



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**  
**Johann Louarn**

Le Vendredi 15 février 2013

**Titre :**

Exploitation des champignons mycorhiziens à arbuscules pour la protection du tournesol contre *Orobanche cumana*

---

ED SEVAB : Interactions plantes-microorganismes

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (UMR 5546)

**Directeur(s) de Thèse :**

Soizic Rochange

Guillaume Bécard

**Rapporteurs :**

Stéphane Declerck

Philippe Simier

**Autre(s) membre(s) du jury :**



## Remerciements

---

Trois années de thèse qui se terminent. Même si tout n'a pas été rose durant cette thèse (et oui vive les manips qui foirent ou toutes autres contrariétés du parfait biologiste), e n'oublierai pas ces trois ans ainsi que tout les gens que j'ai pu rencontrer.

Je tiens en premier lieu à remercier Soizic qui m'a fait confiance en m'offrant cette thèse, pour avoir su m'encadrer (malgré ma personnalité assez... « lunaire ») et pour avoir donné une bonne partie de son temps et de son énergie à relire et corriger la prose approximative de mon manuscrit.

Je tiens aussi à remercier Guillaume, pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour ces conseils et son temps passé à relire ma thèse.

Merci beaucoup à Francis qui m'a bien aidé durant les lourdes manips de comptage d'orobanches, les rempotages et pour son travail sur la partie *in vitro*, sans lui cette partie aurait « beaucoup moins bien marché maintenant ».

Merci à Virginie, pour les analyses d'exsudats de tournesol et pour tous les gâteaux, biscuits et chocolats qu'elle a ramenée dans le bureau :).

Je tiens tout particulièrement à remercier les non permanents de l'équipe, sans qui la vie au labo n'aurait pas était la même et pour les bons moments que l'on a pu passer en dehors du labo. Merci Coco (Vive le Lot et Robert Mitchoum ;), Mathilde (Promis je mangerai plus de carottes), Youyou, Momo, pour ceux qui traînent encore au labo à l'heure où j'écris ces mots. Puis aux anciens Dada (Trop de bon moment pour n'en citer qu'un :), et quand tu veux un Molky sur le Canigo), Alex (Blind test ce soir ;) et laissez-moi répondre en premier svp), Pierre-Marc (pour ces alertes strigo), Marion, Dédé, Jérôme. Et je n'oublie pas le plus non permanent des permanents... Dodo (oui je sais t'es couillon Jojo ;) mais ça me fait tellement plaisir de te l'entendre dire).

Je remercie aussi les autres permanents de l'équipe Christophe, Jean-Phi et Nicolas. Et merci aussi à Saïda et Sylvie pour les analyses en GC-MS.



Je tiens aussi à remercier les membres du LBPV de Nantes et notamment Philippe D, Philippe S, Zac, Math et Johannes (pour s'être occupé de mes précieux tournesols durant mon absence).

Je remercie les entreprises Soltis (groupe euralis) et la Syngenta ainsi que l'ANRT pour avoir soutenues le projet de thèse. Et je remercie plus particulièrement Marta, Olivier et Thierry pour l'intérêt qu'ils ont porté au projet et leur aide.

Merci aussi à Patrick Vincourt pour m'avoir permis d'accéder aux chambres de culture de son équipe, ainsi qu'à Marie-Claude et Nicolas pour leur aide durant ces expériences.

Et je n'oublie pas le secrèterait (Nicole, Catherine et Michelle) pour avoir su répondre à mes demandes de dernière minute.

Enfin, encore merci à vous tous (désolé pour ceux que j'ai oublié), chacun à votre échelle vous avez rendu la pilule de la thèse plus facile à avaler grâce à la bonne humeur quotidienne qu'il y a dans ce laboratoire.



« Doutez de tout  
et surtout de ce que je vais vous dire. »

« Bouddha »





# Sommaire

---

Abréviations .....	4
Introduction .....	5
I. La plante dans son environnement .....	5
II. Les plantes parasites .....	6
II.A. Les différentes stratégies de parasitisme .....	6
II.B. Quelles conséquences pour l'agriculture ? .....	7
III. Les orobanches .....	9
III.B. Les mécanismes de défense contre les plantes parasites .....	20
III.C. Méthodes de lutte contre les plantes parasites .....	21
IV. La symbiose mycorhizienne à arbuscules .....	25
IV.A. Les champignons mycorhiziens à arbuscules .....	25
IV.B. Cycle de vie des champignons MA .....	27
IV.C. Les bénéfices de la symbiose MA pour la plante .....	32
V. Objectifs de la thèse .....	34
Chapitre I : Impact de la mycorhization du tournesol sur l'infection par <i>O. cumana</i> .....	36
I. Introduction – Mécanismes de résistance à <i>O. cumana</i> chez le tournesol et choix des variétés à étudier .....	36
II. Résultats et discussion : Effet de la mycorhization du tournesol sur l'interaction avec <i>O. cumana</i> .....	38
II.A. Expériences de coculture sur une longue période .....	38
II.B. Expériences plus courtes arrêtées au stade tubercule .....	44
III. Conclusion .....	51
Chapitre II : Effet des champignons MA sur la germination d' <i>O. cumana</i> .....	53



I.	Introduction.....	53
II.	Résultats et discussion.....	55
II.A.	Comparaison de l'activité d'exsudats de plants mycorhizés et non mycorhizés	55
II.B.	Analyse des exsudats fongiques.....	64
III.	Conclusion.....	72
Chapitre III : Etude des étapes précoces de l'interaction tournesol/orobanche sur racines « hairy » de tournesol.....		
		76
I.	Du rhyzotron aux racines « hairy ».....	76
II.	Production des racines « hairy » de tournesol.....	78
III.	Infection des racines « hairy » de tournesol par <i>O. cumana</i> .....	79
III.A.	Essais préliminaires.....	79
III.B.	Développement d'un système à double compartiment.....	80
III.C.	Comparaison de tubercules obtenus <i>in vitro</i> et <i>in planta</i> .....	82
IV.	Conclusion.....	83
Discussion – perspectives.....		
		86
I.	Les potentiels de l'utilisation des champignons MA dans le contrôle de l'orobanche.	86
II.	Intérêt pour les inhibiteurs produits par les champignons MA.....	89
III.	Comment apporter les champignons MA au champ ?.....	90
IV.	Pourrait-on combiner la mycorhization avec d'autres méthodes de lutte contre l'orobanche ?.....	91
V.	Pourquoi identifier l'inducteur de la germination d' <i>O. cumana</i> ?.....	92
Matériels et méthodes.....		
		94
I.	Matériel végétal et fongique.....	94
II.	Conditions de culture.....	94
II.A.	Stérilisation des graines de tournesol.....	94
II.B.	Fertilisation.....	95
II.C.	Expériences de coculture avec prémycorhization.....	95



II.D.	Expériences de coculture sur longue période .....	96
II.E.	Expériences de coculture sur courte période .....	96
II.F.	Expériences de split-root .....	97
II.G.	Culture en rhyzotron.....	97
II.H.	Culture des racines « hairy » .....	98
III.	Mesure du taux de mycorhization .....	98
IV.	Mesure de la biomasse.....	99
V.	Analyse des strigolactones.....	99
V.A.	Préparation des exsudats racinaires .....	99
V.B.	Analyse des strigolactones par spectrométrie de masse.....	100
V.C.	Test de ramification sur le champignon MA, <i>G. rosea</i> .....	100
VI.	Analyse des DCL par spectrométrie de masse .....	101
VII.	Préparation des exsudats de champignons MA .....	102
VIII.	Test de germination des graines de plantes parasites.....	103
IX.	Test de germination de graines d' <i>A. thaliana</i> et de poireau.....	104
X.	Test de viabilité des graines d'orobanche .....	104
XI.	Etude de l'interaction tournesol/ <i>O. cumana</i> sur racines « hairy ».....	105
XII.	Etude histologique .....	106
XIII.	Analyses statistiques .....	107
	Références bibliographiques .....	108
	Annexe 1 .....	129



## Abréviations

---

ABA : acide abscissique

ACC : 1-amino-1-cyclopropanecarboxylic acide

ANOVA : ANalysis Of Variance (analyse de variance)

cAMP : Adenosine 3'.5'-cyclic MonoPhosphate

CCD : Carotenoid Cleavage Dioxygenase

CETIOM : Centre technique interprofessionnel des oléagineux et du chanvre

CIFRE : Conventions Industrielles de Formation par la REcherche

Da : Dalton

DCL : DéhydroCostus Lactone

EPS : Extraction en Phase Solide

FAO : *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA : Fluoresceine DiAcetate

GA : Gibbérelline

GC-MS : Gas Chromatography–Mass Spectrometry

HPLC : *High-Performance-Liquid Chromatography*

HR : Hypersensitive Response

IAA : acide indole-3- acétique

IPP : Isopentényl-PyroPhosphate

JA : Acide Jasmonique

LBPV : *Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales*

LC-MS : Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

M6PR : Mannose 6-Phosphate Réductase

MA : Mycorhizien à Arbuscule

MRM : Multiple Reaction Monitoring

MVA : Mévalonate

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PPA : PrePenetration Apparatus

QTL : Quantitative Trait Loci

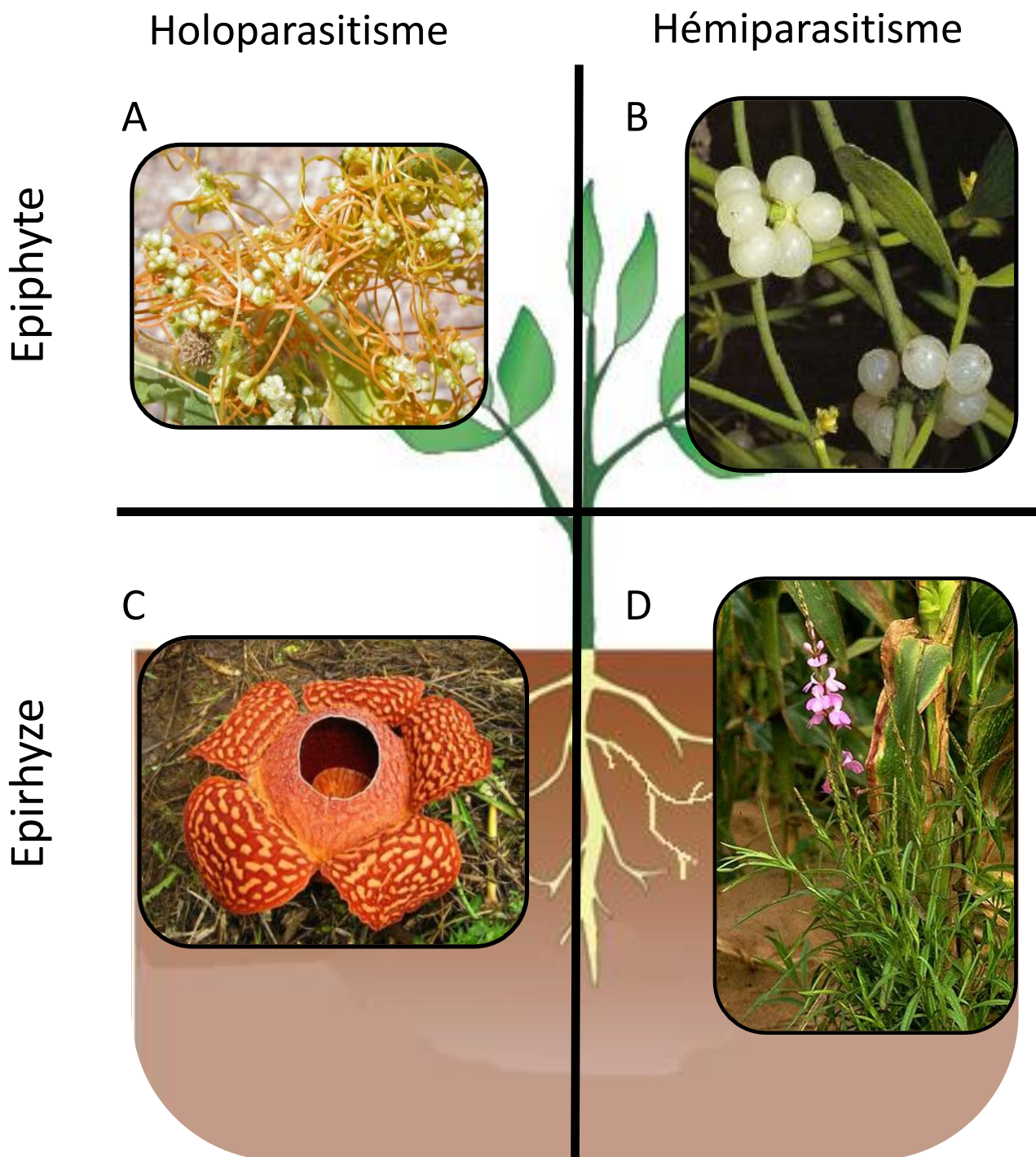
SA : Acide salicylique

SIM : Selective Ion Monitoring

TTC : 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride

UHQ : Ultra-High Quality

UV : Ultra Violet



**Figure 1: Les différentes stratégies de parasitisme.** (A) La cuscute est un holoparasite épiphyte. (B) Le guï est un exemple d'hémiparasitisme épiphyte. (C) L'holoparasitisme épirhyze est illustré par le rafflésia. (D) *Striga* représente un cas d'hémiparasitisme épirhyze.



# Introduction

---

## I. La plante dans son environnement

Les végétaux sont définis comme des organismes généralement chlorophylliens, fixés au sol, peu mobiles et capables d'utiliser le CO<sub>2</sub> et les sels minéraux du sol pour se nourrir (Larousse). Ces organismes une fois fixés sur leur substrat ne peuvent éviter les différentes contraintes abiotiques et biotiques les affectant. Ainsi, les végétaux ont mis en place différentes stratégies leur permettant de résister ou tolérer les stress auxquels ils sont soumis.

Les végétaux peuvent interagir avec de nombreux organismes. Parmi ces organismes on retrouve, entre autre, des virus, des bactéries, des champignons, des nématodes, des insectes et des mammifères. Les plantes peuvent également interagir avec d'autres plantes, ces interactions pouvant être bénéfiques ou non. Il existe ainsi des plantes capables de coloniser d'autres plantes et de se comporter comme des parasites. Cette interaction va être défavorable à la plante hôte, qui verra une part importante de ces nutriments détournée par la plante parasite (laquelle ne procure aucun bénéfice à son hôte).

A l'inverse de cette relation parasitaire, certains organismes ont établi avec les plantes des relations réciproquement bénéfiques pour les deux partenaires, on parle dans ce cas de symbiose. L'association symbiotique la plus répandue dans le monde végétal fait intervenir des champignons du sol appelés champignons endomycorhiziens. Ces champignons permettent aux plantes d'acquérir plus aisément l'eau et les minéraux, et en contrepartie les plantes leur fournissent des composés carbonés.

Dans les écosystèmes naturels et agricoles, les plantes interagissent simultanément avec un grand nombre d'organismes différents. De nombreux exemples montrent que ces relations ne sont pas indépendantes les unes des autres. Il a notamment été montré dans divers contextes que l'association d'une plante avec un partenaire symbiotique peut lui permettre de mieux faire face aux attaques de pathogènes. Sur cette base, l'objectif de ma thèse est d'explorer la possibilité d'utiliser les champignons endomycorhiziens pour protéger le tournesol d'une plante parasite, *Orobanche cumana*.

Dans cette introduction je présenterai dans un premier temps les plantes parasites, puis dans une seconde partie j'aborderai différents aspects de la symbiose mycorhizienne à

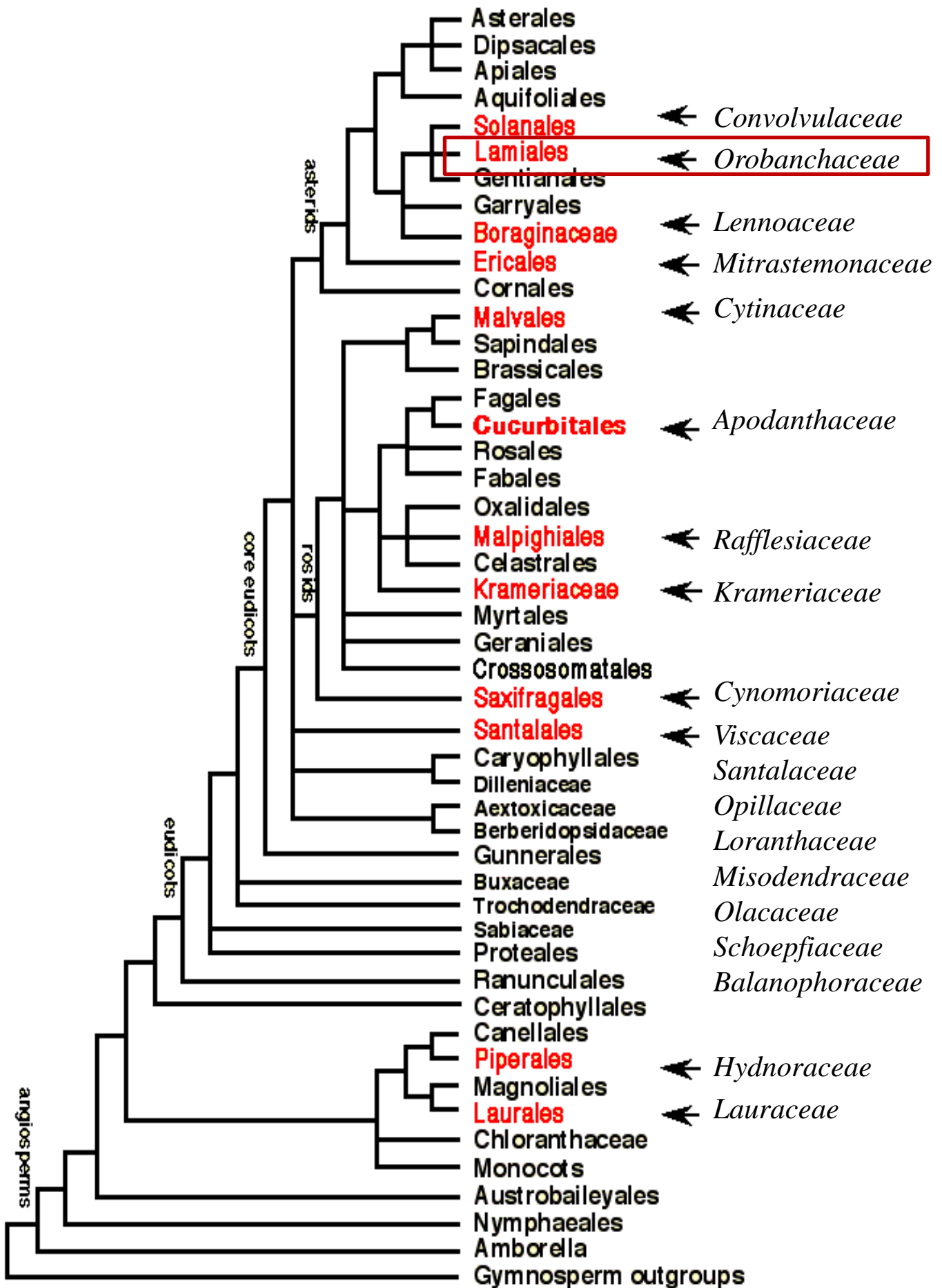


Figure 2 : Localisation des plantes parasite dans la phylogénie des dicotylédones. En rouge sont représentés les ordres comprenant des familles de plantes parasites. Le nom de la famille concernée est indiqué en face de l'ordre (d'après [http://www.parasiticplants.siu.edu //Relation-Flowering.html](http://www.parasiticplants.siu.edu//Relation-Flowering.html))

arbuscules. Pour finir, je résumerai les travaux antérieurs sur les interactions entre les trois partenaires (plantes hôtes, plantes parasites et champignons endomycorhiziens) et je préciserai les hypothèses de travail de mon projet de thèse.

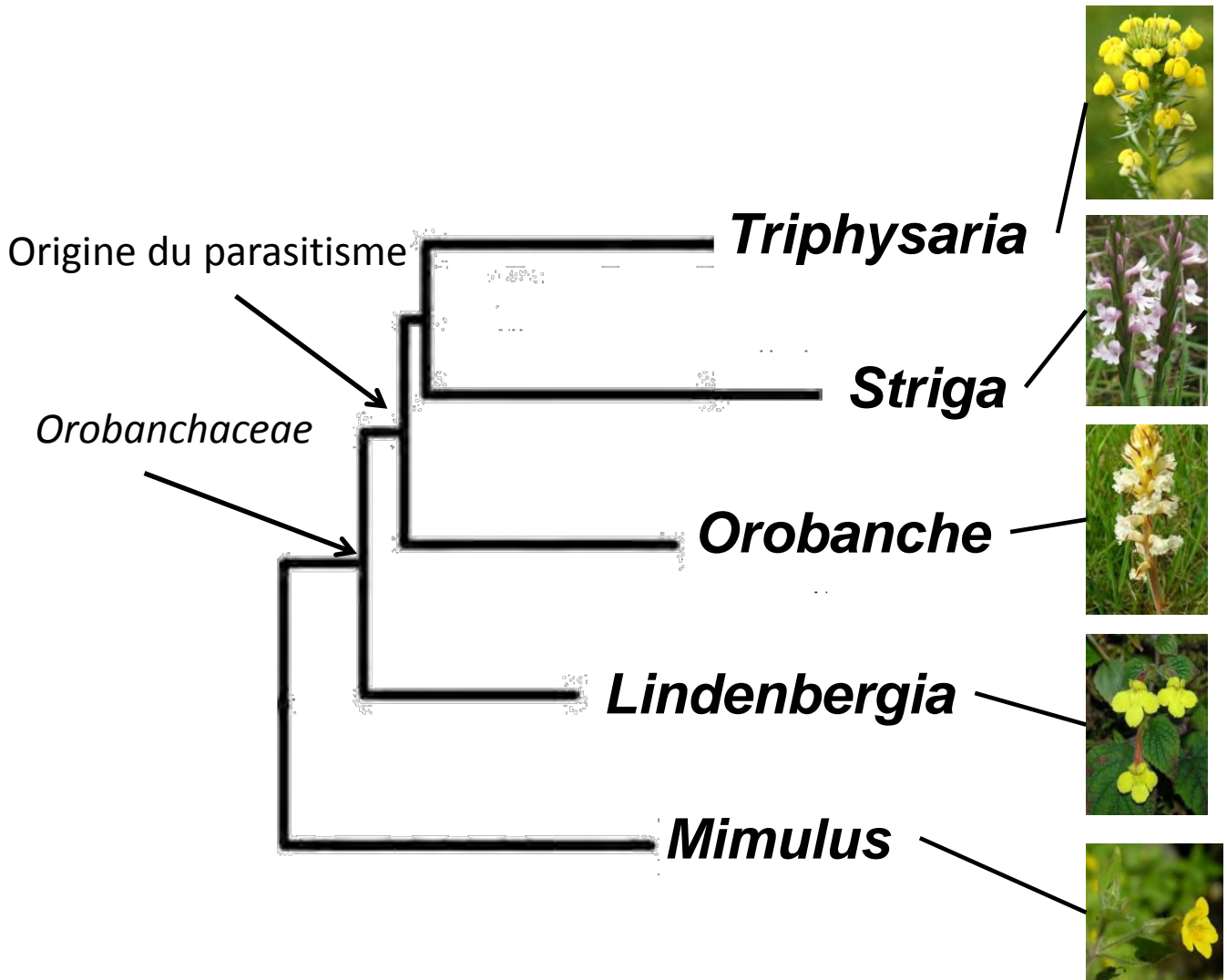
## II. Les plantes parasites

### II.A. Les différentes stratégies de parasitisme

Les plantes parasites se retrouvent chez 1% des espèces d'angiospermes, soit plus de quatre mille espèces réparties dans vingt deux familles. Les plantes parasites dépendent, partiellement ou totalement, de leur hôte pour l'apport en minéraux, en eau et en carbone (Nickrent et al., 1997). Ainsi une classification de ces organismes peut être définie suivant la nature trophique de la relation et le lieu de fixation du parasite (Fig.1). (i) Les hémiparasites sont des organismes photosynthétiques qui se fixent à leur hôte pour y prélever l'eau et les minéraux. On identifie deux catégories d'hémiparasites : les hémiparasites facultatifs (ces plantes sont capables de vivre en absence d'hôte mais peuvent devenir parasites dans certaines conditions) et les hémiparasites obligatoires (ces plantes ont besoin d'un hôte pour se développer) (Yoder, 1997; Graves et al., 1989 ; Hull et Leonard, 1964). (ii) Les holoparasites sont des plantes non photosynthétiques qui se fixent sur leur hôte pour y prélever l'eau, les sels minéraux ainsi que les ressources carbonées nécessaires à leur développement.

En relation avec le site de colonisation, on peut distinguer les parasites épiphytes (qui se fixent à l'appareil aérien de l'hôte) et les parasites épirhizes (qui se fixent au niveau des racines).

Chez les Angiospermes le parasitisme serait apparu indépendamment chez plusieurs familles (Nickrent et al., 1997) (Fig.2). Dans la plupart des familles de plantes parasites on ne retrouve qu'une seule stratégie trophique. Toutefois, chez les *Orobanchaceae* qui seront décrites en détail plus loin, il existe des espèces représentant les différentes stratégies trophiques. On retrouve des plantes autotrophes (du genre *Lindenbergia*), des hémiparasites facultatifs (genre *Trypthisaria*), des hémiparasites obligatoires (genre *Striga*) ainsi que des holoparasites (genre *Orobanche*) (Fig.3). La présence de ces trois différentes stratégies de parasitisme épirhizes dans la même famille peut être expliquée par la perte successive de



**Figure 3 : Phylogénie des *Lamiales*.** Parmi les *Orobanchaceae* on retrouve des hémiparasites facultatifs tels que le genre *Triphysaria*, des hémiparasites obligatoires tels que le genre *Striga*, des holoparasites comme les *Orobanches* ainsi que quelques genres non parasites tels que le genre *Lindenbergia*. *Mimulus* est un genre non parasite très proche de la familles des *Orobanchaceae* dont le génome est disponible (d'après Wickett et al., 2011).

fonctions importantes. Le passage de l'hémiparasitisme facultatif à obligatoire peut être expliqué par la perte de la capacité à développer un système racinaire, liée à l'apparition d'un haustorium à l'extrémité de la racine. La plante hémiparasite obligatoire doit donc rapidement trouver un hôte après germination. La perte de la capacité de photosynthèse peut expliquer le passage de l'hémiparasitisme à l'holoparasitisme. La plante parasite étant dans l'incapacité d'effectuer la photosynthèse le parasite devient dépendant de son hôte pour les apports en composés carbonés (pour revue Westwood et al., 2010).

## II.B. Quelles conséquences pour l'agriculture ?

Il existe un grand nombre d'espèces de plantes parasites et seulement quelques-unes d'entre elles sont capables d'attaquer les plantes d'intérêt agronomique. Ce sont essentiellement, chez les *Orobanchaceae*, des espèces des genres *Striga* et *Orobanche* qui affectent les plantes de grande culture.

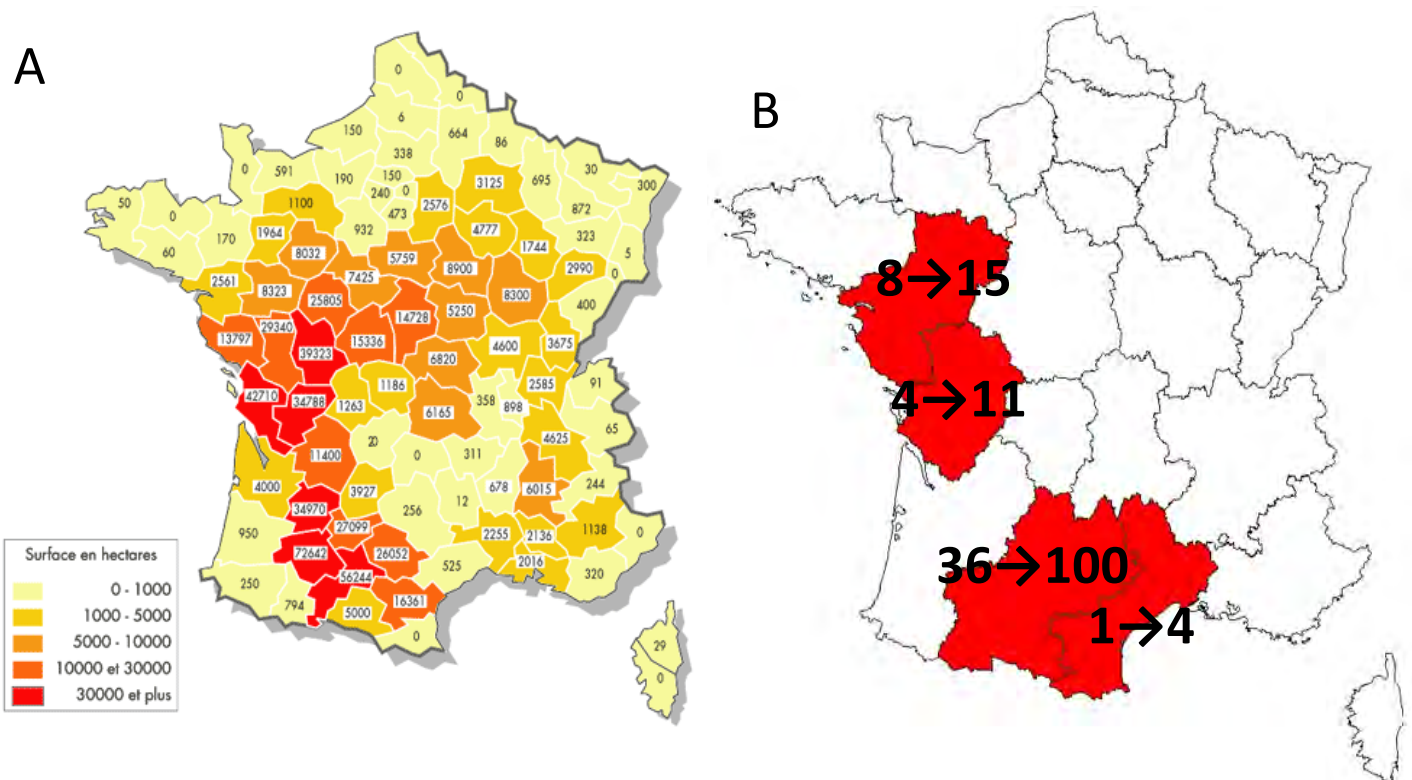
En anglais on distingue les « witchweeds » qui correspondent au genre *Striga* et les « broomrapes » qui correspondent aux genres *Orobanche* et *Phelipanche*. En français on ne dispose pas de termes équivalents. Ainsi, pour parler des « witchweeds » j'emploierai le mot *striga* (sans majuscule). Le genre *Striga* sera écrit avec une majuscule et en italique. Et pour parler des « broomrapes » j'utiliserai le terme *orobanches* (sans majuscule). Le genre *Orobanche* sera écrit avec une majuscule et en italique.

En Afrique, la principale contrainte sur les cultures est la présence très répandue des plantes parasites du genre *Striga*. Les *Striga* s'attaquent aux cultures de sorgho, de maïs, de riz et de millet qui sont des cultures de première importance en Afrique. Dans les zones fortement touchées par *Striga*, les pertes de production peuvent atteindre 40% à 100%, limitant fortement les ressources alimentaires et la quantité des semences pour la saison suivante. On estime ainsi que plus de trois cent millions d'Africains (soit presque un tiers de la population) sont affectés par les dégâts causés par *Striga*, qui représentent des pertes d'environ un milliard de dollars chaque année (source FAO).

Autour du bassin méditerranéen les orobanches causent de sérieux dommages sur les cultures de nombreuses dicotylédones. Cinq espèces d'*Orobanche* ont été identifiées comme



**Figure 4: Zone de répartition d' *O. cumana*.** La zone de répartition actuelle d' *O. cumana* se localise principalement autour du bassin Méditerranéen (en rouge). En vert est représenté la zone d'expansion potentielle d' *O. cumana* (d'après Mohamed et al., 2006).

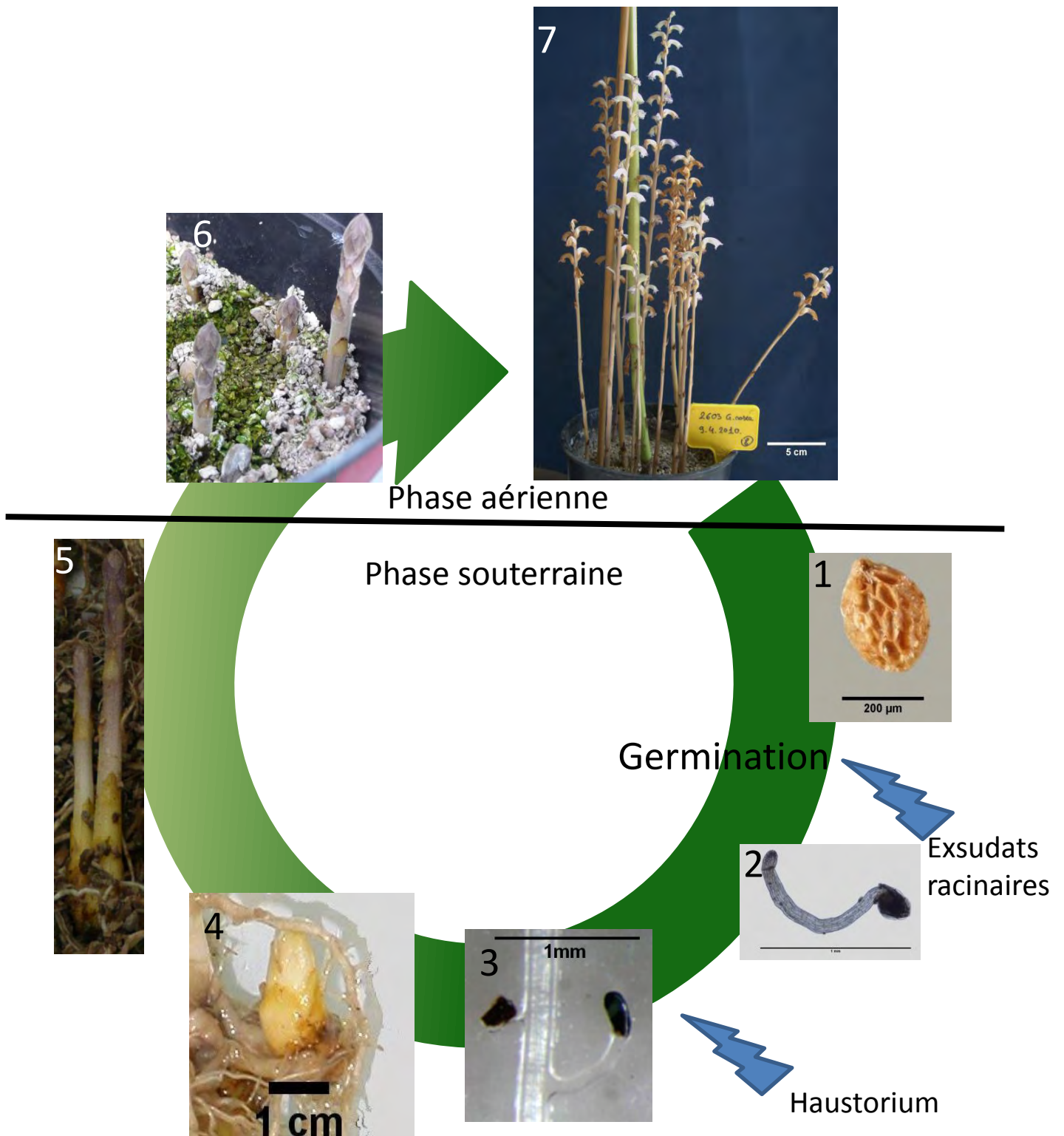


**Figure 5: Carte représentant les zones de cultures du tournesol et les régions touchées par *Orobanche cumana*.** (A) Cartographie des régions françaises productrices de tournesol selon la surface de culture. (B) Cartographie des régions françaises touchées par *O. cumana*, en rouge sont représentées les régions comptant au moins 1 foyer d' *O. cumana* en 2012. Les chiffres montrent l'évolution du nombre de foyers détectés entre 2011 et 2012 (source Cetiom).

causant d'importantes pertes: *O. crenata* parasite de la fève, *O. cernua* parasite des *Solanaceae*, *O. faetida* parasite de la fève et de la vesce, *O. minor* parasite de la luzerne et *O. cumana* parasite du tournesol. On estime que les orobanches infesteraient seize millions d'hectares de terres arables du pourtour méditerranéen et de l'ouest de l'Asie où elles sont largement répandues (Parker, 2009).

Le tournesol, l'une des principales cultures d'oléagineux en Europe (plus de quatorze millions d'hectares, source FAO), est affecté par *O. cumana* sur le pourtour du bassin Méditerranéen (Fig.4). On retrouve ce parasite particulièrement en Espagne, en Europe de l'Est et sur le littoral de l'Afrique du nord où de grandes surfaces sont touchées par ce problème. *O. cumana* continue à se répandre et de nouvelles régions sont infectées, et cette espèce pourrait coloniser de nombreuses régions du monde (Fig.4) (Mohamed et al., 2006). Notamment, *O. cumana* commence à arriver en France où l'on comptait en 2011 une cinquantaine de foyers et plus d'une centaine de foyer en 2012 répartis à l'ouest et au sud-ouest (Fig.5, source CETIOM). L'orobanche cause des dommages importants sur les cultures pouvant entraîner plus de 50% de pertes de rendement voire la perte totale de la récolte (Grenz et al., 2008).

L'enjeu des prochaines années est d'arriver à endiguer la progression de l'orobanche. Les graines d'orobanche sont produites en très grande quantité, elles sont très petites (environ 200µm) et peuvent rester viables dans le sol plusieurs dizaines d'années (López-Granados et García-Torres, 1999 ; Bebawi et al., 1984). Ces caractéristiques rendent difficile la gestion des parcelles contaminées. Pourtant il est essentiel de diminuer la pression parasitaire observée dans ces parcelles, à la fois pour limiter les pertes de productivité des parcelles elles-mêmes mais aussi pour éviter la propagation vers de nouvelles zones.



**Figure 6 : Cycle de développement d'*Orobanche cumana*.** (1) Imbibition de la graine. (2) Perception des exsudats racinaires et germination de la graine. (3) Induction de la formation de l'haustorium et fixation de l'orobanche à la racine hôte. (4) Développement d'une structure de réserve appelée tubercule. (5) Différenciation de tiges souterraines à partir des tubercules. (6) Emergence des tiges. (7) Développement de la hampe florale et fructification.



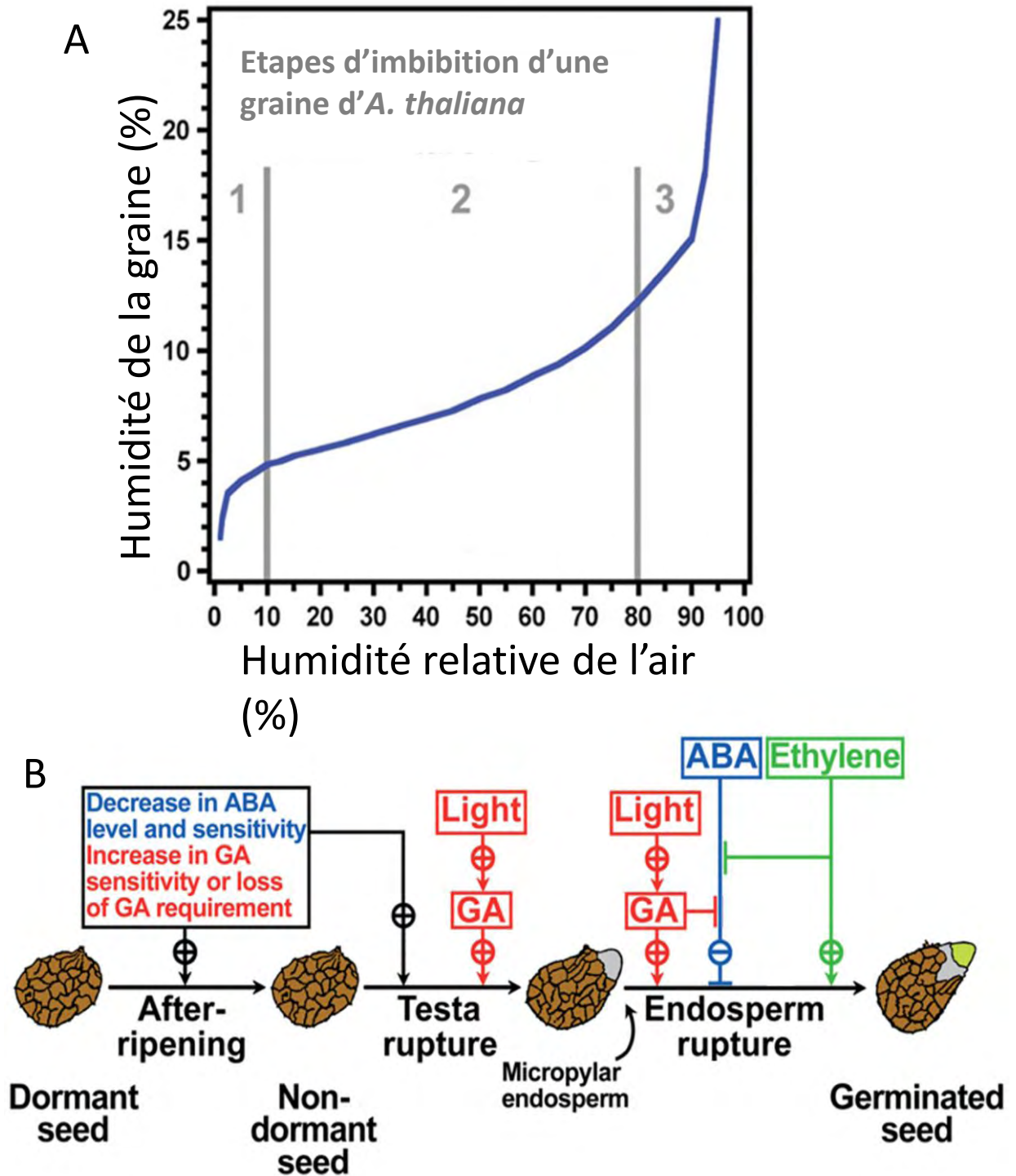
### III. Les orobanches

Les *Orobanchaceae* appartiennent à l'ordre des *Lamiales*, elles seraient apparues il y a 3,6 millions d'années (Gamalei et al., 2007). Les *Orobanchaceae* sont la famille de plantes parasites comprenant le plus grand nombre d'espèces d'holoparasites, on en compte plus de cent soixante dix dont font partie les orobanches (Uhlich et al., 1995). Parmi les orobanches quatre groupes ont été initialement définis : les *Osproleon* comprenant le genre *Orobanche*, les *Trionychon*, les *Myzorrhiza* ainsi que les *Gymnocaulis* (Schneeweiss et al., 2004a). Mais plus récemment, de nouvelles études phylogénétiques ont permis de montrer que les *Trionychon*, *Myzorrhiza* et *Gymnocaulis* formaient un seul groupe définissant un nouveau genre : le genre *Phelipanche*. Deux genres sont ainsi actuellement retenus, le genre *Orobanche* (anciennement *Osproleon*) et le genre *Phelipanche*. Ces nouveaux genres ont été définis sur la base du nombre de chromosomes. Les espèces du genre *Orobanche* comptent dix neuf chromosomes et les membres du genre *Phelipanche* comptent douze chromosomes (vingt quatre chromosomes pour l'ancien groupe des *Myzorrhiza*) (Schneeweiss et al., 2004b).

#### III.A.1. Cycle de développement de l'orobanche

##### III.A.1.a. Déroulement du cycle de développement

Le cycle de développement des orobanches est composé d'une phase souterraine et d'une phase aérienne. La phase souterraine débute par la germination de la graine induite par des signaux spécifiques libérés par la racine hôte (Bouwmeester et al., 2007). La germination est une étape cruciale du cycle de développement de l'orobanche : les réserves de la graine étant très faibles celle-ci doit rapidement trouver un hôte pour assurer son développement (Stewart et Press, 1990). Ensuite l'orobanche développe un haustorium qui va lui permettre de se fixer à la racine et de pénétrer les tissus jusqu'aux vaisseaux de l'hôte. L'orobanche une fois fixée et connectée au système vasculaire va prélever les nutriments sur son hôte. Puis elle va développer un tubercule qui sera le lieu de différenciation de la hampe florale, laquelle restera dans un premier temps souterraine avant d'émerger. Enfin, la hampe florale va développer son inflorescence et produire des graines (Fig.6).



**Figure 7 : Régulation de la germination chez *A. thaliana*.** (A) Modèle de l'imbibition chez la graine d' *A. thaliana*. On peut observer 3 phases : (1) une phase d'imbibition rapide. (2) Une phase d'imbibition ralentie, la germination reste réversible à ce stade. (3) Une phase de forte acquisition en eau qui sera suivie par la sortie de la radicule. (B) Modèle de la régulation hormonale de la germination. On observe que l'ABA joue un rôle d'inhibiteur de la germination et que les GA et l'éthylène jouent un rôle d'activateurs (Weitbrecht et al., 2011).

### III.A.1.b. La germination des *Orobanchaceae*

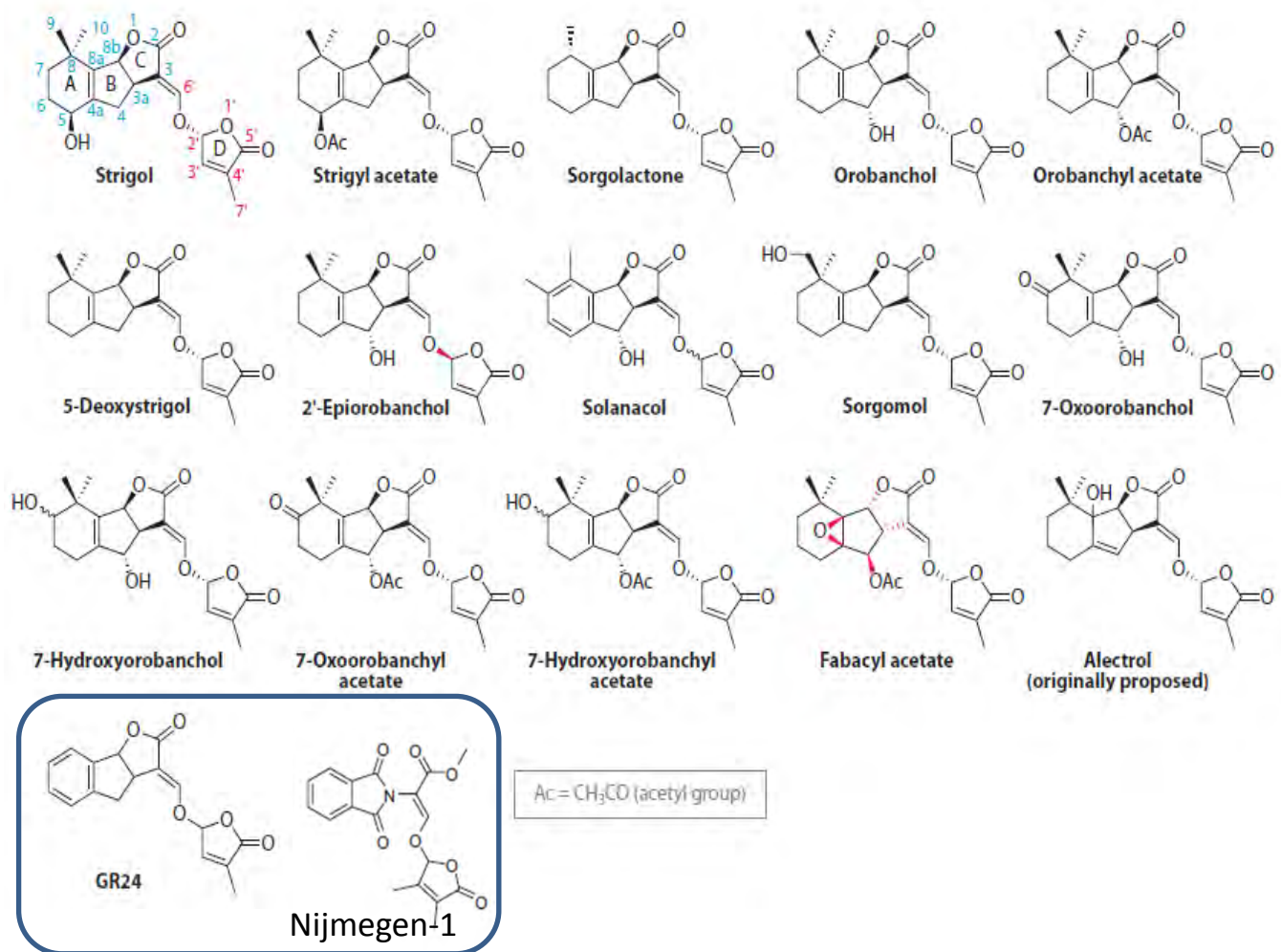
Chez les plantes non parasites, on appelle germination la période qui commence au moment où une graine dite dormante commence à s'imbiber d'eau et se termine par la sortie de la radicule. La phase d'imbibition comprend 3 phases ; une première phase d'acquisition rapide de l'eau (phase 1) qui sera suivie d'une phase où la prise d'eau est beaucoup plus faible ; phase 2), la germination reste réversible à ce stade. Puis on observe une accélération de l'acquisition d'eau et une croissance de l'embryon suivie par la sortie de la radicule (Phase 3 ; Fig.7A). La germination est un processus complexe régulé par de nombreux paramètres environnementaux, tels que la température ou l'hygrométrie. En outre, différentes hormones vont réguler ce processus, notamment les gibbérellines (GA) et l'acide abscissique (ABA). Les GA jouent un rôle d'activateur de la germination alors que l'ABA joue un rôle de répresseur (Fig.7B) (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006 ; Linkies et Leubner-Metzger, 2011).

Comment se déroule le processus de germination chez les plantes parasites ?

#### *III.A.1.b.i. Le préconditionnement*

Le préconditionnement des graines d'orobanche est une étape importante de la germination. Comme pour une graine de plante non parasite, on va observer une première imbibition rapide de la graine (Nun et Mayer, 1993). Cette première imbibition de la graine d'orobanche ne l'engage pas à germer : si la graine ne rencontre pas les conditions favorables à sa germination (présence d'un hôte), elle peut retourner en dormance (Plakhine et al., 2009). Durant la phase de préconditionnement on va observer une baisse de la concentration en ABA dans les graines d'orobanche, suggérant un rôle de cette hormone dans l'inhibition de la germination. Ce rôle a pu être démontré grâce à l'application d'inhibiteurs de la synthèse de l'ABA, qui stimule la germination des graines d'orobanches en présence de strigolactones (Chae et al., 2004).

En outre, deux types d'observations indiquent un rôle positif des GA lors de la germination des orobanches : (i) l'application de GA durant la phase de préconditionnement



### Molécules de synthèses

**Figure 8 : Structure des strigolactones.** Les strigolactones sont composées de 4 cycles A, B, C et D, les cycles C et D sont reliés par un pont éno-éther. Le GR24 et le Nijmegen-1 sont des strigolactone de synthèse utilisée (d'après Xie et al., 2010).

permet de stimuler la sortie de la radicule induite par le GR24 (Chae et al., 2004) ; (ii) l'application d'inhibiteurs de la synthèse des GA, lors du préconditionnement, permet d'inhiber le processus de germination induit par le GR24 (Zehhar et al., 2002).

### *III.A.1.b.ii. Les molécules inductrices de la germination*

Suite au préconditionnement les graines sont aptes à germer. Mais la germination des graines d'orobanche ne pourra se faire qu'en présence d'exsudats racinaires de la plante hôte (Fernandez-Aparicio et al., 2008). La perception des exsudats est plus ou moins spécifique selon l'espèce de plante parasite (Estabrook et Yoder, 1998). On peut ainsi classer les graines selon leur niveau d'exigence aux exsudats racinaires, allant des graines exigeantes qui ne germent qu'en présence d'un exsudat de plante spécifique jusqu'aux graines qui peuvent germer au contact d'exsudats assez variés (Fernandez-Aparicio et al., 2008).

De nombreux travaux ont été menés pour étudier ce mécanisme de stimulation et recherchés les molécules permettant l'induction de la germination. Différentes classes de molécules ont montré un potentiel d'induction de la germination des plantes parasites (Bouwmeester et al., 2003).

- *Les strigolactones*

Les strigolactones ont été les premiers inducteurs de la germination de graines de *Striga* identifiés. Ces molécules ont été isolées à partir d'exsudats racinaires de coton (Cook et al., 1966). Depuis l'identification du strigol chez le coton de nombreuses autres strigolactones ont été caractérisées. Toutes les strigolactones présentent la même structure de base. Elles sont constituées d'une partie composée de trois cycles A, B et C, et d'une partie comprenant le cycle D et reliés au cycle C par un pont éno-ether (Fig.8). Des travaux ont montré que le couple C-D était essentiel à l'induction de la germination des plantes parasites (Zwanenburg et al., 2009). Il existe aujourd'hui une vingtaine de strigolactones naturelles connues variant selon les groupements portés par les cycles A et B et plus précisément sur les carbones 4, 5, 6, 7 et 8 (Fig.8). Ces carbones peuvent porter des groupements méthyle (CH<sub>3</sub>), hydroxyle (OH) ou des groupements acétate (CH<sub>3</sub>CO) (Xie et al., 2010 ; Yoneyama et al.,

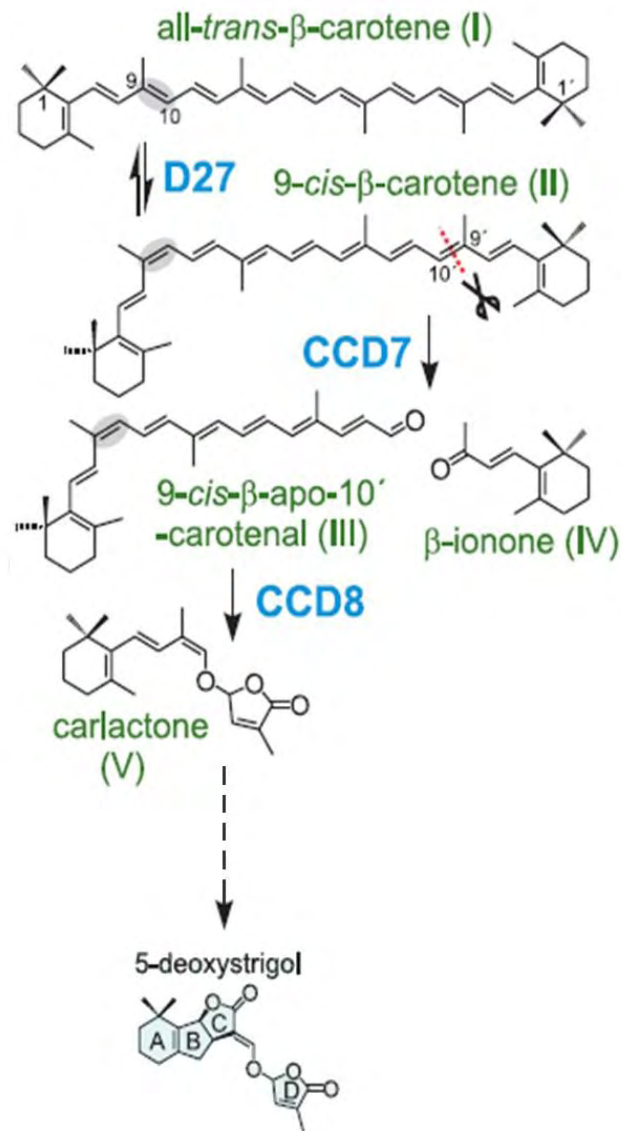


2009). Il est possible qu'un nombre beaucoup plus grand de strigolactones, non encore identifiées, soit produit par les végétaux (Xie et al., 2010). Généralement, une espèce donnée produit un cocktail de trois à cinq strigolactones (Yoneyama et al., 2008).

De nombreux travaux ont étudié la spécificité d'induction de la germination des orobanches par les strigolactones. Ces travaux ont permis de montrer une différence de sensibilité pour les strigolactones selon l'espèce d'orobanche considérée. La germination pour une espèce donnée peut être induite par un certain nombre de strigolactones mais pas par toutes les strigolactones. (Ueno et al., 2011 ; Kim et al., 2010 ; Fernández-Aparicio et al., 2010). Ainsi, le fait de ne trouver qu'un faible nombre de strigolactones différentes dans les exsudats racinaires pourrait expliquer la spécificité de certaines orobanches pour un hôte.

Les strigolactones font partie des inducteurs de germination les plus actifs, elles peuvent agir à très faible concentration (jusqu'à  $10^{-12}$  M). En outre, les strigolactones se dégradent assez rapidement dans le sol, permettant ainsi au parasite de détecter avec une bonne fiabilité la proximité d'une racine (Babiker et al., 1987). Toutes ces caractéristiques en font d'excellents inducteurs de la germination pour les plantes parasites.

Depuis leur découverte il y a plus de cinquante ans de nouveaux rôles ont été attribués aux strigolactones. En premier lieu, Akiyama et al. (2005) et Besserer et al. (2006) ont montré que les strigolactones entraînaient une ramification plus importante des hyphes de champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) au stade présymbiotique. Cette nouvelle activité dans la rhizosphère sera détaillée dans la partie II de l'introduction. Plus récemment, un rôle hormonal à l'intérieur de la plante a été montré : les strigolactones régulent négativement la croissance des bourgeons latéraux chez les angiospermes. Ceci a été montré grâce à l'utilisation de plants de pois, de riz et d'arabette mutés sur les gènes de synthèse des strigolactones *CCD7* et *CCD8*. Ces plants présentent un phénotype hyper-ramifié qui peut être atténué par un traitement avec des strigolactones exogènes, montrant ainsi l'implication de ces molécules dans la régulation du développement des bourgeons latéraux (Gomez-Roldan et al., 2008 ; Umehara et al., 2008). D'autres travaux ont montré, chez l'arabette, que les strigolactones pouvaient réguler l'architecture du système racinaire ainsi que l'élongation des poils absorbants (Kapulnik et al., 2011 ; Ruyter-Spira et al., 2011). Plus récemment, une étude a montré la présence de strigolactones chez des algues, les charales, suggérant ainsi l'apparition précoce des strigolactones au cours de l'évolution. Les auteurs proposent que le premier rôle des strigolactones serait le contrôle de l'élongation des rhizoïdes (Delaux et al.,



**Figure 9 : voie putative de la synthèse des strigolactones.** D27 catalyse l'isomérisation de la double liaison C9-C10 du all-trans-β-carotène. CCD 7 va cliver ce dernier en 9-cis-β-apo-10'-caroténal qui sera pris en charge par CCD8 afin de former la carlactone. Suivent ensuite des étapes encore inconnues permettant la synthèse complète des strigolactones (d'après Alder et al., 2012).



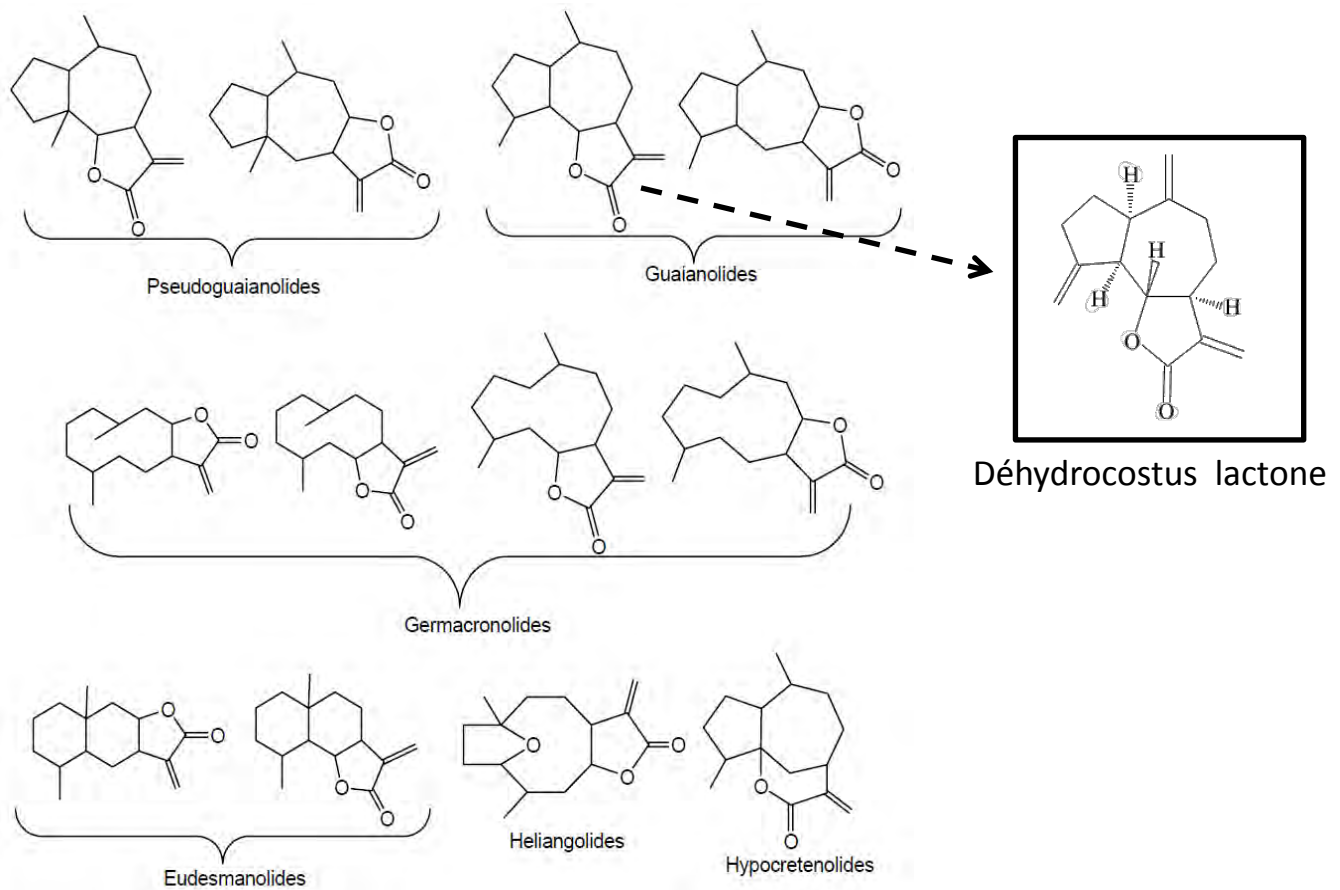
2012). Puis on découvre peu à peu que les strigolactones interviennent dans de nombreux processus développementaux (Mayzlish-Gati et al., 2010 ; Hu et al., 2010 ; Agusti et al., 2011 ; Toh et al., 2012 ; Rasmussen et al., 2012 ; Kohlen et al., 2012).

Les strigolactones sont des métabolites issus de la voie des caroténoïdes (Matusova et al., 2005). Plusieurs enzymes intervenant dans la synthèse des strigolactones ont pu être identifiées : les enzymes Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD) 7 et CCD8, MAX1 codant pour un cytochrome P450 ainsi que D27. Des travaux récents ont montré que D27 était une  $\beta$ -carotène-isomérase permettant la conversion du all-trans- $\beta$ -carotène en 9-cis- $\beta$ -carotène. Ce dernier est clivé par CCD7 en 9,-cis- $\beta$ -apo-10'-caroténal qui sera pris en charge par CCD8 pour former la carlactone, un intermédiaire de synthèse des strigolactones (Fig.9) (Alder et al., 2012). Les étapes suivantes conduisant à la formation des strigolactones sont pour le moment inconnues.

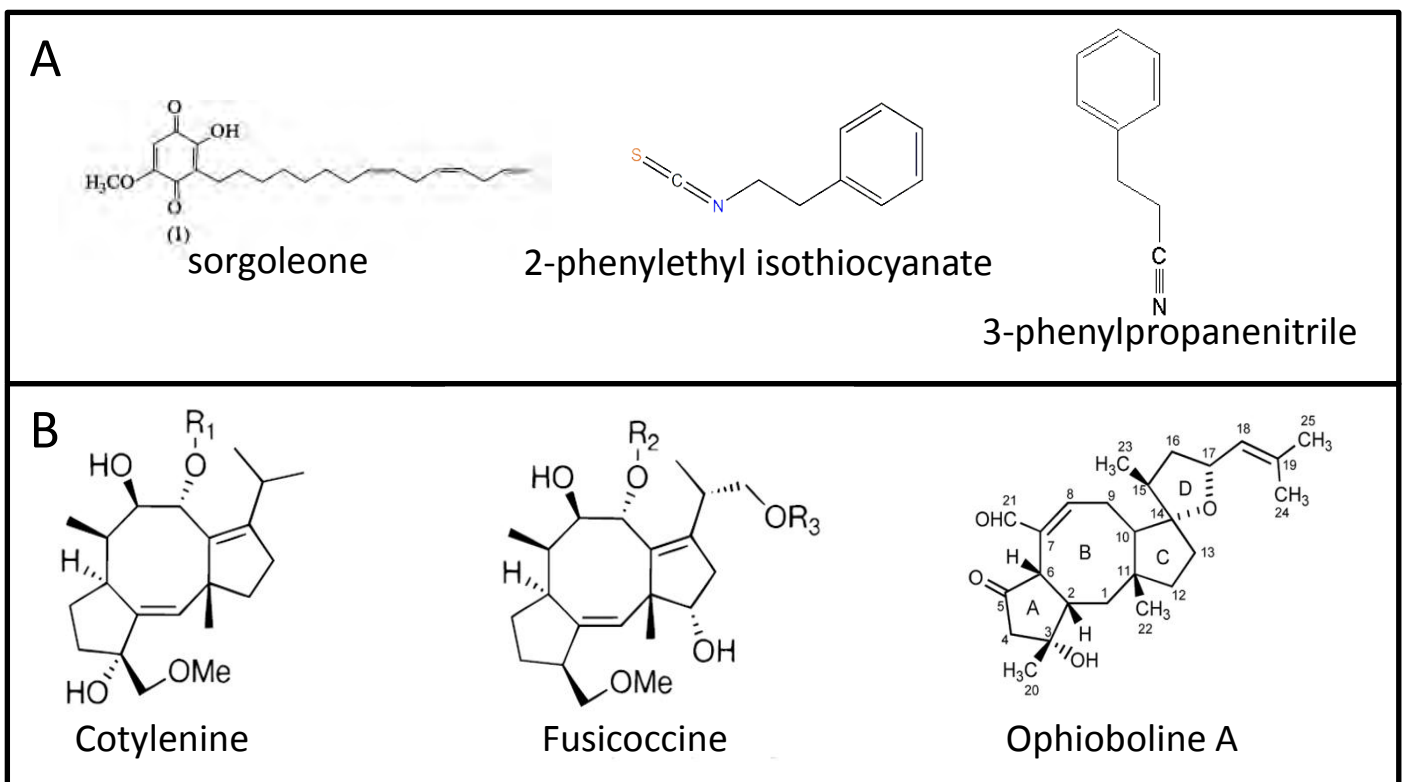
En outre, il a été montré que d'autres protéines étaient impliquées, non plus dans la synthèse des strigolactones mais dans la voie de signalisation de ces hormones. Les mutations d'une protéine à domaine Fbox (MAX2) et d'une  $\alpha/\beta$  hydrolase (DWARF14, identifiée chez le riz) rendent les plants mutants insensibles aux strigolactones. Ces plantes présentent toujours un phénotype ramifié même après l'application de strigolactones exogènes (pour revue Xie et al., 2010 ; Arite et al., 2009). Récemment, une étude menée sur le pétunia a montré que DAD2 (un orthologue de DWARF14) peut se lier à MAX2 en présence de strigolactone (Hamiaux et al., 2012). DAD2 semble donc être un bon candidat pour jouer le rôle de récepteur des strigolactones chez les angiospermes non parasites. Il serait bien sûr intéressant de rechercher ses orthologues chez les plantes parasites, chez lesquelles aucun récepteur des strigolactones n'a été identifié faute d'outils moléculaires et génétiques.

- *La déhydrocostus lactone*

La déhydrocostus-lactone (DCL) appartient à la famille des sesquiterpènes lactones, un grand groupe de métabolites secondaires présent chez de nombreuses familles de plantes et particulièrement chez les *Asteraceae*, où l'on retrouve plus de trois mille composés. Parmi les sesquiterpènes lactones une classification peut être établie en fonction de la structure du squelette carboné de ces molécules. On identifie ainsi les pseudoguaianolides, les



**Figure 10 : Structure des sesquiterpènes lactones.** On distingue 6 groupes de sesquiterpènes lactones, classés selon la structure de leur squelette carboné. On identifie ainsi les pseudoguaianolides, les guaianolides (dont fait partie la déhydrocostus lactone), les germacronolides, les eudesmanolides, les heliangolides et les hypocretenolides (Chaturvedi., 2011).



**Figure 11 : Autres molécules inductrices de la germination des graines de plantes parasites.** (A) Différents inducteurs de la germination produits par des plantes. (B) Différents inducteurs de la germination produits par des champignons (Netzyl et al., 1998 ; Yoneyama et al., 1998 ; Fernandez-Aparicio et al., 2008 ; Auger et al., 2012).

guaianolides (dont fait partie la DCL), les germacronolides, les eudesmanolides, les héliangolides et les hypocretenolides (Fig.10) (Chaturvedi, 2011).

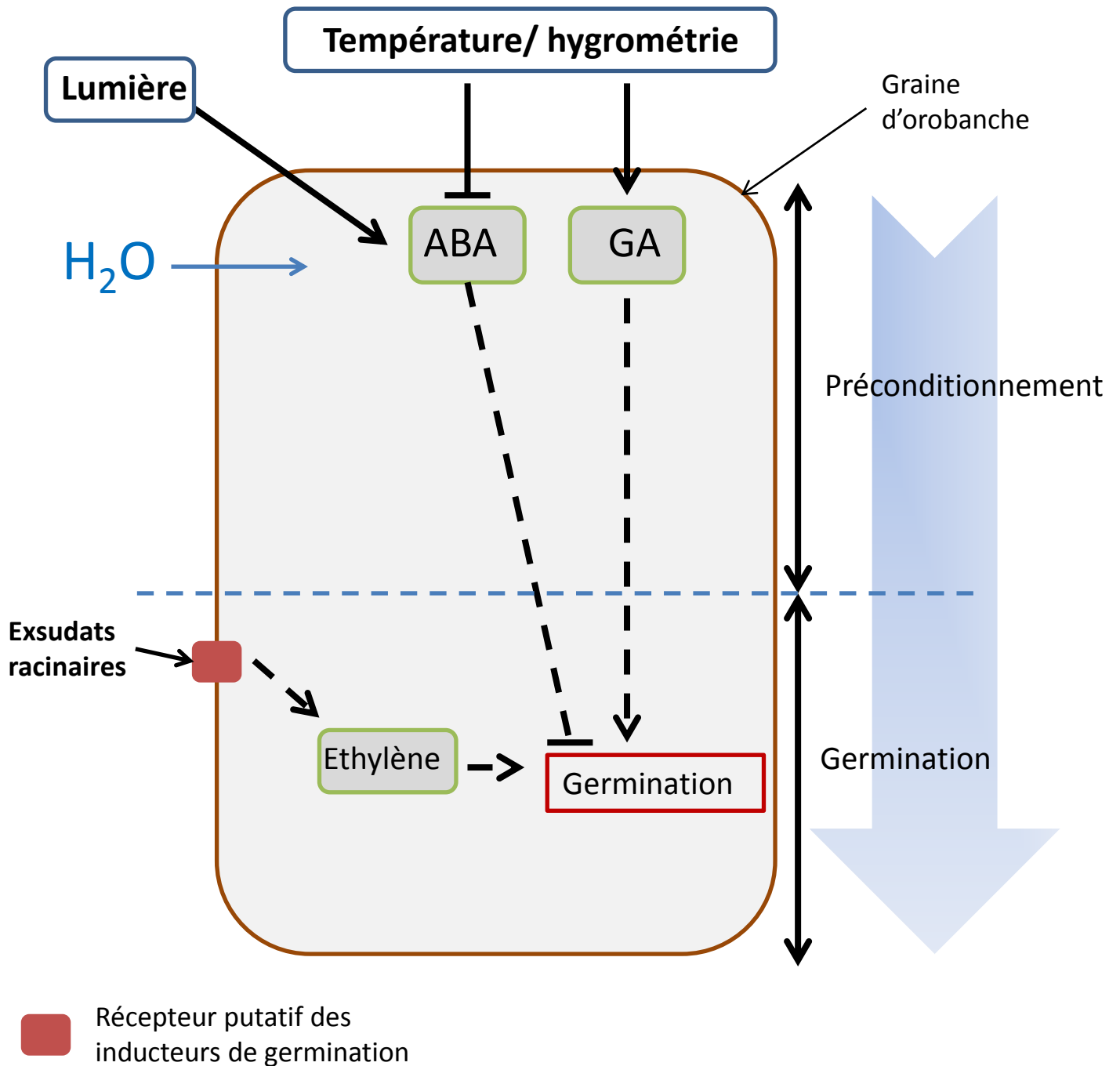
Les rôles des guaianolides sont très variés ; elles interviennent notamment dans divers processus permettant d'éloigner les ravageurs. Ces molécules, présentes à la surface des feuilles, exercent un rôle d'anti-appétant contre différentes larves d'insectes ainsi qu'un rôle antifongique (Ambrósio et al., 2008 ; Vajs et al., 1999 ; Meng et al., 2001). Au niveau de la rhizosphère ces molécules semblent impliquées dans des processus allélopathiques (Macías et al., 2000 ; Macías et al., 2006). D'autre part, il a été montré qu'elles peuvent avoir un intérêt pour la médecine, car elles montrent des effets inhibiteurs sur la croissance de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie responsable de la tuberculose) et induisent l'apoptose de cellules cancéreuses (Luna-Herrera et al., 2007; Kim et al., 2008).

Du fait de la présence d'une fonction lactone et de leur capacité à induire ou inhiber la germination de certaines graines (Picman, 1986), des travaux ont testé l'activité de certains guaianolides sur la germination de graines de *Striga asiatica*. L'activité de ces molécules sur la germination de *Striga* s'est révélée faible, ne permettant d'induire que 35% de germination à une concentration de  $10^{-4}$ M (Fischer et al., 1989 ; Fischer et al., 1990). Plus récemment, il a été montré que certains pseudoguaianolides et guaianolides pouvaient induire la germination des graines d'*O. cumana* (Perez-de-Luque et al., 2000 ; Galindo et al., 2002). Parmi ces sesquiterpènes lactones, la DCL (Fig.10) semble la plus active : à  $10^{-7}$ M elle permet d'induire 90% de germination chez *O.cumana* (Macías et al., 2009).

- *Autres inducteurs de la germination des plantes parasites*

Plusieurs autres classes de métabolites végétaux ont été identifiées comme pouvant induire la germination des graines de plantes parasites, parmi elles on retrouve les sorgoleones (Fig.11A) identifiées dans des exsudats de sorgho. Ces molécules très instables peuvent induire la germination de *Striga asiatica* (Netzly et al., 1988).

Des travaux récents ont identifié l'inducteur de la germination de *P. ramosa*, un parasite des *Brassicaceae*, qui sont connues pour produire peu de strigolactones (Westwood, 2000). Des isothiocyanates (Fig. 11A) produits par *Brassica napus* sont de bons inducteurs de la germination de *P. ramosa*, la concentration efficace médiane (EC50) est de l'ordre de  $10^{-7}$ M (Fig.11A). Ces molécules ne sont pas structurellement apparentées aux strigolactones et



**Figure 12 : Modèle de régulation de la germination chez les orobanches.** La phase de préconditionnement est contrôlée par des facteurs de l'environnement (lumière, température et hygrométrie). Suite à l'imbibition on observe une diminution de la concentration en ABA et une augmentation de la concentration des GA. Suite à la perception d'exsudats racinaires, on va observer une augmentation de la concentration en éthylène qui va induire une cascade de réaction menant à la sortie de la radicule (d'après Zehhar et al., 2002 ; Chae et al., 2004 ; Rungmekarat et al., 2007).

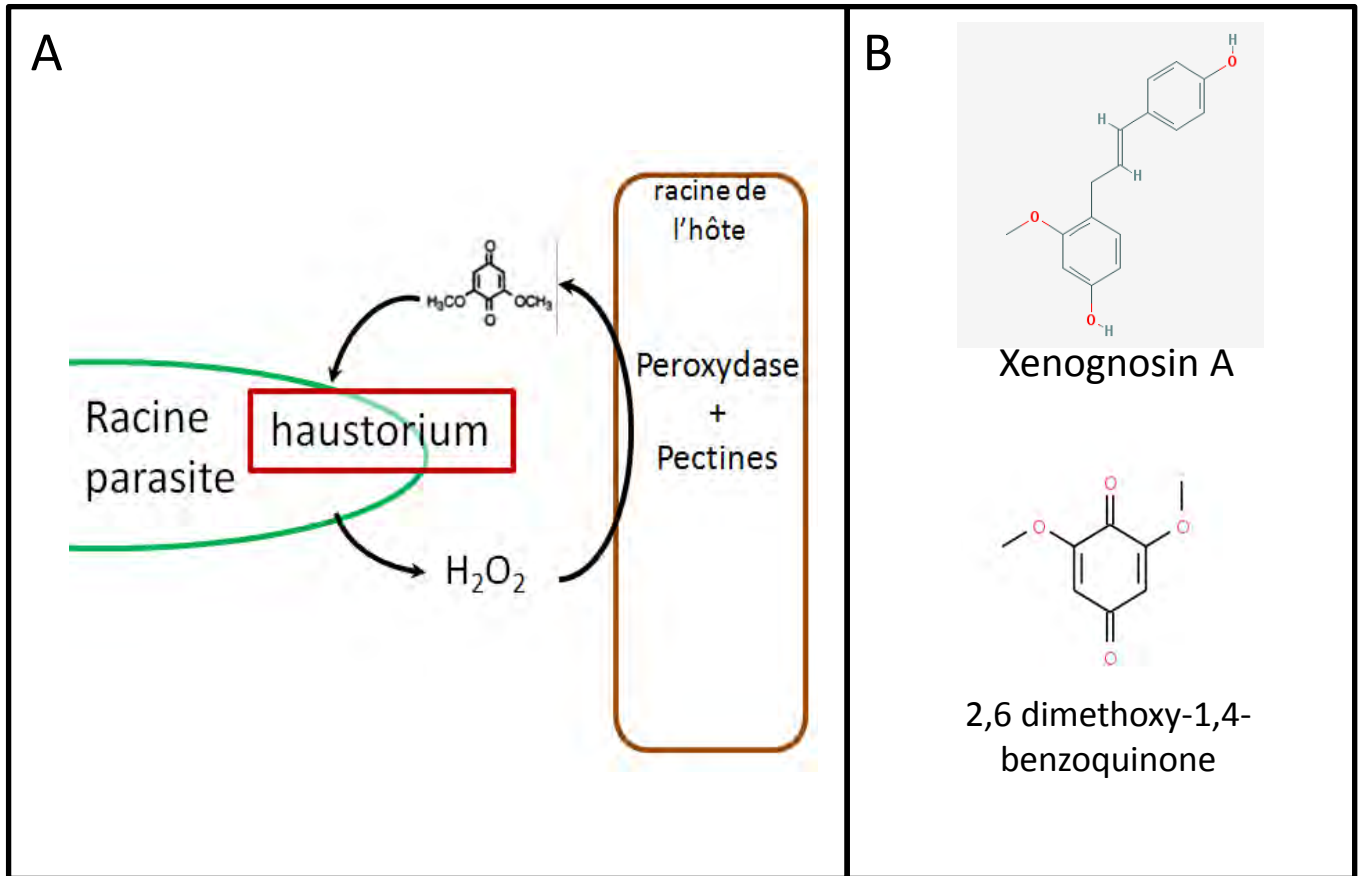
n'induisent pas la germination d'autres graines parasites telles que *O. minor*, *O. cumana*, ou *O. crenata*. Bien que la germination de *P. ramosa* puisse être induite par des strigolactones, il semblerait que dans le cadre de l'interaction avec *B. napus* les graines de *P. ramosa* aient mis en place des mécanismes de reconnaissance spécifique des isothiocyanates (Auger et al., 2012).

Les plantes parasites semblent avoir évolué avec leur hôte et avec les molécules sécrétées par celui-ci. Toutefois, certaines molécules non issues de plantes peuvent également induire leur germination. C'est le cas de certains métabolites fongiques tel que la cotylenine, la fusicoccine et l'ophioboline A (Fig.11B). Ces molécules permettent d'induire plus ou moins fortement la germination de graines de plantes parasites, suivant leur concentration et l'espèce considérée. Certaines de ces molécules sont connues pour perturber la signalisation de certaines phytohormones dont l'ABA et l'éthylène, deux hormones régulant la germination des graines de plantes parasites (Yoneyama et al., 1998 ; Fernández-Aparicio et al., 2008).

#### III.A.1.b.iii. La germination

Chez *Striga*, on va observer une production d'éthylène suite à l'application de GR24 (Sugimoto et al., 2003 ; Babiker et al., 2000 ; Logan et Stewart, 1991). Chez *Orobanche*, la production d'éthylène n'a pas été observée directement. Toutefois, il a été montré que des enzymes clés de la synthèse d'éthylène, la 1-amino-1-cyclopropanecarboxylic acide (ACC) synthase et l'ACC oxydase, sont induites en réponse au GR24 chez *O. minor* et *P. ramosa* (Rungmekarat et al., 2007). D'autre part, l'application d'un inhibiteur de la synthèse de l'éthylène, après application de GR24, inhibe tout ou partie la germination de *P. ramosa* ce qui suggère un rôle important de l'éthylène dans la germination (Zehhar et al., 2002).

On observe que la régulation de la germination des graines d'orobanche ressemble beaucoup à la régulation de la germination des graines de plantes non-parasites (Fig.12). L'ABA, les GA ainsi que l'éthylène semblent jouer les mêmes rôles. Néanmoins, les graines d'orobanche ne germent qu'en présence de signaux spécifiques relâchés par la racine de leur hôte. Chez l'arabette, on observe que la germination de mutants de la voie de biosynthèse des strigolactones n'est pas affectée suggérant que les strigolactones ne seraient pas essentielles à la germination. Toutefois, dans des conditions bien précises, les strigolactones permettent

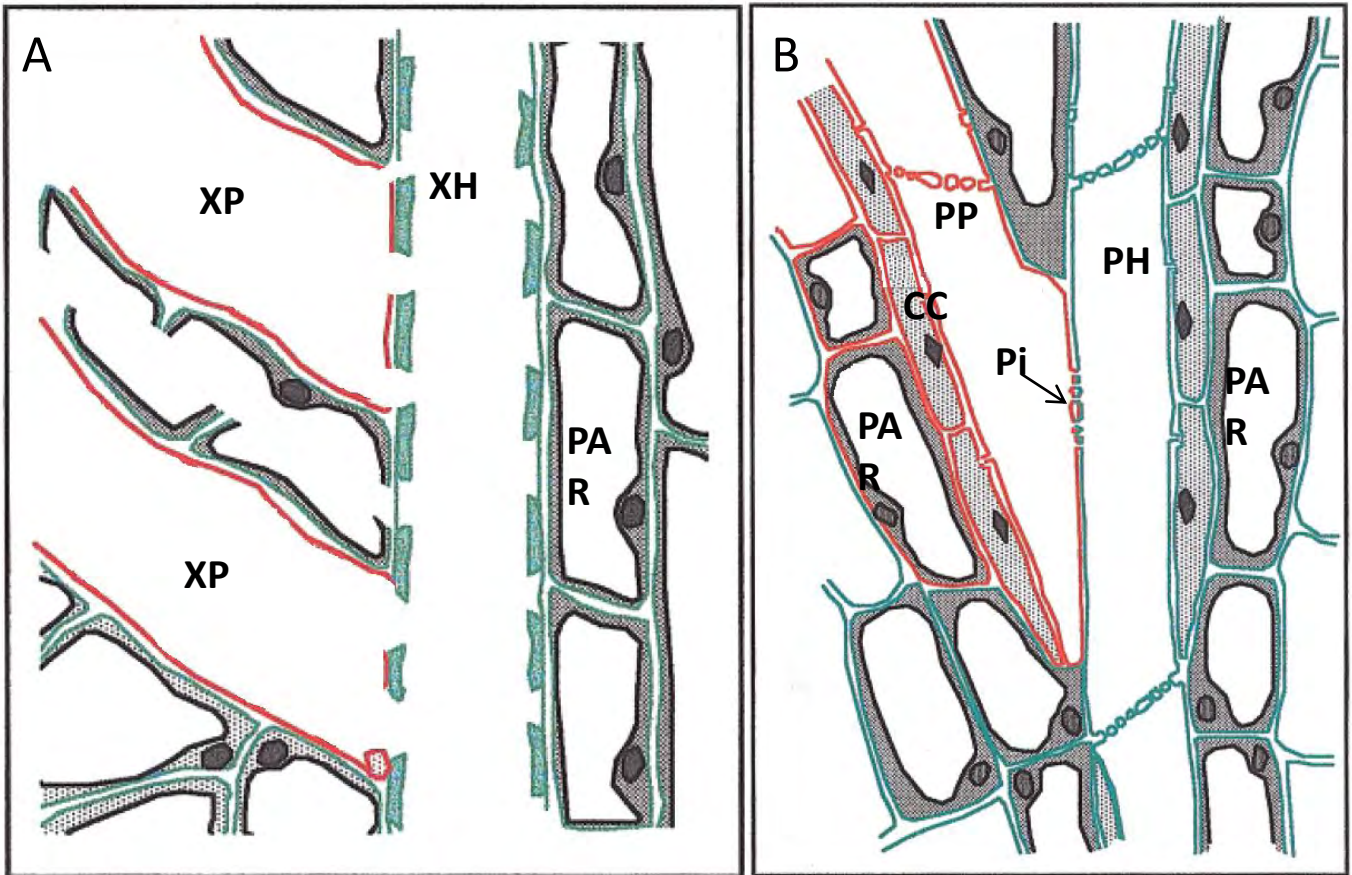


**Figure 13 : Signaux permettant la formation de l'haustorium chez *Striga*.** (A) La racicule de *Striga* va libérer de l' $H_2O_2$ , cet  $H_2O_2$  sera pris en charge par des peroxydases de la racine hôte ce qui induira la dégradation de pectines. La plante parasite va utiliser les produits issus de cette dégradation comme molécules inductrices de l'haustorium. (B) Différentes molécules qui permettent la formation de l'haustorium chez *Striga* (d'après Keyes et al., 2000).

l'induction de la germination des graines de cette espèce: il a été montré que la thermo-inhibition de la germination pouvait être levée grâce à l'application de strigolactone (Toh et al., 2011). Ce mécanisme aurait pu être détourné par les plantes parasites afin de germer en présence de strigolactones sécrétées par leur hôte.

### III.A.1.c. Formation de l'haustorium

Suite à la germination la racine va développer un haustorium. Cet organe a pour fonction la fixation du parasite sur la racine hôte et la pénétration des tissus de la racine jusqu'aux vaisseaux. La formation de l'haustorium se fait suite à la reconnaissance de signaux spécifiques (Yoder, 2001). Chez *Striga* la formation de l'haustorium peut être induite par des produits de dégradation de la pectine ou de la lignine présentes dans les parois des cellules racinaires de l'hôte. Ces produits sont formés suite à la libération d' $H_2O_2$  par *Striga*. L' $H_2O_2$  sera pris en charge par les peroxydases de la racine hôte, ce qui induira la dégradation de la pectine ou de la lignine menant à la production de molécules inductrices de l'haustorium (Fig.13A) (Pour revue Keyes et al., 2000). Différents composés ont montré une activité inductrice de l'haustorium, comme des phénylpropanoïdes tels que la Xenognosine A et B ainsi que le 2,6 diméthoxy-1,4-benzoquinone (Fig.13B) (Lynn et al., 1981; Keyes et al., 2007). Lors d'une interaction non-hôte, on va observer un enroulement de la racine du parasite à proximité de la racine sans pour autant que celle-ci parvienne à se fixer à la racine (Yoshida et Shirasu, 2009 ; Kubo et al., 2009). Ceci suggère que la spécificité d'hôte ne fait pas seulement jouer les inducteurs de la germination mais également les molécules inductrices de l'haustorium.



En rouge = la plante parasite ; en vert = la plante hôte

**Figure 14 : Schéma des connexions entre les vaisseaux du parasite et de l'hôte.** (A) Schéma de la connexion entre le xylème du parasite et le xylème de l'hôte. (XH) : xylème de la plante hôte; (XP) : xylème de la plante parasite (PAR) : parenchyme. (B) Représentation de la connexion entre les vaisseaux du phloème du parasite et de l'hôte. (PH) : phloème de la plante hôte ; (Pi) : plasmodesmes interspécifiques ; (PP) : phloème du parasite ; (CC) : cellule compagne (Hibberd et Jeschke, 2001).



### III.A.1.d. Connexion au réseau vasculaire

Avec les plantes hémiparasites on observe la formation d'un pont de xylème au niveau de l'haustorium reliant ainsi l'hôte et le parasite et permettant l'approvisionnement de ce dernier en eau et sels minéraux. On n'observe pas de connexion au niveau du phloème (Heide-Jorgensen et Kuijt, 1995). En revanche chez les holoparasites comme les orobanches, on observe une continuité à la fois au niveau du xylème (Gibot-Leclerc et al., 2012) et entre les éléments conducteurs du phloème, ces derniers étant reliés entre eux par des plasmodesmes (Fig.14) (pour revue Hibberd et Jeschke, 2001).

Une fois l'orobanche connectée à son hôte, elle développe un nouvel organe appelé tubercule. Le tubercule est un organe de réserve, contenant principalement des hexoses, du mannitol et de l'amidon, pouvant atteindre cinq centimètre de diamètre. Des racines non fonctionnelles vont se développer à la base du tubercule, participant à l'augmentation de la force de puits du parasite (Draie et al., 2011). Le tubercule va devenir le lieu de différenciation de la tige, qui dans un premier temps sera souterraine. Après la mise en place des connexions vasculaires, la plante parasite en déviant les flux de nutriments à son profit détourne aussi les flux hormonaux, ce qui lui permet de calquer son développement sur celui de l'hôte (Hibberd et Jeschke, 2001).

Une fois la tige souterraine développée, la seconde phase majeure du cycle va commencer : la phase aérienne. Ce stade va débiter par l'émergence d'une tige non chlorophyllienne d'où se développera la hampe florale. Cette hampe florale pourra porter plusieurs dizaines de fleurs suivant l'espèce et pourra produire plus de cent mille graines.

### III.A.2. Transfert des nutriments de l'hôte à la plante parasite

Dans l'association avec *Striga*, qui est dépendante de son hôte pour les apports en eaux et en minéraux, on observe que l'ouverture des stomates est plus importante chez la plante parasite que chez la plante hôte. Il en résulte une transpiration plus importante et un potentiel hydrique plus bas chez la plante parasite par rapport à l'hôte; ce mécanisme permet le détournement du flux du xylème vers la plante parasite (Shen et al., 2006).



Les orobanches sont entièrement dépendantes de leur hôte pour l'apport en eau, en minéraux et en photo-assimilats. Elles ont donc établi des stratégies pour prélever les nutriments, notamment ceux circulant dans la sève élaborée. Ainsi, elles augmentent leur force de puits afin de détourner à leur profit les flux du xylème mais aussi du phloème. Afin de maintenir un potentiel hydrique bas elles vont accumuler du mannitol. L'importance de la mannose 6-phosphate réductase (M6PR), une enzyme clé de la synthèse du mannitol, dans le maintien du potentiel hydrique a été proposée. Les auteurs ont montré un accroissement de l'activité de l'enzyme durant les phases post-attachement, corrélé à une accumulation de mannitol dans les tissus de l'orobanche (Delavault et al., 2002). Des travaux récents ont montré, dans l'interaction tomate/*Phelipanche aegyptiaca*, que l'extinction de la M6PR (par « host induced gene silencing ») permet une meilleure résistance de la tomate à la plante parasite. Les plantes transgéniques présentent un nombre plus important de tubercules morts, corrélé avec une plus faible teneur en mannitol dans les orobanches (Aly et al., 2009).

Ces mécanismes vont permettre de détourner une partie des nutriments au profit de la plante parasite, ce qui va donc avoir un impact négatif sur la plante hôte. L'impact de ce prélèvement sera dépendant de la force d'infection (nombre de tubercules) et de la disponibilité en ressource. En cas de ressource limitante et d'attaque intense les effets pourront être sévères causant une réduction de la croissance et du développement de la plante hôte pouvant aller jusqu'à sa mort (Shen et al., 2006). Des travaux menés sur le pathosystème tabac/*Orobanche cernua* ont montré que les plants infectés par l'orobanche présentaient une réduction de biomasse de l'ordre de 70% par rapport aux témoins. Cette baisse de biomasse est directement corrélée à l'augmentation de la biomasse de l'orobanche (Hibberd et al., 1998). A l'inverse de l'infection par l'orobanche, où les dommages dus à l'infection sont majoritairement dus aux composés carbonés prélevés par le parasite, l'infection par *Striga* cause des dégâts à des stades très précoces de l'interaction, perturbant la croissance et le développement de la plante hôte (Gurney et al., 1999).

Différentes études ont analysé les flux de nutriments entre l'hôte et le parasite et des modèles ont été établis. Plusieurs paramètres vont influencer sur les flux de nutriments détournés par l'orobanche : la charge parasitaire, le niveau de résistance et/ou de tolérance de la plante ainsi que les espèces hôtes et parasites vont influencer sur les quantités de nutriments allouées au parasite. Dans le cas de l'interaction entre le tabac et *O. cernua*, on peut observer une augmentation de 80% du flux de carbone vers la racine, et 70% du flux dirigé vers la racine



sera détourné par le parasite. L'orobanche détourne aussi une partie du flux des minéraux à son bénéfice, on observe ainsi un prélèvement de 15% de l'azote, 15% du potassium et 60% du magnésium (Hibberd et al., 1999).

### **III.A.3. L'interaction tournesol/*O. cumana***

*O. cumana* est une orobanche spécialisée qui ne s'attaque qu'aux racines de tournesol. Cette spécificité d'hôte d'*O. cumana* peut être liée à la nature des composés exsudés par les racines de cette espèce. Les graines d'*O. cumana* ne répondent qu'aux exsudats racinaires de tournesol (Fernandez-Aparicio et al., 2008). En outre, les exsudats racinaires de tournesol n'induisent fortement que la germination d'*O. cumana*. Ils peuvent aussi induire la germination de *P. ramosa* et de *P. aegyptiaca* mais plus faiblement (Fernandez-Aparicio et al., 2008). Récemment il a été montré que la DCL était sécrétée par les racines de tournesol (Joel et al., 2011). Or, cette molécule est connue pour induire seulement la germination des graines d'*O. cumana* (Macías et al., 2009 ; Joel et al., 2011). La présence de cette molécule dans les exsudats de tournesol pourrait expliquer la spécificité d'*O. cumana* pour son hôte. Toutefois, Joel et al., 2011 ont montré que le GR24 est aussi efficace que la DCL sur la germination d'*O. cumana*, suggérant un rôle des deux molécules dans l'induction de la germination d'*O. cumana*. Cette hypothèse est étayée par les travaux de Yoneyama et al (2011) qui ont montré que les exsudats de tournesol contiennent deux strigolactones, l'orobanchyl acetate et le 5-deoxystrigol.

Une fois l'orobanche installée sur les racines du tournesol on va observer une baisse de la croissance racinaire, une réduction de la biomasse de l'ordre de 50% ainsi qu'une diminution du diamètre de l'inflorescence (Alcántara et al., 2006). On remarque que la baisse de biomasse du tournesol est directement corrélée à la biomasse prélevée par *O. cumana* (Labrousse et al., 2001).



### III.B. Les mécanismes de défense contre les plantes parasites

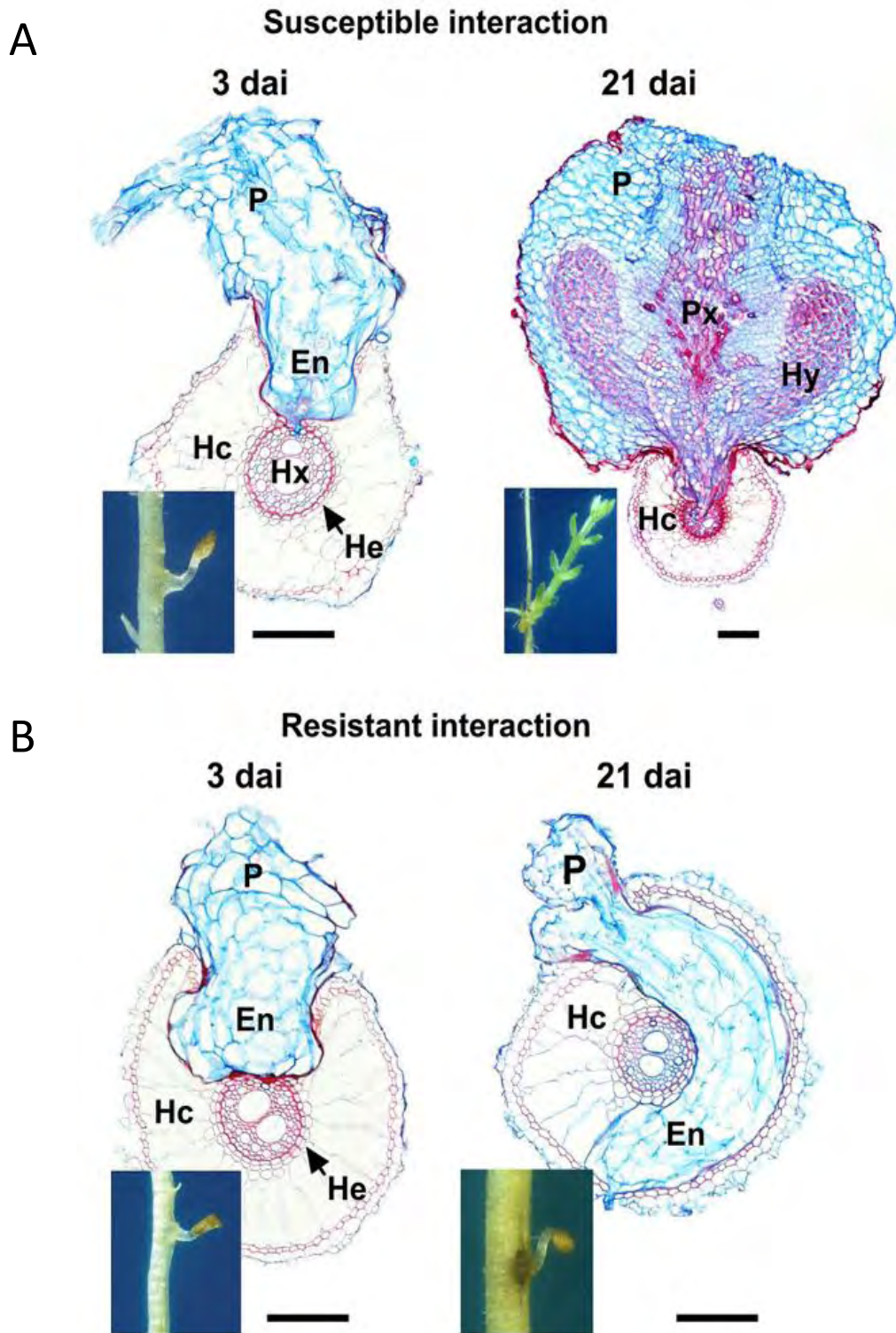
Des mécanismes de défense mis en place chez la plante hôte peuvent intervenir à plusieurs stades de développement du parasite pour contrôler l'infection.

Une étape importante du cycle de l'orobanche est la germination. Il a été observé que les plantes hôtes produisant moins d'inducteurs de germinations présentaient un niveau de résistance plus important aux plantes parasites. Ainsi, l'étude de différents cultivars de riz a montré que les cultivars produisant moins de strigolactones induisaient une moindre germination des graines de *S. hermontica*, corrélée avec une moindre attaque par le parasite (Jamil et al., 2011). D'autre part, des mutants de tomate et de riz déficients en strigolactone, ou des plants de riz traités avec un inhibiteur de la voie de synthèse des strigolactones présentent une meilleure résistance aux plantes parasites ceci grâce à une moindre induction de la germination (Umehara et al., 2008 ; Dor et al., 2011 ; Kohlen et al., 2012 ; Jamil et al., 2010). Ces données indiquent que la régulation de la germination par l'hôte peut constituer une voie de contrôle efficace de l'infection par les plantes parasites.

Des travaux menés sur le sorgho ont identifié plusieurs cultivars induisant faiblement la formation d'haustorium chez *Striga*. Les auteurs suggèrent que ces cultivars pourraient produire des molécules inhibant l'initiation de la formation des haustoria, ce qui les rendrait plus résistants aux attaques de plantes parasites (Rich et al., 2004).

Lors d'une interaction compatible l'haustorium se fixe à la racine puis pénètre la racine hôte jusqu'à atteindre les vaisseaux de l'hôte. Durant cette phase plusieurs mécanismes de défense peuvent être mis en place par la plante hôte, rendant ainsi l'interaction incompatible. Une réaction de type « réponse hypersensible » (HR) peut par exemple être observée. Chez certains cultivars de sorgho lors d'une attaque par *Striga spp*, on peut observer des zones de nécrose autour des points de fixation des haustoria, qui limitent le développement du parasite (Mohamed et al., 2003 ; Li et Timko, 2009).

On peut aussi observer des défauts de pénétration du parasite à l'intérieur de la racine hôte. Le parasite n'arrive pas à pénétrer la racine, ou bien ne peut atteindre le cylindre central. Ce phénomène est observé lors d'une interaction incompatible. La production de subérine par l'hôte pourrait contribuer à ce phénomène (Kubo et al., 2009). Chez certaines plantes résistantes un enroulement du parasite dans le cortex racinaire autour du cylindre central peut



**Figure 15 : Exemple de réactions compatible et incompatible entre la plante parasite *Striga* et son hôte.** (A) Interaction compatible ; la plante parasite se connecte aux vaisseaux conducteurs de l'hôte et peut se développer normalement. (B) Interaction incompatible ; la plante parasite ne parvient pas à franchir le cylindre central et à se connecter aux vaisseaux conducteurs de l'hôte se qui induit la nécrose du parasite. P: haustorium du parasite, En : endophyte (partie interne de l'haustorium), Hc : cortex de l'hôte, Hx : Xylème de l'hôte, He : endoderme de l'hôte, Px : xylème du parasite, Hy : corps hyalin (zone d'intense activité du métabolisme azoté)(Gurney et al., 2005).



être observé (Fig.15). Le parasite ne parvient pas à atteindre les vaisseaux vasculaire et finit par dégénérer (Swarbrick et al., 2008). Dans le cadre de l'interaction *Orobanche crenata* / *Fabaceae*, on peut observer une importante lignification au niveau de l'endoderme et du pericycle. Ce renforcement permet de prévenir l'intrusion du parasite jusqu'aux vaisseaux conducteurs de l'hôte (Pérez-de-Luque et al., 2004).

Le parasite une fois connecté aux tissus vasculaires y prélève les nutriments dont il a besoin pour se développer. L'un des mécanismes de défense, à ce stade, chez la plante hôte est de boucher les vaisseaux conducteurs du parasite, de sorte que ce dernier ne puisse plus s'alimenter. Pérez-de-Luque et al (2004) ont observé la sécrétion d'une substance remplissant l'apoplaste à l'interface hôte/parasite. Cette substance bloque les connections entre les vaisseaux du parasite et ceux de l'hôte, et est composée majoritairement de carbohydrates et de polyphénols (Perez-de-Luque, 2006).

D'autres mécanismes de défense peuvent encore être induits. On observe par exemple une augmentation de l'expression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes (qui pourraient participer au renforcement des parois au niveau de la zone d'infection) ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation du jasmonate (JA), connue pour être activée suite aux blessures (Dos Santos et al., 2003 ; Hassan et al., 2004 ; Hiraoka et Sugimoto, 2008). Aucune réaction de défense dépendante de l'acide salicylique (SA) n'est observée durant l'infection par l'orobanche. Toutefois, l'application exogène de SA permet une meilleure résistance aux orobanches (Smith et al., 2009). Enfin, l'analyse de mutants dans la voie de signalisation de la symbiose rhizobienne et mycorhizienne montre une plus grande sensibilité à l'orobanche, suggérant un rôle de cette voie dans le contrôle de l'infection (Fernandez-Aparicio et al., 2010).

### **III.C. Méthodes de lutte contre les plantes parasites**

#### **III.C.1. Pratiques agricoles**

Une fois installée l'orobanche devient difficile à contrôler, la prévention des risques est donc d'une grande importance. Ainsi, des méthodes simples, comme la vérification de



l'absence de contamination dans les lots de graines, ou la mise en quarantaine des parcelles infectées, permettent de réduire les risques d'infection.

La solarisation est une technique qui utilise l'énergie du soleil pour produire des fortes températures sur une surface de sol couverte d'un film transparent. Des températures de plus de 55°C sont atteintes permettant ainsi de provoquer la mort des graines parasites. Toutefois, cette technique reste assez coûteuse et ne peut être réalisée que dans des régions où il y a de longs étés ensoleillés (Mauromicale et al., 2005).

Une autre façon de réduire l'infection par l'orobanche est de décaler la date de semis. En effet, il a été observé que des semis précoces favorisaient l'infection par l'orobanche. La germination de l'orobanche étant fortement liée à la température du sol, en décalant les dates de semis les conditions pédoclimatiques sont différentes et permettent une moindre germination des graines d'orobanche (Pérez-de-Luque et al., 2010 ; Grenz et al., 2008 ; Eizenberg, 2003).

Plusieurs études ont montré qu'un apport d'azote ou de phosphate permet de réduire l'infection par l'orobanche (Labrousse et al., 2010 ; Jamil et al., 2012). En général, une meilleure fertilisation permet à la plante d'être en meilleure santé et permet ainsi une meilleure résistance aux orobanches (Rubiales et al., 2009). D'autre part un apport supplémentaire de minéraux réduit la sécrétion de strigolactones par la plante hôte, limitant ainsi la germination du parasite (Yoneyama et al., 2007a). Toutefois, cette méthode reste assez coûteuse, même si elle permet d'augmenter les rendements, et reste écologiquement discutable car la fabrication et l'utilisation d'engrais sont fortement polluantes.

« L'inter-cropping » ou « companion cropping » est une méthode de culture où l'on associe plusieurs cultures sur la même parcelle. C'est une technique peu coûteuse souvent utilisée en Afrique pour lutter contre *Striga*. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le rôle protecteur de « l'inter-cropping ». Certaines plantes peuvent induire la germination des graines parasites sans permettre leur fixation (on appelle ce phénomène la germination suicide). D'autre part, l'augmentation du couvert végétal permet d'augmenter la surface ombragée ce qui réduit la température au sol, et par conséquent la germination. En outre, l'utilisation de légumineuses, plantes fixatrices d'azote, augmenterait la fertilisation du sol et pourrait expliquer la diminution de l'infection (Fernández-Aparicio et al., 2010a ; Rubiales et al., 2009). Enfin, des mécanismes allélopathiques pourraient aussi expliquer le rôle protecteur de l'intercropping. Il a par exemple été observé que certaines plantes utilisées sécrètent des

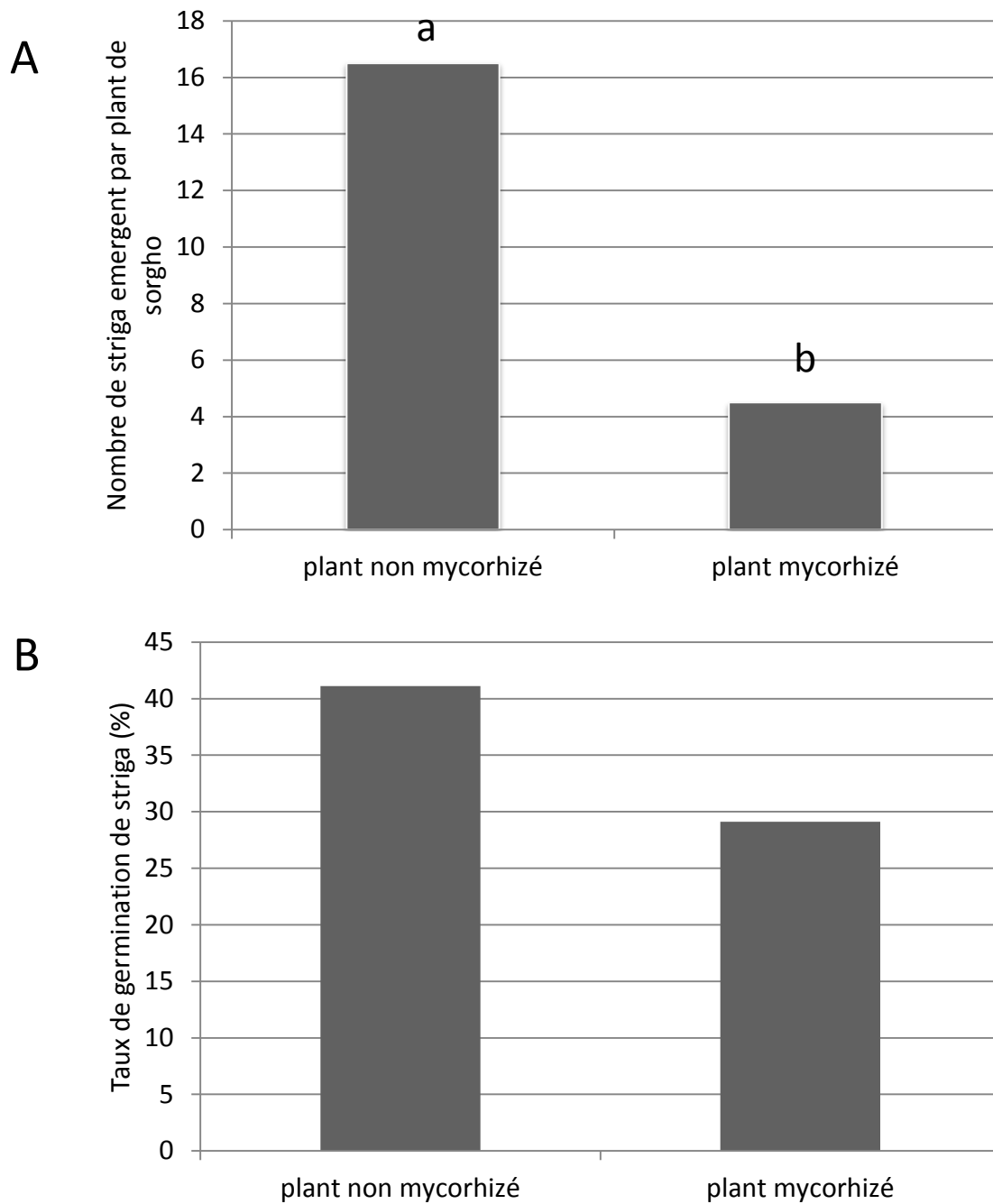


molécules inhibant la germination des orobanches (Evidente et al., 2007 ; Khan et al., 2008 ; Pickett et al., 2010).

### III.C.2. Méthodes chimiques

Afin de lutter contre l'orobanche l'utilisation d'herbicides a été envisagée. Les herbicides peuvent être appliqués après l'attachement du parasite à l'hôte. L'herbicide passera alors par les tissus vasculaires de l'hôte puis atteindra le parasite. Plusieurs herbicides permettent de réduire l'infection par l'orobanche. Ils sont difficiles à développer car ils doivent être à la fois efficace contre le parasite et inoffensif pour la plante hôte (Aly et al., 2001 ; Eizenberg et al., 2004). En outre, cette approche reste couteuse, des races d'*O. cumana* résistante à l'herbicide risquent d'émerger et peut causer des problèmes pour l'environnement, la santé des agriculteurs et des consommateurs.

Une méthode de lutte originale est celle dite de "germination suicide". Cette méthode consiste à induire la germination des graines d'orobanche en absence de leurs hôtes. Depuis l'identification des inducteurs de la germination des graines d'orobanche par Cook et al (1966), de nombreuses études ont cherché à identifier des molécules capables d'induire la germination des graines au champ. La première tentative de germination suicide a été réalisé à l'aide de GR24, toutefois cette tentative n'a pas donné de résultats probants du fait de l'instabilité de la molécule au champ (Johnson et al., 1976). De nouvelles recherches ont permis de mettre au point des analogues des strigolactones, notamment le Nijmegen-1, plus stables dans le sol et tout aussi efficaces sur la germination des orobanches (Fig.9) (Wigchert et al., 1999 ; Kgosi et al., 2012). Cette technique semble prometteuse, car ces molécules sont efficaces à faible concentration et ne semblent pas avoir d'effet négatif sur l'environnement. De plus amples études sont à mener afin de savoir si le cout de ces produits peut être compatible avec une utilisation agronomique à grande échelle.



**Figure 16 : Effet de la mycorhization du sorgho sur l'infection par *S. hermontica*.** (A) Effet de la mycorhization du sorgho sur le nombre de *S. hermontica* émergent, d'après Lenzemo et al., 2001. (B) Taux de germination de graines de *S. hermontica* exposées à des exsudats de plants de sorgho non mycorhizés et mycorhizés, d'après Lenzemo et al., 2007.

### III.C.3. Utilisation de microorganismes

Des méthodes de lutte biologique, comme l'utilisation de champignons pathogènes de l'orobanche, font également partie des pistes étudiées. Plusieurs souches d'organismes pathogènes ont pu être isolées, ces souches permettent d'induire la nécrose du parasite une fois celui-ci fixé à l'hôte (Thomas et al., 1998 ; Boari et Vurro, 2004 ; Müller-Stöver et Kroschel, 2005). Malgré l'identification de souches n'affectant pas l'hôte, cette technique reste délicate à mettre en place car elle implique l'épandage d'organismes potentiellement pathogènes pour d'autres plantes aux abords de la culture.

Au-delà de leur effet pathogène proprement dit, certains de ces organismes ont aussi montré un rôle dans l'inhibition de la germination des graines de plantes parasites, comme certaines souches de *Fusarium* et de *Myrothecium*. Cette inhibition semble due à la sécrétion de molécules diffusibles par le champignon (Ahmed et al., 2001 ; Abouzeid et El-Tarabily, 2010). Certaines de ces molécules ont été caractérisées comme la verrucarine, le vrichotheceane ou l'AAL-toxine. Ces molécules toxiques pour la graine vont interférer avec plusieurs voies métaboliques et pourront induire des déstructurations cellulaires (Sugimoto et al., 2002 ; Andolfi et al., 2005 ; de Zélicourt et al., 2009).

D'autres travaux se sont intéressés à l'utilisation d'organismes bénéfiques pour lutter contre l'orobanche. Ainsi, l'utilisation d'*Azospirillum brasilense*, une bactérie fixatrice d'azote (non symbiotique), permet de réduire l'infection par *Striga* grâce à l'inhibition de la germination des graines du parasite tout en permettant une fertilisation du sol (Miché et al., 2000). L'utilisation de bactéries symbiotiques (*Rhizobium leguminosarum*) chez les *Fabaceae*, permet de réduire l'infection par *Orobanche crenata*. Les plants colonisés par *Rhizobium* induisent une moindre germination des graines d'orobanches, ce qui semble dû à la sécrétion de composés phénoliques inhibiteurs de la germination des graines (Mabrouk et al., 2007a). D'autre part, l'inoculation de pois par *Rhizobium* permet l'activation de voies de défenses jouant un rôle dans la résistance à l'orobanche (Mabrouk et al., 2007b).

Ces dernières années plusieurs travaux se sont focalisés sur l'utilisation de champignons symbiotiques pour contrôler l'infection par les plantes parasites. Les premiers travaux ont montré que l'emploi des champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) permet de limiter l'infection par *Striga* chez le sorgho (Fig.16A) : les tiges de *Striga* émergent plus





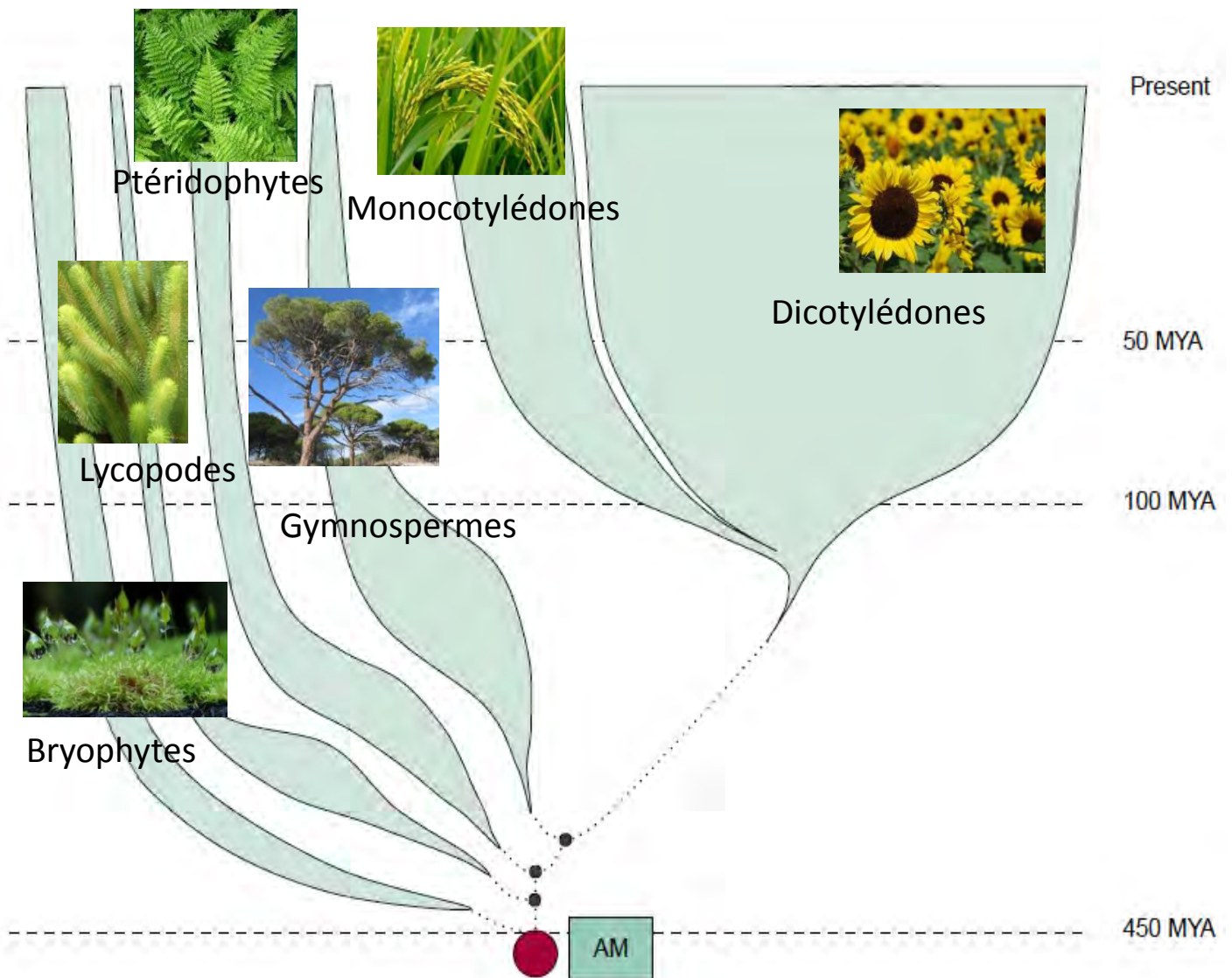
tardivement et en nombre réduit (Lendzemo et Kuyper, 2001). Ceci permet de réduire les dommages causés par *Striga*, les plants mycorhizés montrant une biomasse plus importante que les plants non-mycorhizés. Une étude menée sur le maïs a aussi permis de montrer que l'inoculation par des champignons MA réduisait le développement de *S. hermontica* (Othira et al., 2012). De plus amples investigations ont permis aux auteurs de montrer que les exsudats des plants mycorhizés induisent une moindre germination des graines de *Striga* (Fig.16B) (Lendzemo et al., 2007 ; Lendzemo et al., 2009). De la même manière, des travaux menés par Fernández-Aparicio et al (2010b) ont montré que les exsudats de pois mycorhizés étaient moins actifs sur la germination de graines d'orobanche, confirmant ainsi les résultats obtenus sur sorgho. Les auteurs de ces différents travaux ont proposé que les plants colonisés par les champignons MA produisaient moins de molécules inductrices de la germination que les plants non-mycorhizés. En accord avec cette hypothèse il a été montré peu après chez la tomate, par des analyses biochimiques, que la production de strigolactones était en effet très significativement réduite dans les plantes mycorhizées (Lopez-Raez et al 2011).

C'est sur cette base qu'il m'a été proposé d'étudier l'effet de la symbiose MA sur l'infestation du tournesol par *O. cumana*. Mais avant d'entrer dans le vif du sujet nous allons nous intéresser à cette symbiose mycorhizienne à arbuscules.

#### **IV. La symbiose mycorhizienne à arbuscules**

##### **IV.A. Les champignons mycorhiziens à arbuscules**

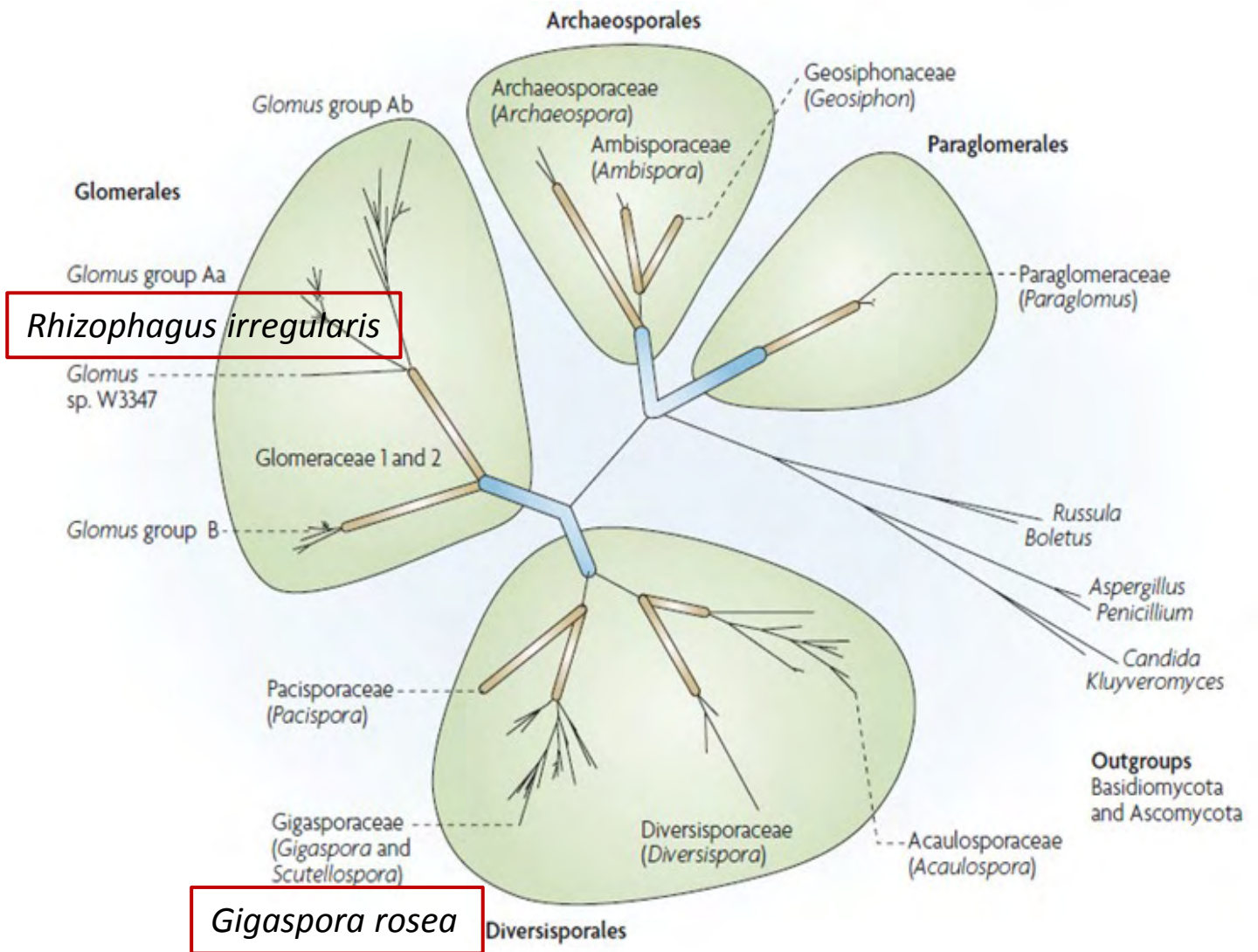
Dans le sol vivent de nombreux microorganismes interagissant étroitement avec les plantes. Certains de ces microorganismes sont phytopathogènes, dans ce cas ils peuvent se développer aux dépens de leur hôte. D'autres sont symbiotiques ; ils établissent avec les plantes des relations à bénéfice réciproque. Parmi ces symbiotes on trouve des bactéries fixatrices d'azote à l'origine de la symbiose rhizobienne, qui concerne les plantes de la famille des *Fabaceae* (légumineuses). Les bactéries se développent dans des nodosités racinaires où, grâce à un complexe enzymatique, la nitrogénase, elles sont capables de fixer l'azote atmosphérique. L'ammoniac produit sera ensuite assimilé par la plante en échange de carbone réduit (Lodwig et al., 2003). Grâce à cette symbiose les légumineuses peuvent vivre dans des



**Figure 17 : Arbre phylogénétique représentant la répartition de la symbiose MA dans le règne végétal.** L'association symbiotique entre les champignons MA et les plantes terrestres est apparue il y a plus de 400 millions d'années et se retrouve représentée dans tout le règne végétal (d'après Kistner et Parniske, 2002).

sols très pauvres en azote. Par ailleurs, la plupart des plantes sont capables d'établir une relation symbiotique avec des champignons du sol, les champignons mycorhiziens. Il existe deux types principaux de symbioses mycorhiziennes, la symbiose ectomycorhizienne et la symbiose endomycorhizienne. Les champignons ectomycorhiziens sont principalement présents sur les racines des arbres des régions tempérées et boréales. Leurs hyphes forment un manteau autour de la racine et pénètrent entre les cellules de la racine pour former le réseau de Hartig, lieu d'échange entre le champignon et la plante. Par contre, lors de la symbiose endomycorhizienne une partie des hyphes du champignon pénètre à l'intérieur de certaines cellules du cortex racinaire de l'hôte afin d'établir les structures nécessaires aux échanges entre la plante et le champignon (Kistner et Parniske, 2002 ; Bonfante et Anca, 2009). La symbiose endomycorhizienne la plus répandue est la symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA) chez laquelle la structure fongique d'échanges intracellulaire, l'arbuscule, est une structure caractéristique, extrêmement ramifiée.

La symbiose MA est une interaction très ancienne ; des traces de structures semblables aux champignons MA actuels ont été observées dans des fossiles d'*Aglaophyton*, une plante de l'ère Dévonienne (Remy et al., 1994), ainsi que dans des fossiles datant de l'Ordovicien suggérant que les premières symbioses MA seraient apparues il y a plus de 460 millions d'années. L'apparition d'une telle symbiose au moment de la colonisation du milieu terrestre par les plantes laisse penser que la symbiose MA aurait facilité cette colonisation en améliorant la nutrition minérale et hydrique des plantes. Cette apparition dès le début de l'évolution des plantes terrestres expliquerait aussi le caractère extrêmement répandu de cette symbiose dans le monde végétal. Aujourd'hui elle concerne environ 80% des espèces de plantes terrestres. On retrouve cette symbiose chez les dicotylédones, les monocotylédones, les gymnospermes, les ptéridophytes, les lycopodes ainsi que chez les bryophytes (Fig.17) (Kistner et Parniske, 2002). Toutefois, certaines familles de plantes sont incapables d'établir la symbiose MA telles que les *Brassicaceae*, les *Chenopodiaceae*, les *Proteaceae* ou quelques genres des *Fabaceae* comme le genre *Lupinus* (Brundrett, 2009). Du fait de la présence d'associations symbiotiques chez les plantes basales ainsi que chez des fossiles datant de plus de 400 millions d'années, on pense que ces espèces de plantes non mycotrophes, au cours de l'évolution, ont perdu la capacité d'effectuer la symbiose MA. Ces plantes disposent aujourd'hui d'autres mécanismes leur permettant de prélever les minéraux. Ainsi, les plantes de la famille des *Proteaceae* (ainsi que les plantes du genre *Lupinus*) forment de denses agrégats de poils absorbants leur permettant d'augmenter la surface d'échange avec le sol ce



**Figure 18 : Phylogénie des *Glomeromycota*.** Les champignons MA forment un groupe monophylétique, les *Glomeromycota*, qui peut être partagé en 4 Ordres(d'après Schüßler et al., 2001).

qui facilite l'acquisition des minéraux faiblement concentrés du sol (Lambers, 2006). D'autres sécrètent des acides organiques permettant une meilleure solubilisation du phosphore (Shane et al., 2003). D'autres encore ont choisi des stratégies différentes afin d'acquérir les minéraux essentiels à leur développement. On peut citer les plantes carnivores (qui acquièrent les nutriments via leurs proies) ou les plantes parasites obligatoires qui puisent les nutriments sur leur plante hôte (Brundrett, 2009).

Les champignons MA appartiennent à un groupe monophylétique, le phylum des *Glomeromycota* (Schüßler et al., 2001), différents des *Zygomycota* avec qui ils étaient primitivement regroupés (Morton et Benny, 1990). Cette nouvelle classification est basée sur l'analyse de la petite sous unité de l'ARN ribosomique. Quatre ordres distincts ont ainsi pu être définis au sein des *Glomeromycota* : les *Paraglomerales*, les *Archaeosporales*, les *Diversisporales* et les *Glomerales* (Fig.18) (Schüßler et al., 2001). Au sein des *Glomerales* on trouve le champignon MA *Glomus intraradices*, récemment rebaptisé *Rhizophagus irregularis* (Schüßler et Walker., 2010), et au sein des *Diversisporales* se positionne *Gigaspora rosea*. Ces deux champignons MA seront utilisés lors de la thèse.

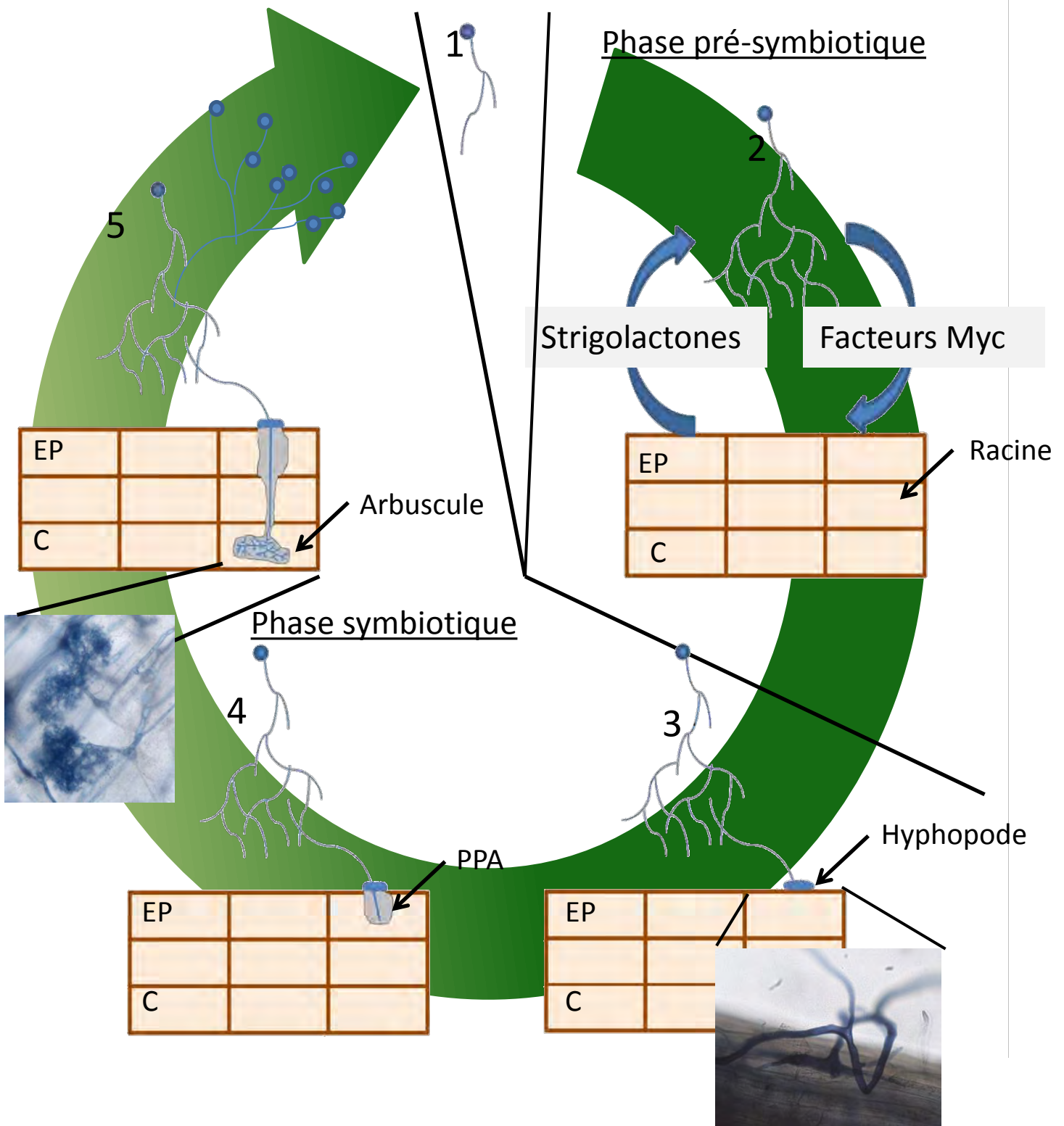
Les champignons MA dépendent entièrement de leur hôte pour leur nutrition carbonée, ce sont donc des biotrophes obligatoires (Bago et al., 2000). En échange de ce carbone et en formant un réseau d'hyphes extra-racinaires dense qui s'étend au-delà des racines et de la rhizosphère (pouvant atteindre cent mètres d'hyphes par cm<sup>3</sup> de sol), ils améliorent grandement la nutrition hydrique et minérale de leur plante hôte (Johansen et al., 1993 ; Miller et al., 1995 ; Smith et al., 2003).

#### **IV.B. Cycle de vie des champignons MA**

Le cycle de développement des champignons MA comporte plusieurs phases. La première phase est dite asymbiotique : les spores sont capables de germer spontanément et de croître pendant quelques jours sans pratiquement entamer les réserves énergétiques. Cette croissance asymbiotique s'arrête si le champignon ne rencontre pas de racines hôtes (Bécard et Piché, 1989b). Dans le cas contraire, le champignon pourra entrer dans la phase présymbiotique puis symbiotique (Fig.19).

## Phase asymbiotique

## Phase pré-symbiotique



**Figure 19 : Cycle de développement des champignons mycorhiziens à arbuscules.** (1) Durant la phase asymbiotique la spore germe mais se développe très peu. (2) Durant la phase présymbiotique un échange de signaux moléculaire se met en place entre les 2 partenaires de l'interaction, le champignon active son métabolisme et se ramifie en réponse à des strigolactones. Il produit des facteurs Myc qui activent le programme symbiotique de la plante hôte. (3) Durant la phase symbiotique, le champignon rentre en contact avec la racine et développe un hyphopode qui va lui permettre de pénétrer la racine. (4) Suite à la formation de l'hyphopode, la plante met en place l'appareil de pré-pénétration (PPA) qui permet au champignon de s'introduire dans la racine. (5) Le champignon colonise la racine, forme des structures intracellulaires hyper ramifiées, les arbuscules, développe un important mycélium extraracinaire et sporule. EP : épiderme ; C : cortex.

#### IV.B.1. La phase pré-symbiotique.

La phase pré-symbiotique est une phase de reconnaissance mutuelle, pendant laquelle des signaux moléculaires sont échangés entre les deux partenaires sans qu'il y ait de contact direct entre les deux organismes (Fig.19-2).

##### IV.B.1.a. Du « Branching factor » aux strigolactones

Plusieurs travaux ont montré qu'en présence d'exsudats racinaires la croissance des hyphes germinatifs des champignons MA était significativement stimulée. Cette stimulation de croissance se traduit le plus souvent par une ramification (« branching ») plus importante des hyphes (Bécard et Piché, 1989a ; Giovannetti et al., 1993). D'autre part, il a été montré que les exsudats de plantes non-hôtes ne permettaient pas de stimuler cette croissance fongique (Bécard et Piché, 1990 ; Giovannetti et al., 1994).

Des expériences séparant la racine hôte du champignon MA, à l'aide d'une membrane à dialyse, ont montré que la racine hôte (ici *Ocimum basilicum L*) produisait un signal diffusible d'un poids moléculaire inférieur à 500 Da (Giovannetti et al., 1996). Par la suite, Buée et al (2000) ont réussi à obtenir des fractions semi-purifiées permettant d'induire le « branching » du champignon. Les auteurs de ces travaux montrent que ce signal est présent dans les exsudats racinaires de toutes les espèces mycotrophes testées et absent des espèces non mycotrophes. La présence des signaux dans la phase acétate d'éthyle après fractionnement, ainsi que leur profil de rétention sur une colonne C18 suggèrent que le « Branching factor » est une molécule hydrophobe (Buée et al., 2000 ; Nagahashi et Douds, 2000).

Akiyama et al (2005) ont réussi à purifier le « Branching factor » à partir d'exsudats racinaires de *Lotus japonicus*, et de l'identifier comme étant le 5-deoxy-strigol (Fig.9), une molécule de la famille des strigolactones. Besserer et al (2006) ont également identifié une strigolactone, la sorgolactone, dans le « Branching factor » isolé à partir d'exsudats racinaires de sorgho. Par la suite, l'utilisation de mutants déficients dans la synthèse de strigolactones a permis de montrer que les strigolactones jouent un rôle important dans l'établissement de la





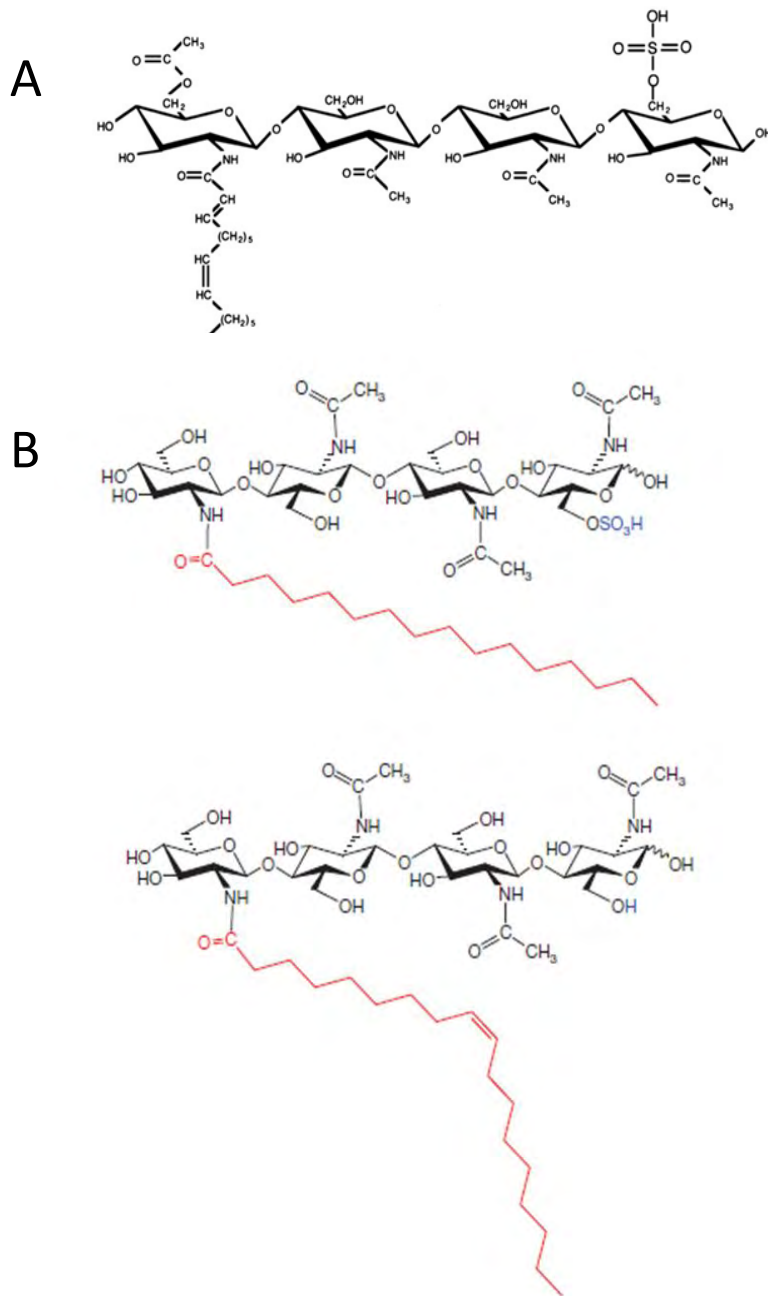
symbiose MA, les plants mutants montrant une moindre colonisation par le champignon MA (Gomez-Roldan et al., 2008).

Une fois les strigolactones perçues par le champignon MA, on va remarquer une réactivation du métabolisme fongique. On observe des modifications de la forme et de l'activité des mitochondries conduisant à une plus forte respiration (Besserer et al., 2006). Le métabolisme oxydatif et la synthèse d'ATP sont activés en quelques minutes (Besserer et al., 2008).

Les strigolactones sont actives à de très faibles concentrations : elles peuvent induire la ramification du champignon MA à des concentrations de l'ordre de  $10^{-13}$ M, suggérant l'existence d'un système de reconnaissance très sensible (Besserer et al., 2006). Différents tests d'activité sur les champignons MA ont permis d'établir la « structure requise » des strigolactones. Ainsi, il a été montré que la perte du cycle A ou des cycles AB rendait la molécule moins active (mais pas complètement inactive). Par contre, la perte du cycle D ou la modification du pont éno-éther, reliant le cycle C au cycle D conduit à une perte totale de l'activité, montrant le rôle essentiel de cette partie de la molécule dans les mécanismes de reconnaissance par les champignons MA (Akiyama et al., 2010).

L'établissement de la symbiose MA est fortement lié au phosphate accessible pour la plante. Plusieurs travaux ont montré une inhibition de la colonisation de la racine par le champignon MA dans des conditions de forte fertilisation phosphatée (Graham et al., 1981 ; Nagy et al., 2009 ; Balzergue et al., 2011). Ce contrôle semble en partie dû à la régulation de la sécrétion des strigolactones par le système racinaire. En effet, on constate, en condition de forte fertilisation phosphatée, une importante diminution de la sécrétion de strigolactones par la plante (Yoneyama et al., 2007a ; Yoneyama et al., 2007b). Toutefois, l'ajout de strigolactones en condition de forte nutrition phosphatée ne permet pas d'améliorer la mycorhization des plants, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de régulation (Balzergue et al., 2011).

Par ailleurs, on observe chez les plants mycorhizés une diminution de la sécrétion des strigolactones par la plante, ceci suggère un système d'autorégulation de la mycorhization via la régulation de la sécrétion des strigolactones (López-Ráez et al., 2011).



**Figure 20 : Structure des facteurs symbiotiques Nod et Myc.** (A) Le principal facteur Nod de *Sinorhizobium meliloti*. (B) Principaux facteurs Myc (Myc-LCOs) de *Rhizophagus irregularis* (Maillet et al., 2011).

#### IV.B.1.b. La nature du « Facteur Myc »

Lors de la symbiose rhizobienne, entre les plantes de la famille des *Fabaceae* et les bactéries rhizobiacées, un dialogue moléculaire est établi durant les phases précoces de l'interaction. En réponse aux flavonoïdes produits par la plante les bactéries sécrètent des lipo-chitooligosaccharides, appelés facteurs Nod. La perception de ce signal par la plante permet aux premières étapes de l'interaction symbiotique de se dérouler correctement (Pour revue Cooper, 2007).

La perception du facteur Nod par la plante se fait par l'intermédiaire d'une voie de signalisation dont plusieurs acteurs ont été caractérisés. La perception du signal se fait par l'intermédiaire de récepteurs LysM-RLK. En aval de ces récepteurs d'autres protéines de la voie de transduction ont été caractérisées permettant notamment la mise en place d'oscillations calciques qui seront décodées par plusieurs protéines dont une calmoduline kinase. Enfin, des facteurs de transcriptions NSP1, NSP2, NIN interviennent en fin de cette voie de signalisation (Pour revue Riely et al., 2004 ; Parniske, 2008 ; Singh et Parniske, 2012).

Certains des éléments de cette voie sont également nécessaires pour la mise en place de la symbiose MA. On parle donc de voie symbiotique commune. Ces découvertes ont conduit à proposer que la voie de signalisation Nod serait une adaptation de la voie de signalisation Myc, la symbiose mycorhizienne étant apparue bien avant la symbiose rhizobienne. De nombreux travaux ont montré que des signaux fongiques diffusibles pouvaient modifier l'expression de gènes, et entraîner des modifications du métabolisme ou de l'architecture racinaire chez la plante hôte (kosuta et al., 2003 ; Weidmann et al., 2004 ; Kuhn et al., 2010 ; Gutjahr et al., 2009 ; Oláh et al., 2005). Ces signaux par analogie avec les facteurs Nod ont été appelé facteurs Myc. Dans un travail publié récemment (Maillet et al., 2011), les auteurs sont partis de l'hypothèse selon laquelle les facteurs Nod, qui possèdent un noyau structural constitué d'un oligomère de chitine (métabolite que l'on trouve typiquement chez les champignons) seraient dérivés des facteurs Myc et qu'ainsi les facteurs Myc posséderaient eux aussi un noyau. Ainsi, Maillet et al (2011) ont pu identifier dans les exsudats de *Rhizophagus irregularis* la présence de lipochitooligosaccharides (Myc LCOs) structurellement proches des facteurs Nod (Fig.20). Ces molécules sont composées d'un squelette de N-acétylglucosamine de quatre à cinq résidus. Elles peuvent être sulfatées ou non



sur le sucre réducteur et portent, sur la fonction amine du résidu non réducteur, soit un acide gras en C16 soit un acide gras en C18, pouvant être saturé ou non. Les auteurs ont montré que l'application de ces molécules permettait d'augmenter le taux de mycorhization des plants traités et de stimuler la prolifération des racines latérales.

Cette découverte des Myc LCOs dans des exsudats de champignon MA n'exclut pas que d'autres signaux fongiques, non encore identifiés, soient également impliqués dans les phases précoces de la symbiose MA (Bonfante et Requena, 2011).

#### **IV.B.2. La phase symbiotique**

La phase symbiotique de l'interaction commence au moment où le champignon MA entre en contact avec la racine de l'hôte. Cette première étape débute par la formation d'un hyphopode (Fig.19-3), qui permet au champignon MA d'adhérer à la surface de l'épiderme racinaire (Bonfante et Genre, 2010).

Suite à la formation de l'hyphopode de nombreux gènes sont activés dont des gènes impliqués dans le remodelage de la paroi. On observe une restructuration du cytoplasme de la cellule sous-jacente, indispensable au succès de la pénétration du champignon MA : l'appareil de pré-pénétration (PPA) (Fig.19-4). La formation de cette structure est associée à une migration du noyau qui semble guider le PPA à travers la cellule. Le champignon s'introduit alors à travers le PPA afin d'atteindre le cortex interne où s'établira la symbiose (Genre et al., 2005 ; Genre et al., 2008).

Puis le champignon colonisera le cortex racinaire et formera des structures intracellulaires hyper-ramifiées: les arbuscules (Fig.19-5). Ces structures fongiques ne sont toutefois pas incorporées à la cellule mais elles restent séparées du cytoplasme de la cellule hôte par une membrane spécifique appelée membrane périarbusculaire (Pumplin et Harrison, 2009). Cette membrane est une interface clé de la symbiose MA. C'est à son niveau que l'on trouve notamment les transporteurs de phosphate permettant le transfert efficace du phosphate du champignon vers la racine (Hahn et Mendgen, 2001 ; Harrison et al., 2002 ; Lima et al., 2009). Récemment, un transporteur de monosaccharides (MST2) a été identifié chez le champignon MA *R. irregularis*. Ce transporteur, probablement impliqué dans l'échange de



monosaccharides entre la plante et le champignon MA, est fortement exprimé au niveau des arbuscules et des hyphes intercellulaires (Helber et al., 2011).

#### **IV.C. Les bénéfices de la symbiose MA pour la plante**

De nombreux travaux ont étudié l'impact de la mycorhization sur la plante hôte dans différentes conditions de culture et de stress afin de préciser les bénéfices apportés par la symbiose MA.

Un premier axe de recherche a été de mesurer l'effet de la mycorhization sur la croissance de l'hôte (Mosse, 1973 ; Crush, 1974 ; Hayman, 1974 ; Schubert et Hayman, 1986). Les travaux ont montré que les plantes mycorhizées avaient souvent une biomasse aérienne et racinaire plus importante. L'augmentation de biomasse de la plante hôte est corrélée à une concentration en phosphate plus importante, suggérant ainsi que la hausse de biomasse serait la conséquence d'une meilleure nutrition phosphatée (Stribley et al., 1980). Les plants mycorhizés montrent une meilleure acquisition d'autres minéraux tels que l'azote, le soufre ou le calcium, participant aussi à leur meilleure croissance (Clark et Zeto, 2000). D'autre part, on observe chez les plantes mycorhizées une activité photosynthétique plus efficace, pouvant ainsi expliquer l'augmentation de la biomasse. Néanmoins, la totalité du surplus des composés photosynthétiques produits ne sera pas transformée en biomasse végétale mais sera en partie transférée vers le champignon MA (Allen et al., 1981 ; Wright et al., 1998). On estime que de 4 à 20% des photoassimilats produits par la plante sont dirigés vers le champignon MA (Bago et al., 2000).

La mycorhization permet aussi d'augmenter la tolérance des plantes à divers stress et notamment le stress hydrique. On observe chez les plants mycorhizés un potentiel hydrique plus élevé, expliqué notamment par la meilleure nutrition minérale mentionnée plus haut et par la synthèse de proline au niveau du système racinaire (Augé, 2001). La symbiose MA semble ainsi influencer sur l'ajustement osmotique et le maintien d'un gradient de potentiel hydrique favorable à l'acquisition d'eau par la plante (Rivera-Becerril et al., 2002 ; Porcel et Ruiz-Lozano, 2004). Les stomates peuvent ainsi rester ouverts plus longtemps permettant une meilleure vigueur de la plante. En outre, le développement du système racinaire et la présence d'un réseau mycélien étendu au delà de la rhizosphère, permet à la plante d'accroître

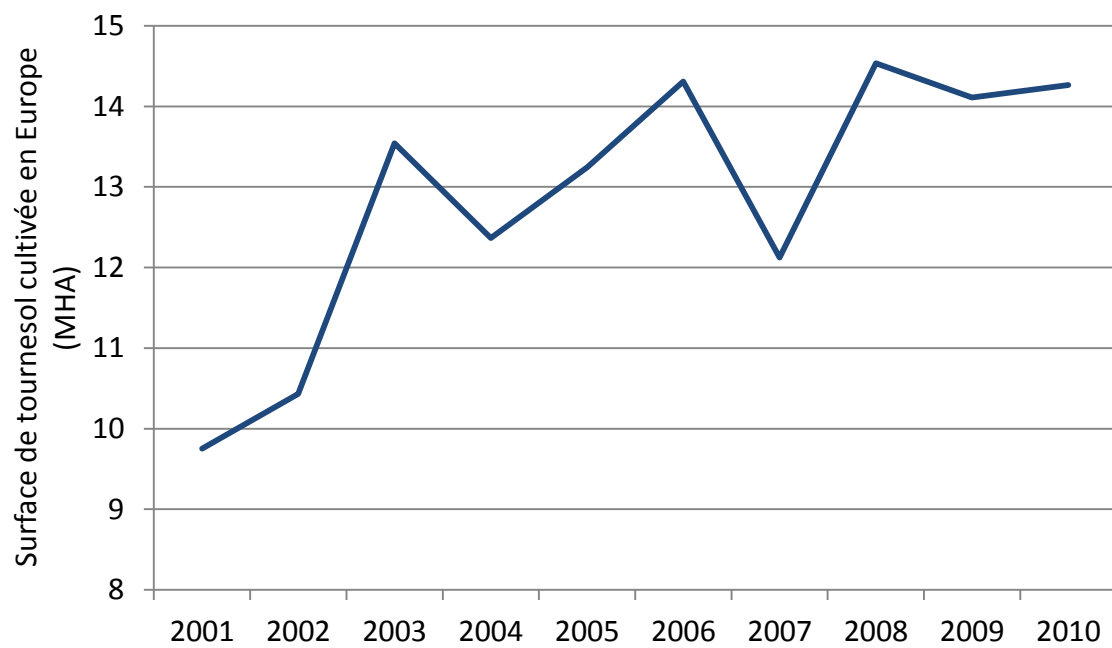




considérablement le volume de sol exploré pour le prélèvement d'eau. Par ailleurs, on a également pu observer une meilleure tolérance des plantes mycorhizées au stress salin et au stress cadmium (Feng et al., 2002 ; Rivera-Becerril et al., 2002).

Un apport bénéfique de la mycorhization a pu être observé lors de diverses interactions avec des pathogènes. On observe par exemple une diminution des attaques des racines par des nématodes. Les mécanismes de cette résistance ne sont pas encore entièrement élucidés mais il semblerait que les exsudats de plants mycorhizés soient moins attractifs pour les nématodes (Hol et Cook, 2005 ; Vos et al., 2011). Des résistances à divers pathogènes du sol tels que *Aphanomyces*, *Verticillium* ou encore *Phytophthora* ont été observées (Harrier et Watson, 2004). Différents mécanismes jouent un rôle dans ce gain de résistance chez les plants mycorhizés : l'amélioration de la nutrition, la compétition pour le site de colonisation, la compétition pour les photosynthétats, des changements de la microflore du sol. On observe ainsi, au niveau de la racine, l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et une production plus rapide et plus intense de certaines enzymes intervenant dans les mécanismes de défenses chez les plantes telles que des chitinases et des glucanases (Pour revue Pozo et Azcon-Aguilera., 2007). Les plants mycorhizés présentent également une meilleure résistance à certains pathogènes foliaires. En effet, il a été observé que la mycorhization de plants de tomates rendait les plants plus résistants au champignon pathogène *Botrytis cinerea* (Fiorilli et al., 2011). Cette meilleure résistance semble liée à l'activation, par le champignon MA, des voies de défenses systémiques : on observe chez les plants mycorhizés une augmentation transitoire de la production de SA pouvant participer à la mise en place de ces mécanismes de défense. En outre, on observe une augmentation du niveau basal de la production de JA chez les plants mycorhizés par rapport aux plants non mycorhizés. Ainsi, cette accumulation de JA induirait, elle aussi, l'activation des voies de défenses systémiques (Truman et al., 2007). Il en résulterait une expression plus rapide des gènes de défense chez les plants mycorhizés en cas d'infection par un pathogène (García-Garrido et Ocampo, 2002 ; Liu et al., 2007 ; Campos-Soriano et al., 2010). Chez le tournesol, la symbiose MA a montré un effet protecteur contre le pathogène *Plasmopara helianthi*, montrant une réduction de l'infection et de la sporulation du pathogène ainsi qu'une meilleure vigueur de la plante mycorhizée (Tosi et al., 1993).

Comme indiqué précédemment, un autre bénéfice de la symbiose MA dans un contexte de stress biotique serait la meilleure résistance à certaines plantes parasites (Lendzemo et al. 2001, 2007 ; Fernández-Aparicio et al., 2010b). C'est cet effet de la symbiose endomycorhizienne qui sera exploré dans la thèse, avec l'objectif d'améliorer la résistance du tournesol au parasite *Orobanche cumana*.



**Figure 21 : Evolution des surfaces cultivées en tournesol entre 2001 et 2010 en Europe.**  
(source FAO).

## V. Objectifs de la thèse

En Europe, le tournesol est une culture majeure (neuvième plante cultivée en 2010, source FAO). Le tournesol est utilisé pour son huile en alimentation humaine, ainsi que pour ses tourteaux en alimentation animale. La demande croissante en huile et tourteaux a conduit à une augmentation des surfaces de culture ces dernières années (Fig.21, source FAO). En raison de l'augmentation des surfaces de nouvelles contraintes sur la culture du tournesol sont apparues. La prolifération de l'*Orobanche cumana* est l'une de ces nouvelles contraintes, et cause de plus en plus de problèmes en Europe. Aujourd'hui, il existe peu de méthodes efficaces pour lutter contre ce pathogène, il est donc important d'identifier de nouvelles approches permettant de lutter contre l'orobanche afin de limiter sa prolifération. L'utilisation des champignons MA s'est montré efficace pour la réduction de l'infection par *Striga* chez le sorgho et le maïs ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans la lutte contre les plantes parasites. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'étude de la triple interaction « plante parasite/plante hôte/champignon MA » et les mécanismes de résistance induit par les champignons MA contre l'orobanche restent encore mal compris.

Le travail de thèse présenté ici a été financé à travers une bourse CIFRE par l'entreprise semencière Soltis (groupe Euralis/Limagrain) et le groupe d'agrofourniture Syngenta. Ces entreprises développent des variétés résistantes à l'orobanche, néanmoins les résistances introduites dans ces variétés sont régulièrement contournées par l'apparition de nouvelles races d'orobanches. Ainsi, compte-tenu de l'avancée d'*O. cumana* en Europe, et notamment en France où elle commence à apparaître, les semenciers cherchent à identifier de nouvelles sources de résistance non génétiques. Ceci, afin de limiter le contournement des résistances et de limiter ainsi la propagation de l'orobanche. C'est dans cette optique que les semenciers se sont intéressés à l'utilisation des champignons MA comme source de résistance. D'autre part, cette étude s'inscrit également dans une perspective de développement de variétés présentant de bons rendements en conditions de faibles intrants, en intégrant l'utilisation des champignons MA. Les groupes semenciers m'ont ainsi demandé d'évaluer l'impact de la mycorhization sur la résistance du tournesol à l'*O. cumana*.

La première étape de l'étude a été de déterminer si les résultats obtenus par Lenzemo et Kuyper (2001) chez le sorgho pouvaient être retrouvés lors de l'interaction entre *O. cumana* et le tournesol. C'est dans le chapitre I que nous allons tester le rôle protecteur des



champignons MA sur l'infection du tournesol par *O.cumana*. Par la suite nous avons cherché à identifier la source potentielle de cette protection.

Dans le chapitre II, nous avons testé l'effet des exsudats de plants de tournesol mycorhizés sur la germination des graines d'*O.cumana*. Plusieurs hypothèses ont été établies pouvant expliquer le rôle protecteur de la symbiose MA sur l'infection par orobanche. Nous avons notamment cherché à déterminer si la baisse de germination était due à un manque d'inducteurs de germination (les strigolactones ou la DCL) ou à la présence d'inhibiteurs de la germination sécrétés par la plante mycorhizée ou le champignon MA.

Enfin dans le chapitre III nous avons exploré une nouvelle méthode d'étude de l'interaction plante hôte/plante parasite *in vitro* à partir de racines « hairy » de tournesol. Cette méthode devrait faciliter dans des travaux futurs le suivi visuel de l'interaction en conditions axéniques, permettant aussi, au gré de l'expérimentateur, de contrôler plus rigoureusement les différents facteurs à étudier.



# Chapitre I : Impact de la mycorhization du tournesol sur l'infection par *O. cumana*

---

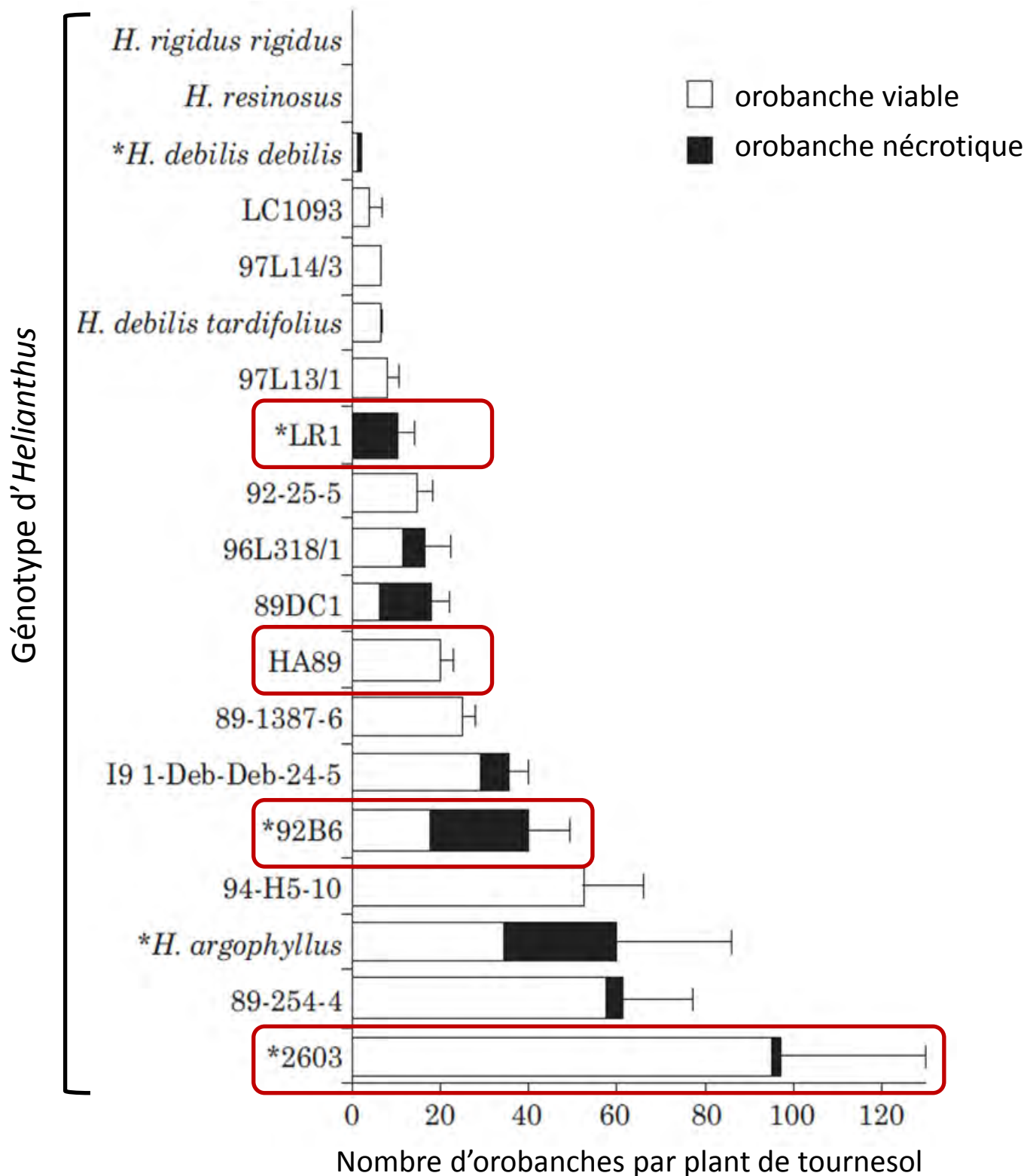
## I. Introduction – Mécanismes de résistance à *O. cumana* chez le tournesol et choix des variétés à étudier

Le tournesol présente une forte sensibilité aux attaques d'*O. cumana*, pouvant entraîner la perte de la récolte. Toutefois, certaines variétés résistantes ont été identifiées. On parle de résistance à l'orobanche si :

- (i) Seulement un faible nombre d'orobanches peuvent se développer sur les racines,
- (ii) Les orobanches fixées aux racines se nécrosent.

Dans certains cas on peut observer une croissance normale de la plante malgré le développement important d'orobanches sur les racines. On parle alors de tolérance plutôt que de résistance.

Afin de lutter contre *O. cumana*, des QTL (*Quantitative Trait Loci*) dominants de résistance, pour la plupart issus d'espèces sauvages ou de genres différents (Fernández-Martínez et al., 2000), ont été introduits dans des variétés de tournesol cultivées par croisement. Les premières résistances génétiques ont ainsi été introduites dans les années 1960 dans des variétés cultivées à partir d'une espèce sauvage, *Helianthus tuberosus* (Pustovoit, 1966). Cette première variété cultivée résistante à l'orobanche comportait le QTL de résistance *Or1*. Néanmoins, il a été très vite observé que les mécanismes de résistance dans ces nouvelles variétés pouvaient être contournés par l'apparition de nouvelles races d'orobanches (Fernández-Martínez et al., 2000 ; Pérez-Vich et al., 2004). Ces nouvelles races peuvent avoir deux origines. (i) Elles peuvent provenir du « stock » d'*O. cumana* sauvage poussant sur des plantes sauvages. (ii) Elles peuvent être originaires de la parcelle cultivée. En effet le très grand nombre de graines produites par les orobanches augmente la probabilité d'apparition de variants capables d'attaquer la variété « résistante ». Ces nouveaux génotypes peuvent alors se multiplier rapidement au cours des générations suivantes et donner naissance à une nouvelle race, face à laquelle les variétés disponibles sont vulnérables. Ainsi, on a défini



**Figure 22 : Degré de résistance de différents génotypes d'*Helianthus* à *O. cumana*.** Le niveau de résistance d'un génotype de tournesol est estimé par le nombre d'orobanches fixées par plant de tournesol. On retrouve les génotypes les plus résistants en haut du diagramme et les plus sensibles en bas du diagramme (d'après Labrousse et al., 2001). Les génotypes encadrés en rouge seront utilisés pendant notre étude.



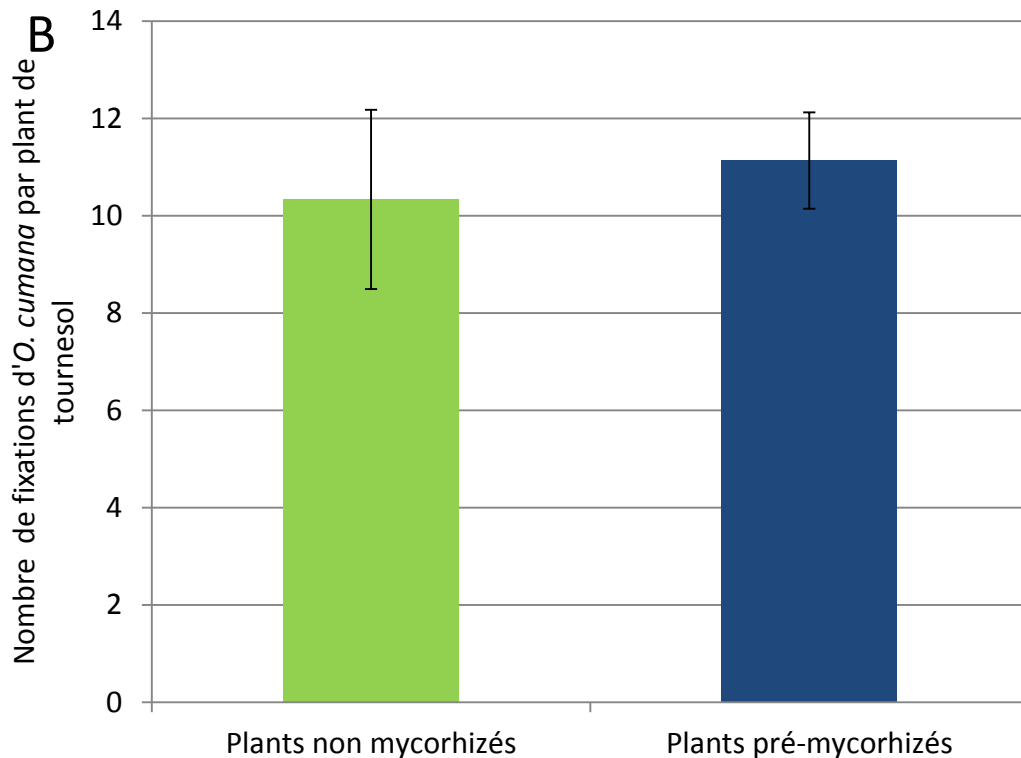
la première race d'orobanche pouvant contourner le QTL *Or1* comme la race A. Au début des années 2000, on a identifié six races successives d'*O. cumana* (races A à F) pouvant contourner respectivement les cinq QTL de résistances déjà introduits (*Or1* à *Or5*) chez le tournesol. Des travaux ont donc cherché à identifier de nouvelles variétés résistantes et à caractériser les mécanismes de défense sous-jacents. D'autres sources de résistance ont ainsi pu être identifiées chez différents génotypes de tournesol.

On retrouve chez le tournesol plusieurs des mécanismes de résistance décrits dans d'autres interactions hôte/plante parasite (cf Introduction générale). Des mécanismes de défense précoces ont été caractérisés chez des nouveaux génotypes de tournesol. Ainsi, il a été observé que les exsudats de certaines variétés résistantes à l'orobanche induisent très faiblement la germination d'*O. cumana* (Labrousse et al., 2001). Chez d'autres variétés (par exemple la variété LR1) on observe l'expression d'une défensine, Ha-Def1, au niveau des racines. Il a été montré que cette défensine induisait la nécrose des radicules des graines d'*O. cumana* après germination (de Zélicourt et al., 2007). Ces deux mécanismes interviennent à un stade précoce de l'interaction limitant ainsi le nombre d'évènements d'attachement des orobanches aux racines.

Plusieurs mécanismes de défense agissant après l'attachement ont pu être observés. Notamment, chez le génotype HE-39999 on a pu mesurer un renforcement de la paroi des cellules de la racine par des dépôts de callose ou par une subérisation importante au niveau de la zone d'infection, qui permettent de confiner l'orobanche au niveau de l'endoderme de la racine avant qu'elle ne puisse atteindre les vaisseaux conducteurs (Echevarria-Zomeno et al., 2006 ; Letousey et al., 2007). On peut aussi observer chez certaines variétés résistantes, l'occlusion des vaisseaux conducteurs de l'orobanche qui bloque le flux de nutriments vers le parasite (Labrousse et al., 2001). Ces différents mécanismes induisent la nécrose de l'orobanche dans les premiers stades post-attachements.

On a ainsi pu identifier une gamme de résistance à *O. cumana*, allant des variétés résistantes, telles que les variétés LC1093 et LR1, aux variétés très sensibles, comme les variétés 89-254-4 et 2603. La variété 2603 montre une grande sensibilité aux attaques d'*O. cumana* (Fig.22) : on observe une forte infection de la racine par le parasite et un faible nombre de tubercules nécrosés. En outre, l'infection par l'orobanche réduit fortement le développement de la plante hôte (Labrousse et al., 2001). C'est pour cela que nous avons choisi cette variété de tournesol dans un premier temps, ainsi que la variété AP451CF qui

A



**Figure 23 : Effet de la pré-mycorhization du tournesol sur la résistance à *O. cumana*.** Des plants de la variété 2603 ont été prémycorhizés par *R. irregularis*, puis au bout de quatre semaines les plants ont été mis en contact des graines d'*O. cumana*. (A) Photographie montrant l'aspect des émergences au moment de la récolte. (B) Le nombre d'orobanches fixées a été déterminé 10 semaines après inoculation avec l'orobanche. Les valeurs représentent la moyenne du nombre d'orobanches fixées par plant (n=15), +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées par une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Tukey.

présente le même niveau de sensibilité à *O. cumana* que la variété 2603. Nous pensions plus facile d'identifier les mécanismes de défense que pourraient induire les champignons MA avec de telles variétés. Puis dans un second temps nous avons testé l'effet de la mycorhization sur d'autres génotypes de tournesol, plus résistants à *O. cumana*.

## **II. Résultats et discussion : Effet de la mycorhization du tournesol sur l'interaction avec *O. cumana***

Afin de déterminer si la mycorhization des plants de tournesol permet une meilleure résistance à *O. cumana*, nous avons comparé le niveau d'infection de plants inoculés avec le champignon MA *R. irregularis* avec celui de plants non mycorhizés. Cette comparaison a été réalisée sur deux durées de coculture différentes pour nous permettre d'identifier les stades de développement de l'orobanche affectés par la mycorhization.

### **II.A. Expériences de coculture sur une longue période**

Dans une première série d'expériences, nous avons testé la résistance à l'orobanche de plants préalablement mycorhizés. Les plants ont été cultivés dans un substrat contenant des spores de champignons MA pendant cinq semaines permettant ainsi une bonne mycorhization du système racinaire. Cette période de pré-mycorhization devait *a priori* faciliter la mise en évidence d'un effet de la mycorhization sur la protection contre l'orobanche. Les plants ont ensuite été transplantés dans un substrat contenant des graines d'orobanche préalablement préconditionnées dans le substrat humide et à l'obscurité pendant sept jours. Puis la coculture a été conduite pendant dix semaines, jusqu'à la floraison des orobanches (Fig.23A). Trois expériences ont été réalisées, toutefois deux d'entre elles ne peuvent être prises en compte pour les raisons précisées ci-dessous.

La présence de structures fongiques (arbuscules et/ou vésicules) à l'intérieur des racines a été quantifiée par la méthode dite de « gridline intersect » (Giovannetti et Mosse, 1980) après la coloration des racines (Vierheilig et al., 1998). Dans la première expérience nous avons



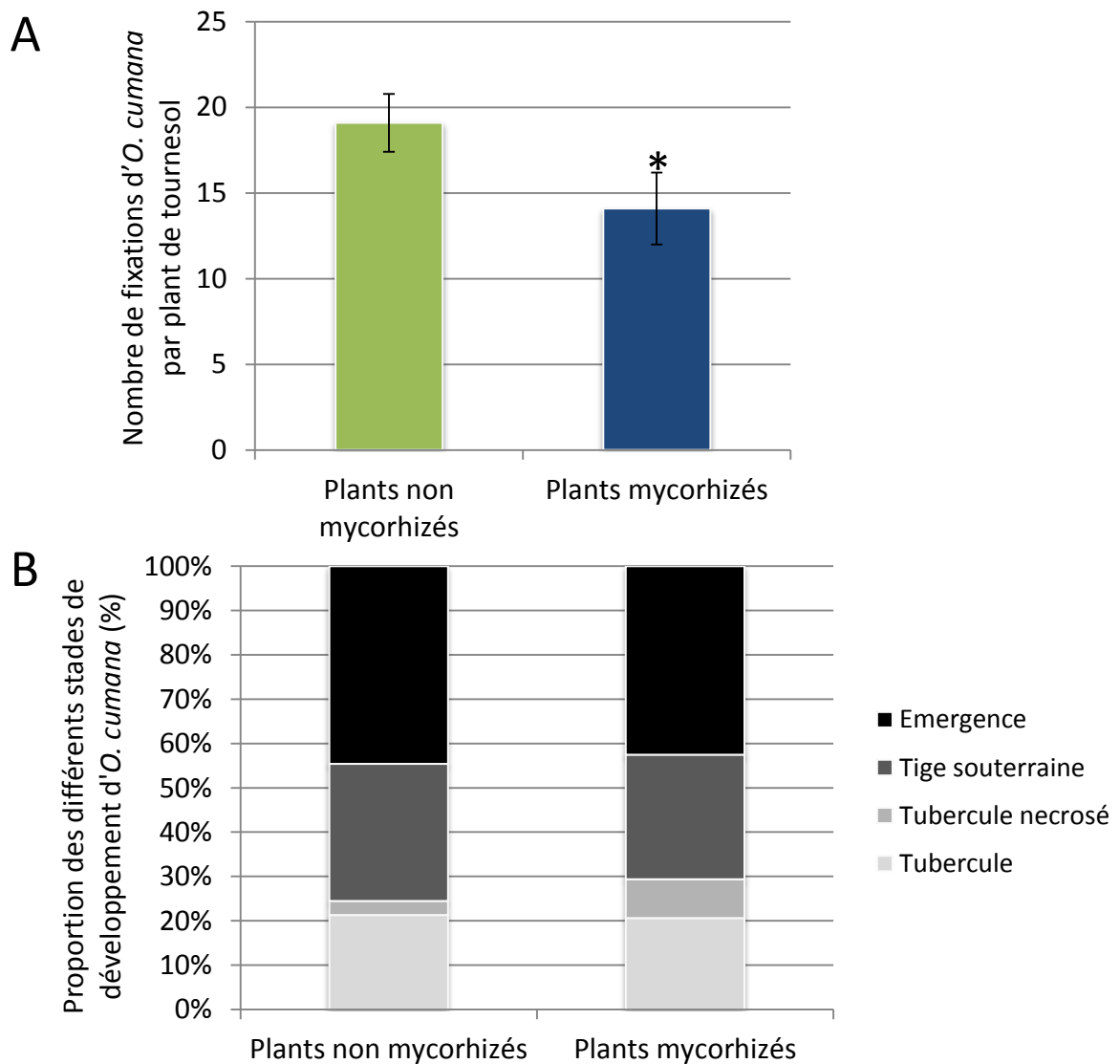
observé la présence de mycorhizes dans les systèmes racinaires des plants témoins (non inoculés avec *R. irregularis*). Lors de cette première expérience les graines d'orobanche avaient été conditionnées dans un mélange de tourbe et de sable. En effet ce mélange est utilisé en routine au LBPV de Nantes, où j'ai réalisé ces expériences avec la participation de Johannes Schmidt. L'analyse des témoins a montré que la tourbe utilisée contenait vraisemblablement des spores de champignons MA. Nous avons donc choisi, pour les expériences suivantes, de mener les tests de résistance avec un substrat composé d'argile calcinée préalablement stérilisée. L'utilisation de ce substrat a permis par la suite d'éviter tout problème de contamination des témoins non inoculés par des champignons MA.

Dans la deuxième expérience on n'a observé qu'un faible nombre d'orobanches sur les racines de tournesol (deux à trois par plant témoin), ne permettant pas de déterminer un quelconque effet bénéfique de la mycorhization.

Ainsi, seuls les résultats de la troisième expérience ont pu être pris en compte. On n'observe pas de différences significatives entre les plants prémycorhizés avec *R. irregularis* et les plants témoins en ce qui concerne le nombre d'orobanches fixés (Fig.23B). Ces premiers résultats, contrairement à ceux obtenus par Lenzemo et Kuyper (2001), semblent indiquer que la prémycorhization des plants de tournesol n'apporte aucun avantage contre l'orobanche. Cette différence de résultats pourrait être expliquée par le pathosystème étudié et/ou les dispositifs expérimentaux utilisés. D'autre part, il est connu que des mécanismes de défense basale sont induits par la mycorhization chez la plante hôte au début de l'interaction puis diminuent par la suite (Campos-Soriano et al., 2010). On peut penser qu'au bout de la période de pré-mycorhization (quatre semaines) certains de ces mécanismes de défense soient déjà atténués et ne permettent donc plus une bonne défense contre l'orobanche. En outre, dans notre expérience, les plants sont mycorhizés dans un premier pot, puis la motte comprenant le système racinaire, le substrat initial et le champignon MA est transférée dans un substrat ne comportant que des graines d'orobanche. On génère ainsi une pseudo-compartimentation où on trouve au centre les racines mycorhizées, et autour les graines d'*O. cumana*. Il est possible que cette configuration séparant les deux organismes symbiote et pathogène ait un impact sur le résultat des interactions. Par exemple, certains champignons montrent des effets inhibiteurs sur la germination des graines d'orobanche (Abouzeid et El-Tarabily, 2010). Il se peut que ces effets ne se manifestent pas quand les deux organismes sont éloignés.

**Tableau 1: Effet de la pré-mycorhization du tournesol, en présence d'*O. cumana*, sur la production d'akènes.** La masse des akènes, le nombre d'akènes produits par plant de tournesol ainsi que la masse de 1 000 akènes ont été mesurés afin d'estimer l'effet de la mycorhization, sur les rendements en présence d'orobanche. Les valeurs représentent la moyenne de différents paramètres du rendement de douze individus par condition, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un t. test de student ( $P < 0,05^*$  ;  $P < 0,01^{**}$ )

	Masse totale akènes (g)	Nombre total d'akènes	Masse de 1 000 akènes (g)
Témoin	5,84 +/-0,72	121,58 +/-9;56	47,47 +/-3,82
Plants mycorhizés	8,53* +/-0,62	171,13** +/-9,34	49,36 +/-1,58



**Figure 24 : Effet de la mycorhization du tournesol sur la résistance à *O. cumana*.** (A) Les valeurs représentent la moyenne du nombre d'orobanches fixées de douze plants par condition, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées par une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Tukey. L'étoile indique une différence significative ( $P < 0,05$ ). (B) Effet de la mycorhization sur le développement de l'orobanche. Les valeurs représentent la proportion relative des différents stades de développement de l'orobanche au moment de la récolte.

Les plants de tournesol étant arrivés à maturité nous avons récolté les akènes pour identifier d'éventuels bénéfices de la mycorhization sur le rendement. Nous avons mesuré la masse totale et le nombre total d'akènes produits par capitule, puis nous avons déterminé la masse de mille akènes (communément appelée « poids de mille grains »). On remarque que la masse totale d'akènes par capitules ainsi que le nombre d'akènes sont plus élevés en condition mycorhizée (Tab.1). La masse de mille d'akènes, elle, est équivalente entre la condition mycorhizée et la condition non-mycorhizée. Il semble donc que la mycorhization permette de produire un nombre plus important d'akènes, augmentant ainsi le rendement, mais n'affecte pas le remplissage de l'akène. Pour compléter cette étude il serait intéressant d'évaluer la teneur en acides gras des akènes, afin de voir si la mycorhization et/ou l'infection par l'orobanche peut modifier la qualité des grains obtenus.

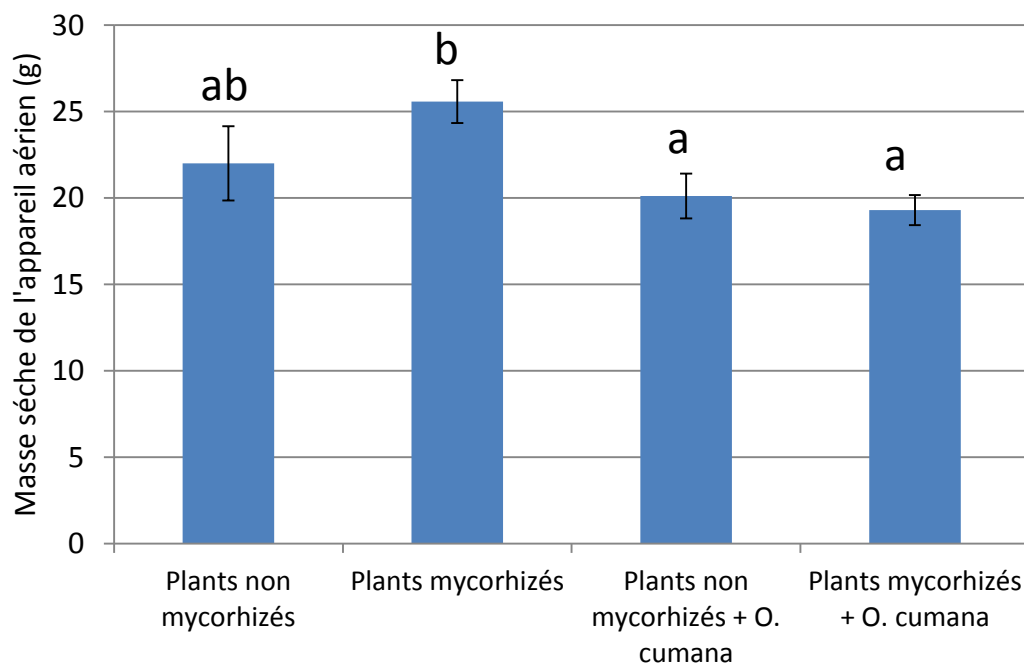
Le système expérimental précédent présente plusieurs inconvénients : il est assez compliqué à mettre en place, nécessite une culture très longue et ne facilite pas l'interaction directe entre orobanches et champignons MA qui sont inoculés dans des zones différentes. Afin d'améliorer le dispositif expérimental nous avons par la suite inoculé les plants avec le champignon et les orobanches au même moment. Dans une seconde série d'expériences, les graines d'orobanches et les spores de champignons MA ont donc été mélangées simultanément au substrat, puis laissées sept jours à l'obscurité à 23°C pour permettre le préconditionnement des graines d'orobanche. Une graine de tournesol germée a ensuite été placée dans chaque pot et après trois mois de culture des trois partenaires ensemble, le niveau d'infection par *O. cumana* a été estimé. Au moment de l'évaluation du niveau d'infection les plants de tournesol étaient au stade début de floraison et les orobanches commençaient à émerger. Les résultats de cette expérience sont représentés Fig. 24. On observe que les plants mycorhizés sont moins infectés par *O. cumana* que les plants non mycorhizés (Fig.24A). Ces résultats concordent avec les précédents travaux réalisés par Lenzemo et Kuyper (2001), où il a été montré une baisse du nombre des émergences chez les plants mycorhizés. On observe néanmoins que chez le sorgho la protection induite par la mycorhization semble plus importante que celle que l'on observe dans nos conditions. Dans nos expériences nous utilisons la variété de tournesol 2603, qui est connue pour être extrêmement sensible à l'orobanche. Lenzemo et Kuyper (2001), dans leurs expériences, ont utilisé des plantes sensibles et des plantes tolérantes. Ils ont montré que chez la variété sensible la mycorhization ne permettait pas d'induire une meilleure protection contre l'orobanche. En revanche, ils ont constaté que la mycorhization de la variété tolérante à *S. hermontica* permettait d'accroître

A

Traitement	Plants non mycorhizés	Plants mycorhizés	Plants non mycorhizés + <i>O. cumana</i>	Plants mycorhizés + <i>O. cumana</i>
Poids sec racinaire (g)	6,06 +/-1,11	10,19 +/-1,12	3,88 +/- 0,84	3,73 +/- 0,57



B



**Figure 25 : Effet de l'infection par *O. cumana* et de la mycorhization sur le développement du tournesol.** (A) Développement de l'appareil racinaire. Des couleurs différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ). Sur les photographies la barre correspond à 5 cm. (B) Développement de la partie aérienne. Les valeurs représentent la moyenne de masse sèche de 12 plants, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Tukey. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).



encore la résistance. On peut ainsi émettre l'hypothèse que le niveau de protection induit par la mycorhization pourrait dépendre du niveau de tolérance intrinsèque de la variété hôte. Ainsi, les différences de réponses que l'on observe entre les deux modèles pourraient être dues au pathosystème, dans un cas tournesol/*O. cumana* et dans l'autre Sorgho/*Striga*, et aux niveaux de tolérance des variétés utilisées. D'autre part, Lenzemo et Kuyper (2001) ont utilisé un inoculum fongique mixte (composé de *Gigaspora margarita* et *Glomus clarum*) alors que dans nos expériences nous utilisons seulement l'espèce *R. irregularis*. Or, Gworgwor et Weber (2003) ont observé que le choix de l'espèce de champignon MA pouvait avoir un impact sur le niveau de protection contre striga. Des résultats équivalents ont été observés lors de la triple interaction plante hôte/nématodes/champignon MA, où le niveau de résistance aux nématodes pouvait dépendre de l'espèce de champignon MA utilisée (Hol et Cook, 2005). On peut donc penser que des phénomènes similaires s'appliquent lors de l'interaction tournesol/*O. cumana*/champignons MA. Nous confirmerons plus tard que l'espèce fongique peut avoir un impact sur le niveau de protection du tournesol contre l'orobanche.

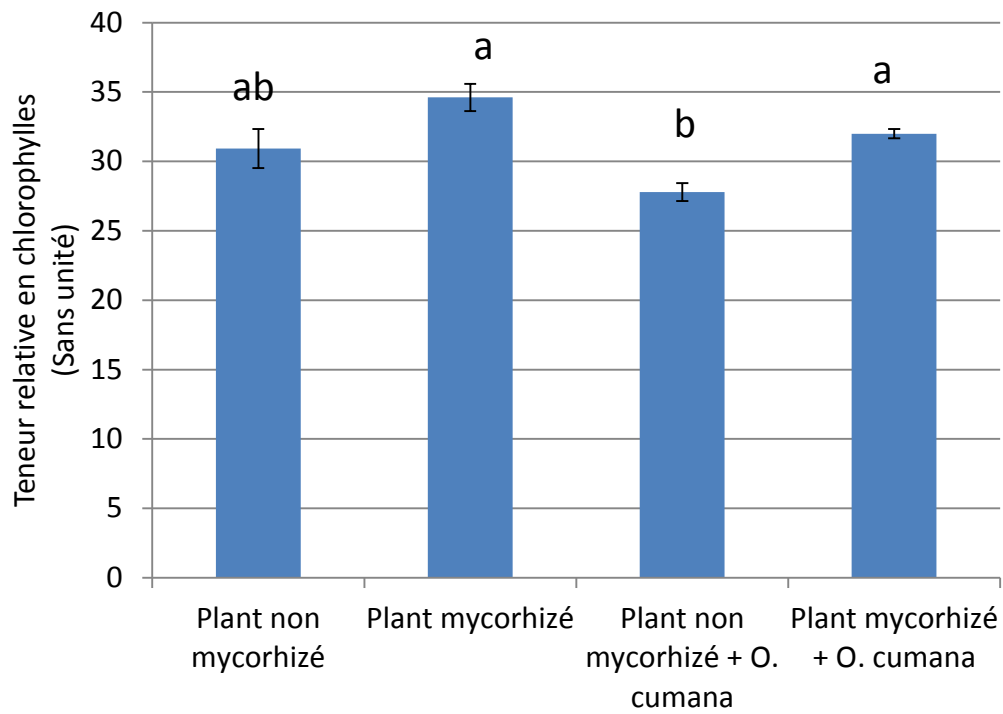
D'autre part, on remarque que la proportion des différents stades de développement de l'orobanche est identique entre les deux conditions, et qu'il y a la même proportion d'orobanches nécrosées chez les plants mycorhizés et non mycorhizés (Fig.24B). En outre, la taille des tubercules ne semble pas affectée par la mycorhization, la masse sèche moyenne des tubercules n'étant pas significativement différente (Myc = 0,49 g +/- 0,07 ; Non Myc = 0,39 g +/- 0,04 ; P= 0,088 ; t-test de Student). Ce résultat semble nous indiquer que la mycorhization n'aurait pas d'impact sur le développement de l'orobanche une fois fixée et n'induirait pas de mécanismes de défense particuliers pouvant induire des nécroses. On peut ainsi émettre l'hypothèse que la mycorhization induirait des mécanismes de protection précoces affectant la germination et/ou la fixation de l'orobanche.

En outre, nous avons recherché les effets de la mycorhization et d'*O. cumana* sur le développement du tournesol en mesurant sa biomasse. Lorsque l'on compare les plants mycorhizés aux plants non mycorhizés (les deux sans orobanches), on observe que les plants mycorhizés possèdent un système racinaire plus développé, présentant notamment un réseau de racines plus dense (Fig.25A). Ces résultats concordent avec plusieurs travaux qui ont rapporté un effet bénéfique de la mycorhization sur le développement racinaire (Azcón-Aguilar et al., 1996 ; Plenchette et Duponnois, 2005). Labrousse et al (2001) ont observé que



l'infection par *O. cumana* réduisait significativement la masse racinaire, nous avons donc voulu vérifier si l'addition de champignons MA permettait de contrebalancer l'effet négatif de l'orobanche sur le développement racinaire. Les mesures effectuées montrent que les plants infectés par l'orobanche présentent une forte diminution du développement de l'appareil racinaire par rapport aux témoins. En outre, on ne remarque pas de différences significatives de biomasse racinaire entre les plants « non mycorhizés + orobanche » et les plants « mycorhizés + orobanche » (Fig.25A). Ces résultats concordent avec les données obtenues par Lenzemo et Kuyper (2001) sur le sorgho. Il semble donc que les effets négatifs de l'infection par orobanche (ou striga) sur le développement racinaire ne puissent être compensés par la mycorhization.

Les mesures de la biomasse aérienne ne permettent pas de mettre en évidence des différences significatives entre les plants mycorhizés et non mycorhizés infectés par l'orobanche. Les plants témoins non mycorhizés ont une biomasse aérienne équivalente aux plants infectés par l'orobanche, mycorhizés et non mycorhizés. Néanmoins, les plants témoins mycorhizés (sans orobanches) ont une biomasse de l'appareil aérien plus importante que ceux des autres conditions testées (Fig.25B). Les mesures de biomasse aérienne vont dans le sens des mesures observées sur les biomasses racinaires, montrant que les effets positifs de la mycorhization sont réduits par la présence de l'orobanche. Malgré une meilleure protection des plants mycorhizés (ils présentent un nombre moins important de fixations d'orobanche), nous n'observons pas un gain de biomasse racinaire ou aérienne suggérant que la mycorhization du tournesol ne permettrait pas une meilleure tolérance à *O. cumana*. La différence que l'on observe entre les plants « mycorhizés » et les plants « mycorhizés + orobanche » pourrait être dû à la force de puits de l'orobanche qui détourne une bonne partie des produits carbonés produits par la plante (Hibberd et al., 1999). Dans les expériences de prémycorhization nous avons observé que les plants mycorhizés produisaient plus d'akènes que les plants non mycorhizés. Il serait intéressant de réaliser les mêmes mesures dans les conditions où les spores de champignon MA et les graines d'orobanche sont inoculées au même moment. En effet, dans ces conditions la mycorhization a permis d'améliorer la protection des plants de tournesol contre l'orobanche. Il serait donc intéressant de vérifier si cette meilleure protection pourrait permettre d'augmenter le rendement (nombre et remplissage des akènes).

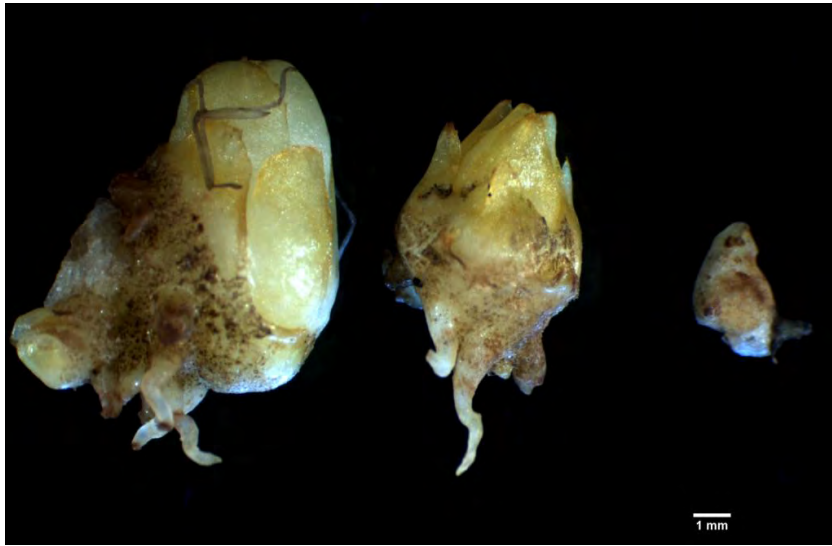


**Figure 26 : Effet de la mycorhization et de l'infestation par *O. cumana* sur la teneur en chlorophylles de feuilles de tournesol.** Les valeurs représentent la moyenne de plants, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées par une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Tukey. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ).

Par ailleurs, des mesures de teneur en chlorophylles ont été réalisées à l'aide de la sonde SPAD-502 (Minolta Camera Co.Ltd., Osaka, Japon). Cette sonde permet une estimation de la concentration relative en chlorophylles (mesure globale des chlorophylles) par la mesure de transmission de lumière à travers la feuille. L'appareil émet de la lumière rouge (650 nm) qui est absorbée par les chlorophylles ainsi que de la lumière infrarouge (940 nm) qui n'est pas absorbée par les chlorophylles. L'appareil mesure le rapport des lumières transmises à travers la feuille aux deux longueurs d'onde, estimant ainsi la concentration en chlorophylles (Chang et Robison, 2003; Coste et al., 2010). On constate que les plants mycorhizés + orobanche contiennent significativement plus de chlorophylles que les plants non-mycorhizés + orobanche, ce qui pourrait refléter une activité photosynthétique plus importante (Fig.26). Des travaux antérieurs ont observé que la mycorhization permet de stimuler la photosynthèse, grâce notamment à de meilleurs apports en eau, en nutriments et à une ouverture des stomates plus importante (Allen et al., 1981 ; Wright et al., 1998). En outre, il a été observé que l'infection par l'orobanche réduisait la concentration en chlorophylles des feuilles des plants infectés ainsi que leur capacité de photosynthèse (Mauromicale et al., 2008). Il semble d'après nos résultats que la mycorhization permette d'améliorer la photosynthèse des plants infectés par l'orobanche. Toutefois, l'estimation de la teneur en chlorophylles ne mesure pas directement la photosynthèse, il serait donc intéressant de compléter ces analyses en déterminant réellement le niveau de photosynthèse dans les différentes conditions.

D'autre part, le développement des orobanches ne semble pas affecté par la présence du champignon, la masse moyenne des plants d'orobanche étant équivalente entre les différentes conditions (plants mycorhizés = 453,8 mg +/- 74,8 ; plants non mycorhizés = 478,9 mg +/- 43,6 ; P=0,9154 ; t-test de Student). On n'observe pas non plus de retard de développement significatif. Ceci laisse penser que les flux de nutriments vers l'orobanche ne seraient pas perturbés par la mycorhization. On pourrait vérifier cette hypothèse en estimant la force de puits des orobanches par des mesures de contenu en mannitol dans les orobanches (Delavault et al., 2002), ou par des mesures d'activité de différentes protéines permettant le transport de sucre vers l'orobanche (Draie et al., 2011 ; Péron et al., 2012).

Réciproquement, on pourrait se demander si la mise en place de la symbiose MA peut être perturbée par la présence d'orobanche. Nous avons donc comparé le taux de mycorhization entre les plants mycorhizés seuls et les plants mycorhizés + orobanches. On n'observe pas de différences significatives dans les pourcentages de mycorhization entre les plants mycorhizés



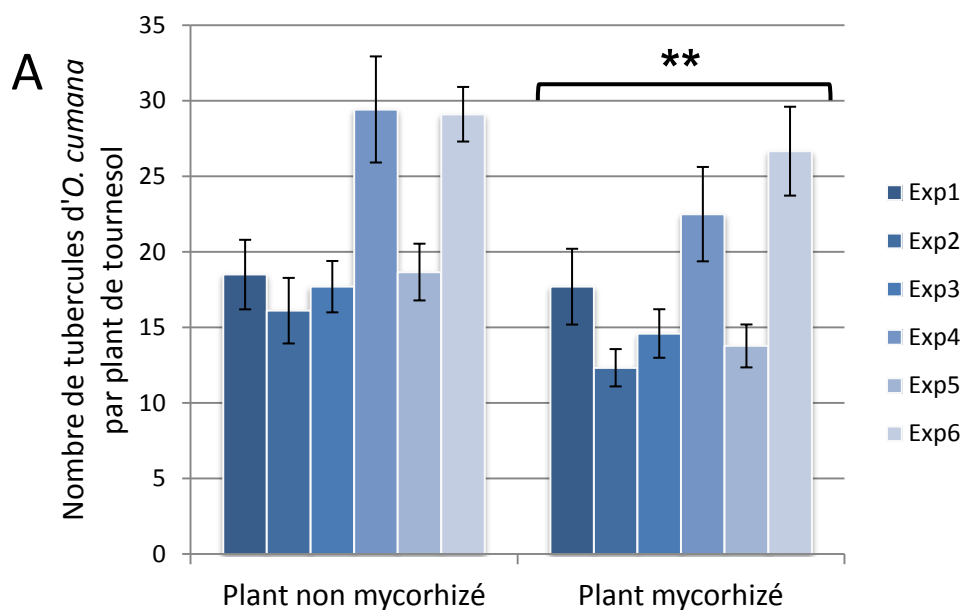
**Figure 27 : Tubercules d'*O. cumana* observés sur des racines de tournesol.** Au moment de la récolte, les tubercules d'orobanches présentent des tailles variables. Cette photographie permet de constater la variabilité observée à 5 semaines de culture.

seuls (82,7 % +/- 2) et les plants mycorhizés + orobanches (75,4 % +/- 1,5). Ce résultat suggère que l'infection par l'orobanche n'affecte pas la capacité du champignon MA à coloniser la racine. Néanmoins, des études complémentaires devraient être menées afin de vérifier l'effet de l'infection par l'orobanche sur la mycorhization. En plus de l'estimation de la colonisation globale des racines réalisée jusqu'à présent, on pourrait mesurer la fréquence des structures fongiques telles que les arbuscules et les vésicules. Les arbuscules sont le lieu d'échange entre le champignon et la plante alors que les vésicules sont des structures de stockage. Des différences de fréquence pour l'une ou l'autre des structures pourraient indiquer des perturbations dans la physiologie du champignon. En outre, on pourrait réaliser des mesures d'activité de la phosphatase alcaline spécifique du champignon MA (Dodd et al., 1987). Ce paramètre est lié au métabolisme phosphaté chez le champignon MA, et sa mesure permet d'estimer l'activité du champignon MA au sein de la plante. Ces données permettraient, en partie, de vérifier si la physiologie du champignon MA est affectée. D'autre part, il serait aussi intéressant d'estimer la colonisation du sol par le champignon MA, en présence et en absence d'orobanches. La compétition pour les photoassimilats avec l'orobanche pourrait affecter la croissance des hyphes extra-racinaires du champignon MA. Ceci pourrait être réalisé par la mesure de certains phospholipides spécifiques des champignons MA (Olsson et al., 1995 ; Olsson et al., 1999).

## **II.B. Expériences plus courtes arrêtées au stade tubercule**

### **II.B.1. Etude de variétés sensibles à *O. cumana***

Les expériences sur trois mois nous ont montré que l'infection par l'orobanche n'était pas synchrone et que l'on pouvait observer plusieurs stades de développement de l'orobanche sur un même système racinaire de tournesol. En outre, les résultats précédents ont montré que la mycorhization n'avait pas ou peu d'impact sur le développement de l'orobanche une fois fixée (on observe les mêmes proportions des différents stades de développement de l'orobanche et à chaque stade les structures ont une biomasse moyenne équivalente). Afin de simplifier la mesure du niveau d'infestation, d'augmenter le nombre de répétitions (en réalisant des expériences plus courtes et dans des pots plus petits il est possible de mener davantage d'expériences) et finalement de faciliter la compréhension des mécanismes de



**B**

	Degrés de liberté	Carrés moyens	F de Fisher	Valeur de P
<b>Traitement</b>	1	334	7,332	0,008007**
<b>Expérience</b>	4	2470,5	13,5598	8,116e-09***
<b>Temps de culture</b>	1	769,8	16,8999	8,250e-05***
<b>Temps de culture : traitement</b>	1	8,5	0,1864	0,666908
<b>Expérience : Traitement</b>	4	94,8	0,5204	0,720927
<b>Total</b>	97	4418,1		

**Figure 28 : Effet de la mycorhization du tournesol sur la résistance à *O. cumana*.** (A) Compilation de six expériences indépendantes (Exp1 à Exp6). Les valeurs représentent le nombre moyen de tubercules d'*O. cumana* par plant de tournesol +/- l'erreur standard sur la moyenne (n=8 à 10 plants par condition pour chaque expérience). L'effet de la mycorhization sur le nombre de tubercules est comparé à l'aide d'une ANOVA multi factorielle, montrant un effet fortement significatif (P=0,008). (B) Table d'ANOVA de l'expérience. La première colonne correspond aux sources de variations de l'expérience : le traitement (plants mycorhizés et plants non-mycorhizés), l'expérience (6 expériences sont regroupées dans l'analyse), le temps de culture (les plants sont récoltés à cinq ou six semaines après inoculation) et l'interaction entre les différents facteurs. La valeur de P témoigne de l'effet significatif de la mycorhization, du temps de culture et de l'expérience. L'analyse ne montre pas d'interactions significatives entre les différents facteurs.

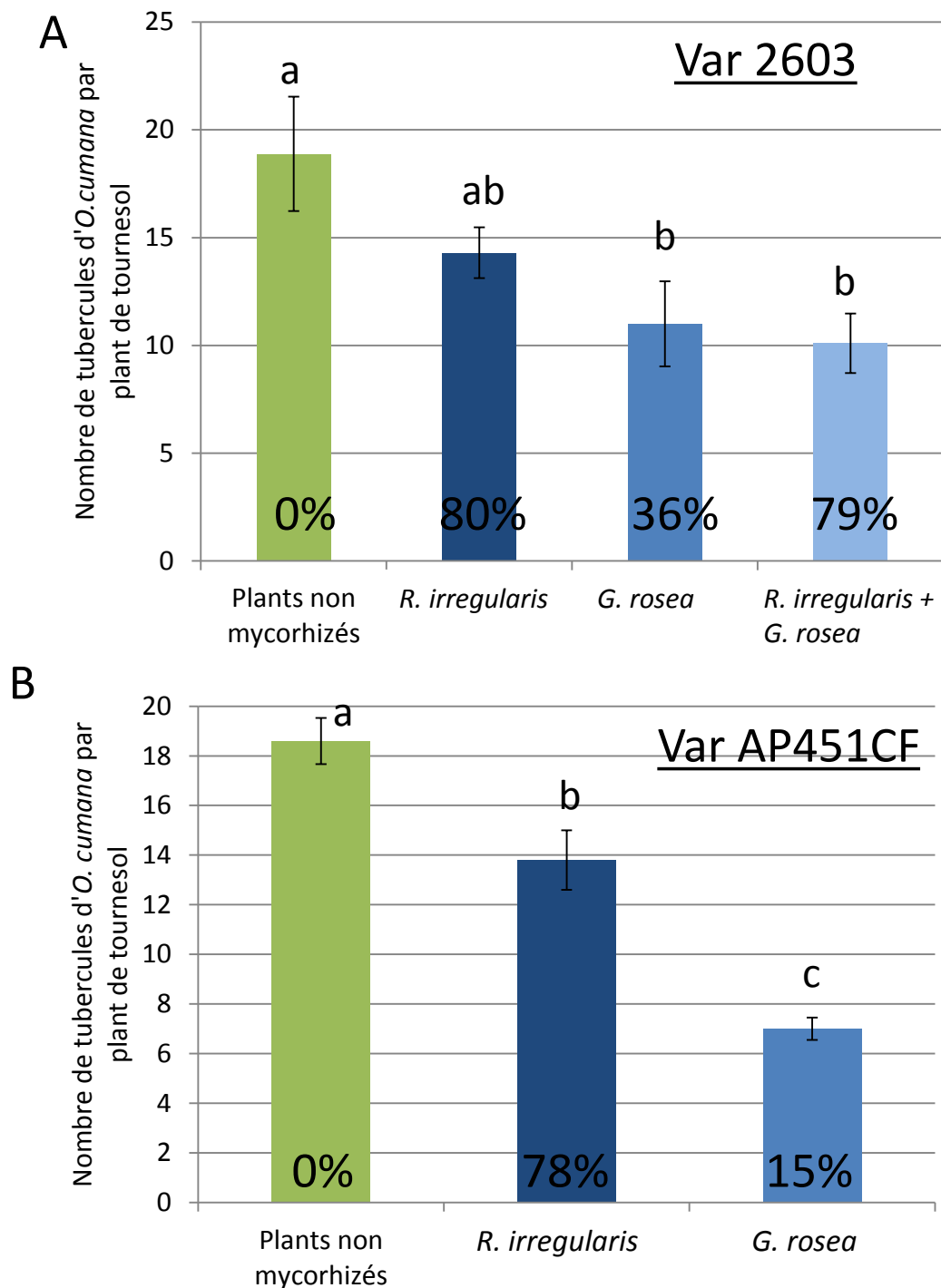


défense induits par le champignon mycorhizien, nous avons réalisé une série d'expériences de durée plus réduite (cinq ou six semaines). Cette durée d'expérience permet à la majorité des orobanches d'atteindre le stade tubercule sans toutefois commencer à se différencier en tige souterraine (Fig.27). Le niveau de protection induits chez les plantes mycorhizées a donc été déterminé par le dénombrement des tubercules fixés aux racines du tournesol. D'autre part, une durée de culture de cinq ou six semaines permet un bon établissement de la symbiose MA chez le tournesol.

Six expériences indépendantes ont été réalisées sur la variété sensible 2603. Les résultats ont ensuite été regroupés puis analysés à l'aide d'une ANOVA multifactorielle prenant en compte les différents facteurs de l'expérience (traitement, expérience, durée de l'expérience ainsi que les interactions entre ces facteurs). L'ANOVA est une méthode statistique qui permet de décomposer la variabilité en fonction des différents facteurs impliqués dans l'expérimentation et d'identifier les facteurs les plus influents sur cette variabilité. En outre, elle permet de regrouper plusieurs expériences réalisées indépendamment ce qui permet d'augmenter le nombre de degrés de liberté sans augmenter la taille des expériences. Cette analyse a permis de mettre en évidence un effet très significatif de la mycorhization sur le nombre d'orobanches fixés sur les racines de tournesol (Fig.28), les plants mycorhizés étant moins infectés que les plants non mycorhizés avec environ 20% de tubercules en moins (Fig.28). Ce résultat nous indique que la mycorhization interférerait avec les étapes précoces de l'interaction plante/orobanche, confirmant les hypothèses proposées lors des expériences précédentes. Des travaux antérieurs ont montré que des exsudats de plantes mycorhizées induisaient une moindre germination des graines d'*Orobanchaceae* (Lendzemo et al., 2007 ; Fernández-Aparicio et al., 2010). Nos premiers résultats semblent indiquer l'existence de mécanismes précoces touchant la germination et/ou la fixation de l'orobanche à la racine.

Le taux de mycorhization des racines a été évalué dans chacune des plantes inoculées. Sur l'ensemble des expériences, il évolué entre 40% et 70%, mais aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre le niveau de colonisation de la racine par le champignon MA et le niveau de protection contre *O. cumana*.

D'autre part, on n'observe pas davantage de tubercules nécrosés en présence du champignon MA, le nombre de tubercules nécrosés étant proche de zéro dans chaque condition. En outre, la masse moyenne des tubercules entre les deux conditions n'est pas significativement différente (Plants non-mycorhizés = 13,08 mg +/- 1,42 ; Plants mycorhizés



**Figure 29 : Effet de différentes espèces de champignons MA sur l'infection du tournesol par *O. cumana*.** (A) Effet de la mycorhization de la variété 2603 sur le nombre moyen de tubercules d'orobanche par plant (10 plants par condition), +/- l'erreur standard. Pour le traitement avec *R. irregularis* 1 000 spores ont été inoculées par pot, pour le traitement avec *G. rosea* 200 spores ont été ajoutées par pot. Pour la condition avec les deux champignons MA l'inoculum de chaque champignon MA a été divisé par deux par rapport aux conditions avec un seul champignon MA. (B) Effet de la mycorhization de la variété AP451CF sur le nombre de tubercules d'orobanche. Les valeurs représentent le nombre moyen de tubercules d'orobanche par plant (10 plants par condition), +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Tukey. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ). Le taux de mycorhization moyen pour chaque condition est indiqué au pied de la barre correspondante.

= 15,41 mg +/- 1,75 ; P=0,2873 ; t-test de Student). Ce résultat confirme les premières observations qui suggéraient qu'il n'y avait pas d'induction de mécanisme de défense post-attachement par la mycorhization.

Gworgwor et Weber (2003) ont montré que la résistance à *Striga* du sorgho induite par la mycorhization est dépendante de l'espèce de champignon avec laquelle on inocule la plante. D'autre part, Lenzemo et al (2009) ont observé que le pouvoir inducteur de la germination des exsudats de plants mycorhizés pouvait être plus ou moins réduit suivant l'espèce de champignons MA. Nous avons donc voulu tester l'effet de la mycorhization par le champignon MA *G. rosea*, un champignon MA phylogénétiquement éloigné de *R. irregularis* (Fig.18), sur l'infection par *O. cumana* chez deux variétés de tournesol sensible : les variétés 2603 et AP451CF. Les plants ont été inoculés avec *R. irregularis*, *G. rosea* ou les deux champignons en même temps. On observe que les plants mycorhizés par *R. irregularis* présentent environ 20% de tubercules en moins que les plants non mycorhizés, ce résultat correspond aux tendances observées lors des premières expériences réalisées avec cette espèce de champignon (cf Fig.28, Fig.29). Les plants inoculés avec *G. rosea* présentent une diminution plus importante du nombre d'orobanches fixés par rapport aux plants non mycorhizés (environ 40% de tubercules en moins chez 2603 et plus de 50% de réduction chez la variété AP451CF) (Fig. 29A et B). Dans le cas d'une inoculation avec les deux espèces de champignon, les résultats sont équivalents à ceux obtenus avec *G. rosea* seul (Fig. 33A). Aucun tubercule nécrosé n'est observé et la masse moyenne des tubercules est équivalente entre les différentes conditions confirmant les résultats précédemment obtenus. Ainsi, les plants mycorhizés par *G. rosea* semblent mieux protégés à *O. cumana* que ceux colonisés par *R. irregularis*. Ce résultat concorde avec ceux obtenus par Gworgwor et Weber (2003) et par Lenzemo et al (2009). Les champignons MA pourraient modifier de façon différentielle, selon l'espèce fongique considérée, les exsudats racinaires de la plante. Il est également possible que les champignons eux-mêmes sécrètent des molécules ayant un impact sur la germination ou l'attachement d'*O. cumana*.

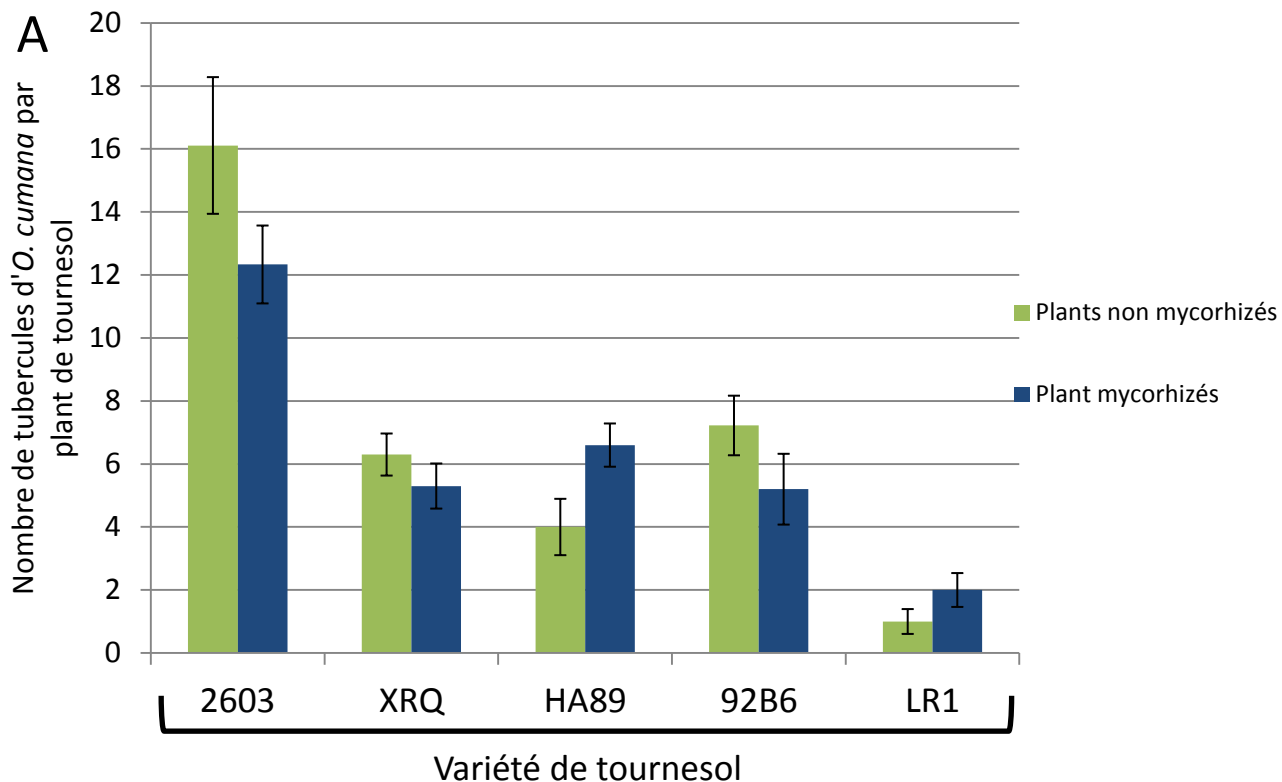
Par ailleurs, les mesures de biomasses racinaires et aériennes, et de la biomasse du parasite ne permettent pas de mettre en évidence des différences significatives entre les différents traitements. L'effet bénéfique de la mycorhization semble donc équivalent entre les variétés 2603 et AP451CF et confirme aussi un bénéfice plus important apporté par *G. rosea*. Toutefois, ces résultats ont été obtenus tardivement dans le déroulement de la thèse, c'est



pourquoi *G. rosea* n'a pas été utilisé de façon plus systématique dans le reste des travaux. Il aurait été intéressant de mener des expériences complémentaires sur des temps plus longs afin de vérifier les tendances observées à cinq semaines, et de rechercher si d'autres stades de développement de l'orobanche peuvent être affectés par la mycorhization avec *G. rosea*.

D'autre part on observe des différences importantes entre les niveaux de mycorhization obtenus avec les deux champignons MA (Fig.29). Les plants mycorhizés par *G. rosea* sont nettement moins colonisés que les plants mycorhizés par *R. irregularis*. De façon surprenante, c'est avec ce même champignon que l'effet bénéfique de la mycorhization est le plus important. Néanmoins, on remarque que les plants mycorhizés avec les deux champignons MA, *G. rosea* et *R. irregularis*, présentent un niveau de protection équivalent aux plants mycorhizés par *G. rosea* seul malgré un fort niveau de mycorhization (comparable aux plants mycorhizés par *R. irregularis*). Ces résultats nous indiquent que le niveau de protection induit par un champignon MA n'est pas dépendant de la capacité du champignon MA à coloniser fortement la racine. Différentes études ont montré que *Gigaspora* et *Rhizophagus* ont des effets différents sur la physiologie de leur hôte (Boddington et Dodd, 2002 ; Burleigh et al., 2002), qui pourrait expliquer les différences de niveau d'infection que l'on observe avec les deux champignons. Enfin, notre expérience ne révèle pas d'effet synergique sur la protection contre l'orobanche si l'on inocule des plants de tournesol avec les deux espèces de champignons ; le niveau de protection reste équivalent à celui que l'on observe avec *G. rosea*, suggérant que les mécanismes induits par ces différents champignons ne sont pas cumulatifs.

Il est connu que la mycorhization permet d'induire certains mécanismes de défense chez les plantes (Campos-Soriano et al., 2012), et notamment la voie de défense « JA dépendante » qui entre particulièrement en jeu dans la résistance à l'orobanche (Smith et al., 2009). On peut imaginer que certains mécanismes de défense peuvent être induits par une espèce de champignon et pas par une autre. Il serait intéressant de tester si *G. rosea* induit certains mécanismes de défense que n'induirait pas *R. irregularis*, comme la sécrétion de la défensine Ha-DEF1 qui provoque la nécrose des radicules des graines d'*O. cumana* (de Zélicourt et al., 2007). La sécrétion de la défensine réduirait le nombre d'évènements de fixation mais n'affecterait pas le développement post-attachement, ce qui correspond au phénotype observé. D'autre part, la résistance induite par la mycorhization pourrait résulter de la baisse de sécrétion de strigolactones par la plante. Il serait intéressant de mesurer si la mycorhization



**B**

Variété	Traitement	Taux de mycorhization (%)
2603	Non-myc	0
	Myc	57 +/-3
XRQ	Non-myc	0
	Myc	52 +/-3
HA89	Non-myc	0
	Myc	43 +/-4
92B6	Non-myc	0
	Myc	57 +/-3
LR1	Non-myc	0
	Myc	48 +/-3

**Figure 30 : Effet de la mycorhization de différentes variétés de tournesol sur la résistance à *O. cumana*.** (A) Effet de la mycorhization par *R. irregularis* sur la résistance à *O. cumana* chez différentes variétés de tournesol. Les valeurs représentent la moyenne du nombre de tubercules d'orobanche sur 10 individus par condition, +/- l'erreur standard de la moyenne. (B) Taux de mycorhization des différentes variétés au moment de la récolte. Les valeurs correspondent à la moyenne de 10 plants pour chaque condition, +/- l'erreur standard.

par *G. rosea* ou *R. irregularis* a un impact différent sur la production et la sécrétion de strigolactones par les racines de tournesol.

## **II.B.2. Effet de la mycorhization chez des variétés de tournesol plus ou moins résistantes à l'orobanche**

Dans le pathosystème sorgho/*Striga*, les effets protecteurs de la mycorhization semblent dépendants de la variété de la plante hôte (Lendzemo et Kuyper, 2001). Nous avons donc voulu tester l'effet de la mycorhization sur différentes variétés de tournesol présentant des niveaux contrastés de résistance au parasite.

Nous avons utilisé des variétés moyennement sensibles à l'orobanche caractérisées par Labrousse et al (2001) : les variétés XRQ, HA89, 92B6 et LR1 (Fig.22). Ces variétés ont été inoculées ou non avec le champignon MA *R. irregularis* et le nombre de tubercules a été déterminé après cinq semaines de culture. La variété 2603 a été intégrée à l'essai comme témoin. On observe que les plants de la variété 2603 mycorhizés présentent une diminution modérée du nombre de tubercules semblable aux expériences précédentes. Pour les autres variétés testées on n'observe pas de différences significatives entre les plants mycorhizés et non mycorhizés sur le niveau de protection contre l'orobanche, le nombre de tubercules étant équivalent chez les plants mycorhizés et non mycorhizés (Fig.30A). Néanmoins, pour la variété LR1 on observe un effet significativement bénéfique de l'inoculation par des champignons MA sur la biomasse racinaire (LR1 non-mycorhizé = 0,37 g +/- 0,03 ; LR1 mycorhizé = 0,56 g +/- 0,04). A l'inverse, il semblerait que l'inoculation par le champignon MA ne soit pas bénéfique au développement racinaire de la variété 96B6, la masse racinaire des plants mycorhizés étant significativement moins importante que celle des plants non mycorhizés (92B6 non mycorhizé = 0,41g +/- 0,02 ; 92B6 mycorhizé = 0,28g +/- 0,04). Les mesures de la masse racinaire chez les autres variétés testées lors de cette expérience, ne montrent pas de différences significatives entre les deux conditions. Ce test a été réalisé avec *R. irregularis*, qui n'a montré que des effets bénéfiques modérés. De plus les variétés utilisées lors de cette expérience présentent, au départ, un niveau de résistance à *O. cumana* assez important, il est donc possible que l'apport de la symbiose soit trop faible pour qu'il puisse être mis en évidence. Il serait intéressant de réaliser cette même expérience avec *G. rosea* qui





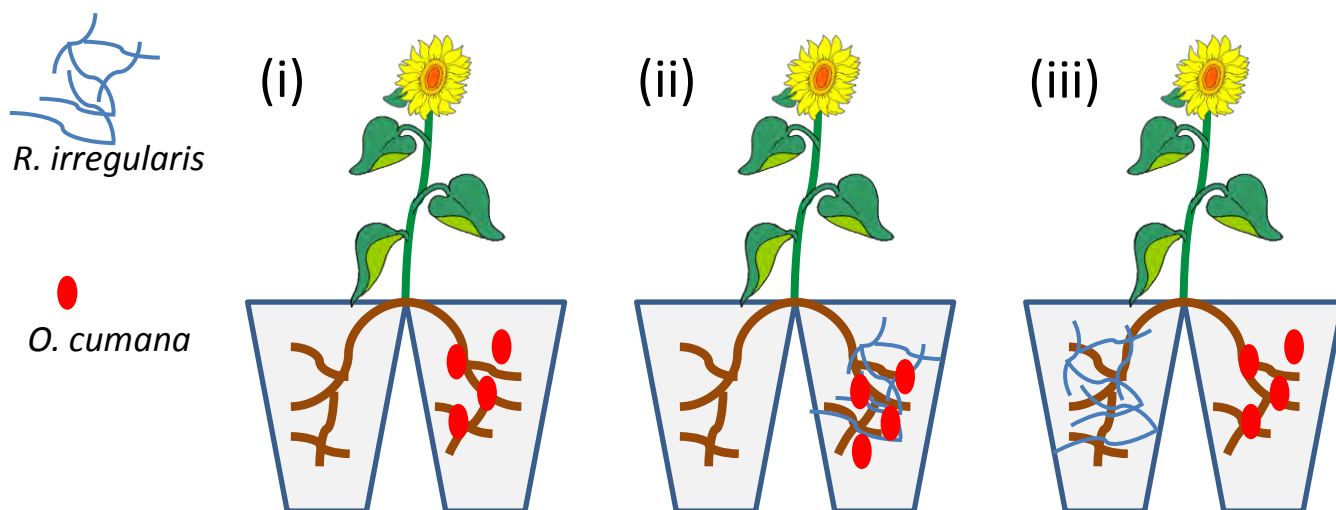
a permis d'induire une meilleure protection contre *O. cumana* chez les variétés 2603 et AP451CF.

Par ailleurs, le taux de mycorhization dans chaque condition a été mesuré. On constate que le taux de mycorhization entre les différentes variétés est équivalent après cinq semaines de cultures (Fig.30B). Ces résultats montrent que l'absence d'effet de la mycorhization sur la protection de ces variétés à *O. cumana*, n'est pas liée à une moindre capacité du champignon à coloniser la racine. D'autre part, le fait d'observer un taux de mycorhization équivalent chez ces différentes variétés indique à nouveau qu'il n'y a pas de corrélation entre le niveau de mycorhization et le niveau de protection à l'orobanche.

En conclusion, nos expériences montrent que l'effet de la mycorhization sur la protection contre l'orobanche est dépendant de la variété de tournesol et de l'espèce de champignon MA utilisé (*G. rosea* semble induire un niveau de protection plus important que *R. irregularis*). Dans l'optique d'une exploitation de nos résultats au champ, il paraît donc essentiel de prendre en compte ces paramètres. Idéalement, il faudrait identifier pour chaque variété cible l'espèce de champignon MA qui apporte le meilleur niveau de protection. Ceci ne constitue cependant qu'une perspective à long terme, car aujourd'hui le matériel fongique nécessaire pour inoculer des plantes de grande culture n'est disponible que pour un nombre très restreint d'espèces MA.

### **II.B.3. Recherche d'un effet systémique de la mycorhization sur la résistance à l'orobanche**

Récemment, il a été montré que la mycorhization, en réponse au phosphate, est régulée de façon systémique (Balzergue et al., 2011). En outre, les auteurs ont montré que la synthèse des strigolactones pouvait également être régulée de façon systémique. Les strigolactones pourraient être un acteur majeur de l'interaction tournesol/champignon MA/*O. cumana*, la baisse de leur production pouvant expliquer la meilleure protection des plants mycorhizés. Afin d'étudier un potentiel effet systémique de la mycorhization sur la protection du tournesol envers *O. cumana*, des expériences de split-root ont été mises en place. Le système split-root consiste à partager le système racinaire de la plante en deux et à disposer chacune des deux parties ainsi obtenues dans un conteneur différent. Ces deux parties du système racinaire



Traitement	Ø	orobanche	Ø	orobanche + <i>R. irregularis</i>	<i>R. irregularis</i>	orobanche
Nombre d'orobanches par plant		23,55 +/-1,71		21,05 +/-2,53	17,13 +/-1,65	
Poids sec moyen des tubercules		26,9mg +/-3,8		45,1mg +/-13,6	41,9mg +/-9,7	

**Figure 31 : Effet systémique de la mycorhization sur la résistance à *O. cumana*.** Le système racinaire est partagé en deux puis chaque moitié du système racinaire est traitée différemment. (i) l'un des compartiments est inoculé avec des graines d'orobanche, le second ne subit aucun traitement ; (ii) un des compartiments est inoculé avec des graines d'orobanche et des spores de *R. irregularis*, le second compartiment n'est pas traité ; (iii) un premier compartiment est inoculé avec des spores de *R. irregularis* et le second compartiment avec des graines d'orobanche. Les valeurs représentent la moyenne du nombre de tubercules fixés de 10 échantillons par conditions, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées par une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Tukey. Le poids moyen des tubercules est estimé sur 10 plantes, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Des couleurs différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).

peuvent ainsi être soumises à des conditions différentes. Ce système permet donc, en mycorhizant un seul des côtés, de mettre en évidence des mécanismes de résistance systémiques s'ils existent. Ainsi, trois conditions ont été retenues :

- (i) un des compartiments est inoculé avec des orobanches,
- (ii) les orobanches et les spores de champignons MA sont déposés dans le même compartiment,
- (iii) les graines d'orobanches sont déposées dans l'un des compartiments et le second est inoculé avec les spores de champignons MA.

Les conditions (i) et (ii) sont les conditions témoins, tandis que la condition (iii) devrait permettre d'identifier un effet systémique de la mycorhization en comparant avec les conditions (i) et (ii). Le dénombrement des orobanches fixées sur la racine, après six semaines de culture, permet de définir le niveau de protection. Deux expériences ont été réalisées puis les résultats de ces deux expériences ont été regroupés et analysés à l'aide d'une ANOVA. On remarque que le nombre d'orobanches fixées est équivalent entre la condition (i) et la condition (ii). On constate que la condition (iii) présente significativement moins d'orobanches que les conditions (i) et (ii) (Fig.31). Il semblerait donc que tout ou partie de la protection induite par la mycorhization soit dû à un mécanisme systémique. Cette réponse pourrait correspondre à une régulation systémique de la sécrétion de strigolactones, comme observé en condition de forte nutrition phosphatée. Toutefois, si tel est le cas nous devrions observer une diminution de l'infection quelle que soit la partie du système racinaire mycorhizée. Or, nous n'observons pas d'effet de la mycorhization lorsque les champignons MA et l'orobanche sont présents dans le même compartiment, ce qui entre en contradiction avec les résultats obtenus dans les expériences précédentes. Bien qu'il soit difficile d'expliquer les résultats obtenus lors des expériences de split-root, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle les strigolactones et/ou la DCL seraient différenciellement sécrétées entre le compartiment mycorhizé et non mycorhizé ce qui pourrait expliquer le phénotype observé. Il serait donc intéressant de mesurer la quantité de strigolactones et de DCL produites dans les différents compartiments afin de vérifier, chez le tournesol, si l'on observe des mécanismes systémiques équivalents à ceux observés par Balzergue et al (2011).

On sait que la plante va détourner jusqu'à 20% de ses photoassimilats pour nourrir le champignon MA, et les racines mycorhizées sont des puits de carbone plus importants que des



racines non-mycorhizées (pour revue Bago et al., 2000). On pourrait ainsi penser que dans un système split-root la plante favoriserait la partie mycorhizée au détriment de la partie non mycorhizée. Nous avons donc mesuré la biomasse racinaire dans les deux compartiments dans la condition (iii). Ces mesures indiquent que le développement racinaire entre les deux compartiments est comparable (compartiment mycorhizé = 756,3 mg +/- 30,2 ; compartiment orobanche = 753,8 mg +/-87,4). D'autre part, nous avons mesuré la masse moyenne des tubercules et n'avons pas observé de différences de développement de l'orobanche dans les différentes conditions (Fig.31). Ces résultats suggèrent que les flux de carbone entre les deux parties du système racinaire sont identiques. La distribution préférentielle des photoassimilats vers la partie mycorhizée ne semble pas une hypothèse assez solide pour expliquer la différence de résistance entre les conditions (ii) et (iii). La mycorhization semble donc jouer un rôle sur les phases précoces de l'interaction, c'est-à-dire la germination et/ou l'attachement de l'orobanche à la racine.

### III. Conclusion

Nous avons recherché si la mycorhization du tournesol pouvait induire une protection contre *O. cumana*. Nos premiers résultats ont permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques de la triple interaction tournesol/orobanche/champignons MA.

- (i) L'effet protecteur des champignons MA contre l'orobanche est dépendant de l'espèce fongique. En effet, la protection induite par *R. irregularis* reste modérée, alors que les plantes mycorhizées avec *G. rosea* semblent disposer d'un bon niveau de protection contre l'orobanche (environ 40 à 50% de tubercules en moins par rapport aux plantes témoins).
- (ii) Labrousse et al (2001) montrent qu'il existe différents mécanismes de défense contre l'orobanche chez le tournesol, certains se manifestant par la nécrose des orobanches se qui favorise une meilleure vigueur de la plante hôte pouvant résulter de la baisse du nombre de fixation d'orobanches sur la plante. Dans nos conditions nous n'avons pas observé d'induction de nécrose significative ou de défaut de croissance des tubercules. Ceci semble indiquer que la mycorhization affecte la germination et/ou la fixation des



orobanches limitant ainsi la charge parasitaire sur les plants mycorhizés, mais ne semble pas exercer d'autres effets protecteurs par la suite.

- (iii) Nous avons testé l'effet de l'inoculation par *R. irregularis* sur différentes variétés de tournesol. La mycorhization de ces différentes variétés ne semble pas apporter un gain dans la résistance à l'orobanche, indiquant que la résistance naturelle de ces variétés domine sur la protection induite par celle apportée par *R. irregularis*.
- (iv) L'expérience de split-root n'a pas montré d'effet direct de la mycorhization sur l'infection par orobanche (ce qui entre en contradiction avec les résultats menés en simple compartiment). Ces expériences ont toutefois montré l'existence d'un effet systémique de la mycorhization sur la protection contre l'orobanche.





## Chapitre II : Effet des champignons MA sur la germination d'*O. cumana*

---

Une partie des résultats présentés ci-dessous ont été publiés dans la revue PLoS One en 2012 (Louarn et al. 2012, Annexe 1)

### I. Introduction.

Dans le chapitre précédent nous avons montré que les plants de tournesol mycorhizés étaient moins parasités par *O. cumana* que les plants non mycorhizés. La réduction du nombre de tubercules à un stade précoce et l'absence de phénotypes particuliers aux stades post-attachement laissent supposer un défaut de germination ou d'attachement de l'orobanche. Par ailleurs, des travaux réalisés par d'autres équipes ont montré que les exsudats de plants mycorhizés sont moins actifs sur la germination des graines de plantes parasites par comparaison avec les exsudats de plants non mycorhizés (Lendzemo et al., 2007 ; Fernández-Aparicio et al., 2010). Les auteurs de ces travaux ont proposé que les plantes mycorhizées sécrètent moins d'inducteurs de la germination, réduisant ainsi la charge parasitaire sur la racine hôte. A l'appui de cette hypothèse, López-Ráez et al (2011) ont montré par des analyses biochimiques que des plants de tomate mycorhizés sécrètent moins de strigolactones que des plants non mycorhizés. En outre, il a été montré que la germination des graines d'orobanche répond de façon dose dépendante aux strigolactones (Kim et al., 2010) ; ainsi la baisse de production de strigolactones par les plants mycorhizés pourrait expliquer l'amélioration de la résistance.

Pour aborder cette question du rôle des exsudats racinaires dans l'interaction tournesol/*O. cumana*, il est nécessaire d'examiner plus en détail la nature des inducteurs de germination produits par le tournesol. Yoneyama et al (2011) ont montré que le tournesol produit deux strigolactones, l'orobanchyl acétate et le 5-deoxystrigol. D'après nos analyses cette dernière molécule est capable d'induire la germination d'*O. cumana* (résultats non présentés).



Cependant, il est vraisemblable que la situation chez le tournesol ne soit pas aussi simple que chez beaucoup d'autres espèces. En effet, la relation entre le tournesol et *O. cumana* est originale car *O. cumana* ne germe qu'en présence d'exsudats de tournesol. Réciproquement, les exsudats de tournesol ne font germer, quasi exclusivement, que les graines d'*O. cumana* (Fernandez-Aparicio et al., 2008). Il est donc possible que le tournesol sécrète un inducteur de germination spécifique. Une molécule de la famille des sesquiterpènes lactones, la déhydrocostuslactone (DCL), pourrait être un bon candidat. En effet, elle est sécrétée par les racines de tournesol (Joel et al., 2011) et elle induit la germination d'*O. cumana* mais pas celle des autres graines d'orobanches (Macías et al., 2009). En outre, Joel et al. (2011) ont utilisé de la mévastatine afin d'inhiber la voie du mévalonate (MVA), qui permet la synthèse d'Isopentényl-PyroPhosphate (IPP), un précurseur de la DCL. L'application de cet inhibiteur a permis d'inhiber fortement l'induction de la germination d'*O. cumana*. En outre, les auteurs ont constaté que ni l'application de fluridone (un inhibiteur de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, et donc des strigolactones) ni une forte fertilisation phosphatée (connue pour affecter négativement la sécrétion de strigolactones chez différentes plantes), n'affectent le pouvoir germinatif des exsudats racinaires de tournesol. L'ensemble de ces résultats amène les auteurs à conclure que la DCL jouerait un rôle majeur dans la germination d'*O. cumana*. Toutefois, une série d'arguments nous amènent à interpréter ces observations avec davantage de prudence :

(i) comme il sera détaillé plus tard dans ce chapitre, nous avons aussi utilisé la nutrition phosphatée pour inhiber la synthèse des strigolactones. Pour des raisons non élucidées, nos résultats vont à l'encontre de ceux décrits par Joel et al. (2011) : dans notre cas un apport de phosphate élevé affecte négativement le pouvoir germinatif des exsudats de plants de tournesol.

(ii) les résultats du traitement par le fluridone sont difficiles à interpréter car ce composé augmente la sensibilité des graines d'orobanche pour les strigolactones (Chae et al., 2004). Par conséquent, un taux de germination inchangé suite à ce traitement ne signifie pas forcément que les strigolactones ne jouent pas un rôle important.

(iii) l'effet de la mévastatine n'est pas spécifique : en bloquant la synthèse de l'IPP il peut réduire, en plus de la production de DCL, celle des strigolactones (Matusova et al., 2005) et d'autres composés.



(iv) la mévastatine n'est pas non plus capable de bloquer totalement la synthèse de l'IPP : il existe des voies de synthèse secondaires capables de produire ce composé. Il paraît donc très important de doser la DCL (et si possible, les strigolactones) après ce traitement pour pouvoir conclure sur l'importance de la DCL. Idéalement, les exsudats de plantes traitées pourraient être complétés avec de la DCL.

Compte-tenu de ces remarques, il semble difficile aujourd'hui de tirer des conclusions définitives sur la nature des inducteurs de la germination d'*O. cumana* produits par le tournesol. La DCL et les strigolactones, ou une combinaison des deux, restent de bons candidats mais on ne peut pas exclure la contribution d'autres composés. Ces différentes possibilités seront prises en compte pour la recherche d'un effet de la mycorhization sur la production d'inducteurs de germination.

L'effet bénéfique des champignons MA peut également être expliqué par d'autres mécanismes :

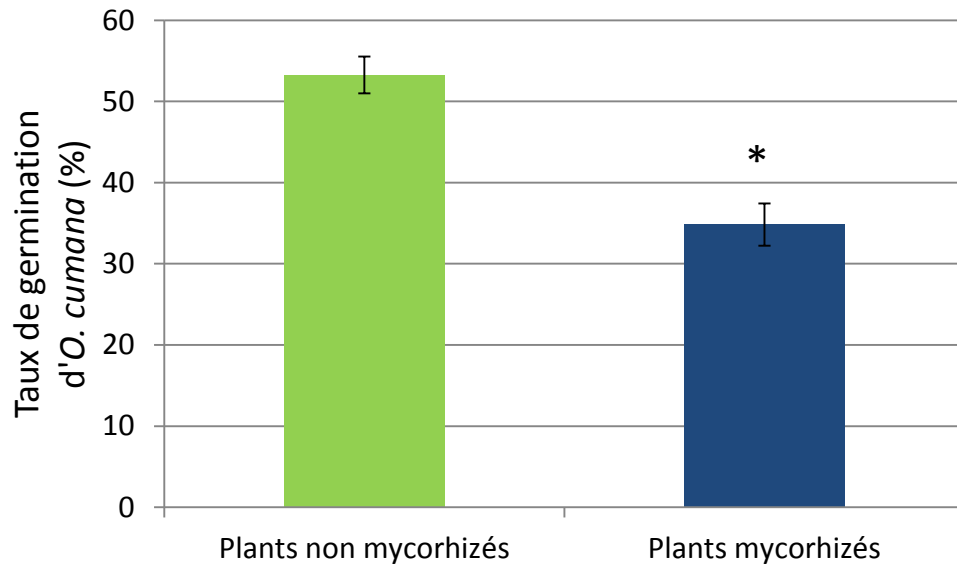
Premièrement, les racines mycorhizées pourraient libérer un inhibiteur de la germination d'*O. cumana*. On observe ce mécanisme lors de la symbiose entre le pois et *Rhizobium leguminosarum* qui permet de réduire l'infection par *O. crenata*. Les plants en symbiose avec la bactérie produisent des composés phénoliques qui inhibent la germination de l'orobanche (Mabrouk et al., 2007). Deuxièmement, la mycorhization pourrait provoquer un défaut d'attachement des orobanches à la racine. Enfin, la diminution du parasitisme chez les plants mycorhizés pourrait être due à une combinaison de plusieurs de ces mécanismes.

## **II. Résultats et discussion**

### **II.A. Comparaison de l'activité d'exsudats de plants mycorhizés et non mycorhizés**

#### **II.A.1. Activité des exsudats racinaires de tournesol sur la germination d'*O. cumana***

Afin de déterminer si la mycorhization affecte la synthèse d'inducteurs de germination, nous avons traité des graines d'*O. cumana* avec des exsudats racinaires de plants de tournesol



**Figure 32 : Effets des exsudats racinaires sur la germination d'*Orobancha cumana*.** Des graines d'*O. cumana* sont traitées avec des exsudats racinaires de plants de tournesol non mycorrhizés et mycorrhizés. Le taux de germination est déterminé 8 jours après traitement. Les valeurs représentent le taux de germination moyen de 5 échantillons d'environ 100 graines, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Wilcoxon. L'étoile indique une différence significative ( $P < 0,05$ ).

mycorhizés et non mycorhizés. Pour obtenir ces exsudats, après quatre semaines de culture, le système racinaire des plants est extrait du substrat, nettoyé, puis les racines (non séparées de la partie aérienne) sont incubées dans de la solution nutritive pendant vingt-quatre heures. Pendant cette période les racines libèrent différents composés dans la solution. Les exsudats racinaires ainsi obtenus sont ensuite stérilisés par filtration puis le volume est ajusté, par dilution, de telle façon qu'un millilitre de solution finale contienne les molécules produites par l'équivalent de quatre milligrammes de racines sèches. Les graines d'orobanche sont ensuite traitées avec ces solutions et huit jours après application des exsudats le taux de germination moyen pour chaque traitement est déterminé.

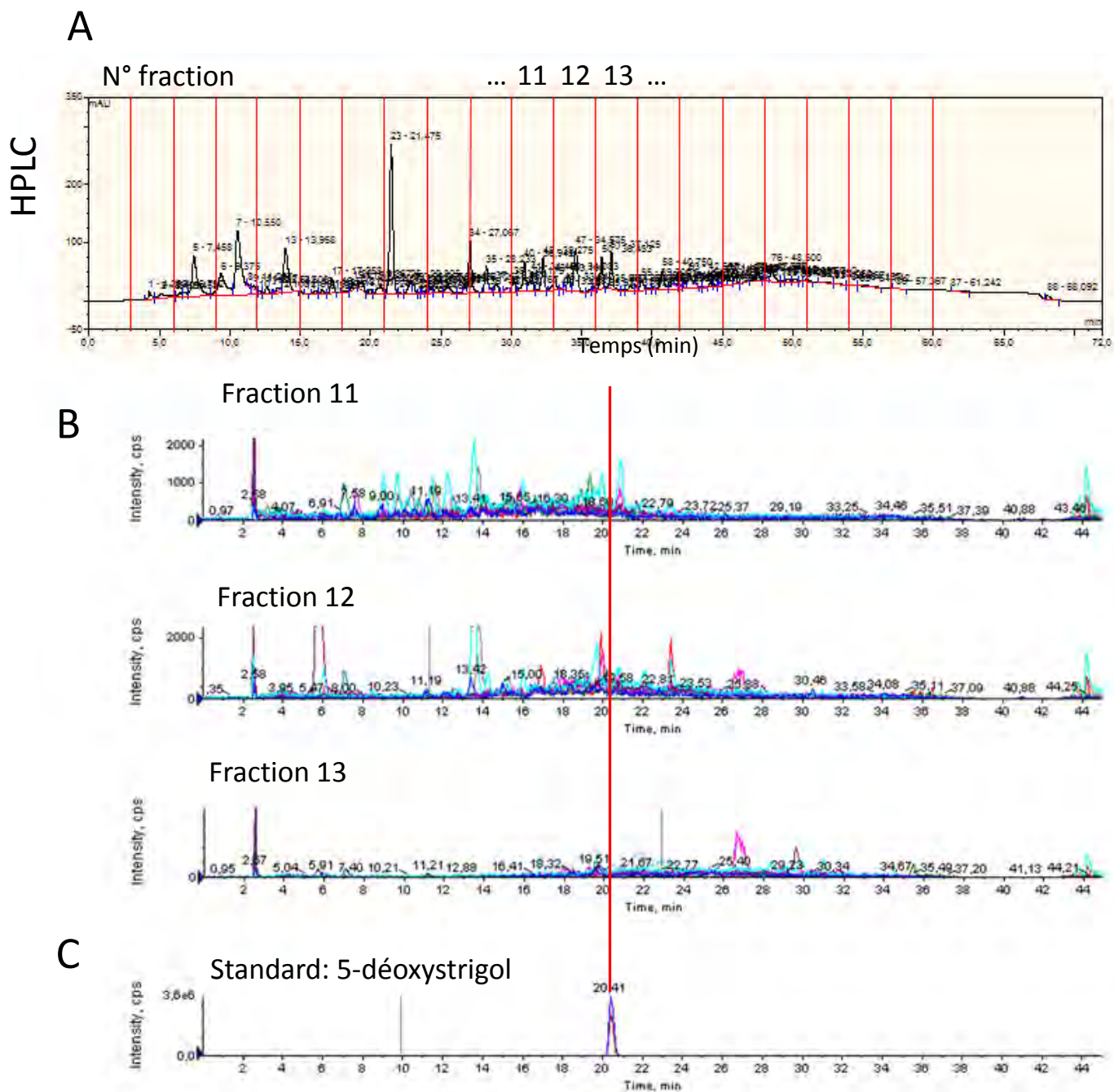
On observe que les exsudats produits par les racines de tournesols mycorhizés sont moins actifs que ceux libérés par les plants de tournesols non mycorhizés (Fig.32). La différence d'activité entre les deux types d'exsudats est significative. On peut émettre deux hypothèses non exclusives pour expliquer cette baisse de pouvoir germinatif :

- (i) les plants mycorhizés produisent moins de strigolactones et/ou de DCL, ou d'autres inducteurs de germination encore inconnus
- (ii) les racines mycorhizées sécrètent une ou des molécules inhibitrices de la germination d'*O. cumana*.

## **II.A.2. Analyse des strigolactones dans les exsudats racinaires**

### **II.A.2.a. Analyses biochimiques**

Nous avons voulu dans un premier temps déterminer si la mycorhization de plants de tournesol influe sur la sécrétion de strigolactones. Deux strigolactones, l'orobanchyl acétate et le 5-deoxystrigol, ont été identifiées dans des exsudats racinaires de tournesol (Yoneyama et al., 2011). Nous avons donc recherché par spectrométrie de masse ces molécules dans nos exsudats racinaires de tournesol mycorhizés et non mycorhizés. Les analyses ont été réalisées par Virginie Puech-Pagès, qui possède une grande expérience dans la détection des strigolactones chez différentes plantes (Gomez-Roldan et al., 2008 ; Lopez-Raez et al., 2008, Delaux et al., 2012). La recherche de strigolactones a été effectuée par la méthode la plus sensible, la LC-MS/MS (Liquid chromatography - tandem mass spectrometry). Selon le cas,



**Figure 33 : Recherche des strigolactones dans des exsudats racinaires de tournesol.** (A) Chromatogramme montrant le fractionnement d'exsudats racinaires de tournesol par HPLC. Les barres rouges limitent les différentes fractions obtenues. En abscisse est représenté le temps de rétention et en ordonnée l'intensité du signal correspondant à une détection par UV (280 nm). (B) Analyse des fractions HPLC par LC-MS/MS. Chromatogrammes représentant l'analyse par LC-MS/MS pour les fractions 11 à 13. En abscisse est représenté le temps de rétention et en ordonnée l'intensité du signal pour les transitions recherchées. (C) Chromatogramme obtenu par LC-MS/MS d'une strigolactone standard, le 5-déoxystrigol. La transition caractéristique de cette strigolactone ( $353 > 256$   $m/z$ ) n'a pu être détectée dans les différentes fractions HPLC au bon temps de rétention.

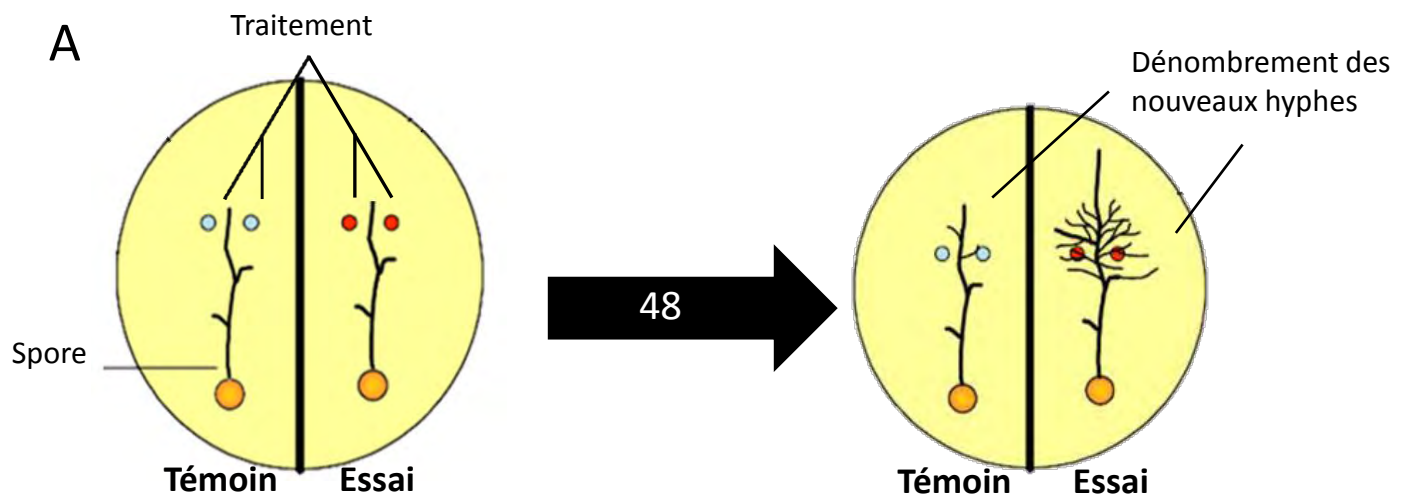


les extraits d'exsudats racinaires ont été soit analysés directement soit préfractionnés par HPLC.

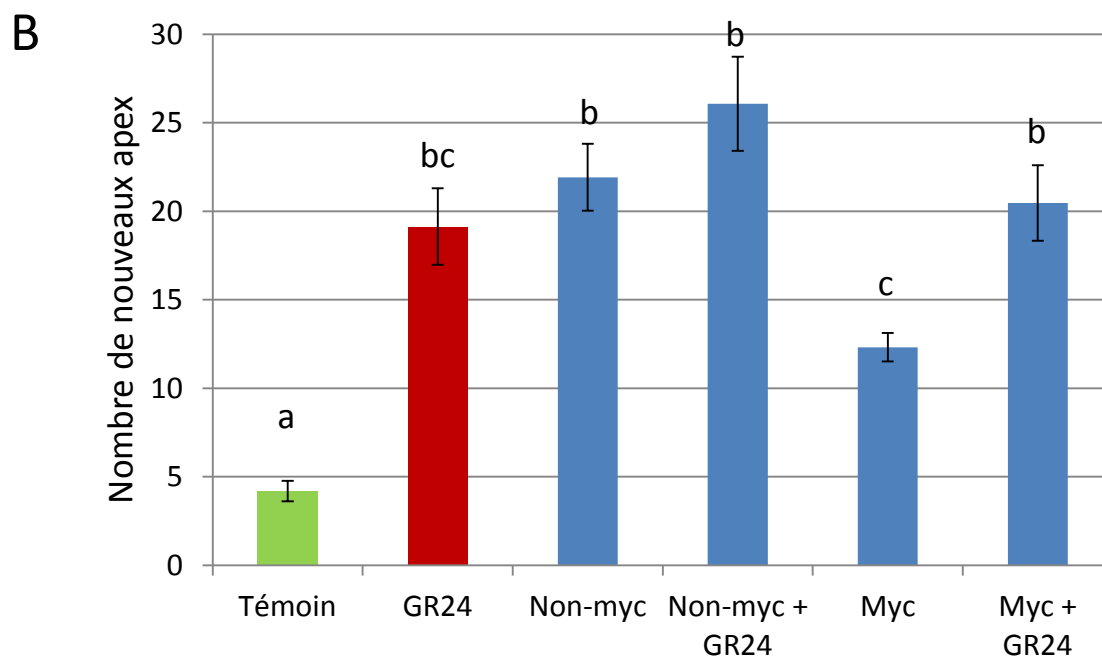
Avant l'analyse en LC-MS/MS, les extraits ou fractions sont séparés par chromatographie en phase liquide (LC). Les molécules sont séparées selon leur affinité pour la colonne C18 apolaire ; chaque molécule sera ainsi caractérisée par un temps de rétention. Le spectromètre de masse couplé à la LC détermine ensuite la masse des ions obtenus après ionisation des molécules. Dans le mode de détection choisi (MRM = Multiple Reaction Monitoring), le spectromètre de masse peut sélectionner les ions ayant un rapport masse/charge ( $m/z$ ) donné, et les diriger vers la cellule de collision où ces ions sont fragmentés. Un second détecteur placé en aval de la cellule de collision détermine le rapport  $m/z$  des ions fils obtenus par fragmentation des ions parents. Avec ce mode de détection, on peut ainsi rechercher des transitions caractéristiques d'une ou plusieurs molécules : ces transitions correspondent aux masses des ions avant (ions parents) et après (ions fils) la fragmentation. L'ensemble de ces opérations se déroule au fur et à mesure que les molécules sont éluées de la colonne. On peut ainsi obtenir, à chaque temps de rétention, un signal dont l'intensité reflète la quantité de molécules présentant la transition recherchée.

Par exemple, pour l'orobanchyl acetate on obtient un ion parent majoritaire de 411,1  $m/z$ , et un ion fils de 254,1  $m/z$  correspondant à la perte du cycle D (97  $m/z$ ) et de la fonction acétate (60  $m/z$ ). On associe alors la transition 411,1>254,1  $m/z$  à l'orobanchyl acetate. Parallèlement, on peut déterminer à l'aide d'un standard quel est le temps de rétention de l'orobanchyl acetate dans les conditions de LC utilisées. La combinaison du temps de rétention et d'une ou plusieurs transitions de masse permet d'attribuer sans ambiguïté le signal à la présence d'orobanchyl acetate.

Cette méthode d'analyse, qui permet d'optimiser la sensibilité de la détection, a été utilisée pour rechercher la présence d'orobanchyl acetate et de 5-deoxystrigol, mais aussi celle des autres strigolactones connues. Malgré de nombreuses tentatives, il n'a pas été possible de détecter de strigolactones dans les exsudats racinaires de tournesol (Fig. 33). Une explication possible pourrait se trouver dans les conditions utilisées dans notre étude pour produire les exsudats. En effet nous devons laisser pousser les plants quatre semaines dans un substrat solide afin d'obtenir un niveau de mycorhization suffisant. Dans le seul article disponible décrivant l'analyse de strigolactones chez le tournesol, Yoneyama et al (2011) ont utilisé un système de culture hydroponique sans substrat, et une durée de culture assez courte. Les



Concentration en GR24 (M)	0 (Témoin)	10 <sup>-13</sup>	10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-7</sup>
Activité relative (nombre hyphes essai/nombre hyphes Témoin)	1	1,55	1,58*	2,81*	3,31*



**Figure 34 : Effets des exsudats racinaires sur la ramification de *Gigaspora rosea*.** (A) Représentation schématique du test d'activité de ramification avec *G. rosea*. Le tableau représente l'activité relative de différentes concentrations de GR24 par rapport au témoin (d'après Besserer et al., 2006). (B) Activité des exsudats racinaires non mycorhizés et mycorhizés sur *G. rosea*. Le nombre de nouveaux hyphes est déterminé 48h après application des différents extraits. Témoin : 10% d'acétonitrile dans H<sub>2</sub>O. GR24 : GR24 à 10<sup>-7</sup>M dans 10% d'acétonitrile. Non-myc et Myc : exsudats de plants non mycorhizés ou mycorhizés dans 10% d'acétonitrile, complétés ou non avec 10<sup>-7</sup>M de GR24. Les valeurs représentent la moyenne de 25 spores traitées par condition, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Tukey. Des lettres différentes indiquent une différence significative (P<0,05).

plantes poussent au contact de la solution nutritive, puis les exsudats produits dans cette solution sont passés sur charbon actif afin d'y fixer les strigolactones. Cette méthode permet de traiter un grand volume d'exsudats, et éventuellement de cumuler les molécules produites par les plantes pendant plusieurs jours. Dans notre cas l'analyse porte sur les exsudats produits pendant seulement vingt-quatre heures. Si les strigolactones sont produites en faible quantité par le tournesol il est possible que notre méthode ne permette pas de libérer suffisamment de strigolactones dans nos exsudats pour qu'elles soient détectables par LC-MS/MS. Toutefois, la mise en place de la symbiose MA n'est pas compatible avec un système de culture en hydroponie, car la symbiose MA ne se développe pas en milieu liquide. En outre, l'âge de nos plantes pourrait expliquer les difficultés de détection des strigolactones. En effet, Sato et al (2005) ont observé, chez le coton, que la quantité de strigolactone sécrétée par la plante augmente significativement pendant les sept premiers jours de croissance de la plante et semble se réduire par la suite.

#### II.A.2.b. Estimation du contenu en strigolactones par bioessais

Faute de mesure biochimique directe, nous avons décidé d'estimer la teneur en strigolactones par un test d'activité indirect utilisant le champignon MA *G. rosea*. Ce test est basé sur la capacité des strigolactones à stimuler la ramification des champignons endomycorhiziens (Akiyama et al., 2005). Pour réaliser ce test, on traite l'apex d'hyphes de *G. rosea* avec des extraits organiques d'exsudats racinaires. Deux jours après traitement on dénombre les nouvelles ramifications produites, puis on compare le nombre moyen de ramifications induit par les différents traitements. Les travaux de Besserer et al (2006) ont montré que les strigolactones induisent la formation de nouvelles ramifications chez *G. rosea* de façon dose dépendante (Fig.34A).

Nous avons traité des hyphes de *G. rosea* avec des extraits racinaires de plants de tournesol mycorhizés et non mycorhizés, complémentés ou non avec du GR24. Les exsudats racinaires de plants de tournesol non mycorhizés présentent une activité significativement plus importante que les exsudats de plants mycorhizés (Fig.34B). D'autre part, l'addition de GR24 aux exsudats racinaires mycorhizés permet de restaurer l'activité au niveau du témoin, ce qui suggère une moindre concentration en strigolactones dans les exsudats racinaires de plant mycorhizés. Cette baisse possible de la teneur en strigolactones pourrait expliquer la



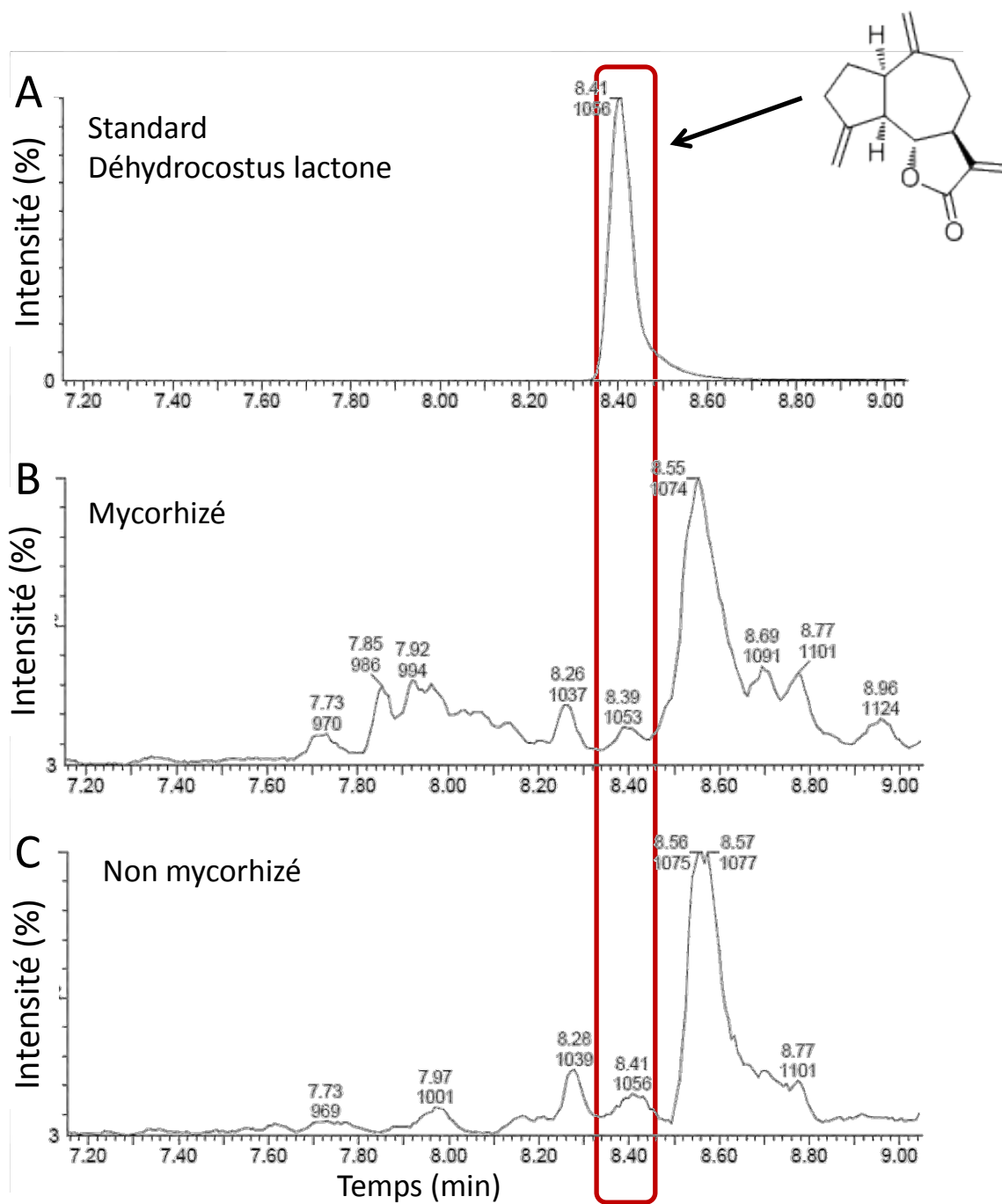
diminution du pouvoir germinatif des exsudats racinaires mycorhizés. Il faut toutefois noter que ce bioessai n'est peut-être pas spécifique des strigolactones, et donc que l'on ne peut pas exclure que les différences entre les exsudats soient liés à d'autres types de molécules. On peut cependant exclure ici un rôle joué par la DCL car Akiyama et al (2010) ont montré que cette molécule n'induit pas la formation de nouveaux apex sur les champignons MA. La baisse d'activité sur des exsudats de plants mycorhizés ne peut donc pas être imputée à une plus faible teneur en DCL par rapport aux exsudats de plants non mycorhizés.

### **II.A.3. Analyses biochimiques de la DCL**

#### **II.A.3.a. Recherche de la DCL dans les exsudats racinaires**

Nous avons essayé de quantifier par spectrométrie de masse la DCL dans les exsudats racinaires de plants de tournesol mycorhizés et non mycorhizés. Les exsudats racinaires ont été analysés par GC-MS (Gas chromatography - mass spectrometry). Le principe général de la GC-MS est le même que pour la LC-MS, à la différence que la phase mobile dans le cas de la GC est un gaz (ici l'hélium), et que les molécules étudiées doivent être volatiles ou rendues volatiles par dérivation. La DCL est un composé naturellement volatil, il n'a donc pas été nécessaire de la dériver pour l'analyser. Les molécules, injectées en solution, sont ensuite vaporisées puis sont séparées sur une colonne capillaire, et sont enfin analysées par le spectromètre de masse. Ces analyses ont été réalisées par Saïda Danoun et Sylvie Fournier (LRSV, Plateforme METATOUL, Toulouse). Après plusieurs essais infructueux, certaines étapes de l'extraction et de l'analyse ont été modifiées afin d'améliorer la détection.

Dans une première approche, nous avons tenté d'extraire la DCL par une extraction liquide/liquide. Cette méthode permet de séparer les molécules présentes dans les exsudats en fonction de leur affinité pour le solvant d'extraction. La DCL est une molécule très apolaire, nous avons donc essayé de l'extraire avec de l'éther de pétrole ou du dichlorométhane. Puis la phase organique a été récupérée, séchée, afin de concentrer les molécules dans un petit volume. Cette méthode ne nous a pas permis de détecter la DCL. Nous avons également tenté de concentrer la DCL à partir d'exsudats racinaires à l'aide d'une colonne d'extraction sur phase solide, de nouveau sans succès. Afin de nous assurer que la méthode d'extraction par colonne était efficace, nous avons rajouté de la DCL (molécule standard disponible



**Figure 35 : Analyse par GC-MS de la DCL dans des broyats racinaires de plants mycorhizés et non mycorhizés.** (A) Chromatogramme obtenu avec un standard de la DCL (230  $m/z$ ), en abscisse est représenté le temps de rétention de la molécule et en ordonnée l'intensité du signal. (B) Chromatogramme obtenu avec des broyats de racines mycorhizées, la transition caractéristique au bon temps de rétention de la Déhydrocostus-lactone est détectée. (C) Chromatogramme obtenu par GC-MS de broyat de racines non mycorhizées, la transition caractéristique de la DCL est détectée.

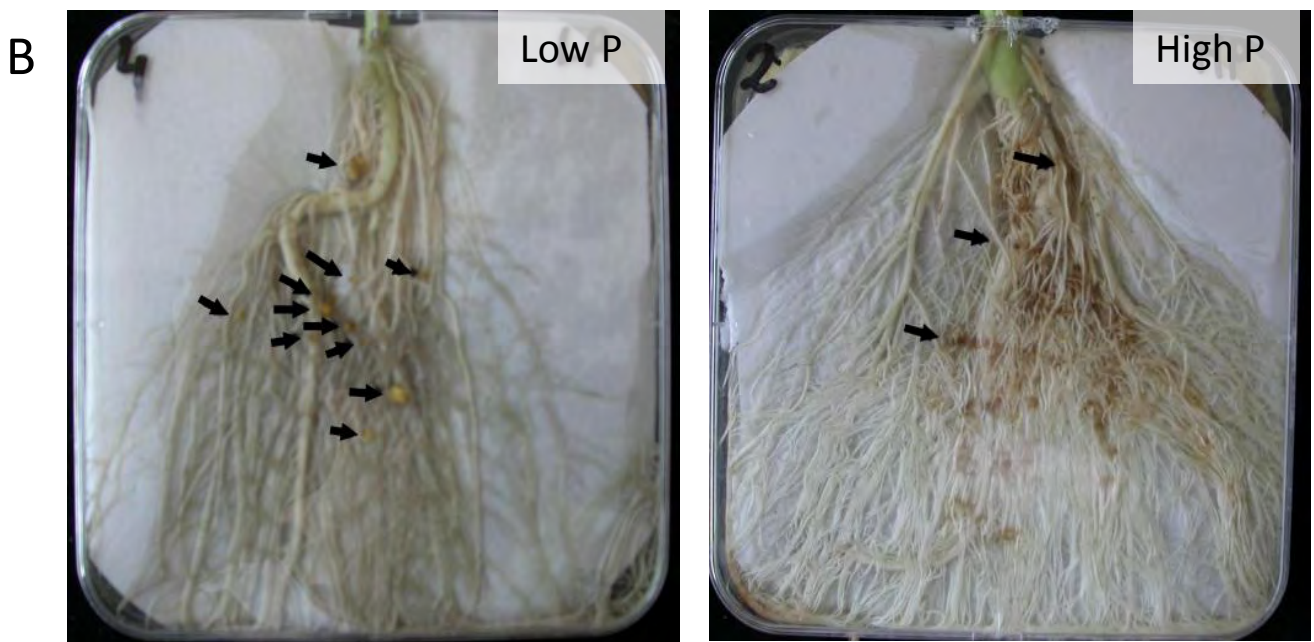
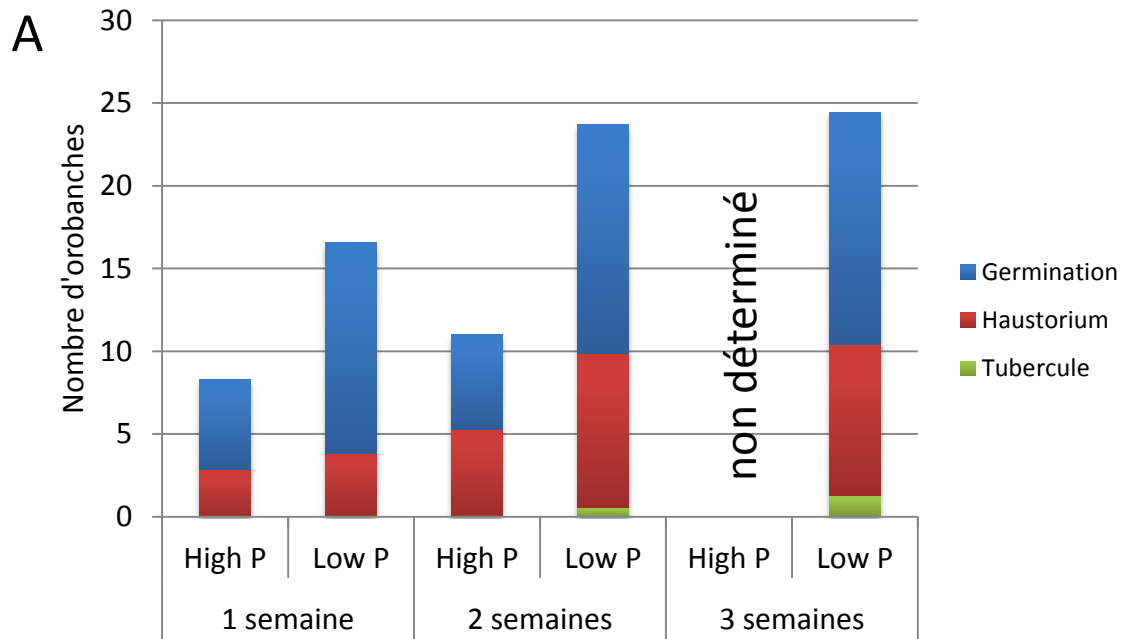
commerciallement) de façon exogène dans des exsudats. Après extraction et analyse par GC-MS nous avons pu détecter la DCL, montrant l'efficacité de la méthode d'extraction et d'analyse. Il semblerait donc que les quantités de DCL présentes dans nos exsudats soient trop faibles pour être détectées.

Nous avons alors essayé d'extraire la DCL dans l'éther de pétrole directement à partir des racines (sans produire des exsudats), en trempant les racines dans ce solvant comme décrit par Joel et al (2011). Cette méthode ne nous a pas permis d'améliorer la détection de la DCL de façon suffisante : la DCL semble présente mais à une concentration correspondant aux limites de détection de l'appareil. Dans les travaux de Joel et al (2011) les auteurs sont parvenus à détecter la DCL en utilisant un nombre important de plantules (quatre vingt à cent) qu'ils laissent pousser pendant six jours entre un papier absorbant humide et une feuille d'aluminium. Nous ne pouvions faire de même, car cette durée de culture était trop courte et le système de culture non adéquat pour obtenir une mycorhization significative du système racinaire. En outre, la variété de tournesol que nous utilisons est sans doute différente de celle utilisée par Joel et al (2011) (non précisé dans l'article), et il est possible que la variété 2603 sécrète peu de DCL.

#### II.A.3.b. Recherche de la DCL dans des broyats racinaires

Le problème majeur pour la détection de la DCL semble être la quantité de molécules présentes dans les exsudats racinaires. Nous avons donc essayé de détecter la DCL non plus dans des exsudats mais dans des broyats racinaires. L'extraction des broyats par l'éther de pétrole est similaire à la méthode par trempage, mais en broyant la racine on espère rendre la DCL plus accessible au solvant. Cette méthode nous a permis de détecter la DCL dans les racines mycorhizées et non mycorhizées (Fig.35). Les quantités de DCL mesurées sont proches du seuil de détection, ce qui doit nous rendre prudents dans nos interprétations. Cependant il n'apparaît pas de différence importante entre les racines mycorhizées et non mycorhizées. La mycorhization ne semble donc pas affecter de façon significative la production de DCL par la racine.

Les tests de germination effectués avec les exsudats racinaires nous ont montré que les exsudats de plants mycorhizés sont moins actifs sur la germination d'*O. cumana* que les



**Figure 36 : Effet de la nutrition phosphatée sur le développement d'*Orobanche cumana*.** (A) Evolution de l'infection par l'orobanche en fonction de la nutrition phosphatée (Low P= 7,5 $\mu$ M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; High P = 750 $\mu$ M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et du temps. (B) Comparaison du développement racinaire et de l'infection par *O. cumana* en fonction de l'apport en phosphate, 2 semaines après inoculation. Les flèches noires indiquent la présence d'une orobanche fixée au système racinaire de l'hôte.



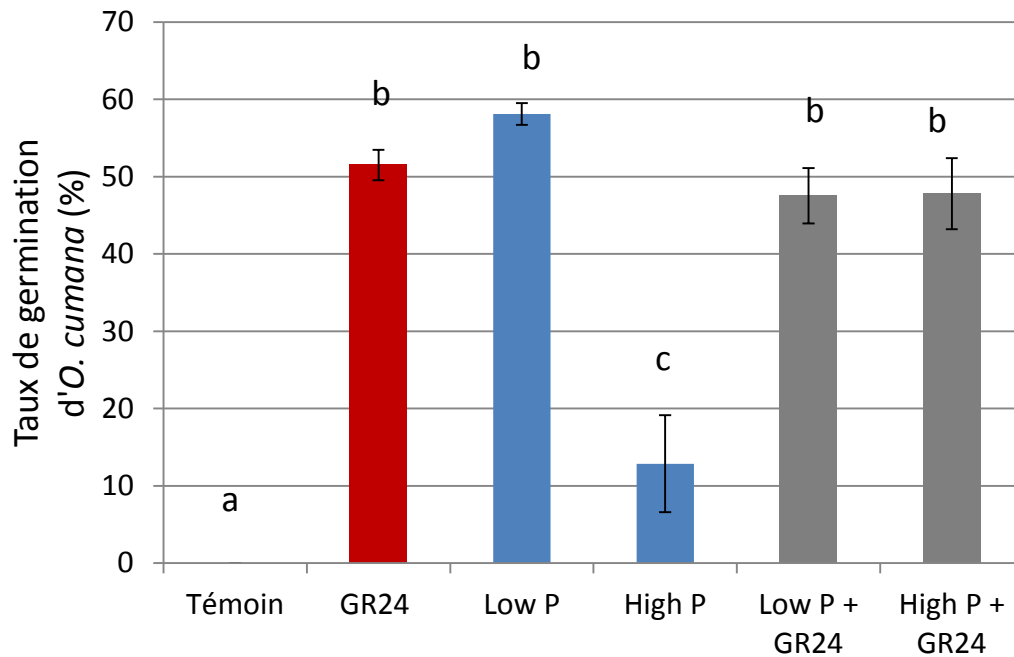
exsudats de plants non mycorhizés. Il semblerait, d'après les résultats partiels de l'analyse des strigolactones et de la DCL, que la baisse d'activité des exsudats mycorhizés soit davantage liée à la baisse de sécrétion de strigolactones qu'à un effet sur la production de DCL.

#### **II.A.4. Effet de la fertilisation phosphatée sur la résistance à *O. cumana* : rôle des strigolactones dans la germination d'*O. cumana***

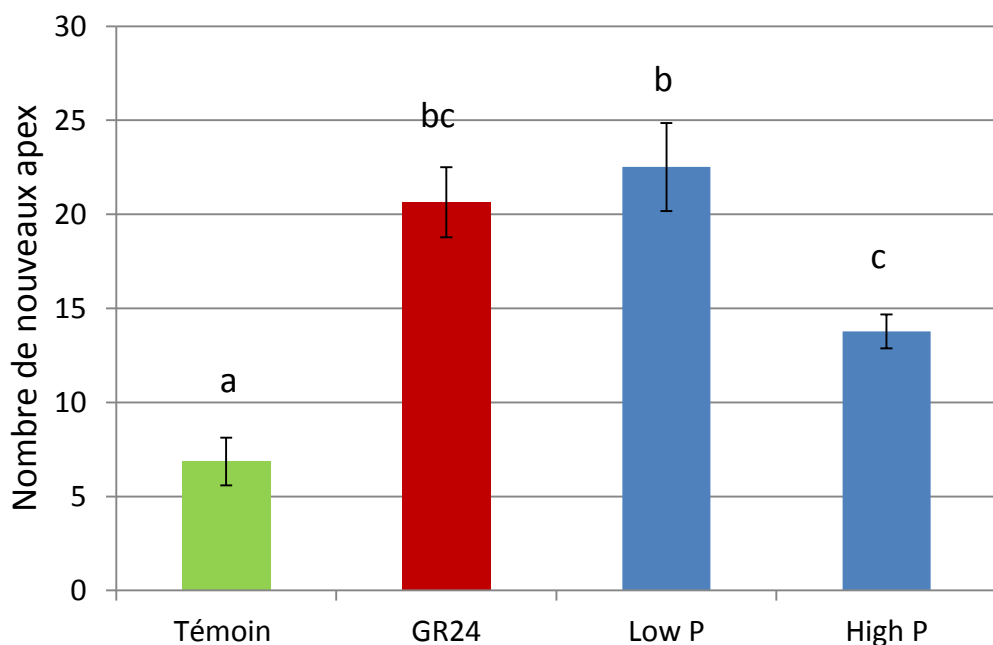
##### **II.A.4.a. Effet de la fertilisation phosphatée sur la résistance à *O. cumana***

Nos résultats précédents laissent supposer qu'une baisse d'inducteurs de la germination, et notamment de strigolactones, pourrait expliquer la moindre activité des exsudats mycorhizés. Il est connu qu'en modifiant le niveau de fertilisation phosphatée, on peut altérer la sécrétion de strigolactones chez différentes plantes (Yoneyama et al., 2007 ; López-Ráez et al., 2008). Ainsi, un apport important de phosphate réduit de façon significative la quantité de strigolactones libérée par les racines, ce phénomène étant associé à une moindre induction de la germination des graines de plantes parasites (Yoneyama et al., 2007 ; Jamil et al., 2012). En outre, l'application d'une forte fertilisation phosphatée au champ permet de réduire l'infection du trèfle par *O. minor* (Southwood, 1971). Un phénomène équivalent pourrait avoir lieu lors de l'interaction qui nous intéresse, car on sait que la nutrition minérale peut avoir un impact sur le niveau de résistance du tournesol contre *O. cumana* (Labrousse et al., 2010 ; NB dans cet article l'effet du phosphate n'a pas été étudié spécifiquement).

Nous avons donc essayé de moduler la production de strigolactones chez le tournesol en jouant sur la fertilisation phosphatée, puis nous avons examiné les conséquences sur la protection contre *O. cumana*. Ces tests ont été réalisés dans un dispositif expérimental appelé rhyzotron (Labrousse et al., 2004). Le rhyzotron permet de faire pousser les racines, à l'intérieur d'une boîte carrée, dans un système à deux dimensions, entre un support (laine de roche recouverte d'un papier filtre) et le couvercle transparent de la boîte. On peut ainsi examiner périodiquement la germination, la fixation et le développement de tubercules d'orobanche sans avoir à détruire la plante. On observe, au bout d'une semaine, que les plants cultivés en condition de forte nutrition phosphatée induisent une moindre germination des



**Figure 37 : Effet de la nutrition phosphatée sur le pouvoir germinatif des exsudats racinaires de tournesol sur *Orobancha cumana*.** Témoin : 0,1% acétone. GR24 : GR24 à  $10^{-8}$ M dans 0,1% acétone. Les valeurs représentent le taux de germination moyen de 5 échantillons d'environ 100 graines, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).



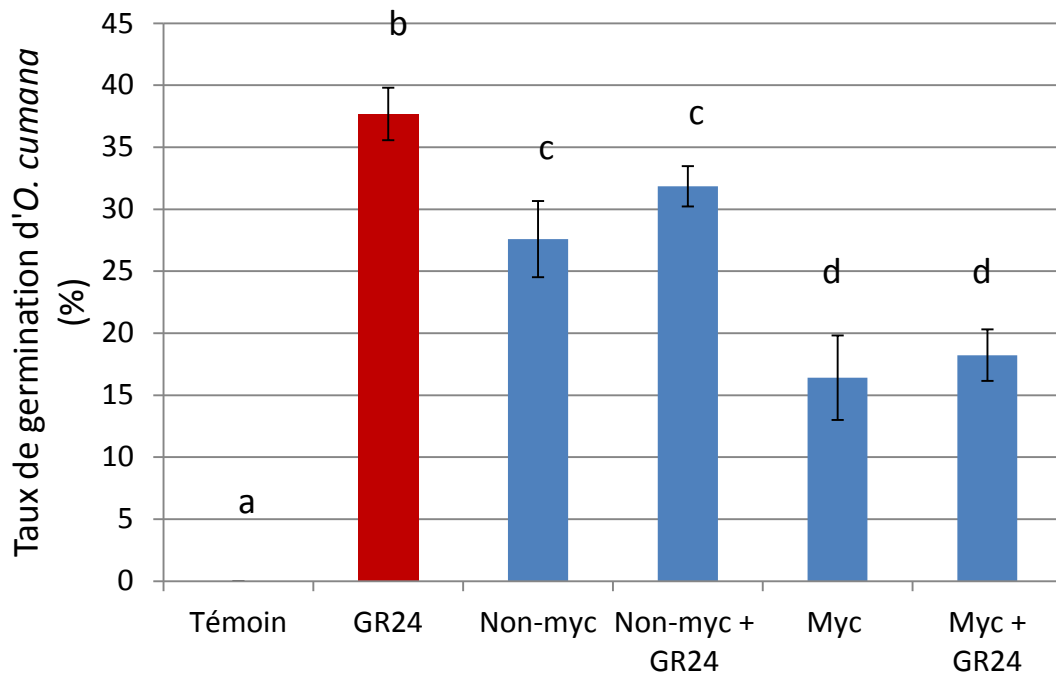
**Figure 38 : Effet des exsudats racinaires de tournesol, sous deux régimes de fertilisation phosphatée (Low P et High P), sur la ramification de *Gigaspora rosea*.** Test de ramification du champignon *G. rosea*. Témoin : 10% acétonitrile. GR24 : GR24 à  $10^{-7}$ M dans 10% acétonitrile. Les exsudats Low P et High P sont extraits à l'acétate d'éthyle, séchés puis repris dans 10% d'acétonitrile. Les valeurs représentent la moyenne de 23 spores par condition, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Tukey. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ).

graines d'*O. cumana* et présentent moins d'orobanches fixées sur les racines que les plants fertilisés en condition de faible nutrition phosphatée (Fig.36A). Cette tendance semble perdurer au delà de la première semaine. Il semble donc que la nutrition phosphatée influe sur le niveau de résistance à *O. cumana* des plants de tournesol via une réduction de la germination des graines.

D'autre part, on constate que le développement racinaire en condition de forte nutrition phosphatée est beaucoup plus important qu'en faible concentration en phosphate (Fig.36B). Ce développement important n'a pas permis de poursuivre l'expérience en rhyzotron au-delà de deux semaines, le système racinaire des plants en condition de forte nutrition phosphatée ayant un développement beaucoup trop important pour pouvoir déterminer le niveau d'infection.

#### II.A.4.b. Test de germination d'*O. cumana*

Les expériences en rhyzotron indiquent que la germination des graines d'orobanche est réduite en condition de forte nutrition phosphatée. Afin de confirmer cette observation nous avons produit des exsudats racinaires de plants ayant poussé en condition de faible ou forte nutrition phosphatée. Puis les exsudats ont été appliqués sur des graines d'*O. cumana* afin de tester leur pouvoir germinatif. On observe que les exsudats de plants ayant été fertilisés avec une forte concentration en phosphate sont moins actifs que les exsudats de plants fertilisés avec une faible concentration de phosphate (Fig.37). Ce résultat confirme les observations réalisées lors des tests en rhyzotron. Il semble donc que la fertilisation phosphatée affecte la sécrétion d'inducteurs de germination. En outre, on observe que l'addition de GR24 dans les exsudats permet de restaurer l'activité des exsudats au niveau des témoins (Fig.37), suggérant que la baisse du pouvoir germinatif de ces exsudats peut être due à une baisse de la teneur en strigolactones.



**Figure 39: Mise en évidence d'un inhibiteur de la germination d'*Orobancha cumana* dans les exsudats racinaires de plants mycorhizés.** Les graines sont traitées avec des exsudats de plants mycorhizés ou non-mycorhizés dans lesquels on a rajouté ou non du GR24 à  $10^{-8}$ M. Témoin négatif: 0,1% d'acétone. Témoin positif :  $10^{-8}$ M de GR24 dans 0,1% acétone. Les valeurs représentent le taux de germination moyen de 5 échantillons d'environ 100 graines, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).

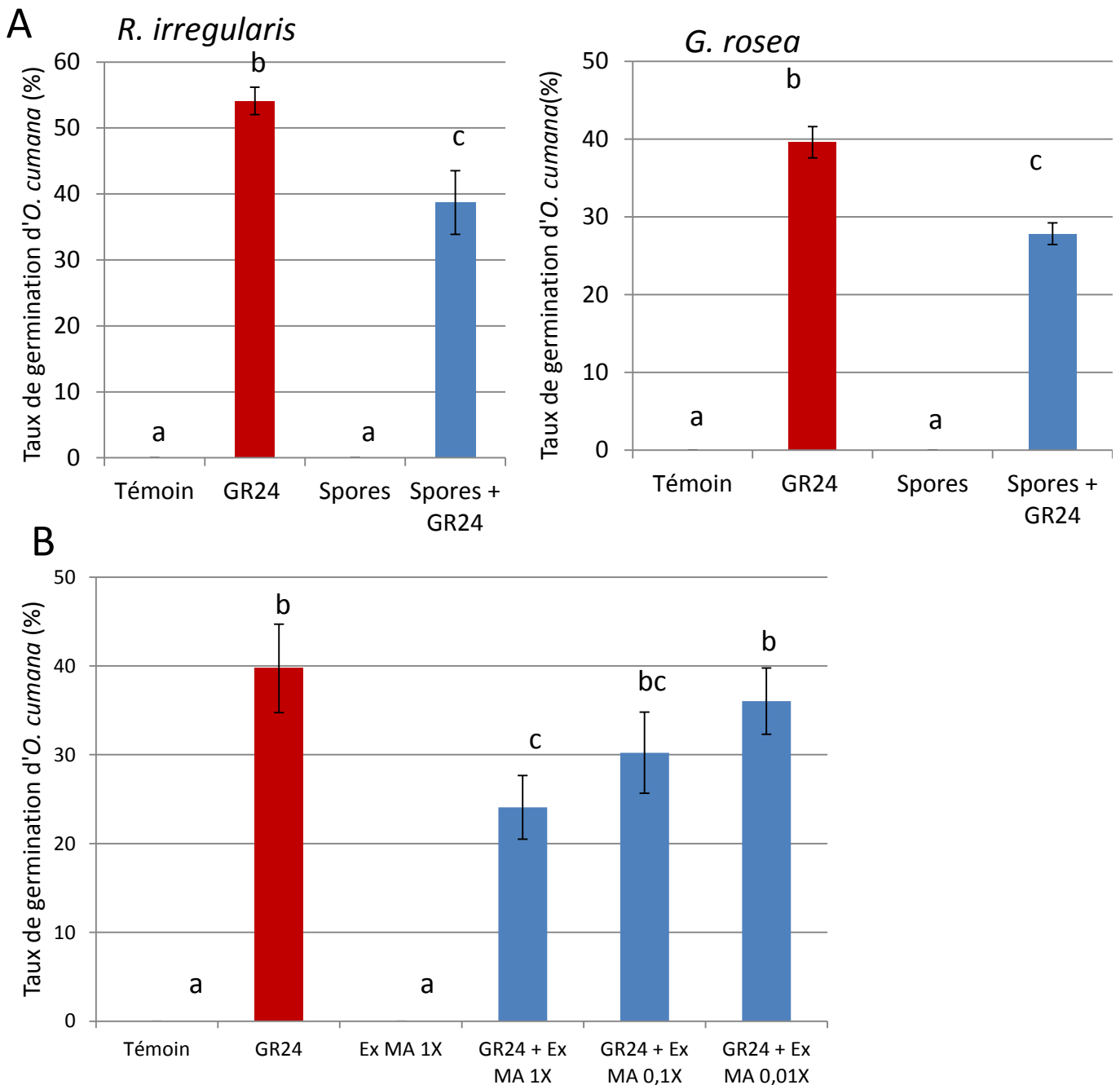
#### II.A.4.c. Test d'activité avec *G. rosea*

Afin de déterminer si la baisse de pouvoir germinatif des exsudats obtenus sous forte fertilisation phosphatée est liée à une baisse de la production de strigolactones, nous avons réalisé un test d'activité sur le champignon MA *G. rosea*. On observe que les exsudats racinaires de plants fertilisés en condition de forte nutrition phosphatée sont moins actifs sur *G. rosea* que des exsudats racinaires de plants fertilisés en condition de faible teneur en phosphate (Fig.38). Ce résultat suggère que les exsudats racinaires de plants fertilisés en condition de forte nutrition phosphatée contiennent moins de strigolactones. La baisse de strigolactones dans les exsudats de plants fertilisés en condition de forte nutrition phosphatée pourrait expliquer tout ou partie de la baisse du pouvoir germinatif de ces exsudats.

Nos expériences montrent qu'en condition de forte fertilisation phosphatée le pouvoir germinatif des exsudats racinaires de tournesol est fortement réduit ainsi que leur activité sur la ramification des hyphes du champignon MA. La première observation est contradictoire avec celles de Joel et al (2011), qui n'observent pas d'effet du phosphate sur la capacité des exsudats à faire germer *O. cumana*. Nous n'avons pas pu attribuer cette différence à un paramètre particulier dans la façon de réaliser l'expérience. Il est possible que la variété de tournesol et la race d'orobanche utilisées affectent les résultats. Dans leurs travaux Joel et al (2011) ont observé que des exsudats de tournesol ne sont pas aussi actifs sur toutes les races d'*O. cumana*. Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de doser la DCL dans les exsudats racinaires des plants cultivés en condition de faible et de forte nutrition phosphatée.

#### II.A.5. Complémentation des exsudats mycorhizés par des strigolactones

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la baisse d'activité des exsudats racinaires de plants mycorhizés : (i) une diminution de la sécrétion des inducteurs de la germination, (ii) la sécrétion d'un inhibiteur de la germination. Afin de tester ces hypothèses, du GR24 à  $10^{-8}$ M est ajouté aux exsudats racinaires de plants de tournesol mycorhizés et non mycorhizés. On observe que l'addition de GR24 aux exsudats racinaires de plants mycorhizés ne permet pas d'augmenter leur capacité à stimuler la germination des graines d'*O. cumana* (Fig.39), alors que l'activité des exsudats de plants fertilisés en condition de forte nutrition



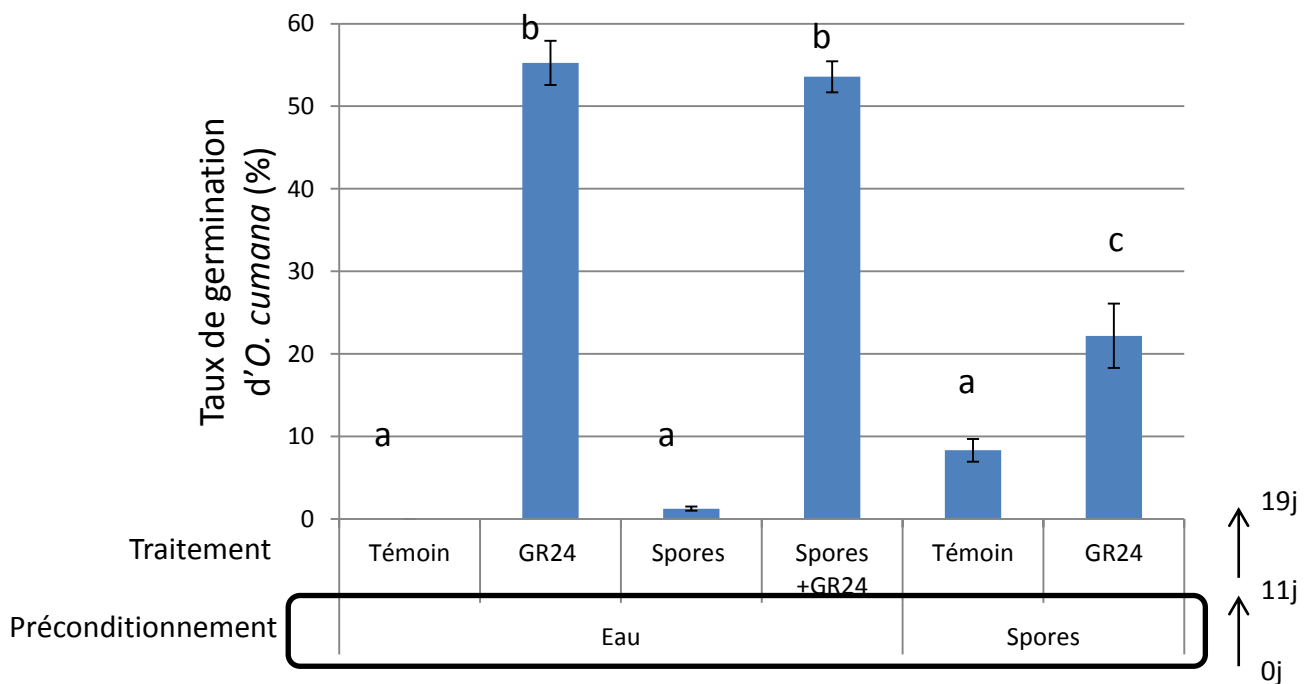
**Figure 40 : Effet des exsudats de champignon mycorhiziens à arbuscules sur la germination d'*Orobancha cumana*.** (A) La germination des graines d'*O. cumana* est induite par du GR24 à  $10^{-8}$ M en présence ou non de 10 spores de *R. irregularis* ou de *G. rosea*. Témoin : 0,1% acétone. Spores : 10 spores dans 0,1% acétone. Témoin positif :  $10^{-8}$ M de GR24 dans 0,1% d'acétone. (B) Les graines d'*O. cumana* sont traitées avec différentes concentrations d'exsudats de *R. irregularis* +/- du GR24 à  $10^{-8}$ M. Témoin : 0,1% acétone. Ex MA 1X : exsudat de spores équivalent à 500 spores dans 500  $\mu$ l (volume de solution avec lequel les graines d'orobanche sont traitées). Les valeurs représentent le taux de germination moyen de 5 échantillons d'environ 100 graines, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).

phosphatée pouvait être complétée (Fig. 37). Par conséquent, la moindre capacité des exsudats de plants mycorhizés à stimuler la germination d'*O. cumana* ne semble pas due seulement à l'absence de strigolactones. Elle pourrait également être la conséquence de la production d'un ou de plusieurs composé(s) inhibant la germination des graines d'*O. cumana*. Ces inhibiteurs pourraient être de différentes origines. Ils pourraient provenir de la plante elle-même : il a été montré que certaines variétés de tournesol sont capables de libérer des molécules inhibant la germination des graines d'orobanche (Serghini et al., 2001). Dans cette hypothèse la mycorhization pourrait favoriser la sécrétion de ces molécules par les racines de tournesol. Les molécules inhibitrices pourraient aussi être d'origine fongique, en effet il a été montré que de nombreux microorganismes pouvaient sécréter des inhibiteurs de la germination des graines d'orobanche et de striga (Müller-Stöver et Kroschel, 2005 ; Bouizgarne et al., 2006 ; Abouzeid et El-Tarabily, 2010). On peut alors émettre l'hypothèse que les champignons MA sécrètent des molécules équivalentes capables d'inhiber la germination des graines d'orobanche.

## **II.B. Analyse des exsudats fongiques**

### **II.B.1. Effet des spores de champignons MA sur la germination d'*O. cumana***

Dans les exsudats de racines mycorhizées, il n'est pas possible de distinguer les composés d'origine végétale ou fongique. Pour aller plus loin dans la détermination de l'origine de potentiels composés inhibiteurs de germination, nous avons donc recherché si des champignons MA seuls étaient capables de produire de tels composés. Pour cela des graines d'orobanche ont été mises à germer en présence de spores de champignons MA. Les graines sont mises en contact avec les spores au début de la période de préconditionnement puis elles sont traitées avec du GR24 pour la phase de germination. Pour cette expérience nous avons utilisé des spores de deux champignons MA très différents, *R. irregularis* et *G. rosea*. On observe, en présence de spores de champignons MA, une diminution significative du taux de germination des graines d'*O. cumana* (Fig.40A). Il semblerait donc que les spores germées de champignons soient capables de produire un inhibiteur de la germination des graines d'*O. cumana*. D'autre part, on remarque que les deux champignons MA utilisés pour ces tests, qui sont phylogénétiquement très éloignés, montrent une activité inhibitrice équivalente sur la



**Figure 41 : Effet du moment de l'application des spores de *Rhizophagus irregularis* sur la germination d'*Orobancha cumana*.** Les graines sont préconditionnées en présence ou en absence de spores de champignons MA. Après 11 jours de préconditionnement les graines sont traitées au GR24 (avec ou sans spores). Témoins : 0.1% acétone. GR24 : GR24 à  $10^{-8}$ M dans 0.1% acétone. Spores : 10 spores de *R. irregularis* dans 0.1% acétone. Les valeurs représentent le taux de germination moyen de 5 échantillons d'environ 100 graines, +/- erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).



germination de l'orobanche. Ce résultat suggère que la capacité de ces champignons à réduire la germination de l'*O. cumana* est présente chez de nombreux champignons MA.

### **II.B.2. Comparaison de l'activité inhibitrice de spores germées et non germées**

Afin de préciser la cinétique de sécrétion d'une molécule inhibitrice, nous avons appliqué les spores soit au moment du préconditionnement (ce qui laisse le temps aux spores de produire des exsudats avant germination des graines d'orobanche) soit au moment du traitement des graines avec le GR24 (ne laisse pas le temps aux spores de produire des exsudats avant la germination des graines). On remarque que le dépôt de spores au moment du traitement ne permet pas de limiter la germination d'*O. cumana* ; à l'inverse des graines traitées au moment du préconditionnement montrent un niveau de germination moins important (Fig.41). Il semble donc que la seule présence de spores de champignons MA germées au moment de l'application de GR24 ne soit pas suffisante pour induire l'inhibition de la germination d'*O. cumana*. Cette expérience suggère que les spores de champignon MA germées produiraient une molécule inhibitrice pendant leur croissance et que cette molécule devrait être mise en contact des graines d'orobanche avant la perception de l'inducteur par la graine pour être actif.

### **II.B.3. Effet des exsudats de spores de champignons MA sur la germination d'*O. cumana***

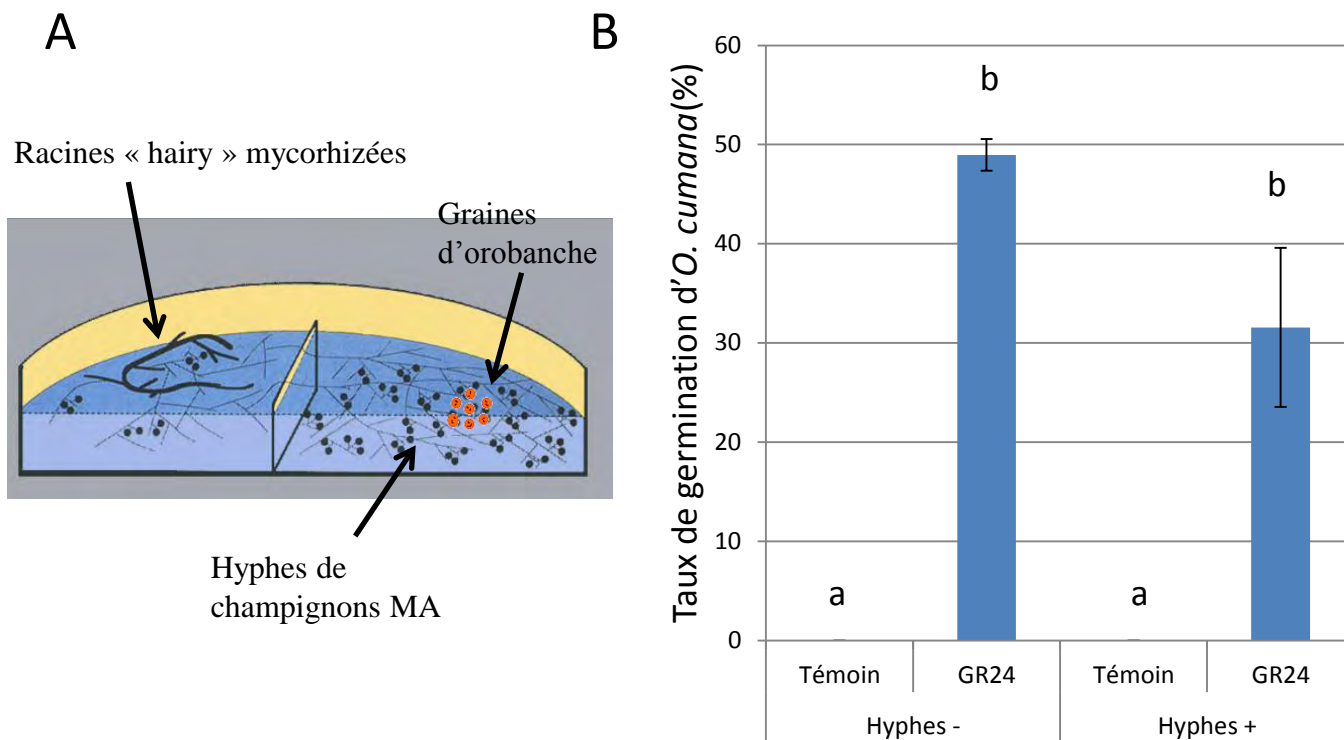
Afin de déterminer si cet effet inhibiteur est dû à la présence d'une molécule diffusible sécrétée par les spores, nous avons testé l'activité d'exsudats fongiques sur la germination d'*O. cumana*. Même s'il s'agit de biotrophes obligatoires, les spores de champignons MA peuvent germer et se développer pendant plusieurs jours en l'absence de plante hôte. En faisant germer les spores dans l'eau, on peut récupérer facilement par filtration les composés libérés par les spores dans le milieu. Les exsudats fongiques ainsi produits ont été appliqués sur les graines d'orobanche en présence ou non de GR24. On constate que l'application



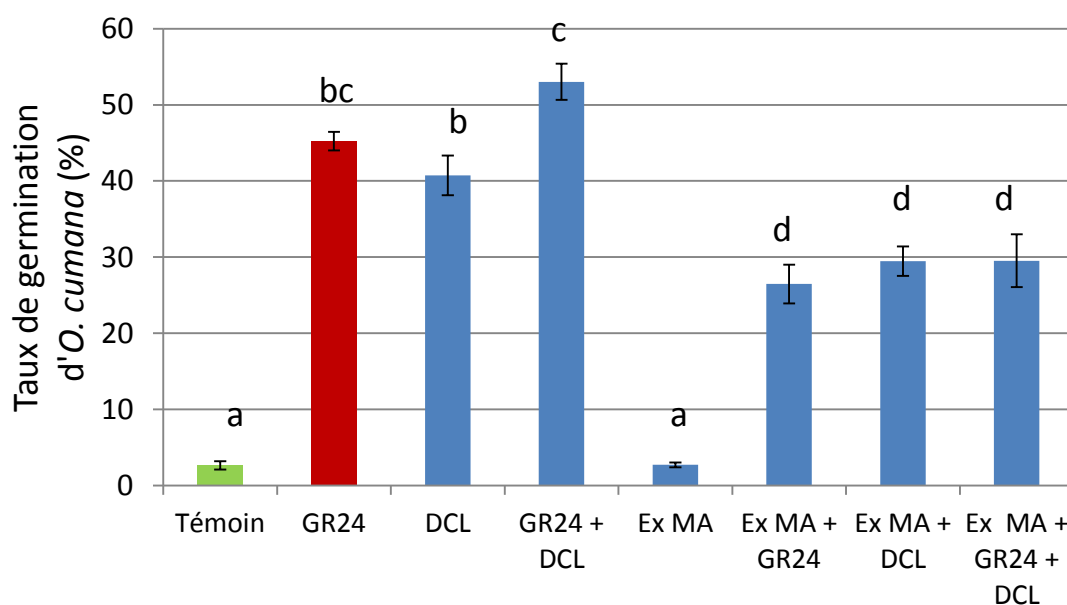
d'exsudats fongiques limite la germination des graines d'*O. cumana* (Fig.40B). Cette expérience montre que l'effet inhibiteur des champignons MA est au moins en partie lié à des composés diffusibles, et n'est pas dépendant de la présence des spores au moment du test : il ne s'agit donc pas seulement d'un effet de contact ou de l'émission de composés volatils. D'autre part, on constate que l'effet inhibiteur dépend de la dose appliquée : plus on dilue les exsudats de champignons MA et moins l'inhibition de la germination est importante. Si l'on compare l'activité de spores seules (dix spores par boîte) à l'activité des exsudats de spores 1X (équivalent à cinq cent spores par boîte), on remarque que l'activité inhibitrice est du même niveau. Les spores, malgré une « concentration » inférieure (en équivalents spores par boîte), semblent aussi actives que les exsudats. Ceci pourrait être le résultat de la sécrétion active et continue des molécules diffusibles par les spores. Quand on applique les exsudats la quantité de molécules actives ne peut que diminuer dans le temps (cette diminution est plus ou moins rapide selon la stabilité des molécules), ce qui pourrait expliquer la moindre activité des exsudats.

Différents mécanismes d'action des exsudats de champignons MA peuvent être envisagés :

- (i) Des composés présents dans les exsudats de champignons MA pourraient conduire à la dégradation des molécules inductrices (strigolactones et/ou DCL), ou former des complexes avec elles, diminuant ainsi la concentration d'inducteurs libres et actifs.
- (ii) Des composés produits par les champignons MA pourraient occuper les récepteurs des inducteurs de germination.
- (iii) Les exsudats de champignons MA pourraient bloquer des processus physiologiques associés à la germination.
- (iv) Les champignons pourraient libérer une molécule induisant la mort des graines d'orobanche. Il a été observé que certains champignons comme *Alternaria alternata* et *Fusarium spp* pouvaient sécréter des molécules induisant la nécrose des racines d'orobanche (de Zélicourt et al., 2009). On peut ainsi imaginer qu'une toxine équivalente soit produite chez les champignons MA induisant la mort des graines d'orobanche.



**Figure 42 : Effet des hyphes extra-racinaires sur la germination d'*Orobanche cumana*.** (A) Schéma du dispositif expérimental. Dans un premier compartiment se développent des racines « hairy » de carotte mycorhizées, puis on laisse le champignon MA coloniser le second compartiment. Les graines sont ensuite déposées dans le compartiment contenant les hyphes (Hyphes +), puis elles sont traitées avec du GR24. Des compartiments sans hyphes sont utilisés comme témoin. (B) Inhibition de la germination d'*O. cumana* en présence d'hyphes extra-racinaires. Hyphes - : Absence d'hyphes de champignon MA dans le compartiment contenant les graines d'orobanche. Hyphes + : Présence d'hyphes dans le compartiment destiné au traitement des graines. Témoin : 0,1% acétone. GR24 : GR24  $10^{-8}$ M. Les valeurs représentent le taux de germination moyen dans 5 échantillons d'environ 70 graines, +/- erreur standard. Les moyennes sont comparées par un test de Kruskal-Wallis. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).



**Figure 43 : Effet des exsudats de champignons MA sur la germination d'*Orobanche cumana* stimulée par différents inducteurs de la germination.** Témoin : 0,2% acétone. GR24 :  $10^{-8}$ M de GR24 dans 0,2% acétone. DCL : Déhydrocostus-lactone à  $10^{-8}$ M dans 0,2% acétone. GR24 + DCL : GR24 à  $10^{-8}$ M et DCL à  $10^{-8}$ M dans 0,2% d'acétone. Ex MA 1X équivaut aux exsudats de 500 spores dans 500  $\mu$ l. Les valeurs représentent le taux de germination moyen de 5 échantillons d'environ 100 graines, +/- erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).

Dans la suite du chapitre ces différents mécanismes pouvant interférer avec la germination des graines d'*O. cumana* seront discutés.

#### **II.B.4. Effet des hyphes extraracinaires de champignons MA sur la germination d'*O. cumana***

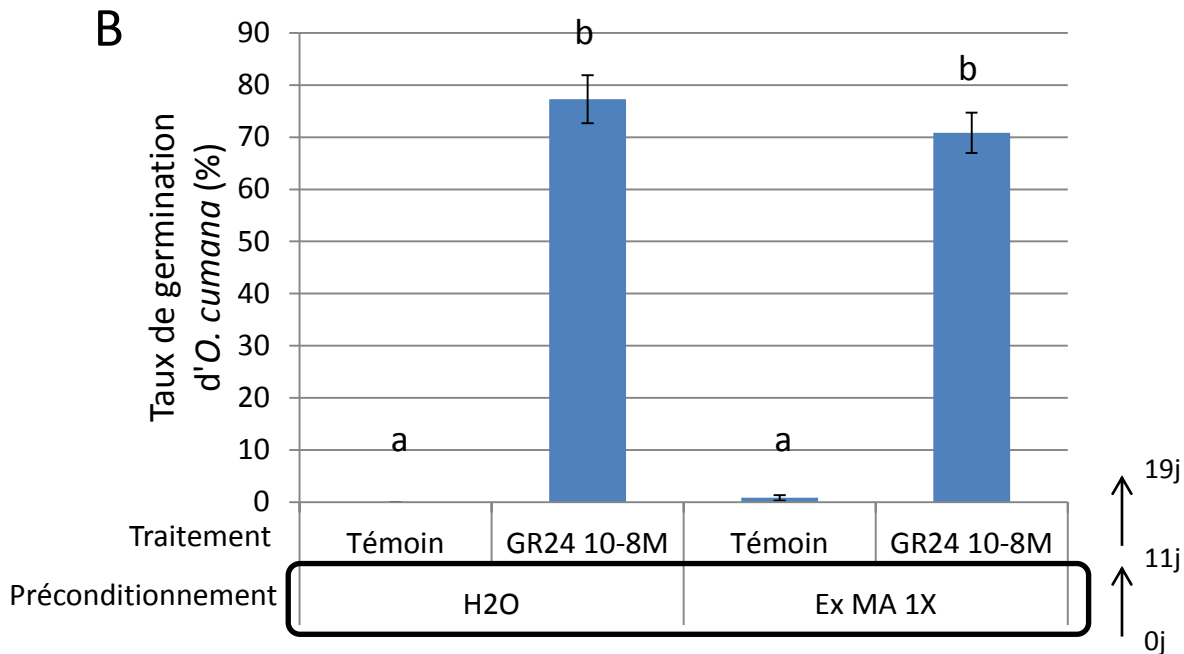
Les expériences précédentes nous ont montré que les exsudats de spores de champignons MA pouvaient réduire la germination des graines d'orobanche. Ces exsudats ont été obtenus à partir de spores cultivées seules, dans un état a-symbiotique. Nous avons voulu déterminer si des hyphes extraracinaires de ces champignons (cultivés en association avec des racines, donc dans un état symbiotique) possédaient également cette capacité.

Pour pouvoir travailler avec ces hyphes indépendamment de l'influence de la racine, nous avons utilisé un système de culture *in vitro* dans des boîtes de Petri à deux compartiments (St-Arnaud et al., 1996). Un des deux compartiments est inoculé avec des racines « hairy » de carotte mycorhizées. Les racines se développent dans ce compartiment seulement, mais après quelques semaines de culture les hyphes extraracinaires du champignon MA sont capables de coloniser le second compartiment. C'est dans ce compartiment, avec ou sans hyphes que nous avons effectué les tests de germination. On constate qu'en présence d'hyphes extraracinaires l'induction de la germination par du GR24 est moins importante qu'en absence d'hyphes (Fig.42). Ce résultat suggère que la capacité des champignons MA à réduire la germination des graines d'orobanche n'est pas spécifique aux stades présymbiotiques. Toutefois, cette expérience qui n'a pu être réalisée qu'une fois devrait être répétée afin de confirmer ce résultat.

#### **II.B.5. Effet des exsudats de champignons MA sur la germination d'*O. cumana* induite par différents stimulants**

Afin de tester si l'effet inhibiteur des exsudats des champignons MA dépend de l'inducteur de germination utilisé, nous avons comparé l'activité des exsudats fongiques en présence de différents inducteurs : le GR24, la DCL et un mélange des deux. On constate que

Traitement	Taux de viabilité (%)	
Témoin	70.9	±1.7
GR24	70.9	±1.9
Ex MA 1X	70.3	±1.5
Ex MA 1X+GR24	76.8	±0.9



**Figure 44 : Viabilité des graines d'*Orobancha cumana* suite à l'application d'exsudats de *Rhizophagus irregularis*.** (A) Estimation de la viabilité par une coloration au TTC. Les graines sont colorées à l'aide d'une solution de TTC à 1% puis examinées sous loupe binoculaire. Les graines présentant une coloration rose/rouge sont considérées viables. Les valeurs représentent la moyenne de cinq comptages d'approximativement 100 graines pour chaque traitement, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis, aucune différence significative n'est observée ( $P=0,3971$ ). (B) Test de germination d'*O. cumana* après rinçage des exsudats de *R. irregularis*. Les graines d'orobanches sont préconditionnées en présence d'eau ou d'exsudats de champignon MA (équivalent à 500 spores dans 500µl). Au bout de onze jours les graines sont rincées à l'eau afin d'éliminer les exsudats de *R. irregularis*, puis les graines sont traitées au GR24. Le taux de germination est estimé huit jours après stimulation. Les valeurs représentent la moyenne de cinq comptages d'approximativement 100 graines pour chaque traitement, +/- l'erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P<0,05$ ).

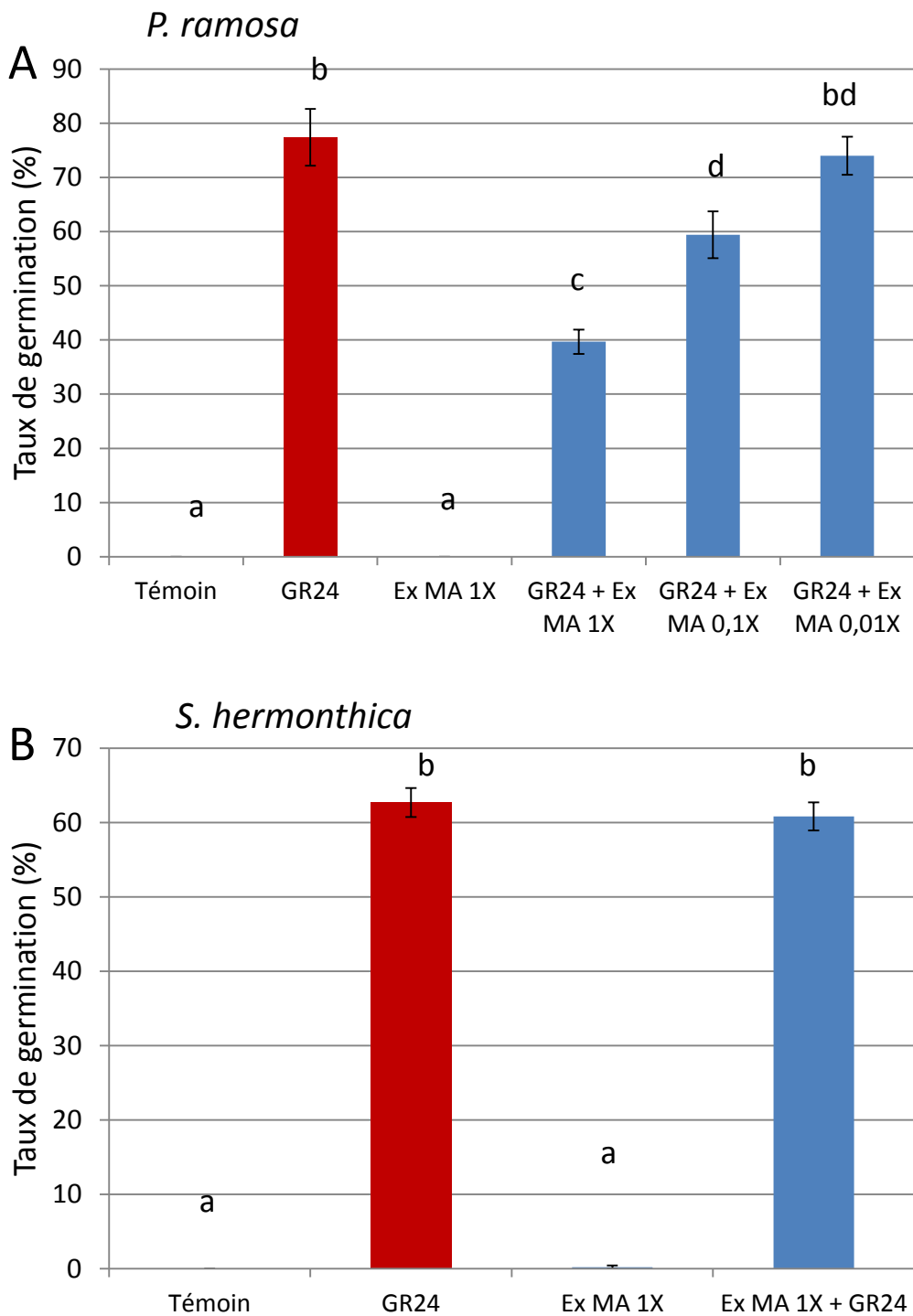
l'effet inhibiteur des exsudats de champignons MA est observé dans tous les cas (Fig.43). Il semblerait donc que l'activité inhibitrice des exsudats de champignons MA soit indépendante de l'inducteur choisi. Ces résultats nous indiquent que les exsudats fongiques affectent la germination d'*O. cumana* au niveau de mécanismes communs entre la voie d'induction de la germination induite par les strigolactones et la DCL.

#### **II.B.6. Effet des exsudats de champignons MA sur la viabilité d'*O. cumana***

Il est envisageable que les champignons MA produisent des composés toxiques pour les graines d'*O. cumana* ; le taux de germination réduit ne serait alors qu'une manifestation indirecte d'une perte de viabilité des graines. Nous avons donc voulu évaluer la viabilité des graines d'orobanche en présence d'exsudats de *R. irregularis*. Pour cela, des graines d'*O. cumana* traitées avec des exsudats de ce champignon (avec et sans GR24) ont été colorées au 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC). Cette molécule est un indicateur indirect de viabilité : en présence de NADH le TTC, de couleur blanche, est réduit en formazan, de couleur rouge/rose, indiquant ainsi la viabilité de la graine (Thorogood et al., 2009). Le NADH intervient dans les réactions d'oxydoréduction au sein de la cellule. Il ne peut être stocké et doit être renouvelé constamment grâce notamment à la glycolyse et au cycle de Krebs. La présence de NADH dans une cellule est donc le signe d'une cellule vivante.

On constate par la méthode de coloration au TTC que les exsudats de champignons MA ne semblent pas diminuer la viabilité des graines d'*O. cumana* (Fig.44A). Nous avons ensuite cherché à confirmer ce résultat en utilisant une autre approche. Le principe ici est de traiter des graines d'orobanche par des exsudats de champignons MA, puis d'éliminer ces derniers par rinçage et de procéder à un test de germination. Dans le cas où les exsudats affecteraient la viabilité des graines d'orobanche, on s'attend à observer une baisse du taux de germination par rapport au témoin non traité par les exsudats. Dans le cas contraire, si les exsudats agissent au niveau de la germination elle-même et non au niveau de la viabilité des graines, le taux de germination ne sera pas diminué.

Des graines d'orobanche ont été conditionnées soit dans de l'eau soit dans des exsudats de champignons MA. Puis elles ont été rincées abondamment à l'eau et enfin traitées au GR24. On observe que le préconditionnement des graines dans les exsudats de champignons



**Figure 45 : Germination de *Phelipanche ramosa* et *Striga hermonthica* en présence d'exsudats de champignon MA.** (A) Effet de différentes concentrations d'exsudats de *Rhizophagus irregularis* sur la germination de graines de *P. ramosa* stimulées par du GR24 à  $10^{-8}$ M. (B) Germination de graines de *S. hermonthica* en présence ou non d'exsudats de champignon MA et de GR24 à  $10^{-8}$ M. Témoin : 0,1% acétone. Ex MA 1X équivaut aux exsudats de 500 spores dans 500  $\mu$ l. Les valeurs représentent le taux de germination moyen de 5 échantillons d'environ 100 graines, +/- erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).



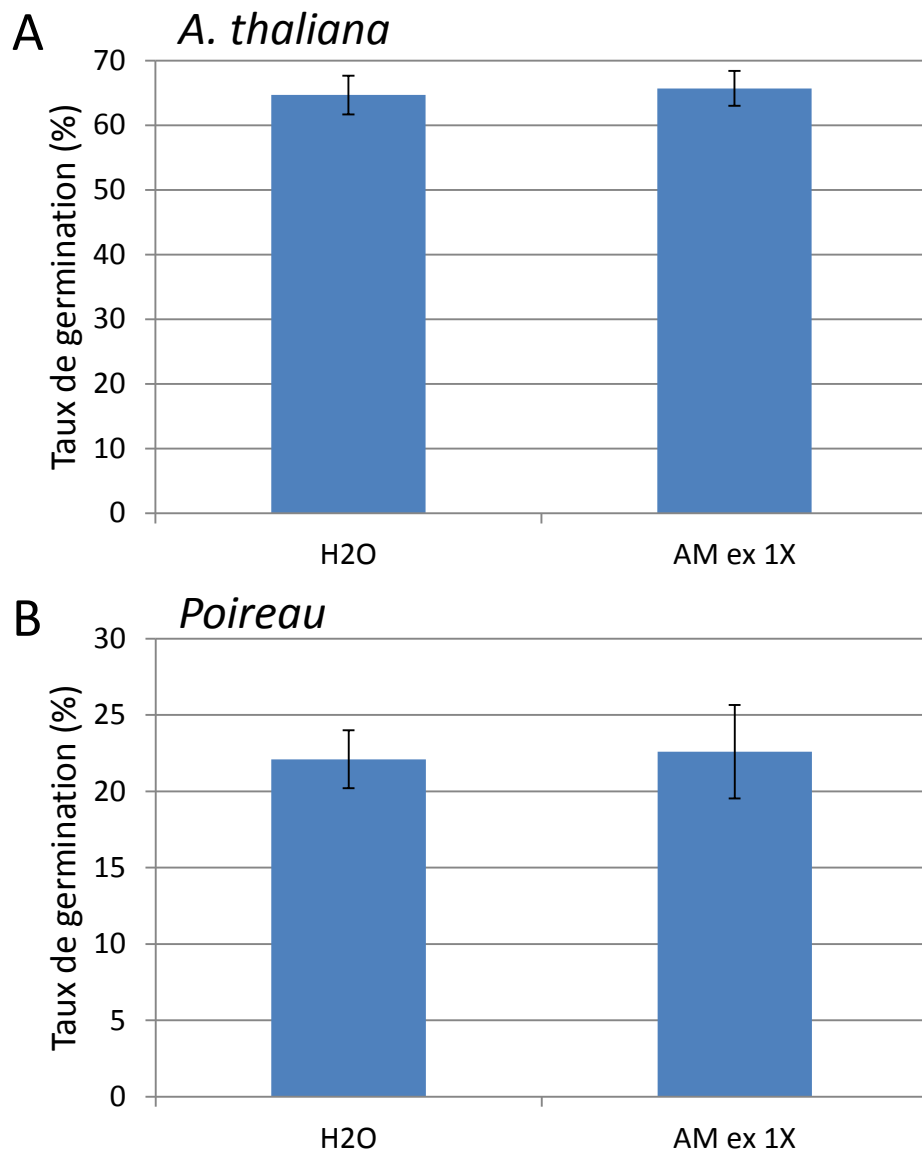
MA n'affecte pas la germination après rinçage (Fig. 44B). Ce résultat confirme ceux obtenus avec la coloration au TTC. Il semblerait donc que l'effet inhibiteur des champignons MA ne soit pas dû à un effet toxique sur la graine.

### **II.B.7. Effet des exsudats de champignons MA sur la germination des graines de plusieurs autres espèces de plante**

#### **II.B.7.a. Autres espèces de plantes parasites**

Nous avons voulu savoir si l'activité inhibitrice des champignons MA sur la germination est spécifique à *O. cumana* ou si on peut l'observer sur d'autres plantes parasites. Pour cela nous avons appliqué des exsudats de spores de champignons MA sur des graines de *P. ramosa* et de *S. hermonthica*. Ces deux espèces appartiennent à l'ordre des *Lamiales* mais sont phylogénétiquement éloignées. On remarque que l'application d'exsudats de champignons MA permet d'inhiber la germination de *P. ramosa* de manière dose dépendante, comme observé avec *O. cumana* (Fig.45A). En revanche, la présence d'exsudats fongiques n'affecte pas la germination des graines de *S. hermonthica* (Fig.45B). Ces résultats pourraient indiquer que les exsudats fongiques affecteraient seulement les orobanches et pas les striga. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait bien sûr tester un plus grand nombre d'espèces d'orobanche et de striga. Par ailleurs, comme *O. cumana*, *P. ramosa* peut germer en présence d'autres inducteurs que les strigolactones. Comme on l'a fait pour la DCL avec *O. cumana*, il serait intéressant de tester l'activité de ces exsudats fongiques en présence des isothiocyanates, produit par *B. napus*, permettant d'induire la germination de *P. ramosa* (Auger et al., 2012).

L'absence d'effet des exsudats de champignons MA sur les graines de *S. hermonthica* tend à éliminer l'hypothèse selon laquelle l'effet inhibiteur des exsudats de champignons MA pourrait être due à la séquestration ou la dégradation des inducteurs de la germination, à moins que les graines de *S. hermonthica* ne soient plus sensibles au GR24 que les graines d'*O. cumana* et *P. ramosa* (dans ce cas, il resterait après action des exsudats suffisamment de GR24 actif pour faire germer *S. hermonthica*, mais pas les deux autres espèces). Pour aller plus loin, il serait intéressant de réaliser le même test de germination, avec *S. hermonthica*, mais avec des concentrations moins importantes en GR24. Une autre façon d'aborder cette



**Figure 46 : Effet des exsudats du champignon MA *Rhizophagus irregularis* sur la germination de graines d'*Arabidopsis thaliana* et de poireau.** Les exsudats de champignon MA, 1 ml à une concentration de 1 000 spores par ml, sont appliqués sur les graines d'*A. thaliana* (A) et de poireaux (B), puis le taux de germination est déterminé respectivement deux jours et dix jours après application des exsudats.

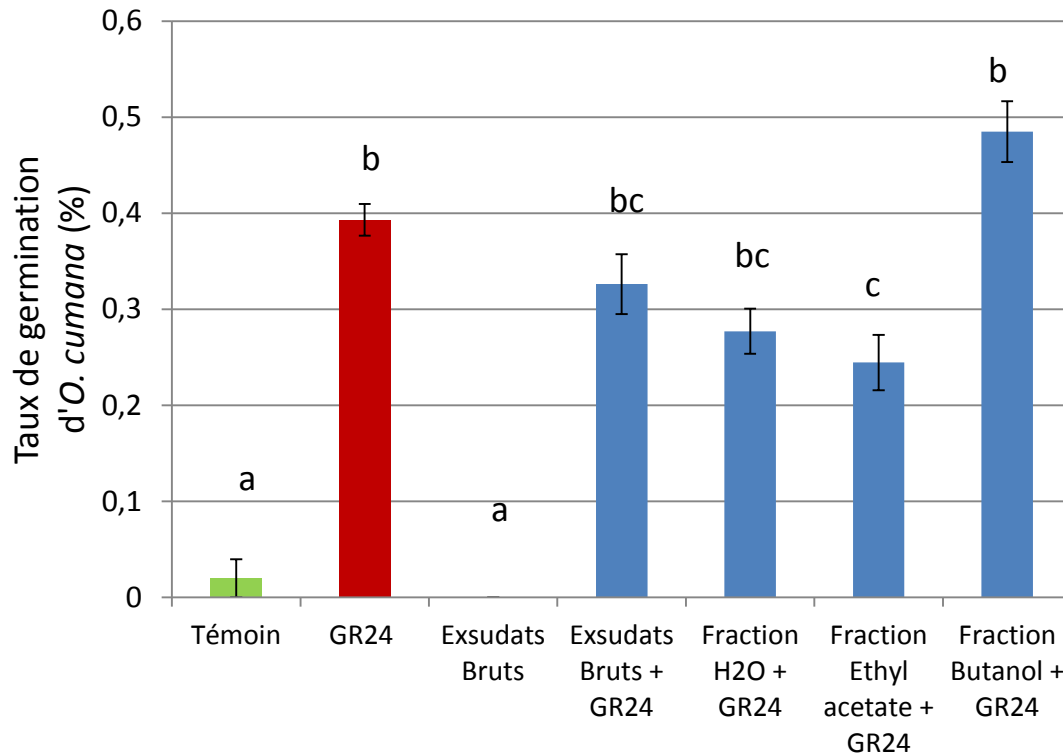
question serait de mesurer si les strigolactones et la DCL peuvent être dégradées en présence d'exsudats de champignons MA. On pourrait faire ceci en comparant la demi-vie des strigolactones dans de l'eau et en présence d'exsudats de champignons MA.

#### II.B.7.b. Graines de plantes non parasites

Nous avons également recherché si les exsudats de champignons MA pouvaient affecter la germination de graines de plantes non parasites. Nous avons choisi *Arabidopsis thaliana* et le poireau, des espèces respectivement dicotylédone et monocotylédone qui produisent des graines de très petite taille. Les graines ont été traitées avec des exsudats de spores de *R. irregularis*. On observe que les exsudats de champignon MA n'affectent pas la germination de ces graines non parasites (Fig.46). Il aurait été surprenant d'observer un effet négatif des exsudats de champignons MA sur la germination de ce types de graines, car la majorité des végétaux vivent en association avec les champignons MA. Il semble donc que les exsudats de champignons MA perturbent un processus spécifique à la germination des graines d'orobanche. Les exsudats de champignons MA peuvent affecter soit la perception des molécules inductrices de la germination (en occupant le récepteur de la DCL et des strigolactones), soit un processus physiologique spécifique à la germination des graines d'orobanche.

#### II.B.8. Vers la caractérisation des composés inhibiteurs

La caractérisation chimique des inhibiteurs mycorhiziens permettraient de préciser les mécanismes d'action de ces molécules et potentiellement, de développer de nouveaux moyens de lutte contre l'orobanche. Dans une première étape, en vue de la caractérisation des molécules inhibitrices, nous avons fractionné des exsudats de spores de *R. irregularis* à l'aide de différents solvants. A partir des exsudats obtenus dans l'eau, une première extraction à l'acétate d'éthyle est réalisée. La phase aqueuse subit ensuite une seconde extraction au butanol. On obtient ainsi trois phases de polarité décroissante : la phase aqueuse, la phase butanol et la phase acétate d'éthyle. Ces différentes phases sont séchées puis reprises dans



**Figure 47 : Germination d'*Orobanchaceae cumana* en présence de différentes fractions d'exsudats de *R. irregularis*.** Les exsudats bruts de spores de *R. irregularis* sont successivement extraits à l'acétate d'éthyle puis au butanol. Les différentes fractions sont ensuite séchées puis reprises dans 0,2% d'acétone pour être appliquées sur les graines d'*O. cumana*. Témoin : 0,2% acétone. GR24 : GR24 à  $10^{-8}$ M dans 0,2% d'acétone. Les valeurs représentent le taux de germination moyen de 5 échantillons d'environ 100 graines, +/- erreur standard. Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ).

0,2% d'acétone afin d'être appliquées sur des graines d'*O. cumana* pour des tests de germination. Cette expérience, qui consomme de grandes quantités de spores, a été réalisée plusieurs fois. Différents problèmes techniques se sont présentés, qui ont gêné l'interprétation des résultats et nous empêchent aujourd'hui de dégager une conclusion tout-à-fait certaine. Cependant, l'observation la plus fréquente a été que la fraction acétate d'éthyle exerçait un effet inhibiteur plus important que les exsudats bruts, la fraction aqueuse et la fraction butanol (Fig.47). Ce résultat suggère que les molécules affectant la germination des graines d'orobanche seraient de nature hydrophobe. Des molécules hydrophobes inhibant la germination des graines de plantes parasites ont déjà été mises en évidence chez différents micro-organismes (Miché et al., 2000 ; Andolfi et al., 2005). Les strigolactones et la DCL étant des molécules plutôt hydrophobes, les molécules fongiques pourraient interagir avec ces inducteurs de la germination, en milieu liquide, en les rendant inaccessibles pour les graines limitant ainsi leur germination.

Je n'ai pas eu le temps pendant ma thèse de pousser plus loin la caractérisation des molécules inhibitrices. Dans l'avenir on peut envisager de poursuivre ce volet de l'étude par une caractérisation plus précise : taille des molécules actives, comportement chromatographique, stabilité, etc. Pour ensuite identifier les molécules inhibitrices deux types d'approches pourraient être mises en œuvre :

(i) Approche avec *a priori* : dans ce cas on recherche dans les exsudats de champignons MA des molécules candidates, déjà connues (ou soupçonnées) pour leurs effets inhibiteurs sur la germination des graines d'orobanche. Par exemple, on pourrait rechercher la verrucarine, une molécule inhibitrice de la germination de *P. ramosa* produite par un autre champignon, *Myrothecium verrucaria* (Andolfi et al., 2005). L'avantage d'une telle approche est qu'elle peut être rapide. Elle est en revanche assez risquée et ne permet pas d'aboutir à l'identification de nouvelles molécules actives.

(ii) Approche sans *a priori* : ici on cherche à identifier les molécules inhibitrices sans faire d'hypothèses préalables sur leur nature. Le principe est de fractionner les exsudats de plus en plus finement, et d'identifier au fur et à mesure les fractions actives. L'objectif est d'obtenir des fractions suffisamment pures pour permettre l'identification des molécules qui la composent. Cette approche permet d'évaluer plus précisément le niveau d'activité biologique des molécules inhibitrices. Elle peut permettre d'identifier des molécules soit totalement inconnues, soit dont l'activité sur



les graines d'orobanche n'a jamais été décrite. Elle est toutefois assez lourde à mettre en œuvre, et il n'est pas toujours possible de conserver suffisamment de molécules actives au cours de la purification pour aller jusqu'à l'identification.

### III. Conclusion

Dans le premier chapitre nous avons montré que la mycorhization du tournesol permet de réduire le développement d'*O. cumana*. Ce sont les phases précoces de l'interaction, la germination et/ou l'attachement sur la racine, qui semblent les plus affectées par la mycorhization. Dans le chapitre II, nous montrons que la mycorhization du tournesol réduit le pouvoir germinatif de ses exsudats racinaires. Ce résultat est cohérent avec les observations faites au chapitre I. Il est également en accord avec des travaux antérieurs réalisés par d'autres auteurs (Lendzemo and Kuyper, 2001 ; Lendzemo et al., 2007 ; Fernández-Aparicio et al., 2010). Ces auteurs ont proposé, sans pouvoir fournir de données analytiques, que la production réduite d'inducteurs de la germination (notamment les strigolactones) soit à l'origine de la meilleure protection des plants mycorhizés contre les plantes parasites. A l'aide d'un test biologique très sensible sur la ramification des hyphes de *G. rosea* nos analyses de strigolactones, certes indirectes, suggèrent que les plants mycorhizés sécrètent moins de strigolactones que les plants non mycorhizés. Jusqu'à ce point de l'étude, nos résultats sont donc en accord avec l'hypothèse proposée par les auteurs mentionnés ci-dessus.

Néanmoins, lorsque l'on complémente les exsudats racinaires de plants mycorhizés avec du GR24, on ne restaure pas le pouvoir germinatif de ces exsudats. Par conséquent, une baisse de production des strigolactones ne semble pas suffisante à elle seule pour expliquer la baisse d'activité inductrice de germination des exsudats de racines mycorhizées. Il semble en effet que les plants de tournesol mycorhizés produisent des composés inhibiteurs de la germination d'*O. cumana*. Cette découverte nous met sur la voie d'un nouveau mécanisme de protection des plantes hôtes contre les plantes parasites. Il serait intéressant de déterminer si la baisse du pouvoir germinatif des exsudats de plants de pois mycorhizés observées par Fernández-Aparicio et al (2010) pourrait être en partie due à la présence d'inhibiteurs similaires à ceux que nous avons mis en évidence. De plus, il serait intéressant de vérifier que





l'on peut induire une protection à *O. cumana* seulement en rajoutant des exsudats de champignons MA sur des racines de tournesol.

Nous avons montré que les champignons MA sont capables de produire un ou des composé(s) diffusible(s) affectant la germination des graines d'orobanche. Il est néanmoins difficile d'établir clairement si les molécules inhibitrices présentes dans les exsudats racinaires de plants de tournesol mycorhizés sont les mêmes que celles présentes dans les exsudats purs de champignons MA. En effet, les plants de tournesol seuls sont capables de produire des molécules affectant la germination des graines d'orobanche (Serghini et al., 2001). Il serait donc intéressant de réaliser des études complémentaires afin de déterminer si les racines mycorhizées secrètent ces molécules en plus grande quantité. Néanmoins, il sera difficile de séparer les molécules sécrétées par la racine mycorhizée et les molécules libérées par le champignon MA. C'est, entre autres, pour cela qu'il faudrait identifier les molécules inhibitrices sécrétées par le champignon pour voir si elles sont présentes dans les exsudats racinaires de plants de tournesol mycorhizés.

Nous avons testé l'activité de deux champignons MA sur la germination d'*O. cumana*, et ces deux champignons semblent avoir un pouvoir inhibiteur équivalent sur la germination de l'orobanche. Or, on a observé au chapitre I que les plants mycorhizés avec *G. rosea* sont beaucoup moins infectés par *O. cumana* que les plants mycorhizés par *R. irregularis*. Il semblerait donc que dans ce cas le simple effet inhibiteur du champignon MA sur la germination des graines d'orobanche ne puisse expliquer totalement le gain de protection. Le niveau de contrôle de l'infection que l'on observe avec *R. irregularis* pourrait correspondre à l'effet direct du champignon MA sur l'orobanche et le niveau de contrôle induit par *G. rosea* pourrait correspondre à l'effet direct du champignon MA sur la germination de l'orobanche additionné à un autre mécanisme spécifiquement induit par ce champignon. Une autre explication possible serait liée au développement de ces deux champignons : les spores de *G. rosea* produisent des hyphes germinatif de plus grande longueur que *R. irregularis* (Scervino et al., 2009). Il se pourrait donc que le mycélium de *G. rosea* en colonisant un plus grand volume de sol inhibe la germination d'un plus grand nombre de graines d'*O. cumana*, induisant ainsi une meilleure protection qu'avec *R. irregularis*.

Pour aller plus loin dans la compréhension des différences observées entre les effets protecteurs de ces deux champignons, il serait intéressant de comparer l'activité des exsudats racinaires de plants de tournesol mycorhizés par *R. irregularis* ou par *G. rosea*. Puis dans un



second temps : (i) si les exsudats de plants mycorhizés par *G. rosea* induisent une moindre germination que les exsudats de plants mycorhizés par *R. irregularis*, il faudrait rechercher s'ils produisent moins d'inducteurs ou si ils produisent plus d'inhibiteurs de la germination d'*O. cumana*. (ii) si les exsudats ont un pouvoir germinatif équivalent, il faudrait vérifier que des mécanismes de défense particuliers sont activés lors de la mycorhization par *G. rosea* et pas par *R. irregularis*.

Par ailleurs, on remarque que la baisse du niveau d'infection induite par *R. irregularis* est variable d'une expérience à une autre (Fig.28). Si on estime qu'elle est le résultat d'un effet direct du champignon MA sur la germination, la physiologie du champignon ainsi que les conditions de température et d'hygrométrie au moment du préconditionnement pourraient influencer le niveau de protection. En effet, nous avons observé que le champignon doit être actif afin de pouvoir sécréter ses inhibiteurs (Fig.41). Il se pourrait donc, si les conditions ne sont pas optimales au moment de l'inoculation avec le champignon MA, que ce dernier ne produise pas toujours une quantité suffisante d'inhibiteurs. Toujours dans l'idée d'examiner si l'effet inhibiteur des exsudats de champignons peut rendre compte de la meilleure protection des plants mycorhizés, on peut faire la remarque suivante : lors des tests de germination *in vitro*, les exsudats racinaires de plants mycorhizés réduisent le taux de germination de 30 à 40% par rapport aux exsudats de plants non mycorhizés. Or au niveau de l'infection des plants de tournesol on observe en moyenne seulement 20% de tubercules en moins. Pour expliquer cette différence, il faut garder en mémoire que l'on inocule plus de mille graines d'orobanche par pot et que l'on observe en moyenne seulement quinze à trente tubercules par pot. Si on estime que le taux de germination en pot est de 30% (taux minimum de germination d'*O. cumana* observé dans les tests *in vitro*, cf Fig.32), alors environ trois cent graines germent. Le nombre de graines germées, indépendamment de la présence de spores de champignon MA, reste assez important par rapport au nombre final de tubercules. L'éloignement des graines germées des racines pourrait expliquer en partie le faible taux de formation de tubercules. Par ailleurs, il pourrait exister, en plus de la germination, d'autres étapes limitantes dans la mise en place de l'interaction tournesol/orobanche. Ces étapes ne seront pas nécessairement affectées par la présence de champignons MA.

La mycorhization pourrait affecter d'autres stades précoces du développement de l'orobanche, et notamment l'attachement à la racine. La culture en pot ne se prête pas bien à la détermination des taux de germination et d'attachement des orobanches. Il est en effet



impossible de récolter en fin de culture la totalité des graines et d'estimer le taux de germination. Pour examiner la fréquence d'attachement, il faudrait observer la totalité du système racinaire sous loupe binoculaire, ce qui prendrait énormément de temps. Toutefois, il existe des méthodes alternatives qui permettent de suivre le processus d'infection par l'orobanche. Ces techniques utilisent des supports partiellement transparents et présentent l'avantage de laisser pousser le système racinaire dans seulement deux dimensions, ce qui permet de suivre plus facilement l'évolution de l'infection. Dans le troisième chapitre, nous allons évaluer et développer de telles méthodes pour l'étude de l'interaction tournesol/orobanche/champignons MA.



4 semaines



5 semaines

**Figure 48 : Photographie de plants de tournesol mycorhizés en rhyzotron.** Les plants sont inoculés avec 500 spores de *R. irregularis* par rhyzotron et fertilisés avec une solution nutritive pauvre en phosphate. Après cinq semaines on observe des signes de dépérissement des plantes.

## Chapitre III : Etude des étapes précoces de l'interaction tournesol/orobanche sur racines « hairy » de tournesol

---

### I. Du rhyzotron aux racines « hairy »

Dans les chapitres précédents nous avons montré que la mycorhization avait un effet négatif sur les étapes précoces de l'interaction entre les racines de tournesol et l'orobanche. Nous avons notamment montré que les exsudats racinaires de plants de tournesol mycorhizés induisaient moins fortement la germination des graines d'*O. cumana*. Afin de confirmer l'effet de la mycorhization sur la germination de l'orobanche mais surtout afin d'observer un éventuel effet de la mycorhization sur l'attachement des orobanches à la racine, nous avons recherché une méthode qui permette de suivre l'évolution de l'interaction parasitaire au cours du temps sans avoir à interrompre l'expérience.

Différentes méthodes ont été mises au point dans d'autres laboratoires pour observer le déroulement de l'interaction plante/orobanche, en utilisant des dispositifs partiellement transparents. Deux de ces méthodes sont couramment employées : (i) la culture dans des poches en polyéthylène (Goldwasser et al., 2000); et (ii) l'utilisation d'un rhyzotron (décrite dans le chapitre II) (Labrousse et al., 2004). Nous avons choisi d'évaluer la méthode en rhyzotron, car elle nous semble plus appropriée pour la culture du tournesol. Nous avons donc réalisé des expériences préliminaires afin d'examiner la mise en place de la symbiose MA en rhyzotron. De jeunes plantules de tournesol sont mises en culture dans le rhyzotron puis elles sont inoculées avec des spores de *R. irregularis*. Le taux de mycorhization est évalué au bout de quatre et cinq semaines. On observe un taux de colonisation du système racinaire de 15% au bout de cinq semaines. Ce taux de mycorhization est assez faible si on le compare aux expériences réalisées en pot, où sur une période équivalente on observe un taux de mycorhization d'environ 50%. Ce système ne semble donc pas adapté pour un développement optimal de la symbiose MA. En outre, on observe une dégénérescence des feuilles et une très faible croissance racinaire chez les plantes mycorhizées (Fig.48). Dans cette expérience nous n'avons pas de témoin non mycorhizé, cependant dans les expériences menées précédemment en rhyzotron (cf chapitre II, effet de la nutrition phosphatée) nous n'avons pas observé de tels problèmes de développement racinaire. Une explication possible est que dans la mesure où la

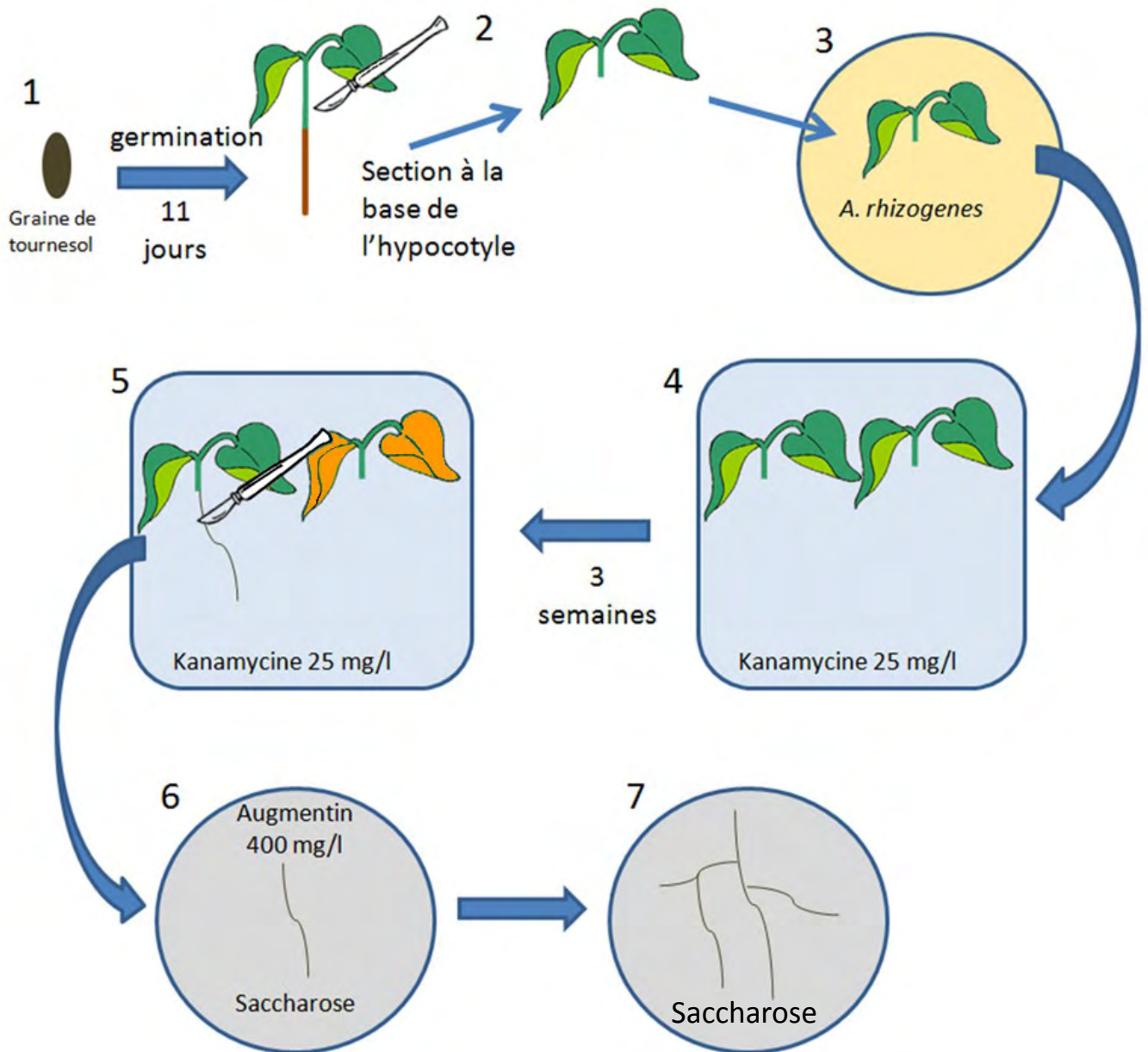




plante doit détourner une part de ses photoassimilats pour le développement du champignon MA cette « perte » de carbone doit être compensée par un surcroît de photosynthèse (Bago et al., 2000). Or, il est vraisemblable que dans nos conditions la photosynthèse n'ait pas été optimum. La quantité d'énergie dépensée par la plante pour fournir du carbone au champignon a dû être supérieure au gain apporté par la mycorhization. Du fait de ces effets négatifs du champignon MA sur le développement du tournesol nous avons choisi d'exclure cette méthode pour étudier l'interaction triple.

Nous avons donc essayé de mettre au point une méthode de culture pour laquelle la mycorhization des racines serait aisément réalisable et non néfaste pour l'hôte. Plusieurs systèmes de culture de plantes entières faisant intervenir des méthodes *in vitro* ont été mis au point permettant d'établir une association entre racines et champignons MA. Parmi ces méthodes il existe des systèmes semi-*in vitro*, où la partie racinaire pousse en conditions stériles et où la partie aérienne se développe à l'air libre. Cette technique est idéale pour la culture de petites plantes, dont le diamètre de la tige ne va pas trop augmenter au cours du temps. Toutefois, cette méthode en semble pas adapté à la culture du tournesol. En effet, le diamètre de la tige de plant de tournesol augmente rapidement pendant les premières semaines de culture et il nous semblait difficile d'adapter ce système pour à la fois permettre le bon développement de la tige et conserver le compartiment racinaire stérile. Il existe aussi des systèmes où la plante se développe entièrement *in-vitro* et peut être mycorhizée (Voets et al., 2005). Certains de ces modèles de culture *in vitro* ont été utilisés pour l'étude d'interactions hôte/pathogène (Wu et al., 2004 ; Koffi et al., 2012). De nouveau ces systèmes sont très bien adaptés pour la culture de petites plantes. Le tournesol ayant un développement aérien et racinaire important, ces systèmes nous semble inadaptés à la culture du tournesol.

Pour nous affranchir des problèmes liés à la croissance très rapide du tournesol, nous avons considéré l'utilisation d'un système basé sur la culture de racines seules. Bécard et Fortin (1988) ont montré qu'il est possible de mycorhizer des racines « hairy » de carotte, sur un milieu de culture gélosé. Nous avons donc voulu tester si ce système pourrait permettre la mise en place de l'interaction triple tournesol/orobanche/mycorhize. Dans un premier temps nous avons produit des racines « hairy » de tournesol et dans un second temps nous avons mis au point une méthode de culture qui permette une infection de ces racines par l'orobanche. Malheureusement nous avons manqué de temps pour réaliser des études d'interactiontriple.



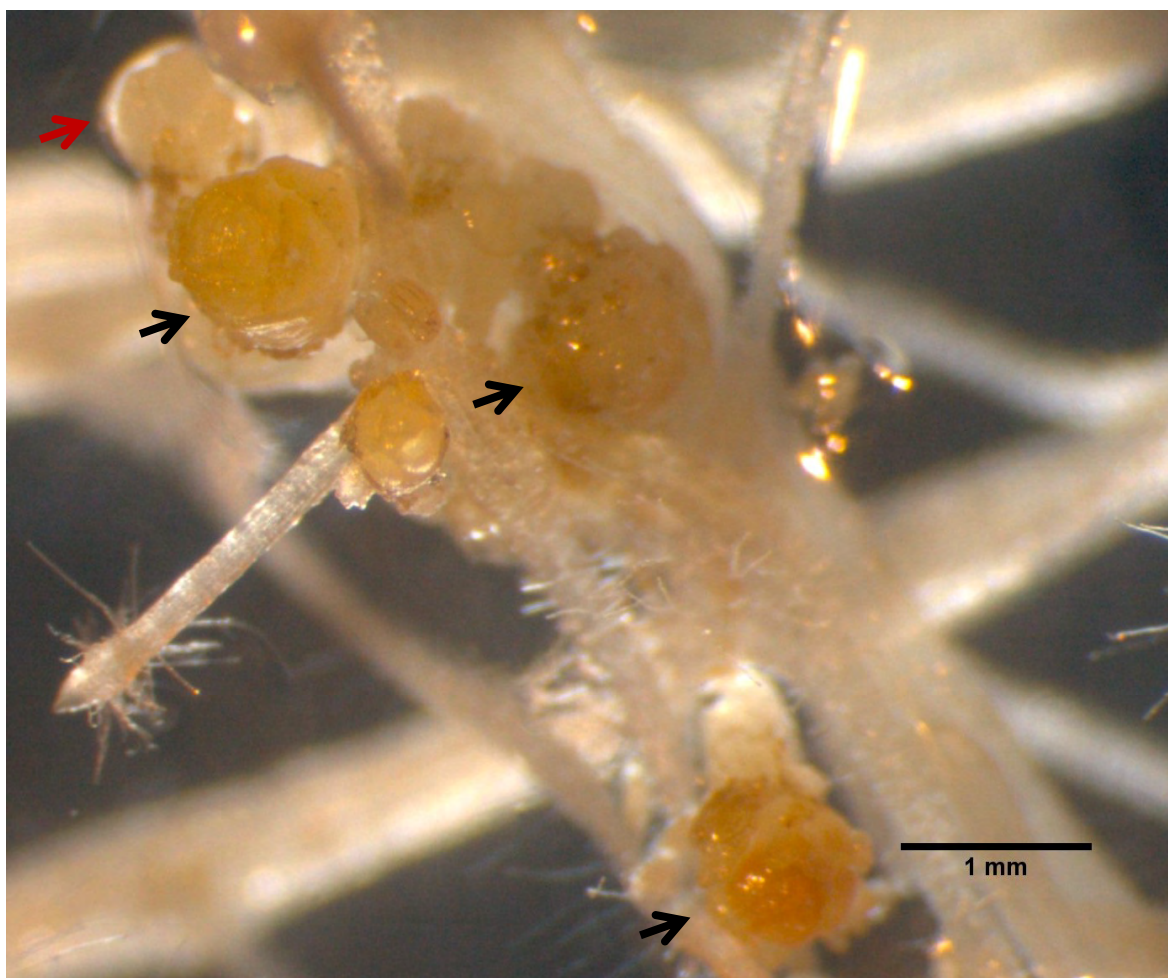
**Figure 49 : Production de racines « hairy » de tournesol par *Agrobacterium rhizogenes*.** (1) Des graines de tournesol sont stérilisées en surface puis mises à germer *in vitro* et cultivées pendant 11 jours. (2) L'hypocotyle des jeunes plantules est sectionné. (3) La base de l'hypocotyle est mise en contact avec *A. rhizogenes*. (4) Les plantules ainsi traitées sont placées sur un milieu contenant de la kanamycine. (5) Après 3 semaines sur ce milieu les plantules qui portent des racines transformées se développent, les autres se nécrosent. (6) Les racines transformées sont séparées du reste de la plante puis elles sont déposées sur un milieu M contenant de l'Augmentin, afin d'éliminer *A. rhizogenes*. (7) Les racines ainsi décontaminées se multiplient sur milieu M avec saccharose.

## II. Production des racines « hairy » de tournesol

Comme nous ne disposions pas de racines « hairy » de tournesol nous avons entrepris de transformer des plants de tournesol avec la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*. Ne disposant pas de protocole spécifique pour la production de racines « hairy » de tournesol, nous avons adapté le protocole de transformation décrit par Boisson-Dernier et al (2001) pour *Medicago truncatula*. Cette méthode peut être résumée comme suit. Les graines sont mises à germer pendant cinq jours ; pendant cette période la radicule sort de la graine. L'extrémité de la radicule est ensuite sectionnée puis *A. rhizogenes* est inoculé sur la blessure à partir d'une colonie bactérienne cultivée sur milieu solide (la souche utilisée contient un gène de résistance à la kanamycine et un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente, la DsRED, sous le contrôle d'un promoteur constitutif). Enfin, la plantule est déposée sur un milieu contenant de la kanamycine afin de sélectionner les racines transformées.

Au bout d'une semaine, des racines se sont développées de façon très importante. Après la recherche de la présence de la DsRED sous loupe à épifluorescence et le repiquage de nombreuses racines, nous avons constaté qu'aucune de ces racines n'était transformée. Il est possible que le fait d'avoir sectionné l'apex racinaire ait favorisé le développement naturel de nouvelles racines non transformées.

Afin de résoudre ce problème nous avons ensuite sectionné les jeunes plantules de tournesol au niveau de l'hypocotyle. L'hypocotyle est la partie de la jeune plantule située juste en dessous des cotylédons. Cette partie de la plante est différenciée en tige aérienne et ne devrait donc pas générer spontanément de nouvelles racines. Avec cette nouvelle méthode, les graines de tournesol germent et poussent préalablement pendant onze jours pour permettre le développement des cotylédons (Fig.49.1). Ensuite, l'hypocotyle est sectionné en dessous des cotylédons (Fig.49.2) et la partie racinaire est éliminée, puis la région sectionnée est inoculée avec *A. rhizogenes* comme précédemment (Fig.49.3). La suite du protocole est identique à celui décrit par Boisson-Dernier et al (2001) (Fig.49.4). Au bout de trois semaines de culture, on observe le développement de racines seulement sur quelques plantules. Les plantules qui ne présentent aucune racine ont commencé à se nécroser, alors que celles sur lesquelles des racines sont apparues restent vertes (Fig.49.5). Les racines qui se sont développées sont séparées des plantules puis déposées sur un milieu M contenant un nouvel antibiotique pour éliminer les agrobactéries restantes (Fig.49.6). Plusieurs repiquages sur ce milieu permettent



**Figure 50 : Aspect des orobanches sur milieu contenant du saccharose.** Sur un milieu contenant du saccharose les orobanches forment des organes globulaires sans se fixer à la racine. La photographie a été prise 45 jours après inoculation. Les flèches noires indiquent la présence d'organes globulaires ressemblant à des pseudo-tubercules. La flèche rouge indique un organe globulaire ressemblant à un cal.

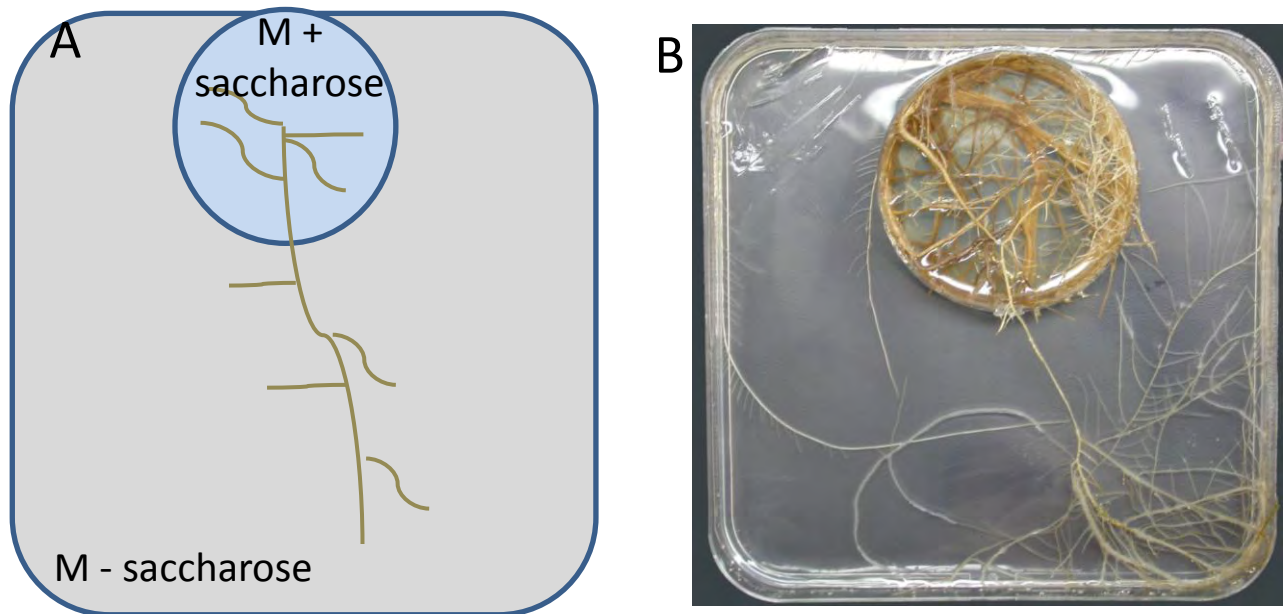
une bonne décontamination des racines. Les racines qui se développent le mieux sont ensuite multipliées par repiquages successifs (Fig.49.7). En utilisant ce protocole nous avons obtenu quatre clones de racines « hairy » de tournesol, que nous avons dénommés LT1 à LT4. Pour la suite des expériences nous présenterons essentiellement les résultats obtenus avec les clones LT1 et LT3, qui se sont développées plus rapidement que les deux autres.

### **III. Infection des racines « hairy » de tournesol par *O. cumana*.**

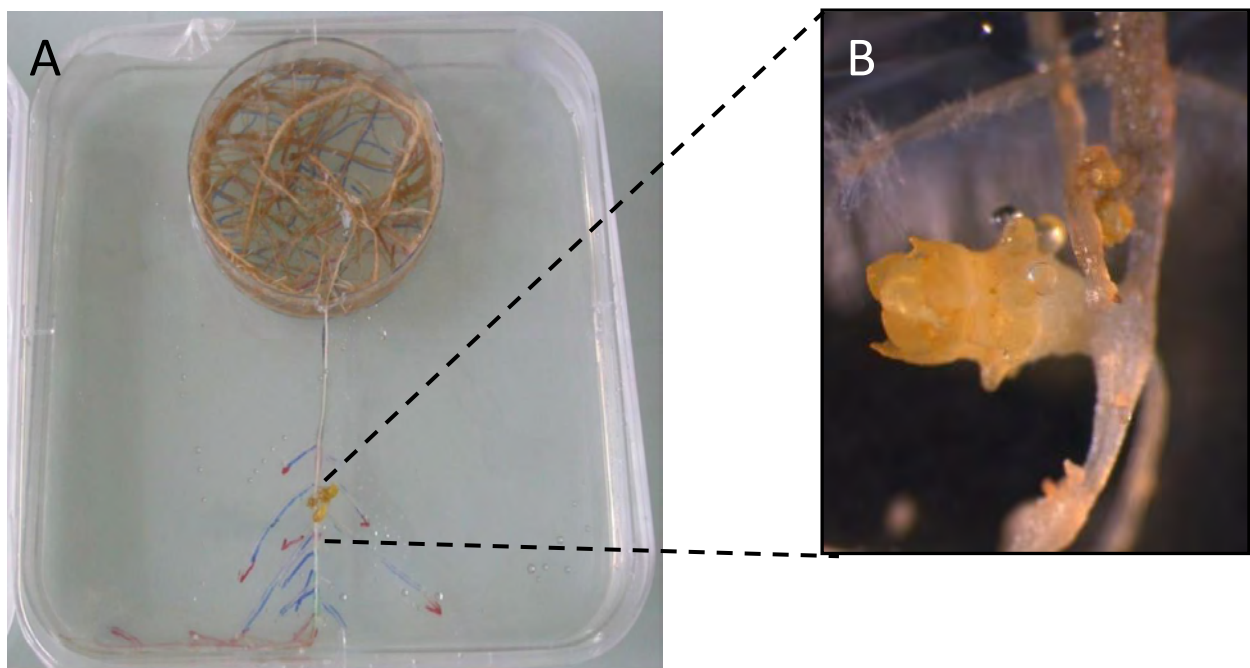
#### **III.A. Essais préliminaires**

Après une période de multiplication, nous avons obtenu suffisamment de racines « hairy » pour commencer les essais d'infection par *O. cumana*. Lors des premiers essais, des racines « hairy » de tournesol sont repiquées au milieu des boîtes de Petri. Après une semaine de croissance des racines, des graines d'*O. cumana* préconditionnées sont déposées autour des racines. L'interaction entre les racines « hairy » et les orobanches est suivie régulièrement. Après quelques jours de culture on observe la germination des graines d'orobanche, ce qui montre que les racines « hairy » de tournesol sont capables de libérer des inducteurs de la germination d'*O. cumana*. Néanmoins, après quelques semaines de culture on n'observe aucune fixation des orobanches à la racine. On remarque au contraire la formation d'organes globulaires au niveau de nombreuses plantules d'orobanche. Ces structures peuvent prendre plusieurs formes, certaines sont semblables à des cals tandis que d'autres ressemblent à des pseudo-tubercules (Fig.50). La formation d'organes globulaires sur un milieu contenant du saccharose a déjà été observée chez *P. ramosa* (Gonzalez-Verdejo et al., 2006). Les travaux de Gonzalez-Verdejo et al (2006) montrent que le saccharose pourrait affecter le développement de l'orobanche. Il se pourrait qu'en présence de saccharose l'orobanche, alors qu'il n'est même pas encore attaché à la racine déclenche des stades post-attachement, comme lorsqu'il se connecte aux tissus vasculaires de la plante hôte et obtient les photoassimilats. Le saccharose jouerait un rôle de signal impliqué dans la différenciation de l'orobanche en (pseudo)tubercule (Gonzalez-Verdejo et al., 2006).





**Figure 51 : Système à double compartiment pour la culture de racines « hairy » de tournesol.** (A) Schéma du système à double compartiment. La base des racines est déposée dans une première boîte contenant du milieu M avec 20 g/l de saccharose. Un apex racinaire est déposé sur milieu M sans saccharose. (B) Photographie du système à double compartiment en présence d'une racine « hairy » de tournesol, 49 jours après repiquage.

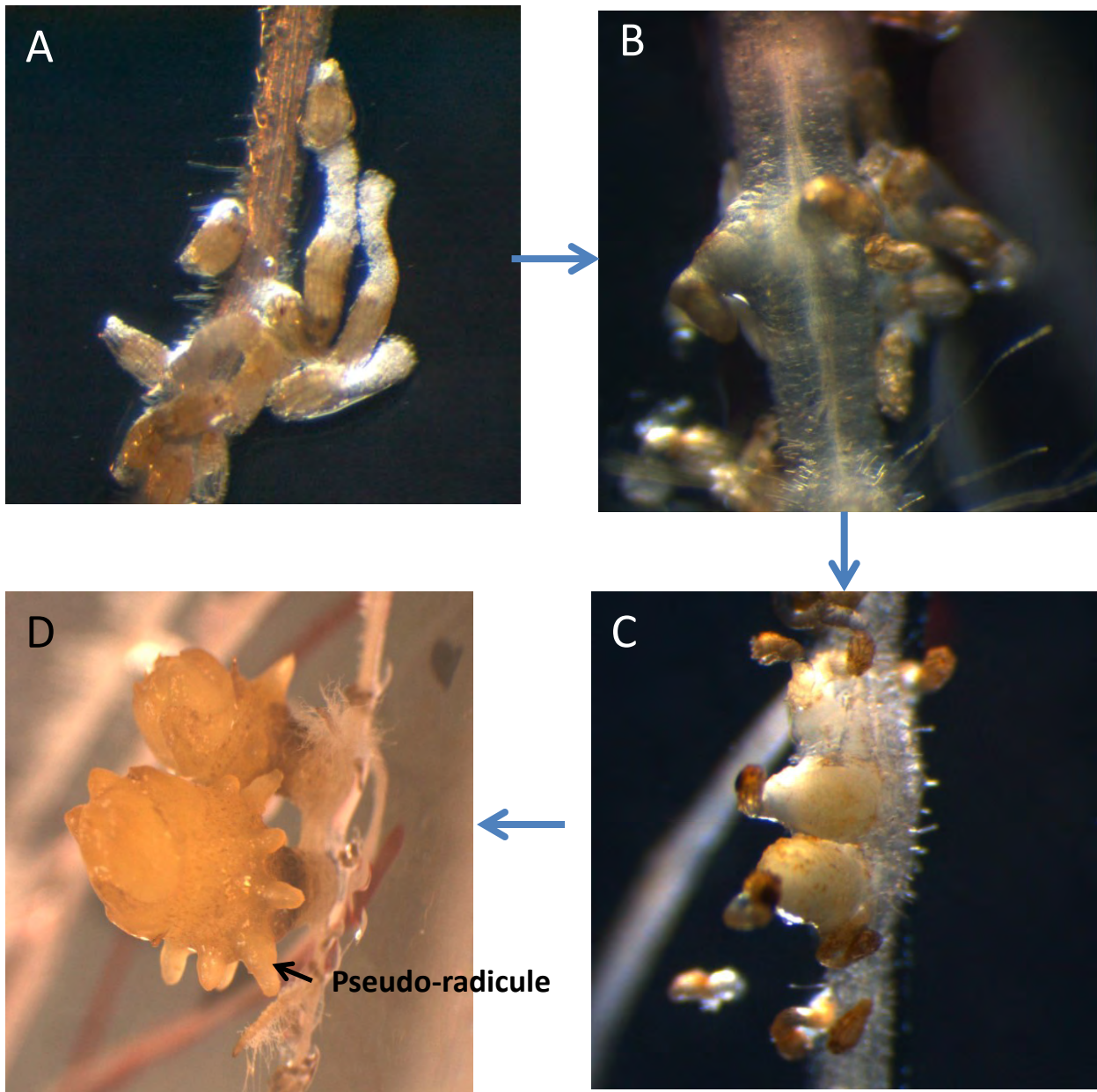


**Figure 52 : Développement d'une interaction entre *O. cumana* et des racines « hairy » de tournesol.** (A) Photographie du développement d'*O. cumana* sur racine « hairy » de tournesol *in vitro*, 49 jours après inoculation. (B) Agrandissement de la zone d'infection, on observe le développement d'un tubercule typique d'orobanche fixé sur la racine.

### III.B. Développement d'un système à double compartiment

Bien que le saccharose semble perturber le développement des orobanches, il est indispensable au développement des racines « hairy » de tournesol. Nous avons donc développé un système à deux compartiments dans lequel les racines « hairy » se développent à la fois sur un milieu contenant du saccharose (pour y prélever cette ressource carbonée indispensable) et sur un milieu sans saccharose (pour permettre le développement normal de l'orobanche). Ce dispositif a été mis au point par Francis Carbonne dans notre équipe (Fig.51A). Une petite boîte de Petri contenant un milieu riche en saccharose est placée dans une deuxième boîte de Petri plus grande contenant du milieu sans saccharose. Au moment du repiquage les racines « hairy » sont placées « à cheval » sur ces deux compartiments, avec l'essentiel des racines sur le milieu avec saccharose et un apex placé sur le milieu sans saccharose. Cet apex reçoit la totalité de son carbone via le reste de la racine, qui pousse dans le milieu riche en saccharose. On peut ainsi imaginer que ce système mime au moins en partie les flux de nutriments que l'on peut observer au sein d'une plante, où le carbone provient de la partie aérienne pour redescendre vers les racines. On constate qu'avec ce système les racines « hairy » se développent bien dans les deux compartiments (Fig.51B).

Nous avons donc testé si l'infection de racine « hairy » par l'orobanche était réalisable dans ce dispositif. Des graines préconditionnées d'*O. cumana* sont déposées à proximité des racines dans le compartiment sans saccharose. Contrairement aux essais précédents nous n'observons pas la formation de pseudo-tubercules ou de cals sur les plantules d'orobanche, suggérant que ce serait bien la présence de saccharose qui conduirait à la formation de ces structures. Au bout de quelques semaines, on observe dans certaines boîtes la formation de tubercules attachés sur les racines (Fig.52). Avec ce système il est donc possible d'observer les stades précoces de l'interaction, germination et attachement, entre les racines et l'orobanche (Fig.53). Tout d'abord, on observe qu'une proportion importante des graines d'orobanche (environ 80%) est capable de germer à proximité des racines (taux équivalent à celui que l'on observe avec le même lot de graines traité avec  $10^{-8}$ M de GR24) (Fig.53A). Ce résultat suggère que les inducteurs de la germination d'*O. cumana* sont produits par les racines « hairy » dans ces conditions de culture. Il serait toutefois intéressant de comparer la qualité de ces exsudats avec des exsudats racinaires de plantes entières, pour vérifier si les deux systèmes racinaires sécrètent les mêmes strigolactones et la DCL. A un temps plus

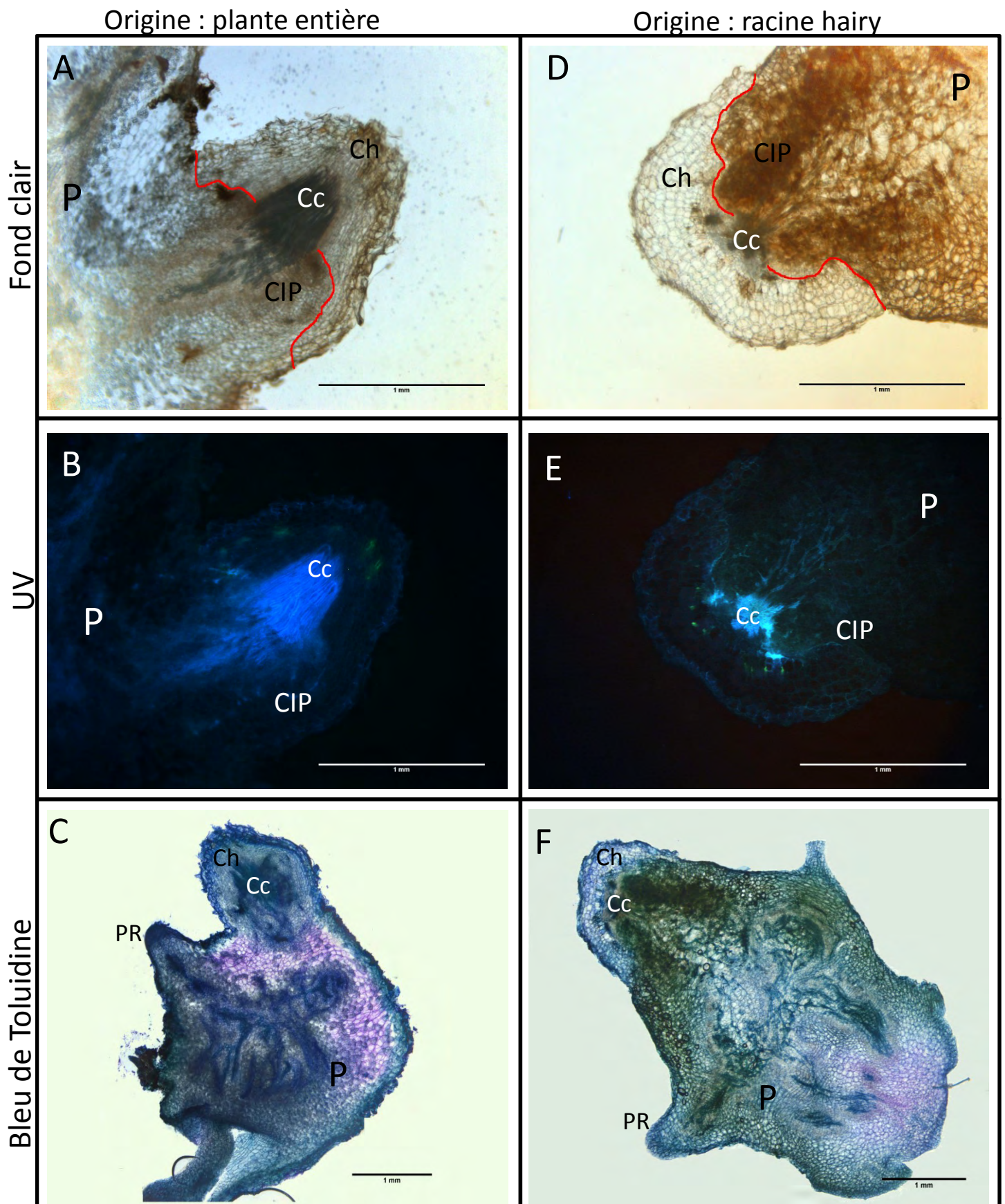


**Figure 53 : Différents stades de l'interaction entre *O. cumana* et une racine « hairy » de tournesol.** (A) Induction de la germination des graines de l'*O. cumana* à proximité d'une racine « Hairy » de tournesol. (B) Attachement de l'orobanche à la racine « hairy ». (C) Développement de tubercules aux sites de fixation. (D) Les orobanches se différencient jusqu'au stade « araignée » et semblent arrêter leur croissance.



tardif, on peut observer quelques évènements de fixation de l'orobanche sur les racines « hairy » (Fig.53B) suivis par la formation de tubercules (Fig.53C). La formation de tubercules non-nécrotiques indique que les orobanches arrivent à se connecter au réseau vasculaire de la racine hôte. Environ 3% des graines atteignent le stade tubercule dans nos conditions. Ce taux est semblable à celui observé dans nos expériences en pot (cf chapitre I), où sur environ mille graines on observait entre vingt et trente tubercules. Néanmoins, on observe dans le cas du système *in vitro* une forte variabilité : dans certaines boîtes plusieurs tubercules d'orobanche se développent, alors que dans d'autres boîtes il peut n'y avoir aucune infection. Si on veut réaliser des études comparatives (par exemple, avec ou sans champignons MA), il est indispensable d'améliorer encore ce dispositif expérimental pour que les unités expérimentales soient moins variables. Enfin, on observe le développement d'orobanches jusqu'au stade « araignée » où l'on peut voir le début de différenciation d'un bourgeon (Fig.53D). Dans la plupart de nos expériences le développement de l'orobanche s'est arrêté à ce stade, le tubercule finissant par se nécroser après plusieurs semaines. Trois hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène :

- (i) Le saccharose pourrait être un nutriment limitant dans ce système. En effet, tout le saccharose disponible pour les racines et l'orobanche est présent dans la petite boîte de Petri (Fig.51), où l'on peut verser environ quinze millilitres de milieu soit environ trois cent milligrammes de saccharose. Il se pourrait que cette quantité de saccharose soit limitante et ne permette pas une croissance plus importante de l'orobanche. Pour confirmer cette hypothèse il serait intéressant de faire pousser l'amont de la racine dans un compartiment où le saccharose ne serait plus un facteur limitant. On pourrait par exemple augmenter la concentration initiale en saccharose dans ce compartiment, ou rajouter du saccharose pendant la culture (à l'aide d'une solution liquide qu'on laisserait s'infiltrer dans le milieu) ou bien encore faire pousser la partie supérieure de la racine dans un compartiment contenant du milieu liquide que l'on pourrait renouveler régulièrement.
- (ii) Dans nos conditions la racine pousse sans partie aérienne, et l'orobanche pourrait avoir besoin d'un métabolite ou d'un signal synthétisé exclusivement par la partie aérienne pour initier la différenciation du tubercule en tige.
- (iii) La croissance des racines « hairy » est basée sur l'expression de plusieurs gènes, transférés d'*A. rhizogenes* vers le génome de la plante hôte, qui vont modifier



**Figure 54 : Coupes transversales de tubercules d'*O. cumana* prélevés sur plantes entières ou sur racines « hairy ».** (A) Coupe d'un tubercule d'orobanche fixé à une racine de plant de tournesol, (B) la même section observée sous excitation UV (340-380nm). (D) Coupe transversale d'un tubercule d'orobanche fixé à une racine « hairy » de tournesol, (E) la même coupe observée après excitation par UV. (C) Coupe transversale d'un tubercule d'orobanche, fixé à la racine d'un plant de tournesol, colorée au bleu de Toluidine. (F) Section d'un tubercule d'orobanche, fixé à une racine « hairy » de tournesol, colorée au bleu de toluidine. (Cc) Cylindre central de l'hôte ; (Ch) cortex de l'hôte ; (CIP) cellules intrusives du parasite ; (P) parasite ; (PR) pseudo-racine de l'orobanche.

l'équilibre hormonal conduisant à la formation de racines au point d'infection. Ce sont ces modifications de l'équilibre hormonal qui permettent à ces racines de croître en l'absence d'une partie aérienne. Si ces modifications hormonales ne semblent pas perturber le développement de la symbiose MA, elles pourraient avoir un impact sur le développement de l'orobanche. En effet, l'orobanche calque une partie de son développement sur celui de la plante hôte, ainsi un défaut dans la signalisation hormonale pourrait expliquer pourquoi l'orobanche ne dépasse pas le stade « araignée ».

### **III.C. Comparaison de tubercules obtenus *in vitro* et *in planta***

Nous avons réussi à observer la formation de tubercules viables sur les racines « hairy ». Toutefois, malgré un aspect macroscopique semblable à celui des tubercules formés sur des racines de plantes entières, nous avons voulu vérifier que les tubercules formés sur des racines « hairy » présentaient des structures histologiques équivalentes au niveau microscopique. Des coupes de tubercules ont été réalisées au vibratome, puis des observations en fond clair, sous excitation aux UV et après coloration au bleu de toluidine ont été réalisées afin d'avoir une image la plus complète possible du tubercule et de sa connexion à la racine.

Les observations des coupes de tubercules issus de plantes entières montrent une invasion de la racine de tournesol par l'orobanche. Il est difficile de faire une différence nette entre les tissus de l'orobanche et ceux du tournesol (Fig.54A). Des observations sous UV (mise en évidence des tissus lignifiés) montrent par contre clairement la connexion des tissus vasculaires de l'orobanche à ceux de la racine (Fig.54B).

Les tubercules fixés sur les racines « hairy » présentent une morphologie similaire à celle des tubercules formés sur des plantes entières. On observe clairement l'envahissement de la racine « hairy » par les tissus de l'orobanche (Fig.54D). Les tissus vasculaires de l'orobanche semblent bien connectés au système vasculaire de la racine (Fig.54E).

Enfin, nous avons coloré les tubercules au bleu de toluidine afin d'observer la structure globale du tubercule (Fig.54C et F). On observe chez les deux types de tubercules un réseau de tissus lignifiés (en bleu), correspondant aux tissus vasculaires du tubercule, au centre du tubercule. Cette observation confirme que les tissus vasculaires de l'orobanche



semblent se connecter au réseau vasculaire de la racine hôte. En outre, on constate aussi que ces tissus vasculaires se dirigent vers les pseudo-racines du tubercule. On distingue aussi chez les deux types de tubercules un tissu coloré en rose, majoritairement composé de cellules avec des parois riches en cellulose, correspondant au parenchyme entourant les tissus vasculaires. Par ailleurs, on constate que la structure des tubercules issus de racines « hairy » est bien organisée : le réseau vasculaire à la base du tubercule est relié à celui de l'hôte, puis il remonte à l'intérieur du tubercule et l'apex du tubercule semble se terminer par l'ébauche d'un bourgeon (Fig.54F).

Pour le tubercule fixé sur une racine de plante entière l'organisation des tissus est légèrement plus difficile à observer. On distingue toujours très bien la connexion entre les systèmes vasculaires de l'hôte et du parasite, mais la distinction entre les tissus de la racine et ceux du tubercule est plus difficile. Ensuite, l'architecture de ce tubercule semble plus confuse (Fig.54C). Les différences de morphologie entre ces deux types de tubercules pourraient être dues à leur environnement physique. Les tubercules issus de plants poussent dans un environnement comprimé par le substrat, leur morphologie pourrait donc être affectée par ces contraintes mécaniques. En revanche les tubercules observés sur les racines « hairy » se développent à la surface du milieu gélosé en absence de contraintes physiques.

En outre, il semblerait que le développement des tubercules sur les racines « hairy » soit plus lent que sur les racines de plantes entières. En effet, on peut observer des tubercules au stade « araignée » au bout de cinq semaines en pot alors qu'il faut attendre environ sept semaines pour observer ce même stade sur des racines « hairy ». Cette différence de croissance pourrait être due à la disponibilité en ressources carbonées. Dans le système *in vitro* la quantité de saccharose est limitée et diminue au fur et à mesure de la croissance de la racine et du tubercule. Dans le cas des plantes entières la quantité de sucres est moins limitante, la plante continuant à en produire de manière continue.

#### **IV. Conclusion**

Grâce à la mise au point d'un système double compartiment nous avons vu que l'orobanche pouvait infecter des racines « hairy » de tournesol. En différenciation des pseudo-tubercules dans un milieu riche en saccharose, il semblerait que l'orobanche se comporte



comme au moment de sa connexion avec la racine. Sur le milieu sans saccharose les étapes précoces de l'interaction semblent se dérouler normalement ; on observe la germination, la fixation à la racine, et le développement de tubercules jusqu'au stade « araignée ». Nous n'avons cependant pas observé le développement de l'orobanche au-delà de ce stade.

Néanmoins, ce dispositif expérimental semble pouvoir être utilisé pour étudier les phases précoces de l'interaction :

(i) Il pourrait permettre l'étude des phases précoces de l'interaction triple tournesol/orobanche/champignon MA. Dans les chapitres précédents nous avons montré que les champignons MA produisaient des composés capables d'inhiber la germination des graines d'orobanche. On pourrait donc utiliser ce système de culture *in vitro* pour étudier l'effet des champignons MA sur la germination d'*O. cumana* en présence des inducteurs sécrétés par une racine de tournesol vivante. On pourrait aussi déterminer si la mycorhization a un impact sur l'attachement des orobanches (en déposant des graines prégermées), ce qui est très difficile à déterminer en pot. Des expériences de confrontation entre racines « hairy », *O. cumana* et champignons MA ont été mises en place par Francis Carbonne, afin de commencer ces études. Toutefois, du fait du temps consacré à la mise au point de la technique et de problèmes de contaminations liés à la complexité du système il n'a pas été possible d'obtenir des résultats avant la fin de la thèse.

(ii) Il pourrait aussi servir à mieux comprendre la formation de l'haustorium. En effet il est facile d'observer la croissance de la racicule et d'identifier le moment où l'apex de la racicule se différencie en haustorium, un moment clé de l'interaction. On pourrait ainsi identifier des gènes impliqués dans la formation de l'haustorium, en comparant par exemple les gènes différentiellement exprimés entre une graine d'orobanche germée et une graine ayant développé un haustorium.

(iii) Il pourrait être utilisé pour tester les inhibiteurs de la germination, notamment ceux produits par les champignons MA et confirmer leur activité en présence des inducteurs libérés par les racines de tournesol. En outre, ce système permettrait de préciser l'étape ciblée par ces molécules : non seulement la germination mais aussi l'attachement par exemple.





(iv) Il permettrait enfin par génétique inverse d'identifier des gènes de tournesol impliqués dans l'interaction avec l'orobanche. Bien que l'obtention de plantes entières transgéniques soit possible chez le tournesol (Rao et Rohini, 1999), la technique est difficile et longue à mettre en place, en comparaison avec celle qui conduit à produire des racines transformées par *A. rhizogenes*. Ainsi, la disponibilité d'une méthode d'infection par l'orobanche de telles racines transformées rendrait ensuite possible l'analyse fonctionnelle de gènes candidats potentiellement impliqués dans l'interaction.

Ce nouveau système expérimental *in vitro* reste à améliorer, notamment pour augmenter le taux de formation des tubercules et diminuer la variabilité entre les unités expérimentales. A terme, ce système de culture devrait permettre d'améliorer les connaissances sur les phases précoces de l'interaction et d'identifier de nouvelles méthodes de lutttes contre l'orobanche.



## Discussion – perspectives

---

L'étude de l'interaction triple plante hôte/plante parasite/champignon MA en n'est qu'à ses débuts. Nos travaux ainsi que des études précédentes indiquent que les champignons MA peuvent être une voie prometteuse dans la lutte contre les plantes parasites. Durant ces trois années de thèse nous avons pu mettre en évidence certaines caractéristiques de l'interaction tournesol/*O. cumana*/ champignon MA : (i) un biocontrôle de l'infection par *O. cumana* grâce à la mycorhization ; (ii) un niveau de protection variable suivant l'espèce de champignon MA utilisée ; (iii) les phases précoces de l'interaction tournesol/*O. cumana* semblent être plus affectées par la mycorhization que les phases tardives ; (iv) les exsudats racinaires de plants mycorhizés sont moins actifs sur la germination d'*O. cumana* et ceci semble dû à la présence d'un inhibiteur ; (v) les champignons MA produisent des substances qui affectent négativement la germination des graines d'orobanches. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives d'application des champignons MA au champ pour la lutte contre *O. cumana*. Nous détaillerons ces perspectives au long de ce chapitre.

### I. Les potentiels de l'utilisation des champignons MA dans le contrôle de l'orobanche

#### **Effet de l'espèce de champignons MA sur la protection du tournesol contre l'orobanche.**

Nous avons montré que la mycorhization de variétés de tournesol sensibles à l'orobanche permettait de réduire le développement de la plante parasite. L'effet protecteur dépend du champignon MA utilisé : *R. irregularis* a eu un effet protecteur modeste alors que *G. rosea* a eu un effet protecteur plus marqué. Nous n'avons pu tester que ces deux espèces de champignons MA (disponibles au laboratoire), l'une dans l'ordre des Glomérales (*R. irregularis*) et l'autre dans l'ordre des Diversisporales (*G. rosea*). Ces deux ordres de champignons MA, phylogénétiquement éloignés, présentent de plus des stratégies de colonisation contrastées. Les Glomérales ont généralement un comportement opportuniste, ils colonisent rapidement et fortement la racine hôte. Ce comportement est adapté à un environnement perturbé et changeant, que l'on retrouve dans les champs cultivés, et on parle



de stratégie R. A l'inverse, les Diversisporales sont plus adaptés à un environnement stable avec une forte concurrence entre espèces, on parle dans ce cas de stratégie de type K.

Il est possible que les espèces choisies pour cette étude ne soient pas les plus efficaces pour lutter contre l'orobanche. Pour compléter nos résultats il faudrait tester d'autres espèces de champignons MA. La sélection des plus efficaces permettrait d'avoir des candidats intéressants pour l'étude des mécanismes protecteurs et pour une utilisation éventuelle au champ.

Avec *R. irregularis*, nous avons montré que la présence du champignon conduisait à une inhibition des phases précoces de l'interaction parasitique : la germination des graines du parasite et/ou l'attachement du parasite à la racine. Pourrait-on identifier d'autres espèces de champignons MA capables d'inhiber des phases plus tardives telles que la pénétration et le développement de l'orobanche ? Identifier de telles espèces affectant différentes phases de l'interaction tournesol/orobanche, ou affectant de manière différentielle une étape particulière du cycle de développement de l'orobanche (par la synthèse de différents inhibiteurs par exemple) permettrait de lutter durablement contre l'orobanche en limitant les risques de contournement. En effet, on constate que les différents gènes de résistance qui ont été introduits chez le tournesol on fini par être contournés par *O. cumana* (Fernández-Martínez et al., 2000 ; Pérez-Vich et al., 2004). L'utilisation d'un inoculum formé de plusieurs espèces de champignons agissant à différents niveaux permettrait peut-être de limiter ce risque et éventuellement, par des effets additifs, d'augmenter le niveau de protection induit par la mycorhization. Néanmoins, il existe encore assez peu d'espèces de champignons MA disponibles en grande quantité pour réaliser de tels tests.

### **Bénéfices additionnels des champignons MA**

Un des intérêts principaux de l'utilisation des champignons MA comme agents de biocontrôle réside dans la multiplicité des bénéfices apportés par ces champignons à leur plante hôte. On peut citer par exemple une augmentation de la productivité et une amélioration de la résistance à différents stress :

- (i) La mycorhization permet une meilleure acquisition du phosphate par la plante. Ainsi, malgré de faible apport en phosphate on peut obtenir des bons rendements sur une plante mycorhizées (Smith et al., 2003).



(ii) Il a été montré que la mycorhization permet d'augmenter les rendements, par exemple chez le blé (Singh et Kapoor, 1999). Nous n'avons pas mesuré en profondeur cette variable dans nos expériences ; toutefois, des mesures préliminaires indiquent que les plants infectés par l'orobanche et mycorhizés produisent plus de grains que les plants infectés par l'orobanche mais non mycorhizés. En outre, plusieurs études ont montré que la mycorhization améliore la qualité des fruits de tomates et de poivrons, à travers des teneurs en sucre et en minéraux plus élevées (Al-Karaki et Hammad, 2001 ; Mena-Violante et al., 2006 ; Subramanian et al., 2006). On pourrait également tester l'effet de la mycorhization sur la qualité de l'huile et des protéines du tournesol.

(iii) La mycorhization permet également de lutter contre d'autres pathogènes tel que le mildiou (Tosi et al., 1993), ou contre certains stress abiotiques tels que les stress salins et hydriques (Feng et al., 2002; Porcel et Ruiz-Lozano, 2004). Si l'agriculteur emploie des techniques agronomiques adéquates, les champignons MA pourront se développer de façon autonome dans le sol et les effets bénéfiques de la mycorhization pourront donc se manifester sur les cultures suivantes.

### **Potentiel des champignons MA contre les différentes races d'*O. cumana***

Au cours de notre étude, nous avons utilisé la race E d'*O. cumana*. La race E s'est largement répandue en Europe depuis les années 2000 (Fernández-Martínez et al., 2000). Depuis, la race F est apparue (Velasco et al., 2007) et récemment la race G a été identifiée en Europe (Molinero-Ruiz et al., 2008 ; Dicu et al., 2011). Mais comment définit-on une nouvelle race d'orobanche ? La race d'*O. cumana* est définie en fonction des QTL de résistance à l'orobanche (*Or*) qu'elle est capable de contourner. Ainsi les premières variétés de tournesol résistantes portaient le QTL de résistance *Or1* et elles étaient résistantes à la race A. La race E, elle, contourne les QTL de résistance *Or1* à *Or4* mais pas le QTL de résistance *Or5*. La variété de tournesol 2603 ne possède aucun QTL de résistance à *O. cumana* ; elle est sensible à toutes les races (Véronési et al., 2005). Nous avons montré que la mycorhization de la variété 2603 permettait une certaine protection contre la race E d'*O. cumana*. Il serait intéressant de tester si l'effet protecteur des champignons MA peut être observé avec des variétés de tournesol dont la résistance a été contournée par l'apparition d'une nouvelle race d'orobanche.





## **Quel impact sur la production de graines par l'orobanche ?**

Nous n'avons pas observé d'effets significatifs de la mycorhization sur le développement de l'orobanche une fois fixée (la masse moyenne d'un tubercule est équivalente entre la condition mycorhizée et non mycorhizée). Néanmoins, nous n'avons pas recherché si la mycorhization peut affecter des stades plus tardifs tels que la production de graines par l'orobanche. En effet, on peut se demander si chez une plante mycorhizée le puits de carbone que représente le partenaire mycorhizien peut avoir un impact négatif sur la production de graines par l'orobanche. Il serait donc intéressant d'estimer la quantité de graines d'orobanche produite chez des plants mycorhizés et non mycorhizés et d'estimer leur capacité germinative.

## **II. Intérêt pour les inhibiteurs produits par les champignons MA**

L'un des résultats originaux de la thèse a été la découverte d'un effet inhibiteur des exsudats de champignons MA sur la germination des graines d'orobanche. Dans la bibliographie il existe peu d'exemples d'inhibition de la germination des graines d'*Orobanchaceae* par des microorganismes, le cas le mieux décrit étant celui des mycotoxines produites par *Fusarium compactum* et *Myrothecium verrucaria*, telles que le neosolaniol ou la verrucarine A et B (Abouzeid et al., 2004 ; Andolfi et al., 2005 ; Vurro et al., 2009), ainsi que certains acides aminés, tels que la leucine (Vurro et al., 2006). L'identification des molécules inhibitrices de la germination des orobanches produites par les champignons MA pourrait permettre d'élargir la gamme de molécules disponibles et ainsi de retarder l'apparition de races d'*O. cumana* résistantes.

Par ailleurs, il serait intéressant d'identifier les mécanismes d'action de ces inhibiteurs. Une possibilité serait de tester si ces inhibiteurs entrent en compétition avec les inducteurs de la germination (strigolactones et/ou DCL) pour la liaison à un récepteur. Ceci pourrait être réalisé en faisant varier les concentrations d'inducteurs de la germination et d'inhibiteurs.



### III. Comment apporter les champignons MA au champ ?

Une fois définies les espèces de champignon MA les plus efficaces contre l'orobanche, il faudra être capable de les multiplier pour produire de l'inoculum abondant à moindre coût. Les champignons MA sont des organismes biotrophes obligatoires, ils ont besoin d'un hôte pour réaliser leur cycle de vie. Ils doivent donc être maintenus en co-culture avec une plante pour être multipliés. Il existe actuellement deux méthodes principales pour produire de l'inoculum MA : (i) les cocultures en pots avec une plante hôte (Pour revue IJdo et al., 2011), (ii) les cocultures *in vitro* sur racines « hairy », issues de la transformation par *Agrobacterium rhizogenes* (Fortin et al., 2002). Dans le premier cas le champignon MA produit ses spores dans le substrat utilisé pour la coculture. Celui-ci peut ensuite être utilisé directement comme inoculum, ou bien on peut extraire les spores et les racines de la plante-hôte pour préparer un inoculum plus concentré. L'avantage de cette méthode est sa simplicité. Les inconvénients sont des échelles de production peu adaptées aux besoins industriels, des coûts de production élevés et des risques de contaminations de l'inoculum par des microorganismes pathogènes. Dans le deuxième cas l'inoculum produit est axénique et l'industrialisation du procédé plus facilement envisageable (Declerck et al., 1996). Les inconvénients de cette méthode, en cours de développement dans plusieurs laboratoires et entreprises, sont les difficultés rencontrées pour domestiquer *in vitro* certaines espèces de champignon MA.

Une fois l'inoculum fongique disponible se pose la question de son stockage et de la façon dont on peut l'apporter au champ (Menge, 1983). Les spores de champignons pourraient être conservées dans un substrat sec ou dans une matrice déshydratée (Dalpé, 1990 ; Voyron et al., 2009) ou bien cryoconservés (Declerck et Angelo-Van Coppenolle, 2000 ; Lalaymia et al., 2012). Ensuite, les spores pourraient être mélangées dans de l'eau avant d'être épandus au champ. Cette approche n'est pas envisageable pour le moment car elle suppose des prix d'inoculum beaucoup plus bas que ceux actuellement proposés. On peut aussi apporter l'inoculum de façon plus ciblée, dans la ligne de semis, ou en enrobant les semences de tournesol avec l'inoculum MA. Ces deux dernières méthodes d'inoculation des spores rapprochent le champignon MA et la semence de tournesol, elles pourraient donc favoriser une mycorhization rapide et inhiber la germination des graines d'orobanches à proximité du lieu de semis. Cependant les techniques d'enrobage et de conservation des semences avec un inoculum de champignon MA doivent être mises au point. Les semences de



tournesol sont actuellement enrobées avec un fongicide afin de limiter les dégâts causés par le mildiou (source CETIOM ; Gulya, 2002). Or, il semble difficile d'associer un fongicide et des spores de champignons MA sur la même semence. La présence du fongicide affectera la viabilité des champignons MA et réduira l'efficacité de la mycorhization (Kough et al., 1987 ; Kjølner et Rosendahl, 2000). Enfin, une dernière méthode pourrait être de laisser se développer la microflore déjà présente au champ. Pour cela les méthodes d'étude et de suivi au champ des populations de champignons et plus généralement les connaissances sur l'écologie microbienne des sols cultivés devront être plus développées qu'elles ne le sont actuellement (Mc Caig et al., 1999 ; Oehl et al., 2004b).

#### **IV. Pourrait-on combiner la mycorhization avec d'autres méthodes de lutte contre l'orobanche ?**

Pour le moment, il n'existe pas de méthodes de lutte parfaitement efficaces contre l'orobanche. Les résistances introduites dans les variétés finissent par être contournées et l'utilisation d'herbicides favorise l'émergence de races résistantes aux herbicides. Afin de lutter efficacement contre ce problème il peut être intéressant de combiner plusieurs méthodes.

Les champignons MA pourraient être associés à des bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Bacteria) telles que celles du genre *Azospirillum*. Ces bactéries ont la capacité d'inhiber la germination de graines d'orobanche (Miché et al., 2000), mais aussi d'augmenter la croissance et les rendements des plantes cultivées (Bashan et al., 2004). Un inoculum mixte « *Azospirillum* + champignons MA » permettrait peut-être de lutter plus efficacement contre l'orobanche. En effet, une première étude a observé que l'utilisation combinée de bactéries PGPR et de champignons MA permet une bonne protection du sorgho contre *Striga* (Hassan et al., 2011). Cette méthode pourrait donc être une piste intéressante pour un biocontrôle de l'infection du tournesol par *O. cumana*.

Enfin, il a été montré que *Fusarium oxysporum f sp orthoceras* pouvait être utilisé pour lutter contre *O. cumana* (Thomas et al., 1998 ; Thomas et al., 1999). Ce champignon attaque spécifiquement *O. cumana* sans provoquer de dégâts sur les plants de tournesol. Cette



méthode de lutte ne permet pas une protection totale contre l'orobanche, il serait donc intéressant de tester si un inoculum mixte *Fusarium oxysporum f sp orthoceras* et champignons MA permet une bonne protection contre l'orobanche.

## V. Pourquoi identifier l'inducteur de la germination d'*O. cumana* ?

Durant mes travaux nous nous sommes posé la question de savoir quelle était la nature des molécules inductrices de la germination d'*O. cumana* : les strigolactones et/ou la DCL ? Répondre à cette question est important pour la compréhension de l'interaction entre le tournesol et *O. cumana* et pourrait aider à cibler les futurs choix des sélectionneurs pour la création de nouvelles variétés de tournesol résistantes à *O. cumana*. Afin de répondre à cette question. On pourrait analyser le pouvoir inducteur de la germination d'*O. cumana* d'exsudats racinaires de plants de tournesol mutés dans la voie de biosynthèse des strigolactones et des sesquiterpènes lactones. Pour le moment il n'existe pas de banque de mutants chez le tournesol. Une possibilité alternative serait de construire des plants RNAi ciblant des gènes impliqués dans l'une ou l'autre voie de biosynthèse. Pour les strigolactones on connaît plusieurs gènes candidats assez spécifiques : les gènes *D27*, *CDD7* et *CDD8* (Lin et al., 2009 ; Vogel et al., 2009 ; Kohlen et al., 2012) qu'il faudrait identifier chez le tournesol. Pour la DCL, on connaît chez le tournesol un gène codant pour la germacrene A synthase, impliquée dans la synthèse de la costunolide, un précurseur de la DCL (Göpfert et al., 2009). Durant nos travaux, nous avons mis au point un système permettant l'interaction d'*O. cumana* avec des racines « hairy ». On pourrait donc produire des racines transgéniques ciblant la voie de biosynthèse de la DCL et/ou des strigolactones et tester, en leur présence, la germination des graines d'orobanche, si possible des sept races identifiées.

Une fois les inducteurs de la germination d'*O. cumana* clairement caractérisés et après avoir vérifié que les différentes races d'*O. cumana* répondent aux mêmes inducteurs, les sélectionneurs disposeraient de gènes candidats pour cibler leur stratégie de sélection de tournesols résistants à l'orobanche. Cette approche visant à sélectionner des tournesols produisant des quantités moindres de strigolactones et/ou de DCL comporte des risques. Elle peut conduire à sélectionner des plantes avec d'autres caractéristiques non souhaitées. Par exemple, en perturbant la synthèse des strigolactones, la capacité à être mycorhizés et

	<b>Concentration finale</b>
<b>KNO<sub>3</sub></b>	3,71 mM
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O</b>	2 mM
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O</b>	7,5 μM
<b>MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O</b>	1 mM
<b>MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O</b>	5 μM
<b>CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O</b>	0,5 μM
<b>ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O</b>	0,5 μM
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	24,3 μM
<b>NaCl</b>	42,8 μM
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 4 H<sub>2</sub>O</b>	0,04 μM
<b>Na Fe-EDTA</b>	30 μM

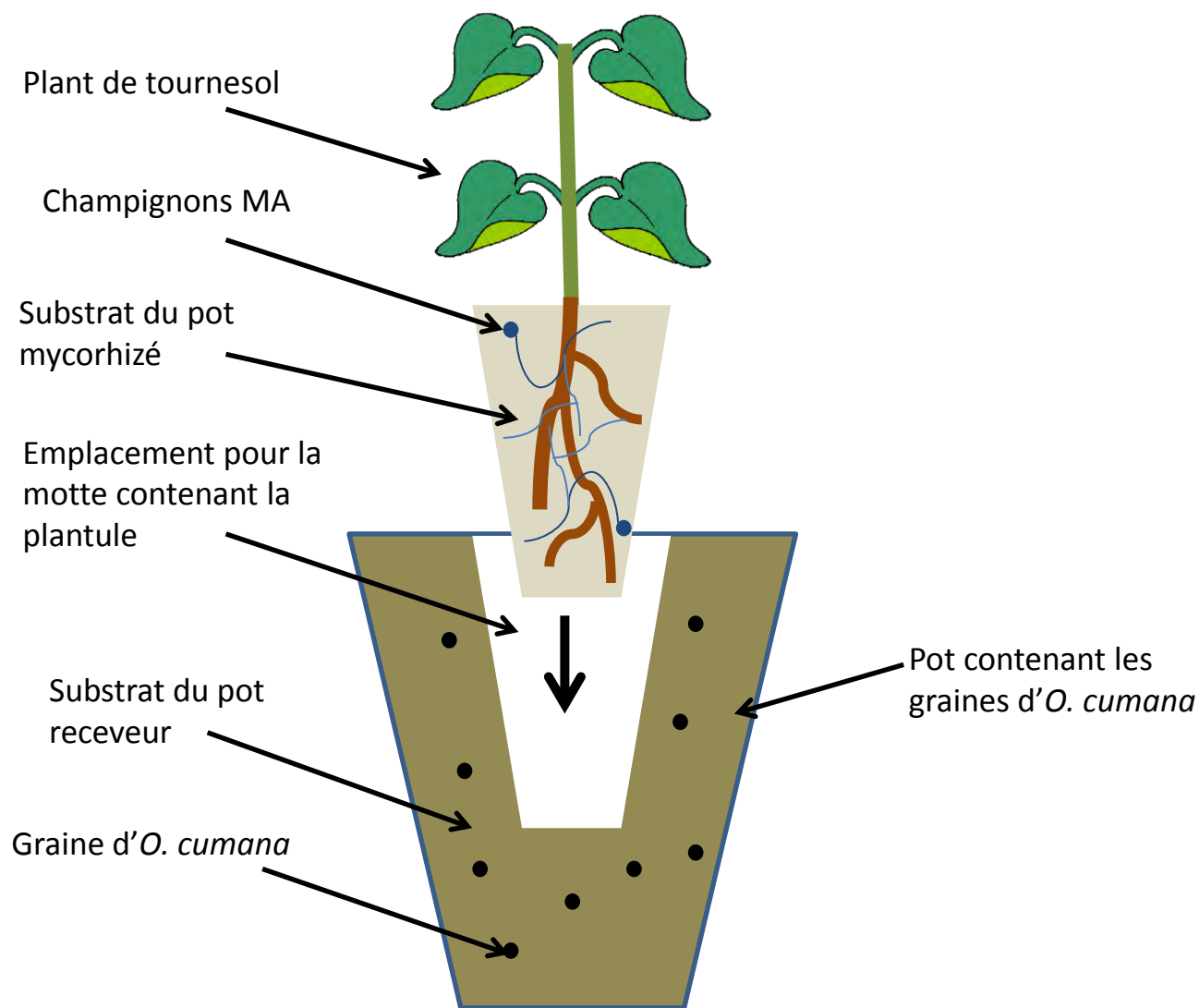
**Tableau 2 : Composition de la solution nutritive Long Ahston pauvre en phosphate.** D'après Hewitt (1966) et modifié pour la concentration en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> d'après Balzergue et al (2011).



l'architecture des plants de tournesol pourraient être affectées (Gomez-Roldan et al., 2008), avec des conséquences sur la productivité des cultures (Hladni et al., 2003). Et des tournesols sécrétant moins de DCL pourraient devenir plus sensibles face à certains ravageurs (Ambrósio et al., 2008).

L'identification des molécules inductrices produites par le tournesol aurait un autre intérêt dans la lutte contre *O. cumana*. On pourrait utiliser ces molécules ou des dérivés plus stable pour provoquer la germination suicide du parasite au champ (Kgosi et al., 2012).

En conclusion, mes travaux de thèse ouvrent des perspectives sur le plan fondamental pour une compréhension affinée de l'interaction tournesol/*O. cumana*. En particulier, l'identification des inhibiteurs produits par les champignons MA pourrait conduire à une meilleure connaissance des mécanismes qui régissent la germination des graines d'orobanches. Sur le plan appliqué, les champignons MA pourraient jouer un rôle important dans la lutte contre l'orobanche en participant à l'enrichissement du panel des méthodes de lutte disponibles, que ce soit par l'application des molécules inhibitrices ou par l'inoculation de spores au champ. Dans ce dernier cas, les mycorhizes apportent en plus de la protection contre l'orobanche des bénéfices plus larges aux plantes cultivées, comme une meilleure tolérance face à des stress biotiques et abiotiques, et un moindre besoin de fertilisation phosphatée et d'irrigation. Une telle stratégie de biocontrôle s'inscrirait donc parfaitement dans les préoccupations actuelles pour le développement d'une agriculture plus respectueuse de l'environnement.



**Figure 55: Dispositif expérimental de coculture avec prémycorhization.** Après cinq semaines de culture dans des pots de 250 ml les plantes, prémycorhizées ou non, sont transférées avec leur substrat dans un pot de 2 litres contenant des graines d'*O. cumana* préconditionnées.

# Matériels et méthodes

---

## I. Matériel végétal et fongique

Les akènes de tournesols (*Helianthus annuus L.*) de la variété 2603, sensible à l'orobanche, sont fournis par le groupe Syngenta (Toulouse, France) et les akènes de la variété AP451CF sont fournis par le groupe Euralis (France). Les variétés XRQ, HA89, 92B6 et LR1 ont été fournies par le Pr P. Vincourt (INRA, Toulouse, France).

Les graines d'*Orobanche cumana wallr* race E ont été collectées près d'Ecija en Espagne et fournies par le Dr B. Perez-Vich. Les graines de *Phelipanche ramosa Pomel* pathovar C ont été collectées en 2005 près de Saint Jean d'Angely en France et transmises par le LBPV de Nantes. Les graines de *Striga hermontica Benth* ont été prélevées au Soudan en 1999.

Les spores de *Rhizophagus irregularis* (anciennement appelé *Glomus intraradices*, souche DAOM197198), sont achetées à Agronutrition (Carbonne, France) qui les produit *in vitro* sur culture de racines « hairy » de carotte. Les spores de *Gigaspora rosea* (DAOM194757) sont produites en culture sur poireau et stérilisées comme décrit par Bécard et Fortin (1988).

## II. Conditions de culture

### II.A. Stérilisation des graines de tournesol

Les graines de tournesol sont stérilisées pendant 5 min dans une solution à 2,6% de NaClO puis elles sont rincées plusieurs fois à l'eau stérile. Les graines sont ensuite semées sur un milieu Long Ashton (Tab.2), pauvre en phosphate, gélifié à l'aide de 3 g/l de phytigel. Les graines sont placées en chambre de culture (16h de photopériode, 22°C/20°C) afin d'assurer leur germination et la croissance des jeunes plantules.



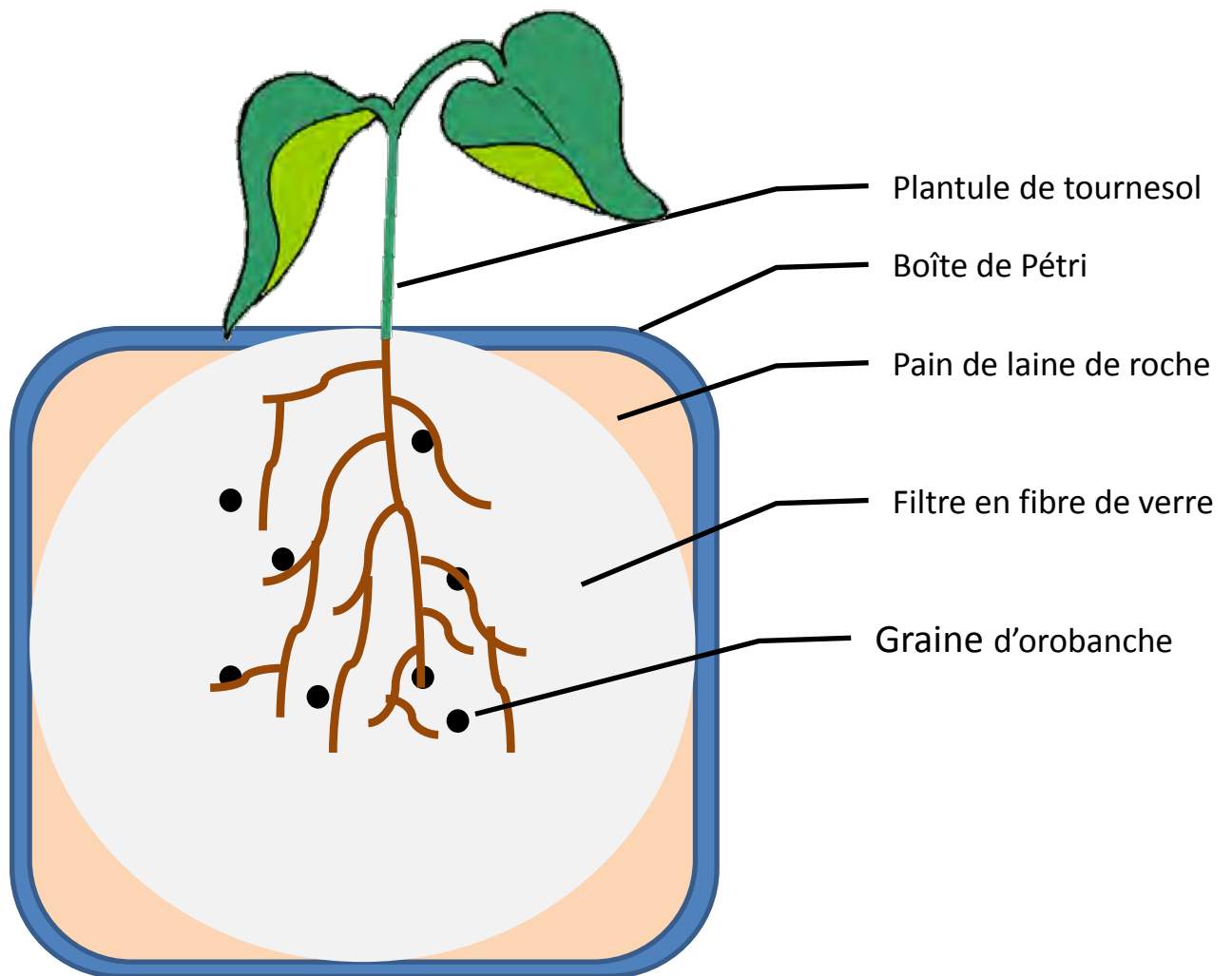
## II.B. Fertilisation

Les plants de tournesol sont arrosés quotidiennement avec une solution nutritive de Long Ashton, contenant une concentration finale en dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$ ) de  $7,5 \mu\text{M}$ . Ce mode de fertilisation permet de favoriser la colonisation de la racine par les champignons MA (Balzergue et al., 2011).

## II.C. Expériences de coculture avec prémycorhization

Des plantules âgées d'une semaine sont repiquées dans un pot de 250 ml contenant comme substrat de l'argile calcinée (Oil Dri, Klasmann, France) préalablement stérilisé par un traitement à  $180^\circ\text{C}$  pendant 24h.

Pour les pots inoculés avec le champignon MA, 1 000 spores de *R. irregularis* par pot sont mélangées au substrat. Les plantes sont placées en chambre de culture, avec une photopériode de 14h ( $21^\circ\text{C}/17^\circ\text{C}$ , 70% d'humidité) pendant 5 semaines afin de permettre une bonne mycorhization du système racinaire. Puis les plants sont transférés, avec leur substrat, dans un pot de deux litres contenant 5 mg de graines d'*O. cumana* par litre de substrat (Fig.55), et placés en serre. Ainsi, le plant mycorhizé et son substrat se trouvent au milieu d'un substrat contenant les graines d'orobanche. La récolte a lieu 10 semaines après transfert des plants, soit 15 semaines après germination des graines de tournesol. On détermine alors le niveau d'infection en comptant les orobanches fixées au système racinaire. De plus, les capitules de tournesol sont récoltées puis le nombre d'akènes par tête, la masse d'akènes par tête et la taille des akènes (communément appelée « poids de mille grains ») sont déterminés. Ces expériences ont été réalisées au LBPV de Nantes.



**Figure 56 : Schéma du système de culture en rhizotron.** Une jeune plantule de tournesol est déposée dans une boîte carrée sur un support de laine de roche recouvert d'un papier filtre et les graines d'orobanche sont semées à la surface du papier filtre. Le couvercle de la boîte recouvre les racines et les orobanches, une entaille est réalisé dans le couvercle afin de laisser passer la tige. Les boîtes sont ensuite déposées verticalement dans un bac contenant de la solution nutritive. Cette solution remonte jusqu'en haut de la boîte par imbibition de la laine de roche (d'après Labrousse et al., 2003).

## II.D. Expériences de coculture sur longue période

Une semaine avant repiquage des plantules de tournesol, les graines d'orobanches et les spores de champignons MA sont mélangées au substrat et placées dans des pots de 3 litres. Quatre conditions sont réalisées :

- (i) le substrat ne contient ni spores de *R. irregularis* ni graines d'*O. cumana*,
- (ii) 2 000 spores de *R. irregularis* par pot sont ajoutées au substrat,
- (iii) 5 mg de graines d'*O. cumana* par pot sont mélangées au substrat,
- (iv) 5 mg de graines d'*O. cumana* et 2 000 spores de *R. irregularis* par pot sont mélangées au substrat.

Pour chaque condition 12 pots sont préparés, le substrat est humidifié puis recouvert d'une feuille de papier d'aluminium afin de garder le substrat humide. Les pots ainsi préparés sont placés en serre pendant une semaine pour permettre le préconditionnement des graines d'orobanche. Ensuite, une jeune plantule de tournesol est transférée dans chaque pot. Les plants sont placés en serre et l'expérience est conduite jusqu'à l'émergence des premières orobanches, soit environ 14 semaines de culture.

## II.E. Expériences de coculture sur courte période

Les plantules de tournesol sont transférées dans des pots de 250 ml contenant de l'argile calcinée stérile, puis ils sont placés soit en chambre de culture avec une photopériode de 16h (22°C le jour, 20°C la nuit), soit en serre suivant les disponibilités.

Pour les inoculations avec les champignons MA, 1 000 spores de *R. irregularis* et/ou 200 spores de *G. rosea* par pot sont mélangées au substrat.

Pour les tests de confrontation avec *O. cumana*, les graines d'*O. cumana* sont mélangées au substrat (5 mg de graines par pot, soit environ 1 250 graines), avec ou sans spores de champignons MA. Le substrat est humidifié et les pots sont placés l'obscurité (16h à 22°C et 8h à 20°C) pendant 7 jours pour permettre le préconditionnement des graines

	<b>Concentration</b>
<b>KNO<sub>3</sub></b>	791,3 $\mu$ M
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	3 mM
<b>KCl</b>	0,87 mM
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	30,7 $\mu$ M
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O</b>	1,22 mM
<b>MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O</b>	30,3 $\mu$ M
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	24,26 $\mu$ M
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	9,2 $\mu$ M
<b>NaMoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>	0,011 $\mu$ M
<b>CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O</b>	0,52 $\mu$ M
<b>KI</b>	4,5 $\mu$ M
<b>Na-Fe-EDTA</b>	21,8 $\mu$ M
<b>Glycine</b>	40 $\mu$ M
<b>Inositol</b>	277,5 $\mu$ M
<b>Nicotinic acid</b>	4,06 $\mu$ M
<b>Pyrimidic HCl</b>	0,87 $\mu$ M
<b>Thiamine HCl</b>	0,33 $\mu$ M
<b>Saccharose</b>	29,2 mM

**Tableau 3 : Composition du milieu M.** Le pH du milieu est ajusté à 5,5 (d'après Bécard et Fortin., 1988).



d'orobanche, puis la plantule est semée. Le niveau d'infection par *O. cumana* est déterminé après 5 ou 6 semaines de culture.

## **II.F. Expériences de split-root**

La racine principale de plantules âgées d'une semaine est sectionnée en deux dans le sens de la longueur à l'aide d'une lame de scalpel stérile, puis les plantules sont remises sur le milieu gélosé pour permettre la reprise de la croissance du système racinaire. Au bout d'une semaine les plantules sont repiquées, les deux parties du système racinaire étant placées dans deux pots différents.

Pour les pots inoculés avec l'orobanche, 4 mg de graines d'*O. cumana* sont mélangées à 200 ml de substrat. Le niveau d'infection est déterminé par le dénombrement des orobanches fixées sur les racines au bout de 6 semaines de culture.

Les pots inoculés avec le champignon MA contiennent 800 spores de *R. irregularis* mélangées à 200 ml de substrat. Le niveau de colonisation par le champignon MA est évalué au bout de 6 semaines de culture.

## **II.G. Culture en rhyzotron**

Des boîtes de Petri carrées (12x12 cm) sont percées en haut (pour laisser passer la plantule) et en bas (pour permettre à la solution nutritive d'entrer dans la boîte). Les boîtes sont ensuite remplies avec des pains de laine de roche (Grodan) d'une épaisseur de 1 cm, préalablement stérilisés. Les pains de laine de roche sont imbibés de solution nutritive puis ils sont recouverts d'un papier filtre GF/F de 15 cm de diamètre (Whatman). La plantule de tournesol est ensuite placée sur le papier filtre, l'hypocotyle sortant de la boîte par le trou réalisé au sommet de la boîte (Fig.56). Le couvercle est posé sur les racines puis la boîte est maintenue fermée à l'aide d'élastiques. Les boîtes sont ensuite déposées verticalement dans un bac contenant environ 3 cm de solution nutritive de Long Ashton pauvre en phosphate ou riche en phosphate (7,5 ou 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).



Pour les inoculations avec les graines d'*O. cumana* environ 100 graines, préconditionnées pendant 8 jours, sont déposées à proximité des racines. La germination des graines d'orobanche, l'attachement et la formation de tubercules sont examinés toutes les semaines sous loupe binoculaire.

Pour les inoculations avec *R. irregularis* 500 spores sont déposées au voisinage des racines. Le niveau de colonisation par le champignon MA est contrôlé au bout de 4 et 5 semaines.

## **II.H. Culture des racines « hairy »**

Les racines « hairy » de carotte et de tournesol sont cultivées sur milieu M (Tab.3 ; Bécard et Fortin, 1988) contenant 10 g/l de saccharose et 4 g/l de phytigel. Les boîtes sont placées à l'obscurité et à 24°C. Des racines jeunes sont repiquées régulièrement afin de les multiplier.

## **III. Mesure du taux de mycorhization**

Un échantillonnage aléatoire de fragments racinaires d'1 cm de longueur est réalisé. Les racines sont traitées au KOH 10% à 95°C pendant 10 min, puis les racines sont rincées à l'eau. Ensuite, les racines sont baignées dans une solution à 5% d'encre noire Schaeffer et 5% d'acide d'acétique à 95°C pendant 10 min afin de colorer les structures fongiques, puis les racines sont rincées à l'eau (Vierheilig et al., 1998). Enfin, la colonisation de la racine par le champignon MA est déterminée par la méthode dite de « gridline intersect » (Giovannetti et Mosse, 1980). Les racines sont étalées de façon aléatoire dans une boîte de Petri, où on a préalablement tracé un quadrillage, et elles sont observées sous loupe binoculaire. On suit une ligne du quadrillage et à chaque intersection formée par une racine et le quadrillage (on observe environ 300 intersections) on recherche la présence de structures fongiques à l'intérieur de la racine (présence d'arbuscules ou de vésicules). On compte comme mycorhizé si une telle structure est observée et comme non mycorhizé si on n'en observe pas. Le résultat de l'observation est exprimé en pourcentage de longueur de racines mycorhizées.



#### **IV. Mesure de la biomasse**

Afin d'évaluer la biomasse de l'appareil aérien et racinaire des plants de tournesol ainsi que la biomasse des orobanches, nous avons mesuré leur masse sèche. Pour cela les différentes parties des plants sont mises à sécher dans des poches en papier, pendant 48h dans un four à 60°C. Elles sont ensuite sorties du four et pesées directement à l'aide d'une balance de précision.

#### **V. Analyse des strigolactones**

##### **V.A. Préparation des exsudats racinaires**

Les plants destinés à la production d'exsudats racinaires sont cultivés pendant 4 semaines en absence ou en présence de spores de champignon MA. Les plants sont nettoyés de leur substrat et les racines sont rincées. Les racines (non séparées de la partie aérienne) sont ensuite trempées dans une solution nutritive de Long Ashton pauvre en phosphate pendant 24h à température ambiante. Les exsudats racinaires ainsi obtenus sont ensuite filtrés, puis la masse sèche racinaire est déterminée.

Les exsudats racinaires sont extraits à l'aide d'un volume d'acétate d'éthyle. La phase organique est conservée et elle est traitée par un volume de  $K_2HPO_4$  à 0,2M. La phase organique est de nouveau récupérée puis séchée au Rotavapor. Les résidus solides obtenus à partir de la phase acétate d'éthyle sont ensuite repris dans 4 ml d'acétone, formant ainsi la solution stock. Ces extraits serviront par la suite pour les tests d'activités sur le champignon MA et pour la recherche de strigolactones par spectrométrie de masse.



## **V.B. Analyse des strigolactones par spectrométrie de masse**

Les extraits d'exsudats racinaires sont analysés par LC-MS/MS en mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM), soit directement soit après une première étape de purification et de fractionnement par HPLC. Dans ce dernier cas les extraits sont repris dans un mélange 50% méthanol/50% eau (v : v) puis ils sont injectés dans l'HPLC. A cette étape, les molécules composant l'extrait racinaire sont séparées à l'aide d'une colonne de chromatographie C18 (ODS-3 4,6x250mm ; Inertsil), qui retient les molécules apolaires. La phase mobile correspond à un gradient de solvant (méthanol/eau) qui permet d'éluer progressivement les molécules à caractère plus en plus hydrophobe. Ce gradient est réalisé comme suit : 50% méthanol pendant 3 min, puis de 50 à 100% méthanol en 40 min, 100% méthanol pendant 20 min, retour à 50% méthanol en 1 min et enfin 50% méthanol pendant 10 min pour la ré-équilibration de la colonne. Le débit d'écoulement de la phase mobile est de 800 µl/min et les différentes fractions sont récoltées toute les 3 min. Les fractions sont ensuite séchées puis analysées par LC-MS/MS (Gomez-Roldan et al., 2008). Les transitions correspondant à toutes les strigolactones connues sont recherchées dans ces extraits, et notamment l'orobanchyl acétate et le 5-deoxystrigol (respectivement 411,1>254,1  $m/z$  et 353>256  $m/z$ ) identifiées chez le tournesol par Yoneyama et al (2011).

## **V.C. Test de ramification sur le champignon MA, *G. rosea***

Le test d'activité est réalisé de la manière décrite par Besserer et al (2008). Des spores stériles de *G. rosea* sont déposées sur du milieu M gélosé contenant 10 µM de quercétine, puis elles sont placées verticalement dans une étuve à 30°C sous 2% de CO<sub>2</sub>, pour une période de 6 jours. Ensuite, l'apex de l'hyphe principal est traité avec 10 µl d'extrait d'exsudats racinaires contenant 10% d'acétonitrile. Les extraits d'exsudats racinaires sont dilués de telle façon que 500 µl de solution corresponde aux exsudats produit par 60 mg de racine sèche. Les boîtes sont replacées dans l'étuve pour 48h dans les mêmes conditions que précédemment. Enfin le nombre de nouveaux apex est déterminé par observation sous la loupe binoculaire.





## VI. Analyse des DCL par spectrométrie de masse

**Préparation des échantillons :** plusieurs méthodes d'extraction à partir d'exsudats racinaires ou directement sur les racines ont été utilisées :

(i) Extraction liquide/liquide : les exsudats racinaires sont obtenus comme décrit précédemment (cf V.A.). Une extraction est réalisée à l'aide d'un volume d'éther de pétrole et la phase organique est conservée. Cette phase est ensuite traitée par un volume de  $K_2HPO_4$  à 0,2M, puis la phase aqueuse est éliminée. Enfin la phase organique est séchée au Rotavapor et les résidus solides obtenus sont repris dans 4 ml d'acétone.

(ii) Utilisation d'une colonne d'extraction en phase solide (EPS) : Les exsudats racinaires bruts obtenus comme décrit au paragraphe V-A sont passés sur une colonne EPS (Oasis® HLB 6cc, Waters) préalablement conditionnée avec 3 ml de méthanol puis 3 ml d'eau UHQ. Cette colonne retient les molécules apolaires contenues dans les exsudats, que l'on élue ensuite avec deux fois 3 ml d'acétone. L'éluat est ensuite séché sous flux d'azote.

(iii) Extraction par trempage : Ici on extrait la DCL directement à partir des racines, sans produire d'exsudats racinaires. Les racines sont séparées de la partie aérienne de la plante. La masse fraîche des racines est mesurée. Pour chaque extraction 20 g de racines sont trempées et agitées pendant 5 min dans 100 ml d'éther de pétrole. L'extrait est ensuite filtré afin d'éliminer les fragments de racines. L'extrait est enfin séché sous flux d'azote.

(iv) Extraction des broyats racinaires : les racines sont broyées dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Ensuite, 15 g de la poudre ainsi obtenue sont repris dans 100 ml d'eau, puis 100 ml d'éther de pétrole sont rajoutés à la solution et le tout est mélangé pendant 5 minutes. Le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre GF/F (Whatman). Puis la phase organique est récupérée et séchée sous flux d'azote.

**Analyse de la DCL par spectrométrie de masse :** les échantillons sont repris dans une solution d'acétonitrile : hexane (1:1 ; v:v), à raison de 10  $\mu$ l pour les exsudats produits par 500



mg de racines sèches, et 1 µl de la solution est injecté. L'analyse est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse. La séparation chromatographique est réalisée à l'aide d'une colonne capillaire ZB-5MS (30 m x 0.25 µm x 0.25 mm, Phenomenex), en utilisant l'hélium comme gaz vecteur à un débit de 1 ml/min. La température du four est maintenue initialement à 60 ° C pendant 2 min, puis elle augmente jusqu'à 340°C à un rythme de 12°C/min. Enfin la détection est réalisée en mode SIM (Selective Ion monitoring), où les ions analysés sont préalablement sélectionnés en fonction leur masse avant d'entrer dans l'analyseur de masse. Le spectromètre de masse est un triple quadrupôle TSQ Quantum (Thermo Scientific), avec une injection en mode splitless à 230°C, une ionisation par impact d'électron à 70 eV et une température de source de 250°C. Le temps de rétention et la masse des ions sont comparés à ceux de la DCL standard (Sigma).

## VII. Préparation des exsudats de champignons MA

Dix milles spores de *R. irregularis* ou 2 000 spores de *G. rosea* sont lavées 2 fois à l'eau UHQ stérile afin d'éliminer un maximum de composés potentiellement présents dans le milieu de stockage. Les spores sont ensuite reprises dans 10 ml d'eau stérile puis déposées dans une boîte de Petri de 55 mm de diamètre. Les boîtes sont ensuite mises à incuber à l'obscurité à 30°C et sous 2% de CO<sub>2</sub> pendant 7 jours. Pendant cette période les spores sont capables de germer et libèrent différents composés dans l'eau. La solution est ensuite filtrée à travers un filtre 0,22 µm, le filtrat constitue la solution « 1X » d'exsudats de spores germées. Cette solution est directement utilisée pour les tests de germination, ou bien diluée 10 ou 100 fois dans de l'eau pour former les solutions « 0,1X » et « 0,01X ».

Pour le fractionnement, des exsudats de *R. irregularis* 1X sont extraits à l'aide d'un volume d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée au Rotavapor. La phase aqueuse est extraite une seconde fois à l'aide d'un volume de butanol et les deux phases obtenues sont séchées au Rotavapor. Les résidus solides obtenus à partir des phases acétate d'éthyle et butanol sont ensuite repris dans 10% d'acétone pour une concentration finale de la solution équivalente à 1 000X. Le résidu solide de la phase aqueuse est repris dans de l'eau pour une concentration finale équivalente à 100X. Ces différentes solutions mères sont ensuite diluées



afin de former des solutions 10X et 1X dans 0,2% d'acétone, enfin elles sont appliquées sur les graines d'orobanche (avec ou sans addition de GR24).

### **VIII. Test de germination des graines de plantes parasites.**

Les tests de germination sont réalisés comme décrit par (Joel et al., 2011) avec des modifications mineures. Les graines sont stérilisées par un traitement à 2,6% NaClO pendant 5 minutes puis elles sont rincées 5 fois avec de l'eau stérile. Pour chaque essai on dépose environ 100 graines sur un disque de papier filtre GF/F de 25 mm de diamètre (Whatman), humidifié avec 500 µl d'eau stérile, dans une boîte de Petri de 35 mm de diamètre. Les boîtes de Petri sont ensuite scellées avec du Parafilm puis elles sont incubées à l'obscurité, à 22°C pour les graines d'orobanche ou à 35°C pour les graines de striga, pendant 11 jours. Ensuite, l'excès d'eau est enlevé de la boîte puis les graines sont traitées avec 500 µl de la solution désirée (solvant seul, GR24 ou exsudats). Les boîtes sont ensuite scellées avec du Parafilm, puis elles sont incubées dans les mêmes conditions que précédemment pendant 8 jours. Enfin, le pourcentage de graines germées est déterminé à l'aide d'une loupe binoculaire. On considère que la graine a germé si l'on observe la sortie de la radicule.

Pour chaque test de germination un lot témoin est traité avec  $10^{-8}$ M de GR24 dissous dans 0,1% d'acétone, ceci correspond au contrôle positif, et un lot est traité avec une solution de 0,1% d'acétone correspondant au contrôle négatif. Les exsudats de tournesol sont dilués de telle façon qu'1 ml de la solution finale corresponde aux exsudats produits par l'équivalent de 4 mg de racine sèche.

Pour les tests de germination en présence d'hyphes extraracinaires en boîte double compartiment, deux conditions sont appliquées :

- (i) Dans un compartiment des racines « hairy » mycorhizées et leur réseau d'hyphes sont présents. Dans le second compartiment il n'y a ni racines « hairy » ni hyphes.
- (ii) Dans un compartiment des racines « hairy » mycorhizés et leur réseau d'hyphes sont présents. Dans le second compartiment on a laissé se développer un réseau d'hyphes du champignon MA mais sans racines « hairy » (cf chap II, Fig.42).

	<b>Concentration finale</b>
<b>CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	0,9 mM
<b>MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	0,48 mM
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,73 mM
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	0,42 mM
<b>Citrate de Fe ammoniacal</b>	0,02 mM
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	0,5mM
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	0,8 μM
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	0,6 μM
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	0,7 μM
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	1,6 μM
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b>	0,5 μM

**Tableau 4 : Composition du milieu Fahraeus. (Fahraeus., 1957)**

Les graines d'*O. cumana* sont préconditionnées comme décrit précédemment. Ensuite, 3 lots d'environ 100 graines sont déposés dans le compartiment de la boîte ne contenant pas de racines « hairy » de carotte, et contenant ou pas des hyphes extraracinaires de champignon MA. Les compartiments ne contenant pas d'hyphes servent de témoin. Les différents lots de graines sont ensuite traités avec 400 µl d'une solution de GR24 à 10<sup>-8</sup>M (dans 0,1% acétone) ou avec 0,1% d'acétone seulement (témoin négatif). Les boîtes sont ensuite scellées à l'aide de Parafilm, puis elles sont incubées à l'obscurité et à 24°C. Le taux de germination est déterminé après 8 jours d'incubation.

## **IX. Test de germination de graines d'*A. thaliana* et de poireau**

Les graines sont stérilisées par un bain de 5 minutes dans une solution à 2,6% de NaClO, puis rincées 3 fois à l'eau stérile et enfin traitées pendant 2 minutes avec de l'éthanol à 96%. Les graines sont ensuite séchées sous hotte. Pour chaque réplicat, 50 graines sont déposées sur milieu M solide, solidifié avec 4 g/l de Phytigel, et placées 48h à 4°C avant traitement. Les graines sont ensuite traitées avec 1ml d'eau (témoin) ou avec 1ml d'exsudats de spores 1X. Puis les graines sont incubées à 25°C, sous une photopériode de 16h, pendant 2 jours pour *A. thaliana* et 10 jours pour le poireau, avant détermination du taux de germination.

## **X. Test de viabilité des graines d'orobanche**

La viabilité des graines d'*O. cumana* est évaluée de deux manières :

Coloration au TTC : le test de viabilité par coloration au 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) est réalisé comme décrit par Thorogood et al (2009). Huit jours après traitement avec des exsudats de *R. irregularis*, les graines d'orobanche sont traitées avec une solution de TTC à 1%, puis les boîtes de Petri sont scellées puis incubées à l'obscurité et à 30°C pendant 24h. La viabilité des graines est vérifiée sous loupe binoculaire : les graines sont considérées comme viables si elles montrent une coloration rouge/rose.





Test de rinçage : en complément du test de coloration au TTC nous avons réalisé un test de germination, comme décrit précédemment (cf point VIII), mais cette fois des graines d'*O. cumana* sont conditionnées dans 500 µl d'exsudats de spores de champignons MA pendant 11 jours. Puis les graines sont rincées abondamment avec de l'eau avant d'être traitées avec  $10^{-8}$  M de GR24.

## **XI. Etude de l'interaction tournesol/*O. cumana* sur racines « hairy »**

**Production des racines « hairy » de tournesol** : des bactéries *A. rhizogenes* (souche Arqua1, résistante à la kanamycine et à la tétracycline) sont mises en culture dans 10 ml de milieu LB liquide contenant 50 mg/l de kanamycine et 10 mg/l de tétracycline. La culture est incubée à 28°C sous agitation pendant 12 heures. Ensuite, 100 µl de la culture sont étalés sur un milieu LB-agar contenant 50 mg/l de kanamycine et 10 mg/l de tétracycline. Les boîtes sont incubées 48h à 28°C (cf chap III, Fig.49).

Des plantules de tournesol sont produites *in vitro* ; après 11 jours de culture elles ont atteint le stade cotylédon. Chaque plantule est sectionnée au niveau de l'hypocotyle à l'aide d'un scalpel et la partie racinaire est éliminée. Puis la partie sectionnée de l'hypocotyle est enrobée d'*A. rhizogenes*, par passage sur le tapis de bactéries obtenu sur milieu solide. Ces plantules sont ensuite déposées dans une boîte de Petri (12x12 cm) contenant du milieu Fahraeus (Tab.4) avec 25 mg/l de kanamycine. Les boîtes sont placées à 25°C en chambre de culture (16h de photopériode). Après trois semaines de culture les racines transformées sont séparées de la plante mère à l'aide d'un scalpel et elles sont transférées dans une boîte de Petri contenant du milieu M (Bécard et Fortin, 1988) (10 g/l de saccharose) avec 400 mg/l d'augmentin le premier mois, puis 200 mg/l d'augmentin le second mois. Les boîtes sont incubées à l'obscurité et à 24°C. Le passage sur l'antibiotique augmentin permet d'éliminer les bactéries *A. rhizogenes*. Enfin, les racines sont cultivées sur milieu M contenant 10 g/l de saccharose et repiquées régulièrement.



**Mise en place du système à deux compartiments :** une boîte de Petri ronde de 55 mm de diamètre, sans son couvercle, est placée dans une boîte de Petri carrée de 12x12 cm. Une fente est ensuite pratiquée sur le bord de la boîte de Petri ronde, ce qui servira à faire passer la racine d'un compartiment à l'autre. Environ 20 ml de milieu M concentré 2 fois contenant 20 g/l de saccharose et 4 g/l de phytigel sont coulés dans la boîte ronde, et du milieu M sans saccharose avec 4 g/l de phytigel est coulé dans la boîte carrée.

Avant repiquage dans ce système, les racines « hairy » sont préalablement cultivées verticalement sur un milieu M concentré 2 fois contenant 20 g/l de saccharose pendant 1 semaine, afin d'obtenir des racines droites et homogènes d'environ 5 cm. Puis, une racine est déposée à cheval entre les 2 compartiments en passant par la fente réalisée sur le bord de la boîte ronde (cf chap III, Fig.51). Après 3 jours de culture à la verticale, des graines d'*O. cumana* stérilisées sont déposées à proximité de la racine « hairy » dans le compartiment sans saccharose (cf chap III, Fig.52). Puis, les boîtes sont incubées verticalement à l'obscurité et à 24°C. La germination, l'attachement et la formation de tubercule sont examinés régulièrement à la loupe binoculaire.

## **XII. Etude histologique**

Des tubercules d'orobanche sont prélevés sur des racines de plantes entières de tournesol (35 jours après inoculation) et sur des racines « hairy » de tournesol (49 jours après inoculation). Les tubercules sont enrobés d'un gel d'agar à 5%. Des coupes transversales de 100 µm sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT 100S). Certaines coupes sont déposées entre lame et lamelle afin d'être observées en fond clair et sous excitation par les UV (excitation : 340-380 nm, émission : long pass 425 nm). D'autres coupes sont colorées au bleu de Toluidine à 1% pendant 10 secondes puis elles sont abondamment rincées à l'eau. Les coupes colorées sont ensuite montées entre lame et lamelle pour être observées au microscope (Leica DM IRBE).



### **XIII. Analyses statistiques**

Toutes les données quantitatives (nombre d'orobanches fixées, pourcentages de germination, biomasses, etc) ont été soumises à une analyse statistique. Dans les cas où les conditions de normalité et d'homoscédasticité sont remplies, les données sont traitées par une analyse de variance (ANOVA), ou bien par un t-test de Student dans le cas d'une comparaison de 2 échantillons. Dans le cas contraire des tests non paramétriques sont utilisés : un test de Wilcoxon est effectué pour une comparaison de 2 échantillons, ou un test de Kruskal-Wallis pour une comparaison multiple (Siegel et Castellan, 1988). Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R version 2.12.1 (<http://www.r-project.org/>).



## Références bibliographiques

---

- Abouzeid, M.A., Boari, A., Zonno, M.C., Vurro, M., and Evidente, A. (2004). Toxicity profiles of potential biocontrol agents of *Orobanche ramosa*. *Weed Science* 52, 326–332.
- Abouzeid, M.A., and El-Tarabily, K.A. (2010). *Fusarium spp.* suppress germination and parasitic establishment of bean and hemp broomrapes. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 51–64.
- Agusti, J., Herold, S., Schwarz, M., Sanchez, P., Ljung, K., Dun, E.A., Brewer, P.B., Beveridge, C.A., Sieberer, T., Sehr, E.M., et al. (2011). Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 20242–20247.
- Ahmed, N.E., Sugimoto, Y., Babiker, A.G.T., Mohamed, O.E., Ma, Y., Inanaga, S., and Nakajima, H. (2001). Effects of *Fusarium solani* isolates and metabolites on *Striga* germination. *Weed Science* 49, 354–358.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., and Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435, 824–827.
- Akiyama, K., Ogasawara, S., Ito, S., and Hayashi, H. (2010). Structural Requirements of Strigolactones for Hyphal Branching in AM Fungi. *Plant and Cell Physiology* 51, 1104–1117.
- Alcántara, E., Morales-García, M., and Díaz-Sánchez, J. (2006). Effects of Broomrape Parasitism on Sunflower Plants: Growth, Development, and Mineral Nutrition. *Journal of Plant Nutrition* 29, 1199–1206.
- Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., Ghisla, S., Bouwmeester, H., Beyer, P., and Al-Babili, S. (2012). The Path from  $\beta$ -Carotene to Carlactone, a Strigolactone-Like Plant Hormone. *Science* 335, 1348–1351.
- Al-Karaki, G.N., and Hammad, R. (2001). Mycorrhizal influence on fruit yield and mineral content of tomato grown under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 24, 1311–1323.
- Allen, M.F., Smith, W.K., Moore, T.S., and Christensen, M. (1981). Comparative water relations and photosynthesis of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Bouteloua gracilis* H.B.K. *Lag Steud. New Phytologist* 88, 683–693.
- Aly, R., Cholakh, H., Joel, D.M., Leibman, D., Steinitz, B., Zelcer, A., Naglis, A., Yarden, O., and Gal-On, A. (2009). Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant Biotechnology Journal* 7, 487–498.
- Aly, R., Goldwasser, Y., Eizenberg, H., Hershenhorn, J., Golan, S., and Kleifeld, Y. (2001). Broomrape (*Orobanche cumana*) Control in Sunflower (*Helianthus annuus*) with Imazapic. *Weed Technology* 15, 306–309.





- Ambrósio, S.R., Oki, Y., Heleno, V.C.G., Chaves, J.S., Nascimento, P.G.B.D., Lichston, J.E., Constantino, M.G., Varanda, E.M., and Da Costa, F.B. (2008). Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry* 69, 2052–2060.
- Andolfi, A., Boari, A., Evidente, A., and Vurro, M. (2005). Metabolites inhibiting Germination of *Orobanche ramosa* seeds produced by *Myrothecium verrucaria* and *Fusarium compactum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1598–1603.
- Arite, T., Umehara, M., Ishikawa, S., Hanada, A., Maekawa, M., Yamaguchi, S., and Kyojuka, J. (2009). d14, a Strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant and Cell Physiology* 50, 1416–1424.
- Augé, R.M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3–42.
- Auger, B., Pouvreau, J.-B., Pouponneau, K., Yoneyama, K., Montiel, G., Le Bizec, B., Yoneyama, K., Delavault, P., Delourme, R., and Simier, P. (2012). Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Azcón-Aguilar, C., Padilla, I.G., Encina, C.L., Azcon, R., and Barea, J.M. (1996). Arbuscular mycorrhizal inoculation enhances plant growth and changes root system morphology. *Agronomie : Plant Genetics and Breeding* 16, 647–652.
- Babiker, A.G.T., Hamdoun, A.M., Rudwan, A., Mansi, N.G., and Faki, H.H. (1987). Influence of soil moisture on activity and persistence of the strigol analogue GR 24. *Weed Research* 27, 173–178.
- Babiker, A.G.T., Ma, Y., Sugimoto, Y., and Inanaga, S. (2000). Conditioning period, CO<sub>2</sub> and GR24 influence ethylene biosynthesis and germination of *Striga hermonthica*. *Physiologia Plantarum* 109, 75–80.
- Bago, B., Pfeffer, P.E., and Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124, 949–958.
- Balzergue, C., Puech-Pagès, V., Bécard, G., and Rochange, S.F. (2011). The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of Experimental Botany* 62, 1049–1060.
- Bashan, Y., Holguin, G., and de-Bashan, L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50, 521–577.
- Bebawi, F.F., Eplee, R.E., Harris, C.E., and Norris, R.S. (1984). Longevity of witchweed (*Striga asiatica*) seed. *Weed Science* 494–497.
- Bécard, G., and Fortin, J.A. (1988b). Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108, 211–218.



- Bécard, G., and Piché, Y. (1989a). Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 2320–2325.
- Bécard, G., and Piché, Y. (1989b). New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular—arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* 112, 77–83.
- Bécard, G., and Piché, Y. (1990). Physiological factors determining vesicular—arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. *Canadian Journal of Botany* 68, 1260–1264.
- Besserer, A., Becard, G., Jauneau, A., Roux, C., and Séjalon-Delmas, N. (2008). GR24, a Synthetic Analog of Strigolactones, Stimulates the Mitosis and Growth of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora rosea* by Boosting Its Energy Metabolism. *Plant Physiology* 148, 402–413.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.-C., Roux, C., Bécard, G., and Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* 4, e226.
- Boari, A., and Vurro, M. (2004). Evaluation of *Fusarium spp.* and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*). *Biological Control* 30, 212–219.
- Boddington, C.L., and Dodd, J.C. (2002). Evidence that differences in phosphate metabolism in mycorrhizas formed by species of *Glomus* and *Gigaspora* might be related to their life-cycle strategies. *New Phytologist* 142, 531–538.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 695–700.
- Bonfante, P., and Anca, I.-A. (2009). Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology* 63, 363–383.
- Bonfante, P., and Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1, 1–11.
- Bonfante, P., and Requena, N. (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 451–457.
- Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Masion, K., Biligui, B., Monestiez, M., Pennarun, A.M., Amiar, Z., Rona, J.P., Ouhdouch, Y., El Hadrami, I., et al. (2006). A putative role for fusaric acid in biocontrol of the parasitic angiosperm *Orobanche ramosa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 550–556.
- Bouwmeester, H.J., Matusova, R., Zhongkui, S., and Beale, M.H. (2003). Secondary metabolite signalling in host–parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 358–364.



- Bouwmeester, H.J., Roux, C., Lopez-Raez, J.A., and Bécard, G. (2007). Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* 12, 224–230.
- Brundrett, M.C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320, 37–77.
- Buée, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R., and Bécard, G. (2000). The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 693–698.
- Burleigh, S.H., Cavagnaro, T., and Jakobsen, I. (2002). Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. *Journal of Experimental Botany* 53, 1593–1601.
- Campos-Soriano, L., García-Garrido, J.M., and Segundo, B.S. (2010). Activation of basal defense mechanisms of rice plants by *Glomus intraradices* does not affect the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 188, 597–614.
- Campos-Soriano, L., García-Martínez, J., and Segundo, B.S. (2012). The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular Plant Pathology* 13, 579–592.
- Chae, S.H., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., and Joel, D.M. (2004). Fluridone and norflurazon, carotenoid-biosynthesis inhibitors, promote seed conditioning and germination of the holoparasite *Orobancha minor*. *Physiologia Plantarum* 120, 328–337.
- Chang, S.X., and Robison, D.J. (2003). Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. *Forest Ecology and Management* 181, 331–338.
- Chaturvedi, D. (2011). Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 313–334.
- Clark, R.B., and Zeto, S.K. (2000). Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* 23, 867–902.
- Cook, C.E., Whichard, L.P., Turner, B., Wall, M.E., and Egley, G.H. (1966). Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* 154, 1189–1190.
- Cooper, J.E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1355–1365.
- Coste, S., Baraloto, C., Leroy, C., Marcon, É., Renaud, A., Richardson, A.D., Roggy, J.-C., Schimann, H., Uddling, J., and Hérault, B. (2010). Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. *Annals of Forest Science* 67, 607–607.



- Crush, J.R. (1974). Plant Growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. *New Phytologist* *73*, 743–749.
- Dalpé, Y. (1990). *Endogone pisiformis* : croissance, morphologie et conservation des cultures. *Canadian Journal of Botany* *68*, 910–915.
- Declerck, S., and Angelo-Van Coppenolle, M. (2000). Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* *148*, 169–176.
- Declerck, S., Strullu, D.G., and Plenchette, C. (1996). In vitro mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycological Research* *100*, 1237–1242.
- Delaux, P.-M., Xie, X., Timme, R.E., Puech-Pages, V., Dunand, C., Lecompte, E., Delwiche, C.F., Yoneyama, K., Bécard, G., and Séjalon-Delmas, N. (2012). Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytologist* *195*, 857–871.
- Delavault, P., Simier, P., Thoiron, S., Véronési, C., Fer, A., and Thalouarn, P. (2002). Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in broomrape (*Orobancha ramosa*) parasitic on tomato roots. *Physiologia Plantarum* *115*, 48–55.
- Dicu, G., Teodorescu, E.A., Dumitrescu, N.C., Boache, N., and Ionita, M. (2011). Research regarding the virulence of broomrape parasit (*Orobancha cumana* Wallr.) in southEastern of Romania. *UASVM Bucharest* *54*.
- Dodd, J.C., Burton, C.C., Burns, R.G., and Jeffries, P. (1987). Phosphatase activity associated with the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* *107*, 163–172.
- Dor, E., Yoneyama, K., Wininger, S., Kapulnik, Y., Yoneyama, K., Koltai, H., Xie, X., and Hershenhorn, J. (2011). Strigolactone deficiency confers resistance in tomato line SL-ORT1 to the parasitic weeds *Phelipanche* and *Orobancha* spp. *Phytopathology* *101*, 213–222.
- Draie, R., Péron, T., Pouvreau, J.B., Véronési, C., Jégou, S., Delavault, P., Thoiron, S., and Simier, P. (2011). Invertases involved in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa*: Characterization of the dominant soluble acid isoform, PrSAII. *Molecular Plant Pathology* *12*, 638–652.
- Echevarria-Zomeno, S., Perez-de-Luque, A., Jorin, J., and Maldonado, A.M. (2006). Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobancha cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. *Journal of Experimental Botany* *57*, 4189–4200.
- Eizenberg, H., Goldwasser, Y., Golan, S., Plakhine, D., and Hershenhorn, J. (2004). Egyptian Broomrape (*Orobancha aegyptiaca*) Control in Tomato with Sulfonylurea Herbicides—Greenhouse Studies. *Weed Technology* *18*, 490–496.
- Eizenberg, H., Plakhine, D., Hershenhorn, J., Kleifeld, Y., and Rubin, B. (2003). Resistance to broomrape (*Orobancha* spp.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) is temperature dependent. *Journal of Experimental Botany* *54*, 1305–1311.





- Estabrook, E.M., and Yoder, J.I. (1998). Plant-plant communications: rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts. *Plant Physiology* 116, 1–7.
- Evidente, A., Fernández-Aparicio, M., Andolfi, A., Rubiales, D., and Motta, A. (2007). Trigoxazonane, a monosubstituted trioxazonane from *Trigonella foenum-graecum* root exudate, inhibits *Orobancha crenata* seed germination. *Phytochemistry* 68, 2487–2492.
- Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology* 16, 374–381.
- Feng, G., Zhang, F.S., Li, X.L., Tian, C.Y., Tang, C., and Rengel, Z. (2002). Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* 12, 185–190.
- Fernández-Aparicio, M., Andolfi, A., Cimmino, A., Rubiales, D., and Evidente, A. (2008). Stimulation of seed germination of *Orobancha* Species by Ophiobolin A and Fusicoccin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8343–8347.
- Fernández-Aparicio, M., Emeran, A.A., and Rubiales, D. (2010a). Inter-cropping with berseem clover (*Trifolium alexandrinum*) reduces infection by *Orobancha crenata* in legumes. *Crop Protection* 29, 867–871.
- Fernandez-Aparicio, M., Flores, F., and Rubiales, D. (2008). Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobancha* and *Phelipanche*) species. *Annals of Botany* 103, 423–431.
- Fernández-Aparicio, M., García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A., and Rubiales, D. (2010b). Colonisation of field pea roots by arbuscular mycorrhizal fungi reduces *Orobancha* and *Phelipanche* species seed germination. *Weed Research* 50, 262–268.
- Fernandez-Aparicio, M., Rispaill, N., Prats, E., Morandi, D., García-Garrido, J.M., Dumas-Gaudot, E., Duc, G., and Rubiales, D. (2010). Parasitic plant infection is partially controlled through symbiotic pathways. *Weed Research* 50, 76–82.
- Fernández-Aparicio, M., Yoneyama, K., and Rubiales, D. (2010c). The role of strigolactones in host specificity of *Orobancha* and *Phelipanche* seed germination. *Seed Science Research* 21, 55–61.
- Fernández-Martínez, J., Melero-Vara, J., Muñoz-Ruz, J., Ruso, J., and Domínguez, J. (2000). Selection of wild and cultivated sunflower for resistance to a new broomrape race that overcomes resistance of the gene. *Crop Science* 40, 550–555.
- Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171, 501–523.
- Fiorilli, V., Catoni, M., Francia, D., Cardinale, F., and Lanfranco, L. (2011). The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants infected by *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology* 93, 237–242.
- Fischer, N.H., Weidenhamer, J.D., and Bradow, J.M. (1989). Dihydroparthenolide and other sesquiterpene lactones stimulate witchweed germination. *Phytochemistry* 28, 2315–2317.



- Fischer, N.H., Weidenhamer, J.D., Riopel, J.L., Quijano, L., and Menelaou, M.A. (1990). Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study. *Phytochemistry* 29, 2479–2483.
- Fortin, J.A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A.P., and Piché, Y. (2002). Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany* 80, 1–20.
- Galindo, J.C.G., De Luque, A.P., Jorrín, J., and Macías, F.A. (2002). SAR studies of sesquiterpene lactones as *Orobancha cumana* seed germination stimulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1911–1917.
- Gamalei, Y.V., Pakhomova, M.V., and Sheremet'ev, S.N. (2007). Ecological evolution of the phloem of dicotyledonous plants. *Doklady Biological Sciences* 416, 364–367.
- García-Garrido, J.M., and Ocampo, J.A. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 53, 1377–1386.
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D.G., and Bonfante, P. (2008). Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell* 20, 1407–1420.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., and Barker, D.G. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* Root epidermal cells before infection. *The Plant Cell* 17, 3489–3499.
- Gibot-Leclerc, S., Sallé, G., Reboud, X., and Moreau, D. (2012). What are the traits of *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel that contribute to the success of its biological cycle on its host *Brassica napus* L.? *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*.
- Giovannetti, M., and Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84, 489–500.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernesi, A.S., and Logi, C. (1993). Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist* 125, 587–593.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Citernesi, A.S., and Avio, L. (1996). Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 133, 65–71.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., and Logi, C. (1994). Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 127, 703–709.
- Goldwasser, Y., Plakhine, D., and Yoder, J.I. (2000). *Arabidopsis thaliana* susceptibility to *Orobancha* spp. *Weed Science* 48, 342–346.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.-P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.-C., et al. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, 189–194.



- Gonzalez-Verdejo, C.I., Barandiaran, X., Moreno, M.T., Cubero, J.I., and Di Pietro, A. (2006). A peroxidase gene expressed during early developmental stages of the parasitic plant *Orobancha ramosa*. *Journal of Experimental Botany* 57, 185–192.
- Göpfert, J.C., MacNevin, G., Ro, D.K., and Spring, O. (2009). Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitata glandular trichomes. *BMC Plant Biology* 9, 86.
- Graham, J.H., Leonard, R.T., and Menge, J.A. (1981). Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiology* 68, 548.
- Graves, J.D., Press, M.C., and Stewart, G.R. (1989). A carbon balance model of the sorghum-*Striga hermonthica* host-parasite association. *Plant, Cell and Environment* 12, 101–107.
- Grenz, J.H., Iştoc, V.A., Manschadi, A.M., and Sauerborn, J. (2008). Interactions of sunflower (*Helianthus annuus*) and sunflower broomrape (*Orobancha cumana*) as affected by sowing date, resource supply and infestation level. *Field Crops Research* 107, 170–179.
- Gulya, T.J. (2002). Efficacy of single and two-way fungicide seed treatments for the control of metelaxyl-resistant strains of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). The BCPC Conference : Pests and diseases 575–580.
- Gurney, A.L., Press, M.C., and Scholes, J.D. (1999). Infection time and density influence the response of sorghum to the parasitic angiosperm *Striga hermonthica*. *New Phytologist* 143, 573–580.
- Gurney, A.L., Slate, J., Press, M.C., and Scholes, J.D. (1995). A novel form of resistance in rice to the angiosperm parasite *Striga hermonthica*. *New Phytologist* 169, 199–208.
- Gutjahr, C., Novero, M., Guether, M., Montanari, O., Udvardi, M., and Bonfante, P. (2009). Presymbiotic factors released by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* induce starch accumulation in *Lotus japonicus* roots. *New Phytologist* 183, 53–61.
- Gworgwor, N.A., and Weber, H.C. (2003). Arbuscular mycorrhizal fungi-parasite-host interaction for the control of *Striga hermonthica* (Del.) Benth. in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Mycorrhiza* 13, 277–281.
- Hahn, M., and Mendgen, K. (2001). Signal and nutrient exchange at biotrophic plant–fungus interfaces. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 322–327.
- Hamiaux, C., Drummond, R.S.M., Janssen, B.J., Ledger, S.E., Cooney, J.M., Newcomb, R.D., and Snowden, K.C. (2012). DAD2 is an  $\alpha/\beta$  Hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, Strigolactone. *Current Biology*.
- Harrier, L.A., and Watson, C.A. (2004). The potential role of arbuscular mycorrhizal(AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Management Science* 60, 149–157.
- Harrison, M.J., Dewbre, G.R., and Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell* 14, 2413–2429.



- Hassan, E.A., El-Akkad, S.S., Moustafa, S.M., and El-Awadi, M.E. (2004). Histochemical aspects of penetration and vascular connection of broomrape haustoria in the host root, and the possible implication of phenylpropanoids. *International Journal of Agriculture and Biology* 6, 430–434.
- Hassan, M.M., Abdelhalim, T.S., Yagoub, S.O., Osman, A.G., El, M., Gain, A., and Babiker, A.G.T. (2011). Effects of Arbuscular Mycorrhiza Fungi (AMF), Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR) and interaction on *Striga Hermonthica* management in sorghum. *International Journal of Agriculture: Research and Review* 1, 107–115.
- Hayman, D.S. (1974). Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 73, 71–80.
- Heide-Jorgensen, H.S., and Kuijt, J. (1995). The haustorium of the root parasite *Triphysaria* (Scrophulariaceae), with special reference to xylem bridge ultrastructure. *American Journal of Botany* 82, 782–797.
- Helber, N., Wippel, K., Sauer, N., Schaarschmidt, S., Hause, B., and Requena, N. (2011). A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus sp* is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant Cell* 23, 3812–3823.
- Hewitt, E.J. (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureau.
- Hibberd, J.M., and Jeschke, W.D. (2001). Solute flux into parasitic plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 2042–2049.
- Hibberd, J.M., Quick, W.P., Press, M.C., and Scholes, J.D. (1998). Can source–sink relations explain responses of tobacco to infection by the root holoparasitic angiosperm *Orobancha cernua*? *Plant, Cell & Environment* 21, 333–340.
- Hibberd, J.M., Quick, W.P., Press, M.C., Scholes, J.D., and Jeschke, W.D. (1999). Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm *Orobancha cernua* and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. *Plant, Cell and Environment* 22, 937–947.
- Hiraoka, Y., and Sugimoto, Y. (2008). Molecular Responses of Sorghum to Purple Witchweed (*Striga hermonthica*) Parasitism. *Weed Science* 56, 356–363.
- Hladni, N., Skorić, D., and Kraljević-Balalić, M. (2003). Components of phenotypic variability for head diameter in sunflower-*Helianthus annuus* L. *Genetika* 35, 67–75.
- Hol, W.H., and Cook, R. (2005). An overview of arbuscular mycorrhizal fungi-nematode interactions. *Basic and Applied Ecology* 6, 489–503.
- Hu, Z., Yan, H., Yang, J., Yamaguchi, S., Maekawa, M., Takamura, I., Tsutsumi, N., Kyozuka, J., and Nakazono, M. (2010). Strigolactones negatively regulate mesocotyl elongation in rice during germination and growth in darkness. *Plant and Cell Physiology* 51, 1136–1142.
- Hull, R.J., and Leonard, O.A. (1964). Physiological aspects of parasitism in mistletoes (*Arceuthobium* and *Phoradendron*). I. The carbohydrate nutrition of mistletoe. *Plant Physiology* 39, 996.





- Ijdo, M., Cranenbrouck, S., and Declerck, S. (2011). Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza* 21, 1–16.
- Jamil, M., Charnikhova, T., Verstappen, F., and Bouwmeester, H. (2010). Carotenoid inhibitors reduce strigolactone production and *Striga hermonthica* infection in rice. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 504, 123–131.
- Jamil, M., Kanampiu, F.K., Karaya, H., Charnikhova, T., and Bouwmeester, H.J. (2012). *Striga hermonthica* parasitism in maize in response to N and P fertilisers. *Field Crops Research* 134, 1–10.
- Jamil, M., Rodenburg, J., Charnikhova, T., and Bouwmeester, H.J. (2011). Pre-attachment *Striga hermonthica* resistance of New Rice for Africa (NERICA) cultivars based on low strigolactone production. *New Phytologist* 192, 964–975.
- Joel, D.M., Chaudhuri, S.K., Plakhine, D., Ziadna, H., and Steffens, J.C. (2011). Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobancha cumana*. *Phytochemistry* 72, 624–634.
- Johansen, A., Jakobsen, I., and Jensen, E.S. (1993). Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biology and Fertility of Soils* 16, 66–70.
- Johnson, A.W., Rosebery, G., and Parker, C. (1976). A novel approach to *Striga* and *Orobancha* control using synthetic germination stimulants. *Weed Research* 16, 223–227.
- Kapulnik, Y., Delaux, P.-M., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Wininger, S., Bhattacharya, C., Séjalon-Delmas, N., Combier, J.-P., Bécard, G., Belausov, E., et al. (2011). Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* 233, 209–216.
- Keyes, W.J., O'Malley, R.C., Kim, D., and Lynn, D.G. (2000). Signaling organogenesis in parasitic angiosperms: xenognosin generation, perception, and response. *Journal of Plant Growth Regulation* 19, 217–231.
- Kgosi, R.L., Zwanenburg, B., Mwakaboko, A.S., and Murdoch, A.J. (2012). Strigolactone analogues induce suicidal seed germination of *Striga spp.* in soil. *Weed Research* 52, 197–203.
- Khan, Z.R., Pickett, J.A., Hassanali, A., Hooper, A.M., and Midega, C.A.O. (2008). *Desmodium* species and associated biochemical traits for controlling *Striga* species: present and future prospects. *Weed Research* 48, 302–306.
- Kim, E.J., Lim, S.S., Park, S.Y., Shin, H.-K., Kim, J.-S., and Park, J.H.Y. (2008). Apoptosis of DU145 human prostate cancer cells induced by dehydrocostus lactone isolated from the root of *Saussurea lappa*. *Food and Chemical Toxicology* 46, 3651–3658.
- Kim, H.I., Xie, X., Kim, H.S., Chun, J.C., Yoneyama, K., Nomura, T., Takeuchi, Y., and Yoneyama, K. (2010). Structure–activity relationship of naturally occurring strigolactones in *Orobancha minor* seed germination stimulation. *Journal of Pesticide Science* 35, 344–347.
- Kistner, C., and Parniske, M. (2002). Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends in Plant Science* 7, 511–518.



- Kjøller, R., and Rosendahl, S. (2000). Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biology and Fertility of Soils* 31, 361–365.
- Kohlen, W., Charnikhova, T., Lammers, M., Pollina, T., Tóth, P., Haider, I., Pozo, M.J., Maagd, R.A., Ruyter-Spira, C., Bouwmeester, H.J., et al. (2012). The tomato Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8 (SICCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytologist* 196, 535–547.
- Kosuta, S., Chabaud, M., Loughon, G., Gough, C., Dénarié, J., Barker, D.G., and Bécard, G. (2003). A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 131, 952–962.
- Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V., and Gianinazzi, S. (1987). Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide applications. *New Phytologist* 106, 707–715.
- Kubo, M., Ueda, H., Park, P., Kawaguchi, M., and Sugimoto, Y. (2009). Reactions of *Lotus japonicus* ecotypes and mutants to root parasitic plants. *Journal of Plant Physiology* 166, 353–362.
- Kuhn, H., Küster, H., and Requena, N. (2010). Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 185, 716–733.
- Labrousse, P., Arnaud, M., Griveau, Y., Fer, A., and Thalouarn, P. (2004). Analysis of resistance criteria of sunflower recombined inbred lines against *Orobanche cumana* Wallr. *Crop Protection* 23, 407–413.
- Labrousse, P., Arnaud, M.C., Serieys, H., Bervillé, A., and Thalouarn, P. (2001). Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. *Annals of Botany* 88, 859–868.
- Labrousse, P., delmail, D., Arnaud, M.C., and Thalouarn, P. (2010). Mineral nutrient concentration influences sunflower infection by broomrape (*Orobanche cumana*). *Botany* 88, 839–849.
- Lalaymia, I., Cranenbrouck, S., Draye, X., and Declerck, S. (2012). Preservation at ultra-low temperature of in vitro cultured arbuscular mycorrhizal fungi via encapsulation-drying. *Fungal Biology*.
- Lambers, H. (2006). Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany* 98, 693–713.
- Lenzemo, V., Kuyper, T.W., and Vierheilig, H. (2009). Striga seed-germination activity of root exudates and compounds present in stems of *Striga* host and nonhost (trap crop) plants is reduced due to root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 19, 287–294.



- Lenzemo, V.W., and Kuyper, T.W. (2001). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on damage by *Striga hermonthica* on two contrasting cultivars of sorghum, *Sorghum bicolor*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 87, 29–35.
- Lenzemo, V.W., Kuyper, T.W., Matusova, R., Bouwmeester, H.J., and Van Ast, A. (2007). Colonization by arbuscular mycorrhizal fungi of sorghum leads to reduced germination and subsequent attachment and emergence of *Striga hermonthica*. *Plant Signaling & Behavior* 2, 58–62.
- Letousey, P., De Zélicourt, A., Vieira Dos Santos, C., Thoiron, S., Monteau, F., Simier, P., Thalouarn, P., and Delavault, P. (2007). Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathology* 56, 536–546.
- Li, J., and Timko, M.P. (2009). Gene-for-Gene resistance in striga-cowpea associations. *Science* 325, 1094–1094.
- Lima, P.T., Faria, V.G., Patraquim, P., Ramos, A.C., Feijó, J.A., and Sucena, É. (2009). Plant-microbe symbioses: new insights into common roots. *BioEssays* 31, 1233–1244.
- Lin, H., Wang, R., Qian, Q., Yan, M., Meng, X., Fu, Z., Yan, C., Jiang, B., Su, Z., Li, J., et al. (2009). DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *The Plant Cell* 21, 1512–1525.
- Linkies, A., and Leubner-Metzger, G. (2011). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* 31, 253–270.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D., and Harrison, M.J. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50, 529–544.
- Lodwig, E.M., Hosie, A.H.F., Bourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J.A., and Poole, P.S. (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* 422, 722–726.
- Logan, D.C., and Stewart, G.R. (1991). Role of ethylene in the germination of the hemiparasite *Striga hermonthica*. *Plant Physiology* 97, 1435–1438.
- López-Granados, F., and García-Torres, L. (1999). Longevity of crenate broomrape (*Orobanche crenata*) seed under soil and laboratory conditions. *Weed Science* 47, 161–166.
- López-Ráez, J.A., Charnikhova, T., Fernández, I., Bouwmeester, H., and Pozo, M.J. (2011). Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of Plant Physiology* 168, 294–297.
- López-Ráez, J.A., Charnikhova, T., Gómez-Roldán, V., Matusova, R., Kohlen, W., De Vos, R., Verstappen, F., Puech-Pages, V., Bécard, G., Mulder, P., et al. (2008). Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist* 178, 863–874.



- Luna-Herrera, J., Costa, M.C., Gonzalez, H.G., Rodrigues, A.I., and Castilho, P.C. (2007). Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus spp.* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 548–552.
- Lynn, D.G., Steffens, J.C., Kamut, V.S., Graden, D.W., Shabanowitz, J., and Riopel, J.L. (1981). Isolation and characterization of the first host recognition substance for parasitic angiosperms. *Journal of the American Chemical Society* 103, 1868–1870.
- Mabrouk, Y., Simier, P., Arfaoui, A., Sifi, B., Delavault, P., Zourgui, L., and Belhadj, O. (2007a). Induction of phenolic compounds in pea (*Pisum sativum L.*) inoculated by *Rhizobium leguminosarum* and infected with *Orobanche crenata*. *Journal of Phytopathology* 155, 728–734.
- Mabrouk, Y., Simier, P., Delavault, P., Delgrange, S., Sifi, B., Zourgui, L., and Belhadj, O. (2007b). Molecular and biochemical mechanisms of defence induced in pea by *Rhizobium leguminosarum* against *Orobanche crenata*. *Weed Research* 47, 452–460.
- Macías, F.A., Fernández, A., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., Torres, A., and Alves, P.L.C.A. (2006). Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals. *Journal of Natural Products* 69, 795–800.
- Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., and Castellano, D. (2000). Dehydrozaluzeanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. *Phytochemistry* 54, 165–171.
- Macías, F.A., García-Díaz, M.D., Pérez-de-Luque, A., Rubiales, D., and Galindo, J.C.G. (2009). New Chemical Clues for Broomrape-Sunflower Host- Parasite Interactions: Synthesis of Guaianestrigeolactones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5853–5864.
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., et al. (2011). Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469, 58–63.
- Matusova, R., Rani, K., Verstappen, W.A., Franssen, M.C.R., Beale, M.H., and Bouwmeester, H.J. (2005). The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche spp.* are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* 139, 920–934.
- Mauromicale, G., Monaco, A.L., and Longo, A.M.G. (2008). Effect of branched broomrape (*Orobanche ramosa*) infection on the growth and photosynthesis of tomato. *Weed Science* 56, 574–581.
- Mauromicale, G., Monaco, A.L., Longo, A.M.G., and Restuccia, A. (2005). Soil solarization, a nonchemical method to control branched broomrape (*Orobanche ramosa*) and improve the yield of greenhouse tomato. *Weed Science* 53, 877–883.
- Mayzlish-Gati, E., LekKala, S.P., Resnick, N., Winger, S., Bhattacharya, C., Lemcoff, J.H., Kapulnik, Y., and Koltai, H. (2010). Strigolactones are positive regulators of light-harvesting genes in tomato. *Journal of Experimental Botany* 61, 3129–3136.





- Mc Caig, A.E., Glover, L.A., and Prosser, J.I. (1999). Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1721–1730.
- Mena-Violante, H.G., Ocampo-Jiménez, O., Dendooven, L., Martínez-Soto, G., González-Castañeda, J., Davies, F.T., and Olalde-Portugal, V. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance fruit growth and quality of chile ancho (*Capsicum annuum* L. cv San Luis) plants exposed to drought. *Mycorrhiza* 16, 261–267.
- Meng, J.C., Hu, Y.F., Chen, J.H., and Tan, R.X. (2001). Antifungal highly oxygenated guaianolides and other constituents from *Ajania fruticulosa*. *Phytochemistry* 58, 1141–1145.
- Menge, J.A. (1983). Utilization of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. *Canadian Journal of Botany* 61, 1015–1024.
- Miché, L., Bouillant, M.L., Rohr, R., Sallé, G., and Bally, R. (2000). Physiological and cytological studies on the inhibition of *Striga* seed germination by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *European Journal of Plant Pathology* 106, 347–351.
- Miller, R.M., Jastrow, J.D., and Reinhardt, D.R. (1995). External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103, 17–23.
- Mohamed, A., Ellicott, A., Housley, T.L., and Ejeta, G. (2003). Hypersensitive Response to infection in sorghum. *Crop Science* 43, 1320–1324.
- Mohamed, K.I., Papes, M., Williams, R., Benz, B.W., and Peterson, A.T. (2006). Global invasive potential of 10 parasitic witchweeds and related *Orobanchaceae*. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 35, 281–288.
- Molinero-Ruiz, M., Pérez-Vich, B., Pineda-Martos, R., and Melero-Vara, J.M. (2008). Indigenous highly virulent accessions of the sunflower root parasitic weed *Orobanche cumana*. *Weed Research* 48, 169–178.
- Morton, J.B., and Benny, G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* 37, 471–491.
- Mosse, B. (1973). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 72, 127–136.
- Müller-Stöver, D., and Kroschel, J. (2005). The potential of *Ulocladium botrytis* for biological control of *Orobanche spp.* *Biological Control* 33, 301–306.
- Nagahashi, G., and Douds, D.D. (2000). Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research* 104, 1453–1464.
- Nagy, R., Drissner, D., Amrhein, N., Jakobsen, I., and Bucher, M. (2009). Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is phosphorus-repressible and transcriptionally regulated. *New Phytologist* 181, 950–959.



- Netzly, D.H., Riopel, J.L., Ejeta, G., and Butler, L.G. (1988). Germination stimulants of witchweed (*Striga asiatica*) from hydrophobic root exudate of sorghum (*Sorghum bicolor*). *Weed Science* 36, 441–446.
- Nickrent, D.L., Duff, R.J., Colwell, A.E., Wolfe, A.D., Young, N.D., Steiner, K.E., and dePamphilis, C.W. (1997). Molecular phylogenetic and evolutionary studies of parasitic plants. *Molecular Systematics of Plants II* 211–241.
- Nun, N.B., and Mayer, A.M. (1993). Preconditioning and germination of *Orobanch*e seeds: Respiration and protein synthesis. *Phytochemistry* 34, 39–45.
- Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, K., Boller, T., and Wiemken, A. (2004). Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138, 574–583.
- Oláh, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarié, J., and Gough, C. (2005). Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* 44, 195–207.
- Olsson, P.A., Baath, E., Jakobsen, I., and Söderström, B. (1995). The use of phospholipid and neutral lipid fatty acids to estimate biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Mycological Research* 99, 623–629.
- Olsson, P.A., Thingstrup, I., Jakobsen, I., and Baath, E. (1999). Estimation of the biomass of arbuscular fungi in a linseed field. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1879–1887.
- Othira, J.O., Omolo, J.O., Wachira, F.N., and Onek, L.A. (2012). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in protection of maize (*Zea mays* L.) against witchweed (*Striga hermonthica* Del Benth) infestation. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development* 4, 37–44.
- Parker, C. (2009). Observations on the current status of *Orobanch*e and *Striga* problems worldwide. *Pest Management Science* 65, 453–459.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6, 763–775.
- Perez-de-Luque, A. (2006). Mucilage production during the incompatible interaction between *Orobanch*e *crenata* and *Vicia sativa*. *Journal of Experimental Botany* 57, 931–942.
- Pérez-de-Luque, A., Eizenberg, H., Grenz, J.H., Sillero, J.C., Ávila, C., Sauerborn, J., and Rubiales, D. (2010). Broomrape management in faba bean. *Field Crops Research* 115, 319–328.
- Perez-de-Luque, A., Galindo, J.C.G., Macias, F.A., and Jorrín, J. (2000). Sunflower sesquiterpene lactone models induce *Orobanch*e *cumana* seed germination. *Phytochemistry* 53, 45–50.
- Pérez-Vich, B., Akhtouch, B., Knapp, S.J., Leon, A.J., Velasco, L., Fernandez-Martinez, J.M., and Berry, S.T. (2004). Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanch*e *cumana* Wallr.) resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 92–102.



- Péron, T., Véronési, C., Mortreau, E., Pouvreau, J.-B., Thoiron, S., Leduc, N., Delavault, P., and Simier, P. (2012). Role of the sucrose synthase encoding PrSus1 Gene in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* L. (Pomel). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 402–411.
- Pickett, J.A., Hamilton, M.L., Hooper, A.M., Khan, Z.R., and Midega, C.A.O. (2010). Companion cropping to manage parasitic plants. *Annual Review of Phytopathology* 48, 161–177.
- Picman, A.K. (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology* 14, 255–281.
- Plakhine, D., Ziadna, H., and Joel, D.M. (2009). Is seed conditioning essential for *Orobanche* germination? *Pest Management Science* 65, 492–496.
- Plenchette, C., and Duponnois, R. (2005). Growth response of the saltbush *Atriplex nummularia* L. to inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Journal of Arid Environments* 61, 535–540.
- Porcel, R., and Ruiz-Lozano, J.M. (2004). Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 55, 1743–1750.
- Pumplin, N., and Harrison, M.J. (2009). Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 151, 809–819.
- Pustovoit, V.S. (1966). Selection, seed culture and some agrotechnical problems of sunflower. (Delhi, India).
- Rao, K.S., and Rohini, V.K. (1999). *Agrobacterium*-mediated transformation of Sunflower (*Helianthus annuus* L.): A simple protocol. *Annals of Botany* 83, 347–354.
- Rasmussen, A., Mason, M.G., De Cuyper, C., Brewer, P.B., Herold, S., Agusti, J., Geelen, D., Greb, T., Goormachtig, S., Beeckman, T., et al. (2012). Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and Pea. *Plant Physiology* 158, 1976–1987.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., and Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 11841.
- Rich, P.J., Grenier, C., and Ejeta, G. (2004). *Striga* resistance in the wild relatives of sorghum. *Crop Science* 44, 2221–2229.
- Riely, B.K., Ané, J.-M., Penmetsa, R.V., and Cook, D.R. (2004). Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 408–413.
- Rivera-Becerril, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J.-P., Belimov, A.A., Gianinazzi, S., Strasser, R.J., and Gianinazzi-Pearson, V. (2002). Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany* 53, 1177–1185.



- Rubiales, D., Fernández-Aparicio, M., Wegmann, K., and Joel, D.M. (2009). Revisiting strategies for reducing the seedbank of *Orobanch*e and *Phelipanche* spp. *Weed Research* 49, 23–33.
- Rungmekarat, S., Iino, M., Sato, M., Takahashi, T., Natsuaki, T., Takeuchi, Y., and Yoneyama, K. (2007). Characterization of mRNAs encoding ethylene biosynthesis enzymes in the root holoparasitic plants *Orobanch*e. *Journal of Pesticide Science* 32, 24–31.
- Ruyter-Spira, C., Kohlen, W., Charnikhova, T., Van Zeijl, A., Van Bezouwen, L., De Ruijter, N., Cardoso, C., Lopez-Raez, J.A., Matusova, R., Bours, R., et al. (2011). Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiology* 155, 721–734.
- Dos Santos, C.V., Letousey, P., Delavault, P., and Thalouarn, P. (2003). Defense gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* parasitized by *Orobanch*e *ramosa*. *Phytopathology* 93, 451–457.
- Sato, D., Awad, A.A., Takeuchi, Y., and Yoneyama, K. (2005). Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants *Striga* and *Orobanch*e, produced by cotton. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69, 98–102.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Delia Monica, I., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., and Godeas, A. (2009). Development of arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of different patterns of *Trifolium repens* shoot flavonoids. *Revista De La Ciencia Del Suelo y Nutrición Vegetal* 9, 102–115.
- Schneeweiss, G.M., Colwell, A., Park, J.M., Jang, C.G., and Stuessy, T.F. (2004a). Phylogeny of holoparasitic *Orobanch*e (*Orobanchaceae*) inferred from nuclear ITS sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30, 465–478.
- Schneeweiss, G.M., palomeque, T., Colwell, A.E., and Weiss-Schneeweiss, H. (2004b). Chromosome numbers and karyotype evolution in holoparasitic *Orobanch*e (*Orobanchaceae*) and related genera. *American Journal of Botany* 91, 439–448.
- Schubert, A., and Hayman, D.S. (1986). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XVI. Effectiveness of different endophytes at different levels of soil phosphate. *New Phytologist* 103, 79–90.
- Schüßler, A., and Walker, C. (2010). The Glomeromycota - A species list with new families and new genera (Gloucester: the Royal Botanic Garden Edinburgh).
- Schüßler, A., Schwarzott, D., and Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105, 1413–1421.
- Serghini, K., Pérez-de-Luque, A., Castejon-Munoz, M., Garcia-Torres, L., and Jorrín, Jesus V. (2001). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanch*e *cernua* Loebl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *Journal of Experimental Botany* 52, 2227–2234.





- Shane, M.W., De Vos, M., De Roock, S., and Lambers, H. (2003). Shoot P status regulates cluster-root growth and citrate exudation in *Lupinus albus* grown with a divided root system. *Plant, Cell & Environment* 26, 265–273.
- Shen, H., Ye, W., Hong, L., Huang, H., Wang, Z., Deng, X., Yang, Q., and Xu, Z. (2006). Progress in parasitic plant biology: Host selection and nutrient transfer. *Plant Biology* 8, 175–185.
- Siegel, and Castellan (1988). Non parametric statistics for the behavioural sciences. *Biochem. Pharmacol.* 213–214.
- Singh, S., and Kapoor, K.K. (1999). Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biology and Fertility of Soils* 28, 139–144.
- Singh, S., and Parniske, M. (2012). Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 444–453.
- Smith, J.L., De Moraes, C.M., and Mescher, M.C. (2009). Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science* 65, 497–503.
- Smith, S.E., Smith, F.A., and Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* 133, 16–20.
- Southwood, O.R. (1971). The effect of superphosphate application, 2,4-DB and grazing on broomrape (*Orobancha minor* SM.) in a subterranean clover pasture. *Weed Research* 11, 240–246.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., and Fortin, J.A. (1996). Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycological Research* 100, 328–332.
- Stewart, G.R., and Press, M.C. (1990). The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Annual Review of Plant Biology* 41, 127–151.
- Stribley, D.P., Tinker, P.B., and Rayner, J.H. (1980). Relation of internal phosphorus concentration and plant weight in plants infected by vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* 86, 261–266.
- Subramanian, K.S., Santhanakrishnan, P., and Balasubramanian, P. (2006). Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae* 107, 245–253.
- Sugimoto, Y., Ahmed, N.E., Yasuda, N., and Inanaga, S. (2002). Trichothecene inhibitors of *Striga hermonthica* germination produced by *Fusarium solani*. *Weed Science* 50, 658–661.
- Sugimoto, Y., Ali, A.M., Yabuta, S., Kinoshita, H., Inanaga, S., and Itai, A. (2003). Germination strategy of *Striga hermonthica* involves regulation of ethylene biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 119, 137–145.



- Swarbrick, P.J., Huang, K., Liu, G., Slate, J., Press, M.C., and Scholes, J.D. (2008). Global patterns of gene expression in rice cultivars undergoing a susceptible or resistant interaction with the parasitic plant *Striga hermonthica*. *New Phytologist* 179, 515–529.
- Thomas, H., Heller, A., Sauerborn, J., and Müller-Stöver, D. (1999). *Fusarium oxysporum* f. sp. orthoceras, a potential mycoherbicide, parasitizes seeds of *Orobanche cumana* (Sunflower Broomrape): a cytological study. *Annals of Botany* 83, 453–458.
- Thomas, H., Sauerborn, J., Müller-Stöver, D., Ziegler, A., Singh Bedi, J., and Kroschel, J. (1998). The Potential of *Fusarium oxysporum* f.sp. orthoceras as a biological control agent for *Orobanche cumana* in sunflower. *Biological Control* 13, 41–48.
- Thorogood, C.J., Rumsey, F.J., and Hiscock, S.J. (2009). Seed viability determination in parasitic broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche*) using fluorescein diacetate staining. *Weed Research* 49, 461–468.
- Toh, S., Kamiya, Y., Kawakami, N., Nambara, E., McCourt, P., and Tsuchiya, Y. (2011). Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in *Arabidopsis* seed germination. *Plant and Cell Physiology* 53, 107–117.
- Tosi, L., Giovannetti, M., Zizzerini, A., and Sbrana, C. (1993). Interactions between *Plasmopara helianthi* and arbuscular mycorrhizal fungi in sunflower seedlings susceptible and resistant to downy mildew. *Phytopathologia Mediterranea* 32, 106–114.
- Ueno, K., Fujiwara, M., Nomura, S., Mizutani, M., Sasaki, M., Takikawa, H., and Sugimoto, Y. (2011). Structural requirements of strigolactones for germination induction of *Striga gesneroides* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 9226–9231.
- Uhlich, H., Pusch, J., and Barthel, K. (1995). Die sommerwurzarten Europas (Magdeburg).
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., et al. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455, 195–200.
- Vajs, V., Todorovic, N., Ristic, M., Tesevic, V., Todorovic, B., Janackovic, P., Marin, P., and Milosavljevic, S. (1999). Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity. *Phytochemistry* 52, 383–386.
- Velasco, L., Pérez-Vich, B., Jan, C.C., and Fernandez-Martinez, J.M. (2007). Inheritance of resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) race F in a sunflower line derived from wild sunflower species. *Plant Breeding* 126, 67–71.
- Véronési, C., Bonnin, E., Benharrat, H., Fer, A., and Thalouarn, P. (2005). OPINION: Are pectinolytic activities of *Orobanche cumana* seedlings related to virulence towards sunflower? *Israel Journal of Plant Sciences* 53, 19–27.
- Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U., and Piché, Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 5004–5007.
- Vogel, J.T., Walter, M.H., Giavalisco, P., Lytovchenko, A., Kohlen, W., Charnikhova, T., Simkin, A.J., Goulet, C., Strack, D., Bouwmeester, H.J., et al. (2009). SICCD7 controls



strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal* *61*, 300–311.

Vos, C., Claerhout, S., Mkandawire, R., Panis, B., Waele, D., and Elsen, A. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi reduce root-knot nematode penetration through altered root exudation of their host. *Plant and Soil* *354*, 335–345.

Voyron, S., Roussel, S., Munaut, F., Varese, G.C., Ginepro, M., Declerck, S., and Filipello Marchisio, V. (2009). Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycological Research* *113*, 1027–1038.

Vurro, M., Boari, A., Evidente, A., Andolfi, A., and Zermane, N. (2009). Natural metabolites for parasitic weed management. *Pest Management Science* *65*, 566–571.

Vurro, M., Boari, A., Pilgeram, A.L., and Sands, D.C. (2006). Exogenous amino acids inhibit seed germination and tubercle formation by *Orobanche ramosa* (Broomrape): Potential application for management of parasitic weeds. *Biological Control* *36*, 258–265.

Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V. (2004). Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-microbe Interactions* *17*, 1385–1393.

Weitbrecht, K., Muller, K., Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* *62*, 3289–3309.

Westwood, J.H. (2000). Characterization of the *Orobanche–Arabidopsis* system for studying parasite–host interactions. *Weed Science* *48*, 742–748.

Westwood, J.H., Yoder, J.I., Timko, M.P., and dePamphilis, C.W. (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plant Science* *15*, 227–235.

Wickett, N.J., Honaas, L.A., Wafula, E.K., Das, M., Huang, K., Wu, B., Landherr, L., Timko, M.P., Yoder, J., Westwood, J.H., dePamphilis, C. (2011). Transcriptomes of the parasitic plant family *Orobanchaceae* reveal surprising conservation of chlorophyll synthesis. *Current Biology* *21*, 2098–2104.

Wigchert, S.C.M., Kuiper, E., Boelhouwer, G.J., Nefkens, G.H.L., Verkleij, J.A.C., and Zwanenburg, B. (1999). Dose–response of seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobanche* toward the synthetic germination stimulants GR 24 and Nijmegen 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *47*, 1705–1710.

Wright, D.P., Scholes, J.D., and Read, D.J. (1998). Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* *21*, 209–216.

Xie, X., Yoneyama, K., and Yoneyama, K. (2010). The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology* *48*, 93–117.

Yoder, J.I. (1997). A species-specific recognition system directs haustorium development in the parasitic plant *Triphysaria* (*Scrophulariaceae*). *Planta* *202*, 407–413.



- Yoder, J.I. (2001). Host-plant recognition by parasitic *Scrophulariaceae*. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 359–365.
- Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Ogasawara, M., Konnai, M., Sugimoto, Y., and Sassa, T. (1998). Cytolenins and fusicoccins stimulate seed germination of *Striga hermonthica* (Del.) Benth and *Orobanche minor* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1583–1586.
- Yoneyama, K., Xie, X., Kisugi, T., Nomura, T., Sekimoto, H., Yokota, T., and Yoneyama, K. (2011). Characterization of strigolactones exuded by *Asteraceae* plants. *Plant Growth Regulation* 65, 495–504.
- Yoneyama, K., Xie, X., Kusumoto, D., Sekimoto, H., Sugimoto, Y., Takeuchi, Y., and Yoneyama, K. (2007a). Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* 227, 125–132.
- Yoneyama, K., Xie, X., Sekimoto, H., Takeuchi, Y., Ogasawara, S., Akiyama, K., Hayashi, H., and Yoneyama, K. (2008). Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from *Fabaceae* plants. *New Phytologist* 179, 484–494.
- Yoneyama, K., Xie, X., Yoneyama, K., and Takeuchi, Y. (2009). Strigolactones: structures and biological activities. *Pest Management Science* 65, 467–470.
- Yoneyama, K., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., and Sekimoto, H. (2007b). Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* 225, 1031–1038.
- Yoshida, S., and Shirasu, K. (2009). Multiple layers of incompatibility to the parasitic witchweed, *Striga hermonthica*. *New Phytologist* 183, 180–189.
- Zehhar, N., Ingouff, M., Bouya, D., and Fer, A. (2002). Possible involvement of gibberellins and ethylene in *Orobanche ramosa* germination. *Weed Research* 42, 464–469.
- De Zélicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Champion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., Marion, D., Simier, P., and Delavault, P. (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. *Planta* 226, 591–600.
- De Zélicourt, A., Montiel, G., Pouvreau, J.-B., Thoiron, S., Delgrange, S., Simier, P., and Delavault, P. (2009). Susceptibility of *Phelipanche* and *Orobanche* species to AAL-toxin. *Planta* 230, 1047–1055.
- Zwanenburg, B., Mwakaboko, A.S., Reizelman, A., Anilkumar, G., and Sethumadhavan, D. (2009). Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Management Science* 65, 478–491.

## Annexe 1

---



# Reduced Germination of *Orobanche cumana* Seeds in the Presence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi or Their Exudates

Johann Louarn<sup>1,2</sup>, Francis Carbonne<sup>1,2</sup>, Philippe Delavault<sup>3</sup>, Guillaume Bécard<sup>1,2</sup>, Soizic Rochange<sup>1,2\*</sup>

**1** Université de Toulouse; UPS, UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales; BP 42617 Auzeville, F-31326 Castanet-Tolosan, France, **2** CNRS; UMR 5546; BP 42617, F-31326 Castanet-Tolosan, France, **3** Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales, SFR 4207 QUASAV, LUNAM University, Nantes, France

## Abstract

Broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche* spp) are parasitic plants responsible for important crop losses, and efficient procedures to control these pests are scarce. Biological control is one of the possible strategies to tackle these pests. Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi are widespread soil microorganisms that live symbiotically with the roots of most plant species, and they have already been tested on sorghum for their ability to reduce infestation by witchweeds, another kind of parasitic plants. In this work AM fungi were evaluated as potential biocontrol agents against *Orobanche cumana*, a broomrape species that specifically attacks sunflower. When inoculated simultaneously with *O. cumana* seeds, AM fungi could offer a moderate level of protection against the broomrape. Interestingly, this protection did not only rely on a reduced production of parasitic seed germination stimulants, as was proposed in previous studies. Rather, mycorrhizal root exudates had a negative impact on the germination of *O. cumana* induced by germination stimulants. A similar effect could be obtained with AM spore exudates, establishing the fungal origin of at least part of the active compounds. Together, our results demonstrate that AM fungi themselves can lead to a reduced rate of parasitic seed germination, in addition to possible effects mediated by the mycorrhizal plant. Combined with the other benefits of AM symbiosis, these effects make AM fungi an attractive option for biological control of *O. cumana*.

**Citation:** Louarn J, Carbonne F, Delavault P, Bécard G, Rochange S (2012) Reduced Germination of *Orobanche cumana* Seeds in the Presence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi or Their Exudates. PLoS ONE 7(11): e49273. doi:10.1371/journal.pone.0049273

**Editor:** Els J.M. van Damme, Ghent University, Belgium

**Received:** July 19, 2012; **Accepted:** October 8, 2012; **Published:** November 7, 2012

**Copyright:** © 2012 Louarn et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** JL was funded by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (France), Syngenta Seeds and Soltis through a CIFRE grant (number 300/2009). The authors wish to declare that the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** This research was funded by 'Soltis' and 'Syngenta'. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: rochange@scvs.ups-tlse.fr

## Introduction

Broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche* spp) and witchweeds (*Striga* spp) are parasitic plants from the *Orobanchaceae* family. They attach to the roots of host plants from which they drain water, mineral and photoassimilate resources. Together, *Orobanchaceae* species can attack a wide range of host plants, and those that infect crops can cause considerable agricultural damage. In Africa, *Striga* spp represent a major and increasing threat to cereal crops, affecting millions of farmers [1]. Broomrapes are of particular concern around the Mediterranean basin and in Eastern Europe, where they attack a large number of crops including *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae* and *Asteraceae*. In this study we focus on a broomrape species that became weedy only recently, *Orobanche cumana*. Unlike other broomrape species, *O. cumana* exhibits a restricted host range and essentially attacks sunflower (*Helianthus annuus* L.) [2].

As obligate parasites, broomrape seedlings can only survive for a few days after germination before connecting to a host root. The germination of their seeds has evolved to become dependent on compounds secreted by host roots, and thus occurs only in the favourable presence of a host. Germination stimulants have been identified in several host plants [3]. Broadly speaking, the most

potent are strigolactones, a family of carotenoid-derived metabolites, but germination stimulants have also been identified in several other classes of metabolites [4]. Although sunflower produces strigolactones [5], dehydrocostus lactone (DCL) has been proposed as a major germination stimulant in this species [6].

When stimulated after a conditioning period of several days under appropriate temperature and humidity, seeds germinate and produce a radicle that can adhere to a host root. A haustorium is formed, which allows the penetration into the cortex and the exploitation of the host's resources through the development of vascular connections. From this stage, *Orobanchaceae* engage in their truly parasitic lifestyle [7]. A new organ called the tubercle develops on the host root and acts as a strong sink to accumulate reserves [8]. Later, a stem arises from the tubercle, and emerges above ground to produce an inflorescence, giving rise to thousands of new seeds able to survive in soil for many years [9].

Research efforts have aimed to identify resistance mechanisms in host plants. Tolerant or resistant genotypes have been identified in a number of hosts of *Orobanche* spp, and in some cases the physiological basis for improved resistance has been characterized. Such mechanisms can act before or after root penetration and include a lower production of germination stimulants, the production of germination inhibitors, the formation of physical



barriers against the parasite, the release of compounds inducing tubercle necrosis, the occlusion of vascular connections between host root and parasite, and a low supply of carbon to the parasite through competition with the host plant carbon sinks [10–12]. From a genetic point of view, resistance often shows a complex heritability [13]. The *O. cumana*/sunflower interaction is an exception in this context, since the existence of several dominant resistance genes has been demonstrated (e.g. [14]). Unfortunately such sources of resistance can rapidly be overcome by the parasite, and new *O. cumana* races appeared that could attack the successive “resistant” sunflower genotypes [15]. This underlines the need for approaches that favour the intervention of several physiological processes and genes.

Biological control is one of several alternative strategies to tackle the parasitic weed problem. For example, *Fusarium* spp have been used against *O. cumana* and *P. aegyptiaca* [16]. Among additional potential control agents, Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi could be of particular interest. These fungi live in all kinds of terrestrial ecosystems and associate with the vast majority of land plants, forming the most widespread type of symbiosis on Earth [17]. In exchange for hexoses, AM fungi can supply their host plant with water and minerals, and provide a certain degree of protection against pathogens [18]. Like parasitic weeds, AM fungi are obligate biotrophs and rely on stimulation by their host to engage in their developmental cycle and colonize a plant root. Remarkably, they were shown to respond to the same chemical cues as the majority of *Orobanchaceae* seeds: early fungal development and metabolism are strongly stimulated by strigolactones [19,20]. Because of the reported protective effect of AM fungi against various pathogens, their influence on *Orobanchaceae*/host interactions was investigated. Lendzemo & Kuyper [21] first showed that mycorrhizal inoculation could alleviate the damage caused on sorghum by *Striga hermonthica*, and in some cases reduce the level of host infestation. This effect was later attributed to a reduced release of germination stimulants by mycorrhizal plants [22,23]. Mycorrhizal colonization of pea plants was also shown to reduce the production of *Orobanche* and *Phelipanche* seed germination stimulants [24]. In tomato, Lopez-Raez et al. [25] demonstrated biochemically that root colonization by AM fungi decreased the synthesis and exudation of strigolactones.

The aim of the present study was to investigate whether, and how, AM fungi affect the *O. cumana*/sunflower interaction. Root colonization by AM fungi was found to confer some degree of protection against *O. cumana*. This effect seemed to involve a lower production of germination stimulants, but also an antagonism between AM fungi and the parasite: the presence of fungal spores or fungal exudates alone could reduce the seed germination of *O. cumana*. Therefore, the effects of AM fungi on the pathosystem sunflower/*O. cumana* seem to be more complex than previously anticipated.

## Materials and Methods

### Plant and Fungal Materials

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds of the broomrape-susceptible variety 2603 were provided by Syngenta Seeds (Toulouse, France). Seeds of *Orobanche cumana* (Wallr.) race E were collected near Ecija, Spain, and provided by Dr B. Perez-Vich. Seeds of *Phelipanche ramosa* (Pomel) pathovar C were collected in France (Saint Jean d’Angely, 2005). Seeds of *Striga hermonthica* were collected in Sudan in 1999. No specific permits were required. The locations where seeds were collected were not privately-owned or protected in any way, and these field studies did not involve endangered or protected species.

Sterile spores of *Rhizophagus irregularis* (formerly *Glomus intradices*, DAOM197198) produced *in vitro* on root organ cultures were purchased from Agronutrition (Carbonne, France). Spores of *Gigaspora rosea* (DAOM194757) were produced in co-culture with leek and surface-sterilized as described in [26].

### Plant Growth Conditions

Sunflower seeds were sown in 250-mL pots containing sterilized charred clay (Oil Dri, Klasmann, France) as an inert substrate, and kept in a growth chamber under a 16 h photoperiod (22°C day, 20°C night). Plants were watered daily with a low-phosphate half-strength Long Ashton Nutrient Solution (LANS, [27]) containing a final concentration of sodium dihydrogen phosphate of 7.5 μM. This fertilization regime promoted root colonization by AM fungi [28].

For mycorrhizal inoculation, 1,000 sterile spores of *R. irregularis* per pot were mixed with the substrate. Root colonization by AM fungi was determined using the gridline intersect method [29], after staining roots with Schaeffer black ink [30]. For the assessment of resistance to *O. cumana*, the substrate was mixed with *O. cumana* seeds (approx. 1,250 seeds per pot), with or without AM fungal spores (1,000 spores per pot). The pots were left for seven days under moist conditions in the dark (16 h at 22°C and 8 h at 20°C), to promote conditioning of *Orobanche* seeds. Then, sunflower seeds were sown directly in the pots. Infection by *O. cumana* was determined after five or six weeks in culture by counting the number of tubercles.

### Preparation of Root Exudates

Four-week-old plants grown as described above were removed from the substrate. The roots were rinsed and incubated in low-phosphate LANS for 24 h at room temperature (roots were not separated from the aerial parts). Crude root exudates were filtered, and root dry weight was determined.

### Preparation of Exudates of AM Fungi

For each replicate 10,000 spores of *R. irregularis* or 2,000 spores of *G. rosea* were suspended in 10 mL sterile water in 55 mm Petri dishes (a smaller number of spores was used for *G. rosea* because they are larger than those of *R. irregularis*). They were incubated in the dark at 30°C under 2% CO<sub>2</sub> for seven days. Most spores germinated during this period. The suspension was filtered through a 0.22 μm filter and the filtrate constituted the “1X” germinated spore exudates. This solution was either used directly in seed germination assays, or diluted in water to 0.1X or 0.01X before use.

### Orobanchaceae Seed Germination Assays

Germination assays were conducted as described in [6] with minor modifications. Broomrape seeds were surface sterilized by treatment with 2.6% NaClO for 5 min, then rinsed five times with sterile water. For each replicate, around 100 seeds were sown on a 25 mm glass-fiber filter (Whatman GF/F) moistened with 500 μL sterile water, in a 35 mm Petri dish. The Petri dishes were sealed with parafilm and incubated in the dark at 22°C for 11 days. After this conditioning period, excess water was removed from the glass fiber filter. Seeds were treated with 500 μL solution (see below), and incubated in the dark at 22°C for another eight days before germinated seeds were counted using a stereo microscope. For *Striga hermonthica*, seeds were incubated at 35°C throughout the test.

Control batches were treated with 10<sup>-8</sup> M GR24 in 0.1% acetone (positive control) or 0.1% acetone alone (negative control). Crude sunflower root exudates were diluted so that 1 mL of



solution contained the exudates produced by the equivalent of 4 mg root dry weight. For the experiment described in Fig. 4 and Fig. 5, *O. cumana* seeds were treated with AM germinated spore exudates prepared as described above. Alternatively, ten AM fungal spores were deposited on the glass-fiber filters together with *O. cumana* seeds.

### Arabidopsis and Leek Seed Germination Assays

Seeds were surface-sterilized by treatment with 2.6% NaClO for 5 min. They were then rinsed three times with sterile water, incubated in ethanol for 2 min and allowed to dry. For each replicate, 50 seeds were sown on M medium [26] solidified with 4 g/L Phytigel (Sigma) in two-compartment Petri dishes, and left at 4°C for 48 h before treatment. Seeds in each compartment were treated either with 1 mL water (control) or with 1 mL of 1X AM spore exudates obtained as described above. Seeds were incubated at 25°C under a 16 h photoperiod for two days for *A. thaliana* and 10 days for leek, before germination rates were determined.

### Seed Viability Test

2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) viability staining was performed as described in [31] with minor modifications. Eight days after treatment with *R. irregularis* spore exudates, broomrape seeds were treated with a 1% solution of TTC in water, and the Petri dishes were sealed and incubated in the dark at 30°C for 24 h. Seeds were considered as viable if they displayed a pink/red colour.

### Gigaspora Rosea Hyphal Branching Bioassay

Crude root exudates were extracted with 1 volume of ethyl acetate as described in [28], then dried and resuspended in 500  $\mu$ L of 10% acetonitrile per 60 mg root dry weight.

Hyphal branching bioassays were carried out as described in [20]. Briefly, germinated hyphae were treated with 10  $\mu$ L root exudate extracts. Newly formed hyphal apices were counted 48 h after treatment.

### Mass Spectrometry Analysis of Strigolactones

Root exudates were extracted and analysed by LC-MS/MS in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode as described in [28]. Transitions corresponding to orobanchyl acetate and 5-deoxystrigol (353>256  $m/z$  and 411>254  $m/z$ , respectively) were monitored.

### Mass Spectrometry Analysis of DCL

Root exudates were extracted using Solid Phase Extraction tubes (Oasis® HLB 6cc, Waters). The tubes were pre-conditioned with 3 mL of methanol followed by 3 mL ultra-pure water. The samples were loaded on the column, then eluted with 2×3 mL acetone and dried under gaseous nitrogen flow.

Root extracts were obtained as follows: roots frozen in liquid nitrogen were ground using a mortar and pestle and 15 g of powder were resuspended in 100 mL water. This solution was mixed to 100 mL dichloromethane for 5 min. The mix was then filtered under vacuum on a GF/F filter (Whatman) to eliminate remaining solid particles. The organic phase was collected and dried under gaseous nitrogen flow.

The solid residue of root exudates or root extracts was resuspended in acetonitrile:hexane (1:1; v:v). Samples were analyzed by GC-MS using a GC Trace gas chromatograph coupled with a TSQ Quantum triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific), with splitless injection at 230°C, and electron impact ionization at 70 eV with a source temperature of

250°C. Chromatographic separation was achieved on a ZB-5MS capillary column (30 m×0.25  $\mu$ m×0.25 mm, Phenomenex), using helium as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature was initially held at 60°C for 2 min, then increased to 340°C at a rate of 12°C/min. Retention times and ion masses were compared to those of a DCL standard (Sigma).

### Statistical Analyses

Analysis of variance (ANOVA), or Student's t-test in the case of a two-sample comparison, were performed when the homoscedasticity and normality criteria were met. In the other cases, i.e. for the *O. cumana* seed germination assays where  $n=5$ , non-parametric tests were used: the Wilcoxon test for two-sample comparisons, or the Kruskal-Wallis test for multiple comparisons [32]. All statistical analyses were performed with R version 2.12.1 (<http://www.r-project.org/>) using the `pgirmess` package.

## Results

### Mycorrhization Moderately Protects Sunflower against *O. cumana*

To investigate whether mycorrhizal fungi can offer a protection against *O. cumana* in sunflower as they do against *Striga* in sorghum, sunflower seedlings were inoculated simultaneously with spores of the AM fungus *Rhizophagus irregularis* (formerly *Glomus intraradices*, [33]) and seeds of *O. cumana*. Experimental conditions were designed to determine as clearly as possible the effect of mycorrhizal inoculation (see Materials and Methods). The root systems of all plants were examined. AM fungal structures were never observed in non-inoculated control plants, while root colonization levels in AM-inoculated plants ranged from 25 to 70% depending on experiments.

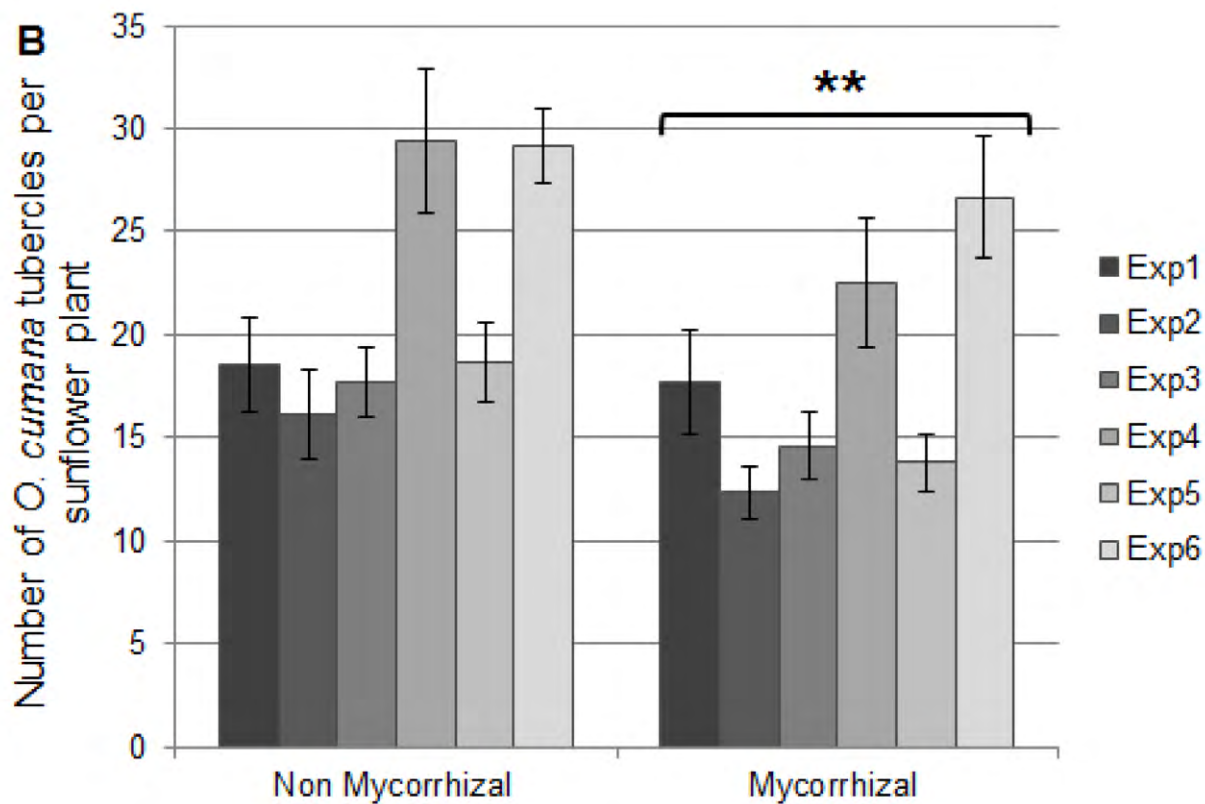
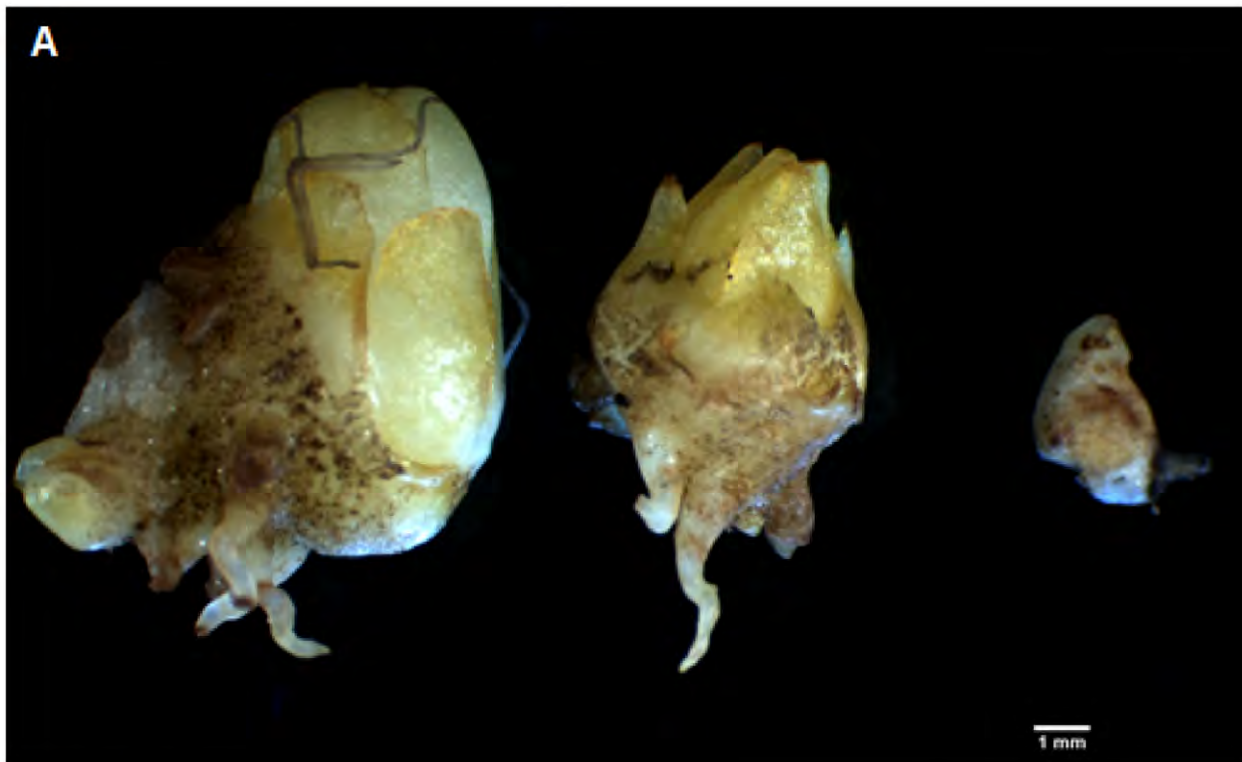
The tubercle stage was retained for estimation of *O. cumana* infestation (tubercles of different sizes were observed as illustrated in Fig. 1A), because at that stage it was possible to examine thoroughly the colonization of the root system. At later stages the quantitative assessment of infestation was made more complex by the presence of attached broomrapes at several different stages.

The level of broomrape infestation was examined five or six weeks post-inoculation by counting the total number of attached *O. cumana* tubercles on each plant. Because results of such experiments exhibited strong variability both within and between experiments (Fig. 1B), we performed six independent experiments to increase the total number of plants in each condition (AM-inoculated or not). The whole set of results was subsequently analyzed through a multi-way ANOVA, which allows to segregate the different sources of variation. Across the set of experiments, mycorrhizal plants were significantly more resistant to *O. cumana* ( $P=0.008$ , ANOVA details in Table S1), although this effect was moderate (ca 20% less tubercles in average). The size of tubercles as estimated by their average dry weight was not significantly affected by mycorrhizal inoculation (15.4+/-1.7 mg in mycorrhizal plants *vs* 13.1+/-1.4 mg in non-mycorrhizal plants).

### Mycorrhizal Status Affects the Germination Stimulant Content of Root Exudates

Previous studies [22,23] suggested that the protective effect of AM fungi against *Striga* infection involved a reduced production of germination stimulants. To investigate whether this was the case in the *O. cumana*/sunflower interaction, we assessed the germination of *O. cumana* seeds triggered by root exudates of mycorrhizal *vs* non-mycorrhizal plants. While both types of exudates could stimulate seed germination of *O. cumana*, this activity was markedly reduced in exudates of mycorrhizal plants: they induced only 35%





**Figure 1. Effect of mycorrhizal status on sunflower infestation by *O. cumana*.** Sunflower plants were inoculated with *O. cumana* seeds, in the presence or absence of AM fungal spores. A- Photograph of *O. cumana* tubercles of different sizes observed on sunflower roots. At the time of harvest (five or six weeks post inoculation) almost all attached broomrapes were at the tubercle stage. B- Number of *O. cumana* tubercles. The results of six independent experiments (Exp1 to Exp6) are presented. Values represent the average number of *O. cumana* tubercles per plant,  $\pm$  s.e.m (n = 8 to 10 plants per condition for each experiment). The asterisks indicate a highly significant effect of mycorrhizal inoculation according to multi-way ANOVA (P = 0.008, see also Table S1). doi:10.1371/journal.pone.0049273.g001





germination of *O. cumana* seeds, *vs* 53% with non-mycorrhizal root exudates. The difference was significant ( $P < 0.05$ ) and suggested that root exudates of mycorrhizal sunflower plants may lack some germination stimulants present in non-mycorrhizal root exudates.

Strigolactones are recognized as a major class of germination stimulants for *Orobanche spp.*, and have been detected in root exudates of a number of plants including sunflower [5,34]. In this host plant, however, additional germination stimulants including DCL have been proposed to play an important role in the induction of *O. cumana* germination [6,35]. Therefore, we tried to examine the strigolactone and DCL content of sunflower root exudates, in plants that were colonized or not by AM fungi.

Attempts were made to measure biochemically the abundance of these compounds. Analysis of the DCL content of root exudates by GC-MS/MS proved more sensitive than LC-MS/MS, but the amount of DCL remained close to the detection limit. Comparative analysis of mycorrhizal *vs* non-mycorrhizal root exudates did not reveal significant differences (data not shown).

Unfortunately, the sunflower strigolactones orobanchyl acetate and 5-deoxystrigol were undetectable in all root exudate extracts. The difficulties in detecting DCL and strigolactones may relate either to the sunflower variety used, or to the age of plants, both of which differ from those reported in the article describing biochemical analyses of DCL [6] and strigolactones [5]. In the present study it was necessary to wait for four weeks after AM inoculation to obtain significant root colonization. The plants may then have been too old for optimal production of germination stimulants.

The strigolactone content of root exudates was estimated using an AM fungus-based bioassay. The hyphal branching response of *G. rosea* germinated spores is highly sensitive to various strigolactones [19,20]. Therefore, it allows an indirect comparison of the amount of strigolactones in different samples: the activity in root exudates of strigolactone-deficient mutants is strongly decreased in comparison with root exudates from wild-type plants [36]. In addition, DCL is not able to trigger such hyphal branching [37]. Root exudate extracts of non-mycorrhizal plants exhibited a strong activity in this bioassay (Fig. 2). This activity was markedly lower in root exudate extracts of mycorrhizal plants, and could be enhanced when the synthetic strigolactone analogue GR24 was added to these exudates, suggesting that their low activity was related to a low strigolactone content.

### Root Exudates of Mycorrhizal Plants have a Negative Impact on *O. cumana* Germination

According to the above results, a reduced amount of germination stimulants could account for the reduced ability of root exudates of mycorrhizal plants to stimulate *O. cumana* germination. To further investigate this possibility, we added GR24 to sunflower root exudates, at a concentration of  $10^{-8}$  M identical to that used for the positive control. As shown in Fig. 3, this did not improve the germination stimulant activity of mycorrhizal root exudates: it remained lower than that of non-mycorrhizal root exudates (complemented or not with GR24). This suggests that the lower germination stimulant activity of mycorrhizal root exudates is not only due to a reduced production of strigolactones by these roots.

Secondly, the germination rates obtained with root exudates (both mycorrhizal and non-mycorrhizal) complemented with GR24 were lower than that measured with GR24 alone (Fig. 3). Since these exudates were produced in nutrient solution, it cannot be completely ruled out that the salts contained in the solution contributed to the reduced germination rate. Nevertheless, mycorrhizal root exudates consistently led to lower germination

rates as compared with non-mycorrhizal root exudates, establishing their stronger capacity to interfere with GR24-induced *O. cumana* germination.

### AM Fungal Spores and their Exudates Negatively Affect Broomrape Seed Germination

The negative effect of mycorrhizal root exudates could be due to factors originating from the colonized roots, and/or from the fungus itself. Therefore, we next examined the effect of fungal spores or their exudates on *O. cumana* germination. With two phylogenetically distant AM fungi (*R. irregularis* and *G. rosea*), the seed germination rate was reduced in the presence of germinated fungal spores (Fig. 4A). Furthermore, fungus-free exudates of these spores could also exert a dose-dependent effect (Fig. 4B), which demonstrated that it is due to diffusible compounds rather than to volatile molecules or to direct contact between fungal structures and *O. cumana* seeds.

The germination of *O. cumana* can be triggered with similar efficiencies by GR24 or DCL ([13], Fig. 5). We thus investigated whether AM fungal exudates could affect *O. cumana* germination regardless of the germination stimulant used. As shown in Fig. 5, the effect of AM spore exudates was the same when seeds were stimulated by GR24, DCL or both.

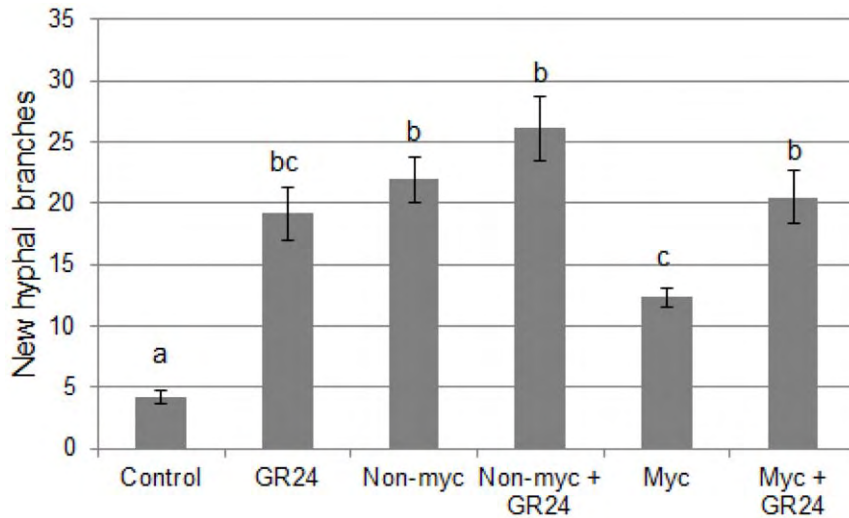
Various fungal toxins have previously been shown to inhibit parasitic plant seed germination [38]. This can be attributed either to toxicity or to effects on the germination process *per se*. To determine whether the effect of AM fungal exudates involved some degree of toxicity towards broomrape seeds, we measured the viability of *O. cumana* seeds after treatment with fungal exudates. No effect on seed viability could be detected using a TTC-based assay [31], regardless of the presence of GR24 (Table 1). In another experiment, seeds were incubated with 1X AM spore exudates for seven days, then washed in water to eliminate the exudates. Following exposure to GR24, the germination rate of these washed seeds was not significantly lower than that of seeds that had not been in contact with AM exudates ( $70.9\% \pm 3.9$  *vs*  $77.3\% \pm 4.6$  respectively,  $P = 0.32$ ). This indicated that AM spore exudates had not altered the seeds ability to germinate.

We then investigated whether this effect on seed germination could affect a wide range of plant seeds. Another broomrape species, *Phelipanche ramosa*, was first examined and results were very similar to those obtained with *O. cumana* (Fig. S1). In contrast, *Striga hermonthica* seed germination was not affected by AM spore exudates (Fig. 4C). Two non-parasitic dicot and monocot plant species, *Arabidopsis thaliana* and leek (*Allium porrum* L.) were also examined, and again their germination rate remained the same when treated with fungal exudates (Fig. S2).

### Discussion

Root exudates of mycorrhizal plants exhibited a clearly reduced ability to trigger *O. cumana* seed germination. This is in line with the previous studies of Lenzemo *et al.* [22] and Fernandez-Aparicio *et al.* [24] on sorghum and pea, respectively. The most immediate interpretation was that the production of the main germination stimulants, strigolactones and DCL, was affected by root colonization with AM fungi. Biochemical analyses of the DCL content of mycorrhizal *vs* non-mycorrhizal roots did not reveal significant differences, although these results should be taken with caution since in all samples the amount of DCL was very close to the detection limit. In contrast, an indirect bioassay for strigolactone activity (Fig. 2) suggested that the production or release of these compounds could be reduced in mycorrhizal



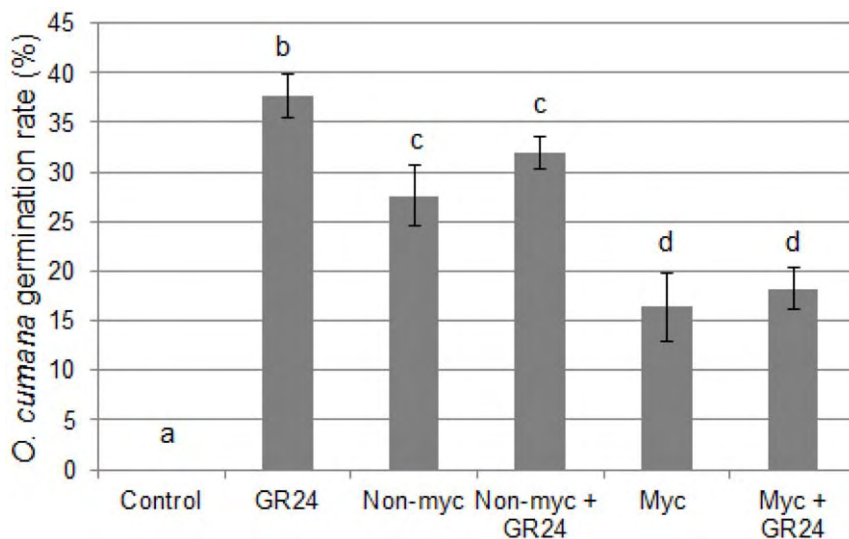


**Figure 2. Investigation of the strigolactone content of root exudates.** Ethyl acetate extracts of root exudates were dried and resuspended in 10% acetonitrile. Germinated spores of *G. rosea* were treated with root exudate extracts, and the newly formed hyphal apices were counted 48 h after treatment. Control: solvent only (10% acetonitrile). GR24:  $10^{-7}$  M GR24 in 10% acetonitrile. Non-Myc and Myc: root exudates of non-mycorrhizal and mycorrhizal plants, respectively. Data represent the mean  $\pm$  s.e.m. obtained with 25 treated spores per treatment. Means were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test. Different letters indicate statistically significant differences between means ( $P < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0049273.g002

plants, as has been observed in tomato [25]. Interestingly, however, this observation did not solely account for the decreased *O. cumana* germination in the presence of mycorrhizal root exudates. Rather, complementation experiments with GR24 demonstrated that mycorrhizal root exudates could reduce the germination of *O. cumana* triggered by GR24 (Fig. 3). It would be interesting to know if the sorghum and pea mycorrhizal roots previously analysed [22,24] exhibited similar properties, and whether this could have contributed to the observed protective effects of AM fungi.

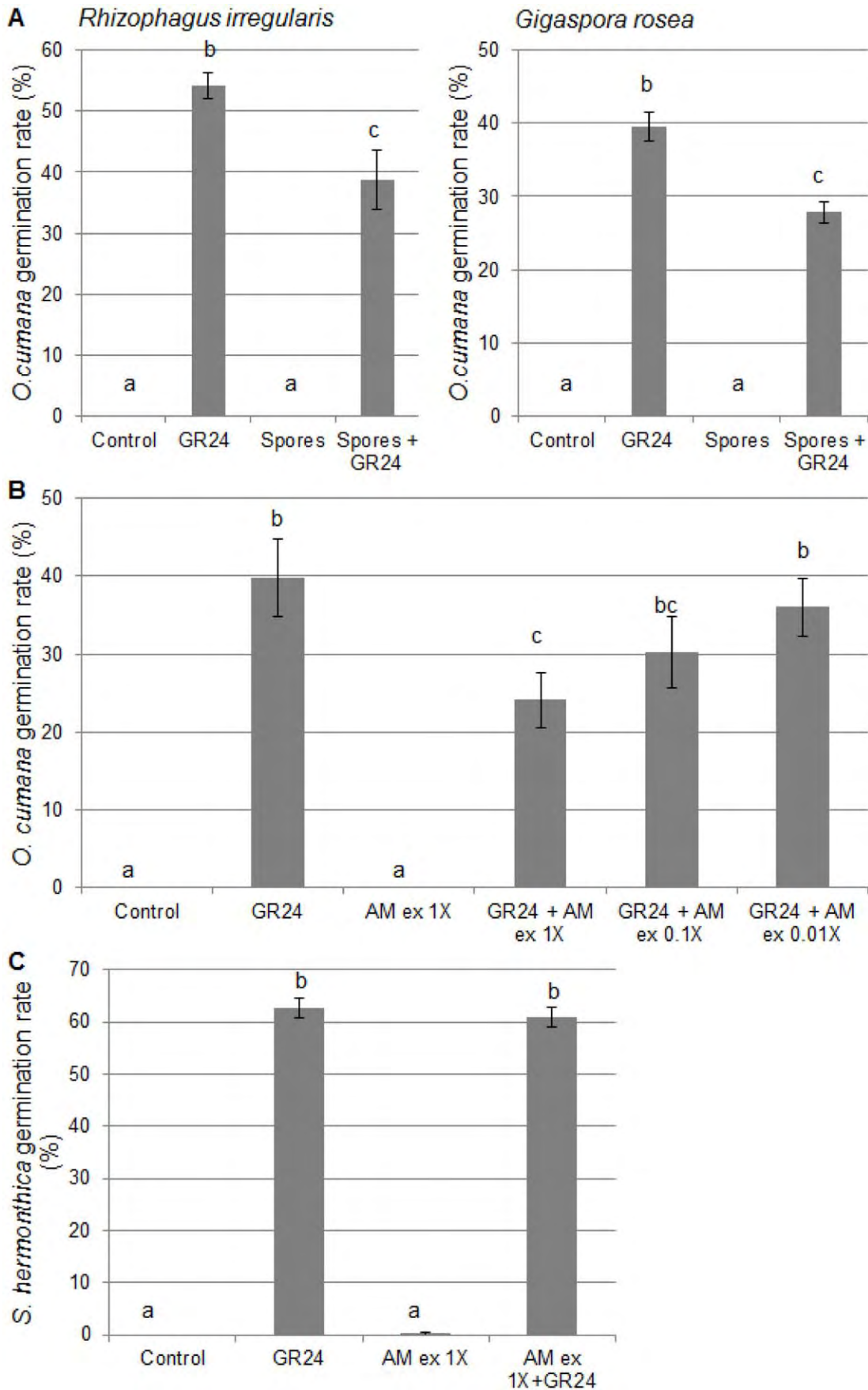
In addition to mycorrhizal roots, AM fungi living asymbiotically can also release factors that lead to a reduced germination of

*O. cumana* (Fig. 4A and 4B). It remains unknown at this stage whether the same diffusible compounds are responsible for the observed effects of mycorrhizal root and fungal spore exudates on germination. Roots produce and secrete large numbers of molecules, many of which are active in the rhizosphere. For example, sunflower has been shown to produce phytoalexins that can inhibit *O. cumana* germination [39]. Such compounds could potentially contribute to the slight inhibitory effect noted with non-mycorrhizal root exudates, and possibly also to the stronger effect of mycorrhizal root exudates on seed germination, since mycorrhization is known to modify root metabolism [40]. In root exudates however, it is impossible to distinguish between



**Figure 3. Induction of *O. cumana* germination by root exudates and GR24.** Seeds were treated with GR24, and/or root exudates of mycorrhizal or non-mycorrhizal plants. Control: solvent only (0.1% acetone). GR24:  $10^{-8}$  M GR24 in 0.1% acetone. Non-Myc and Myc: root exudates of non-mycorrhizal and mycorrhizal plants, respectively. Data represent the average germination percentage of five batches of approx. 100 seeds,  $\pm$  s.e.m. Means were compared using the Kruskal-Wallis test; different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0049273.g003







**Figure 4. Germination of *O. cumana* and *S. hermonthica* in the presence of spores or spore exudates of AM fungi.** A- *O. cumana* seed germination was induced by  $10^{-8}$  M GR24 in the presence or absence of fungal spores of *R. irregularis* or *G. rosea*. Control: solvent only (0.1% acetone). B, C- Seeds of *O. cumana* (B) or *S. hermonthica* (C) were treated with  $10^{-8}$  M GR 24 and/or *R. irregularis* spore exudates (AM ex) at different concentrations.  $1 \times$  corresponds to 1,000 spores per mL. The "AM  $1 \times$  exudate" negative control was complemented with 0.1% acetone in order to match the acetone concentration in the other samples. Data represent the average germination rate of five batches of approx. 100 seeds,  $\pm$  s.e.m. Means were compared using the Kruskal-Wallis test; different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0049273.g004

compounds produced by the colonized root or by the fungus itself. In contrast, the analysis of fungal spore exudates allowed us to establish unequivocally that AM fungi alone can release diffusible compounds that interfere with GR24- or DCL-induced *O. cumana* germination. This observation shows that AM fungi can benefit their host plants before the symbiotic interaction is established.

Various hypotheses can be put forward to explain the effect of exudates from mycorrhizal roots or fungal spores on *O. cumana* germination. First, they could contain factors (such as enzymes or reactive oxygen species) that lead to the degradation of germination stimulants in the medium, or alternatively compounds that bind to the germination stimulants and prevent their action. Second, they could contain germination inhibitors (compounds that target germination *per se* or act as antagonists of germination stimulants). Two lines of evidence tend to argue against the first hypothesis, although they do not rule it out completely: a) addition of GR24 to mycorrhizal root exudates enhanced their hyphal branching activity (Fig. 2), indicating that GR24 was not significantly degraded nor sequestered in this experiment, but it should be born in mind that the kinetics here are different from a seed germination assay; and b) AM spore exudates did not affect the germination of *S. hermonthica* (Fig. 4C), again suggesting that sufficient active GR24 was available in the medium, but the minimal GR24 concentrations required to induce *S. hermonthica* and *O. cumana* germination may be different.

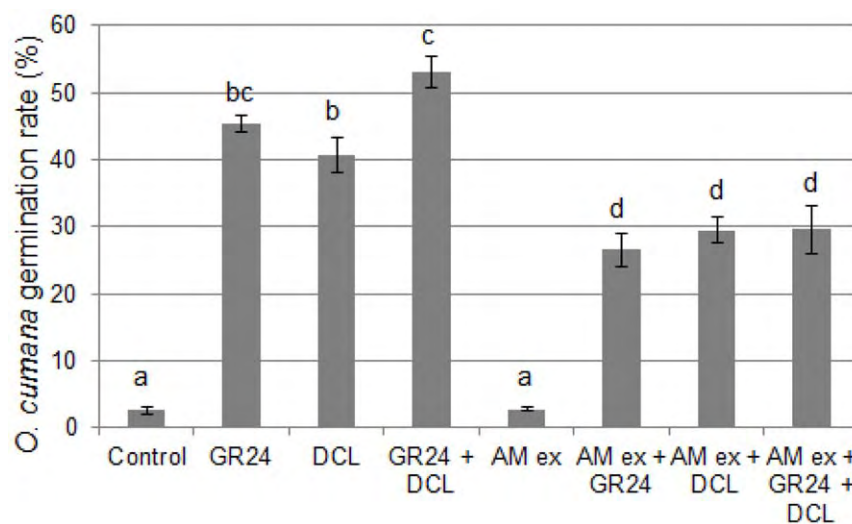
It would be interesting to test the effect of AM spore exudates on a larger number of plant species, especially parasitic, in order to assess the range of potential applications of our findings, and to help decipher the underlying mechanisms of action. No effect of AM exudates on the germination of non-parasitic plant species could be detected. This is not surprising since AM fungi live

symbiotically with most land plants, and actually require the association with a living plant to complete their own life cycle [18].

Similar effects on seed germination were obtained with spores or spore exudates of two distant AM fungi. This suggests that these effects are a general property of *Glomeromycota*, and that a wide range of AM fungi could be used as biocontrol agents. Furthermore, the fact that mycorrhizal roots also exert such effects on *Orobanche* germination (Fig. 3) indicates that this protective effect of AM fungi could persist throughout the crop cycle. In addition to the use of AM inoculants, the biochemical identification of the active compound(s) may lead to novel opportunities to help keeping broomrapes under control.

The effect of mycorrhizal inoculation on root infestation (Fig. 1 and 3) was rather modest, as compared with some results of the studies on sorghum [21,22]. In the sorghum studies however, the beneficial effects of AM fungi were strongly dependent on the host plant genotype, the tolerant variety being more responsive to the effect of mycorrhizae. The present study was carried out on a susceptible sunflower variety (2603), which may not be the most responsive to the protective effect of AM fungi.

It may seem surprising that the effects of AM exudates on *O. cumana* seed germination are stronger than those of AM inoculation on root infestation. On the other hand, only a small proportion of the seeds present in each pot ( $>1,000$  seeds) develops to reach the tubercle stage (15 to 30 per pot after five to six weeks, Fig. 1). If one assumes a reasonable seed germination rate in these conditions (for example, a 20% germination rate would yield over 200 germinated *O. cumana* seedlings per pot), this suggests that various factors prevent the attachment of most seedlings to the host roots. This could explain why a reduced



**Figure 5. Response of *O. cumana* seeds to *R. irregularis* exudates and pure germination stimulants.** AM ex corresponds to 1,000 spores per mL in 0.2% acetone. Control: solvent only (0.2% acetone). GR24 and DCL were used at a final concentration of  $10^{-8}$  M in 0.2% acetone. Data represent the average germination rate of five batches of approx. 100 seeds,  $\pm$  s.e.m. Means were compared using the Kruskal-Wallis test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0049273.g005





**Table 1.** Effect of crude exudates of *R. irregularis* on seed viability of *O. cumana*.

Treatment	Viability rate (%)	s.e.m.
Control (solvent only)	70.9	1.7
GR24	70.9	1.9
<i>R. irregularis</i> exudates 1X	70.3	1.5
<i>R. irregularis</i> exudates 1X+GR24	76.8	0.9

Seeds were stained with TTC and examined with a dissecting microscope. Data represent the average percentage of viable seeds. Five batches of approx. 100 seeds were used for each treatment. Means were compared using the Kruskal-Wallis test. No significant differences between treatments were found. doi:10.1371/journal.pone.0049273.t001

germination rate does not necessarily translate into a similarly reduced number of tubercles.

Various biocontrol agents have been tested against parasitic weeds. Among them, various fungi such as *Fusarium* and *Alternaria* spp. and *Myrothecium verrucaria* [41–43] have been used successfully against *Orobanche* and *Striga* spp. These fungi seem to act differently from AM fungi: they behave as pathogens of the parasite, infecting its tissues or producing toxins [38,42,44,45]. Mycorrhizal fungi offer two advantages as biocontrol agents: they are not pathogenic to any crop plant, and provide important additional benefits such as an improved water and mineral nutrition. In some cases they can also confer a protection against fungal pathogens, such as *Plasmopara helianthii* for sunflower [46]. They can adapt to a wide range of environments and stay in the soil for many years after inoculation. Therefore, their use as biocontrol agents offers an attractive complementary approach to breeding strategies and other biocontrol methods.

## Supporting Information

**Figure S1 Germination of *P. ramosa* seeds in the presence of spore exudates of AM fungi.** *P. ramosa* seed

## References

- Parker C (2009) Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Manag Sci* 65: 453–459.
- Pujadas-Salva AJ, Velasco L (2000) *O. cumana* Wallr. (*Orobanchaceae*) in the Iberian Peninsula. *Bot J Linn Soc* 134: 513–527.
- Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH (2003) Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr Opin Plant Biol* 6: 358–364.
- Auger B, Pouvreau J-B, Pouponneau K, Yoneyama K, Montiel G, et al. (2012) Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 993–1004. doi:10.1094/MPMI-01-12-0006-R.
- Yoneyama K, Xie X, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, et al. (2011) Characterization of strigolactones exuded by *Asteraceae* plants. *Plant Growth Regul* 65: 495–504. doi:10.1007/s10725-011-9620-z.
- Joel DM, Chaudhury S, Plakhine D, Ziadna H, Steffens J (2011) Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry* 72: 624–634. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.037.
- Musselman L (1980) The biology of *Striga*, *Orobanche*, and other root-parasitic weeds. *Ann Rev Phytopath* 18: 463–489.
- Draie R, Péron T, Pouvreau J-B, Véronési C, Jégou S, et al. (2011) Invertases involved in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa*: characterization of the dominant soluble acid isoform, PrSAII. *Mol Plant Pathol* 12: 638–652. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00702.x.
- Lopez-Granados F, García-Torres L (1999) Longevity of crenate broomrape (*Orobanche crenata*) seed under soil and laboratory conditions. *Weed Sci* 47: 161–166.
- Labrousse P, Arnaud M, Serieys H, Berville A, Thalouarn P (2001) Several mechanisms are involved in resistance of helianthus to *Orobanche cumana* Wallr. *Ann Bot* 88: 859–868.
- Perez de Luque A, Fondevilla S, Perez-Vich B, Aly R, Thoiron S, et al. (2009) Understanding *Orobanche* and *Phelipanche*-host plant interactions and developing resistance. *Weed Res* 49: 8–22.
- Yoder JL, Scholes J (2010) Host plant resistance to parasitic weeds; recent progress and bottlenecks. *Curr Opin Plant Biol* 13: 478–484.
- Rubiales D, Pérez-de-Luque A, Fernández-Aparicio M, Sillero JC, Román B, et al. (2006) Screening techniques and sources of resistance against parasitic weeds in grain legumes. *Euphytica* 147: 187–199. doi:10.1007/s10681-006-7399-1.
- Dominguez J (1996) R-41, a sunflower restorer inbred line, carrying two genes for resistance against a highly virulent Spanish population of *Orobanche cernua*. *Plant Breed* 115: 203–204. doi:10.1111/j.1439-0523.1996.tb00904.x.
- Velasco L, Perez-Vich B, Jan C, Fernandez-Martinez J (2007) Inheritance of resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr) race F in a sunflower line derived from wild sunflower species. *Plant Breed* 126: 67–71.
- Amsellem Z, Barghouthi S, Cohen B, Goldwasser Y (2001) Recent advances in the biocontrol of *Orobanche* (broomrape) species. *Biocontrol* 46: 211–228.
- Brachmann A, Parniske M (2006) The most widespread symbiosis on Earth. *PLoS biology* 4: e239. doi:10.1371/journal.pbio.0040239.
- Smith S, Read D (2008) Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. London: Academic Press.
- Akiyama K, Matsuzaki K-ichi, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824–827. doi:10.1038/nature03608.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, et al. (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* 4: e226. doi:10.1371/journal.pbio.0040226.
- Lenzemo V, Kuyper T (2001) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on damage by *Striga hermonthica* on two contrasting cultivars of sorghum, *Sorghum bicolor*. *Agric Ecosyst Environ* 87: 29–35.
- Lenzemo V, Kuyper T, Matusova R, Bouwmeester HJ, Van Ast A (2007) Colonization by arbuscular mycorrhizal fungi of sorghum leads to reduced

germination was induced by GR24 in the presence or absence of *R. irregularis* spore exudates. Control: solvent only (0.1% acetone). GR24:  $10^{-8}$  M GR24 in 0.1% acetone. Spore exudates (AM ex) were used at different concentrations; 1× corresponds to 1,000 spores per mL. Data represent the average germination percentage of five batches of approx. 100 seeds, +/– s.e.m. Means were compared using the Kruskal-Wallis test; different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

(EPS)

**Figure S2 Effect of AM spore exudates on seed germination of non-parasitic plant species.** The germination rates of *Arabidopsis thaliana* (A) and leek seeds (B) were measured in the presence or absence of *R. irregularis* spore exudates (AM ex 1X, obtained with 1,000 spores per mL). Six to twelve batches of 50 seeds were tested, values represent the mean +/– s.e.m. Means were compared using Student's t-test and no significant differences were found ( $P = 0.79$  for *A. thaliana* and  $P = 0.89$  for leek). (EPS)

**Table S1 Multi-way ANOVA analysis of experiments described in Figure 1.** (DOCX)

## Acknowledgments

Mass spectrometry analyses were performed in the Metatoul platform (Toulouse, France), and the contribution of Saïda Danoun, Sylvie Fournier and Virginie Puech-Pagès to strigolactone and DCL analysis is gratefully acknowledged. The authors also wish to thank Johannes Schmidt (LBPV, Nantes, France) for his help in initial experiments.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JL PD GB SR. Performed the experiments: JL FC. Analyzed the data: JL FC PD GB SR. Contributed reagents/materials/analysis tools: PD. Wrote the paper: JL PD GB SR.



- germination and subsequent attachment and emergence of *Striga hermonthica*. *Plant Signal Behav* 2: 58–62.
23. Sun Z, Hans J, Walter MH, Matusova R, Beekwilder J, et al. (2008) Cloning and characterisation of a maize carotenoid cleavage dioxygenase (ZmCCD1) and its involvement in the biosynthesis of apocarotenoids with various roles in mutualistic and parasitic interactions. *Planta* 228: 789–801. doi:10.1007/s00425-008-0781-6.
  24. Fernández-Aparicio M, García-Garrido JM, Ocampo J, Rubiales D (2010) Colonisation of field pea roots by arbuscular mycorrhizal fungi reduces *Orobanche* and *Phelipanche* species seed germination. *Weed Res* 50: 262–268.
  25. López-Ráez JA, Charnikhova T, Fernández I, Bouwmeester HJ, Pozo MJM, et al. (2011) Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *J Plant Physiol* 168: 294–297. doi:10.1016/j.jplph.2010.08.011.
  26. Bécard G, Fortin J (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211–218.
  27. Hewitt EJ (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. London and Reading: The Eastern Press.
  28. Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF (2011) The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J Exp Bot* 62: 1049–1060. doi:10.1093/jxb/erq335.
  29. Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol* 84: 489–500.
  30. Vierheilig H, Coughlan A, Wyss U, Piche Y (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 64: 5004–5007.
  31. Thorogood CJ, Rumsey FJ, Hiscock SJ (2009) Seed viability determination in parasitic broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche*) using fluorescein diacetate staining. *Weed Res* 44: 461–468. doi:10.1111/j.1365-3180.2009.00716.x.
  32. Siegel S, Castellan N (1988) Nonparametric statistics for the behavioral sciences. 2nd ed. London: McGraw-Hill.
  33. Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüssler A (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol* 193: 970–984. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x.
  34. Cardoso C, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ (2011) Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Plant Sci* 180: 414–420.
  35. Perez-de-Luque A, Galindo JC, Macías F, Jorrin J (2000) Sunflower sesquiterpene lactone models induce *Orobanche cumana* seed germination. *Phytochemistry* 53: 45–50.
  36. Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun E, et al. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189–194. doi:10.1038/nature07271.
  37. Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol* 51: 1104–1117.
  38. Vurro M, Boari A, Evidente A, Andolfi A, Zermane N (2009) Natural metabolites for parasitic weed management. *Pest Manag Sci* 65: 566–571. doi:10.1002/ps.1742.
  39. Serghini K, Pérez de Luque A, Castejón-Muñoz M, García-Torres L, Jorrin JV (2001) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loeff.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *J Exp Bot* 52: 2227–2234.
  40. Schliemann W, Ammer C, Strack D (2008) Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 69: 112–146. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.06.032.
  41. Andolfi A, Boari A, Evidente A, Vurro M (2005) Metabolites inhibiting germination of *Orobanche ramosa* seeds produced by *Myrothecium verrucaria* and *Fusarium compactum*. *J Agric Food Chem* 53: 1598–1603. doi:10.1021/jf048339i.
  42. de Zélicourt A, Montiel G, Pouvreau J-B, Thoiron S, Delgrange S, et al. (2009) Susceptibility of *Phelipanche* and *Orobanche* species to AAL-toxin. *Planta* 230: 1047–1055. doi:10.1007/s00425-009-1008-1.
  43. Sauerborn J, Muller-Stover D, Hershenhorn J (2007) The role of biological control in managing parasitic weeds. *Crop Prot* 26: 246–254.
  44. Thomas H, Sauerborn J, Mu D (1998) The Potential of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* as a Biological Control Agent for *Orobanche cumana* in Sunflower. *Biol Control* 13: 41–48.
  45. Bouizgarne B, El-Maarouf-Bouteau H, Madiona K, Biligui B, Monestiez M, et al. (2006) A putative role for fusaric acid in biocontrol of the parasitic angiosperm *Orobanche ramosa*. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 550–556.
  46. Tosi L, Zizzerini A (2000) Interactions between *Plasmopara helianthi*, *Glomus mosseae* and two plant activators in sunflower plants. *Eur J Plant Pathol* 106: 735–744.

## **Can we use arbuscular mycorrhizal fungi to improve resistance to *Orobanche cumana* in sunflower?**

Parasitic weeds such as broomrapes (*Orobanche* spp.) can cause severe damage on crop plants, and efficient and sustainable control methods are needed. The aim of our work was to determine whether symbiotic micro-organisms called arbuscular mycorrhizal fungi can be used as a biocontrol method to protect sunflower against *Orobanche cumana*. We first observed that mycorrhization of sunflower plants reduced significantly their infection by *Orobanche cumana*. We then showed that mycorrhizal sunflower root exudates induced lower *Orobanche cumana* seed germination than non-mycorrhizal root exudates. Moreover, we demonstrated for the first time that AM fungi alone could produce inhibitors of *Orobanche* seed germination. Finally, we set up a novel *in vitro* system in which the early stages of sunflower root infestation by *Orobanche cumana* can be monitored. This system could be used to investigate possible effects of mycorrhizal fungi on these different stages.

Keywords : *Orobanche cumana*, parasitic plants, arbuscular mycorrhizal fungi, germination

**Auteur :** Louarn Johann

**Titre :** Exploitation des champignons Mycorhiziens à arbuscules pour la protection du tournesol contre *Orobanche cumana*

**Directeur de Thèse :** M Bécard Guillaume et Mme Rochange Soizic

**Soutenance :** Vendredi 15 Février 2013

**Résumé :**

Les plantes parasites telles que l'orobanche causent de nombreux dégâts sur les cultures et il existe peu de méthodes efficaces pour lutter contre ce fléau. L'objectif de la thèse a été de déterminer si des micro-organismes vivant en symbiose avec les plantes, les champignons mycorhiziens à arbuscules, peuvent être utilisés pour combattre les attaques d'*Orobanche cumana* sur le tournesol. Nous avons tout d'abord observé que la mycorhization de plants de tournesol réduit significativement leur infection par *Orobanche cumana*. Cet effet semble au moins en partie dû à une moindre germination des graines d'orobanche à proximité des plants mycorhizés. Nous avons ensuite montré que les champignons mycorhiziens eux-mêmes produisent des inhibiteurs de la germination des graines d'orobanche. Enfin, nous avons mis au point un système *in vitro* permettant d'observer toutes les étapes précoces de l'infection de racines de tournesol par *Orobanche cumana*, en présence ou non de champignons mycorhiziens.

**Mots clés :** *Orobanche cumana*, plantes parasites, champignons mycorhiziens à arbuscules, germination.

**Discipline :** Interactions plantes-microorganismes

**Adresse :** UMR 5546/Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales

24, chemin de Borde Rouge. BP 42617. 31326 Castanet-Tolosan