with some Caesalpinaceae, Dipterocarpaceae and Phyllanthaceae trees in southern Burkina Faso. *Mycorrhiza* (in press).
- Selosse MA, Jacquot D, Bouchard D, Martin F & Le Tacon F (1998).** Spatio-temporal persistence and distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. *Molecular Ecology* (in press).
- Séne S (2010).** Les champignons ectomycorhiziens de *Coccoloba uvifera* en zone d'introduction (Sénégal) : diversité et tolérance au NaCl. Mémoire de Master 2, UCAD, 60 p
- Smith S & Read J (2008).** Mycorrhizal symbiosis, 3rd edition (Hardcover). 800 p.

- Strullu DG (1991).** Les relations entre les plantes et les champignons. *In* : "Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées", (éd. Lavoisier), p. 9-49.
- Tedersoo L, Tom WM & Matthew ES (2010).** Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217–263.
- Tedersoo L, Pellet P, Koljalg U & Selosse MA (2007).** Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understory *Ericaceae* and *Orchidaceae*: ecological evidence for mixotrophy in *Pyroleae*. *Oecologia* 151: 206-217.
- Thoen D & Bâ AM (1989).** Ectomycorrhizae and putative ectomycorrhizal fungi of *Azelia africana* Sm. and of *Uapaca guineensis* Müll.Arg. in Southern Senegal. *New Phytologist* 113: 549-559.
- Tuxbury SM & Salmon M (2005).** Competitive interactions between artificial lighting and natural cues during seafinding by hatchling marine turtles. *Biological Conservation* 121: 311-316.
- Vellinga EC, Benjamin EW & Pringle A (2009).** Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist* 181: 960–973.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB & Taylor JW (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in: PCR Protocols: a Guide to Methods and applications (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ); pp. 315-322. Academic Press, London.
- Zhou Z, Miwa M, Matsuda Y & Hogetsu T (2001).** Spacial distribution of subterranean mycelia and ectomycorrhizae of *Suillus grevillei* genets. *Journal of Plant Research* 114: 179-185.

ANNEXE

SOLUTIONS

Glycérol 40%

Glycérol 100%.....	40ml
Eau déminéralisée.....	60ml
Autoclave 120°C.....	20min

Composition du tampon CTAB 2x (Hexadecyltrimethylammonium Bromide)

Tris-HCl pH 9,0	100ml
EDTA pH 8	20mM
NaCl	1,4M
CTAB	2% (p/v)
β -mercaptoethanol	0,2 (v/v)

Composition du bleu de charge

Bleu de Bromophénol	0,25% (p/v)
Glycérol	30%
EDTA	10Mm
H ₂ O	qsp
A utiliser au 1/10 ^{ème}	
pH	8

Composition du Tampon TBE (Tris-borate) 10X

Tris-base	7,44g
Na ₂ EDTA, H ₂ O	7,44g
Acide borique	55g
H ₂ O	qsp 1000ml
pH ajusté à	8

Composition de la solution de BET (Bromure d'Ethidium)

Solution à utiliser à 100µl dans 1000ml (à protéger de la lumière, à conserver à 4°C et à manipuler impérativement avec des gants).

Composition de la solution Bleu de tyrpan pour 1000ml

Bleu de tyrpan.....0,5g
Eau déminéralisée.....900ml
Vinaigre100ml

Composition KOH 10% pour 1000ml

KOH100g
Eau déminéralisée1000ml

BIOLOGIE MOLECULAIRE

Protocole extraction d'ADN

Au préalable il faut : Décongelé le tube, éliminer un maximum de tampon CTAB de conservation en rinçant l'ECM ou le morceau de sporophore à extraire avec de l'eau ultra pure stérile ; préchauffer un bain marie a 65°C et y mettre le flacon contenant la solution d'éluion AE; Nettoyer le plan de travail avec de l'alcool et disposer de gans. L 'extraction comprend plusieurs étapes :

Les échantillons sont mis dans des tubes éppendorf de 2ml et broyés à sec avec une pincée de sable de Fontaine bleu à l'aide d'un piston en plastique. Les racines doivent être bien broyées ;

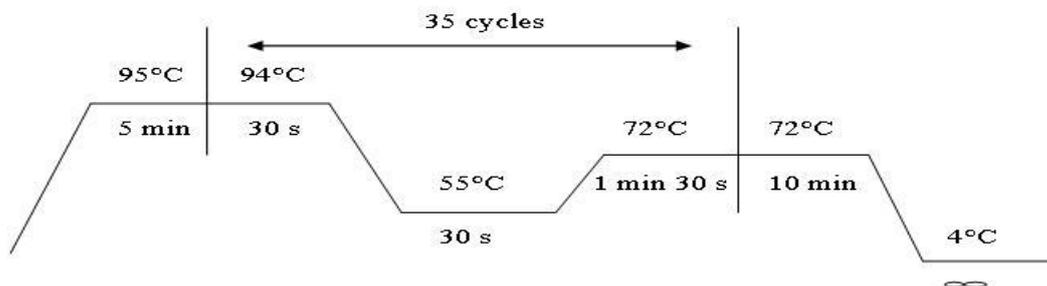
- Après broyage ajouter 400 µl de tampon de lyse (AP1) et 4 µl de RNase (100mg/ml) et vortexer vigoureusement pour éliminer la masse de tissus et avoir une suspension liquide ;
- Incuber pendant 10mn à 65°C en faisant 2 à 3 inversions de tubes : c'est l'étape de la lyse des cellules ;
- Ajouter 130µl de tampon de déprotéinisation (AP2), vortexer et incuber dans la glace pendant 5mn : c'est l'étape de la précipitation des solvants, des protéines et des polysaccharides ;
- Centrifuger 5mn à 14000 rpm ;
- Transférer le surnageant dans une colonne de filtration QIAshredder et centrifuger 2 mn à 14000 rpm ;
- Jeter la colonne et transférer le filtrat dans un nouveau tube éppendorf de sans le culot et noter le volume de filtrat ;
- Ajouter 1,5 volume de tampon AP3 (0,5 volume de tampon et 1 volume d'éthanol absolu) ; mixer en pipetant ;

- Déposer 650µl de mélange dans une colonne Dneasy et centrifuger 1mn à 8000 rpm puis répéter avec le mélange restant ;
- Placer la colonne dans un nouveau tube eppendorf ;
- Ajouter 500µl de tampon de lavage (AW), centrifuger 1mn à 8000 rpm et jeter le filtrat
- Ajouter à nouveau 500µl de tampon de lavage (AW), centrifuger 2mn à 14000 rpm et jeter le filtrat ;
- Centrifuger à sec 1mn à 14000 rpm, la membrane de la colonne doit être bien sécher avant de passer à l'éluion de l'ADN ;
- Transférer la colonne Dneasy dans un tube eppendorf de 1,5 ml ;
- Ajouter 50µl (100µl pour le sporophore) de tampon d'éluion (AE) préchauffé à 65°C. Déposer le tampon au milieu de la colonne ;
- Laisser incubé pendant 5mn à température ambiante ;
- Centrifuger 1mn à 8000 rpm ;
- Jeter la colonne et conserver l'ADN à -20°C.

Procédure d'amplification de l'ITS

L'amplification de la région de l'ITS par la PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) suivant un régime cyclique dans les conditions suivantes:

- Une dénaturation thermique du fragment d'ADN à amplifier à 94 °C pendant 5min,
- Un cycle d'amplification répété 35fois et constitué : d'une dénaturation à 94°C pendant 30s, d'une hybridation des amorces à 55°C pendant 30s et d'une élongation ou extension des amorces à 72°C pendant 1 min 30s.
- Une dernière étape (étape de polymérisation), à 72°C pendant 10min pour s'assurer que les fragments sont synthétisés au complet termine le processus de l'amplification.



Programme d'amplification utilisé pour la PCR

Purification des produits d'amplification de l'ITS

Après la PCR de la région ITS, les produits d'amplification sont visualisés par électrophorèse sur gel horizontal d'agarose (BIO-RAD) 2% en déposant 22 µl d'amplifiat additionnés à 5 µl de bleu de charge (BIO-RAD). 5 µl d'un marqueur de taille moléculaire 100 Pb (SIGMA) ont aussi été déposés dans un puits sur le gel. La migration s'est faite dans une cuve moyenne (Hoefer HE

99X) à 50 volts pendant environ 2 heures afin de bien séparer les bandes très proches. Le gel est coloré et rincé dans les mêmes conditions que précédemment. Les bandes sont ensuite découpées sur une table à UV (TFP-20 C) et introduites dans des tubes Eppendorf 2.5 ml préalablement numérotés. La purification s'est faite à l'aide du protocole du Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) selon le protocole défini par le fabricant :

- Les gels contenant les bandes d'ADN sont pesés dans des tubes Eppendorf. Ensuite 3 volumes de tampon QG ont été ajoutés à 1 volume de gel (1 mg~1 µl).
- Les tubes sont incubés dans un bain-marie à 50°C pendant 10 mn durant lesquelles la solution est mixée au vortex toutes les 2 à 3 mn pour dissoudre le gel.
- Ensuite 1 volume (1 mg~1 µl) d'isopropanol est ajouté et le tout mélangé immédiatement à l'aide de la pipette.
- Le mélange est déposé dans la colonne QIAquick et centrifugé 1 mn à 13000 rpm, à la température ambiante, puis le filtrat a été versé.
- A nouveau 500 µl de tampon QG sont ajoutés dans la colonne QIAquick puis la colonne est centrifugée 1 mn à 13000 rpm pour enlever toutes traces d'agarose.
- L'ADN est lavé en ajoutant 750 µl de tampon PE dans la colonne QIAquick, qui a été incubé pendant 2 à 5 mn à la température ambiante et centrifugé pendant 1 mn.
- Le filtrat est versé et la colonne QIAquick Centrifugée à vide pendant 1 mn.
- La colonne QIAquick est placée dans un nouveau tube Eppendorf 1.5 ml.
- L'ADN est élué en ajoutant 50 µl de tampon EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) au centre de la membrane de la colonne QIAquick qui est centrifugée ensuite pendant 1 mn. La concentration de l'ADN peut être augmentée en ajoutant 30 µl de tampon EB au lieu de 50 µl.

L'analyse des purifiats est faite dans les mêmes conditions que l'analyse des amplifiats, 5 µl d'un marqueur moléculaire (Smart Ladder MW-1700-02 200 lanes, EUROGENENTEC) sont déposés dans un puits pour déterminer la taille des bandes d'ADN ainsi que leur concentration dans 1 µl de purifiat.

Caractéristiques physico-chimiques du sol de Sangalkam (pour 100g de sol)

Composants	Teneur
pH / (sol /eau ratio 1:2)	6
pH / (sol /KCl 1:2)	4,6
Argile	5,4%
Limon	5,8%
Sable	88,80%
Matière organique	0,60%
Carbone total %	0.30%
Azote total %	0.02%
C/N ratio	14%
Phosphore total	41,4 ppm
Potassium total	333,3 ppm
Phosphore assimilable	2,1 ppm
Magnésium total	0,30 ppm

Titre du mémoire Introduction de *Coccoloba uvifera* (L.) et son champignon ectomycorhizien *Scleroderma bermudense* au Sénégal

Candidate : Mame Khoudia CISSE

Nature du mémoire : Master en Agroforesterie, Ecologie, Adaptation (AfEcA)

Composition du jury :

Président : M.	Léonard E.	AKPO	Professeur	UCAD
Membres : M.	Amadou M.	BA	Directeur de recherche	IRD
	Aboubacry	KANE	Maître assistant	UCAD
	Abdala G.	DIEDHIOU	Assistant	UCAD

Résumé

Coccoloba uvifera L., communément appelé Raisinier bord de mer, a été introduit au Sénégal pour ses fruits comestibles dans des concessions familiales et en plantation ornementale dans des sites touristiques. Dans son aire d'origine (Guadeloupe), il pousse naturellement en bordure de mer, sur des cordons sableux, salés et pauvres en nutriments grâce à une diversité de champignons du sol avec lesquels il forme des ectomycorhizes (ECMs). En zone d'introduction (Sénégal), *C. uvifera* est souvent plantée à proximité de deux autres arbres exotiques potentiellement à ECMs (*Casuarina equisetifolia* et *Eucalyptus camaldulensis*) et se serait naturalisée avec un seul de ses champignons d'origine *Scleroderma bermudense*.

Notre étude avait pour objectifs (i) de rechercher la présence de spores sur les téguments de graines récoltées en zone d'origine et d'évaluer leur aptitude à coloniser *C. uvifera* en zone d'introduction (ii) de mettre en évidence la présence de propagules de *S. bermudense* dans des sols rhizosphériques de *C. uvifera* prélevés en Guadeloupe, (iii) d'étudier la spécificité de *S. bermudense* vis-à-vis de *C. equisetifolia* et d'*E. camaldulensis*, et celle des champignons ectomycorhiziens de ces deux espèces d'arbres vis-à-vis de *C. uvifera*.

Des graines de *C. uvifera* provenant de trois sites de Guadeloupe (Bois Jolan, Deshaies et Viard) ont été observées en microscopie électronique à balayage (MEB) et semées sur du sol stérilisé en gaine. Des graines scarifiées ont été semées sur du sol importé des trois sites de Guadeloupe mais aussi sur des sols de plantation de *C. uvifera*, d'*E. camaldulensis* et de *C. equisetifolia* provenant de deux sites au Sénégal (Potou et Dakar). Après 4 à 6 mois de culture en serre, les ECMs ont été morphotypées et caractérisées par PCR/RFLP et séquençage de l'ITS.

L'observation des graines de *C. uvifera* en MEB avait révélé que des spores de *S. bermudense* étaient incrustées dans la cavité des téguments. De plus, les spores étaient viables et seul le morphotype (MT) blanc brillant (BB), observé sur les trois provenances de graines semées sur sol stérilisé, était identifié à *S. bermudense*. Dans les trois sols d'origine, des MTs brun foncé poilu (BFP), identifiés à des Thelephorales étaient présents dans les mêmes proportions que le MT BB. Par contre, seul le MT BB était sur les plants de *C. uvifera* cultivés dans les sols de plantation.

Ces résultats suggèrent que *S. bermudense* aurait été introduit *via* ses spores incrustées dans les téguments de graines de *C. uvifera*. Ce champignon serait spécifique de *C. uvifera*.

Mots clés : *Coccoloba uvifera*, *Scleroderma bermudense*, ectomycorhizes, graines, spores.

