

MARIE-PIER DUBÉ

**ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE AU SEIN DES
GÉNOMES NUCLÉAIRE ET CHLOROPLASTIQUE CHEZ
LES CINQ RACES CONNUES DU *STRIGA GESNERIODES*,
UNE PLANTE PARASITE D'IMPORTANCE MONDIALE.**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en biologie végétale
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.)

DÉPARTEMENT DE PHYTOLOGIE
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

Résumé

La présente recherche avait pour but de révéler la diversité génétique qui existe au sein et entre différentes populations d'Afrique de l'Ouest du parasite épirhize *Striga gesnerioides*. Cette plante parasite plusieurs espèces appartenant à différentes familles de dicotylédones, dont le niébé (*Vigna unguiculata*), une légumineuse alimentaire constituant la majeure partie des protéines retrouvées dans la diète de plusieurs populations rurales des zones semi-arides d'Afrique de l'Ouest. Certains cultivars résistants ont déjà été identifiés et sont utilisés dans les programmes d'amélioration variétale. Il existe cependant plusieurs biotypes, ou races physiologiques, de *S. gesnerioides*, lesquels diffèrent quant à leur virulence. En utilisant trois types de marqueurs moléculaires différents, soit des marqueurs AFLP, ISSR et cpSSR, nous avons mis en évidence la quasi-absence de variabilité au sein des populations de *Striga* étudiées, ainsi que la très faible diversité qui existe entre les différentes populations du parasite. Nous n'avons pas non plus trouvé de marqueurs permettant de discriminer entre les races. Il semble exister une certaine structure dans la distribution géographique des populations, mais aucun groupe monophylétique n'a été obtenu sur une base « raciale », indiquant que la virulence ne joue pas encore un rôle dans leur différenciation. Quelques hypothèses ont été émises pour expliquer la faible diversité et l'absence de marqueur de races, dont le mode de reproduction autogame du parasite, ainsi qu'une origine probablement récente de la forme de *Striga gesnerioides* parasitant le niébé.

Abstract

The goal of the present study was to reveal the genetic diversity within and among different West African populations of the root parasite *Striga gesnerioides*. This plant parasitizes many species from different dicotyledonous families, including cowpea (*Vigna unguiculata*), an important legume crop and the major dietary protein source for many people of the semi-arid regions of West Africa. Some resistant cowpea varieties have been identified and are used in breeding programs. However, based on host-parasite interactions in the field, various races of *S. gesnerioides* attacking cowpea have been identified. Using three different types of molecular markers, AFLP, ISSR and cpSSR, we showed that there is almost no genetic variability within populations. The variability between the populations was also extremely low and did not allow discrimination of the five races. A few populations were more closely related, and there was a certain geographical structure but no “racial” clustering could be seen, enhancing the fact that virulence is not yet involved in the genetic differentiation process. Possible causes of the extremely low level of genetic variability seen in *S. gesnerioides* are proposed including the autogamous mode of reproduction of the parasite and the hypothesis that the cowpea strain has only quite recently arisen.

Résumé long

Le *Striga gesnerioides* représente une contrainte importante à la production du niébé, une légumineuse alimentaire de l'Afrique subsaharienne. Le *S. gesnerioides* est un parasite épiphyte obligatoire qui peut causer des pertes de rendement en champ de plus de 50%. L'utilisation de cultivars de niébé résistants est la méthode qui semble la plus efficace pour lutter contre le *Striga*. Il existe cependant plusieurs biotypes, ou races physiologiques, de *S. gesnerioides*, lesquels diffèrent quant à leur virulence. Cinq races de *Striga* avaient été identifiées à la suite de l'évaluation des cultivars résistants de niébé dans plusieurs régions d'Afrique de l'Ouest. Récemment, une équipe de recherche a étudié la diversité génétique au sein du génome nucléaire du *Striga* à l'aide de marqueurs AFLP. Ces travaux ont mis en lumière la très faible diversité génétique chez cette espèce, mais les marqueurs utilisés ont néanmoins permis à ces auteurs de séparer les différentes races en groupes distincts presque monophylétiques et d'identifier une sixième race provenant du Sénégal.

Compte tenu du fait que le *S. gesnerioides* ne possède que peu ou pas d'activité photosynthétique et qu'une grande fraction du génome chloroplastique est dévolue aux gènes impliqués dans la photosynthèse, il nous a paru intéressant de mesurer le degré de polymorphisme du génome chloroplastique. Une faible pression de sélection pour un génome fonctionnel peut avoir donné naissance à une plus grande diversité génétique. Certaines études ont réussi à mettre en évidence de tels polymorphismes chez d'autres espèces à l'aide d'amorces amplifiant des microsatellites chloroplastiques.

Le premier volet de ce projet avait pour objectif d'étudier la diversité génétique au sein du génome nucléaire de populations (entre 42 et 44, selon le type d'analyse) réparties dans sept pays d'Afrique de l'Ouest et appartenant à l'une ou l'autre des cinq races précédemment identifiées. La caractérisation génétique a été réalisée à l'aide de marqueurs AFLP et ISSR. Un total de 100 amorces ISSR ont été testées, cinq d'entre elles révélant 11 marqueurs polymorphes. Pour les marqueurs AFLP, plus de 1200 bandes provenant de 20 paires d'amorces ont été examinées, desquelles 67 marqueurs se sont révélés polymorphes.

Des analyses de groupement ont été employées pour déterminer les relations phénétiques entre les représentants des différentes races. Les 11 marqueurs ISSR et les 67 marqueurs AFLP ont permis de démontrer que les différentes populations de *S. gesnerioides* sont très homogènes. On ne retrouve presque pas de diversité au sein des populations, et cette diversité est extrêmement faible entre les populations du parasite. Aucun marqueur n'a permis de différencier les races entre elles. Il semble que l'isolement géographique peut être un facteur influençant la variabilité entre les populations.

Pour le second volet portant sur l'étude de la variabilité au sein du génome chloroplastique, nous avons utilisé un total de 34 paires d'amorces de SSR chloroplastiques « universels » provenant d'espèces diverses, dont 26 ont produit des amplicons chez le *S. gesnerioides*. Aucun polymorphisme n'a pu être détecté, ce qui indique que malgré une distribution géographique étendue, la variabilité génétique entre les différentes populations est extrêmement faible.

En conclusion, il ressort des différents types d'analyses que la variabilité génétique au sein des différentes populations ou entre les différentes races de *S. gesnerioides* est extrêmement limitée. Ceci peut être dû à son mode de reproduction autogame, mais aussi à une origine récente de la forme parasitant le niébé. Ces résultats diffèrent de ceux rapportés précédemment en ce qui a trait à l'existence de marqueurs génétiques capables de distinguer les races. Nos résultats ne reposent cependant pas sur un seul type d'analyse, mais bien sur trois méthodes d'analyse différentes des génomes nucléaire et chloroplastique, qui toutes trois confirment le peu de variabilité génétique.

Avant-Propos

Cette thèse est composée de cinq chapitres, dont deux sont rédigés en anglais sous forme de manuscrits. Le premier chapitre est une revue bibliographique présentant l'essentiel des connaissances générales sur le *Striga gesnerioides* et son hôte, le niébé, ainsi que les différents aspects de leur relation et de la résistance du niébé. On y présente aussi la littérature portant sur les principales techniques utilisées dans les travaux. Ce chapitre se termine par l'énoncé des hypothèses et des objectifs des travaux présentés dans cette thèse.

Le second chapitre, intitulé « Travail préliminaire et validation des populations » est présenté sous forme libre. Ce chapitre relate les travaux préliminaires que j'ai effectués afin de m'assurer que les lots de graines de *Striga gesnerioides* qui allaient servir aux différentes études étaient toujours viables, et correctement identifiés. Ce chapitre décrit aussi les travaux que nous voulions effectuer sur l'hérédité des gènes d'avirulence chez le *Striga*. Nous voulions développer des populations de cartographie, et le manque de marqueurs AFLP liés à l'avirulence nous a amené à l'alternative des marqueurs ISSR et cpSSR pour essayer de trouver plus de marqueurs, sans succès.

Le troisième chapitre, intitulé « Low genetic variability of *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke populations parasitic on cowpea might be explained by a recent origin » est présenté sous forme d'article scientifique. Ce chapitre décrit l'utilisation des marqueurs AFLP dans l'étude de la diversité génétique des cinq races du *S. gesnerioides*. Je suis la principale auteure de ce manuscrit, car j'ai contribué à la réalisation de l'ensemble des étapes de recherche, de la planification et la préparation des expériences aux manipulations en laboratoire ainsi qu'aux analyses des résultats et à la rédaction de l'article. Ce manuscrit a été soumis à un éditeur.

Le chapitre IV, « Extremely limited genetic variability among five races of *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke detected by ISSR and cpSSR analysis » est le second chapitre présenté sous forme d'article scientifique. Il décrit les analyses que nous avons effectuées avec les marqueurs ISSR et les marqueurs microsatellites chloroplastiques. Tout comme pour le second chapitre, je suis l'auteure principale de ce manuscrit.

Enfin, le dernier chapitre est une discussion générale qui résume et tente d'expliquer les résultats les plus novateurs, ainsi que quelques conclusions qui ouvrent sur les perspectives de travaux futurs. Trois annexes complètent la thèse.

Les références citées dans l'introduction, la revue bibliographique, le chapitre II et la discussion générale se retrouvent à la fin de la thèse, tandis que celles citées dans les manuscrits se trouvent à la fin de ces derniers.

Une partie de la revue bibliographique et de la discussion générale feront peut-être l'objet d'un article de synthèse.

Remerciements

Cette thèse est le fruit de longues années de travail, et plusieurs personnes m'ont aidée de près ou de loin tout au long de la réalisation de mes travaux. Je voudrais donc leur exprimer toute ma gratitude. Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr François Belzile, qui m'a accueillie dans son laboratoire. Ses nombreux conseils, sa patience et ses encouragements quand tout n'allait pas comme je le voulais m'ont grandement aidée à avancer malgré les difficultés. Je remercie également mon co-directeur, le Dr Alain Olivier, pour le soutien et pour m'avoir fait connaître le *Striga*, même si je ne suis pas fâchée de passer à d'autres plantes!

Mes remerciements s'adressent également aux Drs Michael Timko, Daniel Dostaler et Claude Lavoie qui ont accepté d'évaluer ma thèse.

Je remercie la Dre Martine Jean, pour ses innombrables conseils, son aide inestimable, sa grande disponibilité et sa gentillesse. Elle a toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses interrogations lors de la réalisation de mes expériences au laboratoire. Ses suggestions lors de mes présentations se sont toujours avérées de très bon conseil.

Je remercie également tous les collègues que j'ai côtoyés au cours des années, et qui ont contribué ou contribuent à l'ambiance fantastique qui règne au laboratoire. Je tiens à remercier plus particulièrement Vicki Bourdages et Aïda Azaiez, qui sont devenues au fil des années des amies très chères.

Je ne peux pas oublier tous mes amis, particulièrement Chantal, qui m'a soutenue et encouragée durant les dernières années, ainsi que Monika, et mes amies de longue date Mélanie et Nicole, que je ne vois pas souvent car elles sont bien loin, mais qui m'ont encouragée tout au long de mon doctorat. Merci aussi à tous ceux que je n'aurais pas cités et qui m'ont directement ou indirectement aidée à réaliser ce travail.

Enfin, je tiens aussi à remercier les membres de ma famille, qui m'ont soutenue de multiples façons tout au long de la réalisation de mes études, et particulièrement mes

parents. Je leur serai éternellement reconnaissante pour leur soutien, leur confiance et leur fierté. La dernière personne que je désire remercier, mais non la moindre, est mon conjoint Zafari. Il a été d'une patience à toute épreuve, d'une générosité et d'un support incroyable. Sans le savoir (ou peut-être bien que si!), il a grandement contribué à la réalisation de mon doctorat.

Ces travaux ont été rendus possibles grâce à des bourses d'études du Conseil de la recherche en sciences naturelles et génie du Canada ainsi que de la Fondation de l'Université Laval.

*Je dédie cette thèse et tout le travail qu'elle
représente à mes parents, à mon conjoint et à
tous ceux et celles qui m'ont appuyée tout au
long de mon doctorat.*

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Résumé long	iii
Avant-Propos	v
Remerciements	vii
Table des matières	x
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des abréviations	xv
Introduction générale	1
Chapitre I : Revue bibliographique	4
1.1 Le parasite et son hôte	5
1.1.1 Description générale du parasite.....	5
1.1.2 Description générale et usages de l'hôte.....	7
1.2 L'interaction niébé- <i>Striga gesnerioides</i>	11
1.2.1 La germination du <i>Striga</i>	11
1.2.2 La fixation et la pénétration des tissus de l'hôte.....	15
1.2.3 Les effets du parasite sur la photosynthèse chez l'hôte	18
1.3 La résistance chez le niébé et les biotypes (races) du <i>Striga gesnerioides</i>	20
1.3.1 Le développement de cultivars de niébé résistants.....	20
1.3.2 Les biotypes de <i>Striga gesnerioides</i>	21
1.3.3 Les mécanismes de la résistance.....	23
1.3.4 La génétique de la résistance	25
1.4 Diversité génétique des plantes parasites et techniques de marquage moléculaire ..	27
1.4.1 Techniques utilisées pour l'étude de la diversité génétique des plantes	
parasites	27
1.4.2 La technique AFLP	28
1.4.3 La technique ISSR	31
1.5 La variabilité au sein du génome chloroplastique du <i>Striga gesnerioides</i>	33
1.6 Hypothèses de recherche	35

Chapitre II : Travail préliminaire et validation des populations.....	37
2.1 Introduction.....	38
2.2 Taux de germination des graines de <i>Striga</i>	38
2.3 Validation des races.....	42
2.4 Cartographie de la virulence.....	45
Chapitre III : Low genetic variability of <i>Striga gesnerioides</i> (Willd.) Vatke populations parasitic on cowpea might be explained by a recent origin	46
3.1 Résumé du manuscrit.....	48
3.2 Abstract.....	49
3.3 Introduction.....	50
3.4 Materials and methods.....	53
3.4.1 Plant material and growth conditions	53
3.4.2 DNA extraction.....	55
3.4.3 AFLP markers.....	55
3.4.4 Data analysis.....	56
3.5 Results.....	58
3.5.1 Genetic diversity within <i>S. gesnerioides</i> populations	58
3.5.2 Genetic diversity among <i>S. gesnerioides</i> populations	60
3.5.3 Genetic diversity among <i>S. gesnerioides</i> races.....	61
3.5.4 Race-specific markers.....	69
3.6 Discussion.....	70
3.7 Acknowledgements.....	74
3.8 References.....	75
Chapitre IV : Extremely limited genetic variability among five races of <i>Striga gesnerioides</i> (Willd.) Vatke detected by ISSR and cpSSR analysis.....	80
4.1 Résumé du manuscrit.....	82
4.2 Abstract.....	83
4.3 Introduction.....	84
4.4 Materials and methods.....	87
4.4.1 Plant material and growth conditions	87
4.4.2 DNA extraction.....	89
4.4.3 ISSR markers.....	89
4.4.4 Chloroplastic primers.....	90
4.4.5 Data analysis.....	93
4.5 Results.....	94
4.5.1 ISSR analysis.....	94
4.5.1.1 Genetic diversity within <i>S. gesnerioides</i> populations.....	94

4.5.1.2	Genetic diversity among <i>S. gesnerioides</i> populations	95
4.5.1.3	Genetic diversity among <i>S. gesnerioides</i> races.....	96
4.5.2	Chloroplastic simple sequence repeat analysis	101
4.5	Discussion.....	103
4.6	Acknowledgements.....	107
4.7	References.....	108
Chapitre V : Discussion générale et conclusions.....		113
Références bibliographiques (Chapitres I, II et V).....		122
ANNEXE 1 Liste des échantillons et de leur provenance.....		145
ANNEXE 2 DNA isolation according to Tanksley à la Paul modified by J. Carling.....		147
ANNEXE 3 Liste des amorces ISSR de la UBC (primer set #9).....		149

Liste des tableaux

CHAPITRE 2

Tableau 2.1. Pourcentage de germination des 45 lots de graines de <i>Striga gesnerioides</i>	40
Tableau 2.2 Cultivars de niébé utilisés pour valider les races de <i>Striga gesnerioides</i> et la réponse attendue selon la race présente	42

CHAPITRE 3

Table 3.1 : <i>S. gesnerioides</i> populations used in this work.....	54
Table 3.2 : Genetic distances among <i>S. gesnerioides</i> populations	60
Table 3.3 : Genetic distances between <i>S. gesnerioides</i> races	62
Table 3.4 : Analysis of molecular variance (AMOVA) of 43 populations of <i>Striga gesnerioides</i> representing 5 races	68

CHAPITRE 4

Table 4.1 : <i>S. gesnerioides</i> populations used in this work.....	88
Table 4.2 : cpSSR primer pairs sequences applied in the present study.....	91
Table 4.3 : Analysis of molecular variance (AMOVA) of 42 populations of <i>Striga gesnerioides</i> representing 5 races	100

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1.1 : Schéma du cycle biologique du <i>Striga gesnerioides</i> sur le niébé.	12
Figure 1.2 : Radicule de <i>Striga gesnerioides</i> sur une racine de niébé.	16
Figure 1.3 : Distribution des races de <i>Striga gesnerioides</i> en Afrique de l'Ouest.	22
Figure 1.4 : Principe de la technique d'AFLP.	30
Figure 1.5 : Représentation schématique de la technique ISSR-PCR.	32

CHAPITRE 2

Figure 2.1 : Racines de niébé présentant une interaction compatible.	44
---------------------------------------------------------------------------	----

CHAPITRE 3

Figure 3.1 : AFLP profiles of 10 individual <i>S. gesnerioides</i> plants from each of three populations belonging to three different races present in West Africa.	59
Figure 3.2 : AFLP profiles for selective primer combination E-AGC + M-CAA on the 43 <i>S. gesnerioides</i> populations of the study.	62
Figure 3.3 : Populations structure using a) $k=5$ and b) $k=2$	64
Figure 3.4 : Principal coordinate analysis (PCoA) of the AFLP markers showing the two axes, which account for 23.15% and 10.54%, respectively, of the total variance.	66
Figure 3.5 : UPGMA dendrogram of the <i>S. gesnerioides</i> populations.	67
Figure 3.6 : AFLP profile for selective primer combination E-ACG + M-CAT on the 43 populations of the study.	69

CHAPITRE 4

Figure 4.1 : Amplification products generated by ISSR primer 811 on four populations of the parasite.	94
Figure 4.2 : Amplification products generated by ISSR primer 808 on race 1 populations of the parasite.	95
Figure 4.3 : Amplification products generated by ISSR primer 811 on different populations of the parasite.	96
Figure 4.4 : Principal coordinate analysis (PCoA) of the ISSR markers showing the two axes, which account for 44.23% and 18.69%, respectively, of the total variance.	98
Figure 4.5 : UPGMA dendrogram of the <i>S. gesnerioides</i> populations.	99
Figure 4.6 : Amplification products obtained for three cpSSR: ccmp4, ccmp6 and ccmp8 on the 44 populations of <i>S. gesnerioides</i>	102

Liste des abréviations

2,6-DMBQ	2,6-diméthoxy-p-benzoquinone
ADN, DNA	acide désoxyribonucléique
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> , polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i> , analyse de la variance moléculaire
bp, pb	paire de bases
cpSSR	<i>Chloroplastic Simple Sequence Repeat</i> , microsatellite chloroplastique
CTAB	bromure d'héxa-décyltriméthyl-ammonium
DDRT-PCR	<i>Differential-Display Reverse Transcription-PCR</i> , transcription inverse différentielle des ARNm et amplification par PCR
EcoR1	Enzyme de restriction produite par <i>Escherichia coli</i>
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HOMOVA	<i>Homogeneity of Molecular Variance</i> , analyse de l'homogénéité de la variance moléculaire
IARC	Institute of Arable Crops Research, Long Ashton, UK (fermé en 2003)
IITA	International Institute of Tropical Agriculture
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i> , amplification intermicrosatellites
kb	kilobase
LSC	<i>Large Single Copy</i> , grande région à copie unique
ml	millilitre
Mse1	Enzyme de restriction produite par <i>Micrococcus species</i>
N	azote
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ng	nanogramme
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , réaction de polymérisation en chaîne

PR	pathogenesis related, protéines PR
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> , ADN polymorphe amplifié au hasard
<i>rbcL</i>	gène de la ribulose-bisphosphate carboxylase
RUBISCO	ribulose bisphosphate carboxylase
SAFGRAD	Semi-Arid Food Grain Research and Development
SCAR	<i>Sequence-Characterized Amplified Region</i> , marqueur spécifique de locus
SRAP	<i>Sequence-Related Amplified Polymorphism</i> , polymorphisme d'amplification lié à la séquence
SSC	<i>Small Single Copy</i> , petite région à copie unique
U	unité
µl	microlitre
UPGMA	<i>unweighted pair group method with arithmetic averaging</i> , groupement selon l'association moyenne
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>

Introduction générale

Plus de 3500 angiospermes ont adopté un mode de vie parasitaire et tirent une partie ou la totalité de leur eau et de leurs nutriments d'une plante-hôte (Rispaïl *et al.*, 2007). Parmi celles-ci, les *Striga* spp., appartenant à la famille des Orobanchacées, sont un groupe de plantes parasites racinaires qui causent de nombreux problèmes en Afrique subsaharienne, principalement dans les cultures de céréales. Le *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke n'attaque cependant que des dicotylédones. Il possède une spécificité à l'hôte élevée, et son hôte le plus important d'un point de vue économique est le niébé, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., une légumineuse alimentaire très importante pour de nombreuses populations d'Afrique de l'Ouest. L'utilisation de cultivars de niébé résistants est la méthode qui semble la plus efficace et la plus adéquate pour lutter contre le *Striga*. Il existe cependant plusieurs biotypes, ou races physiologiques, de *Striga gesnerioides*, lesquelles diffèrent quant à leur virulence. Cinq races de *Striga* ont été identifiées à la suite de l'évaluation des cultivars résistants de niébé dans plusieurs régions d'Afrique de l'Ouest (Lane *et al.*, 1997). Les cultivars résistants présentent des réponses différentielles à ces diverses races. En 2006, Botanga et Timko ont identifié une sixième race au Sénégal.

La connaissance de la variabilité génétique du parasite est d'une importance majeure dans le développement et l'élaboration des programmes d'amélioration du niébé. Plusieurs types de marqueurs appropriés pour les études de diversité génétique ont été développés ces dernières années. En ce qui concerne les plantes parasites, trois principales technologies de marquage moléculaire ont été employées. Il s'agit des RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou ADN polymorphe amplifié au hasard), des AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou polymorphisme de longueur des fragments amplifiés) et tout dernièrement des ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* ou amplification intermicrosatellites).

Les marqueurs RAPD ont été principalement employés pour étudier la diversité génétique de plusieurs espèces et populations d'*Orobanche*, une Orobanchacée parasite infestant diverses dicotylédones en Europe et au Moyen-Orient (Gagne *et al.*, 1998; Román *et al.*, 2001). Ils ont aussi été employés par Aigbokhan *et al.* (2000) et Koyama (2000) chez le *S. hermonthica*. Ces types de marqueurs, d'usage assez simple, sont particulièrement

adaptés à l'identification efficace et non radioactive des génotypes et à la détermination des relations génétiques intra et interspécifiques.

Les AFLP ont été quant à eux utilisés pour étudier la diversité génétique du *S. asiatica* (Botanga *et al.*, 2002; Gethi *et al.*, 2005), du *S. hermonthica* (Gethi *et al.*, 2005) et du *S. gesnerioides* (Botanga et Timko, 2006). Mise au point par Vos *et al.* (1995), cette technique permet de détecter un grand nombre de locus polymorphes et permet l'analyse de milliers de marqueurs en un temps relativement court. Sa reproductibilité est également plus élevée que celle de la technique RAPD (Cervera *et al.*, 1996).

La technique ISSR, ou amplification des régions intermicrosatellites, a été utilisée par Román *et al.* (2002) pour étudier la diversité inter et intrapopulations de différentes populations d'*Orobanche crenata* provenant d'Espagne et d'Israël, par Benharrat *et al.* (2002, 2005) pour l'étude de différentes espèces et populations d'*Orobanche* et par Thorogood *et al.* (2008) chez *O. minor*.

D'autre part, le *S. gesnerioides* est quasiment holoparasite, c'est-à-dire qu'il dépend presque entièrement de son hôte pour se procurer les nutriments essentiels à sa survie (Dembélé, 1988; Dembélé *et al.*, 1994). Même en conditions d'éclairage intense, il n'y a pas de gain net de carbone (dePamphilis *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2008), ce qui suggère que le génome chloroplastique n'est pas très sollicité. Une faible pression de sélection pour un génome fonctionnel pourrait avoir donné naissance à une plus grande diversité génétique. Certaines études employant des marqueurs microsatellites chloroplastiques ont réussi à mettre en évidence de tels polymorphismes (Weising et Gardner, 1999; Mengoni *et al.*, 2001, 2003; Imazio *et al.*, 2006).

La présente étude a donc été entreprise afin de révéler les polymorphismes dans le génome nucléaire des populations des cinq races répertoriées par Lane *et al.* (1996b), et pour vérifier s'il existe des polymorphismes au sein du génome chloroplastique de ces populations.

Chapitre I :
Revue bibliographique

1.1 Le parasite et son hôte

1.1.1 Description générale du parasite

Le *S. gesnerioides* (Willd.) Vatke fait partie de la famille des *Orobanchaceae* (anciennement des *Scrophulariaceae*, Olmstead *et al.*, 2001) et parasite des dicotylédones à feuilles larges de plusieurs familles, dont les *Leguminosae*, les *Convolvulaceae*, les *Euphorbiaceae* et les *Solanaceae* (Aggarwal, 1985; Dembélé, 1988; Sallé *et al.*, 1995; Hibberd *et al.*, 1996). Contrairement au *Striga hermonthica* (Del.) Benth., qui est essentiellement africain, on retrouve ce parasite épiphyte non seulement en Afrique tropicale et du Sud, mais aussi au sud du Maroc, sur le continent indien (Ozenda et Capdepon, 1972; Ba, 1977), dans la péninsule arabique et même depuis peu aux États-Unis (Wunderlin *et al.*, 1979; Dembélé, 1985, 1988; Lane et Bailey, 1992). C'est l'espèce de *Striga* la plus répandue, se retrouvant entre les latitudes 33°10'N et 32°15'S (Mohamed *et al.*, 2001).

Le *S. gesnerioides* parasite plusieurs adventices, par exemple l'indigotier (*Indigofera hirsuta* L.) aux États-Unis (Wunderlin *et al.*, 1979), mais d'un point de vue économique et agronomique, ses hôtes les plus importants sont le niébé, le tabac et la patate douce (Dembélé, 1985; Vasudeva Rao et Musselman, 1987; Sallé *et al.*, 1995; Berner et Williams, 1998). Il semble démontrer une spécificité très élevée vis-à-vis de ses hôtes respectifs. En effet, des graines issues de plants qui parasitent le tabac ne semblent pas pouvoir parasiter le niébé, même si cette espèce provoque la germination de ces graines (Aggarwal, 1985; Obilana, 1987; Ralston *et al.*, 1987; Dembélé, 1988; Berner *et al.*, 1995). Ce phénomène a aussi été démontré chez d'autres hôtes dont l'indigotier (Musselman et Parker, 1981a), mais Igbinnosa et Okonkwo (1991) ont observé que des graines issues de plants parasitant le niébé pouvaient aussi bien attaquer cet hôte que l'indigotier. Botanga et Timko (2006) ont observé que certaines graines de *Striga* parasitant l'indigotier pouvaient germer sur le niébé, et une faible proportion des plants issus de ces graines développaient une connexion à l'hôte fonctionnelle et parvenaient à maturité.

Les caractères morphologiques du *S. gesnerioides* varient aussi d'un hôte à l'autre. Aggarwal (1985), ainsi que Vasudeva Rao et Musselman (1987), ont rapporté que les plants de *Striga* parasitant le tabac ont des corolles d'une couleur distinctive, tandis que les plants de *Striga* parasitant le niébé sont plus ramifiés et pubescents que ceux attaquant l'indigotier. Pieterse et Verkleij (1991b) ont pour leur part distingué quatre principaux morphotypes en se basant sur la couleur des fleurs et la ramification des plants, chacun de ces morphotypes parasitant des hôtes distincts. Mohammed *et al.* (2001) en distinguent jusqu'à huit, correspondant à autant d'hôtes, mais mentionnent cependant que les différences morphologiques sont trop insignifiantes pour qu'on sépare ces morphotypes en sous-espèces distinctes. De façon générale, le *S. gesnerioides* forme des touffes de rameaux dressés de 15 à 30 cm de hauteur. Les feuilles sont très petites, de 4 à 10 mm de long et de 1 à 3 mm de large, écailleuses, appressées sur la tige charnue, et de couleur vert très pâle (Ba, 1977, 1984; Hibberd *et al.*, 1996). La floraison se produit de 4 à 7 jours après l'émergence du parasite (Berner et Williams, 1998). Les fleurs solitaires, d'une longueur maximale de 2 cm et d'une largeur de 5 mm, sont de couleurs variées, allant de bleuâtre à rose très pâle, rouge, pourpre ou blanc crème (Ba, 1977, 1983, 1984; Ramaiah *et al.*, 1983; Obilana, 1987; Dembélé, 1988; Dembélé *et al.*, 1994). Cette espèce est autogame (Ralston *et al.*, 1987), mais la pollinisation croisée serait possible (Musselman *et al.*, 1982; Musselman et Ayensu, 1984). Les graines sont produites dans des capsules, chacune pouvant contenir de 400 à 500 graines (Ramaiah *et al.*, 1983; Singh et Emechebe, 1997). Ces graines à tégument strié brun foncé sont minuscules, de 0,20 à 0,35 mm de long, chacune pesant de 4 à 7 μg (Musselman et Parker, 1981b; Hussain et Aigbokhan, 1991; Berner *et al.*, 1995; Sallé *et al.*, 1995). Chaque plant de *S. gesnerioides* peut produire de 50 000 à 500 000 graines (Aggarwal, 1985; Hartman et Tanimonure, 1991; Shawe et Ingrouille, 1993).

Les graines peuvent rester viables dans le sol durant une très longue période, de 10 à 20 ans selon certains auteurs (Worsham, 1987; Dembélé, 1988; Dembélé *et al.*, 1994; Berner *et al.*, 1995), mais d'autres auteurs rapportent qu'en conditions humides au champ, durant la saison pluvieuse, les graines seraient détruites assez rapidement, notamment par les micro-organismes du sol, surtout si elles se retrouvent dans les couches supérieures. Les graines qui sont à moins de 30 cm de la surface pourraient ne pas survivre plus de

5 ans (Bebawi *et al.*, 1984; Gbèhounou *et al.*, 1996, 2003). Selon Touré (1992), 80 % des graines de *Striga* se retrouvent dans les 15 à 30 premiers centimètres de sol. Le reste des graines est réparti jusqu'à une profondeur de 150 cm (Dembélé, 1988). La quantité de graines dans le sol est très variable (van Mourik, 2007), mais Hartman et Tanimonure (1991) ont retrouvé jusqu'à 75 graines par gramme de sol dans un champ très infesté. Dembélé (1988) a pour sa part observé une moyenne de $10,5 \times 10^8$ graines de *S. gesnerioides* à l'hectare. Kim et Adetimirin (1997) estiment qu'en une saison de production, une graine sur 10 000 dans la banque de sol se développera en plant de *Striga* mature. Selon Rodenburg *et al.* (2006), la production de graines par quelques plants de *Striga* serait nécessaire pour maintenir ou augmenter la banque de graines dans le sol et balancer les pertes. La dispersion des graines se fait par l'eau, par le vent ou par les animaux, mais surtout et principalement par le transport et l'utilisation de semences infestées (Berner *et al.*, 1994; Singh et Emechebe, 1997). L'être humain s'avère donc le principal agent de dispersion des graines de *Striga*.

1.1.2 Description générale et usages de l'hôte

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) est une légumineuse alimentaire et fourragère annuelle d'une grande importance pour plusieurs populations des régions arides et semi-arides du globe. Le centre d'origine du niébé, selon la localisation des formes sauvages dont il est dérivé, serait en Afrique méridionale ou en Afrique équatoriale (Rawal, 1975; Vaillancourt *et al.*, 1993), et il aurait été domestiqué par les peuples d'Afrique de l'Ouest, il y a 4000 ans (Padulosi et Ng, 1997). L'Inde constituerait un centre de domestication et de sélection secondaire (Smithson *et al.*, 1980; Ehlers et Hall, 1997). On le cultive principalement en Afrique, en Asie et en Amérique centrale et du Sud (surtout au Brésil), mais aussi en Océanie, en Europe méridionale et au sud des États-Unis. Le niébé est arrivé en Europe 300 ans avant Jésus-Christ via l'Afrique du Nord, puis en Amérique durant la colonisation et la traite des esclaves, au cours des siècles derniers (Smithson *et al.*, 1980; Padulosi et Ng, 1997). Il aurait été introduit en Inde il y a environ 2000 ans, en même

temps que le sorgho et le mil, et par la suite dans le reste de l'Asie au gré des migrations humaines (Smithson *et al.*, 1980; Padulosi et Ng, 1997).

La superficie occupée par cette culture est d'environ 11,3 millions d'hectares pour une production mondiale annuelle d'environ 5,4 millions de tonnes de grains (FAOSTAT 2008). À peu près 90 % de la superficie de culture et 80 % de la production mondiale se retrouvent en Afrique centrale et de l'Ouest (Kormawa *et al.*, 2002; FAOSTAT, 2008), où la zone de production s'étend surtout entre 10 ° et 15 ° de latitude Nord (Quin, 1997). Le Nigeria est le principal producteur de niébé au monde, avec 5 millions d'hectares de culture et plus de 3 millions de tonnes produites par année (Singh *et al.*, 2002; FAOSTAT, 2008). Dans les régions plus humides (régions côtières, savane guinéenne), le niébé est cultivé en association avec l'arachide, l'igname, le manioc et le maïs (Mortimore *et al.*, 1997; Tarawali *et al.*, 1997); dans la zone soudano-sahélienne, principale zone de production, le niébé est plutôt cultivé en association avec le mil et le sorgho (Ntare, 1989; Quin, 1997; Tarawali *et al.*, 1997). Ailleurs dans le monde, on le retrouve plus souvent en culture pure (Mortimore *et al.*, 1997), mais on peut aussi le retrouver associé à une autre culture, parfois même dans les vergers, entre les rangées d'arbres (Ehlers et Hall, 1997).

Le niébé est une culture très bien adaptée aux régions arides et semi-arides. Il supporte des températures élevées et tolère assez bien la sécheresse. De plus, il possède la capacité de fixer l'azote atmosphérique même dans des sols très pauvres (Ehlers et Hall, 1997). Il croît bien à des pH de 4,5 à 9,0 et réussit à fixer l'azote dans des sols possédant moins de 2 % de matière organique et plus de 85 % de sable (Singh et Emechebe, 1997). Selon Quin (1997), le niébé pourrait apporter au sol de 40 à 80 kg N/ha, alors que le taux global de fixation serait de 70 à 350 kg N/ha. L'apport d'azote au sol varie selon le taux de fixation et les parties du niébé qui sont récoltées (Adjei-Nsiah *et al.*, 2007). La balance est en général positive, puisque environ 60 à 70 % de l'azote du niébé est dérivé de l'atmosphère, alors que moins de 50 % de l'azote est exporté dans les graines (Carsky *et al.*, 2002). Il tolère bien l'ombre, ce qui convient aux systèmes de cultures associées, où il constitue la strate inférieure, permettant alors une utilisation optimale de la lumière disponible et de l'eau du sol (Blade *et al.*, 1997). Sa croissance est plutôt rapide et permet l'établissement d'une

bonne couverture du sol, ce qui peut diminuer l'érosion, la température du sol et la compétition avec les mauvaises herbes (Blade *et al.*, 1997).

Le niébé présente une grande variabilité pour ce qui est des types de plants, de graines et du temps de maturité, ce qui le rend polyvalent. C'est une plante autogame dans la plupart des environnements, mais l'hybridation artificielle est facile à réaliser (Ehlers et Hall, 1997). On retrouve des variétés au port érigé, semi-érigé, buissonnant, prostré ou rampant, à gousses plus ou moins longues (10 à 50 cm), courbées ou droites, à graines ridées ou lisses, de diverses couleurs, et de maturité très hâtive à tardive, photosensibles ou non (Rawal, 1975; Smithson *et al.*, 1980). Les préférences des agriculteurs varient dans chaque région de production selon l'usage que l'on fait de la culture. En Afrique de l'Est et du Sud, on l'utilise beaucoup dans l'alimentation humaine, et on consomme ses gousses, ses graines et ses feuilles, qui servent à la préparation de nombreux plats (Mortimore *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1997). En Afrique de l'Ouest, le niébé constitue la principale source de protéines pour plusieurs populations rurales, puisqu'il procure à lui seul plus de 50 % des protéines d'une diète constituée principalement d'hydrates de carbone (Smithson *et al.*, 1980; Lane et Bailey, 1992). Les graines peuvent en effet contenir jusqu'à 24 % de protéines, et sont aussi une bonne source de vitamines et minéraux (Roy et Richharia, 1948; Berner *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1997). Les fanes utilisées pour le fourrage sont elles aussi riches en protéines et en minéraux, et se comparent avantageusement aux autres légumineuses fourragères en ce qui concerne la digestibilité (Tarawali *et al.*, 1997).

En région subsaharienne, les paysans sèment habituellement deux types de variétés dans le même champ, en association avec des céréales. Une variété hâtive donnera du grain, tandis qu'une variété plus tardive donnera du fourrage à la fin de la saison des pluies (Mortimore *et al.*, 1997). Les variétés hâtives sont importantes pour le Sahel, puisqu'elles procurent la première récolte de la saison, brisant ainsi la période de soudure, alors que les réserves en grain de la récolte précédente sont au plus bas (Ehlers et Hall, 1997). Le fourrage produit par les variétés tardives est récolté aux premiers signes de sécheresse, puis est utilisé pour nourrir le bétail ou pour la vente. Les revenus tirés de ce commerce peuvent représenter de 25 à 50 % des revenus provenant de la vente des produits de récolte (Tarawali *et al.*, 1997). Le niébé fait par ailleurs partie des cultures choisies par la NASA

pour son programme CELSS (*Controlled Ecological Life-Support System*), en raison de sa grande versatilité, de son adaptabilité, de ses qualités nutritives et de sa productivité (Ehlers et Hall, 1997; Nielsen *et al.*, 1997).

Cependant, le niébé est cultivé le plus souvent sur des terres marginales, avec peu ou pas d'intrants, et sa productivité demeure très basse, surtout en Afrique. Le rendement moyen en grain, au niveau mondial, se situe à un peu plus de 478 kg/ha, alors qu'il peut atteindre 2083 kg/ha aux États-Unis (FAOSTAT, 2008). Cette situation est due à de nombreuses contraintes biotiques et abiotiques, notamment les maladies, les insectes, la sécheresse et le faible potentiel de certaines variétés locales (Obilana, 1987; Singh et Sharma, 1996; Carsky *et al.*, 2003). Parmi ces facteurs, la plante parasite *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke constitue un problème de plus en plus sérieux dans les zones semi-arides d'Afrique de l'Ouest (Obilana, 1987; Singh et Emechebe, 1997). Ce parasite épirhize peut causer des pertes de rendement très importantes, allant jusqu'à 30 % (Aggarwal et Ouédraogo, 1989; Muleba *et al.*, 1997; Alonge *et al.*, 2005a, 2005b) et même à la récolte entière (Obilana, 1987). Dans une étude regroupant 30 communautés de l'état de Borno, au Nigeria, Dugje *et al.* (2006) ont observé que plus de 81 % des champs étaient infestés. Cette situation peut mener à l'abandon des champs infestés, voire à l'abandon complet d'exploitations et même de villages (Thalouarn et Fer, 1993). En Afrique centrale et de l'Ouest, le *S. gesnerioides* est associé aux écosystèmes sujets à la désertification, causée par le surpâturage, la coupe des arbres et les feux de brousse qui réduisent le couvert végétal (Muleba *et al.*, 1997). Le problème est donc aggravé par la pression croissante sur les terres cultivables dans les régions touchées, par la monoculture (Pieterse et Verkleij, 1991a; Sallé *et al.*, 1995; Singh et Emechebe, 1997; Aflakpui *et al.*, 2008) et par le manque de connaissances sur les moyens de lutte accessibles aux paysans (Touré, 1992).

1.2 L'interaction niébé-*Striga gesnerioides*

1.2.1 La germination du *Striga*

Le cycle biologique du *Striga* (figure 1.1) est très bien adapté aux conditions climatiques qui prévalent dans les zones semi-arides où le parasite se retrouve. Les graines de *S. gesnerioides* nécessitent une période de 6 à 7 mois de post-maturation en conditions sèches et chaudes (Thalouarn et Fer, 1993), à une température comprise entre 25 et 35 °C (Worsham, 1987; Kuiper *et al.*, 1996). Cette période varie en fonction de la température et de l'humidité ambiante. Plus les températures sont élevées, plus la post-maturation est rapide (Okonkwo, 1991). Le taux d'humidité relative durant cette période affecte aussi la longueur de la post-maturation. Par exemple, Mohamed *et al.* (1998) ont observé chez le *S. asiatica* que le taux de germination restait très bas tant que les graines avaient un taux d'humidité de plus de 11 %. Dans certaines régions très sèches, cette période ne serait pas nécessaire à la germination (Aigbokhan *et al.*, 1998; Mohamed *et al.*, 1998). Les phénomènes biochimiques impliqués dans la post-maturation sont encore inconnus (Okonkwo, 1991; Mohamed *et al.*, 1998).

Par la suite, les graines ont besoin d'une période d'imbibition (ou conditionnement) de 10 à 21 jours avant de pouvoir germer (Worsham, 1987; Okonkwo, 1991). L'imbibition a généralement lieu au début de la saison des pluies, à l'établissement des cultures hôtes (Doggett, 1984; Dembélé, 1988). Cette période serait vraisemblablement nécessaire afin de lessiver certains inhibiteurs de germination, de permettre la synthèse d'un composé stimulant ou d'augmenter la perméabilité d'une composante de la graine, par exemple de l'aleurone (Patterson, 1987; Okonkwo, 1991; Rugutt *et al.*, 1996). Une substance inhibitrice composée d'un acide aliphatique a été retrouvée dans les graines de l'espèce *Striga asiatica* (L.) Kuntze par Williams (1959). La teneur de l'inhibiteur était grandement réduite suite à l'immersion des graines dans l'eau durant une certaine période. L'hypothèse de la synthèse d'un stimulant de germination par le parasite, pour sa part, n'a jamais pu être démontrée expérimentalement. Enfin, même s'il a été prouvé que la période de conditionnement augmentait la perméabilité de la cuticule ou de l'aleurone, la scarification mécanique ou chimique de ces structures ne permet pas de contourner cette étape, qui

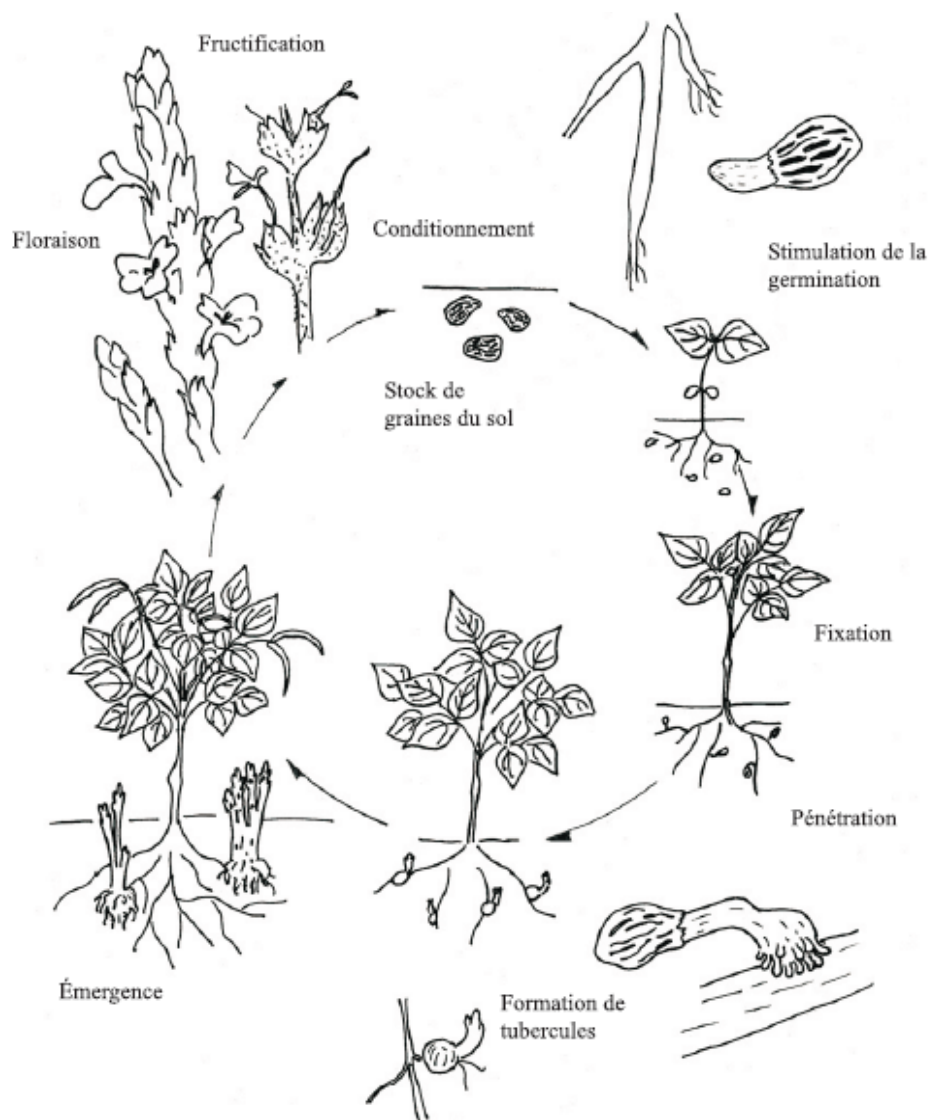


Figure 1.1 : Schéma du cycle biologique du *Striga gesnerioides* sur le niébé.

demeure essentielle pour une germination optimale (Okonkwo, 1991). Le *S. gesnerioides* semble plus exigeant que le *S. hermonthica* et le *S. asiatica* en ce qui concerne la température optimale de conditionnement, puisqu'il répond mieux à une température de 33 °C, contre 21 à 23 °C pour les deux autres parasites (Okonkwo, 1991). Cependant, l'humidité du sol serait un facteur plus important que la température dans le processus de conditionnement (Ransom et Njoroge, 1991).

Après cette période de conditionnement, les graines vont germer si elles sont en présence de substances chimiques spécifiques exsudées par les racines du niébé. La plupart des graines qui se retrouvent à moins de 2 mm d'une racine vont germer, alors que les autres graines imbibées d'eau vont débiter une période de « dormance humide » si elles ne sont pas en contact avec des stimulants de germination (Vallance, 1950). Cette dormance humide n'a cependant jamais été prouvée en champ et certains auteurs parlent plutôt d'une dormance secondaire (Gbèhounou *et al.*, 2000, 2003; Matusova *et al.*, 2004). On ne connaît pas encore la composition exacte des exsudats racinaires, mais plusieurs molécules ont la propriété de stimuler la germination (Kuiper *et al.*, 1996; Matusova *et al.*, 2005; Akiyama et Hayashi, 2008). Une molécule active a déjà été identifiée à partir des exsudats de niébé. Cette molécule, formée d'une xanthine, d'un acide C₁₂-carboxylique insaturé et d'un dipeptide de glycine et d'acide aspartique, provoque la germination des graines de *S. asiatica*, de *S. gesnerioides* et de *Alectra vogelii* Benth. (Herb *et al.*, 1987; Press *et al.*, 1990). Puisque le niébé stimule la germination du *S. asiatica* alors qu'il n'en est pas un hôte, cette stimulation n'est probablement pas un mécanisme qui joue un rôle prépondérant dans la spécificité de la relation hôte-parasite (Weerasuriya *et al.*, 1993; Olivier, 1995). Un autre composé ressemblant au strigol (molécule retrouvée dans les racines du cotonnier et qui provoque la germination des graines de *S. asiatica*), nommé alectrol, a été retrouvé dans les exsudats racinaires du niébé, mais sa structure moléculaire n'avait pas encore été élucidée (Hauck *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1992; Weerasuriya *et al.*, 1993). Récemment, Matsuura *et al.* (2008) et Xie *et al.* (2008) ont isolé une molécule exsudée par les racines de niébé et de trèfle rouge, le (+)-4-*O*-acétylorobanchol, qui provoque la germination du *S. gesnerioides*, et qui serait en fait l'alectrol. En plus des stimulants naturels, plusieurs substances provoquent la germination des graines de *Striga*, notamment l'éthylène, employée aux États-Unis en injection dans le sol pour provoquer la germination suicide des

graines de *Striga* (Dembélé *et al.*, 1994), et certains analogues synthétiques du strigol ou des sorgolactones, comme les composés GR et Nijmegen 1, fréquemment employés en laboratoire pour les analyses de germination (Parker, 1984; Worsham, 1987; Dembélé, 1988; Babiker *et al.*, 1991; Okonkwo, 1991; Igbinnosa et Okonkwo, 1992; Siame *et al.*, 1993; Wigchert *et al.*, 1999).

La germination se fait à proximité de la racine de l'hôte, de 2 à 5 jours après l'exposition aux exsudats (Hussain et Aigbokhan, 1991). La radicule doit se fixer assez rapidement à la racine de l'hôte, en 3 à 7 jours, sous peine de dégénérescence, puisque les nutriments contenus dans l'albumen ne peuvent soutenir plus longtemps une croissance en l'absence d'hôte (Hussain et Aigbokhan, 1991; Berner *et al.*, 1995; Berner et Williams, 1998). La radicule atteint une longueur maximale de 2 mm après quoi elle meurt si aucun contact avec l'hôte n'est établi (Okonkwo et Raghavan, 1982; Hussain et Aigbokhan, 1991). La radicule croît probablement en réponse à un gradient de concentration en stimulants (Sallé et Raynal-Roques, 1989; Bouwmeester *et al.*, 2003). Ce chimiotropisme positif est difficile à démontrer, et certains auteurs n'ont remarqué qu'une tendance à croître vers l'hôte plutôt que de s'en éloigner (Parker, 1984; Press *et al.*, 1990). Plusieurs radicules provenant de graines différentes peuvent s'attacher au même plant de niébé, souvent sur la même racine (Rugutt *et al.*, 1996; Berner et Williams, 1998).

Durant sa croissance vers la racine hôte, la radicule de *Striga* sécrète des enzymes qui dégradent de façon oxydative des phénylpropanoïdes contenus dans les parois cellulaires de l'hôte. Ces phénylpropanoïdes sont ensuite dégradés en une quinone, la 2,6-diméthoxy-p-benzoquinone (2,6-DMBQ), qui induit à l'extrémité de la radicule un renflement et la formation de papilles qui facilitent l'adhérence du parasite à la racine de l'hôte (Chang et Lynn, 1986; Olivier, 1996). Keyes *et al.* (2007) ont démontré que le méristème apical de la radicule du *Striga asiatica* accumule du H₂O₂ qui serait un cosubstrat pour l'oxydation de la quinone. La 2,6-DMBQ a été isolée à partir des racines de sorgho, et est retrouvée dans plus de 48 genres à l'intérieur de 29 familles différentes (Chang et Lynn, 1986). La présence de 2,6-DMBQ n'a toutefois pas encore été démontrée chez le niébé. Cependant, l'extrémité de la radicule de *S. gesnerioides* subit les mêmes modifications que la radicule de *S. hermonthica* et de *S. asiatica* à l'approche de la racine hôte (Sallé *et al.*, 1995; Reiss

et Bailey, 1998). Cette réponse du parasite à la présence probable de la molécule de 2,6-DMBQ correspond au premier stade de développement de l'haustorium. Cependant, cette étape, ainsi que l'étape subséquente, l'attachement, ne seraient pas déterminantes dans la spécificité de la relation entre le parasite et son hôte (Riopel *et al.*, 1986; Press *et al.*, 1990; Ramaiah *et al.*, 1991; Olivier, 1996).

1.2.2 La fixation et la pénétration des tissus de l'hôte

Après le contact avec une racine de l'hôte, la radicule de *Striga* cesse de croître, et les papilles s'allongent en direction de la surface de la racine (figure 1.2). Lors d'un essai *in vitro*, Reiss et Bailey (1998) ont pu constater que près de 40 heures après l'inoculation des graines sur les racines de niébé, la fixation était établie. En effet, le passage d'un pinceau pour enlever les radicules du *Striga* résultait alors en des dommages à la racine au point d'ancrage des papilles. Des résultats semblables ont été obtenus par Lane *et al.* (1991a), et par Reiss *et al.* (1995). Les papilles ne font cependant que faciliter la fixation, et ne pénètrent pas à l'intérieur des racines de l'hôte; de plus, elles ne sont pas indispensables, puisqu'elles sont parfois absentes (Dembélé, 1988; Reiss et Bailey, 1998).

Environ 48 heures après le contact, les radicules pénètrent dans les couches cellulaires superficielles de la racine. Par la suite, la radicule croît au travers du cortex grâce à des cellules intrusives, et prend une forme conique. Elle prend alors le nom d'haustorium primaire (Okonkwo et Nwoke, 1978). La pénétration se fait de façon intercellulaire, vers la stèle de l'hôte (Okonkwo et Nwoke, 1978; Dembélé, 1988; Reiss *et al.*, 1995). La croissance du parasite causerait peu de dommages mécaniques à la racine, même au site de la pénétration (Lane *et al.*, 1991a; Reiss *et al.*, 1995; Reiss et Bailey, 1998). Les cellules de l'hôte qui se trouvent autour des cellules intrusives de l'haustorium sont comprimées, mais les autres cellules ne sont pas affectées. Neumann *et al.* (1999) ont quand même observé la nécrose des cellules corticales situées à l'interface parasite-hôte. La pénétration est facilitée par une légère dissolution de la lamelle moyenne dans l'espace intercellulaire, ce qui permet de séparer les cellules de l'hôte à mesure que le parasite s'enfonce dans le cortex.

Des pectinases ou d'autres enzymes permettant de dégrader les parois cellulaires, comme les hémicellulases et les cellulases, pourraient être impliquées dans le processus de pénétration (Reiss *et al.*, 1995; Losner-Goshen *et al.*, 1998; Reiss et Bailey, 1998).

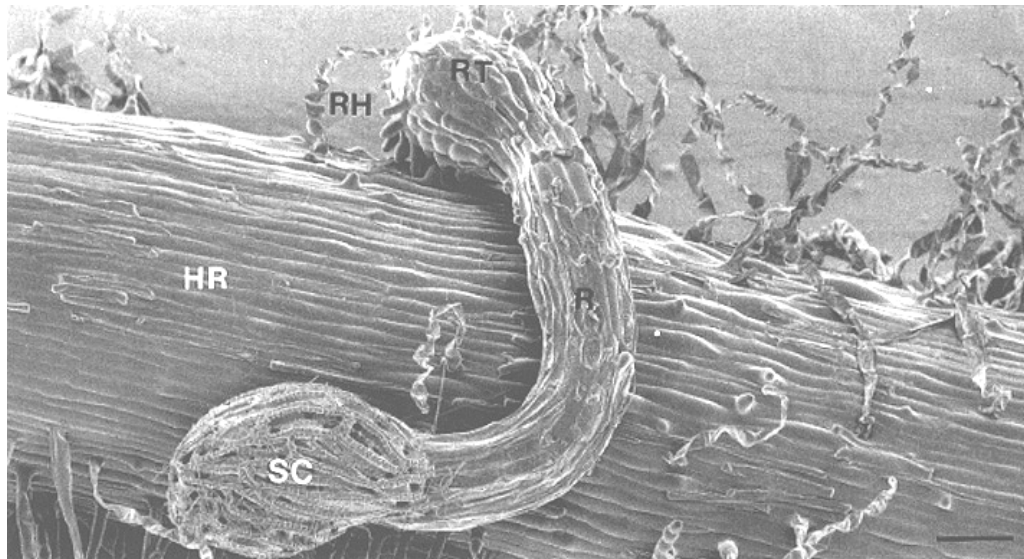


Figure 1.2 : Radicule de *Striga gesnerioides* sur une racine de niébé. Les papilles s'allongent en direction de la surface de la racine. SC: tégument de la graine; R: radicule du parasite; HR: racine de l'hôte; RH: papilles du parasite; RT: extrémité de la radicule. Barre = 54 μm . (Tirée de Reiss et Bailey, 1998).

Lorsque le parasite atteint la périphérie de la stèle de l'hôte, la zone frontale de l'haustorium primaire s'élargit, et seules quelques cellules allongées pénètrent dans la stèle pour entrer en contact avec les éléments du protoxylème de l'hôte (Okonkwo et Nwoke, 1978; Smith et Stewart, 1987). Pendant ce temps, les cellules du parasite qui se trouvent dans le cortex, ainsi que celles de l'hôte qui sont situées près du point d'entrée et dans le péricycle, se divisent rapidement, résultant en le développement d'un tubercule globulaire (Okonkwo et Nwoke, 1978; Reiss *et al.*, 1995). Cette prolifération des cellules de l'hôte serait stimulée par des sécrétions du parasite (Smith et Stewart, 1987). Les cellules de l'haustorium qui sont en contact avec le protoxylème de l'hôte se différencient en éléments de vaisseaux, et cette différenciation progresse vers l'arrière, dans les tissus de l'haustorium situés dans le cortex de l'hôte. Les éléments de xylème traversant le tissu hyalin se terminent par un plateau de courtes trachéides («disque de xylème»), qui se développe perpendiculairement à l'axe des éléments de vaisseaux. Ce disque pourrait constituer la zone de transition entre le xylème du parasite proprement dit, et les éléments de vaisseaux traversant le tissu hyalin (Visser et Dörr, 1987; Reiss *et al.*, 1995). De courts vaisseaux partent aussi de ce disque et délimitent la partie supérieure du tissu hyalin. Ces vaisseaux sont ensuite reconnectés à ce disque par une suite d'autres vaisseaux, formant une boucle à l'intérieur du tissu hyalin (Reiss *et al.*, 1995).

Durant les premiers stades de la formation du tubercule, l'extrémité apicale du parasite est encore contenue dans le tégument de la graine. Lorsque le xylème de l'hôte se retrouve lié à celui du parasite, cet apex se développe en une plantule possédant des structures foliaires écailleuses (Okonkwo et Nwoke, 1975, 1978; Dembélé, 1988). Des éléments de xylème se différencient pour connecter la pousse au disque de xylème du tissu hyalin puis aux éléments de xylème de l'hôte (Reiss et Bailey, 1995). Dans certains cas, plusieurs pousses peuvent émerger d'un haustorium primaire (Hussain et Aigbokhan, 1991). Il peut aussi y avoir émission de racines secondaires à la base de la plantule au moment de l'élongation de la tige (Dembélé, 1988). Ces racines, lorsqu'elles entrent en contact avec une racine de l'hôte, peuvent établir des haustoria secondaires; ces haustoria peuvent même être retrouvés au point de contact de deux racines secondaires du parasite (autoparasitisme) (Okonkwo et Nwoke, 1975; Visser et Dörr, 1987). Le tubercule constituant l'haustorium primaire peut atteindre une dimension de 2 à 15 mm, parfois 30 mm, et peser jusqu'à

150 grammes (Ba, 1984; Dembélé, 1988; Hussain et Aigbokhan, 1991). L'haustorium primaire du *S. gesnerioides* ressemble plus à l'haustorium massif et volumineux que l'on retrouve chez les espèces d'*Orobanche*, qu'à celui des autres espèces de *Striga*, qui sont beaucoup moins volumineux (Ozenda et Capdepon, 1972; Okonkwo et Nwoke, 1975; Lane *et al.*, 1991b).

Contrairement à la plupart des autres espèces de *Striga*, il y a présence dans l'haustorium de tubes criblés qui paraissent raccordés à ceux de l'hôte (Ba, 1983, 1984). Reiss *et al.* (1995) rapportent cependant que la continuité du phloème entre l'hôte et le parasite n'a jamais pu être démontrée.

Les effets de la présence du parasite chez l'hôte sont visibles bien avant son émergence. Les racicules qui sont ainsi attachées à l'hôte peuvent causer des dommages de façon directe, en s'appropriant simplement grâce à leur haustorium l'eau, les nutriments et les composés carbonés et aminés nécessaires à leur croissance, et indirectement, en induisant chez l'hôte des déséquilibres hormonaux et en réduisant le taux de photosynthèse de leur hôte (Gurney *et al.*, 1995; Frost *et al.*, 1997; Watling et Press, 2001; van Mourik, 2007; Cameron *et al.*, 2008). La section suivante traite plus particulièrement de l'impact de la présence du parasite sur la photosynthèse de l'hôte.

1.2.3 Les effets du parasite sur la photosynthèse chez l'hôte

Au début de son cycle évolutif, le *S. gesnerioides* est entièrement dépendant de l'hôte pour sa nutrition carbonée. Même après l'émergence, qui survient de 4 à 5 semaines après la connexion vasculaire (Berner et Williams, 1998), le *S. gesnerioides* est plus dépendant que le *S. asiatica* ou le *S. hermonthica*, de par son système photosynthétique rudimentaire et le taux élevé de respiration de son haustorium (Thalouarn *et al.*, 1991; Graves *et al.*, 1992; Alonge *et al.*, 2005b). Plus de 70 % du carbone provenant de l'hôte serait utilisé pour la respiration des tissus du parasite (Graves *et al.*, 1992). Le taux de photosynthèse peut aussi être réduit dès le début de l'infection, constituant parfois la principale cause de perte de carbone, particulièrement lors de l'établissement de la culture (Graves *et al.*, 1992;

Ramlan et Graves, 1996). Chez le niébé, la baisse initiale du taux de photosynthèse n'est pas due à une limitation de la conductance stomatale, contrairement à ce qui a été observé chez le sorgho (Frost *et al.*, 1997), ni à une baisse de la teneur en chlorophylle (Hibberd *et al.*, 1996). Selon ces derniers auteurs, la baisse de la photosynthèse serait peut-être due à une séquestration de l'azote et du phosphore par le parasite, résultant en une production plus lente de pigments photosynthétiques dans les jeunes feuilles en développement. Ils n'ont cependant pas pu constater de différences significatives dans les contenus en azote et en phosphore des plants parasités ou non. La présence d'une toxine produite par le parasite a également été proposée pour expliquer la baisse de la photosynthèse (Press *et al.*, 1990; Mauromicale *et al.*, 2008), même si aucune preuve n'a été apportée pour appuyer cette hypothèse. Hibberd *et al.* (1995, 1996) ont noté que le taux de photosynthèse des jeunes feuilles de niébé était beaucoup plus faible chez les plants parasités, mais que cette différence s'estompait à mesure que les feuilles vieillissaient. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs ont suggéré que le parasite pourrait retarder la sénescence foliaire par le biais d'une modification de la distribution des phytohormones, en particulier de la cytokinine. Alonge *et al.* (2005a) ont aussi noté une réduction de la surface des feuilles. La nodulation est aussi affectée par la présence du parasite, et les auteurs mentionnent que ce phénomène est probablement dû au fait que l'hôte ne peut exporter assez de photoassimilats pour maintenir la croissance du système racinaire et l'activité des *Rhizobia*.

Le parasite remplacerait donc, en tant que puits photosynthétique, les puits normaux que constituent les gousses. Hibberd *et al.* (1996) ont d'ailleurs démontré que le rendement en gousses était grandement réduit par la présence du parasite, même si cette baisse de rendement n'était pas associée à une baisse significative du contenu en azote ou en phosphore ou à un changement du contenu en sucres des feuilles. Cette baisse du rendement en grain a aussi été observée par Carsky *et al.* (2003) et par Alonge *et al.* (2005b), et Press (1995) confirme que ce sont les tissus reproductifs qui sont les plus atteints par le parasitisme.

1.3 La résistance chez le niébé et les biotypes (races) du *Striga gesnerioides*

1.3.1 Le développement de cultivars de niébé résistants

Plusieurs méthodes existent pour lutter contre les plantes parasites qui s'attaquent aux cultures, notamment l'arrachage à la main des plants émergés, les rotations avec des faux-hôtes qui font germer les graines sans permettre l'attachement (« *trap crops* ») (Vissoh *et al.*, 2008), la lutte biologique avec par exemple le *Fusarium* (Sauerborn *et al.*, 2007; Zahran *et al.*, 2008), et la lutte chimique (par exemple l'éthylène ou divers herbicides) (Kabambe *et al.*, 2007; De Groot *et al.*, 2008) (méthodes de lutte revues dans Verkleij et Kuiper, 2000; Oswald, 2005; Aly, 2007). L'utilisation de variétés résistantes, en combinaison avec des pratiques culturales appropriées, est cependant la méthode la plus adéquate, la plus accessible et la plus simple pour lutter contre le *Striga*. D'après Lane et Bailey (1992), la résistance complète est la plus souhaitable puisqu'elle permet de réduire la quantité de graines dans le sol. La recherche d'une résistance horizontale (résistance polygénique et donc quantitative, modérée) serait plus durable que la recherche d'une résistance verticale (monogénique, élevée), puisque cette dernière est facilement contournée et déjouée par le parasite (Kim, 1998; Rubiales *et al.*, 2006). Néanmoins, la plupart des travaux effectués chez le niébé ont trait à la résistance verticale, puisqu'il est facile et rapide de transférer ce type de résistance à des variétés aux propriétés agronomiques intéressantes (Parker, 1991; Rubiales *et al.*, 2006).

Contrairement à certaines céréales parasitées par d'autres espèces de *Striga*, il existe plusieurs cultivars de niébé résistants au *S. gesnerioides* (Lane *et al.*, 1991b; Singh, 2002). Un premier programme de recherche de résistance au *Striga* a été initié en 1981 par l'IITA (*International Institute of Tropical Agriculture*) et la SAFGRAD (*Semi-Arid Food Grain Research and Development*) au Burkina Faso. Le criblage de 54 cultivars élites de niébé dans un champ artificiellement infesté avait alors permis d'identifier deux cultivars potentiellement intéressants, Suvita-2 (plus connu sous le nom de Gorom, Burkina Faso) et 58-57 (Sénégal) (Aggarwal *et al.*, 1986; Singh et Emechebe, 1990, 1991).

Par la suite, quelques autres cultivars résistants furent identifiés, dont B301 (un cultivar traditionnel du Botswana), plusieurs cultivars développés par l'IITA, dont IT82D-849, IT81D-994, IT90K-82-2, IT97K-497-2 (Berner *et al.*, 1995; Carsky *et al.*, 2003), APL-1 (Nigeria) et 87-2 (Niger) (Moore *et al.*, 1995) et Mouride (ISRA, Sénégal) (Cisse *et al.*, 1995). Plusieurs cultivars sont encore à l'étude (Singh et Emechebe, 1997; Singh, 2002; Alonge *et al.*, 2005a, 2005b; Kamara *et al.*, 2008). Certains cultivars combinent la résistance au *Striga* et à l'*Alectra*, une autre plante parasite qui attaque le niébé, ainsi qu'à divers virus et maladies d'importance (Singh *et al.*, 2002, 2006; Ajeigbe *et al.*, 2008).

1.3.2 Les biotypes de *Striga gesnerioides*

La spécificité du *S. gesnerioides* envers ses différents hôtes est bien connue et documentée (Musselman et Parker, 1981a; Vasudeva Rao et Musselman, 1987; Pieterse et Verkleij, 1991b). Cette spécificité s'exprime envers des hôtes appartenant à différentes espèces. Cependant, lors de l'essai des cultivars 58-57 et Gorom sur différents sites en Afrique de l'Ouest, on s'aperçut que ceux-ci présentaient une réponse différentielle vis-à-vis du parasite selon les pays (Lane *et al.*, 1993; Touré *et al.*, 1997). Plusieurs autres travaux avec divers cultivars mirent en évidence ou confirmèrent l'existence de différents biotypes, ou races physiologiques, du *S. gesnerioides* (Parker et Polniaszek, 1990; Lane *et al.*, 1993, 1994, 1996b; Moore *et al.*, 1995; Muleba *et al.*, 1996; Touré *et al.*, 1998). On a identifié au départ cinq races distinctes du parasite, possédant chacune une virulence spécifique envers différents cultivars de niébé (figure 1.3) (Lane *et al.*, 1996b, 1997). Botanga et Timko (2006) ont pour leur part recensé une sixième race au Sénégal.

Ainsi, la race 1 est surtout présente au Burkina Faso, mais aussi au Mali, au Togo et au Nigeria, alors que la race 2 est exclusive au Mali, et que la race 3 n'est retrouvée qu'au Niger et au Nigeria (Parker et Polniaszek, 1990; Lane *et al.*, 1996b, 1997). La race 4 ne se retrouve qu'au sud du Bénin (Lane *et al.*, 1994). La cinquième race, identifiée en 1995, est retrouvée un peu partout en Afrique de l'Ouest, soit au Bénin, au Burkina Faso, au

Cameroun et au Nigeria (Moore *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1996b, 1997). La race 6 n'est recensée pour le moment qu'au Sénégal (Botanga et Timko, 2006).

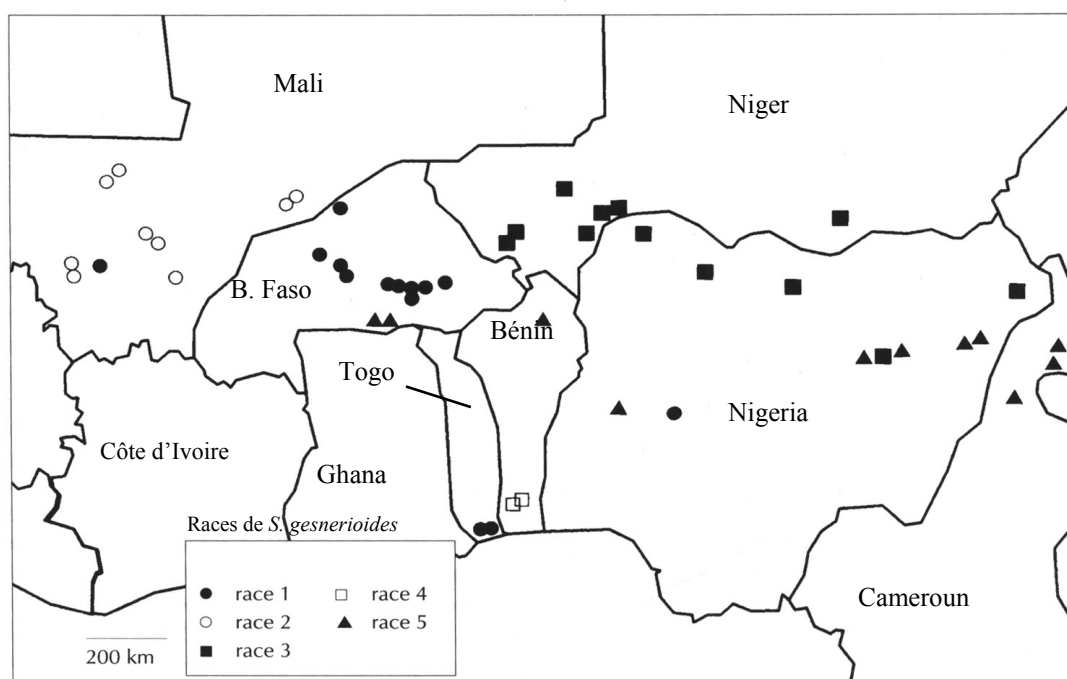


Figure 1.3 : Distribution des races de *Striga gesnerioides* en Afrique de l'Ouest.
(Adaptée de Lane *et al.*, 1997).

1.3.3 Les mécanismes de la résistance

À l'aide d'un système de croissance *in vitro* (Lane *et al.*, 1991a), deux mécanismes de résistance ont été décrits jusqu'à présent (Lane et Bailey, 1992; Lane *et al.*, 1993, 1994). Dans les deux cas, la résistance n'est pas due à une réduction de la germination du parasite, puisque celui-ci parvient à se fixer aux racines du niébé. Ce type de mécanisme a cependant été utilisé avec succès dans le développement de cultivars de sorgho produisant moins de stimulants de germination, ce qui les rend résistants au *S. hermonthica* (Mohamed *et al.*, 2003; Pérez-de-Luque *et al.*, 2008).

La pénétration de la racine par le *Striga* est associée, dans le premier type de mécanisme présent chez le niébé, à la nécrose des cellules de l'hôte autour du point d'entrée de la radicule du parasite. Ce type de résistance a été observé chez le cultivar 58-57 en réponse à l'attaque de la race 4 (Lane *et al.*, 1994) et de la race 1 du *S. gesnerioides* (Lane *et al.*, 1993). De 3 à 4 jours après la pénétration, la radicule est noircie, indiquant la mort du parasite. La réponse de l'hôte est spécifique, puisque seules quelques cellules de la racine sont sacrifiées.

Ce type de résistance est comparable à la réaction d'hypersensibilité démontrée par certaines plantes suite à l'infection par un champignon pathogène (Lane *et al.*, 1996a) ou d'autres plantes parasites (Joel *et al.*, 1996). Les phénomènes biochimiques impliqués dans ce premier type de résistance ne sont pas encore connus chez le niébé (Berner *et al.*, 1995). Les phytoalexines sont parfois associées à la réaction d'hypersensibilité des plantes en réponse à une infection, mais Lane *et al.* (1996a) n'ont pas pu isoler de phytoalexines des tissus de plants de niébé parasités. Des toxines phénoliques ont cependant été observées chez le tournesol en réponse à la présence de la plante parasite *Orobanche cernua* (Serghini *et al.*, 2001). Les protéines PR (*pathogenesis-related*), un groupe de protéines qui s'accumulent en réponse à la présence d'agents pathogènes variés, pourraient être impliquées dans la réaction de défense du niébé. Il a été démontré que le gène codant pour la protéine PR-1 est exprimé chez le tabac en réponse à l'attaque par l'*Orobanche aegyptiaca* Pers. (Joel et Portnoy, 1998). On a aussi observé une subérisation des parois

cellulaires de l'hôte ainsi que la lignification de l'endoderme chez certaines plantes résistantes attaquées par diverses espèces d'*Orobanche* (Pérez-de-Luque *et al.*, 2008).

Le second type de mécanisme permet au parasite de pénétrer jusqu'à la stèle de l'hôte et de fusionner pour former quelques tubercules qui sont visibles à la surface de la racine, mais sont incapables de croître et demeurent d'un diamètre très réduit (environ 1 mm). Ces tubercules sont composés en majeure partie de grandes cellules corticales. À l'interface des tissus de l'hôte et du parasite, il se produit un brunissement (Reiss *et al.*, 1995). Un disque de xylème est formé, mais seuls quelques éléments de xylème se différencient. La connexion avec le xylème est tout de même fonctionnelle (Reiss *et al.*, 1995). Des éléments de tubes criblés sont présents, mais en plus faible nombre que dans les tubercules normaux retrouvés chez les cultivars sensibles (Reiss *et al.*, 1995). D'autre part, certains parasites meurent avant de réussir à former un tubercule, sans qu'il y ait nécrose des cellules de l'hôte. Le cultivar B301 a démontré ce type de résistance *in vitro* et en pot, lorsque confronté aux races 1 et 2 du parasite (Lane *et al.*, 1993). Chez ce dernier cultivar, en effet, aucune tige parasitaire ne se forme après la formation des tubercules. Le même type de résistance a été démontré chez le cultivar IT81D-994 en culture *in vitro*, en réponse à l'attaque de la race 4 du parasite. Dans ce cas, on pouvait observer le développement de courtes tiges atteignant 3 mm de longueur. Il n'y avait toutefois pas de développement subséquent du parasite après le transfert de l'hôte en pot (Lane *et al.*, 1994). Ce type de résistance pourrait s'apparenter au phénomène de « *slow rusting* » que l'on retrouve chez certaines céréales infectées par le *Puccinia* (Lane *et al.*, 1993). L'incapacité du parasite à se développer normalement pourrait être due à une réduction de l'efficacité de la connexion vasculaire pour le transport de l'eau et des nutriments, ou à la production par l'hôte de toxines phénoliques, qui seraient ensuite délivrées via le xylème (Reiss *et al.*, 1995; Pérez-de-Luque *et al.*, 2008).

Il est possible de retrouver les deux mécanismes de résistance chez le même cultivar (Lane *et al.*, 1993). En effet, chez le cultivar B301, certaines racines du *Striga* meurent suite à la nécrose des cellules de l'hôte, tandis que d'autres réussissent à former un tubercule mais ne se développent pas au-delà.

1.3.4 La génétique de la résistance

La génétique de quelques-uns des cultivars résistants a été étudiée. Les cultivars B301 et IT81D-849 sont résistants aux races 1, 2, 3 et 5 du *S. gesnerioides* (Singh et Emechebe, 1991; Berner *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1996b), tandis que Gorom est résistant aux races 1, 2 et 4 (Parker et Polniaszek, 1990; Berner *et al.*, 1995), tout comme le cultivar IT81D-994 (Lane *et al.*, 1994, 1996b; Berner *et al.*, 1995); le cultivar 58-57 est quant à lui résistant aux races 1, 4 et 5 (Parker et Polniaszek, 1990; Lane *et al.*, 1994, 1996b).

L'étude du mode d'hérédité de la résistance de ces cultivars a été entreprise par plusieurs équipes de recherche. Ainsi, chez le cultivar B301, la résistance serait contrôlée par un gène dominant pour la race 1 (Burkina Faso) (Lane et Bailey, 1992; Atokple *et al.*, 1995), la race 2 (Mali) et la race 3 (Niger) (Touré *et al.*, 1997), de même que pour le *S. gesnerioides* présent au Nigeria (race 3) (Singh et Emechebe, 1990; Atokple *et al.*, 1993, 1995). Touré *et al.* (1997) et Singh *et al.* (2002) ont émis l'hypothèse qu'un même gène pourrait contrôler la résistance à ces différentes races. Chez le cultivar IT82D-849, la résistance à la race 1 du *S. gesnerioides* serait contrôlée par un gène dominant (Atokple *et al.*, 1995), de même que la résistance à la race 2 (Touré *et al.*, 1997), mais la résistance à la race 3 (Niger) serait quant à elle contrôlée par un gène récessif (Touré *et al.*, 1997). Cependant, selon Atokple, *et al.* (1995) les gènes de résistance de B301 et de IT82D-849 contrôlant la résistance à la race de *Striga* présente au Nigeria (théoriquement la race 3) seraient deux gènes dominants très liés, ou alors deux allèles d'un seul gène, situés sur le même locus. Chez Gorom, la résistance à la race 1 est conférée par un gène unique dominant (Atokple *et al.*, 1995), ainsi que la résistance à la race 2 (Touré *et al.*, 1997). La résistance de IT81D-994 est aussi contrôlée par un gène dominant pour la race 1. Les symboles *Rsg1*, *Rsg2* et *Rsg3* ont été proposés par Atokple *et al.* (1995) pour désigner la résistance au *S. gesnerioides* chez B301 (race 3), IT82D-849 (race 3) et Gorom (race 1).

L'exploitation des gènes de résistance au *S. gesnerioides* peut être facilitée par la sélection assistée de marqueurs. Certains marqueurs d'ADN permettent d'identifier facilement et rapidement les individus possédant les gènes de résistance. L'utilisation des marqueurs facilite aussi le clonage de ces gènes afin de les insérer dans des cultivars

possédant des qualités agronomiques favorables (Rispaïl *et al.*, 2007). Ouédraogo *et al.* (2001) ont identifié trois marqueurs AFLP fortement liés au gène de résistance à la race 1 présent chez IT82D-849 (*Rsg2-1*), et six marqueurs fortement liés au gène de résistance à la race 3 présent chez Tvu 14676 (*Rsg4-3*). Deux de ces marqueurs AFLP ont été localisés dans une même région du premier groupe de liaison de la carte génétique actuelle du niébé développée par Menéndez *et al.* (1997) et bonifiée par Ouédraogo *et al.* (2002a). De même, ils ont aussi identifié sept marqueurs liés au gène de résistance à la race 1 chez Gorom (*Rsg3*) et cinq marqueurs liés au gène de résistance à la même race chez IT81D-994 (*994-Rsg*). Deux de ces marqueurs sont communs aux deux gènes, et sont localisés sur le sixième groupe de liaison de la carte génétique du niébé (Ouédraogo *et al.*, 2002b). Ces résultats suggèrent l'existence d'un complexe de gènes de résistance chez le niébé. Un autre marqueur associé au gène *Rsg1* a été transformé en marqueur SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*), marqueur codominant plus facile à utiliser dans un programme de sélection assistée de marqueurs (Boukar *et al.*, 2004). Ce SCAR codominant permet la sélection pour la résistance à la race 3 du *S. gesnerioides*, une des plus répandues en Afrique de l'Ouest. Il reste encore à éclaircir les relations alléliques entre ces différents gènes de résistance, et aussi à trouver des marqueurs liés aux gènes de résistance aux races 2, 4 et 5 du parasite.

1.4 Diversité génétique des plantes parasites et techniques de marquage moléculaire

1.4.1 Techniques utilisées pour l'étude de la diversité génétique des plantes parasites

La diversité génétique des plantes parasites d'importance économique (principalement les *Orobanche* spp. et les *Striga* spp.) a été étudiée par diverses équipes de chercheurs. Les premières études employaient pour la plupart l'électrophorèse enzymatique (Werth *et al.*, 1984; Bharathalakshmi *et al.*, 1990; Olivier *et al.*, 1998). Trois principales technologies de marquage moléculaire ont par la suite été employées. Il s'agit des RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou ADN polymorphe amplifié au hasard), des AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou polymorphisme de longueur des fragments amplifiés) et des ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* ou amplification intermicrosatellites). Rubiales *et al.* (2006) et Mohamed *et al.* (2007) présentent une synthèse des recherches menées sur la diversité génétiques des plantes parasites.

Les marqueurs RAPD ont été principalement employés pour étudier la diversité génétique de plusieurs espèces et populations d'*Orobanche*, une Orobanchacée parasite infestant diverses dicotylédones en Europe et au Moyen-Orient (Joel *et al.*, 1996; Paran *et al.*, 1997; Zeid *et al.*, 1997; Gagne *et al.*, 1998; Román *et al.*, 2001, 2003; Brault *et al.*, 2007). Ils ont aussi été utilisés par Koyama (2000) et Aigbokhan *et al.* (2000) pour mesurer la variabilité génétique chez le *S. hermonthica* et le *S. aspera*. Ces types de marqueurs, d'usage assez simple, sont particulièrement adaptés à l'identification efficace et non radioactive des génotypes et à la détermination des relations génétiques intra et interspécifiques. Les marqueurs RAPD sont cependant parfois difficiles à reproduire (Jones *et al.*, 1997).

Les AFLP ont été quant à eux utilisés pour étudier la diversité génétique de différentes espèces d'*Orobanche* et de *Striga* (Gagne *et al.*, 2000; Botanga *et al.*, 2002; Botanga et Timko, 2005; Gethi *et al.*, 2005; Vaz Patto *et al.*, 2008), dont le *S. gesnerioides* (Botanga et Timko, 2006). Ces derniers ont obtenu quelques marqueurs permettant de discriminer chacune des cinq races connues, et ont de plus identifié une nouvelle race au Sénégal, ainsi

qu'une population hypervirulente de la race 4 présente au Bénin. Mise au point par Vos *et al.* (1995), la technique AFLP permet de détecter un grand nombre de locus polymorphes et permet l'analyse de milliers de marqueurs en un temps relativement court. Sa reproductibilité est également plus élevée que celle de la technique RAPD (Cervera *et al.*, 1996).

La technique ISSR, ou amplification des régions intermicrosatellites, a été utilisée par Román *et al.* (2002) pour étudier la diversité inter et intrapopulations de différentes populations d'*Orobancha crenata* provenant d'Espagne et d'Israël, par Benharrat *et al.* en 2002 pour l'étude de différentes espèces et populations d'*Orobancha* et par Benharrat *et al.* en 2005 pour l'étude de différentes populations de *O. ramosa* en France. Dernièrement, Thorogood *et al.* (2008) ont utilisé ce type de marqueurs pour étudier la variabilité intraspécifique de différentes populations de *O. minor*.

Dans le cadre de ce projet de recherche, les deux dernières techniques (AFLP et ISSR) ont été employées et sont donc décrites plus en détail ci-après.

1.4.2 La technique AFLP

La technique AFLP est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et d'hybridation d'amorces sélectives. Elle a été mise au point par la société néerlandaise Keygene (Vos *et al.*, 1995) pour une utilisation initiale en amélioration des plantes et elle est couverte par un brevet. Le principe de cette technique est le suivant (figure 1.4) (selon Santoni *et al.*, 2000) : l'ADN génomique purifié est d'abord coupé par deux enzymes de restriction (généralement *EcoRI* et *MseI*) ayant des sites de reconnaissance respectivement de 6 et 4 bases. Des adaptateurs de séquence connue de 10 à 15 bases, compatibles avec les extrémités cohésives des sites de restriction, sont ajoutés aux extrémités des fragments d'ADN par une réaction de ligation. Une première amplification, dite présélective, amplifie les fragments d'ADN à l'aide d'amorces correspondant à la séquence des adaptateurs et du site de restriction additionné en 3' d'une base définie arbitrairement. Un mésappariement de cette base 3' terminale de l'amorce empêche

totalemment l'amplification. Dans cette réaction, seul 1/16 des fragments de restriction initiaux sont donc amplifiés, soit 1/4 des produits à une extrémité et 1/4 des produits à l'autre extrémité. La deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières additionnées de 1, 2 ou 3 bases supplémentaires à leur extrémité 3'. Un sous-ensemble de fragments est alors amplifié. Les produits de l'amplification finale sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant. Ils peuvent être ensuite visualisés par coloration au nitrate d'argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent réalisé lors de la seconde amplification. Si, par exemple, on veut analyser un génome de 10^9 bases en utilisant une combinaison d'enzymes *EcoR1/Mse1*, on obtiendra environ 450 000 fragments¹ *EcoR1/Mse1* après la digestion de l'ADN génomique (voir le [document](#) de P. Baret de l'Université catholique de Louvain à la page 13 pour un détail des calculs). Après une première amplification avec une amorce à une base sélective, 1/16 de ces fragments sont amplifiés, et 1/256 après la seconde amplification à deux bases sélectives. Des 450 000 fragments *EcoR1* et *Mse1* de départ, 1/4096 seront donc amplifiés, soit environ 110 fragments qui pourront être visualisés sur gel. Il est théoriquement possible d'utiliser plusieurs dizaines de combinaisons d'enzymes de restriction ayant des sites de reconnaissance de 4 ou 6 bases, et de très nombreuses combinaisons de bases sélectives sur les amorces d'amplification. Les combinaisons restriction/amplification sont presque infinies.

La technique AFLP permet de révéler un polymorphisme important chez toutes les plantes, essentiellement de type présence/absence de bande, et peut produire des marqueurs issus de toutes les régions du génome. Elle constitue une technique de choix pour marquer rapidement un grand nombre de locus dans un génome. Cette technique permet donc de réaliser des empreintes génétiques hautement informatives afin de réaliser facilement des cartes génétiques, de saturer une région particulière d'un génome ou de comparer des génotypes génétiquement très proches.

¹ La fréquence des fragments *EcoR1/Mse1* est d'environ 0,11. Bien des facteurs peuvent modifier le nombre de fragments obtenus, notamment le contenu en GC du génome et évidemment les enzymes utilisées dans l'analyse (Rafalski *et al.*, 1996).

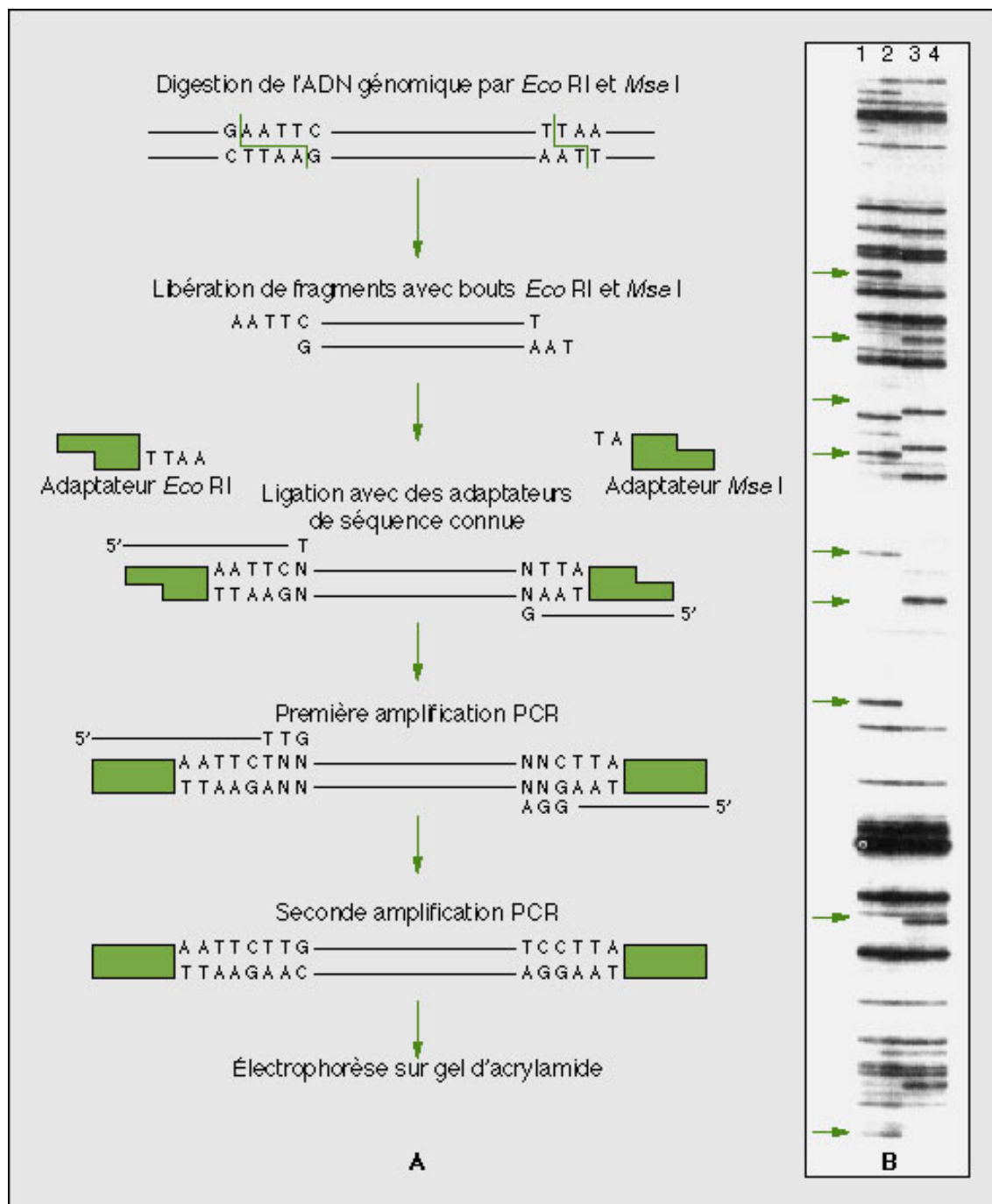


Figure 1.4 : Principe de la technique d'AFLP (A). B : Profils de deux génotypes de l'écotype Columbia (pistes 1 et 2) et de deux génotypes de l'écotype Landsberg (pistes 3 et 4) d'*Arabidopsis*. (Tirée de Santoni *et al.*, 2000).

1.4.3 La technique ISSR

Cette technique, principalement développée par Zietkiewicz *et al.* (1994) et Wu *et al.* (1994), est basée sur l'amplification par PCR des régions entre les microsatellites. On retrouve plusieurs autres appellations pour cette technique : **I-SSR PCR** (*Inter Simple Sequence Repeat PCR*), **IMA** (*Inter Microsatellite Amplification*), **IRA** (*Inter-Repeat Amplification*) et **ISA** (*Inter-SSR Amplification*). On utilise une amorce constituée d'une séquence de microsatellites et parfois d'une partie arbitraire (amorces ancrées, en 5' ou en 3'). Par la suite, en effectuant une simple PCR, il y aura amplification de fragments flanqués de microsatellites (figure 1.5). Les ISSR sont donc des marqueurs non spécifiques de locus, de type dominant. Contrairement à l'utilisation d'amorces spécifiques des régions flanquant les microsatellites, il n'est pas nécessaire de connaître ici la séquence étudiée. Cette technique permet d'amplifier un grand nombre de fragments d'ADN par réaction, et est supérieure aux marqueurs RAPD en terme de détection de polymorphismes et de reproductibilité (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Quian *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2008). L'usage d'amorces plus longues que pour les RAPD (jusqu'à 17 bases contre 10 à 12 généralement utilisées dans les analyses RAPD) contribue à cette reproductibilité (Charters *et al.*, 1996). Les amplicons polymorphes peuvent être séparés sur un gel d'agarose et révélés suite à une coloration au bromure d'éthidium, mais une meilleure résolution est généralement obtenue sur gel de polyacrylamide et par coloration au nitrate d'argent ou par marquage radioactif ou fluorescent.

La technique d'amplification intermicrosatellites est une technique flexible et peut être utilisée pour étudier la génétique des populations, pour la taxonomie moléculaire, la recherche de mutants somatiques et la cartographie (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Pradeep Reddy *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002). Elle a principalement été employée jusqu'à présent dans des études de diversité d'espèces forestières ou agronomiques (Nagaoka et Ogiwara, 1997; Gilbert *et al.*, 1999; Quian *et al.*, 2001; Pradeep Reddy *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2008), souvent en complément d'une autre technique (RAPD ou RFLP) ou parfois à des fins de comparaison.

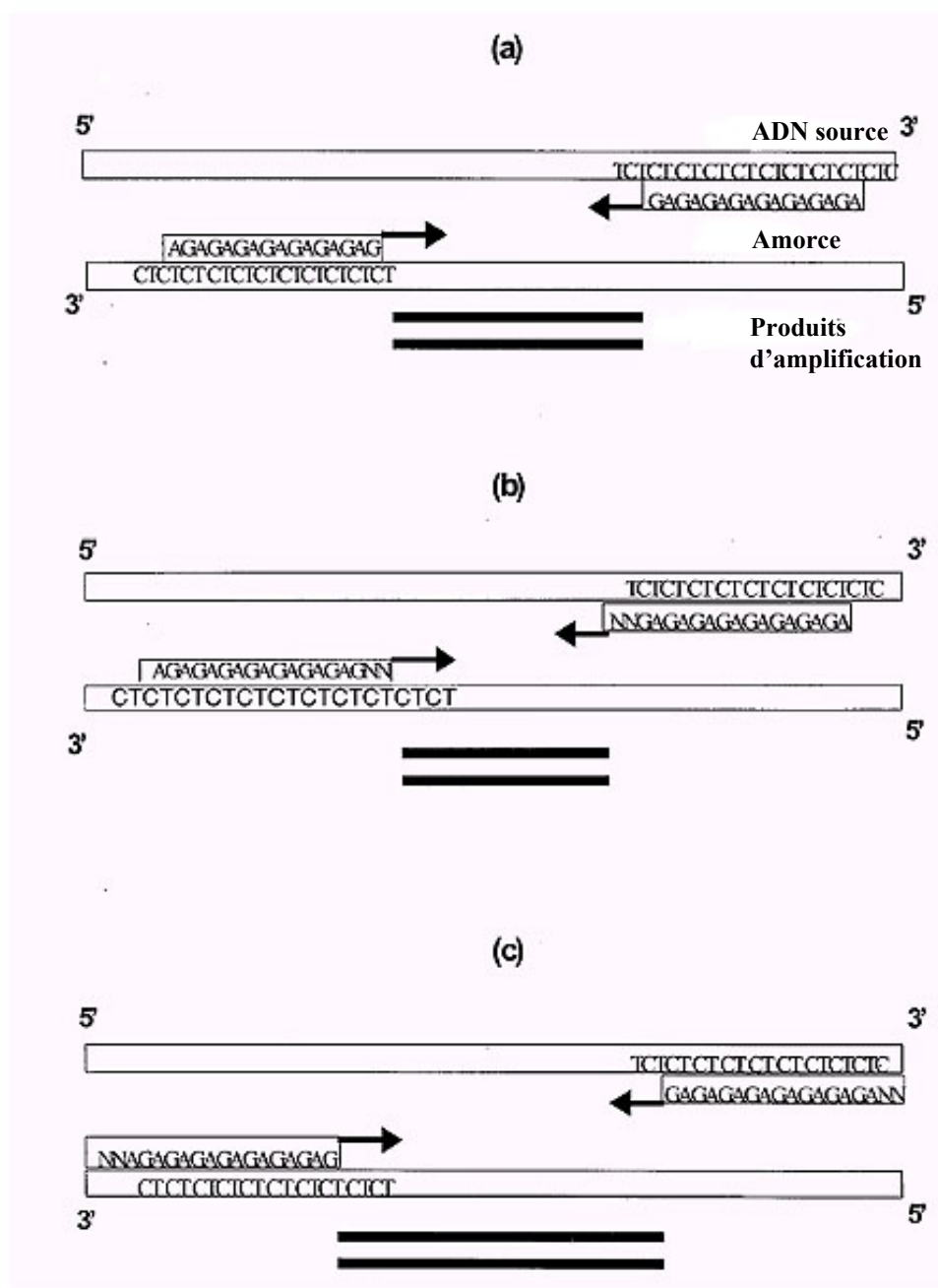


Figure 1.5 : Représentation schématique de la technique ISSR-PCR, utilisant une amorce (AG)₈ non-ancrée (a), ancrée en 3' (b) et ancrée en 5' (c), ciblant un microsatellite (TC)_n. Les amorces sont utilisées pour amplifier la région flanquant deux microsatellites (TC)_n d'orientation inverse. (Adaptée de Pradeep Reddy *et al.*, 2002).

1.5 La variabilité au sein du génome chloroplastique du *Striga gesnerioides*

Le *S. gesnerioides* est quasiment holoparasite, c'est-à-dire qu'il dépend presque entièrement de son hôte pour se procurer les nutriments essentiels à sa survie (Dembélé, 1988; Dembélé *et al.*, 1994). Certains auteurs le considèrent complètement holoparasite, puisque si on retrouve une petite quantité de chlorophylle dans ses feuilles, il n'y a toutefois pas de gain net de carbone, même en conditions d'éclairage intense (dePamphilis *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2008). Le *S. gesnerioides* présente en effet un taux de respiration élevé, notamment au niveau des tissus de l'haustorium (Graves *et al.*, 1992). Même si le parasite est capable de fixer le carbone de façon autotrophique, les pertes dues à la respiration résultent en un bilan carboné faible ou nul (Press *et al.*, 1988).

La concentration en chlorophylle des feuilles de *Striga* spp. est de 50 à 75 % plus faible que celle de plantes non parasites (Stewart, 1987). Dans les chloroplastes du *S. gesnerioides*, de larges portions du stroma sont dépourvues de thylakoïdes, et on n'y retrouve pas d'amidon, contrairement aux chloroplastes du *S. hermonthica* et du *S. asiatica*, qui sont normaux (Tuohy *et al.*, 1986; Thalouarn *et al.*, 1991). Les grana que l'on retrouve chez le *S. gesnerioides* sont cependant typiques de chloroplastes normaux, contrairement à ceux de certains autres holoparasites (Thalouarn *et al.*, 1991). Le génome chloroplastique du *S. gesnerioides* a été passablement étudié par Russo-Sorel et Thalouarn (1996) et Wolfe et dePamphilis (1998). La taille du génome a été évaluée à 115 kb par Russo-Sorel et Thalouarn (1996). En comparaison, le génome chloroplastique du tabac est de 155,5 kb. L'organisation et la structure du génome du parasite semblent comparables à celles du génome d'une plante autotrophe, mais il y a une réduction notable de la taille du génome dans les régions à copie unique (SSC et LSC). Certains gènes pourraient avoir disparu, comme c'est le cas chez le *Striga hermonthica* pour le gène *ndh*, codant pour une NADPH plastinoquinone-oxydoréductase (Benharrat *et al.*, 2000). Le gène *rbcL*, codant pour la grande sous-unité de la Rubisco, est souvent utilisé dans les études sur le génome chloroplastique des plantes parasites. Chez certaines de ces plantes, il a carrément disparu, alors qu'il existe à l'état de pseudogène chez d'autres. Certaines plantes parasites, dont le

S. gesnerioides, ont conservé le gène dans son intégralité (le cadre de lecture du gène est intact, sauf pour quelques substitutions d'acides aminés), mais ceci n'indique pas que la plante est pleinement fonctionnelle sur le plan de la photosynthèse puisque des études ont démontré que cet holoparasite obtient son carbone de la plante hôte et ne le fixe pas (Wolfe et dePamphilis, 1998). Il existe un certain nombre d'holoparasites qui ont conservé le gène *rbcL* intégralement, même s'ils n'ont aucune activité photosynthétique (Bungard, 2004). On ne connaît pas encore la raison de cette conservation, mais certains auteurs pensent que la Rubisco pourrait avoir une fonction dans la biosynthèse des lipides (Schwender *et al.*, 2004, McNeal *et al.*, 2007; Krause, 2008). La capacité de l'enzyme Rubisco est à peu près 20 fois inférieure à celle d'une plante C3 comme le tabac (Thalouarn *et al.*, 1991), mais l'activité de la PEPC est comparable à celle du tabac ou de plantes C3 normales (Press *et al.*, 1986; Thalouarn et Renaudin, 1991). On ne retrouve donc qu'une très faible quantité de Rubisco dans les tissus du *S. gesnerioides* (Thalouarn *et al.*, 1991).

Compte tenu du fait que le *Striga gesnerioides* ne possède que peu ou pas d'activité photosynthétique et qu'une grande fraction du génome chloroplastique est dévolue aux gènes impliqués dans la photosynthèse, il paraît intéressant d'étudier la variabilité de ce génome. Une faible pression de sélection pour un génome fonctionnel pourrait avoir donné naissance à une plus grande diversité génétique, du fait de l'importance moindre des conséquences de changements au sein de l'ADN dans la survie de la plante.

Le génome chloroplastique évolue assez lentement et possède une structure assez conservatrice (Soltis *et al.*, 1992; Soltis et Soltis, 1998; Bungard, 2004), ce qui pourrait le rendre moins intéressant à utiliser pour la recherche de variations intraspécifiques. Mais certaines études ont réussi à mettre en évidence des polymorphismes, à l'aide de différents enzymes de restriction (Milligan, 1991), ou à l'aide d'amorces permettant d'amplifier des microsatellites chloroplastiques (Weising et Gardner, 1999; Mengoni *et al.*, 2001, 2003; Xu *et al.*, 2002). Selon Soltis *et al.*, (1992), la variation intraspécifique est due à des changements aux sites de restriction, ainsi qu'à des mutations du type insertion/délétion, et plus rarement à des inversions. Les mutations de longueur sont souvent de moins de 50 pb. Il serait intéressant de vérifier, à l'aide de certaines amorces utilisées dans les études des

microsatellites, le degré de polymorphisme dans le génome chloroplastique, entre les races et au sein des différentes populations de *Striga*.

1.6 Hypothèses de recherche

À la lumière des informations présentées dans cette revue bibliographique, nous avons tenté d'en connaître plus sur la diversité génétique des races du *Striga gesnerioides* telles que recensées par Lane *et al.* en 1996. Compte tenu de la singularité du génome chloroplastique du *S. gesnerioides*, il nous a également semblé intéressant de vérifier s'il recelait une certaine variabilité génétique. L'hypothèse de départ suivante a été postulée : des marqueurs 1) nucléaires et 2) chloroplastiques permettront de mettre en évidence une diversité génétique à l'intérieur des populations, entre les populations et entre les différentes races de *Striga gesnerioides*.

Le projet a été subdivisé en deux volets dont les objectifs étaient les suivants :

- 1 Mesurer, à l'aide de marqueurs a) AFLP et b) ISSR, la diversité génétique du génome nucléaire du *Striga gesnerioides* :
 - au sein des populations
 - entre les populations
 - entre les races

- 2 Mesurer, à l'aide de marqueurs cpSSR, la diversité génétique du génome chloroplastique du *Striga gesnerioides* :
 - au sein des populations
 - entre les populations
 - entre les races

Nous avons aussi comme objectif secondaire d'initier la cartographie des gènes de virulence des différentes races du parasite. Cependant, ce volet a dû être abandonné, et les raisons sont présentées au chapitre II. Une étude préliminaire (chapitre II) nous a permis de confirmer la viabilité des graines et les races de chacune des populations utilisées dans l'étude, et de mettre en évidence la difficulté de développer des populations de cartographie. Le premier volet portant sur l'analyse AFLP (chapitre III) et ISSR (chapitre IV) nous a permis de démontrer qu'il existait très peu de variabilité au sein et entre les populations et nous avons mis en évidence l'absence de marqueurs de race. Le second volet (chapitre IV également) portant sur la variabilité chloroplastique nous a permis de démontrer l'absence de variabilité au sein du génome chloroplastique du *S. gesnerioides*. Le chapitre V fait un rappel des principaux résultats et met en perspective leur signification quant à l'origine et l'évolution du parasite, ainsi que l'implication de ces résultats dans la recherche de cultivars de niébé résistants.

Chapitre II :
Travail préliminaire et validation des populations

2.1 Introduction

Les graines de *Striga gesnerioides* que nous avons utilisées dans nos travaux nous ont été envoyées par M. Charlie Riches, du centre de recherche IACR à Long Ashton (Royaume-Uni). Ces graines avaient été récoltées dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest par J.A. Lane *et al.* entre 1984 et 1990, alors que cette équipe effectuait une étude de la virulence des différentes populations de *S. gesnerioides* (Lane *et al.*, 1996b). On mentionne dans la littérature que les graines de *Striga* spp. peuvent demeurer viables longtemps en champs, mais les conditions d'entreposage peuvent parfois diminuer leur durée de vie (voir par exemple les travaux de Gbèhounou *et al.* en 1996 et 2003). Comme les lots de graines étaient passablement âgés, et qu'on ne connaissait pas les conditions dans lesquelles ils avaient été entreposés, nous devions nous assurer que les graines étaient toujours viables afin de réaliser nos travaux et nous assurer d'obtenir assez d'individus de chacune des populations. Nous avons donc procédé à un essai de germination avant de mettre en place la suite des expériences. Par la suite, il était important de confirmer la race à laquelle appartenait chacun des lots de graines, puisque l'un des objectifs de nos travaux était de déterminer s'il existait des marqueurs génétiques qui permettaient de distinguer les différentes races. Nous avons donc procédé à des essais de validation en employant différents cultivars et en notant la réponse de ces cultivars à chacune des populations. Les méthodes qui ont été utilisées pour ces travaux préliminaires sont présentées dans les sections qui suivent, ainsi que les travaux que nous voulions entreprendre pour étudier l'hérédité des gènes d'avirulence chez le *S. gesnerioides*, mais qui ont dû être abandonnés.

2.2 Taux de germination des graines de *Striga*

Les lots de graines de *Striga* obtenus pour réaliser ce travail avaient été récoltés plus de dix à quinze ans auparavant par Lane *et al.* (1996b). Afin de s'assurer que les échantillons de graines étaient toujours viables, un test de germination a donc été effectué pour chacune des populations. La surface des graines a préalablement été désinfectée de la

façon suivante : des graines (environ cinquante) de chacune des populations ont été placées dans des tubes de 1,5 ml dans lesquels on a ajouté 50 µl d'éthanol à 70 %. On a laissé tremper les graines pendant 5 minutes. Le liquide a été par la suite enlevé et on a ajouté au tube 500 µl de solution désinfectante (eau, hypochlorite de sodium à 5 % et 1 goutte de Tween 20 pour un total de 10 ml de solution). Les graines ont été rincées à quatre ou cinq reprises à l'eau stérile après cinq minutes de trempage. Les graines ainsi désinfectées ont ensuite été conditionnées en les plaçant dans des boîtes de Petri de 60 mm de diamètre et 15 mm d'épaisseur sur une rondelle de papier filtre (Whatman) imbibé d'eau stérile (une boîte par population). Les boîtes ont ensuite été enveloppées dans du papier d'aluminium pour bloquer la lumière, et placées à l'obscurité à 28°C pendant 15 jours. De l'eau stérile a été ajoutée au besoin afin de maintenir des conditions d'humidité adéquates.

Pendant la période de conditionnement des graines de *Striga*, on a aussi préparé l'exsudat racinaire de niébé nécessaire à la germination des graines. Le cultivar K VX 404-8-1, sensible à toutes les races, a été utilisé pour l'obtention de l'exsudat. Quelques graines ont été désinfectées selon la même procédure que celle employée pour les graines de *Striga*. On a ensuite mis les graines à germer à l'obscurité dans des boîtes de Petri contenant du papier filtre humidifié, à 28°C pour 48 à 72 heures. Les graines qui ont germé ont par la suite été placées sur des tubes à essai en verre recouverts de paraffine. Pour chacun des tubes, une ouverture au centre de la paraffine a été pratiquée afin de laisser passer la racicule dans le tube. Le tube a été ensuite rempli d'eau stérile jusqu'à ce que la racicule soit plongée dans le liquide. On a laissé la racicule croître dans l'eau durant huit à dix jours, en ajoutant de l'eau stérile au besoin. La racicule, en croissant, libère dans l'eau les substances nécessaires à la germination des graines de *Striga* (voir Matsuura *et al.*, 2008 et Xie *et al.*, 2008). Par la suite, l'excédent a été filtré et conservé au froid.

Les graines qui ont été mises à conditionner pendant 15 jours ont ensuite été transférées dans un nouveau plat de Petri, sur un papier filtre. On a ajouté 100 µl d'exsudat racinaire, refermé le plat et laissé 3 jours à 28°C. On a ensuite compté les graines germées à l'aide d'un binoculaire. Le tableau 2.1 présente les résultats obtenus, ainsi que l'information sur les pourcentages de germination qui nous a été transmise par l'IARC.

Tableau 2.1. Pourcentage de germination des 45 lots de graines de *Striga gesnerioides*.

Code des populations ¹	Pourcentage de germination (%)	Pourcentage de germination IACR (%) ²
1.2.1	70	—
1.2.2	70	30-70
1.2.5	<30	—
1.2.7	10	30-70
1.2.8	40	<30
1.4.9	0	30-70
1.6.10	30	—
1.7.12	40	70
2.4.2	60-70	70
2.4.3	50-60	30-70
2.4.5	60-70	60
2.4.6	50-60	<30
2.4.7	10-20	<30
2.4.8	10	<30
2.4.9	40-50	70
3.5.1	40	30-70
3.5.2	70-80	30-70
3.5.4	0-10	<30
3.5.6	<10	<30

Code des populations¹	Pourcentage de germination (%)	Pourcentage de germination IACR (%)²
3.5.7	70	70
3.6.8	30	—
3.6.9	40	30-70
3.6.10	70-80	70
3.6.11	<10	70
3.6.12	Papier filtre sec	30-70
4.1.1	50-70	—
4.1.2	<10	—
5.1.1	40-60	—
5.2.2	70-80	70
5.3.3	80-90	70
5.3.4	70-80	70
5.3.5	80-90	70
5.6.7	<10	<30
5.6.8	30	<30
5.6.9	15-20	<30
5.6.10	20-30	<30

¹ Le premier chiffre réfère à la race du parasite (1 à 5); le second chiffre réfère au pays d'origine (1 à 7, selon l'ordre alphabétique des pays); le troisième chiffre identifie l'échantillon au sein de la race. Ex. : 3.5.1 : 1^{er} échantillon de la race 3, provenant du Niger. Les populations 1.2.3, 1.2.4, 1.2.6, 1.7.11, 2.4.1, 2.4.4, 3.5.3, 3.5.5 et 5.6.6 étaient contaminées, mais on a quand même observé des graines germées.

² Données fournies par M. Charlie Riches du IACR Long Ashton.

Quelques populations ont présenté un taux de germination très bas, voire nul (1.4.9), mais on les a quand même incluses pour l'obtention du matériel végétal en pots, et nous avons pu obtenir des plants de toutes les populations excepté une seule, 3.5.3, pour laquelle aucun plant n'a émergé malgré des essais répétés.

2.3 Validation des races

Afin de s'assurer qu'il n'y avait pas eu d'erreur dans l'identification des races et des populations, nous avons procédé à des essais avec différents cultivars, la réponse de chacun de ces cultivars au parasitisme nous permettant de dresser un portrait global et de valider la race des populations utilisées dans nos travaux. Le tableau 2.2 présente la réponse attendue des différents cultivars utilisés selon la race en présence; ces données proviennent des travaux de différents auteurs (voir Singh et Emechebe, 1991; Berner *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1996b).

Tableau 2.2 Cultivars de niébé utilisés pour valider les races de *Striga gesnerioides* et la réponse attendue selon la race présente.

Cultivars	Races de <i>Striga gesnerioides</i>				
	1	2	3	4	5
B301	R ¹	R	R	S ²	R
IT82D-849	n.d. ³	n.d.	n.d.	S	n.d.
Gorom	R	R	S	R	S
IT81D-994	n.d.	n.d.	S	n.d.	n.d.
58-57	R	S	S	R	R
KVX 404-8-1	S	S	n.d.	S	S

1 Résistant, haustoria <2,5 mm de diamètre et/ou présence de nécroses au point de contact avec la racine, parasite non viable.

2 Sensible, présence d'haustoria normaux (≥2,5 mm de diamètre)

3 n.d. : non déterminée, le cultivar n'a pas été utilisé dans l'expérience pour la validation de cette race.

Sources : Singh et Emechebe, 1991; Berner *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1996b

Afin de visualiser les premiers stades de développement du parasite sur les racines de niébé, nous avons utilisé un système de croissance *in vitro* développé par Lane *et al.* (1991a), légèrement modifié. Des graines de niébé ont d'abord été mises à germer après désinfection (selon les mêmes procédures que pour l'obtention de l'exsudat), et les graines germées ont été transférées dans des verres de plastique contenant de la vermiculite stérilisée et humidifiée avec de l'eau stérile. Une solution fertilisante (formulation N-P-K 20-20-20) était ajoutée au besoin. Lorsque le système racinaire des plants de niébé a été assez développé, soit environ après 15 jours, on a mis en place le système *in vitro*. On a étalé les racines du niébé dans un sachet de croissance (Mega International, West St. Paul, MN). Les sachets de croissance sont des sachets en polyéthylène transparent contenant un papier absorbant. On peut ainsi ajouter la solution nutritive nécessaire à la croissance de la plante tout en observant les racines. Des graines de *Striga* conditionnées ont ensuite été placées près des racines. Pour chacune des cinq races, on a choisi au moins quatre cultivars différents dont les réponses au parasitisme permettent de discriminer les races. Par exemple, pour la race 1 et la race 5, les cultivars B301, Gorom, 58-57 et TVX 404-8-1 ont été utilisés, Gorom permettant de différencier ces deux races (voir tableau 2.2). Chaque population a été vérifiée sur chacun des cultivars choisis pour chaque race. La germination des graines de *Striga* a été observée après 3 jours dans la majorité des cas, et l'attachement aux racines du niébé ainsi que le développement d'haustoria viables puis de tiges de *Striga* dans le cas des cultivars sensibles, ou l'avortement du processus d'infection, chez les cultivars résistants, a été observé conformément aux attentes (figure 2.1). Les plants de niébé présentant des interactions compatibles ont été mis en pot environ 21 jours après le transfert des graines de *Striga* afin de confirmer l'émergence des plants de *Striga*. Dans tous les cas, on a pu confirmer la race de chacune des populations. Par exemple, chez le cultivar B301, seules les deux populations de la race 4 ont pu se développer normalement sur les racines des plants de niébé, et chez le cultivar 58-57, seules les populations des races 2 et 3 ont réussi à se fixer aux racines et à émerger.



Figure 2.1 : Racines de niébé présentant une interaction compatible. On voit un plant de *S. gesnerioides* qui se développe sur la racine du niébé, ainsi que l'haustorium qui s'est formé suite à l'attachement du parasite sur la racine.

2.4 Cartographie de la virulence

En débutant ces travaux, nous voulions également étudier l'hérédité de la virulence des races de *Striga*, en effectuant certains croisements et en vérifiant la réponse des générations F1, F2 et F3 sur des génotypes connus de niébé. Nous voulions de cette façon déterminer si la capacité des races de *Striga* à infecter le niébé repose sur de multiples allèles d'un même locus ou sur plusieurs locus indépendants, et décrire le mode de ségrégation de l'avirulence chez les différentes races. Une carte génétique préliminaire du *S. gesnerioides* devait aussi être établie à l'aide des marqueurs AFLP dont la ségrégation aurait été étudiée chez une des populations. Malheureusement, les croisements se sont révélés très ardues à réaliser. Ces croisements avortant presque systématiquement, nous avons abandonné ce volet. La difficulté d'effectuer des croisements a également été soulignée par Botanga (2005). Par la suite, le faible nombre de marqueurs AFLP utiles au développement d'une carte génétique (voir le chapitre III) nous a amené à essayer d'autres types de marqueurs, et nous avons effectué les analyses avec les amorces ISSR et cpSSR (voir chapitre IV). Ces marqueurs n'ont pas révélé suffisamment de diversité génétique pour poursuivre les travaux de cartographie, qui ont aussi été abandonnés. Les résultats des travaux sur la diversité génétique sont donc présentés dans les deux chapitres suivants.

Chapitre III :

**Low genetic variability of *Striga gesnerioides* (Willd.)
Vatke populations parasitic on cowpea might be
explained by a recent origin**

**Low genetic variability of *Striga gesnerioides* (Willd.)
Vatke populations parasitic on cowpea might be
explained by a recent origin**

Marie-Pier Dubé and François Belzile*

Département de phytologie, Université Laval, Québec, Qc, Canada, G1V 0A6

*Corresponding author:

F. J. Belzile

1243 Pavillon C. E. Marchand, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6

tel: +1 418 656-2131 ext. 5763; fax : +1 418 656-7176

e-mail: francois.belzile@fsaa.ulaval.ca

3.1 Résumé du manuscrit

Le *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke est une plante parasite épirhize obligatoire représentant une contrainte importante à la production du niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), une légumineuse alimentaire d'une grande importance en Afrique subsaharienne. L'utilisation de cultivars de niébé résistants est la méthode qui semble la plus efficace et la plus adéquate pour lutter contre le *Striga*. Certains cultivars résistants ont déjà été identifiés au cours des dernières décennies; la plupart des cultivars présentent cependant des réponses différentielles au parasitisme selon la région où ils sont cultivés, suggérant l'existence de plusieurs biotypes, ou races physiologiques, de *S. gesnerioides*. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons étudié la diversité génétique au sein et entre 43 populations appartenant à l'une ou l'autre des cinq races précédemment identifiées en Afrique de l'Ouest. La caractérisation génétique a été réalisée sur des populations comprenant jusqu'à 10 individus chacune à l'aide de marqueurs AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou polymorphisme de longueur des fragments amplifiés). Les marqueurs ont décelé extrêmement peu de variabilité au sein des populations. Cette diversité est également extrêmement faible entre les populations et aucun marqueur n'a permis de différencier les cinq races entre elles. Quelques populations sont apparentées, et il semble exister une certaine structure dans leur distribution géographique, mais aucun groupe monophylétique n'a été obtenu sur une base « raciale ». Des marqueurs rapportés comme étant capables de distinguer les races au sein d'une autre collection de populations se sont avérés incapables de le faire au sein de notre matériel expérimental. Malgré une distribution géographique étendue, la variabilité génétique entre les différentes populations est extrêmement faible. Les causes possibles de cette faible variabilité génétique seront abordées dans la discussion, notamment l'hypothèse que la souche de *S. gesnerioides* parasitant le niébé soit d'origine récente.

Mots clés : *Striga gesnerioides*, variabilité génétique, AFLP, plantes parasites

3.2 Abstract

Striga gesnerioides (Willd.) Vatke is an obligate root hemiparasitic plant that causes considerable yield losses to cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), an important crop legume of Sub-Saharan Africa. The use of resistant cowpea cultivars is probably the easiest and most effective method to control the parasite. Several cowpea cultivars exhibiting resistance have been identified during the last decades; however, most resistant cultivars show a differential response when grown in different countries across West Africa, suggesting that there are different races of *S. gesnerioides*. In this study, we investigated the genetic variability within and between 43 populations of five of the previously recognized races of the parasite present in West Africa. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers were used on up to 10 individuals from each population. These markers showed almost no genetic variability within populations. The variability between the populations was also extremely low and did not allow discrimination of the five races. A few populations were more closely related, and there was a certain geographical structure but no “racial” clustering could be seen. Even markers previously reported to be race-specific on another set of *Striga* populations proved unable to discriminate between races in this collection of populations. Possible causes of the extremely low level of genetic variability seen in *S. gesnerioides* are discussed including the hypothesis that this strain has only quite recently arisen.

Key words : *Striga gesnerioides*, genetic variability, AFLP, parasitic plants

3.3 Introduction

The genus *Striga* once found in the Scrophulariaceae and now considered part of the Orobanchaceae (Olmstead *et al.*, 2001), includes over 40 species, of which 11 are obligate root parasitic plants of agricultural crops (Ejeta, 2007). *Striga asiatica* L. Kuntze, *S. hermonthica* (Del.) Benth. and *S. gesnerioides* (Willd.) Vatke are the most economically important species of *Striga* and cause considerable losses to many major African crops. *S. asiatica* and *S. hermonthica* attack many cereal crops such as sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.), maize (*Zea mays* L.), millet (*Pennisetum* spp.), and upland rice (*Oryza sativa* L.). *S. gesnerioides* parasites only dicotyledons and causes considerable yield losses to cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), an important crop legume of Sub-Saharan Africa. It also parasites other wild legumes (*Alysicarpus*, *Indigofera*, *Tephrosia*) and non-legumes (*Ipomea*, *Jaquemontia*, *Euphorbia* and *Nicotiana*) (Mohamed *et al.*, 2001).

Control of *S. gesnerioides* is difficult to achieve because of the intimate association between the parasitic weed and its host. The use of resistant cultivars is probably the easiest and most effective method to control the parasite. The lack of broad or polygenic, horizontal resistance, however, is one of the biggest problems when trying to develop resistant cultivars. Doggett (1952, 1965) was one of the first to report varietal differences in sorghum susceptibility to *S. hermonthica* in East Africa, suggesting the existence of physiological strains of the parasite. Other researchers also suggested the existence of such host-specific strains in *S. hermonthica* (Wilson-Jones, 1955; King and Zummo, 1977; Parker and Reid, 1979; Bebawi, 1981; Ramaiah, 1983, 1984, 1987). The existence of intraspecific host specificity has been demonstrated in *S. asiatica* (Bharathalakshmi and Jayachandra, 1979, 1982, 1984) and in *S. gesnerioides* (Parker and Polniaszek, 1990; Shawe and Ingrouille, 1993). In *S. gesnerioides*, there is also a morphological differentiation and the morphotypes can also differ in their host specificity (Aggarwal, 1985; Vasudeva Rao and Musselman, 1987; Pieterse and Verkleij, 1991). In cowpea, several cultivars exhibiting resistance were identified during the last decades; however, most cultivars showed differential expression of resistance when grown in different countries across West Africa, suggesting that there are different races of *S. gesnerioides*.

Indeed, Lane *et al.* (1996) identified five races in West and Central Africa, based on the host-resistance response. In 2006, Botanga and Timko identified a sixth race, present in Senegal.

The genetic variability within the *Striga* genus, mostly among the species of economical importance, has been studied by few researchers (see Mohamed *et al.*, 2007). *S. asiatica* was first studied by Werth *et al.* (1984). Using 18 enzyme systems providing information on 32 loci, they studied two populations of *S. asiatica* introduced in the U.S.A. This study revealed extremely low genetic diversity, all samples being monomorphic. This lack of polymorphism was probably due to a single colonization event (founder effect), coupled with the autogamous mode of reproduction of *S. asiatica*. Botanga *et al.* (2002) found a significant regression between geographic and genetic distance in an AFLP study of 14 populations of *S. asiatica* in Benin. They suggested that the different populations might be considered as ecotypes. But Gethi *et al.* in 2005 found no evidence of isolation by distance in an AFLP study of 17 populations of *S. asiatica* in Kenya, as well as a low genetic diversity and no clear population structure. They supposed that the recent introduction of the parasite in the area might explain the low genetic diversity.

In contrast, Bharathalakshmi *et al.* (1990) examined 9 isozyme loci in two populations of *S. hermonthica* and found a high genetic diversity. They concluded that geographic separation is more important than host specialization in contributing to population differentiation. Kuiper *et al.* (1996) also found a high degree of genetic diversity in different populations from West Africa and Kenya indicating that geographic distance was an important factor in genetic differentiation. On the other hand, Olivier *et al.* (1998) found only a slight effect of geographic distance when studying two loci in 14 population of *S. hermonthica*. In regions where *S. hermonthica* and *S. aspera* coexist, it is sometimes difficult to distinguish the two. In a RAPD analysis, Aigbokhan *et al.* (2000) confirmed the genetic separation of the two species. They found a higher level of genetic diversity within *S. hermonthica* populations than within *S. aspera* populations. Koyama (2000) used both isozyme and RAPD markers to study populations from Mali, Nigeria and Kenya; she found a clear separation of site-specific groups, with high level of variation within and between populations, but did not find any site-specific markers. Finally, in an AFLP study of *S.*

hermonthica in Kenya, Gethi *et al.* (2005) found a low level of genetic diversity, and no relation between genetic distance and geographic distance was revealed. *S. hermonthica* has probably been introduced from a few locations (founder effect) in Kenya, and this could explain the low level of genetic diversity found in this study.

In the only previous molecular study of genetic diversity in *S. gesnerioides*, Botanga and Timko studied the genetic diversity among populations from Florida parasitic on *Indigofera hirsuta* (2002) and among populations from West Africa on cowpea (2006), using AFLP markers. They found a high degree of uniformity within the *I. hirsuta* strain from Florida (founder effect), and this strain was more closely related to the African *S. gesnerioides* parasitic on *I. hirsuta* than to the cowpea strains. In West Africa, the genetic diversity of the different races was studied on 24 populations. Interestingly, the authors found a few markers that could discriminate each of the five previously-reported races. They also identified one new race from Senegal and a hypervirulent isolate from Benin, distinct from the race 4 usually found in this country. They finally suggested that geographic isolation and host-driven selection might be important factors in the formation of races of *S. gesnerioides* in West Africa.

The purpose of the present work was to genetically characterize the populations described by Lane *et al.* (1996), thanks to which the existence of different races of *S. gesnerioides* was first reported. In this work, we used AFLP markers to measure genetic diversity both within and among populations, to describe the population structure and to verify the existence of race-specific markers.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Plant material and growth conditions

The *S. gesnerioides* populations used in this study were grown from seeds of the 45 populations kindly provided by Mr. Charlie Riches from the IACR Research Centre (Long Ashton, UK), and collected between 1984 and 1990 by J.A. Lane *et al.* (see Lane *et al.*, 1996). A germination assay done in 2001 proved all samples except one were viable. We also confirmed the race of each population using different cowpea cultivars (see chapter 2 for the details). For this analysis, we did not have enough material from 3.5.2 population which was excluded from further analysis. We therefore used 43 samples from different locations, each sample representing a population of distinct geographical provenance (see annex 1 and table 3.1).

The seeds were conditioned in 5-inch plastic pots in a growth chamber (model E15, Conviron, Winnipeg, MB) using the following procedures: the plastic pots were filled with a mixture of sand and cactus potting mix (brown peat, sphagnum peat moss and sand mix from Fafard, St-Bonaventure, QC) and infested 5 to 7 cm deep in the soil with *Striga* seeds (approximately 500 seeds per pot). The soil was kept moist for 10 to 12 days, and then two cowpea seeds (cultivar K VX 404-8-1, susceptible to all known races) were sown in each pot. When cowpea seedlings emerged, only one plant was kept. The plants were watered and fertilized with low nitrogen cactus fertilizer (N-P-K 2-7-7) when necessary. Infected plants were submitted to a 16-hour photoperiod, at 33/25°C day/night temperatures, 67% relative humidity and standard growth chamber light intensity. *Striga* shoots emerged 4 to 6 weeks after sowing the cowpea. *Striga* plants from each pot were collected and placed at -80°C until DNA extraction.

Table 3.1 : *S. gesnerioides* populations used in this work. Each population is identified using a three-number code: the first number indicates the race, the second the country of origin (from 1 to 7 in alphabetical order), and the third number identifies a particular population.

COUNTRY (code)	Race 1	Race 2	Race 3	Race 4	Race 5
Benin (1)				4.1.1 4.1.2	5.1.1
Burkina Faso (2)	1.2.1 1.2.2 1.2.3 1.2.4	1.2.5 1.2.6 1.2.7 1.2.8			5.2.2
Cameroon (3)					5.3.3 5.3.4
Mali (4)	1.4.9	2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 2.4.5	2.4.6 2.4.7 2.4.8 2.4.9		
Niger (5)			3.5.1 3.5.4	3.5.5 3.5.6 3.5.7	
Nigeria (6)	1.6.10		3.6.8 3.6.9 3.6.10	3.6.11 3.6.12	5.6.6 5.6.7 5.6.8
Togo (7)	1.7.11 1.7.12				5.6.9 5.6.10

3.4.2 DNA extraction

Plant tissues were kept frozen in liquid nitrogen after removal from the -80°C freezer. DNA extraction was performed on up to 10 individuals of each of the 43 populations. Samples (mostly floral buds and scale-like leaves, avoiding when possible harder stem tissues) were put in a 1.5 ml Eppendorf tube. Tissues were ground to a fine powder by adding two metal beads into each tube and shaking on a tissue lyser (Qiagen, Mississauga, ON). Total genomic DNA was isolated using a modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol based on Fulton *et al.* (1995) available at: http://www.diversityarrays.com/pub/DArT_DNA_isolation.pdf.

3.4.3 AFLP markers

The AFLP markers were generated using the IRDye infrared dye AFLP Kit from LICOR Biosciences (Lincoln, NE) based on the protocol described by Vos *et al.* (1995). A first primer screen was done using 10 individuals from 10 populations, two for each of the five races (1.2.8, 1.4.9, 2.4.2, 2.4.3, 3.5.5, 3.6.10, 4.1.1, 4.1.2, 5.3.4, and 5.6.9). Genomic DNA (100 ng) was digested with an enzyme mix of *EcoRI* (10 U/ μl)/*MseI* (4 U/ μl) at 37°C during 2.5 h and heat inactivated at 70°C for 15 min. The fragments obtained were ligated to *EcoRI/MseI* adapters (3 selective nucleotides per adapter) at 20°C for 2 h. Pre-amplification was performed with a 1:10 dilution of the ligation mixture. Selective PCR amplification was performed with 2 μl of a 1:20 dilution of the pre-amplification mixture, 4 μl of labeled primer mix, and 5 μl of 0.5 U *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) in 1X reaction buffer. All PCR amplifications were performed in a TGradient thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) in 96-well plates. For the screening experiment, 18 selective *EcoRI* + *MseI* primer combinations were used: E-AAC + M-CAA, E-AAC + M-CAT, E-AAG + M-CAA, E-AAG + M-CAT, E-AAG + M-CTT, E-ACA + M-CAA, E-ACA + M-CAC, E-ACA + M-CAT, E-ACC + M-CAT, E-ACG +

M-CAA, E-ACG + M-CAT, E-ACT + M-CAA, E-ACT + M-CAT, E-AGC + M-CAA, E-AGC + M-CAT, E-AGG + M-CAA, E-AGG + M-CAC and E-AGG + M-CAT.

Subsequently, based on the results obtained of the screening experiment, the final AFLP analysis was carried out with the same methodology on one isolate of each of the 43 populations. The 20 selective *EcoR1* + *MseI* primer combinations used were: E-AAC + M-CAA, E-AAG + M-CAA, E-AAG + M-CAT, E-AAG + M-CTT, E-ACA + M-CAA, E-ACA + M-CAC, E-ACA + M-CAT, E-ACA + M-CTT, E-ACC + M-CAT, E-ACC + M-CTC, E-ACG + M-CAA, E-ACG + M-CAT, E-ACG + M-CTT, E-ACT + M-CAA, E-ACT + M-CTC, E-AGC + M-CAA, E-AGC + M-CAT, E-AGC + M-CTT, E-AGG + M-CAC and E-AGG + M-CAT. Each of the E-primers was labeled with either IRDye 700 or IRDye 800 at the 5' end. The bands were revealed using a LI-COR 4200 Automated DNA analyzer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

3.4.4 Data analysis

Each gel was scored for the presence (1) or absence (0) of bands. The genetic distances were estimated using PAUP v. 4.0b10 for Unix (Swofford, 1999), applying pair wise comparison following the method of Nei and Li (1979) with the formula $GD_{ij} = 1 - 2N_{ij}/(N_i + N_j)$, where N_{ij} is the number of bands that are shared by genotypes i and j , N_i the number of bands present in i , and N_j the number of bands present in j . The distance matrix was then subjected to a cluster analysis using the unweighted pair group method with arithmetic averaging (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) in order to visualize the relationships between the different populations (data not shown). A UPGMA tree was also generated using the Jaccard similarity coefficient (Jaccard, 1901) with PAST (Palaeontological Statistics v. 1.81, Hammer *et al.*, 2008), to examine the genetic distance between the populations. The dendrogram yielded the same topology as the Nei and Li tree, and is shown with the genetic similarity axis. Population structure was investigated using STRUCTURE v. 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) with the procedure for dominant markers as described by Falush *et al.* (2007). The program implements a model-based clustering

method for inferring population structure using genotype data consisting of unlinked markers. Distance among populations was also measured as an Euclidean metric distance and subjected to a principal coordinate analysis (PCoA) using PAST (Hammer *et al.*, 2008).

An Analysis of Molecular Variance (Excoffier *et al.*, 1992) was used to partition the variation among populations and among the races. The AMOVA was performed using the AFLP profile as a haplotype (Huff *et al.*, 1993) with AMOVA v. 1.55 software (Excoffier *et al.*, 1992). The variance components were tested statistically by non-randomisation test using 1000 permutations. A non-parametric test for the homogeneity of molecular variance (HOMOVA) based on Bartlett's statistic (Bartlett, 1937) was also performed to test heteroscedasticity (Stewart and Excoffier, 1996) and Bartlett's null distributions were obtained after 1000 permutations.

3.5 Results

3.5.1 Genetic diversity within *S. gesnerioides* populations

To determine the extent of genetic variation within individual *Striga* populations, we performed an AFLP analysis on up to 10 individuals from 10 populations, two for each of the five races. Using a total of 18 primer combinations, over 1,000 reproducible bands were observed following gel electrophoresis. We found only two polymorphic fragments and as shown in figure 3.1, the vast majority (more than 99%) of scorable markers were monomorphic among individuals. From this we conclude that *Striga* populations are genetically extremely homogeneous. In all ensuing work, a single individual was therefore taken to be representative of the population as a whole.

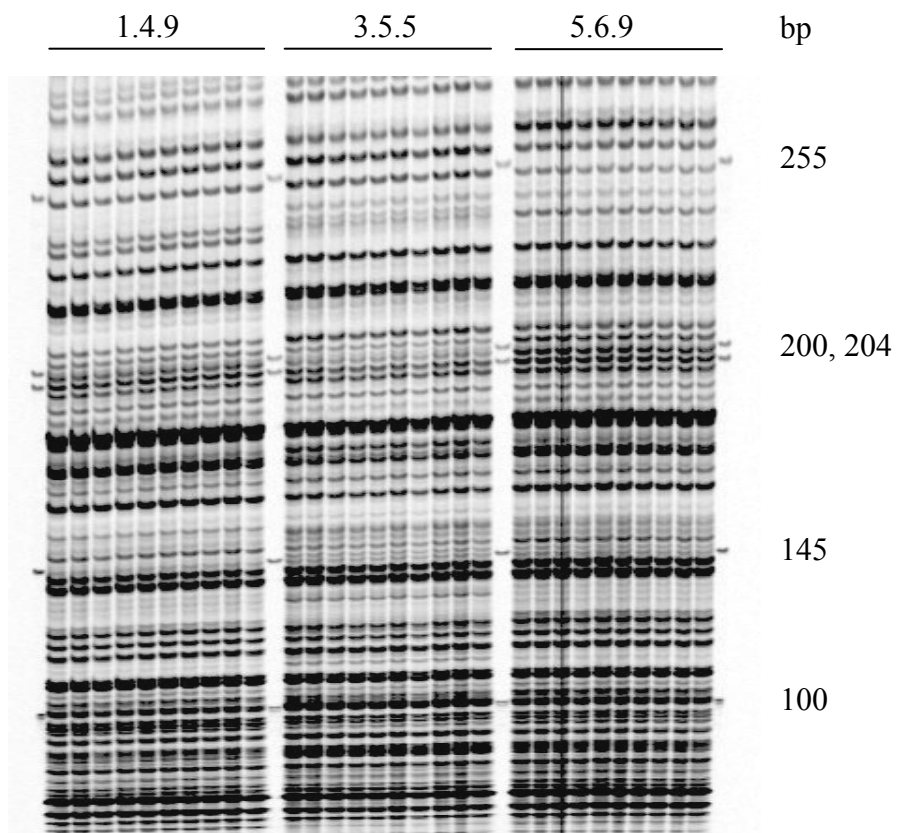


Figure 3.1 : AFLP profiles of 10 individual *S. gesnerioides* plants from each of three populations belonging to three different races present in West Africa. The profiles shown above were generated using primer combination E-AAG + M-CTT.

3.5.2 Genetic diversity among *S. gesnerioides* populations

To measure the amount of genetic variability between the various populations of *Striga*, we used 20 AFLP primer combinations to examine a single individual from each of the 43 populations. In total, less than 6% (67/1,200) of the amplicons proved polymorphic among the set of populations. Only six amplicons (0.5%) were unique to a specific population and such situations were observed only in race 3 (predominantly among populations 3.6.8 and 3.6.10). The populations within race 5 (10 populations), race 3 (10 populations) and race 1 (12 populations) showed the greatest number of polymorphic bands (51, 46 and 43 respectively). Populations of race 4 (4.1.1 and 4.1.2) showed only 4 polymorphic fragments. The mean pairwise genetic distances within these populations varied from 0.0088 (two populations of race 4) to 0.0396 (populations of race 1) (table 3.2).

Table 3.2 : Genetic distances among *S. gesnerioides* populations.

Populations	Number of pairs	Range	Mean distance
12 pop. of race 1	66	0.0115-0.0606	0.0396
9 pop. of race 2	36	0.0101-0.0506	0.0311
10 pop. of race 3	45	0.011-0.068	0.0320
2 pop. of race 4	1	0.0088	-
10 pop. of race 5	45	0.0037-0.0781	0.0378

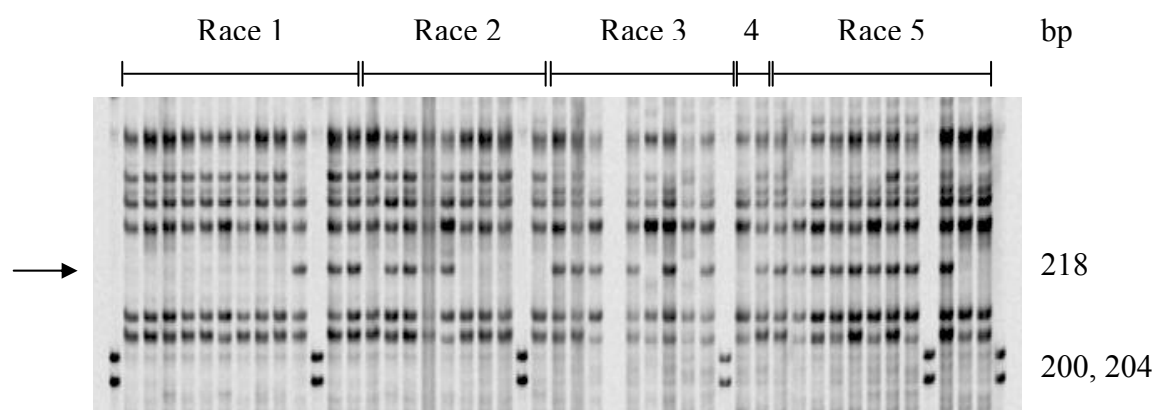
3.5.3 Genetic diversity among *S. gesnerioides* races

In this work, a race is defined as a host species-specific variant of *S. gesnerioides* (Botanga and Timko, 2006). Table 3.3 presents the genetic distance between the different races. Races 1 and 2 are the most closely related (0.0337), while races 1 and 3 are the least (0.0633).

Despite the small genetic distances between races, we examined if some of the 67 polymorphic fragments could allow us to discriminate between races. None of these polymorphisms proved to be race-specific. In the example shown (figure 3.2), a 218-bp product was present in some and absent in other populations of each of the five races.

Table 3.3 : Genetic distances between *S. gesnerioides* races.

Race	1	2	3	4	5
1	-				
2	0.0337	-			
3	0.0633	0.0536	-		
4	0.0462	0.0387	0.0383	-	
5	0.0559	0.0495	0.0414	0.0390	-

**Figure 3.2 : AFLP profiles for selective primer combination E-AGC + M-CAA on the 43 *S. gesnerioides* populations of the study. The arrow indicates a 218 bp polymorphic marker.**

To further explore the relationship between population structure and the physiological races of *Striga*, we performed an analysis with the STRUCTURE v. 2.2 software. STRUCTURE assigns populations to a group using their genotypes. We set $k=5$ to test if the populations would divide themselves into five sub-groups according to their race. As can be seen in the top panel of figure 3.3, there was a poor fit between the five sub-groups formed on the basis of the AFLP data. In fact, the populations formed two obvious sub-groups: races 1 and 2 formed one group (A) whereas races 3, 4 and 5 formed the other (B). When k was set to 2 (lower panel of figure 3.3), the division of the populations into two major groups became quite clear.

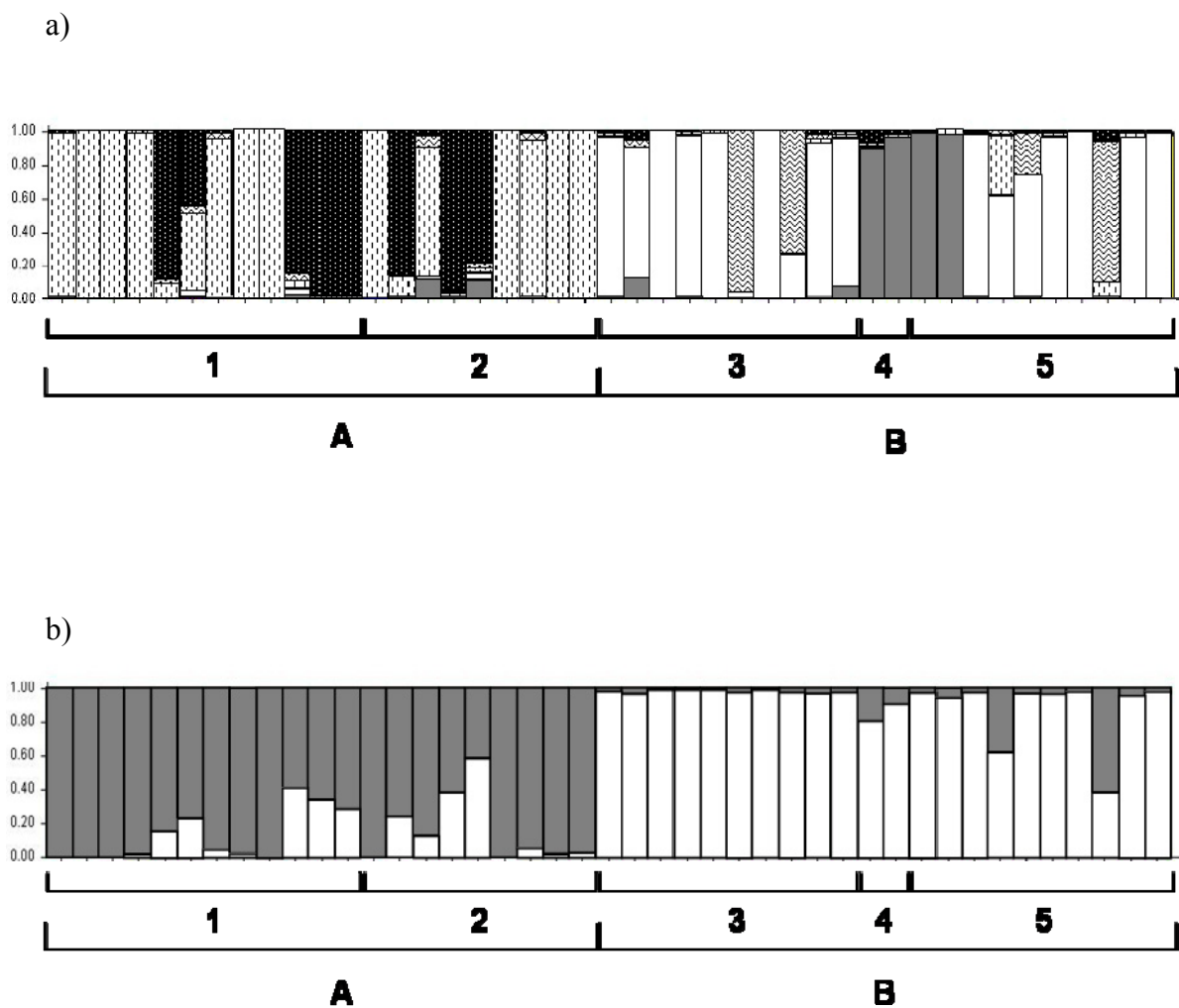


Figure 3.3 : Populations structure using a) $k=5$ and b) $k=2$. Each population is represented by a single vertical line broken into K colored or textured segments, with lengths proportional to each of the K inferred clusters.

A principal coordinate analysis was also conducted. As can be seen in figure 3.4, the first two coordinates quite clearly separate the populations in two groups and account, respectively, for 23.15% and 10.54% of the variation. A few populations (1.6.10, 1.7.11, 2.4.4, 2.4.5, 4.1.1, 4.1.2, 5.1.1 and 5.2.2) are intermediate. A similar pattern was observed for the UPGMA dendrogram based on the Jaccard similarity coefficient (figure 3.5). The first group includes most of the populations belonging to races 1 and 2, while the other group includes most of the populations of races 3, 4 and 5.

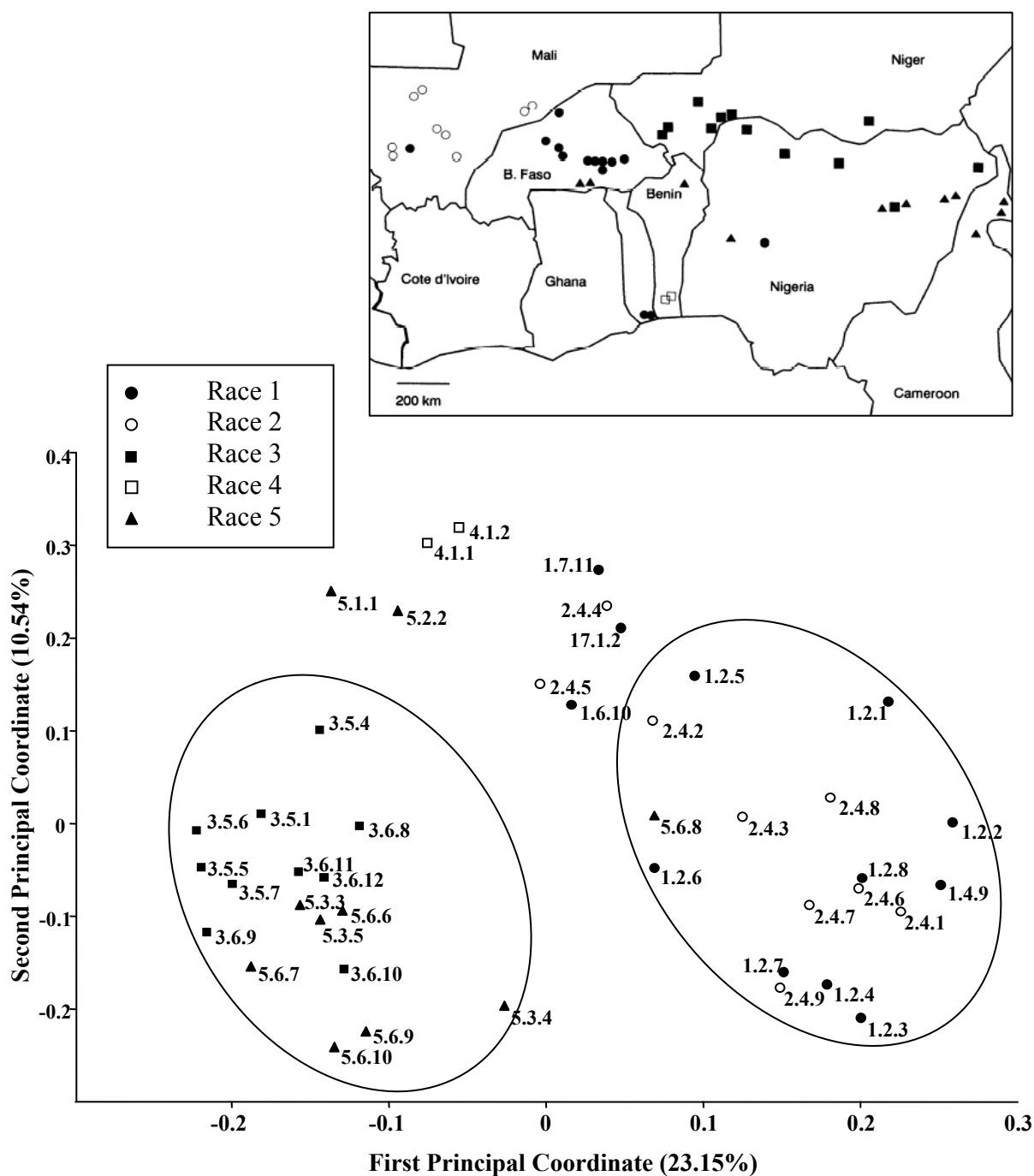


Figure 3.4 : Principal coordinate analysis (PCoA) of the AFLP markers showing the two axes, which account for 23.15% and 10.54%, respectively, of the total variance. The ellipses indicate the apparent segregation of the populations in two principal groups. The map above shows the distribution of the *S. gesnerioides* races in West Africa (from Lane *et al.*, 1996).

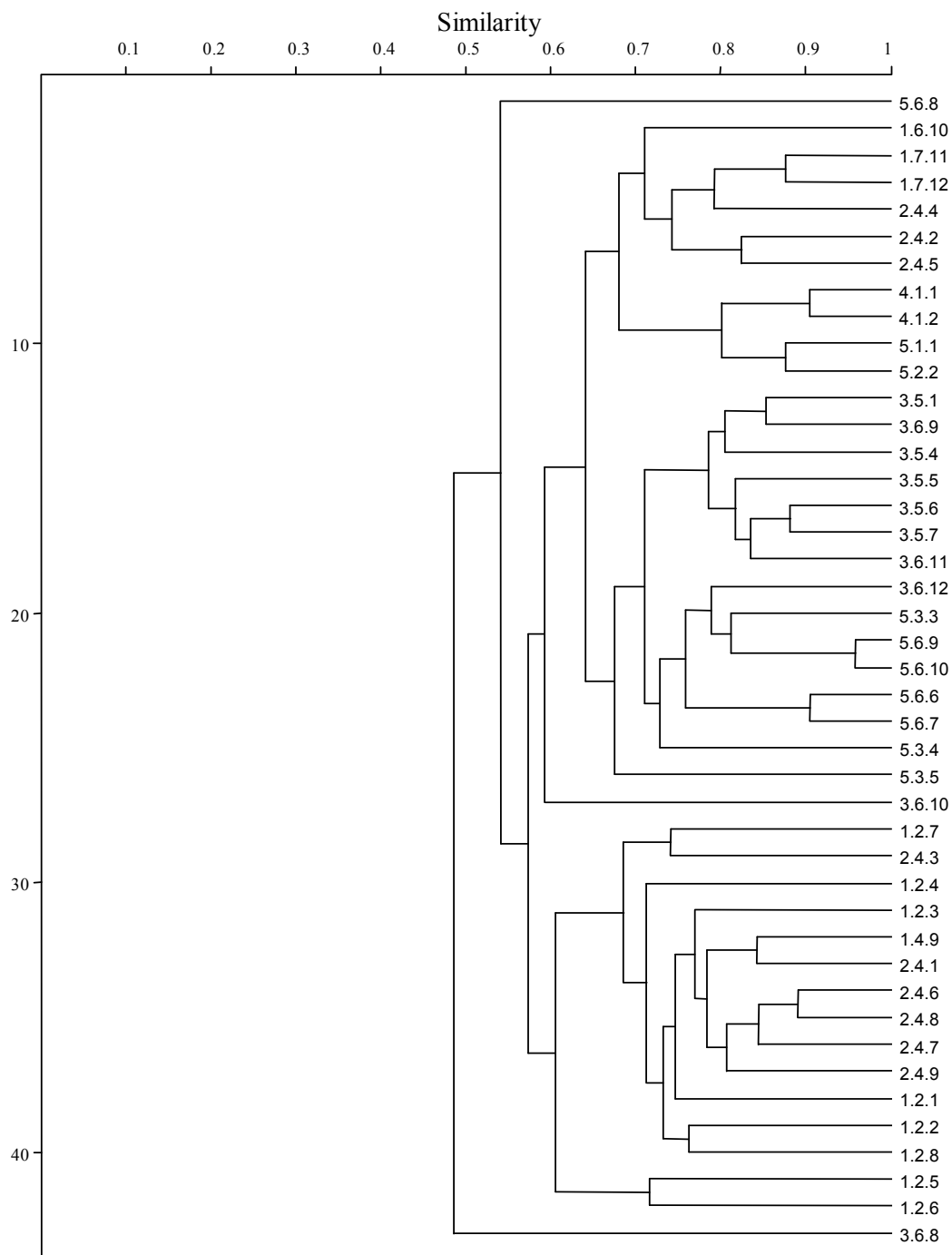


Figure 3.5 : UPGMA dendrogram of the *S. gesnerioides* populations. Each population is identified using a three-number code: the first number indicates the race, the second the country of origin (from 1 to 7 in alphabetical order), and the third number identifies a particular population.

The partitioning of the variation among the populations and among the races using analysis of molecular variance (AMOVA) was evaluated. The majority of the variation is distributed among the populations (table 3.4) as suggested by the banding patterns.

Table 3.4 : Analysis of molecular variance (AMOVA) of 43 populations of *S. gesnerioides* representing 5 races. (SSD: sums of squared deviation, MSD: mean squared deviation).

Source of variation	SSD	df	MSD	Variance component	% Total Variance	Φ -statistics	P-value	Bartlett's index	P-value
Variance among races	136.3506	4	34.088	3.1287	27.48	0.275	<0.001	0.5574	<0.001
Variance among populations	313.7889	38	8.258	8.2576	72.52				

Although most of the genetic diversity was attributable to differences among populations (72.52%), there is a significant Φ_{st} value among the races ($\Phi_{st} = 0.275$, $p < 0.001$). The significant Bartlett's index also confirms the existence of a population structure.

We also performed an AMOVA *a posteriori* using the two groups found by STRUCTURE and the principal coordinates analysis, but the genetic variation is partitioned almost exactly the same way as shown in Table 3.4. The variance among the races and among the populations is 28.47% and 71.53% of the total variance, respectively. The Φ value is significant, as is the Bartlett's index (data not shown).

3.5.4 Race-specific markers

Finally, we examined our marker data for race-specific markers. Even when using the same primer pairs as Botanga and Timko (2006), we could not find any marker capable of discriminating between the five races. Figure 3.6 shows the result obtained with primer pair E-ACG-M-CAT. Using these same primers on 24 populations from West Africa, Botanga and Timko (2006) had reported that a 200-bp amplicon was capable of discriminating between races 1 and 5. Among our populations of *S. gesnerioides* from West Africa, no 200-bp amplicon was observed and the closest amplicon (198 bp) proved monomorphic. Additional analyses of previously-reported race-specific markers also failed to find any such markers among our collection of populations (data not shown).

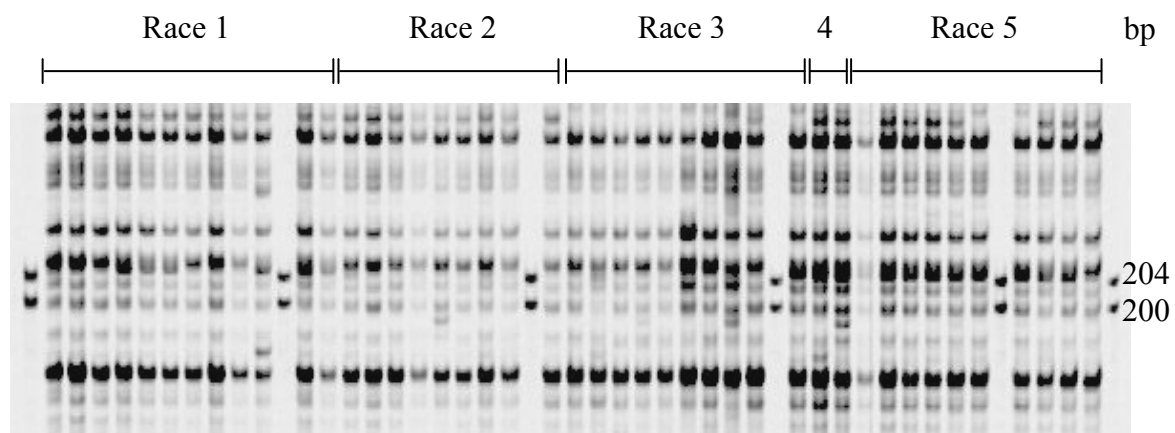


Figure 3.6 : AFLP profile for selective primer combination E-ACG + M-CAT on the 43 populations of the study.

3.6 Discussion

Our data show that there is an extremely low amount of genetic diversity in the collection of *S. gesnerioides* originally used by Lane *et al.* (1996) to define races in this parasitic plant. Similarly, using another set of accessions, Botanga and Timko (2006) found little or no intrapopulation variability among individuals within each of the populations they studied, 98% of all scorable markers being monomorphic among individuals. We also found virtually no diversity between individuals from a same population, and very low levels of interpopulation diversity.

This very low level of genetic diversity can be partly attributed to the high degree of selfing in this species. Indeed, *S. gesnerioides* forms a pollen plug (rather than powdery pollen), so pollen dispersal and outcrossing are quite limited and any minor genetic variation would be rapidly fixed (Botanga and Timko, 2006). Furthermore, as each plant can produce up to 500,000 seeds (Aggarwal, 1985), the introduction of a single seed can rapidly lead to a uniform population in a field.

The low genetic diversity found in the cowpea strains of *S. gesnerioides* is quite remarkable given its wide geographical distribution and cannot be explained solely by its autogamous nature. In the present work, only 6% of 1,200 AFLP bands proved polymorphic. For comparison, in a study on the genetic diversity found in cultivated tomato, a crop often cited as having a very low genetic diversity due to its self-pollinating nature and the extremely narrow genetic base of modern cultivars, Tam *et al.* (2005) found that 14.6% of AFLP amplicons were polymorphic (123 bands out of 845).

Could the parasitic nature of *Striga* somehow explain the low level of genetic diversity found here? To explore this possibility, we examined the levels of polymorphism observed in other parasitic plants using AFLP marker technology. Gagne *et al.* (1998, 2000) reported that 29% of AFLP fragments were polymorphic in different *Orobanche cumana* populations from Europe. In a study of 51 populations of *Arceuthobium americanum*, a North American dwarf mistletoe, Jerome and Ford (2002) found 85% of their AFLP amplicons to be polymorphic. In *S. asiatica* and *S. hermonthica* populations from Kenya,

96.8% and 84% of the AFLP bands were polymorphic, respectively (Gethi *et al.*, 2005). Finally, Vaz Patto *et al.* (2008), studying five *Orobanche foetida* populations from Morocco, observed that 55 to 80% of AFLP bands were polymorphic. Thus, the parasitic nature of *S. gesnerioides* does not seem to explain the lack of genetic diversity within the different populations across West Africa.

An alternative and intriguing hypothesis is that *Striga* capable of parasitizing cowpea is of recent origin and that populations from West Africa derive from a small number of common ancestors. Earlier, dePamphilis *et al.* (1997) suggested that *S. gesnerioides* might be of relatively recent origin given that this species is the sole holoparasite in a genus of hemiparasites. Despite the fact that *Striga* has a wide host range, parasitism on cowpea might result from a rather recent event. Reliable data about cowpea cultivation are difficult to obtain before 1970 (Quin, 1997). The International Institute of Tropical Agriculture (IITA) was given the world mandate for cowpea research in 1967, and advanced varieties were not available before the mid eighties. In the literature, there is little mention of *S. gesnerioides* parasitic on cowpea before 1975 (Okonkwo and Nwoke, 1975). Our results certainly do not suggest an ancient origin, because one would have expected to observe a certain degree of differentiation between the populations. Usually, species with a widespread distribution maintain a higher level of genetic diversity than species with a narrow or endemic distribution (Hamrick and Godt, 1989; Chung, 1995). This is clearly not the case of the *S. gesnerioides* populations studied here.

The AMOVA results suggest the existence of a certain population structure, but most of the admittedly limited genetic diversity (72.5%) is attributable to variation among the populations. There seems to be a certain geographical clustering, as found using STRUCTURE, principal coordinate analysis and cluster analysis. Most populations from the eastern part of West Africa (races 3 and 5) cluster together and a similar situation is found with most populations from the western part of West Africa (races 1 and 2). Geographical isolation might contribute to such population structure and this would be expected to occur during a phase of genetic differentiation following an initial spread of a novel, recently arisen parasite.

The low genetic diversity found here, despite a wide geographic distribution, might support a relatively recent evolution of a cowpea strain from a population infecting some other host. In the study of Botanga and Timko (2006), an *Indigofera* strain was able to complete its lifecycle on a cowpea cultivar known to be susceptible to all races of the parasite, indicating that the host specificity of *S. gesnerioides* is not absolute. Similarly, Vaz Patto *et al.* (2008) found a Moroccan population of *Orobancha foetida* parasitizing a cultivated vetch that was genetically very close to populations infecting a wild species. It is tempting to speculate that such a recent change in host specificity has occurred relatively recently, giving rise to *S. gesnerioides* types capable of infecting cowpea. A good way to test this would be to study the genetic diversity among a wide range of *S. gesnerioides* populations parasitizing various wild species in West Africa and *S. gesnerioides* populations infecting cowpea.

The seeds of such a newly-arisen parasite could then have spread across West Africa. According to Berner *et al.* (1994), seed dispersal can occur by wind, water or animals, but mostly by crop seed contamination. Widespread dispersal might also occur by transportation of cowpea fodder from infested areas to areas deficient in animal feed during the dry season.

With respect to the existence of race-specific markers, our results are in disagreement with those reported by Botanga and Timko (2006). We were unable to find any race-specific markers even when using some of the same primer combinations. The discrepancy between our results and those of Botanga and Timko (2006) may be more apparent than real as we did not examine the same populations and we tested almost twice as many (43 vs 24) populations, thereby decreasing the probability of strict association of one marker with a given population. In the absence of such race-specific markers, the determination of the race to which a specific sample belongs will continue to have to be tested on a differential set of cowpea cultivars.

Therefore, population structure does not appear to be related to race formation. Similarly, Semblat *et al.* (2000) found a lack of correspondence between genetic diversity assessed using AFLP markers and virulence in a study of 17 populations of root-knot nematodes. They concluded that this lack of correspondence indicates that most of the

DNA polymorphism is independent of the virulence which is probably host-driven. There is no common origin of the virulent populations, and virulence would be the result of independent mutational events.

In this study, the differentiation observed between the 43 *S. gesnerioides* populations seemed to be more closely related with geographic location than race. Nevertheless, it would be interesting to use other types of markers on these same populations. For example cpSSR (chloroplastic simple sequence repeat) markers could prove particularly interesting as *S. gesnerioides* has a very low level of photosynthetic activity. A low selection pressure for photosynthetic capacity might lead to a higher genetic variability in this extranuclear genome, as mutations would not be expected to have a significant impact on fitness. It would also be useful to undertake an exhaustive collection of *S. gesnerioides* plants from all over Africa growing on different hosts to have a more global view of the genetic diversity of this parasite.

3.7 Acknowledgements

This work was supported in part by a graduate studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to M.-P. Dubé. We would like to thank Mr. Charlie Riches from the IACR Research Centre who kindly provided the *Striga* seeds.

3.8 References

- Aggarwal, V.D. (1985). Cowpea *Striga* research. In K.O. Rachie (Ed.). Cowpea research, production and utilization, pp. 335-340. John Wiley and Sons, New York.
- Aigbokhan, E.I., D.K. Berner, L.J. Musselman and H.D. Mignouna (2000). Evaluation of variability in *Striga aspera*, *Striga hermonthica* and their hybrids using morphological characters and random amplified polymorphic DNA markers. Weed Research 40: 375-386.
- Bartlett, M.S. (1937). Some examples of statistical methods of research on agriculture and applied biology. Journal of the Royal Statistical Society Suppl. 4: 137-170.
- Bebawi, F.F. (1981). Intraspecific physiological variants of *Striga hermonthica*. Experimental Agriculture 17: 419-423.
- Berner, D.K., K.F. Cardwell, B.O. Faturoti, F.O. Ikie and O.A. Williams (1994). Relative roles of wind, crop seeds, and cattle in dispersal of *Striga* spp. Plant Disease 78(4): 402-406.
- Bharathalakshmi and Jayachandra (1979). Physiological variations in *Striga asiatica*. In R.E. Epplee (Ed.). Proceedings of the second international symposium on parasitic weeds, pp. 132-143. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.
- Bharathalakshmi and Jayachandra (1982). Physiological basis of host-preference in *Striga asiatica* (L.) Kuntze. In Proceedings of the ICRISAT-ICAR group meeting on *Striga* control, pp. 160-182. ICRISAT, Patancheru.
- Bharathalakshmi and Jayachandra (1984). Studies on the germination of some Indian collections of *Striga asiatica* (L.) Kuntze. In A.K. Wilson (Ed.). Proceedings of the third international symposium on parasitic weeds, pp. 108-117. International Center for Agricultural Research in Dry Areas, Aleppo, Syria.
- Bharathalakshmi, C.R. Werth and L.J. Musselman (1990). A study of genetic diversity among host-specific populations of the witchweed *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae) in Africa. Plant Systematics and Evolution 172: 1-12.
- Botanga, C.J., J.G. Kling, D.K. Berner and M.P. Timko (2002). Genetic variability of *Striga asiatica* (L.) Kuntz based on AFLP analysis and host-parasite interaction. Euphytica 128: 375-388.
- Botanga, C.J. and M.P. Timko (2006). Phenetic relationships among different races of *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke from West Africa. Genome 49: 1351-1365.
- Chung, M.G. (1995). Low levels of genetic diversity within populations of *Hosta clausa* (Liliaceae). Plant Species Biology 9: 177-182.

dePamphilis, C.W., N.D. Young and A.D. Wolfe (1997). Evolution of plastid gene *rps2* in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation. *Proceedings of the National Academy Of Science of the U.S.A.* 94: 7367-7372.

Diversity, Arrays Technology Pty Ltd (2007). Plant DNA Extraction Protocol for DArT. *In* Internet site of Diversity Arrays Technology Pty Ltd. [Online] http://www.diversityarrays.com/pub/DArT_DNA_isolation.pdf (Accessed on December 5th 2008).

Doggett, H. (1952). Annual report of the botanist Ukiriguru, for the year 1950. pp. 221-241. Dar es Salaam, Tanzania.

Doggett, H. (1965). *Striga hermonthica* on sorghum in East Africa. *Journal of Agricultural Science* 65(183-194).

Ejeta, G. (2007). The *Striga* scourge in Africa : a growing pandemic. *In* J. Gressel (Ed.). Integrating new technologies for *Striga* control : towards ending the witch-hunt, pp. 3-16. World Scientific Publishing Co. Pte Ltd., Singapore.

Excoffier, L., P.E. Smouse and J.M. Quattro (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Falush, D., M. Stephens and J.K. Pritchard (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7(4): 574-578.

Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley (1995). Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 13(3): 207-209.

Gagne, G., P. Roeckel-Drevet, B. Grezes-Beset, P. Shandrova, P. Ivanov, C. Grand-Ravel, F. Vear, G. Charmet and P. Nicolas (2000). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) as suitable markers to study *Orobanche cumana* genetic diversity. *Journal of phytopathology* 148: 457-459.

Gagne, G., P. Roeckel-Drevet, B. Grezes-Beset, P. Shandrova, P. Ivanov, C. Grand-Ravel, F. Vear, D. Tourvieille de Labrouhe, G. Charmet and P. Nicolas (1998). Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1216-1222.

Gethi, J.G., M.E. Smith, S.E. Mitchell and S. Kresocich (2005). Genetic structure of *Striga hermonthica* and *Striga asiatica* populations of Kenya. *Weed Research* 45: 64-73.

Hammer, O., D.A.T. Harper and P.D. Ryan (2008). PAST - PAleontological STatistics, v. 1.81. Paleontological Museum, University of Oslo, Oslo.

Hamrick, J.L. and M.J.W. Godt (1989). Allozyme diversity in plant species. *In* B.S. Weir (Ed.). *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*, pp. 43-63. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.

Huff, D.R., R. Peakall and P.E. Smouse (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalo grass [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 927-934.

Jaccard, P. (1901). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37: 547-579.

Jerome, C.A. and B.A. Ford (2002). The discovery of three genetic races of the dwarf mistletoe *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) provides insight into the evolution of parasitic angiosperms. *Molecular Ecology* 11: 387-405.

King, S.B. and N. Zummo (1977). Physiologic specialization in *Striga hermonthica* in West Africa. *Plant Disease Reporter* 61: 770-773.

Koyama, M.L. (2000). Molecular markers for the study of pathogen variability : implications for breeding resistance to *Striga hermonthica*. *In* B.I.G. Haussmann, D.E. Hess, M.L. Koyama, L. Grivet, H.F.W. Rattunde and H.H. Geiger (Eds). *Breeding for Striga resistance in cereals*, pp. 227–245. Margraf Verlag, Weikersheim, Germany.

Kuiper, E., J.A.C. Verkleij and A.H. Pieterse (1996). Differences in the primary dormancy pattern of *Striga* species; an ongoing study. *In* C. Parker (Ed.). *Advances in Parasitic Plant Research. Proceedings of the 6th International Parasitic Weed Symposium*, pp. 441-450. Junta de Andalucia, Cordoba, Spain.

Lane, J.A., T.H.M. Moore, D.V. Child and K.F. Cardwell (1996). Characterization of virulence and geographic distribution of *Striga gesnerioides* in cowpea in West Africa. *Plant Disease* 80(3): 299-301.

Mohamed, K.I., J.F. Bolin, L.J. Musselman and A. Townsend Peterson (2007). Genetic diversity of *Striga* and implications for control and modeling future distributions. *In* J. Gressel (Ed.). *Integrating new technology for Striga control : towards ending the witch-hunt*, pp. 71-84. World Scientific Publishing Co. Pte Ltd, Singapore.

Mohamed, K.I., L.J. Musselman and C.R. Riches (2001). The genus *Striga* (Scrophulariaceae) in Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 60-103.

Nei, M. and W.H. Li (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5269-5273.

Okonkwo, S.N.C. and F.I.O. Nwoke (1975). Observations on haustorial development in *Striga gesnerioides* (Scrophulariaceae). *Annals of Botany* 39: 979-981.

- Olivier, A., J.-C. Glaszmann, C. Lanaud and G.D. Leroux (1998). Population structure, genetic diversity and host specificity of the parasitic weed *Striga hermonthica* (*Scrophulariaceae*) in Sahel. *Plant Systematics and Evolution* 209: 33-45.
- Olmstead, R.G., C.W. dePamphilis, A.D. Wolfe, N.D. Young, W.J. Elisons and P.A. Reeves (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 88(2): 348-361.
- Parker, C. and T.I. Polniaszek (1990). Parasitism of cowpea by *Striga gesnerioides* : variation in virulence and discovery of a new source of host resistance. *Annals of Applied Biology* 116: 305-311.
- Parker, C. and D.C. Reid (1979). Host specificity in *Striga* species - some preliminary observations. In R.E. Epplee (Ed.). *Proceedings of the second symposium on parasitic weeds*, pp. 79-90. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.
- Pieterse, A.H. and J.A.C. Verkleij (1991). Genetic variability in *Orobanche* (broomrape) and *Striga* (witchweed) and its implication for host crop resistance breeding. In J.A.C. Verkleij (Ed.). *Ecological responses to Environmental Stresses*, pp. 290-302. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945-959.
- Quin, F.M. (1997). Introduction. In L.E.N. Jackai (Ed.). *Advances in cowpea research*, pp. ix-xv. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.
- Ramaiah, K.V. (1983). *Striga* research at ICRISAT, Upper Volta Center. In M.J. Vasudeva Rao (Ed.). *Proceedings of the second international workshop on Striga*, pp. 53-60. ICRISAT, Ouagadougou.
- Ramaiah, K.V. (1984). Physiological specialization of *Striga hermonthica* and crop specificity. In A.K. Wilson (Ed.). *Proceedings of the third international symposium on parasitic weeds*, pp. 58-65. International Center for Agricultural Research in Dry Areas, Aleppo, Syria.
- Ramaiah, K.V. (1987). Breeding cereal grains for resistance to witchweed. In L.J. Musselman (Ed.). *Parasitic weeds in agriculture. Vol. 1, Striga*, pp. 227-242. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.
- Semblat, J.-P., M. Bongiovanni, E. Wajnberg, A. Dalmaso, P. Abad and P. Castagnone-Sereno (2000). Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Heredity* 84: 81-89.

Shawe, K.G. and M.J. Ingrouille (1993). Isozyme analysis demonstrates host selection of parasite pathotypes in the association between cowpea and *S. gesnerioides*. Brighton Crop Protection Conference - Weeds 2: 919-924.

Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal (1973). Numerical Taxonomy : the principle and practice of numerical classification. W.H. Freeman, San Francisco, 573 p.

Stewart, C.N. and L. Excoffier (1996). Assessing population structure and variability with RAPD data : application to *Vaccinium macrocarpon* (American cranberry). Journal of Evolutionary Biology 9: 153-171.

Swofford, D.L. (1999). PAUP : Phylogenetic Analysis Using Parsimony, v. 4.0b10. Sinauer Associated, Sunderland, MA.

Tam, S.M., C. Mhiri, A. Vogelaar, M. Kerkveld, S.R. Pearce and M.-A. Grandbastien (2005). Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. Theoretical and Applied Genetics 110: 819-831.

Vasudeva Rao, M.J. and L.J. Musselman (1987). Host specificity in *Striga* spp. and physiological "strains". In L.J. Musselman (Ed.). Parasitic weeds in agriculture. Vol. 1, *Striga*, pp. 13-25. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.

Vaz Patto, M.C., R. Diaz-Ruiz, Z. Satovic, B. Román, A.J. Pujadas-Salvà and D. Rubiales (2008). Genetic diversity of Moroccan populations of *Orobanche foetida*: evolving from parasitising wild hosts to crop plants. Weed Research 48: 179-186.

Vos, P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and M. Zabeau (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.

Werth, C.R., J.L. Riopel and N.W. Gillespie (1984). Genetic uniformity in an introduced population of witchweed (*Striga asiatica*) in the United States. Weed Science 32(5): 645-648.

Wilson-Jones, K. (1955). Further experiments on witchweed control. II. The existence of physiological strains of *Striga hermonthica*. Empire Journal of Experimental Agriculture 23: 206-213.

Chapitre IV :

**Extremely limited genetic variability among five races of
Striga gesnerioides (Willd.) Vatke detected by ISSR and
cpSSR analysis**

**Extremely limited genetic variability among five races of
Striga gesnerioides (Willd.) Vatke detected by ISSR and
cpSSR analysis**

Marie-Pier Dubé and François Belzile*

Département de phytologie, Université Laval, Québec, Qc, Canada, G1V 0A6

*Corresponding author:

F. J. Belzile

1243 Pavillon C. E. Marchand, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6

tel: +1 418 656-2131 ext. 5763; fax : +1 418 656-7176

e-mail: francois.belzile@fsaa.ulaval.ca

4.1 Résumé du manuscrit

Le *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke est une plante parasite épiphyte qui s'attaque à certaines dicotylédones à feuilles larges de plusieurs familles, dont le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), une légumineuse alimentaire d'une grande importance pour les régions semi-arides d'Afrique de l'Ouest. Plusieurs races physiologiques, ou biotypes, de *S. gesnerioides* parasitant le niébé ont été identifiées, sur la base de réponses différentielles au parasitisme des cultivars de niébé résistants. Dans le cadre de cette étude, nous avons étudié la diversité génétique au sein et entre 42 ou 44 populations (selon le type de marqueurs utilisés) appartenant aux cinq races identifiées jusqu'à maintenant en Afrique de l'Ouest. La caractérisation génétique a été réalisée sur des populations comprenant jusqu'à 10 individus chacune à l'aide de marqueurs ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* ou amplification intermicrosatellites) et cpSSR (*chloroplastic Simple Sequence Repeat* ou microsatellites chloroplastiques). Les 11 marqueurs ISSR n'ont décelé absolument aucune variabilité au sein des populations. Cette diversité est également extrêmement faible entre les populations et aucun marqueur n'a permis de différencier les cinq races entre elles. Quelques populations sont apparentées, et il semble exister une certaine structure dans leur distribution géographique, mais aucun groupe monophylétique n'a été obtenu sur une base « raciale ». Nous avons finalement utilisé des marqueurs cpSSR qui ont pu mettre en évidence, dans plusieurs travaux, des polymorphismes intraspécifiques. Un total de 34 paires d'amorces cpSSR issues de diverses espèces furent utilisées, desquelles 26 ont produit des amplicons chez le *Striga*. Absolument aucun polymorphisme n'a pu être observé, ce qui souligne que malgré une distribution géographique étendue, la variabilité génétique entre les différentes populations est extrêmement faible.

Mots clés : *Striga gesnerioides*, variabilité génétique, ISSR, cpSSR, plantes parasites

4.2 Abstract

Striga gesnerioides (Willd.) Vatke is an obligate root parasite of several dicotyledonous species including cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), an important legume crop of the semi-arid regions of West Africa. Based on host-parasite interactions in the field, various races of *S. gesnerioides* attacking cowpea have been identified. In this study, we investigated the genetic variability within and between 42 or 44 populations, depending on the type of marker used, of five of the previously recognized races of the parasite present in West Africa. Two different types of molecular markers, ISSR (inter-simple sequence repeat) markers and cpSSR (chloroplastic simple sequence repeat) markers, were used on up to 10 individuals from each population. The 11 ISSR markers showed no genetic variability within populations. The variability between the populations was also extremely low and did not allow discrimination of the five races. A few populations were more closely related, but no geographical or “racial” clustering could be seen. Finally, we used cpSSR markers as these have been shown, in many studies, to reveal greater amounts of polymorphism at the intraspecific level. A total of 34 cpSSR primer pairs from various species were used, 26 of which produced amplicons in *Striga*. Absolutely no polymorphism was observed with cpSSR markers emphasizing that despite a large geographical distribution, very low genetic variability can be found in the different populations of *S. gesnerioides*.

Key words : *Striga gesnerioides*, genetic variability, ISSR, cpSSR, parasitic plants

4.3 Introduction

A parasitic lifestyle has been independently adopted by various families within the plant kingdom. Evolutionary studies suggest that parasitism occurred independently at least 11 times during angiosperm evolution (Barkman *et al.*, 2007). About 3,500 flowering plant species rely on other plants to supply themselves with water and nutrients (Rispaill *et al.*, 2007). Among these, *Striga* spp. (witchweed), a group of parasitic species belonging to the Orobanchaceae (Olmstead *et al.*, 2001), are obligate root parasites that cause major problems in the semi-arid regions of Africa and in parts of Asia, affecting the production of many important crops, mostly cereals. *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke, however, attacks only dicotyledonous plants. It has developed host-specific strains, each with a narrow host range, the most economically important being those parasitizing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and above all cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).

Control of the parasite is difficult because of the intimate association between *Striga* and its host. Major emphasis has been put in the identification of resistant cowpea varieties and the development and selection of improved breeding lines because it is the easiest and most affordable way to reduce crop damage (Singh *et al.*, 2006; Kamara *et al.*, 2008). Many resistant cowpea varieties were identified and developed in the last decades, but failed to be resistant in every country where they were grown. Parker and Polniaszek (1990), Singh and Emechebe (1990) and Lane *et al.* (1994, 1997) showed that differences exist in the virulence of *S. gesnerioides* populations from different locations in West and Central Africa, and at least five different races are present in West Africa. A sixth race was recently identified in Senegal by Botanga and Timko (2006).

However, in cases where most of the control effort is put on the breeding of resistant host varieties, it is important to assess the genetic variability of the parasite, because resistance can sometimes be easily overcome, especially if resistance is based on only a few dominant genes (Román *et al.*, 2002). Knowledge of the genetic variability and population structure of the parasite is important, as it can reflect the evolutionary potential of an organism and the extent of gene flow between populations (Román *et al.*, 2002, 2007). The

spread of *Striga* spp. throughout Africa and other parts of the world shows that rapid dispersal events and gene flow are very common (Mohamed *et al.*, 2007). Several factors may contribute to genetic diversity in *Striga* spp.: the persistence of the seed bank in the soil, hybridization, a wide geographic distribution, long distance dispersal by wind, cattle and men, and locally adapted host races (Nadler, 1995; Mohamed *et al.*, 2007). Resistant crops must therefore be able to cope with the great potential genetic diversity of the parasite populations. Genetic diversity studies of *Striga* spp. have been carried out using two principal PCR based techniques: RAPD in *S. hermonthica* (Aigbokhan *et al.*, 2000; Koyama, 2000) and AFLP in *S. asiatica* (Botanga *et al.*, 2002; Gethi *et al.*, 2005), *S. hermonthica* (Gethi *et al.*, 2005) and *S. gesnerioides* (Botanga and Timko, 2006; this thesis, chapter 3).

We previously demonstrated that the genetic diversity within and among the West African *S. gesnerioides* populations collected and described by Lane *et al.* (1996) was very low (this thesis, chapter 3). Unlike Botanga and Timko (2006), we did not obtain race specific markers, but there was evidence of geographical clustering among the populations. In the present work, our goal was to try to reveal more genetic diversity with different, potentially more polymorphic, PCR-based markers: nuclear inter-simple sequence repeat (ISSR) and chloroplastic microsatellite (cpSSR) markers.

The ISSR technique amplifies DNA sequences lying between microsatellite repeats, which are abundant and dispersed throughout plant genomes (Benharrat *et al.*, 2002). It can amplify a large number of DNA fragments per reaction, thus monitoring multiple loci across the genome and it requires no previous knowledge of the DNA sequence context. According to Román *et al.* (2002), it is an ideal method for fingerprinting and the measure of genetic diversity. In addition, ISSR markers are considered more reliable and robust than RAPD markers, in part because the primers are longer so PCR conditions are more stringent. This technique has been mostly used with *Orobanch*e species by Román *et al.* (2002) (in *O. crenata*), Benharrat *et al.* (2002, 2005) (in *Orobanch*e spp. and *O. ramosa*, respectively) and Thorogood *et al.* (2008) (in *O. minor*).

As a general rule, the chloroplast genome evolves very slowly and has quite a conserved structure (Soltis *et al.*, 1992; Soltis and Soltis, 1998; Bungard, 2004). But given

the fact that *S. gesnerioides* is not photosynthetically active, the chloroplast genome in such a parasite is not under intense selection pressure and would be expected to be more subject to change. Microsatellites are also present in the chloroplast genome and are analogous to those of the nuclear genome, except that cpSSRs are characteristically composed of poly(A) or poly(T) mononucleotide repeats with a maximum length of about 20 bp, rather than di-, tri- or tetra- nucleotide repeats (Bryan *et al.*, 1999). Owing to the haploid nature and the high number of copies of the chloroplast genome, genetic markers based upon cpSSR have been shown to be particularly easy to deploy and analyse using PCR and polyacrylamide gel electrophoresis. In plants, a number of studies have shown that these mononucleotidic fragments can be polymorphic at the inter and intraspecific level (Powell *et al.*, 1995a; Bryan *et al.*, 1999; Weising and Gardner, 1999; Mengoni *et al.*, 2001, 2003; Xu *et al.*, 2002; Chung and Staub, 2003; Imazio *et al.*, 2006; Wills and Burke, 2006; Angioi *et al.*, 2009). According to Powell *et al.* (1995b), cpSSR with mononucleotide A/T motifs are very abundant, and large differences exist between species in the number of such regions. There is usually a high level of length variation due to point mutations in mononucleotide repeat regions.

In this study, our purpose was to use ISSR and cpSSR markers to characterize the genetic diversity of the nuclear and chloroplast genomes within and among populations of *S. gesnerioides*, and to verify the existence of race-specific markers.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Plant material and growth conditions

The *S. gesnerioides* populations used in this study were grown from seeds of the 45 populations kindly provided by Mr. Charlie Riches from the IACR Research Centre (Long Ashton, UK), and collected between 1984 and 1990 by J.A. Lane *et al.* (see Lane *et al.*, 1996). A germination assay done in 2001 proved all samples except one were viable. We also confirmed the race of each population using different cowpea cultivars (see chapter 2 for the details). We therefore used 44 samples from different locations, each sample representing a population of distinct geographical provenance (see annex 1 and table 4.1). For the ISSR study, all amplifications failed with population 1.2.7 and we did not obtain enough material from population 5.1.1; these were therefore excluded from further analysis.

The seeds were conditioned in 5-inch plastic pots in a growth chamber (Conviron, Winnipeg, MB) using the following procedures: the plastic pots were filled with a mixture of sand and cactus potting mix (brown peat, sphagnum peat moss and sand mix from Fafard, St-Bonaventure, QC) and infested 5 to 7 cm deep in the soil with *Striga* seeds (approximately 500 seeds per pot). The soil was kept moist for 10 to 12 days, and then two cowpea seeds (cultivar K VX 404-8-1, susceptible to all known races) were sown in each pot. When cowpea seedlings emerged, only one plant was kept. The plants were watered and fertilized with low nitrogen cactus fertilizer (N-P-K 2-7-7) when necessary. Infected plants were submitted to a 16-hour photoperiod, at 33/25°C day/night temperatures, 67% relative humidity and standard growth chamber light intensity. *Striga* shoots emerged 4 to 6 weeks after sowing the cowpea seeds. *Striga* plants from each pot were collected and placed at –80°C until DNA extraction.

Table 4.1 : *S. gesnerioides* populations used in this work. Each population is identified using a three-number code: the first number indicates the race, the second the country of origin (from 1 to 7 in alphabetical order), and the third number identifies a particular population.

COUNTRY (code)	Race 1	Race 2	Race 3	Race 4	Race 5
Benin (1)				4.1.1 4.1.2	5.1.1
Burkina Faso (2)	1.2.1 1.2.2 1.2.3 1.2.4	1.2.5 1.2.6 1.2.7 1.2.8			5.2.2
Cameroon (3)					5.3.3 5.3.4
Mali (4)	1.4.9	2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 2.4.5	2.4.6 2.4.7 2.4.8 2.4.9		
Niger (5)			3.5.1 3.5.2 3.5.4	3.5.5 3.5.6 3.5.7	
Nigeria (6)	1.6.10		3.6.8 3.6.9 3.6.10	3.6.11 3.6.12	5.6.6 5.6.7 5.6.8
Togo (7)	1.7.11 1.7.12				

4.4.2 DNA extraction

Plant tissues were kept frozen in liquid nitrogen after retrieval from the -80°C freezer. DNA extraction was performed on up to 10 individuals of each of the 44 populations. Samples (mostly floral buds and scale-like leaves, avoiding when possible harder stem tissues) were put in a 1.5 ml Eppendorf tube. Tissues were ground to a fine powder by adding two metal beads into each tube and shaking on a tissue lyser (Qiagen, Mississauga, ON). Total genomic DNA was isolated using a modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol based on Fulton *et al.* (1995) available at: http://www.diversityarrays.com/pub/DArT_DNA_isolation.pdf.

4.4.3 ISSR markers

ISSR primers were purchased from the University of British Columbia, Nucleic Acid Protein Service Unit (Vancouver, BC). The ISSR primer set #9 consists in 100 SSR-targeted primers, either 3'- or 5'- anchored or non-anchored (see annex 3). We surveyed all 100 primers on 6 populations (1.2.8, 1.7.11, 2.4.2, 3.5.6, 4.1.2, and 5.6.8). From the set, a total 11 primers (808, 809, 811, 835, 836, 840, 857, 873, 876, 879 and 880) gave clear and reproducible amplification profiles on agarose gels and were chosen for further use with 42 populations. PCR conditions consisted of 20 ng template genomic DNA, 2 μl 10X buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA), 0.25 mM of a single primer, 0.2 mM of dNTPs (mix), 2 mM of MgCl_2 and 1 U *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) for a total volume of 20 μl . Reactions were placed in 96-well plates in a T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) programmed for the following PCR conditions: initial denaturation for 1 min at 94°C , 9 touchdown cycles (45 s at 94°C , 3 cycles each at 52°C , 50°C and 48°C for 75 s, and 2 min at 72°C), 26 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 75 s and 2 min at 72°C and a final step of 72°C for 5 minutes. PCR products (15 μl) were separated by electrophoresis in 2% agarose gels, stained with ethidium bromide.

4.4.4 Chloroplastic primers

Based on a survey of the literature, we selected 34 primer pairs that amplify cpSSRs from various angiosperms (ccmp, Weising and Gardner, 1999), tobacco (NTCP, Bryan *et al.*, 1999) and *Arabidopsis thaliana* (ARCP, Cheng *et al.*, 2006). A primary screening on a subset of 10 populations was done. The cycling conditions consisted of a touchdown regime as follows: an initial denaturing step of 94°C for 3 min, followed by 21 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 60°C (annealing temperature was reduced by 2°C every three cycles until reaching 48°C), 20 s at 72°C, followed by 14 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 50°C, 20 s at 72°C, and a final extension step of 3 min at 72°C. PCR products (5 µl) were then visualised on 4% agarose gels stained with ethidium bromide. Of the 34 primer pairs tested, a total of 26 primers pairs produced clear and reproducible amplicons and were used in the analysis of the 44 populations (table 4.2). A 5' tail complementary to the M13 primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') was added on the forward primer of each of those 26 primer pairs. Amplifications were carried out in a 10 µl final volume, containing 0.2 mmol of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.1 µM of each cpSSR primer, 0.01 µmol of the universal M13 primer (labeled with IRDye 700) and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) in IX reaction buffer. Reactions were placed in 96-well plates in a T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany), and PCR conditions were as in the screening steps. The bands were revealed on 6.5% (w/v) polyacrylamide gels using a LI-COR 4200 Automated DNA analyzer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Table 4.2 : cpSSR primer pairs sequences applied in the present study

Code and location	Primer sequences	Repeat and expected size* (pb)	Size in <i>Striga gesnerioides</i>
ccmp1 <i>trnK</i> intron	5'-CAGGTAACTTCTCAACGGA-3' 5'-CCGAAGTCAAAAGAGCGATT-3'	(T) ₁₀ 139	147
ccmp2 5' to <i>trnS</i>	5'-GATCCCGGACGTAATCCTG-3' 5'-ATCGTACCGAGGGTTCGAAT-3'	(A) ₁₁ 189	197
ccmp3 <i>trnG</i> intron	5'-CAGACCAAAAGCTGACATAG-3' 5'-GTTTCATTCCGGCTCCTTTAT-3'	(T) ₁₁ 112	112
ccmp4 <i>atpF</i> intron	5'-AATGCTGAATCGAYGACCTA-3' 5'-CCAAAATATTBGGAGGACTCT-3'	(T) ₁₃ 126	160
ccmp5 3' to <i>rps2</i>	5'-TGTTCCAATATCTTCTTGTCATT-3' 5'-AGGTTCCATCGGAACAATTAT-3'	(C) ₇ (T) ₁₀ (T) ₅ C(A) ₁₁ 121	120
ccmp6 ORF 77-ORF 82 intergenic	5'-CGATGCATATGTAGAAAGCC-3' 5'-CATTACGTGCGACTATCTCC-3'	(T) ₅ C(T) ₁₇ 103	90
ccmp7 <i>atpB-rbcL</i> intergenic	5'-CAACATATACCACTGTCAAG-3' 5'-ACATCATTATTGTATACTCTTTC-3'	(A) ₁₃ 133	140
ccmp8 <i>rplk20-rps12</i> intergenic	5'-TTGGCTACTCTAACCTTCCC-3' 5'-TTCCTTCTTATTTTCGCAGDGA-3'	(T) ₆ C(T) ₁₄ 77	54
ccmp9 ORF 74b- <i>psbB</i> intergenic	5'-GGATTGTACATATAGGACA-3' 5'-CTCAACTCTAAGAAATACTTG-3'	(T) ₁₁ 98	135
ccmp10 <i>rpl2-rps19</i> intergenic	5'-TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA-3' 5'-TTCGTGCGDCGTAGTAAATAG-3'	(T) ₁₄ 103	115
NTCP6 <i>rps16-trnQ</i> intergenic	5'-GGTTCGAATCCTTCCGTC-3' 5'-GATTCCTTTCGCATCTCGATT-3'	(A) ₁₁ 176	175
NTCP8 <i>trnG</i> intron	5'-ATATTGTTTTAGCTCGGTGG-3' 5'-TCATTCGGCTCCTTTATG-3'	(T) ₁₁ 251	250
NTCP9 <i>trnG-rnR</i> intergenic	5'-CTTCCAAGCTAACGATGC-3' 5'-CTGTCCTATCCATTAGACAATG-3'	(T) ₁₀ 237	274
NTCP10 <i>atpF</i> intron	TGCTGAATCGACGACCTA-3' AATATTCGGAGGACTCTCTG-3'	(T) ₁₃ 120	155
NTCP26 <i>psaI</i> -ORF184 intergenic	5'-GCAATTGCAATGGCTTCTTTA-3' 5'-TTTATGTTCCGGTGGAAATCACA-3'	(T) ₁₀ 168	177

Code and location	Primer sequences	Repeat and expected size* (pb)	Size in <i>Striga gesnerioides</i>
NTCP28 <i>rpl20-rps12</i> intergenic	5'-TCCAATGGCTTTGGCTA-3' 5'-AGAAACGAAGGAACCCAC-3'	(T) ₁₄ 170	148
NTCP30 <i>clpP</i> intron	5'-GATGGCTCCGTTGCTTTAT-3' 5'-TGCCGGAGAGTTCCTAACAAATA-3'	(T) ₁₃ (T) ₁₅ 158	160
NTCP32 <i>clpP</i> intron	5'-TGTTTCATCTTTTATAGGTTTAT-3' 5'-TCAAGCAAAGTTATCTCAAC-3'	(T) ₁₁ 165	160
NTCP37 <i>rrn5-trnR</i> intergenic	5'-TTCCGAGGTGTGAAGTGG-3' 5'-CAGGATGATAAAAAGCTTAACAC-3'	(A) ₁₃ 143	155
NTCP39 <i>trnR-rrn5</i> intergenic	5'-GTCACAATTGGGGTTTTGAATA-3' 5'-GACGATACTGTAGGGGAGGTC-3'	(T) ₁₃ 156	160
NTCP40 <i>rp12-trnH</i> intergenic	5'-TAATTTGATTCTTCGTCGC-3' 5'-GATGTAGCCAAGTGGATCA-3'	(A) ₁₄ 163	170
ARCP4 <i>16S rRNA-trnV</i>	5'-CAATTCGGGATTTTCCTTGA-3' 5'-GAGCGAAGGGGTACGAAATA-3'	(T) ₁₇ 237	225
ARCP5 <i>trnL-trnF</i> intergenic	5'-GGCCATAGGCTGGAAAGTCT-3' 5'-GTTTATGCATGGCGAAAAGG-3'	(T) ₁₃ 212	205
ARCP7 <i>ndhJ</i>	5'-TTTACCGAGCAGGTCTACG-3' 5'-TGAACGATCCCCAGGACTTA-3'	(A) ₈ 199	180
ARCP9 <i>psbA-trnK</i> intergenic	5'-GAAAAATGCAAGCACGGTTT-3' 5'-TACGATCCGTAGTGGGTTGC-3'	(A) ₁₀ 124	60
ARCP11 <i>ndhB-rps7</i> intergenic	5'-GAGCGAAGGGGTACGAAATA-3' 5'-CAATTCGGGATTTTCCTTGA-3'	(A) ₁₇ 237	225

*For *ccmp* and NTCP: expected size in tobacco, and for ARCP: expected size in *Arabidopsis thaliana*.

4.4.5 Data analysis

Each ISSR gel was scored for the presence (1) or absence (0) of specific bands. The genetic distances were estimated using PAUP v. 4.0b10 for Unix (Swofford, 1999), applying pair wise comparison following the method of Nei and Li (Nei and Li, 1979) with the formula $GD_{ij} = 1 - 2N_{ij}/(N_i + N_j)$, where N_{ij} is the number of bands that are shared by genotypes i and j , N_i the number of bands present in i , and N_j the number of bands present in j . The distance matrix was then subjected to a cluster analysis using the unweighted pair group method with arithmetic averaging (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) in order to visualize the relationships between the different populations (data not shown). A UPGMA tree was also generated using the Jaccard similarity coefficient (Jaccard, 1901) with PAST (Palaeontological Statistics v. 1.81, Hammer *et al.*, 2008), to examine the genetic distance between the populations. Distance among populations was also measured as an Euclidean metric distance and subjected to a principal coordinate analysis (PCoA) using PAST (Hammer *et al.*, 2008). An Analysis of Molecular Variance (Excoffier *et al.*, 1992) was used to partition the variation among populations and among the races. The AMOVA was performed using the AFLP profile as a haplotype (Huff *et al.*, 1993) with AMOVA v. 1.55 software (Excoffier *et al.*, 1992). The variance components were tested statistically by a non-randomization test using 1000 permutations. A non-parametric test for the homogeneity of molecular variance (HOMOVA) based on Bartlett's statistic (Bartlett, 1937) was also performed to test heteroscedasticity (Stewart and Excoffier, 1996) and Bartlett's null distributions were obtained after 1,000 permutations.

For the cpSSR data, no statistical analysis was done, because we could not find any polymorphism within and among the different populations (see results).

4.5 Results

4.5.1 ISSR analysis

4.5.1.1 Genetic diversity within *S. gesnerioides* populations

To determine the extent of genetic variation within individual *Striga* populations, we performed an ISSR analysis on up to 4 individuals from 10 populations, two for each of the five races. Using a total of 11 primers, 78 reproducible bands were observed following gel electrophoresis. Within populations, we did not find any polymorphic fragments and as shown in figure 4.1, all scorable markers were monomorphic among individuals of the same population. From this we conclude that *Striga* populations are genetically extremely homogeneous. In all ensuing work, a single individual was therefore taken to be representative of the population as a whole.

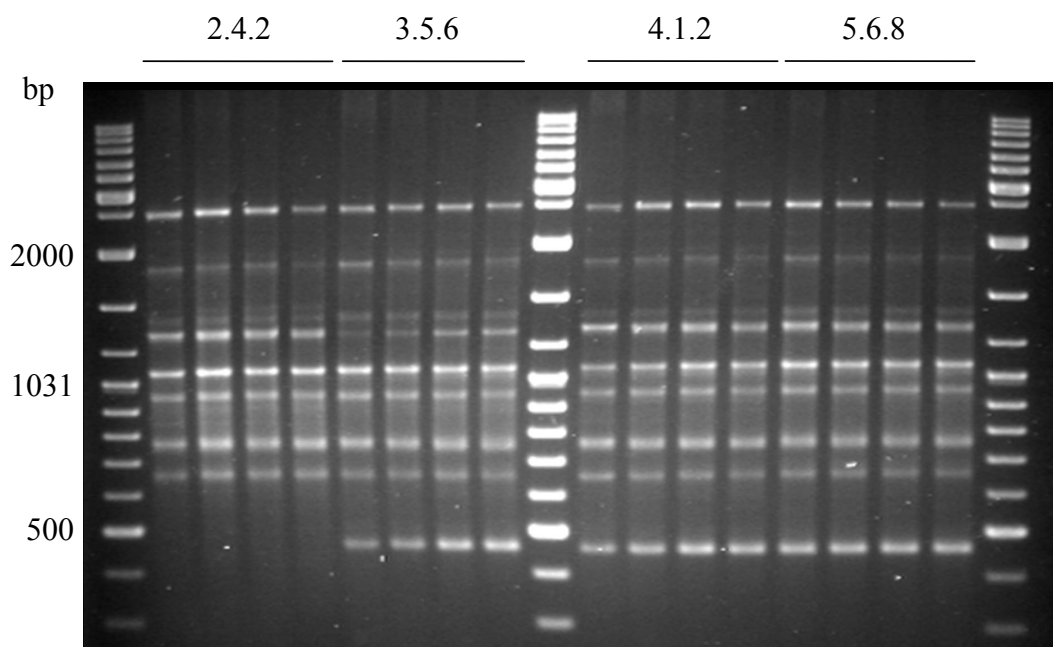


Figure 4.1: Amplification products generated by ISSR primer 811 on four populations of the parasite: 2.4.2 (Mali), 3.5.6 (Niger), 4.1.2 (Benin) and 5.6.8 (Nigeria). Lanes 1, 10 and 19 = GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

4.5.1.2 Genetic diversity among *S. gesnerioides* populations

To measure the amount of genetic variability between the various populations of *Striga*, we used 11 ISSR primers to examine a single individual from each of the 42 populations. In total, 14% (11/78) of the amplicons proved polymorphic among the set of populations, and these 11 markers were produced using 5 of the 11 primers (808, 811, 857, 873 and 880). Only one amplicon (1.3%) was unique to a specific population (3.6.9). The populations within race 3 (10 populations), race 1 (12 populations) and race 5 (10 populations) showed the greatest number of polymorphic bands (10, 8 and 7 respectively). Populations of race 4 (4.1.1 and 4.1.2) were monomorphic. The mean pairwise genetic distances within these populations varied from 0.0000 to 0.5829. Figure 4.2 shows a 1,150 bp band that was polymorphic among populations of race 1.

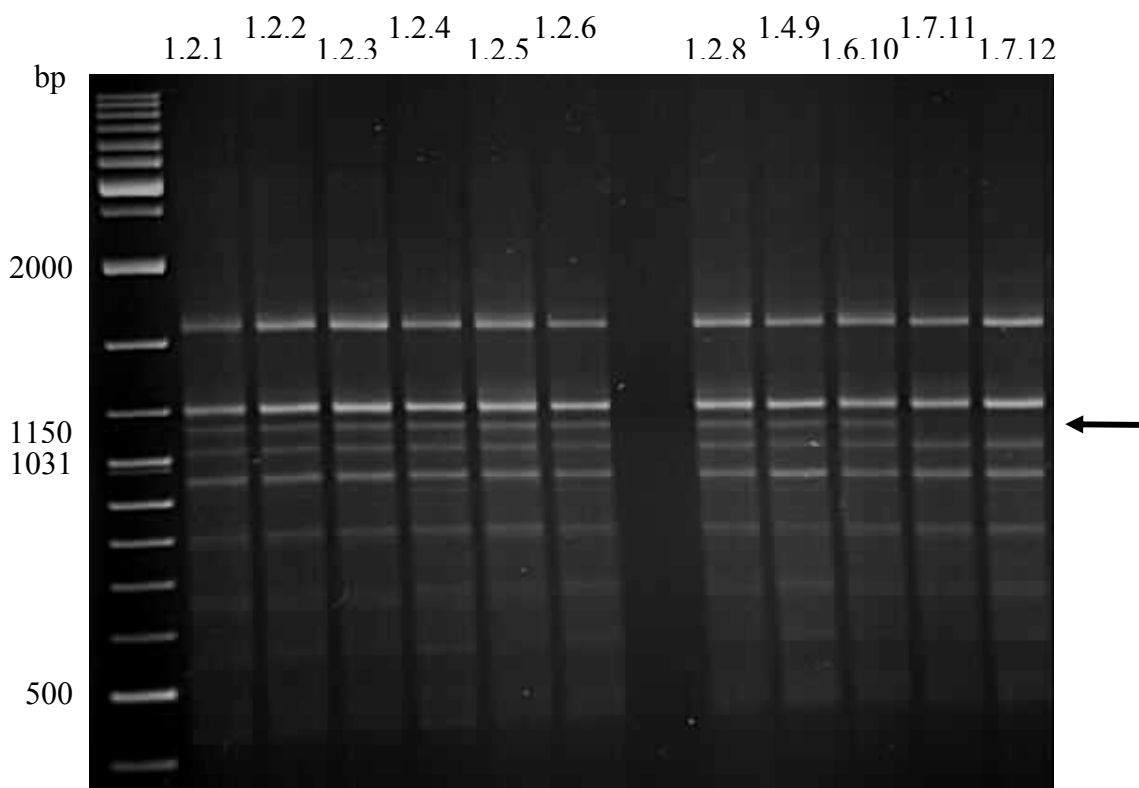


Figure 4.2 : Amplification products generated by ISSR primer 808 on race 1 populations of the parasite. The arrow indicates a 1150 bp polymorphic marker. Lane 1 = GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

4.5.1.3 Genetic diversity among *S. gesnerioides* races

As in the AFLP study (chapter 3), a race is defined as a host species-specific variant of *S. gesnerioides* (see Botanga and Timko, 2006). We examined if some of the 11 polymorphic fragments could allow us to discriminate between races. None of these polymorphisms proved to be race-specific. In the example shown (figure 4.3), three amplicons were present in some and absent in other populations of three of the five races.

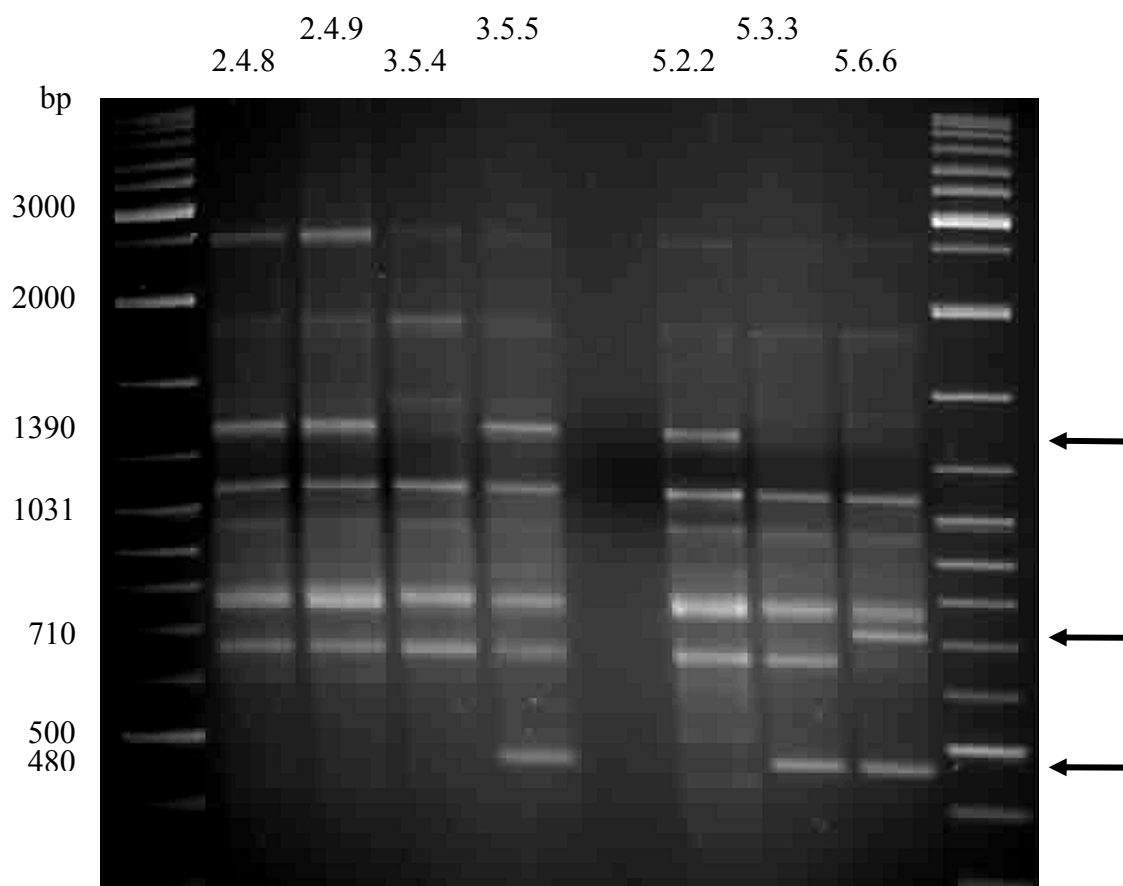


Figure 4.3 : Amplification products generated by ISSR primer 811 on different populations of the parasite. The arrows indicate polymorphic markers among *S. gesnerioides* races. Lane 1 = GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

A principal coordinate analysis was also conducted. As can be seen in figure 4.4, the first two coordinates account, respectively, for 44.23% and 18.69% of the variation. There is no clear separation of the populations in two principal groups, but most of the populations from races 1 and 2 are grouped. A few populations share the same coordinate values. A similar pattern was observed for the UPGMA dendrogram based on the Jaccard similarity coefficient. The dendrogram yielded the same topology as the Nei and Li tree, and is shown with the genetic similarity axis. (figure 4.5).

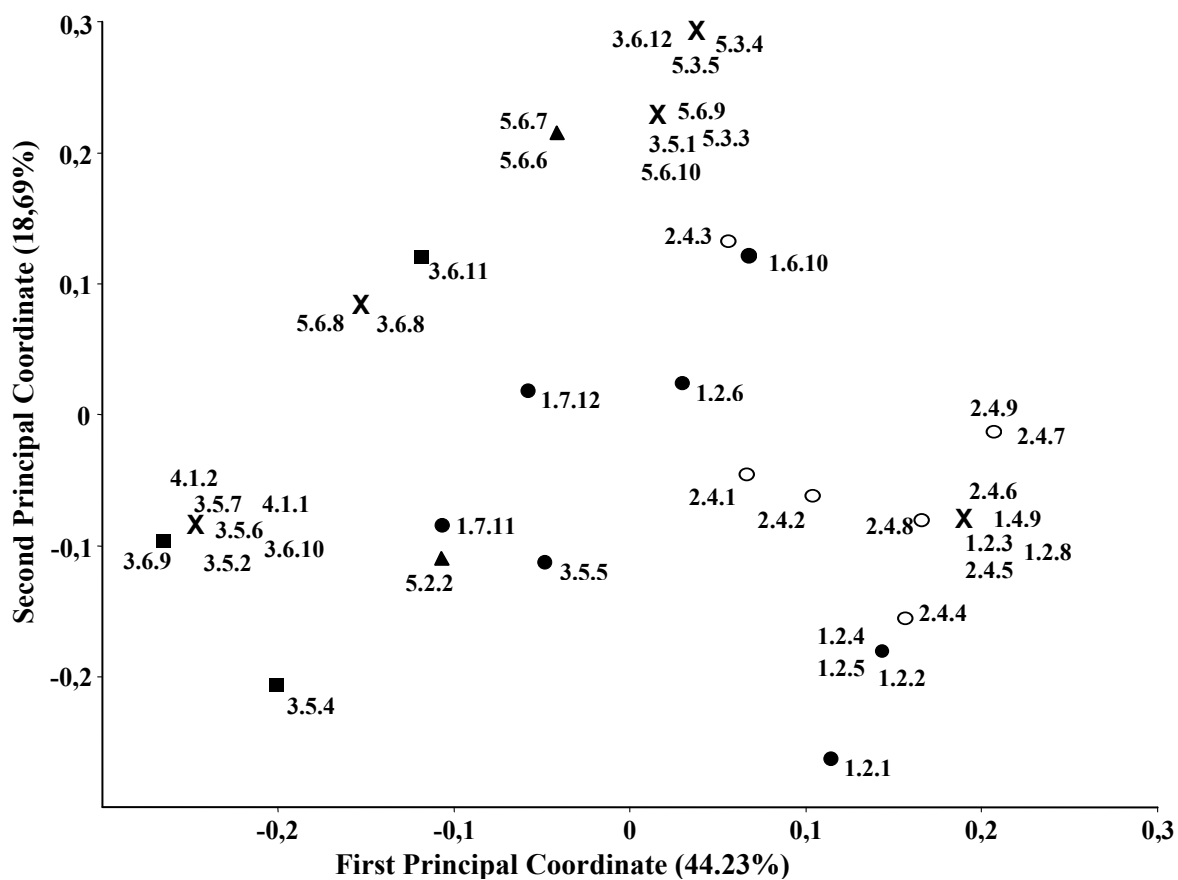
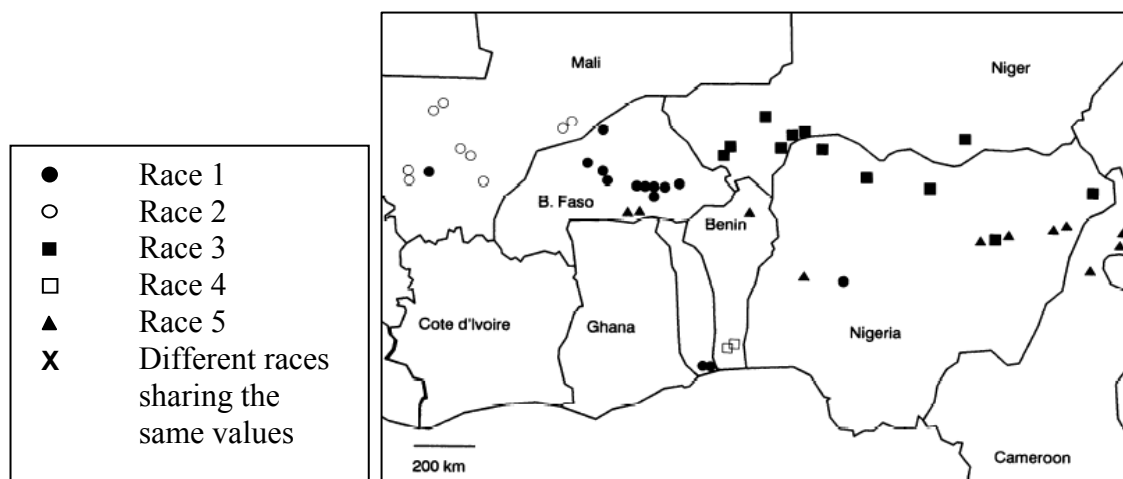


Figure 4.4 : Principal coordinate analysis (PCoA) of the ISSR markers showing the two axes, which account for 44.23% and 18.69%, respectively, of the total variance. The map above shows the distribution of the races in West Africa (from Lane et al., 1996).

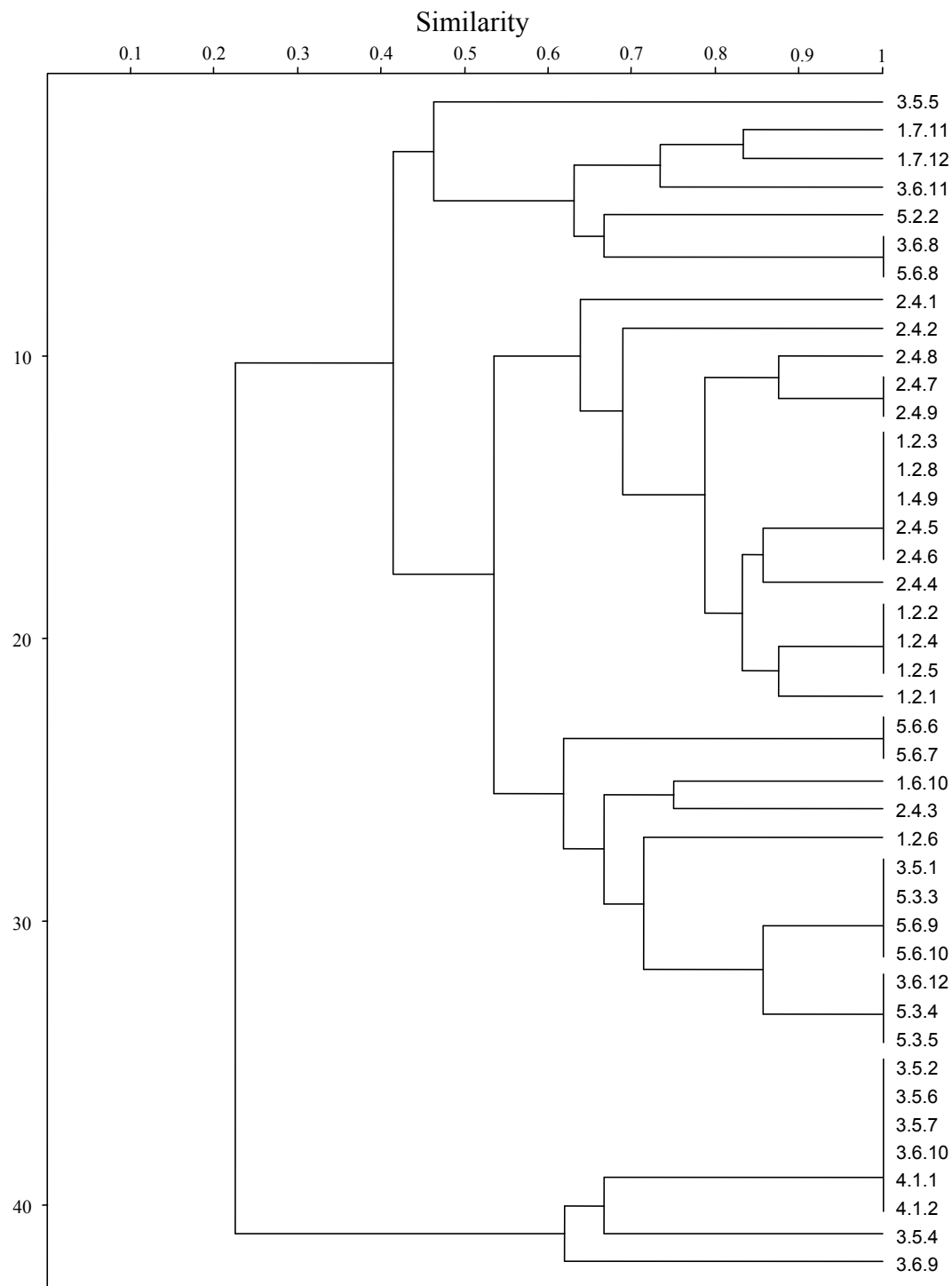


Figure 4.5 : UPGMA dendrogram of the *S. gesnerioides* populations. Each population is identified using a three-number code: the first number indicates the race, the second the country of origin (from 1 to 7 in alphabetical order), and the third number identifies a particular population.

The partitioning of the variation among the populations and among the races using analysis of molecular variance (AMOVA) was evaluated. The majority of the variation is distributed among the populations (table 4.3).

Table 4.3 : Analysis of molecular variance (AMOVA) of 42 populations of *Striga gesnerioides* representing 5 races. (SSD: sums of squared deviation, MSD: mean squared deviation).

Source of variation	SSD	df	MSD	Variance component	% Total Variance	Φ -statistics	P-value
Variance among races	38.2641	4	9.566	1.0182	43.03	0.430	<0.001
Variance among populations	49.8788	37	1.348	1.3481	56.97		

However, although most of the genetic diversity was attributable to differences among populations (56.97%), there is a significant Φ_{st} value among the races ($\Phi_{st} = 0.430$, $p < 0.001$), and the difference between variance among races and populations is quite small. Bartlett's heteroscedasticity index could not be calculated because the two populations of race 4 are monomorphic. We calculated the index without those two populations and we obtained 0.36149 with a non-significant probability ($p = 0.19$). This suggests that there is no significant population structure.

Finally, we examined our marker data for race-specific markers. No such marker was found among our collection of populations. Figure 4.3 shows an example of bands that are randomly distributed among different populations of the same race.

4.5.2 Chloroplastic simple sequence repeat analysis

In total, 34 primer pairs previously reported to amplify cpSSRs in various angiosperms were tested on a subset of 10 *S. gesnerioides* populations. Of these, 26 resulted in a successful amplification. None of the 26 cpSSR primer pairs, however, revealed polymorphism in our *S. gesnerioides* populations. All 26 markers proved entirely monomorphic in all 44 populations tested. Figure 4.6 shows an example of the results of the amplification. There is no evidence of genetic variation in the chloroplastic genome of *S. gesnerioides*. The majority of the primer pairs amplified fragments of comparable length to those amplified in *Nicotiana tabacum* (ccmp and NTCP) or *Arabidopsis thaliana* (ARCP) (see table 4.2). One fragment was 60 bp long in *S. gesnerioides*, half the expected size of the 124 bp fragment found in *A. thaliana* (ARCP9).

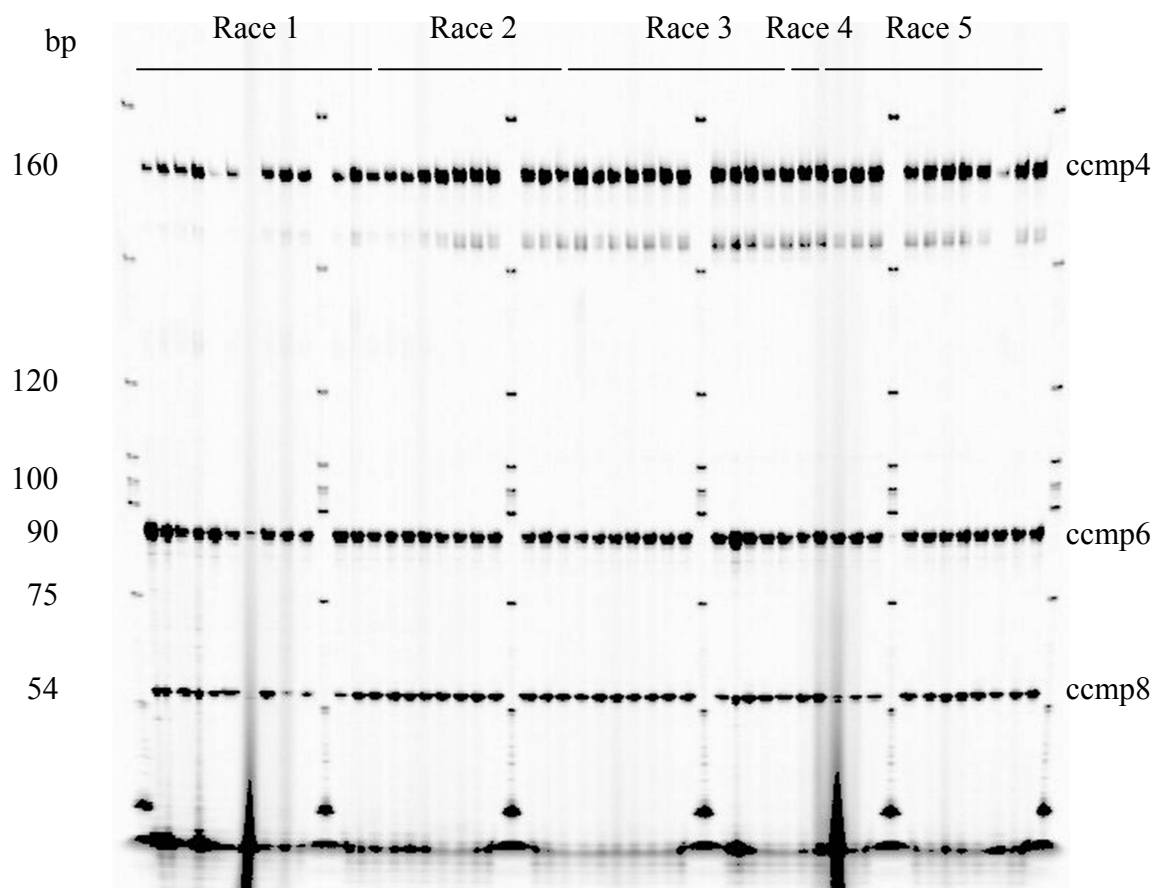


Figure 4.6 : Amplification products obtained for three cpSSR: ccmp4, ccmp6 and ccmp8 on the 44 populations of *S. gesnerioides*. With the exception of four populations, a single individual was tested.

4.5 Discussion

Despite their broad geographic distribution, the present study confirmed the low genetic diversity within and among our *S. gesnerioides* populations and the absence of race-specific markers, as found previously with the AFLP markers (this thesis, chapter 3). Only 11 ISSR primers out of 100 produced clear amplification profiles in our populations, and only 5 primers gave the 11 polymorphic bands we observed (2.2 markers per primer, as compared to 3.4 for the 20 AFLP primer combinations). ISSR primers have been extensively used in Orobanchaceae. An average of 23.4 and 22.2 polymorphic bands per primer was detected for *Hyobanche* spp. and *Orobanche crenata* populations, respectively, by Wolfe and Randle (2001) and Román *et al.* (2002), and Benharrat *et al.* (2005) obtained 4 polymorphic bands with only one primer. ISSR seems therefore to be in our case a less performing technique than AFLP to amplify and detect polymorphisms in *S. gesnerioides* genomic DNA.

The PCoA plot shows that there is no clear separation of the populations in two principal groups as was observed with the AFLP markers (see figure 3.4), but most of the populations from races 1 and 2 are grouped together. The same tendency can be seen on the UPGMA tree, and only a few populations from races 1 and 2 are grouped with the other races. Similarly, the non-significant Bartlett's heteroscedasticity index suggests the absence of population structure. Is this apparent lack of population structure a true reflection of the situation or does it simply come from the limited genetic diversity at hand?

We are inclined to favour the latter hypothesis because the topology of the UPGMA tree changed markedly with every additional ISSR marker. Thus we likely would have obtained a higher resolution with more markers. In the case of the AFLP primers, we began to see separation of the populations in two groups with the data of only 9 primer combinations, and starting from 15 primer combinations onwards there was no further notable change in the grouping of populations in the UPGMA tree. This suggests that the 67 AFLP markers revealed using 20 primer combinations were sufficient to give a reliable pattern of the relationship between the different populations. A similar situation was also

reported by Botanga and Timko (2006), who obtained the same dendrogram topology with 6 AFLP primer combinations and their final 19 primer combinations in *S. gesnerioides*. Furthermore, the heteroscedasticity index was significant in the AFLP analysis of our populations (see table 3.4).

In accordance with Benharrat *et al.* (2002) and Buschmann *et al.* (2005), the use of non-anchored ISSR primers revealed fewer polymorphisms than anchored-primers. Although the number of polymorphisms was very low, the three 3' anchored primers we used (808, 811 and 857) generated 64% of the polymorphic bands we found in our amplification profiles, the same proportion found by Buschmann *et al.* (2005) in *Orobanche ramosa*.

In our study, the chloroplast microsatellites markers were not useful to detect polymorphism in the chloroplast genome of our *S. gesnerioides* populations. The difficulty of detecting intraspecific polymorphism in chloroplast microsatellites using universal primers has been recognized and discussed by other researchers (Weising and Gardner, 1999; Provan *et al.*, 2001), and a possible explanation is the need for conserved primers and polymorphism within a short stretch of DNA. Kaundun and Matsumoto (2002) also mention the conserved nature of the chloroplast genome at the intraspecific level. Fineschi *et al.* (2005) did not find any variation in the chloroplast genome of *Crataegus* spp. even if the 30 populations were extensively collected throughout Europe and even if they considered that they had analyzed a large number of chloroplast markers (six cpSSR markers). They concluded that the low genetic diversity should not be affected by the sample size. It is the same situation here with *S. gesnerioides*, as the seeds were collected all across West Africa and as we used 26 primer pairs. This is another confirmation of the low genetic diversity of our *S. gesnerioides* populations. Similarly, Kaundun and Matsumoto (2002) used 7 cpSSR primers, but only four produced amplicons in tea (*Camilla sinensis*) and only one (ccmp6) revealed polymorphism. They sequenced the fragments and found 76 to 88% homology with the original *N. tabacum* (tobacco) fragments. The differences were mostly indels and substitutions. They explained the failure of the 3 primers by the distant phylogenetic relationship between tea and tobacco. Even if the sequences are conserved, microsatellites are generally located in non-coding regions of

the genome, which are relatively variable DNA regions, so it might be quite difficult to make true universal primers. In *S. gesnerioides*, however, all the ccmp primers from tobacco gave clear amplification profiles.

The fragments amplified in our populations were often of a similar length to those of the reference plants (see table 4.2). A few fragments were longer, and one (ARCP9) was half the length of the expected size in *Arabidopsis*. We could eventually sequence these fragments to study the modifications in the sequences in comparison to the original fragments. Rendell and Ennos (2002) used 6 ccmp in *Calluna vulgaris* (a shrub in the Ericaceae). All primer pairs amplified fragments of comparable length to those amplified in tobacco. Sequence similarity ranged between 76 and 84%, and the variation in all six fragments was due to an interruption by point mutations or indels in the microsatellite, leaving a mononucleotide of seven or fewer bases. The primers were originally designed to amplify repeats of 10 or more bases (Weising and Gardner, 1999), so it would be interesting to see if there is a such a difference in the fragments amplified in *S. gesnerioides*.

In conclusion, the ISSR markers were not useful to detect more polymorphisms than the AFLP markers. We can see that there is a slight tendency of the populations to regroup according to the geographic situation, and perhaps with more markers we could have reached a grouping pattern similar to the one we obtained with the AFLP markers. We could not find any race-specific markers, so the DNA polymorphism found by the ISSR markers is independent of the virulence, as it was the case for the AFLP markers. As Guo *et al.* (2009) pointed out, the degree of diversity that can be detected within any population is highly dependant on the type of molecular marker used. It is quite apparent here for *S. gesnerioides*. The extent of variability detected within and among the populations was highly different for the three types of markers we used (see this thesis, chapter 3, for the AFLP analysis), the most extreme case being the cpSSR markers, where despite the utilization of a high number of primer pairs we could not detect any polymorphism. But all the same we can stress that there is undoubtedly a very low level of genetic diversity within and among the populations we studied. Such a low level of variability and the absence of specific markers for the virulence will have consequences on the evolution of the parasite

and on the development of adequate control methods. This will be discussed among other things in the next chapter.

4.6 Acknowledgements

This work was supported in part by a graduate studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to M.-P. Dubé. We would like to thank Mr. Charlie Riches from the IACR Research Centre who kindly provided the *Striga* seeds.

4.7 References

- Aigbokhan, E.I., D.K. Berner, L.J. Musselman and H.D. Mignouna (2000). Evaluation of variability in *Striga aspera*, *Striga hermonthica* and their hybrids using morphological characters and random amplified polymorphic DNA markers. *Weed Research* 40: 375-386.
- Angioi, S.A., D. Rau, M. Rodriguez, G. Logozzo, F. Desiderio, R. Papa and G. Attene (2009). Nuclear and chloroplastic microsatellite diversity in *Phaseolus vulgaris* L. from Sardinia (Italy). *Molecular Breeding* 23: 413-429.
- Barkman, T.J., J.R. McNeal, S.H. Lim, G. Coat, H.B. Croom, N.D. Young and C.W. dePamphilis (2007). Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology* 7: 248.
- Bartlett, M.S. (1937). Some examples of statistical methods of research on agriculture and applied biology. *Journal of the Royal Statistical Society Suppl.* 4: 137-170.
- Benharrat, H., C. Boulet, C. Theodet and P. Thalouarn (2005). Virulence diversity among branched broomrape (*Orobancha ramosa* L.) populations in France. *Agronomy for sustainable development* 25: 123-128.
- Benharrat, H., C. Veronesi, C. Theodet and P. Thalouarn (2002). *Orobancha* species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR). *Weed Research* 42: 470-475.
- Botanga, C.J. , J.G. Kling, D.K. Berner and M.P. Timko (2002). Genetic variability of *Striga asiatica* (L.) Kuntz based on AFLP analysis and host-parasite interaction. *Euphytica* 128: 375-388.
- Botanga, C.J. and M.P. Timko (2006). Phenetic relationships among different races of *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke from West Africa. *Genome* 49: 1351-1365.
- Bryan, G.J., J. McNicoll, G. Ramsay, R.C. Meyer and W.S. De Jong (1999). Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetic* 99: 859-867.
- Bungard, R.A. (2004). Photosynthetic evolution in parasitic plants: insight from the chloroplast genome. *Bioessays* 26(3): 235-247.
- Buschmann, H., G. Gonsior and J. Sauerborn (2005). Pathogenicity of branched broomrape (*Orobancha ramosa*) populations on tobacco cultivars. *Plant Pathology* 54: 650-656.

Cheng, Y.J., H.J. Meng, W.W. Guo and X.X. Deng (2006). Universal chloroplast primer pairs for Simple Sequence Repeat analysis in diverse genera of fruit crops. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81(1): 132-138.

Chung, S.-M. and J.E. Staub (2003). The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theoretical and Applied Genetic* 107: 757-767.

Diversity, Arrays Technology Pty Ltd (2007). Plant DNA Extraction Protocol for DArT. *In* Internet site of Diversity Arrays Technology Pty Ltd. [Online] http://www.diversityarrays.com/pub/DArT_DNA_isolation.pdf (Accessed on December 5th 2008).

Excoffier, L., P.E. Smouse and J.M. Quattro (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Fineschi, S., D. Salvini, D. Turchini, R. Pastorelli and G.G. Vendramin (2005). *Crataegus monogyna* Jacq. and *C. laevigata* (Poir.) DC. (Rosaceae, Maloideae) display low level of genetic diversity assessed by chloroplast markers. *Plant Systematics and Evolution* 250: 187-196.

Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley (1995). Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 13(3): 207-209.

Gethi, J.G., M.E. Smith, S.E. Mitchell and S. Kresocich (2005). Genetic structure of *Striga hermonthica* and *Striga asiatica* populations of Kenya. *Weed Research* 45: 64-73.

Guo, J., T. van der Lee, D.Y. Qu, Y.Q. Yao, X.F. Gong, D.L. Liang, K.Y. Xie, X.W. Wang and F. Govers (2009). *Phytophthora infestans* isolates from Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity. *Plant Biology* 11: 57-67.

Hammer, O., D.A.T. Harper and P.D. Ryan (2008). PAST - PALaeontological STatistics, v. 1.81. Paleontological Museum, University of Oslo, Oslo.

Huff, D.R., R. Peakall and P.E. Smouse (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalo grass [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 927-934.

Imazio, S., M. Labra, F. Grassi, A. Scienza and O. Failla (2006). Chloroplast microsatellites to investigate the origin of grapevine. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1003-1011.

Jaccard, P. (1901). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37: 547-579.

- Kamara, A.Y., D. Chikoye, F. Ekemele, L.O. Omoigui and I.Y. Dugje (2008). Field performance of improved cowpea varieties under conditions of natural infestation by the parasitic weed *Striga gesnerioides*. *International Journal of Pest Management* 54(3): 189-195.
- Kaundun, S.S. and S. Matsumoto (2002). Heterologous nuclear and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea, *Camellia sinensis*. *Genome* 45: 1041-1048.
- Koyama, M.L. (2000). Molecular markers for the study of pathogen variability : implications for breeding resistance to *Striga hermonthica*. In B.I.G. Haussmann, D.E. Hess, M.L. Koyama, L. Grivet, H.F.W. Rattunde and H.H. Geiger (Eds). *Breeding for Striga resistance in cereals*, pp. 227–245. Margraf Verlag, Weikersheim, Germany.
- Lane, J.A., T.H.M. Moore, D.V. Child and J.A. Bailey (1997). Variation in virulence of *Striga gesnerioides* on cowpea: new sources of crop resistance. In B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell and L.E.N. Jackai (Eds). *Advances in cowpea research*, pp. 225-230. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.
- Lane, J.A., T.H.M. Moore, D.V. Child and K.F. Cardwell (1996). Characterization of virulence and geographic distribution of *Striga gesnerioides* in cowpea in West Africa. *Plant Disease* 80(3): 299-301.
- Lane, J.A., T.H.M. Moore, D.V. Child, K.F. Cardwell, B.B. Singh and J.A. Bailey (1994). Virulence characteristics of a new race of the parasitic angiosperm, *Striga gesnerioides*, from southern Benin on cowpea (*Vigna unguiculata*). *Euphytica* 72: 183-188.
- Mengoni, A., C. Barabesi, C. Gonnelli, F. Galardi, R. Gabrielli and M. Bazzicalupo (2001). Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 10: 1909-1916.
- Mengoni, A., C. Gonnelli, E. Brocchini, F. Galardi, S. Pucci, R. Gabrielli and M. Bazzicalupo (2003). Chloroplast genetic diversity and biogeography in the serpentine endemic Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist* 157: 349-356.
- Mohamed, K.I., J.F. Bolin, L.J. Musselman and A. Townsend Peterson (2007). Genetic diversity of *Striga* and implications for control and modeling future distributions. In G. Ejeta and J. Gressel (Eds). *Integrating new technology for Striga control : towards ending the witch-hunt*, pp. 71-84. World Scientific Publishing Co. Pte Ltd, Singapore.
- Nadler, S.A. (1995). Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *Journal of Parasitology* 81: 395-403.
- Nei, M. and W.H. Li (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5269-5273.

Olmstead, R.G., C.W. dePamphilis, A.D. Wolfe, N.D. Young, W.J. Elisons and P.A. Reeves (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 88(2): 348-361.

Parker, C. and T.I. Polniaszek (1990). Parasitism of cowpea by *Striga gesnerioides* : variation in virulence and discovery of a new source of host resistance. *Annals of Applied Biology* 116: 305-311.

Powell, W., M. Morgante, C. Andre, J.W. McNicol, G.C. Machray, J.J. Doyle, S.V. Tingey and J.A. Rafalski (1995a). Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology* 5: 1023-1029.

Powell, W., M. Morgante, R. McDevitt, G.G. Vendramin and A. Rafalski (1995b). Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy Of Science of the U.S.A.* 92: 7759-7763.

Provan, J., W. Powell and P.M. Hollingsworth (2001). Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 16(3): 142-147.

Rendell, S. and R.A. Ennos (2002). Chloroplast DNA diversity in *Calluna vulgaris* (heather) populations in Europe. *Molecular Ecology* 11: 69-78.

Rispail, N., M.-A. Dita, C. González-Verdejo, A. Pérez-de-Luque, M.-A. Castillejo, E. Prats, B. Román, J.V. Jorrín and D. Rubiales (2007). Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. *New Phytologist* 173: 703-712.

Román, B., Z. Satovic, C. Alfaro, M.T. Moreno, M. Kharrat, A. Pérez-de-Luque and D. Rubiales (2007). Host differentiation in *Orobancha foetida* Poir. *Flora* 202: 201-208.

Román, B., Z. Satovic, D. Rubiales, A.M. Torres, J.I. Cubero, Katzir, N. and D.M. Joel (2002). Variation among and within populations of the parasitic weed *Orobancha crenata* from Spain and Israel revealed by inter simple sequence repeat markers. *Phytopathology* 92(12): 1262-1266.

Singh, B.B. and A.M. Emechebe (1990). Inheritance of *Striga* resistance in cowpea genotype B301. *Crop Science* 30: 879-881.

Singh, B.B., O.O. Olufajo, M.F. Ishiyaku, R.A. Adeleke, H.A. Ajeigbe and S.G. Mohammed (2006). Registration of Six Improved Germplasm Lines of Cowpea with Combined Resistance to *Striga gesnerioides* and *Alectra vogelii*. *Crop Science* 46(5): 2332-2333.

Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal (1973). *Numerical Taxonomy : the principle and practice of numerical classification*. W.H. Freeman, San Francisco, 573 p.

Soltis, D.E. and P.S. Soltis (1998). Choosing and approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. *In* D.E. Soltis, P.S. Soltis and J.J. Doyle (Eds). Molecular systematics of plants II: DNA sequencing, pp. 1-42. Kluwer Academic Publishers, Boston.

Soltis, D.E., P.S. Soltis and B.G. Milligan (1992). Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. *In* P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle (Eds). Molecular systematics of plants, pp. 117-150. Chapman and Hall, London.

Stewart, C.N. and L. Excoffier (1996). Assessing population structure and variability with RAPD data : application to *Vaccinium macrocarpon* (American cranberry). *Journal of Evolutionary Biology* 9: 153-171.

Swofford, D.L. (1999). PAUP : Phylogenetic Analysis Using Parsimony, v. 4.0b10. Sinauer Associated, Sunderland, MA.

Thorogood, C.J., F. J. Rumsey, S.A. Harris and S.J. Hiscock (2008). Host-driven divergence in the parasitic plant *Orobanche minor* Sm. (Orobanchaceae). *Molecular Ecology* 17: 4289-4303.

Weising, K. and R.C. Gardner (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledoneous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.

Wills, D.M. and J.M. Burke (2006). Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Heredity* 97(4): 403-408.

Wolfe, A.D. and C.P. Randle (2001). Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Systematic Botany* 26(1): 120-130.

Xu, D.H., J. Abe, J.Y. Gai and Y. Shimamoto (2002). Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 645-653.

Chapitre V :
Discussion générale et conclusions

Le *Striga gesnerioides*, comme nous l'avons souligné dans le chapitre 1, est une plante parasite épiphyte qui cause des pertes de récolte importantes dans les champs de niébé en Afrique de l'Ouest. On sait, grâce aux travaux de sélection qui ont été effectués avec différents cultivars de niébé résistants, qu'il existe au moins cinq races (biotypes) de *S. gesnerioides* en Afrique subsaharienne. Cependant, même si Lane *et al.* (1996b) ont dressé un portrait de leur répartition géographique, on connaît très peu la composante génétique de ces races. L'étude de la variabilité génétique et de la structure des populations de plantes parasites qui menacent les récoltes est primordiale si on désire développer des méthodes de lutte adéquates. C'est d'autant plus important lorsque ces méthodes de lutte se basent sur la résistance génétique de la plante hôte, comme c'est le cas chez le niébé. La connaissance de la variabilité et de la structure des populations permet de comprendre leur potentiel d'évolution et l'intensité du flux génique entre elles (Román *et al.*, 2007). Lorsque nous avons débuté notre travail, il n'existait aucune étude sur la variabilité génétique du *S. gesnerioides* parasitant le niébé. Par la suite, une étude de la variabilité de certaines populations de *S. gesnerioides* fut effectuée par Botanga et Timko (2006), qui permit de mettre en lumière le peu de diversité qui existe au sein des populations étudiées. Ils mirent aussi en évidence l'existence d'une sixième race, ce qui démontre que la connaissance actuelle de la répartition et de l'existence des différentes races est certainement très partielle.

À la lumière des connaissances rapportées au chapitre 1, le présent projet de recherche avait deux volets principaux. Dans un premier temps, nous avons tenté d'en connaître plus sur la diversité génétique des races du *S. gesnerioides* telles que recensées par Lane *et al.* en 1996. Nous avons en premier lieu utilisé des marqueurs AFLP, qui permettent en général de révéler un grand nombre de polymorphismes. Dans un deuxième temps, pour tenter de trouver des polymorphismes supplémentaires, nous avons utilisé des marqueurs ISSR, et compte tenu de la singularité du génome chloroplastique du *S. gesnerioides*, il nous a également semblé intéressant de vérifier s'il recelait une certaine variabilité génétique à l'aide de marqueurs cpSSR. Ces deux volets ont été séparés chacun en trois objectifs, soit de mesurer la diversité génétique du génome nucléaire ou du génome chloroplastique du *S. gesnerioides* : a) au sein des populations; b) entre les populations; et c) entre les races.

Dans le chapitre II, nous détaillons le travail préliminaire qui a été fait sur les populations. Il était important de vérifier que les graines étaient correctement identifiées et toujours viables et que les populations appartenaient bel et bien à la bonne race physiologique. Les analyses effectuées nous ont démontré que les lots de graines étaient tous viables, à part un échantillon, et qu'ils étaient bien identifiés quant à la race. Nous voulions au départ effectuer des croisements afin de développer des populations pour éventuellement initier la cartographie des gènes de virulence du *S. gesnerioides*. La difficulté d'effectuer des croisements (pollen difficile à récolter, avortements très fréquents) ainsi que l'absence de marqueurs nous permettant de discriminer les différentes populations en ségrégation, malgré l'ajout ultérieur des marqueurs ISSR et cpSSR, nous ont forcé à abandonner ce projet, puisqu'il aurait été ardu de développer des populations de cartographie contrastées.

Les résultats présentés au chapitre III ont démontré qu'il existe extrêmement peu de diversité génétique au sein des populations du *S. gesnerioides* recensées par Lane *et al.* en 1996 et que cette variabilité est très faible entre les populations. Moins de 6 % des 1200 bandes obtenues par les 20 combinaisons d'amorces AFLP étaient polymorphes dans l'étude de la variabilité entre les populations, ce qui, comme nous l'avons souligné dans la discussion du chapitre III, est assez exceptionnel chez les végétaux. De plus, contrairement à Botanga et Timko (2006), nous n'avons pas obtenu de marqueurs AFLP liés aux différentes races. L'analyse des données a plutôt démontré une tendance des populations à se regrouper selon la situation géographique : la majorité des populations des races 1 et 2 que l'on retrouve plus à l'ouest (Mali et Burkina Faso) sont donc regroupées, et la majorité des populations des races 3 et 5 retrouvées plus à l'est (Bénin, Niger, Nigeria et Cameroun) sont aussi regroupées entre elles. Quelques populations, dont les deux populations de la race 4, sont situées dans un groupe intermédiaire associé au groupe des populations des races 3 et 5, mais la partition en deux groupes principaux est quand même assez clairement appuyée par les différentes analyses effectuées.

L'absence de marqueurs de race au sein de nos différentes populations nous a d'abord surpris, puisque Botanga et Timko en 2006 ont trouvé de tels marqueurs chez le *S. gesnerioides*. Mais dans la littérature, cette absence de concordance entre la diversité

génétique décelée par les différents types de marqueurs et la virulence d'un agent pathogène est passablement documentée. Chez le *Striga asiatica* et le *Striga hermonthica*, Gethi *et al.* (2005) n'ont pas pu trouver de structure basée sur la virulence dans les différentes populations, et les auteurs supposent qu'il est possible que la pathogénicité et la virulence n'aient pas été décelées par les marqueurs AFLP utilisés. Valério *et al.* (2005) ont étudié la diversité de *Colletotrichum graminicola*, un champignon pathogène qui cause l'antracnose du sorgho, à l'aide de marqueurs RAPD et RFLP. Ils ont noté une tendance au regroupement géographique mais aucune corrélation entre les phylogénies obtenues et le patron obtenu lors des tests de virulence des différentes populations de l'agent pathogène. Ils en concluent que les marqueurs utilisés sont apparemment neutres en ce qui concerne la virulence, et que celle-ci pourrait être influencée par l'hôte. Le même phénomène a été observé avec des marqueurs RAPD chez le *C. lindemuthianum*, agent responsable de l'antracnose de la fève, par Sharma *et al.* (2007), mais on ne mentionne aucune hypothèse pour expliquer cette absence d'adéquation entre la diversité génétique observée et la virulence de l'agent pathogène. Plus récemment, des marqueurs AFLP ont été utilisés par Malvick *et al.* (2009) pour étudier la diversité génétique de deux races du champignon *Aphanomyces euteiches*, causant la pourriture des racines chez la luzerne. Ils n'ont pas observé de relation entre le phénotype des races et les génotypes obtenus avec les marqueurs AFLP. Selon ces auteurs, si le phénotype de la race est déterminé par un seul locus, une corrélation entre le génotype et le phénotype serait observée seulement si le locus AFLP et le locus de race étaient liés et si ces deux locus étaient fixés. Ils mentionnent également que les résultats obtenus peuvent indiquer que les différences entre les races impliquent une petite partie du génome qui n'a pas été échantillonnée avec la méthode AFLP utilisée dans l'étude. Inversement, la race pourrait être déterminée par plusieurs locus dispersés dans le génome, ou alors la race pourrait potentiellement être déterminée par des différences dans l'expression de certains gènes qui proviendraient d'une base génétique commune à tous les isolats étudiés.

Nous avons aussi mentionné dans la discussion du chapitre III que les résultats discordants entre notre travail et celui de Botanga et Timko (2006) pouvaient n'être en conflit que de façon apparente. Le fait que nous ayons étudié plus de populations que Botanga et Timko (entre 42 et 44, selon le type d'analyse contre 24 pour ces derniers) peut

avoir joué un rôle puisque la probabilité qu'on retrouve une association stricte d'un marqueur avec l'ensemble des populations d'une race diminue avec l'augmentation du nombre de populations étudiées. Ces populations n'ont pas non plus été échantillonnées dans les mêmes localités ni à la même époque, les populations de Botanga et Timko ayant été récoltées plus récemment.

Les résultats présentés au chapitre IV, quant à eux, n'ont fait que souligner le peu de diversité génétique qui existe chez les populations de *S. gesnerioides* que nous avons étudiées. Les 11 amorces ISSR n'ont généré que 11 marqueurs supplémentaires, aucun d'eux n'étant un marqueur de race. Quant aux 26 marqueurs microsattellites chloroplastiques, ils n'ont révélé aucun polymorphisme, ce qui pourrait indiquer que certaines portions du génome chloroplastique sont très conservées d'une population à l'autre. Dans une étude de la virulence et de la diversité génétique de plusieurs populations de *Phytophthora infestans*, l'oomycète responsable de la brûlure tardive de la pomme de terre, Guo *et al.* (2009) ont mis en évidence un spectre de virulence très varié, mais une diversité génétique des populations de Chine extrêmement faible. Plusieurs marqueurs microsattellites ainsi qu'un marqueur mitochondrial n'ont révélé aucun polymorphisme, et bien que des marqueurs AFLP aient été plus efficaces, la faible diversité qu'ils ont détectée n'était pas reliée aux différentes races. Selon les auteurs, les nouvelles races apparaissent lorsque les gènes d'avirulence (*Avr*) du parasite subissent des mutations, et que les protéines Avr pour lesquelles ils codent ne sont ainsi plus reconnues par les protéines R de l'hôte. Selon Montarry *et al.* (2006), la virulence évolue entre autres grâce aux mutations, sans altérer de façon notable l'empreinte génétique des marqueurs moléculaires, et ces marqueurs sont souvent neutres. Botanga (2005) fait d'ailleurs remarquer que la virulence chez le *S. gesnerioides* pourrait être le résultat de changements très subtils dans la fréquence des allèles et impliquerait beaucoup plus que ce qui est détecté par les analyses AFLP.

L'ensemble de ces résultats dresse un portrait assez étonnant de la diversité génétique du *S. gesnerioides*, étant donné la vaste répartition géographique des populations que nous avons étudiées. Cette faible diversité peut être expliquée en partie par le mode de reproduction autogame du parasite. Dans une population de plantes autogames, les

individus sont en général très homogènes, les allèles étant rapidement fixés, tandis que la variabilité se retrouve entre les populations. Les résultats des analyses de variance vont effectivement dans ce sens, la majorité de la variance se retrouvant entre les populations. Mais le faible nombre de marqueurs polymorphes que nous avons pu révéler grâce aux différentes analyses ne peut être entièrement expliqué par l'autogamie du parasite. Nous avons donc émis l'hypothèse que le *S. gesnerioides* parasitant le niébé est d'origine assez récente, et proviendrait probablement d'une population de *S. gesnerioides* parasitant un hôte sauvage. Botanga (2005) a déjà observé la remarquable capacité du *S. gesnerioides* à s'adapter à divers hôtes. Il a observé que sur 38 graines provenant de plants ayant parasité l'indigotier, deux parvenaient à germer sur le niébé, et les plants parvenaient à compléter leur cycle vital. Cela peut sembler faible, mais comme le pollen du *S. gesnerioides* forme un bouchon plutôt que d'être poudreux, la pollinisation croisée par dispersion est impossible, et n'importe quelle variation génétique mineure deviendrait rapidement fixée. Les graines issues de ces plants pourraient donc par la suite coloniser des champs complets assez rapidement, et la progéniture serait probablement très homogène génétiquement. Olivier *et al.* (1998) mentionnent par ailleurs que lorsqu'un champ de sorgho parasité par le *S. hermonthica* est remplacé par un champ de millet, la nouvelle culture est libre de parasite durant la première saison, mais peut devenir rapidement très infestée après quelques années de culture. Cette spécialisation à un nouvel hôte pourrait résulter d'un caractère fixé d'origine ancienne ou alors d'une adaptation récente due à la forte pression de sélection. Si l'hôte est assez abondant, les bénéfices reliés à la spécialisation surpassent les désavantages qu'il y a à moins interagir avec un autre hôte potentiel. Le cas du *S. hermonthica* est un peu différent puisqu'il s'agit d'une plante allogame possédant généralement une grande diversité génétique au sein des populations, et il est probable qu'elle puisse ainsi s'adapter rapidement à un nouvel hôte. Néanmoins, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, les *Striga* spp. produisent une grande quantité de graines minuscules, soit plusieurs milliers par plant, et des événements génétiques rares sont probablement plus susceptibles de se produire que dans d'autres espèces. L'existence dans une population d'un petit nombre de gènes présents à basse fréquence peut être suffisante pour permettre une adaptation à un nouvel hôte à l'intérieur de quelques générations, surtout si on est en présence d'une monoculture répétée.

Un autre cas probable de spécialisation à un hôte cultivé a déjà été rencontré chez une autre plante parasite autogame, l'*Orobanche cumana* (rapporté dans Román *et al.*, 2007). Cette plante parasitait exclusivement l'*Artemisia* spp., une plante sauvage, mais avec l'introduction au début du 20^e siècle de la culture du tournesol en Europe, elle est rapidement devenue un parasite de cette culture. On en fait mention pour la première fois en Bulgarie en 1935, et par la suite en 1958 dans la péninsule ibérique. L'*O. cumana* est maintenant répandue partout où on cultive du tournesol, du bassin méditerranéen jusqu'en Russie, et comporte plusieurs races différentes. Comme on n'a jamais entrepris de comparer la diversité génétique des souches parasitant l'*Artemisia* et celle des souches parasitant le tournesol, on ne peut toutefois déterminer si c'est une spécialisation à un hôte plus abondant, ou simplement une nouvelle introduction. D'autre part, une autre Orobanchaceae, l'*O. foetida*, est présente depuis longtemps en Afrique du Nord sur divers hôtes sauvages, et dans les mêmes régions où on cultive depuis des siècles le pois chiche, la fève et d'autres légumineuses. Or, elle a pour la première fois été observée récemment sur des légumineuses cultivées (Rubiales *et al.*, 2005). Des études entreprises par la suite par Román *et al.* (2007) à l'aide de marqueurs RAPD et par Vaz Patto *et al.* (2008) à l'aide de marqueurs AFLP ont permis de démontrer que les populations retrouvées sur différents hôtes cultivés sont déjà génétiquement différenciées, et pourraient être dérivées de populations parasitant un hôte sauvage. Chez l'*O. foetida*, la diversité génétique est élevée, ce qui peut permettre une adaptation rapide; la forte pression de sélection pourrait compromettre dans un court laps de temps la résistance des cultivars. Éventuellement, ce processus de spécialisation à un autre hôte peut mener à la spéciation (Norton et Carpenter, 1998).

Comme nous l'avons constaté dans les résultats des chapitres III et IV, la structure des populations de *S. gesnerioides* n'est pas basée sur les races. Selon Montarry *et al.* (2006), la sélection par l'hôte jouerait probablement le rôle plus important parmi les forces évolutives qui façonnent la structure des populations d'agents pathogènes, et c'est aussi la force qui peut le plus aisément être manipulée par l'homme, via le développement et le déploiement des cultivars. La découverte de la race 4 du parasite au Bénin, suite à l'introduction du cultivar B301 résistant aux autres races présentes dans ce pays, illustre cette force, même si on ne sait pas si cette race était déjà présente ou si son origine est due à la pression de

sélection sur une race précédemment avirulente (Lane *et al.*, 1994). La description de nouvelles races et le contournement de la résistance de l'hôte sont très fréquents chez les *Orobancha* spp. qui attaquent les espèces cultivées (Tang *et al.*, 2003; Eizenberg *et al.*, 2004; Molinero-Ruiz *et al.*, 2008).

L'étude de la génétique de la virulence sera une des prochaines étapes dans l'approfondissement des connaissances sur le parasite. Il serait utile de cartographier les gènes de virulence, comme nous avons tenté de le faire. Mais comment peut-on créer des populations de cartographie en présence d'une si faible diversité et de l'absence de marqueurs utiles? Nous avons vu qu'il était impossible de le faire avec les marqueurs que nous avons trouvés. On pourrait faire appel à différents autres marqueurs afin d'essayer de trouver plus de polymorphismes. Mhiri et Grandbastien (2004) mentionnent que les marqueurs basés sur les polymorphismes d'insertion d'éléments transposables peuvent être utiles pour les espèces possédant une faible diversité génétique et pour lesquelles les marqueurs moléculaires conventionnels révèlent peu de polymorphismes. Il existe divers autres types de marqueurs qui peuvent détecter des polymorphismes dans des secteurs plus ciblés du génome, comme par exemple les SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*) qui visent l'amplification des cadres de lecture ouverts (Li et Quiros, 2001). Timko (2006) a par ailleurs entrepris l'étude de la virulence de certaines populations à l'aide des marqueurs de race obtenus lors des précédents travaux, et il a généré certaines populations hybrides de *S. gesnerioides* parasitant le niébé et l'indigotier. Il étudie aussi l'expression différentielle des gènes chez le parasite et l'hôte dans les relations compatibles ou incompatibles par la technique DDRT-PCR (*Differential-Display Reverse Transcription-PCR*). Tous ces travaux sont en cours. Par ailleurs, on ne connaît pas grand chose du génome du *S. gesnerioides*, par exemple sa taille, mais on sait que le parasite possède 20 chromosomes (Musselman *et al.*, 1991).

Quoiqu'il en soit, nos résultats ainsi que ceux obtenus par Botanga et Timko en 2006 démontrent qu'il est nécessaire d'entreprendre des études supplémentaires afin d'avoir un meilleur portrait de la variabilité génétique du parasite et de comprendre la composante génétique qui détermine la virulence observée chez le *S. gesnerioides*. On pourrait échantillonner des populations partout où se trouve le *S. gesnerioides* en Afrique (voir

Mohamed *et al.*, 2001), dans les champs cultivés et les habitats naturels, sur toute la gamme d'hôtes que possède le parasite, et effectuer des analyses génétiques en employant divers types de marqueurs pour élucider la structure génétique et l'évolution des différentes populations de *S. gesnerioides*. On pourrait ainsi déterminer si la souche de *S. gesnerioides* qui parasite le niébé a subi un processus de spécialisation vis-à-vis d'un hôte cultivé, et si c'est le cas, de quelle population sauvage cette nouvelle souche pourrait être issue.

Ces études seront d'une grande importance pour le développement des programmes de lutte employant la résistance génétique des cultivars de niébé, et aideront à la compréhension des risques de développement de nouvelles races. La découverte de nouvelles races souligne aussi l'importance d'étudier la variabilité du niébé, des variétés traditionnelles aux cultivars améliorés, ce qui a été entrepris par diverses équipes (Ouédraogo *et al.*, 2002a; Ba *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2007; Ogunkanmi *et al.*, 2008). On augmente ainsi les chances de trouver des allèles avantageux et d'éventuellement bâtir une résistance multigénique plus durable. Pour éviter la détection de nouvelles races, il importe aussi d'alterner l'utilisation d'au moins deux cultivars résistants différents, possédant des gènes de résistance distincts, afin de parvenir à maintenir le plus longtemps possible une répression adéquate (Botanga, 2005).

La lutte contre le *Striga* risque d'en être une de longue haleine, puisque selon Mohamed *et al.* (2006), le *S. gesnerioides* possède un grand potentiel d'invasion, et les changements climatiques pourraient accélérer sa dispersion. Il faut enfin toujours se rappeler que le bénéficiaire ultime de toute cette recherche doit être le paysan.

Références bibliographiques

(Chapitres I, II et V)

Adjei-Nsiah, S., T.W. Kuyper, C. Leeuwis, M.K. Abekoe, J. Cobbinah, O. Sakyi-Dawson et K.E. Giller (2007). Farmers' agronomic and social evaluation of productivity, yield and N₂-fixation in different cowpea varieties and their subsequent residual N effects on a succeeding maize crop. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 80(3): 199-209.

Aflakpui, G.K.S., G.E.K. Bolfrey-Arku, V.M. Anchirinah, J.A. Manu-Aduening et K.O. Adu-Tutu (2008). Incidence and severity of *Striga* spp. in the coastal savanna zone of Ghana: Results and implications of a formal survey. *Outlook on Agriculture* 37(3): 219-224.

Aggarwal, V.D. (1985). Cowpea *Striga* research. In S.R. Singh et K.O. Rachie (Éds). *Cowpea research, production and utilization*, p. 335-340. John Wiley and Sons, New York.

Aggarwal, V.D., S.D. Haley et F.E. Brockman (1986). Present status of breeding cowpea for resistance to *Striga* at IITA. In S.J. ter Borg (Éd.). *Proceedings of a workshop on biology and control of Orobanche*, p. 176-180. LH/VPO, Wageningen, The Netherlands.

Aggarwal, V.D. et J.T. Ouédraogo (1989). Estimation of cowpea yield loss from *Striga* infestation. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 66(1): 91-92.

Aigbokhan, E.I., D.K. Berner et L.J. Musselman (1998). Reproductive ability of hybrids of *Striga aspera* and *Striga hermonthica*. *Phytopathology* 88(6): 563-567.

Aigbokhan, E.I., D.K. Berner, L.J. Musselman et H.D. Mignouna (2000). Evaluation of variability in *Striga aspera*, *Striga hermonthica* and their hybrids using morphological characters and random amplified polymorphic DNA markers. *Weed Research* 40: 375-386.

Ajeigbe, H.A., B.B. Singh et A.M. Emechebe (2008). Field evaluation of improved cowpea lines for resistance to bacterial blight, virus and striga under natural infestation in the West African Savannas. *African Journal of Biotechnology* 7(20): 3563-3568.

Akiyama, K. et H. Hayashi (2008). Plastid-derived strigolactones show the way to roots for symbionts and parasites. *New Phytologist* 178: 695-698.

Alonge, S.O., S.T.O. Lagoke et C.O. Ajakaiye (2005a). Cowpea reactions to *Striga gesnerioides* I. Effect on growth. *Crop Protection* 24: 565-573.

Alonge, S.O., S.T.O. Lagoke et C.O. Ajakaiye (2005b). Cowpea reactions to *Striga gesnerioides* II. Effect on grain yield and nutrient composition. *Crop Protection* 24: 575-580.

Aly, R. (2007). Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 43: 304-317.

Atokple, I.D.K., B.B. Singh et A.M. Emechebe (1993). Independent inheritance of *Striga* and *Alectra* resistance in cowpea genotype B301. *Crop Science* 33: 714-715.

Atokple, I.D.K., B.B. Singh et A.M. Emechebe (1995). Genetics of resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. *Journal of Heredity* 86: 45-49.

Ba, A.T. (1977). Étude d'une phanérogame parasite africaine, *Striga gesnerioides*. *Phytomorphology* 27: 359-368.

Ba, A.T. (1983). Du phloème dans l'haustorium de *Striga gesnerioides*, une scrophulariacée parasite. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences série III* 296: 375-380.

Ba, A.T. (1984). Morphology, anatomy and ultrastructure of some parasitic species of the genus *Striga*. In E.S. Ayensu, H. Doggett, H.D. Keynes, J. Marton-Lefevre, L.J. Musselman, C. Parker et A. Pickering (Éds). *Striga, Biology and Control. Workshop on the Biology and Control of Striga*, p. 47-61. ICSU Press, Dakar, Sénégal.

Ba, F.S., R.S. Pasquet et P. Gepts (2004). Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 539-550.

Babiker, A.G.T., A.M. Mohamed et C. Parker (1991). Stimulation of *Striga* seed germination and haustorium initiation by thidiazuron. In J.K. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 5th International Symposium of Parasitic Weeds*, p. 190-194. CIMMYT, Nairobi, Kenya.

Baret, P. (2008). Cours de génétique. In Site Internet de l'Université catholique de Louvain. [En ligne] <http://www.icampus.ucl.ac.be/claroline/backends/download.php?url=L1BfQmVydGluL21hcnF1ZXVyc19wYXJ0aWVfMy5wZGY=&cidReset=true&cidReq=GENA2110> (Consulté le 4 janvier 2009).

Bebawi, F.F. (1981). Intraspecific physiological variants of *Striga hermonthica*. *Experimental Agriculture* 17: 419-423.

Bebawi, F.F., R.E. Eplee, C.E. Harris et R.S. Norris (1984). Longevity of witchweed (*Striga asiatica*) seed. *Weed Science* 32: 494-497.

Benharrat, H., C. Boulet, C. Theodet et P. Thalouarn (2005). Virulence diversity among branched broomrape (*Orobancha ramosa* L.) populations in France. *Agronomy for sustainable development* 25: 123-128.

Benharrat, H., P. Delavault et P. Thalouarn (2000). Les génomes des angiospermes parasites: aspects fondamentaux et appliqués. *Comptes rendus de l'Académie d'agriculture de France* 86(8): 97-110.

Benharrat, H., C. Veronesi, C. Theodet et P. Thalouarn (2002). *Orobancha* species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR). *Weed Research* 42: 470-475.

Berner, D.K., K.F. Cardwell, B.O. Faturoti, F.O. Ikie et O.A. Williams (1994). Relative roles of wind, crop seeds, and cattle in dispersal of *Striga* spp. *Plant Disease* 78(4): 402-406.

Berner, D.K., J.G. Kling et B.B. Singh (1995). *Striga* research and control: a perspective from Africa. *Plant Disease* 79(7): 652-660.

Berner, D.K. et O.A. Williams (1998). Germination stimulation of *Striga gesnerioides* seeds by hosts and nonhosts. *Plant Disease* 82(11): 1242-1247.

Bharathalakshmi et Jayachandra (1979). Physiological variations in *Striga asiatica*. In L.J. Musselman, A.D. Worsham et R.E. Epplee (Éds). Proceedings of the second international symposium on parasitic weeds, p. 132-143. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.

Bharathalakshmi et Jayachandra (1982). Physiological basis of host-preference in *Striga asiatica* (L.) Kuntze. In Proceedings of the ICRISAT-ICAR group meeting on *Striga* control, p. 160-182. ICRISAT, Patancheru.

Bharathalakshmi et Jayachandra (1984). Studies on the germination of some Indian collections of *Striga asiatica* (L.) Kuntze. In C. Parker, L.J. Musselman, R.H. Polhill et A.K. Wilson (Éds). Proceedings of the third international symposium on parasitic weeds, p. 108-117. International Center for Agricultural Research in Dry Areas, Aleppo, Syria.

Bharathalakshmi, C.R. Werth et L.J. Musselman (1990). A study of genetic diversity among host-specific populations of the witchweed *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae) in Africa. *Plant Systematics and Evolution* 172: 1-12.

Blade, S.F., S.V.R. Shetty, T. Terao et B.B. Singh (1997). Recent developments in cowpea cropping systems research. In B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell et L.E.N. Jackai (Éds). Advances in cowpea research, p. 114-128. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.

Botanga, C.J. (2005). Genetic and molecular analyses of factors defining host-specificity and virulence in *Striga* species (Scrophulariaceae). Thèse de doctorat, University of Virginia, Charlottesville, VA. 215 p.

Botanga, C.J. , J.G. Kling, D.K. Berner et M.P. Timko (2002). Genetic variability of *Striga asiatica* (L.) Kuntz based on AFLP analysis and host-parasite interaction. *Euphytica* 128: 375-388.

Botanga, C.J. et M.P. Timko (2005). Genetic Structure and Analysis of Host and Nonhost Interactions of *Striga gesnerioides* (Witchweed) from Central Florida. *Phytopathology* 95(10): 1166-1173.

- Botanga, C.J. et M.P. Timko (2006). Phenetic relationships among different races of *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke from West Africa. *Genome* 49: 1351-1365.
- Boukar, O., L. Kong, B. B. Singh, L. Murdock et H. W. Ohm (2004). AFLP and AFLP-Derived SCAR Markers Associated with *Striga gesnerioides* Resistance in Cowpea. *Crop Science* 44: 1259-1264.
- Bouwmeester, H.J., R. Matusova, S. Zhongkui et M.H. Beale (2003). Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 358-364.
- Brault, M., F. Betsou, B. Jeune, C. Tuquet et G. Sallé (2007). Variability of *Orobancha ramosa* populations in France as revealed by cross infestations and molecular markers. *Environmental and Experimental Botany* 61(3): 272-280.
- Bungard, R.A. (2004). Photosynthetic evolution in parasitic plants: insight from the chloroplast genome. *Bioessays* 26(3): 235-247.
- Cameron, D.D., J.M. Geniez, W.E. Seel et L.J. Irving (2008). Suppression of host photosynthesis by the parasitic plant *Rhinanthus minor*. *Annals of Botany* 101(4): 573-578.
- Carsky, R.J., C. Akakpo, B.B. Singh et J. Detongnon (2003). Cowpea yield gain from resistance to *Striga gesnerioides* parasitism in Southern Bénin. *Experimental Agriculture* 39: 327-333.
- Carsky, R.J., B. Vanlauwe et O. Lyasse (2002). Cowpea rotation as a resource management technology for cereal-based systems in the savannas of West Africa. In C.A. Fatokun, S.A. Tarawali, B.B. Singh, P.M. Kormawa et M. Tamò (Éds). *Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Proceedings of the World Cowpea Conference III*, p. 252-266. IITA, Ibadan, Nigeria.
- Cervera, M.T., J. Gusmão, M. Steenackers, J. Peleman, V. Storme, A. Vanden Broeck, M. van Montagu et W. Boerjan (1996). Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 733-737.
- Chang, M. et D.G. Lynn (1986). The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *Journal of Chemical Ecology* 12(2): 561-579.
- Charters, Y.M., A. Robertson et M.J. Wilkinson (1996). PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 442-447.
- Cisse, N., M. Ndiaye, S. Thiaw et A.E. Hall (1995). Registration of 'Mouride' cowpea. *Crop Science* 35: 1215-1216.

De Groote, H., L. Wangare, F. Kanampiu, M. Odendo, A. Diallo, H. Karaya et D. Friesen (2008). The potential of a herbicide resistant maize technology for *Striga* control in Africa. *Agricultural Systems* 97: 83-94.

Dembélé, B. (1985). Contribution à l'étude de la biologie de deux scrophulariacées tropicales: *Striga hermonthica* (Del.) Benth. et *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke. Diplôme d'agronomie approfondie, E.N.S.A.M., Montpellier, France. 40 p.

Dembélé, B. (1988). Aspects biologiques et agronomiques de deux Scrophulariacées parasites tropicales: *Striga hermonthica* (Del.) Benth. et *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke. Thèse de doctorat, E.N.S.A.M., Montpellier, France. 100 p.

Dembélé, B., A. Raynal-Roques, G. Sallé et C. Tuquet (1994). Plantes parasites des cultures et des essences forestières au Sahel. Institut du Sahel, John Libbey Eurotext, Paris, France. 44 p.

dePamphilis, C.W., N.D. Young et A.D. Wolfe (1997). Evolution of plastid gene *rps2* in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation. *Proceedings of the National Academy Of Science of the U.S.A.* 94: 7367-7372.

Doggett, H. (1984). *Striga*- its biology and control. In E.S. Ayensu, H. Doggett, H.D. Keynes, J. Marton-Lefevre, L.J. Musselman, C. Parker et A. Pickering (Éds). *Striga, Biology and Control. Workshop on the Biology and Control of Striga*, p. 27-36. ICSU Press, Dakar, Sénégal.

Dubé, M.-P. et F.J. Belzile. Low genetic variability of *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke populations parasitic on cowpea might be explained by a recent origin. Chapter III.

Dugje, I.Y., A.Y. Kamara et L.O. Omoigui (2006). Infestation of crop fields by *Striga* species in the savanna zones of northeast Nigeria. *Agriculture Ecosystems and Environment* 116: 251-254.

Ehlers, J.D. et A.E. Hall (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research* 53: 187-204.

Eizenberg, H., D. Plakhine, T. Landa, G. Achdari, D.M. Joel et J. Hershenhorn (2004). First report of a new race of sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) in Israel. *Plant Disease* 88(11): 1284.

Fang, J., C.-C. T. Chao, P.A. Roberts et J.D. Ehlers (2007). Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 1197-1209.

FAOSTAT (2008). In Site Internet de FAOSTAT. [En ligne] <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> (Consulté le 28 novembre 2008).

Frost, D.L., A.L. Gurney, M.C. Press et J.D. Scholes (1997). *Striga hermonthica* reduces photosynthesis in sorghum: the importance of stomatal limitations and a potential role for ABA? *Plant, Cell and Environment* 20: 493-492.

Gagne, G., P. Roeckel-Drevet, B. Grezes-Besset, P. Shindrova, P. Ivanov, C. Grand-Ravel, F. Vear, G. Charmet et P. Nicolas (2000). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) as suitable markers to study *Orobanche cumana* genetic diversity. *Journal of phytopathology* 148: 457-459.

Gagne, G., P. Roeckel-Drevet, B. Grezes-Besset, P. Shindrova, P. Ivanov, C. Grand-Ravel, F. Vear, D. Tourvieille de Labrouhe, G. Charmet et P. Nicolas (1998). Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1216-1222.

Gbèhounou, G., A.H. Pieterse et J.A.C. Verkleij (1996). The decrease in seed germination of *Striga hermonthica* in Benin in the course of the rainy season is due to a dying-off process. *Experientia* 52: 264-267.

Gbèhounou, G., A.H. Pieterse et J.A.C. Verkleij (2000). Endogenously induced secondary dormancy in seeds of *Striga hermonthica*. *Weed Science* 48: 561-566.

Gbèhounou, G., A.H. Pieterse et J.A.C. Verkleij (2003). Longevity of *Striga* seeds reconsidered: results of a field study on purple witchweed (*Striga hermonthica*) in Bénin. *Weed Science* 51: 940-946.

Gethi, J.G., M.E. Smith, S.E. Mitchell et S. Kresocich (2005). Genetic structure of *Striga hermonthica* and *Striga asiatica* populations of Kenya. *Weed Research* 45: 64-73.

Gilbert, J.E., R.V. Lewis, M.J. Wilkinson et P.D.S. Caligari (1999). Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1125-1131.

Graves, J.D., M.C. Press., S. Smith et G.R. Stewart (1992). The carbon canopy economy of the association between cowpea and the parasitic angiosperm *Striga gesnerioides*. *Plant, Cell and Environment* 15: 283-288.

Guo, J., T. van der Lee, D.Y. Qu, Y.Q. Yao, X.F. Gong, D.L. Liang, K.Y. Xie, X.W. Wang et F. Govers (2009). *Phytophthora infestans* isolates from Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity. *Plant Biology* 11: 57-67.

Gupta, S.K., J. Souframanien et T. Gopalakrishna (2008). Construction of a genetic linkage map of black gram, *Vigna mungo* (L.) Hepper, based on molecular markers and comparative studies. *Genome* 51: 628-637.

Gurney, A.L., M.C. Press et J.K. Ransom (1995). The parasitic angiosperm *Striga hermonthica* can reduce photosynthesis of its sorghum and maize hosts in the field. *Journal of Experimental Botany* 46: 1817-1823.

Hartman, G.L. et O.A. Tanimonure (1991). Seed populations of *Striga* species in Nigeria. *Plant Disease* 75(5): 494-496.

Hauck, C., S. Müller et H. Schildknecht (1992). A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plant. *Journal of Plant Physiology* 139: 474-496.

Herb, R., J.H. Visser et H. Schildknecht (1987). Recovery, isolation and preliminary structural investigation of germination stimulants produced by *Vigna unguiculata* Walp. cv. Saunders Upright. In H.C. Weber et W. Forstreuter (Éds). *Proceedings of the 4th International Symposium on Parasitic Flowering Plants*, p. 351-366. Philipps-University, Marburg, F.R.A.

Hibberd, J.M., W.P. Quick, M.C. Press et J.D. Schole (1995). Carbon fixation, partitioning and growth of cowpea parasitised by *Striga gesnerioides*. *Aspects of Applied Biology* 42: 117-124.

Hibberd, J.M., W.P. Quick, M.C. Press et J.D. Scholes (1996). The influence of the parasitic angiosperm *Striga gesnerioides* on the growth and photosynthesis of its host, *Vigna unguiculata*. *Journal of Experimental Botany* 47: 507-512.

Hussain, H.S.N. et E.I. Aigbokhan (1991). Growth stages of *Striga gesnerioides* on cowpea roots. In J.K. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 5th International Symposium of Parasitic Weeds*, p. 279-286. CIMMYT, Nairobi, Kenya.

Igbinnosa, I. et S.N.C. Okonkwo (1991). Studies on seed germination of cowpea witchweed (*Striga gesnerioides*) and its effect on cowpea (*Vigna unguiculata*). In J.K. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 5th International Symposium of Parasitic Weeds*, p. 58-67. CIMMYT, Nairobi, Kenya.

Igbinnosa, I. et S.N.C. Okonkwo (1992). Stimulation of germination of seeds of cowpea witchweed (*Striga gesnerioides*) by sodium hypochlorite and some growth regulators. *Weed Science* 40: 25-28.

Imazio, S., M. Labra, F. Grassi, A. Scienza et O. Failla (2006). Chloroplast microsatellites to investigate the origin of grapevine. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1003-1011.

Joel, D.M., D. Losner-Goshen, J. Hershenhorn, Y. Goldwasser et M. Assayag (1996). The haustorium and its development in compatible and resistant hosts. In M.T. Moreno, J.I. Cubero, D. Berner, D. Joel, L.J. Musselman et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 6th International Parasitic Weed Symposium*, p. 532-541. Junta de Andalucia, Cordoba, Spain.

Joel, D.M. et V.H. Portnoy (1998). The angiospermous root parasite *Orobancha* L. (Orobanchaceae) induces expression of a pathogenesis related (PR) gene in susceptible tobacco roots. *Annals of Botany* 81: 779-781.

Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes et S. Daly (1997). Reproducibility of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3(5): 381-390.

Kabambe, V.H., F. Kanampiu, S.C. Nambuzi et A.E. Kauwa (2007). Evaluation of the use of herbicide (Imazapyr) and fertilizer application in integrated management of *Striga asiatica* in maize in Malawi. *African Journal Of Agricultural Research* 2(12): 687-691.

Kamara, A.Y., D. Chikoye, F. Ekemele, L.O. Omoigui et I.Y. Dugje (2008). Field performance of improved cowpea varieties under conditions of natural infestation by the parasitic weed *Striga gesnerioides*. *International Journal of Pest Management* 54(3): 189-195.

Keyes, W.J., A.G. Palmer, W.K. Erbil, J.V. Taylor, R.P. Apkarian, E.R. Weeks et D.G. Lynn (2007). Semagenesis and the parasitic angiosperm *Striga asiatica*. *The Plant Journal* 51: 707-716.

Kim, S.K. (1998). Horizontal resistance: misunderstandings, approach and importance. *In* S.K. Kim, R.A. Robinson, K. Atkinson, V.O. Adetimirin, C. Thé et G. Sallé (Éds). Combating parasitic weeds through horizontal resistance. Proceedings of the International Workshop organized by IARI-KNU/ICF, PASCON-FAO, STRC-OAU, KNACF and KOICA., p. 53-56. International Agriculture Research Institute (IARI) of the Kyungpook National University (KNU), Taegu / International Corn Foundation (ICF), Seoul, the Republic of Korea.

Kim, S.K. et V.O. Adetimirin (1997). *Striga hermonthica* seed inoculum rate effects on maize hybrid tolerance and susceptibility expression. *Crop Science* 37: 1066-1071.

Kormawa, P.M., J.N. Chianu et V.M. Manyong (2002). Cowpea demande and supply patterns in West Africa: the case of Nigeria. *In* C.A. Fatokun, S.A. Tarawali, B.B. Singh, P.M. Kormawa et M. Tamò (Éds). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Proceedings of the World Cowpea Conference III, p. 376-386. IITA, Ibadan, Nigeria.

Koyama, M.L. (2000). Molecular markers for the study of pathogen variability : implications for breeding resistance to *Striga hermonthica*. *In* B.I.G. Haussmann, D.E. Hess, M.L. Koyama, L. Grivet, H.F.W. Rattunde et H.H. Geiger (Éds). Breeding for *Striga* resistance in cereals, p. 227–245. Margraf Verlag, Weikersheim, Germany.

Krause, K. (2008). From chloroplasts to "cryptic" plastids: evolution of plastid genomes in parasitic plants. *Current Genetics* 54: 111-121.

Kuiper, E., J.A.C. Verkleij et A.H. Pieterse (1996). Differences in the primary dormancy pattern of *Striga* species; an ongoing study. *In* M.T. Moreno, J.I. Cubero, D. Berner, D. Joel, L.J. Musselman et C. Parker (Éds). Advances in Parasitic Plant Research. Proceedings

of the 6th International Parasitic Weed Symposium, p. 441-450. Junta de Andalucia, Cordoba, Spain.

Lane, J.A. et J.A. Bailey (1992). Resistance of cowpea and cereals to the parasitic angiosperm *Striga*. *Euphytica* 63: 85-93.

Lane, J.A., J.A. Bailey, R.C. Butler et P.J. Terry (1993). Resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke, a parasitic angiosperm. *New Phytologist* 125: 405-412.

Lane, J.A., J.A. Bailey et P.J. Terry (1991a). An *in-vitro* growth system for studying the parasitism of cowpea (*Vigna unguiculata*) by *Striga gesnerioides*. *Weed Research* 31: 211-217.

Lane, J.A., M.J. Kershaw, T.H.M. Moore, D.V. Child, P.S. Terry et J.A. Bailey (1991b). An *in vitro* system to investigate the parasitism of cereals by *Striga* species and resistance of cowpea to *Alectra vogelii*. In J.K. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 5th International Symposium of Parasitic Weeds*, p. 237-240. CIMMYT, Nairobi, Kenya.

Lane, J.A., T.H.M. Moore, D.V. Child et J.A. Bailey (1997). Variation in virulence of *Striga gesnerioides* on cowpea: new sources of crop resistance. In B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell et L.E.N. Jackai (Éds). *Advances in cowpea research*, p. 225-230. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.

Lane, J.A., T.H.M. Moore, D.V. Child, J.A. Bailey et A.B. Obilana (1996a). Post-infection resistance mechanisms against *Striga* in cowpea and sorghum. In M.T. Moreno, J.I. Cubero, D. Berner, D. Joel, L.J. Musselman et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 6th International Parasitic Weed Symposium*, p. 560-565. Junta de Andalucia, Cordoba, Spain.

Lane, J.A., T.H.M. Moore, D.V. Child et K.F. Cardwell (1996b). Characterization of virulence and geographic distribution of *Striga gesnerioides* in cowpea in West Africa. *Plant Disease* 80(3): 299-301.

Lane, J.A., T.H.M. Moore, D.V. Child, K.F. Cardwell, B.B. Singh et J.A. Bailey (1994). Virulence characteristics of a new race of the parasitic angiosperm, *Striga gesnerioides*, from southern Benin on cowpea (*Vigna unguiculata*). *Euphytica* 72: 183-188.

Li, G. et C.F. Quiros (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetic* 103: 455-461.

Losner-Goshen, D., V.H. Portnoy, A.M. Mayer et D.M. Joel (1998). Pectinolytic activity by the haustorium of the parasitic plant *Orobancha* L. (Orobanchaceae) in host roots. *Annals of Botany* 81: 319-326.

Malvick, D.K., N.J. Grünwald et A.T. Dyer (2009). Population structure, races, and host range of *Aphanomyces euteiches* from alfalfa production fields in the central USA. *European Journal of Plant Pathology* 123: 171-182.

Matsuura, H., K. Ohahsi, H. Sasako, N. Tagawa, Y. Takano, Y. Ioka, K. Nabeta et T. Yoshihara (2008). Germination stimulant from root exudates of *Vigna unguiculata*. *Plant Growth Regulation* 54: 31-36.

Matusova, R., K. Rani, F.W.A. Verstappen, M.C.R. Franssen, M.H. Beale et H.J. Bouwmeester (2005). The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* 139: 920-934.

Matusova, R., T.A. Van Mourik et H.J. Bouwmeester (2004). Changes in the sensitivity of parasitic weed seeds to germination stimulants. *Seed Science Research* 14: 335-344.

Mauromicale, G., A. Lo Monaco et A.M.G. Longo (2008). Effect of Branched Broomrape (*Orobanche ramosa*) Infection on the Growth and Photosynthesis of Tomato. *Weed Science* 56(4): 574-581.

McNeal, J.R., J.V. Kuehl, J.L. Boore et C.W. dePamphilis (2007). Complete plastid genome sequences suggest strong selection for retention of photosynthetic genes in the parasitic plant genus *Cuscuta*. *BMC Plant Biology* 7: 57.

Menéndez, C.M., A.E. Hall et P. Gepts (1997). A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theoretical and Applied Genetic* 95: 1210-1217.

Mengoni, A., C. Barabesi, C. Gonnelli, F. Galardi, R. Gabrielli et M. Bazzicalupo (2001). Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 10: 1909-1916.

Mengoni, A., C. Gonnelli, E. Brocchini, F. Galardi, S. Pucci, R. Gabrielli et M. Bazzicalupo (2003). Chloroplast genetic diversity and biogeography in the serpentine endemic Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist* 157: 349-356.

Mhiri, C. et M.-A. Grandbastien (2004). Éléments transposables et analyse de la biodiversité végétale. In J.F. Morot-Gaudry et J.F. Briat (Éds). *La génomique en biologie végétale*, p. 377-401. Éditions INRA, Paris.

Milligan, B.G. (1991). Chloroplast DNA diversity within and among populations of *Trifolium pratense*. *Current Genetics* 19: 411-416.

Mohamed, A., A. Ellicott, T.L. Housley et G. Ejeta (2003). Hypersensitive Response to *Striga* Infection in *Sorghum*. *Crop Science* 43: 1320-1324.

Mohamed, A.H., G. Ejeta, L.G. Butler et T.L. Housley (1998). Moisture content and dormancy in *Striga asiatica* seeds. *Weed Research* 38: 257-265.

Mohamed, K.I., J.F. Bolin, L.J. Musselman et A. Townsend Peterson (2007). Genetic diversity of *Striga* and implications for control and modeling future distributions. In G. Ejeta et J. Gressel (Éds). *Integrating new technology for Striga control : towards ending the witch-hunt*, p. 71-84. World Scientific Publishing Co. Pte Ltd, Singapore.

Mohamed, K.I., L.J. Musselman et C.R. Riches (2001). The genus *Striga* (scrophulariaceae) in Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 60-103.

Mohamed, K.I., M. Papes, R. Williams, B.W. Benz et A. Townsend Peterson (2006). Global invasive potential of 10 parasitic witchweeds and related Orobanchaceae. *Ambio* 35(6): 281-288.

Molinero-Ruiz, M.L., B. Pérez-Vich, R. Pineda-Martos et J.M. Melero-Vara (2008). Indigenous highly virulent accessions of the sunflower root parasitic weed *Orobanche cumana*. *Weed Research* 48: 169-178.

Montarry, J., R. Corbière, S. Lesueur, I. Glais et D. Andrivon (2006). Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *Journal of Evolutionary Biology* 19: 522-531.

Moore, T.H.M., J.A. Lane, D.V. Child, G.M. Arnold, J.A. Bailey et G. Hoffmann (1995). New sources of resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) to *Striga gesnerioides*, a parasitic angiosperm. *Euphytica* 84: 165-174.

Mortimore, M.J., B.B. Singh, F. Harris et S.F. Blade (1997). Cowpea in traditional systems. In B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell et L.E.N. Jackai (Éds). *Advances in cowpea research*, p. 99-113. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.

Muleba, N., J.T. Ouédraogo et I. Drabo (1996). Yield stability in relation to *Striga* resistance in cowpea production in West and Central Africa. *African Crop Science Journal* 4(1): 29-40.

Muleba, N., J.T. Ouédraogo et J.B. Tignegre (1997). Cowpea yield losses attributed to *Striga* infestations. *Journal of Agricultural Science* 129: 43-48.

Müller, S., C. Hauck et H. Schildknecht (1992). Germination stimulants produced by *Vigna unguiculata* Walp cv Saunders Upright. *Journal of Plant Growth Regulation* 11: 77-84.

Musselman, L.J. et E.S. Ayensu (1984). Taxonomy and biosystematics of *Striga*. In E.S. Ayensu, H. Doggett, H.D. Keynes, J. Marton-Lefevre, L.J. Musselman, C. Parker et A. Pickering (Éds). *Striga, Biology and Control. Workshop on the Biology and Control of Striga*, p. 37-45. ICSU Press, Dakar, Sénégal.

Musselman, L.J., Bharathalakshmi, S.B. Safa, D.A. Knepper, Mohamed K.I. et C.L. White (1991). Recent research on the biology of *Striga asiatica*, *S. gesnerioides* and *S. hermonthica*. In S.K. Kim (Éd.). Combating *Striga* in Africa. Proceedings of the International Workshop organized by IITA, ICRISAT and IDRC, p. 31-41. IITA, Ibadan, Nigeria.

Musselman, L.J. et C. Parker (1981a). Studies on indigo witchweed, the american strain of *Striga gesnerioides* (scrophulariaceae). *Weed Science* 29: 594-596.

Musselman, L.J. et C. Parker (1981b). Surface features of *Striga* seeds (Scrophulariaceae). *Adansonia* 20: 431-437.

Musselman, L.J., C. Parker et N. Dixon (1982). Notes on autogamy and flower structure in agronomically important species of *Striga* (Scrophulariaceae) and *Orobanch* (Orobanchaceae). *Beiträge zur Biologie Pflanzen* 56: 329-343.

Nagaoka, T. et Y. Ogihara (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 597-602.

Neumann, U., B. Vian, H.C. Weber et G. Sallé (1999). Interface between haustoria of parasitic members of the Scrophulariaceae and their hosts: a histochemical and immunocytochemical approach. *Protoplasma* 207: 84-97.

Nielsen, S.S., T.A. Ohler et C.A. Mitchell (1997). Cowpea leaves for human consumption: production, utilization, and nutrient composition. In B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell et L.E.N. Jackai (Éds). *Advances in cowpea research*, p. 326-332. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.

Norton, D.A. et M.A. Carpenter (1998). Mistletoes as parasites: host specificity and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 13(3): 101-105.

Ntare, B.R. (1989). Evaluation of cowpea cultivars for intercropping with pearl millet in the sahelian zone of West Africa. *Field Crops Research* 20: 31-40.

Obilana, A.T. (1987). Breeding cowpeas for *Striga* resistance. In L.J. Musselman (Éd.). *Parasitic Weeds in Agriculture*. Vol. 1, *Striga*, p. 243-253. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.

Ogunkanmi, L.A., O.T. Ogundipe, N.Q. Ng et C.A. Fatokun (2008). Genetic diversity in wild relatives of cowpea (*Vigna unguiculata*) as revealed by simple sequence repeats (SSR) markers. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 6: 263-268.

Okonkwo, S.N.C. (1991). The germination of *Striga* – a review. In J.K. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 5th International Symposium of Parasitic Weeds*, p. 144-154. CIMMYT, Nairobi, Kenya.

- Okonkwo, S.N.C. et F.I.O. Nwoke (1975). Observations on haustorial development in *Striga gesnerioides* (Scrophulariaceae). *Annals of Botany* 39: 979-981.
- Okonkwo, S.N.C. et F.I.O. Nwoke (1978). Initiation, development and structure of the primary haustorium in *Striga gesnerioides* (Scrophulariaceae). *Annals of Botany* 39: 979-981.
- Okonkwo, S.N.C. et V. Raghavan (1982). Studies on the germination of seeds of the root parasites, *Alectra vogelii* and *Striga gesnerioides*. I. Anatomical changes in the embryos. *American Journal of Botany* 69(10): 1636-1645.
- Olivier, A. (1995). Le striga, mauvaise herbe parasite des céréales africaines: biologie et méthodes de lutte. *Agronomie* 15: 517-525.
- Olivier, A. (1996). La relation entre le *Striga hermonthica* et ses hôtes: une synthèse. *Canadian Journal of Botany* 74: 1119-1137.
- Olivier, A., J.-C. Glaszmann, C. Lanaud et G.D. Leroux (1998). Population structure, genetic diversity and host specificity of the parasitic weed *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae) in Sahel. *Plant Systematics and Evolution* 209: 33-45.
- Olmstead, R.G., C.W. dePamphilis, A.D. Wolfe, N.D. Young, W.J. Elisons et P.A. Reeves (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 88(2): 348-361.
- Oswald, A. (2005). Striga control - technologies and their dissemination. *Crop Protection* 24(4): 333-342.
- Ouédraogo, J.T., B.S. Gowda, M. Jean, T.J. Close, J.D. Ehlers, A.E. Hall, A.G. Gillaspie, P.A. Roberts, A.M. Ismail, G. Bruening, P. Gepts, M.P. Timko et F.J. Belzile (2002a). An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. *Genome* 45: 175-188.
- Ouédraogo, J.T., V. Maheshwari, D.K. Berner, C.-A. St-Pierre, F.J. Belzile et M.P. Timko (2001). Identification of AFLP markers linked to resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to parasitism by *Striga gesnerioides*. *Theoretical and Applied Genetic* 102: 1029-1036.
- Ouédraogo, J.T., J.B. Tignégré, M.P. Timko et F.J. Belzile (2002b). AFLP markers linked to resistance against *Striga gesnerioides* race 1 in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Genome* 45: 787-793.
- Ozenda, P. et M. Capdepon (1972). Recherches sur les phanérogames parasites. II. Une scrophulariacée holoparasite méconnue, *Striga gesnerioides*. *Phytomorphology* 22(314-324).
- Padulosi, S. et N.Q. Ng (1997). Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell et L.E.N. Jackai (Éds). *Advances*

in cowpea research, p. 1-12. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.

Paran, I., D. Gidoni et R. Jacobsohn (1997). Variation between and within broomrape (*Orobanche*) species revealed by RAPD markers. *Heredity* 78: 68-74.

Park, J.-M., J.-F. Manen, A.E. Colwell et G.M. Schneeweiss (2008). A plastid gene phylogeny of the non-photosynthetic parasitic *Orobanche* (Orobanchaceae) and related genera. *Journal of Plant Research* 121: 365-376.

Parker, C. (1984). The physiology of *Striga* spp.: present state of knowledge and priorities for future research. *In* E.S. Ayensu, H. Doggett, H.D. Keynes, J. Marton-Lefevre, L.J. Musselman, C. Parker et A. Pickering (Éds). *Striga, Biology and Control. Workshop on the Biology and Control of Striga*, p. 179-193. ICSU Press, Dakar, Sénégal.

Parker, C. (1991). Protection of crops against parasitic weeds. *Crop Protection* 10: 6-22.

Parker, C. et T.I. Polniaszek (1990). Parasitism of cowpea by *Striga gesnerioides* : variation in virulence and discovery of a new source of host resistance. *Annals of Applied Biology* 116: 305-311.

Patterson, D.T. (1987). Environmental factors affecting witchweed growth and development. *In* L.J. Musselman (Éd.). *Parasitic Weeds in Agriculture. Vol. 1, Striga*, p. 27-41. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.

Pérez-de-Luque, A., M.T. Moreno et D. Rubiales (2008). Host plant resistance against broomrapes (*Orobanche* spp.): defence reactions and mechanisms of resistance. *Annals of Applied Biology* 152(2): 131-141.

Pieterse, A.H. et J.A.C. Verkleij (1991a). Effect of soil conditions on *Striga* development – A review. *In* J.K. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 5th International Symposium of Parasitic Weeds*, p. 329-339. CIMMYT, Nairobi, Kenya.

Pieterse, A.H. et J.A.C. Verkleij (1991b). Genetic variability in *Orobanche* (broomrape) and *Striga* (witchweed) and its implication for host crop resistance breeding. *In* J. Rozema et J.A.C. Verkleij (Éds). *Ecological responses to Environmental Stresses*, p. 290-302. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Pradeep Reddy, M., Sarla N. et E.A. Siddiq (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.

Press, M.C. (1995). How do the parasitic weeds *Striga* and *Orobanche* influence host carbon relations? *Aspects of Applied Biology* 42: 63-70.

Press, M.C., J.D. Graves et G.R. Stewart (1988). Transpiration and carbon acquisition in root hemiparasitic angiosperms. *Journal of Experimental Botany* 39: 1009-1014.

Press, M.C., J.D. Graves et G.R. Stewart (1990). Physiology of the interaction of angiosperm parasites and their higher plant hosts. *Plant, Cell and Environment* 13: 91-104.

Press, M.C., N. Shah et G.R. Stewart (1986). The parasitic habit: trends in metabolic reductionism. *In* S.J. ter Borg (Éd.). *Proceedings of a workshop on biology and control of Orobanch*, p. 96-106. LH/VPO, Wageningen, The Netherlands.

Quian, W., S. Ge et D.-Y. Hong (2001). Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 440-449.

Quin, F.M. (1997). Introduction. *In* B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell et L.E.N. Jackai (Éds). *Advances in cowpea research*, p. ix-xv. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.

Rafalski, J.A., J.M. Vogel, M. Morgante, W. Powell, C. Andre et S.V. Tingey (1996). Generating and using DNA markers in plants. *In* B.W. Birren et E. Lai (Éds). *Analysis of non-mammalian genomes: a practical guide*, p. 75-134. Academic Press, San Diego, CA, U.S.A.

Ralston, D.M., C.R. Riches et L.J. Musselman (1987). Morphology and hosts of three *Striga* species (Scrophulariaceae) in Botswana. *Bulletin du Museum national d'Histoire naturelle, Paris*, 4e série 9: 195-215.

Ramaiah, K.V., V.L. Chidley et L.R. House (1991). A time-course study of early establishment stages of parasitic angiosperm *Striga asiatica* on susceptible sorghum roots. *Annals of Applied Biology* 118: 403-410.

Ramaiah, K.V., C. Parker, M.J. Vasudeva Rao et L.J. Musselman (1983). Manuel d'identification et de lutte contre le *Striga*. *Bulletin d'information* N°15. ICRISAT, Patancheru, Inde. 52 p.

Ramlan, M.F. et J.D. Graves (1996). Estimation of the sensitivity to photoinhibition in *Striga hermonthica*-infected sorghum. *Journal of Experimental Botany* 47: 71-78.

Ransom, J.K. et J. Njoroge (1991). Seasonal variation in ethylene-induced germination of *Striga hermonthica* in Western Kenya. *In* J.K. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 5th International Symposium of Parasitic Weeds*, p. 391-396. CIMMYT, Nairobi, Kenya.

Rawal, K.M. (1975). Natural hybridization among wild, weedy and cultivated *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Euphytica* 24: 699-707.

- Reiss, G.C. et J.A. Bailey (1998). *Striga gesnerioides* parasiting cowpea: development of infection structures and mechanisms of penetration. *Annals of Botany* 81: 431-440.
- Reiss, G.C., R.J. Pring, J.A. Lane et J.A. Bailey (1995). *Striga gesnerioides*: mechanisms of infection and resistance. *Aspects of Applied Biology* 42: 301-306.
- Riopel, J.L, W.V. Baird, M. Chang et D.G. Lynn (1986). Regulation of early development in witchweed (*Striga asiatica*) and other parasitic plants. In S.J. ter Borg (Éd.). Proceedings of a workshop on biology and control of Orobanch, p. 52-56. LH/VPO, Wageningen, The Netherlands.
- Rispail, N., M.-A. Dita, C. González-Verdejo, A. Pérez-de-Luque, M.-A. Castillejo, E. Prats, B. Román, J.V. Jorrín et D. Rubiales (2007). Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. *New Phytologist* 173: 703-712.
- Román, B., C. Alfaro, A.M. Torres, M.T. Moreno, Z. Satovic, A. Pujadas et D. Rubiales (2003). Genetic Relationships among *Orobanche* Species as Revealed by RAPD Analysis. *Annals of Botany* 91: 637-642.
- Román, B., D. Rubiales, A.M. Torres, J.I. Cubero et Z. Satovic (2001). Genetic diversity in *Orobanche crenata* populations from southern Spain. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1108-1114.
- Román, B., Z. Satovic, C. Alfaro, M.T. Moreno, M. Kharrat, A. Pérez-de-Luque et D. Rubiales (2007). Host differentiation in *Orobanche foetida* Poir. *Flora* 202: 201-208.
- Román, B., Z. Satovic, D. Rubiales, A.M. Torres, J.I. Cubero, Katzir, N. et D.M. Joel (2002). Variation among and within populations of the parasitic weed *Orobanche crenata* from Spain and Israel revealed by inter simple sequence repeat markers. *Phytopathology* 92(12): 1262-1266.
- Roy, R.S. et R.H. Richharia (1948). Breeding and inheritance studies on cowpea, *Vigna sinensis*. *Journal of the American Society of Agronomy* 40(6): 479-489.
- Rubiales, D., A. Perez-de-Luque, M. Fernandez-Aparico, J.C. Sillero, B. Román, M. Kharrat, S. Khalil, D.M. Joel et C.R. Riches (2006). Screening techniques and sources of resistance against parasitic weeds in grain legumes. *Euphytica* 147: 187-199.
- Rubiales, D., M. Sadiki et B. Román (2005). First report of *Orobanche foetida* on common vetch (*Vicia sativa*) in Morocco. *Plant Disease* 89: 528.
- Rugutt, J.K., J.K. Rugutt, J.I. Irani, N.H. Fischer, D.K. Berner et T.D. McCarley (1996). GC/MS evaluation of compounds in dry and conditioned *Striga* species seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(12): 3977-3982.
- Russo-Sorel, N. et P. Thalouarn (1996). Characterization of the plastid genome in hemiparasites. In M.T. Moreno, J.I. Cubero, D. Berner, D. Joel, L.J. Musselman et C.

Parker (Éds). Proceedings of the 6th International Parasitic Weed Symposium, p. 98-104. Junta de Andalucía, Cordoba, Spain.

Sallé, G. et A. Raynal-Roques (1989). Le *Striga*. La Recherche 206: 44-52.

Sallé, G., A. Raynal-Roques et C. Tuquet (1995). Un fléau en Afrique, les *Striga*. La Vie des Sciences 12(1): 27-46.

Santoni, S., P. Faivre-Rampant, E. Prado et D. Prat (2000). Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures 9(4): 311-327.

Sauerborn, J., D. Müller-Stöver et J. Hershenhorn (2007). The role of biological control in managing parasitic weeds. Crop Protection 26: 246-254.

Schwender, J., F. Goffman, J.B. Ohlrogge et Y. Shachar-Hill (2004). Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. Nature 432: 779-782.

Serghini, K., A. Pérez-de-Luque, M. Castejón-Muñoz, L. García-Torres et J.V. Jorrín (2001). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobancha cernua* Loeffl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. Journal of Experimental Botany 52: 2227-2234.

Sharma, P.N., B.A. Padder, O.P. Sharma, A. Pathania et P. Sharma (2007). Pathological and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* (bean anthracnose) across Himachal Pradesh, a north-western Himalayan state of India. Australasian Plant Pathology 36: 191-197.

Shawe, K.G. et M.J. Ingrouille (1993). Isozyme analysis demonstrates host selection of parasite pathotypes in the association between cowpea and *S. gesnerioides*. Brighton Crop Protection Conference - Weeds 2: 919-924.

Siame, B.A., Y. Weerasuriya, K. Wood, G. Ejeta et L.G. Butler (1993). Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plant. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41: 1486-1491.

Singh, B.B., J.D. Ehlers, B. Sharma et F.R. Freire Filho (2002). Recent progress in cowpea breeding. In C.A. Fatokun, S.A. Tarawali, B.B. Singh, P.M. Kormawa et M. Tamò (Éds). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Proceedings of the World Cowpea Conference III, p. 22-40. IITA, Ibadan, Nigeria.

Singh, B.B. (2002). Breeding cowpea varieties for resistance to *Striga gesnerioides* and *Alectra vogelii*. In C.A. Fatokun, S.A. Tarawali, B.B. Singh, P.M. Kormawa et M. Tamò (Éds). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Proceedings of the World Cowpea Conference III, p. 154-163. IITA, Ibadan, Nigeria.

Singh, B.B. et A.M. Emechebe (1990). Inheritance of *Striga* resistance in cowpea genotype B301. *Crop Science* 30: 879-881.

Singh, B.B. et A.M. Emechebe (1991). Breeding for resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. *In* J.K. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham et C. Parker (Éds). *Proceedings of the 5th International Symposium of Parasitic Weeds*, p. 303-305, Nairobi, Kenya.

Singh, B.B. et A.M. Emechebe (1997). Advances in research on cowpea *Striga* and *Alectra*. *In* B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell et L.E.N. Jackai (Éds). *Advances in cowpea research*, p. 215-224. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.

Singh, B.B., O.O. Olufajo, M.F. Ishiyaku, R.A. Adeleke, H.A. Ajeigbe et S.G. Mohammed (2006). Registration of Six Improved Germplasm Lines of Cowpea with Combined Resistance to *Striga gesnerioides* and *Alectra vogelii*. *Crop Science* 46(5): 2332-2333.

Singh, B.B. et B. Sharma (1996). Restructuring cowpea for higher yield. *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding* 56(4): 389-405.

Smith, P.L. et G.R. Stewart (1987). *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke (*S. orobanchoides* Benth.) (Scrophulariaceae): Haustorial ontogeny and a role for ergastic substances in the maintenance of physiological integrity. *In* H.C. Weber et W. Forstreuter (Éds). *Proceedings of the 4th International Symposium on Parasitic Flowering Plants*, p. 763-773. Philipps-University, Marburg, F.R.A.

Smithson, J.B., R. Redden et K.M. Rawal (1980). Methods of crop improvement and genetic resources in *Vigna unguiculata*. *In* R.J. Summerfield et A.H. Bunting (Éds). *Advances in legume science*, p. 445-457. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Soltis, D.E. et P.S. Soltis (1998). Choosing and approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. *In* D.E. Soltis, P.S. Soltis et J.J. Doyle (Éds). *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*, p. 1-42. Kluwer Academic Publishers, Boston.

Soltis, D.E., P.S. Soltis et B.G. Milligan (1992). Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. *In* P.S. Soltis, D.E. Soltis et J.J. Doyle (Éds). *Molecular systematics of plants*, p. 117-150. Chapman and Hall, London.

Stewart, G.R. (1987). Physiological biochemistry of *Striga*. *In* L.J. Musselman (Éd.). *Parasitic Weeds in Agriculture*. Vol. 1, *Striga*, p. 77-88. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.

Tang, S., A. Heesacker, V.K. Kishore, A. Fernandez, E.S. Sadik, G. Cole et S.J. Knapp (2003). Genetic Mapping of the *Or₅* Gene for Resistance to *Orobanche* Race E in Sunflower. *Crop Science* 43: 1021-1028.

Tarawali, S.A, B.B. Singh, M. Peters et S.F. Blade (1997). Cowpea haulms as fodder. *In* B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K.E. Dashiell et L. E. N. Jackai (Éds). Advances in cowpea research, p. 313-325. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), IITA, Ibadan, Nigeria.

Thalouarn, P., M.C. Arnaud, C. Théodet et L. Rey (1991). Cytological, biochemical and genetic aspects of carbon fixation in *Striga hermonthica* and *Striga gesnerioides*. *In* J.K. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham et C. Parker (Éds). Proceedings of the 5th International Symposium of Parasitic Weeds, p. 51-57. CIMMYT, Nairobi, Kenya.

Thalouarn, P. et A. Fer (1993). Le *Striga*, un ravageur de cultures vivrières: le point sur les connaissances récentes et sur les méthodes de lutte. Cahiers Agricultures 2: 167-182.

Thalouarn, P. et S. Renaudin (1991). Obtention par réaction de polymérase en chaîne (PCR) du gène *rbcL* de la scrophulariacée holoparasite *Lathraea clandestina* L. Comparaison avec *Digitalis purpurea* L. autotrophe et *Melampyrum pratense* L. hémiparasite. Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris 313(Série III): 381-387.

Thorogood, C.J., F. J. Rumsey, S.A. Harris et S.J. Hiscock (2008). Host-driven divergence in the parasitic plant *Orobancha minor* Sm. (Orobanchaceae). Molecular Ecology 17: 4289-4303.

Timko, M.P. (2006). Deciphering the Mechanism of Resistance to *Striga gesnerioides* in Cowpea (*Vigna unguiculata* L.). Conférence présentée dans le cadre du "International Symposium on Integrating New Technologies for Striga Control". 7 novembre 2006. p. 41. Adis Ababa, Ethiopie.

Touré, M. (1992). La résistance génétique du niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) à deux biotypes de *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada. 103 p.

Touré, M., A. Olivier, B.R. Ntare, J.A. Lane et C.A. St-Pierre (1998). Reaction of cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars to *Striga gesnerioides* races from Mali and Niger. Canadian Journal of Plant Science 78: 477-480.

Touré, M., A. Olivier, B.R. Ntare, J.A. Lane et C.-A. St-Pierre (1997). Inheritance of resistance to *Striga gesnerioides* biotypes from Mali and Niger in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Euphytica 94: 273-278.

Tuohy, J., E.A. Smith et G.R. Stewart (1986). The parasitic habit: trends in morphological and ultrastructural reductionism. *In* S.J. ter Borg (Éd.). Proceedings of a workshop on biology and control of Orobanch, p. 86-95. LH/VPO, Wageningen, The Netherlands.

Vaillancourt, R.E., N.F. Weeden et J. Barnard (1993). Isozyme diversity in cowpea species complex. Crop Science 33: 606-613.

Valério, H.M., M.A. Resende, R.C.B. Weikert-Oliveria et C.R. Casela (2005). Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola* from Brazil. *Mycopathologia* 159: 449-459.

Vallance, K.B. (1950). Studies on the germination of the seeds of *Striga hermonthica* 1. The influence of moisture-treatment, stimulant-dilution, and after-ripening on germination. *Annals of Botany* 14: 347-363.

van Mourik, T.A. (2007). *Striga hermonthica* seed bank dynamics: process quantification and modelling. Thèse de doctorat, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 123 p.

Vasudeva Rao, M.J. et L.J. Musselman (1987). Host specificity in *Striga* spp. and physiological "strains". In L.J. Musselman (Éd.). *Parasitic weeds in agriculture*. Vol. 1, *Striga*, p. 13-25. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.

Vaz Patto, M.C., R. Díaz-Ruiz, Z. Satovic, B. Román, A.J. Pujadas-Salvà et D. Rubiales (2008). Genetic diversity of Moroccan populations of *Orobanche foetida*: evolving from parasitising wild hosts to crop plants. *Weed Research* 48: 179-186.

Verkleij, J.A.C. et E. Kuiper (2000). Various approaches to controlling root parasitic weeds. *Biotechnology and Development Monitor* 41: 16-19.

Visser, J et I. Dörr (1987). The haustorium. In L.J. Musselman (Éd.). *Parasitic Weeds in Agriculture*. Vol. 1, *Striga*, p. 91-106. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.

Vissoh, P.V., G. Gbèhounou, A. Ahanchédé, N.G. Röling et T.W. Kuyper (2008). Evaluation of integrated crop management strategies employed to cope with *Striga* infestation in permanent land use systems in southern Benin. *International Journal of Pest Management* 54(3): 197-206.

Vos, P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. et M. Zabeau (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

Watling, J.R. et M.C. Press (2001). Impacts of infection by parasitic angiosperms on host photosynthesis. *Plant Biology* 3: 244-250.

Weerasuriya, Y., B.A. Siame, D. Hess, G. Ejeta et L.G. Butler (1993). Influence of conditions and genotype on the amount of *Striga* germination stimulants exuded by roots of several host crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41(9): 1492-1496.

Weising, K. et R.C. Gardner (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledoneous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.

- Werth, C.R., J.L. Riopel et N.W. Gillespie (1984). Genetic uniformity in an introduced population of witchweed (*Striga asiatica*) in the United States. *Weed Science* 32(5): 645-648.
- Wigchert, S.C.M., E. Kuiper, G.J. Boelhouwer, G.H.L. Nefkens, J.A.C. Verkleij et B. Zwanenburg (1999). Dose-response of seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobancha* toward the synthetic germination stimulants GR 24 and Nijmegen 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1705-1710.
- Williams, C.N. (1959). Action of inhibitor- β on the growth of *Striga* seedlings. *Nature* 184: 1577-1578.
- Wolfe, A.D. et C.W. dePamphilis (1998). The effect of relaxed functional constraints on the photosynthetic gene *rbcL* in the photosynthetic and nonphotosynthetic parasitic plants. *Molecular Biology and Evolution* 15(10): 1243-1258.
- Worsham, A.D. (1987). Germination of witchweed seeds. In L.J. Musselman (Éd.). *Parasitic Weeds in Agriculture*. Vol. 1, *Striga*, p. 45-61. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.
- Wu, K.-S., R. Jones, L. Danneberger et P.A. Scolnik (1994). Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research* 22(15): 3257-3258.
- Wunderlin, R.P., L.J. Musselman et A.G. Shuey (1979). *Striga gesnerioides* (scrophulariaceae), first record of the species in the new world. *Plant Disease Reporter* 63(4): 251-252.
- Xie, X., K. Yoneyama, D. Kusumoto, Y. Yamada, T. Yokota, Y. Takeuchi et K. Yoneyama (2008). Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry* 69: 427-431.
- Xu, D.H., J. Abe, J.Y. Gai et Y. Shimamoto (2002). Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 645-653.
- Ye, Y.M., J.W. Zhang, G.G. Ning et M.Z. Bao (2008). A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 118: 1-7.
- Yin, T., X. Zhang, M. Huang, M. Wang, Q. Zhuge, S. Tu, L.-H. Zhu et R. Wu (2002). Molecular linkage maps of the *Populus* genome. *Genome* 45: 541-555.
- Zahran, E., J. Sauerborn, A.A. Elmagid, A.A. Abbasher et D. Müller-Stöver (2008). Granular formulations and seed coating: delivery options for two fungal biological control agents of *Striga hermonthica*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115(4): 178-185.

Zeid, M., M. Madkour, Y. Koraiem, A. Nawar, M. Soliman et F. Zaitoun (1997). Molecular studies on *Orobanche*. *Journal of Phytopathology* 145: 351-355.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski et D. Labuda (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

ANNEXE 1

Liste des échantillons et de leur provenance

Race	Pays	Région	No. LARS*	No. pour le projet		
1	B. Faso	Kamboinse	86-14	1.2.1		
		Koupela	89-08	1.2.2		
		Pobe Mengao	90-05	1.2.3		
		À l'est de Fada N'Gourma	90-14	1.2.4		
		À l'est de Koupela	90-17	1.2.5		
		Koupela	90-18	1.2.6		
		Zorgo	90-19	1.2.7		
		Ouagadougou	90-20	1.2.8		
		Mali	Santiguila	90-50	1.4.9	
		Nigeria	Badeggi	90-80	1.6.10	
		Togo	Agbodafro	90-70	1.7.11	
			Agbodafro	90-76	1.7.12	
		2	Mali	Sotuba	84-01	2.4.1
				Koporokendie	84-03	2.4.2
Koutiala	85-16			2.4.3		
Koropokendie	90-02			2.4.4		
Mourdiah	90-11			2.4.5		
Bamako	90-49			2.4.6		
Cinzana	90-51			2.4.7		
Segou	90-52			2.4.8		
Grindigue	90-66			2.4.9		
3	Niger			À l'ouest de Guidiguir	86-08	3.5.1
				Filingue	88-03	3.5.2
				Dogondoutchi	90-41	3.5.3
				Au sud-ouest de Dogondoutchi	90-42	3.5.4
				Kare	90-43	3.5.5
		Niamey	90-46	3.5.6		
		À l'ouest de Niamey	90-47	3.5.7		
		Nigeria	Minjibir	90-24	3.6.8	
		Bakura	90-29	3.6.9		
		Kware	90-31	3.6.10		
		Maiduguri	90-61	3.6.11		
		Alkalere	90-84	3.6.12		
		4	Bénin	Zakpota	90-74	4.1.1
				Zakpota	90-75	4.1.2
5	Bénin	Kandi	90-56	5.1.1		
	Burkina Faso	Zabre	90-57	5.2.2		
	Cameroun	Lara Kaele	87-05	5.3.3		
		Garoua	89-01	5.3.4		
		Maroua	89-03	5.3.5		

Suite page suivante

Race	Pays	Région	No. LARS*	No. pour le projet
	Nigeria	À l'ouest de Biu	90-77	5.6.6
		À l'est de Biu	90-78	5.6.7
		Mokwa	90-79	5.6.8
		À l'ouest de Bara	90-81	5.6.9
		À l'ouest de Gombe	90-82	5.6.10

* Numéro de code de la Long Ashton Research Station (LARS). Adapté de Lane et coll., 1996b.

Notation des échantillons pour le projet:

Le premier chiffre réfère à la race du parasite (1 à 5); le second chiffre réfère au pays d'origine (1 à 7, selon l'ordre alphabétique des pays); le troisième chiffre identifie l'échantillon au sein de la race. Ex. : 3.5.1 : 1^{er} échantillon de la race 3, provenant du Niger.

ANNEXE 2

DNA isolation according to Tanksley à la Paul modified by J. Carling

- Put a piece of leaf in a tube in the liquid nitrogen and grind it to powder
- Add 500 µl fresh mixture of buffers to each tube and incubate for 30 min. at 65°C.
- Add 500 µl chloroform to each tube and turn over (shake) about 40x.
- Spin down for 5 min. (6000 rpm) and put the supernatant in a new tube.
- Add 0.8 vol. Isopropanol and turn over again.
- Spin down for 5 min. and discard the supernatant.
- Wash the pellet with 500 µl 70% ethanol
- Spin down, discard ethanol.
- Dry the pellet and resuspend in 50 µl 0.1xTE.

Buffer stock solutions:

Extractionbuffer:

- 0.35 M Sorbitol = 31.9 g Sorbitol
 - 0.1 M Tris pH 7.5 = 50 ml 1 M Tris
 - 5 mM EDTA = 5 ml 0.5 M EDTA pH 7.5
- Fill up to 500 ml with MilliQ.

Lysisbuffer:

- 0.2 M Tris pH 7.5 = 100 ml 1 M Tris
 - 0.05 M EDTA = 50 ml 0.5 M EDTA
 - 2 M NaCl = 200 ml 5 M NaCl
 - 2% CTAB = 10 g CTAB
- Fill up to 500 ml with MilliQ.

Sarcosyl 5% (w/v)

Fresh buffer*:

For example 25 ml extractionbuffer + 25 ml lysisbuffer + 10 ml sarcosyl + 0.3 g Sodiumdisulfite + 1% w/v PVP (K29-32).

*This buffer will settle into two layers on standing. Heat to 65°C and shake well immediately before adding to extraction tubes.

Additional comments from collaborators, for grinding in 96 well format

Supplies:

96 wells plates from Qiagen: Collection microtubes (racked, 10 x 96), Cat. no: 19560.
Corresponding caps, Cat. no:19566.

Grind leaf by putting a small metal ball into each tube with the leafmaterial. Put plate in the liquid nitrogen so that everything is frozen and then into a shaking machine (Retsch MM300). Shake for 1.5 minutes at speed = 20x/s. Spin down at 6000 rpm. The result is a very fine powder of the leaf tissue.

ANNEXE 3

Liste des amorces ISSR de la UBC (primer set #9) 5'-3'

801	ATA TAT ATA TAT ATA TT	851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG
802	ATA TAT ATA TAT ATA TG	852	TCT CTC TCT CTC TCT CRA
803	ATA TAT ATA TAT ATA TC	853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT
804	TAT ATA TAT ATA TAT AA	854	TCT CTC TCT CTC TCT CRG
805	TAT ATA TAT ATA TAT AC	855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
806	TAT ATA TAT ATA TAT AG	856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	863	AGT AGT AGT AGT AGT AGT
814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	865	CCG CCG CCG CCG CCG CCG
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
819	GTG TGT GTG TGT GTG TA	869	GTT GTT GTT GTT GTT GTT
820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	870	TGC TGC TGC TGC TGC TGC
821	GTG TGT GTG TGT GTG TT	871	TAT TAT TAT TAT TAT TAT
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	872	GAT AGA TAG ATA GAT A
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	873	GAC AGA CAG ACA GAC A
824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	874	CCC TCC CTC CCT CCC T
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	875	CTA GCT AGC TAG CTA G
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	876	GAT AGA TAG ACA GAC A
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	877	TGC ATG CAT GCA TGC A
828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	878	GGA TGG ATG GAT GGA T
829	TGT GTG TGT GTG TGT GC	879	CTT CAC TTC ACT TCA
830	TGT GTG TGT GTG TGT GG	880	GGA GAG GAG AGG AGA
831	ATA TAT ATA TAT ATA TYA	881	GGG TGG GGT GGG GTG
832	ATA TAT ATA TAT ATA TYC	882	VBV ATA TAT ATA TAT AT
833	ATA TAT ATA TAT ATA TYG	883	BVB TAT ATA TAT ATA TA
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	884	HBH AGA GAG AGA GAG AG
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	885	BHB GAG AGA GAG AGA GA
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	886	VDV CTC TCT CTC TCT CT
837	TAT ATA TAT ATA TAT ART	887	DVD TCT CTC TCT CTC TC
838	TAT ATA TAT ATA TAT ARC	888	BDB CAC ACA CAC ACA CA
839	TAT ATA TAT ATA TAT ARG	889	DBD ACA CAC ACA CAC AC
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	890	VHV GTG TGT GTG TGT GT
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	891	HVH TGT GTG TGT GTG TG
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	892	TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C
843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	893	NNN NNN NNN NNN NNN
844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	894	TGG TAG CTC TTG ATC ANN NNN
845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	895	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC

846 CAC ACA CAC ACA CAC ART

847 CAC ACA CAC ACA CAC ARC

848 CAC ACA CAC ACA CAC ARG

849 GTG TGT GTG TGT GTG TYA

850 GTG TGT GTG TGT GTG TYC

896 AGG TCG CGG CCG CNN NNN NAT G

897 CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G

898 GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G

899 CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A

900 ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA

Abréviations pour les positions à bases dégénérées (nomenclature internationale)

R = G ou A

K = G ou T

S = G ou C

W = A ou T

M = A ou C

Y = T ou C

D = G ou A ou T

V = G ou A ou C

B = G ou T ou C

H = A ou T ou C

N = G ou A ou T ou C