
SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION-----	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE-----	3
1. Les Mycorhizes-----	3
1.1. Les ectomycorhizes-----	4
11.1. Mise en place de la symbiose ectomycorhizienne-----	5
1.1.2 Diversité des champignons ectomycorhiziens-----	6
1.1.3 Caractérisation des champignons ectomycorhiziens-----	7
1.1.3.1 Caractérisation morphologique de la diversité fongique-----	7
1.1.3.2 Caractérisation moléculaire de la diversité fongique-----	7
2. Le stress salin-----	9
2.1 Notion de stress-----	9
2.2. Tolérance des plantes et de leurs symbiotes fongiques au stress salin-----	9
2.2.1 Tolérance des plantes à la salinité-----	9
2.2.2. Tolérance des champignons mycorhiziens au stress salin-----	11
3. L'introduction des plantes et de leurs associés fongiques-----	11
4. <i>Coccoloba uvifera</i> (L.)-----	12
4.1. Description botanique-----	12
4.2..Origine et distribution-----	14
4.3. Quelques utilisations de <i>C. uvifera</i> -----	14
4.4. Statut mycorhizien de <i>C. uvifera</i> -----	16
MATERIEL ET METHODES -----	18
1. Isolement de souches de champignons ectomycorhiziens récoltés sous <i>Coccoloba uvifera</i> -----	18
1.1. Isolement de mycélium de champignons ectomycorhiziens à partir de sporophores----	18
1.2 Isolement de mycélium de champignons ectomycorhiziens à partir de racines ectomycorhizées de <i>C. uvifera</i> -----	18

2. Caractérisation moléculaire des souches de champignons ectomycorhiziens-----	19
2.1 Extraction d'ADN-----	19
2.2 Le contrôle de l'extrait d'ADN-----	20
2.3 Amplification de l'ITS par PCR-----	20
2.4 Contrôle de l'amplification-----	22
2.5 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ITS-----	22
2.6. Séquençage-----	22
3. Etude de la spécificité des champignons ectomycorhiziens de <i>Casuarina equisetifolia</i> et d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> sur <i>C. uvifera</i> -----	23
3.1..Mise en place de l'expérimentation-----	23
3.2. Traitement des graines-----	23
3.3 Morphotypage et conservation des ectomycorhizes (ECM)-----	24
3.4 Analyse moléculaire-----	24
4. Effet du stress salin sur la croissance in vitro de souches de champignons ectomycorhiziens-----	25
4.1. Origine des souches champignons ectomycorhiziens -----	25
4.2 Condition de croissance des champignons -----	25
4.3. Paramètres mesurées-----	26
RESULTATS-----	27
1. Identification des champignons -----	27
2. Caractérisation moléculaire des champignons ectomycorhiziens-----	27
2.1 PCR/RFLP-----	27
2.2. Séquençage-----	30
3. Etude de la spécificité des champignons ectomycorhiziens de <i>Casuarina equisetifolia</i> et d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> sur <i>Coccoloba uvifera</i> -----	32
3.2. Morphotypage des ECM de <i>C. uvifera</i> , d' <i>E. camaldulensis</i> et de <i>C. equisetifolia</i> -----	32
3.3. Caractérisation moléculaire des morphotypes -----	32
4. Tolérance à la salinité des champignons ectomycorhiziens en culture in vitro-----	33

DISCUSSION	36
1. Diversité des champignons ectomycorhiziens en Guadeloupe et au Sénégal.....	36
2. Tolérance à la salinité des champignons ectomycorhiziens en culture in vitro	37
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	40
ANNEXE.....	51

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Coccoloba uvifera, communément appelé Raizinier-bord-de-mer, est une Polygonacée originaire d'Amérique tropicale (Parrota, 1994). C'est une plante qui pousse naturellement sur le littoral rocheux et en bordure de mer, dans son aire d'origine. Exclusivement néotropicale, cette espèce se développe sur les cordons sableux (plages, dunes, arrière-dunes), le plus souvent, salés et pauvres en nutriments où elle s'associe à plusieurs espèces de champignons ectomycorhiziens dont certaines n'ont été que récemment identifiées (Pegler, 1983; Miller *et al.*, 2000; Guzman *et al.*, 2003).

C. uvifera a été introduit au Sénégal comme plante d'ornement au Sénégal (DEFCCS, 2003) et serait potentiellement intéressante comme espèce de reboisement, notamment pour la fixation des dunes du littoral dans la zone des Niayes. La présence de *C. uvifera* en bordure de mer et sous climat fortement saisonnier (8 mois de saison sèche) laisse penser que cette espèce serait adaptée à la salinité et à la sécheresse (Von Carlowitz, 1986).

L'introduction de *C. uvifera* dans la zone des Niayes pourrait être facilitée par l'association symbiotique que contracte cet arbre avec des champignons pour former des ectomycorhizes dont le rôle est bien établi dans l'alimentation des plantes en macroéléments (P, N, K) et en oligo-éléments (Zn, Cu). En effet, L'ectomycorhize formée par l'association symbiotique entre le champignon et la plante hôte, développe un réseau mycélien qui explore un grand volume de sol, mobilisant ainsi les nutriments essentiels (Read *et al.*, 2004).

La symbiose ectomycorhizienne peut aussi contribuer à renforcer la tolérance des plantes à la salinité (Smith et Read, 2008). Il a été démontré que la tolérance au stress salin et hydrique de *C. uvifera* pouvait être nettement améliorée, en l'associant à des champignons ectomycorhiziens tels que *Scleroderma bermudense* (Bandou *et al.*, 2006). En effet, les mycorhizes ont une fonction de filtre des ions toxiques limitant ainsi leur passage dans les racines (Tian *et al.*, 2004). De plus le stress salin étant toujours accompagné d'un stress hydrique, les hyphes sont également capables d'abaisser suffisamment leur potentiel osmotique pour maintenir un flux d'eau du sol vers les racines (Augé, 2001).

Il existe peu de données sur la diversité des ECM et des sporophores de champignons ectomycorhiziens fructifiant sous *C. uvifera* en Guadeloupe (Pegler, 1983 ; Bandou, 2005 ; Avril, 2009). Elle n'est par contre pas connue en zone d'introduction (Sénégal). Si on envisage d'introduire *C. uvifera* dans la zone des Niayes, deux situations peuvent se présenter pour *C. uvifera* : l'inoculation est nécessaire avec l'associé fongique d'origine lorsqu'on ne

trouve pas de champignons compatibles dans la zone d'introduction ; par contre, si on trouve des champignons compatibles dans la zone d'introduction, il faut alors comparer leur efficacité et leur adaptabilité avec des associés fongiques d'origine sélectionnés pour leur performance.

Eucalyptus camaldulensis et *Casuarina equisetifolia* sont deux espèces d'arbre originaire de l'Australie (Ducouso *et al.*, 2003). Elles ont été introduites au Sénégal notamment en bordure du littoral depuis plusieurs années et se sont, au fil du temps, naturalisées avec leurs associés fongiques d'origine (Bâ *et al.*, 1987 ; Ducouso, 1991 ; Ducouso *et al.*, 2003). Les *Eucalyptus* ont été trouvés en symbiose avec *Pisolithus strobilus*, *Scleroderma capense*, *S. verrucosum* et *Phlebopus sudanicus*. *Casuarina equisetifolia* a été trouvé en symbiose avec *Pisolithus* sp. et *P. sudanicus* au Sénégal (Bâ *et al.*, 1987 ; Ducouso, 1991). La spécificité de ces champignons vis-à-vis de *C. uvifera* n'est pas connue. A l'inverse, on ne sait pas si les associés fongiques d'origine de *C. uvifera* sont compatibles avec *C. equisetifolia* et *E. camaldulensis*.

L'objectif de notre travail était (i) d'inventorier les ECM et les sporophores fructifiant sous *C. uvifera* au Sénégal, (ii) d'étudier la spécificité des champignons ectomycorhiziens de *C. equisetifolia* et d'*E. camaldulensis* vis-à-vis de *C. uvifera*, (iii) de déterminer les niveaux de tolérance à la salinité des associés fongiques de *C. uvifera* cultivés seul.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les Mycorhizes

Le terme mycorhize du grec *mukes* qui signifie champignon et *rhiza* qui signifie racine. Il a été employé pour la première fois par Franc (1885) pour définir l'association symbiotique contractée entre les racines de végétaux et les hyphes de champignons. C'est une association ubiquiste, durable et à bénéfice réciproque pour les deux partenaires (Smith et Read, 2008).

Chacun des partenaires optimise son développement grâce à cette association. Le champignon améliore l'alimentation des plantes en macroéléments (P, N, K) et en oligo-éléments (Zn, Cu). En effet, il développe un réseau mycélien qui explore un grand volume de sol mobilisant ainsi des nutriments essentiels. Le champignon bénéficie en retour de composés carbonés issus de la photosynthèse pour accomplir leur cycle biologique (Read *et al.*, 2004). Dans la nature, l'état de mycorhization est la règle et celui de non mycorhization l'exception (Strullu., 1991). En effet, plus de 90 % des familles des plantes forment des associations symbiotiques avec des champignons (Smith et Read., 1997). Deux principaux types d'association mycorhiziennes ont été définis en fonction de la morphologie et de la structure des mycorhizes : les endomycorhizes à vésicules et à arbuscules et les ectomycorhizes.

A côté de ces deux grands groupes de symbioses mycorhiziennes, il existe des ectendomycorhizes et des mycorhizes à pelotons d'hyphes cloisonnés chez les Orchidacées et les Ericacées (Figure 1).

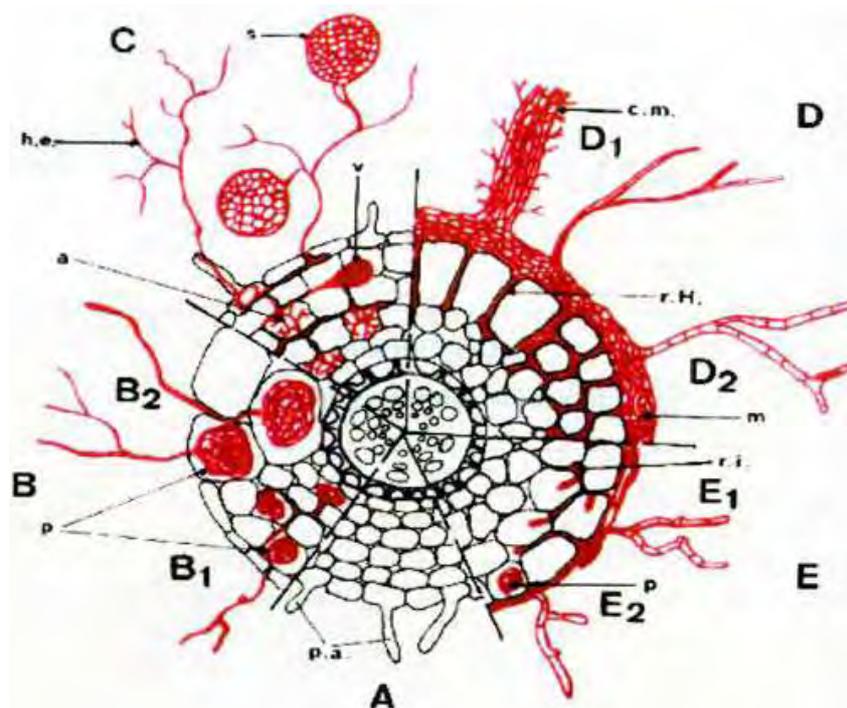


Figure 1: Représentation schématique de la structure des mycorhizes (Mousain, 1989). A : racine non infectée et poils absorbants (p.a.) ; B : endomycorhizes à pelotons des Orchidacées (B₁) et des Ericacées (B₂) ; C : endomycorhizes à vésicules et arbuscules, avec des spores (s), des hyphes externes (h.e.), des arbuscules (a), et des vésicules (v) ; D : ectomycorhizes des Angiospermes (D₁) et des Gymnospermes (D₂), avec des cordons mycéliens (c.m.), un réseau de Hartig (r.h.), et un manteau fongique (m) ; E : ectendomycorhizes, E₁: mycorhizes "monotropoïdes" avec un réseau mycélien intercellulaire (r.i.), E₂: mycorhizes "arbutoïdes" avec des pelotons d'hyphes (p).

1.1. Les ectomycorhizes

La symbiose ectomycorhizienne est, après les mycorhizes à arbuscules, la plus représentée dans les écosystèmes forestiers. Elle concerne la majorité des arbres des régions tempérées et boréales, et très peu d'arbres tropicaux (Smith et Read, 1997 ; Onguene et Kuyper, 2001). Les champignons responsables de ce type de symbiose sont les Basidiomycètes (Russules, Lactaires, Amanites, Bolets, Chanterelles,...) et quelques Ascomycètes (Truffes, *Cenococcum geophilum*...) (Hibbett *et al.*, 2000). Certains de ces champignons ectomycorhiziens sont comestibles et à forte valeur ajoutée (Truffes, Matsutake) dont *Phlebopus sudanicus* récoltée dans les plantations littorales du sud du Sénégal (Ducouso *et al.*, 2003). Très peu de champignons ectomycorhiziens sont cultivables ; certains sont spécifique d'une plante hôte et d'autres ont un spectre d'hôte très large (Thoen et Bâ,

1989). Les ectomycorhizes présentent deux structures typiques : Un manteau fongique et un réseau de Hartig (Figure 1). Elles sont visibles à l'œil nu grâce au manteau fongique qui recouvre la racine, faisant disparaître ainsi les poils absorbants racinaires. La structure et l'épaisseur du manteau varient considérablement en fonction des partenaires symbiotiques et des conditions environnementales (Agerer, 1995). Le manteau fongique, qui constitue une interface entre la racine et le sol peut servir de lieu de stockage d'éléments minéraux et de carbone pour le champignon (Vogt *et al.*, 1982). De ce manteau fongique partent des hyphes externes qui vont explorer un grand volume de sol et des hyphes internes qui s'insinuent entre les cellules du cortex de la plante-hôte pour former le réseau de Hartig. Ce réseau peut se limiter à la première assise superficielle du cortex chez les feuillus ou s'étendre jusqu'à l'endoderme chez les résineux (Voiry, 1981). Il constitue le lieu des échanges bidirectionnels entre les deux partenaires de la symbiose.

1.1.1. Mise en place de la symbiose ectomycorhizienne

La mise en place de l'ectomycorhize implique de profondes modifications morphologiques, anatomiques et physiologiques de la racine (Martin *et al.*, 2001 ; Marmeisse *et al.*, 2004). Les multiples événements touchant les deux partenaires, notamment, l'agrégation des hyphes formant le manteau fongique, la disparition des poils absorbants, la multiplication des racines latérales et l'allongement radial des cellules de l'épiderme permettent de différencier les ectomycorhizes (Tagu *et al.*, 2001). De ce fait, la structure de base de ces derniers est identique bien qu'il existe des morphotypes différents. Se référant aux relations entre bactéries fixatrices d'azote et légumineuses, il s'instaurerait des signaux de « reconnaissance » assurant un dialogue moléculaire entre les deux partenaires de la symbiose (Perret *et al.*, 2000). L'échange de médiateurs moléculaires entre les deux partenaires serait sous le contrôle de facteurs génétiques. La découverte de protéines SR dont la synthèse est régulée par la symbiose, confirme que l'activation et/ou la répression de certains gènes accompagnent la différenciation de l'ectomycorhize (Hilbert *et al.*, 1991 ; Kim *et al.*, 1999 ; Voiblet *et al.*, 2001). Toutefois, les mécanismes de communication entre le champignon et la plante hôte lors de l'établissement de la symbiose restent encore inconnus (Perret *et al.*, 2000).

Par ailleurs, la différenciation de l'ectomycorhize serait également modulée par des facteurs trophiques et environnementaux. Chez les eucalyptus par exemple, les exsudats racinaires stimulent la croissance mycélienne de certaines souches de *Pisolithus* à des

concentrations très faibles (Lagrange *et al.*, 2001). D'autre part, certains métabolites (hypaphorine) sécrétés par des champignons du genre *Pisolithus* stimulent la formation de racines latérales courtes, et arrêtent l'élongation des poils absorbants chez la plante-hôte (Béguiristain et Lapeyrie, 1997; Ditengou et Lapeyrie, 2000 ; Martin *et al.*, 2001). Les champignons synthétisent également de l'acide indole-3-acétique (AIA), qui serait impliqué dans la mise en place de la symbiose (Marmeisse *et al.*, 2004).

1.1.2 Diversité des champignons ectomycorhiziens

Les champignons ectomycorhiziens sont présents dans le sol sous forme de propagules de conservation et de dissémination (p.ex. spores, vieilles mycorhizes, cordons mycéliens) (Bâ *etal.*, 1991). 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 en période humide, les propagules produisent des hyphes qui poussent et se ramifient pour donner un mycélium capable de coloniser le système racinaire pour former des ECM. Le cycle de développement des champignons ectomycorhiziens 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 épigés ou hypogés, et la production de spores. 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 (p.ex. fertilisation, éclaircies) (Débaud et Gay, 1987). Chez les champignons supérieurs, 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. En effet, des champignons comme *Thelephora* et *Cenococcum* forment des ECM 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). Actuellement, la diversité des champignons ectomycorhiziens est estimée être comprise entre 10000 et 15000 espèces (Smith et Read, 2008). Cependant ce chiffre est loin d'être exhaustif car il ne prend pas en compte la diversité encore peu connue des champignons des régions tropicales

1.1.3 Caractérisation des champignons ectomycorhiziens

Plusieurs approches souvent complémentaires sont utilisées pour avoir une image périodique d'une communauté de champignons ectomycorhiziens : l'inventaire des sporophores, l'inventaire des morphotypes d'ectomycorhizes et l'utilisation des outils moléculaires pour caractériser les sporophores et les ectomycorhizes.

1.1.3.1 Caractérisation morphologique de la diversité fongique

Dans les régions boréales et tempérées, de nombreuses communautés de champignonsectomycorhiziens ont été décrites sur la base d'inventaires de sporophores (Ferris *et al.*, 2000). L'avantage de cette approche réside dans la simplicité d'échantillonnage avec peu de perturbation du milieu et dans l'identification de l'espèce fongique à partir de la description du sporophore. Elle a cependant l'inconvénient de nécessiter plusieurs récoltes dans l'année, et d'une année à une autre pour prendre en compte les champignons résupinés peu visibles dans les écosystèmes forestiers (Erland et Taylor, 1999).

L'inventaire des ECM est une approche qui permet aussi d'accéder à la composition des communautés fongiques (Agerer, 1991). Cependant, leur identification basée uniquement sur leurs caractères morphologiques, anatomique et histologiques est souvent aléatoire. En effet, ces caractères peuvent changer en fonction de l'âge de la plante-hôte ou de l'environnement (Thoen et Bâ, 1989 ; Wurzbürger *et al.*, 2001 ; Diédhiou *et al.*, 2004). Il est rarement possible d'observer des connexions entre le mycélium à la base du pied des sporophores et celui des ECM (Thoen & Bâ, 1989 ; Rivière *et al.*, 2007). Encore faut-il établir un lien formel entre sporophores et ECM car on peut aussi trouver des champignons parasites ou saprophytes à proximité des arbres à ECM. C'est le cas de quelques russules saprophytes facultatives ou parasites (p.ex. *Russula parasitica*) en Afrique tropicale (Buyck *et al.*, 1996), bien que le genre *Russula* est souvent ectomycorhizien. L'utilisation des outils de la biologie moléculaire (p.ex. amplification et séquençage de l'ADNr) permet de franchir cet obstacle qui est l'identification des ectomycorhizes notamment chez les champignons dont la fructification est aléatoire (Gehring *et al.*, 1998 ; Taylor et Bruns, 1999 ; Kõljalg *et al.*, 2000).

1.1.3.2 Caractérisation moléculaire de la diversité fongique

Les techniques de biologie moléculaire (p.ex. PCR-RFLP, séquençage), basées sur l'analyse de l'ADNr ont révolutionné les méthodes traditionnelles d'études de la diversité taxonomique des communautés de champignons ectomycorhiziens (Taylor et Bruns, 1999 ; Smit *et al.*, 2003; Diédhiou *et al.*, 2004 ; Rivière *et al.*, 2007 ; Sanon *et al.*, 2009). La

technique PCR 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 (Jacobson *et al.*, 1993 ; 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 ; Stendell *et al.*, 1999 ; Rivière *et al.*, 2007). 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 espaces intergéniques, soit transcrit (ITS, « Internal Transcribed Spacer »), soit non transcrit (IGS, « Intergenic Spacer »), moins conservés évolutivement. L'espace 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). La plupart des études d'écologie moléculaire et de systématique des champignons sont réalisées grâce à l'analyse de la région ITS. De plus, il existe sur cette région une base de données de plus d'une centaine de séquences référencées dans NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). 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 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).

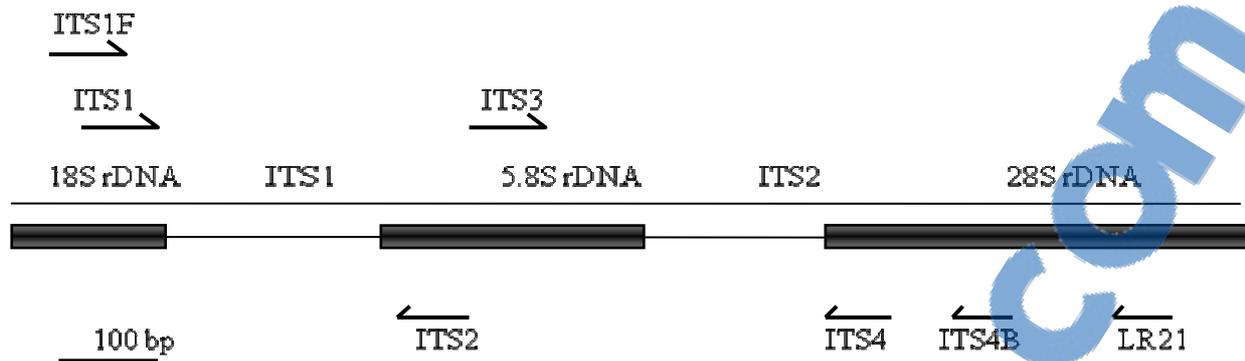


Figure 2. Représentation schématique de l'ITS (ITS1, ITS2 et 5.8S) de l'unité répétée de l'ADN ribosomique chez les champignons. Les flèches représentent les sites de fixation des amorces les plus utilisées en écologie moléculaire des champignons (Tedersoo *et al.*, 2007)

2. Le stress salin

2.1 Notion de stress

Le stress est un facteur environnemental susceptible de déclencher chez les plantes des modifications chimiques ou physiques dommageables. Ces modifications représentent la contrainte qui peut être élastique c'est-à-dire impliquant une modification réversible proportionnelle au facteur stressant, comme elle peut être plastique, provoquant une modification irréversible (Levitt, 1976).

Cette réversibilité dépend de la résistance de l'organisme face au type de stress et à son intensité mais également à la durée d'exposition. En effet, si l'intensité d'un stress est trop faible pour provoquer des dommages irréversibles à court terme, il peut à long terme provoquer des changements plastiques, voir la mort de l'organisme (Levitt, 1980, lichenthaler 1996). Le stress modifie les dimensions et la forme du corps exposé traduisant sa tension intérieur.

2.2. Tolérance des plantes et de leurs symbiotes fongiques au stress salin

Près de 40% des terres émergées sont affectées par la salinité principalement dans les zones côtières des régions méditerranéennes et tropicales (Parida et Das, 2005). La salinité peut avoir une origine naturelle (dégradation de la roche mère, intrusion de l'eau de mer) ou anthropique (fertilisation, irrigation avec de l'eau saumâtre).

2.2.1 Tolérance des plantes à la salinité

Les plantes peuvent être classées en deux groupes selon leur tolérance au sel : les halophytes qui ont la faculté de se développer normalement sous sol salé et les glycophytes

qui ne peuvent pas se développer en présence d'un stress salin. La salinité est considérée comme un facteur significatif qui limite la croissance et la productivité des plantes (Tian *et al.*, 2004). Elle provoque un double stress, hydrique et ionique sur les plantes. Pour faire face à ce double stress, les plantes, en particulier les halophytes, développent trois mécanismes d'adaptation (Munns et Tester, 2008) :

Un mécanisme lié au stress osmotique qui consiste à limiter ou à inhiber le passage des sels des racines vers les feuilles (Berthomieu *et al.*, 2003). Dans ce cas le stress physiologique est causé par l'excès d'ions à l'extérieur de la plante (diminution du potentiel osmotique du sol) et est similaire à un stress hydrique. La plante devra ajuster la pression osmotique de ses cellules pour assurer leur alimentation en eau (Munns et Tester, 2008).

Un mécanisme lié au stress ionique qui consiste à une compartimentation des ions toxiques dans la vacuole et/ou leur exclusion dans les glandes à sel des cellules foliaires (Zid et Grignon, 1991). Ce système met à l'abri du sel les organites cellulaires et la machinerie métabolique, tout en favorisant l'ajustement osmotique et le maintien de la turgescence des cellules (Flowers *et al.*, 1977; Greenway et Munns, 1980; Parida et Das, 2005). En effet, Parida et Das (2005) proposent une compartimentation cellulaire des mécanismes de la tolérance à la salinité. Trois compartiments sont délimités par la paroi, le plasmalemme et le tonoplaste. Il s'agit de l'apoplasme, du cytoplasme et de la vacuole. Dans l'apoplasme, les ions Na⁺ peuvent traverser la paroi ou s'y fixer. Le mécanisme principal est l'exclusion des ions toxiques. Lorsque la vacuole accumule des ions Na⁺ et Cl⁻, on observe dans le cytoplasme le maintien des potentiels hydriques faibles par un ajustement osmotique dû à une accumulation d'osmorégulateurs (K⁺, proline, glycine, bêtaïne). Par exemple, en milieu salin, le taux de proline chez les plantes est élevé. Cependant, Le rôle de la proline dans la tolérance aux stress abiotiques n'est pas bien élucidé. L'accumulation de la proline ne serait pas une réaction d'adaptation au stress mais plutôt le signe d'une perturbation métabolique (Dix et Pearce, 1981; Alem et Amri, 2005).

Un troisième mécanisme, récemment découvert par Berthomieu *et al.* (2003) chez *Arabidopsis thaliana*, permet à la plante de reconduire les sels par les vaisseaux, des feuilles vers les racines. Ces sels sont ensuite ré-excrétés vers l'extérieur (Berthomieu *et al.*, 2003). Ce dernier mécanisme est sous le contrôle de gènes bien identifiés. Un gène codant pour un transporteur de Na⁺ s'exprime dans le phloème qui conduit la sève élaborée des feuilles vers les racines. Quand ce gène est muté, on observe une accumulation de Na⁺ dans les feuilles et une diminution dans les racines. La plante mutante devient ainsi plus sensible au NaCl

(Berthomieu *et al.*, 2003).

Chez les plantes sensibles à la salinité (glycophytes), les ions toxiques sont exportés vers la partie aérienne des plantes et provoquent leur dessèchement.

2.2.2. Tolérance des champignons mycorhiziens au stress salin

Les champignons mycorhiziens doivent faire face aux mêmes contraintes physiologiques que les plantes hôtes dans les sols salins. Cependant, les effets de la salinité sur ces champignons seuls ou en symbiose sont moins bien connus. Dixon *et al.* (1993) ont montré que la croissance des champignons seuls ou en symbiose diminuent avec l'augmentation du taux de salinité du substrat. Toutefois, la tolérance au sel des champignons peut varier significativement entre espèces (Dixon *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2001; Kernaghan *et al.*, 2002). Les genres *Pisolithus*, *Laccaria* et *Suillus* montrent une meilleure tolérance aux ions Na⁺ que *Thelephora* et *Cenococcum*. Les espèces de *Suillus* compartimentent le sel et les métaux toxiques dans des vacuoles et excluent en partie ces composés des voies métaboliques (Dixon, 1988). La tolérance au sel peut également varier entre différentes souches de la même espèce isolées sur des sites différents. C'est l'exemple de deux souches de champignons ectomycorhiziens *Scléroderma bermudense* isolées en Guadeloupe, l'une à la Basse-Terre (Petit-Bourg, Plage Viard) et l'autre à la Grande-Terre (Saint François, Plage Raisins-clairs). Celle isolée à la plage Raisins-clairs étant plus tolérante que celle isolée à la plage Viard (E. bandou, 2005).

En milieu salin, les champignons ectomycorhiziens présentent une activité métabolique à des potentiels hydriques inférieurs à ceux du point de flétrissement des plantes. Ce phénomène implique des mécanismes d'osmorégulation cytoplasmique efficaces chez les champignons (Mexal et Reid, 1973; Smith et Read, 1997).

Pour tester la tolérance des champignons ectomycorhiziens à la salinité, une première approche consiste à les cultiver *in vitro* sans la plante sur un milieu de culture contenant différents sels à différentes concentrations (Chen *et al.*, 2001; Kernaghan *et al.*, 2002). La deuxième approche consiste à évaluer la tolérance des champignons en symbiose avec leur partenaire végétal (Tian *et al.*, 2004).

3. L'introduction des plantes et de leurs associés fongiques

De nombreuses espèces de plante et de champignons sont dispersés dans le monde entier. Des milliers de spores sont transportés à des kilomètres par les vents (Hallenberg et Kuffer, 2001 ; Muñoz *et al.*, 2004). La dérive des continents et les oscillations climatiques ont

également contribués à la migration des plantes et de leurs associés fongiques (Halling, 2001). Plus récemment, les humains ont involontairement facilité la diffusion des champignons pathogènes et symbiotiques en important des produits de sylviculture et en établissant les plantes de forêt exotiques (Wingfield *et al.*, 2001). L'introduction de certaines espèces peut perturber l'intégrité et la biodiversité d'un écosystème. Par exemple, l'établissement des plantations de forêt exotique avec des jeunes plantes de *pregrown* a été la source principale de l'introduction des champignons mycorhiziens en Espagne. La présence de ces champignons avait facilité l'invasion des communautés naturelles par des espèces d'*Eucalyptus* (Diez, 2005). Cependant, certaines plantes non invasives n'ont aucun effet néfaste sur la communauté native du site d'introduction. *C. uvifera* est une espèce qui prolifère des plantules sous le houppier des ses arbres-mères, aussi bien en zone d'origine que zone d'introduction. Des sporophores en fructification sont souvent observés sous le houppier de *C. uvifera* en période humide. Cependant, les proliférations de plantule et les fructifications de sporophores ne s'observent pas aux alentours mais seulement sous les houppiers des arbres adultes. Ceci suggère que *C. uvifera* n'est pas une plante invasive.

4. *Coccoloba uvifera* (L.)

4.1. Description botanique

Coccoloba uvifera est couramment appelé raisinier bord-de-mer ou raisin marine. C'est un arbre de la famille des Polygonacées. Il peut atteindre une dizaine de mètres de hauteur, mais présente généralement des dimensions plus modestes en bord de mer, où les vents jouent un rôle nanifiant (Crawford et Peterson, 1997). Cet arbre a de grandes feuilles larges, persistantes, caulinaires, alternées, pétiolées, ocrées souvent caduques, membraneuses à coriaces arrondies pouvant mesurer jusqu'à une vingtaine de centimètres de largeur (figure 4) (Portecop et Petit Le Brun, 2003). *C. uvifera* possède des fleurs unisexuées; certaines plantes ont uniquement des fleurs mâles, et d'autres seulement des fleurs femelles (Figure 5). Le périanthe est blanc ou blanc verdâtre, campanulé, glabre. La floraison blanche et parfumée est étalée de janvier à mai et les fruits arrivent en maturité en juillet-août. Les fruits de 1 à 2 cm de diamètre sont sphériques à ovoïdes et disposés en grappe d'où le nom de **raisinier bord de mer** (Figure 4). À maturité, ils prennent une couleur rouge violacé (figure 5) et sont comestibles.

Tableau 1 : Classification botanique de *C. uvifera* (Bush *et al.*, 1969)

Règne	Plantae
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Caryophyllidae</i>
Ordre	<i>Polygonale</i>
Famille	<i>Polygonaceae</i>
Genre	<i>Coccoloba</i>
Nom binominal	
<i>Coccoloba</i> (L.) L., 1759	<i>uvifera</i>



A



B

Figure 3 : Fruits verts immature (A) ; Fruits rouge violacés mature (B)



C



D

Figure 4 : Fleurs mâles (C) ; Graine sans pulpes (D)

4.2..Origine et distribution

Le genre *Coccoloba* exclusivement néo-tropical, regroupe plus de 400 espèces dans la Famille des Polygonacées largement distribuée à l'échelle de la planète (Miller, 200). Les plus grandes diversités spécifiques à l'intérieur du genre *Coccoloba* ont été décrites en Amazonie avec 44 espèces recensées. *Coccoloba* est un genre, composé d'espèces tropicales et arboricoles qui prédominent en Amérique du Sud, le plus grand nombre étant au Brésil. Dans les Caraïbes, dix espèces de *Coccoloba* ont été répertoriées, dont *C. uvifera*, l'espèce la plus connue, originaire des Antilles, de la côte Est de l'Amérique Centrale, et de la côte Nord-Est de l'Amérique du Sud. Cependant, il a été introduit dans le monde entier (p.ex. Asie du Sud Est, Afrique, Océanie) en plantation ornementale. *C. uvifera* occupe naturellement les cordons sableux des forêts littorales du bassin caribéen (Portecop & Petit Le brun, 2003). L'arbre est réputé résistant aux embruns marins et à la sécheresse parce qu'il s'installe près de la mer à la limite de balancement des marées (Figure 6).



Figure 5 : *Coccoloba uvifera* en bordure de mer sur la plage de Bois Jolan (Guadeloupe). Limite de la zone de balancement des marées (flèche)

4.3. Quelques utilisations de *C. uvifera*

Les faux-fruits sont consommés à maturité ou utilisés pour la préparation de gelée et de vin obtenu par fermentation (Figure 3). En pharmacopée traditionnelle, un extrait aux propriétés astringentes est obtenu par décoction de feuilles et d'écorce et est indiqué pour traiter la

dysenterie (Portecop & Petit Le Brun, 2003). L'extrait d'écorce riche en tanin est aussi utilisé comme teinture pour le cuir et le bois. Le « raisinier bord de mer » est utilisé comme bois de feu ou pour la fabrication de charbon de bois. Le bois rouge veiné de noir est aussi apprécié en ébénisterie (Parrotta, 1994).

Tolérante à la salinité du sol des zones côtières et des embruns marins, *Coccoloba uvifera* est souvent choisie comme arbre d'ornement et de reboisement des plages et des routes (Figure 7). Ces plantations jouent le rôle de brise-vent, première protection des côtes et des dunes contre les ouragans (Craig, 1984). Il protège également la ponte des tortues marines dans le Golfe du Mexique, aux Antilles, en Afrique et en Océanie (Moreno-Casasola et Espejel, 1986 ;Tuxbury et Salmon, 2005).



Figure 6 : Plantations ornementales de *Coccoloba uvifera* en bordure de route (San Juan, Puerto Rico).

4.4. Statut mycorhizien de *C. uvifera*

Dans son milieu naturel, *C. uvifera* serait associés uniquement à des champignons ectomycorhiziens (Kreisel, 1971; Mounichy, 2004). A l'échelle des Antilles, quinze espèces de sporophores ectomycorhiziens ont été récoltées sous *C. uvifera* dont 6 en Guadeloupe (Tableau 2) (Bandou, 2005). Parmi ces six espèces, *Scleroderma bermudense* est la moins représentée en milieu non salé. Elle a été cependant la seule espèce récoltée sous le houppier de *C. uvifera* en milieu salé (Raymond, 2009). *Scleroderma bermudense*, un champignon très répandu en forêt littorale, a un effet bénéfique sur la croissance et l'adaptation de *C. uvifera* en situation de stress salin et hydrique (Bandou *et al.*, 2006).

Six ECM de *C. uvifera* ont été identifiés en Guadeloupe dont les quatre correspondent à des espèces de sporophores déjà récoltés. Les deux autres ont été identifiés à deux espèces de *Tomentella* (Raymond, 2009). En revanche, on ne dispose pas de données publiées sur la diversité des Champignons ectomycorhiziens de *C. uvifera* au Sénégal

Tableau 2 : champignons ectomycorhiziens associés à *Coccoloba uvifera* aux Antilles

Familles	Espèces	Pays	Auteurs
<i>Amanitaceae</i>	<i>Amanita cystidiosa</i>	Anguilla, Guana (Iles vierges), Porto Rico	(Miller <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Amanita antillana</i>	Martinique, Trinidad	(Pegler, 1983)
	<i>Amanita arenicola</i>	Porto Rico, Guadeloupe	(Miller <i>et al.</i> , 2000 ; Bandou, 2005)
	<i>Amanita microspora</i>	Porto Rico	Miller <i>et al.</i> , 2000)
<i>Cantharellaceae</i>	<i>Cantharellus cinnabarinus</i>	Martinique, Guadeloupe	(Pegler, 1983 ; Bandou, 2005)
<i>Cortinariaceae</i>	<i>Inocybe littoralis</i>	Martinique, Guadeloupe	(Pegler, 1983 ; Bandou, 2005)
	<i>Inocybe xerophitica</i>	Guadeloupe	(Pegler, 1983 ; Bandou, 2005)
<i>Russulaceae</i>	<i>Lactarius coccolobae</i>	Anguilla, Guana (Iles vierges), Porto Rico	Miller <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Lactarius ferrugineus</i>	Martinique, Porto Rico	(Pegler, 1983)
	<i>Lactarius nebulosus</i>	Martinique, Iles Vierges, Porto-Rico	(Pegler, 1983)
	<i>Russula cremeolilacina</i>	Iles Vierges, Porto Rico, Guadeloupe	Pegler, 1983 ; Bandou, 2005)
<i>Sclerodermatacea</i>	<i>Scleroderma bermudense</i>	Proto-Rico, Guadeloupe	(Guzman <i>et al.</i> , 2004; Bandou <i>et al.</i> , 2006)
<i>Xerocomoideae</i>	<i>Xerocomus coccolobae</i>	Martinique	(Pegler, 1983)
	<i>Xerocomus cuneipes</i>	Martinique	(Pegler, 1983)
	<i>Xerocomus guadelupae</i>	Martinique, Dominique, Guadeloupe	(Pegler, 1983)

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Isolement de souches de champignons ectomycorhiziens récoltés sous *Coccoloba uvifera*

Les champignons ectomycorhiziens utilisés dans ce travail ont été récoltés au Sénégal et en Guadeloupe. Au Sénégal, deux campagnes de récoltes ont été faites en 2006 et en 2008. Ces prélèvements ont eu lieu dans les aires de plantation de *Coccoloba uvifera*. Dans ces endroits, des racines ectomycorhizées et des sporophores ont été identifiées et prélevées. Au cours de chaque prélèvement, la forme, la couleur et l'odeur caractéristiques de chacun des sporophores et ectomycorhizes récoltés a été notée.

1.1. Isolement de mycélium de champignons ectomycorhiziens à partir de sporophores

Des sporophores à l'état jeune, ont été soigneusement débarrassés du sol adhérent à l'aide d'un pinceau. Ces sporophores ont ensuite été récupérés dans des sachets puis conservés au froid jusqu'à leur utilisation.

Les sporophores récoltés ont été aseptisés en nettoyant la partie superficielle avec de l'eau javellisée. Sous une hotte, à proximité d'un bec bensen, le chapeau de sporophores a été fractionné en petits morceaux. A l'aide d'un scalpel flambé, ces morceaux de chair ont été prélevés et déposés sur milieu nutritif gélosé MNM (Marx, 1969) contenu dans des boîtes de Pétri. Ces boîtes de Pétri ont été mises à incubation à l'étuve à une température de 30°C.

Plusieurs séries de repiquages des explants ont été effectuées sur milieu nutritif gélosé MNM pour éliminer les contaminants jusqu'à l'obtention de mycélium pure de champignons ectomycorhiziens.

Les souches ainsi purifiées ont été repiquées tous les mois pour leur maintien en collection.

1.2 Isolement de mycélium de champignons ectomycorhiziens à partir de racines ectomycorhizées de *C. uvifera*

Des racines ectomycorhizées de *C. uvifera* ont été prélevées sous l'arbre dans les horizons superficiels du sol (0-15 cm) puis récupérées dans des sachets et conservées au froid jusqu'à leur utilisation.

Les racines ectomycorhizées ont été abondamment rincées avec l'eau du robinet pour éliminer le sable. Sous une loupe binoculaire, des fragments de racines de trois à cinq centimètres de long, portant un type de mycorhize ont été placées dans des tubes eppendorff. Sous la hotte, les racines ont été lavées à l'eau déminéralisée stérile et désinfectées d'abord avec 1 ml d'une

solution de Tween 20 (25%) pendant 20 mn, puis avec 1 ml d'une solution de NaClO (10%) pendant 3 mn. Pour chaque traitement, les tubes eppendorff contenant les racines ont été centrifugés.

Trois séries de rinçages ont été effectuées sur les racines découpées en petits fragments avec de l'eau déminéralisée stérile. Ces fragments de racines ont été égouttés à l'aide de papier buvard puis déposés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu nutritif gélosé MNM. Les boîtes ont été mises à incuber à l'étuve à une température de 30°C.

A partir de deux jours de culture, plusieurs séries de repiquages des racines ont été effectuées sur des boîtes contenant du milieu nutritif gélosé MNM pour éliminer les contaminants.

Les mycéliums purs ainsi obtenus ont été mis en collection et repiqués tous les mois pour leur maintien en vie.

2. Caractérisation moléculaire des souches de champignons ectomycorhiziens

La technique de PCR/RFLP a été utilisée pour caractériser et mettre en évidence la diversité des souches de champignons récoltés. L'ADN extrait des mycéliums des champignons isolés, des fragments de racines ectomycorhizées et des sporophores a été utilisé comme matrice pour les réactions de PCR.

2.1 Extraction d'ADN

L'ADN total a été extrait des ECM du mycélium ou d'un sporophore à l'aide du kit de purification d'ADN Dneasy de QIAGEN

Les différents échantillons ont été broyés à sec, séparément, dans des tubes eppendorff, avec une pincée de sable de Fontainebleau à l'aide d'un piston en plastique.

Le flacon contenant la solution d'éluion AE a été placé dans un bain marie réglé à 35°C.

- La lise des cellules

Quatre cent microlitres (400µl) de tampon de lyse (AP1) ont été ajoutés au broyat. La suspension a été vortexées vigoureusement puis incubée au bain marie à 65°C pendant 10 mn. Au cour de cette phase, la lyse des cellules permet la libération de leur contenu.

- La précipitation des solvants

A cette suspension a été ajouté 130 µl de tampon de précipitations (AP2). Le mélange a été homogénéisé à l'aide d'un vortex, incubé dans la glace pendant 5 mn et centrifugée 5 min à 1400 rpm. Durant cette phase de dénaturation des protéines et de précipitation des solvants, l'intégrité des acides nucléiques reste très conservée.

L'élimination des débris cellulaires a été réalisée en transférant le surnageant dans une colonne de filtration QIAshredder et en centrifugeant pendant 2 min à 14.000 rpm à la température de 4°C.

- La récupération de l'ADN

Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube après centrifugation et additionné à 0.5 volume de tampon (AP3) et 1 volume d'éthanol absolu. Ce mélange a été transféré dans une colonne DNeasy mini spin et centrifugé 1 min à 8000 rpm à la température de 4°C. L'ADN étant retenu dans la colonne, le filtrat a été jeté. Le culot contenant l'ADN a été rincé deux fois avec 500 µl de tampon de lavage (AW) puis centrifugé à chaque fois pendant 1 minute à 8000 rpm. La colonne DNeasy a été centrifugée à vide pendant 1 mn à 14 000 rpm à la température de 4°C. Le culot d'ADN retenu dans la colonne a été dissout dans un volume de 100 µl (pour mycélium) ou 50 µl (pour ectomycorhize) de tampon d'éluion (AE) préchauffé à 65°C et mis à incuber dans la colonne pendant 5 min à température ambiante. L'ADN a été ensuite récupéré par centrifugation à 8000 rpm pendant 1 mn. L'ADN extrait a été conservée à -20 °C.

2.2 Le contrôle de l'extrait d'ADN

Une analyse quantitative et qualitative de l'ADN extrait a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose (SIGMA) à 1 % dans du TBE 1 X (Tris – HCL 1,1 p/v ; Na₂EDTA 0,1 % p/v ; 2H₂O ; acide borique 0,55 % p/v). Cinq microlitres (5 µl) de l'extrait on été prélevé et additionnés à 1,5 µl de bleu de charge (bleu de Bromophénol 0,025 %, glycérol 3 %, EDTA 1 mM). Le bleu de charge sert à maintenir l'échantillon au fond du puits ainsi qu'à visualiser le front de la migration. Les mélanges ainsi obtenu ont été déposés dans les puits du gel et mis à migrer parallèlement avec un marqueur de poids moléculaire 1 Kb qui a servi d'échelle moléculaire. La migration a été réalisée dans une cuve à électrophorèse sous une tension de 50 volts pendant 30 mn. Après migration, le gel a été coloré avec une solution de Bromure d'Ethidium (BET 1 µg/ml) pendant 25 mn puis rincé à l'eau distillée pendant 15 mn. Le gel a été par la suite visualisé et photographié sous lumière UV à l'aide d'un appareil Gel Doc (BIO RAD) connecté à un ordinateur.

Les échantillons d'ADN ont été conservés à -20 °C pour les analyses par PCR/RFLP.

2.3 Amplification de l'ITS par PCR

Pour chacun des échantillons qui ont été traités, la PCR a été réalisée dans un microtube de 0,2 ml (tube PCR) avec un volume réactionnel de 25 µl. Le mélange réactionnel

comprend : 2,5 µl de chacune des deux amorces (10 mM) ITS₁ et ITS₄ ; des billes lyophilisées de « Taq Ready-To-Go » fabriquées par Amersham Pharmacia Biotech ; 5 à 10 µl d'ADN génomique utilisé comme matrice et de l'eau ultra pure stérile (Qsp). 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. Un témoin négatif sans ADN a été utilisé pour servir de contrôle de la PCR. Les séquences nucléotidiques du couple d'amorce utilisé pour l'amplification de l'ITS sont définies ci-après : ITS₁ (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ; ITS₄ (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Genre Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Le programme d'amplification utilisé comprend plusieurs étapes (fig 8). Une dénaturation du fragment d'ADN à amplifier à 94 °C pendant 5 min, suivie d'un cycle d'amplification répété 35 fois et constitué : d'une dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, d'une hybridation des amorces à 55 °C pendant 30 secondes et d'une élongation à 72 °C pendant 1 min. Une dernière étape à 72 °C pendant 7 minutes pour s'assurer que les fragments sont synthétisés au complet termine le processus de l'amplification. Ainsi la quantité de matériel génétique obtenue est théoriquement 2³⁵ fois plus importante que celle de départ.

La figure ci-dessous montre l'évolution de la température au cours de l'amplification.

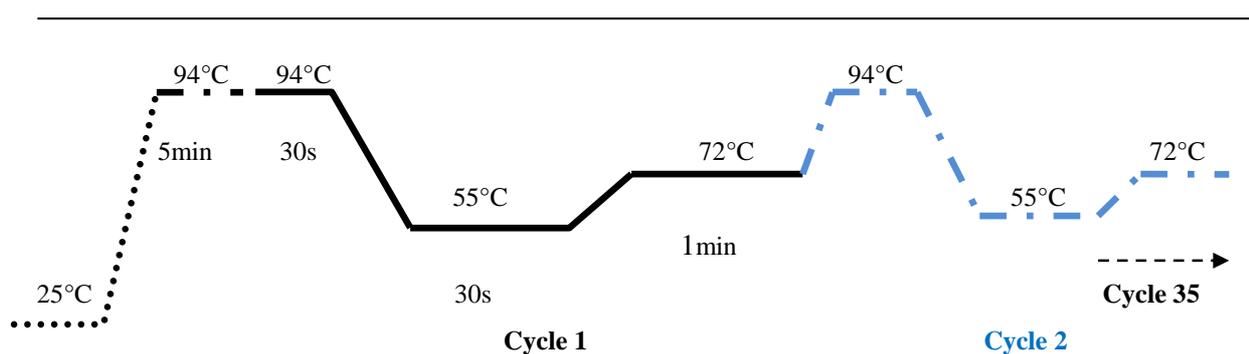


Figure 7 : programme d'amplification utilisé pour la PCR

2.4 Contrôle de l'amplification

Le succès de l'amplification a été contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose horizontal 1 % comme pour le contrôle de l'extraction. Les échantillons qui ont été bien amplifiés ont été choisis pour être digérés avec des enzymes de restriction.

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

L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) a été effectuée à partir des produits obtenus après amplification.

Suivant l'intensité des bandes de la PCR, des aliquotes de 8 à 13 µl d'amplifiats ont été digérés en utilisant les enzymes *Msp* I et *Hae* III (Amersham Pharmacia Biotec) reconnaissant respectivement les sites de restriction spécifiques (5'-C/CGG-3') et (5'-GG/CC-3'). Le volume réactionnel de 20 µl comprend : 8 à 13 µl du produit PCR, 1 µl de l'enzyme de restriction (10 unités) pour 2 µl du tampon (10 X) de l'enzyme et 9 à 4 µl d'eau ultra pure stérile (QSP). Le mélange réactionnel ainsi obtenu a été incubé pendant trois heures de temps dans l'étuve à 37 °C. Au bout des trois heures d'incubation à 37 °C, la totalité du produit de la digestion est mélangée avec 3 µl du bleu de charge et déposé sur gel d'agarose (2,5 %) Métaphor (FMC Bio Products, Rockland, Marine USA). La migration des fragments a été réalisée sous une tension 100 volts pendant 40 min. un marqueur moléculaire de 100 pb a servi d'échelle moléculaire. Le gel a été coloré et les profils visualisés selon le protocole utilisé pour le contrôle de l'extrait d'ADN (Section 5.2). Les profils visualisés sont comparés aux profils obtenus à partir de la souche de référence de *C. uvifera* (*Sleroderma bermudense*).

2.6. Séquençage

Des représentants de chacun des différents groupes de profils ITS ont été choisis et séquencé en utilisant respectivement les amorces ITS1, ITS1-F, ITS4 et ITS4-B ayant servi lors des amplifications par PCR. Les réactions de séquence et leur purification ont été faites par la plateforme bioinformatique de l'Université Laval, Québec. Les séquences ont été corrigées et analysées avec les logiciels suivant : « Sequence Navigator », « AutoAssembler », « ClustalX » et « *Njplot* ».

3. Etude de la spécificité des champignons ectomycorhiziens de *Casuarina equisetifolia* et d'*Eucalyptus camaldulensis* sur *C. uvifera*

3.1. Mise en place de l'expérimentation

La durée de l'expérimentation a été d'environ quatre mois. Les sols utilisés ont été prélevés sous *C. uvifera*, sous *C. equisetifolia* et sous *E. camaldulensis* aux alentours du LCM. Sous chacun de ces trois arbres, quinze gaines de sable ont été prélevées. Quarante cinq gaine au total ont été ainsi préparées et mise en disposition en serre en trois lots de quinze pour chaque sol. Chacun de ces trois lots de quinze a été également disposées en trois lots de cinq gaines.

Des graines de *C. uvifera*, d'*E. camaldulensis* et de *C. equisetifolia* ont été semées séparément sur chacun des sols prélevés sous *C. uvifera*, sous *C. equisetifolia* et sous *E. camaldulensis* avec une répétition de cinq par espèce et par sol.



Figure 8: Plants de *C. uvifera*, d'*E. camaldulensis* et de *C. equisetifolia* cultivés en serre sur trois sols prélevés à Bel-air sous *C. uvifera*, sous *E. camaldulensis* et sous *C. equisetifolia*

3.2. Traitement des graines

Les graines de *C. uvifera* qui ont été utilisées proviennent de la Guadeloupe. Ces graines ont été au préalable scarifiées 1h 15mn dans de l'acide sulfurique, puis rincées abondamment à l'eau déminéralisée stérile avant d'être mise en imbibition pendant 3 h dans de l'eau déminéralisée stérile. Elles ont été ensuite égouttées à l'aide de papier buvard stérile avant d'être déposées sur boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée (1%). Les boîtes ont été recouvertes de papier aluminium et mise à incubation à l'étuve. Au bout d'une semaine, les

graines qui avaient déjà germées ont été repiquées dans les gaines humidifiées à température ambiante.

Les graines de *C. equisetifolia* et d'*E. camaldulensis* ont été aseptisées avec de l'eau de javel puis semées directement sans pré-germination préalable.

Les plantes ont été arrosées tous les jours à l'eau de robinet.

3.3 Morphotypage et conservation des ectomycorhizes (ECM)

Trois récoltes ont été effectuées : Au bout de deux mois et demi de culture, après quatre mois et au bout de six mois de culture. Pour chaque récolte, deux plants ont été échantillonnés par espèces et par sol. 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 courante sous la loupe binoculaire et au microscope optique. Les ECM ou morphotypes (MT) ectomycorhiziens ont été différenciées par des caractères macroscopiques et microscopiques : texture et couleur du manteau fongique, présence d'anses d'anastomoses, de cordons mycéliens et de sclérotés. Le maximum de fragment de racines ectomycorhizés a été prélevé au niveau de chaque plant pour les trois espèces. Les fragments de racines ont été conservés séparément dans des tubes eppendorff avec du CTAB 2x jusqu'à leur utilisation ultérieure pour les analyses moléculaires.

Les morphotypes ectomycorhiziens ont été étiquetés comme suit : CC Coccoloba sur sol coccoloba ; CE Coccoloba sur sol d'Eucalyptus ; CCa Coccoloba sur sol de Casuarina ; EC Eucalyptus sur sol de Coccoloba ; ECa Eucalyptus sur sol de Casuarina ; EE Eucalyptus sur sol d'Eucalyptus ; CaC Casuarina sur sol de Coccoloba ; CaE Casuarina sur sol d'Eucalyptus ; CaCa Casuarina sur sol de Casuarina.

3.4 Analyse moléculaire

L'ADN total a été extrait des ECM à l'aide du kit de purification d'ADN Dneasy de QIAGEN suivant le protocole décrit précédemment (cf. section 5.1).

Deux sporophores de *Scleroderma* ont été récoltés : L'un sous un pied adulte d'*E. camaldulensis* et l'autre sous un pied adulte de *C. uvifera* à Bel-air (Sénégal). L'ADN ribosomique de ces deux sporophores a été également extrait à l'aide du kit de purification d'ADN Dneasy de QIAGEN.

Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Le protocole utilisé est celui décrit précédemment. Les amorces

universelles : ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) ont été utilisés.

Les échantillons ayant donné une bonne amplification ont été digérés avec deux enzymes de restrictions (*Hae* III et *Msp* I) selon le protocole décrit en 5.5.

Les profils obtenus avec les différents échantillons d'ECM (CE ; CC ; CCa) ont été analysés et regroupés en profils types suivant leur similarité. Ils ont été comparés avec les profils RFLP du *Scleroderma bermudense* récolté sous *C. uvifera* et du *Scleroderma* récolté sous *E. camaldulensis*.

4. Effet du stress salin sur la croissance in vitro de souches de champignons ectomycorhiziens

4.1. Origine des souches champignons ectomycorhiziens

Les souches BA 001 ; S13 ; M185 ; BA ; et S.sp1 qui ont été isolées sous *C. uvifera* et mise en collection au Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM) de Bel-air ont été utilisées pour tester leur tolérance à la salinité. Les souches S13 et BA ont été isolées en milieu salé respectivement au Sénégal et en Guadeloupe. Les souches M185 et S.sp1 de la Guadeloupe et la souche BA 001 du Sénégal ont été isolées en milieu non salé.

4.2 Condition de croissance des champignons

Les souches de champignons ectomycorhiziens ont été cultivées sur milieu MNM (Marx, 1969) (Annexe) avec différentes gammes de concentration de NaCl [0 mM ; 50 mM (2.97g) ; 100 mM (5.84) ; 200 mM (11.7g)]. Le milieu de culture a été coulé dans des boîtes de pétri au dessus desquelles deux axes perpendiculaires ont été tracées au préalable. Après refroidissement et solidification du milieu, du papier cellophane a été bien étalé sur chaque boîte de sorte qu'il n'y est aucune poche d'air entre le milieu et le papier. Ce dernier a été au préalable trempé dans une solution d'EDTA bouillante puis rincé abondamment à l'eau de robinet. Il a par la suite été submergé avec de l'eau déminéralisé stérile et stérilisé à l'autoclave (120°C, 20 minutes).

Pour chaque souche fongique, des implants mycéliens (0,8 mm de diamètre) ont été déposés au centre des boîtes avec une répétition de quatre pour chaque dose de NaCl. Les boîtes de Pétri ont été incubées à l'obscurité à 30°C.

4.3. Paramètres mesurés

Les paramètres (croissance radiale et poids sec du mycélium) ont été mesurés pour évaluer la tolérance à la salinité des différentes souches testées. La croissance du mycélium a été mesurée sous la loupe binoculaire, une fois par semaine pendant un mois. Les mesures ont été effectuées suivant deux axes perpendiculaires tracés en dessous des boîtes et la moyenne des deux mesures a été calculée pour chaque boîte. A la fin de la période expérimentale, les mycéliums ont été détachés du papier cellophane et les biomasses fraîches mesurées. Chaque échantillon a été séché à l'étuve à 65 °C pendant trois jours et la biomasse sèche mesurée. Les données de croissance radiale, de poids frais et de poids sec ont été soumises à une analyse statistique ANOVA à une variable, avec XLSTAT 6.1.9 pour discriminer les souches en fonction de la salinité, de la croissance radiale, du poids frais et du poids sec.

RESULTATS

RESULTATS

1. Identification des champignons

Les missions de prospection et de prélèvements au Sénégal ont permis de collecter 35 souches de champignons à partir de 15 ectomycorhizes et 20 sporophores. Toutes les ectomycorhizes récoltées au Sénégal sont de couleur blanche. Vingt-trois échantillons de racines ectomycorhizées (6 blanches, 5 brun foncé, 4 orange-clair, 1 brun clair, 1 brune, 4 brune à brun foncé) ont été récoltés de la Guadeloupe. Six espèces de champignons ectomycorhiziens ont été identifiées à partir de sporophores récoltés sous *C. uvifera* en bordure de mer en zone d'origine (Guadeloupe) : *Inocybe xerophytica*, *I. littoralis*, *Russula cremeolilacina*, *Amanita arenicola*, *Cantharellus cinnabarinus*, et *Scleroderma bermudense*. Parmi ces champignons, seul *S. bermudense* a été récolté sous *C. uvifera* en zone introduite (Sénégal) en bordure de mer comme à l'intérieur des terres.



Sporophores de *Scleroderma bermudense*

2. Caractérisation moléculaire des champignons ectomycorhiziens

2.1 PCR/RFLP

L'analyse génétique de l'ADN pour l'identification des champignons ectomycorhiziens à partir de mycéliums, de racines ectomycorhizées ou de sporophores a été effectuée en utilisant la technique de PCR/RFLP appliquée à l'ITS. Des profils de fragments de restrictions obtenus avec les enzymes *Msp* I et *Hinf* I de l'ITS des différentes souches sont représentés sur la figure 9

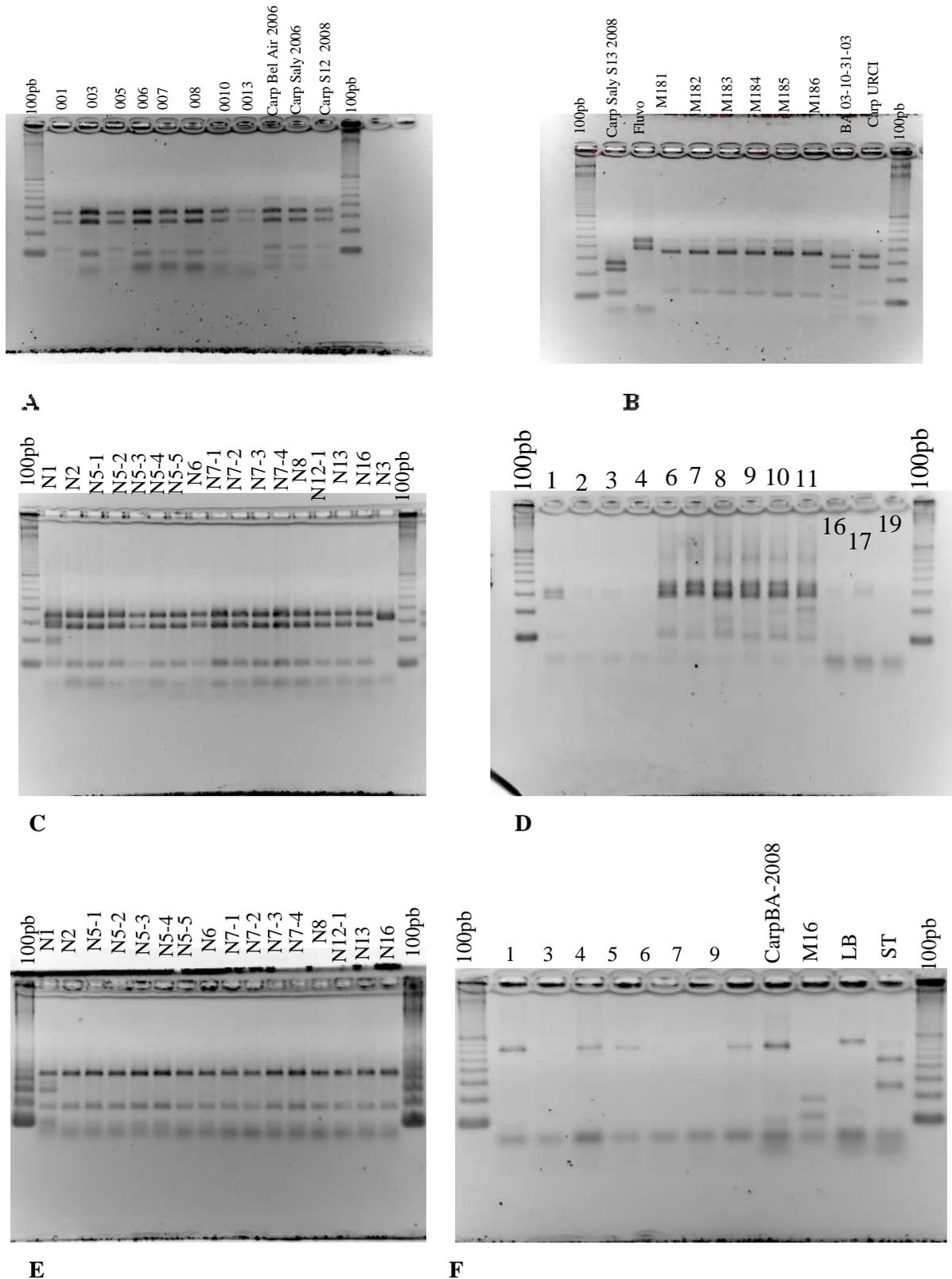


Figure 9 : Profils de restriction de l'ITS d'ectomycorhizes récoltés au Sénégal (A) et en Guadeloupe (B) avec l'enzyme *Hinf* I ; de sporophores récoltés au Sénégal (C) et d'ectomycorhizes récoltés en Guadeloupe (D) avec l'enzyme *Hinf* I ; de sporophores (E) et de racines ectomycorhizées récoltés au Sénégal de 1 à 9 + *Laccaria*, M16 et *Sillus* (F) obtenus avec l'enzyme *Msp*I ; M= marqueur de poids moléculaire

Tableau 3 : Groupage des profils RFLP de l'ITS

Groupes RFLP	Souches
Groupe 1	001 005 Isolé de CarpBA 2006 Isolé de CarpS 2006 S12-2008 BA 03-10-31-03 BA 10-12-2006 003 006 007 008 0010 0013 CarpURCI CarpBA-2008 Racines LCM Racines Saly 4 Racines Saly 5 Racines Saly 6 Racines Saly 9 Racines Saly 14 Racines Fatick Racines ecto blanche Guadeloupe 1 Racines ecto blanche Guadeloupe 2 Racines ecto blanche Guadeloupe 3 Racines ecto blanche Guadeloupe 4 Racines ecto blanche Guadeloupe 5 Racines ecto blanche Guadeloupe 16 Carp N1 BA 06-05-08 Carp N2 BA 06-05-08 Carp N5-1 Saly Rambeau Carp N5-2 Saly Rambeau Carp N5-3 Saly Rambeau Carp N5-4 Saly Rambeau Carp N5-5 Saly Rambeau Carp N6 Saly Dieynaba Carp N7-1 Saly Dieynaba Carp N7-2 Saly Dieynaba Carp N7-3 Saly Dieynaba Carp N7-4 Saly Dieynaba Carp N8 Saly Seydina CarpN12-1 Saly Reception CarpN13 Saly Reception CarpN16 Saly Reception CarpN3 URCI
Groupe 2	M 181 M 182 M 183 M 184 M 185 M 186

Deux types de profils différents et correspondants à 2 groupes de champignons différents ont été obtenus (tableau 3). Toutes les quatre enzymes de restriction utilisées ont données les mêmes types de groupages. Le groupe 1 renferme le plus grand nombre de souches et toutes correspondent à des ectomycorhizes blanches. Les résultats semblent montrer un groupage en fonction de la couleur de l'ectomycorhize et de la provenance. Les souches M181, M182, M183, M184, M185 et M186, de couleur noire, en provenance de la Guadeloupe forment un groupe à part, différent du premier.

Les résultats de la caractérisation par PCR-RFLP des sporophores récoltés au Sénégal sont consignés sur le tableau 3. Ils montrent que tous les sporophores, bien que récoltés à des endroits et dans des zones différents, ont le même profil RFLP de l'ITS. Ce profil est identique à celui des champignons ectomycorhiziens du groupe 1 qui renferme des ectomycorhizes blanches.

La caractérisation par PCR-RFLP des racines récoltées à Saly, Fatick et Bel Air qui contiennent des ectomycorhizes blanches a donné également des profils identiques à celui du groupe 1. Ces premiers résultats semblent montrer, au Sénégal, une prépondérance des ectomycorhizes blanches avec une large distribution suivant le gradient de salinité de Fatick-Saly-Bel Air.

Les racines avec des ectomycorhizes blanches récoltées en Guadeloupe montrent le même type de profils (Groupe 1) que celles récoltées au Sénégal.

L'amplifier de l'ADN extrait des échantillons de racine ectomycorhizées de couleur brun foncé, orange-clair, brun clair, brune, brune à brun foncé en provenance de la Guadeloupe, en utilisant les amorces ITS1, ITS1-F, ITS4 et ITS-4B n'a pas été réussie.

2.2. Séquençage

Quelques représentants du groupe 1 (ectomycorhizes blanches : Carp URCI, 006, Carp Saly 2006) ont été séquencés. La comparaison des séquences obtenues a permis de constater que les champignons ectomycorhiziens de ce groupe sont proches du *Scleroderma bermudense*. Des représentants du groupe 2 (ectomycorhizes noires : M181 et M185) ont été également séquencés. Les résultats ont montrés que ces champignons étaient différents de ceux des groupes 1 et qu'ils été proches des Thelephoroïdes (voir figure ci-dessous).

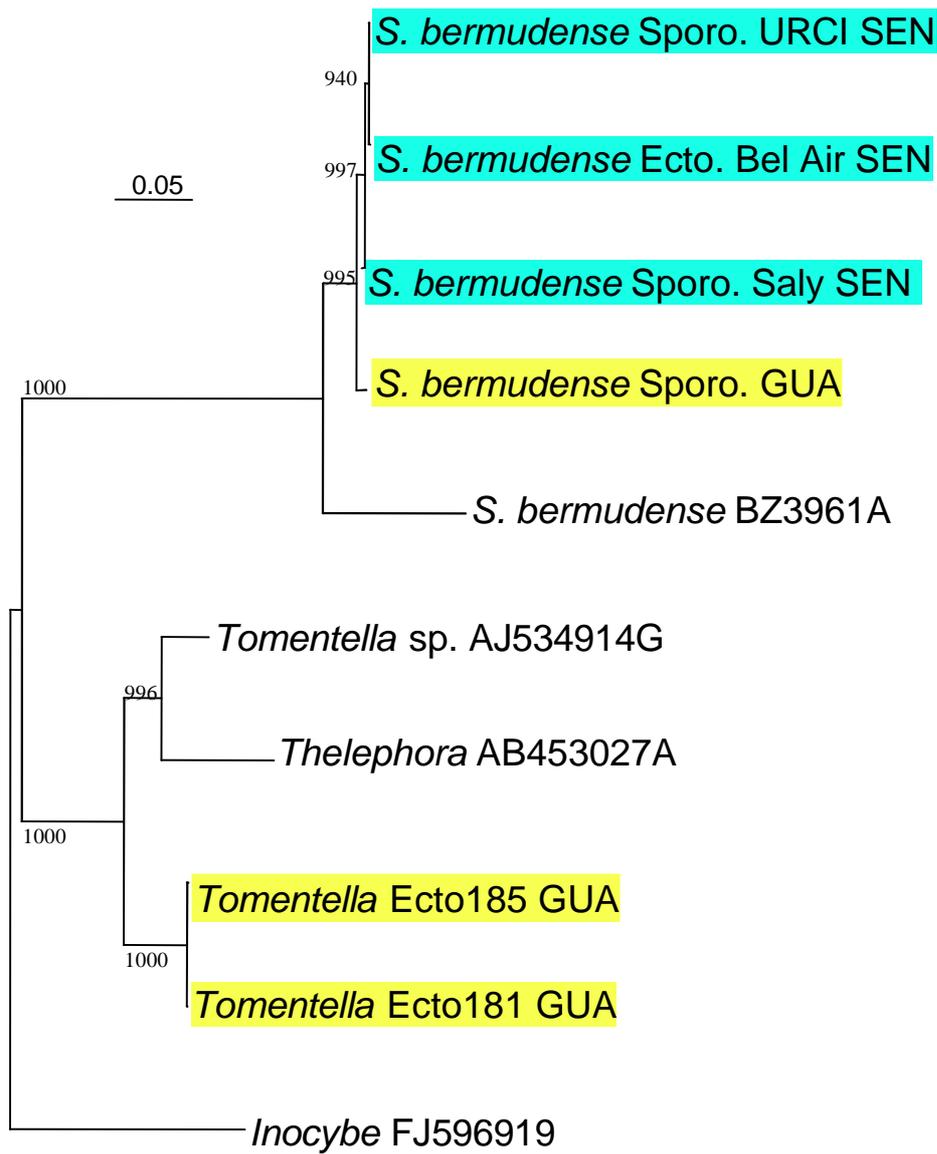


Figure 10 : Position phylogénétique de quelques sporophores et ectomycorhizes provenant de la Guadeloupe (jaune) et du Sénégal (bleu) par rapport à des souches de référence

3. Etude de la spécificité des champignons ectomycorhiziens de *Casuarina equisetifolia* et d'*Eucalyptus camaldulensis* sur *Coccoloba uvifera*

Elle a été effectuée pour évaluer les possibilités de symbiose entre *C. uvifera* et les champignons ectomycorhiziens de *C. equisetifolia* et d'*E. camaldulensis* et vis-versa en croisant les trois espèces. Chacune d'elle a été cultivée sur du sol prélevé sous *E. camaldulensis*, *C. uvifera* et *C. equisetifolia* et les poids frais et sec de racines et de parties aériennes ont été mesurés.

3.2. Morphotypage des ECM de *C. uvifera*, d'*E. camaldulensis* et de *C. equisetifolia*

Les racines des plants de *C. equisetifolia* n'ont pas été mycorhizées dans les trois types de sol du fait que les plants ne s'étaient pas bien développés.

Des ECM blanches ont été identifiées sur les racines des plants d'*E. camaldulensis* cultivés sur du sol prélevé sous *E. camaldulensis*. Par contre, les racines des plants d'*E. camaldulensis* cultivés sur du sol prélevé sous *C. uvifera* et de *C. equisetifolia* n'ont pas été mycorhizées.

Sur les racines des plants de *C. uvifera* cultivés sur du sol prélevé sous *E. camaldulensis* et de *C. uvifera*, des ECM blanches ont été également identifiées. Cependant sur du sol prélevé sous *C. equisetifolia*, les racines des plants de *C. uvifera* n'ont pas été mycorhizées

3.3. Caractérisation moléculaire des morphotypes

Les profils de restriction obtenus avec les enzymes *Hae* III et *Msp* I de l'ITS des ECM de *C. uvifera*, de *S. bermudense* et du *Scleroderma* récolté sous *Eucalyptus* sont représentés sur la figure 13. Le profil obtenu avec les ECM de *C. uvifera* sur du sol prélevé sous *Coccoloba* est identique à celui obtenu avec les ECM de *C. uvifera* sur du sol prélevé sous *Eucalyptus*. Ces deux profils sont identiques à celui de *S. bermudense*. Cependant, la digestion du produit PCR de l'extrait d'ADN du *Scleroderma* récolté sous le houppier d'*E. camaldulensis* a donné un profil différent de celui de *S. bermudense*.

Ces résultats confirment nos premiers résultats qui suggéraient qu'au Sénégal, *C. uvifera* ne pouvait mycorhizer qu'avec les ectomycorhizes blanches plus particulièrement avec *S. bermudense*.

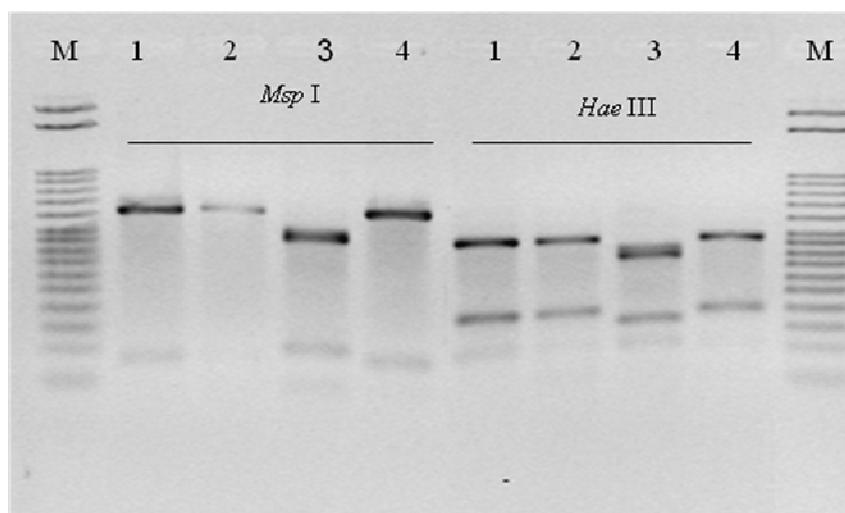


Figure 11 : Profil *Msp I* et *Hae III* des ECM de *C. uvifera*, d'un sporophore de *Scleroderma* récoltés sous *Eucalyptus camaldulensis* et d'un sporophore de *S. bermudense* récoltés sous *C. uvifera*.

1= racine de *Coccoloba* sur sol de *Coccoloba* ; 2= racine de *Coccoloba* sur sol d'*Eucalyptus* ; 3= *Scleroderma* récolté sous *Eucalyptus* ; 4= *Scleroderma bermudense* ; M= marqueur de poids moléculaire

4. Tolérance à la salinité des champignons ectomycorhiziens en culture in vitro

Parmi les souches de champignons ectomycorhiziens qui ont été isolées et mise en collection au LCM, 4 ont été choisies dont une ont été isolée au Sénégal (BA 001) et les trois autres (M185, S.sp1 et BA) en Guadeloupe. La souche M185 est un représentant du groupe ITS 2, identifié comme étant très proche des Thelephoroïdes. La souche BA001 est un représentant du groupe ITS 1, isolé à Bel Air, très proche du *S. bermudense*. Les souches BA et S.sp1 sont des *S. bermudense* qui ont été isolés en Guadeloupe, respectivement en milieu salé et non salé. Les résultats de l'analyse statistique des mesures de croissance radiales sont consignés sur le Tableau 4. Dans l'ensemble, la taille des colonies diminue avec le gradient de sel. Cependant une différence a été notée entre les souches sur la taille des colonies suivant les concentrations en sel à la fin de la culture.

La souche BA présente une meilleure croissance à 0 Mm avec un rayon moyen de 30.4 mm. A 50 Mm la taille moyenne des colonies est réduite de 7.3 mm et à 100 et à 200 mM elle est réduite au tiers.

Pour la souche M185, il n'y a pas de différence significative sur la taille des colonies entre 0, 50 et 100 mM de NaCl. Cependant à 200 mM, la taille moyenne des colonies est très réduite

Les tailles moyennes des colonies à 0 et à 50 mM de NaCl ne présentent également pas de différences significatives pour la souche BA001. Cependant la croissance de cette souche est fortement réduite à 100 et à 200 mM.

La souche S.sp1 présente une meilleure croissance à 0 mM avec un rayon moyen de 8.4 mm. Notons que cette souche croit de façon très lente sur milieu MNM normal. Une réduction de la croissance a été observée à 50, 100, et 200 Mm de NaCl.

Tableau 4 : Effet du NaCl sur la croissance radiale des champignons ectomycorhiziens

souches	NaCl (Mm)	Croissance radiale
BA	0	30,4 f
	50	23,1 e
	100	10,8 b
	200	10,2 b
S.sp1	0	8,4 ab
	50	5,8 a
	100	5,6 a
	200	5,1 a
BA 001	0	19,3 cde
	50	16,5 cd
	100	7,7 ab
	200	5,5 a
M185	0	21,8 e
	50	20,5 de
	100	15,2 c
	200	7,5 ab

Les résultats de l'analyse statistique des données de poids sec des mycéliums sont consignés sur le Tableau 5. Ces résultats montrent les mêmes tendances que celles observées au niveau de la croissance radiale.

Toutes les souches testées tolèrent les différentes concentrations de NaCl parce que parvenant à pousser sur milieu MNM avec ces différentes concentrations de sel. Néanmoins, la croissance de la souche BA001 semble être plus affectée que celle des souches BA et M185, S13 notamment aux concentrations de 100 et 200 mM de NaCl. Par contre elle est plus tolérante que la souche S.sp1 à la concentration de 200 mM.

La souche BA tolère plus le NaCl que la souche M185 à la concentration de 200 mM. La souche BA est un *S. bermudense* isolé en milieu salé. Elle est plus tolérante au NaCl que la souche S.sp1 qui est également un *S. bermudense* mais qui a été isolé en milieu non salé.

Le NaCl semble avoir un effet stimulateur sur la croissance de la souche S13 provenant de milieu salé aux concentrations de 50 et 100 mM.

Le NaCl réduit la croissance de S.sp1 qui est un *Scleroderma bermudense* récolté en milieu non salé.

Tableau 5 : Effet du NaCl sur le poids sec du mycélium des champignons ectomycorhiziens

souches	NaCl (mM)	Poids sec mycélium
BA	0	0,057 d
	50	0,053 d
	100	0,051 cd
	200	0,039 bc
S.sp1	0	0,014 a
	50	0,013 a
	100	0,014 a
	200	0,007 a
BA 001	0	0,051 cd
	50	0,050 cd
	100	0,040 d
	200	0,032 b
M185	0	0,005 a
	50	0,003 a
	100	0,003 a
	200	0,002 a

Discussion

DISCUSSION

1. Diversité des champignons ectomycorhiziens en Guadeloupe et au Sénégal

De nombreuses communautés de champignons ectomycorhiziens ont été décrites sur la base d'inventaires de sporophores (Ferris *et al.*, 2000). Dans les 20 sporophores qui ont été récoltés, six espèces de champignons présumés ectomycorhiziens ont été identifiées sous *C. uvifera* en Guadeloupe : *Inocybe xerophytica*, *I. littoralis*, *Russula cremeolilacina*, *Amanita arenicola*, *Cantharellus cinnabarinus* et *Scleroderma bermudense*. Ces six champignons avaient déjà été répertoriés sous *C. uvifera* sur différentes plages en Guadeloupe (Bandou, 2005) En revanche, tous les sporophores récoltés au Sénégal ont été identifiés au *Scleroderma bermudense*.

L'inventaire des ECM est une approche qui permet aussi d'accéder à la composition des communautés fongiques (Agerer, 1991). En Guadeloupe, 23 échantillons d'ECM ont été inventoriés dont 6 blanches, 6 brun foncé, 4 orange-clair, 1 brun clair, 1 brune, 4 brune à brun foncé. Au Sénégal toutes les ECM inventoriées ont été de couleur blanche.

L'utilisation des outils de la biologie moléculaire (p.ex. amplification et séquençage de l'ADNr) permet de franchir les limites du morphotypage des ECM et de l'inventaire des sporophores notamment chez les champignons dont la fructification est aléatoire (Gehring *et al.*, 1998 ; Taylor et Bruns, 1999 ; Kõljalg *et al.*, 2000).

En effet, l'analyse phylogénétique des ectomycorhizes de *C. uvifera* par séquençage partiel de la grande sous-unité de l'ADNr mitochondriale montre que les morphotypes blancs inventoriés en Guadeloupe et au Sénégal sont très proche de *S. bermudense*. Cependant, les morphotypes bruns foncé ont été très proches des *Thelephoraceae*, absentes des relevés de basidiomes de *C. uvifera* effectués en Guadeloupe (Diédhiou et Bâ, comm.pers.). Ces résultats suggèrent que la diversité des basidiomes donne une image biaisée de la diversité des champignons associés à *C. uvifera*. Un inventaire plus exhaustif des ectomycorhizes s'avère donc nécessaire pour avoir une image plus exacte de la diversité des communautés de champignons ectomycorhiziens inféodées à *C. uvifera* en Guadeloupe (Horton & Bruns, 2001).

Au Sénégal, les sporophores et les ECM blanches ont été identifiés au *S. bermudense*.

Eucalyptus camaldulensis et *Casuarina equisetifolia* sont parmi les espèces ectomycorhiziennes les plus dominantes du Sénégal. Elles sont originaires d'Australie et ont

été introduites dans cette zone avec leurs associés fongiques depuis plusieurs années (Ducouso *et al.*, 2003).

Les *Eucalyptus* ont été trouvés en symbiose avec *Pisolithus* sp, *S. verrucosum*, *Phlebopus sudanicus* et *S. capense* dont des sporophores en fructification ont été récoltés sous le houppier d'*E. camaldulensis* à Bel-air. *Casuarina equisetifolia* a été trouvé en symbiose avec *Pisolithus* sp. et *Phlebopus sudanicus* au Sénégal (Ducouso, 1991).

Les résultats du croisement de ces deux espèces avec *C. uvifera* ont montré que ce dernier ne pouvait pas mycorhizer avec les symbiotes ectomycorhiziens d'*E. camaldulensis* et de *C. Equisetifolia*. En effet, des ECM blanches ont été trouvées sur les racines des plants de *C. uvifera* cultivés sur du sol prélevé sous *Eucalyptus*. Ces ECM blanches ont été identifiées par PCR/RFLP au *S. bermudense* qui fructifie sous le houppier de *C. uvifera* à Bel-air.

Les champignons ectomycorhiziens sont présents dans le sol sous forme de propagules de conservation et de dissémination (p.ex. spores, vieilles mycorhizes, cordons mycéliens) (Bâ *et al.*, 1991). Ce résultat suggère alors que les spores du *S. bermudense* qui fructifie sous *C. uvifera* ont été disséminées dans l'espace et se sont retrouvées sous l'arbre adulte d'*E. camaldulensis* qui se trouve à cinq mètres de l'arbre adulte de *C. uvifera* à Bel-air. Ces spores seraient alors responsables de la mycorhization des plants de *C. uvifera* sur du sol prélevé sous *E. camaldulensis*, ce qui expliquerait l'identification des ECM blanches de *Coccoloba* sur du sol prélevé *Eucalyptus* au *S. bermudense*.

En Guadeloupe *S. bermudense* est la seule espèce de champignon ectomycorhizien qui a été récoltée sous le houppier de *C. uvifera* en milieu salé. Ceci suggère qu'elle est inféodée à la plante hôte. *S. bermudense* aurait alors été apporté avec les graines de *C. uvifera* lors de son introduction au Sénégal. L'inoculation avec *S. bermudense* serait alors nécessaire pour l'introduction de *C. uvifera* dans la zone des Niayes au Sénégal.

2. Tolérance à la salinité des champignons ectomycorhiziens en culture in vitro

Il existe des champignons qui vivent en milieu marin à des concentrations supérieures à 500 mM de NaCl (Clipson et Jennings, 1992). Dans de telles conditions, ces champignons sont capables d'accumuler des ions toxiques et d'augmenter leur potentiel osmotique (Munns, 2002). En effet, les champignons ont recours à la compartimentation vacuolaire des ions toxiques et à la production de quantités importantes de glycérol et de mannitol qui jouent le rôle d'osmorégulateur (Clipson et Jennings, 1992). Cette compartimentation des ions toxiques préserve les activités enzymatiques qui interviennent dans la synthèse de protéines (Serrano,

1996; Parida et Das, 2005). Toutefois, la tolérance au sel des champignons peut varier significativement entre espèces (Dixon *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2001; Kernaghan *et al.*, 2002).

Les résultats de notre expérience ont montré que la souche M185 qui est un *Telophora*, tolère mieux les fortes concentrations de sel que la souche BA001 qui est un *S. bermudense* récolté au Sénégal, notamment à 200 mM de NaCl. La tolérance au sel peut également varier entre différentes souches d'une même espèce, isolées à des endroits différents. Il a été démontré entre deux souches de *S. bermudense* isolées l'une en milieu salé et l'autre en milieu moins salé, une différence dans la tolérance au sel. Celle isolée en milieu salé tolérant mieux les fortes teneurs en sel que celle isolée en milieu moins salé (Bandou, 2006). Les résultats des analyses de nos données de croissance radiale et de poids sec, ont montré que la souche BA qui est un *S. bermudense* isolé de milieu salé en Guadeloupe, tolère mieux le sel que la souche S.sp1 qui est également un *S. bermudense* isolé de milieu non salé en Guadeloupe.

Ces souches qui tolèrent le stress salin seraient alors capables de compartimenter les ions toxiques dans leurs vacuoles et de synthétiser des osmorégulateurs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail nous a permis d'identifier à partir de sporophores, sept espèces de champignons ectomycorhiziens (*Inocybe xerophytica*, *I. littoralis*, *Russula cremeolilacina*, *Amanita arenicola*, *Cantharellus cinnabarinus*, *C. sp* et *Scleroderma bermudense*) inféodées à *C. uvifera* en Guadeloupe. Sept morphotypes de différentes couleurs (blanches, brun foncé, orange-clair, brun clair, brune, brune à brun foncé) ont été également répertoriés en Guadeloupe. L'utilisation d'outils moléculaires (PCR/RFLP et séquençage de l'ITS) nous a révélé que les morphotypes brun étaient reliés aux Thelephoroïdes qui ont été absents dans nos relevés de Sporophores. La diversité des sporophores ne reflète donc pas celle des ECM. Une identification des autres morphotypes à l'aide d'outils moléculaires est envisagée.

Au Sénégal, seul des ECM blanches ont été répertoriées. L'ensemble de ces ECM et des sporophores récoltés sous le houppier de *C. uvifera* au Sénégal ont été identifiés au *S. bermudense*.

Nous avons également noté que *C. uvifera* ne formait pas d'ectomycorhizes avec les symbiotes fongiques des espèces végétales ectomycorhiziennes du Sénégal que sont *E. camaldulensis* et *C. equisetifolia*. En effet sur les plants de *C. uvifera* cultivés sur du sol prélevé sous *E. camaldulensis*, les ECM blanches qui ont été répertoriées correspondaient au *S. bermudense*. Ces résultats suggèrent que *C. uvifera* n'est pas compatible avec la microflore symbiotique du Sénégal et que *S. bermudense* aurait alors été apporté avec les graines de *C. uvifera* lors de son introduction au Sénégal.

Un inventaire plus exhaustif des sporophores et des ectomycorhizes devrait être envisagé dans l'archipel de la Guadeloupe pour avoir une bonne image de la diversité des champignons ectomycorhiziens de *C. uvifera*.

Un autre aspect de notre travail a consisté à évaluer les effets du NaCl sur la croissance *in vitro* des champignons ectomycorhiziens. Nous avons montré que la tolérance à la salinité des souches dépendait de l'espèce, du lieu d'isolement et de la concentration des sels.

De façon générale, les souches originaires de milieux non salés (BA001, M185 et S.sp1) tolèrent moins le NaCl que les souches de milieux salés (*S. bermudense* BA et la souche indéterminée S13). La souche M185 qui est un Thelephoroïde tolère mieux le NaCl que la souche BA001. La croissance radiale de la souche S13 semble être stimulée par le NaCl aux concentrations de 50 et 100 mM. Cependant, un échantillonnage plus représentatif de la diversité des champignons ectomycorhiziens de *C. uvifera* devrait nous permettre de sélectionner une souche bien adaptée aux stress hydrique et salin.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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
- Agerer, R., 1995.** Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas : an attempt towards a natural classification. *Mycorrhiza*, Varma A and Hock B eds. Springer-Verlag Berlin heidelberg ; pp.686-733.
- Alem, C. et Amri, A., 2005.** Importance de la stabilité des membranes cellulaires dans la tolérance à la salinité chez l'orge. *Reviews in Biology and Biotechnology* **4**(1): 20-31.
- Augé, R.M., 2001.** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11** : 3-42
- Bâ, A. M. et Thoen, D., 1990.** First syntheses of ectomycorrhizas between *Afzelia africana* Sm. and native fungi from West Africa. *New Phytologist* **103**: 441-448.
- Bâ, A.M., Garbaye, J et Dexheimer, J., 1991.** Influence of fungal propagules during the early stade of the time sequence of the ectomycorrhizal colonization of *Afzelia Africana* Sm. seedlings. *Canadian Journal of Botany*. **66** : 2442-2447.
- 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, **50p**.
- Bandou E., Lebailly, F., Muller, F., Dulormne, M., Toribio, A., Chabrol, J., Courtecuisse, R., Plenchette, C., Prin, Y, Duponnois, R., Thiao, M., Sylla, S., Dreyfus, B. et Bâ, A.M., 2006.** The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. *Mycorrhiza*. **16** : 559-565.
- Berthomieu, P., Conjero, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P. A., Tester, M., Very, A.-A., Senetac, H. et Casse F., 2003.** Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *Embo Journal* **22**: 2004-2014.
- Béguiristain, T. et Lapeyrie, F., 1997.** Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phyto*. **136**: 525-532.

- Blaudez, D., Botton, B. et Chalot, M., 2000.** Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*. **146**: 1109-1117.
- Bogeat-Triboulot, M. I., Bartoli, F., Garbaye, J., Marmeisse, R. et Tagu, D., 2004.** Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings. *Plant and Soil*. **267**: 213-223.
- Boukcim, H. et Plassard, C., 2003.** Juvenile nitrogen uptake capacities and root architecture of two open-pollinated families of *Picea abies*. Effect of nitrogen source and ectomycorrhizal symbiosis. *J. Plant Physiol*. **160**: 1211-1218.
- Bradley, R., Burt, A.J. et Read, D.J., 1981.** Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature*. **292**:335-337.
- Brownlee, C., Duddridge, J.A., Malibari, A. et Read, D.J., 1983.** The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. *Plant and Soil*. **71**:433-443.
- Bruns, T.D., Szaro, T.M., Gardes, M., Cullings, K.W., Pan, J.J., Taylor, D.L., Horton, T.R., Kretzer, A., Garbelotto, M. et Li, Y., 1998.** A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Mol. Ecol*. **7**: 257-272.
- Bush, C. S. et Morton, J. F., 1969.** Native Trees and Plants for Florida Landscaping. Bulletin No.193, Department of Agriculture - State of Florida.
- Buyck, B., Thoen, D. et Watling, R., 1996.** Ectomycorrhizal fungi of the Guineo-Congo Region. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh 104B : 313-333.
- Chen, D. M., Ellul, S., Herdman, K. et Cairney, J. W. G., 2001.** Influence of salinity on biomass production by Australian *Pisolithus spp.* isolate. *Mycorrhiza* **11**: 231-236.
- Clipson, N. J. W. et Jennings, D. H. 1992.** *Dendryphiella salina* and *Debaryomyces hansenii* : models for ecophysical adaptation to salinity by fungi that grow in the sea. *Canadian Journal of Botany* **41**: 2091-2105.
- Colpaert, J.V. et Van Laere, A., 1996.** A comparison of the extracellular enzyme activities of two ectomycorrhizal and a leaf-saprotrophic basidiomycete colonizing beech leaf litter. *New Phyto*. **133**: 133-141.

- Conn, C. et Dighton, J., 2000.** Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil, Biol. and Biochem.* **32**: 489-496.
- Crawford, B. et Peterson, L. E., 1997.** Forest Trees of Florida, Florida Forestry Association, United States Department of Agriculture.
- Davet, P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, 383p.
- DEFCCS (2003).** Élaboration 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, J.C. et 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, A.G., Bâ, A.M., Sylla, S. Nd., Dreyfus, B., Neyra, M. et Ndoye I., 2004.** The early-stage ectomycorrhizal Thelephoroid fungal sp. is competitive and effective on *Afzelia africana* Sm. In nursery conditions in Senegal. *Mycorrhiza*. **14**: 313-322.
- Diez, J., 2005.** Invasion biology of Australian ectomycorrhizal fungi introduced with eucalypt plantations into the Iberian Peninsula. *Biological Invasions* **7**: 3–15.
- Ditengou, F.A. et Lapeyrie, F., 2000.** Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not symbiotic auxins in eucalypt seedlings. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 151-158.
- Dix, P. J. et Pearce, P. S., 1981.** Proline accumulation in NaCl resistant and sensitive cells of *Nicotiana sylvestris*. *Z pflanzenphysiol.* **120(s)**: 243-248.
- Dixon, R. K., Rao, M. V. et Garg, V. K., 1993.** Salt stress affects *in vitro* growth and *in situ* symbioses of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **3**: 63-68.
- Duchesne, L.C., Ellis, B.E. et Peterson, R.L., 1989.** Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Puxillus incolutus*: contribution of oxalic acid. *Can. J. Bot.* **67**: 2726-2730.

- Ducouso, M., Bâ, A. M. et 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.
- Duddridge, J.A., Malibari, A. et Read, D.J., 1980.** Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature*. **287**: 834-836.
- Duponnois, R., Founoune, H.B., Plenchette, A.M., El jaafari, C., Neyra, S. et Ducouso, M., 2000.** Ectomycorrhization of *Acacia holosericea* A. Cunn. Ex G. Don by *Pisolithus* spp. In Senegal: effect on plant growth and on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Annals of Forest Sciences*. **57**: 345-350.
- Erland, S. et Taylor, A.F.S., 1999.** Resupinate ectomycorrhizal fungal genera. *In*: Ectomycorrhizal fungi – Key genera in profile (eds: J.W.G. Cairney & S.M. Chambers). Springer- Verlag: Germany, pp347-363.
- Ferris R., Peace, A.J. et Newton, A.C., 2000.** Macrofungal communities of lowland Scots pine (*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.
- Finlay, R.D., Frostegard, A. et Sonnerfeldt, A.M., 1992.** Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougal. Ex Loud. *New Phytol.* **120**: 105-115.
- Flowers, T. J., Troke, P. F. et Yeo, A. R., 1977.** The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **28**: 89-121.
- Gardes, M., White, T.J., Fortin, J.A., Bruns, T.D. et Taylor, T.W., 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.
- Gay, G., 1990.** Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in de-rooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. *Can. J. Bot.* **68**: 1265-1270.
- Garbaye, J., Churin, J.L. et Duponnois, R., 1992.** Effects of substrate sterilization, fungicide treatment, and mycorrhization helper bacteria on ectomycorrhizal formation of pendunculate oak (*Quercus robur*) inoculated with *Laccaria laccata* in two peat bare-root nurseries. *Biology and Fertility of Soils*. **13**: 55-57.

- Garbaye, J. et Guehl, J.M., 1997.** Les rôles des ectomycorhizes dans l'utilisation de l'eau par les arbres forestiers. *Rev. For. Fr.* **49**: 110-120.
- Gehring, C.A., Theimer, T.C., Whitham, T.G. et Keim, P., 1998.** Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology*. **79**: 1562-2572.
- Greenway, H. et Munns, R., 1980.** Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **31**: 149-190.
- Guzman, G., Tapia, F., Ramirez-Guillen, F., Baroni, T. J., Lodge, D. J., Cantrell, S. A. et Nieves-Rivera, A. M., 2003.** New species of *Psilocybe* in the Caribbean, with an emendation of *P. guilartensis*. *Mycologia* **95**(6): 1171-1180.
- Guzman G., Ramirez-Guillen, F., Miller, O.K., Jr., Lodge, D.J. et Baroni, T.J., 2004.** *Scleroderma stellatum* versus *Scleroderma bermudense* : the status of *Scleroderma echinatum* and the first record of *Veligaster nitidum* from the Virgins Islands. *Mycologia*. **96**(6): 1370-1379.
- Hallenberg, N et Küffer, N., 2001.** Long-distance spore dispersal in wood-inhabiting Basidiomycetes. *Nordic Journal of Botany* **21**: 431–436.
- Halling RE. 2001.** Ectomycorrhizae: co-evolution, significance, and biogeography. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**: 5–13.
- Henkel, T.W., Terborgh, J. et Vilvalys, R., 2002.** Ectomycorrhizal fungi and their leguminous hosts in the Pakaraima Mountain of Guyana. *Mycological Research*. 106: 515-531.
- Hibbett, D.S., Gilbert, L.B. et Donoghue, M.J., 2000.** Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* (London) **407**: 506-508.
- Hilbert, J.L., Costa, G. et Martin, F., 1991.** Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhizal development. *Plant physiology*. **97**: 977-984.
- Horton, T. R. et Bruns, T. D., 2001.** The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*. **10**: 1855–1871.
- Jacobson, K.M., Miller, O.K. Jr. et Turner, B.J., 1993.** Randomly amplified polymorphic DNA makers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes and

natural populations of ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. The Proceedings of the *National Academy of Science (US)* **90**: 9159-9163.

Karabaghli-Degron, C., Sotta, B., Bonnet, M., Gay, G. et Le Tacon, F., 1998. The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phyto.* **140**: 723-733.

Keeney, D.R., 1980. Prediction of soil nitrogen availability in forest ecosystems: a literature review. *For. Sci.* **26**: 159-171.

Kernaghan, G., Hambling, B., Fung, M. et Khasa, D., 2002. *In Vitro* Selection of Boreal Ectomycorrhizal Fungi for Use in Reclamation of Saline-Alkaline Habitats. *Restoration Ecology* **10**(1): 43-51.

Kim, S.J., Hiremath, S.T. et Podila, G.K., 1999. Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Mycol. Res.* **103**: 168-172.

Köljalg, U., Dahlberg, A., Taylor, A.F.S., Larsson, E., Hallenberg, N., Stenlid, J., Larsson, K.H., Fransson, P.M., Kårén, O. et Jonsson, L., 2000. Diversity and abundance of resupinate theleporoid fungi as ectomycorrhizal symbionts in Swedish boreal forests. *Mol. Ecol.* **9**: 1985-1996.

Kreisel, H., 1971. Ektotrophe mycorrhizal infection in an Amazonian rainforest. *Acta Amazonica.* **10**: 527-533.

Lagrange, H., Jay-Allmand, C. et Lapeyrie, F., 2001. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentration. *New Phyto.* **149**: 349-355.

Landerweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D., Kuyper, T.W. et Van Breemen, N., 2001. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol. Evol.* **16**: 248-254.

Lapeyrie, F., Ranger, J. et Vairelled, D., 1991. Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. *Can. J. Bot.* **69**: 342-346.

Lindhauer, M.G., 1985. Influence of K nutrition and drought on water relation and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Zeitung Pflanzenernähr. Bodenk.* **148**: 654-669.

- Marmeisse, R., Guidot, A., Gay, G., Lambillotte, R., Sentenac, H., Combier, J. P., Melayah, D., Fraissinet-Tachet L., et Debaud, J. C., 2004.** *Hebeloma cylindroporum*- a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from the gene to ecosystem. *New Phytologist* **163**: 481-498.
- Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet C. et Lapeyrie, F., 2001.** Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis : signals and communication genes. *New Phytologist* **151**: 145-154.
- Marx, D. H., 1969.** The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots on pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*. **59**: 153-163.
- Marx, D. H., 1972.** Ectomycorrhizae as Biological Deterrents to Pathogenic Root Infections. *Ann. Rev. Plant. Phytopatol.* **10**: 429-454.
- Marx, D.H., 1980.** Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and re-isolation. *Can. J. For. Res.* **11**: 168-174.
- Mexal, J. et Reid, C. C. P., 1973.** The growth of selected mycorrhizal fungi in reponse to induced water stress. *Canadian Journal of Botany* **51**: 1579-1588.
- Miller, O.K., Jr., Lodge, D.J. et Baroni, T.J., 2000.** New and interesting ectomycorrhizal fungi from Porto-Rico, Mona, and Guana islands. *Mycologia* **92** : 558-572.
- Mounichy, D., 2004.** Les ectomycorhizes de *Coccoloba uvifera* (L) L. en Guadeloupe : Aspects morphologiques et fonctionnels. Pointe-à-Pitre, Université des Antilles et de la Guyane: **17p**.
- Mousain, D., 1989.** Etude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse de Doctorat d'Etat, USTL Montpellier II, 279p.
- 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.
- Munns, R., 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* **25**(2): 239-250.
- Munns, R. et Tester, M., 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59** : 651-681.

- Muñoz, J., Felicísimo, A.M., Cabezas, F., Burgas, A.R., Martínez, I., 2004.** Wind as a long distance dispersal vehicle in the Southern Hemisphere. *Science* **304**: 1144–1147.
- Normand, L., Bärtschi, H., Debaud, J.C. et Gay, G., 1996.** Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Physiol. Plant.* **98**: 759-766.
- Onguene, N.A. et Kuyper, T.W., 2002.** Importance of the ectomycorrhizal network for seedling survival and ectomycorrhiza formation in rain forests of South Cameroon. *Mycorrhiza* **12** : 13–17.
- Olsson, P.A., Chalot, M., Baath, E., Finlay, R.D. et Soderstrom, B., 1996.** Ectomycorrhizal mycelia reduce bacterial activity in a sandy soil. FEMS, *Microbiology Ecology.* **21**: 77-86.
- Parida, A. K. et Das, A. B., 2005.** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**: 324-349.
- Parrotta, J. A., 1994.** *Coccoloba uvifera* (L.) L. Sea grape, uva de playa. Research Note SOITF-SM-74. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, New Orleans, LA.: 5 p.
- Pegler, D. N., 1983.** Agaric Flora Of The Lesser Antilles. London, Royal Botanic Garden.
- Perret, X., Staehelin, C. et Broughton, W. J., 2000.** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- Plassard, C., Guérin-Laguette, A., Véry, A.-A., Casarin, V. et Thibaud, J.B., 2002.** Local measurements of nitrate and potassium fluxes along roots of maritime pine. Effects of ectomycorrhizal symbiosis. *Plant, Cell and Environment.* **25**: 75-84.
- Portecop, J. et Le Brun, P., 2003.** Arbres indigènes des Antilles, Tome I, p 14-15.
- Rasanayagam, S. et Jeffries, P., 1992.** Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* **11**: 971-976.
- Raymond, A., 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 : Écosystèmes Naturels et Exploités, Université des Antilles et de la Guyane, **51p**
- Read, D. J., 1991.** Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* **47**: 376-389.

- Read, D. J., Leake, J. R. et Perez-Moreno, J., 2004.** Mycorrhizal fungi as driver of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian journal of botany* **82**: 1243-1263.
- Redecker, D., Szaro, T.M., Bowman, R.J. et Bruns, T.D., 2001.** Small genets of *Lactarius xanthalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Molecular Ecology*. **10**: 1025-1034.
- Rivière T., Diédhiou, A.G., Diabaté, M., Senthilarasu, K., Natarajan, K., Ducouso, M., Verbeken, A., Buyck, B., Dreyfus, B., Béna, G. et Bâ, A.M., 2007.** Genetic diversity of ectomycorrhizal Basidiomycetes in West African and Indian tropical rain forests. *Mycorrhiza*. **17** : 415-428.
- Sanon, B.K., Bâ, A.M., Delaruelle, C., Duponnois, R. et 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).
- Serrano, R., 1996.** Salt tolerance in plants and microorganisms : toxicity targets and defense responses. *International Review of Cytology* **165**: 1-52.
- Smit, E., Veenman, C. et Baar, J., 2003.** Molecular analysis of ectomycorrhizal basidiomycete communities in a *Pinus sylvestris* L. stand reveals long-term increased diversity after removal of litter and humus layers. *FEMS, Microbiology Ecology*. **45**: 49-57.
- Smith, S. et Read, J., 1997.** Mycorrhizal symbiosis. Oxford, *Clarendon Press*.
- Smith, S. et Read, J., 2008.** Mycorrhizal symbiosis, 3rd edition Hardcover. 800 p.
- Stendell, E.R., Horton, T.R et Bruns, T.D., 1999.** Early effects of prescribed fire on the structure of the ectomycorrhizal fungus community in a Sierra Nevada ponderosa pine forest. *Mycologia Research*. **103** : 1353-1359.
- Strullu, D.G., 1991.** Les relations entre les plantes et les champignons. Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées ; éd. Lavoisier, p. 9-49.
- Tagu, D., Rampant, P.F., Lapeyrie, F., Frey-Klett, P., Vion, P. et Villar, M., 2001.** Variation in the ability to form ectomycorrhizas in the F1 progeny of an interspecific poplar (*Populus* spp.) cross. *Mycorrhiza*. **10**: 237-240.
- Taylor, D.L. et Bruns, T.D., 1999.** Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule

communities. *Mol. Ecol.* **8**: 1837-1850.

Tedersoo, L., Pellet, P., Koljalg, U. et Selosse, M.A., 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey *Ericaceae* and *Orchidaceae*: ecological evidence for mixotrophy in *Pyroleae*. *Oecologia.* **151**: 206-217.

Toen, D. et Bâ, A. M., 1989. Ectomycorrhizae and putative ectomycorizal fungi of *Afzelia africana* Sm. and of *Uapaca guineensis* Müll. Arg. in southern Senegal. *New Phytologist* **113**: 549-559.

Tian, C. Y., Feng, G., Li, X. L. et Zhang, F. S., 2004. Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants. *Applied Soil Ecology* **26**(2): 143-148.

Tinker, P.B., Jones, M.D. et Durall, D.M., 1992. A functional comparison of ecto- and endomycorrhizas. in: D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter & I.J. Alexander (eds), *Mycorrhizas in ecosystems*, pp. 303-310. Wallingford, CAB International.

Tuxbury, S.M. et Salmon, M., 2005. Competitive interactions between artificial lighting and natural cues during seafinding by hatchling marine turtles. *Biological Conservation.* **121** : 311-316.

Vogt, K.A., Grier, C.C., Meier, C.E. et Edmonds, R.L., 1982. Mycorrhizal role in net primary production and nutrient cycling in *Abies amabilis* ecosystems in western Washington. *Ecology.* **63**: 370-380.

Voiblet, C., Duplessis, S., Encelot, N. et Martin, F., 2001. Identification of symbiosisregulated genes in *Eucalyptus globulus*–*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant Journal.* **25**: 181-191.

Voiry, H., 1981. Classification morphologique des ectomycorhizes du chêne et du hêtre dans le Nord-Est de la France. *European Journal of Forest Pathology.* **11**: 284-299.

Von Carlowitz, P. G., 1986. Multipurpose tree and shrub seed directory. Nairobi, International Council for Research on Agroforestry: **265** p.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. et Taylor, J.W., 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.

Wingfield, M.J., Slippers, B., Roux, J., Wingfield, B.D., 2001. Worldwide movement of exotic forest fungi, especially in the tropics and the Southern Hemisphere. *Bioscience* **51**: 134–140.

Wurzburger, N., Bidartondo, M.I. et Bledsoe, C.S., 2001. Characterization of *Pinus* ectomycorrhizas from mixed conifer and pygmy forests using morphotyping and molecular methods. *Canadian Journal of Botany*. **79** : 1211-1216.

Zhou Z., Miwa, M., Matsuda, Y. et Hogetsu, T., 2001. Spacial distribution of subterranean mycelia and ectomycorrhizae of *Suillus grevillei* genets. *Journal of Plant Research*. **114**: 179-185.

Zid, E. et Grignon, C., 1991. Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes au stress, cas des stress salin et hydrique. IIème journées scientifiques du réseau de biotechnologies végétales, Paris et Londres.

ANNEXES

ANNEXE

MILIEU DE CULTURE

Milieu (MNM) Melin et Norkrans modifié (Marx, 1969)

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.25 g
Extrait de Malt	3 g
Glucose	10 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
KH_2PO_4	0.5 g
MgSO_4	0.15 g
NaCl	0.025 g
Thiamine-HCl 1mg/ml	1 ml
Citrate ferrique 1%	1.2 ml
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

SOLUTIONS

CTAB 2x

Composition : 100 mM Tris HCl (pH 7,5 à 8); 1,4 M NaCl ; 20 mM Na₂EDTA ; 2 % CTAB.

Pour 100 ml :

-Dissoudre 2 g de CTAB dans 50 ml d'eau ultrapure en mélangeant et en chauffant légèrement (45 à 50°C) si besoin pour faciliter la dissolution)

-Ajouter ensuite en mélangeant :

10 ml de **Tris HCl** 1 M pH 7,5 à 8,0

28,6 ml de **NaCl** 5 M.

4 ml **Na₂EDTA** 0,5 M pH 8,0.

-Ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau ultrapure (7,4 ml environ).

-Préparation des diverses solutions :

Tris HCl 1 M :

Mélanger :

121,14 g de Tris Base.

800 ml de H₂O ultrapure.

Ajuster le pH entre 7,5 et 8,0 avec HCl 37 % (environ 50 ml).

Ajuster le volume à 1 l avec H₂O ultrapure et stériliser à l'autoclave.

Na₂EDTA 0,5 M pH 8 :

Pour 250 ml :

46,53 g de Na₂EDTA.

200 ml de H₂O ultrapure.

Ajouter des pastilles de NaOH (environ 15) jusqu'à ce que la solution devienne transparente.

Ajuster le pH à 8,0 avec NaOH 10 N.

Ajuster le volume à 250 ml avec H₂O et autoclaver.

Chlorure de sodium (NaCl) 5 M :

Pour 1 l, mélanger :

292 g de NaCl.

q.s.p. 1 l de H₂O ultrapure.

Bien homogénéiser et stériliser à l'autoclave.

Solution de NaClO (10%) (Désinfectant)

NaClO (Eau de javel) (2,6%)	6.4 ml
Eau déminéralisée stérile	90 ml

Solution de Tween 20(25%)

Tween 20 (détergent non ionique)	25 ml
Eau déminéralisée stérile	75 ml

Tampon Tris-Borate (TBE)

Tris-Base	1 % p/v
Na ₂ EDTA	0.07 % p/v
Acide Borique	0.5 % p/v
Ph ajusté à	8.0

Tampon de charge

Bleu de Bromophénol	0.25 %
Glycérol	30 %

Bromure d’Ethidium

Bromure d’Ethidium	100 µl
Eau distillée qsp	1000 ml

Titre du mémoire : Les champignons ectomycorhiziens de *Coccoloba uvifera* (L.) en zone d'introduction (Sénégal) : diversité et tolérance au NaCl.

Candidat : Nom : SENE

Prénom : Seynabou

Nature du mémoire : Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Végétale

Soutenu le 06 Janvier 2010

Composition du jury : M. Kandoura NOBA	Maître de conférences, UCAD
M. Amadou BA	Directeur de Recherche, IRD
M. El. Samba Ndao SYLLA	Maître de conférences, UCAD
M. Mansour THIAO	Maître-assistant, UCAD
M. Abdala Gamby DIEDHIOU	Chercheur, LCM

Résumé

La diversité morphologique et génétique des champignons ectomycorhiziens et des ectomycorhizes de *Coccoloba uvifera* a été étudiée au Sénégal et en Guadeloupe. Six sporophores de champignons ectomycorhiziens (*Inocybe xerophytica*, *Inocybe littoralis*, *Russula cremeolilacina*, *Amanita arenicola*, *Cantharellus cinnabarinus* et *Scleroderma bermudense*) ont été répertoriés en Guadeloupe. Parmi ces champignons, seul *Scleroderma bermudense* a été récolté sous *C. uvifera* en zone introduite (Sénégal). Vingt-trois échantillons d'ECM ont été inventoriés en Guadeloupe dont 8 morphotypes blancs, 5 brun foncé, 4 orange-clair, 1 brun clair, 1 brune, 4 brune. Au Sénégal, seul des ECM blanches identifiés au *S. bermudense* ont été inventoriés. Les morphotypes bruns sont très proches des *Thelephoraceae* qui ont été absentes des relevés de basidiomes de *C. uvifera* effectués en Guadeloupe. Ces résultats suggèrent que la diversité des sporophores ne reflète la diversité des champignons associés à *C. uvifera*.

Nos résultats ont également montré que *C. uvifera* n'était pas compatible avec la microflore symbiotique des espèces d'arbres ectomycorhiziens du Sénégal à savoir *E. camaldulensis* et *C. equisetifolia*. Ceci suggère que le *S. bermudense*, seul champignon associés à *C. uvifera* au Sénégal, aurait été introduit avec ses graines au Sénégal.

Nos résultats sur la tolérance au sel des champignons ont montré que la souche de *S. bermudense* (BA, Guadeloupe), isolée d'un milieu salé, a mieux poussé que les souches *Thelephora* sp. (M185, Guadeloupe), *Scleroderma* sp1 (Guadeloupe) et *S. bermudense* (Bel Air BA001, Sénégal), isolées de milieux non salés, en présence de forte teneurs en NaCl (50, 100 et 200 mM).

Mots clés : *Coccoloba uvifera* (L.) ; stress salin ; diversité ; champignons ectomycorhiziens, Sénégal