

ANALYSE PAR IMAGERIE MULTI-ECHELLES DE L'INTERACTION ENTRE LA PLANTE PARASITE *PHELIPANCHE RAMOSA* ET UNE SOUCHE DE CHAMPIGNON PATHOGENE D'ORIGINE TELLURIQUE

CARTRY Dñia, AVOSCAN Laure, BONNOTTE Aline, ARNOULD Christine,
NOIROT Elodie, MICHEL Joël, AUBERT Véronique, STEINBERG Christian,
GIBOT-LECLERC Stéphanie

*Agroécologie, INRAE, Institut Agro, Univ. Bourgogne,
Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France*

stephanie.gibot-leclerc@inrae.fr
ORCID : 0000-0002-3722-5321

ANALYSIS BY MULTI-SCALE IMAGING OF THE INTERACTION BETWEEN THE PARASITIC PLANT *PHELIPANCHE RAMOSA* AND A SOIL-BORNE PATHOGENIC FUNGUS

ABSTRACT

Phelipanche ramosa (L.) Pomel, branched broomrape of winter oilseed rape *Brassica napus* L., is a parasitic weed that needs a host plant to develop. The parasitic lifestyle requires a close relationship with the host plant from the earliest stages of development. This parasitic plant has been causing significant yield losses in rapeseed crops in France for some thirty years. Cryogenic scanning electron microscopy (cryo-SEM), transmission electron microscopy (TEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) techniques were used to assess how the colonization of the parasitic plant by a pathogenic fungal strain affected the integrity of the plant tissues. Our observations reveal a particularly reticulated parasite seed coat, composed of voluminous dehydrated cells forming a set of irregular alveoli. The outer walls of these cells have collapsed and are joined to the inner walls, which have thinned to form numerous punctuations. While the orange auto-fluorescence reveals the seed coat with CLSM, green auto-fluorescence reveals soil debris on the surface of the outer wall, as well as the presence of albumen and embryo beneath the seed coat. Interaction of the seed with the *Fusarium* strain leads to structural changes, as revealed by cryo-SEM observations. These include more pronounced cross-linking, increased punctuation and collapse of the seed tissue. These observations also reveal mycelial filaments running through the integument, reflecting the development of the fungal strain. In MET, the pathogenicity of the fungal strain can be observed in the crushing and less clear contours of the tissues of the young *P. ramosa* tuber. A large

number of fungal spores are found in the seed coat and in the peripheral cells of the seed albumen, while fungal material fills the xylem of *P. ramosa* and the intercellular spaces of the haustorium tissues. Finally, the starch grains initially present in *P. ramosa* tissues are less numerous and deteriorated, probably exploited by the fungal strain. The results obtained indicate that the approach followed makes it possible to understand in detail and at the cytological level the mechanisms of the pathogenic fungus-parasitic plant interaction. They also validate the relevance of the analysis by multi-scale imaging of this interaction to acquire the required knowledge to consider the biocontrol of the parasitic plant *P. ramosa* by soil-borne pathogenic fungi.

KEY WORDS

Confocal microscopy, Electron microscopy, Fungal pathogens, Germination, Haustorium.

RESUME

Phelipanche ramosa (L.) Pomel, l'orobanche rameuse du colza d'hiver *Brassica napus* L., est une plante adventice parasite qui a besoin d'une plante hôte pour se développer. Le mode de vie parasite nécessite une relation étroite avec la plante hôte dès les premiers stades de développement. Cette plante parasite entraîne des pertes importantes de rendement dans les cultures de colza en France depuis une trentaine d'années. Les techniques de cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-MEB), de microscopie électronique à transmission (MET) et de microscopie confocale à balayage laser (MCBL) ont été utilisées pour tenter d'apprécier en quoi, la colonisation de la plante parasite par une souche fongique pathogène affectait l'intégrité des tissus de cette plante. Nos observations révèlent un tégument de la graine du parasite particulièrement réticulé, composé de volumineuses cellules déshydratées formant un ensemble d'alvéoles irrégulières. Les parois externes de ces cellules sont effondrées et s'accolent aux parois internes qui s'amincissent pour former de nombreuses punctuations. Si

l'auto-fluorescence orange révèle le tégument au MCBL, l'auto-fluorescence verte permet de visualiser les débris du sol à la surface de la paroi externe ainsi que la présence de l'albumen et de l'embryon sous le tégument de la graine. L'interaction de la graine avec la souche de *Fusarium* entraîne des modifications structurales mises en évidence par les observations en cryo-MEB. Il s'agit notamment de réticulations plus marquées, de ponctuations plus nombreuses et d'un affaissement des tissus de la graine. Ces observations révèlent également des filaments mycéliens traversant le tégument et traduisant le développement de la souche fongique. En MET, la pathogénicité de la souche fongique est observable par un écrasement et des contours moins nets des tissus du jeune tubercule *P. ramosa*. Dans le tégument ainsi que dans les cellules périphériques de l'albumen de la graine, un grand nombre de spores de champignons est retrouvé tandis que du matériel fongique remplit le xylème de *P. ramosa* ainsi que les espaces intercellulaires des tissus de l'haustorium. Enfin, les grains d'amidon initialement présents dans les tissus de *P. ramosa* sont moins nombreux et détériorés, probablement exploités par la souche fongique. Les résultats obtenus indiquent que l'approche suivie permet d'appréhender finement et au niveau cytotologique, les mécanismes de l'interaction champignon pathogène-plante parasite. Ils valident également la pertinence de l'analyse par imagerie multi-échelles de cette interaction pour acquérir les connaissances nécessaires et envisager le biocontrôle de la plante parasite *P. ramosa* par des champignons pathogènes d'origine tellurique.

MOTS-CLES

Germination, Haustorium, Microscopie électronique, Microscopie confocale, Pathogènes fongiques.

INTRODUCTION

Les plantes parasites sont un groupe diversifié d'Angiospermes qui possèdent un organe caractéristique, l'haustorium, pour se connecter à une plante hôte et y prélever l'eau et les nutriments dont elles ont besoin pour leur

développement. Cette connexion constitue un pont fonctionnel et structurel entre l'hôte et son parasite. Les plantes parasites sont ubiquistes et souvent classées en fonction de leur mode trophique (présence ou non de chlorophylle) et de leur point de fixation sur l'hôte (tige ou racine) [1]. Nous pouvons citer les cuscutes et les orobanches parmi les plantes parasites non chlorophylliennes, le gui ou certaines espèces de santal parmi les hémiparasites possédant des pigments chlorophylliens [2]. Elles affectent à différents degrés leurs plantes hôtes en impactant directement leur croissance, leur morphologie, voire leur faculté reproductrice et indirectement leur compétitivité, leur distribution ainsi que les organismes et services écosystémiques associés à ces plantes hôtes [3]. Elles jouent donc un rôle majeur dans la diversité des communautés naturelles, fournissant de nouvelles niches microbiotiques et par ailleurs, elles peuvent être utilisées en médecine et en foresterie [2]. Néanmoins, quand elles affectent des plantes d'intérêt agronomique et/ou environnemental, ces plantes parasites sont qualifiées de nuisibles. En effet, parmi les 280 genres de plantes parasites, 12 d'entre elles ont un impact sur l'économie agricole mondiale [1, 4, 5]. Les plantes adventices parasites diminuent fortement le rendement des cultures et génèrent des pertes économiques importantes dans de nombreux pays. Par exemple, en Afrique, *Rhampicarpa fistulosa* et *Striga* spp. infestent les cultures de maïs, millet, perle, riz, sorgho, canne à sucre causant jusqu'à 199 millions de dollars US de pertes [6]. Les orobanches sont, quant à elles, des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche* répandues en Australie du Sud, en Chine et en Europe [4, 7]. Par exemple, l'orobanche du tournesol infeste les régions du nord de la Chine. Ces dernières sont d'importantes régions productrices et peuvent perdre 100% du rendement de leurs cultures [4, 8].

En France, *Phelipanche ramosa* parasite plusieurs plantes cultivées telles que le colza d'hiver (*Brassica napus* L.), le tabac (*Nicotiana tabacum*), et le chanvre (*Cannabis sativa*) [9, 10, 11]. Aujourd'hui, la distribution du parasite s'étend à tout le pays [10, 12]. A la fin des années 90, les cultures de *B. napus* sont devenues une cible privilégiée de *P. ramosa* dans l'Ouest de la France. Depuis plusieurs décennies, *B. napus* est une culture majeure en France sur 1,5 million d'hectares et elle fournit 26% de la production européenne (FAOSTAT,

<https://www.fao.org/faostat/en/#home>). *Phelipanche ramosa*, dépourvue de chlorophylle, est une plante parasite épirhize obligatoire qui germe à proximité des racines de la plante hôte. *Phelipanche ramosa* se développe d'abord sous terre, puis émerge à la surface du sol pour s'épanouir et fructifier. A la fin de son cycle, une plante de *P. ramosa* peut produire des centaines de milliers de graines et augmenter considérablement son stock semencier dans le champ. La moitié du cycle de vie de *P. ramosa* se déroule dans la rhizosphère, ce qui rend son contrôle au champ difficile [5, 10]. De multiples stratégies de gestion ont été envisagées parmi les méthodes culturales et chimiques traditionnelles [13, 14]. Cependant, ces méthodes conventionnelles ne sont pas suffisamment efficaces car *P. ramosa* présente des traits biologiques spécifiques [15]. Aujourd'hui, dans le cadre du projet Ecophyto II+, les pratiques agricoles émergentes doivent réduire l'utilisation des produits chimiques habituels et leurs conséquences sanitaires [16]. Pour atteindre cet objectif, Petit *et al.* [17] mettent en avant la biodiversité des agroécosystèmes pour réguler les plantes adventices. Il s'agit en particulier d'optimiser les interactions biotiques qui sont des régulateurs naturels afin de promouvoir les mécanismes de biocontrôle des plantes adventices [18].

Dans le cas des infestations de *P. ramosa* dans les cultures de *B. napus*, la lutte biologique doit agir dans la rhizosphère car d'une part, c'est une composante importante du cycle de *P. ramosa* mais surtout, ce sont les premiers stades du développement de la plante parasite qu'il faut contrôler, si possible avant qu'elle ne se fixe aux racines de la plante hôte [14, 19]. La rhizosphère abrite divers macro et microorganismes dont certains peuvent être des agents pathogènes et d'autres, des antagonistes de ces derniers [20, 21]. Des champignons mycorhiziens, des souches de *Trichoderma* spp., de *Coniothyrium minitans* et de *Clonostachys rosea* sont déjà utilisés comme agents de biocontrôle de champignons phytopathogènes présents dans le sol [22, 23, 24]. La diversité des exigences écologiques que présentent les champignons du sol permet de penser que certains puissent être pathogènes de *P. ramosa* sur la base de mécanismes différents [25]. Le champignon peut produire des métabolites toxiques ou inhibiteurs de certaines étapes du développement de *P. ramosa* (antibiose ou interférence contre *P. ramosa*).

C'est le mode d'action de *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, qui produit des acides aminés, la L-leucine et la L-tyrosine, inhibant l'extension du procaulôme des graines de la plante parasite *Striga* en Afrique [26]. Une souche fongique peut simplement pénétrer et coloniser les vaisseaux de *P. ramosa* comme dans le cas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* avec la tomate [27, 28]. Dans ce cas, nous pourrions parler d'hyperparasitisme puisqu'un champignon parasite une plante elle-même parasite. La souche fongique peut également induire la résistance de la plante qu'elle colonise pour la protéger de ses agresseurs [29]. Une souche non pathogène de *F. oxysporum* peut contrôler une souche pathogène de *F. oxysporum* ou de *Verticillium dahliae* ou un nématode comme *Meloidogyne incognita* à travers l'induction de la résistance des plantes de tomate [29, 30, 31, 32]. Enfin, la souche fongique pourrait combiner toutes ces stratégies et être plus efficace [20]. Par conséquent, le candidat idéal de biocontrôle contre *P. ramosa* remplirait les trois critères ci-dessous :

- a. Réduire et/ou arrêter le développement de *P. ramosa* dans un champ (inhibition de la germination des graines, inhibition de la fixation des graines germées aux racines de *B. napus*, activité nécrotique intense sur les tubercules se développant après la fixation de *P. ramosa* aux racines de *B. napus*, inhibition de la croissance ou parasitisme de *P. ramosa* ayant échappé aux étapes précédentes de contrôle des premiers stades de son développement),
- b. Stimuler les réactions de défense de l'hôte et ainsi favoriser la croissance de *B. napus*,
- c. Ne pas produire de mycotoxines nuisibles à la consommation humaine.

Dans la littérature, les champignons du genre *Fusarium* font partie des pathogènes fongiques les plus importants économiquement et scientifiquement [33]. Malgré un large spectre d'hôtes pour le genre, il existe une spécificité d'hôte ou formes spéciales plus stricte au sein de certaines espèces [34, 35, 36]. En outre, les espèces de *Fusarium* sont des hémibiotrophes répertoriés comme des pathogènes responsables de fonte des semis, de pourriture des racines ou de flétrissement [16, 36, 37]. Par conséquent, nous

nous sommes focalisés sur le genre *Fusarium* dans cette étude et notre objectif est d'étudier le mode de colonisation des souches de *Fusarium* dans la co-culture *P. ramosa*/*B. napus* pendant la phase souterraine de *P. ramosa*.

Dans ce contexte, nous avons posé comme postulats que (i) le microbiote de *P. ramosa* abrite une gamme d'espèces fongiques parmi lesquelles se trouvent des agents pathogènes potentiels, (ii) certaines de ces souches fongiques sont des agents pathogènes endophytes de *P. ramosa* car elles ont été isolées à partir de *P. ramosa* symptomatiques désinfectées en surface, (iii) les stades souterrains de *P. ramosa* sont les stades de développement à cibler pour une régulation plus efficace.

Sur la base de ces postulats, nous avons mené une étude de micromorphologie des graines de *P. ramosa* au cours des stades précoces du parasitisme permettant d'illustrer l'effet biologique. L'objectif de la présente publication est de décrire et comprendre la colonisation fongique des tissus de *P. ramosa* en combinant plusieurs approches d'imagerie, la microscopie confocale à balayage laser (MCBL) et les microscopies électroniques à balayage et à transmission (MEB et MET).

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel végétal

Les hampes florales de *P. ramosa* ont été récoltées au stade de fructification le 4 juillet 2019 dans une parcelle cultivée en colza (*B. napus* L.) située dans la commune de Saint-Maxire (79). Les hampes florales ont ensuite été frottées au-dessus d'une pile de trois tamis (800 µm, 425 µm, 125 µm) afin de récupérer les graines sans résidus. Toutes les graines tamisées ont été conservées dans des récipients en verre étanches, à environ 20 °C jusqu'au début des expériences.

Les graines de *B. napus*, de la variété ES IMPERIO sensible à *P. ramosa*, ont été fournies par Euralis (lot n°F0440E268007EX) et ont été utilisées pour les co-cultures de *P. ramosa* en chambre climatique. Avant utilisation, les graines

ont été désinfectées en surface avec de l'éthanol à 70% pendant dix minutes puis avec de l'hypochlorite de calcium $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ à 3% pendant 30 minutes et enfin, elles ont été lavées dix fois avec de l'eau stérile pendant dix minutes à chaque fois. Pendant les différents bains, les graines de colza étaient placées sur un agitateur à rotor (325 rpm) pour faciliter leur désinfection. Enfin, les graines ont été mises à germer sur un papier filtre humidifié dans une boîte en plastique scellée, dans l'obscurité, à 23 °C le jour et 18 °C la nuit préalablement à leur utilisation pour les expérimentations.

2. Matériel fongique

Dans le cadre de la thèse de D. Cartry [38], des souches fongiques du genre *Fusarium*, ont été isolées de hampes florales symptomatiques de *P. ramosa*, purifiées par obtention de monospores, identifiées par des méthodes moléculaires et cryo-préservées dans la collection de microorganismes d'intérêt agronomique et environnemental (MIAE) à l'UMR Agroécologie, INRAE de Dijon [38]. Ces souches ont été testées pour leur aptitude à inhiber la germination des graines de *P. ramosa* et, à l'issue de ces tests, trois souches présentant des taux d'inhibition de la germination des graines de *P. ramosa* très différents seront retenues pour l'analyse microscopique comparativement à i) la souche de *Fusarium oxysporum* Fo47 isolée du sol, non pathogène et non inhibitrice de la germination des graines de *P. ramosa* [29] et à ii) la souche de *Fusarium oxysporum* 2108 décrite dans la littérature [39] comme pathogène de *P. ramosa* (pathovar tomate, *Lycopersicon esculentum*).

3. Test de pathogénicité du genre *Fusarium* sur le pathosystème *P. ramosa*/*B. napus*

3.1. Inhibition de la germination des graines de *P. ramosa* par les souches de *Fusarium* en conditions *in vitro*

Les souches fongiques ont été cultivées pendant sept jours sur milieu potato dextrose agar (PDA, 34 g L⁻¹) en boîtes de Petri (Ø 40 mm). Cinq mL d'un milieu minimum liquide sans glucose (MML : NaNO_3 2 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, et 2mL d'une solution d'oligo-éléments. La solution d'oligo-éléments contenait : acide citrique 5 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,75 g/L,

Fe (NH₄)²⁺-(SO₄)²⁻-6H₂O 1 g/L, CuSO₄-5H₂O 0,25 g/L, MnSO₄-H₂O 50 mg/L, H₃BO₄ 50 mg/L et NaMoO₄-2H₂O 50 mg/L) ont été déposés sur la colonie fongique. Cette dernière a été raclée avec une pointe de cône stérile et la suspension de propagules résultante a été diluée dans 20 mL de MML.

Après deux semaines de pré-conditionnement dans l'obscurité à 20 °C sur un filtre en papier humide, les graines de *P. ramosa* ont été transférées dans une nouvelle boîte de Petri (Ø 90 mm) sur un filtre en papier Whatman® GF/A préalablement trempé dans 3 mL d'une suspension de propagules. Après une semaine d'incubation avec la suspension de propagules, les graines de *P. ramosa* sont transférées sur un nouveau filtre en papier Whatman® GF/A imbibé d'une solution de GR24 (3 mL à 0,1 mg/L) un stimulant synthétique de la germination des graines. Un témoin négatif a été préparé avec uniquement du MML comme solution imbibant le filtre en papier. Après sept jours d'incubation, toutes les graines non germées et toutes les graines germées qui présentaient un tube germinatif ou procaulôme émergeant ou mature ont été comptées sous un microscope stéréoscopique (1,95x-250x, Carl Zeiss Stemi 2000-C, 444036-9000). Pour vérifier si les graines sont encore viables ou mortes, un test de viabilité a été effectué sur toutes les graines à la fin de l'expérience. Trois mL de chlorure de 2,3,5-triphényl tétrazolium (TTC, Sigma) à 1% ont été ajoutés sur une nouvelle feuille de papier Whatman® GF/A (Ø 90 mm), et les graines ont été placées sur cette feuille. Les plaques ont été enveloppées dans des feuilles d'aluminium et placées dans un four de séchage à 40 °C. Après 48 h, les graines ont été transférées sur une nouvelle feuille de papier Whatman® GF/A (Ø 90 mm) préalablement imbibée de 3 mL d'une solution d'hypochlorite de sodium (1% HClO) et incubées pendant au moins 20 minutes. Les graines dont l'embryon ne présentaient aucune coloration au rouge carmin ont été considérées comme non viables [40].

3.2. Pathogénicité de *Fusarium* sur le pathosystème *P. ramosa*/B. napus

La pathogénicité du *Fusarium* envers le pathosystème *P. ramosa*/B. *napus* a été testée en suivant le protocole de la **Figure 1**. Le substrat composé d'un tiers de sable (Biot B4) et de deux tiers de terre limoneuse de Bretenière (21000, France) a été stérilisé trois fois à 120 °C à 24 heures d'intervalle et laissé reposer

pendant 8 jours pour évaporer les éventuels composés volatils toxiques. Au fond des pots plastiques d'un litre, un papier filtre stérile a été recouvert de 200 mL de billes d'argile (\varnothing 8-16 mm) et de 450 mL de substrat préalablement stérilisé à l'autoclave 120 °C 3 fois, 20 minutes. Les graines de *B. napus* préalablement désinfectées ont germé sur un papier humide dans l'obscurité à 23 °C/18 °C (jour/nuit) dans une boîte de Petri (15 graines par boîte de Petri) pendant cinq jours. Les graines de *P. ramosa* ont été désinfectées et pré-conditionnées pendant deux semaines à 20 °C dans l'obscurité sur un papier filtre humide. Les souches de *Fusarium* retenues à l'issue des tests d'inhibition de germination ont été testées dans deux chambres climatiques séparées contenant chacune les modalités témoins suivantes : la souche de *Fusarium* isolée du sol, non inhibitrice de la germination des graines d'orobanche et considérée comme non pathogène, la souche de *Fusarium*, inhibitrice de la germination mais décrite dans la littérature comme pathogène de *P. ramosa* pathovar tomate [39] et le témoin sans inoculation fongique. Un total de 15 pots sont préparés par souche de *Fusarium*. Les isolats de *Fusarium* ont été cultivés dans un milieu malt liquide (10 g/L) agité pendant cinq jours à 125 rpm et 25 °C. Les milieux et les cultures fongiques qu'ils contiennent ont été filtrés à travers des filtres en verre fritté 40-100 μ m. Les suspensions de spores obtenues ont été centrifugées à 14 000 rpm pendant 20 minutes, remises en suspension dans de l'eau stérile, comptées et les concentrations ont été ajustées pour être équivalentes entre tous les isolats (105 spores par mL de substrat). Parallèlement, les graines de *B. napus* ont été désinfectées comme décrit précédemment et mises à germer pendant cinq jours à l'issue de quoi, les racines d'une plantule de *B. napus* ont été placées sur le papier filtre contenant les graines de *P. ramosa*. Le jour de l'inoculation, correspondant à T0, trois mL de la suspension de spores ont été directement inoculés sur les graines de *P. ramosa* placées sur le même papier filtre. Un autre papier filtre a recouvert les racines de *B. napus*, les graines de *P. ramosa* et l'inoculum fongique. Enfin, tous ces éléments ont été placés dans une boîte de Petri perforée, elle-même placée dans le pot et le tout a été recouvert de substrat. Les pots ont été incubés dans une chambre climatique avec 16 heures de lumière (jour) à 25 °C et 8 heures d'obscurité (nuit) à 18 °C. Après 19 jours de

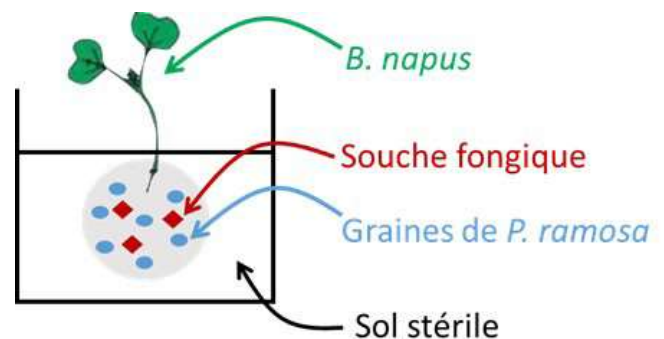
culture, cinq pots de chaque modalité ont été prélevés et les plantes dépotées. Les racines de *B. napus* et les papiers filtres ont été soigneusement récupérés pour compter et noter chaque individu de *P. ramosa* (tubercules, bourgeons, tige souterraine et aérienne). Des isollements microbiologiques ont été réalisés à partir du sol, des racines de *B. napus* et des jeunes *P. ramosa*, pour s'assurer de la présence des souches de *Fusarium* inoculées dans les pots.

4. Observation de l'interaction tripartite *Fusarium/P. ramosa/B. napus* en microscopie électronique

4.1. Traitement des échantillons pour la cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-MEB)

La préparation des échantillons pour la cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-MEB) nécessite une étape de cryo-fixation avant observation à froid dans le microscope. Les graines ont été traitées avec ou sans le stimulant de germination GR24 et une suspension de *Fusarium* comme décrit ci-dessous avant la préparation cryo-MEB.

Figure 1 : Dispositif expérimental pour les tests de pathogénicité des souches fongiques contre *P. ramosa*. Un pot contenait une seule souche fongique et une plante de *B. napus*. Dans l'expérience en chambre climatique, les propagules fongiques, les graines de *P. ramosa* et les racines de *B. napus* ont été placées ensemble sur un papier filtre (en gris).



Tous les échantillons ont été fixés et dégazés une heure dans une solution composée de 2,5% de glutaraldéhyde et 2% de paraformaldéhyde dans un tampon phosphate 0,1M. Les échantillons ont été rincés trois fois dans le tampon 0,1M et placés sur du ruban carbone. Les échantillons sont cryo-fixés dans l'azote pâteux puis transférés dans le microscope à l'aide de l'unité de transfert cryogénique Quorum (réf : PP3010T). L'étape de cryo-fixation permet de préserver les échantillons biologiques dans un état hydraté proche de leur état naturel. Les observations dans le microscope électronique à balayage

Hitachi SU8230 sont réalisées à froid avec la platine cryogénique Quorum PP3010T (-170 °C). Une étape de sublimation permet ensuite d'éliminer la glace exogène, dans l'unité de transfert cryogénique. Une métallisation est réalisée, si nécessaire, dans l'unité de transfert cryogénique du MEB.

4.2. Traitement des échantillons pour la microscopie électronique à transmission (MET)

Les jeunes tubercules de l'expérience de co-culture ont été récoltés et fixés comme décrit précédemment : une heure à 4 °C avec dégazage et stockage à 4 °C. Les échantillons ont ensuite été enrobés d'agarose inerte à bas point de fusion pour permettre une manipulation plus aisée des jeunes stades de *P. ramosa*. Après fixation, les échantillons sont rincés 5 fois dans le tampon phosphate 0,1M (pH 7,2) et post-fixés avec 1% de tétr oxyde d'osmium pendant une heure à 4 °C. Ils ont ensuite été rincés 3 fois avec ce même tampon phosphate et rincés une fois avec de l'eau. Pour leur déshydratation, les échantillons ont été immergés dans des bains d'éthanol gradués (6 bains de 20 minutes et une nuit pour l'éthanol 70%) puis imprégnés dans de la résine époxy Spurr. La polymérisation de la résine a été réalisée à 60 °C pendant 48 h. Les échantillons contenus dans les blocs de résine polymérisée ont été coupés avec un couteau diamant pour obtenir des sections ultrafines de 70 nm à 90 nm. Les sections ultrafines déposées sur des grilles de cuivre (200-300 mesh) ont été contrastées classiquement avec des solutions commerciales (Uranyless® et citrate de Plomb, EMS, USA). Les observations en microscopie électronique à transmission ont été réalisées avec le microscope Hitachi HT7800. Les images ont été obtenues avec deux caméras numériques de technologie CMOS, modèles AMT (4 millions de pixels en haut de la colonne et 43 millions de pixels en bas de la colonne, caméra ultra haute résolution nanoSprint43 AMT, USA).

4.3. Traitement des graines de *P. ramosa* pour la microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Visualiser une graine dans son intégralité sans réaliser de coupes est possible grâce à la clarification ou transparençation des différents tissus la constituant.

De plus, cette technique permet d'observer la colonisation des graines clarifiées par un champignon *via* le microscope confocal. Les observations en microscopie confocale à balayage laser (MCBL) ont été réalisées avec le microscope Leica SP8. Les graines d'orobanche sont des échantillons de petites tailles avec une paroi cellulosique colorée et différents compartiments cellulaires opacifiant une observation directe. La transparenisation ou clarification des tissus du tégument permet de supprimer ou de réduire l'opacité des cellules due aux lipides membranaires sans endommager les cellules, de décolorer les pigments et ce grâce à des solutions clarifiantes tout en homogénéisant l'ensemble des indices de réfraction des composés de l'échantillon et des milieux traversés pour limiter les phénomènes de réfraction et de diffusion.

A partir des graines de *P. ramosa* issues du sol rhizosphérique, le protocole de Hériché *et al.* [41] a été appliqué. Il nécessite une étape de transparenisation avec le TDE (2,2'-thiodiethanol) et ClearSee®, produits clarifiants utilisés pour la transparenisation des tissus végétaux [42, 43]. Les graines de *P. ramosa* ont été traitées pendant trois semaines avant d'être marquées à l'iodure de propidium (IP). L'observation des graines au microscope sous lumière blanche et fluorescence (laser 488 nm) révèle également l'auto-fluorescence de la graine.

RESULTATS

1. Caractérisation de la pathogénicité du genre *Fusarium* sur les graines de *P. ramosa* et leur germination

Les tests d'inhibition de la germination des graines de *P. ramosa* par les différentes souches de *Fusarium*, appartenant à plusieurs espèces au sein de ce genre ont mis en évidence une très grande variabilité dans cette aptitude inhibitrice et celle-ci n'est pas liée à l'espèce mais relève d'un caractère de souche. C'est pourquoi nous avons retenu pour cette étude trois souches présentant des taux d'inhibition fort, modéré et faible de la germination des graines de *P. ramosa*. Il s'agit de la souche *F. avenaceum* 7601 (taux d'inhibition

90,7%), *F. brachygibbosum* 7586 (taux d'inhibition 72,2%) et *F. solani* 7619 (taux d'inhibition 13,1%). A ce panel ont été ajoutées la souche *F. oxysporum* Fo47 isolée du sol et non pathogène [29] (taux d'inhibition 0%) et la souche *F. oxysporum* 2108, présentant un taux d'inhibition (65,5%), certes proche de celui de la souche 7586, mais isolée en Italie en 2004 et décrite comme pathogène par Boari et Vurro [39].

Afin d'étudier, par des techniques de microscopie, la colonisation des graines de *P. ramosa* par des souches de *Fusarium*, nous nous sommes intéressés aux deux souches *F. avenaceum* 7601 et *F. oxysporum* 2108, différemment inhibitrices de la germination des graines de la plante parasite mais affectant significativement et de la même manière la viabilité des graines de *P. ramosa* (35% de viabilité après confrontation). Il s'agit de comprendre comment le différentiel d'activité inhibitrice de germination exprimé par ces deux souches aboutit à un même impact sur la viabilité des graines. Au préalable, il était nécessaire d'observer finement la structure des graines de *P. ramosa* mature issue de la rhizosphère de *B. napus*.

L'imagerie MEB et MCBL (respectivement, **Figure 2A** et **2B**) montrent des graines de plante parasite mesurant environ 200 µm de largeur sur 400 µm de longueur. Elles présentent généralement une forme ovoïde. Le micropyle (Mi) se situe le plus souvent au niveau de la zone la plus étroite de la graine, à l'opposé de la zone chalazienne (Ch) plus arrondie. Des perforations régulières (**Figure 2A**, flèches) sont observables autour du micropyle. Le tégument réticulé de la graine est composé de volumineuses cellules déshydratées formant un ensemble d'alvéoles irrégulières (**Figure 2A** et **2B**, *). Ce même tégument est marqué à l'iodure de propidium (marquage des parois, têtes de flèche noires) et fluoresce orange au MCBL (**Figure 2B**). En MCBL, l'auto-fluorescence verte permet de visualiser les débris du sol à la surface de la paroi externe (**Figure 2B**, flèche). Cette même auto-fluorescence (fixation aldéhydique) met en évidence l'albumen et l'embryon, parfois visible sous le tégument de la graine. L'analyse des graines de *P. ramosa* récoltées à partir de hampes florales matures, désinfectées, pré-conditionnées et sans inoculation de souche fongique a ensuite été réalisée au MEB. Des perforations régulières sont à nouveau observables autour du micropyle (**Planche 1A**, flèches) ainsi que

les alvéoles et les ponctuations du tégument (**Planche 1A**, tête de flèches). Les alvéoles du tégument sont plus régulières que précédemment (**Figure 2A**), certainement dû à la réhydratation de la graine lors de son pré-conditionnement.

Lorsque la graine est au contact du stimulant synthétique de germination, le GR24, le procaulôme (Pr) émerge de la zone micropylaire avec une forme vrillée et une extrémité mesurant en moyenne 100 µm (**Planche 1B**). La germination provoque l'apparition de nouvelles perforations dans le tégument de la graine (**Planche 1B**, flèches).

Après inoculation de la souche fongique 2108, témoin positif, les réticulations du tégument sont plus marquées et les ponctuations plus nombreuses (**Planche 1C**, flèches). De même en présence de GR24, le procaulôme (Pr) est plus court et son extrémité est déstructurée (**Planche 1D**).

Après inoculation de la souche fongique 7601, les réticulations marquées et les nombreuses ponctuations sont également visibles (**Planche 1E**, flèches) et un affaissement des tissus est observable. De plus, la souche fongique s'est développée sur la graine de *P. ramosa* au travers de quelques filaments mycéliens traversant le tégument (**Planche 1E**, têtes de flèche). Après ajout de GR24, les filaments mycéliens de la souche 7601 ont colonisé efficacement le tégument de la graine notamment au niveau du micropyle (**Planche 1F**, têtes de flèche) ce qui montre une sensibilité plus importante de la graine après stimulation de la germination.

Germination d'une graine de *P. ramosa* pré-conditionnée et après sept jours de contact avec la souche fongique *F. avenaceum* 7601, suivi de sept jours en présence du GR24. Présence d'hyphes fongiques (flèches). Ch, chalaze ; Mi, micropyle arrondie. Pr, procaulôme.

2. Caractérisation de la pathogénicité du genre *Fusarium* sur le pathosystème *P. ramosa*/*B. napus*

2.1. Co-culture de *B. napus* et *P. ramosa* en sol désinfecté sans inoculum fongique (SIF)

Afin de comparer le mode de colonisation de ces quatre souches, il est

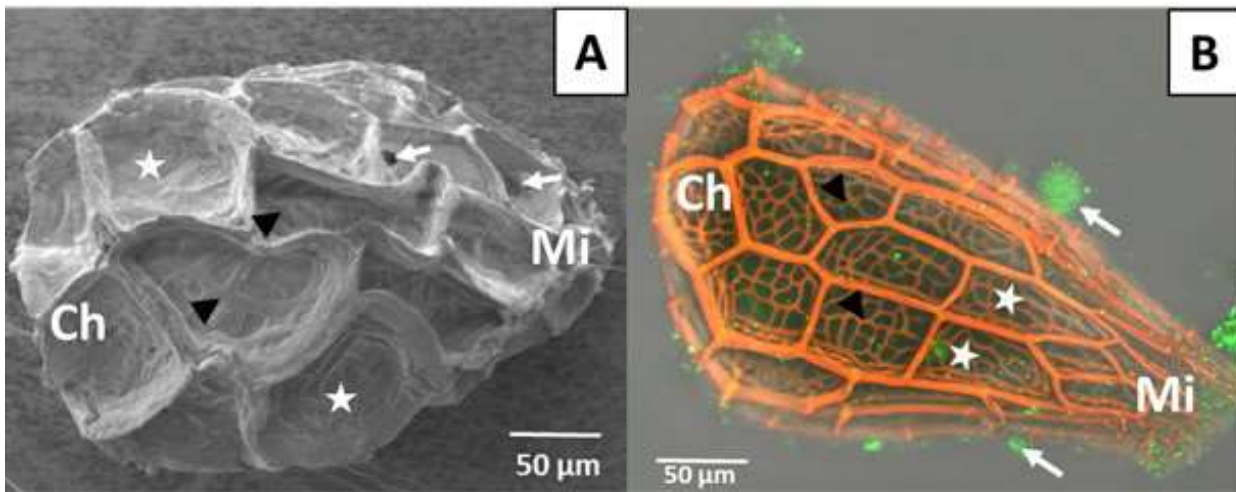


Figure 2 : (A) Aspect morphologique d'une graine de *P. ramosa* mature issue de la rhizosphère du colza montrant l'ornementation réticulée du tégument (tête de flèches) ainsi que les ponctuations (flèches). Ch, chalaze ; Mi, micropyle arrondie. (B) Aspect morphologique d'une graine de *P. ramosa* mature issue de la rhizosphère du colza dont les tissus du tégument sont transparisés, marqués à l'iodure de propidium pour visualiser les parois et auto-fluorescence des tissus fixés avec fixation aldéhydrique (microscopie confocale à balayage laser, superposition des images lumière blanche et fluorescence après marquage à l'iodure de propidium). Les débris du sol auto-fluorescent à la surface du tégument (flèches). Ch, chalaze ; Mi, micropyle arrondie. Ensemble d'alvéoles (★).

important de décrire au préalable le parasitisme de *P. ramosa* sur les racines de *B. napus* sans inoculation de souche fongique (**Figure 3**). Après la germination, les graines de *P. ramosa* donnent ainsi naissance à un procaulôme (flèche) qui se dirige par chimiotropisme vers les racines de *B. napus*. Ce procaulôme les pénètre en dissolvant les parois cellulaires racinaires pour ensuite former un haustorium terminal (**Figure 3**).

Suite à l'établissement de la connexion vasculaire de *B. napus* par l'haustorium, *P. ramosa* développe un tubercule souterrain en dehors de la racine hôte (**Planche 2**). Sur notre échantillon, la graine de *P. ramosa* (Gp) est encore visible à l'extrémité du tubercule (Tp) qui est prépondérant sur la racine de *B. napus* (Rb) (**Planche 2A**). Au début de son développement, ce jeune tubercule est constitué essentiellement de tissus méristématiques permettant par la suite l'édification de vaisseaux conducteurs et un parenchyme de réserve. Ce jeune tubercule est donc majoritairement composé de cellules parenchymateuses à paroi fine et à forme irrégulière qui envahissent les tissus de *B. napus* (**Planche 2B**).

L'observation de la racine de *B. napus* (**Figure 4**) montre une structure

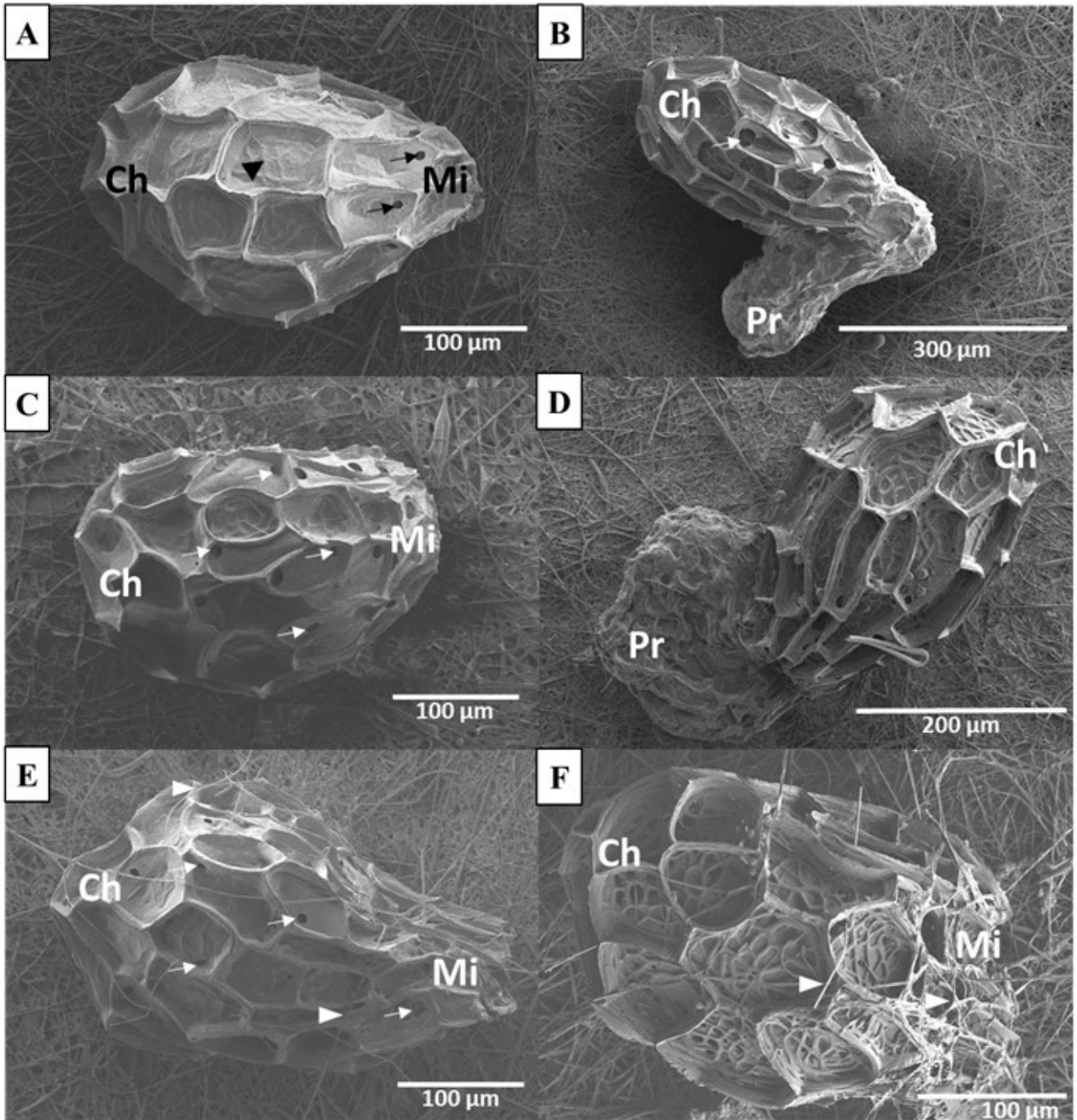


Planche 1 : (A) Aspect morphologique d'une graine désinfectée de *P. ramosa* après trois semaines de pré-conditionnement. Ornementation réticulée du tégument ainsi que les ponctuations ou microfibrilles des cellules du tégument (tête de flèche). (B) Graine de *P. ramosa* après pré-conditionnement et sept jours de contact avec le stimulant synthétique de germination, GR24. (C) Aspect morphologique d'une graine de *P. ramosa* après pré-conditionnement et sept jours de contact avec la souche *F. oxysporum* 2108. (D) : Germination d'une graine de *P. ramosa* après sept jours de contact avec la souche *F. oxysporum* 2108, suivi de sept jours en présence du GR24. (E) Aspect morphologique d'une graine de *P. ramosa* après pré-conditionnement et sept jours de contact avec la souche *F. avenaceum* 7601. (F)

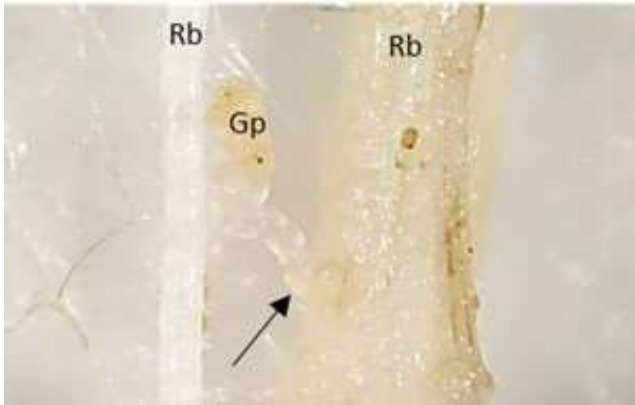


Figure 3 : Procaulôme (flèche) de *P. ramosa* parasitant une racine de *B. napus* sans inoculum fongique, observation à l'aide d'une loupe binoculaire. Rb, racine de *B. napus* ; Gp, graine de *P. ramosa*.

classique de dicotylédones avec au centre le cylindre central qui est composé d'autant de couches de cellules que le cortex en périphérie. Ce dernier est constitué de l'épiderme (E) composé d'une couche ultrapériphérique de petites cellules rectangulaires jointives et du parenchyme cortical (Pc) caractérisé par de grandes cellules irrégulières avec de larges vacuoles plaquant le cytoplasme contre la membrane plasmique et la paroi cellulosique. Entre le cortex et le cylindre central, l'assise cellulaire de l'endoderme montre des cellules étroitement jointives entourant le cylindre central. Les parois tangentiels externes et internes des cellules de l'endoderme possèdent une bande imprégnée de subérine, le cadre de Caspary. Cette interface joue un rôle important dans la régulation de flux de substances entre l'écorce et les tissus conducteurs. Au niveau du cylindre central, les tissus conducteurs forment deux arches qui s'alternent. Les grandes cellules à paroi lignifiée et ponctuée constituent le métaxylème (Mx) et assurent la circulation de la sève brute à côté des cellules du phloème dans laquelle la sève élaborée passe. L'observation du tubercule de *P. ramosa* montre que la zone de pénétration de ce tubercule se reconnaît par un amas de petites cellules désorganisées

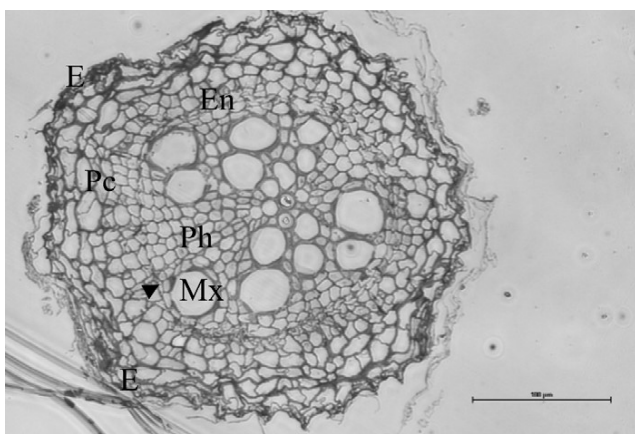


Figure 4 : Section de racine de *B. napus* (colza) (microscope photonique). Le cadre de Caspary est indiqué par la tête de flèche. Echelle = 100 µm. E, épiderme de *B. napus* ; Pc, parenchyme cortical ; En, endoderme ; Mx, métaxylème ; Ph, phloème.

colonisant la moitié de la racine de colza (**Planche 2C**). En effet, les cellules intrusives allongées passent au travers de l'épiderme (E), du parenchyme corticale (Pc) jusqu'au tissu du métaxylème de *B. napus* (Mx). Ce dernier est reconnaissable par ses grandes cellules à paroi ponctuée et épaisse, donc lignifiée (Po) au centre de la racine qui permettent la circulation de la sève brute (**Planche 2C et 2D**). Les cellules du métaxylème de *B. napus* sont déformées au contact des cellules de *P. ramosa* (*) (**Planche 2C**). La connexion entre *P. ramosa* et *B. napus* se traduit par un accolement des vaisseaux lignifiés du xylème de *P. ramosa* (Xp) avec les vaisseaux lignifiés du métaxylème (Mx) de *B. napus* (**Planche 2D**).

Dans ce tubercule, *P. ramosa* accumule de fortes concentrations d'amidon sous forme de grains qui participeraient au gradient osmotique entre la plante hôte et la plante parasite [1]. Au niveau de l'ultrastructure cellulaire, les cellules de *P. ramosa* sont reconnaissables par une abondance de grains d'amidon (Ga) et d'inclusions lipidiques (Li) dans les cellules parenchymateuses (**Planche 2E**).

Gp, graine de *P. ramosa* ; Tp, tubercule de *P. ramosa* ; Rb, racine de *B. napus* ; Mx, métaxylème ; Pc, parenchyme cortical ; Po, ponctuations ; E, épiderme ; Xp, xylème de *P. ramosa*, Ga, grains d'amidon ; P, parenchyme médullaire ; Li, inclusions lipidiques.

2.2. Co-culture de *B. napus* et *P. ramosa* en présence de la souche *F. solani* 7619

Les observations microscopiques effectuées (**Planche 3**) montrent que les tubercules de *P. ramosa* (Tp) sont plus flétris en présence de la souche *F. solani* 7619, caractérisée comme très faiblement inhibitrice de la germination de *P. ramosa*, que les tubercules dans la modalité sans inoculation fongique (SIF) (**Planche 3A**). De plus, la structure des tubercules de *P. ramosa* est effondrée et peu reconnaissable (**Planche 3B**). Au niveau de l'haustorium, les cellules conductrices ont des parois plus fines et discontinues (**Planche 3C**). Cependant, les grains d'amidon

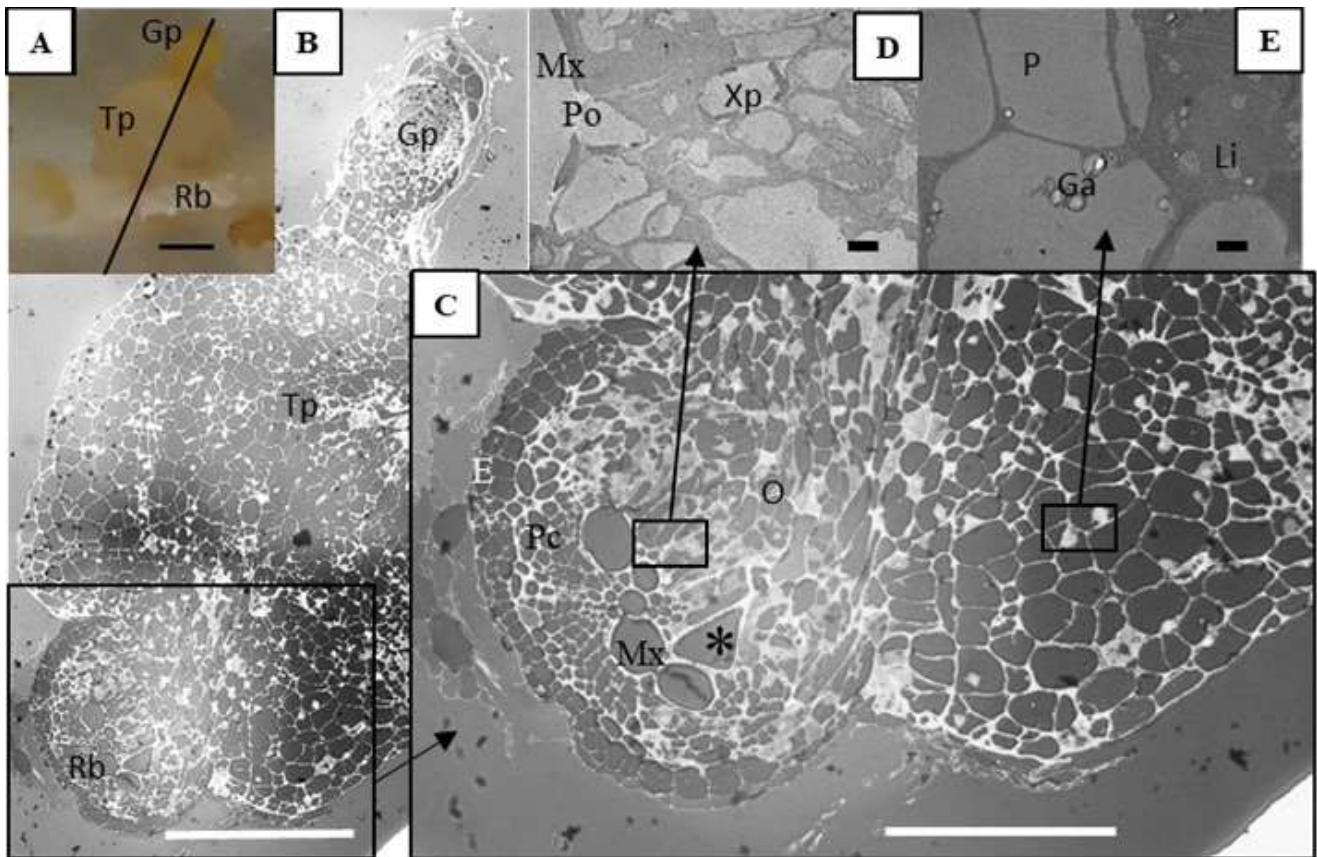


Planche 2 : aspect morphologique d'un jeune tubercule de *P. ramosa* fixé à une racine latérale de *B. napus* (colza). (2A) Observation du couple parasite orobanche rameuse et hôte colza à la loupe binoculaire illustrant l'axe de coupe pour la MET, échelle = 200µm. (2B) Coupe transversale d'un jeune tubercule de *P. ramosa* fixé à une racine latérale de *B. napus* colorée au bleu de toluidine observée au microscope photonique démontrant la taille importante du tubercule de *P. ramosa* comparé à la racine de *B. napus*, échelle = 200 µm. (2C) Détail de la zone de pénétration du tubercule d'orobanche rameuse dans la racine de *B. napus* observé au MET, mettant en évidence l'accolement des cellules de *P. ramosa* (O) sur la moitié de la racine de *B. napus* et la réorganisation des vaisseaux de *B. napus* (*), échelle = 200 µm. (2D) Détail de la zone de contact avec le xylème de *B. napus* montrant la présence de cellules du xylème de *P. ramosa* à proximité, échelle = 10 µm. (2E) Détail du parenchyme médullaire (P) du tubercule de *P. ramosa* où les grains d'amidons sont présents (Ga), échelle = 10 µm.

(Ga) restent nombreux et entiers dans les cellules du parenchyme de *P. ramosa*. Ces dernières sont très inégales, ont une paroi irrégulière (**Planche 3C**). A l'inverse, les tissus du colza sont réguliers et indemnes de matériel fongique (**Planche 3D**). Au niveau des cellules périphériques du tubercule, nous observons quelques spores fongiques (**Planche 3E**).

Gp, graine de *P. ramosa* ; Rb, racine de *B. napus* ; Tp, tubercule de *P. ramosa* ; T, tégument ; Cp, cellules parenchymateuses ; Ga, grains d'amidon ; Xp, xylème de *P. ramosa* ; Cc, cellules corticales.

2.3. Co-culture de *B. napus* et *P. ramosa* en présence de la souche *F. oxysporum* 2108

Avec l'inoculation de la souche 2108, décrite comme pathogène de *P. ramosa* pathovar tomate, nous observons que les tissus du jeune tubercule *P. ramosa* (Tp) sont écrasés et les contours sont moins nets que dans la modalité SIF (**Planche 4B**). De plus, la racine de *B. napus* s'est décollée du tubercule de *P. ramosa* ce qui montre une fixation moins stable que dans la modalité SIF. Dans le tégument ainsi que dans les cellules périphériques de l'albumen de la graine, un grand nombre de spores de champignons sont retrouvés (**Planche 4C, ***). Du matériel fongique remplit également le xylème de *P. ramosa* ainsi

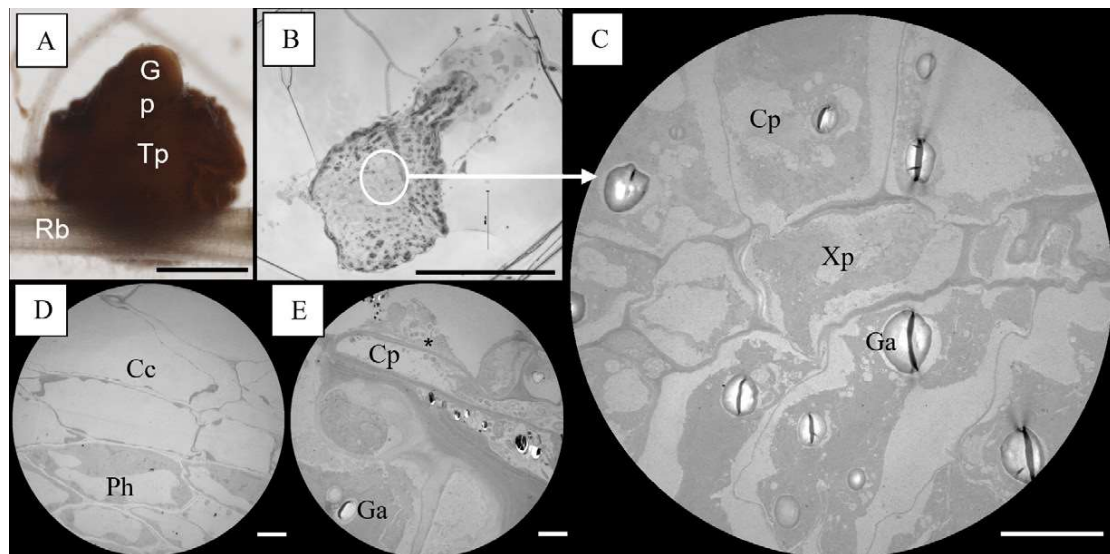


Planche 3 : aspect morphologique d'un jeune tubercule de *P. ramosa* fixé sur une racine de *B. napus* en présence de la souche *Fusarium solani* 7619. (3A) observation à la loupe binoculaire du jeune tubercule de *P. ramosa* fixé sur une racine de *B. napus* en présence de la souche 7619, échelle = 200 µm. (3B) Coupe transversale du jeune tubercule de *P. ramosa* colorée au bleu de toluidine en microscopie photonique montrant un aspect désorganisé du tubercule de *P. ramosa*, échelle = 200 µm. (3C) Détail des cellules conductrices de xylème (Xp) et parenchymateuses (Cp) de la coupe de *P. ramosa* – *B. napus* en présence de la souche 7619 observé au MET. Notez la forme discontinue des parois ainsi que les nombreux grains d'amidon (Ga), échelle = 5 µm. (3D) Détail des tissus de *B. napus* au MET, échelle = 5 µm. (3E) Détail des tissus vasculaires du colza au niveau de l'haustorium et des spores fongiques (étoile) au MET, échelle = 5 µm.

que les espaces intercellulaires des tissus de l'haustorium (**Planche 4D et 4E**). Les grains d'amidon présents dans les tissus de *P. ramosa* sont moins nombreux et détériorés en comparaison avec ceux présents dans les tubercules de la modalité SIF (**Planche 4F**).

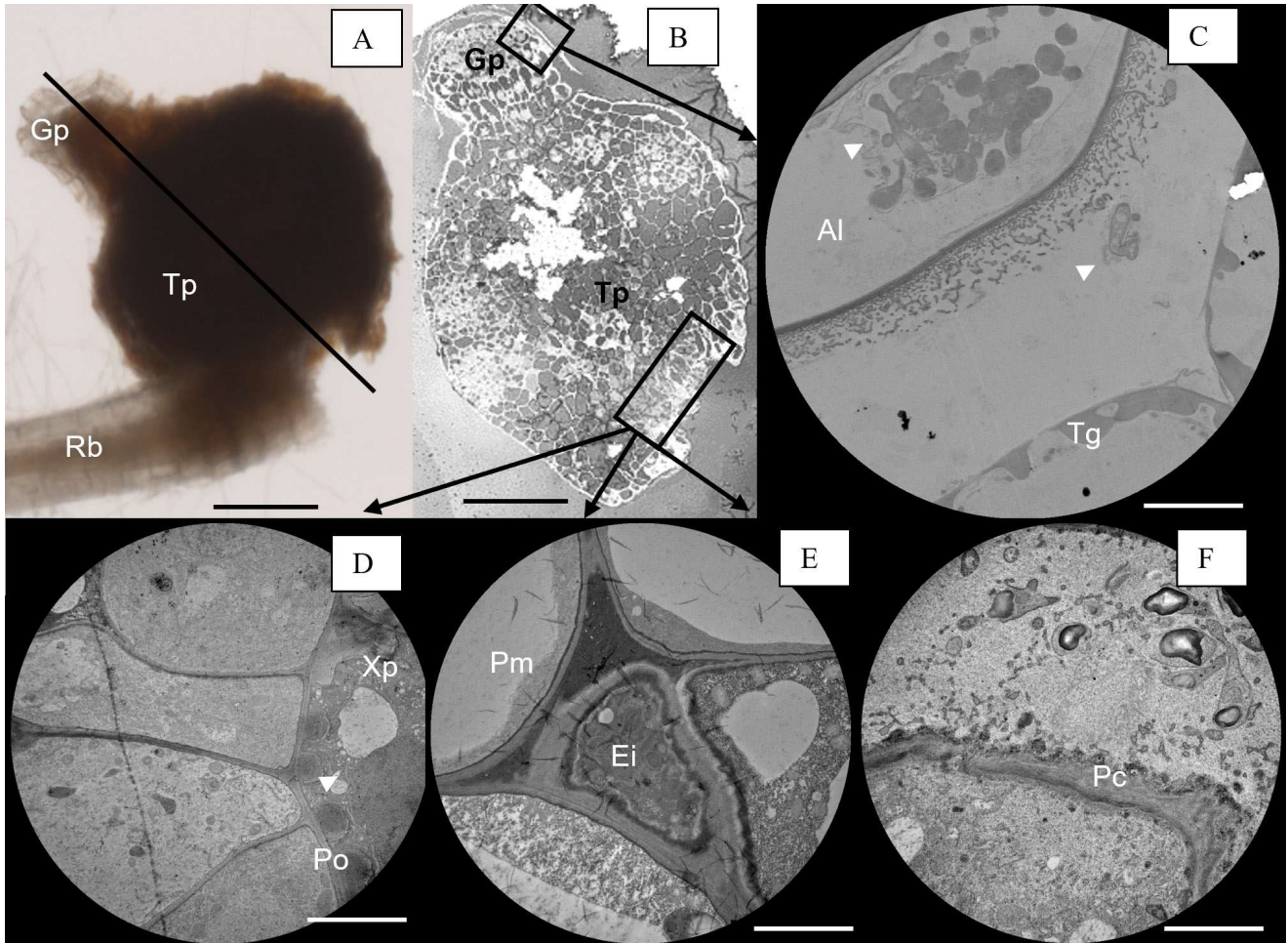


Planche 4 : aspect morphologique d'un jeune tubercule de *P. ramosa* fixé sur une racine de *B. napus* et en présence de la souche *F. oxysporum* 2108. (4A) Observation de l'échantillon entier à la loupe binoculaire avec axe de coupe indiqué, échelle = 100 µm. (4B) Coupe transversale d'un jeune tubercule de *P. ramosa* coloré au bleu de toluidine et observé en microscopie photonique montrant la taille importante du tubercule de *P. ramosa* comparé à la racine de *B. napus*, échelle = 100 µm. (4C) Détail du tégument de la graine de *P. ramosa* observé au MET. Notez la présence de spores fongiques (tête de flèche) dans les différents espaces, échelle = 10 µm. (4D) Détail de la zone de contact entre les cellules de *B. napus* et le xylème de *P. ramosa* rempli de matériel fongique (tête de flèche), échelle = 10 µm. (4E) Détail du parenchyme médullaire du tubercule de *P. ramosa*. Présence de matériel mycélien dans l'espace intercellulaire (Ei), échelle = 5 µm. (4F) Détail des cellules au niveau de l'haustorium. Notez la présence de grains d'amidon (Ga) consommés, échelle = 5 µm. Gp, graine de *P. ramosa* ; Tp, tubercule de *P. ramosa* ; Rb, racine de *B. napus* ; Al, albumen ; Tg, tégument ; Po, ponctuations ; Xp, xylème de *P. ramosa* ; Pm, parenchyme médullaire ; Ei, espace intercellulaire ; Ga, grains d'amidon ; Pc, parenchyme cortical.

2.4 Co-culture de *B. napus* et *P. ramosa* en présence de la souche *F. brachygibbosum* 7586

En présence de la souche 7586, le tubercule *P. ramosa* fixé à la racine de *B. napus* présente les mêmes structures que dans la modalité SIF (**Planche 5A** et 5B). Au niveau de l'haustorium, les tissus de *P. ramosa* et *B. napus* sont très denses aux électrons comparés à ceux observés dans la modalité SIF (**Planche 5B**). Les tissus sont bien différenciés avec le parenchyme (Cp) et l'haustorium (H) pour *P. ramosa*, et le xylème (X) pour *B. napus*. A l'interface haustorium – épiderme de *B. napus*, les cellules sont également écrasées, libérant ainsi les grains d'amidon (Ga), cependant les spores de microorganismes sont absentes (**Planche 5C**). C'est à la surface et à l'intérieur du tégument de la graine *P. ramosa* qu'on retrouve des spores fongiques (**Planche 5D**). Cependant, les cellules xylémiennes de *B. napus* au niveau de l'haustorium sont indemnes de microorganismes

2.5. Co-culture de *B. napus* et *P. ramosa* en présence de la souche *F. oxysporum* Fo47

Avec l'inoculation de Fo47, le tubercule *P. ramosa* fixé à la racine de *B. napus* présente les mêmes structures que dans la modalité SIF (**Planche 6A**). La zone de contact entre *B. napus* et *P. ramosa* révèle des tissus lignifiés comme dans la modalité avec inoculation de la souche 7586 (**Planche 6A**). Dans les cellules du parenchyme de *P. ramosa*, les grains d'amidon sont toujours abondants (**Planche 6B**). A l'inverse, au niveau de l'haustorium, les grains d'amidon sont détériorés comme en présence de la souche 2108 (**Planche 6C**). Les cellules conductrices du *B. napus* sont dépourvues de champignon (**Planche 6C**). Cependant, de nombreuses spores de microorganismes se retrouvent entre les tissus de *P. ramosa* et de *B. napus*, au niveau de la zone de pénétration des cellules de l'haustorium (**Planche 6D**). A la surface des cellules de l'épiderme de *B. napus* ainsi que des cellules du tubercule, les spores de champignons sont abondantes (**Planche 6E**).

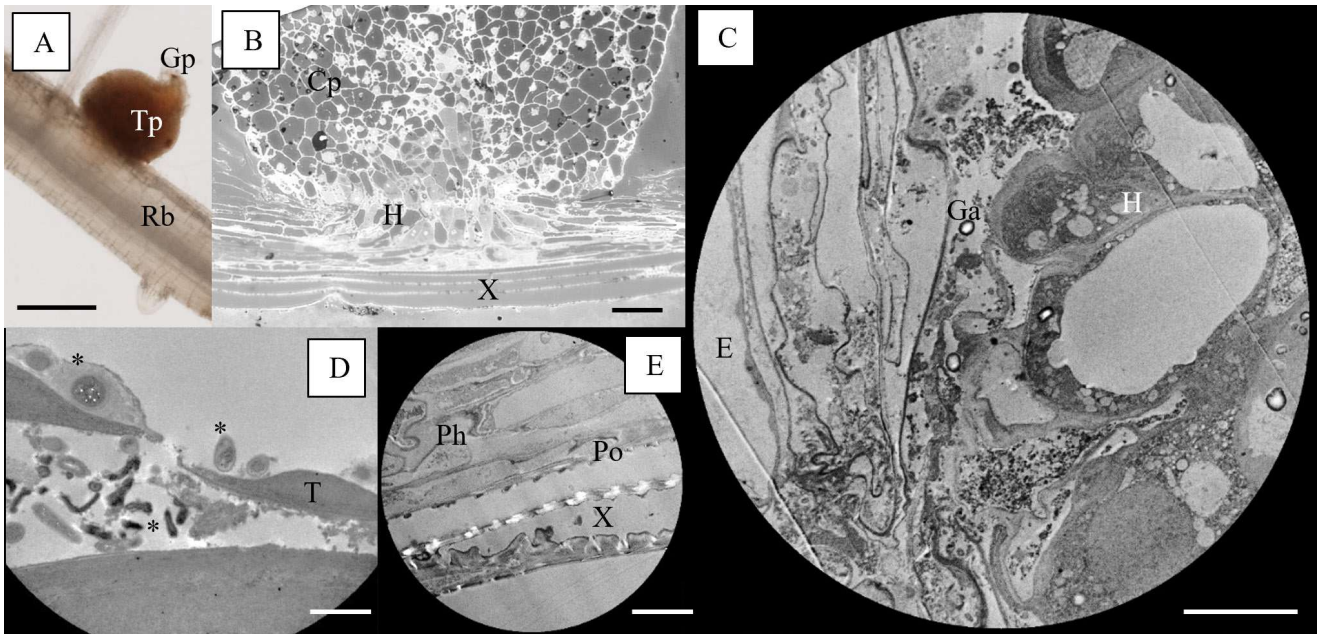


Planche 5 : aspect morphologique d'un jeune tubercule de *P. ramosa* fixé sur une racine de *B. napus* et en présence de la souche *F. brachygibbosum* 7586. (5A) Observation de l'échantillon entier à la loupe binoculaire, échelle = 200 µm. (5B) Coupe transversale d'un jeune tubercule de *P. ramosa* fixé sur une racine de *B. napus* observé au MET, échelle = 100 µm. (5C) Détail des cellules au niveau de l'haustorium. (E) ainsi que les grains d'amidon (Ga) libérés par cet écrasement, échelle = 10 µm. (5D) Détail du tégument de la graine de *P. ramosa*. Présence de nombreuses spores fongiques proches du tégument (*), échelle = 10 µm. (5E) Détail des tissus vasculaires de *B. napus* au niveau de l'haustorium, échelle = 2 µm.

Gp, graine de *P. ramosa*; Rc, racine *B. napus* ; Tp, tubercule de *P. ramosa*, Cp, cellule parenchymateuse ; H, cellules de l'haustorium ; Rb, racine de *B. napus* ; E, cellule de l'épiderme ; Ga, grains d'amidon ; Ph, cellules du phloème ; Po, ponctuations ; X, cellule du xylème,

DISCUSSION

1. Interprétation des observations sur les graines de *P. ramosa*

De façon globale, l'analyse microscopique des graines de *P. ramosa* issues du sol rhizosphérique et des hampes florales révèle les mêmes caractéristiques morphologiques que celles décrites par Plaza [44]. Le tégument des graines de *P. ramosa* se distingue par ses cellules polygonales marquées par des ponctuations plus ou moins visibles. En effet, ces cellules étant vidées de leur contenu, la paroi est affaissée et révèle ainsi les ponctuations ou éléments fibreux (microfibrilles de cellulose) qui la composent [10]. La déformation de

ces cellules montre que la graine se vide de ses réserves pour pouvoir germer ou que la graine est colonisée et son contenu consommé par des souches fongiques.

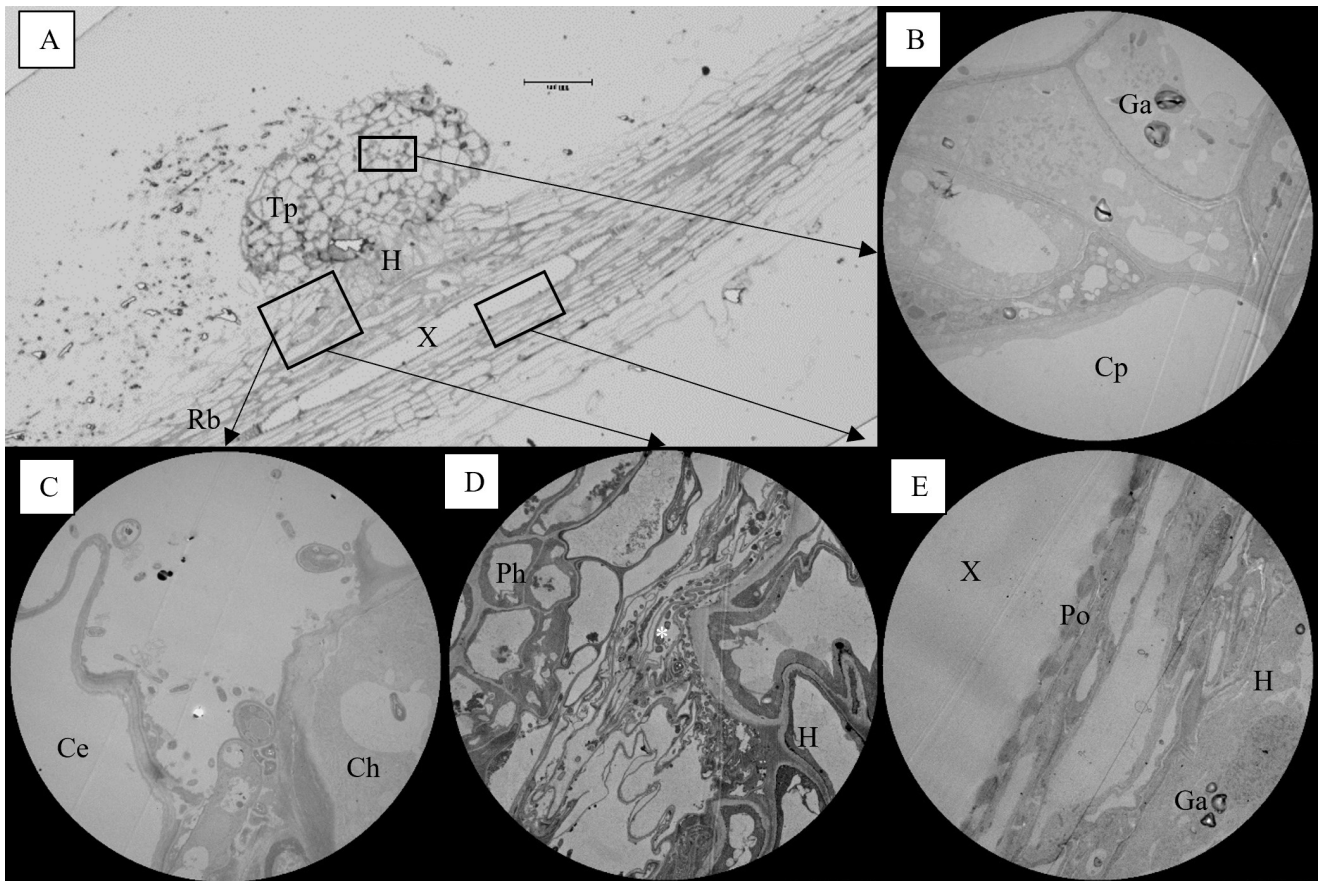


Planche 6 : aspect morphologique d'un jeune tubercule de *P. ramosa* fixé sur une racine de *B. napus* et en présence de la souche *F. oxysporum* Fo47. **(6A)** Coupe longitudinale d'un jeune tubercule de *P. ramosa* fixé sur une racine de *B. napus* et en présence de la souche Fo47 colorée au bleu de toluidine et observée au microscope photonique, échelle = 100 µm. **(6B)** Détail des cellules du parenchyme du tubercule de *P. ramosa*, échelle = 10 µm. **(6C)** Détail des cellules au niveau de l'haustorium et de la surface externe. Accolement des cellules de *P. ramosa* (O) sur l'épiderme de *B. napus* ainsi que l'abondance de spores fongiques (*), échelle = 5 µm. **(6D)** Détail des cellules au centre de l'haustorium. Présence de nombreuses spores fongiques le long des cellules (*), échelle = 10 µm. **(6E)** Détail des tissus vasculaires du colza au contact des cellules de l'haustorium. Présence de grains d'amidons (Ga), échelle = 10 µm. Rb, racine de *B. napus* ; Tp, tubercule de *P. ramosa* ; X, cellules du xylème ; Cp, cellule parenchymateuse ; Ga, grain d'amidon ; Ce, cellule épidermique ; Ch, cellule de l'haustorium ; Ph, cellules du phloème ; H, cellules de l'haustorium ; Ga, grains d'amidon ; H, cellules de l'haustorium ; Po, ponctuations ; X, cellule du xylème.

Les perforations dans le tégument de *P. ramosa* ont déjà été observées [10, 44, 45] mais ne sont pas expliquées. Chez la cuscute (*Cuscuta australis*), l'ouverture d'une fissure proche de la zone micropylaire indique la non-dormance d'une graine car elle agit comme détecteur de signaux environnementaux et permet la première entrée d'eau [46]. Les graines de *P. ramosa* connaissent des périodes de dormance [47], mais ne sont pas des graines physiquement dormantes comme celles de la famille de la Cuscute. C'est pourquoi ces perforations du tégument de *P. ramosa* au niveau du micropyle pourraient être un trait primitif restant des ancêtres communs entre *P. ramosa* et *C. australis*. L'entrée d'eau pour la germination chez *P. ramosa* se fait plus vraisemblablement au niveau du micropyle lorsque la graine est pré-conditionnée et a déjà accumulé suffisamment d'eau par son tégument [48]. Ces perforations représentent donc une entrée potentielle pour les filaments mycéliens des souches inoculées.

Les souches fongiques sont capables de coloniser la surface et l'intérieur du tégument des graines de *P. ramosa* [49]. Cette pénétration peut se faire par les perforations du tégument mais également par la dégradation de celui-ci. En effet, le genre *Fusarium* produit divers métabolites secondaires toxiques pour les plantes infectées [50, 51]. Certains métabolites ont pour effet l'alcalinisation extracellulaire des tissus de la plante attaquée [52]. L'alcalinisation est un mécanisme commun chez les hémibiotrophes comme *F. oxysporum* lors des premiers stades d'infection.

La stimulation de la germination des graines de *P. ramosa* semble faciliter leur colonisation par les souches fongiques. D'une part, une graine en germination exsude plus de métabolites qu'une graine en dormance et ces métabolites peuvent être, certes, répulsifs pour certains champignons [53] mais aussi attractifs pour d'autres susceptibles de coloniser la graine [54]. En effet, le micropyle s'ouvre suite à l'absorption d'eau au niveau du tégument et permet donc l'entrée d'eau au cœur de la graine (albumen) [48]. L'ouverture du micropyle représente ainsi une voie de pénétration potentielle pour les souches fongiques qui empêcheront la sortie du procaulôme et donc la germination. Même si la souche 2108 n'inhibe pas entièrement la germination, la graine et le procaulôme qu'elle émet sont très endommagés. L'action de

métabolites lytiques d'origine fongique peut en être la cause comme cela a été démontré dans le cas de *F. oxysporum* f. sp. *strigae* sur la plante parasite *Striga* [26]. En ce qui concerne les souches non inhibitrices de la germination, il est possible que les souches fongiques ne colonisent pas la graine de *P. ramosa* car elles n'ont pas l'arsenal enzymatique pour dégrader ou pénétrer efficacement le tégument de la graine mais elles interviennent après que la graine ait germé, ce qui aboutit *in fine* à un impact négatif sur la viabilité, équivalent à celui de la souche fortement inhibitrice de la germination des graines. Ainsi, la non-inhibition de la germination ne suffit pas à conclure à une non-pathogénicité des souches. Des tests de pathogénicité sur les autres stades de développement de *P. ramosa* seront nécessaires pour caractériser la pathogénicité d'une souche fongique. De plus, nous savons que de nombreuses graines ont des mécanismes de défenses enzymatiques (tels que la production de phénol oxydase) permettant de les protéger des champignons, décomposeurs ou pathogènes, du sol [55, 56]. Il est possible que les graines d'orobanche disposent également de systèmes répulsifs, constitutifs ou inductibles, pour se défendre, cependant, le complexe métabolique des graines *P. ramosa* n'a pas encore été étudié. Il faut également prendre en compte le stade phénologique du champignon quand il est au voisinage de la graine. Si la population fongique, même dense, est sous forme de chlamydospores, elle n'interagira pas avec la graine alors que des conidies pourront rapidement germer en réponse à des stimuli venant de la graine. La réponse sera encore plus rapide si l'inoculum fongique est sous forme mycélienne, à même de produire les enzymes lytiques nécessaires à son développement [57].

Nos résultats *in vitro* montrent que les graines de *P. ramosa* pourraient être une cible intéressante pour les souches fongiques. Cependant en condition *in vivo* dans le sol, les *Fusarium* peuvent avoir une plus grande diversité de sources trophiques et ne pas coloniser les graines de *P. ramosa* qui sont microscopiques (200 - 400 µm). En revanche, le développement de *P. ramosa* après le stade de germination peut représenter une source trophique plus intéressante ou plus facilement accessible (absence de tégument) pour les *Fusarium* du sol rhizosphérique.

2. Interprétation des observations relatives aux différentes interactions

2.1. Interaction entre *B. napus* et *P. ramosa*

La fixation des tubercules de *P. ramosa* se produit grâce à l'haustorium qui pénètre les différents tissus racinaires de *B. napus*. Cet organe spécialisé possède une structure particulière et importante puisqu'il est le pont anatomique et physiologique entre la plante hôte et la plante parasite [58]. Il est donc le lieu d'échange de diverses molécules (hormones, ARN, virus...) dans le pathosystème [59, 60]. L'haustorium montre un contact direct au niveau des vaisseaux conducteurs du xylème de *B. napus* et échangent divers éléments. Les tissus de l'haustorium s'insèrent dans le parenchyme cortical jusqu'au cylindre central afin d'atteindre les tissus vasculaires comme cela a déjà été observé pour *O. cumana*, chez qui, en outre, de nombreux plastes permettent de reconnaître la plante parasite ainsi que son stade de développement au niveau du phloème [61]. Dans le cas de *P. ramosa*, c'est au niveau du parenchyme qu'il y a une accumulation de réserve sous forme de grains d'amidon. Les grains d'amidon ont également été observés dans les stades pré-haustorium chez *S. hermonthica* et *P. aegyptiaca* [48]. Nous aurions probablement observé de nombreux grains d'amidon également si nous avions regardé les coupes histologiques des graines et du jeune haustorium de *P. ramosa*. Ces grains d'amidon jouent un rôle dans les réponses gravitropiques des jeunes plantules [62]. Aux stades plus développés, il est fort probable que *P. ramosa* accumule les grains d'amidon sous forme de réserve puis la plante parasite dépend exclusivement de *B. napus* et ne peut pas faire ses propres réserves. Ainsi, des réserves d'amidon sont accumulées dans les tissus dès les jeunes stades de *P. ramosa*. Nos observations ont aussi montré que les vaisseaux conducteurs qui permettent la circulation de la sève brute et élaborée forment un épaississement de la paroi des cellules à l'interface *P. ramosa* – *B. napus*. Cet épaississement est également un moyen pour *P. ramosa* de se protéger de pathogènes car la fixation de l'haustorium est un moment critique et vulnérable pour cette plante parasite qui dépend exclusivement de la plante hôte. Plusieurs mécanismes de défense existent pour la plante hôte : une barrière mécanique avec épaississement des

parois cellulaires, une réaction hypersensible avec nécrose au moment de la pénétration de l'haustorium dans l'endoderme et l'impossibilité pour la plante parasite de former des connexions vasculaires [63]. Cependant aucune de ces réactions n'a été observée dans nos expérimentations, ce qui confirme la sensibilité de la variété ES Imperio de *B. napus* à l'activité parasite de *P. ramosa*.

2.2. Interaction entre *B. napus* et *Fusarium* sp.

Toutes les souches fongiques n'ont pas colonisé *B. napus* malgré la forte proximité et le temps de développement suffisant (19 jours post-inoculation) comparé à d'autres études : 10 jours post-inoculation pour Pereira *et al.* [64]. Les spores fongiques se retrouvent uniquement à l'interface *P. ramosa* – *B. napus* mais n'ont pas pénétré les tissus de *B. napus*. Il est possible que la colonisation des *Fusarium* soit plus tardive car il a été montré que *Fusarium* sp. colonise les tissus de *B. napus*. L'analyse moléculaire de la diversité des champignons a révélé la présence de certaines espèces de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. albidum* SC) dans les racines de *B. napus* [38]. Le caractère endophyte et protecteur de *F. oxysporum* ou *F. tricinctum* a été mis en évidence dans certaines études [65] alors que *F. avenaceum* et *F. oxysporum* apparaissent dans la liste des agents potentiellement pathogènes de *B. napus* [65, 66]. Une colonisation progressive des tissus de *B. napus* était attendue, et notamment du parenchyme cortical comme cela a été observé sur la tomate et le sorgho [27, 67]. La présence de champignon dans le cylindre central n'a pas été observée ce qui concorde avec le caractère non pathogène des souches. La colonisation du cylindre central et donc des vaisseaux conducteurs est plus délicate car les parois des cellules sont lignifiées. Ce sont donc des souches pathogènes qui parviendront à coloniser cette partie des tissus de la plante hôte [68]. En effet, l'obstruction des vaisseaux conducteurs par des hyphes fongiques est le mode d'action des formes spéciales de *F. oxysporum* ou *F. culmorum* [69, 70]. Bien que le caractère endophyte attendu n'ait pas été mis en évidence dans notre expérimentation, aucun des symptômes typiques d'une infection fongique tels que le flétrissement, la chlorose et la nécrose n'ont été observés. Nous ne pouvons pas exclure que des molécules fongicides ou fongistatiques comme les glucosinolates, classiquement produites par

les *Brassicaceae*, aient limité la colonisation des racines de *B. napus* par les souches de *Fusarium* utilisées. Nos résultats nous permettent cependant d'affirmer que ces souches ne sont pas pathogènes de la plante hôte, *B. napus*. Par ailleurs, la variété ES Imperio utilisée dans les expérimentations est caractérisée comme « très peu sensible » à *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*), le principal agent phytopathogène du colza. Il est possible que les réactions de défense de la plante à cet agent pathogène puissent s'étendre au genre *Fusarium*. Cependant l'évolution de cette interaction dans le temps est à confirmer avec des observations plus tardives. Il est possible que les souches contournent cette barrière si elles colonisent *P. ramosa*, elles pourraient pénétrer dans les racines de *B. napus* en passant par l'haustorium.

2.3. Interaction entre *P. ramosa* et *Fusarium sp.*

La même diversité fonctionnelle que celle observée avec les quatre souches de *Fusarium* vis-à-vis des graines a été observée avec ces souches vis-à-vis du développement de *P. ramosa* dès 33 jours post-inoculation. Les souches ont un effet négatif ou positif sur le développement de *P. ramosa* ou *B. napus* 47 jours après inoculation. Cependant, au bout de 19 jours d'inoculation, les interactions au sein du pathosystème *P. ramosa*/*B. napus*/*Fusarium* sont déjà visibles. La souche 7619, qui n'avait pas d'impact sur les graines de *P. ramosa in vitro*, est celle qui réduit le plus le développement de *P. ramosa* et en contrepartie favorise *B. napus*. Cette différence d'efficacité de la souche fongique peut s'expliquer par les conditions d'expérimentation contrôlées en boîte de Petri (*in vitro*) ou semi-contrôlées en pot (chambre climatique). Une infestation entraînant une nécrose spécifique des jeunes stades de *P. ramosa* est vraisemblable puisque *B. napus* ne montre aucun signe d'infestation. Même si la colonisation des tissus de *P. ramosa* par la souche 7619 n'est pas observée en microscopie, la structure nécrosée des tubercules suggère une infestation ou une dégradation due à la souche. Ces résultats mettent en évidence la complexité de pouvoir pathogène d'une souche de *Fusarium* car des conditions particulières sont certainement requises pour l'expression de sa pathogénicité. L'espèce *F. solani* est un agent phytopathogène très répandu et impactant une large gamme de plantes cultivées (canne à sucre,

fenugrec, haricot, pois, tomate...) [71, 72]. L'existence de formes spéciales au sein de l'espèce *F. solani* relève d'une diversité phylogénétique se traduisant par une virulence variable selon les souches testées [73, 74]. Une souche de *F. solani* s'est révélée pathogène du pathovar tomate de *P. ramosa* en Italie [39]. Il est donc envisageable que la souche de *F. solani* que nous avons isolée possède des propriétés équivalentes et suscite une investigation plus poussée en vue de futures applications de biocontrôle.

En revanche, les souches 2108, Fo47 et 7586 sont capables de coloniser le tégument des graines de *P. ramosa* ainsi que les tissus du tubercule. Elles ont colonisé *P. ramosa* de manière plus ou moins abondante par une colonisation inter ou intracellulaire et de manière différente selon les souches. Le temps de développement de ces souches peut être mis en cause car la souche la moins colonisatrice est *F. brachygibbosum* 7586, qui sporule peu et se développe lentement, sur tous les milieux, par comparaison aux deux souches Fo47 et 2108. Ces trois souches semblent consommer les grains d'amidon de *P. ramosa* sans empêcher son développement. Il semblerait que cette carence en réserve glucidique qui en résulte chez *P. ramosa* accentue son activité parasitique et explique la croissance réduite de *B. napus*. Cet effet indirect des souches sur *B. napus* ne pourra être confirmé qu'avec une analyse microscopique des stades plus développés de *P. ramosa*.

L'effet direct des souches sur *P. ramosa* a pu être confirmé par la co-culture en chambre climatique et les observations microscopiques. La souche 7586 n'a pas montré d'effet négatif direct sur *P. ramosa* ni sur *B. napus* malgré un potentiel d'inhibition de germination observé précédemment. La faible virulence de *F. brachygibbosum* 7586 dans notre expérimentation concorde avec les résultats sur le blé de Özer *et al.* [75]. Malgré tout *F. brachygibbosum* est considéré comme un agent pathogène opportuniste en Europe [76]. Son efficacité sur les plantules de *P. ramosa* n'est pas concluante même si la souche a été isolée d'une hampe florale symptomatique. Son mode de pathogénicité peut dépendre de la condition physiologique de la plante (blessée ou stressée) ainsi que de la présence d'un consortium d'espèces comme cela a été montré pour la pathogénicité de plusieurs espèces de *Fusarium* sur *Cannabis sativa* [77].

Enfin les deux souches Fo47 et 2108 appartiennent à la même espèce, *F. oxysporum*, qui sporule abondamment sous forme de micro- et de macroconidies (spores de dissémination) et éventuellement de chlamydospores (spores de résistance). La souche 2108 qui a colonisé efficacement les tissus de *P. ramosa* semble non pathogène de ces tubercules. L'efficacité de cette souche sur les stades de tubercules est remise en cause car même si elle est présente, elle n'induit aucun symptôme ni baisse de développement à l'inverse de ce qu'a montré Boari et Vurro [39] sur l'*orobanche* de la tomate. La virulence très spécifique des souches de *F. oxysporum* est largement reconnue aujourd'hui [35]. Nos résultats suggèrent que la souche 2108 est pathogène d'un pathovar de *P. ramosa*. En revanche, la souche non pathogène Fo47 a eu un effet facilitateur pour le développement de *P. ramosa* au détriment de *B. napus*. Ce résultat est très surprenant. En effet, bien que la souche Fo47 soit reconnue pour son effet protecteur des plantes cultivées contre des champignons pathogènes [29, 78, 79, 80], cette même souche aurait un effet beaucoup moins intéressant dans la protection de *B. napus* quand elle interagit avec la plante parasite, *P. ramosa*. Il est donc vraisemblable que la souche non-pathogène Fo47 ne soit pas applicable comme agent de biocontrôle dans un pathosystème de type plante hôte/plante parasite. Même si elle ne semble pas avoir colonisé les deux plantes, cette souche peut agir par la production de métabolites à l'encontre de champignons pathogènes [79]. Il est également possible que Fo47 colonise *B. napus* plus tardivement ce qui réoriente les défenses de *B. napus* contre le champignon mais pas contre *P. ramosa*.

En résumé, dans le pathosystème, les interactions varient en fonction de l'espèce et de la souche fongique inoculée mais aussi en fonction du stade de développement des plantes. Toutes les souches ont pu pénétrer *P. ramosa* au moment de la formation de l'haustorium car c'est une zone vulnérable où l'on observe des spores. C'est pourquoi, une lignification des parois cellulaires au niveau de l'interface *B. napus* et *P. ramosa* est observée dans toutes les modalités. Dans notre pathosystème *P. ramosa/B. napus*, seule la souche *F. solani* 7619 semble être pathogène des jeunes *P. ramosa* et protectrice de *B. napus*. A l'inverse, la souche Fo47 semble avoir un effet facilitateur du développement de *P. ramosa* au détriment de *B. napus*. Cet effet positif sur

le développement de *P. ramosa* dans le pathosystème est encore à élucider. Enfin, les souches 2108 et 7586 ont tendance à agir comme Fo47. Il est possible que la pathogénicité des souches ait été bloquée par des mécanismes de défenses de la plante attaquée [80]. Ces mécanismes n'ont pas été observés à un seul temps d'observation, ce qui n'exclut pas que *P. ramosa* ait développé des réactions de défenses spécifiques contre les souches inoculées plus tardivement.

L'ensemble de ces résultats montre la complexité de la pathogénicité de souches de *Fusarium*. Une diversité fonctionnelle a été mise en évidence (inhibition de germination, colonisation tissulaire, activité nécrotique...) et permet de mieux caractériser l'activité pathogène des souches envers le pathosystème *P. ramosa*/*B. napus*. Il est nécessaire de poursuivre ces analyses de pathogénicité afin de cerner toutes les conditions de virulence les mieux adaptées pour les souches pathogènes. Nous n'avons pas pu isoler de souche qui soit véritablement pathogène du pathovar colza de *P. ramosa* de même que Gibot-Leclerc *et al.* [81] n'y sont pas parvenus pour le pathovar tabac de cette même plante et ce contrairement à Nzioki *et al.* [26] qui ont isolé une souche de *F. oxysporum* f. sp. *strigae*, pathogène spécifique de *Striga*. Pour une meilleure application au champ, l'ensemble de nos résultats indique qu'il faudra compter sur un ensemble de souches appartenant à plusieurs espèces de *Fusarium* ayant des modes d'actions complémentaires pour parvenir à réguler les différentes étapes et notamment les premiers stades du développement de *P. ramosa*. Ce consortium pourrait être indigène des sols cultivés et devra être stimulé par des pratiques culturales qui restent à définir. Il pourra aussi être constitué à façon, au laboratoire, sur la base des collections constituées et caractérisées pour les modes d'actions des isolats, produit et formulé en fonction des conditions environnementales locales pour être inoculé avec les graines des plantes hôtes à protéger. Aujourd'hui, plusieurs modes d'application sont possibles comme l'enrobage des graines de la plante cultivée. C'est une méthode d'inoculation fongique qui permet une diffusion constante des propagules fongiques dans le sol au moment du semis de *B. napus*.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les membres de la plateforme DimaCell pour leur aide dans la réalisation du travail de microscopie et d'imagerie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. HEIDE-JØRGENSEN H. *Parasitic flowering plants*. Brill, 2008. Consulté le: 15 décembre 2022. (En ligne). Disponible sur: <https://brill.com/display/title/15231>
2. TĚŠITEL J. Functional biology of parasitic plants: a review. *Plecevo*, 2016, **149** (1): 5–20, doi: [10.5091/plecevo.2016.1097](https://doi.org/10.5091/plecevo.2016.1097).
3. PRESS M.C. & PHOENIX G.K. Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytologist*, 2005, **166** (3): 737–751, doi: [10.1111/j.1469-8137.2005.01358.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01358.x).
4. PARKER C. Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest. Manag. Sci.*, 2009, **65** (5): 453–459, doi: [10.1002/ps.1713](https://doi.org/10.1002/ps.1713).
5. FERNÁNDEZ-APARICIO M, DELAVAUULT P. & TIMKO M.P. Management of Infection by Parasitic Weeds: A Review. *Plants*, 2020, **9** (9): 1184, doi: [10.3390/plants9091184](https://doi.org/10.3390/plants9091184).
6. RODENBURG J., DEMONT M., ZWART S.J., & BASTIAANS L. Parasitic weed incidence and related economic losses in rice in Africa. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2016, **235**: 306–317, doi: [10.1016/j.agee.2016.10.020](https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.10.020).
7. VIRTUE J., PRIDER J. & WILLIAMS A. Host range of branched broomrape (*Orobanche ramosa* subsp. *mutelii*) in South Australia. *Plant Protection Quarterly*, 2014, **29** (2): 46–54, doi: [10.3316/informit.592705999357949](https://doi.org/10.3316/informit.592705999357949)
8. SHI B. & ZHAO J. Recent progress on sunflower broomrape research in China. *OCL*, 2020, **27**: 30, doi: [10.1051/ocl/2020023](https://doi.org/10.1051/ocl/2020023).
9. BRAULT M., BETSOU F., JEUNE B., TUQUET C. & SALLE G. Variability of *Orobanche ramosa* populations in France as revealed by cross infestations and molecular markers. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, **61** (3): 272–280, doi: [10.1016/j.envexpbot.2007.06.009](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.06.009).
10. GIBOT-LECLERC S., SALLÉ G., REBOUD X. & MOREAU D. What are the traits of *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel that contribute to the success of its biological cycle on its host *Brassica napus* L.? *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 2012, **207** (7): 512–521, doi: [10.1016/j.flora.2012.06.011](https://doi.org/10.1016/j.flora.2012.06.011).

11. STOJANOVA B., DELOURME R., DUFFÉ P., DELAVAUT P. & SIMIER P. Genetic differentiation and host preference reveal non-exclusive host races in the generalist parasitic weed *Phelipanche ramosa*. *Weed Research*, 2019, **59** (2): 107-118, doi: [10.1111/wre.12353](https://doi.org/10.1111/wre.12353).
12. GRENZ J.H. & SAUERBORN J. Mechanisms limiting the geographical range of the parasitic weed *Orobanche crenata*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2007, **122** (3): 275-281, doi: [10.1016/j.agee.2007.01.014](https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.01.014).
13. DISCIGLIO G. *et al.* Effects of different methods to control the parasitic weed *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel in processing tomato crops. *Ital J Agronomy*, 2016, **11** (1): 39-46, doi: [10.4081/ija.2016.681](https://doi.org/10.4081/ija.2016.681).
14. FERNÁNDEZ-APARICIO M., REBOUD X. & GIBOT-LECLERC S. Broomrape Weeds. Underground Mechanisms of Parasitism and Associated Strategies for their Control: A Review. *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**:135, doi: [10.3389/fpls.2016.00135](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00135).
15. GABA S. *et al.* Response and effect traits of arable weeds in agro-ecosystems: a review of current knowledge. *Weed Research*, 2017, **57** (3):123-147, doi: [10.1111/wre.12245](https://doi.org/10.1111/wre.12245).
16. LAMICHHANE J.R., DACHBRODT-SAAAYDEH S., KUDSK P. & MESSÉAN A. Toward a Reduced Reliance on Conventional Pesticides in European Agriculture. *Plant Disease*, 2016, **100** (1): 10-24, doi: [10.1094/PDIS-05-15-0574-FE](https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0574-FE).
17. PETIT S., CORDEAU S., CHAUVEL B., BOHAN D., GUILLEMIN J.-P. & STEINBERG C. Biodiversity-based options for arable weed management. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 2018, **38**: 48, doi: [10.1007/s13593-018-0525-3](https://doi.org/10.1007/s13593-018-0525-3).
18. CARRY D., STEINBERG C. & GIBOT-LECLERC S. Main drivers of broomrape regulation. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 2021 **41**: 22, doi: [10.1007/s13593-021-00669-0](https://doi.org/10.1007/s13593-021-00669-0).
19. ZHANG R., VIVANCO J.M. & SHEN Q. The unseen rhizosphere root-soil-microbe interactions for crop production. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, **37**: 8-14, doi: [10.1016/j.mib.2017.03.008](https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.008).
20. MASTELING R., LOMBARD L., DE BOER W., RAAIJMAKERS J.M. & DINI-ANDREOTE F. Harnessing the microbiome to control plant parasitic weeds. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, **49**: 26-33, doi: [10.1016/j.mib.2019.09.006](https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.006).

21. LÓPEZ-RÁEZ J.A., BOUWMEESTER H. & POZO M.J. Communication in the Rhizosphere, a Target for Pest Management. In *Agroecology and Strategies for Climate Change*, E. Lichtfouse, Ed., Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, 109-133. doi: [10.1007/978-94-007-1905-7_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1905-7_5).
22. BASTAKOTI S., BELBASE S., MANANDHAR S. & ARJYAL C. *Trichoderma* species as Biocontrol Agent against Soil Borne Fungal Pathogens. *Nepal J Biotechnol*, 2017, **5** (1): 39-45, doi: [10.3126/njb.v5i1.18492](https://doi.org/10.3126/njb.v5i1.18492).
23. DAR M.H. & RESHI Z.A Vesicular Arbuscular Mycorrhizal (VAM) fungi- as a major biocontrol agent in modern sustainable agriculture system. *Russ. Agricult. Sci.*, 2017, **43** (2): 138-143, doi: [10.3103/S1068367417020057](https://doi.org/10.3103/S1068367417020057).
24. PATEL D. *et al.* Genome Sequence of the Biocontrol Agent *Coniothyrium minitans* Conio (IMI 134523). *MPMI*, 2021, **34** (2): 222-225, doi: [10.1094/MPMI-05-20-0124-A](https://doi.org/10.1094/MPMI-05-20-0124-A).
25. BARDIN M. & NICOT P. Microorganisms as Biocontrol Products. In *Extended Biocontrol*, X. Fauvergue, A. Rusch, M. Barret, M. Bardin, E. Jacquin-Joly, T. Malausa, et C. Lannou, Éd., Dordrecht: Springer Netherlands, 2022, 127-136. doi: [10.1007/978-94-024-2150-7_11](https://doi.org/10.1007/978-94-024-2150-7_11).
26. NZIOKI H.S. *et al.* *Striga* Biocontrol on a Toothpick: A Readily Deployable and Inexpensive Method for Smallholder Farmers. *Front. Plant Sci.*, 2016, 7:8 doi: [10.3389/fpls.2016.01121](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01121).
27. OLIVAIN C., HUMBERT C., NAHALKOVA J., FATEHI J., L'HARIDON F. & ALABOUVETTE C. Colonization of Tomato Root by Pathogenic and Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strains Inoculated Together and Separately into the Soil. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72** (2): 1523-1531, doi: [10.1128/AEM.72.2.1523-1531.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1523-1531.2006).
28. SRINIVAS C. *et al.* *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity- A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, **26** (7): 1315-1324, doi: [10.1016/j.sjbs.2019.06.002](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002).
29. AIMÉ S., ALABOUVETTE C., STEINBERG C. & OLIVAIN C. The Endophytic Strain *Fusarium oxysporum* Fo47: A Good Candidate for Priming the Defense Responses in Tomato Roots. *MPMI*, 2013, **26** (8): 918-926, doi: [10.1094/MPMI-12-12-0290-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0290-R).

30. MARTINUZ B., SCHOUTEN A. & SIKORA R.A. Systemically Induced Resistance and Microbial Competitive Exclusion: Implications on Biological Control. *Phytopathology*, 2012, **102** (3): 260-266, doi: [10.1094/PHYTO-04-11-0120](https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0120).
31. DE LAMO F.J. & TAKKEN F.L.W. Biocontrol by *Fusarium oxysporum* Using Endophyte-Mediated Resistance. *Front. Plant Sci.*, 2020, **11**: 37, doi: [10.3389/fpls.2020.00037](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00037).
32. DEAN R. *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2012, **13** (4): 414-30. doi: [10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x).
33. BAWA I. Management Strategies Of *Fusarium* Wilt Disease Of Tomato Incited By *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.): A Review. *International Journal of Advanced Academic Research*, 2016, **2** (5): 32-42.
34. MREMA E., SHIMELIS H., LAING M. & BUCHEYEKI T. Screening of sorghum genotypes for resistance to *Striga hermonthica* and *S. asiatica* and compatibility with *Fusarium oxysporum* f.sp. *strigae*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*, 2017, **67** (5): 395-404, doi: [10.1080/09064710.2017.1284892](https://doi.org/10.1080/09064710.2017.1284892).
35. EDEL-HERMANN V. & LECOMTE C. Current Status of *Fusarium oxysporum* *Formae Speciales* and Races. *Phytopathology*, 2019, **109** (4): 512-530, doi: [10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW](https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW).
36. MA L.-J. *et al.* *Fusarium* Pathogenomics. *Annu. Rev. Microbiol.* 2013, **67** (1): 399-416, doi: [10.1146/annurev-micro-092412-155650](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650).
37. LECOMTE C. *et al.* *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*: underestimated genetic diversity. *Eur J Plant Pathol*, 2016, **145** (2): 421-431, doi: [10.1007/s10658-016-0856-3](https://doi.org/10.1007/s10658-016-0856-3).
38. CARRY C. Analyse de la diversité taxonomique et fonctionnelle de champignons associés à l'orobanche rameuse, *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel, plante parasite du colza d'hiver, *Brassica napus* (L.). *Thèse de doctorat de l'Université Bourgogne Franche-Comté*, 2023, 258p.
39. BOARI A. & VURRO M. Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*). *Biological Control*, 2004, **30** (2): 212-219, doi: [10.1016/j.biocontrol.2003.12.003](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2003.12.003).

40. GIBOT-LECLERC S., CORBINEAU F., SALLÉ G. & CÔME D. Responsiveness of *Orobanche ramosa* L. Seeds to GR 24 as Related to Temperature, Oxygen Availability and Water Potential During Preconditioning and Subsequent Germination. *Plant Growth Regulation*, 2004, **43** (1): 63-71, doi: [10.1023/B:GROW.0000038242.77309.73](https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000038242.77309.73).
41. HÉRICHÉ M., ARNOULD C., WIPF D. & COURTY P.-E. New clearing protocol for tannic roots optical imaging. *Trends in Plant Science*, 2022, **27** (6): 616-617, doi: [10.1016/j.tplants.2021.08.015](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.015).
42. KURIHARA B., MIZUTA Y., SATO Y. & HIGASHIYAMA T. ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development*, 2015, **42** (23): 4168-4179, doi: [10.1242/dev.127613](https://doi.org/10.1242/dev.127613).
43. MUSIELAK T.J., SLANE D., LIEBIG C. & BAYER M. A Versatile Optical Clearing Protocol for Deep Tissue Imaging of Fluorescent Proteins in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE, 2016, **11** (8): e0161107, doi: [10.1371/journal.pone.0161107](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161107).
44. PLAZA L. Micromorphological Studies on Seeds of *Orobanche* Species from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands, and Their Systematic Significance. *Annals of Botany*, 2004, **94** (1): 167-178, doi: [10.1093/aob/mch124](https://doi.org/10.1093/aob/mch124).
45. AKBULUT M.K., AKÇIN Ö.E. & ŞENEL G. Anatomical and micromorphological properties of holoparasite *Orobanche gracilis* and *Orobanche fuliginosa* (*Orobanchaceae*) species. *Rend. Fis. Acc. Lincei*, 2016, **27**(3): 565-571, doi: [10.1007/s12210-016-0522-x](https://doi.org/10.1007/s12210-016-0522-x).
46. JAYASURIYA M.G.G., BASKIN J.M., GENEVE R.L., BASKIN C.C. & CHIEN C.-T. Physical Dormancy in Seeds of the Holoparasitic Angiosperm *Cuscuta australis* (*Convolvulaceae*, *Cuscutaceae*): Dormancy-breaking Requirements, Anatomy of the Water Gap and Sensitivity Cycling. *Annals of Botany*, 2008, **102** (1): 39-48, doi: [10.1093/aob/mcn064](https://doi.org/10.1093/aob/mcn064).
47. POINTURIER O., GIBOT-LECLERC S., LE CORRE V., REIBEL C., STRBIK F. & COLBACH N. Intraspecific seasonal variation of dormancy and mortality of *Phelipanche ramosa* seeds. *Weed Research*, 2019, 59: 407-418, doi: [10.1111/wre.12378](https://doi.org/10.1111/wre.12378)
48. JOEL D.M. *et al.* Seed ultrastructure and water absorption pathway of the root-parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* (*Orobanchaceae*). *Annals of Botany*, 2012, **109** (1): 181-195, doi: [10.1093/aob/mcr261](https://doi.org/10.1093/aob/mcr261).

49. THOMAS H. *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras*, a Potential Mycoherbicide, Parasitizes Seeds of *Orobanche cumana* (Sunflower Broomrape): a Cytological Study. *Annals of Botany*, 1999, **83** (4): 453–458, doi: [10.1006/anbo.1998.0847](https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0847).
50. CHEN B., MA R. & CHEN X.-L. Advances of Metabolomics in Fungal Pathogen–Plant Interactions. *Metabolites*, 2019, **9** (8): 169, doi: [10.3390/metabo9080169](https://doi.org/10.3390/metabo9080169).
51. PERINCHERRY I., LALAK-KANCZUGOWSKA J. & STEPIEN Ł. *Fusarium*–Produced Mycotoxins in Plant–Pathogen Interactions. *Toxins*, 2019, **11** (11): 664, doi: [10.3390/toxins11110664](https://doi.org/10.3390/toxins11110664).
52. MASACHIS S. *et al.* A fungal pathogen secretes plant alkalizing peptides to increase infection. *Nat Microbiol*, 2016, **1** (6): 16043, doi: [10.1038/nmicrobiol.2016.43](https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.43).
53. SCARAFONI A. *et al.* The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defence. *FEBS J*, 2013, **280** (6): 1443–1459, doi: [10.1111/febs.12140](https://doi.org/10.1111/febs.12140).
54. NELSON P.E., TOUSSOUN T.A. & COOK R.J., *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press, 1981, 457p.
55. FUERST E.P., JAMES M.S., POLLARD A.T. & OKUBARA P.A. Defense Enzyme Responses in Dormant Wild Oat and Wheat Caryopses Challenged with a Seed Decay Pathogen. *Front. Plant Sci.*, 2018, **8**: 2259, doi: [10.3389/fpls.2017.02259](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02259).
56. POLLARD A.T. Seeds vs fungi: an enzymatic battle in the soil seedbank. *Seed Science Research*, 2018, **28** (3): 197–214, doi: [10.1017/S0960258518000181](https://doi.org/10.1017/S0960258518000181).
57. CHANG I.F. *et al.* Disease reaction to *Fusarium avenaceum* and yield losses in narrow-leafed lupin lines. *Can. J. Plant Sci.*, 2014, **94** (7): 1211–1218, doi: [10.4141/cjps2013-243](https://doi.org/10.4141/cjps2013-243).
58. YOSHIDA S., CUI S., ICHIHASHI Y., & SHIRASU K. The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2016, **67** (1): 643–667, doi: [10.1146/annurev-arplant-043015-111702](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111702).
59. LEBLANC I., KIM G., & WESTWOOD J.H. RNA trafficking in parasitic plant systems, *Front. Plant Sci.*, 2012, **3**: 203, doi: [10.3389/fpls.2012.00203](https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00203).
60. SHAHID S. MicroRNAs from the parasitic plant *Cuscuta campestris* target host messenger RNAs. *Nature*, 2018, **553** (7686): 82–85, doi: [10.1038/nature25027](https://doi.org/10.1038/nature25027)

61. KRUPP A., HELLER A. & SPRING O. Development of phloem connection between the parasitic plant *Orobancha cumana* and its host sunflower. *Protoplasma*, 2019, **256** (5): 1385–1397, doi: [10.1007/s00709-019-01393-z](https://doi.org/10.1007/s00709-019-01393-z).
62. SONG K. *et al.* Early Starvation 1 Is a Functionally Conserved Protein Promoting Gravitropic Responses in Plants by Forming Starch Granules. *Front. Plant Sci.*, 2021, **12**: 628948, doi: [10.3389/fpls.2021.628948](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.628948).
63. KAVULUKO J. *et al.* GWAS provides biological insights into mechanisms of the parasitic plant (*Striga*) resistance in sorghum. *BMC Plant Biol.*, 2021, **21** (1): 392, doi: [10.1186/s12870-021-03155-7](https://doi.org/10.1186/s12870-021-03155-7).
64. PEREIRA A.C. *et al.* Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. *Trop. Plant Pathol.*, 2013, **38** (4) 323–328, doi: [10.1590/s1982-56762013005000022](https://doi.org/10.1590/s1982-56762013005000022).
65. ZHANG Q. *et al.* Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*, 2014, **72**: 98–108, doi: [10.1016/j.biocontrol.2014.02.018](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.018).
66. CHLEBEK D., PINSKI A., ŻUR J., MICHALSKA J. & HUPERT-KOCUREK K. Genome Mining and Evaluation of the Biocontrol Potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a New Endophyte of *Oilseed Rape* (*Brassica napus* L.) against Fungal Pathogens. *IJMS*, 2020, **21** (22): 8740, doi: [10.3390/ijms21228740](https://doi.org/10.3390/ijms21228740).
67. ELZEIN A., HELLER A., NDAMBIB., DE MOLM., KROSCHEL J. & CADISCH G. Cytological investigations on colonization of sorghum roots by the mycoherbicide *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* and its implications for *Striga* control using a seed treatment delivery system. *Biological Control*, 2010, **53** (3): 249–257, doi: [10.1016/j.biocontrol.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.02.002).
68. OLIVAIN C. & ALABOUVETTE C. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 1997, **137** (3): 481–494, doi: [10.1046/j.1469-8137.1997.00855.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00855.x).
69. CHAREST P.M., OUELLETTE G.B., BLAIS P. & CHAMBERLAND H. Irregular growth forms and cell wall modifications, polygalacturonase detection, and endocell formation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* infecting tomato plants, as studied ultrastructurally and cytochemically. *Mycol. Progress*, 2004, **3** (2): 137–150, doi: [10.1007/s11557-006-0084-x](https://doi.org/10.1007/s11557-006-0084-x).

70. JAROSZUK-ŚCISEŁ J., KUREK E., WINIARCZYK K., BATURO A. & ŁUKANOWSKI, A. Colonization of root tissues and protection against *Fusarium* wilt of rye (*Secale cereale*) by nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Biological Control*, 2008, **45** (3): 297–307, doi: [10.1016/j.biocontrol.2008.03.007](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.007).
71. KRIAA M., HAMMAMI I., SAHNOUN M., AZEBOU M.C., TRIKI M.A., & KAMMOUN R. Biocontrol of tomato plant diseases caused by *Fusarium solani* using a new isolated *Aspergillus tubingensis* CTM 507 glucose oxidase. *Comptes Rendus Biologies*, 2015 **338** (10): 666–677, doi: [10.1016/j.crv.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.crv.2015.05.007).
72. RAMTEKE P. Effect of resistance inducers on *in vitro* inhibition of mycelial growth and sporulation of *Fusarium solani* causing root rot of fenugreek. *PPQ*, 2019, **9** (1): 198–209, doi: [10.5943/ppq/9/1/18](https://doi.org/10.5943/ppq/9/1/18).
73. ŠIŠIĆ A. *et al.* The 'forma specialis' issue in *Fusarium*: A case study in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Nature Scientific Reports*, 2018, **8**: 1252, doi: [10.1038/s41598-018-19779-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-19779-z)
74. SUMMERELL A. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2019, **57** (1): 323–339, doi: [10.1146/annurev-phyto-082718-100204](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204).
75. ÖZER G., PAULITZ T.C., IMREN M., ALKAN M., MUMINJANOV H. & DABABAT A.A. Identity and Pathogenicity of Fungi Associated with Crown and Root Rot of Dryland Winter Wheat in Azerbaijan. *Plant Disease*, 2020, **104** (8): 2149–2157, doi: [10.1094/PDIS-08-19-1799-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1799-RE).
76. BRAGARD C. *et al.* Pest categorisation of *Fusarium brachygibbosum*. *EFSA Journal*, 2021, **19** (11): e06887, doi: [10.2903/j.efsa.2021.6887](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6887).
77. PUNJA Z.K., SCOTT C. & CHEN S. Root and crown rot pathogens causing wilt symptoms on field-grown marijuana (*Cannabis sativa* L.) plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2018, **40** (4): 528–541, doi: [10.1080/07060661.2018.1535470](https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1535470).
78. EDEL-HERMANN V., BRENOT S., GAUTHERON N., AIMÉ S., ALABOUVETTE C. & STEINBERG C. Ecological fitness of the biocontrol agent *Fusarium oxysporum* Fo47 in soil and its impact on the soil microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, **68** (1): 37–45, doi: [10.1111/j.1574-6941.2009.00656.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00656.x).
79. VELOSO J. *et al.* Modes of action of the protective strain Fo47 in controlling verticillium wilt of pepper. *Plant Pathol*, 2016, **65** (6): 997–1007, doi: [10.1111/ppa.12477](https://doi.org/10.1111/ppa.12477).

80. ZHANG J., CHEN J., JIA R., MA Q., ZONG Z. & WANG Y. Suppression of plant wilt diseases by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 combined with actinomycete strains. *Biocontrol Science and Technology*, 2018, **28** (6): 562-573, doi: [10.1080/09583157.2018.1468996](https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1468996).
81. GIBOT-LECLERC S. *et al.* Screening for potential mycoherbicides within the endophyte community of *Phelipanche ramosa* parasitizing tobacco. *FEMS Microbiology Ecology*, 2022, **98** (3): fiac024, doi: [10.1093/femsec/fiac024](https://doi.org/10.1093/femsec/fiac024).

